

尖吻蝮蛇蛇毒金属蛋白酶 cDNA 序列抗原位点分析及免疫保护效果观察

张志晓^{1,2}, 杨彦³, 叶锋平², 范泉水², 李东江⁴, 张希⁵, 符云新¹, 郑颖^{2,6*}

1. 云南大学生物资源保护与利用重点实验室, 昆明 650091
2. 成都军区疾病预防控制中心军事医学研究所, 昆明 650032
3. 成都军区疾病预防控制中心博士后科研工作站, 昆明 650032
4. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201
5. 云南大学现代生物学研究中心, 昆明 650091
6. 中国协和医科大学医学生物学研究所, 昆明 650118

[摘要] **目的** 采用生物信息学方法分析尖吻蝮蛇蛇毒金属蛋白酶 cDNA 序列的关键抗原位点, 并观察根据这些位点设计合成的新型免疫原的免疫保护效果。**方法** 扩增尖吻蝮蛇蛇毒金属蛋白酶 cDNA 序列, 采用 Jameson-Wolf 方法和 Clustal X 软件结合的生物信息学方法分析其抗原位点, 人工合成筛选的抗原位点序列, 并连接到 pIRESneo 表达载体, 3 次(0、2、4 周)对 BALB/c 小鼠进行核酸免疫, ELISA 法测定免疫后机体抗体水平, 出血中和实验和攻毒实验初步观察其免疫保护效果。**结果** 生物信息学方法分析得到 6 个关键抗原位点(MPA-1MPA-6); ELISA 法检测抗血清结果表明, 抗原位点序列诱导小鼠产生的抗血清相对未免疫的小鼠血清稀释 100 倍后仍能表现出阳性结果; 出血中和实验和攻毒实验表明, 将抗原位点序列免疫小鼠可以诱导机体产生免疫反应, 使体内产生抗体, 能有效中和蛇毒, 从而对尖吻蝮蛇蛇毒引起的出血有防护作用。**结论** 用生物信息学方法成功获得尖吻蝮蛇蛇毒金属蛋白酶 cDNA 序列的 6 个关键抗原位点, 针对这些位点设计合成的新型免疫原展示出初步免疫保护效果。

[关键词] 生物信息学; 尖吻蝮蛇; 蛇毒液类; 表位; 抗蛇毒素类

[中图分类号] R 392.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0364-05

Epitope analysis of cDNA sequences of *Deinagkistrodon acutus* snake venom metalloproteinases and observation of their immune protective effects

ZHANG Zhi-xiao^{1,2}, YANG Yan³, YE Feng-ping², FAN Quan-shui², LI Dong-jiang⁴, ZHANG Xi⁵, FU Yun-xin¹, ZHENG Ying^{2,6*}

1. Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China
2. Military Medical Institute, CDC of PLA Chengdu Military Area Command, Kunming 650032, Yunnan, China
3. Post-doctoral Station, CDC of PLA Chengdu Military Area Command, Kunming 650032, Yunnan, China
4. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China
5. Modern Biological Research Center of Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China
6. Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China

[Abstract] **Objective** To analyze the epitopes of cDNA sequences of *Deinagkistrodon acutus* snake venom metalloproteinases using bioinformatical method, and to observe the immune protective effect of the new immunogen designed according to the identified epitopes. **Methods** The cDNA sequences of *Deinagkistrodon acutus* snake venom metalloproteinases were amplified by PCR. The epitopes of the sequences were analyzed by Jameson-Wolf method and Clustal X software, then the sequences of the screened epitopes were artificially synthesized and linked to the vector pIRESneo. BALB/c mice were immunized by the resultant plasmid at 0, 2, and 4 weeks for three times, then the titers of the anti-serum were measured by ELISA. The immune protective effects of the anti-serum were tested by the neutralization of venom hemorrhagic activity and venom attacking test. **Results** Bioinformatical analysis yielded 6 epitopes (MPA-1-6). The ELISA results of anti-serum showed that these epitopes could induce immune reaction in mice, and the anti-serum was detectable even when it was

[收稿日期] 2009-11-20 **[接受日期]** 2009-12-02

[基金项目] 中国博士后科学基金(20080440214). Supported by the National Science Foundation for Post-doctoral Scientists of China (20080440214).

