

文章编号: 1008-9209(2002)03-0289-04

## 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 Entomolgy, 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%<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[2~5]</sup>, 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。

# 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 AGAATTCAATGTCTCGGCCTCTCGTGATC 和反向引物 GAAGCTTACACTGGTCCACGCTCA 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.

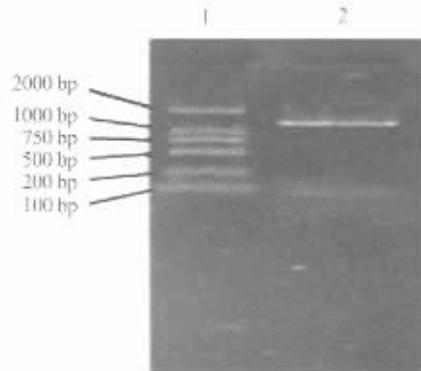
# 2 结果

## 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<sup>[4]</sup>(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 G<sub>188</sub> 替代了后者的 A<sub>188</sub>, T<sub>992</sub> 替代了后者的 C<sub>992</sub>,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<sup>[8]</sup>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%,而与吸血沙蠧唾腺 Hya (LiHya) 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<sup>[2,4]</sup>,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<sup>[4]</sup>,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.

AcHya	MSRPLVIAEEMMVGVLLMLAPV-L-RINALLGF-VPSTPNDNNKTKREFNVY--WNVPT	55
AmHya	MSRPLVITEGMMTGIVLLMLAP-----INALLGF-VQSTPDNNKTV-REFNVY--WNVPT	51
DmHya	S-----ERPK-----RNFNLY--WNVPT	16
L1Hya	MNW-----IFH---LFCAVYG-I-FCEE-----N-----S-----FTIY--WNVPT	29
PaHya	YVS-LSPDSV-FNI---ITDD-I-SHQIL-SR-SNCERSKRP--KRWFSTIY--WNVPT	45
PH20Hya	MGV-LKFHKHIFRSFVKSSGSVSQLV-TFLIPCCCLTNFRAPPVIPNVAFLWAWNAPS	57
VvHya	S-----ERPK-----RNFNLY--WNVPT	16
AcHya	FMCHKYGL-RFEEVSBKYGILQNW-MDKFWGEELAIALYD-PGMFPALLKDSDNGNVVARN	111
AmHya	FMCHKYGL-RFEEVSEKYGILQNW-MDKFRGEELAIALYD-PGMFPALLKDSDNGNVVARN	111
DmHya	HQCEKLNV-SFISLKLNLVHNK-DGNGFSGESFTILYS-PGLWPSMEHK--NIT-NG	81
L1Hya	FMCQHQGM-NFDEVTD-FNIKHNS-KDNFRGETIISTIYYD-PGKFPALMPLKNGNYEERN	100
PaHya	EFCFLGKFDEPLDMSLSFSFGSP-RINA-T-GCGVTFYDRLGYPPYIDSTITGVTVNG--	112
PH20Hya	FMCHQHQYL-YFDEVTN-FNIKRNS-KDDFQGDKIAFYD-PGEGFPALLSLKDCKYKKRN	71
VvHya	*. . . . . * . . . . * . . . . * . . . .	*
AcHya	GGVPQLGNLTKHLQVFRDHLINQIP-DKSIFPCVGVIDFESWRPIFRQNWSASLQPYKKLSI	170
AmHya	GGVPQLGNLTKHLQVFRDHLINQIP-DKSIFPCVGVIDFESWRPIFRQNWSASLQPYKKLSI	170
DmHya	GGVPQEGNITIHLQRFIENLDKTYP-NRNFNCGVIFDFERWRPIFRQNWNQNMIIHKKFSI	130
L1Hya	-GMPQCCGNMTLHLLEKLEKDVKELLK-DDGYSGLAVIDMESWRPVFRQNTGWMIKYRELTF	139
PaHya	GGVPQERGNITIHLQQFNEIDLDDKMTP-DKNGFGIGVIFDFERWKPIFRQNWNQNTIEHKKYSI	159
PH20Hya	-GIPQKISLQDHDLKAKKDITFYMPVD-NL-GMAVIDWEWBWRPTWARN--WKP---K-	161
VvHya	GGVPQEGNITIHLQKFIENLDKLYP-NRNFNCGVIFDFERWRPIFRQNWNQNMIIHKKFSI	130
AcHya	DVVRREHPS-WGDQRVEQEAKRRFE---K-Y---GKLFMEETLKAAKRMRPAANWGHYA	221
AmHya	EVVRREHPS-WDDQRVEQEAKRRFE---K-Y---GKLFMEETLKAAKRMRPAANWGHYYA	217
DmHya	DLYRNEHPF-WDKKMIIELEASKRFE---K-Y---ARLFMEETLKLAKKTRKQADWGYYG	181
L1Hya	EQYNKTLAEEYKNNNTNDKLNRNLIKESAEIPEAPAKDFLMNSTELVKKWYWDKAWGYYG	199
PaHya	ELVRKEEHPK-WSESMIEAEATKKPF---K-Y---ARYFMEETLKLAKKTRKRAKGWYYG	210
PH20Hya	DVYKNRSLIELVQQQNQQLSLTEATEBKAKQEFEKACK-DFLVETIKLGKLLRPNHLWCGYI	220
VvHya	DLVRNEHEPT-WNKKMIELEASKRFE---K-Y---ARFFMEETLKLAKKTRKQADWGYYG	181
AcHya	YPYCYNLTTPNQP---SSQCEAT-TMQENDKMSWLFESEDVLLPSSVYLWRW-LTSGERVGLV	277
AmHya	YPYCYNLTTPNQP---SAQCEAT-TMQENDKMSWLFESEDVLLPSSVYLWRW-LTSGERVGLV	273
DmHya	YPYCFNMSNP---VPDCDAT-AMLENDKMSWLFESEDVLLPSSVYLWRW-LTDPDRQVGLV	237
L1Hya	FPYCFNMSNP---VKEENNKTTEWLFSKSYDWFPSVYITKVNFCTCEERGQLV	258
PaHya	FPYCYNTPNQP---GPDCDA-ATIENDRSLWMYNNQEIIFPSVYVHR-E-QKPEERVYLV	266
PH20Hya	FPDCYNNHHYKPGYNGSCPNVEIKRND-DLSWLWNESTALYPSIYLNLTQQSPPVAATLYV-	278
VvHya	YPYCFNMSPNP---VPECQDVT-AMHENDKMSWLWNQNVLPSVYVQE-LTPDQRIGLV	237
AcHya	GGRKVEALRIARQMTTSRK---KVLPPYYWYKYQDERRDTDSLRADLEATLRKITDL-G-ADG	333
AmHya	GGRKVEALRIARQMTTSRK---KVLPPYYWYKYQDERRDTDSLRADLEATLRKITDL-G-ADG	329
DmHya	QGRVKEAVRISNNLKHSPK---V-LSYWWVYVQYDQDNTFLTETDVKKTQFQEIAIN-G-GDG	292
L1Hya	RGRVTEYQRLRKEFNPKAK---IY-PPYWFLYNLSNEY-LSKEDLEMSLKLKLM---GKMDG	312
PaHya	QGRVKEAVRISNNLKHSPS---V-LAYWWVYVQYDQDNTFLTETDVKKTQFQEIAIN-G-GDG	321
PH20Hya	RNRVRBAIRVSKIPDAKSLPWF-A-TRIVFTDQVLKPLSQDELVYTFFGETVALGA-SGI	336
VvHya	QGRVKEAVRISNNLKHSPK---V-LSYWWVYVQYDNTFLTETDVKKTQFQEIAIN-G-GDG	292
AcHya	FIIIWGSSNDIN-TKAKCQFREYLNND-----LG-PVV---KR---I-AL	369
AmHya	FTIWGSSDDIN-TKAKCQFREYLNN-----LG-PAV---KR---I-AL	365
DmHya	IWIWGSSSDVN-SLSKCKRLERYLLTV-----LG-PIT---VN---V-TE	328
L1Hya	AVIWGSSKNLT---KECECKDLYDYVNGTMRT---V-LEGLKKPEN-----NV---K-WN	356
PaHya	IWIWGSSSDVN-SLSKCKRLERYLLNT-----LG-PFA---VN---V-TE	357
PH20Hya	V-IWGLTSIMSRMSK---CLLDNQMYMETILNPYIINVTLAAKMCSCQVLQCQGVCIKRNW	393
VvHya	IWIWGSSSDVN-SLSKCKRLERYLLTV-----LG-PIA---IN---V-TE	328
AcHya	N-----S-----	371
AmHya	N-----N-----	367
DmHya	-----	328
L1Hya	G-----S-----	358
PaHya	-----	357
PH20Hya	SSDYLHLPNDNFAIQLEKGKFTVRGKPTLEDLQEKFSEKFCYCSYSTLSCKEADVKDID	453
VvHya	-----	328
AcHya	--NAPAAK-S-RLDVSV-----QV-----	387
AmHya	--NANDRL-T-VDVSV-----QV-----	382
DmHya	--TVN-----	331
L1Hya	--CQETSADAARY-LKNCTDK-Q-----	376
PaHya	--TVNGRS-S-LN-F-----	367
PH20Hya	--AVDVCTIADGVCTDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLISATMFTVSTLFLITSSVASI	509
VvHya	--AVN-----	331

