

## 两个蛇毒基因克隆及 cDNA 序列多态性再分析

林鲁萍, 林 群, 王义权\*

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:**  $\alpha$ -银环蛇毒素 ( $\alpha$ -bungarotoxin) 是一种突触后神经毒素, 广泛存在于眼镜蛇科蛇类的毒腺中, 对于该基因 cDNA 多态性是否真实一直存有争议。本研究从银环蛇基因组 DNA 中克隆到  $\alpha$ -银环蛇毒素基因序列, 并对其中 5 个克隆进行测序和序列比对分析。作为参照, 从同一次反转录得到的 cDNA 混合物中, 克隆了蛇毒神经生长因子 cDNA, 并对其进行测序、比对和突变情况分析。综合各研究组报道的  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列、 $\alpha$ -银环蛇毒素基因序列和神经生长因子 cDNA 序列的突变情况, 发现  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 的多态性在基因组模板上不存在对应的变化, 因此推测这种多态性不是从不同的转录本而来, 同时考虑到不同研究小组报道的序列突变位点并没有出现相同的情况, 因此其多样性也不是 RNA 编辑的结果。可见这种 cDNA 序列上的多样性很可能是由反转录过程以及基因克隆过程中人为引入的错误造成的。

**关键词:**  $\alpha$ -银环蛇毒素; 多态性; RNA 编辑; 突变

中图分类号: Q959.62; Q38; Q785 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853(2007)05-0457-08

## Cloning of Two Toxin Related Genes and Analysis of Their cDNA Polymorphism

LIN Lu-ping, LIN Qun, WANG Yi-quan\*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Alpha-bungarotoxin is one of the post-synaptic neurotoxins, which widely exists in the Elapidae venom. The polymorphism of  $\alpha$ -bungarotoxin's cDNA sequences has been controversial in previous reports. In the present study, cloning of  $\alpha$ -bungarotoxin gene from the genomic DNA, sequencing of five clones and analysis of their polymorphism were reported. Furthermore, we cloned and sequenced the nerve growth factor (NGF) gene from the same cDNA pool as a standard, and compared the mutation rates among different sources of  $\alpha$ -bungarotoxin cDNAs,  $\alpha$ -bungarotoxin genes and NGF cDNA. The results indicated that there was no diversification in the genome or comparability in the mutative points between different sequences. Therefore, we speculate that the polymorphism of  $\alpha$ -bungarotoxin cDNA resulted neither from different transcripts, nor from RNA editing, but possibly from reverse transcript processes and gene-cloning processes.

**Key words:**  $\alpha$ -bungarotoxin; Polymorphism; RNA editing; Mutation

$\alpha$ -银环蛇毒素 ( $\alpha$ -bungarotoxin) 是一种突触后神经毒素, 可以通过与尼克酰胺乙酰胆碱受体特异性的结合, 从而阻断肌肉神经元与交感神经元之间的神经兴奋传递。1998 年, Liu et al (1998) 第一次从银环蛇毒腺的 cDNA 中克隆到  $\alpha$ -银环蛇毒素基因的全长序列, 结果发现在测得的大量序列中, 有 16 种编码区不同的 mRNA 序列, 可翻译成 10 种不同的蛋白, 此前在用双向电泳的方法从粗蛇毒分离

蛇毒成分时, 已得到过 2 种  $\alpha$ -银环蛇毒素蛋白 (Koesn et al, 1988), 分别对应于 V31 和 A31。但 Liu et al (1998) 从基因组 DNA 中只克隆到一种  $\alpha$ -银环蛇毒素基因, 根据这种在 cDNA 序列上的多态性和在基因组序列上的单一性他们猜测  $\alpha$ -银环蛇毒素基因可能经历了转录后 RNA 编辑的过程。

Chang et al (1999) 从银环蛇基因组 DNA 中, 克隆到 2 种  $\alpha$ -银环蛇毒素基因序列, 编码的蛋白序列

收稿日期: 2007-04-26; 接受日期: 2007-08-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30470938; 30570208); 福建省自然科学基金 (D0510002)

\*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: wangyq@xmu.edu.cn

第一作者简介: 林鲁萍 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物分子遗传学。现在美国 Vanderbilt University

正好与 V31 和 A31 两种变体对应,同时他们对银环蛇毒腺 cDNA 进行扩增,获得超过 100 个阳性克隆的测序结果,但是这些序列也只能推导出 2 种蛋白序列即 V31 和 A31,因此他们认为  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 并不存在那么高的多态性,并且 V31 和 A31 两种同工毒素是由不同的转录本来的,不是由 RNA 编辑造成。Qian et al (2000)再次从银环蛇中克隆到 V31 变体。随后 Wang et al (2005)也从银环蛇毒腺 cDNA 中克隆到 12 种不同的  $\alpha$ -银环蛇毒素序列,可翻译成 8 种不同的蛋白,也包括了 V31 和 A31 两种变体,此外还有其他一些位点的同义替代。然而, $\alpha$ -银环蛇毒素基因的这种多态性是否真实存在,蛇毒素基因转录后是否有 RNA 编辑等问题仍然需要进一步的探讨。

