

少棘蜈蚣毒腺 RACE cDNA 文库的构建及 β -actin 基因的克隆与序列分析

任文华 张双全* 宋大祥 周开亚

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要: 运用 SMART 技术首次构建了少棘蜈蚣 (*Scolopendra subspinipes*) 毒腺 cDNA 文库。经琼脂糖电泳检测, 文库所含全长 cDNA 主要分布在 500 bp 以上, 大于 2 000 bp 的区域尚有很长拖尾, 中间有几条高丰度 mRNA 亮带。以此文库为模板, 通过 5' RACE (Rapid amplification of cDNA ends, 快速扩增 cDNA 末端) 方法获得了细胞质肌动蛋白 β -actin 基因 5' 末端 598 bp 片段, 其中包括开放阅读框 546 bp, 编码 182 个氨基酸。将该基因片段推导的氨基酸序列通过 BLAST 软件与蛋白质公共数据库 Swissprot 比对, 发现与蜜蜂 (*Apis mellifera*) 的 β -actin 基因同源性高达 96%, 说明本实验所构文库质量完全可以满足用 RACE 方法进行功能基因的 cDNA 克隆。通过基于双参数模型的 NJ 法对部分动物 β -actin 基因进行系统重建, 较好地反映了这些动物的系统发生关系。

关键词: 少棘蜈蚣; 毒腺; SMART 技术; cDNA 文库; β -肌动蛋白

中图分类号: Q956 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2005)03-01-05

Construction of cDNA Library of Venom Gland and Cloning of β -actin cDNA 5'-end Fragments in *Scolopendra subspinipes*

REN Wen-Hua ZHANG Shuang-Quan SONG Da-Xiang ZHOU Kai-Ya

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: A cDNA library of venom gland in *Scolopendra subspinipes* was constructed with SMART technique. The full length of cDNAs in the library ranged from 500 to 2 000 base pairs. A 5'-end of β -actin cDNA sequence of 598 bp in length was obtained with RACE technique, including a 546 bp of open reading frame (ORF) coding 182 amino acids. The BLAST search of the present sequences in the public protein database Swissprot revealed a very high similarity with β -actin gene of *Apis mellifera*, suggesting that the present library is of high quality for the cDNA cloning of function genes with RACE technique. The phylogenetic reconstruction of some animal β -actin genes based upon NJ algorithm with Kimura two-parameter model could be used to show phylogenetic relationships between different species of animals.

Key words: *Scolopendra subspinipes*; Venom gland; SMART technique; cDNA library; β -actin

少棘蜈蚣 (*Scolopendra subspinipes*) 是传统的中药材之一, 主要产地在湖北、浙江和江苏等省^[1]。蜈蚣的毒腺位于头部额肢, 捕食时将毒腺刺入猎物体内并注入毒液, 使之麻痹甚至死亡^[2]。尽管少棘蜈蚣在我国中药材中占有极其重要的地位, 但国内外对其进行的分子生物学研究很少, 对

蜈蚣毒蛋白进行基因工程的研究仅见韩国 Sohn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 30270193);

* 通讯作者;

第一作者介绍 任文华, 女, 博士研究生, 副教授, 研究方向: 从事生物化学及分子生物学研究, E-mail: spidervenom@163.com

收稿日期: 2004-09-28, 修回日期: 2005-03-09

构建了少棘蜈蚣全虫 cDNA 文库,克隆了纤溶酶原激活物 942 bp 的全长 cDNA,并进行了原核表达^[3]。本研究运用 SMART(Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript)技术首次构建了其毒腺的 cDNA 文库,为将来利用基因工程手段获取蜈蚣毒素蛋白做准备。肌动蛋白(actin)是真核生物中普遍存在,在进化中高度保守的蛋白质家族。肌动蛋白有 6 种不同的异构体,根据不同的等电点,分别称之为 α 、 β 、 γ -actin。 β -actin 作为一种细胞质肌动蛋白,是细胞骨架的重要组成部分。与一些管家基因一样在物种内持续衡量表达,因而在很多需量化的实验技术,如 RT-PCR、半定量 PCR、Northern 杂交中被当作内参照^[4-7]。且基于细胞质肌动蛋白氨基酸序列构建的真核生物分子发生树,可较好地反映真核生物间的进化关系^[8]。少棘蜈蚣 β -actin 基因的 cDNA 序列至今未见报道。对其进行研究,一方面可用以检测本实验构建的毒腺 cDNA 文库质量,更重要的是可为少棘蜈蚣分子生物学的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 少棘蜈蚣购于安徽省滁州市花山光明养殖场。电刺激取毒,诱导毒腺 mRNA 大量表达,分离毒腺组织,将其保存在液氮内。

