

A-超家族芋螺毒素基因的克隆及 内含子遗传进化分析^{△*}

孟海玲, 庞静, 林波, 李庆, 李明祥, 马艺珍, 罗素兰, 长孙东亭*

(海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海口市海洋药物重点实验室, 海南 海口 570228)

摘要:目的 从中国南海独特芋螺中克隆新的 A-超家族芋螺毒素基因, 并分析其内含子的遗传进化关系。**方法** 以独特芋螺基因组 DNA 为模板, 根据 A-超家族芋螺毒素基因的信号肽保守序列和 3'-非翻译区(3'-UTR)保守序列设计特异性引物, 通过 PCR 方法扩增出目的基因片段, 并将其连接到 pMDTM19-T 载体, 转化到 DH5 α 感受态细胞并测序, 同时对新的 A-超家族芋螺毒素基因内含子进行遗传进化分析。**结果** 从海南产独特芋螺基因组 DNA 中克隆到 4 条新的完整 A-超家族芋螺毒素基因。CaI-M1a, CaI-M1b, CaI-M1c 是编码同一种芋螺毒素 CaI-M1 的 3 个基因, 它们的内含子序列存在较大的差异, 特别是其中的 GT 重复不同。CaXXVII-M2 编码产生的成熟肽含有 5 个半胱氨酸, 与传统的属于 A-超家族的 α -芋螺毒素含有 4 个半胱氨酸的模式不同。**结论** 首次在独特芋螺中克隆到 4 个新的含有完整内含子的 A-超家族芋螺毒素基因, 并表明其内含子的多样性与物种进化和捕食习性有一定的联系。

关键词: A-超家族芋螺毒素基因; 基因克隆; 内含子; 遗传进化树

中图分类号: R931 文献标志码: A 文章编号: 1002-3461(2015)03-014-09

Cloning A-superfamily conotoxin genes and phylogenetic analysis of their introns

MENG Hai-ling, PANG Jing, LIN Bo, LI Qing, LI Ming-xiang, MA Yi-zhen, LUO Su-lan,
ZHANGSUN Dong-ting*

(Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Ministry of Education;
Key Lab for Marine Drug of Haikou, Hainan University, Haikou, 570228, China)

Abstract: Objective To clone novel A-superfamily conotoxin genes from *Conus characteristicus* native to Hainan, and analyze phylogeny of their introns. **Methods** The *C. characteristicus* Genomic DNA was used as template for gene cloning of novel A-superfamily conotoxins using the conserved DNA sequences of signal peptide and 3'-UTR (untranslated region) of A-superfamily genes by PCR. The targeted DNA was ligated into the pMDTM19-T vector and transformed into *E. coli* DH5 (competent cell). Then the individual bacterial colonies were individually sequenced. Finally, gene structure, sequence characteristics and phylogeny of their introns were analyzed. **Results** 4 A-superfamily conotoxins were cloned from genomic DNA of *C. characteristicus* native to Hainan, China. CaI-M1a, CaI-M1b & CaI-M1c encoded the same conotoxin CaI-M1 but the sequences of their introns were different in the number

* Δ 基金项目: 国家自然科学基金项目(41366002, 81160503); 国家国际科技合作专项(2011DFR31210); 海南省社会发展科技专项(SF201328); 海口市重点科技计划项目(2013-16); 长江学者和创新团队发展计划(IRT1123)资助

作者简介: 孟海玲(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋药物。E-mail: 779631101@qq.com

* 通讯作者: 长孙东亭, 男, 副研究员。Tel / Fax: (0898) 66289538, E-mail: zhangsundt@163.com

收稿日期: 2014-11-06

of GT repeats. And CaXXVII-M2 encoded a new member of A-superfamily with five-Cys framework (CC-C-C-C), which did not belong to classic (-conotoxins (CC-C-C)). **Conclusion** It was the first time to clone four novel A-superfamily conotoxin genes with complete introns from *C. characteristicus*. Furthermore, the phylogenetic tree of A-superfamily conotoxin introns showed that introns was associated with conus species and their prey.