RNA 编辑 (RNA editing) 是在转录时或转录后能够改变 RNA 分子编码特性而又不同于选择性剪接的一种修饰方式,已在多种生物中发现了这一特殊现象 (Benne et al, 1986)。有研究发现果蝇的尼克酰胺乙酰胆碱受体的一些亚基经历着 RNA 编辑过程 (Sattelle et al, 2005); 在神经元的传递过程中, RNA 编辑也起到非常重要的作用 (Barlati et al, 2005)。Hoopengardner et al (2003) 用比较基因组学的方法,发现了 16 条果蝇的 mRNA 和 1 条人的 mRNA 经历了 RNA 编辑的过程,所有这些基因都参与电学神经传导,很多被编辑位点都参与编码功能保守的重要氨基酸,在神经系统的兴奋传导中发挥重要作用。

$\alpha$ -银环蛇毒素可以通过结合乙酰胆碱受体的亚单位,直接参与兴奋传导的过程 (Wu et al, 2005)。毒蛇在捕食者与被捕食者的协同进化过程中,是否也通过产生不同的同工毒素来对应尼克酰胺乙酰胆碱受体的不同变体。这首先要验证蛇毒腺中  $\alpha$ -银环蛇毒素 mRNA 多态性是否存在及这种多态性产生的原因。

本文曾用发现  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 多态性的同一银环蛇个体的冻存肌肉样品,提取总 DNA、扩增基因片段并测序,以确认这种  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 的多态性是否由转录本的多样性造成。此外,从数据库 (<http://www.ensembl.org>) 检索得知,神经生长因子 (NGF) 基因在人类基因组中为单拷贝,我们以克隆  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 的反转录产物为模板,用同样的方法克隆神经生长因子部分 cDNA 序

列,作为参照,估计这一反转录产物过程中是否引入了人为的错误。并统计分析了突变率和突变位点的情况,以期阐明造成  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 多态性的原因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用材料为眼镜蛇科 (Elapidae) 的银环蛇 (*Bungarus multicinctus*), 活蛇经排毒诱导毒腺 RNA 表达数日后,断头剥离毒腺,立即冻存于液氮中,用于提取毒腺组织总 RNA (Wang et al, 2005), 本实验所用的 cDNA 为此次总 RNA 反转录产物; 用同一银环蛇个体的冻存肌肉作为提取总 DNA 的材料。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 和 RNA 提取 总 DNA 用常规的酚-氯仿-酒精沉淀方法从 -20 冰箱冻存的肌肉组织中提取,所得 DNA 用无菌 ddH<sub>2</sub>O 溶解后保存于 4 备用;总 RNA 用 Trizol 方法从上述液氮中保存的同一条蛇毒腺中提取,cDNA 合成根据 Clotech 公司的 SMART<sup>TM</sup> cDNA 文库构建试剂盒的操作步进行。

1.2.2  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组的 PCR 扩增与克隆 根据 GenBank 中已有的  $\alpha$ -银环蛇毒素 DNA 序列,设计引物 BgTX\_genome\_upper 和 BgTX\_genome\_lower,用于扩增  $\alpha$ -银环蛇毒素基因。25  $\mu$ L 的 PCR 反应体系中包括: 10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ L,浓度为 10 mmol/L 的上、下游引物 BgTX\_genome\_upper 和 BgTX\_genome\_lower 各 0.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 4  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L 的 ExTaq 酶 0.25  $\mu$ L, 模板为银环蛇肌肉组织的基因组 DNA 1  $\mu$ L, 加水补足。PCR 循环经 95 预变性 4 min,再按以下参数进行 30 个循环: 95 变性 40 s, 55 退火 45 s, 72 延伸 2 min; 最后 72 保温 7 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物, 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外光下拍照。PCR 产物约 2 kb, 电泳后将目的片段切胶纯化,装入 TA 克隆载体 pMD18, 菌落 PCR 筛选阳性克隆。分别用载体引物 M13-M4, M13-RV 双向测序得到部分序列,再根据所得序列设计测序引物 BgTX\_sequencing、BgTX\_intronI-U、BgTX\_intronI-I、BgTX\_intron2, 用引物步行法 (primer walking) 完成克隆的测序,引物序列见表 1; 并用 BgTX\_check\_upper 和

BgTX\_check\_lower 引物从  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组扩增一段序列, PCR 产物纯化后直接测序, 以确定该样品基因组 DNA 中  $\alpha$ -银环蛇毒素基因是否以单拷贝形式存在。测序用 CEQ-8000 基因分析系统测序 (Beckman-Coulter), 测得的序列运用 DNASTar-SeqMan 软件进行序列拼接。

