

意大利蜜蜂蜂毒透明质酸酶基因的克隆与序列分析

沈立荣, 张传溪, 程家安

(浙江大学 应用昆虫学研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 从意蜂毒腺抽提总 RNA, 用 RT-PCR 获得蜂毒透明质酸酶(AmHya)基因, 其核苷酸序列全长为 1 149 bp. 将 AmHya 氨基酸序列与中蜂蜂毒透明质酸酶(AcHya)和其它 5 种透明质酸酶(Hya)氨基酸序列比较, 结果显示, AmHya 与 AcHya 的同源性最高(91%), 同时对 7 种 Hya 作了分子结构与分子进化分析.

关键词: 意蜂; 蜂毒; 透明质酶; 基因; 序列分析

中图分类号: Q781 文献标识码: A

SHEN Li-rong, ZHANG Chuan-xi, CHENG Jia-an(*Inst. of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Cloning and sequencing of gene encoding hyaluronidase from the venom of *Apis mellifera*. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2002, 28(3): 289-292

Abstract: The venomous hyaluronidase (AmHya) gene of Italian honey bee (*Apis mellifera*) collected in China was amplified by RT-PCR from total RNA of venom glands of the worker bee. Sequence analysis showed the gene was composed of 1 149 nucleotides. The alignment of the amino acid sequence of AmHya gene and 6 Hya genes from other organisms showed that AmHya is most closely related to the AcHya of Chinese honeybee (*A. cerana cerana*) with 91% amino acid level identity. A phylogenetic tree of 7 Hyaluronidases was drawn by using GENETYX program, and molecular structures and functions of these enzymes were compared and analysed.

Key words: *Apis mellifera*; bee venom; hyaluronidase; gene; sequence analysis

透明质酸酶(Hyaluronidase, Hya,)是蜜蜂蜂毒的主要过敏原之一,约占蜂毒干重的2%~3%^[1]. 其生化性质属糖蛋白,是一种催化透明质酸水解的 β -N-乙酰-氨基己糖苷酶,具有很强的生物活性,可以促使蜂毒在局部组织

间渗透和扩散^[2]. 多年来,欧洲学者已对意大利蜜蜂(*Apis mellifera*, 意蜂)蜂毒 Hya (AmHya)作了详细的生物化学和分子生物学研究^[2~5], 而国内对蜂毒 Hya 尚缺乏研究. 我们采用 RT-PCR 方法先后克隆了我国意蜂 AmHya 和中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 中蜂)蜂毒 Hya (AcHya)的编码基因. 本文报道我国意蜂 AmHya 基因的克隆及其序列分析结果.

收稿日期: 2001-07-23

作者简介: 沈立荣(1960—),男,浙江杭州人,博士研究生,主要从事昆虫资源与昆虫分子生物学的研究.

1 材料和方法

1.1 材料

意蜂工蜂采自杭州市东郊蜂场, PGEM - T easy 载体、*Taq* DNA 聚合酶购自 Promega 公司, *Trizol*、*Hind* III、*EcoR* I、低熔点凝胶购自 Invitrogen 公司, cDNA 合成试剂盒购自上海博亚生物科技公司, DNA Marker 购自大连宝生物工程公司, TG1 为宿主菌。

1.2 方法

用 *Trizol* 快速抽提意蜂毒腺总 RNA 的方法参照文献[6]。用 cDNA 合成试剂盒, 并参照该试剂盒说明, 将总 RNA 反转录成 cDNA。然后用正向引物 AGAATTCATGTCTCGGCCTCTCGTGATC 和反向引物 GAAGCTTACACTTGGTCCACGCTCA 及 *Taq* DNA 聚合酶, 经 PCR 从 cDNA 中扩增出目的基因。PCR 条件为 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 30 次循环。RT-PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。低熔点凝胶回收分离目的片段, 与载体的连接、转化, 酶切鉴定重组克隆方法均按文献[7]。由大连宝生物工程公司测定 DNA 序列, 测序结果用 DNA Club 推导氨基酸序列, 通过 Internet 网的 Blast 进行同源性序列检索, 用 GENETYX 与相关生物的 *Hya* 氨基酸序列进行同源性比较以及分子进化分析。

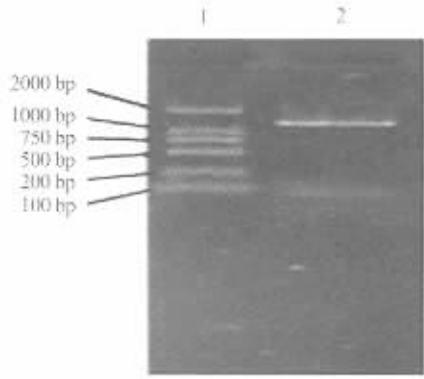
2 结果

2.1 AmHya 基因的 RT-PCR 扩增及基因克隆

取意蜂毒腺总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 反应, 扩增出大小约为 1.2 kb 的 DNA 产物(图 1)。将 RT-PCR 产物克隆入 PGEM - T easy 载体后, 经 *Hind* III、*EcoR* I 双酶切及 PCR 扩增鉴定, 证明插入片断大小正确。

2.2 AmHya 基因的结构

AmHya 基因的核苷酸序列全长为 1149 bp, 可编码由 382 个氨基酸残基组成的多肽,



1-DNA marker; 2-RT-PCR product

图 1 AmHya RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 RT-PCR product agarose gel electrophoresis of AmHya