Key words: A-superfamily conotoxin gene; gene cloning; intron; phylogenetic tree

全世界有约 800 种芋螺,都生活在热带海洋中。1 种芋螺可以产生多达 2 000 种肽类毒素,用来捕获猎物,防御或者威慑竞争对手^[1]。这些肽大多数包含 10~50 个氨基酸和 1~5 个二硫键,大致分为 2 种,1 种是富含二硫键的芋螺毒素,即含有 2 个或 2 个以上二硫键;另一种是含有 1 个二硫键或者不含二硫键的芋螺肽^[2]。芋螺毒素按其前体蛋白的信号肽序列相似性,目前可分为 A、B1、B2、B3、C、D、E、F、G、H、I1、I2、I3、J、K、L、M、N、O1、O2、O3、P、S、T、V、Y-共 26 个超家族;按其前体蛋白成熟肽区半胱氨酸骨架及二硫键的位置不同,可分为 25 类;按其药理活性靶位可分为 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ι 、 κ 、 μ 、 ρ 、 σ 、 χ 、 ω -11 个家族^[3]。其中 A-超家族的 α -芋螺毒素作用于乙酰胆碱受体,是治疗老年痴呆、帕金森症、癫痫、肌无力、神经痛等疾病的潜在药物^[4]。其半胱氨酸骨架为 I 型(CC-C-C),依据 Cys2 与 Cys3, Cys3 与 Cys4 之间氨基酸的数量,将其分为不同的亚家族。

目前克隆芋螺毒素基因的方法主要有以下 4 种:一是根据各个超家族芋螺毒素高度保守的信号肽基因序列,及 3'端非翻译区基因序列,设计特异性引物,以 cDNA 为模板,克隆新的毒素基因^[5];二是根据各个超家族芋螺毒素高度保守的信号肽基因序列,采用 3'-RACE 和巢式 PCR 的方法扩增各家族的新型芋螺毒素基因^[6];三是构建 cDNA 文库^[7];四是转录组测序^[8-9]。上述方法得到的芋螺毒素基因都是转录后的 cDNA 基因,没有内含子,还有 1 种技术是利用已知的 cDNA 基因序列设计引物,以基因组 DNA 为模板,运用染色体步移法克隆出整条芋螺毒素基因^[10],但是方法比较复杂。本实验采用的是以基因组 DNA 为模板,用 A-超家族高度保守信号肽序列和 3'-端非翻译区基因序列设计引物直接 PCR,方法简单易行,能够完整地克隆到整条芋螺毒素基因组基因,包括完整的内含子在内,并对内含子的遗传

进化关系进行了深入分析。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料独特芋螺(*C. characteristicus*)活体(见图 1),从海南岛、西沙群岛采集,−80℃保存;海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒(Tiangen);琼脂糖凝胶回收试剂盒(Tiangen);pMD™ 19-T Vector Cloning Kit(TaKaRa);质粒小提试剂盒(Tiangen);其他化学试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR 引物由上海生工合成。试剂配制:氨苄 100 mg/ml, IPTG 24 mg/ml, X-Gal 20 mg/mL。



图 1 海南产独特芋螺

Fig. 1 *C. characteristicus* native to Hainan

1.2 方法

1.2.1 毒腺基因组 DNA 的提取

−80℃保存的独特芋螺,解冻后取毒腺组织约 10 mg,用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒提取其基因组 DNA,并用分光光度计测其 OD₂₆₀, OD₂₈₀, OD₂₆₀/OD₂₈₀。

1.2.2 DNA 克隆与测序

将其基因组 DNA,稀释 50 倍用作 PCR 模板,采用 A-超家族芋螺毒素高度保守的信号肽序列及 3'端非翻译区基因序列设计引物 A1: ATGGGCATGCGGATGATGTT; A2: GTCGTG-GTTCAGAGGGTC, PCR 程序为 94℃ 10 min 预热, 94℃ 30 s, 52℃ 60 s, 72℃ 2 min 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物用琼脂糖凝

