

蛇神经毒素的表达和鉴定

钱友存 沈雁 范春阳 胡太山 杨胜利 龚毅*

(中国科学院上海生命科学院生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 抽提中华眼镜蛇毒腺总 RNA,通过反转录 PCR 扩增 cobrotoxin cDNA,克隆并测序。该 cDNA 编码 83 个氨基酸,包括 21 个氨基酸的信号肽和 62 个氨基酸的成熟蛋白。该成熟蛋白的氨基酸序列和通过蛋白测序从台湾眼镜蛇鉴定的 Cobrotoxin 完全一致。PCR 扩增编码 Cobrotoxin 的 DNA,并亚克隆到表达载体 pMAL-P₂。此外,通过合成寡核苷酸片段,拼接成完整的 CM-11 基因,并将其克隆至 pMAL-P₂。经 IPTG 诱导,两种神经毒素基因在大肠杆菌中都得到高效的可溶性融合表达。表达产物通过 SDS-PAGE 和蛋白印迹杂交加以鉴定。表达的融合蛋白经过 Sepharose 6B-amylose 亲和色谱和 DEAE-Sepharose FF 离子交换色谱得到有效纯化。经 Xa 因子酶切后得到的两种重组神经毒素都具有小白鼠体内毒性。

关键词 神经毒素,融合表达,基因工程

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0312-04

蛇神经毒素广泛存在于眼镜蛇科和海蛇科。根据其作用靶位不同,可被分为两大类型,即突触前神经毒素和突触后神经毒素^[1]。突触前神经毒素阻断乙酰胆碱从突触前运动神经末梢的释放,而突触后神经毒素特异性地结合于突触后膜运动终板的尼古丁乙酰胆碱受体而阻断神经传导。突触后神经毒素又进一步分为短链神经毒素和长链神经毒素^[2]。短链神经毒素有 60~62 个氨基酸残基构成,含 4 对二硫键;长链神经毒素则由 70~74 个氨基酸残基构成,含 5 对二硫键。神经毒素富含二硫键的结构可作为研究蛋白质折叠、空间构象与功能关系的模型,根据其阻断神经传导过程的性质可开发出不成瘾的新型镇静药,用于镇痛、麻醉和戒毒^[3,4],表达和制备重组神经毒素是开展上述研究的基础。本文以眼镜蛇(*Naja naja atra*)神经毒素 Cobrotoxin 和眼镜王蛇(King cobra)神经毒素 CM11 为例,报道在大肠杆菌系统表达和鉴定重组神经毒素的技术方法。

1 材料和方法

1.1 材料

眼镜蛇产地为江西省,眼镜王蛇产地为广西省;焦碳酸二乙酯(DEPC),MOPS 为 AMRESCO 公司

产品;低熔点琼脂糖为 Sigma 公司产品;各种限制酶,IPTG,X-gal,pGEMT-vector,总 RNA 抽提试剂盒,M-MLV 反转录酶均购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶为加拿大 AGCT 公司产品;其它产品为国产分析纯。

1.2 蛇毒腺总 RNA 的抽提

总 RNA 的抽提方法参照 Promega 总 RNA 抽提试剂盒产品说明。总 RNA 的质量和浓度通过甲醛变性电泳和紫外分光法检测。

1.3 RT-PCR 条件和 cDNA 克隆

2 μ g 总 RNA 模板和 30ng oligo(dT)₂₅ 反向引物混合,加 DEPC 处理过的水至总体积 15 μ L,70 $^{\circ}$ C 5min 破坏 RNA 模板中的二级结构,迅速置于冰上,加 5 \times RT 缓冲液,0.5mmol/L dNTP,20u RNA 酶抑制剂和 200u M-MLV 反转录酶,再加水至总体积 25 μ L,42 $^{\circ}$ C 温育 1h,95 $^{\circ}$ C 5min 灭活反转录酶,以反转录产物为模板,以设计的引物进行 PCR 反应。35 个循环之后,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物克隆于 pGEMT 载体。在 ABI373 荧光自动测序仪上测定克隆的 cDNA 序列。

