

间斑寇蛛卵粒毒素-VI的基因克隆、异源表达与活性鉴定

颜帅, 唐小超, 余典梅, 王海燕, 孟雯雯, 唐萍萍, 王贤纯

湖南师范大学 生命科学学院蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081

颜帅, 唐小超, 余典梅, 等. 间斑寇蛛卵粒毒素-VI的基因克隆、异源表达与活性鉴定. 生物工程学报, 2021, 37(2): 635-645.
Yan S, Tang XC, Yu DM, et al. Gene cloning, heterologous expression and activity identification of latroeggtxin-VI. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 635-645.

摘要: 间斑寇蛛 *Latrodectus tredecimguttatus* 的一个显著特点是其毒腺外组织甚至卵粒中也存在毒性成分。研究毒腺外的毒素不但可以加深对蜘蛛毒素的了解, 而且可以发现具有重要应用前景的新型毒素分子。为了探究间斑寇蛛卵粒中低丰度表达的蛋白质类毒素, 利用生物信息学方法从间斑寇蛛卵粒转录组中挖掘出一条编码多肽毒素的基因序列, 利用基于 3'-RACE 和巢式 PCR 的策略成功克隆并异源表达了该基因。表达的多肽毒素命名为间斑寇蛛卵粒毒素-VI (Latroeggtxin-VI, LETX-VI)。生物学活性鉴定结果表明, LETX-VI 能抑制 ND7/23 细胞膜上的钠离子通道电流和促进 PC12 细胞多巴胺的释放, 但对美洲蜚蠊 *Periplaneta americana* 和金黄色葡萄球菌及白色念珠菌等细菌和真菌不显示明显的毒性, 说明 LETX-VI 是一种哺乳动物特异的神经毒素, 在神经生物学研究工具试剂和相关疾病治疗药物的研发等方面具有潜在的应用前景。

关键词: 黑寡妇蜘蛛, 卵粒毒素, 多肽, cDNA 末端快速扩增, 巢式 PCR, 生物学活性

Gene cloning, heterologous expression and activity identification of latroeggtxin-VI

Shuai Yan, Xiaochao Tang, Dianmei Yu, Haiyan Wang, Wenwen Meng, Pingping Tang, and Xianchun Wang

Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China

Abstract: One of the distinct characters of *Latrodectus tredecimguttatus* is that its toxic components exist not only in the venomous glands, but also in the tissues outside the venomous glands and even in the eggs. Investigation on the toxins outside the venomous glands can deepen our understanding of spider toxins and discover new lead molecules with important application prospects. In order to explore the low-abundance proteinaceous toxins in the *L. tredecimguttatus* eggs, we used

Received: May 1, 2020; Accepted: July 24, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31870770, 31070770), the Crosswise Project (No. 53122-1371).

Corresponding author: Xianchun Wang. Tel: +86-731-88872556; E-mail: wangxc@hunnu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31870770, 31070770), 横向课题 (No. 53122-1371) 资助。

bioinformatic strategies to mine a gene sequence encoding a peptide toxin from the transcriptome of *L. tredecimguttatus* eggs, and then heterologously expressed the gene successfully with a 3'-RACE combined with nest PCR strategy. Biological activity analyses indicated that the expressed peptide toxin, named latroeggtxin-VI (LETX-VI), could inhibit Na⁺ channel currents in ND7/23 cells and promote dopamine release from PC12 cells, without obvious toxicity against *Periplaneta americana* and bacteria as well as fungi including *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, demonstrating that LETX-VI is a mammal-specific neurotoxin with a potential application prospect in development of the tool reagents for neurobiological study and the drugs for treating related diseases.

Keywords: black widow spider, latroeggtxin, peptide, rapid-amplification of cDNA ends, nest PCR, biological activity

有毒动物的毒腺毒液富含多种活性成分,是捕猎和自卫的有效武器。由于其中的许多活性成分在神经生物学研究工具试剂和临床药物开发等方面具有重要的应用前景而引起了相关科学工作者的浓厚兴趣^[1]。间斑寇蛛 *Latrodectus tredecimguttatus* 俗称“黑寡妇”蜘蛛,是目前发现的毒性最强的有毒蜘蛛之一。其毒腺毒液代表性蛋白质类毒素成分黑寡妇蜘蛛毒素 (Latrotoxins) 尤其是 α -黑寡妇蜘蛛毒素 (α -latrotoxin) 的研究极大地加深了我们对神经递质释放及其调节机制的了解^[2]。奇特的是,间斑寇蛛与其他有毒动物不同,其毒素不仅存在于毒腺之中,而且存在于成蛛的其他组织器官之中,甚至存在于初生幼蛛和卵粒之中^[3-5]。利用多种生理、生化方法分析间斑寇蛛卵粒提取物的组成和性质时发现,其中高分子量蛋白质和分子量<5 kDa的多肽居多,显示明显的哺乳动物和昆虫神经毒性及多种水解酶活性^[6-7]。Li 等^[7-8]利用蛋白质组学的方法分析了卵粒的蛋白质成分。凝胶电泳分离结果显示,卵粒的蛋白质成分主要分布在 34 kDa 附近以及大于 55 kDa 的区域,在 60 kDa 和 130 kDa 附近存在高丰度蛋白质。从卵粒提取物中鉴定到了 157 种蛋白质,它们涉及多种生理生化过程,包括催化、转运、代谢调控等。通过对比发现,卵粒提取物与毒腺毒液的蛋白质组成差异很大,提示卵粒具有不同于毒腺毒液的毒性基础和机制。