预计分子量为 42.0 kD。经序列比较, 我国意蜂 AmHya 与欧洲意蜂 AmHya 核苷酸序列^[4](GenBank 登录号 L10710)的同源性在 99% 以上, 二者只有两个碱基的差别, 即前者的 G₁₈₈ 替代了后者的 A₁₈₈, T₉₉₂ 替代了后者的 C₉₉₂, 显示出二者具有高度的亲缘关系; 这与我国意蜂来源于欧洲意蜂的历史记载^[8]是相符的; AmHya 与 AcHya (AF49037) 有 93% 的同源性。将 AmHya 的氨基酸序列与 AcHya 以及其它 5 种生物 *Hya* 的氨基酸序列联配比较(图 2), 结果表明 AmHya 与 AcHya 具有 91% 的同源性, 与长黄胡蜂 *Hya* (DmHya)、常见黄胡蜂 *Hya* (VuHya)、及马蜂 *Hya* (PaHya) 的同源性分别为 54%、52%、46%, 而与吸血沙蠊唾腺 *Hya* (LlHya) 和人精子 *Hya* (PH20Hya) 的同源性分别为 27%、20%。根据已知的 AmHya 蛋白一级结构^[2,4], 可发现 AmHya 与 AcHya 均含有 3 个相应的糖基化位点(NLT), 7 种 *Hya* 均具有共同的模式酶活性位点 DEE(Asp-Glu-Glu), 形成二硫键的 Cys 位点。AmHya 与豚鼠及人精液 PH20Hya 同属糖苷酶 56 家族^[4], 因此上述 *Hya* 的特点可能正是该类 *Hya* 保守性和生物活性相似的分子基础。

2.3 分子进化分析

由图 3 系统树可见, AmHya 与 AcHya 处在同一个单一分枝中, 亲缘关系最近。其它 3 种属胡蜂总科的蜂毒 *Hya* 处于与蜜蜂蜂毒 *Hya* 平行的另一分枝中, 同源性也很高

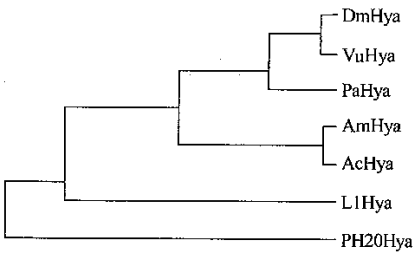


图 3 AmHya 与其它 6 种生物 Hya 氨基酸序列的亲缘关系树状图

Fig. 3 Phylogenetic tree of AmHya gene and 6 Hya genes from other organisms based on amino acid sequence

(DmHya 与 VuHya 和 PaHya 的同源性分别达到 91% 和 76%)。从该系统树可见,蜂毒 Hya 间的亲缘关系近于与非蜂毒 Hya 的亲缘关系,在一定程度上显示出同类 Hya 的系统发育关系。

3 讨 论

Hya 可作为工具酶和药物扩散剂用途很多。按来源和结构特征及酶学特性等, Hya 分为鞣丸型、水蛭型和细菌型三类,鞣丸型存在于人、羊、牛和其它哺乳动物的体液(血液、精液等),蜘蛛毒、蛇毒、蝎毒以及蜂毒中^[9],多数已知成分的蜂毒、蚂蚁毒中均含有 Hya^[10,11]。我国作为世界第一养蜂大国,具有丰富的蜂毒资源,开展蜂毒 Hya 等生物活性成分的分子生物学研究,利用基因工程技术进行产业化开发利用的探索是十分必要的。

References:

- [1] Habermann E. Bee and wasp venoms [J]. *Science*, 1972,177:314-322.
- [2] Housley M Z, Miglierini G, Soldatova L, *et al.* Crystal structure of hyaluronidase, a allergen of bee venom[J]. *Structure*, 2000,8: 1025-1035.
- [3] Kemeny D M, Dalton N, Lawrence A J, *et al.* The purification and characterization of hyaluronidase from venom of the honey bee. *Apis mellifera* [J]. *Eur J Biochem*, 1984,139:217-223.
- [4] Gmachl M, Kreil G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993,90: 3569-3573.
- [5] Soldatova L, Mueller U. Superior biological activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in Baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli* [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1998,101:691-697.
- [6] Chomczynski P, Brar A K, Frohman L A. Solvent containing guanidium and phenol and method for isolating RNA from tissue samples [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987 162:156-159.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 nd)* [M]. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Editorial Board of Chinese Agricultural Encyclopedia (Volume Apiculture) [中国农业百科全书(养蜂卷)编委会]. *Chinese Agricultural Encyclopedia (Volume Apiculture)* [中国农业百科全书(养蜂卷)] [M]. Beijing: Agricultural Press, 1993, 396.
- [9] Menzel E J, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaruronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses[J]. *Cancer Letter*, 1998,131:3-11.
- [10] Anthony T T. *Venoms: Chemistry and molecular biology* [M]. New York, USA: A Wiley-Inter Sci publ. John Wiley & Sons, 1977. 501-530.
- [11] Schmidt J O. Biochemistry of insect venoms[J]. *Ann Rev Entomol*, 1982,27:339-368.