

东亚钳蝎毒素 Bm α TX14 的基因组克隆、真核表达纯化及功能的初步研究 Genomic DNA Sequences and Functional Expression , Purification of Bm α TX14 Neurotoxin from Scorpion *Buthus martensii* Karsch

吕 猛,王 昆,曹志贱,蒋达和,毛 歆,李文鑫*

LÜ Meng, WANG Kun, CAO Zhi-Jian, JIANG Da-He, MAO Xin and LI Wen-Xin*

武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室,武汉 430072

State Key Lab of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

摘 要 以东亚钳蝎(*Buthus martensii* Karsch, BmK) Bm α TX14 全长 cDNA 序列设计引物,克隆 Bm α TX14 成熟肽,插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中,转化酵母,诱导表达。Tricine-SDS- PAGE 和 Western blot 分析显示,表达产物以可溶性分子形式存在于培养上清中,诱导 84h 时的表达量达到高峰,约为 120mg/L。通过 Ni 金属螯合层析柱亲和层析、聚乙二醇沉淀、凝胶分子筛层析获得纯化的 rBm α TX14 融合蛋白。经毒性实验表明,具有明显的抗昆虫活性。同时以蝎基因组总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到 Bm α TX14 基因克隆,序列分析显示:Bm α TX14 在编码信号肽的基因序列中有 1 个长 408bp 的内含子,其基因组组织具有 α 型 Na⁺ 通道毒素的特征。从功能活性和基因组组织两个角度证实 Bm α TX14 为 α 型 Na⁺ 通道毒素。

关键词 蝎毒素, Bm α TX14, 基因组组织, 毕赤酵母, 真核表达

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)06-0853-05

Abstract Based on the full-length cDNA of Bm α TX14 from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch (BmK), gene of the mature peptide of Bm α TX14 was cloned into the yeast expression vector pPIC9K. After transforming, screening and inducing, tricine-SDS-PAGE and Western blot proved that rBm α TX14 protein was expressed in the medium for up to 84 hours, getting nearly 120mg/L. Recombinant Bm α TX14 was purified rapidly and efficiently through Ni-NTA-agarose, polyethylene glycol precipitation and gel filtration chromatography. The purified rBm α TX14 proved to have the anti-insect activity by toxicity assay. Meanwhile, genomic gene of Bm α TX14 was cloned and sequenced by PCR method, sequence analysis of this gene showed that Bm α TX14 had an intron of 408 base pairs located at the signal peptide encoding region, which was similar with the characteristic of other α -type sodium ion-channel toxin. Considering both the genomic organization and the peptide function, Bm α TX14 proved to be a membership belonging to α -type sodium ion-channel toxin.

Key words Scorpion toxins, Bm α TX14, genomic organization, *Pichia pastoris*, gene expression

蝎毒素的主要成分是一类由 20 ~ 90 个氨基酸组成的具有多种生物活性的小分子多肽,它们可以

选择性、特异性的与细胞膜上的离子通道(K⁺ 通道、Ca²⁺ 通道、Cl⁻ 通道和 Na⁺ 通道)结合,从而改变细胞

Received: June 13, 2005; Accepted: August 19, 2005

This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China(No. 39970897, 30370349).

* Corresponding author. Tel: 86-27-68752831; E-mail: liwxlab@whu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 39970897, 30370349)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

对离子的通透能力,不仅可以调节细胞体积、膜电位及兴奋性等多种细胞生理效应,而且可调节细胞分泌、激素作用和信号转导等多种生理过程^[1,2]。全蝎或蝎尾还在中药中被用来治疗癫痫、中疯、偏瘫等,已有1000多年的历史。然而对蝎毒素单组分的研究最近10多年才开始。据估计蝎毒腺中大约有100 000种不同生物活性的多肽^[3],已发现的大约只占0.03%:150多个Na⁺通道毒素,80多个K⁺通道毒素,近20个Cl⁻通道毒素,几个Ca²⁺通道毒素^[4-6]。绝大多数毒素的功能和其在通道上的结合位点还不清楚,这主要是因为通过直接从蝎粗毒中分离纯化的方式无法得到足够量的单一蛋白作为研究材料。通过基因工程的方式来表达某一蛋白,不仅可能获得大量的活性蛋白,而且还可以通过定点突变的方法,对多肽进行有目的的改造。因此,基因工程表达蝎毒素不但具有重要的应用开发价值,而且也具有重要的基础理论研究意义。