胶回收试剂盒回收目的基因,然后与 pMDTM19-T 载体 4 °C 连接过夜,转化到 DH5 α 感受态细胞,在含有 40 μ L X-gal 和 10 μ L IPTG 的氨苄琼脂 LB 培养基上挑选白色菌落,用 M13 引物进行 PCR 检测重组子,阳性克隆送上海生工进行双向测序。

1.2.3 新芋螺毒素基因序列及其遗传进化分析

测序结果用在线工具包 VecScreen 和 DNAs-tar 软件进行分析,得到芋螺毒素基因和前体肽序列,再经 NCBI 上的 BLASTN 和 ConoServer 上的 exact match 系统比对,以及与芋螺毒素专利和其它相关文献中的序列进行比较分析。并在 ProP 1.0 Server predicts propeptide cleavage 在线软件上预测信号肽、前体肽区和成熟肽区。

基于 NCBI 数据库,对 30 个 A-超家族基因组基因的内含子序列与成熟肽蛋白序列,采用在线 ClustalW2 软件多重比对后,构建进化树,分析其遗传多态性。新芋螺毒素基因序列已在 GenBank 登录, CaI-M1a 的登录号为 KP233883, CaI-M1b 的登录号为 KP233884, CaI-M1c 登录号为 KP233885, CaXXVII-M2 的登录号为 KP233886。

2 结果与分析

2.1 4 个新的 A-超家族芋螺毒素基因组基因的克隆

根据 A-超家族芋螺毒素保守信号肽序列设计引物,以独特芋螺基因组 DNA 为模板,通过在 46~56 °C 范围内优化退火温度,进行 PCR 扩增。本研究者从退火温度为 52 °C 的 PCR 产物中,克隆到 4 条新的 A-超家族芋螺毒素基因,其中 3 条基因编码相同的、具有 I 型半胱氨酸模式(CC-C-C)的 α -芋螺毒素前体肽,包括信号肽、前肽区,和成熟肽的序列均相同。但唯一不同的是它们的内含子序列各异。芋螺是二倍体,用不同个体 DNA 作为模板获得 CaI-M1a, b, c 这 3 个基因,同时用单个个体 DNA 作为模板也获得了这 3 个基因,如果这 3 个基因是等位基因或者复等位基因,那么不可能在同一个体中同时获得此 3 个基因,所以这 3 个基因很可能是同源基因,编码相同的氨基酸序列。依据芋螺毒素命名法,将它们分别命名为 CaI-M1a, CaI-M1b, CaI-M1c(见图 2A、B、C)。另 1 条新基因编码产生含有 5 个半胱氨酸模式(CC-C-C-C)的新芋螺毒素肽,与上述发现的 α -芋螺毒

素前体肽相比,信号肽区完全一样,但在前肽区仅有 4 个氨基酸不同(...P...S...N...G),而成熟肽区高达 9 个氨基酸不同,相似性为 62.5%,将其命名为 CaXXVII-M2(见图 2D)。已有研究表明,成熟肽区有时 1 个氨基酸的改变会改变毒素受体的选择性。因而, CaXXVII-M2 的功能与 α -芋螺毒素 CaI-M1a 理应不同。成熟的芋螺毒素一般是从胰蛋白酶切割位点 R 或 K 处剪切,经翻译后修饰,从前体肽中被释放出来。据此,这 2 个新芋螺毒素基因的成熟肽区,都含有 24 个氨基酸。前人克隆的 A-超家族芋螺毒素完整基因都是标准的 I 型(CC-C-C)或者 IV 型(CC-C-C-C-C)半胱氨酸骨架,本研究首次克隆到含有 5 个半胱氨酸骨架的完整基因组基因,对芋螺毒素基因结构的遗传突变研究具有重要意义。