1.2.3 神经生长因子 cDNA 3' RACE 片段扩增与克隆 为考查银环蛇毒腺 mRNA 反转录和特定 cDNA 扩增过程中由 RT-PCR 和 PCR 引入的错误率, 以同一反转录产物为模板, 根据已知银环蛇神经生长因子的 cDNA 序列设计引物 NGFu, 与 SMART 试剂盒(Clontech)中 3' RACE 的通用引物 CDSIII/3' PCR 一起, 扩增神经生长因子的 cDNA 片段。25  $\mu$ L 的 PCR 反应体系中加入: 10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, 浓度为 10 pmol/L 的两条引物 NGFu 和 CDSIII/3' PCR 各 0.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 4  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L 的 ExTaq 酶 0.25  $\mu$ L, 银环蛇毒腺 cDNA 模板 1  $\mu$ L, 加水补足。PCR 时 95  $^{\circ}$ C 先预变性 4 min; 再按以下循环参数进行 30 个循环: 95  $^{\circ}$ C 变性 40s, 55  $^{\circ}$ C 退火 45s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 40s, 最后 72  $^{\circ}$ C 保温 2 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物, 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯下观察、拍照。PCR 产物电泳后将目的片段切胶纯化, 装入 TA 克隆载体 pMD18, 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 用 CEQ-8000 基因分析系统测序。由于测序过程中遇到 PolyA 重复序列, 使其后续序列的读取困难。故先确定插入序列的方向后, 用 M13-M4 或 M13-RV 引物从 5' 端测得部分序列, 再根据得到的结果设计一段测序引物 NGF\_sequencing 完成克隆的测序 (表 1)。测得的序列用 DNASTar SeqMan 拼接。

1.2.4 实验中引入的突变估算 为估算实验过程

中人工引入的突变, 我们取不同来源的  $\alpha$ -银环蛇毒素、神经生长因子和心脏毒素类似物基因的序列比对, 统计每个基因各个克隆之间多态性位点数, 用公式: 突变率=突变位点数/(被测克隆数 $\times$ 序列长度), 计算出各个序列间的突变率。突变位点数表示各个基因比对后互相间不一致的多态位点个数, 参照 Stapleton et al (2002) 统计的反转录错误率 (1/1 000—1/15 000), 计算出扣除可能的反转录错误率后的突变率。

## 2 结果

### 2.1 $\alpha$ -银环蛇毒素基因和神经生长因子 cDNA 克隆

从银环蛇基因组中用引物 BgTX\_genome\_upper 和 BgTX\_genome\_lower 扩增  $\alpha$ -银环蛇毒素基因, 目的基因约 2kb (图 1A)。

从同一次转录的银环蛇 cDNA 中用引物 NGFu 和 CDSIII/3' PCR 扩增神经生长因子 cDNA 部分序列, 获得约 900bp 和 500bp 的两段序列, 经测序 900bp 的序列为目标基因 (图 1B)。

### 2.2 $\alpha$ -银环蛇毒素基因序列分析

选取  $\alpha$ -银环蛇毒素基因 5 个阳性克隆, 测序分析, 得到了 2655bp 的  $\alpha$ -银环蛇毒素基因序列, 与已知  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列比较, 确定外显子和内含子间剪接位点。结果表明, 该基因含有 3 个外显子, 2 个内含子 (图 2A)。从测得的 5 个  $\alpha$ -银环蛇毒素基因序列的比对结果可见,  $\alpha$ -银环蛇毒素编码区共有 288bp, 第 1 个外显子包括 58bp 的编码区部分, 编码信号肽部分 N 端的 20 个氨基酸; 外显

表 1 用于基因克隆和测序的引物序列

Tab. 1 Information of the primers used in gene cloning and sequencing

引物名称 Primers	序列 Sequences
BgTX_genome_upper	5'-CCg gAA TTC AgA TCG CAA gAT gAA AAC TC-3'
BgTX_genome_lower	5'-gCg ggA TCC TCA ACC Agg TCT CTg TTT C-3'
BgTX_sequencing	5'-gAT gAA AAA TgT TTC TgC TC-3'
BgTX_intron1-U	5'-TTg gCC TTC CAT CCT TTT gAA ATg-3'
BgTX_intron1-I	5'-TAg CCg AAC TAg CTg TTg TgT g-3'
BgTX_intron2	5'-TTC ATC CAA TTT CCC TCA T-3'
BgTX_check_upper	5'-CAA gAA gCT CAC TCT gTA gA -3'
BgTX_check_lower	5'-TAT CAg CTC AAA AAA CCT TAA C-3'
NGFu	5'-ATg TCC ATg CTg TgC TAC ACT CTg-3'
CDS /3' PCR	5'-ATT CTA gAg gCC gAg gCg gC-3'
NGF_sequencing	5'-AAG TTC CTg gAC ACT gAA gA-3'
M13-M4	5'-CAg CAC TgA CCC TTT Tgg gAC CgC-3'
M13-RV	5'-AgC ggA TAA CAA TTT CAC ACA Agg-3'