1.4 寡聚核苷酸片段拼接

根据蛋白质序列设计合成寡聚核苷酸片段,将

收稿日期:1999-04-19,修回日期:2000-01-03。

基金项目:中国科学院九五重大项目资助(KY95/A1-301-02)。

* 通讯作者。

对应的寡聚核苷酸片段分别溶解于退火缓冲液中,浓度约为 26pmol/ μ L,然后等体积混合后通过缓慢降温退火。在用 T4 激酶在寡聚核苷酸片段 5'端加上磷酸基团后,将所有寡聚核苷酸片段混合,用 T4 DNA 连接酶连接,插入载体 pUC19,用琼脂糖凝胶电泳, DNA 序列测定验证。

1.5 重组蛋白印迹杂交

蛋白印迹法参照文献 [5]。眼镜蛇神经毒素抗血清由台湾高雄医学院 Chang Long-Sen 教授赠送。

2 结 果

2.1 Cobrotoxin 和 CM11 基因的克隆

Cobrotoxin 和 CM11 的天然蛋白质序列已有报道^[6,7]。制备重组 Cobrotoxin 和 CM11 的基础是获得其基因。Cobrotoxin 基因采用 RT-PCR 技术克隆。比较分析眼镜蛇科神经毒素 cDNA 序列发现这些序列的 5'端和 3'端以及信号肽编码区比较保守,据此合成 PCR 引物 [NU1]: 5'-AGAT-GAAAAGTCTG(C/T)TGCTG(A/T)CCTTGG-3'; [NU2]: 5'-GGATGGTCCATGAT(T/G)GAC(T/G)GAGAGCAA-3'用于扩增眼镜蛇神经毒素基因。

用于 RT-PCR 扩增的眼镜蛇总 RNA 经 1% 甲醛变性琼脂糖电泳分析验证, 18S 和 28S 两条 rRNA 条带清晰完整。紫外分光检测结果显 $A_{260/280} = 1.8$, $A_{260/230} = 2.0$, 浓度约为 0.9 μ g/ μ L, 表明 mRNA 的质量和浓度满足反转录的要求。

RT-PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在 300bp 位置有特异的 DNA 条带, 与预测的该神经毒素 cDNA 大小基本一致。PCR 产物经低熔点琼脂糖回收后直接连接于 pGEMT-vector, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选有插入片段的重组子并测定插入片段的 DNA 序列, 共获得 10 种不同的插入片段, 其中一个全长 280bp 片段所推导的氨基酸序列含有 83 个氨基酸, 包含 21 个氨基酸的信号肽和 62 个氨基酸的成熟蛋白(Fig. 1A)。该成熟蛋白的氨基酸序列和蛋白分离鉴定的 Cobrotoxin 一致。可认定这一插入片段为 Cobrotoxin 基因。根据得到的 Cobrotoxin 基因设计正向和反向两条引物用 PCR 特定地扩增出编码成熟蛋白的 DNA 片段, 并在其 5'和 3'端加上 *Eco*RI 和 *Pst*I 位点。作为插入表达载体的连接位点。

CM11 基因通过设计, 拼接合成寡聚核苷酸片段克隆。根据 CM11 蛋白的氨基酸序列, 按大肠杆菌偏爱的密码子设计并化学合成 12 条寡聚核苷酸

片段, 长度从 37 到 41 个碱基不等, 这些寡聚核苷酸片段是两两互补配对的, 经连接后形成一完整基因, 并且在两端分别加上了 *Eco*RI 和 *Hind*III 位点, 作为插入表达载体的连接位点(Fig. 1B)。

[A]

```
AGATGAAAAGTCTGCTGCTGCTTGGTGGTGGTGAACAATCGTGTGCCTGGACTTAGGAT 60
ACACCCCTGGAATGTCAACCAACAATCATCGCAAACCTCAACACTACAGGTTGTTGAG 120
GTGGGGACAGCAATGCTATAAAAAAGCGTTGGCGTGATCACCCTGGATATAGAACCAGAGA 180
GGGGATGTGTTGCCCTTCAGTGAAGAACCGCATTGAATAACTGTTGCACAACAGACA 240
GATGCAACAATAGCTCTACGAATGGCTAAATTCGTTGAG 280
```