[作者简介] 张志晓, 硕士. E-mail: zhixiaozhang@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0871-4775711, E-mail: zhengyingcdc@163.com

diluted to 1 : 100. The neutralization test and venom attacking test demonstrated that the anti-serum induced by the epitopes could neutralize the venom and protect the mice from haemorrhage. **Conclusion** Six epitopes of *Deinagkistrodon acutus* snake venom metalloproteinases have been obtained successfully using bioinformatical method, and the new immunogen designed based on these epitopes shows a primary immune protective effect.

[Key words] bioinformatics; *Deinagkistrodon acutus*; snake venoms; epitopes; antivenins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(4): 364-368]

尖吻蝮蛇(*Deinagkistrodon acutus*, *Agkistrodon acutus*)血循毒主要成分为蛇毒金属蛋白酶(snake venom metalloproteinase, SVMP),根据其cDNA序列和蛋白结构可分为4类:P I类仅含金属蛋白酶域,P II类含金属蛋白酶域和去整合素域,P III类含金属蛋白酶域、去整合素域和富半胱氨酸域,P IV类在P III类基础上增加了二硫键连接的C型凝集素域^[1]。本研究对能引起严重出血的尖吻蝮蛇蛇毒金属蛋白酶cDNA序列进行分析,筛选导致出血的关键抗原位点,并根据分析结果尝试制备针对性抗原,观察免疫效果,为抗蛇毒血清的制备奠定基础。

1 材料和方法

1.1 金属蛋白酶cDNA扩增、重组克隆及测序 将2条尖吻蝮蛇(产于广东)断头取出毒腺,立刻置于液氮罐中保存。取出冻存的部分尖吻蝮蛇毒腺置于液氮中研磨成粉状,总RNA提取按照TRIzol试剂盒(Invitrogen公司,美国)说明书进行。反转录反应按照3'-Full Race Core Set Ver 2.0试剂盒(大连宝生物公司)说明书进行。用于扩增金属蛋白酶cDNA序列的上游引物根据不同来源的金属蛋白酶cDNA序列起始密码子附近保守序列设计,序列为:5'-ATG ATY SAA GTT CTC TTG GTR A-3',下游引物为试剂盒自带引物。反应条件:94℃预变性3 min;然后94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min进行30个循环;最后72℃终末延伸10 min。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,用胶回收试剂盒(北京百泰克公司)进行回收后,与pMD19-T载体(大连宝生物公司)在16℃连接数小时,转入DH5 α 感受态细胞(北京百泰克公司),在含有氨苄青霉素(100 μ g/ml)的LB平板上37℃培养过夜后,挑取阳性克隆送交上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.2 生物信息学方法进行抗原位点分析 采用Blast搜索GenBank中尖吻蝮蛇的mRNA序列;从前期测定的序列和BLAST得到的尖吻蝮蛇序列中,各取出P I、P II、P III类的2条代表序列,以Jameson

-Wolf方法对抗原位点进行预测;采用Clustal X软件将前期测定的序列与BLAST得到的尖吻蝮蛇全部序列进行序列比对,分析其抗原位点;将得到的所有抗原位点串联并在5'端加入Not I酶切位点,3'端加入BamH I酶切位点,5'端酶切位点后加入启动子,经过密码子优化后,交上海生工生物工程技术有限公司进行序列人工合成。