2.2 新的 A-超家族芋螺毒素基因内含子特征

目前发现的 I1、I2、M、O2、O3、P、S、T-超家族基因结构为 2 个内含子隔开 3 个外显子,而 A-超家族芋螺毒素基因只含有 1 个内含子隔开 2 个外显子,使得第一个外显子包含信号肽区和 N 端前体肽区,第二个外显子包含 C 端前体肽区和成熟肽区。通过序列比对分析发现 CaI-M1a、b、c 与 CaXXVII-M2 内含子插入位点都在前体肽区第一个氨基酸密码子 Thr 中,即 A 后 gt 前插入至 ag 后 CA 之前,完全遵从 GT/AG 规则(见图 2)。这 4 条序列的长度不同,但是它们之间的相似度均在 98% 以上, CaI-M1a、b、c 相互之间的相似性明显比与 CaXXVII-M2 的相似性要高(见表 1)。主要是内含子的长度有较大区别, CaI-M1a, CaI-M1b, CaI-M1c 与 CaXXVII-M2 基因的内含子长度依次是:1 167 bp、1 167 bp、1 165 bp、1 174 bp(见图 2)。而且内含子中还包含 2 个, 3 个或者多个碱基的重复如:GT、GTT、CTT、TC、GTTTT,这些简单重复序列在许多真核生物的基因组中出现,被称之为微卫星 DNA^[11]。比较 CaI-M1a、b、c 与 CaXXVII-M2 微卫星 DNA 的重复次数,发现它们内含子末端 GT 的重复数存在差异,依次是:22、21、20、25。CaI-M1a、b、c 之间可能是同种毒素不同亚型间的微小差异,而 CaXXVII-M2 与 CaI-M1 的显著差异除了 GT 的重复,还有 1 120 bp 左右的 TCT 的缺失(见图 3)。微卫星 DNA 可能影响基因转录, mRNA 剪切和 mRNA 释放到细胞质的

表 1 CaI-M1a,b,c 与 CaXXVII-M2 基因的相似性
Table 1 The percent identity matrix of CaI-M1a,b,c and CaXXVII-M2

相似性/%	CaI-M1a (1397bp)	CaI-M1b (1397bp)	CaI-M1c (1395bp)	CaXXVII-M2 (1403bp)
CaI-M1a				
CaI-M1b	99.57			
CaI-M1c	99.43	99.57		
CaXXVII-M2	98.35	98.35	98.21	