我们综合利用多种实验技术从间斑寇蛛卵粒中分离出 4 种蛋白质类毒素,依次命名为间斑寇蛛卵粒毒素-I (Latroeggtxin-I, LETX-I) 至间

斑寇蛛卵粒毒素-IV (LETX-IV),并对它们的结构和性质做了较为系统的分析。LETX-I 和 LETX-II 被证明为神经毒素^[9-10],LETX-III 是一种昆虫特异的毒素而 LETX-IV 是一种抗菌肽^[11]。为了进一步鉴定卵粒中的蛋白质类毒素尤其是那些由于表达丰度低而不易直接分离纯化的毒素,我们进行了卵粒转录组分析。鉴定出 280 个可能编码蛋白质、多肽毒素的开放阅读框^[12]。通过序列分析,从中挑选出几个可能编码蛋白质类毒素的基因并进行了克隆、表达和活性鉴定。其中一个多肽毒素被命名为间斑寇蛛卵粒毒素-V (LETX-V)。实验证明它是一种 ATP 酶抑制剂,能选择性作用于乳腺癌细胞系 MDA-MB-231,不仅阻滞其细胞周期,抑制其增殖和迁移,而且诱导其凋亡^[13]。另一个基因编码的多肽毒素命名为间斑寇蛛卵粒毒素-VI (LETX-VI)。本研究旨在对 LETX-VI 的基因进行克隆、异源表达并对表达的 LETX-VI 的生物学活性进行分析鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

10×快速消化缓冲液、T4 DNA 连接酶、10×连接酶缓冲液、200 bp DNA ladder marker、dNTPs、6×核酸电泳上样缓冲液和 pMD19-T 载体克隆试剂盒 (TaKaRa)、质粒抽提试剂盒、50×TAE 和 LB 液体和固体培养基粉末 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司)、Trizol 和琼脂糖 (Invitrogen)、DEPC 水 (合肥博美生物科技有限公司)、Taq 酶和 10×Taq Buffer (北京天根生化科技)、

Nco I 和 *Xho* I 限制酶 (Thermo 公司)、pET32a 空载 (淼灵生物资源中心)、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 感受态细胞 (Vazyme 公司)、Ni 纯化介质和重组肠激酶轻链 (REK, BBI life sciences 公司)。DNA 凝胶回收试剂盒和 SDS-PAGE 试剂盒 (康为世纪), SMARTer RACE 5'/3' Kit (Clonetech)。间斑寇蛛卵粒从新疆维吾尔自治区奇台县采集^[7]。

1.2 方法

1.2.1 卵粒总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

利用 Trizol 法提取间斑寇蛛卵粒的总 RNA, 参照相关试剂盒提供的方法进行。称取 0.3 g 间斑寇蛛卵粒置于研钵中, 添加液氮后用杵棒充分研磨。转移至 1.5 mL EP 管中, 添加 1.0 mL Trizol 试剂, 混匀, 静置 10 min。加入 0.25 mL 三氯甲烷, 振荡 15 s 后静置 5 min。4 °C、10 000 r/min 离心 10 min。吸取上层水相至另一 EP 管中, 异丙醇沉淀。预冷的 75%乙醇洗涤沉淀, 自然干燥。最后将沉淀溶于无 RNase 的水中, -80 °C 保存备用。cDNA 第一链的合成参照 Clonetech SMARTer RACE 5'/3'Kit 的相关说明进行^[7]。取 5.0 μ L 提取的总 RNA, 加 1.0 μ L 3'-CDS 逆转录引物 A, 6.0 μ L 灭菌水。混匀后置于 72 °C 孵育 3 min, 然后降温至 42 °C, 孵育 2 min, 以破坏 RNA 的空间结构。加入 4.0 μ L 5 \times First Strand Buffer (第一链合成缓冲液), 0.5 μ L DTT (100 mmol/L), 1.0 μ L dNTPs (20 mmol/L), 0.5 μ L RNase 抑制剂 (40 U/ μ L), 2.0 μ L SMARTScribe 逆转录酶 (100 U), 构成一个总体积为 20 μ L 的 cDNA 合成反应体系。充分混匀后 42 °C 孵育 90 min, 然后 70 °C 孵育 10 min 使逆转录酶失活, 终止合成反应。逆转录

完成后的产物即为 cDNA, 可直接作为模板用于 PCR 反应扩增基因^[7]。

1.2.2 基于 3'-RACE 的巢式 PCR 扩增 LETX-VI 基因

根据卵粒转录组分析获得的 LETX-VI 的成熟肽及信号肽的编码序列设计上游巢式外引物和上游巢式内引物。上游巢式外引物含部分信号肽序列, 上游巢式内引物含成熟肽起始部分序列。下游通用引物 Long UPM 和 Short UPM 由试剂盒提供 (表 1)^[7]。第一次 PCR 扩增利用上游巢式外引物和试剂盒的通用长引物 (Long UPM), 以合成的 cDNA 第一链为模板进行, 得到从上游至 3'端非翻译区 (UTR) 的序列。PCR 循环参数设定为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 循环 25 次; 72 °C 终延伸 3 min。将第一次 PCR 扩增的产物稀释后作为模板, 利用上游巢式内引物和试剂盒提供的通用短引物 (Short UPM) 进行第二次 PCR 扩增, 仍参照第一次 PCR 实验的条件进行。第二次 PCR 完成之后, 取适量产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的条带。

1.2.3 目的片段与 T 载体的连接和转化

回收到的 PCR 扩增的目的片段由于是经过 3'端加 A 的, 所以可以利用 TA 克隆技术直接用于与 T 载体的连接。利用 pMD19-T Vector Cloning Kit 并根据说明书进行 TA 连接克隆反应^[7]。总体积 10 μ L 的 TA 连接反应体系组成为: pMD19-T vector (50 ng/ μ L) 1.0 μ L, Insert DNA (目的片段) 4.0 μ L, Solution I 5.0 μ L。混合溶液置于 16 °C 反应 1 h。

表 1 巢式 PCR 扩增 LETX-VI 基因所用引物

Table 1 Primers used for nest PCR of LETX-VI gene

Primer name	Sequence (5'-3')
Upstream outer primer	TACAGTATTATTCTTGTGGCTTTG
Upstream inner primer	CTCGAGGAAATGACATGTGCAGATACTCAGG
Long UPM	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Short UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC

