

卓城洁, 袁 萌, 伍文攀, 等. 家福捕鸟蛛毒腺 cDNA 文库构建及其毒素-16 序列和活性分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34( 1 ): 11-19.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.002

## 家福捕鸟蛛毒腺 cDNA 文库构建及其毒素-16 序列和活性分析

卓城洁, 袁 萌, 伍文攀, 邓娟华, 喻振国, 向小亮, 胡朝瞰

(怀化学院生物与食品工程学院/民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418008)

**摘要:** 家福捕鸟蛛(*Selenocosmia jiafu*)是一种生活在广西、云南等地的蜘蛛新种。为了阐明其毒素的分子多样性和筛选河豚毒素不敏感型(Tetrodotoxin-resistant, TTX-R)钠通道抑制剂,利用 SMART 法构建了毒腺全长 cDNA 文库,并进行 DNA 测序和表达序列标签(Expressed sequence tags, ESTs)聚类分析。结果表明家福捕鸟蛛毒腺双链 cDNA 条带分布在 300~3 000 bp。经测序得到 752 个高质量的 EST 序列,去冗余后得到 257 个唯一序列,其中毒素序列 438 条。家福捕鸟蛛毒素-16(Jiafu toxin-16, JF-16)是从家福捕鸟蛛粗毒中分离得到的 1 种分子量为 3 954.616 的哺乳类神经毒素,其全序列为 H<sub>2</sub>N-ECTKLLGGCTKSSECCPHLGCRKWPYHCGWDGTF-COOH。研究结果揭示 JF-16 的全长 cDNA 为 518 bp,编码 87 个氨基酸。全细胞膜片钳试验结果表明 JF-16 对大鼠背根神经节(Rat dorsal root ganglion, DRG)细胞 TTX-R 钠通道具有抑制作用。说明 JF-16 是一种潜在的具有镇痛活性的蜘蛛毒素。本研究有利于开展家福捕鸟蛛毒腺转录组研究和 JF-16 潜在镇痛活性分析。

**关键词:** 家福捕鸟蛛; 蜘蛛毒腺; cDNA 文库; 家福捕鸟蛛毒素-16

**中图分类号:** Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)01-0011-09

## Venom gland cDNA library construction from the spider *Selenocosmia jiafu* and sequence and activity analysis of Jiafu toxin-16

ZHUO Cheng-jie, YUAN Meng, WU Wen-pan, DENG Juan-hua, YU Zhen-guo, XIANG Xiao-liang, HU Zhao-tun

(College of Biological and Food Engineering, Huaihua College/Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Huaihua 418008, China)

**Abstract:** *Selenocosmia jiafu* (*S. jiafu*) is a new species of spider living in Yunnan and Guangxi Province of China. In order to investigate the toxin molecular diversity and screen for tetrodotoxin-resistant(TTX-R) sodium channel inhibitors from the crude venom of the *S. jiafu*, the full-length cDNA library of the venom gland was constructed by SMART method. Single clones were selected randomly for sequencing and the related expressed sequence tags(EST) sequences were analyzed by cluster. The results showed that the double-stranded cDNA bands of venom gland were distributed in the range of 300-3 000 bp. After sequencing, 752 high-quality ESTs were obtained and 257 of them were non-redundant. The 752 EST sequences included 438 toxin-like sequences. A novel mammal neuron toxin, named as Jiafu toxin-16 (JF-16), was purified from the crude venom of the spider *S. jiafu* by reversed

phase HPLC. The molecular weight of the toxin was 3 954.616 determined by MALDI-TOF-MS analysis and the sequence was: H<sub>2</sub>N-ECTKLLGGCTKSSECCPHLGCRKWPYHCGWDGTF-COOH determined by the amino acid sequence analysis. The results revealed the full-length cDNA

收稿日期: 2017-06-21

基金项目: 湖南省教育厅青年基金项目(13B087)

作者简介: 卓城洁(1995-), 女, 湖南邵阳人, 学士, 主要从事蜘蛛毒素相关研究。(E-mail) 1437417436@qq.com

通讯作者: 胡朝瞰, (E-mail) huzhaotun@163.com; 向小亮, (E-mail) xiangxiaoliang225@163.com

of JF-16 was 518 bp, coded 87 amino acids. Whole cell patch clamp analyses indicated that the JF-16 could inhibit TTX-R sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. The results showed that JF-16 was a spider toxin which had potential analgesic activity. The study is beneficial to carrying out the venom gland transcriptome of *S. jiafu* and potential analgesic activity analysis of JF-16.

