

03072



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

6  
2 eje.

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACION DE GENES QUE CODIFICAN  
PARA TOXINAS DE ALACRANES AMERICANOS  
QUE BLOQUEAN CANALES DE SODIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

MIGUEL CORONA VILLEGAS

CUERNAVACA, MOR.

AGOSTO 1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

\* A FRIDA Y MARICELA.

\* A MIS AMIGOS:

Jesús Avalos

José Naranjo

Francisco Trujillo.

ESTA TESIS SE REALIZO BAJO LA DIRECCION DEL DR.  
BALTAZAR BECERRIL LUJAN, EN LOS LABORATORIOS  
DEL DR. LOURIVAL D. POSSANI POSTAY y FRANCISCO  
BOLIVAR ZAPATA DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## **AGRADECIMIENTOS**

*\*A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar en ella mis estudios.*

*\*Al CONACyT por otorgarme la beca que hizo posible la realización de este trabajo.*

*\* Al Dr. Baltazar Becerril, por todo lo aprendido.*

*\* Al Dr. Possani, por su confianza y entusiasmo mostrado en la realización de este trabajo.*

*\* A todos lo compañeros que compartieron conmigo las experiencias en el laboratorio.*

*Este trabajo fue financiado en parte por Howard Hughes Medical Institute grant No. 75191-527104 y CONACyT No. 0018-N9105 y DGAPA-UNAM No. IN-205893 al Dr. Possani.*

## INDICE GENERAL

1.- RESUMEN.....	7
2.- INTRODUCCION.....	8
2.1.- El alacrán y la importancia de su estudio.....	8
2.2.- Extracción y purificación del veneno de alacrán.....	9
2.3.- Especificidad de las toxinas de alacrán.....	9
2.3.1.- Toxinas bloqueadoras de canales de sodio.....	10
2.3.1.1.- Mecanismo de acción.....	10
2.3.1.2.- Toxinas específicas para mamíferos.....	10
2.3.1.3.- Toxinas específicas para insectos.....	11
2.4.- Estructura de las toxinas de alacrán.....	11
2.4.1.- Toxinas bloqueadoras de canales de Na <sup>+</sup> .....	11
2.5.- Genética molecular de las toxinas de alacrán.....	12
2.5.1.- ADN complementarios.....	12
2.5.2.- ADN genómico.....	14
3.- ANTECEDENTES.....	14
4.- OBJETIVO.....	16
5.- MATERIALES Y METODOS.....	17
5.1.- Extracción y purificación de ADN genómico.....	17
5.2.- Reacción en cadena de la polimerasa.....	18
5.3.- Clonación.....	21
5.5.- Detección de clonas positivas y secuenciación.....	21
6.- PUBLICACIONES.....	22
6.1.- ARTICULO 1.....	22
6.2.- ARTICULO 2.....	29
7.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
8.- CONCLUSIONES.....	42
9.- BIBLIOGRAFIA.....	43

## INDICE DE FIGURAS

1.- Secuencia nucleotídica del ADNc de la toxina gama del alacrán <i>Tityus serrulatus</i> .....	20
2.- Secuencia nucleotídica de las clonas CnA.....	33
3.- Secuencia nucleotídica de las clonas CnB y CnC.....	37
4.- Comparación de ADNcs que codifican para toxinas de alacrán.....	38
5.- Alineación de péptidos señal de genes de toxinas .....	40

## INDICE DE FOTOGRAFIAS

1.- Producto de la reamplificación del ADN genómico de <i>C. noxius</i> con los oligos "Ntox2" y "Extremo 3'".....	36
--	----

## 1.- RESUMEN

En esta tesis se aportan algunos elementos para la caracterización de la estructura y organización de los genes que codifican para toxinas bloqueadoras de canales de sodio de alacranes americanos. Estas toxinas constituyen una familia de proteínas con secuencias muy conservadas.

Se trabajó con dos géneros representativos de América que habitan en la mayor parte del continente: El género norteamericano *Centruroides* y el género sudamericano *Tityus*.

La especie *C. noxius*, originaria de Nayarit es de particular interés, ya que por la alta toxicidad de su veneno es considerada la especie más venenosa de norteamérica. Para determinar la estructura individual de los genes que en esta especie codifican para toxinas bloqueadoras de canales de sodio, se realizaron experimentos de amplificación por PCR. Durante la clonación y caracterización de algunos productos de la amplificación se obtuvo la clona CnA, cuya secuencia nucleotídica pudiera ser la de un pseudogen. Asimismo, se amplificó y se determinó la secuencia nucleotídica de la región que codificaría para la parte estructural y extremo 3' de la clona CnC que corresponde a una nueva secuencia muy parecida a la que codificaría para la toxina CnI. De esta forma, se confirmó que en esta especie no existen intrones cuando menos en la región amplificada de estos genes.

Por otra parte, se intentó determinar la estructura de los genes que codifican para este tipo de toxinas en alacranes del género sudamericano *Tityus*. El alacrán *Tityus serrulatus* es asimismo de gran interés puesto que su veneno es uno de los más tóxicos de sudamérica y del mundo. En particular una toxina de su veneno, la toxina gama, es de considerable importancia puesto que presenta afinidad tanto para los canales de sodio de insecto como para los de mamífero. Esta toxina presenta además la mayor afinidad conocida para canales de sodio de cerebro de rata.

Puesto que era conocida la secuencia del ADNc que codifica para la toxina gama, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen cromosomal completo. De esta forma, se logró amplificar y secuenciar un fragmento 790 pb que corresponde con el ADNc de la toxina gama. La secuencia de tal fragmento es interrumpida por un intrón de 462 pb situado en la región que codificaría para el péptido señal.

Posteriormente, siguiendo una metodología similar, se colaboró en la obtención de los genes que codifican para los equivalentes de la toxina gama en otras dos especies del género *Tityus*.



## 2.-INTRODUCCION.

Esta tesis se constituye de dos partes: Una publicada (artículos 1 y 2 pág. 22 y 29) y otra en vías de preparación para publicación. Esta última parte se describe con mayor detalle en esta tesis.

Los artículos publicados y los datos de la tesis, se anteceden con una introducción general y una revisión del conocimiento más reciente respecto a las toxinas de alacrán.

### 2.1.- EL ALACRAN Y LA IMPORTANCIA DE SU ESTUDIO.

Los alacranes o escorpiones son los artrópodos terrestres más antiguos que se conocen y probablemente fueron los primeros miembros de este phylum en conquistar la tierra. Los primeros alacranes fueron acuáticos y su registro fósil data del silúrico, los escorpiones terrestres aparecen en el devónico, hace aproximadamente 350 millones de años (Barnes, 1983).

Se han reportado alrededor de 600 especies de alacranes incluidos en 70 géneros y 6 familias (Miranda *et al.*, 1970). La mayor parte de las especies venenosas conocidas están dentro de la familia *Buthidae*, a la cual pertenecen los géneros *Tityus* de América del Sur y *Centruroides* de América del Norte. Las especies *Centruroides noxius* y *Tityus serrulatus*, originarias de Nayarit y Brasil respectivamente, son de particular interés, ya que por la alta toxicidad de sus venenos están consideradas como dos de las especies más venenosas del mundo (Hassan, 1984; Dehesa-Dávila, 1989).

Los alacranes aún representan un problema médico y un riesgo para la salud en México, Brasil, Medio Oriente y Africa del Norte (ver revisión Possani, 1984). En nuestro país, anualmente son atendidos más de 200 000 casos de picaduras y el promedio de personas fallecidas por esta causa es del orden de 700 a 800, en su mayoría niños menores de 2 años (D.López-Acuña y A. Alagón, comunicado durante la sesión técnica de la Sociedad Mexicana de Salud Pública, Mexico D.F. marzo de 1979). Los estados más afectados por este problema son Colima, Nayarit, Guerrero y Morelos (Keegan, 1980).

No obstante que las picaduras de alacrán aún representan para algunos países un problema de salud pública, el enfoque actual de las investigaciones sobre los venenos de los alacranes dejó de ser objeto de interés únicamente médico. En el presente, el conocimiento de que las toxinas contenidas en los venenos de alacrán bloquean en forma específica diferentes canales iónicos, las ha convertido en valiosas herramientas para estudios de neurobiología, electrofisiología y farmacología molecular (Catterall *et al.*, 1986).

Recientemente, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, se abre la posibilidad de acelerar el estudio de las relaciones estructura-función de este grupo de toxinas, así como la organización y expresión de los genes que las codifican.

## 2.2.- EXTRACCION Y PURIFICACION DEL VENENO DE ALACRAN

En diversas investigaciones en las cuales se ha purificado el veneno de alacrán, se ha demostrado que sus componentes activos son polipéptidos que reciben el nombre de toxinas (ver revisión Rochat *et al.*, 1979).

La mayoría de los trabajos bioquímicos reportados sobre toxinas de alacrán se han llevado a cabo con veneno extraído por estimulación manual o eléctrica de los telsones (Babin *et al.*, 1974; Zlotkin *et al.*, 1978; Rochat *et al.*, 1979; Possani *et al.*, 1981a), ya que el uso de glándulas homogeneizadas presenta el problema de contaminación del veneno con componentes de alto peso molecular (Possani *et al.*, 1980, 1981b).

La presencia de las toxinas en los diferentes venenos es usualmente seguida por el efecto que estas presentan al ser inyectadas en animales de laboratorio (Tu, 1977; Zlotkin *et al.*, 1978; citado en revisión Possani, 1984).

La técnica más ampliamente utilizada para la purificación de toxinas de alacrán, consiste en su extracción del veneno crudo a través de solubilización en agua y centrifugación seguida por una cromatografía en columna (ver revisión Zlotkin *et al.*, 1978). La filtración en gel con reciclamiento en Sephadex G-50, es seguida de 1 ó 2 cromatografías de intercambio iónico sobre soportes insolubles como puede ser la carboximetilcelulosa (Rochat *et al.*, 1979; Possani *et al.* 1981a, c). Las resinas se equilibran y las muestras son aplicadas en una serie de diferentes sistemas de amortiguadores a valores específicos de pH y fuerza iónica. En algunos casos, la estrategia para la purificación involucra un paso cromatografía de intercambio iónico seguido de filtración en gel de Sephadex (ver revisión Possani 1984).

## 2.3.- ESPECIFICIDAD DE LAS TOXINAS DE ALACRAN.

Las toxinas de alacrán, como algunas otras de origen animal, son proteínas básicas y cortas de una sola cadena polipeptídica (Miranda *et al.*, 1970) de 28 (Lazarovici *et al.*, 1982a,b) a 78 aminoácidos (Toledo y Neves, 1976). Se ha reportado el aislamiento de alrededor de 120 toxinas puras, de las cuales se ha determinado la secuencia completa de aminoácidos de más de un tercio (ver revisión Possani 1984; Meves *et al.*, 1986; Ramírez *et al.*, 1994)

Según su especificidad sobre los canales iónicos, se han reconocido hasta el momento 4 tipos diferentes de toxinas: las que bloquean canales de sodio (Miranda *et al.*, 1970), potasio (Possani *et al.*, 1982), calcio (Valdivia, *et al.* 1991 y 1992) y cloro (DeBin *et al.*, 1993). Las toxinas bloqueadoras de canales de sodio fueron las primeras caracterizadas y hasta ahora son también las mejor estudiadas.

### 2.3.1.- Toxinas bloqueadoras de canales de sodio.

#### 2.3.1.1.- Mecanismo de acción.

La potente acción de este tipo de toxinas está relacionada con su habilidad para unirse con alta afinidad a los canales de sodio que son voltaje dependientes en células excitables (Catterall, *et al* 1976 y 1986; Couraud y Jover, 1984).

Los canales de sodio permiten el flujo de este ión produciendo la fase inicial de despolarización rápida en el potencial de acción. La actividad de estos canales es alterada cuando las toxinas se unen a ellos en diferentes sitios (Strichartz, 1989). Esta interrupción en el flujo de iones de  $\text{Na}^+$  a través de los canales en fibras nerviosas y musculares, trae consigo un efecto paralizante sobre el individuo (Catterall *et al.*, 1986). Las arritmias respiratorias producidas por las picaduras de alacrán son debidas principalmente a la despolarización de las fibras viscerales aferentes (Freire-Mala, 1983).

Las toxinas que bloquean canales de sodio muestran entre sí diferente grado de toxicidad para los diferentes grupos animales. De esta manera, se han reportado toxinas que han demostrado ser preferentemente específicas contra mamíferos (Miranda *et al.*, 1970) insectos (Zlotkin *et al.*, 1971) o crustáceos (Zlotkin *et al.*, 1978).

#### 2.3.1.2.- Toxinas específicas para canales de sodio de mamíferos.

Al realizar una comparación de los diversos estudios realizados sobre la unión específica de las toxinas que bloquean canales de sodio de mamíferos, resulta evidente que existen dos clases de éstas (Meves *et al.*, 1989). De acuerdo con Koppenhofer y Smith (1968) y Narashashi *et al.*, (1972), los efectos de las toxinas de los alacranes de los géneros *Leiurus* y *Buthus* del viejo mundo, producen un retardamiento en la inactivación de los canales de sodio. Por otra parte, Cahalan (1975) demuestra que las toxinas de los alacranes del género americano *Centruroides* inducen la aparición de una nueva corriente de sodio (citados por Freire-Maia y Campos, 1989).

En este contexto, Catterall (1980) encontró 3 sitios receptores asociados a canales de sodio. El sitio I, al que se unen la tetrodotoxina y la saxitoxina (toxinas de especies marinas). El sitio II, al que se unen las toxinas liposolubles como la veratridina y batracotoxina y el sitio III, al que se unen las toxinas de anémtona y de alacranes de géneros del viejo mundo.

De acuerdo con Jover (1980) y Couraud *et al.* (1982) las toxinas de los alacranes de Africa y Asia, se unen de manera dependiente de voltaje al sitio III del canal de sodio afectando su inactivación (uniéndose al canal abierto) y son denominadas toxinas  $\alpha$ . Por otra parte, las toxinas de alacranes norteamericanos se unen de manera independiente del voltaje a otro sitio del canal, que se llamó sitio IV, afectando su activación (uniéndose al canal cerrado) y se denominan toxinas tipo B.