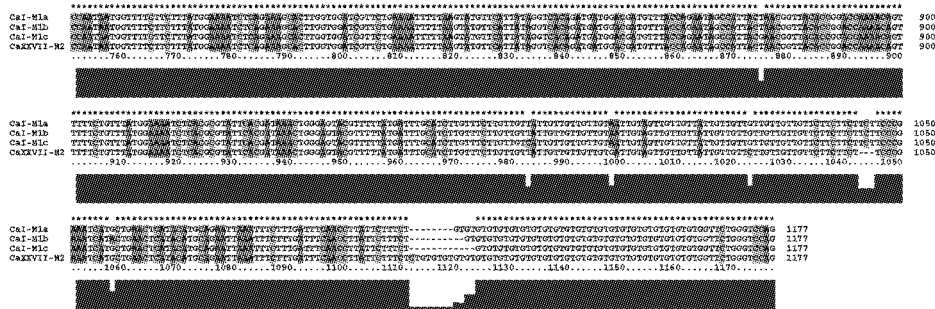


图 3 CaI-M1a,b,c 与 CaXXVII-M2 的内含子比对

Fig. 3 The sequence comparison of intron of CaI-M1a,b,c and CaXXVII-M2

2.3 新的 A-超家族芋螺毒素蛋白序列特征

芋螺毒素基因内含子在转录为 mRNA 的过程中被选择性剪切, mRNA 翻译为前体蛋白序列, 通过比对数据库, 确定 CaI-M1a,b,c 和 CaXXVII-M2 分别编码具有 I 型半胱氨酸模式的 CaI-M1 与含有 5 个 Cys 的新型半胱氨酸模式的 CaXXVII-M2 前体蛋白序列(见图 2)。前体蛋白序列经翻译后修饰, 信号肽区、N 端和 C 端前体肽区被切除, 产生成熟肽区, 成熟肽区的氨基酸再经修饰 (PTMs) 和二硫键折叠等翻译后加工过程, 最终生成有活性的毒物质^[14]。经在线 Pro1.0Server 软件分析, CaI-M1 与 CaXXVII-M2 产生的成熟肽序列分别为: “SFTINCKIPSCFAKYGSKC-SEVH”和“YLGIDCCRIPSCFAKYGSKCSKIC”。

将 CaI-M1, CaXXVII-M2 与公共数据库中独特芋螺的 A-超家族芋螺毒素序列进行比对, 发现 CaI-M1 与 Cal. 7 相似度极高, 只有 2 个氨基酸的

差异且分布在信号肽区和前体肽区, 成熟肽区完全一致(见图 3)。同时, CaXXVII-M2 与 Cal. 5 相似度较高, 信号肽区有 1 个氨基酸不同, 前体肽区有 2 个氨基酸差异, 而成熟肽区末端多了 3 个氨基酸(见图 4)。但是它们与 Cal. 1, 1.2, 1.3, 1.4 相似度不高, 一定程度上增加了独特芋螺毒素的遗传多样性。那么 CaI-M1 具有与 Cal. 7 相同的两对二硫键, 2 个 loop 环, 且二硫键连接方式为 C1-C3, C2-C4, 都属于 $\alpha(4,7)$ 亚家族, 可能是神经型乙酰胆碱受体某个亚型的选择性阻断剂, 其具体功能有待进一步深入研究。 $\alpha(4,7)$ 芋螺毒素在疼痛、成瘾、抑郁症、帕金森综合症、老年痴呆症、多发性硬化症、癫痫、中风、肌无力等疾病的研究领域具有重要科学意义, 有的具有潜在的药用价值^[15]。而 CaXXVII-M2 因含有 5 个半胱氨酸, 所以二硫键连接方式未知其靶点类型和功能有待进一步研究。

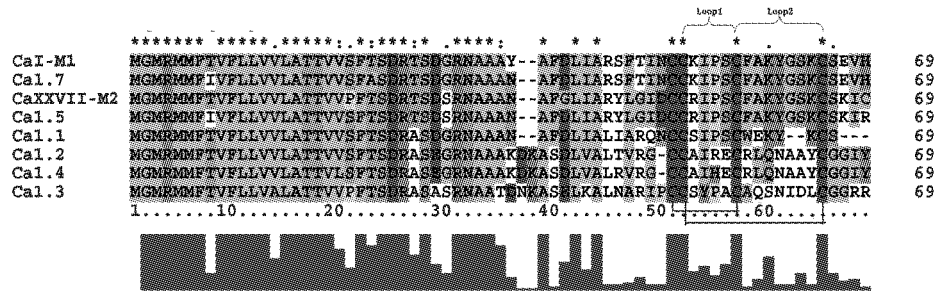


图 4 CaI-M1, CaXXVII-M2 与其他 A-超家族芋螺毒素序列比对

Fig. 4 The sequence comparison of the CaI-M1, CaXXVII-M2 with other A-superfamily conotoxins

2.4 A-超家族芋螺毒素基因内含子遗传进化分析

目前,据 conoserver 数据库统计,A-超家族芋螺毒素基因有 286 条,但是大多是 cDNA 基因,完整的带有内含子的基因只有 26 条(见表 2),而且前人的研究也都集中在 cDNA 序列,对内含子的

研究较少,将本研究发现的 4 条完整基因的内含子与已发现的 26 条基因内含子经 ClustalW2 软件多重比对后,导入 MEGA6.0 构建了进化树(见图 5)。