**Key words:** *Selenocosmia jiafu*; spider venom gland; cDNA library; Jiafu toxin-16

近年来随着研究的不断深入,蜘蛛毒素的重要性日益显现。蜘蛛毒素的专一性和高效性使其成为潜在的新型药物、离子通道工具试剂和杀虫剂等领域重要的原料来源<sup>[1-2]</sup>,其在农业生物技术、神经生物学、蛋白质化学、天然药物开发等领域广泛应用。由于蜘蛛毒液分泌量很少,且其毒液是由很多性质不同、含量差异很大的成分组成的混合物,除了几个主要成分外,大多数成分在粗毒中含量很低,因此很难获得足够的单体毒素用于相关研究<sup>[3]</sup>。随着分子生物学的发展,利用毒腺 cDNA 文库的构建结合基因工程表达的方法可以有效解决毒素来源问题。近十年来,已经构建了很多有毒动物毒腺 cDNA 文库<sup>[4-9]</sup>,获得了大量的编码毒素的 ESTs 序列。

疼痛是世界医学面临的重大难题,也是急需攻克的顽固性疾病。目前,这种疾病严重影响到数百万人的生命<sup>[10]</sup>。研究发现电压门控钠通道的改变与炎性疼痛和神经病理性疼痛密切相关<sup>[11]</sup>。能阻断这些钠通道亚型的成分具有开发成为治疗疼痛的药物分子的潜能。由于蜘蛛毒素是一类主要作用于离子通道及具有特定药理学特性的多肽毒素<sup>[12-13]</sup>,因此,从蜘蛛粗毒中筛选一些治疗疼痛的药物分子成为研究人员梦寐以求的事情。家福捕鸟蛛是一种生活在广西、云南等地的蜘蛛新种。本实验室最先对该蜘蛛毒素进行了研究<sup>[14]</sup>。目前,未见家福捕鸟蛛毒腺 cDNA 文库相关研究的报道。为了阐明家福捕鸟蛛毒素的分子多样性和获得其毒素序列,构建了一个定向的毒腺全长 cDNA 文库,获得了 752 条高质量的 EST 序列,并开展了 EST 聚类分析。另外,从家福捕鸟蛛粗毒中筛选到了 1 种对 DRG 细胞 TTX-R 钠通道具有明显抑制作用的毒素分子(命名为 JF-16),并对该毒素进行了序列分析和活性测定。这些试验的开展为家福捕鸟蛛毒腺转录组以及 JF-16 潜在镇痛活性分析奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 家福捕鸟蛛捕自广西宁明县、SD

大鼠购于中南大学湘雅医学院动物房。

1.1.2 试剂 cDNA 文库试剂盒为 Clontech 公司产品,Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品,DNA Marker、焦碳酸二乙酯、氯霉素、NaOH、葡萄糖、冰乙酸、KCl、MgCl<sub>2</sub>、溴化乙锭、溴酚蓝、甘油、蛋白酶 K、乙醇、氯仿、异丙醇等购自上海生工生物工程有限公司,RNase Free 的枪头和离心管为 Axygen 公司产品,三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA)、河豚毒素、 $\alpha$ -氰基-4-羟基-肉桂酸(CCA)、胰蛋白酶、胶原酶、胰蛋白酶抑制剂、HEPES、EGTA、D-glucose、氯化铯、氢氧化铯等购自 Sigma 公司,色谱纯乙腈购自湖南化工研究所,其他为国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器 PCR 仪和电泳仪均为 bio-rad 公司产品,MALDI-TOF-TOF 质谱仪为 Bruker 公司产品,U-2000 型紫外-可见分光光度计购自 Hitachi 公司,真空冷冻干燥机为 Thermo Savant 公司产品,Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪为美国 Waters 公司产品,EPC-10 膜片钳仪为德国 HEKA 公司产品,491 型蛋白质测序仪为美国 Applied Biosystem 公司产品,高速冷冻离心机为德国 Eppendorf 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与分析 将解剖的家福捕鸟蛛毒腺加入到研钵中液氮研磨 30 min 至粉状。采用 Trizol 试剂提取总 RNA,用核酸测定仪测定总 RNA 在 260 nm、280 nm 处的吸光值,计算  $OD_{260}/OD_{280}$  的值。总 RNA 的纯度和完整性通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳来检测。

1.2.2 家福捕鸟蛛毒腺 cDNA 文库构建 以总 RNA 为模板,按照 SMARTTM cDNA Library Construction Kit (Clontech) 试剂盒说明书方法合成 cDNA 第一条链,采用 LD-PCR 法扩增合成双链 cDNA。将合成的双链 cDNA 进行蛋白酶 K 消化及 *Sfi*I 酶切。酶切后双链 cDNA 用 CHROMASPIN-400 柱分级分离,选取优化的 cDNA 用 T4 DNA 连接酶连接到载体。用电转化法将连接产物转化到宿主菌 *E. coli* HST08,将转化后的宿主菌接种到含氯霉素的 LB 培养基中培养,

获得家福捕鸟蛛毒腺 cDNA 文库。

**1.2.3 cDNA 文库的滴度测定和插入片段检测** 从文库中取 1.0  $\mu\text{l}$  细菌培养液,分别稀释不同倍数,再从中取 1  $\mu\text{l}$  稀释菌液与 200  $\mu\text{l}$  LB 液体培养基混匀后分别涂布于含氯霉素的 LB 固体培养基上,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12~16 h 后计算菌落生长个数并计算文库滴度。随机选取 16 个单克隆进行 PCR 扩增试验得到插入片段。PCR 反应程序如下:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min,30 个循环;4  $^{\circ}\text{C}$  冷却。反应完成后,取 5  $\mu\text{l}$  产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。将符合要求的单克隆菌落送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

