

# 蜘蛛牵引丝蛋白 cDNA 的扩增、克隆与序列分析

张立树<sup>1</sup> 马鹤雯<sup>2\*</sup> 陆一鸣<sup>2</sup> 张玉静<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 解放军军需大学军事兽医研究所, 长春 130062)

<sup>2</sup> 解放军军需大学军事兽医系, 长春 130062)

关键词 牵引丝, *Nephila clavata*, 嵌套 PCR, 克隆

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0641-03

蜘蛛是一种能在同一生物体内产生具有不同功能的多种丝的生物。蜘蛛丝的本质是蛋白质。牵引丝(Dragline silk)是由蜘蛛的主壶腹腺(Major ampullate, MA)产生的,其较高的抗张强度( $4 \times 10^9 \text{ N/m}^2$ )与弹性(35%)<sup>[1,2]</sup>,使之成为一种有广阔应用前景的生物材料。目前,国外已有实验室通过构建 cDNA 文库的方法获得 *Nephila clavipes* 中的两个牵引丝蛋白 Spidroin1 与 Spidroin2 的 cDNA 片段<sup>[3,4]</sup>;但国内尚未见有相关报道。本文介绍的工作是利用简单便捷的 PCR 技术对牵引丝蛋白 cDNA 序列进行扩增,并利用生物信息学软件对克隆片段进行序列分析,从而证明所获得的基因片段为 *Nephila clavata* 牵引丝蛋白 Spidroin2 的 cDNA 片段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验选取络新妇属蜘蛛 *Nephila clavata* 为研究对象,对蜘蛛进行剖解并剥离获得主壶腹腺<sup>[5]</sup>。用无 RNA 酶的水将腺体冲洗干净。

### 1.2 方法

1.2.1 参考 *Nephila clavipes* 牵引丝的核苷酸序列<sup>[4]</sup>,设计引物:

- 引物 1 5'-GGT GGT GCC GGA CAA GGA GGT T-3';
- 引物 2 5'-GAC AAG GCC GCA GAA TTA GTA GGA-3';
- 引物 3 5'-TGG ACC AGG ACA ACA AGG ACT ATC-3';
- 引物 4 5'-GCC AAT TTG AGA CAC AGC GTT ACT-3'

1.2.2 按 RT-PCR 与嵌套 PCR 等方法<sup>[6]</sup>由总 RNA 中扩增获得目的基因并对之进行克隆和核苷酸序列分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR 鉴定、酶切鉴定以及核苷酸序列测定

PCR 鉴定、酶切鉴定均表明获得预期目的 DNA 片段的克隆核苷酸序列测定结果及预期的氨基酸序列分析结果见图 1。

对测序结果的预期氨基酸序列进行排列,从中找出氨基

酸排列的规律(图 2)。由图 2 可见,N 端的 259 个氨基酸中存在着较高的重复性,同 *Nephila clavipes* 蜘蛛的牵引丝蛋白 Spidroin2 基因(Genbank Accession No. M92913)的氨基酸序列(图 3)相比,二者具有完全相同的氨基酸重复序列:GPGGY, GPGQQ 及 GPSGPGSA。

对两个序列 C 端的 42 个氨基酸(图 4)进行比较,发现二者具有完全相同的氨基酸序列,保守性极高。将克隆所得 cDNA 序列提交至 GenBank,获得的登录号为 AF441245。

### 2.2 密码子使用情况分析

克隆的 cDNA 片段中,密码子在使用上具有高度的选择性,即在密码子的第 3 位碱基上避免使用 G 或 C。以出现次数较多的氨基酸 G、A、P、Q 为例,密码子第 3 位碱基为 A/T 与为 G/C 的比例分别是 83:8、57:17、38:4、21:3。这一点同以往文献的报道是一致的<sup>[4]</sup>。