利用热激法转化感受态细胞。将大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞从 -80 °C 取出，放在冰上解冻，加入上一步中的 10 μ L 连接产物，冰上继续放置 30 min。然后 42 °C 热激 90 s。取出后冰上放置 2–3 min。每管加入 890 μ L LB 培养基，放入 37 °C 摇床中培养 60 min。取 40 μ L X-Gal 和 4 μ L IPTG 的混合液均匀涂布于含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB-Agar 平板上。从摇床中取出 EP 管，离心去上清，取 25 μ L 底部的菌液均匀涂布在有 X-Gal 和 IPTG 混合液的 LB-Agar 板上，37 °C 倒置培养过夜^[7]。

1.2.4 菌落 PCR 检测和测序

第 2 天共挑取 5 个白色菌落，分别放入预先加入 10 μ L 超纯水的 1.5 mL EP 管中，用枪头吸打混匀，配成菌液，进行菌落 PCR 检测^[7]。分别以第二次 RACE PCR 扩增时用的上游巢式内引物和试剂盒提供的 Short UPM 作为上、下游引物，用 *Taq* DNA 聚合酶进行扩增。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测。取菌落 PCR 鉴定呈阳性结果的几管菌液进行接种摇菌，即将 PCR 阳性的菌液分别接种到若干管含 Amp (终浓度 100 μ g/mL) 的 LB 培养基中，220 r/min、37 °C 摇菌过夜 (12–16 h)。第 2 天每管取 1 mL，标记后送公司测序。剩余部分进行菌种保存：取 0.5 mL 菌液和 0.5 mL 灭菌的 30% 的甘油在灭菌的 1.5 mL EP 管中吸打混合，然后放入 -80 °C 进行菌种保存。保留测序正确的菌种备用^[7]。

1.2.5 重组 T 载体质粒的提取和表达载体的构建

取 0.5 μ L 测序正确的菌液接种到 3 mL 灭菌的含有 Amp 的液体 LB 培养基中，摇菌过夜。第 2 天离心收集菌体，利用质粒小提试剂盒进行质粒提取^[7]。

由于后续工作需将克隆的 LETX-VI 的基因通过双酶切产生的粘性末端连入表达载体中，所以重新设计 5' 端经过修饰的表达引物从克隆成功的质粒上扩增 LETX-VI 基因，使其带上限制性内切酶识别序列^[7]。使用的表达载体为 pET32a，选择其 MCS 区域的 *Nco* I 和 *Xho* I 作为双酶切位点。引物设计如表 2 所示。利用设计合成的表达引物从克隆成功的重组 T 载体中进行目的基因的 PCR 扩增。PCR 扩增参考 RACE PCR 的条件进行，反应完成后利用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物^[7]。

胶内回收扩增的目的片段后，利用 *Nco* I 和 *Xho* I 进行双酶切以产生粘性末端。同时，从购买的含有 pET32a 的大肠杆菌中提取 pET32a 质粒，提取成功后也同样进行双酶切，产生和目的片段相同的粘性末端。双酶切完成以后的目的片段和空载体都用琼脂糖凝胶电泳鉴定和胶回收纯化。获得了双酶切且纯化的目的片段和线性空载之后，利用 T4 DNA 连接酶将二者连接构建成 LETX-VI 的重组表达载体。表达载体转化到 BL21(DE3) 宿主菌中，涂布在 Amp 抗性 LB 平板培养基上。第 2 天挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定阳性，分别进行摇菌和测序。选择测序正确的菌株 -80 °C 保存备用^[7]。

表 2 构建表达载体时 PCR 扩增 LETX-VI 基因所用引物

Table 2 Primers used for PCR of LETX-VI gene when constructing expression vectors

Primer name	Sequence (5'–3')
Upstream primer	CATGCCATGGCT <u>GACGACGACGACA</u> AGGAAATGACATGTGCAGATAC
Downstream primer	CCGCTCGAGT <u>TACTGAGGGCA</u> ATTGAGATTT

In the upstream primer, CATG are protective bases; CCATGG singly underlined is the sequence recognized by *Nco* I; CT are added bases that calibrate the ORF so as to protect against frame shift mutation; the sequence doubly underlined is enterokinase recognition sequence that will help to get LETX-VI without exogeneous sequence in later experimental steps. In the downstream primer, CCG are protective bases; CTCGAG singly underlined is the sequence recognized by *Xho* I; TTA are complementary bases of the stop code.

1.2.6 原核诱导表达和融合蛋白的亲纯化

在 3 mL 含 Amp (终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中接种 5 μL 重组表达菌株, 220 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜培养。次日从其中取 1.5 mL 菌液转接到 50 mL 的灭菌 LB 液体培养基中, 继续在摇床上以同样条件摇瓶培养, 期间每隔一段时间取菌液进行 OD_{600} 吸光值测定。当吸光值达到 0.4–0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L 诱导 5 h, 每小时取 1.0 mL 的菌液用 SDS-PAGE 检测融合蛋白诱导表达的效果^[7]。

扩大培养后离心收集菌体, 每 1 L 培养液离心后获得的菌体加入 150 mL 裂解缓冲液, 振荡混匀初步破碎, 然后利用均质机进一步破碎菌体 4–5 次。离心收集上清并用 0.22 μm 的过滤器过滤。每 15 mL 滤液分装一管, 每管加入约 300 μL 预先用洗涤缓冲液漂洗 3 次的 Ni 纯化介质, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇动孵育过夜。次日离心去上清, 用洗涤缓冲液重复漂洗 Ni 纯化介质 3 次, 最后每管加入 600 μL 洗脱缓冲液进行洗脱, 摇动孵育 2 h 左右。离心收集上清, 即为纯化的融合蛋白。取适量用 SDS-PAGE 检测纯度^[7]。