Un caso especial lo constituyen las toxinas de los alacranes sudamericanos del género *Tityus*. Las toxinas del alacrán *Tityus serrulatus* se unen a sitios diferentes en el canal de sodio. La tityustoxina, aislada por Gómez y Diniz en 1966, también llamada TsIV-5 por Possani *et al* quienes la secuenciaron en 1985, se une al sitio III del canal de sodio y es por lo tanto una toxina  $\alpha$  (Kirsch *et al.*, 1989). Por otra parte, la toxina gama (Possani *et al.*, 1977) también indebidamente llamada TI-VIII (Sampaio *et al.*, 1983) ó Ts VII (Bechis *et al.*, 1984, citado por Martin-Eauclaire, *et al*, 1992) se une a los mismos sitios receptores que las toxinas del género *Centruroides*, por lo que se le considera una toxina tipo  $\beta$  (Jover *et al.*, 1980; Couraud *et al.*, 1982; Barhanin *et al.*, 1982).

El estudio de la toxina gama reviste considerable interés ya que posee la más alta afinidad hasta ahora descrita para los canales de sodio del cerebro de rata (con una constante de disociación en el rango picomolar). Esta toxina tiene además propiedades farmacológicas tanto de las toxinas del tipo  $\beta$ , como de las toxinas específicas contra insectos (De Lima *et al.*, 1986, citado por Martin-Eauclaire *et al* 1992).

### 2.3.1.3.- Toxinas específicas contra canales de insectos.

Las toxinas que bloquean canales de sodio de insectos se clasifican como excitatorias y depresantes (Zlotkin *et al.*, 1971; 1985). Aunque estos dos tipos de toxinas producen efectos opuestos, ambas se unen al mismo sitio en las membranas neuronales de insectos (Zlotkin *et al.*, 1985 ; De Lima *et al.*, 1989).

## 2.4.- ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS DE ALACRAN.

### 2.4.1.- Estructura de las toxinas bloqueadoras de canales de Na<sup>+</sup>.

Las toxinas que bloquean canales de sodio constituyen una familia de proteínas que presentan entre sí gran homología (Possani *et al.*, 1984) (ver figura 2, artículo 1 pág. 25), tienen de 61 a 78 aminoácidos y presentan una compactación estructural dada por 4 puentes disulfuro (Miranda *et al.*, 1970; Kopeyan *et al.*, 1974; Fontecilla Camps *et al.*, 1980; Possani *et al.*, 1982 y 1983).

Los aminoácidos que son conservados en este grupo de proteínas son de gran importancia para la estabilización de su estructura secundaria y terciaria (ver revisión Possani, 1984). Fontecilla Camps *et al.*, (1981), realizaron un análisis de la estructura de 28 toxinas encontrando que aunque las secuencias exhibían considerable variación, mostraban tres regiones conservadas. La región conservada más grande corresponde a los residuos 1-6, la segunda región a los residuos 45-47 y la tercera a los residuos 51-53.

Las principales características de la estructura secundaria y terciaria de las toxinas de alacrán han sido estudiadas por las técnicas de dispersión rotatoria óptica, dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear y cristalografía por rayos X (ver revisión Possani *et al.*, 1984). Aunque la combinación de varias de estas técnicas ha permitido conocer los detalles de la estructura de estas moléculas, la cristalografía por difracción de rayos X es sin duda la técnica que más información ha aportado. Hasta ahora, con esta técnica se ha logrado determinar la estructura tridimensional de la variante 3 del alacrán norteamericano *Centruroides sculpturatus* (Fontecilla-Camps *et al.* 1980; Almassy *et al.*, 1983) y de la toxina AaII II del alacrán norteafricano *Androctonus australis* Hector (Fontecilla-Camps *et al.*, 1988).

Las características más sobresalientes de la estructura de la variante 3, son dos y media vueltas de  $\alpha$  hélice que comprende de los residuos 23 al 32, y un corto trocho de lámina  $\beta$  plegada de 3 hebras antiparalelas que incluyen los residuos 1-4, 37-41 y del 46-50. La lámina  $\beta$  plegada corre en forma casi paralela a la hélice  $\alpha$  y se unen ambas mediante dos puentes disulfuro que incluyen las cisteínas 25-46 y 29-48. Cercas de esta región, se forma un tercer puente disulfuro entre las cisteínas 16 y 41. El cuarto puente disulfuro, entre las cisteínas 12 y 65, está expuesto en un extremo de la molécula.

La estructura tridimensional de AaII II de *Androctonus australis* Hector, presenta características estructurales similares a la variante 3. De esta forma, ambas toxinas comparten una región altamente estructurada la cual contiene la  $\alpha$  hélice, el triplete de hebras antiparalelas de la lámina  $\beta$  plegada y tres de los cuatro puentes disulfuro. Como era esperado, los aminoácidos que componen las asas protuberantes varían en forma apreciable en ambas moléculas. Las mayores diferencias fueron encontradas en las regiones donde ocurren inserciones y en el extremo COOH terminal (Fontecilla-Camps *et al.*, 1988).

## 2.5.- GENETICA MOLECULAR DE LAS TOXINAS DE ALACRAN.

### 2.5.1.- ADN complementarios.

En el presente se han logrado aislar y secuenciar varios ADNes que codifican para toxinas específicas contra canales de sodio tanto de mamíferos como de insectos.

#### *Androctonus australis* Hector (alacrán norteafricano).

Bougis *et al.*, aislaron en 1989 los primeros 6 precursores que codifican para toxinas de alacrán utilizando un banco de ADNes de la especie norteafricana *Androctonus australis* Hector. De estos precursores, 4 codifican para toxinas específicas contra mamíferos del tipo alfa (AaII I, AaIII', AaH II y AaH III) y 2 específicos contra insectos del tipo excitatorio (AaH IT1, AaHIT2). Los precursores de toxinas específicas contra mamíferos están codificados por ARNms de alrededor de 380 pb (sin incluir poliA). En la parte codificante se presenta una región que codificaría para un péptido señal de 19 aminoácidos y una parte estructural que codificaría para 64 ó 65 aminoácidos de los

## INTRODUCCION

cuales el último (arginina) o los dos últimos (glicina y arginina) respectivamente, son aminoácidos que no se encuentran en el péptido maduro, por lo que se presume que son sitios de procesamiento. Estos autores proponen que para la activación de estas toxinas se requiere el corte del último aminoácido (arginina) en el extremo COOH del precursor. Además, en el caso de la toxina AaII, se requiere que el penúltimo aminoácido del precursor (glicina) done su grupo amino al aminoácido que lo antecede (ver figura 4, pág. 38)

Los precursores de toxinas específicas contra insectos tienen un péptido señal de 18 aminoácidos, una parte estructural que codificaría para 70 aminoácidos y no presentan aminoácidos extra con respecto al péptido maduro.

### *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Asia)

Gurevitz y colaboradores (1991) reportaron la secuencia de Lqh $\alpha$ IT1, un transcrito de 314 pb (sin incluir poli A) que codifican para una toxina específica contra insectos. Lqh $\alpha$ IT exhibe un 75% de homología con respecto a la toxina  $\alpha$  4 de *Leiurus quinquestriatus* y solo un 53% con respecto a la familia de toxinas  $\alpha$  que afectan mamíferos del alacrán *Androctonus australis* Hector. No obstante esta relativamente baja similitud entre la parte estructural de Lqh $\alpha$ IT1 y la familia de las toxinas  $\alpha$  de *A. australis*, ambas toxinas comparten un péptido señal muy semejante con solo 4 diferencias en 57 nucleótidos codificantes, por lo tanto, se presume que Lqh $\alpha$ IT1 es una toxina alfa específica contra insectos.

### *Buthotus judaicus*

Zilberberg *et al* (1991) reportaron la secuencia de un ADNc que codifica para una toxina específica contra insectos del tipo depresante. Este transcrito de 323 pb (sin incluir poli A), incluye las regiones que codificarían para un péptido señal de 21 aminoácidos, la parte estructural de la proteína madura de 61 aminoácidos y tres residuos adicionales antes del codón de terminación (Arginina-Lisina-Lisina)

### *Tityus serrulatus* (sudamérica)

Martin Eaucuire *et al* (1992), reportaron la secuencia del ADNc que codifica para la toxina Ts VII o gama del alacrán brasileño *Tityus serrulatus*. Esta toxina es específica contra mamíferos y es del tipo de las neurotoxinas beta. Este transcrito con una longitud de 343 pb (sin incluir poli A), tiene una región que codificaría para 20 aminoácidos del

péptido señal, la región que codificaría para el péptido maduro (61 a.a.) y una región que codifica para 3 aminoácidos que no forman parte de la toxina madura (Glicina-Lisina-Lisina) antes del codón de terminación. Por determinación de secuencia de aminoácidos se sabe que la última cisteína es amidada (cisteinamida).

En todos los transcritos que codifican para toxinas de alacrán se ha reportado una posible señal de poliadenilación en el extremo 3'.

### 2.5.2.- ADN genómico.

Bougis *et al* (1989), realizaron análisis mediante hibridación tipo Southern utilizando como sonda el ADNc de la toxina AaIII. Estos experimentos sugirieron, según dichos autores, que este gen se encuentra en copia única y tiene un tamaño mínimo de 2800 pb. Posteriormente, Martín-Eauclaire *et al* (1992), presentaron en el Congreso Internacional de Toxinología de Singapur información de que habían determinado la secuencia nucleotídica del gen AaII 1' del alacrán norteafricano *Androctonus australis* Hector. Dichos autores establecieron la estructura de este gen pero no reportan la secuencia nucleotídica. De esta manera, el gen de AaII 1' contendría dos exones (exón 1 = 48 pb y exón 2 = 207 pb) y un intrón de 426 pb que se encontraría cercano al final del péptido señal (longitud total del gen 681 pb).

## 3.- ANTECEDENTES

### 3.1.-Antecedentes del grupo

En los últimos años, en el grupo del Dr. L.D. Possani se ha trabajado extensamente en la bioquímica de los venenos de alacranes americanos, principalmente del género *Centruroides* de norteamérica y *Tityus* de sudamérica. Hasta la fecha, se han identificado 8 toxinas bloqueadoras de canales de sodio de *C. noxius* (Possani *et al.*, 1981; Possani *et al.*, 1984; Valdivia *et al.*, en prensa), 2 de *C. limpidus limpidus* (Atagón *et al.*, 1987), 1 de *C. limpidus tecomanus* (Ramírez *et al.*, 1988; Martín *et al.*, 1988) y 4 de *T. serrulatus* (Possani *et al.*, 1991).

De las toxinas de *C. noxius*, 7 son específicas contra mamíferos: Cn1 (fracción II-14), Cn2 (II-9.2.2), Cn3 (II-9.2.3), Cn4 (II-10.2.2), Cn7 (II-13.3), Cn8 (II-13.4) y Cn9 (II-14.4) (de las últimas solo se ha secuenciado su extremo N terminal) y una contra crustáceos Cn5 (II-5). Del alacrán *Tityus serrulatus* se ha logrado secuenciar completamente la toxina gama, la toxina IV-5 y la toxina III-8.

En forma más reciente, en nuestro laboratorio se han utilizado metodologías de biología molecular para el aislamiento y secuenciación de los genes que codifican para toxinas de alacrán. De esta manera, en el presente se han logrado secuenciar 4 precursores completos que codifican para toxinas bloqueadoras de canales de sodio del tipo B del alacrán *C. noxius*. De estos precursores, dos son de la familia de genes que

## ANTECEDENTES

codifican para toxinas específicas contra mamíferos (CngtIV, CngtV) y otros dos son toxinas específicas contra insectos y crustáceos (CngtII y CngtIII). Dos de estos ADNc corresponden con la secuencia de aminoácidos de toxinas ya secuenciadas: CngtII con Cn5 y CngtV con Cn4 (Becerril *et al.*, 1993; Vázquez *et al.*, 1993). De esta manera, al comparar las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las de nucleótidos de los ADN complementarios, con la de aminoácidos de estas toxinas, se ha podido deducir las modificaciones post-traduccionales que sufren los péptidos precursores para generar las toxinas maduras, los cuales son similares a los de los otros precursores previamente reportados:

- 1) En primer lugar, una peptidasa señal realiza un corte en la primera lisina del amino terminal para escindir el péptido señal.
- 2) Una carboxipeptidasa específica corta los residuos básicos que se encuentran en el COOH terminal del péptido (Una y dos lisinas en Cn4 y Cn5 respectivamente).
- 3) Cuando al último, o a los dos últimos aminoácidos básicos antecede una glicina, una enzima  $\alpha$  amidasa amida al aminoácido que a su vez le antecede. Este sería el caso de Cn5 cuyo péptido precursor terminaría con Asn-Gli-Lis. De esta manera, la toxina madura terminaría en asparaginamida.

### 3.1.- Antecedentes directos.

Los antecedentes más inmediatos a este trabajo, los constituyen los resultados obtenidos en mi tesis de licenciatura titulada "Implementación de un método general para la caracterización de genes que codifican para toxinas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann" (1992). En dicho trabajo, se realizaron básicamente experimentos del tipo Southern y PCR que a continuación describo:

#### a) Southern.

Con el objetivo de obtener información relativa a la organización de los genes que codifican para toxinas de alacrán que bloquean canales de sodio, se realizaron experimentos del tipo Southern blot. Para ello, se realizaron digestiones con diferentes enzimas de restricción utilizando 10  $\mu$ g de ADN genómico por ensayo y se utilizaron como sondas las clonas CngtI y CngtII. Este análisis sugiere un tamaño máximo de 18 kb para la región genómica total que codifica para esta familia de genes y un tamaño mínimo de aproximadamente 600 pb para los elementos de dicha familia (figura 3 artículo 1, pág. 26). Si consideramos que la extensión de los ADNc de esta familia es de alrededor de 330 pb, podemos deducir que si existe un intrón en estos genes éste no sería muy grande.



**b) PCRs genómicos.**

Para obtener información relativa a la estructura de los genes que codifican para toxinas bloqueadoras de canales de sodio en *C. noxius*, se realizaron experimentos de PCR. Puesto que entonces sólo conocíamos la secuencia de nucleótidos de la clona CngtI (clona incompleta en el extremo 5') y la secuencia de aminoácidos de algunas toxinas de *C. noxius*; decidimos elegir la región del amino y del extremo 3' para diseñar los oligos para el PCR por las siguientes razones: i) La parte N terminal es una región bien conservada entre las toxinas bloqueadoras de canales de Na<sup>+</sup>. (ver figura 1 y 2 artículo 1, pág. 24 y 25) ii) La región del extremo 3' que elegimos para el diseño del oligo fue la región que inmediatamente antecede a la posible señal de poliadenilación de la clona CngtI, por lo tanto, con este oligo amplificaríamos la región más amplia posible hacia el extremo 3' (aún no sabíamos que esta región era conservada en esta familia de genes).