### 2.3 预期氨基酸序列的二级结构分析

使用 DNASTar 生物信息学软件对克隆 cDNA 片段的预期氨基酸序列进行二级结构分析。依据 Garnier-Robson(RG)统计方法推测预期氨基酸序列中几乎没有  $\alpha$ -螺旋的存在,但却存在着大量  $\beta$ -片层结构,尤以多聚丙氨酸区域显著。分析还表明在这段氨基酸序列中的  $\beta$ -片层间还分别存在着许多  $\beta$ -转角结构。而依据 Chou-Fasmar(CF)统计方法的结构却表明此段氨基酸序列中存在着一定数量的  $\alpha$ -螺旋, $\beta$ -片层则主要出现在氨基酸序列的-COOH 端。此外,CF 方法还表明存在着大量的  $\beta$ -转角和无规卷曲。

## 3 讨论

本实验以蛛丝性能较佳的 *Nephila clavata* 蜘蛛为实验动物<sup>[7]</sup>利用较为简单经济的 RT-PCR 技术获得其牵引丝蛋白 Spidroin2 cDNA,这在国内外尚属首次。结合图 1 至图 4 可见,克隆所得之 cDNA 编码的肽段 1)富含丙氨酸、丝氨酸及甘氨酸,完全符合丝蛋白的氨基酸组成特点<sup>[8]</sup>;2)存在着与 Spidroin2 相同的氨基酸重复序列 GPGGY, GPGQQ 及 GPSGPG-

5'	GGA CCA GGA CAA CAA GGA CUA UCA GGC CCA GGA AGU GCU GCA GCA GCA GCC ACU	54
	G P G Q Q G L S G P G S A A A A A T	
	GGU GCA GGC GCU GGA GGA UAU GGA CCA GGA CAA CAA GGA CCA GGU GGA UAU GGU	108
	G A G A G G Y G P G Q Q G P G G Y G	
	CCA UCA GGA CCA UCU GGA CCU GGA GGU GCA UCA GCC GCC GCA GCA GCA GCA	162
	P S G P S G P G G A S A A A A A A	
	GGA CCA GGA GGA UAU GGA CCC GGA CAA CAA GGA CCC GGA CAG CAA GGA CCA GGA	216
	G P G G Y G P G Q Q G P G Q Q G P G	
	CAA CAA GGA CCA GCU GGA UAU GGA CCA UCC GGA CCA UCU GGA CCU GGA GGU GGA	270
	Q Q G P A G Y G P S G P S G P G G A	
	GCA GCC GCC GCC GCA GCA GCA GGA CCA GGA GGA UAU GGA CUC GGA CAA CAA	324
	A A A A A A A A A G P G G Y G L G Q Q	
	GGA CCC GGA CAG CAA GGA CCA GGA CAA CAA GGA CCA GGU GGA CCA GCA UCC	378
	G P G Q Q G P G Q Q G P A G Y G P S	
	GGA CUA UCU GGA CCU GGA GGA GCA GCA GCC GCC GCC GCA GCA GGA CCA GGA GGA	432
	G L S G P G G A A A A A A A A G P G G	
	UAU GGA CCG GCA CAA AGA CCA UCU GGA GGA GGA GCA GCU GCA GCC GCA	486
	Y G P G Q Q R P S G P G G A A A A A	
	GCC GCA GCA GGA CCU GGA GGA UAU GGA CCA AGU CAA CGA GGU CCA UCU GGA CCA	540
	A A A G P G Y G P S Q R G P S G P	
	GGC AGU GCA GCA GCA GCC GCU GCU GGU GCA GGA CCU GGA GGU UAU GGA CCA GGG	594
	G S A A A A A A G A G P G G Y G P G	
	CAA AAG GGA CCU UCU GGA CCU GGA AGC GCA GCU GCU GCC GCA GCA GCU GGG CCU	648
	Q K G P S G P G S A A A A A A A G P	
	GGA GGG UAC GGA CCU UCU CAG CAA GGA CCA GCU CGA UAU GGA CCU UCU GGA CCU	702
	G G Y G P S Q Q G P A R Y G P S G P	
	GGA AGC GCA GCA GCA GCG GCU GCC GGU GCA GGA ACC GCC GGA UAU GGA CCA GGU	756
	G S A A A A A A G A G T A G Y G P G	
	CCA CAA GCA UCC GCU GCA GCU UCU CGU CUU GCU UCU CCA GAU UCA GGC GCU AGA	810
	P Q A S A A A S R L A S P D S G A R	
	GUG GCA UCU GCA GUU UCU AAC UUG GUA UCC AGU GGU CCA ACU AGC UCU GCU GCC	864
	V A S A V S N L V S S G P T S S A A	
	UUA UCA AGU GUU AUC AGU AAC GCU GUG UCU CAA AUU GGC	903
	L S S V I S N A V S Q I G	
		3'

