

玫瑰红绿海葵触手 cDNA 表达文库的构建和初步分析

刘文华 王义良 陈慧萍 姜孝玉 涂洪斌 卫剑文 彭文烈 徐安龙*

(中山大学生命科学学院生物化学系, 国家 863 计划海洋生物功能基因组开放实验室, 广州 510275)

关键词 玫瑰红绿海葵触手, cDNA 表达文库

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0749-05

海葵共有 1000 多种, 栖息于世界各地的海洋中, 从极地到热带、从潮间带到深海都有分布, 我国地处温带和亚热带, 海葵种类较多^[1]。海葵的单体呈圆柱状, 柱体开口端为口盘, 口盘周围环生众多触手, 触手上有被称为刺丝囊的毒腺结构, 能分泌毒液, 柱体下端为基盘, 海葵以其基盘吸附于甲壳、海藻等物体上, 较少运动。海葵毒液成分主要是蛋白质和多肽, 它们对甲壳类动物有较大毒性, 对人或其它高等动物的毒性则相对较小。现代研究表明, 海葵多肽毒素有多种药理效果, 这些毒素主要作用于神经及心血管系统, 可引起强心、降低血压、麻痹肌肉等多种效应^[2-5]。作者曾运用 RT-PCR 技术, 从采自我国湛江海域的侧花海葵中筛选到了多个海葵强心肽基因^[6], 本文采用 cDNA 文库构建技术, 从玫瑰红绿海葵触手中筛选到了海葵溶细胞素、海葵荧光蛋白、泛醌-细胞色素 c 还原酶、延伸因子、铁蛋白、核黄素激酶, 核糖体蛋白等多个全长 cDNA 克隆, 并结合生物信息学分析方法, 对这些功能基因作初步的分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织样品 玫瑰红绿海葵(*Sagartia rosea*)采自广西省北海市海域。

1.1.2 质粒和菌种: 哺乳动物细胞表达质粒 pcDNA3 购自 Invitrogen 公司, 宿主菌 *E. coli* DH5 α 为本实验室保存。

1.1.3 试剂和酶 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech 公司。质粒提取和胶回收试剂盒为 Omega Biotek 公司产品。焦碳酸二乙酯(DEPC)、MOPS 购自上海 Sangon 公司, Taq DNA 聚合酶为本实验室保存, 各种限制性内切酶和 T4 DNA Ligase 购自 NEB 公司。DNA marker 购自 Gibco 公司, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 玫瑰红绿海葵触手的处理^[7]: 分离 1 只玫瑰红绿海

葵触手, 迅速加入适量的异硫氰酸胍变性液(4mol/L 异硫氰酸胍, 25mmol/L 柠檬酸钠, pH7.0, 0.5% SLS, 0.1mol/L β -巯基乙醇), 充分匀浆破碎细胞, 按 1g 触手组织加 10 mL 变性液的比例补足变性液后, 80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存以备提取总 RNA。

1.2.2 载体的制备: PEG 纯化法^[8]提取 pcDNA3 质粒, 经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 充分酶切后, 琼脂糖凝胶电泳, 载体 DNA 回收参照 Omega Biotek 公司的 Gel Extraction Kit 说明书。

对载体 pcDNA3 的多克隆位点作适当改造, 引入 *Sfi* I 酶切位点, 具体方法是: 以 λ TripIEx2 为模板, 用 SMARTTM Kit 中的测序引物进行 PCR 扩增, 回收 PCR 产物, 用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切, 然后用 T4 DNA Ligase 与经 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切的 pcDNA3 载体 DNA 连接, 构建成 pcDNA3-*Sfi* I 质粒(Fig. 1), 提取质粒 pcDNA3-*Sfi* I, 用限制性内切酶 *Sfi* I 酶切后, 回收载体 pcDNA3-*Sfi* I DNA, 载体 DNA 以 50ng/ μ L 的浓度保存备用。

