

Molecular Cloning and Expression of an Isotoxin Gene, α -bungarotoxin, from *Bungarus multicinctus*

WANG Fang^{1,2}, WANG Yi Qian^{1,①}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Snake venom contains a number of small proteins, enzymes and other components which displays a broad spectrum of biological activities. With the ability of specifically binding on acetylcholine receptor, α -bungarotoxins are not only useful molecular probes in investigating the mechanism of neural signal transmission but also potential pharmacological preparations for neural disease treatment. In current research, cDNAs of *Bungarus multicinctus* venom gland were synthesized using SMART™ cDNA amplification kit and then α -bungarotoxin genes were cloned and sequenced. Total of 20 clones were sequenced representing 14 isotoxin mRNAs of α -bungarotoxins. Among those clones, a novel isotoxin gene was subcloned into two expression plasmids α -BgTX/pQE30a and α -BgTX/pGEX 4T 1, and transformed into *E. coli*. After inducing with IPTG, fused protein of GST- α -BgTX was successfully expressed at level of 30% gross proteins of bacteria. More than 25% of fused protein was in the soluble fraction and the rest in inclusion body.

Key words: α -bungarotoxin; gene cloning; prokaryotic expression; cDNA sequence

α -银环蛇毒素同工毒素基因的克隆和表达

汪芳^{1,2}, 王义权^{1,①}

(1. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005;

2. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: α -银环蛇毒素是存在于银环蛇蛇毒中的一种长链神经毒素,能与神经递质受体特异性结合,因此它不仅是神经信号传导机制研究的重要分子探针,更具有开发治疗某些神经性疾病新型药物的可能性。用 SMART 技术,反转录合成银环蛇毒素 cDNA,克隆并测定了 α -银环蛇毒素基因,得到 14 种 mRNA 序列;进而将其中一种新的 α -银环蛇毒素基因亚克隆到原核表达载体 pQE30a 和 pGEX 4T 1 中,在大肠杆菌中通过 IPTG 诱导表达,其中带有 GST 融合蛋白的重组质粒 α -BgTX(P22 A31)/pGEX 4T 1 在 BL21 菌株中得到高效表达,表达量占菌总蛋白的 30%,可溶形式存在的融合蛋白大于 25%。

关键词: α -银环蛇毒素; 基因克隆; 原核表达; cDNA 序列

中图分类号: Q344⁺.13 文献标识码: A 文章编号: 0379-4172(2005)07-0682-07

收稿日期: 2004-07-25; 修回日期: 2004-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30470938)、教育部骨干教师资助计划项目(编号: GG-180 21002403 1740)和教育部留学回国人员启动基金资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30470938), Foundation of University Key Teacher from State Education Ministry (No. GG-180 21002403 1740) and SRF for ORCS, SEM]

作者简介: 汪芳(1978-), 上海人, 硕士, 研究方向: 动物分子生物学

① 通讯作者。E-mail: wangyiq@xmu.edu.cn

神经毒素是蛇毒蛋白中的一种重要成分,在不同种类的蛇毒成分中差别较大。目前蛇毒中有效成分的获取主要是通过捕蛇或养蛇取毒,得到粗蛇毒后再分离纯化有效成分。由于粗蛇毒来源复杂,分离纯化难度大,不易形成固定的纯化生产工艺,尤其是无法实现规模化、低成本生产;同时通过直接从自然界中大量捕蛇获取蛇毒,还会破坏生态平衡。与此相比,用基因工程技术生产蛇毒有效成分则具有巨大的优势。它不仅能实现规模化生产特定的蛇毒有效成分,而且还可通过基因的定点突变,改造天然成分的特性,有望生产出药效更高、副作用更小的蛇毒有效成分制品。因此,用基因工程技术克隆和表达蛇毒有效成分对保护自然资源,实现可持续发展具有重要意义。

α 银环蛇毒素(α bungarotoxin, α BgTX)是银环蛇毒素中一种由 74 个氨基酸组成的碱性多肽,属于长链神经毒素,有典型的三指型空间结构^[1,2],是探讨蛋白结构与功能的理想材料。 α 银环蛇毒素可与乙酰胆碱受体上的 α 亚基特异性结合,从而竞争性阻断神经递质的传递,因此 α 银环蛇毒素是研究神经系统中乙酰胆碱受体,神经递质的产生及其传递过程中分子机制的重要探针。正是由于 α 银环蛇毒素与神经递质受体特异性结合的特点,因而具有将其开发成治疗某些神经性疾病药物和新型、高效镇痛剂的可能性。