1.3 质粒免疫小鼠 将人工合成的序列进行Not I/BamH I双酶切,胶回收纯化后与同样双酶切的真核表达载体pIRESneo(本室保存)回收产物用T₄DNA连接酶(大连宝生物公司)于16℃连接过夜,转化到DH5 α 感受态细胞,在含有氨苄青霉素(100 μ g/ml)的LB平板37℃培养过夜后,阳性重组质粒命名为pIRESneo-EpiDA,摇菌后进行质粒提取。30只成年BALB/c小鼠(昆明医学院实验动物中心)随机分为6组,各组分别编号为A1、A2、A3、B1、B2、B3,其中A1、A2、A3为实验组,B1、B2、B3为对照组。将1 g/ml的pIRESneo-EpiDA质粒辅以等体积的Al(OH)₃佐剂肌肉注射实验组的15只小鼠,每只接种0.2 ml于4个部位,2个部位在背部,2个部位在后大腿,分别于0、2、4周对小鼠分3次进行接种。对照组小鼠用pIRESneo质粒代替pIRESneo-EpiDA接种,其他不变。

1.4 ELISA法测定抗体水平 第5周时分别经A1、B1组小鼠的眼球取血,离心后取上层血清,ELISA法测定抗体水平。具体步骤为:将尖吻蝮蛇毒溶于双蒸水配成1%溶液,然后加入包被液配成浓度为0.05%的终溶液,包被酶标板,每孔100 μ l,4℃湿盒过夜,洗板。将空白对照组只加稀释液,实验组和对照组免疫血清10倍倍比稀释至10⁴倍后加入酶标板中,共4个浓度梯度,37℃结合2 h后,洗板。再加入二抗,37℃结合2 h,洗板。加入新配制的邻苯二氨(OPD)底物液,暗处显色30 min后加入2 mol/L H₂SO₄终止反应,于492 nm处测定光密度值^[2]。

1.5 出血中和及攻毒实验 A2、B2组小鼠分别在背部皮下注射出血毒测定出血中和情况。具体步

骤:将尖吻蝥蛇蛇毒溶于生理盐水,配成 0.02 mg/ml 的溶液,每只小鼠背部皮下注射 0.2 ml,24 h 后处死,剥皮观察出血情况。A3、B3 组小鼠分别进行腹腔注射全毒,测定活体保护率。预实验测定的尖吻蝥蛇蛇毒对小鼠的全数致死量为 10 $\mu\text{g/g}$ 。具体步骤:将尖吻蝥蛇蛇毒溶于生理盐水,配成 0.5 mg/ml 的溶液,每只小鼠腹腔注射全数致死量的蛇毒,72 h 内观察小鼠死亡情况。

2 结果

2.1 实验测得及 BLAST 得到的序列结果 本研究测定了 2 条序列,并将其推导的金属蛋白酶分别命名为 Acutusin 1 (GenBank accession number: GU290060) 和 Acutusin 2 (GenBank accession number: GU290061),均属于 P I 类。BLAST 得到的序列: Acutolysin A (AF174392)、Acutolysin E (AF141379)、Acutolysin F (AF174391) 序列^[3]; H1 前体 (AF098309)、H2 前体 (AF099085)、H3 前体 (AF099086)、H4 前体 (AF098308)、H5 前体 (AF098310)、MD1 前体 (AF117636)、MD2 前体 (AF117637) 序列^[4]; Acurhagin 序列 (AY566610)^[5]; DQ377325、AJ223283、AF162086、DQ263750 序列。其中,AF174392、AF174391、AF098309、AF099085、AF099086、AF098308、AF098310、DQ377325 属于 P I 类,AF117636、AF117637、AJ223283、AF162086 属于 P II 类,AF141379、AY566610、DQ263750 属于 P III 类。

2.2 生物信息学方法分析得到的抗原位点 从 P I、P II、P III 类中分别取出的 2 条代表序列为 Acutusin 1、Acutusin 2、AF117637、AJ223283、AF141379、AY566610。然后去除其信号肽、前肽部分,只留取成熟肽部分进行分析。P I 类造成出血的主要是 Zn^{2+} 金属蛋白酶基序 (motif),表示为 MPA-1; P II 类 RGD 去整合素基序可以与 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 整合素结合,从而抑制血小板的凝结,造成大量出血^[6],表示为 MPA-2; P III 类 ECD 去整合素基序的作用和 RGD 基序相似,但其主要与 $\alpha_2\beta_1$ 整合素结合^[7-8],表示为 MPA-3; HQC 基序和 VKC 基序对 $\alpha_2\beta_1$ 整合素也有一定的结合作用^[9],分别表示为 MPA-4、MPA-5; 通过 Jameson-Wolf 方法和 Clustal X 的综合分析,得到 MPA-6。这样一共得到 6 个抗原位点。