1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒(Trizol Reagent, Gibco); cDNA 文库构建试剂盒(SMARTTM cDNA Library Construction Kit, Clontech)无 H 型 RNA 酶活性的逆转录酶(SuperScriptTM Rnase H⁻ Reverse Transcriptase, Life Technologies)。

1.3 毒腺组织总 RNA 的提取 取液氮保存的毒腺组织(300 ~ 400 mg),用 Trizol 试剂提取总 RNA。具体操作按 Gibco 公司 Trizol 试剂盒说明书进行。总 RNA 提取后,溶于无 RNA 酶的水中,经琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计测定其 A_{260} 和 A_{280} 鉴定质量后,保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.4 SMART RACE cDNA 文库的构建 实验操作基本按 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 说明书进行。在 0.2 ml 的反应管中加入 3

μ l RNA 提取样品(约 0.5 μ g),按说明书加入相应试剂及引物,反转录合成第一链 cDNA,并采用 LD-PCR(long-distance PCR)技术合成第二链 cDNA。反应在 MJ PTC-200 热循环仪上进行。循环参数如下:95℃ 预变性 1 min,95℃ 15 s,68℃ 6 min,循环数为 25。循环结束后,取 5 μ l 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 β -actin 基因的 5' 末端序列的克隆

1.5.1 β -actin 基因的 5'RACE 从 GenBank 中下载的蜜蜂 *Apis mellifera*(GenBankno. XM 393368)、剑尾螺 *Cynops ensicauda*(GenBankno. AB 117093)、蛇鳄龟 *Chelydra serpentina serpentina*(GenBankno. AF 541916)、鸡 *Gallus gallus*(GenBankno. NM 205518)、小家鼠 *Mus musculus*(GenBankno. XM NM007393)的 β -actin 序列合并,用 CLUSTAL X^[9]进行序列比对,选取保守序列设计引物 Pact 5'-GAC TAC CTC ATG AAG ATC CT -3'。以少棘蜈蚣毒腺 cDNA 文库为模板,通过 SMARTTM cDNA Library Construction Kit(Clontech)提供的引物 PV 5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG -3'和作者设计的引物 Pact 扩增 β -actin 基因 cDNA5'端序列。聚合酶链式反应在 MJ PTC-200 型 PCR 仪上进行,循环参数如下:95℃ 预变性 5 min,95℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 40 s,循环数为 30,循环结束后 72℃ 延伸 7 min。

1.5.2 PCR 产物的纯化和序列测定 PCR 产物用 DNA gel extraction kit 试剂盒(Vitagene)经切胶纯化后,由上海申能博彩生物科技有限公司测序。

1.5.3 β -actin 基因的序列分析 将本研究获得的少棘蜈蚣 β -actin 基因 cDNA5'端序列(599 bp)与从 GenBank 中下载的海扇贝 *Placopecten magellanicus*(No. U 55046)、滨螺 *Littorina littorea*(No. AY 099151)、黑背陆地蟹 *Gecarcinus lateralis*(No. L 76943)、*Apis mellifera*、*Cynops ensicauda*、*Chelydra serpentina serpentina*、*Gallus gallus*、*Mus musculus* 的 β -actin 序列合并,用 CLUSTAL X^[9]进行序列比对。用 MEGA 软件^[10]中基于 Kimuar 双参数模型的邻接法(Neighbor joining, NJ)构建上述物种的系统发生树。

2 结 果

2.1 总 RNA 的提取 总 RNA 提取后,紫外分光光度计测定其 A_{260} 和 A_{280} , A_{260}/A_{280} 为 1.83。电泳检测,可见条带以 28S rRNA 和 18S rRNA 为主(图 1:A),表明所提 RNA 纯度较高,完整性较好,可用于 SMART RACE cDNA 文库的构建。

2.2 SMART RACE cDNA 文库的构建 琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 1:B)构建的 SMART RACE cDNA 文库中,全长双链 cDNA 群体长度主要为 500 bp 以上,大于 2 000 bp 的区域尚有很长拖尾。中间有几条高丰度 mRNA 亮带。

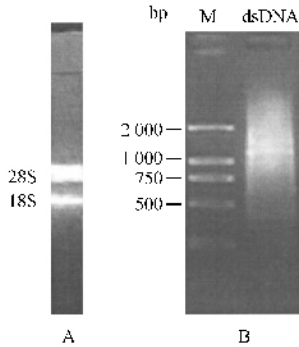


图 1 少棘蜈蚣毒腺总 RNA(A)和双链 cDNA(B)的琼脂糖电泳检测

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA of venom gland(A) and double stranded cDNA(B)

from *Scolopendra subspinipes*

M :DNA 分子量标记

M : DNA molecular weight marker

2.3 β -actin 基因 5'RACE 片段的获得 通过 5'RACE 获得的 β -actin 基因片段经切胶纯化,在琼脂糖电泳时可见一条清晰的约 650 bp 条带(图 2)。测序得到 598 bp 的序列,包含 546 bp 的开放阅读框,推导的氨基酸序列包括 182 个氨基酸残基(图 3)。氨基酸序列经与蛋白质公共数据库 Swissprot 比对、分析,发现与蜜蜂 *Apis mellifera* 的同源性最高,为 96%。