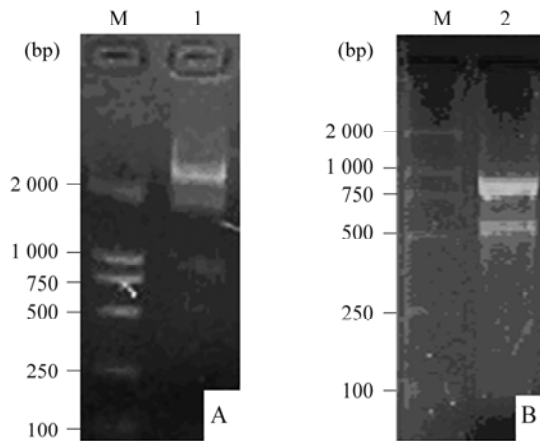


图1  $\alpha$ -银环蛇毒素 PCR 扩增产物 (A) 和神经生长因子 3' RACE PCR 扩增产物 (B) 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products of  $\alpha$ -bungarotoxin gene (A) and 3' RACE PCR amplification products of nerve growth factor gene from the venom cDNA(B)

M: 分子量标记(bp) (DL2000 marker); 1:  $\alpha$ -银环蛇毒素基因 ( $\alpha$ -bungarotoxin gene); 2: 神经生长因子 cDNA(nerve growth factor cDNA)。

子 2 长 105 bp, 编码信号肽剩余的 4 个氨基酸和成熟肽 N 端的 33 个氨基酸; 外显子 3 长 128 bp, 编码剩余的 41 个氨基酸和 1 个终止密码子, 翻译出来的蛋白序列符合 V31 变体。第 1 和第 2 两个内含子长分别为 1790 bp 和 538 bp。

比对结果还显示, 5 个  $\alpha$ -银环蛇毒素基因克隆间共有 13 个多态性位点, 所有这些位点均位于内含子中 (图 2B), 而外显子部分没有发现多态性位点, 也没有与已报道过的  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列多态性中多态性位点相同的情况。同时, Wang et al (2003) 在同一条蛇的毒腺中克隆到 1 个 A31 变体的 DNA 序列, 本次研究中没有发现。

为了进一步验证这 5 个克隆多态性位点的真实性, 我们用 BgTX\_check\_upper 和 BgTX\_check\_

lower 引物, 再次以基因组 DNA 为模板, 扩增  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组序列第一个内含子部分的一个长 508 bp 的片段, 这个片段在比对结果中显示有较多突变位点的区域 (图 2A)。PCR 扩增产物纯化后直接测序, 从测序峰图看出, 没有杂合子峰出现, 提示该段序列在银环蛇基因组中并没有多态性, 此前用 PCR 产物克隆测序的方法, 所得到的 5 个克隆子序列出现较多突变, 可能是由于 PCR 过程引入的错误。此外, 这段序列的单一性还同时暗示了  $\alpha$ -银环蛇毒素基因在银环蛇基因组中不是以多拷贝基因的形式存在的, 不存在基因多态性的现象。

### 2.3 神经生长因子 3' RACE 产物序列的测定

挑取神经生长因子 3' RACE 产物 6 个阳性克隆, 经测序得到神经生长因子 3' RACE 产物的序列共 891 bp, 其中包括完整的编码序列 732 bp, 6 个克隆的序列比对结果显示了 11 个多态性位点 (图 3A), 其中除了 2 号克隆与 4 号克隆完全相同外, 其他序列间各不相同, 克隆间的多态性位点如图 3B 所示。据此 6 种神经生长因子 cDNA 可翻译成 2 种氨基酸序列, 一种序列是 24 号克隆在 581 位缺失了一个 G 改变了读码框而被提前终止, 另外一种序列是其余的 5 个克隆翻译成的完全相同的氨基酸序列, 全部为同义突变。

### 2.4 基因突变率的估算

根据本文测得的  $\alpha$ -银环蛇毒素基因 PCR 产物 5 个克隆的 5 种序列、神经生长因子 cDNA 6 个克隆的 5 种序列, 合并 Wang et al (2005) 所测 18 个克隆中的 12 种  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列、Liu et al (1998) 的 50 个克隆的 16 种  $\alpha$ -银环蛇毒素以及 Wang et al (2003) 的 7 种心脏毒素类似物 cDNA 序列各自比对的结果, 计算突变率, 结果如表 2 所示。由以上计算出的突变率的结果可以看出:  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组序列的突变率明显低于神经生长因子 cDNA, 而

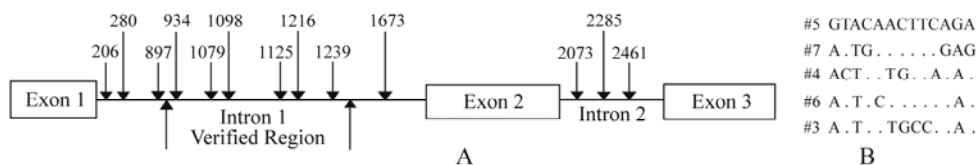


图 2  $\alpha$ -银环蛇毒素基因结构、突变位点的分布及再次验证的区域标示 (A) 和 5 个  $\alpha$ -银环蛇毒素基因克隆的多态性位点 (B)

Fig. 2  $\alpha$ -bungarotoxin gene organization, distribution of mutation sites and indication of verified region (A) and mutation sites of five clones with  $\alpha$ -bungarotoxin gene (B)