En este PCR (ver condiciones en artículo 1) se amplificó una banda específica de 270 pb (ver figura 4 artículo 1), que es el tamaño que se obtiene al usar estos mismos oligos con un banco de ADNc, es decir, se obtiene un tamaño que correspondería al que se tuviera si en esta región no existieran intrones. Por lo tanto, estos experimentos sugieren que no existen intrones, en la parte estructural y el extremo 3', del gen o grupo de genes amplificados con estos oligos en *C. noxius*.

**4.- OBJETIVO**

**DETERMINAR LA ESTRUCTURA DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA TOXINAS BLOQUEADORAS DE CANALES DE SODIO DE ALACRANES AMERICANOS**

## 5.- MATERIALES Y METODOS

### 5.1.- EXTRACCION Y PURIFICACION DE ADN DE ALACRAN

El ADN genómico fue obtenido mediante la técnica de Blin and Stafford (1976), con las modificaciones que se describen en Corona M., (1992). Esta técnica consiste fundamentalmente en el congelamiento y trituración del cuerpo del alacrán, tratamiento con una solución que contiene proteínasa K y extracciones con fenol y fenol-cloroformo.

Puesto que este ADN aún contiene fuertemente unido, un pigmento de bajo peso molecular probablemente cargado positivamente, se necesita de un tratamiento adicional para purificarlo. Un método que implementamos para este objetivo consiste en pasar el ADN por una columna de agarosa A-50 de filtración molecular (el cual se describe en en el artículo 1, pág 26.)

Otro método que posteriormente implementamos debido a la limitante de trabajar con muy pocos o incluso, un sólo alacrán (ya que para usar la columna necesitamos una carga de ADN que sólo se obtiene con varios alacranes) consiste en el uso conjunto de una columna de Centricon 100 (Amicon) y una columna de GlassMax (Gibco BRL).

Después de la extracción del ADN, la solución que lo contiene se pasa a una columna de Centricon 100 y se centrifuga a 1000g (cada carga 2 ml, si se tiene más que este volumen, se debe de recargar la columna cuantas veces se necesite), el tiempo de la centrifugación depende de la concentración del soluto y puede ser de varias horas. Esta columna tiene una membrana hidrofílica de baja adsorción, con un tamaño de poro que permite filtrar a las moléculas de bajo peso y retiene a las de alto peso molecular. En el caso de Centricon 100, la membrana filtra a las moléculas con un peso molecular inferior a 100 kD. Por tanto, se pueden eliminar de la solución, sales, ácidos nucleicos degradados, proteínas pequeñas o las fracciones peptídicas que resultan de la degradación de proteínas de alto peso molecular. Una limitante lo constituye el hecho de que no es tan eficiente la filtración de moléculas cargadas que se adhieren electrostáticamente a un componente de alto peso molecular (como es el caso del pigmento que pretendemos eliminar).

Para eliminar por completo dicho pigmento y otros contaminantes, se utilizó una columna GlassMax. Es importante notar que si no se utiliza primero el Centricon y se pasa directamente la solución con el ADN por el GlassMax, se provoca la pérdida del ADN. Esta columna funciona en 3 pasos: en el primero, se agrega a la columna la solución de ADN en presencia de un agente caotrópico (NaI) provocando que el ADN se una a una membrana de sílica; en el segundo paso, se pasan sucesivamente 3 volúmenes (0.4 ml c/u) de una solución de lavado (50% etanol, 0.1 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA); finalmente se eluye el ADN con agua a 65°C.

Con una columna GlassMax es posible limpiar con eficiencia, desde nanogramos hasta más de 50 µg de ADN de un tamaño entre 0.2 a 50 kb. Si se intenta limpiar una molécula de mayor peso molecular esta es fragmentada. De lo anterior se concluye, que para la mayoría de las aplicaciones no es recomendado el uso de esta columna para limpiar ADN genómico (que después de la extracción de fenol tiene un tamaño de alrededor de 200 kb. Sambrook, *et al* 1989). Sin embargo, en el caso del PCR parece ser diferente. Numerosas observaciones indican que el fraccionamiento del ADN constituye una ventaja para la amplificación ya que reduce la T<sub>m</sub> del templado y además parece aumentar la especificidad del alineamiento (Corona M. 1992), por lo tanto, la ruptura del ADN genómico en fragmentos de alrededor de 50 Kb podría ser una ventaja en este caso.

Con el conjunto de procedimientos descritos, fue purificado ADN de los cuerpos de un alacrán entero y aproximadamente la mitad de otro (aprox. 2 gramos de tejido). Con este material se obtuvieron 60 µg de ADN genómico limpio (40 µg por alacrán). Puesto que hemos experimentado que desde 1 µg de ADN genómico como templado (aunque lo óptimo son 5 µg) se puede obtener una amplificación significativa en 30 ciclos (de alrededor de 0.5 µg de producto amplificado), con la cantidad de ADN purificado de un sólo alacrán podríamos realizar 40 ensayos de amplificación.

## 5.2.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

A continuación se describen las condiciones de los 2 tipos básicos de PCRs realizados con ADN de *Centruroides noxius* y el realizado con ADN de las especies del género *Tityus*. La T<sub>m</sub> de todos los oligos utilizados fue estimada según la ecuación de Bolton y McCarthy, 1962 (citado por Sambrook *et al*, 1989).

### 1) *C. noxius*

A) Con los oligos 5'*extBam*I (extremo 5' de la secuencia de la clona CngII con sitio de restricción) y CtoxEcoRI (región anterior a la que codificaría el C terminal de la clona CngII con sitio de restricción)

Los oligonucleótidos utilizados para este PCR fueron los siguientes:

Oligo 5*xtBam* (Directo). GGG'GATCCCT'ICGAAGATGAACTCGTTG. 28mero T<sub>m</sub> = 64°C. Oligo CtoxEcoRI(Inverso) GGG'AATTCAGGAAGGGGATAAGTCGGTGT 29mero T<sub>m</sub> = 64°C. Se muestran subrayados los sitios de restricción.

Las condiciones fueron: 200 µM de cada dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, oligos 5*xtBam* y CtoxEcoRI 1 µM c/u, ADN genómico 1.5 µg y Enzima Vent polimerasa 2 U. El programa se inició con 95°C 5 minutos, se agregó la enzima y se prosiguió con un programa inicial de 92°C 1 minuto, 50°C 1 minuto y 72°C 3 minutos durante 1 ciclo y se continuó con 92°C 1 minuto, 53°C 1.5 minutos y 72°C 3 minutos durante 35 ciclos y finalmente, un período de extensión de 15 minutos a 72°C. El experimento se realizó en una máquina Biosycler .

**B) Con los oligos Ntox 2 (región que codificaría para el N terminal de las toxinas bloqueadoras de canales de sodio contra mamíferos) y Extremo 3' (extremo 3' de la clona CngII).**

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligo Ntox 2 (Directo): AAAGAAGGTTATCTGGTGG. 19mero Tm = 51°C.

Oligo Extremo 3' (Inverso): AACTGCAATTAACAAGCGTTAC 22mero Tm = 52°C.

Se realizó un primer experimento de amplificación con las siguientes condiciones: 200 µM de cada dNTPs, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, oligos Ntox2 y Extremo 3' 1 µM c/u, ADN genómico 5 µg y 2 U de enzima Vent polimerasa. El programa que se utilizó fue 95°C 30 segundos, 50°C 20 segundos y 72°C durante 40 segundos, durante 33 ciclos. Se utilizó una máquina Perkin Elmer 9600.

El resultado de este PCR mostró un rendimiento muy pequeño (alrededor de 50 ng), el cual hasta cierto punto puede justificarse por tratarse de una amplificación específica en pocas copias de genoma eucariótico. Por tal motivo, se realizó una reamplificación tomando como templado 1/10 del volumen de la reacción de amplificación y las mismas condiciones utilizadas en la amplificación. Este nuevo PCR tuvo un rendimiento de alrededor de 3 µg del producto amplificado.

## 2) *Tityus* sp

A continuación se describen las condiciones utilizadas para la amplificación del gen que codifica para la toxina gama de *T. serrulatus*.

Los oligonucleótidos usados para la amplificación (TB1 y TB2) fueron diseñados en base a la secuencia del ADNc que codifica para la toxina gama de *T. serrulatus* (ver figura 1, pág. 20). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: Se utilizaron 10 µg (medido por D.O.) de ADN genómico como templado, 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, oligo TB1 4.4 µg (4.7 µM), TB2 5 µg (6.3 µM), enzima Vent polimerasa 2 U. El programa utilizado para la amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95°C 5 min, seguido por 92°C 1 min., 53°C 1 min. 72°C 3 min. durante 1 ciclo; se prosigue con 92°C 1 min., 55°C 1 min., 72°C 3 min., durante 30 ciclos y finalmente, un paso de extensión de 72°C 15 min. Se realizó una reamplificación tomando como templado 10 ng del fragmento de alrededor de 800 pb (purificado por elusión de banda), las condiciones de la reacción fueron similares a la amplificación, el programa usado también fue similar, excepto en la temperatura de alineamiento que en este caso fue de 56°C.



### 5.3.- CLONACION

Se utilizó el plásmido pBLUESCRIPT KS (Stratagene, La Jolla Cal. U.S.A.), purificado de una minipreparación de lisis alcalina (Sambrook *et al* 1989), seguida por GlassMax. Se probaron varias estrategias de clonación. En el caso del PCR 1 de *C. noxius* en que ambos oligos tienen sitios de restricción se digirieron el plásmido y el inserto con las enzimas que cortan en estos sitios. En el PCR 2 de *C. noxius*, en el que ningún oligo tiene sitios de restricción, el vector se digirió con *EcoRV* para generar extremos rasurados y el inserto no se trató (aprovechando la propiedad de la enzima *Vent* de generar extremos rasurados). En los PCR realizados con ADN de las especies del género *Tityus*, puesto que un oligo tiene un sitio de restricción (*Bam*III), se realizaron dos estrategias de clonación: en un caso se digirió el plásmido primero con *EcoRV* y después con *Bam*III y el inserto con *Bam*III; en el segundo caso, se digirió el plásmido con *EcoRV* y se clonó rasurado. Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen de 10  $\mu$ l con T4 ADN ligasa (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) de baja concentración. Se utilizaron dos tipos de relaciones molares plásmido:inserto, 1:1 y 1:5. (0.05 pM de plásmido e inserto para una relación 1:1).

En todas estas estrategias de clonación, incluyendo la de extremos rasurados, se obtuvieron suficientes recombinantes (ver adelante), por lo que no parece ser necesario añadir sitios de restricción a los oligos a menos que se quiera clonar direccionalmente.

Para la preparación de las células competentes (*E.coli* DH5 $\alpha$  F') y para su transformación, se utilizó el protocolo SEM (Inove *et al.*, 1990). Con este método obtuvimos una eficiencia de transformación de  $2 \times 10^7$  transformantes por  $\mu$ g de plásmido superenrollado. El número de recombinantes obtenidas en las dos concentraciones molares utilizadas fue la siguiente:

Recombinantes ( $\mu$ g): Rasurado	1:5	8,000.
	1:1	<1,000.
Cohesivo	1:5	8,000.
	1:1	40,000.

Como puede apreciarse, se obtuvo mayor número de recombinantes cuando se utilizó un extremo cohesivo, con respecto a cuando se utilizó extremos rasurados. Así mismo, cuando se clonó con extremos rasurados, la eficiencia fue mayor utilizando una relación molar de 1:5. Un dato más difícil de interpretar, es el hecho de que cuando se clonó con un extremo cohesivo se obtuvieron más recombinantes en la relación molar 1:1 en relación a 1:5. Una posible explicación la constituye la hipótesis de que a una mayor concentración de insertos con extremos cohesivos, se favorece más la unión de varios insertos en concatameros, que la unión de un inserto con el plásmido

### 5.5.- DETECCIÓN DE CLONAS POSITIVAS Y SECUENCIACION

Ver materiales y estrategia en los artículos 1 y 2. (pág. 22 y 29).

GENE 07136

## Cloning and characterization of cDNAs that code for Na<sup>+</sup>-channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann

(Recombinant DNA;  $\lambda$ gt11 cDNA library; Southern blot genomic analysis; nucleotide sequence; polymerase chain reaction; toxin gene evolution; introns)

Baltazar Becerril, Alejandra Vázquez, Consuelo García, Miguel Corona, Francisco Bolívar and Lourival D. Possani

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Received by L.K. Miller: 23 September 1992; Revised/ Accepted: 19 January/ 20 January 1993; Received at publishers: 1 March 1993

### SUMMARY

With the purpose of studying the organization and characteristics of the genes that code for toxins present in the venom of the Mexican scorpion, *Centruroides noxius* Hoffmann (CnH), we prepared a  $\lambda$ gt11 cDNA library from the venom glands. Using specific oligodeoxynucleotides (oligos) designed according to known amino acid (aa) sequences of CnH toxins (STox), we detected several positive clones, determined their nucleotide (nt) sequences and deduced their aa sequences. A comparative analysis of these sequences with previously reported STox revealed that CnH cDNAs code for a family of very similar STox. The cDNA coding for a known STox, II-10, was cloned. Additionally, three other complete (new) nt sequences were obtained for cDNAs encoding peptides similar to STox 1 from CnH or variants 2 and 3 from *Centruroides sculpturatus* Ewing. Southern blot genomic DNA analysis showed a minimum size of approximately 600 bp as EcoRI fragments for elements of this family. PCR amplifications of CnH genomic DNA and hybridization of PCR products with specific probes indicated that the genomic structural regions that code for these genes do not contain introns, or at least not large introns.

### INTRODUCTION

Of the 134 species and sub-species of Mexican scorpions, only eight are dangerous to man (Dehesa-Dávila, 1989). Species which cause the most frequent cases of scorpion poisoning in Mexico belong to the *Centruroides* genus. They represent a serious health problem with more than 200,000 people stung per year and a mortality rate

of 700-800 people per year (D. López-Acuña and A. Alagón, communicated during the technical session of the Sociedad Mexicana de Salud Pública, Mexico City, March 1979).