蝎子的种类很多,我国主要产东亚钳蝎(*Buthus martensii* Karsch)。BmαTX14就是从其毒腺组织cDNA文库中分离提取到的,从一级序列上分析,它与蝎毒素α型Na⁺通道阻断剂具有较高的同源性,同时具有哺乳动物类和昆虫类神经毒性^[5]。α型神经毒素结合于Na⁺通道的位点3上,并不影响Na⁺通道的活化,而是减慢Na⁺通道的快速失活,从而引起动作电位的延长;所以这类神经毒素在动物或昆虫体内引发快速的麻痹^[7]。

P. pastoris 基因表达系统是一种新型外源基因的酵母表达系统,发酵条件简单,表达水平高、适宜高密度培养,且具有分泌型表达的优势,为工业化生产和纯化提供了极大的方便^[8]。本文从蝎基因组总DNA中扩增得到BmαTX14基因的克隆;并将BmαTX14基因的成熟肽片段,克隆入*P. pastoris* 酵母表达载体pPIC9K,设计并利用His-tag(组氨酸标签)纯化;功能性分泌表达的产量达120mg/L,约为大肠杆菌原核表达量的10倍。从基因组织结构和功能活性两个角度证实BmαTX14为α型Na⁺通道毒素;同时BmαTX14成功的真核表达,表明小分子多肽同样也能得到高效的生物工程合成,为毒素药物的工业化应用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蝎毒腺cDNA文库由本室构建,从文库中筛选出的含BmαTX14基因的菌株C60由本室保藏^[5]。

东亚钳蝎购自武汉市个体养殖户。*Pichia pastoris* 菌株GS115[his4]及质粒pPIC9K购自Invitrogen(USA)公司。大肠杆菌DH5α为本室保存,用于质粒的扩增。各种限制酶、DNA连接酶购自TaKaRa(Japan)公司。Taq酶及PCR反应缓冲液为Biosta(CA)公司产品。YNB(W/O amino acid)和蛋白胨购自OXOID(UK)公司。Ni金属离子螯合层析柱购自Invitrogen公司。HRP标记的山羊抗兔IgG为华美公司产品。组氨酸标签特异性多抗血清由温国元博士惠赠。常规生化药品均为国产分析纯。

1.2 表达质粒的构建和多拷贝转化子的筛选

酵母表达载体pPIC9K为分泌型表达载体,为了方便表达纯化并根据GenBank登录号AF156169(BmαTX14)基因设计引物扩增成熟肽部分:正向引物(FP-14):5'GCGAATTCCATCACCATCACCATCACGTTCGGGATGCTTATA3',含EcoRI酶切位点(单线)和6聚His序列(双线);反向引物(RP-14):5'CGCGGCCGCTCAATGGCATTTTCCTG3',含NotI酶切位点(单线)。以C60菌株为模板,PCR反应条件为94℃、3min、94℃、40s、58℃、40s、72℃、45s、72℃、5min,共35个循环。将产物经EcoRI和NotI酶切后插入pPIC9K的相同位点,得到含His-tag的表达载体pPIC9K/rBmαTX14,转化*E. coli* DH5α,作重组质粒的酶切图谱鉴定,并送交测序公司测序。

按Invitrogen公司提供的毕赤氏酵母使用手册制备*P. pastoris* GS115的电转感受态细胞。取10μL(约5μg)重组载体pPIC9K/rBmαTX14经SalI酶切完全线性化后,与80μL酵母电转感受态细胞混匀转移于预冷的0.2cm电转化杯,冰育5min、电转化(参数为1500V、25μF、200Ω),立即加入500μL冰预冷的1mol/L山梨醇混匀,铺于RDB板上,30℃培养3~4d。

按毕赤氏酵母使用手册的方法,将His⁺转化子分别对应地点到逐步增高G418浓度(0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 g/L)的YPD平板上,于30℃培养3~5d,筛选具有高G418抗性且生长良好的菌株作为表达株。

1.3 rBmαTX14蛋白的诱导表达纯化和Western blot 鉴定

接种单菌落于25mL BMGY(Buffered glycerol complex medium)培养基于30℃培养至OD₆₀₀≈4.0。离心、收集菌体,用100mL BMMY培养基重悬培养。每日取样1mL,并补加纯甲醇于培养基至终浓度为1%。诱导表达6d,取样品离心收集上清作Tricine