对 α 银环蛇毒素基因结构的研究结果显示,该蛇毒素为多个基因编码产物,因此可能存在多种同工毒素(isotoxin),目前只报道了其中 2 种同工毒素基因的 DNA 序列^[3,4]。国内虽有人报道过 α 银环蛇毒素基因的克隆和在大肠杆菌中的表达^[5,6],但均是国外已报道过的 α 银环蛇毒素同工毒素基因^[7]。我们在对银环蛇毒素基因的研究过程中,从大陆产银环蛇(*Bungarus multicinctus*)毒腺 cDNA 中克隆到数种同工毒素基因,并用其中 1 种新的 α 银环蛇毒素同工毒素基因构建大肠杆菌表达质粒,获得了高效表达。

1 材料和方法

1.1 材料

银环蛇(*Bungarus multicinctus*)购自南京惠民桥农贸市场。DEPC(焦碳酸二乙脂)和 SDS 为 Amresco 公司产品;Trizol 购自 Gibco 公司;反转录

酶购自 Life Technologies 公司;质粒提取试剂盒购自 Promega 公司;PCR 产物纯化和胶纯化试剂盒购自上海华舜生物工程公司;SMART™ cDNA 文库构建试剂盒系 Clotech 公司产品;pMD18 T 载体, BamH I, Pst I, Not I, T4 DNA Ligase 均为 TaKaRa 公司产;原核表达质粒 pQE30a、pGEX 4T-1 和宿主菌大肠杆菌 M15、BL21 分别为南京师范大学张双全教授和李朝军教授惠赠;丙烯酰胺、双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自 Roche 公司;TEMED 购自 Bio Rad 公司;Tryptone、Yeast Extract 购自 Oxioid 公司。RNA 提取和 cDNA 合成过程中用到的所有器皿均经 0.05% 的 DEPC 水浸泡 24 h 后高压灭菌处理。

1.2 方法

1.2.1 样品处理和 cDNA 合成

活蛇经人工排毒诱导毒腺 mRNA 表达数日后,断下蛇头,取出双侧毒腺,氮中研磨成粉。总 RNA 提取和全长 cDNA 合成与此前报道相似^[8]:组织粉末转入匀浆器中,加入适量 Trizol,上下匀浆数次,分装至 1.5 mL 离心管中,室温静置 5 min,加入为 Trizol 体积 0.2 倍的氯仿,剧烈摇晃 15 s; 4℃ 12 000 g 离心 15 min,取上清至新离心管中,再加入 0.5 倍体积的异丙醇,室温静置 10 min, 12 000 g 离心 10 min,沉淀物用 75% 的乙醇洗涤,然后离心 5 min,倾弃上清,自然干燥 5~10 min,加入适量无 Rnase 的超纯水,溶解沉淀的总 RNA, 1.4% 琼脂糖胶电泳检测。

双链 cDNA 合成用 Clotech 公司的 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒,操作步骤按照试剂盒提供的手册。该试剂盒根据 mRNA 的 3' 端有 poly A 和 5' 端有帽子的特点,提供了一套引物,从而可以获得质量较高的全长 cDNA。

1.2.2 α 银环蛇毒素基因的克隆和测序

α 银环蛇毒素基因的 3' RACE 方法与已报道的心脏毒素类似物基因的 RACE 方法基本相同^[9], α 银环蛇毒素基因特异性引物 CTXS 序列为: 5'-AAGATGAAAACCTCTGCTGCTGAG 3', 下游引物 CDS3 依据 SMART 试剂盒中所用接头 CDS III/3' PCR Primer 序列合成;以反转录的全长双链 cDNA 为模板,用该对引物扩增 α 银环蛇毒素基因。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 4 min 后,反应 30 个循环,循环参数 95℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃

延伸 40 s; 最后 72 °C 补齐 2 min。PCR 产物电泳后, 将约 500 bp 大小的片段切胶纯化, 插入克隆载体中, 筛选阳性克隆。

得到的阳性克隆用 PCR 方法鉴定载体中是否已插入目的基因, 选取含有目的基因的阳性克隆, 扩大培养后提取质粒, 重组质粒用荧光标记方法, 全自动测序。每个克隆的双向测序数据均经过仔细核对, 然后将全部序列数据连同已报道的 2 个 α 银环蛇毒素同工毒素一起用 Clustal X 1.8 比对。