Scorpion venoms constitute a rich source of low-M<sub>r</sub> peptides toxic to a variety of organisms including man (Miranda et al., 1970; reviews by Zlotkin et al., 1978; Possani, 1984). The most dangerous scorpion venoms so

Correspondence to: Dr. L.D. Possani, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México. Tel. (52-73) 172799; Fax (52-73) 172388; e-mail: possani@phr322.ceingeb.unam.mx

Abbreviations: aa, amino acid(s); bp, base pair(s); cDNA, DNA complementary to RNA; Cl, *Centruroides limpidus tecomanus*; CnH, cDNA from CnH cloned into  $\lambda$ gt11; CnH, *Centruroides noxius* Hoffmann; ClE, *Centruroides sculpturatus* Ewing; Cs, *Centruroides suffusus suffusus*;

ctd DNA, calf thymus sonicated and denatured DNA; Denhardt's solution, 0.02% each of bovine serum albumin, ficol polyvinylpyrrolidone; EtDbr, ethidium bromide, kb, kilobases(s) or 1000 bp; N, any nucleotide; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxynucleotide; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, 0.15 M NaCl, 0.015 M Na<sub>2</sub> citrate pH 7.6; SP, signal peptide(s); STox, scorpion toxin(s); T<sub>m</sub>, melting temperature (temperature at which 50% of the hybrids formed between two nucleic acids are dissociated).





GENE 07136

## Cloning and characterization of cDNAs that code for Na<sup>+</sup>-channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann

(Recombinant DNA;  $\lambda$ gt11 cDNA library; Southern blot genomic analysis; nucleotide sequence; polymerase chain reaction; toxin gene evolution; introns)

Baltazar Becerril, Alejandra Vázquez, Consuelo García, Miguel Corona, Francisco Bolívar and Lourival D. Possani

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Received by L.K. Miller: 23 September 1992; Revised Accepted: 19 January 20 January 1993; Received at publishers: 1 March 1993

### SUMMARY

With the purpose of studying the organization and characteristics of the genes that code for toxins present in the venom of the Mexican scorpion, *Centruroides noxius* Hoffmann (CnH), we prepared a  $\lambda$ gt11 cDNA library from the venom glands. Using specific oligodeoxyribonucleotides (oligos) designed according to known amino acid (aa) sequences of CnH toxins (STox), we detected several positive clones, determined their nucleotide (nt) sequences and deduced their aa sequences. A comparative analysis of these sequences with previously reported STox revealed that CnH cDNAs code for a family of very similar STox. The cDNA coding for a known STox, II-10, was cloned. Additionally, three other complete (new) nt sequences were obtained for cDNAs encoding peptides similar to STox 1 from CnH or variants 2 and 3 from *Centruroides sculpturatus* Ewing. Southern blot genomic DNA analysis showed a minimum size of approximately 600 bp as EcoRI fragments for elements of this family. PCR amplifications of CnH genomic DNA and hybridization of PCR products with specific probes indicated that the genomic structural regions that code for these genes do not contain introns, or at least not large introns.

### INTRODUCTION

Of the 134 species and sub-species of Mexican scorpions, only eight are dangerous to man (Dehesa-Dávila, 1989). Species which cause the most frequent cases of scorpion poisoning in Mexico belong to the *Centruroides* genus. They represent a serious health problem with more than 200 000 people stung per year and a mortality rate

of 700-800 people per year (D. López-Acuña and A. Alagón, communicated during the technical session of the Sociedad Mexicana de Salud Pública, Mexico City, March 1979).

Scorpion venoms constitute a rich source of low-M<sub>r</sub> peptides toxic to a variety of organisms including man (Miranda et al., 1970; reviews by Zlotkin et al., 1978; Possani, 1984). The most dangerous scorpion venoms so

Correspondence to: Dr. L.D. Possani, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México. Tel. (52-73) 172799; Fax (52-73) 172388; e-mail: possani@pbr322.ceinghi.unam.mx

Abbreviations: aa, amino acids; bp, base pairs; cDNA, DNA complementary to RNA; Cn, *Centruroides limpidus tecomanus*; Cng, cDNA from CnH cloned into  $\lambda$ gt11; CnH, *Centruroides noxius* Hoffmann; CnE, *Centruroides sculpturatus* Ewing; CnS, *Centruroides suffusus suffusus*;

ctd DNA, calf thymus sonicated and denatured DNA; Denhardt's solution, 0.02% each of bovine serum albumin, ficoll, polyvinylpyrrolidone; EtBr, ethidium bromide; kb, kilobases; or 1000 bp; N, any nucleoside; nt, nucleotides; oligo, oligodeoxyribonucleotide; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, 0.15 M NaCl, 0.015 M Na<sub>2</sub> citrate pH 7.6; SP, signal peptide; STox, scorpion toxin; T<sub>m</sub>, melting temperature (temperature at which 50% of the hybrids formed between two nucleic acids are dissociated).

far studied have been shown to contain two kinds of STox: long-chain polypeptides of 60–70 aa which block Na<sup>+</sup>-channels of excitable cells [Catterall, 1977; Couraud et al., 1982] and short-chain peptides of 37–39 aa affecting K<sup>+</sup>-channels [Carbone et al., 1982; Possani et al., 1982; Miller et al., 1985; Gimenez-Gallego et al., 1988; Strong et al., 1989]. Recently, Valdivia et al. (1991) demonstrated the existence of another class of polypeptides in the scorpion venom that activates the Ca<sup>2+</sup>-release channel of the sarcoplasmic reticulum.

Nevertheless, the most thoroughly studied STox are those that modify Na<sup>+</sup>-channels and were classified as  $\alpha$ - and  $\beta$ -STox [Couraud et al., 1982; Wheeler et al., 1983]. This classification was proposed based on the existence of two different binding sites on the Na<sup>+</sup>-channels for the  $\alpha$ - and  $\beta$ -toxins [Jover et al., 1980; Couraud et al., 1982].  $\alpha$ -STox modify mainly the inactivation mechanism of the Na<sup>+</sup>-channels [Nonner, 1979], while  $\beta$ -STox preferentially alter the activation mechanism [reviewed by Meves et al., 1986; Sirichartz et al., 1987; Thomsen and Catterall, 1989].

Our group has contributed during the last decade to the knowledge of the structure-function relationship of the toxins from the venom of Mexican scorpions [Possani, 1984; Zamudio et al., 1992]. A few regions involved in toxicity or antigenicity have been mapped in these STox using synthetic peptide and monoclonal antibody approaches [Gurrola et al., 1989; Possani et al., 1991]. The possibility of using modern molecular biology strategies for cloning, directed mutagenesis and expression of specific STox-encoding genes or gene fragments in order to use the purified products to verify their interactions with ion channels has greatly motivated our work.

The aim of the present study was the isolation and characterization of several cDNAs from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann (CnII) and an initial characterization of the genomic region encoding these cDNAs.

## RESULTS AND DISCUSSION

### (a) Isolation of cDNA clones encoding STox peptides

A degenerate oligo probe coding for aa 42–48 of STox Cn2, which are well-conserved among *Centruroides* toxins, was used to screen a  $\lambda$ gt11 cDNA library prepared from CnII venom glands (legend to Fig. 1 and Fig. 2). From this screening we detected several positive signals with different intensities; we decided to characterize first the clone that gave the strongest signal. This clone was named CngI and had an insert of approximately 230 bp. This insert was subcloned into the *EcoRI* sites of M13mp18 and M13mp19, and its nt sequence was deter-

mined. When the aa sequence from this cDNA was deduced, we found the target sequence (aa 42–48 of Cn2); however, the entire sequence did not correspond to Cn2. CngI was a truncated clone that contained the sequence for a (new) Na<sup>+</sup>-channel-blocking STox cDNA coding from aa 25 through the polyadenylation site. A comparative analysis of the deduced aa sequence of clone CngI with reported STox aa primary sequences revealed that from 41 aa encoded by this clone, 40 aa were identical with the STox variant 3 of *C. sculpturatus* (see Fig. 2), whose three-dimensional structure is known [Fontecilla-Camps et al., 1980]. To explore the possibility of isolating a complete cDNA that encoded a STox closely related to CnE variant 3, we decided to use the CngI insert as a probe to screen the cDNA library under conditions of high stringency in order to isolate clones highly homologous to the CngI insert. From this second screening, we isolated several positive clones.

The next step consisted of probing Southern blots of digested DNA of the isolated positive clones with a variant 3-specific oligo (designed from aa 10–16; see Figs. 1 and 2). Two positive inserts with a size adequate to encode a complete STox sequence were subcloned into the *EcoRV* site of pBluescript (pKS, Stratagene, La Jolla, CA). They were called CngII and CngIII.

From this second screening, two less strongly positive clones were isolated, subcloned and sequenced. They were called CngIV and CngV. The nt sequences of clones CngII through CngV are shown in Fig. 1. These cDNAs are about 350 bp in length and encode STox precursors of 86–87 aa.

It has been proposed, based on the analysis of their cDNA sequences, that STox might be synthesized as precursors with a signal peptide (SP) of 18–19 aa [Bougis et al., 1989; Gurevitz et al., 1991]. CnII SP sequences met all the requirements for eukaryotes as proposed by von Heijne (1986).

In the case of STox that affect mammalian Na<sup>+</sup>-channels [Bougis et al., 1989] and in the case of a STox that affects insect Na<sup>+</sup>-channels [Gurevitz et al., 1991], it has also been observed that they have extensions at their C-terminal ends: Arg, Gly-Arg or Arg-Lys. These basic residues are not present in the mature peptides and when Gly precedes a basic residue, the residue becomes amidated at the C terminus [Bougis et al., 1989].

Of the STox coded by the cDNAs shown in Fig. 1, only CngV was thoroughly studied. It corresponded to STox II-10 [Possani et al., 1981], a Na<sup>+</sup>-channel effector [Carbone et al., 1982; 1984], whose complete primary aa sequence has been determined (A.V., B.B., B. Martin, F. Zamudio, F.B. and L.D.P., manuscript in preparation). As shown in Fig. 2, the deduced aa sequences of these cDNAs are closely related to *Centruroides* STox that have



Group	10	20	30	40	50	60
CnI	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnII	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnII1	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnII2	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnII3	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnI	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnIV	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.1	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.2	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.3	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.4	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.5	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.6	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.7	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.8	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.9	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.10	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.11	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.12	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.13	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.14	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.15	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.16	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.17	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.18	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.19	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.20	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.21	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.22	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.23	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.24	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.25	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.26	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.27	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.28	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.29	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.30	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.31	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.32	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.33	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.34	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.35	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.36	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.37	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.38	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.39	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.40	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.41	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.42	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.43	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.44	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.45	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.46	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.47	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.48	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.49	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.50	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.51	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.52	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.53	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.54	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.55	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.56	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.57	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.58	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.59	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					
CnV.60	REGILVDFDQCTECLKLELGHNDICLAECKFOOYFGAGGTCYAFACNCTHLTEGALVWPLFPHKCS					

Fig. 2. The aa sequence comparison of principal representatives of *Centruroides* STox. Toxin sequences were grouped according to their similarities. Gaps (-) were introduced to maximize similarities. Below each similarity group, the consensus sequence is shown in bold. The aa sequences deduced from cDNAs are included. The CnIV deduced primary sequence has been corroborated by direct aa sequence of the mature STox (A.V., B.H., B. Martin, F. Zamudio, F.B. and L.D.P., manuscript in preparation). Data are from this study, Meves et al. (1984) and Zamudio et al. (1992). In consensus sequences, X represents a variable residue. The aa are aligned with the last digits of the numerals.

cDNAs originate from mRNAs transcribed from closely related genes. Comparative studies with the North African *Androctonus australis* Hecator STox cDNAs show that although the regions encoding mature peptides are more variable, the nucleotide sequences encoding SP and the 3' non-coding regions are relatively well-conserved (data not shown). The cDNAs encoding STox I, I', II and III of *A. australis* Hecator (see Bougès et al., 1989) have a similar variation in the regions that code for the mature peptides, but those encoding the SP and the 3' non-coding regions are also well-conserved. These results indicate that both scorpion species (*A. australis* Hecator and CnI) have followed a similar strategy to generate variation in their STox: gene duplications and independent evolution of the duplicated genes.

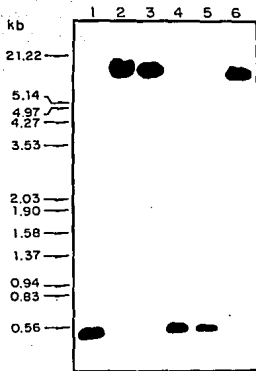
#### (b) Deduced aa sequences derived from cDNAs. Analysis and comparison with different *Centruroides* primary STox sequences

In order to compare the aa sequences derived from the cloned CnI cDNAs, different *Centruroides* STox were grouped according to their similarities. Gaps were introduced where necessary to maximize similarities. The STox can be clustered into three groups as shown in Fig. 2. The sequences were aligned with respect to Cys residues. Each main group was aligned, and a consensus sequence was proposed for each one of them. CnIV (II-10) is included in the first group, where Cn2 can be considered representative. CnIII and CnIII1 are included in the second group, where CnE variants 2 and 3 are also present. CnIV is included in the third group, where Cn1 can be considered representative. Some specific differ-

ences among the three groups can be observed, especially several deletions of 1 aa residue in different positions. Examples of such deletions or insertions can be deduced from cDNA sequences. The aa residue number 9 that is a Ser in CnIII and CnIII1 is missing in CnIV (Figs. 1 and 2). It is interesting to note, however, that this region in *Centruroides* toxins is very variable (Zamudio et al., 1992), indicating that its encoding DNA could be a hot spot for mutation.