表 2 A-超家族芋螺毒素基因内含子特征
Table 2 The introns of A-superfamily conotoxin genes

名称	来源	内含子 (bp)	成熟肽序列	亚型	GenBank 登录号
Bt1. 7a	<i>C. betulinus</i>	970	GGCCSY PACSVEHQDLCD	$\alpha 4/7$	JX293539
Bt1. 7b	<i>C. betulinus</i>	996	GGCCSY PACSVEHQDLCD	$\alpha 4/7$	JX293538
Bt1. 7c	<i>C. betulinus</i>	990	GGCCSY PACSVEHQDLCD	$\alpha 4/7$	JX293537
Bt1. 7d	<i>C. betulinus</i>	974	GGCCSY PACSVEHQDLCD	$\alpha 4/7$	JX293536
Ca1. 6a	<i>C. characteristicus</i>	1173	YLGIDCCRIPSCFAKYGSKCSKIR	$\alpha 4/7$	JX293544
Ca1. 6b	<i>C. characteristicus</i>	1169	YLGIDCCRIPSCFAKYGSKCSKIR	$\alpha 4/7$	JX293543
Ca1. 7a	<i>C. characteristicus</i>	1159	SFTINCKIPSCFAKYGSKCSEVH	$\alpha 4/7$	JX293542
Ca1. 7b	<i>C. characteristicus</i>	1156	SFTINCKIPSCFAKYGSKCSEVH	$\alpha 4/7$	JX293541
Ca1. 7c	<i>C. characteristicus</i>	1172	SFTINCKIPSCFAKYGSKCSEVH	$\alpha 4/7$	JX293540
CaF-M1a	<i>C. characteristicus</i>	1167	SFTINCKIPSCFAKYGSKCSEVH	$\alpha 4/7$	KP233884
CaF-M1b	<i>C. characteristicus</i>	1167	SFTINCKIPSCFAKYGSKCSEVH	$\alpha 4/7$	KP233885
CaF-M1c	<i>C. characteristicus</i>	1165	SFTINCKIPSCFAKYGSKCSEVH	$\alpha 4/7$	KP233886
CaXXVII-M2	<i>C. characteristicus</i>	1174	YLGIDCCRIPSCFAKYGSKCSKIC	$\alpha 4/7$	KP233883
Ec1. 7	<i>C. emaciatius</i>	1000	DCCSNPPCAHNIHCA	$\alpha 4/5$	JX293547
Ec1. 8a	<i>C. emaciatius</i>	993	DCCSDPPCAHNNPDCR	$\alpha 4/6$	JX293546
Ec1. 8b	<i>C. emaciatius</i>	1056	DCCSDPPCAHNNPDCR	$\alpha 4/6$	JX293545
Lp1. 4	<i>C. leopardus</i>	937	GCCSHPACSGNHQELCD	$\alpha 4/7$	DQ311056
Lp1. 6	<i>C. leopardus</i>	824	QFCCGHYDCDFIPNVC	$\alpha 4/6$	DQ311057
QcaL-1	<i>C. quercinus</i>	1375	FCSDPPCRISNPESCWEP	$\alpha 4/7$	DQ311058
QcaL-2	<i>C. quercinus</i>	1440	FCSDPSCRFGNPELCDWRR	$\alpha 4/7$	DQ311059
Sl. 10a	<i>C. striatus</i>	1119	AYCCHPACGKNFDCGR	$\alpha 3/5$	JX293554
Sl. 10b	<i>C. striatus</i>	1133	AYCCHPACGKNFDCGR	$\alpha 3/5$	JX293553
SII	<i>C. striatus</i>	1159	GCCCN PACGPNY GCGTSCSRTI	II	JX293535
SIV Aa	<i>C. striatus</i>	1327	QKSLVPSVITCCGYDPGTMCPPCRCTNSCG	IV	JX293532
SIV Ab	<i>C. striatus</i>	1260	QKSLVPSVITCCGYDPGTMCPPCRCTNSCG	IV	JX293531
Tr1. 1a	<i>C. terebra</i>	1068	DCCSNPPCAHNNPDCR	$\alpha 4/6$	JX293550
Tr1. 1b	<i>C. terebra</i>	1044	DCCSNPPCTHNNPDCR	$\alpha 4/6$	JX293549
Tr1. 1c	<i>C. terebra</i>	1038	DCCSNPPCSHNNPDCR	$\alpha 4/6$	JX293548
Vr1. 1	<i>C. varius</i>	1262	ATWDYCCPPYICDTHFPSHCK	$\alpha 4/7$	JX293552
Vr1. 2	<i>C. varius</i>	1422	AIGGTCCPIPCASTFPRLCG	$\alpha 4/7$	JX293551