1.2.3 融合表达质粒构建和阳性克隆筛选与鉴定

从上述已测序的 20 阳性克隆中选取克隆 I5 为目的基因, 构建融合表达质粒。根据 α BgTX 成熟肽编码区 cDNA 序列以及质粒 pQE30a 和 pGEX-4T-1 的多克隆位点另设计 1 条上游引物 BgTXE1: 5'-TCTAGGATCCATCGTATGCCACAG-3' 和 2 条下游引物 BgTXE2: 5'-AATCCTGCAGTCAAGCAGGTCTG-3', BgTXE4: 5'-ACAGCGGCCGCTAACCAGGTCTCTG-3'。其中 BgTXE1 中含有 *Bam*H I 酶切位点, BgTXE2 中含有 *Pst* I 酶切位点, BgTXE4 中含有 *Not* I 酶切位点。

以含有序列 I5 的重组质粒 DNA 为模板, 分别用引物对 BgTXE1/BgTXE2 和 BgTXE1/BgTXE4 扩增 I5 中 α 银环蛇毒素成熟肽编码区, PCR 反应体积为 30 μ L, 内含 10 mmol/L 的上下游引物各 1 mL, 2 mmol/L 的 dNTPs 2 μ L, PCR 采用普通的循环条件, 退火温度分别为 55 °C 和 60 °C。PCR 产物经酶切后与表达质粒连接, 构建成 α BgTX (P22 A31)/pQE30a 和 α BgTX (P22 A31)/pGEX-4T-1 融合表达质粒。

两种重组的融合表达质粒分别转化各自的宿主菌, 用蓝白斑筛选, 挑取阳性单克隆菌落, 经短暂培养后, 用基因特异性引物做菌落 PCR, 筛选出 PCR 为阳性的克隆; 进一步提取阳性克隆的重组质粒, 用全自动荧光标记测序, 以检验插入的 DNA 片段是否为目的基因, 及插入的位置是否正确。

1.2.4 融合基因的诱导表达

经检验插入片段准确无误的重组质粒 α BgTX (P22 A31)/pQE30a 再转化大肠杆菌 M15, 转化后的单克隆培养液在 37 °C 250 r/min 振摇至 *OD*₆₀₀ 为 0.4 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 诱导表达 4 h, 并每隔 1 h 取 1 mL 菌液, 12 000 g 离心 2 min, 弃上清, 菌体沉淀物置 -20 °C 冻存备用。重组质粒 α BgTX (P22 A31)/pGEX4T 的诱导表达与 α

BgTX (P22 A31)/pQE30a 基本相同, 不同的是使用大肠杆菌 BL21, 液体培养基为 2 \times YTA, IPTG 诱导后采用 28 °C 低温培养。

将不同诱导时间的样品, 分别用 100 μ L 1 \times SSB 重悬菌体沉淀物, 于 100 °C 水浴 5 min, 恒压 100 V 进行 18% 或 12% SDS PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色显带, 凝胶成像系统分析并拍照。

表达产物分布情况的确定是将培养 4 h 后的 50 mL 诱导培养物冷冻离心后, 取 2 mL PBS 重悬菌体, 在冰浴中经超声破碎后再次离心, 取 10 mL 上清加入等量的 2 \times SSB 混合; 沉淀物用 500 μ L 1 \times SSB 重悬。分别取 5 μ L 进行 SDS PAGE 电泳、染色、观察、拍照。

2 结果

2.1 α 银环蛇毒素基因的序列分析

从 3' RACE 的 cDNA 阳性克隆中, 随机选出 20 个阳性克隆测序, 将测序获得的 20 个 cDNA 序列与从 GenBank 中下载的 2 个 α 银环蛇毒素基因序列(登录号为: Y17057, Y17058)一起比对, 得到 472 bp, 序列间相似性达 98.6% 以上, 表明这些序列同属 α 银环蛇毒素基因, 不过在测得的 20 个 cDNA 序列中, 共有 14 种互不完全相同的序列; 测序结果还表明, 3' RACE 扩增得到的 cDNA 已包括了起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA)和 mRNA 加尾信号(AATAAA), 在这段 cDNA 序列中包括 288 bp 完整的开放阅读框, 编码 21 个氨基酸的信号肽、74 个氨基酸的成熟肽和 3' 非翻译区的 184 bp(图 1)。