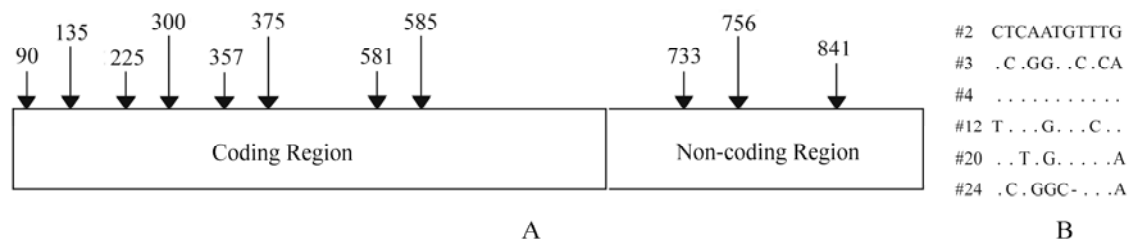


图 3 银环蛇毒腺神经生长因子编码区和非编码区突变位点的分布 (A) 和 6 个神经生长因子 cDNA 克隆的多态性位点 (B)

Fig. 3 Indication for the coding region and non-coding region and distribution of mutation sites of *Bungarus multicinctus* nerve growth factor gene (A) and mutation sites of six clones for nerve growth factor cDNA (B)

表 2 各基因突变率计算结果

Tab. 2 Results of mutation rates of several genes

测序基因 Gene	突变位 点数 Mutation number	被测克隆数 Sequenced clones	氨基酸 序列数 Amino acid number	序列长度 (bp) Length of sequence (bp)	突变率 Mutation rate	扣除可能的反转录错误 率后的突变率 Mutation rate with deducted reversal error
$\alpha$ -银环蛇毒素基因组 $\alpha$ -bungarotoxin genome	13	5	1	2655	0.00098	N/A
$\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA $\alpha$ -bungarotoxin cDNA	16	18	8	472	0.00188	0.00088-0.00181 <sup>a</sup>
神经生长因子 cDNA NGF cDNA	11	6	2	891	0.00206	0.00106-0.00199
$\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA $\alpha$ -bungarotoxin cDNA	19	50	10	222	0.00171	0.00071-0.00164 <sup>b</sup>
心脏毒素类似物 cardiotoxin-like gene	7	7	1	505	0.00198	0.00098-0.00191

根据 Wang et al (2005) 克隆的序列 (a) 和 Liu et al (1998) 克隆的序列 (b) 计算的基因突变率。

The mutation rates calculated according to sequences from Wang et al (2005) (a) and Liu et al (1998) (b).

且与  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA、及心脏毒素类似物 cDNA 的突变率相比也较低。

## 2.5 不同来源 $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 及基因外显子序列比较

为了研究  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 是否经历 RNA 编辑过程, 我们做了如下分析: 本研究测得  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组序列外显子进行拼接, 获得一种序列, 与 Wang et al (2005) 报道的 12 种 cDNA 序列 (其中省略了 3 条与用于比对的序列相同的序列, 故这里选用 9 条序列用于比对) Liu et al (1998) 报道的 16 种 cDNA 序列及从 NCBI 中找到的另外 3 种 cDNA 序列: C1 (Y17057), C2 (Y17058), K (X91990), 共 29 条序列进行比对。结果显示, 这些序列中有 4 条序列完全相同, 翻译出的蛋白为 A31 变体; 还有 3 条完全相同的序列, 翻译出的蛋白对应于 V31 变体; 其他的 22 条序列没有完全相同的。比对结果显示不同来源的  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列与基因组序列之间的多态性位点共有 28

处。除了 157 位的 T-C 的突变外 (此处是引起 V31 和 A31 变体的位点), Wang et al (2005) 报道的 12 种 cDNA 序列中的突变热点位置并没有与 Liu et al (1998) 报道的突变热点位置相同。值得一提的是, 在 211 位上, 基因组序列上该处核苷酸为 C, Wang et al (2005) 得到的 cDNA 序列中有一条在此位置上突变为 A, 而 Liu et al (1998) 得到的 cDNA 序列中有一条在这个位置突变为 T。Wang et al (2005) 报道的 cDNA 序列中的其他突变位点没有再出现和 Liu et al (1998) 报道的 cDNA 序列的突变位点重叠的情况 (图 4)。