SDS-PAGE 分析。

在表达上清中补加 KOH 至 80mmol/L ,NaCl 至 0.3mmol/L , β -Me 至 10mmol/L ,咪唑至 20mmol/L 后 ,用 Ni 金属离子螯合层析柱过柱纯化。用含 100mmol/L 咪唑的洗涤缓冲液洗涤杂蛋白 ;用含 250mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。收集洗脱液 ,并用 5kD 孔径的透析膜包裹 ,聚乙二醇 20000 覆盖 ,浓缩除盐 2~3h。取浓缩液过凝胶层析柱 G25 除掉小分子盐分。收集液用 Bradford 法测定纯化蛋白的浓度 ,而后冻干冷藏。

Western blot 所用一抗为抗 His-tag 的特异性多抗血清 ,二抗为用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗血清 ,以 3,3'-二氨基联苯胺显色。Western 印迹参考文献 [9] 的方法进行。

1.4 rBm α TX14 蛋白的活性测定

将母液浓度为 5 μ g/ μ L 的 rBm α TX14 溶液以 2 倍比稀释后 ,在 (200 \pm 2)mg 的蟑螂尾节间注射 5 μ L 生理盐水或者 rBm α TX14 溶液 ,每组 10 只蟑螂 ,共 7 组。观察 48h ,测定松弛麻痹单位(FPU)。

对 (20 \pm 2)g 小鼠尾静脉注射 200 μ L 生理盐水或者 rBm α TX14 溶液 ,每组 6 只小鼠 ,测定半数致死剂量(LD50)。

1.5 Bm α TX14 的基因组克隆及序列测定

剪取蝎子的四肢 ,70% 的乙醇清洗 ,置于液氮中碾碎 ,采用蛋白酶 K(SABC , China)温育消化及酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提杂蛋白 ,无水乙醇沉淀 DNA^[10] ,无菌水溶解备用。根据已知的 Bm α TX14 基因 cDNA 全长序列^[5] ,设计引物 :正向引物 FP1 :5' AACGATTCAAATGAATT ATTTGG 3' ;反向 RP1 :5' AAATAATTTATATTTATTTAATA G 3' ;巢式正向 FP2 :5' ATGAATA TTTGGTAATGATCAG 3' ;反向 RP2 :5' AGTTCCTCTTACGACAATTCTTTA 3'。采用两步 PCR 法扩增 Bm α TX14 基因组序列。第 1 步为 Touch-down PCR 方法 ,以 FP1 和 RP1 为正反向引物 ,蝎总基因组 DNA 为模板 ,95 $^{\circ}$ C 预变性 ,然后分两轮循环 ,第 1 轮 PCR 条件为 94 $^{\circ}$ C、45s ,59~50 $^{\circ}$ C、45s ,72 $^{\circ}$ C、2min ,共 10 个循环 ,每一循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C ;第 2 轮 PCR 循环条件 94 $^{\circ}$ C、45s ,52 $^{\circ}$ C、45s ,72 $^{\circ}$ C、2min ,共 25 个循环。第 2 步为 Nested PCR ,以 FP2 和 RP2 为正反向引物 ,以第 1 步 PCR 产物为模板 ,反应条件为 :95 $^{\circ}$ C、3min ,94 $^{\circ}$ C、45s ,55 $^{\circ}$ C、45s ,72 $^{\circ}$ C、1min ,72 $^{\circ}$ C、5min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收 ,连接于 T 载体 pMD-18T 上 ,制备克隆 ,并将阳性克隆送交测序公司(Sangon 公司)测序。

2 结果

2.1 重组表达质粒 pPIC9K/rBm α TX14 的构建

直接以含有 C60 菌株为模板 ,FP-14 和 RP-14 为引物可扩增出含有 his-tag 和 Bm α TX14 成熟肽的片段约 220bp ,与预计大小相符。提取重组质粒 pPIC9K/ rBm α TX14 经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切鉴定 ,得到相应的片段 ,测序结果表明 pPIC9K/6his/ rBm α TX14 的编码读框及序列均正确无误。