从 A-超家族芋螺毒素基因内含子的遗传进化树分析可以看出,同一物种的内含子聚为一类,遗传距离很近,说明内含子的多样性可能与物种的进化有一定的关系,而且 6 种食虫芋螺(*C. betulinus*, *C. characteristicus*, *C. emaciates*, *C. leopardus*, *C. quercinus*, *C. striatus*)与 2 种非食虫芋螺(*C. terebra*, *C. varius*)的亲缘关系较远,捕食习性对内含子也有一定影响。芋螺因栖息地和食物的局限性,物种及芋螺食物间的竞争自然地产生,与此同时,芋螺也就产生大量多样的毒素来保证它们的生存。分子水平上,基因可能产生大量重复短序列,这些广泛连续的基因重复有助于物种间毒液成分的快速进化和显著增加多样性,且这些基因

大多存在于内含子中,从而影响转录水平的表达^[10,16]。进化树中,本实验发现的 CaI-M1a、b、c 与 Ca1.7a、b、c 遗传距离最小,它们的成熟肽完全一致,说明微卫星 DNA 的重复差异较小时对成熟肽影响不大,但是当差异较大时,如 CaXXVII-M2 导致了成熟肽的差异。与 *C. characteristicus* 同属一支的是 *C. betulinus* 的 4 个基因 Bt1.7a、b、c、d 遗传距离也很近,内含子差异较小,编码相同的成熟肽序列。*C. striatus* 的 5 个内含子被分为了 3 支,且成熟肽的半胱氨酸模式分属 I、II、IV 类,说明内含子的进化驱动着成熟肽结构的变化,可能还影响着功能的改变。