**1.2.4 EST 序列分析和功能预测** 将测序的序列处理后得到高质量的 EST 序列。利用 DNASTar 软件对 EST 序列进行聚类分析。应用在线分析软件 Translate tool (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>)对测序获得的 EST 序列进行编码蛋白质氨基酸序列分析。EST 及其编码的蛋白质氨基酸序列与公共数据库进行 Blast 比对,可以获取与目的序列匹配的序列信息及功能注释。

**1.2.5 家福捕鸟蛛毒液采集和 JF-16 的分离纯化** 按文献[3]的方法采集毒液,采集得到的家福捕鸟蛛毒液冷冻干燥后为粗毒。粗毒用超纯水配制成浓度为 10 mg/ml 的溶液,8 000 r/min 离心 15 min。毒液经 RP-HPLC 分离纯化,上样量为 100  $\mu\text{l}$ 。反相柱为  $\text{C}_{18}$  柱 (Phenomenex 100  $\text{\AA}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。洗脱液 A 为含 0.1 % TFA 的水溶液,洗脱液 B 为含 0.1% TFA 的乙腈溶液。在 50 min 内 0~50%洗脱液 B 的线性梯度洗脱,流速为 1.0 ml/min,柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ,在 215 nm 下收集洗脱峰冷冻干燥或质谱分析。

**1.2.6 JF-16 的 MALDI-TOF 分析** 质谱分析在 MALDI-TOF 质谱仪上进行。 $\text{N}_2$ 激光器,离子源加速电压为 20 kV,检测电压 16.5 kV,激光波长 337 nm,阳离子模式。用含 0.1 % TFA 的 50 % 乙腈溶液溶解 CCA 基质至终浓度为 10 mg/ml,取 0.5  $\mu\text{l}$  样品与 1.0  $\mu\text{l}$  CCA 基质液混合,再取 0.5  $\mu\text{l}$  混合液点样室温干燥后质谱鉴定。使用外标(混合标准样品)进行校正。

**1.2.7 大鼠背根神经节细胞的急性分离培养** 参照文献[15]的方法进行。

**1.2.8 钠电流的全细胞膜片钳记录** 将细胞培养液更换为细胞外液,20~25  $^{\circ}\text{C}$  置于倒置显微镜下选择质膜光滑饱满的细胞进行全细胞模式(Whole-cell)膜片钳试验。玻璃电极经电极拉制仪(PC-10, Narishige)两步拉制后热抛光,加电极内液后电阻为 1.8~3.0 M $\Omega$ 。电极内液:CsCl 145 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  4 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 10 mmol/L, D-Glucose 10 mmol/L, ATP-Mg 2 mmol/L, 用 1 mol/L CsOH 调节 pH 至 7.2。细胞外液:NaCl 145.0 mmol/L, KCl 2.5 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  1.5 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  1.2 mmol/L, HEPES 10.0 mmol/L, D-glucose 10.0 mmol/L, 用 1 mol/L NaOH 调至 7.2。2 种溶液都用蔗糖调至 280 mOsm/L。试验细胞形成稳定电流后经过 3 kHz 和 10 kHz 的双重过滤,采用 P/4 程序删除电容电流和线性漏电流。采用低压微量进样器施加毒素。毒素先配制成 1 mmol/L 的母液, -20  $^{\circ}\text{C}$  储存。试验时稀释至目的浓度,加药剂量为 10  $\mu\text{l}$ 。

**1.2.9 JF-16 的氨基酸序列测定** 氨基酸序列分析是利用 Edman 降解原理,在 Perkin Elmer Procise 491A 型气相测序仪上进行的。选用碘乙酰胺烷基化修饰后的毒素肽作为测序样品。根据毒素分子量大小设定测序循环数。

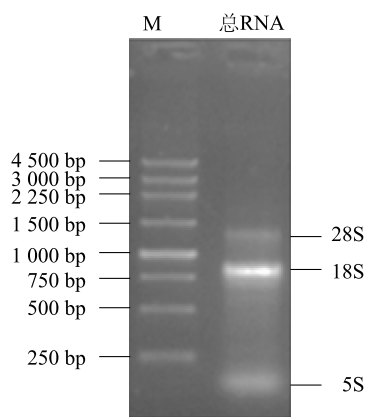
**1.2.10 JF-16 的 cDNA 序列分析** 根据 JF-16 Edman 降解测定的氨基酸序列和 EST 编码的蛋白质氨基酸序列比对,找到 JF-16 的 cDNA 序列。应用在线分析软件 SignalP 4.1 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行 JF-16 前体信号肽预测。根据 Von 等<sup>[16]</sup>的方法确定 JF-16 前体肽酶切割位点。根据在线分析软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)计算 JF-16 成熟肽序列的理论等电点和理论分子量。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 的提取与分析

Trizol 提取的家福捕鸟蛛毒腺总 RNA 经紫外分光光度计检测,测得总 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280} = 1.87$ ,比值在 1.8~2.0,说明家福捕鸟蛛毒腺总 RNA 纯度较好。总 RNA 浓度为 0.49  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。总 RNA 经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后显示出 28S、18S 和 5S 3 个条带(图 1)。从图谱中没有发现明显的拖尾现象,表明家福捕鸟蛛毒腺总 RNA 提取成功。