[B]

```
AATTTCATGACCAAGTGTACCTTACTCCAGACGTTAAG TCTGAAACTTGT
GTACTGGTTCACAATGCAATGAGGTTGCAATTCAGACTT TGAACA
```

```
CCAGCTGGTCAAGACATCTGTTACTACT GAAACTGGTGTGACGCTTGGTGT
GGTGCACCAGTTCTGTAGACAATGTGACTTTGA ACCCACTCGGAACCA
```

```
ACTTCTCGTGTAG CCGTGTAACTGGGTTGTGCTGCTACTTGTCCAATC
TGAAGAGCACCATTCCGACAA TTGGACCAACACGACGATGAACAGGTTAG
```

```
GTT AAGCCAGGTTGTAATCAAGTGTGTTCTACCGA CAACTGTAACCCA
CAATTCGGT CCACAACCTTATGTCACAACAAGATGGCTGTGTAC ATTGGGT
```

```
TTCCCAACTCGTAAGCGTCCATGATA 3'
AAGGGTTGAGCATTCCGAGGTAATTCGA
```

图 1 (A) Cobrotoxin 的 mRNA 序列
(B) CM11 基因的序列

Fig.1 (A) The mRNA sequence of the cobrotoxin

(B) The sequences of the CM11 gene

The starting cordon(ATG) and the terminating cordon(TAG) or (TGA) are double underlined. The right end marks the positions of the nucleotides. The plus and minus primers are underlined.

2.2 重组 Cobrotoxin 和 CM11 蛋白的表达

Cobrotoxin 和 CM11 均为富含二硫键的小分子量蛋白, 在大肠杆菌内直接表达一不够稳定, 二形成无活性的包涵体。为得到有生物活性的重组蛋白, 选用了大肠杆菌融合表达系统表达 Cobrotoxin 和 CM11 基因。

2.2.1 基因工程菌的构建和最适培养条件: 表达载体选用质粒 pMAL-P₂, pMAL-P₂ 含有 Tac 启动子, 麦芽糖结合蛋白基因, *Lac*I 等基因表达元件, 麦芽糖结合蛋白基因下游为多克隆位点。经 PCR 扩增的编码 Cobrotoxin 成熟蛋白的 DNA 片段插入 *Eco*RI-*Pst*I 位点, 得到 Cobrotoxin 融合表达质粒 pMAL-CBT, 经拼接得到的 CM11 基因的片段插入 *Eco*RI-*Hind*III 位点, 得到 CM11 融合表达质粒 pMAL-CM11。pMAL-CBT 和 pMAL-CM11 分别转化大肠杆菌宿主 BL21, 得到表达 Cobrotoxin 和 CM11 融合蛋白的基因工程菌 BL21(CBT) 和 BL21(CM11)。经过对培养时间, 诱导时刻, 温度, 通气量等条件的摸索, 基因工程菌最适培养条件为: 接种单菌落到 LB 培养基中(含 100 μ g/mL Ap), 37 $^{\circ}$ C, 18h。

250 r/min 培养过夜,取该培养物转接到 100 倍体积的 LB 培养基中(含 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ Ap), 37°C 250 r/min 培养 2h,加入 IPTG 至终浓度为 $0.5\text{mmol}/\text{L}$ 诱导,继续培养 3h 后离心收获菌体。SDS-PAGE 电泳分析表明在此条件下 CM11 和 Cobrotoxin 融合蛋白表达量占菌体总蛋白的 30% 以上(Fig. 2 and Fig. 3)。

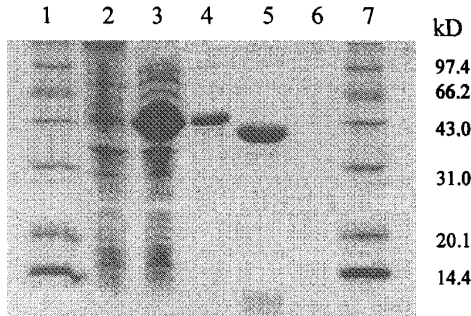


图 2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测重组 Cobrotoxin 的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant cobrotoxin

2. The uninduced control; 3~4. The expressed and purified fusion proteins 5. The digested purified fusion by factor X_a ; 6. The natural α -bungarotoxin (purchased from Sigma, c.); 7. Protein molecular weight markers in kD 97.4, 66.2, 43.0, 31.0, 20.1 and 14.4