2.2 表达质粒的构建及其在大肠杆菌中的表达

以上述克隆 I5 的重组质粒为模板, 用引物 BgTXE1/BgTXE2 扩增得到编码 α BgTX 成熟肽的 cDNA 片段, 经 *Bam*H I /*Pst* I 双酶切后, 定向插入经过同样两种酶切的 pQE30a 表达质粒, 转化大肠杆菌 JM109, 经菌落 PCR 鉴定和进一步双向测序检测, 得到了正确的重组表达质粒 α BgTX (P22 A31)/QE30a。然而, 虽然用该质粒曾成功转化了大肠杆菌 M15, 但用终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h, 在不同时段取出的细菌培养液经离心沉淀、SSB 重悬、裂解后, 用 18% SDS PAGE 电泳检测, 均未观察到目的基因表达产物的条带。

100

I1 AAGATCAAAA CTCCTCTGCT GACCTTGGTG GTTGIGACAA TCGTGTGCTT CGACTTAGGA TATACCATCG TATGCCACAC AACAGCTACTTCGCCATTA

I2

I3

I4G.....

I5G.....

I6G.....

I7G.....

I8C.....

I9

I10G.....

I11G.....

I12G.....

I13G.....

I14G.....

V31G.....

A31G.....

200

I1 GCGCTGTGAC TTGTCCACCT GGGGAGAACC TATGCTATAG AAAGATGTGG TGTGATGTAT TCTGTTCCAG CAGAGGAAAG GTAGTCCAAT TGGGGTGTGC

I2G.....

I3C.....

I4C.....

I5C.....

I6C.....

I7C.....

I8G.....

I9

I10

I11C.....

I12C.....G.....

I13

I14

V31

A31C.....

300

I1 TGCTACTTGC CCTTCAAAGA AGCCCTATGA GGAAGTTACC TGTGTCTCAA CAGACAAGTG CAACCCACAT CCGAAACAGA GACCTGGTGA GTTTTGCTC

I2

I3A.....A.....

I4G.....A.....

I5

I6

I7

I8

I9T.....

I10T.....

I11T.....

I12

I13T.....

I14T.....

V31

A31

400

I1 TCATCCATCA TGGACCATCC TTGAAAATTT ATGCTTGTGG CCTTTACCAC CAGATGGTCC ATCATTCCCC TCTCCCCTGC TGTCTTTGAC ATCTCAACAT

I2

I3

I4

I5

I6

I7A.....