采用 Clustal X 进行序列比对确定每个基序的

具体序列(图 1),得到如下结果:MPA-1 为 HEI-AHNLGVHHDGSCSCGSGYTCIM,长度为 26 个氨基酸残基;MPA-2 为 GTICRRARGDDLDDY-CN,长度为 17 个氨基酸残基;MPA-3 为 FRTS-GTECRASHSECDPAEHCTGQSSEC,长度为 28 个氨基酸残基;MPA-4 为 CPIMYHQCYALFG,长度为 13 个氨基酸残基;MPA-5 为 VKCGRLY-CKDDSP,长度为 13 个氨基酸残基;MPA-6 为 TKCADGKVCNSG,长度为 12 个氨基酸残基。

2.3 ELISA 法检测结果 结果(表 1)表明:在 10^{-1} 和 10^{-2} 水平,A1 组和 B1 组光密度值有统计学差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),即 B1 组的小鼠抗血清在稀释 100 倍后仍然可以有效中和包被的尖吻蝥蛇蛇毒。

2.4 出血中和实验及攻毒实验结果 皮下注射蛇毒 24 h 后,B2 组的 5 只小鼠均出现直径 1 cm 左右的出血区域,而 A2 组的 5 只小鼠皮下出血区域较小,出血区域颜色较浅(图 2)。B3 组的 5 只小鼠于注射蛇毒 1 h 后死亡 1 只,2 h 后死亡 2 只,6 h 后死亡 2 只;A3 组的 5 只小鼠于注射蛇毒 24 h 后死亡 1 只,72 h 后存活 4 只,保护率为 80%。

3 讨论

尖吻蝥蛇 (*Deinagkistrodon acutus*, *Agkistrodon acutus*) 是我国常见的毒蛇,属于蝰科蝥亚科,其毒液主要为血循毒。患者被咬伤后,伤口局部红肿、疼痛剧烈,流血不止,肿胀迅速,毒素向肢体上端蔓延,常有水泡、淤斑出现。中毒严重者还会出现血压下降、心律失常、少尿、无尿,最后因循环衰竭而导致死亡。

目前治疗毒蛇咬伤的方法包括外敷、口服中草药和注射抗蛇毒血清。注射抗蛇毒血清是目前最有效的治疗方法,但蛇毒本身成分复杂,含有数百种功能各异的蛋白质,用全毒免疫产生的抗蛇毒血清不仅含有能中和毒素成分的抗体,也含有大量针对蛇毒中其他非毒素成分的抗体。这不仅使得抗血清的临床使用剂量大大增加,增加了过敏反应概率^[10],也浪费了宝贵的血清资源。如能针对蛇毒中主要毒素的关键抗原位点制备新型特异性抗原,不仅能使抗体作用的专一性大大提高,在同样疗效的基础上大大降低抗血清使用量,降低过敏反应率,同时由于设计的抗原位点具有多属共性,因此在一定程度上还可产生能有效中和多蛇种毒素的多价血清,从而为