M: Marker。

图 1 家福捕鸟蛛毒腺总 RNA 电泳图

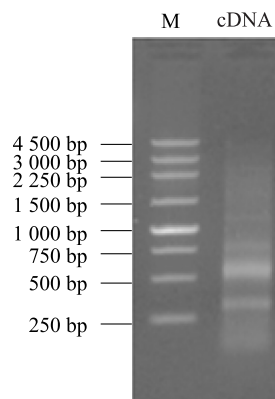
Fig.1 Electrophoresis of total RNA from venom glands of *Selatosmia jiafu*

## 2.2 双链 cDNA 的合成和片段大小的选取

取 1.0  $\mu\text{g}$  总 RNA 进行逆转录合成第一链,再以第一链产物为模板通过长距离 PCR 合成双链 cDNA。双链 cDNA 产物经琼脂糖凝胶电泳结果显示,条带分布在 300~3 000 bp,且在 400~750 bp 区域形成亮带(图 2)。双链 cDNA 经蛋白酶 K 和 *Sfi*I 酶切消化,再通过 CHROMASPIN-400 柱分离并收集液滴,最后从每 1 管中取出适量样品进行琼脂糖凝胶电泳检测,保留 400~750 bp(短片段部分,主要是毒素基因)和 750~2 000 bp(长片段部分,主要是细胞蛋白基因)两部分(图 3)。保留这两部分片段是基于下列考虑:研究发现蜘蛛毒素主要是由 20~65 个氨基酸残基组成的多肽类毒素。根据毒素氨基酸残基数目大致估计其前体肽的大小,再加上 5'端非编码区和 3'端非编码区部分,最终估算家福捕鸟蛛毒素 cDNA 片段大小大致在 400~750 bp。另外,蜘蛛毒腺完成毒液的合成和分泌等生命活动需要很多相关蛋白质参与。因此,保留长片段部分是为了得到相关蛋白质的信息,以期对蜘蛛毒腺分泌毒液的机理有初步的了解。

## 2.3 文库库容和插入片段大小分析

将家福捕鸟蛛毒腺 cDNA 进行放大培养检测,结果显示短片段部分 cDNA 文库的初级文库滴度为  $2.0 \times 10^7$  CFU/ml,长片段部分 cDNA 文库的初级文库滴度为  $1.4 \times 10^6$  CFU/ml,均符合 cDNA 文库构建的要求(一般要求文库滴度在  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml 以上即为有效库容)。长片段和短片段各随机抽取 16 个克隆进行插入片段大小检测。图 4 为插入片段电泳检测图,从图中



M: Marker。

图 2 家福捕鸟蛛毒腺双链 cDNA 电泳图

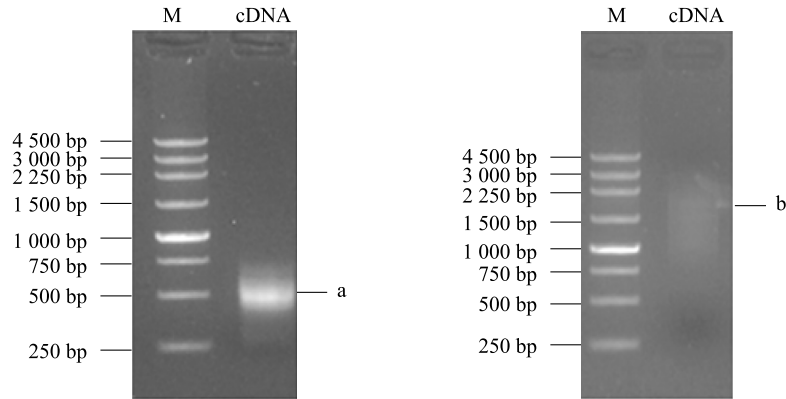
Fig.2 Electrophoresis of double-stranded cDNA from venom glands of *S. jiafu*

可知短片段长度为 400~750 bp,平均长度约 500 bp,长片段长度为 750~2 000 bp,平均长度为 1 500 bp。

## 2.4 EST 序列分析和功能预测

选取 899 个短片段菌落和 400 个长片段菌落送北京六合华大基因科技股份有限公司测序,最后获得高质量的 EST 序列 752 条。752 条 EST 经聚类分析得到 257 个唯一序列(Unique sequence),其中 61 个重叠群(Contigs)和 196 个单一序列(Singletons)。61 个重叠群中,2 个重叠群包含 50 条以上的 ESTs,4 个重叠群包含 20~49 条 ESTs,9 个重叠群包含 10~19 条 ESTs,46 个重叠群包含 2~9 条 ESTs。752 条 EST 序列中毒素序列 438 条(毒素序列必须同时满足 2 个条件:序列含有信号肽和含有 4 个或 4 个以上半胱氨酸),普通蛋白序列 220 条,另外有 94 条序列没有匹配到相似的序列。