2.2 rBm α TX14 的表达纯化和 Western blot 鉴定

挑选能耐受 4g/L G418 的重组酵母菌株 ,摇瓶培养诱导表达。用 Tricine-SDS-PAGE 分析甲醇诱导的时间对表达量的影响时发现 ,甲醇诱导的第 1 天 ,即有表达产物出现 ,但表达量较低 ,随着表达时间的延长 ,表达量也逐步增高 ,到了第 84 小时达到高峰。从一级序列上看 ,Bm α TX14 成熟肽部分含有 65 个氨基酸残基。因为其一级序列具有典型的 α 型 Na⁺ 通道毒素特征 ,所以其最后一位的精氨酸应该符合 α 型 Na⁺ 通道毒素加工特点 ,而被除去。因此 rBm α TX14 含有 64 个氨基酸的成熟肽 ,另外加上组氨酸标签 ,共 70 个氨基酸 ,分子量 8.2kD。从 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳图上看(图 1) ,在 6.5kD~14.2kD 间有一明显条带(箭头所指) ,对照 :空载体整合子、未诱导整合子 ,在相应的地方没有出现条带 ,证实了 rBm α TX14 得到了表达。运用可吸附带有 6 个 His 的融合蛋白的 Ni-NTA 层析柱进行纯化 ,大部分杂质被去除。再经过聚乙二醇迅速浓缩和分子

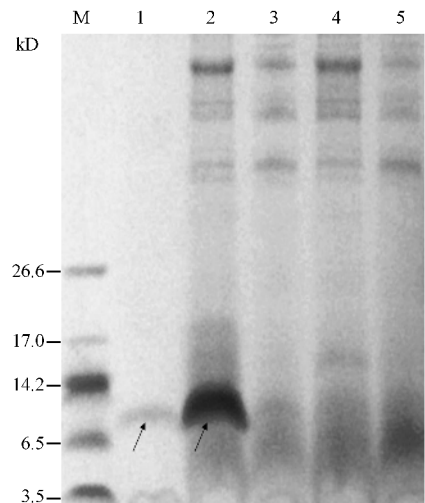


图 1 rBm α TX14 的表达

Fig. 1 Expression of his-tagged rBm α TX14 protein

M : protein marker ; 1 : after purification ; 2 : induced supernatant of GS115/pPIC9K/rBm α TX14 ; 3 : uninduced supernatant GS115/pPIC9K/rBm α TX14 ; 4 : induced supernatant GS115/pPIC9K ; 5 : uninduced supernatant GS115/pPIC9K.

筛除盐处理 ,收集的蛋白质纯度有了很大的提高。将纯化后的溶液经 Bradford 法测定重组蛋白的浓度 ,并按照纯化浓缩比例计算知 酵母培养液中重组蛋白表达量约为 120mg/L 培养基。

Western 印迹结果显示 ,rBmαTX14 表达上清在分子量为 8.2kD 处有一特异条带 ,而空载体转化菌株诱导上清对照未见特异条带(图 2) ,证实表达产物为组氨酸标签融合表达的 rBmαTX14。

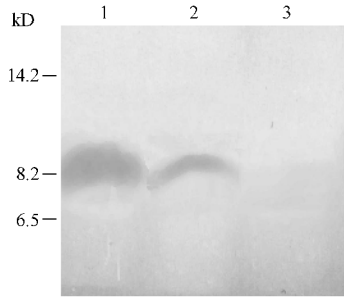


图 2 Western blot 分析 rBmαTX14 的表达

Fig. 2 Western blot analysis of the rBmαTX14

1 : culture supernatant of methanol induced recombinant GS115/pPIC9K/rBmαTX14 ; 2 : rBmαTX14 after purification ; 3 : culture supernatant of uninduced GS115/pPIC9K/rBmαTX14.

2.3 rBmαTX14 的初步活性测定

rBmαTX14 对蟑螂有明显的松弛麻痹作用。注入昆虫体内 ,30s 后 ,虫体腹部剧烈抽搐 ,1min 左右虫体松弛麻痹 ,20h 后 ,低用药虫体苏醒 ,高剂量时虫体死亡。采用 2 倍稀释法 ,测定 $FPU = \text{母液浓度} / \text{稀释度} \times \text{注入量}$ 。如图 3 ,用中点法计算得 :稀释度 = $2^{2.68} = 6.41$,所以 $FPU = 5\mu\text{g}/\mu\text{L} \times 5\mu\text{L}/6.41 = 3.885\mu\text{g}$ 。尾静脉注射小鼠 :小鼠无明显的反应 ,rBmαTX14 溶液与生理盐水对照组相同。

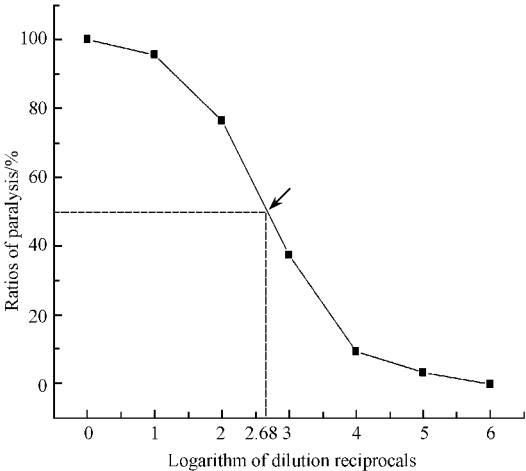


图 3 rBmαTX14 对蟑螂的毒性

Fig. 3 Insect toxicity of rBmαTX14.