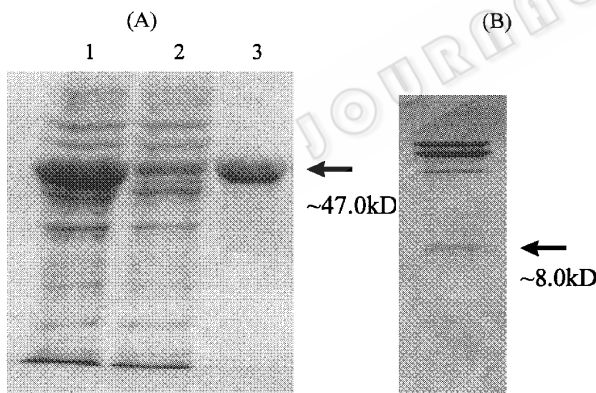


图 3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测重组 CM11 的表达

Fig. 3 SDS-PAGE of the recombinant CM11

(A) Expressed and purified fusion protein of CM11. 1. The expressed fusion protein 2. The supernatant after absorption by affinity column 3. The purified fusion protein. (B) The digested products of the purified fusion protein by X_a factor. The molecular weights of the fusion protein and the recombinant CM11 are marked.

2.2.2 融合蛋白的纯化工艺: 将离心收获菌体重悬于 TE 缓冲液中($50\text{mmol}/\text{L}$ Tris, $\text{pH}7.6$, $1\text{mmol}/\text{L}$ EDTA),在冰浴中用超声波发生仪进行超声破壁。 $12000g$, 10min 4°C 高速离心后对菌体裂解液的可溶部分和不可溶部分进行 SDS-PAGE 电泳分

析,表明融合蛋白 90% 以上存在于可溶部分。可直接通过层析技术分离纯化。离子交换层析采用 DEAE-SepharoseFF 柱。起始缓冲液为 $50\text{mmol}/\text{L}$ Tris.HCl, $\text{pH}8.7$ 。上样后用 $0\sim 0.5\text{mmol}/\text{L}$ NaCl 梯度洗脱。CM11 和 Cobrotoxin 融合蛋白在 $0.16\text{mmol}/\text{L}$ NaCl 浓度时被洗脱。亲和层析采用 Sepharose 6B-amylose 柱,亲和树脂制备参照文献 [8],起始缓冲液为 $50\text{mmol}/\text{L}$ Tris.HCl, $\text{pH}7.2$ 。上样后用 $10\text{mmol}/\text{L}$ Maltose 洗脱。收集的融合蛋白经电泳扫描表明纯度为 90% 以上。用 Factor X_a 酶切融合蛋白,得到 Cobrotoxin (Fig. 2)和 CM11 (Fig. 3)。

2.3 重组 Cobrotoxin 和 CM11 蛋白的鉴定和活性测定

为了确定目的蛋白 Cobrotoxin 得到正确的表达,我们对重组蛋白进行 Western blot 鉴定。为进一步了解重组蛋白的空间构象折叠的正确性,我们进行了重组蛋白 Cobrotoxin 和 CM11 在小白鼠体内毒性的初步试验。

2.3.1 重组 Cobrotoxin 融合蛋白 Western blotting 印迹分析: 为了验证表达的融合蛋白的正确性,我们对纯化的融合蛋白进行蛋白印迹分析,并以自身麦芽糖结合蛋白作为阴性对照,结果表明表达的融合蛋白有特异性杂交条带 (Fig. 4)。

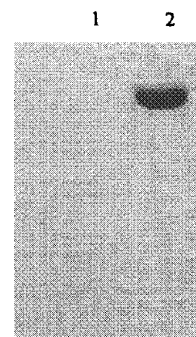


图 4 重组 Cobrotoxin 的免疫印迹分析

Fig. 4 Western blotting of the recombinant cobrotoxin

1. The negative control of the purified maltose binding protein 2. The purified fusion protein of cobrotoxin by sepharose 6B-amylose affinity chromatography. The antisera was prepared against the natural cobrotoxin.