## 2.6 PCR 过程可能造成的错误率统计

除了反转录过程可能引入的错误外,  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组、 $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA、神经生长因子 cDNA、 $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA (Liu et al, 1998) 和心脏毒素类似物 cDNA 都存在约 1/1000 的突变率。根据 TAKARA 公司对产品的说明, 该公司的 ExTaq 酶, 每 30 个循环扩增 1 kb 的 DNA 有 2—3 个位点

```

#genome_exon GGTGTAGATTAGGAGTACAAAGAAACAC
#c1 .....
#c2 .....C.....
#K .....C.....
#W_1 T.....
#W_2 T...G.....
#W_3 .....C.....A.....A
#W_4 .....C.....G.....
#W_5 .....C.....
#W_7 .....C.....
#W_8 T...C.....
#W_9 T.....G.....
#W_12 .....C...G.....
#L_R1 .....A.C...A.A.....
#L_R2 .....A.C...A.A.....TT.
#L_R3 .....A.C...A.AC.....TT.
#L_R4 .....AGC...A.A.....TT.
#L_R5 .....C...AA.A.....TT.
#L_R6 .....A.C...A.A.T.....TT.
#L_R7 .....A.C...A.A...GT...TT.
#L_R8 .....C.....
#L_R9 .....C.....
#L_R10 .....C.....TT.
#L_R11 .....A.C.....
#L_R12 .....C.....CC...
#L_R13 .....A.C.....
#L_R14 .....C.....
#L_R15 .....A.C.....G.T.....
#L_R16 .....A.CC.....C.G.T.....

```

图 4  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组序列的外显子与已知的多种 cDNA 序列的比较

Fig.4 Alignment of exons of  $\alpha$ -bungarotoxin genomic DNA and cDNA from Wang et al (W-1-W-12), Liu et al (L-R1-L-R16) and another  $\alpha$ -bungarotoxin cDNA sequences from GenBank (C1, C2, K)

图中省略了序列相同的部分。点表示相同的碱基，短横表示缺失。  
Identical sequences are omitted. The identical nucleotides with the first line are indicated by dots and deleted nucleotides by hyphens.

的错误；Wang et al(2003, 2005)使用的普通 rTaq 酶，每 30 个循环扩增 1 kb 的 DNA 有 5—6 个位点的错误。根据我们 PCR 扩增各个基因的长度，计算出 PCR 过程可能造成的错误位点数及突变率如表 3 所示。在获得  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组、 $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列、神经生长因子 cDNA 序列及心脏毒素类似物这些序列的过程中，PCR 扩增这个环节会引入一定的突变，而造成一些序列多态性的假象。

### 3 讨论

#### 3.1 $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 多态性不是由于基因组不同转录本造成

我们从同一条银环蛇基因组 DNA 扩增得到 2.65 kb 的  $\alpha$ -银环蛇毒素基因，经克隆、测序得知，该基因在外显子部分没有发现突变现象，对应的是 V31 变体。而 Wang et al (2003)也报道在同一条蛇的毒腺 cDNA 中克隆到  $\alpha$ -银环蛇毒素基因，测了一个克隆子，结果得到的是 A31 变体。但从 Chang et al (1999)、Wang et al (2005)及本研究得到的  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组序列不难看出， $\alpha$ -银环蛇毒素的 V31 和

A31 变体是由于基因组序列的不同造成的。而我们克隆到的  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组序列虽有 13 个突变位点，但是都位于内含子区域，对基因组突变位点较多的区段即第一个内含子进行扩增，PCR 产物直接测序，以减少实验过程中可能引入的人为错误以及存在的误差，从测序所得结果中我们发现这段序列并不存在多态性的现象，说明其在基因组的模板并不存在突变位点。原来获得的 5 个克隆子中该区段的多态性很可能是由于 PCR 和测序过程中引入的误差。这在一定程度上说明  $\alpha$ -银环蛇毒素基因在整个基因组中不是一个多拷贝的基因。从我们测得的 5 个  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组序列以及其后的验证序列的结果可以看出： $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列的多态性在基因组上都找不到对应的变化，说明  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列多态性不是由不同的基因组转录本而来。

#### 3.2 造成 $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 多态性的原因分析

按 Stapleton et al (2002)对反转录错误率的估计，扣除反转录错误后，得出神经生长因子 cDNA 突变率在 0.00106—0.00199；Wang et al (2005)克隆的  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 突变率在 0.00088—0.00181；Liu et al (1998)克隆的  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 突变率在 0.00071—0.00164；Wang et al (2003)测得的心脏毒素类似物 cDNA 突变率在 0.00098—0.00191。这一结果说明：从同一次反转录产物中克隆到的神经生长因子的 cDNA 序列、 $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列和心脏毒素类似物 cDNA 的突变率相差不大，与 Liu et al (1998)在不同个体的银环蛇中克隆到的  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列的突变率也相当。因此产生的突变不是在反转录过程中出现的。实验中用基因组 DNA 为模板扩增、克隆、测序得到的  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组序列的突变率约为 0.00098，这与扣除反转录后的 cDNA 突变率也十分相近，我们所计算得到的 cDNA 序列突变率其中包含了反转录过程中引入的错误，而这正是造成 cDNA 序列突变率高于基因组序列突变率的原因。

虽然在同一次反转录产物中克隆到的 3 种基因（ $\alpha$ -银环蛇毒素、神经生长因子和心脏毒素类似物）的突变率相当，且在扣除了反转录过程可能的错误后，与  $\alpha$ -银环蛇毒素基因组序列的突变率也十分接近，但是 cDNA 序列的突变率还是高于基因组序列的突变率。蛇毒蛋白的产生和进化与毒蛇的捕食对