1.2.3 玫瑰红绿海葵触手总 RNA 的提取: 用一步快速热酚法^[7]提取保存于变性液中的玫瑰红绿海葵触手组织总 RNA。

1.2.4 玫瑰红绿海葵触手 cDNA 的合成及 PCR 扩增: 用 Clontech 公司 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 按操作说明书先合成 cDNA 链, 然后用 LD PCR 法扩增 cDNA, 扩增产物用 *Sfi* I 酶切消化后, 过柱回收 dscDNA。

1.2.5 玫瑰红绿海葵触手 cDNA 文库的构建: 用 T4 DNA Ligase 连接上述分别经 *Sfi* I 酶切的 pcDNA3-*Sfi* I 载体和毒腺 dscDNA, 连接产物转化 DH5 α 高效感受态细胞。将转化产物分为两部分, 一部分经过扩增后, 提取质粒, 作为 cDNA 表达文库质粒总库, -80 $^{\circ}$ C 冻存; 另一部分涂布平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 平板克隆用于下一步的序列测定^[9]。

1.2.6 序列测定: 随机挑选文库克隆, 用 Omega Biotek 公司的 Plasmid Miniprep Kit 提取质粒。以 T7 和 SP6 为测序引物, 采用 Applied Biosystem 377 DNA Sequencer 进行序列测定。