I8

I9

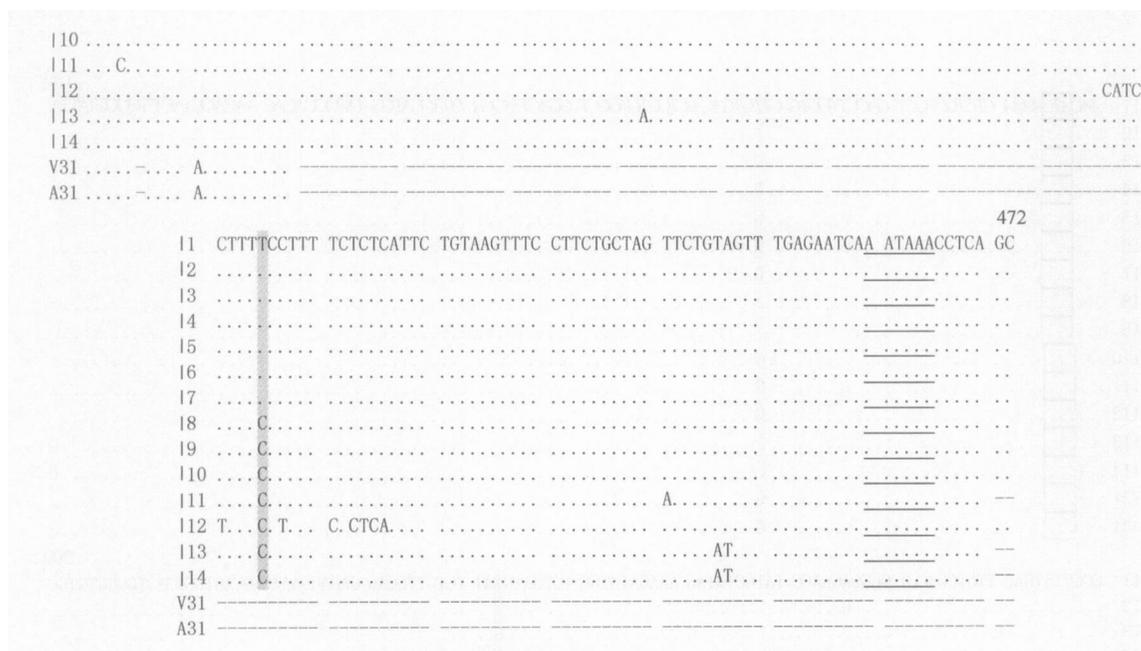


图 1 α -银环蛇毒素 3' RACE cDNA 序列比对

斜体表示信号肽编码区;下划线表示加尾信号序列;方框分别表示起始和终止密码子;阴影表示突变热点;圆点表示与第一行相同碱基,短横表示缺失。I1~I14 本研究得到的 14 种序列;V31: α -银环蛇毒素(Y17057);A31: α -银环蛇毒素(Y17058)。

Fig. 1 3' RACE cDNA sequences comparison of α -bungarotoxin

The italic sequences are signal peptide encoding region, and sequences underlined are poly (A) adding signal. Sequences marked with boxes are initiation or termination codons, and that marked with shadow denote mutation hot spots. Identical nucleotides are indicated by dots and deleted nucleotides indicated by hyphens. V31: α -bungarotoxin (Y17057); A31: α -bungarotoxin(Y17058).

再次以同样的重组质粒为模板,用引物 BgTXE1/ BgTXE4 扩增编码 α BgTX 成熟肽的 cDNA 片段,重新构建 α BgTX (P22 A31) /pGEX 4T 1 融合表达质粒,经 PCR 鉴定和双向测序检测,得到正确的重组融合表达质粒,再转化大肠杆菌 BL21。同样用终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h,取不同时段的菌体裂解物,经 12% SDS PAGE 检测,结果显示在分子量为 35 kD 左右处有目的基因的诱导表达带;光密度分析表明,目的基因表达产物量约占全菌总蛋白的 30%,至此,得到了 α BgTX 基因的高效融合表达系统(图 2)。含重组质粒未经诱导的培养物有较弱的本底表达,同样条件下无插入基因片段的 pGEX 4T 1 空载体的表达产物为 29 kD 的谷胱甘肽转移酶(GST)。

表达产物分布情况研究结果表明, α BgTX (P22 A31) /pGEX 4T 1 融合表达质粒在大肠杆菌 BL21 中的表达产物以可溶性和包涵体两种状态存在,其中可溶部分含量约占总表达产物 25%左右(图 3)。

3 讨论

关于 α -银环蛇毒素 mRNA 在同一个体中是否存在多态性,以及这种多态性是由于基因组中存在多拷贝基因造成,还是由 mRNA 转录后编辑形成的争论由来已久^[3,4]。本文测得的 20 个 α -银环蛇毒素 cDNA 克隆中有 14 种序列,虽然 cDNA 合成过程中由于 PCR 误差可能会引入人工假象,但在上述 14 种序列中至少有 6 种是同时在 2 个 cDNA 克隆中测得的,表明 α -银环蛇毒素 mRNA 多态性客观存在。至于这种 mRNA 多态现象是多拷贝基因生成,还是由 mRNA 编辑产生,或二者皆有?尚不得而知。这 14 种 cDNA 中大多数突变位点为同义突变,在引起编码氨基酸改变的突变中,除了有已报道过的导致成熟肽第 31 氨基酸变化的突变外,还有一些造成其他氨基酸变化的突变,因此可以推断,银环蛇毒腺中有两种以上 α -银环蛇毒素同工毒素存在。

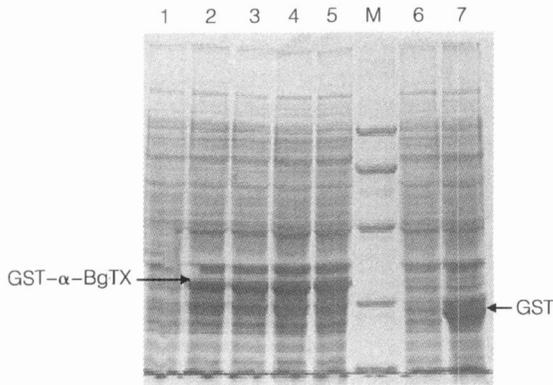


图2 α BgTX (P22 A31) / pGEX 4T 1
诱导表达产物

1~5: IPTG 分别诱导 0、1、2、3 和 4 h; 6: 空载体未诱导; 7: 空载体诱导; M: 蛋白质分子量标记 (97、65、43、31 和 20 kD)。

Fig. 2 Induced products of α BgTX
(P22 A31) / pGEX 4T 1

1~5: Induced by IPTG for 0, 1, 2, 3 and 4 hours respectively; 6: pGEX 4T 1 without inducement; 7: pGEX 4T 1 induced by IPTG; M: Protein molecular weight marker.