表 3 PCR 过程可能造成的错误率统计结果  
Tab. 3 Results of error rates by PCR process

测序基因 Gene	PCR 造成的突变位点数 Mutation points during PCR	可能造成的突变率 Expected mutation rate
$\alpha$ -银环蛇毒素基因组 $\alpha$ -bungarotoxin genome	5.72—8.59	0.00040—0.00060
$\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA $\alpha$ -bungarotoxin cDNA	2.36—2.83	0.00027—0.00033 <sup>a</sup>
神经生长因子 cDNA NGF cDNA	1.78—2.67	0.00033—0.00050
$\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA $\alpha$ -bungarotoxin cDNA	0.44—0.67	0.00004—0.00006 <sup>b</sup>
心脏毒素类似物 Cardiotoxin-like	2.53—3.79	0.00072—0.00107

用 ExTaq 酶 PCR 可能带入的错误位点数公式计算的 Wang et al (2005) 克隆的序列(a)和 Liu et al (1998) 克隆的序列 (b)可能的突变率。

The mutation rates in sequences from Liu et al (1998) (a) and Wang et al (2005) (b) were calculated by the ExTaq-PCR error point formula.

象有很大的联系, 这种由于单个核苷酸序列的突变而产生多种同工毒素的现象是否是毒蛇对生存环境的一种适应机制? 毒蛇体内的多种蛋白都存在修饰的过程, 形成各种变体, 如平颞海蛇毒素 (Erabutoxin) *Agkistrodon acutus* 蛇毒中的 C 型凝集素样蛋白 (Endo et al, 1991; Zha et al, 2004)。 $\alpha$ -银环蛇毒素作为一种突触后毒素, 在乙酰胆碱介导的神经传递过程中, 起重要的作用 (Shen et al, 2000)。随着兴奋传导通路的进化,  $\alpha$ -银环蛇毒素可能会存在多个变体。Liu et al (1998) 提出, 这种  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 序列上的多态性有可能是由于 RNA 编辑造成的。虽然在 RNA 编辑中起作用的酶是有种群特异性的 (Reenan, 2005), 可是在同种生物不同个体中的作用还是相同的。如果  $\alpha$ -银环蛇毒素的 cDNA 序列的多态性是由于 RNA 编辑引起的话, 那么在先前的报道中必定存在相同的多态位点, 或者突变热点。但从我们分析的结果看出, 两个工作组报道的  $\alpha$ -银环蛇毒素的 cDNA 序列多态位点几乎没有重复的, 这就说明  $\alpha$ -银环蛇毒素 cDNA 的多态性不是由于 RNA 编辑引入的。

#### 参考文献:

- Barlatti S, Barbon A. 2005. RNA editing: a molecular mechanism for the fine modulation of neuronal transmission [J]. *Acta Neurochir Suppl*, **93**: 53-57.
- Benne R, Van den Burg J, Brakenhoff JP, Sloof P, Van Boom JH, Tromp MC. 1986. Major transcript of the frame-shifted *cox* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA [J]. *Cell*, **46**(6): 819-826.
- Chang L, Lin S, Huang H, Hsiao M. 1999. Genetic organization of alpha-bungarotoxins from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait): evidence showing that the production of alpha-bungarotoxin

也有报道认为, cDNA 克隆和测序过程中可能造成误差 (Yu et al, 1997; Gunaratne et al, 2003)。我们使用的 ExTaq DNA 聚合酶在 PCR 反应过程中是每 1000 碱基会引入 2—3 个碱基的错误, 说明 PCR 反应过程中难免要引入一定的错配。据人类基因组测序中心有报道, 高质量的人类基因组序列的错误率也有 1/10000 (Schmutz et al, 2004)。我们认为, 造成  $\alpha$ -银环蛇毒素的 cDNA 序列多态性的原因不是基因组的的不同转录本, 也不是 RNA 编辑, 而可能是由于反转录过程的错误、基因克隆中的偏差以及测序过程的误差造成的。

Furey et al (2004) 在比较了人的 mRNA 和基因组序列以后认为, mRNA 序列可能有一些不可避免的错误, 并提出建议说, 对于 mRNA 序列的收获, 要很谨慎地对待其与基因组序列的差异, 然后将他们分类为: 多态性、RNA 编辑、组织器官差异以及基因组测序错误。我们分析的例子也说明, 仅仅用简单的 cDNA 序列和基因组序列进行比对是很难确定某个位点的突变是否真的是由于 RNA 编辑引起的。

isotoxins is not derived from edited mRNAs [J]. *Neucleic Acids Research*, **27**(20): 3970-3975.

Endo T, Tamiya N. 1991. In: Harvey AL. Structure-function relationships of post-synaptic neurotoxins from snake venoms, Snake Toxins(M). New York: Pergamon Press, 165-209.

Furey TS, Diekhans M, Lu Y, Graves TA, Oddy L, Randall-Maher J, Hillier LW, Wilson RK, Haussler D. 2004. Analysis of human mRNAs with the reference genome sequence reveals potential errors, polymorphisms, and RNA editing [J]. *Genome Res*, **14**(10B): 2034-2040.