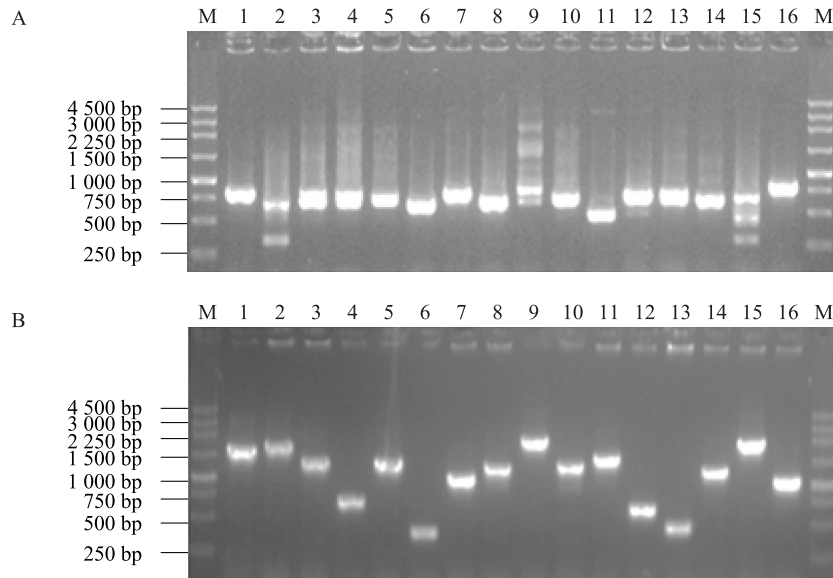
EST 序列的丰度能反映该转录组的蛋白质表达情况。因此,按 EST 序列重复数高低将 EST 序列的丰度分成 5 个区段。(1)  $\geq 50$  ESTs:包含 2 个重叠群,每个重叠群含 50 条以上的 EST 序列,这是家福捕鸟蛛毒腺转录组中最丰富的部分,该 2 族占有所有族的比例为 0.78% (2/257),而所包含的 EST 序列占整个 EST 序列的比例却高达 21.94% (165/752),这 2 个重叠群全部是毒素基因。(2) 20~49 ESTs:包含 4 个重叠群,该 4 族占有所有族的比例为 1.56% (4/257),而所包含的 EST 序列占整个 EST 序列的比例为 16.62% (125/752),这 4 个重叠群全部是毒素基因。(3) 10~19 ESTs:包含 9 个重叠群,



M:Marker; a:400~750 bp;b:750~2 000 bp。

图3 家福捕鸟蛛毒腺双链 cDNA 柱分离后电泳图

Fig.3 Electrophoresis of double-stranded cDNA from venom glands of *S. jiafu* by column separation



A:400~750 bp 插入片段电泳图;B:750~2 000 bp 插入片段电泳图。

图4 家福捕鸟蛛毒腺 cDNA 文库插入片段电泳图

Fig.4 Electrophoresis of the inserted fragments of cDNA library from venom glands of *S. jiafu*

该9族占有所有族的比例为3.50%(9/257),而所包含的EST序列占整个EST序列的比例为15.03%(113/752),这9个重叠群中有7个重叠群是毒素基因,2个重叠群是普通细胞蛋白基因。(4)2~9 ESTs;包含46个重叠群,该46族占有所有族的比例为17.90%(46/257),而所包含的EST序列占整个EST序列的比例为20.35%(153/752),这46个重叠群中有11个重叠群是毒素基因,另外35个重叠群为普通细胞蛋白基因。(5)1 EST:196个单拷贝序列,其所占族的比例为76.26%(196/257),而所包含的

EST序列占整个EST序列的比例为26.06%(196/752),这196个单一序列中有9个是毒素基因,另外187个是普通细胞蛋白基因。因此,家福捕鸟蛛毒腺转录组中绝大部分的单一序列基因为非毒素基因。

## 2.5 JF-16 的分离纯化、分子量和活性鉴定

图5为家福捕鸟蛛粗毒反相高效液相色谱图。粗毒经RP-HPLC后得到40多个色谱峰,采用全细胞膜片钳技术将各个色谱峰进行TTX-R通道活性筛选。发现保留时间为29.81 min的标注为16的

色谱峰(命名 JF-16)经全细胞膜片钳检测,对 DRG 细胞 TTX-R 通道电流具有抑制作用。JF-16 膜片钳活性鉴定时,先往细胞外液中加入 200 nmol/L TTX,将 DRG 细胞上记录的河豚毒素敏感性(Tetrodotoxin-sensitivity, TTX-S)钠电流阻断。选取小直径(< 10  $\mu\text{m}$ )的 DRG 细胞进行膜片钳试验,将膜电位控制在 -80 mV,给予脉冲宽度为 50 ms,以 10 mV 步幅递增的去极化电压刺激引出 DRG 细胞 TTX-R 电流,再加入 JF-16 进行全细胞膜片钳 TTX-R 通道活性的测定。结果发现 JF-16 对 DRG 细胞上 TTX-R 通道具有抑制作用。浓度为 400 nmol/L 的 JF-16 大约抑制  $36.17\% \pm 3.2\%$  ( $n=5$ ) TTX-R 钠通道电流,当 JF-16 浓度增到 1  $\mu\text{mol/L}$  时大约能抑制  $49.89\% \pm 4.70\%$  ( $n=5$ ) 的 TTX-R 钠通道电流(图 6A)。JF-16 经 MALDI-TOF 鉴定分子量为 3 954.616(图 6B)。