图 1 克隆片段的核苷酸序列测定结果及其预期氨基酸序列

Fig.1 Sequence of the cloned cDNA and predicted amino acid sequence

SA<sub>n</sub> 等<sup>2,41</sup> 3' 端的 42 个保守性氨基酸同 Spidroin2 蛋白完全一致。因此,虽然同牵引丝 Spidroin2 基因在核苷酸的具体排列上存在较大的差异,但从氨基酸的组成及重复序列的组成及排列上分析,均可认定所克隆获得的 cDNA 为 *Nephila clavata* 的牵引丝蛋白 Spidroin2 基因。

对克隆 cDNA 片段的密码子使用情况的分析表明,这段基因密码子第 3 位上偏爱使用 A/T,这可能同牵引丝蛋白 mRNA 的二级结构有关。如果密码子的第 3 位碱基以 G/C 为多,那么,在多聚 A(密码子为 GCX)中将会出现较高含量的 GCG 或 GCC,极大地提高了 G/C 含量,必将导致大量发夹结构的形成<sup>41</sup>。二级结构过于稳定将不利于 mRNA 进行正

常的翻译,这一点对于其它的重复序列也同样适用。

```

NH2 ---GPGQQGL-----SGPGSAAAAATGAGA
--GGYGPGQQGPG-----GYGSPGSPGPGASAAAAAAA
GPGGYGPGQQGPGQQGPGQQGPGYGPSPGSPGPGAAAAAAA
GPGGYLGGQQGPGQQGPGYGPSPGSLGSPGPGAAAAAAA
GPGGYGPGQRP-----SGPGAAAAAAA
GPGGYGPGSR-----GSPGPGSAAAAAAGA
GPGGYGPGQK-----GSPGPGSAAAAAAA
GPGGYGPGSQ-----GPARY---GSPGPGSAAAAAAGA
GTAGY-----GPGQASAAA
SRLASPDGARVASAVSNLVSSGPTSSAALSSVISNAVSIQ - COOH

```

图 2 克隆片段预期氨基酸序列(为方便显示氨基酸序列中存在的重复性规律而将肽链进行拉伸)

Fig.2 Predicted amino acid sequence of the cloned cDNA of *Nephila clavata*, rearranged to show repetitive elements

```

NH2-----PGGYGPGQQGPGGYGPGQQGP--SGPGSAAAAAAA
-----GPGGYGPGQQGPGGYGPGQQGPGRYGPGQQGP--SGPGSAAAAA
-----GSGQQGPGGYGPRQQGPGYGGQQGP--SGPGSAAAAAASAA
ESGQQGPGGYGPGQQGPGGYGPGQQGPGGYGPGQQGP--SGPGSAAAAAAAAS
-----GPGQQGPGGYGPGQQGPGGYGPGQQGP--SGPGSAAAAAAAAS
-----GPGQQGPGGYGPGQQGPGGYGPGQQGL--SGPGSAAAAAAA
-----GPGQQGPGGYGPGQQGP--SGPGSAAAAAAA
-----GPGGYGPGQQGPGGYGPGQQGP--SGAGSAAAAAAA
-----GPGQQGLGGYGPGQQGPGGYGPGQQGPGGYGPGSAAAAAAA
-----GPGQQGPGGYGPGQQGP--SGPGSASAAAAAAA
-----GPGGYGPGQQGPGGYAPGQQGP--SGPGSASAAAAAAA
-----GPGGYGPGQQGPGGYAPGQQGP--SGPGSAAAAAAA
-----GPGGYGPAQQGP--SGPGIAASASAA
-----GPGGYGPAQQGPAGY-----GPGSAAVAAASAGA
-----GSAGY-----GPGSQASAAA-----COOH