收稿日期 2002-03-25, 修回日期 2002-08-09。

基金项目 国家高新技术海洋领域 863 项目(No. 819-06-06) & (No. 2001AA62-6010) 资助。

* 通讯作者。 Tel 86-20-84113655; Fax 86-20-84038377; E-mail ds36@zsu.edu.cn

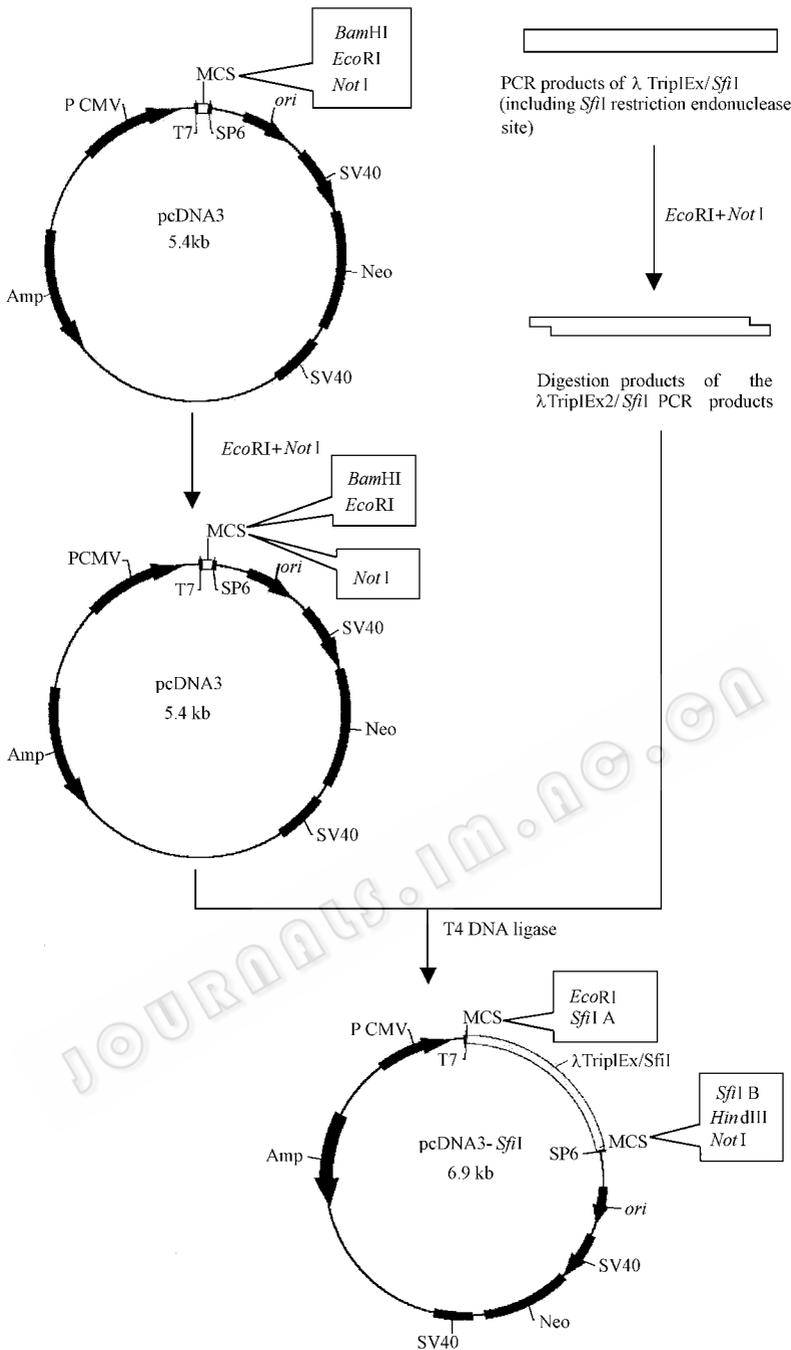


图1 质粒载体 pcDNA3-Sfi I 的制备示意图

Fig. 1 Preparation of plasmid vector of pcDNA3-Sfi I for expressional cDNA library construction

1.2.7 序列分析^[10]:使用 BLAST 分析软件,对各测序结果进行序列的同源性搜索、分析。如果匹配性的 P 值为 10^{-5} 或更小,则认为序列之间有较高的同源性,否则认为序列的同源性很低,即“low hits”,数据库中若没有与其匹配的序列称为“no hits”。

2 结果与分析

2.1 玫瑰红绿海葵触手总 RNA 的提取^[7]

采用异硫氰酸胍一步法提取的玫瑰红绿海葵触手总 RNA 经 1% 的琼脂糖甲醛变性电泳检测,可见清晰的 28S

和 18S 两条 rRNA 条带(Fig. 2),说明 RNA 质量符合要求。

2.2 玫瑰红绿海葵触手 cDNA 的合成及 PCR 扩增

取总 RNA 约 $1\mu\text{g}$ 直接进行逆转录合成第一链,得到 $10\mu\text{L}$ 第一链产物,取其中 $2\mu\text{L}$ 通过 LD PCR 法扩增富集 cDNA 得到 $100\mu\text{L}$ 扩增产物,保留其中一半 cDNA 于 -80°C 备用,另一半 cDNA 的经 Sfi I 酶切消化,过柱回收较大分子量的 cDNA,经过乙醇沉淀、重悬,最终得到 $7\mu\text{L}$ ds cDNA。电泳结果显示,LD PCR 产物为从小到大均匀分布的 smear,主要分布在 $0.1 \sim 5.0\text{kb}$ 范围内,这表明玫瑰红绿海葵触手的成分具有多样性和复杂性。

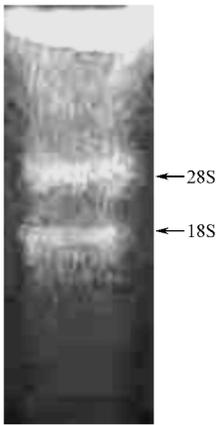


图2 玫瑰红绿海葵触手总 RNA 的甲醛变性胶电泳分析

Fig.2 Denaturing agarose gel analysis of total RNA from the tentacles of *Sagartia rosea*