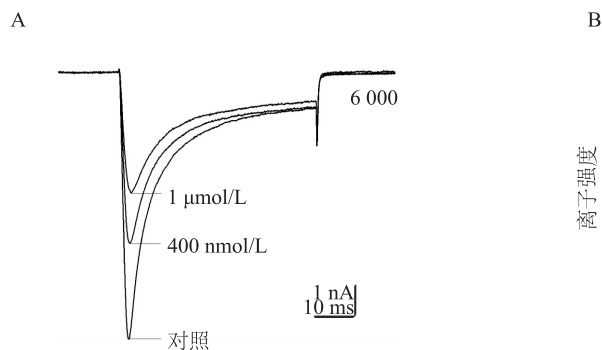


图 6 JF-16 对大鼠 DRG 细胞 TTX-R 钠电流的影响(A)及其质谱分析图谱(B)

Fig.6 Effects of JF-16 on TTX-R sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons (A) and MALDI-TOF mass analysis (B)

众所周知,DRG 细胞表达的 TTX-R 钠电流为 Nav1.8 和 Nav1.9 电流,其中以 Nav1.8 为主。这 2 类钠通道电流也是目前研究的热点。Nav1.8 被认为和神经性疼痛相关<sup>[10]</sup>,而 Nav1.9 通过调节神经元的兴奋性从而与炎症反应和疼痛调节紧密相关<sup>[17]</sup>。Nav1.8 主要在小直径和中等直径感觉神经元上高表达,可被阈上电位激活,且呈现缓慢激活,缓慢失活及快速去失活的动力学特征,从而介导大量钠离子内流引起细胞膜快速去极化,因此是动作电位上升相的主要电流成分<sup>[18]</sup>。大量研究结果表明 Nav1.8 在机体炎症、神经病理性以及多种伤害性刺激诱发的疼痛中具有重要作用,因此靶向 Nav1.8 已成为新型镇痛药研发的新策略和热点<sup>[19-20]</sup>。由于 JF-16 能够抑制 DRG 细胞 TTX-R 钠通道电流,因

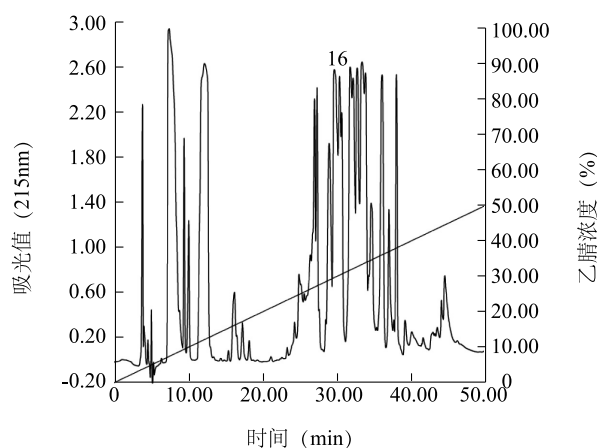
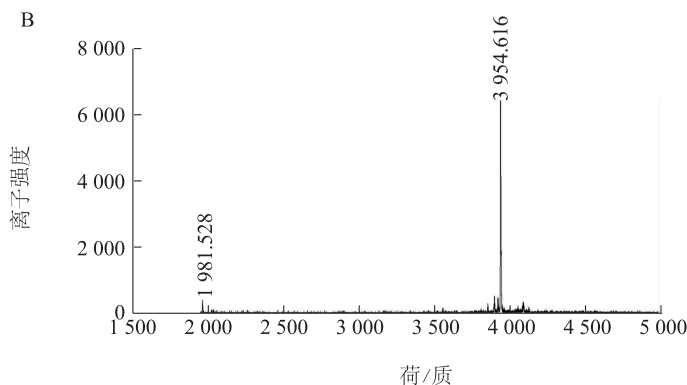


图 5 JF-16 反相高效液相色谱图

Fig.5 Reversed phase-HPLC of JF-16



此,JF-16 是一个潜在的可能具有镇痛活性的毒素分子。

## 2.6 JF-16 的序列测序与分析

通过 Edman 降解法进行全序列测定,发现 JF-16 是 1 个由 35 个氨基酸残基组成的多肽,全序列为:  $\text{H}_2\text{N-ECTKLLGGCTKSSECCPHLGCRKWPYH-CGWDGTF-COOH}$ ,序列中包含有 6 个 Cys。根据在线分析软件计算得到该序列的理论分子量为 3 960.5,这与质谱鉴定所测定的值相差约 6.0,表明该多肽分子的 6 个半胱氨酸残基形成了 3 对二硫键。该序列中包含 3 个极性带负电荷的酸性氨基酸(1Asp+2 Glu)和 5 个极性带正电荷的碱性氨基酸(2Arg+3Lys),碱性氨基酸数大于酸性氨基酸数使得整个多肽分子偏碱性,这与在线分析软件计算出