```

图 3 *Nephila clavipes* 牵引丝蛋白 Spidroin2 基因预期氨基酸序列

Fig.3 Predicted amino acid sequence of Spidroin2 of *Nephila clavipes*, rearranged to show repetitive elements

ASAAASRLASPDGARGAVASAVSNLVSSGPTSSAALSSVISNAVSQIG	cloned cDNA
ASAAASRLASPDGARGAVASAVSNLVSSGPTSSAALSSVISNAVSQIG	Spidroin2

图 4 克隆片段与 Spidroin2 基因二者预期氨基酸序列-COOH 端保守序列的比较

Fig.4 Comparison of a conserved sequence found in the COOH-terminal regions of the cloned cDNA and Spidroin2

通过生物学软件对预期氨基酸序列二级结构的分析,并结合蜘蛛牵引丝高强度,有弹性的自然特点,初步认为此段氨基酸序列的二级结构主要包括两部分:一是多聚丙氨酸区域形成的 $\beta$ -片层结构,它为蜘蛛丝提供了较强的刚性;另外一个含有 Pro 的区域,它可形成蜘蛛丝提供弹性的 $\beta$ -转角结构。两种结构相互交替出现,从而赋予蜘蛛牵引丝兼具良好的强度与弹性的特性。

#### REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Lazaris A, Arcidiacono S, Huang Y *et al.* Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science*, 2002, **295**: 472 ~ 476

- [ 2 ] Hinman M B, Jones A J, Lewis R V. Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends in Biotechnology*, 2000, **18**: 374 ~ 379
- [ 3 ] Xu M, Lewis R V. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 7120 ~ 7124
- [ 4 ] Hinman M B, Lewis R V. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *J. Biol. Chem*, 1992, **267**: 19320 ~ 19324
- [ 5 ] Candelas G C, Cintron J. A spider fibroin and its synthesis. *The Journal of Experimental Zoology*, 1981, **216**: 1 ~ 6
- [ 6 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 7 ] Osaki S. Spider silk as mechanical lifeline. *Nature*, 1996, **384**: 419 (illustr.)
- [ 8 ] PENG W R (彭卫平). Structure and expression of silk protein gene in the silkworm and spider. *CANYE KEXUE(蚕业科学)*, 1998, **24**: 231 ~ 243

## Amplification, Cloning and Sequence Analysis of Spider Dragline Silk cDNA

ZHANG Li-Shu<sup>1</sup> MA He-Wen<sup>2\*</sup> LU Yi-Ming<sup>2</sup> ZHANG Yu-Jing<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( Military Veterinary Institute, The Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China )

<sup>2</sup>( Military Veterinary Faculty, The Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China )

**Abstract** Spider dragline silk is synthesized in special gland named major ampulate (MA) gland. The MA glands were dissected from the abdomen of the spiders *Nephila clavata* and the total RNA was extracted by the TRIZOL. The cDNA of dragline silk was amplified by RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), multiplex PCR and cloned. PCR identification, restriction analysis and DNA sequence analysis were carried out to verify the recombinant plasmids. The codon usage frequencies of the cloned cDNA were added up, and the predicted amino acid sequence was compared with Spidroin2 of *Nephila clavipes*. Predicted secondary structure of the predicted amino-acid sequence was analyzed by DNASTar software. All results showed that the cloned cDNA we got (GenBank Accession No. AF441245) was the very fragment of spider dragline silk Spidroin2 cDNA.

**Key words** dragline silk, *Nephila clavata*, multiplex PCR, cloning