#### (c) Southern blot genomic analysis

To determine the size of the genomic DNA region containing the genes encoding the peptides shown in Fig. 1, Southern blot hybridization analysis was carried out. When using CnIII or CnIII1 inserts as probes (Fig. 3), only two DNA fragments are clearly observed: one of approximately 18 kb when the genomic DNA was digested with *Bam*III, *Hind*III or *Bam*III + *Hind*III and a second segment of approximately 0.6 kb when the digestions were performed with *Eco*RI, *Eco*RI + *Bam*III or *Eco*RI + *Hind*III. These results and the fact that CnIII and CnIII1 share 92% similarity at the nt level suggest that at least two different 0.6-kb *Eco*RI DNA segments should contain the genomic DNA regions encoding these two cDNAs (mRNAs). Since CnIV (or CnV) is 80% similar at the nt level to CnIII (or CnIII1), and since the bands mentioned above are the only two bands present in the Southern blot experiment (18 kb and 0.6 kb), we propose that the genomic regions that specify these four cDNAs (mRNAs) are contained within these 0.6-kb *Eco*RI DNA fragments. The double digestions with *Eco*RI + *Bam*III or *Eco*RI + *Hind*III suggest that the 18-

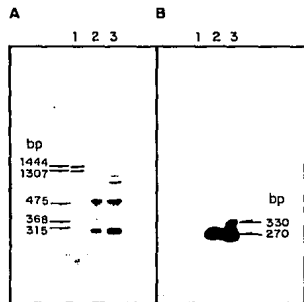


**Fig. 3.** Southern blot genomic analysis. *CnH* DNA digested with restriction endonucleases was blotted in lanes: 1, *EcoRI*; 2, *BamHI*; 3, *HindIII*; 4, *EcoRI* + *BamHI*; 5, *EcoRI* + *HindIII*; 6, *BamHI* + *HindIII*. **Methods:** High  $M_r$  genomic DNA was prepared from the whole body of *CnH*. After ethanol precipitation the DNA was resuspended in water and subjected to molecular filtration chromatography on an agarose A-50 (Bio-Rad, 0.7 × 28 cm column) equilibrated and then eluted with 10 mM Tris pH 7.6 1 mM EDTA 0.75 M NaCl. Twenty fractions of 0.5 ml were collected, and the DNA profile was determined by absorbance at 260 nm. Fractions corresponding to the maximum of absorbance were pooled and ethanol-precipitated. This step was necessary in order to eliminate a pigment that coprecipitates with scorpion DNA. The colored material was shown to inhibit the enzymatic digestion of DNA. After digestion with the indicated endonucleases, 10- $\mu$ g samples of DNA were electrophoresed in a 0.7% agarose gel, blotted onto a nitrocellulose membrane and probed independently with the inserts derived from clones *Cngt1* or *CngtII*. The probes were  $^{32}$ P-labeled using the random primer labeling kit from Dupont. The filters were prehybridized, hybridized and washed as described in the legend to Fig. 1 for double-stranded probes (second step screening), except that an additional wash at 65°C for 10 min was performed.

kb band might contain at least these four 0.6-kb *EcoRI* segments. An alternative explanation is that each cDNA (mRNA) could be encoded by a different 18-kb band. Thus, their corresponding genes may also be encoded in the same or different 18-kb DNA bands, and consequently, they might have the same organization as the 0.6-kb *EcoRI* fragments in which a substantial part of the region transcribed into their respective mRNAs might be present. Furthermore, these results also suggest that the genes encoding these STox lack large introns.

#### (d) PCR genomic analysis

In order to understand the genomic organization of the structural DNA regions encoding *CnH* STox, a PCR amplification experiment using genomic DNA and specific primers was performed. The DNA sequences that were used for the synthesis of the PCR primers correspond to well-conserved sequences of *CnH* cDNA. They are shown overlined in Fig. 1 and flank a stretch of 263–266 bp of DNA that includes the mature part of the STox encoded by these cDNA. As can be seen in Fig. 4, while several DNA bands were visualized after staining with EtDbr, when using 0.5  $\mu$ g of genomic DNA as the PCR substrate (Fig. 4A, lane 2), only one specific DNA band, of about 270 bp, was observed after hybridization (Fig. 4B, lane 2). This band corresponds to the smallest band stained with EtDbr. When ten times more genomic DNA (5  $\mu$ g) was used as the substrate for PCR amplification, a second specific band of about 330 bp was detected.



**Fig. 4.** PCR genomic analysis. Primers for genomic PCR amplifications were synthesized as described in the legend to Fig. 1. The forward primer (5'-AAAGAAGGTTATCTGGTAAAC), corresponds to a well-conserved DNA sequence that codes for the first 7 aa of mature *C. naxius* toxin (see Figs. 1 and 2). The reverse primer (5'-AAGTGAATTAAGAAGCGTTA) is complementary to a well-conserved nt 246–266 sequence of cDNA (see Fig. 1). The source of the DNA was the same as for the Southern blot genomic analysis. PCR conditions were the same as described in the legend to Fig. 1, except that 0.5  $\mu$ g or 5  $\mu$ g of template DNA were used. (Panel A) Products of PCR amplification: lanes: 1, pBR322 (Bolívar et al., 1977) digested with *TaqI* as size marker; 2, PCR sample (1:20 of total reaction) using 0.5  $\mu$ g of genomic DNA as template; 3, same as lane 2 but using 5  $\mu$ g of template DNA. The gel was stained with EtDbr and photographed under ultraviolet light. (Panel B) Autoradiography of PCR products shown in panel A hybridized with *CngtI* insert. The pBR322 DNA was also transferred and hybridized as a negative control.

(Fig. 4B, lane 3). It is important to observe that the 330-bp band was detected only when high concentrations of genomic DNA were used as a substrate for PCR, suggesting that this band might correspond to a region that might have an at least tenfold lower copy number than the 270-bp band versions. Taking the cDNA sequences shown in Fig. 1 as prototypes of DNA sequences that encode *CnII* STox, these PCR results indicate that the 270-bp product should code for the mature part of *CnII* STox closely related to the ones encoded by the *CngrII-CngrV* cDNAs. These results also indicate that those genomic regions do not contain introns. However, the results in Fig. 4B (lane 3) clearly show the presence of a 330-bp fragment which could accommodate an intron of about 60 bp in its genomic region. Another possibility is that the 330-bp band corresponds to a rare version of a closely related gene. Preliminary results aimed at verifying the existence of introns in the genomic regions encoding the 5' end of *CnII* STox cDNAs (including the SP) did not detect introns. We have sequenced some of the cloned PCR products, and we did not find introns at least between the regions coding for the SP and the C terminus (data not shown). An interpretive review of the results presented in this work, including detailed comparative analyses and recent data on the STox structure-function relationship, is now in preparation for publication (B.B., A.V., C.G., M.C., L.D.P. and F.B.).

#### (e) Conclusions

(1) We have prepared and probed a  $\lambda$ gt11 cDNA library from the venom glands of the Mexican *CnII* scorpion. From this cDNA library we have isolated four cDNAs that code for different STox.

(2) We have determined the nt sequence of these cDNAs and deduced their aa sequences. From these sequences we have shown that they are closely related to the STox *CnI* of *CnII* and to variants 2 and 3 of *CsE*. *CngrV* corresponded to STox II-10 of *CnII*, which has been purified and sequenced in our group.

(3) From the nt sequence data, it seems that these *CnII* cDNAs derived from a common gene ancestor. We propose that this gene might have duplicated, and each duplication then evolved independently.

(4) From Southern blot genomic analysis, it can be proposed that this family of closely related genes, including at least the genes coding for the four cDNAs reported here, shows a minimal size of about 600 bp when the genomic DNA is digested with *EcoRI*.

(5) PCR genomic amplifications of *CnII* DNA with specific primers and hybridization with specific probes suggest that the region(s) encoding the mature part of

STox closely related to the ones reported here do not seem to contain large introns.

(6) Comparison of STox sequences deduced from *CnII* cDNAs provided background for their classification, in terms of their similarity, in three different groups.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants of the Universidad Nacional Autónoma de México project DGAPA No. IN202689 to L.D.P., CONACYT (México) project 0018-N9105 to L.D.P. and F.B. and Howard Hughes Medical Institute No. 75191-527104 to L.D.P. Training received by B.B. in the laboratories of Dr. Ki-Han Kim (Department of Biochemistry, Purdue University) and Dr. Edward Gimms (National Institute for Mental Health, Bethesda) is greatly appreciated. Dr. Fernando López Casillas and Dr. Brian Martin are acknowledged for helpful discussions. Oligos were synthesized at the 'Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos' of the Instituto de Biotecnología, with the assistance of Paul Gaytán. The technical assistance of Fernando Zamudio is also recognized.

#### REFERENCES

- Holvar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Bellach, M.C., Heyneger, H.L., Boyer, H.W., Cross, J.H. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vectors. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977) 95-113.
- Bougin, P.E., Rochat, H. and Smith, L.A.: Precursors of *Androctonus australis* neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 19259-19265.
- Carbone, E., Wank, E., Prestipino, G., Possani, L.D. and Matzke, A.: Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296 (1982) 90-91.
- Carbone, E., Prestipino, G., Francolini, F., Dent, M.A.R. and Possani, L.D.: Selective modification of the squid axon Na<sup>+</sup> currents by *Centruroides noxius* toxin II-10. *J. Physiol. Paris* 79 (1984) 179-184.
- Catterall, W.A.: Activation of the action potential Na<sup>+</sup> ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 8669-8676.
- Couraud, F., Jover, E., Dubois, J.M. and Rochat, H.: Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicol.* 20 (1982) 9-16.
- Dehesa-Dávila, M.: Epidemiological characteristics of scorpion sting in León, Guanajuato, México. *Toxicol.* 27 (1989) 281-286.
- Fonoteca-Camps, J.C., Almásy, R.J., Suddath, F.L., Witt, D.D. and Bugg, C.E.: Three dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 6496-6500.
- Giménez-Gallego, G., Navia, M.A., Reuben, J.P., Katz, G.M., Kuczarowski, G.J. and Garcia, M.L.: Purification sequence, and model structure of charybotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 3329-3333.

- Gurevitz, M., Urbach, D., Zlotkin, E. and Zilberberg, N.: Nucleotide sequence and structure analysis of a cDNA encoding an alpha insect toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *Toxicol* 29 (1991) 1270-1272.
- Gurrillo, G.B., Molinar-Rode, R., Silges, M., Bajon, A. and Possani, L.D.: Synthetic peptide corresponding to the sequence of Nosiustoxin indicate that the active site of this K<sup>+</sup> channel blocker is located on its N-terminal portion. *J. Neural Transm.* 77 (1989) 11-20.
- Jøyer, E., Couraud, F. and Rochat, H.: Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980) 1607-1614.
- Méves, H., Simard, M.J. and Watt, D.D.: Biochemical and electrophysiological characteristics of toxin isolated from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus*. *J. Physiol. Paris* 79 (1984) 185-191.
- Méves, H., Simard, M.J. and Watt, D.D.: Interactions of scorpion toxins with the sodium channel. In: Kan, C.Y. and Levinson, S.R. (Eds.), *Tetrodotoxin, Saxitoxin and the Molecular Biology of the Sodium Channel*. Ann. NY Acad. Sci. 479 (1986) 113-132.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. and Phillips, M.: Charybdomulin, a protein inhibitor of single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313 (1985) 316-318.
- Miranda, F., Kopejan, C., Rochat, H., Rochat, C. and Lissitzky, S.: Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpions *Androctonus australis* Hector, *Buthus scaber* tunetanus and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur. J. Biochem.* 16 (1970) 514-523.
- Nonner, W.: Effects of *Leiurus scorpion* venom on the 'gating' current in myelinated nerve. In: Ceccarelli, B. and Clementi, F. (Eds.), *Advances in Cytopharmacology*, Vol. 3. Raven Press, New York, 1979, pp. 345-351.
- Possani, L.D.: Structure of scorpion toxins. In: Tu, A.T. (Ed.), *Handbook of Natural Toxins*, Vol. 2. Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 513-550.
- Possani, L.D., Dent, M.A.R., Maria, B.M., Maelicke, A. and Svendsen, I.: The N-terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 46 (1981) 207-214.
- Possani, L.D., Maria, B.M. and Svendsen, I.: The primary structure of Nosiustoxin: a K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 47 (1982) 285-289.
- Possani, L.D., Gurrillo, G.B., Portugal, T.O., Zamudio, E.Z., Vaca, L.D., Calderon, E.S.A. and Kirsch, G.E.: Scorpion toxins: a model for peptide synthesis of new drugs. In: Oliveira, B. and Spatieri, V. (Eds.) *Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins*. Editora da UNICAMP, Campinas, Brazil, 1991, pp. 352-367.
- Sirichartz, G., Raible, T. and Wang, G.K.: An integrated view of the molecular toxicology of sodium channel gating in excitable cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 10 (1987) 237-267.
- Strong, P.N., Weir, S.W., Beech, D.J., Hirstand, P. and Köcher, H.P.: Effects of potassium channel toxins from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom on responses to cromakalim in rabbit blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 98 (1989) 817-826.
- Thomsen, W.J. and Catterall, W.A.: Localization of the receptor site for  $\alpha$ -scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10161-10165.
- Valdivia, H.H., Fuentes, O., U-Hayek, M., Morrisvette, J. and Coronado, R.: Activation of the ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19135-19138.
- von Heijne, G.: A new method for predicting sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 4683-4690.
- Wheeler, P.K., Watt, D.D. and Lazdunski, M.: Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflügers Arch.* 397 (1983) 164-165.
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B.M., Gurrillo-Bitones, G., Herion, P. and Possani, L.D.: Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* 204 (1992) 281-292.
- Zlotkin, E., Miranda, I. and Rochat, C.: Chemistry and pharmacology of Bathine scorpion venoms. In: Bettini, S. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 48. Springer-Verlag, Berlin, 1978, pp. 317-369.

## The genomic region encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron

B. Becerril<sup>a</sup>, M. Corona<sup>a</sup>, M.C. Mejia<sup>a</sup>, B.M. Martin<sup>b</sup>, S. Lucas<sup>c</sup>, F. Bolivar<sup>a</sup>, L.D. Possani<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, 62271 México

<sup>b</sup>National Institute of Mental Health, Molecular Neurogenetics Unit, Clinical Neuroscience Branch, Building 49, B1EE16, Bethesda, MD 20892, USA

<sup>c</sup>Instituto Butantan, Av. Vital Brazil 1500, São Paulo, Brazil

Received 30 September 1993

The gene encoding toxin gamma from the scorpion, *Tityus serrulatus*, was amplified by PCR from genomic DNA employing synthetic oligonucleotides designed from the reported cDNA sequence. The nucleotide sequence of this gene reveals the presence of an intron of 475 base pairs (bp) which interrupts the region that encodes the signal peptide of the precursor toxin. A comparison of the intron boundary sequences of the gamma toxin gene with ones from other arachnid genes is also presented.