多价抗血清的制备提供了一种新方法。

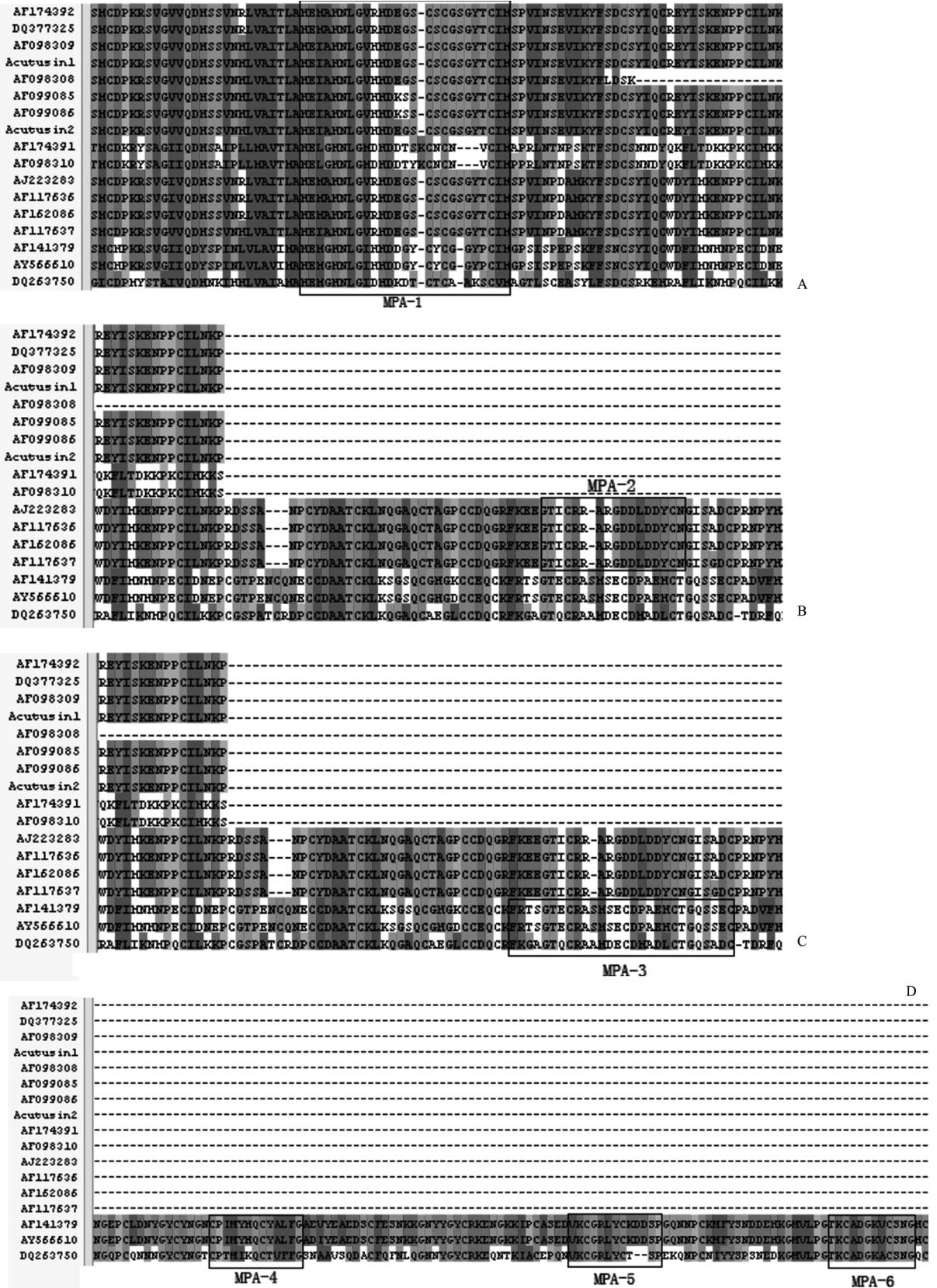


图 1 用 Clustal X 分析得到的尖吻蝮蛇金属蛋白酶抗原位点序列

Fig 1 Epitope sequences of *Deinagkistrodon acutus* snake venom metalloproteinases as analyzed by Clustal X

A: MPA-1; B: MPA-2; C: MPA-3; D: MPA-4, MPA-5, and MPA-6

表 1 各组测得的 D_{492} 值的比较
Tab 1 Comparison of D_{492} values among all groups

Dilution folds	Blank control	A1-1	A1-2	A1-3	B1-1	B1-2	B1-3	P value
10^{-1}	0.060	0.128	0.207	0.102	0.472	0.477	0.419	0.001
10^{-2}	0.061	0.079	0.060	0.068	0.146	0.149	0.209	0.010
10^{-3}	0.059	0.058	0.057	0.072	0.050	0.059	0.059	0.329
10^{-4}	0.064	0.081	0.056	0.054	0.061	0.053	0.052	0.414