1.2.7 酶切和重组 LETX-VI 的分离与鉴定

利用重组肠激酶轻链对纯化的 LETX-VI 融合蛋白进行酶切, 每 50 μg 融合蛋白加 1.2 U 重组肠激酶轻链, 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。酶切后通过反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 进行分离纯化, 使用 C4 反相柱 (4.6 mm \times 250 mm)。洗脱液 A 为 0.05% TFA, 洗脱液 B 为含 0.05% TFA 的乙腈。洗脱梯度: 0–10 min, 100% A; 10–40 min, 0–40% B in A; 40–50 min, 40%–100% B in A。流速 1 mL/min, 柱温箱温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 。RP-HPLC 分离后, 采用 TOF-Q 电喷雾质谱准确测定重组 LETX-VI 的分子量。N₂ 作为雾化气体, 离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.8 重组 LETX-VI 的活性鉴定

(1) 抗菌活性和昆虫毒性检测

采用抑菌圈法^[11,14], 利用金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus*

subtilis、痤疮丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes*, 白色念珠菌 *Candida albicans* 以及花斑癣菌 *Malassezia furfur* 检测 LETX-VI (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 是否具有抗菌活性。

检测 LETX-VI 的昆虫毒性时, 首先以 0 (生理盐水对照)、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量的 LETX-VI 对美洲蜚蠊进行腹腔注射, 观察受试蜚蠊的行为反应。然后利用膜片钳技术测定 LETX-VI 对美洲蜚蠊背侧不成对中间神经元 (DUM) 钠离子通道的作用。用 75% 乙醇对蜚蠊进行表面消毒, 并用生理盐水漂洗一次, 然后剪去其翅膀、脚、触须等, 用银针固定在蜡盘上。剪开腹部两侧, 去除腹部上表面, 用镊子去除消化道, 分离腹部神经索, 将腹部末端神经节 (TAG) 置于 0.1% 胰酶中消化 7 min, 分离出 DUM 神经元, 生理盐水漂洗几次后转入配制好的细胞外液中以备膜片钳检测分析^[7]。

细胞外液组成 (mmol/L): NaCl 30, CsCl 5, KCl 5, TEA-Cl 90, D-葡萄糖 25, MgCl₂ 1, HEPES 5, CaCl₂ 1.8, 用 NaOH 调 pH 至 7.4。细胞内液组成 (mmol/L): CsF 135, HEPES 5, NaCl 10, 用 1 mol/L CsOH 调 pH 至 7.0。

(2) 哺乳动物毒性检测

小鼠腹腔注射: 以 3 mg/kg 剂量的 LETX-VI 分别对小鼠进行腹腔注射, 观察小鼠的行为反应, 初步判断 LETX-VI 的哺乳动物毒性。

对 ND7/23 细胞钠离子通道的作用: 利用膜片钳技术检测 LETX-VI 对 ND7/23 细胞膜钠离子通道电流的影响。ND7/23 细胞培养时利用 DMEM 培养基 (添加 10% 小牛血清, 2 mmol/L L-谷氨酰胺和 100 U/mL 青霉素, 100 mg/mL 链霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$, 通入含有 5% CO₂ 的空气。传代后培养过夜即可进行膜片钳检测。检测前吸走培养基, 加入 2 mL 记录钠离子通道电流的细胞外液。细胞外液组成 (mmol/L): NaCl 140, CaCl₂ 2, MgCl₂·6H₂O 1, KCl 5, HEPES 20, 葡萄糖 10, pH 7.4。细胞内液组成 (mmol/L): CsF 140,

EGTA 1, NaCl 10, HEPES 1, pH 7.0^[7]。

对 PC12 细胞多巴胺释放的影响: 用含 10% FBS 和 100 U 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 培养基在 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养 PC12 细胞。分别用不同浓度 (0、500、1 500、2 500 nmol/L) 的 LETX-VI 处理培养的 PC12 细胞 15 min, 然后采用荧光分光光度法^[15-16]测定分泌至培养基中的多巴胺的含量。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物的检测与鉴定

逆转录生成 cDNA 以后, 利用 3'-RACE 策略进行巢式 PCR, 对目的片段进行扩增。扩增产物检测结果如图 1A 所示, 可知该 LETX-VI 基因加上 3'端非翻译区的长度约为 400 bp 左右, 与理论值相符。将该 400 bp 片段克隆到 T 载体并成功转化、测序正确后, 提取重组 T 载体作为模板, 利用带有限制性内切酶识别位点及修饰碱基的表达引物来扩增 LETX-VI 的编码序列 (CDS), 结果如图 1B 所示。扩增产物长度与预期的 200 bp 左右

相符。利用表达引物扩增的 LETX-VI CDS 的片段和 pET32a 表达载体分别经过双酶切并连接后, 测序结果见图 2。结果显示, 重组表达载体中插入序列和预期的序列完全一致 (Identity=100%), 且插入的位置和方向正确无误, 证明间 LETX-VI 基因克隆成功^[7]。

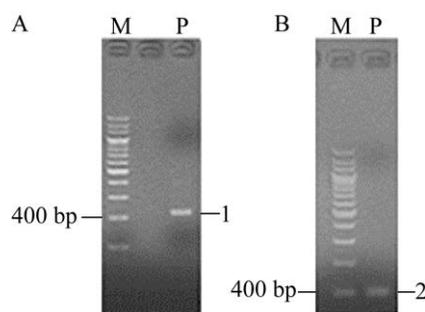


图 1 LETX-VI 3'-RACE 巢式 PCR 扩增产物 (A) 和编码序列 PCR 扩增产物 (B) 的凝胶电泳检测图

Fig. 1 Gel electrophoresis for 3'-RACE nest PCR product of LETX-VI gene (A) and its coding sequence PCR product (B). M: DNA marker; P: PCR product. 1: 3'-RACE nest PCR product; 2: coding sequence PCR product.