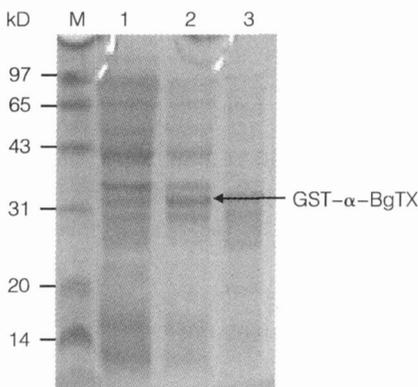


图3 α BgTX (P22 A31) / pGEX 4T 1
诱导产物的分布

1: 未诱导; 2: 超声后上清; 3: 超声后沉淀物; M: 蛋白质分子量标记。

Fig. 3 Distribution of induced α BgTX
(P22 A31) / pGEX 4T 1 protein

1: Supernatant without inducement; 2: Supernatant after ultrasonication; 3: Srecipitate after ultrasonication; M: Protein molecular weight marker.

同工毒素间只有个别氨基酸的变化, 且都有非常相似的空间结构。由于其结构上差异微小, 可能在毒素的生物学活性和其他生化特性上只是略有不同。 α 银环蛇毒素与乙酰胆碱受体上的 α 亚基有很

强的亲合性, 可以竞争性地阻断神经递质的传递。银环蛇在捕食过程中以 α 银环蛇毒素麻醉猎物, 使之麻痹瘫痪, 然后完整地吞食下去, 这一过程中一方面要迅速致使猎物麻痹, 另一方面由于蛇的吞食过程非常缓慢, 需要在一次注入毒素后能使猎物在足够长的时间内持续保持麻醉状态, 不至于中途跳脱或伤及自身。多种同工毒素的存在可能在作用时效方面有所不同, 以适应毒蛇的这种捕食方式。另一方面, 毒蛇在自然界中猎食对象多种多样, 变化的同工毒素在针对不同猎物的作用效力方面也可能有所不同。因此, 同一蛇体内同时存在多种同工毒素, 是毒蛇在自然环境中对其捕食行为方式和食物多样性的一种适应。

在获得的 14 种 cDNA 序列的成熟肽编码区中, 除第 31 位氨基酸外, 还有 6 个引起氨基酸代换的突变, 但这些代换的氨基酸中, 都有相同的极性特征。软件模拟分析表明, 这些氨基酸代换均未对三指型空间结构发生影响。其中克隆 I5 的第 131 位碱基为 C, 从而使其编码蛋白的成熟肽部分第 22 位氨基酸由 Leu \rightarrow Pro, 二者均为非极性氨基酸, 估计这种改变对毒素的生物学活性没有太大影响。故将这一新的 α 银环蛇毒素基因克隆到大肠杆菌表达系统中, 以期得到其基因工程产品, 用于进一步的药理和毒理研究。

大肠杆菌表达系统具有表达量高、成本低廉、易于分离纯化和放大制备等优点, 因此首先尝试了原核表达系统。构建的重组质粒 I 5 中有 α 银环蛇毒 P22 A31 基因完整的编码区和 3' 非翻译区, 包括了起始密码子、终止密码子和 poly A 加尾信号, 用其中的成熟肽编码区和 pQE30a 构建重组表达质粒 α BgTX (P22 A31) / pQE30a。pQE30a 载体为 T5 启动子, 表达产物仅带 6 个 His 的 N 端融合蛋白, 可用 Ni^{2+} -IDA 亲和层析胶进行纯化。但转化相应的表达宿主菌, 并用 IPTG 诱导后, 经 SDS PAGE 电泳检测, 没有得到期望的目的条带。出现这一结果有两种可能, 一方面是由于目的蛋白的分子量太小 (约 6 kD 左右), 很容易被大肠杆菌中的蛋白酶降解, 因而在蛋白电泳检测时, 观察不到; 另一方面不同的蛋白需要在不同的表达体系中才能得到有效地表达, α BgTX 在用 pQE30a 作为表达载体时不能得到足够的表达。因此, 我们又尝试了另一原核表达载体——pGEX 4T 1。