2.3 玫瑰红绿海葵触手 cDNA 表达文库的构建和鉴定

取 $1\mu\text{L}$ 双链 cDNA 用于连接反应,反应体积 $10\mu\text{L}$,转化其中 $2\mu\text{L}$ 连接产物,分别取 $10\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}$ 和 $300\mu\text{L}$ 转化菌液涂板,剩余菌液用来提取文库总质粒,记数培养过夜平板的单菌落数分别为 43、409 和 2001 个。因此双链 cDNA $7\mu\text{L}$ 可获得的 cDNA 表达文库克隆数为 $[(43 + 409 + 2001) \times (100/41)] \times 5 \times 7 = 2.09 \times 10^5$ 。文库总质粒的酶切和 PCR 分析结果表明,经 *Sfi* I 酶切的总库质粒呈现 $0.1 \sim 5.0\text{kb}$ 分布的 smear。利用载体 pcDNA3 多克隆位点两端的序列 T7 和 SP6 为引物,进行 PCR 扩增,扩增产物也出现类似分布,这与 cDNA 的大小相互吻合。随机挑取 600 个克隆,使用 T7 和 SP6 引物,通过 PCR 扩增鉴定插入 cDNA 片段的大小,结果显示大部分的插入片段在 500bp 以上($450/600$),部分重组子克隆的 PCR 结果见 Fig. 3。通过载体自连片段的特异引物 PCR 扩增鉴定,重组率超过 95%(在 600 个克隆中只有 23 个是自连)。

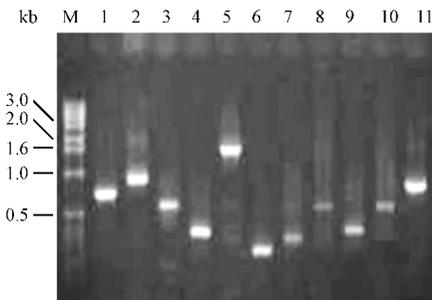


图3 玫瑰红绿海葵触手文库部分重组子的 PCR 结果

Fig.3 Partial PCR results from clones in the library of *Sagartia rosea* with T7 and SP6 primers

M. 1kb DNA ladder; 1~11. PCR results from clones in the library of *Sagartia rosea* with T7 and SP6 primers

根据以上实验结果,玫瑰红绿海葵触手 cDNA 表达文库在文库重组子数、重组率和插入片段大小等方面达到了良好文库的质量标准^[9]。

2.4 玫瑰红绿海葵触手 cDNA 的序列测定和分析

随机挑选了 130 个在 500bp 以上的 cDNA 克隆,进行序列测定,测序结果表明玫瑰红绿海葵触手 cDNA 文库包含的基因多种多样,这与玫瑰红绿海葵触手成分复杂多样相一致。所得序列经 Blast^[10]初步分析表明,已获得了 71 个玫瑰红绿海葵触手新 EST 序列(Table 1)。这 71 个 EST 中,最小的插入片段是 130bp ,另外有 30 个克隆的插入片段介于 $150\text{bp} \sim 500\text{bp}$,剩下 40 个克隆的插入片段介于 $500\text{bp} \sim 1.5\text{kb}$ 。这些 EST 中已确定全长的 cDNA 克隆有 21 个,包括海葵溶细胞毒素基因、海葵荧光蛋白、延伸因子、铁蛋白、核黄素激酶、核糖体蛋白等(Table 2)。

表1 玫瑰红绿海葵触手文库 EST 统计结果

Table 1 Summary of *Sagartia rosea* tentacles ESTs data

EST category	No. of ESTs	Percentage
Total no. of ESTs	71	100
ESTs with significant match	34	47.9
Ribosomal proteins	7	9.9
Metabolic enzymes	10	14.1
Toxin related proteins	2	2.8
Others	15	21.1
ESTs without significant match	37	52.1

表2 玫瑰红绿海葵触手 cDNA 文库全长克隆序列分析结果

Table 2 BLAST analysis of full-length cDNA clones from the cDNA library of *Sagartia rosea* tentacles