AmHya 为本文序列, AcHya、DmHya、HsHya、L1Hya、PaHya、VvHya 在 GenBank 的登录号分别为 AF 490379、P49371、S40465、S40465、AD52616、P49340。“▲”表示酶活位点, “■”表示 Cys 位点。下划线表示信号肽, 黑体表示糖基化位点。

图 2 AmHya 与其它 6 种生物 Hya 氨基酸序列的同源性比较列的同源性比较

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequences of AmHya gene and 6 organism Hya genes from other organisms

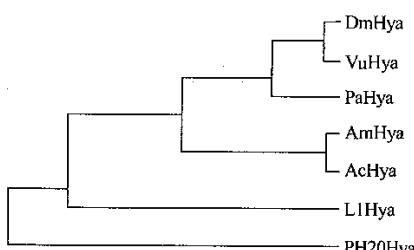


图3 AmHya 与其它 6 种生物 Hya 氨基酸序列的亲缘关系树状图

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 分为睾丸型、水蛭型和细菌型三类, 睾丸型存在于人、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<sup>[9]</sup>, 多数已知成分的蜂毒、蚂蚁毒中均含有 Hya<sup>[10,11]</sup>. 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 guanidinium 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(养蜂卷) ] [M]. Beijing: Agricultural Press, 1993, 396.
- [9] Menzel E J, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: 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-Interscience publ. John Wiley & Sons, 1977. 501-530.
- [11] Schmidt J O. *Biochemistry of insect venoms* [J]. *Ann Rev Entomol*, 1982, 27: 339-368.