的该序列理论等电点为 8.35 相符。

## 2.7 JF-16 的 cDNA 序列分析

根据 JF-16 Edman 降解测定的氨基酸序列和 EST 编码的蛋白质氨基酸序列比对,找到编码 JF-16 的 cDNA 序列。研究发现 JF-16 的全长 cDNA 为 518 bp,其中开放阅读框 ORF 长 261 bp,编码 87 个氨基酸(前体肽)。5'-端非翻译区(5'-UTR)长 116 bp, 3'-端非翻译区(3'-UTR)长 141 bp, 具有典型的 polyA 尾结构。信号肽预测结果显示,在前体肽 N 末端含有 1 个 21 个氨基酸组成的信号肽序列,切

割位点位于 21 位 A 和 22 位 A 之间。起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA。前体肽具有典型的“EER”蛋白酶水解位点(48~50)和酰胺化标记残基“GF”(86,87)。毒素前体被蛋白水解酶在“EER”位点水解为成熟肽储存于毒囊中, 尾部的 2 个酰胺化标记氨基酸残基“GF”也会切割。最终形成由 35 个氨基酸组成的成熟肽, 与 Edman 降解法测定的序列完全吻合。JF-16 的 cDNA 序列及其编码的蛋白质氨基酸序列见图 7。



灰色部分表示信号肽序列(1~21);下划线表示蛋白水解酶位点(EER);▲表示保守的半胱氨酸残基;\*表示终止密码子。

图7 JF-16 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

**Fig.7 Deduced amino acid sequence and cDNA sequence of JF-16**

### 3 讨论

cDNA 文库构建是研究基因功能和发现新基因的主要技术方法,而高质量的 RNA 是 cDNA 文库构建成功的必要条件。本试验采用 Trizol 法提取家福捕鸟蛛毒腺总 RNA,所提取的毒腺总 RNA 经电泳检测未见明显的降解,纯度和含量都符合要求,表明家福捕鸟蛛毒腺总 RNA 提取成功。影响文库质量的另一个因素是构建方法的选择。本试验采用 SMART 法构建了家福捕鸟蛛毒腺 cDNA 文库。SMART 法是 Clontech 公司发明的一种全长 cDNA 文库构建方法,具有以下优点<sup>[21]</sup>:(1)文库构建时所需 mRNA 量少,一般只需要 0.5~1.0 μg;(2)文库构建过程中 mRNA 不会损耗和降解;(3)试验快速

和简便。cDNA 文库构建后进行了文库滴度和 cDNA 片段大小的检测分析,发现构建的文库滴度和获得的插入片段大小均符合文库构建的要求,表明家福捕鸟蛛毒腺 cDNA 文库构建成功。

BLAST 序列比对发现 JF-16 与敬钊缨毛蛛部分毒素<sup>[22]</sup>及一种生活在澳大利亚的捕鸟蛛 *Phlogius* sp. 毒素分子  $\mu$ -TRTX-Phlo1a,  $\mu$ -TRTX-Phlo1b 相似性很高<sup>[23]</sup>。这些毒素分子的 Cys 不但高度保守且位置也基本相同, 为第 2、第 9、第 15、第 16、第 21、第 29 位, 第 15 和第 16 位 Cys 紧密相邻。其他很多氨基酸残基也高度保守, 如第 7 位的 Gly, 第 18、第 19 位的 His、Leu, 第 24、第 25 位的 Lys、Trp, 第 26 位的 Pro, 第 31、第 32 位的 Trp、Asp。BLAST 比对发现 JF-16 与 JZTX-9 有高达 94% 的序列相似性<sup>[24]</sup>。



JZTX-9 是一个含有 6 个半胱氨酸, 由 35 个氨基酸残基组成的 C 端酰胺化的多肽分子。与 JZTX-9 相比, JF-16 的第 12 位由极性带负电荷的酸性氨基酸 Asp 变成极性不带电荷的中性氨基酸 Ser, 第 21 位由极性带正电荷的碱性氨基酸 Lys 变成 Arg。因此, JF-16 的理论等电点会高于 JZTX-9。JZTX-9 空间结构属于典型的抑制型胱氨酸结构 (Inhibitor cystine knot, ICK) 模体, 由于 JF-16 与 JZTX-9 序列相似性很高, 推断 JF-16 的空间结构也很可能属于 ICK 模体。

由于 JF-16 对 DRG 细胞上 TTX-R 钠通道电流具有抑制作用, 因此, 可以将 JF-16 作为一个潜在的镇痛药物开展相关研究。当然, JF-16 对 DRG 细胞上 TTX-R 钠电流具有抑制作用并不意味着 JF-16 就能够成为镇痛药物。首先, JF-16 开发成为镇痛药物分子需要其具有高度的专一性。近十年来, 在靶向 Nav1.8 镇痛新药研发领域, 国际上主要集中在专一性抑制剂的发现和作用机制研究。虽然取得一些进展<sup>[25-26]</sup>, 但是国际上该研究领域进展缓慢, 具有应用前景的 Nav1.8 专一性抑制剂很少。其次, JF-16 必须具有高效低毒性的特性。另外, 本研究只开展了 JF-16 对 DRG 细胞上 TTX-R 钠通道活性的初步检测, 未开展通道的分子水平作用机理研究, 后续可以开展这方面的研究。