Clone	Putative Identification	Accession No.
Ribosomal Proteins		
H350	Ribosomal protein L5	pir :A33823
H67	40S ribosomal protein s4	RS4-CRIGR
H331	Ribosomal protein L18a	gi :11415026
H417	Ribosomal protein L17/23	gi :15081322
K26	40S ribosomal protein s20	sp :RS20-XENLA
K47	Ribosomal protein l41	gp :SPAC3F10-18
Metabolic enzymes		
H88	ATP synthase B chain	sp :ATPF-HUMAN
H234	Ubiquinol-cytochrome C reductase	sp :UCRY-BOVIN
H519, H140	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase A	gi :18307578
K3	Riboflavin kinase	gp :SPCC18-16
Toxin related proteins		
H127, H251	Equinatoxin II precursor	pir :JC4682
Others		
H106, H175	Flourescent protein FP583	gp :AF168419-1
H100	beta-actin	gi :10834855
H173	Hypothetical 28.5kD protein zk1236.7 in chromosome III	sp :YO87-CAEEL
H178	Eukaryotic translation initiation factor	gi :14735107
H318	Ferritin	pir :S45603
H516	Elongation factor 1-alpha	gi :1706586
H529	Cg11686 gene product	gp :AE003699-9
H530	Actin beta-bovine	gi :71621

这 21 个全长 cDNA 克隆中,有 6 个克隆编码核糖体蛋白,它们和其它物种的核糖体蛋白有较高的同源性。其中克隆 H417 编码 140 个氨基酸,它与来自 *Spodoptera frugiperda* 的核糖体大亚基蛋白 L17/23 具有 96% 的同源性(同源性最高者,以下同),而克隆 H331 编码 176 个氨基酸,它与来自人的核糖体大亚基蛋白 L18a 具有 78% 的同源性,其同源性相对较低。核糖体蛋白是生物进化史上较为保守的生物大分子,它们的一级结构对生物进化研究具有重要意义。初步的研究结果显示,玫瑰红绿海葵的核糖体大亚基蛋白 L17/23 比其大亚基蛋白 L18a 在进化上具有更大的保守性。

在文库的全长 cDNA 克隆中,有 2 个克隆编码绿色荧光蛋白(H106 和 H175 核苷酸序列相同),它们的氨基酸序列和来自珊瑚虫 *Discosoma* sp. 的荧光蛋白 FP583 具有 67% 的同源性。绿色荧光蛋白最早于 1962 年由 Shimomura 和 Johnson 从水母类生物 *Aequorea victoria* 中分离得到^[11]。绿色荧光蛋白的荧光性质较特殊,它不需要外加底物,其荧光用肉眼或荧光显微镜可以检测到,观察方便,而且它本身对细胞生长基本没有毒性,因此绿色荧光蛋白作为报告基因,在生物技术上有十分广泛的用途。从玫瑰红绿海葵中新发现的这两个基因,为荧光蛋白结构与功能关系的研究提供了新的线索。

从文库中还发现了两个新的溶细胞素基因(H127 和 H251 核苷酸序列相同)经 Blast 同源性搜索,它们的氨基酸顺序和来自海葵 *Actinia equina* 的溶细胞素 Equinatoxin II(Eqt II)具有 75% 的同源性。海葵溶细胞素是由 170~180 个氨基酸组成的单链多肽,链内无二硫键,分子量在 20kD 左右,有较高的等电点^[12]。它们具有十分广泛的生理活性:包括血小板凝集、心肌毒性、溶细胞作用、引起肺水肿等,其中最典型的是在细胞膜上形成穿孔,使细胞破碎,溶解^[13]。对玫瑰红绿海葵溶细胞素基因的重组表达以及活性研究正在进行之中。

3 讨 论

海葵触手中含有多种毒素多肽,这些毒素对甲壳类或哺乳类动物具有一定的毒性,但它们往往也具有多种药理活性,如麻醉、抗癌、抗心血管病活性。如果能够搞清楚它们的理化性质、作用机理并很好地控制使用剂量,这些毒素多肽有可能开发成治疗疾病的新药,同时,还可以对它们进行结构改造、定点突变,筛选毒性小而活性高的有效成分。海葵活性多肽在海葵中的含量往往很低微,理化性质相接近的一些组分难以分开,而且,有些资源不能重复采集,完全依靠生化提取的方法,成本高、得率低,尤其不能满足作为药物开发所应进行的大量结构与功能关系的研究。因此,采用 cDNA 文库构建技术,直接从基因入手,是筛选海葵活性多肽的一条有效途径。