Scorpion toxin; Na<sup>+</sup> channel; Genomic DNA clone; Nucleotide sequence; Arachnid intron; *Tityus serrulatus*

### 1. INTRODUCTION

Scorpion toxins are extremely useful tools for the study of ion channels [1]. Toxin gamma, the first chemically characterized toxin from *Tityus serrulatus* venom [2], has played an important role in the characterization of voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channels (see review in [3]). The complete amino acid sequence of this peptide was obtained by two independent groups [4,5]. An extended report on the modification of the Na<sup>+</sup> channel gating mechanism by this peptide has previously been reported [6]. Toxin gamma [2], also called toxin VII [5], belongs to the class of  $\beta$ -scorpion toxins, binds to the 4th site of the Na<sup>+</sup> channel and has been the subject of intense research because it is toxic to both mammals and insects [7]. Recently, emphasis has been placed on cloning the gene that encodes this peptide, with the aim of expressing recombinant variants for the study of the structure-function relationship of the toxin-channel interactions [8]. A complementary DNA sequence encoding toxin VII was reported [9], however, no information on the nucleotide sequence at the genomic DNA level is known. In this communication, we report the complete nucleotide sequence of the gene that encodes gamma toxin of *T. serrulatus*. Thus, this toxin is the first for which the complete peptide sequence, nucleotide messenger RNA (cDNA) sequence and genomic DNA sequence have been determined.

### 2. MATERIALS AND METHODS

- 2.1. Purification of DNA from *T. serrulatus***  
Genomic DNA was purified from whole body as described [10].
- 2.2. Synthesis of oligonucleotides**  
The oligonucleotides used for PCR (oligo 1) at 1-20; oligo 2, at 766-790 (complementary, Fig. 1) and the one used to screen for the gamma toxin gene (oligo 3, corresponding to amino acid residues 24-30, Fig. 1), were synthesized as described [10].
- 2.3. Polymerase chain reaction (PCR) and detection of gamma toxin-related nucleotide sequences**  
The PCR was performed in a programmable heating chamber (Hybaid) using 30 rounds of temperature cycling (92°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min) followed by a 10-min step at 72°C. A sample of the PCR reaction was electrophoresed in a 1% agarose gel, blotted onto a nitrocellulose membrane and probed with a specific <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide (oligo 3, Fig. 1).
- 2.4. Cloning and characterization of PCR products**  
PCR products were purified from gel, blunt-ended with T4 DNA polymerase and ligated into the EcoRV site of pBluescript phagemid (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The ligation reaction was used to transform competent *E. coli* DH5- $\alpha$  cells. Plasmid DNA from white colonies was purified and digested with BamHI and HindIII. Digestions were electrophoresed in an agarose gel, blotted onto nitrocellulose and probed with radioactive oligo 3 (see section 2.2, above). Positive clones were sequenced using the Sequenase kit, version 2 (US Biochemical, Cleveland, OH, USA) on both strands. Oligo 1, 2 (see section 2.2, above), M13-20, M13 reverse and 4 (complementary to nt 531-550, Fig. 1), were used for sequencing.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Southern blot of PCR products

Electrophoresis and staining with ethidium bromide of PCR products revealed the presence of several faint