2.4 BmαTX14 内含子序列测定及其基因组结构分析

以 FP1、RP1 及 FP2、RP2 两组引物分步对蝎基因组 DNA 进行扩增 ,得到一条明显的特异性 DNA 带(图 4) ,电泳显示 ,基因组扩增产物比相应的 cDNA 的扩增产物长约 400bp。

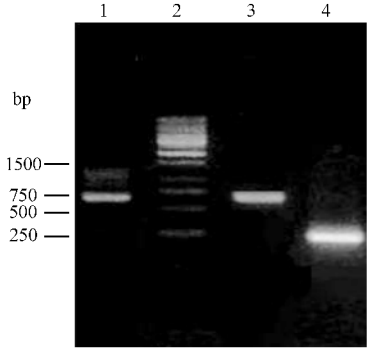


图 4 基因组 DNA 的 PCR 扩增

Fig. 4 PCR amplification of genomic DNA

1 and 3 : The touch-down and nested PCR amplification products of BmαTX14 from genome of scorpions , respectively ; 2 : 1 kb DNA ladder marker ; 4 : the cDNA control of BmαTX14.

将 Nested PCR 的产物克隆至 pMD-18T 载体中 ,转化 DH5α 菌株后 ,筛选阳性克隆子 ,以 M13R 为测序引物测序。序列结果如图 5。

序列分析表明 :BmαTX14 基因组含有一个 408bp 的内含子 ,其基因组结构分析表明 :富含 AT ,含量达 73.5% ,明显高于外显子 (57.6%) ;内含子插入在 BmαTX14 信号肽 C 端编码区倒数第 4 个氨基酸 Gly 密码子的第一位和第二位碱基之间 ,与其他 α 型 Na⁺ 通道毒素相同^[2] ;5'、3'剪接位点序列分别为 5'-AG gtaaga-3'、5'-tgacag GA-3' ,符合蝎毒素基因内含子剪接位点保守序列的一般规律^[11] ;在 3'剪接受体位点上游 74 个碱基处含有一个剪接分枝点序列元件 5'-taat-3' ,该分枝点与受体位点之间的碱基距离符合 Na⁺ 通道毒素的规律^[12]。BmαTX14 基因组组织结构具有典型的 α 型 Na⁺ 通道毒素的特征。

3 讨论

体内毒性实验表明 ,表达的 rBmαTX14 仅具有昆虫毒性 ,而对小鼠无明显影响。虫体用药后快速抽搐至麻痹 ,暗示 rBmαTX14 可能抑制了蟑螂钠电流的失活 ,这与 α 类 Na⁺ 通道毒素的功能特性相符^[5,7] ;同时基因组结构分析表明 :BmαTX14 在内含子插入位点、所插入的氨基酸种类、插入位点距离起始 ATG 的核苷酸数目 ,以及 5'剪接供体位点区的核苷酸序列几方面都符合 α 类 Na⁺ 通道毒素的特征。这些结

5' aacgattcaaa**ATG AAT TAT TTG GTA ATG ATC AGT TTT GCA CTT CTC CTA ATG**
M N Y L V M I S F A L L L M
ACA G gtaagat ttacatat ttttagtataag tttatggatc tgcata agatattcg gnaa: tgc tgggattacagaaataat
T
ccattat tgaattt gttaaaggnaatttcgat gcttgraaactaaagac tcaaaatatacattt gntaaatc taattttataaaga
aaacattgcata ttgatgna gnaaaactt ttaatttaa tttagt tgggnaatc attg tggnaaaatttt caaataaatttcgagac
gaaaganaatgtaaat tttatat tgcattcagcagacaaa tcaaacgtt tctgtt aaatgggtataaaaatttccatccggtaac
gtaattggnaaaatagtttttgcatttctagtaattgggattttttatttagagagttatttttctgagacag **GA GTG**
G V
GAG AGT GTT CGG GAT GCT TAT ATT GCC AAG CCC GAA AAC TGT GTA TAC CAT
E S V R D A Y I A X P E N C V Y H
TGT GCT ACA AAT GAA GGT TGC AAC AAA TTA TGT ACT GAC AAT GGT GCT GAG
C A T N E G C N K L C T D N G A E
AGT GCC TAT TGC CAA TGG CGA GGT AAA TAT GGA AAT GCC TGC TGG TGC ATA
S G Y C Q W G G K Y G N A C W C I
AAG TTG CCC GAT GAT GTA CCG ATT AGA GTA CCA GGA AAA TGC CAT CGT TGA
K L P D D V P I R V P G K C H R end
Taataaacc t gtaaaaaaac ataaagaattg t gtaagaagaactaataaagaaataaataat