Recombinant vector	CCATGGCTGACGACGACGACAAG	GAAATGACATGTGCAGA	560
Latroegtoxin-VI	GAAATGACATGTGCAGA	17
Consensus		gaaatgacatgtgcaga	
	TACTCAGGGACAATGTGTTGCTGGCAACGACTGCAGTTGT		600
	TACTCAGGGACAATGTGTTGCTGGCAACGACTGCAGTTGT		57
	tactcagggacaatgtgctggcaacgactgcagttgt		
	TGTGGCCAATACGACAAATGTGATTGCACTTGGAACTCTGG		640
	TGTGGCCAATACGACAAATGTGATTGCACTTGGAACTCTGG		97
	tgtggccaatacgcacaaatgtgattgcacttggaaactctgg		
	GTGTGAGAACCCTGCAAGTGCAAGAGAGTGCCTATTTAAG		680
	GTGTGAGAACCCTGCAAGTGCAAGAGAGTGCCTATTTAAG		137
	gtgtgagaaccctgcaagtgcagagagtgctatTTAAG		
	TGATTGGAAGAAAAATCTCAATTGCCCTCAGTAACTCGAG		720
	TGATTGGAAGAAAAATCTCAATTGCCCTCAG.....		168
	tgattggaagaaaaatctcaattgccctcag		
	CACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAG		760
		168

图 2 LETX-VI/pET32a 测序结果和目标序列比对

Fig. 2 Alignment of determined and target sequences of LETX-VI/pET32a.

2.2 诱导表达效果和融合蛋白的溶解性

LETX-VI基因经 IPTG 诱导表达的 5 h 内, 每小时采集样品并利用 SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达效果, 结果如图 3A 所示。从电泳图谱中可以看出, 在略高于 25 kDa 的位置有一个蛋白条带的颜色随着诱导时间的延长而逐渐加深, 说明该蛋白的表达量在逐步增加。提示 LETX-VI 融合蛋白诱导表达成功^[7]。通过比较沉淀和上清液中融合蛋白的分布, 对表达的融合蛋白的溶解性进行了检测, 结果如图 3B 所示, 融合蛋白溶解性好, 主要存在于上清中, 有利于下游的分离纯化。

2.3 重组 LETX-VI 的分离与鉴定

采用优化的诱导表达条件进行扩大培养后, 离心收集菌体, 裂解释放融合蛋白。利用 Ni²⁺柱亲和纯化融合蛋白后用重组肠激酶轻链进行酶切, 得到的酶切混合物用 RP-HPLC 进行分离, 分离图谱如图 4 所示, 在乙腈浓度为 30% 左右时洗脱下一个组分 (图中用*标记)。电喷雾质谱分析表明, 该成分的单同位素分子量为 6 195.58 (图 5), 与根据 LETX-VI 的编码序列计算的理论分子量相符, 说明该成分是 LETX-VI。

2.4 LETX-VI 的活性鉴定

用抑菌圈法检测 LETX-VI 的抗菌活性时, 发现在 10 μmol/L 的浓度下, LETX-VI 对受试的

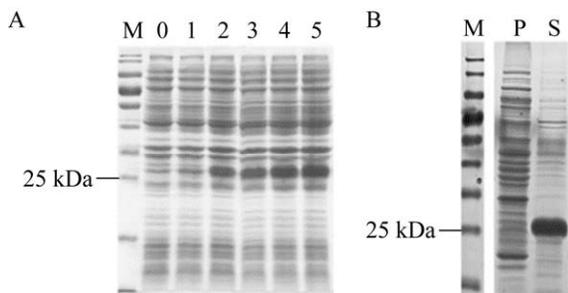


图 3 LETX-VI 诱导表达效果 (A) 和融合蛋白的溶解性 (B) 的 SDS-PAGE 检测结果图
Fig. 3 SDS-PAGE of induced expression effect of LETX-VI (A) and fusion protein solubility (B). M: protein marker; 0-5: induction time (h); P: pellet; S: supernatant.

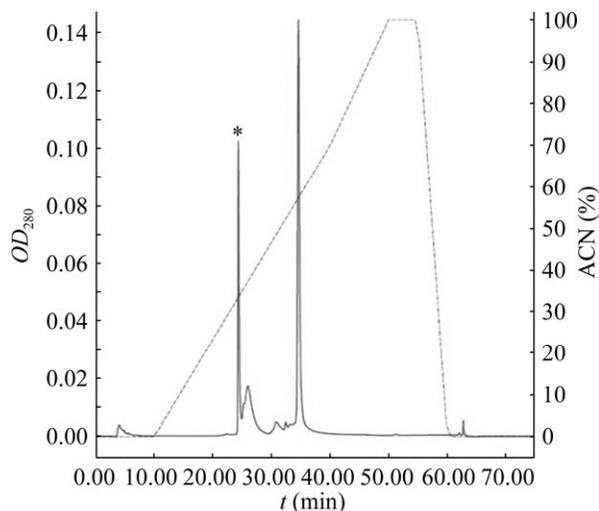


图 4 融合蛋白酶切产物的 RP-HPLC 分离图谱
Fig. 4 RP-HPLC of enzymolyzed fusion protein. * indicates the target peak.