\*Corresponding author. Fax: (52) (73) 172 388.



```

TCGATCTGACCG ATG AAA GGA ATG ATC TTT ATT AGC TGC TTA TTG CTG ATC G   55
      K   P   D   H   L   L   F   I   H   C   L   L   L   I
-----
GTAAGCTGAATCTCAAGTCTCAAGTATCTTATATCAATATATATGTTATCTCGCTTAAACAACT   123
AAACCCATCAATAAGTGGTGTGTATCAATCTCATCATGCTATCGTACACAACTCATGACGAA    191
CGTAGTCTCAAGTGTATCTCAAGTCTTATCAAGTATCTGAGTGTGAAAAGTCAAGTACTCTTT   259
CATGCTTCACTCAAGGAGCGATCTTCCCTCTGTTTGCCTACTAAATGTGTAAGAAGTCTCTTA   327
GTGTGTGTATCAAGTGTATGCAATCAAGGATATCAAGTATCTGAGTGTGAAATATAGAAGAAC   395
GTTGACCCAACTTCAAGTGTATGCTGTCTCAAGTCTGCTGAGTCCAACTGTGACGTGCGTC    463
TATAGATTTCTCATCTTATAGATCTCAAGTATCTGAGTGTGAAATCTTCTTCTTCTTCAACTG   530
-----
GC ATT GTC GTA GAA TGT AAA GAA GGT TAT CTC ATG GAT CAC GAA GGT TGC AAA   583
      Q   T   D   G   A   T   T   A   G   A   D   T   T   A   T   C   T   C   A   T   G   D   A   T   C   A   C   G   A   A   G   G   T   T   G   C   A   A
      K   P   D   H   L   L   F   I   H   C   L   L   L   I
-----
CIT AGT TGC TTT ATC AGA CCA TCG GGA TAC TCC GGC AGA GAA TGC GGA ATT AAA   637
      L   S   C   F   I   R   P   S   C   T   G   Y   T   C   G   G   R   E   C   G   I   K
-----
AAG GGC TCA TCG GCC TAT TCC GCG TGG CCC GCG TGY TAC TGC TAC GGG GTT CCA   691
      K   G   S   S   G   Y   C   A   M   P   A   C   G   Y   C   G   L   G   L   P   A   R
-----
AAT TCG GTG AAA GTT TGG GAT AGA CCG ACC AAC AAA TGT GGC AAA AAA TAA ATC   745
      N   W   V   K   V   M   D   R   A   T   N   K   C   G   K   K   K   end
-----
TCTTTCGCTGAAAACCCCTTCAAAATGAACTGTAATAGTTTGGC   790

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the genomic DNA encoding the gamma toxin precursor from *Tyros serrulatus*. The deduced amino acid sequence is given below the nucleotide sequence. Nucleotides and amino acids (taking the first residue of the mature toxin as +1) are numbered at the right side of corresponding sequences. The signal peptide is underlined. Oligonucleotides 1 and 2 used for PCR (nt 1-20 and 746-780) (complementarity) are double underlined. The broken line above nt 617-637 and dotted line above nt 531-540 represent oligos 3 and 4, respectively (see section 2.4). Exons 1 (nt 1-55) and 2 (nt 531-790) are written in capital letters. The intron (nt 56-530) is written in lower case letters.

bands of diverse size and a stronger one of approximately 800 bp. Southern blot of these bands, using radioactive oligo 3 (see section 2.2) as a probe, showed that only the 800 bp band was specific (data not shown). According to the stretch flanked by oligos 1 and 2 (315 bp) on the cDNA [9], these results suggested the presence of an intron of approximately 485 bp. As shown in Fig. 1, it is actually 475 bp.

### 3.2. Nucleotide sequencing determination

From the final screening (see section 2.4), 3 clones were selected on the basis of the expected size and the strength of the autoradiographic signal. They were partially sequenced and finally, one of them which encoded gamma toxin, was completely sequenced on both strands using the oligonucleotides described in section 2.4, as sequencing primers. This nucleotide sequence is shown in Fig. 1. Analysis of this sequence identifies two exons (nt 1-55 and nt 531-790) and an intron (nt 56-530) with a size of 475 bp. To our knowledge, this is the first formal report of a scorpion gene in which the complete genomic nucleotide sequence is presented. Preliminary results obtained with a gene from *Androctonus australis* Hestor [8], suggested the presence of an intron of similar size and position, but provided no nucleotide sequence [8]. The nucleotide sequence of the two exons from the gene encoding gamma toxin of *T. serrulatus* presented here, coincides exactly with the reported cDNA sequence for toxin VII [9], except for positions 745 and 760 in which a thymine (cDNA) is replaced by a cytosine (genomic DNA). These results are consistent

Table 1

Comparison of intron boundaries from different genes of arachnids\*

Intron	Sequence of intron boundaries			Ref.
	5' Splice donor	Intron size	3' Splice acceptor	
1	GTAGTGTGAT	61 kbp	TTCTTTCTAG	[12]
2	GTAGTGTGAT	8.6 kbp	TTCTTTCTAG	[12]
3	GTAGTGTGAT	6.3 kbp	GTAACTCTAG	[12]
4	GTAGTGTGAT	2.1 kbp	TTCTTTCTAG	[12]
5	GTAGTGTGAT	5.0 kbp	TTCTTTCTAG	[12]
6	GTAGTGTGAT	6.9 kbp	TTCTTTCTAG	[12]
7	GTAGTGTGAT	14.3 kbp	TTCTTTCTAG	[12]
8	GTAGTGTGAT	2.7 kbp	GTAACTCTAG	[12]
9	GTAGTGTGAT	475 bp	GTAACTCTAG	**
10	GTAGTGTGAT	58 bp	TAAGTGTGAT	[13]
11	GTAGTGTGAT	60 bp	TAAGTGTGAT	[13]
12	GTAGTGTGAT	60 bp	TAAGTGTGAT	[13]
13	GTAGTGTGAT	65 bp	TAAGTGTGAT	[13]
14	GTAGTGTGAT	60 bp	TAAGTGTGAT	[13]
15	GTAGTGTGAT	65 bp	TAAGTGTGAT	[13]
16	GTAGTGTGAT	61 bp	TAAGTGTGAT	[13]
Consensus	GTAGTGTGAT		TTCTTTCTAG	

\*Comparison of 5' and 3' intron boundaries from different genes of arachnids. Only the first 10 and last 10 nucleotides of the introns are shown. The proposed consensus for 5' and 3' intron boundaries are shown at the bottom of this table (in means any nucleotide). Introns 1-8 correspond to the gene encoding subunit I of hemocyanin from the tarantula *Baryscyllus californicus*. Intron 9 corresponds to the gamma toxin encoding gene from the South American scorpion, *Tyros serrulatus*. Introns 10-16 correspond to the genes encoding cysteine proteases from the mites, *Dermatophagoides farinose* (introns 10-12), *Euroglyphus maynei* (introns 13-14) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (introns 15-16).

\*\*This work.

with the conclusion that the gene encoding toxin gamma [2], also called toxin VII [5], from *Tityus serrulatus*, has been cloned and sequenced. Also, it appears that native toxin gamma is in fact processed at the C-terminal region, after synthesis, by a similar mechanism to that described for toxin Cn4 of the scorpion, *Centruroides noxius* [11]. As shown in Fig. 1, prior to the termination codon, in the translated peptide there is a glycine followed by two basic residues (lysines). Thus, the cysteine at the end of the mature peptide may be amidated, after C-terminal processing as described [5] and suggested by Martin-Eauclaire et al. [9].

### 3.3. Intron sequence analysis

A search of the GenBank (release August, 1993) using the program Gene-Works, revealed the existence of four genes containing introns from other members of the group of arachnids. One from the tarantula (*Euryphma californica*) encoding subunit e of hemocyanin [12] which contains eight introns and other three encoding cysteine proteases from the mites, *Euroglyphus maynei*, with two introns, *Dermatophagoides fariniae* with three introns, and *Dermatophagoides pteronyssinus* with two introns (unpublished results of Kent et al. [13]). Comparison of the sequences from these fifteen introns with the intron of gamma toxin gene (Table I), reveals a diversity of sizes from 58 bp to 14.3 kbp. The only common sequences are those at the 5' and 3' boundaries. A consensus sequence is proposed for these boundaries in Table I. When these boundary consensus sequences are compared to other eukaryotic intron boundaries [14], it appears that they are a regular feature of all eukaryotic introns thus far reported.

**Acknowledgments:** This work was partially supported by grants from Howard Hughes Medical Institute (75191-527104), DGAPA-UNAM (IN 205893) to L.D.P., and CONACYT-Mexico (0018-N9105) to L.D.P. and F.P.

### REFERENCES

- [1] Catterall, W. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 5528-5536.
- [2] Possani, L.D., Alagon, A.C., Fletcher Jr., P.L. and Erickson, B.M. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **180**, 394-403. See also Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J. and Svendsen, I. (1981) *Carlsberg Res. Commun.* **46**, 195-205.
- [3] Lazdunski, M., Frelin, C., Barhanin, J., Lombet, A., Meiri, H., Fauron, D., Romey, G., Schmid, A., Schaefer, H., Vigne, P. and Vijzterberg, H.P.M. (1986) *Ann. NY Acad. Sci.* **496**, 204-220.
- [4] Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I., Rode, G.S. and Erickson, B.W. (1985) *Biochem. J.* **229**, 739-750. See also Possani, L.D., Martin, B.M., Fletcher, M.D. and Fletcher Jr., P.L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3178-3183.
- [5] Bechtis, G., Sampieri, F., Yuan, P.-M., Brando, T., Martin, M.F., Dñiz, C.R. and Rochat, H. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1146-1153.
- [6] Kirsch, G.E., Skattebol, A., Possani, L.D. and Brown, A.M. (1989) *J. Gen. Physiol.* **93**, 67-83.
- [7] Loret, E.P., Sampieri, F., Roussel, A., Granier, C. and Rochat, H. (1990) *Proteins* **8**, 164-172.
- [8] Martin-Eauclaire, M.F., Delabre, M.L., Ceard, B., Ribeiro, A., Sogaard, M., Svenson, B., Dñiz, C.R., Smith, L.A., Rochat, H. and Bougis, P.E. in: *Recent Advances in Toxinology Research*, vol. 1 (Gopalakrishnakone, P. and Tan, C.K. eds.) pp. 196-209, Singapore University Press, Singapore.
- [9] Martin-Eauclaire, M.F., Ceard, B., Ribeiro, A.M., Dñiz, C.R., Rochat, H. and Bougis, P.E. (1992) *FEBS Lett.* **302**, 220-222.
- [10] Becerril, B., Vázquez, A., Garcia, C., Corona, M., Bolívar, F. and Possani, L.D. (1993) *Gene* **128**, 165-171.
- [11] Vázquez, A., Becerril, B., Martin, B.M., Zamudio, F., Bolívar, F. and Possani, L.D. (1993) *FEBS Lett.* **320**, 43-46.
- [12] Voll, W. and Voit, R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5312-5316.
- [13] Kent, N., Hill, M.R., Holland, P.W. and Hart, B.J. Dept. Biochem. Univ. Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, UK. (Unpublished).
- [14] Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiber, S. and Sharp, P.A. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1119-1150.

## 7.- RESULTADOS Y DISCUSION.

A continuación se discutirán los resultados de los experimentos realizados.

### 1.- *Centruroides noxius*.

#### PCRs GENOMICOS.

En los experimentos iniciales de amplificación realizados en esta especie (ver mi tesis de licenciatura) fue utilizado un oligo correspondiente a la región amino terminal que es altamente conservada en esta familia de toxinas. El otro oligonucleótido fue diseñado con base en una región del extremo 3' de los ADNes hasta entonces secuenciados. Los resultados de estos experimentos sugieren que no hay intrones en la parte amplificada. De esta manera, faltaba investigar si había intrones en la región que codifica para el péptido señal y el extremo 5' de estos genes.

Con el objetivo de obtener más información sobre la estructura individual de esta familia de genes, se realizaron 2 tipos más de experimentos de amplificación.

- 1) Con los oligos 5'*extBamI* y *CtoxEcoRI*.
- 2) Con los oligos *Ntox 2* y Extremo 3'.

1) Con los oligos 5'*extBamI* (extremo 5' con sitio de restricción) y *CtoxEcoRI* (región un poco anterior a la que codificaría para el C terminal de *CngtIII* con sitio de restricción)

Cuando realizamos este PCR conocíamos además de la clona *CngtI* (incompleta en el 5'), las secuencias nucleotídicas completas de las clonas *CngtII* y *CngtIII* (ver figura 1, artículo 1). El conocer el extremo 5' de estas secuencias, abría la posibilidad de investigar si había intrones en esta región. El oligo 5'*extBamI* (directo) fue diseñado con base en la secuencia del extremo 5' de *CngtII*. El oligo *CtoxEcoRI* (inverso) se diseño con base en la secuencia de una región un poco anterior al COOH terminal que se conserva en la subfamilia a la cual pertenece *CsEv3*, *CngtII* y *CngtIII* (ver figura 2, artículo 1, pág. 24 y figura 2, pág. 33).

El resultado de este experimento mostró la amplificación de un fragmento de alrededor de 225 el cual fue clonado y secuenciado. Al analizar dicha secuencia se encontró que aunque presentaba considerable homología con las secuencias de ADNes antes determinadas, exhibía varias características atípicas (ver figura 2, pág. 33) que podemos enumerar de la siguiente manera:



i) Carece de un trecho de 30 nucleótidos en la región que codificaría para el péptido señal. ii) Presenta una repetición de 7 nucleótidos alrededor de la región que codificaría para el aminoácido 40. iii) Presenta 2 nucleótidos adicionales que se encuentran después de la secuencia del oligo 5'extBamIII y antes del triplete que codificaría para la glicina 15 del péptido señal. iv) Por lo anteriormente expuesto, esta secuencia no estaría en fase de lectura.

Debido a que esta clona no había sido antes secuenciada, se descarta la posibilidad de que sea una contaminación del PCR. Además, puesto que esta clona presenta una secuencia particular que se diferencia en forma significativa de cualquier otra secuencia conocida (17 cambios con respecto a CngtIII) creemos que es poco probable que se trate de un artefacto, principalmente por las siguientes razones:

i) Se utilizó la enzima Vent polimerasa con actividad correctora 3'-5' exonucleasa, la cual introduce un error en promedio por cada 100 000 nucleótidos incorporados, por lo tanto, la posibilidad que introduzca 17 cambios en un fragmento de 270 pb es muy remota.

ii) El tipo de errores mas comunes introducidos por la polimerasa son transiciones (cambios de nucleótidos del mismo tipo químico, purinas o pirimidinas) o desplazamientos de una base. Con respecto al primer caso, los cambios observados con respecto a CngtIII no son en su mayoría de este tipo (6 de 15); en cuanto al segundo caso, no se observan desplazamientos en la secuencia de CnA.

iii) El hecho de que en el mismo experimento, se haya amplificado otro fragmento cuya secuencia (en 4 clonas independientes) es idéntica a la clona CngtIII, nos indica que bajo esas condiciones la enzima Vent polimerasa tiene una gran fidelidad.

Por tales razones, creemos posible que lo que se amplificó y clonó en CnA es una secuencia de un pseudogen que se encuentra en estado crítico en el genoma de *C. noxius*.

2) Con los oligos Ntox 2 (región que codificaría para el N terminal) y extremo 3'.

En el tiempo en que se realizó este PCR, se conocía además de las clonas CngtI, CngtII y CngtIII, dos clonas nuevas: CngtIV y CngtV. La clona IV pertenece a una subfamilia diferente a las otras clonas (ver figura 2, artículo 1, pág. 25) y su secuencia deducida de aminoácidos presenta alta homología con respecto a las toxinas Cn1 (fracción II.14) y Cn2 (fracción II.9.2.2) en su región N terminal. Debido a que era interés del grupo encontrar los genes que codifican para estas toxinas, se diseñó un oligo de la región N terminal el cual pudiera amplificar en forma específica los genes relacionados a CngtIV, Cn1 y Cn2.

Al analizar los productos de este PCR, se observó que el fragmento amplificado mayoritariamente era de alrededor de 270 pb (lo cual coincidía con el tamaño esperado) (ver fotografía 1, próxima página). Si bien en la amplificación no se observó contaminación en el control negativo, en el experimento de reamplificación se observaron varias bandas una de las cuales pudiera coincidir con la banda de 270 pb. Dicha banda podría ser producto de una contaminación de la misma clona genómica o de algún ADNc.

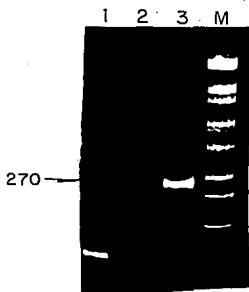
El producto de este PCR fue clonado y fueron secuenciadas 4 clonas, 3 de las cuales fueron iguales (CnB) y una diferente (CnC). En la región amplificada, la clona CnB difiere con respecto a la CnC, en 4 cambios de nucleótidos y 2 de aminoácidos y con respecto a la clona CngtIV, en 6 nucleótidos y 5 aminoácidos (ver figura 3, próxima página 37).

Por otra parte, la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CnB tiene 4 cambios de aminoácidos con respecto a la secuencia publicada de Cn1. De estos cambios, 3 son en el COOH terminal y 1 un poco antes en la posición 60 (prolina por treonina).

Considerando la alta similitud entre las secuencias de la toxina Cn1 con respecto a la deducida de aminoácidos de la clona CnB, proponemos las siguientes 2 hipótesis:

A) La clona CnB podría codificar para la toxina Cn 1. Para ello, se tendría presente las siguientes 2 premisas:

i) El precursor péptido que codificaría la clona CnB sufriría un procesamiento en el extremo carboxilo similar al propuesto para los precursores de las toxinas AnIII, Ts gama y CnV (ver figura 4, pág 38). Este procesamiento incluiría la eliminación de la lisina COOH terminal por una carboxipeptidasa específica y la amidación del antepenúltimo residuo (serina) por el grupo amino del penúltimo aminoácido (glicina). Puesto que este aminoácido modificando no se detecta mediante el análisis convencional de los fenil-tio-hidantoína (PTH) aminoácidos, podríamos suponer que no se detectó cuando se realizó la secuencia de la toxina Cn1 y por tanto, se tomó el aminoácido precedente (cisteína) como el COOH terminal (ver figura 3, página 37).



**Fotografía 1.-** Producto de la reamplificación del ADN genómico de *C. noxius* con los oligos Ntox2 y extremo 3'. En el carril 1, se presenta un control negativo (15 de 100 µl); en el carril 2, un control sin muestra; en el carril 3, el producto de la reamplificación (2 de 100 µl pasados por centricon). En el carril 4 se muestra el marcador VI de Boehringer (2176\1766\1230\1033\653\ 517\453\394\298\234\220 154). En el carril 3, se observa que el producto principal de la reamplificación es de alrededor de 270 pb. En el control negativo (carril 1), se aprecia una banda muy tenue de alrededor de 270 que puede corresponder a una contaminación.

10 20

IV) AAGGACGGTTATCTGGTGGACGTAAGGGCTGCAAAAAGAATTGCTATAAATGGGAGAAAACGAT  
 K D G Y L V D V K G C K K N C Y K L G E N D

CnC) AAGAAGGTTATCTGGTGGACGCAAAAGGGCTGCAAAAAGAATTGCTATAAATGGGAGAAAACGAT  
 K E G Y L V D A K G C K K N C Y K L G K N D

CnB) AAAGAAGGTTATCTGGTGGACGCAAAAGGGCTGCAAAAAGAATTGCTATAAATGGGAGAAAACGAT  
 K E G Y L V D A K G C K K N C Y K L G K N D

Cn1) K D G Y L V D A K G C K K N C Y K L G K N D

30 40

IV) TATTGCAATAGGGAATGCAAAATGAAACACCGAGGAGGTAGTTACGGCTATTGCTACCGAATTGGGTGC  
 Y C N R E C R M K H R G G S Y G Y C Y G F G C

CnC) TATTGCAATAGGGAATGCAAAATGAAACACCGAGGAGGTAGTTACGGCTATTGCTACCGAATTGGGTGC  
 Y C N R E C R M K H R G G S Y G Y C Y G F G C

CnB) TATTGCAATAGGGAATGCAAAATGAAACACCGAGGAGGTAGTTACGGCTATTGCTACCGAATTGGGTGC  
 Y C N R E C R M K H R G G S Y G Y C Y G F G C

Cn1) Y C N R E C R M K H R G G S Y G Y C Y G F G C

50 60 67

IV) TATTGTGAAGGATATCCCGATAGTACACCGACTTGGCCCTTCCTAATAAAAAGATGCCGCGGAAAATAA  
 Y C E G L S D S T P T W P L P N K R C G G K End

CnC) TATTGTGAAGGATATCCCGAAGTACACCGACTTGGCCCTTCCTAATAAAAAGATGCCGCGGAAAATAA  
 Y C E G L A E S T P T W P L P N K T C S G K End

CnB) TATTGTGAAGGATATCCCGATAGTACACCGACTTGGCCCTTCCTAATAAAAAGATGCCGCGGAAAATAA  
 Y C E G L S D S T P T W P L P N K T C S G K End