#### 参考文献:

- [1] ESCOUBAS P, DIOCHOT S, CORZO G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins [J]. *Biochimie*, 2000, 82(9/10): 893-907.
- [2] ESCOUBAS P, BOSMANS F. Spider peptide toxins as leads for drug development [J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2007, 2(6): 823-883.
- [3] LIANG S P. An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)] [J]. *Toxicon*, 2004, 43(5): 575-585.
- [4] CHATRATH S T, CHAPEAUROUGE A, LIN Q, et al. Identification of novel proteins from the venom of a cryptic snake *Drysdalia coronoides* by a combined transcriptomics and proteomics approach [J]. *Journal Proteome Research*, 2011, 10(2): 739-750.
- [5] RUIMING Z, YIBAO M, YAWEN H, et al. Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 452.
- [6] DIEGO-GARCIA E, PEIGNEUR S, CLYNEN E, et al. Molecular diversity of the telson and venom components from *Pandinus cavi-*
- manus* (Scorpionidae Latreille 1802): Transcriptome, venomics and function [J]. *Proteomics*, 2012, 12(2): 313-328.
- [7] REMIGIO E A, DUDATF J R. Evolution of ecological specialization and venom of a predatory marine gastropod [J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17(4): 1156-1162.
- [8] ZHANG Y Q, CHEN J J, TANG X, et al. Transcriptome analysis of the venom glands of the Chinese wolf spider *Lycosa singoriensis* [J]. *Zoology (Jena)*, 2009, 113(1): 10-18.
- [9] DIEGO-GARCIA E, PEIGNEUR S, PEIGNEUR S, et al. Venom components from *Citharischius crawshayi* spider (Family Theraphosidae): exploring transcriptome, venomics, and function [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(16): 2799-2813.
- [10] HARRIOTT A M, GOLD M S. Contribution of primary afferent channels to neuropathic pain [J]. *Current Pain and Headache Reports*, 2009, 13(3): 197-207.
- [11] AMIR R, ARGOFF C E, BENNETT G J, et al. The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain [J]. *Journal of Pain*, 2006, 7 (Suppl 5): 1-29.
- [12] 梁海勇, 李 骞, 陈金军. 蜘蛛毒素研究进展 [J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(19): 2612-2613.
- [13] 浦飞飞, 尹 松, 王晓英. 蜘蛛毒素的生物学活性研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(12): 1651-1654.
- [14] HU Z T, ZHOU X, CHEN J, et al. The venom of the spider *Selenocosmia jiafu* contains various neurotoxins acting on voltage-gated ion channels in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Toxins (Basel)*, 2014, 6(3): 988-1001.
- [15] 邱 方, 刘艳红, 姜雨鸽, 等. 用于膜片钳研究的大鼠背根神经节细胞急性分离技术的改良 [J]. *北京医学*, 2012, 34(8): 719-722.
- [16] VON HEIJNE G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1983, 133(1): 17-21.
- [17] QIAO G F, LI B Y, ZHOU Y H, et al. Characterization of persistent TTX-R Na<sup>+</sup> currents in physiological concentration of sodium in rat visceral afferents [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5(3): 293-297.
- [18] CATTERALL W A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology [J]. *Journal of Physiology*, 2012, 590(11): 2577-2589.
- [19] FABER C G, LAURIA G, MERKIES I S, et al. Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(47): 19444-19449.
- [20] ROWE A H, XIAO Y, ROWE M P, et al. Voltage-gated sodium channel in grasshopper mice defends against bark scorpion toxin [J]. *Science*, 2013, 342(6157): 441-446.
- [21] 董志敏, 张宝石, 关荣霞, 等. 全长 cDNA 文库的构建方法 [J]. *中国农学通报*, 2006, 22(2): 51-55.
- [22] CHEN J J, DENG M C, HE Q Y, et al. Molecular diversity and evolution of cystine knot toxins of the tarantula *Chilobrachys jing-*



- zhao [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(15): 2431-2444.
- [23] CHOW C Y, CRISTOFORI-ARMSTRONG B, UNDHEIM E A, et al. Three peptide modulators of the human voltage-gated sodium channel 1.7, an important analgesic target, from the venom of an australian tarantula [J]. Toxins (Basel), 2015, 7(7): 2494-2513.
- [24] DENG M C, KUANG F, SUN Z H, et al. Jingzhaotoxin-IX, a novel gating modifier of both sodium and potassium channels from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao* [J]. Neuropharmacology, 2009, 57(2): 77-87.
- [25] THEILE J W, CUMMINS T R. Recent developments regarding voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of inherited and acquired neuropathic pain syndromes [J]. Frontiers in Pharmacology, 2011, 2(54):54.
- [26] ZULIANI V, RAPALLI A, PATEL M K, et al. Sodium channel blockers: a patent review (2010-2014) [J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2015, 25(3):279-290.

(责任编辑:陈海霞)