金黄色葡萄球菌和白色念珠菌等几种细菌和真菌都不显示抑制活性 (结果图未列出)。

以 5、10、20、50、100 μg/只的剂量对美洲蜚蠊腹腔注射 LETX-VI 后, 与注射生理盐水的对照相比, 未观察到明显的毒性反应。利用膜片钳技术检测 LETX-VI 对美洲蜚蠊 DUM 神经元钠通道的作用时, 即使用 10 μmol/L 的浓度也不能对其电流产生明显的影响 (图 6A)。

用 LETX-VI 按 3 mg/kg 的剂量对小鼠进行腹腔注射后, 发现受试小鼠畏缩于鼠笼一角, 对外界刺激的反应性减弱, 但不久后即恢复正常, 说明 LETX-VI 在实验剂量下对小鼠显示有限的毒性作用。用全细胞膜片钳技术检测 LETX-VI 对哺乳动物模式细胞 ND7/23 钠通道的影响时, 发现在 2 μmol/L 浓度下, LETX-VI 能抑制 36.7% 的钠离子通道电流 (图 6B)。

检测 LETX-VI 对 PC12 细胞多巴胺释放的影响时, 用不同浓度 (0、500、1 500、2 500 nmol/L) 的 LETX-VI 与 PC12 细胞孵育 15 min。测定结果显示, LETX-VI 能促进 PC12 细胞多巴胺的释放, 且随着 LETX-VI 浓度的升高, PC12 细胞释放至培养基中的多巴胺呈不断增加的趋势, 在测试浓

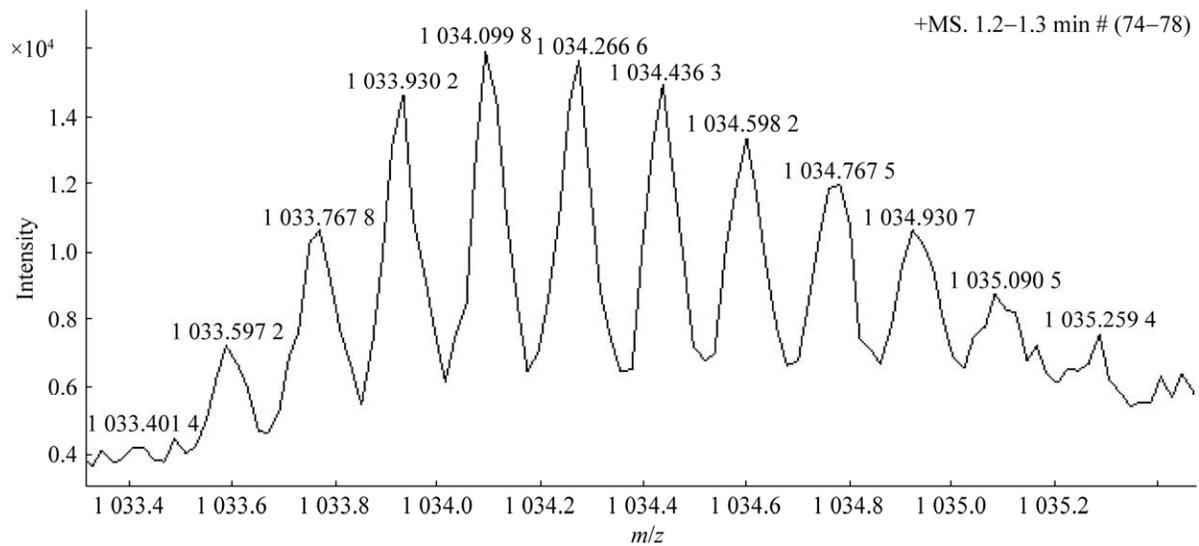


图5 电喷雾质谱测定LETX-VI分子量时6电荷峰的同位素峰图

Fig. 5 Isotopic peaks of LETX-VI with 6 positive charges obtained during monoisotopic molecular weight determination with ESI mass spectrometry. The molecular weight of LETX-VI=1 033.597 2 \times 6-6=6 195.58.

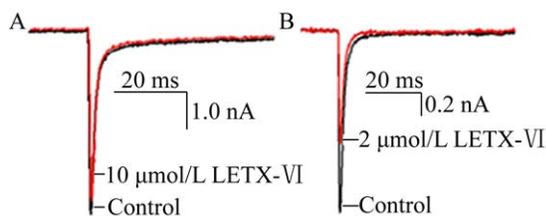


图6 LETX-VI对蜚蠊DUM神经元细胞膜钠离子通道电流(A)和ND7/23细胞膜钠离子通道电流(B)的影响

Fig. 6 Effects of LETX-VI on Na⁺ channel currents of *P. americana* DUM (A) and ND7/23 (B) cells.

度范围内呈现一定的浓度依赖性(图7)。这些结果证明,LETX-VI是一种哺乳动物特异的多肽类神经毒素。

3 讨论

间斑寇蛛因其毒腺毒素活性强且毒腺外也含有毒性成分而很早以来就受到相关科学工作者的广泛关注^[2,17-20]。分离和筛选具有重要应用前景的间斑寇蛛毒素并对其进行系统的结构、功能和应用研究不仅可以拓展蜘蛛毒素的研究范围,加深对蜘蛛毒素的了解,而且可以为分子生物学研究

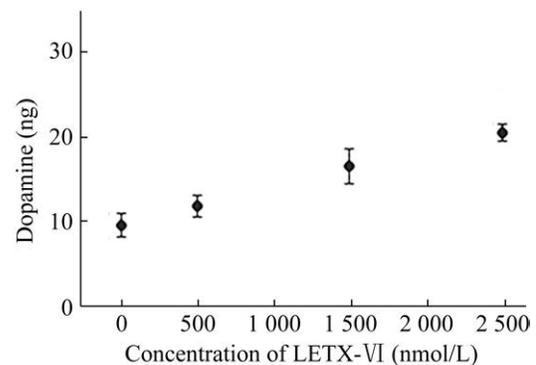


图7 LETX-VI对PC12细胞多巴胺释放的影响

Fig. 7 Effect of LETX-VI on the dopamine release from PC12 cells. $n=3$.