- Gunaratne P, Wu J, Garcia A, Hulyk S, Worley K, Margolin J, Gibbs R. 2003. Concatenation cDNA sequencing for transcriptome analysis [J]. *C R Biol*, **326**(10-11): 971-977.
- Hoopengardner B, Bhalla T, Staber C, Reenan R. 2003. Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics [J]. *Science*, **301**(5634): 832-836.
- Kosen PA, Finer-Moore J, McCarthy MP, Basus VJ. 1988. Structural studies of  $\alpha$ -bungarotoxin.3.correction in the primary sequence and X-ray structure and characterization of an isotoxin  $\alpha$ -bungarotoxin [J]. *Biochemistry*, **27**: 2775-2781.
- Liu LF, Chang CC, Lian MY, Kuo KW. 1998. Genetic characterization of the mRNA encoding  $\alpha$ -bungarotoxin : isoforms and RNA editing in *Bungarus multicinctus* gland cells [J]. *Neucleic Acids Research*, **26**(24): 5624-5629.
- Qian YC, Fan CY, Hu TS, Yang YG, Yang SL, Gong Y. 2000. Molecular cloning and functional expression of  $\alpha$ -bungarotoxin(V31) from Chinese continental banded krait [J]. *Zool Res*, **21**(1):41-47.[ 钱友存, 范春阳, 胡太山, 杨运桂, 杨胜利, 龚毅. 2000. 银环蛇神经毒素的分子克隆和功能表达. 动物学研究, **21**(1): 41-47.]
- Reenan RA. 2005. Molecular determinants and guided evolution of species-specific RNA editing [J]. *Nature*, **434**(7031): 409-413.
- Sattelle DB, Jones AK, Sattelle BM, Matsuda K, Reenan R, Biggin PC. 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster* [J]. *Bioessays*, **27**(4): 366-376.
- Schmutz J, Wheeler J, Grimwood J, Dickson M, Yang J, Caoile C, Bajorek E, Black S, Chan YM, Denys M, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Garcia C, Gomez M, Gonzales E, Haydu L, Lopez F, Ramirez L, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salazar A, Tsai M, Myers RM. 2004. Quality assessment of the human genome sequence [J]. *Nature*, **429**(6990): 365-368.
- Shen GG, Xu K. 2000 Purification of  $\alpha$ -bungarotoxin-binding protein from rat diaphragm muscle [J]. *Zool Res*, **21**(3):177-180. [沈国光, 徐科. 2000.  $\alpha$ -银环蛇神经毒素结合蛋白的分离纯化. 动物学研究, **21**(3):177-180.]
- Stapleton M, Carlson J, Brokstein P, Yu C, Champe M, George R, Guarin H, Kronmiller B, Pacleb J, Park S, Wan K, Rubin GM, Celniker SE. 2002. A drosophila full-length cDNA resource [J]. *Genome Biology*, **3**(12): RESEARCH0080.1-0080.8.
- Wang F. 2003. Cloning and expression of the genes related to snake venom[D]. MD thesis, Nanjing Normal University, 51-60. [汪芳. 2003. 蛇毒相关基因的克隆和表达. 南京师范大学硕士论文, 51-60.]
- Wang F, Wang YQ, Tong ZZ. 2003. Cloning and characterization of cDNAs of cardiotoxin-like protein in *Bungarus multicinctus* Venom Gland[J]. *Hereditas (Beijing)*, **25**(6): 672-676. [汪芳, 王义权, 童宗中. 2003. 银环蛇心脏毒素类似物 cDNA 的克隆 [J]. 遗传, **25**(6): 672-676.]
- Wang F, Wang YQ. 2005. Molecular cloning and expression of an isotoxin gene,  $\alpha$ -bungarotoxin, from *Bungarus multicinctus* [J]. *Acta Genetica Sinica*, **32**(7): 682-688. [汪芳, 王义权. 2005.  $\alpha$ -银环蛇毒素同工毒素基因的克隆和表达. 遗传学报, **32**(7): 682-688.]
- Wu PP, Ma DD, Pierzchala M, Wu J, Yang LC, Mai XP, Chang XY, Schmidt-Glenewinkel T. 2005. The *drosophila* acetylcholine receptor subunit Da5 is part of an  $\alpha$ -bungarotoxin binding acetylcholine receptor [J]. *J Biol Chem*, **280**(22):20987-20994.
- Yu W, Andersson B, Worley K, Muzny D, Ding Y, Liu W, Ricafrente J, Wentland M, Lennon G, Gibbs R. 1997. Large-scale concatenation cDNA sequencing [J]. *Genome Research*, **7**(4): 353-358.
- Zha XD, Zhou LZ, Huang HS, Liu J, Xu KS. 2004. Analysis of cDNAs and genomic DNA of snake venom CTL-like proteins revealed an extraordinary post-transcriptional processing event [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **20**(6): 713-718. [查向东, 周立志, 黄河胜, 刘兢, 徐康森. 2004. 蛇毒C型凝集素蛋白 cDNA 与基因组 DNA 序列分析显示特别的转录后加工. 中国生物化学与分子生物学报, **20**(6): 713-718.]