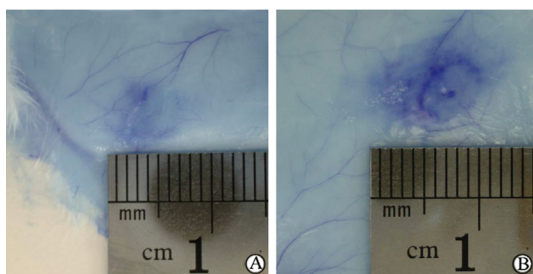


图 2 出血中和实验

Fig 2 Neutralization of venom hemorrhagic activity

A: Experimental group; B: Control group

本研究采用 Jameson—Wolf 方法和 Clustal X 软件结合的生物信息学方法分析尖吻蝮蛇金属蛋白酶抗原位点。Jameson—Wolf 方法结合了 Gamier—Robson 和 Chou—Fasman 法预测氨基酸序列的二级结构、Kyte—Doolittle 法预测的疏水性、Karplus—Schulz 法预测的柔韧性、Emini 法预测的表面可能性 4 方面共同确定其抗原位点, 有较高的准确性; 而 Clustal X 主要分析序列的保守性。经该方法预测得到的 6 个抗原位点免疫小鼠, 经 ELISA 检测、出血中和实验和攻毒实验说明这些位点可以诱导小鼠机体产生免疫反应, 证实该方法分析的抗原位点是可靠的。此外, 该方法还可以预测其他蛇种的抗原位点, 将不同蛇种的抗原位点连接在一起制备免疫原, 能够获得多价抗蛇毒血清, 具有重要的科学意义和应用价值。

[参考文献]

[1] Hite L A, Jia L G, Bjarnason J B, Fox J W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinase: structure, classification and their relationships to mammalian reproductive proteins[J]. Arch Biochem Biophys, 1994, 308: 182—191.

- [2] 张连江, 郑颖, 范泉水, 邱薇, 李江, 余芳芳. 高纯度抗五步蛇毒 $F(ab')_2$ 血清的制备[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25: 414—418.
- [3] Liu Q, Xu W, Cheng X, Jin G, Shen X, Lou H, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding haemorrhagic toxin acutolysin A from *Agkistrodon acutus* [J]. Toxicon, 1999, 37: 1539—1548.
- [4] Tsai I H, Wang Y M, Chiang T Y, Chen Y L, Huang R J. Purification, cloning and sequence analyses for pro—metalloprotease—disintegrin variants from *Deinagkistrodon acutus* venom and subclassification of the small venom metalloproteases[J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 1359—1367.
- [5] Wang W J, Huang T F. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom[J]. Thromb Haemost, 2002, 87: 641—650.
- [6] Niewiarowski S, McLane M A, Kloczewiak M, Stewart G J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors[J]. Semin Hematol, 1994, 31: 289—300.
- [7] Jia L G, Wang X M, Shannon J D, Bjarnason J B, Fox J W. Function of disintegrin—like/cysteine—rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 13094—13102.
- [8] Kamiguti A S, Moura—da—Silva A M, Laing G D, Knapp T, Zuzel M, Crampton J M, et al. Collagen—induced secretion—dependent phase of platelet aggregation is inhibited by the snake venom metalloproteinase jararhagin[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1335(1—2): 209—217.
- [9] Kamiguti A S, Gallagher P, Marcinkiewicz C, Theakston R D, Zuzel M, Fox J W. Identification of sites in the cysteine—rich domain of the class P—III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function[J]. FEBS Lett, 2003, 549(1—3): 129—134.
- [10] Wagstaff S C, Laing G D, Theakston R D, Pappaspyridis C, Harrison R A. Bioinformatics and multi-epitope DNA immunization to design rational snake antivenom[J]. PLoS Med, 2006, 3: e184.

[本文编辑] 贾泽军