在基于 β -actin 基因 cDNA5'端序列(598 bp)重

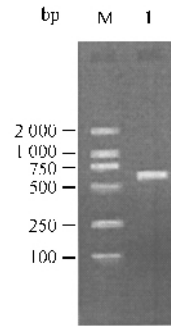


图 2 少棘蜈蚣 β -actin 基因 5'RACE 产物

Fig.2 5'RACE products of β -actin gene from

Scolopendra subspinipes

M :DNA 分子量标记 ; l :目标条带

M :DNA molecule weight marker ; l :targeted band

建的系统发生树(图 4)中,少棘蜈蚣与蜜蜂最先聚在一起,显示出相对较高的亲缘关系。此外,在系统树中,无脊椎动物位于树的基部,较早分化,而脊椎动物则处于系统树的末端,分化较晚。

3 讨 论

对中药蜈蚣的研究表明,其具有抗惊厥、抗炎、抗肿瘤和抗衰老等作用,对心血管系统和免疫功能也有一定的影响^[1]。但蜈蚣的药用研究主要处于整体用药和基本成分的分离鉴定及生物活性测定阶段。蜈蚣毒无论是化学组成还是药理作用都与蜈蚣全虫的有所不同^[2]。对蜈蚣毒素的组成、生物学活性和作用机理研究以及综合开发利用尚未形成规模,其研究远远落后于蛇、蝎、蜂、蜘蛛等其它有毒动物的毒素^[3,4]。

韩国 Sohn 构建的是少棘蜈蚣全虫 cDNA 文库,以而本实验的目的是在将来的工作中获取毒蛋白质或多肽的基因,无疑毒腺里此类基因的丰度较高,所以作者首次构建了少棘蜈蚣毒腺 cDNA 文库,为从毒液中分离纯化蛋白质及多肽后,利用基因工程手段重组蛋白质或多肽奠定基础,亦为将来从蜈蚣毒中开发出抗衰老、镇痛、麻醉、抗菌和杀虫药物,开发生物学和医学研究中的工具试剂(或工具酶)等做准备。

```

1  C AGG AGA CAG GAG TTC GCT CAT ACG TGT TAC CCA GCT AGA AGT ATA ACA ACA ATG TGC GAC
l
                                     M C D
62  GAC GAG GTT GCT GCT CTG GTT GTT GAC AAT GGC TCC GGC ATG TGC AAG GCC GGG TTC CCC
4   D E V A A L V V D N G S G M C K A G F P
122 GGA GAC GAC GCT CCC CGA GCT GTA TTT CCT TCC ATG GTC GGC CGA CCC CGT CAT CAG GGT
24  G D D A P R A V F P S M V G R P R H Q G
182 GTC ATG GTG GGT ATG GGT CAA AAA GAC AGG TAC GTA GGC GAT GAG GCC CAG AGC AAG AGA
44  V M V G M G Q K D R Y V G D E A Q S K R
242 GGT ATT CTG TCT TTG AAA TAC CCA ATT GAG CAC GGA ATT GTG ACC AAC TGG GAC GAC ATG
64  G I L S L K Y P I E H G I V T N W D D M
302 GAG AAA ATC TGG CAT CAT ACC TTC TAC AAT GAA CTC CGA GTG GCC CCT GAG GAA CAC CCA
84  E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P
362 GTG CTG CTG ACT GAG GCC CCC CTG AAC CCC AAA GCC AAC AGG GAG AAG ATG ACC CAG ATC
104 V L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I
422 ATG TTT GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC GTA GCT ATC CAG GCC GTG CTG TCC CTG
124 M F E T F N T P A M Y V A I Q A V L S L
482 TAC GCC TCC GGT CGT ACG ACT GGT ATT GTG CTG GAC AGC GGT GAC GGT GTC TCC CAC ACT
144 Y A S G R T T G I V L D S G D G V S H T
542 GTC CCC ATT TAT GAA GGT TAC GCC CTT CCT CAC GTA TTC TGC GTT TGG ACT TGA CCG
164 V P I Y E G Y A L P H V F C V W T Z P

```

图 3 少棘蜈蚣 β -actin 基因 cDNA5'端序列及推导的氨基酸序列

Fig.3 cDNA 5'-end sequence and deduced amino acid sequence of β -actin gene from *Scolopendra subspinipes*