SMARTTM cDNA Library Construction 技术与其它 cDNA 文库构建方法比较,具有很多优点。首先,常规 cDNA 文库构建方法需要 5 μ g mRNA 样品,而 SMARTTM cDNA 文库构建技

术只需要 25ng mRNA 样品,因此这种技术非常适合珍贵稀少的海洋生物组织的 cDNA 文库构建。另外,常规 cDNA 文库构建方法采用 oligo(dT)作为反转录引物,进行反转录时容易提前终止反应,且无法富集全长 cDNA,而 SMARTTM cDNA 文库构建技术直接从总 RNA 出发合成 cDNA,采用专一的反转录引物,通过 LD PCR 方法扩增,再将 cDNA 过柱分离,选择性分管收集 cDNA,通过这些技术,可以富集全长 cDNA 片段,使文库中全长 cDNA 片段的比率相对较高,减少了克隆筛选的工作量,同时,这种技术还可通过常规电泳对每一步骤进行实时监测,操作简便,而采用常规 cDNA 文库构建方法,需要用同位素技术对每一步的反应结果进行监测,操作复杂。除上述优点之外,本研究还采用了哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3,重组质粒可直接在真核细胞中表达,这样可以直接通过功能表达筛选的方法鉴定功能新基因。应用这项文库构建技术,我们实验室成功构建了多个具有药用价值的海洋生物的 cDNA 文库^[14]。

玫瑰红绿海葵触手 cDNA 表达文库的构建保存了基因资源,通过小规模随机测序,获得了多个全长 cDNA 克隆,包括溶细胞素基因、海葵荧光蛋白、泛醌-细胞色素 c 还原酶、铁蛋白、核黄素激酶等,其中的一些基因,如海葵溶细胞素具有一定的药用开发价值,海葵荧光蛋白作为报告基因,在生物化学和细胞生物学研究中有广泛的应用前景。另外,文库中还有多个具有完整读码框(ORFs)的基因序列,同源序列分析结果为“low hits”或“no hits”,表明这些基因在 Genbank 中几乎没有同源序列,对这些基因的研究基本上还是空白,这意味着它们很可能具有某些独特功能。对海葵文库新基因的进一步研究,将会为海洋生物功能基因的研究开发提供新的线索。

REFERENCES(参考文献)

- [1] HUANG Z Q(黄宗国). *China Marine Biology Species and Distribution*. Beijing: Ocean Press, 1994, p284
- [2] Norton R S. Structure and Structure-function relationships of sea anemone protein that interact with the sodium channel. *Toxicon*, 1991, **29**: 1050~1084
- [3] Anderlueh G, Krizaj I, Strukelj B et al. Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family. *Toxicon*, 1999, **37**: 1391~1401
- [4] Gendah G S, Young L C, Medeiros C L C et al. A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression. *Biochemistry*, 1997, **36**: 11461~11471
- [5] JIA Y H(贾玉海). *China Pharmaceutics of Marine Lakes and Marshes*. Beijing: XueYuan Press, 1997, pp. 80~82
- [6] LIU W H(刘文华), WANG Y L(王义良), WEI J W(卫剑文) et al. Cloning and sequences analysis of neurotoxin gene from sea anemone. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2001, **17**(5): 617~620
- [7] LU S X(卢圣栋). *Modern Molecular Biology*. Beijing: Higher Educational Publishing House, 1993

- [8] Sambrook J , Fristch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. Second Edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 , pp345 ~ 356
- [9] ZHONG X K (钟肖芬) , WEI J W (卫剑文) , ZHAO G J (赵贵军) *et al*. The construction of cDNA expression library from the venom of *Lapemis hardwickii* Gray. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* [中山大学学报(自然科学版)] , 2001 , 40(3) : 66 ~ 69
- [10] Altschul S F , Madden T L , Schaffer A A. Gapped BLAST and PSI-BLAST :A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* , 1997 , 25(17) : 3389 ~ 3402
- [11] Shimomura O , Johnson F H , Saiga Y. Extraction , purification and properties of aequorin , a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa , *Aequorea victoria*. *J Cell Comp Physiol* , 1962 , 59 : 223 ~ 227
- [12] Macek P. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemone (*Actinaria*). *FEMS Microbiol Immunol* , 1992 , 105 : 121 ~ 130
- [13] Teng C M , Lee L G , Lee C Y *et al*. Platelet aggregation induced by equinatoxin. *Thromb Res* , 1988 , 52 : 401 ~ 411
- [14] TU H B (涂洪斌) , WEI J W (卫剑文) , JIANG X Y (姜孝玉) *et al*. The construction of cDNA expression library from the caudal spine of *Dasyatis akajei*. *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学报) , 2001 , 36(12) : 906 ~ 909