图 5 BmTX14 的基因组序列

Fig. 5 Precursor nucleotide and genomic sequence of BmTX14 from *Buthus martensii* Karsch
The amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. The signal peptide is given in bold type and larger letters. The putative branch point is underlined once. Exons are written in capital letters. Introns and flanking regions are written in lower-case letters. The polyadenlation signal AATAAA is underlined twice.

果从多个方面证实 :BmTX14 为 α 类 Na^+ 通道毒素。而且 ,我们的研究还暗示 :毒素基因内含子的组织结构与其功能有一定程度的相关性。

目前用基因工程方法获得重组蝎毒素主要还是利用大肠杆菌的原核表达系统 ,该系统在表达重组活性蛋白时存在许多弊端 ,如 :细菌缺少蛋白质翻译后加工机制 ,细菌内环境偏于还原 ,不易于二硫键的正确搭配 ;原核表达易形成包含体 ,不易于蛋白质复性等。甲醇毕赤酵母 *P. pastoris* 表达系统作为第二代酵母表达系统克服了细菌表达的这些不足 ,而且为实现高密度发酵 ,在提高重组蛋白表达量上也超出了酿酒酵母表达系统。此外 ,*P. pastoris* 分泌表达载体的构建对外源蛋白分离纯化工作带来了极大的便利 ,加之 *P. pastoris* 本身的分泌蛋白较少 ,这样就更加减少了下游分离纯化的成本 ,具有很大的商业利用价值^[8]。

本文首次成功地利用 *P. pastoris* 表达系统 ,高效地表达了活性重组蝎 α 型钠通道毒素 BmTX14 ,这对于加快蝎毒素的研究和应用有重要的实践意义。

REFERENCES(参考文献)

[1] Catterall WA. Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channel in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* , 1980 , **20** :15 - 43
[2] Froy O , Sagiv T , Poreh M *et al.* Dynamic diversification from a pupative common ancestor of scorpion toxins affecting sodium potassium

and chloride channels. *J Mol Evol* , 1999 , **48** :187 - 196
[3] Possani L D , Merino E , Corona M *et al.* Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* , 2000 , **82** : 861 - 868
[4] Goudet C , Chi C-W , Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* , 2002 , **40** :1239 - 1258
[5] Zhu SY(朱顺义) , Li WX(李文鑫) , Zeng XC(曾宪春) *et al.* Nine novel precursors of *Buthus martensii* scorpion α -toxin homologues. *Toxicon* , 2000 , **38** :1653 - 1661
[6] Srinivasan KN , Gopalakrishnakone P , Tan PT *et al.* SCORPION , a molecular database of scorpion toxins. *Toxicon* , 2001 **40** :23 - 31
[7] Couraud F , Tover E , Wang GK. Two types of scorpion toxin receptor sites , one related to the activation , the other to the inactivation of the action-potential sodium channel. *Toxicon* , 1982 , **20** :9 - 14
[8] Gregg JM , Vedvick TS , Rashechke WC. Recent advances in expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio-Technology* , 1993 , **11**(8) :905 - 910
[9] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 , pp.366 - 373
[10] Becerril B , Vazquez A , Garcia C *et al.* Cloning and characterization of cDNAs that code foe Na^+ channel-blocking toxins of scorpion *Centruroides novius* Hoffman. *Gene* , 1993 , **128** :165 - 171
[11] Blanc E , Hassani U , Meunier S *et al.* ¹H-NMR derived secondary structure and overall fold of a maturat anatoxin from the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Eur J Biochem* , 1997 , **247** :1181 - 1126
[12] Senapathy P , Shapiro MB , Harris NL. Splice junctions , branch point sites , and exons : sequence statistics , identification , and application to genome project. *Methods Enzymol* , 1990 , **183** :252 - 279