Cn1) Y C E G L S D S T P T W P L P N K T C

IV) TGGCAACGACTTTTATGTGCCACCAACAGAAATAGTGTAAACGGCTTGTAAATPGCAGTT

CnC) TGGCAACGACTTTTATGTGCCACCAACAGAAATAGTGTAAACGGCTTGTAAATPGCAGTT

CnB) TGGCAACGACTTTTATGTGCCACCAACAGAAATAGTGTAAACGGCTTGTAAATPGCAGTT

**Figura.- 3.-** Secuencia nucleotídica de las clonas CnB y CnC. Son comparadas con la secuencia nucleotídica de la clona Cn1 (ADNc) y con la secuencia de aminoácidos que fue reportada para la toxina Cn1. Los oligonucleótidos usados para la amplificación son subrayados (oligo Ntox2 19mero. Tm = 51°C; oligo extremo 3' 22mero Tm = 52°C, ecucción por Bolton y McCarthy 1962). Se marcan con negritas los cambios de la clona CnC con respecto a CnB y los cambios de esta con respecto a la secuencia originalmente reportada para Cn1 (fracción II.14). Asimismo, son subrayadas las bases que cambian en la clona Cn1 con respecto a la clona CnB.



<u>ESPECIE</u>	<u>ADNc</u>	<u>EXTENSION</u>	<u>P. SEÑAL</u>	<u>R. ESTRUCT.</u>	<u>+TER.</u>
<i>Androctonus australis</i>	AaH I	331 pb	19 a.a.	63 a.a.	R
<i>Androctonus australis</i>	AaH I'	331 pb	19 a.a.	63 a.a.	R
<i>Androctonus australis</i>	AaH II	331 pb	19 a.a.	63 a.a.	G-R
<i>Androctonus australis</i>	AaH III	331 pb	19 a.a.	64 a.a.	R
<i>Androctonus australis</i>	AaH IT1	320 pb	18 a.a.	70 a.a.	
<i>Androctonus australis</i>	AaH IT2	320 pb	18 a.a.	70 a.a.	
<i>Buthotus judaicus</i>	Bjt2	323 pb	21 a.a.	61 a.a.	R-K-K
<i>Leiurus quinquestratus</i>	LqhnIT	314 pb	19 a.a.	64 a.a.	H-R-K
<i>Tityus serrulatus</i>	Toxina gama	321 pb	20 a.a.	61 a.a.	G-K-K
<i>Centruroides noxius</i>	CngtII(Cn5)	328 pb	19 a.a.	66 a.a.	K-K
<i>Centruroides noxius</i>	CngtIII	349 pb	19 a.a.	66 a.a.	K-K
<i>Centruroides noxius</i>	CngtIV	323 pb	19 a.a.	65 a.a.	G-K
<i>Centruroides noxius</i>	CngtV(Cn4)	349 pb	19 a.a.	65 a.a.	G-K
<i>Centruroides noxius</i>	CnB ("Cn1")	266 pb	19 a.a.	65 a.a.	G-K
<i>Centruroides noxius</i>	CnC	266 pb	19 a.a.	65 a.a.	G-K

**Figura 4.-** Comparación de ADNc que codifican para toxinas de alacrán. La extensión de estos ADNc incluye desde el péptido señal hasta antes del poli A. En el caso de las clonas CngtII y CngtIV, es posible que el oligo T (para la síntesis del ADNc) haya alineado antes del poli A.

Las clonas CnB y CnC son clonas genómicas obtenidas por PCR en las que se amplificó desde el N terminal hasta el extremo 3' (no se amplificó la región del péptido señal). Aún no se ha aislado los posibles péptidos que estarían codificados por las clonas CngtIII, CngtIV y CnC, por lo que se señala la región estructural (toxina madura) deducida y los aminoácidos que se ha propuesto que se procesados en el C terminal. Proponemos que CnB codifica para la toxina Cn1.

Se presenta en la columna +Ter los aminoácidos del C terminal del precursor que no aparecen en el péptido maduro. Ha sido propuesto que los aminoácidos básicos son cortados por una carboxipéptidasa específica. Cuando antes de estos aminoácidos básicos hay una glicina (señalada en negritas), una  $\alpha$  amidasa tomaría su grupo amino para amidar al aminoácido precedente. Las referencias de las secuencias son mencionadas en la figura 5, pág. 40)

## RESULTADOS Y DISCUSION

ii) Debido a un error técnico al realizar la secuencia del péptido, se confundió una prolina en la posición 60 por una treonina.

B) El gen que codifica para la toxina Cn1, es un gen diferente al de la clona CnB. Estos genes, junto con los de las clonas CnGIV y CnC, forman una subfamilia de genes que codifican para toxinas bloqueadoras de canales de sodio de mamífero. Puesto que durante la purificación de la toxina Cn1 se observó en la misma fracción la presencia de cuando menos 2 componentes minoritarios adicionales (Possani *et al.* 1981a); cabe la posibilidad de que existan otras toxinas similares a Cn1. Estas toxinas pudieran corresponder con algunos de los genes antes mencionados.

Resulta claro que para poder corroborar cualquiera de estas dos hipótesis, es indispensable realizar la revisión de la secuencia péptídica de la toxina Cn1.

Un poco después, en el laboratorio se secuenció una clona de ADNc con una secuencia idéntica a la clona CnB; puesto que existe la posibilidad de que en el PCR genómico hubiera contaminación (ver foto 1, pág. 35) el hecho de que se haya secuenciado el mismo gen pudiera ser correlacionado en ese sentido. Sin embargo, puesto que se obtuvo otra secuencia de la misma amplificación (CnC), no se puede descartar que la clona CnB sea una clona genómica.

Considerando que cuando menos la clona CnC es una clona genómica, se puede concluir que no existen intrones en la parte estructural de este gen. Esta conclusión es consistente con los datos previamente obtenidos.

### 2) *Tityus serrulatus*

Por los trabajos de Bougis *et al.* (1989) en los que se reportaron 7 ADNc de *A. australis* y los de nuestro grupo (Becerril *et al.*, 1993; Vázquez *et al.*, 1993), en los que se secuenciaron 4 ADNc de *C. noxius*, resultaba claro que existía conservación de las regiones que codifican para el péptido señal y el extremo 3' (ver figura 1, artículo 1, pág. 24 y figura 5, próxima página). Por otra parte, por experimentos de PCR realizados en *C. noxius*, teníamos datos que sugerían que no había intrones en la región que comprende la parte estructural y el extremo 3' de estos genes. Aunque no sabemos si había un intrón en la parte anterior a la región que codificaría para el N terminal, los datos obtenidos por análisis del tipo Southern sugerían que en caso de haber un intrón en esta zona, éste no sería muy grande.

Cuando Martin-Eauchaire *et al.* (1992) obtuvieron la secuencia nucleotídica del ADNc que codifica para la toxina gama de *T. serrulatus*, en nuestro grupo se consideró (teniendo en cuenta los antecedentes mencionados), que era factible obtener por PCR la secuencia genómica de este gen.



En la figura 1 (página 20) se muestra la secuencia del ADNc que codifica para la toxina gama de *T. serrulatus*. Se muestran los oligos diseñados para la amplificación (TB1 y TB2) así como los utilizados para la búsqueda de las secuencias amplificadas (TB3 y TB4).

El producto de la amplificación de este PCR fue un fragmento de alrededor de 800 pb el cual mostró ser específico cuando se hibridó con las sondas TB3 y TB4. El fragmento fue clonado y se secuenciaron 3 clonas de 790 pb que mostraron ser idénticas entre sí.

Las secuencias de estas clonas genómicas, son idénticas al ADNc previamente reportado por Martin-Eauclaire *et al.*, excepto por dos cambios en las posiciones 745 y 760 del extremo 3' no traducido, en las cuales se cambia una timina del ADNc por una citocina en el ADN genómico (ver figura 1, artículo 2, página 30). Este es el primer gen que codifica para una toxina de alacrán del cual se ha determinado la secuencia genómica, el ARN (ADNc) y la secuencia peptídica.

### OTRAS ESPECIES DEL GENERO *TITYUS*

Utilizando una metodología similar, se colaboró en la obtención de las secuencias genómicas de los equivalentes de la toxina gama en otras dos especies del género *Tityus*. Las secuencias no son mostradas porque se prevé utilizarlas para una patente.

## **9.- CONCLUSIONES**

Las conclusiones de este trabajo las podemos enumerar de la siguiente manera:

**1.- Se implementó una nueva metodología para la purificación de ADN genómico de alacrán.**

**2.- Utilizando ADN genómico de *C. noxius*, se amplificó una secuencia que pudiera corresponder a la de un pseudogen.**

**3.- En esta misma especie, se amplificó la región genómica que codificaría para la parte estructural de una toxina parecida a Cn1. De esta manera, se confirmó que no existen intrones en la parte estructural y extremo 3' de este grupo de genes.**

**4.- Se amplificó y secuenció el gen que codifica para la toxina gama del alacrán sudamericano *Tityus serrulatus*. Este gen tiene un tamaño de 790 pb y presenta un intrón de 475 pb en la región que codificaría para el péptido señal. Al publicar esta secuencia, se realizó el primer reporte formal de una secuencia genómica de alacrán.**

**5.-Utilizando una metodología similar, se colaboró en la obtención de las secuencias genómicas que codifican para los equivalentes de la toxina gama en otras dos especies del género *Tityus*.**

## 10.- BIBLIOGRAFIA

- Alagón, A.C., Guzmán H. S., Martín B.M., Ramírez A.N., Carbone E. and L.D. Possani. (1988). Isolation and characterization of two toxins from the mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus*, Karsch. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B: 153-161.
- Babin, D.R., Watt D.D., Goos S.M. and Meejnc R. V. (1974). Amino acid sequences of neurotoxin protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Arch. Biochem. Biophys.* 164: 694-706.
- Barhanin, J., Giglio J.R., Leopold P., Schmid A., Sampaio S.V. and Lazdunski M. (1982). *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins-Tityus Gama toxin is a new tool with a very high affinity for studying the sodium Na<sup>+</sup>. *J. Biol. Chem.* 257: 12553-12558.
- Barnes, R. *Zoología de los Invertebrados* (1983). Tercera edición. Ed. Interamericana. México, D.F.
- Becerril, B. Vázquez A., García C., Corona M., Bolívar F. and Possani L.D. (1993). Cloning and Characterization of cDNAs that code for Na<sup>+</sup> channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Gene.* 128: 165-171.
- Becerril, B. Corona M., Mejía M.C., Martín B.M., Lucas S., Bolívar F. and Possani L.D. (1993). The genomic region encoding toxin gama from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. *FEBS Lett.* 335: 1: 6-8.
- Blin, N. and Stafford D.W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eucaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3: 2303.
- Bougis, P. E. Rochat, H. and Smith L.A. (1989) Precursors of *Androctonus australis* Scorpion Neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 264: 19259-19265.
- Catterall, W. A., (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 15-43.
- Catterall, W. A., (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 953-985.
- Carbone, E., Pestipino G., Wanke E., Possani L.D. and Maelicke A. (1982). Selective blockage of voltage-dependent potassium channels by a novel scorpion toxin. *Nature*, 296: 90-91.
- Corona, M. Implementación de un método general para la caracterización de genes que codifican para toxinas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann. (1992). Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara.

- Couraud, F., Jover E., Dubois, J.M. and Rochat H. (1982)** Two types of scorpion toxin receptors sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 20: 9-16.
- Couraud, F. and Jover E., (1984)** in *Handbook of Natural Toxins* (Tu, A.T., Ed.) Vol.2, pp 659-678, Marcel Dekker, New York.
- DeBin, J.A., Maggio J.E. and Strichartz G.R. (1993).** Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from venom of the scorpion. *A.J. Physiol.* 264 (Cell Physiol.) 33: 361-369.
- Dehesa-Dávila, M.** Epidemiological characteristics of scorpion sting in León Guanajuato, México. (1989) *Toxicon* 27: 281-286.
- Fontecilla-Camps, J. C., Almassy, R.J. Suddath, F. L. Watt, D.D. and Bugg, Ch. E. (1980).** Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: A new structural class of neurotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 77: 6466-6500
- Fontecilla-Camps, J. C., Habersetzer-Rochat C. and Rochat H. (1989).** Orthorhombic crystal and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.,* 85: 7443-7447.
- Freire-Maia, L. and Campos J.A. (1989).** Pathophysiology and Treatment of Scorpion poisoning. In *Natural Toxins*. Pergamon Press. Edited by Charlotte L. Ownby. Great Britain. pp. 139-159.
- Gómez, M.V. and Diniz C.R. (1966).** Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. *Mem. Inst. Butantan,* 33: 899-902.
- Gurevitz, M., Zlotkin E. and Zilberberg N. (1990).** Characterization of the transcript for a depressant insect selective neurotoxin gene with an isolated cDNA clone from the scorpion *Buthotus judaicus*. *FEBS Lett.* 269: 229-332.
- Gurevitz, M., Urbach D., Zlotkin E. Zilberberg N. (1991).** Nucleotide sequence and structure analysis of a cDNA encoding an alpha insect toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *Toxicon* 29: 1270-1272.
- Hassan, F. (1984).** Production of scorpion antivenin. In A. Tu (Ed.) *Handbook of Natural toxins*, Marcel Dekker, New York, 2: 577-605.
- Inoue, H., Nojima H., Okuyama H., (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Jover, E., Courard F. and Rochat H. (1980).** Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 95: 1607-1614.

- Keegan, H.L.** (1980). Scorpions of Medical Importance. University Press of Mississippi.
- Kirsch, G.E., Skattebol A, Possani L.D. and Brown.** (1989). Modification of Na<sup>+</sup> channel gating by an  $\alpha$  scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. J. Gen. Physiol. 93: 67-83.
- Kopeyan, C., Martínez G., Lissitzky S., Miranda F. and Rochat H.** (1974). Disulfide Bonds of toxin II of scorpion *Androctonus australis* Hector. Eur. J. Biochem., 47: 483-489.
- Koppchenhofer, E. and Schmidt** (1968). Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. Experientia (Basel) 24: 41-42.
- Lazarovicini, P., Yanai, P., Pelhate, M. and Zlotkin E.** (1982a) Insect toxic components from the venom of a charactoid scorpion, *Scorpio maurus palmasus* (scorpionidae) J. Biol. Chem. 27:8397-8404.
- Martin, B. M., Carbone E., Yatani A., Brown A.M., Ramírez A.N., Gurrola G.B. and Possani L.D.** (1988). Amino acid sequence and physiological characterization of toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. Toxicon 26: 785-794.
- Martin-Eauclaire, M.F., Delabre M.L., Ceard, B., Ribeiro A., Sogaard M., Stevensson B, Diniz C, Smith L.A., Rochat, H. and Bougis P.E.** (1992). Genetics of scorpion toxins. in: Recent Advances in toxicology Research, vol 1 (Gopalakrishnakone, P. and Tan, C.K. Eds.) pp. 196-209, Singapore University Press.
- Martin-Eauclaire, M.F., Ceard B., Ribeiro A.M. Diniz C.R. Rochat H. and Bougis P.E.** (1992). Molecular Cloning and Nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main  $\beta$ - neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. FEBS Lett 302: 220-222.
- Meves, Simard, M. and Watt D.** (1986). Interactions of scorpions toxin with the sodium channel. In Tetradotoxin, Saxitoxin and the Molecular Biology of the Sodium Channel. Ed. C.Y. Kao and S.R. Levinson. Ann. N.Y. Acad. Sci. 479: 113-132.
- Miranda, F., Kopeyan C., Rochat H. Rochat C. and Lissitzky S.** (1970). purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis* Hector. *Buthus occitanus tunetanus*, *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. Eur. J. Biochem. 16: 514-523.
- Narahashi, T.B., Shapiro I., Deguci T., Scuka and Wang C.M.** (1972). Effects of scorpion venom on squid axon membranes. Amer. J. Physiol., 222: 850-857.
- Possani, L.D. Dent, R.A., Martin M.B., Maelicke, A. and Svendsen I.B.** (1981a). The amino terminal sequence of several toxins from the venoms of the mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Carlsberg Res. Commun. 46: 297-214.



- Possani, L.D., Martin, M.B., Svendsen I.B. (1982).** The primary structure of Noxiustoxin: A potassium channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg res. Commun.* 47: 285-289.
- Possani, L.D. (1984)** Structure of scorpion toxins. In A. Tu (Ed), *Handbook of Natural Toxins*, Marcel Dekker, New York 2: 513-550.
- Possani, L.D., Martin B.M., Fletcher M.D. and Fletcher P.L. Jr. (1991).** Discharge effect on Pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 266: 3178-3185.
- Ramírez, A.N., Gurrola G.B., Martin B.M. and Possani L.D. (1988).** Isolation of several toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann *Toxicon* 26: 773-783.
- Ramírez, A.N., Martin B.M., Gurrola G.B. and L.D. Possani. (1994).** Isolation and Characterization of a novel toxin from the Venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon* 32: 479-490.
- Rochat, H., Bernard P. and Couraud F. (1979).** Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In B. Ceccarelli and Clementi F.(Ed.), *Advances in Cito pharmacology*, Marcel Dekker, New York, 2: 325-334.
- Sambrook, J. Fritsch E., Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press N.Y.
- Sampaio, S.V., Laure C.J. and Giglio J.R. (1983).** Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* *Toxicon*, 21: 265-277.
- Strichartz, G., Rando, T. and Wang, G.K. (1989).** An integrated view of the molecular toxicology of sodium channel gating in excitable cells, *Annu. Rev. Neuroscience* 10: 237-267.
- Toledo, D. and Neves, A.G. (1976)** Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 55B: 249-253
- Valdivia, H.H., Fuentes O., El-Hayek R., Morrissette J. and Coronado R. (1991).** *J.Biol. Chem.* 266: 19135-19138.
- Valdivia, H.H., Kirby M. S., Lederer J.W. and Coronado R. (1992)** Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12185-12189.
- Valdivia, H.H. Martin B.M, Fletcher P.L., Ramírez A.N. and Possani L.D.** Isolation and pharmacological characterization of four novel  $Na^{+}$  channel-blocking toxins from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Biochem J. Japan.* (en prensa).

- Vázquez, A. Becerril B., Martín B.M., Zamudio F., Bolívar F. and Possanni L.D. (1993).** Primary structure determination and cloning of the cDNA encoding toxin 4 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *FEBS Lett.* 320: 43-46.
- Zilberberg N. and Gurevitz M. (1993).** Rapid Isolation of Full Length cDNA Clones by Inverse PCR: Purification of a Scorpion cDNA Family Encoding  $\alpha$ - Neurotoxins. *Anal. Biochem.* 209: 203-205.
- Zilberberg, N., Zlotkin E. and Gurevitz M. (1991).** The cDNA sequence of a depressant insect selective neurotoxin from the scorpion *Buthotus judaicus*. *Toxicon* 29: 1155-1158.
- Zlotkin, E, Rochat H., Kopeyan C., Miranda F., and Lissizki S. (1971).** Purification and properties of the insect toxin from venom of scorpion *Androctonus australis* Hector. *Biochimie.* 53: 1073-1078.
- Zlotkin, E., Miranda F. and Rochat C. (1978).** Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In Bettini, S. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin, 1978, 48: 317-369.
- Zlotkin, E., Kaduri, D., Gordon, D., Pelhate, M., Martín, M.F. and Rochat H. (1985).** An excitatory and depressant insect toxins from scorpion venom-both effect sodium conductance and possess a common binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* 240: 877-887.