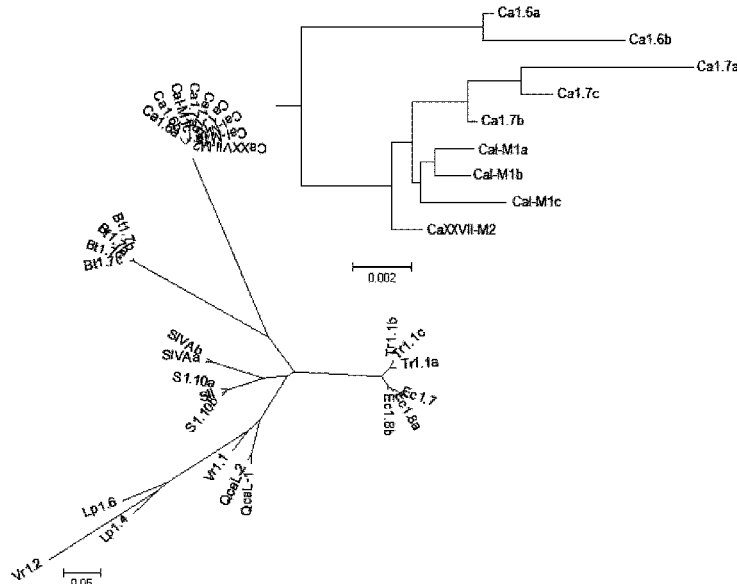


图 5 A-超家族芋螺毒素基因内含子遗传进化树

Fig. 5 Phylogeny tree of introns of A-superfamily conotoxin genes

3 讨论

芋螺毒素因为具有相对分子质量小、结构稳定、对各种配体门控和电压门控离子通道的高选择性等特点,被誉为海洋药物宝库,独特芋螺毒素也不例外。目前从独特芋螺中克隆到的芋螺毒素基因在数据库查到完整的 DNA 序列只有 5 条,平均长度为 1 400 bp,其余大多数是 mRNA 序列和只有成熟肽的片段 DNA 序列。本文首次在独特芋螺中克隆到 4 个新的完整的 A-超家族芋螺毒素基因组基因,对其内含子的遗传多样性进行了分析,并与物种进化有一定的联系,且与捕食习性有

关。芋螺毒素基因在多细胞动物中是编码蛋白基因进化最快速的基因,这与广泛连续的基因重复有关,并且驱动芋螺毒素功能的改变。本研究编码 CaI-M1 的 3 个基因内含子中 GT 重复数的不同,表明了芋螺毒素基因内含子的高度多样性, CaXXVII-M2 中 5 个半胱氨酸的形成可能由于微卫星 DNA 的不同使芋螺毒素成熟肽基因突变,从而进一步引起功能的改变。本研究发现的 4 条芋螺毒素完整基因组基因,其内含子序列多样性高,对研究芋螺毒素的基因结构和进化有很重要的意义。

参考文献

- [1] Gerwig G J, Hocking H G, Stocklin R, et al. Glycosylation of conotoxins [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11: 623-642.
- [2] Lewis R J, Dutertre S, Vetter I, et al. Conus venom peptide pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64: 259-298.
- [3] Kaas Q, Yu R, Jin A H, et al. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D325-330.
- [4] 罗素兰, 长孙东亭, 吴勇, 等. 海南产芋螺毒素在疼痛与成瘾治疗中的应用前景 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 03: 439-440.
- [5] Zhangsun D, Luo S, Wu Y, et al. Novel O-superfamily conotoxins identified by cDNA cloning from three vermivorous Conus species [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2006, 68: 256-265.
- [6] Luo S, Zhangsun D, Feng J, et al. Diversity of the O-superfamily conotoxins from *Conus miles* [J]. *J Pept Sci*, 2007, 13(1): 44-53.
- [7] 李宝珠. 利用 SMART 技术构建疣螭芋螺毒管 cDNA 噬菌体文库及芋螺毒素新基因的克隆 [D]: 海口: 海南大学, 2012.
- [8] Violette A, Biass D, Dutertre S, et al. Large-scale discovery of conopeptides and conoproteins in the injectable venom of a fish-hunting cone snail using a combined proteomic and transcriptomic approach [J]. *J Proteomics*, 2012, 75: 5215-5225.
- [9] Terrat Y, Biass D, Dutertre S, et al. High-resolution picture of a venom gland transcriptome: case study with the marine snail *Conus consors* [J]. *Toxicon*, 2012, 59: 34-46.
- [10] Wu Y, Wang L, Zhou M, et al. Molecular evolution and diversity of Conus peptide toxins, as revealed by gene structure and intron sequence analyses [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e82495.
- [11] Debrauwere H, Gendrel C G, Lechat S, et al. Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites [J]. *Biochimie*, 1997, 79: 577-586.
- [12] Meloni R, Albanese V, Ravassard P, et al. A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element in vitro [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 423-428.
- [13] Gabellini N. A polymorphic GT repeat from the human cardiac $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ exchanger intron 2 activates splicing [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 1076-1083.
- [14] 张玲, 袁多多, 戚正武. 芋螺毒素的翻译后修饰 [J]. *生命科学研究*, 2009, 03: 258-267.
- [15] 房立丛, 沈立姿, 于津鹏, 等. 作用于烟碱乙酰胆碱受体的 α -芋螺毒素研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2013, 03: 284-289.
- [16] Chang D, Duda T F, Jr. Extensive and continuous duplication facilitates rapid evolution and diversification of gene families [J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29: 2019-2029.