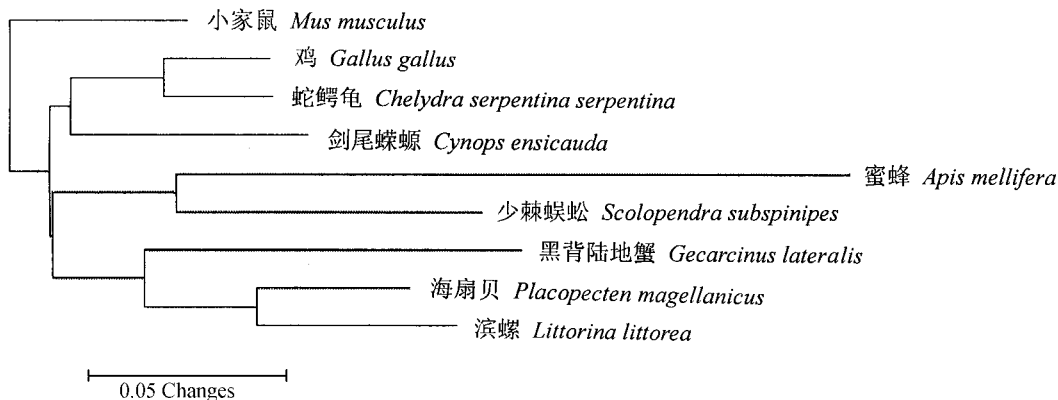


图 4 基于 β -actin 基因 cDNA5'端序列重建的几种动物的 NJ 分子系统树

Fig.4 Phylogenetic tree of several animal species reconstructed by Neighbor-joining (NJ) algorithm based on cDNA 5'-end sequence data of β -actin gene

Bar equals 0.05 (NJ) unit of Kimura's two-parameter distance

通过 PCR 技术,我们成功地从少棘蜈蚣的 cDNA 文库中扩增出 β -actin 基因 cDNA 5'端部分序列。通过 PCR 产物的序列测定和分析,显示所获得的扩增产物的确来自少棘蜈蚣的 β -

actin。序列变异比较发现,少棘蜈蚣的 β -actin 与蜜蜂的同源性最高。在基于 Kimura 双参数模型的 NJ 系统发生分析中,少棘蜈蚣也首先与蜜蜂聚为一支,同时无脊椎动物和脊椎动物分

别组成单系,从而较为正确地反映这些物种的系统发生关系,可见 β -actin 可作为生物物种进化的分子标志,值得进一步研究。这些均表明,本研究构建的文库,完全可以满足目的基因的克隆及其进一步比较分析的需要。

参 考 文 献

- [1] 张崇洲 王克勤. 两种药用蜈蚣的简介. 动物学杂志, 1996, **30**(4) : 51 ~ 53.
- [2] 王贤纯. 蜈蚣的药用研究进展. 动物学杂志, 2002, **37**(3) : 88 ~ 91.
- [3] You Weon-Kyoo, Sohn Young-Doug, Kim Ki-Yong, *et al.* Purification and molecular cloning of a novel serine protease from the centipede, *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2004, **34**(3) : 239 ~ 250.
- [4] Choi J K, Holtzer S, Chacko S A, *et al.* Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes. *Mol Cell Biol*, 1991, **11** : 4 473 ~ 4 482.
- [5] Labuhn M, Brack C. Age-related changes in the mRNA expression of actin isoforms in *Drosophila melanogaster*. *Gerontology*, 1997, **43** : 261 ~ 267.
- [6] Wolf C, Kruppa T, Dreier J, *et al.* Apidelimitation of GB virus C (hepatitis G virus) in the mosquito *Aedes aegypti*. *Microbes Infect* 2001, **3** : 683 ~ 687.
- [7] Kurusu M, Awasaki T, Masuda-Nakagawa L M, *et al.* Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II. *Development* 2002, **129** : 409 ~ 419.
- [8] 胡松年 阎隆飞. 肌动蛋白与真核生物的进化. 动物学报, 1999, **45**(4) : 440 ~ 447.
- [9] Jeanmougin F, Thompson J D, Gouy M, *et al.* Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trend Biochem Sci*, 1998, **23** : 403 ~ 405.
- [10] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 2001, **17** : 1 244 ~ 1 245.
- [11] 刘峰. 蜈蚣的临床应用及其毒性研究. 广西中医药, 1999, **22**(4) : 52.
- [12] 陶勇. 蜈蚣毒的研究进展. 中国生化药物杂志, 2000, **21**(2) : 94 ~ 95.
- [13] 聂东宋 梁宋平, 李敏. 动物肽类神经毒素基因工程研究进展. 湖南师范大学自然科学学报, 2002, **24**(1) : 78 ~ 83.
- [14] 李绍祥 李琦, 凌昌全. 蜂毒素的研究新进展. 中草药, 2001, **32**(10) : 942 ~ 945.