工具试剂和临床医药及杀虫药等的开发发现新的前体分子。近年来,我们对间斑寇蛛的卵粒毒素开展了较为系统的探究,分析了卵粒毒性的分子基础及其与毒腺毒性分子基础的差异^[6,8,21],分离纯化出多种具有重要意义的蛋白质类毒素^[9-11]。但由于间斑寇蛛卵粒来源有限和卵粒蛋白质组成复杂等原因,极大地限制了其他蛋白质类活性成分尤其是低丰度成分的分离与鉴定。转录组学和生物信息学的发展为毒素研究的深入提供了有效

的手段。通过转录组测定和生物信息学分析,可以得到很多可能编码蛋白质类毒素的候选基因^[12,22-23]。对候选基因进行克隆和异源表达后,在生物信息学功能预测结果的指导下对重组蛋白质和多肽的生物学活性进行分析鉴定,可以大大减少活性筛选的盲目性,从而较为迅速地发现新的蛋白质类毒素。这种策略与传统的先分离纯化蛋白质、进行活性鉴定后再克隆其基因的策略是恰好相反的,而两种策略的结合有利于更加全面地揭示毒性的分子基础和发现新的具有应用前景的蛋白质类毒素。

本研究中,我们根据转录组分析得到的编码序列,采用基于3'-RACE原理的巢式PCR快速、准确克隆出LETX-VI基因。通过BLAST比对,发现LETX-VI与部分Lycotoxin、Cystin knot toxin和Ctenitoxin具有40%以上的一致性,而它们大多是神经毒素。活性鉴定结果表明,LETX-VI在实验剂量范围内未显示明显的抗菌活性和昆虫毒活性,但能有效抑制ND7/23细胞膜的钠离子通道,促进PC12细胞的多巴胺释放。ND7/23是一种由大鼠胚胎DRG与小鼠N18Tg2神经母细胞瘤构成的融合细胞系,主要表达Na_v1.6和Na_v1.7钠离子通道^[24-25]。Na_v1.6和Na_v1.7都是与疼痛信号传递有关的钠离子通道亚型^[26-28]。LETX-VI能抑制ND7/23细胞的钠离子通道电流,暗示该活性多肽在疼痛机制研究和相关药物的开发方面具有潜在的应用价值。

PC12细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株,具有神经内分泌细胞的一般特征,广泛应用于神经生理和神经药理学研究。多巴胺是PC12细胞分泌的主要神经递质^[7,29]。多巴胺受体在机体的许多组织尤其是大脑中高丰度表达。多巴胺信号与许多生理功能有关,包括认知、记忆、愉悦、奖励、成瘾、疼痛、精细运动控制以及神经内分泌调控等^[30-31]。多巴胺与许多疾病的发生发展也密切相关,在某些疾病的治疗中显示出重

要的应用价值。如,抑郁症是以情绪低落为主要特征的常见精神和心理疾病之一。大鼠海马区域的单胺类神经递质释放减少与抑郁症发病有关^[32]。许多神经毒素在抑郁症的治疗中具有重要的应用前景,能给抑郁症发病机制研究以及临床治疗提供重要工具。如 α -芋螺毒素^[33]和肉毒菌素^[34-35]。因此,研究LETX-VI影响多巴胺代谢和释放的作用机理,不仅可为阐明神经递质释放的调节机制提供更多的实验证据,而且在药理学研究和抑郁症等相关疾病的治疗等方面具有重要意义。目前,我们正在综合利用包括差异表达转录组和蛋白质组分析在内的多种研究策略对相关机制进行系统的探究。

综上所述,我们利用基于3'-RACE和巢式PCR的策略从间斑寇蛛卵粒的转录组中成功挖掘和克隆出编码LETX-VI的基因;生物学信息学分析导向的活性鉴定实验证明该毒素是一种特异性作用于哺乳动物细胞的神经毒素;不仅为神经生物学研究工具试剂和相关疾病药物的开发鉴定了一种新的前体分子,而且为转录组学和生物信息学指导下研究因表达丰度低而难以从天然材料直接提取的蛋白质类毒素提供了可借鉴的实验方法。

REFERENCES

- [1] Zhang Y. Why do we study animal toxins? *Zool Res*, 2015, 36(4): 183-222.
- [2] Ushkaryov YA, Volynski KE, Ashton AC. The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon*, 2004, 43(5): 527-542.
- [3] Peng XZ, Zhang YY, Liu JY, et al. Physiological and biochemical analysis to reveal the molecular basis for black widow spiderling toxicity. *J Biochem Mol Toxicol*, 2014, 28(5): 198-205.
- [4] Buffkin DC, Russell FE, Deshmukh A. Preliminary studies on the toxicity of black widow spider eggs. *Toxicon*, 1971, 9(4): 393-402.
- [5] Buffkin DC, Russell FE. A poison from the eggs and