The Construction of cDNA Expression Library from the Tentacles of *Sagartia rosea*

LIU Wen-Hua WANG Yi-Liang CHEN Hui-Ping JIANG Xiao-Yu TU Hong-Bin
WEI Jian-Wen PENG Wen-Lie XU An-Long*

(The Open Laboratory for Marine Functional Genomics National High-Tech Department , Department of Biochemistry ,
College of Life Science , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China)

Abstract A cDNA expression library of the tentacles of *Sagartia rosea* was constructed. The cDNA was cloned into eukaryotical expression plasmid pcDNA3. SMARTTM protocol was used for cDNA library construction and bioinformatics analysis was carried out. 71 novel EST clones were obtained from 130 sequences in the library , of which there were 21 full-length clones , including cytolysin genes , fluorescent protein , ubiquinol-cytochrome C reductase gene , elongation factor , ferritin gene riboflavin kinase gene , ribosomal protein. This provides a base for further investigating their biological activity and application.

Key words tentacles of *Sagartia rosea* , cDNA expression library

Received : 03-25-2002

This work was supported by grants from the State 863 High Technology Project of China (No. 819-06-06) & (No. 2001AA62-6010) .

* Corresponding author. Tel : 86-20-84113655 ; Fax : 86-20-84038377 ; E-mail : Ls36@zsu.edu.cn

干细胞技术用于眼疾患者大有希望

干细胞(stem cells)是机体组织保留的一部分未分化的原始细胞,有“万能细胞”之称。按其分化潜能可分为胚胎干细胞和非胚胎干细胞,前者表现其全能性(细胞能发育成任何类型细胞或组织的特性,最终能分化形成独立个体),后者表现其多能性和专能性,但不具全能性。这二者在临床医学上均有着潜在的应用前景。加拿大多伦多大学研究人员发现人视网膜中有干细胞的存在。过去认为人的眼球发育在胚胎阶段完成,在人的视网膜中不再有干细胞存在,人眼球一旦受损伤,不能自行修复。后来研究者发现,人、牛、鼠的视网膜中都有干细胞的存在,对受损伤细胞的自行修复起着关键作用。平时这种干细胞只不过处于“休眠状态”而已,难以被发现。该研究人员已分离和培养出视网膜干细胞,在细胞分裂再生过程中产生新的细胞,经培养可成为修复受损伤视网膜所需要的许多特定细胞,发挥其修复受损伤细胞之功能,为因眼球损伤或眼疾而失明的患者复明以及制备更多视网膜干细胞创造了有利条件。在日本,研究人员对后天性视网膜、角膜因某种原因而失去视力的患者实施干细胞移植入眼内,使其能发育为视网膜或角膜。京都大学研究人员用脑神经干细胞再生视网膜取得了成功,为失去视力的盲人重见光明带来希望。在美国,研究人员发现来自骨髓的干细胞有可能用于治疗诸如因糖尿病所出现的视网膜疾病和因衰老相伴视力衰退病症,这二者是由于视网膜血管损伤所造成的后果。不同来源的干细胞有针对性地用于治疗不同眼疾患者将起着重要作用。因此,视网膜干细胞的存在和克隆将有可能为“视网膜干细胞制剂”的研制开辟新途径,实行产品商业化,为因眼球受伤或眼疾而失明的患者恢复视力展现出光明前景。

(柯 为 供稿)