2.3.2 小鼠体内神经毒活性测定: 体重 $20\pm 2g$ 小白鼠分为 5 组,每组 4 只(雌雄各半),按不同剂量进行皮下注射(Cobrotoxin)和腹腔注射(CM11)经 X_a 因子酶切的重组神经毒素融合蛋白,在 24h 内观察死亡情况。另外,取两只(雌雄各一)作麦芽糖结合蛋白阴性对照。

表 1 重组 Cobrotoxin 的小鼠体内神经毒活性测定

Table 1 The *in vivo* toxicity of the recombinant cobrotoxin in mice

Group classification	1	2	3	4	5	Control
Fusion protein/ μg	14	28	42	56	70	500 μg
Recombinant cobrotoxin/ μg	2	4	6	8	10	0
Number of death	0	0	2	4	4	0

表 2 重组 CM11 的小鼠体内神经毒活性测定

Table 2 The *in vivo* toxicity of the recombinant CM11 in mice

Group classification	1	2	3	4	5
Fusion protein/ μg	427	855	1760	427	855
Recombinant CM11/ μg	35	70	140	0	0
Number of death	0	3	4	0	0

3 讨论

我们得到的重组 Cobrotoxin 和 CM11 在小白鼠体内的神经毒活性分别约为文献报道的天然蛋白活

性的 1/3 和 1/10 (Table 1, 2)。该重组蛋白未经复性处理,有可能存在部分蛋白空间构象不完全正确而导致活性下降。眼镜蛇神经毒素(Cobrotoxin)是短链神经毒素的典型代表,是研究蛋白多肽的结构与功能的极好材料。尽管已经通过化学修饰法对其进行了一些结构与功能的研究^[9,10],但在某些情况下,修饰试剂的插入可能会产生空间结构的障碍而影响数据的可靠性。天然眼镜王蛇神经毒素 CM11 的毒理学、药理学研究证实它具有较强的止痛、麻醉及戒毒功效,可以开发成为一种新型的镇痛和戒毒药。但眼镜王蛇是国家二类保护动物,蛇毒来源受到限制。且 CM11 在蛇毒中含量少,不易分离纯化出单一组分。用基因工程技术制备 CM11 可解决这些问题。本文研究结果为对蛋白质折叠、空间构象与功能关系研究和新型的镇痛和戒毒药的研制奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Tu A T. Overview of Snake Venom Chemistry, In: Natural Toxin 2: Structure, Mechanism of Action and Detection. Singh B R, Tu A T ed. New York: Plenum Press, 1996, 391: 37~62
- [2] Endo T, Tamiya N. Structure-function Relationships of Postsynaptic Neurotoxins from Snake Venoms, in Snake Toxins. Harvey A L, ed. New York: Pergamon Press, 1991, pp. 165~222
- [3] Chen R Z, Robinson S E. *Life Sci*, 1990, 47: 1949~1954
- [4] Pu X C, Wong P T, Gopalakrishnakone P. *Toxicon*, 1995, 33: 1425~1431
- [5] 金冬雁等译. 分子克隆实验指南, 第二版. 北京: 科学出版社, 1992, pp. 888~889
- [6] Yang C C, Yang H J, Huang J S. *Biochim Biochem Acta*, 1969, 188: 65~77
- [7] 庞玉玺, 刘卫东, 刘爱琢, 裴奉奎. *生物化学与生物物理学报*, 1997, 29: 503~509
- [8] Krovciarski Y. *J Chromatography*, 1993, 633: 273~280
- [9] Chang C C, Kawaya Y, Sakiyama F. *Eur J Biochem*, 1990, 193: 567~572
- [10] Chang L S, Lin S R, Chang C C. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 358: 164~170

Expression and Characterization of Two Kinds of Recombinant Snake Neurotoxins

QIAN You-Cun SHEN Yan FAN Chun-Yang HU Tai-Shan YANG Sheng-Li GONG Yi*

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract The cDNA encoding the precursor of cobrotoxin was cloned from the venom gland of the Chinese continental cobra (*Naja naja atra*) by RT-PCR. Its deduced amino acid sequence analysis showed that the mature protein was identical to that identified from the Taiwan cobra (*Naja naja atra*) by protein sequencing technique. The cDNA encoding the mature protein was then subcloned into the expression vector pMAL-P₂. The gene of CM11, which was formed by ligation of the fragments of the synthetic oligonucleotides, was also cloned into the expression vector pMAL-P₂. After induction of IPTG both of the neurotoxins were overexpressed as soluble fusion proteins which were confirmed by SDS-PAGE and western blotting. The expressed fusion proteins was purified by sepharose 6B-amylose affinity chromatography and DEAE-sepharose FF chromatography. Both of the recombinant proteins achieved after digestion by factor Xa showed the *in vivo* toxicity.

Key words Neurotoxin, fusion expression, genetic engineering ©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>