- spiderlings of the black widow spider. Proc West Pharmacol Soc, 1971, 14: 166.
- [6] Yan YZ, Li JJ, Zhang YY, et al. Physiological and biochemical characterization of egg extract of black widow spiders to uncover molecular basis of egg toxicity. Bio Res, 2014, 47: 17-27.
- [7] 颜帅. 黑寡妇蜘蛛卵粒毒素的异源表达和活性分析[D]. 湖南: 湖南师范大学, 2016.
Yan S. Heterologous expression and activity analysis of a black widow spider egg toxin[D]. Hunan: Hunan Normal University, 2016 (in Chinese).
- [8] Li JJ, Liu H, Duan ZG, et al. Protein compositional analysis of the eggs of black widow spider (*Latrodectus tredecimguttatus*): Implications for the understanding of egg toxicity. J Biochem Mol Toxicol, 2012, 26(12): 510-515.
- [9] Li JJ, Yan YZ, Wang JR, et al. Purification and partial characterization of a novel neurotoxic protein from eggs of black widow spiders (*Latrodectus tredecimguttatus*). J Biochem Mol Toxicol, 2013, 27(7): 337-342.
- [10] Li JJ, Yan YZ, Yu H, et al. Isolation and identification of a sodium channel-inhibiting protein from eggs of black widow spiders. Int J Biol Macromol, 2014, 65: 115-120.
- [11] Lei Q, Yu H, Peng XZ, et al. Isolation and preliminary characterization of proteinaceous toxins with insecticidal and antibacterial activities from black widow spider (*L. tredecimguttatus*) eggs. Toxins, 2015, 7(3): 886-899.
- [12] Xu DH, Wang XC. Transcriptome analysis to understand the toxicity of *Latrodectus tredecimguttatus* eggs. Toxins, 2016, 8(12): 378-401.
- [13] Xu DH, Tang XC, Wu XZ, et al. Anti-breast cancer activity of Latroegtoxin-V mined from the transcriptome of spider *Latrodectus tredecimguttatus* eggs. Toxins, 2018, 10(11): 451-468.
- [14] Zarai Z, Kadri A, Ben Chobba I, et al. The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. Lipids Health Dis, 2011, 10: 161.
- [15] Schlumpf M, Lichtensteiger W, Langemann H, et al. A fluorometric micromethod for the simultaneous determination of serotonin, noradrenaline and dopamine in milligram amounts of brain tissue. Biochem Pharmacol, 1974, 23(17): 2437-2446.
- [16] Chen J, Dai ZP, Lei Q, et al. Effects of huwentoxin-I on catecholamines in cultured PC12 cells. Toxicol Mech Methods, 2015, 25(4): 241-248.
- [17] Grishin EV. Black widow spider toxins: the present and the future. Toxicon, 1998, 36(11): 1693-1701.
- [18] Rohou A, Nield J, Ushkaryov YA. Insecticidal toxins from black widow spider venom. Toxicon, 2007, 49(4): 531-549.
- [19] Yan S, Wang XC. Recent advances in research on widow spider venoms and toxins. Toxins, 2015, 7(12): 5055-5067.
- [20] Wang XC, Tang XC, Xu DH, et al. Molecular basis and mechanism underlying the insecticidal activity of venoms and toxins from *Latrodectus* spiders. Pest Manag Sci, 2019, 75(2): 318-323.
- [21] 王贤纯, 梁宋平. 间斑寇蛛毒素的蛋白质化学与蛋白质组学研究新进展. 生物工程学报, 2014, 30(7): 1036-1043.
Wang XC, Liang SP. Recent progress in protein chemistry and proteomics of *Latrodectus tredecimguttatus* toxins. Chin J Biotech, 2014, 30(7): 1036-1043 (in Chinese).
- [22] Brahma RK, McCleary RJR, Kini RM, et al. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. Toxicon, 2015, 93: 1-10.
- [23] He QZ, Duan ZG, Yu Y, et al. The venom gland transcriptome of *Latrodectus tredecimguttatus* revealed by deep sequencing and cDNA library analysis. PLoS ONE, 2013, 8(11): e81357.
- [24] Lee J, Kim S, Kim HM, et al. $Na_v1.6$ and $Na_v1.7$ channels are major endogenous voltage-gated sodium channels in ND7/23 cells. PLoS ONE, 2019, 14(8): e0221156.
- [25] 王红艳, 勾萌, 肖蓉, 等. 钠离子通道疾病及其抑制剂生物学功能研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(6): 875-890.
Wang HY, Gou M, Xiao R, et al. Progress in sodium channelopathies and biological functions of voltage-gated sodium channel blockers. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 875-890 (in Chinese).
- [26] Xie WR, Strong JA, Zhang JM. Local knockdown of the $Na_v1.6$ sodium channel reduces pain behaviors, sensory neuron excitability, and sympathetic

- sprouting in rat models of neuropathic pain. *Neuroscience*, 2015, 291: 317-330.
- [27] Gonçalves TC, Benoit E, Partiseti M, et al. The Na_v1.7 channel subtype as an antinociceptive target for spider toxins in adult dorsal root ganglia neurons. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1000.
- [28] Wu XZ, Wang ZQ, Chen Y, et al. Newly discovered action of HpTx3 from venom of *Heteropoda vednatoria* on Na_v1.7 and its pharmacological implications in analgesia. *Toxins*, 2019, 11(12): 680-700.
- [29] Greene LA, Tischler AS. PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. *Adv Cell Neurobiol*, 1982, 3: 373-414.
- [30] Pignatelli M, Bonci A. Role of dopamine neurons in reward and aversion: A synaptic plasticity perspective. *Neuron*, 2015, 86(5): 1145-1157.
- [31] Beninger RJ. The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res*, 1983, 287(2): 173-196.
- [32] 罗国帅, 杨建立, 司纪剑, 等. N-乙酰半胱氨酸对抑郁模型大鼠行为及神经递质的影响. *天津医药*, 2016, 44(9): 1084-1088.
- [33] Luo GS, Yang JL, Si JJ, et al. Effects of N-acetylcysteine on behavior and monoamine neurotransmitters in rats with chronic unpredictable stress. *Tianjin Med J*, 2016, 44(9): 1084-1088 (in Chinese).
- [34] 王帅, 罗素兰. α -芋螺毒素在抑郁症研究和治疗中的应用前景//第12届生物毒素研究及医药应用学术大会论文集. 延安: 中国毒理学会, 2015: 86.
- [35] Wang S, Luo SL. Application prospect of α -conotoxin in depression research and treatment//The Paper Collection of the 12th Chinese National Conference of Biotoxins Research and Medical Application. Yan'an: Chinese Society of Toxicology, 2015: 86 (in Chinese).
- [34] França K, Lotti T. Botulinum toxin for the treatment of depression. *Dermatol Ther*, 2017, 30(2), DOI: 10.1111/dth.12422.
- [35] Parsaik AK, Mascarenhas SS, Hashmi A, et al. Role of Botulinum toxin in depression. *J Psychiatr Pract*, 2016, 22(2): 99-110.

(本文责编 陈宏宇)