pGEX 4T 1 载体为 Tac 启动子, 表达产物为 N

端连接 29 kD 的 GST 融合蛋白。将该毒素基因成熟肽编码区与 pGEX 4T 1 连接成的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 中, IPTG 诱导表达, 结果产生与预期分子量一致的诱导蛋白电泳条带, 表达量约占全菌总蛋白的 30%。外源重组蛋白在大肠杆菌中表达产物通常表现为可溶形式 (soluble fraction) 和不溶性颗粒, 即所谓的“包涵体” (inclusion body)。 α BgTX(P22 A31)/pGEX 4T 1 的大肠杆菌 BL21 表达体系中, 诱导 4 h 后, 分别检测可溶形式和包含体形式的表达产物, 结果表明可溶形式的表达产物占总表达产物的 25%。尝试降低诱导时的 IPTG 的浓度和诱导温度, 提早诱导的起始时间等方式, 发现可以增加可溶部分的比例。 α BgTX(P22 A31) / pGEX 4T 1 表达产生的融合蛋白 N 端带有 GST, 因此可利用谷胱甘肽琼脂糖凝胶纯化。至此, 这一新的 α 银环蛇毒同工毒素在大肠杆菌中得到成功表达, 为进一步研究其生物学活性和药物开发研究打下了基础。

参考文献 (References):

[1] Love R A, Stroud R M. The crystal structure of alpha bungarotoxin at 2.5Å resolution; relation to solution structure and binding to acetylcholine receptor. *Protein Eng*, 1986, 1(1): 37 ~ 46.

[2] Ohta M, Ohta K, Nishitani H, Hayashi K. Primary structure of α bungarotoxin; six amino acid residues differ from the previously reported sequence. *FEBS Lett*, 1987, 222(1): 79 ~ 82.

[3] Liu L F, Chang C C, Liao M Y, Kuo K W. Genetic characterization of mRNA encoding α bungarotoxin; isoforms and RNA

editing in *Bungarus multicinctus* gland cells. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(24): 5624 ~ 5629.

- [4] Chang L S, Lin S K, Huang H B, Hsiao M. Genetic organization of α bungarotoxins from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait): evidence showing that the production of α bungarotoxins is not derived from the edited mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(20): 3970 ~ 3975.
- [5] DUAN Hai Qing, ZHANG Zhao Shan, LI Shu Qin, HUANG Cui Fen. Cloning and expression of bungarotoxin gene. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1999, 31(3): 254 ~ 258.
段海清, 张兆山, 李淑琴, 黄翠芬. α 银环蛇基因的合成与表达. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(3): 254 ~ 258.
- [6] Qian Y C, Fan C Y, Hu T S, Yang S L, Gong Y. Molecular cloning and functional expression of α bungarotoxin (V31) from Chinese continental banded krait. *Zoological Research*, 2000, 21(1): 41 ~ 47.
- [7] Kuo K W, Chen Y C, Chang C C. cDNA sequence analysis and expression of alpha bungarotoxin from Taiwan banded krait (*Bungarus multicinctus*). *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 216(3): 1088 ~ 1094.
- [8] TONG Zong Zhong, WANG Yi Quan, ZHOU Kai Ya, WU Xiao Bing. Full length cDNA library construction of the venom gland of *Naja naja*. *J Nanjing Normal University (Nature Science)*, 2003, 23(3): 268 ~ 272.
童宗中, 王义权, 周开亚, 吴孝兵. 眼镜蛇毒腺全长 cDNA 文库的构建. *南京师大学报(自然科学版)*, 2000, 23(3): 268 ~ 272.
- [9] WANG Fang, WANG Yi Quan, TONG Zong Zhong. Cloning and characterization of cDNAs of cardiotoxin like protein in *Bungarus multicinctus* venom gland. *Hereditas (Beijing)*, 2003, 25(6): 672 ~ 676.
汪芳, 王义权, 童宗中. 银环蛇心脏毒素类似物 cDNA 克隆研究. *遗传*, 2003, 25(6): 672 ~ 676.