

# 创伤弧菌溶细胞素中类蓖麻毒素功能模序的细胞毒活性研究

许玲 谢旦立 张刘丽 楼永良\*

(温州医学院检验医学院、生命科学学院, 温州 325035)

**摘要** 创伤弧菌溶细胞素(*Vibrio vulnificus* cytolysin, VVC)氨基酸序列的313-445位(Gi No. M34670)与蓖麻毒素B链(Ricin chain B, RTB)的一段高度同源, 为类蓖麻毒素。基因克隆表达创伤弧菌溶细胞素类蓖麻毒素(rRicin B),  $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析法及透析复性法进行纯化、复性。用纯化的rRicin B免疫日本大耳兔获得多克隆抗体, 兔抗rRicin B多克隆抗体经盐析法、分子筛纯化后, 得到较纯的IgG分子。免疫印迹结果显示, 抗rRicin B多克隆抗体与纯化抗原呈现特异性反应条带。流式细胞术结果显示, rRicin B诱导细胞凋亡呈剂量依赖关系, 多抗能够阻断其细胞毒性。至此, 该工作成功制备了兔抗rRicin B的多克隆抗体, 并证明了创伤弧菌溶细胞素结构基因的类蓖麻毒素功能域具有细胞毒活性, 能诱导Hela细胞凋亡, 且其细胞毒活性能被其多抗成功阻断。

**关键词** 创伤弧菌; 溶细胞素; 类蓖麻毒素模序; 多克隆抗体; 凋亡

## Study on the Cell Toxicity of the Lectin-like Domain of RvvhA

Xu Ling, Xie Danli, Zhang Liuli, Lou Yongliang\*

(School of Medical Lab Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

**Abstract** VVC amino acid sequence 313-445 (Gi No. M34670) is highly homologous to the B chain of ricin. We obtained the purified rRicin B proteins by gene cloning, purification, renaturation and purification. Rabbit polyclonal antibody against rRicin B was prepared by immunizing rabbit and was purified by persulfate and Sephadex G25 followed by analysis of Western blot hybridization and antibody titer. Observation of the effect of rRicin B on cell apoptosis and rabbit polyclonal antibody (Endnotes) protection by flow cytometry, we found that rabbit polyclonal antibody against rRicin B was purified successfully by methods of Persulfate and Sephadex G25. Polyclonal antibody showed high immuno-reactivity. The results of flow cytometry observation indicated that rRicin B can inhibit the growth of Hela cells and the effect was depended on doses of rRicin B. Polyclonal antibody could block up the damage of Hela cells acted by rRicin B. All the results showed that rabbit polyclonal antibody against rRicin B was prepared successfully with cell toxicity, but the cell toxicity of rRicin B could be blocked by its polyclonal antibodies.

**Key words** *Vibrio vulnificus*; hemolysin; lectin-like domain; polyclonal antibody; apoptosis

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)为一种具有荚膜的革兰阴性嗜盐弧菌<sup>[1]</sup>, 存在于海洋环境, 尤其是海湾

附近港口。研究发现, 与创伤弧菌致病性相关的毒力因素包括溶细胞素、金属蛋白酶、荚膜多糖、脂

收稿日期: 2012-09-02 接受日期: 2012-10-25

浙江省自然科学基金(批准号: Y2090468)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0577-86699200, E-mail: ly110282004@yahoo.com.cn

Received: September 2, 2012 Accepted: October 25, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. Y2090468)

\*Corresponding author. Tel: +86-577-86699200, E-mail: ly110282004@yahoo.com.cn

多糖、磷脂酶等。创伤弧菌溶细胞素(*Vibrio vulnificus* cytolysin, VVC)是由创伤弧菌结构基因*vvhA*(*V. vulnificus* structural gene for cytolysin)编码的一种细胞外蛋白质,是一种可使细胞膜形成孔道的细胞毒素和溶血毒素,是创伤弧菌向胞外释放的唯一外毒素<sup>[2]</sup>。VVC毒力强,具有特异性,极低剂量即可表现出极强的生物学活性,被认为是创伤弧菌释放的主要毒素之一。我们前期的工作已证实,利用基因工程克隆表达、纯化和复性的重组创伤弧菌溶细胞素(rVvhA)具有溶血活性<sup>[3-4]</sup>,对多种细胞具有致凋亡、坏死和致应激作用<sup>[5]</sup>。

天然的蓖麻毒素蛋白是蓖麻毒素中毒性最强的一种细胞毒素,由两条肽链以二硫键共价相接<sup>[6]</sup>,两条多肽链分别称为A链(Ricin chain A, RTA)和B链(Ricin chain B, RTB)。RTA是活性链,也是毒性链;RTB是结合链,有凝集素的活性,RTA借助RTB的携带作用而使RTA进入细胞发挥其毒性<sup>[7]</sup>。但当RTB与细胞膜表面的受体结合后,信号从膜受体到核的转导过程中,亦能诱导细胞凋亡、细胞因子的产生和脂质体过氧化等毒性作用<sup>[8]</sup>。创伤弧菌溶细胞素氨基酸序列的313-445位(Gi No. M34670)与蓖麻毒素模B链的一段高度同源,为类蓖麻毒素。

本实验以人Hela细胞为模型,观察创伤弧菌溶细胞素rRicin B蛋白对人类Hela细胞的毒性,以探讨其所致的细胞损伤相关机制,从传统细菌毒素结构功能整体研究转为从毒素蛋白的相关功能模序研究,采用局部各个分析研究的方法,完善对vvhA的结构功能研究及创伤弧菌致病机制研究。为今后进一步开发新型的致凋亡肽,并以此为基础改造该毒素的新药开发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌种和质粒 子宫颈癌细胞株(Hela)为本实验室保存,*E. coli* BL21(DE3)(含pET-28a(+)-Ricin B质粒)为本课题组构建保存。日本大耳兔[4个月大小,雄性,健康,体重(2.4±0.5) kg]由温州医学院实验动物中心提供(遵守国家动物实验的相关法规)。

1.1.2 主要试剂与试剂盒 Ni<sup>2+</sup>-NTA His Band亲和层析柱购自上海申能博彩生物科技有限公司;异丙基硫代β-D-半乳糖苷(IPTG)、蛋白质分子量Marker、Trixton X-100购自宝生物工程(大连)有

限公司;还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSH)、精氨酸均为美国波士顿生物技术公司产品;β-巯基乙醇(2-ME)为BBI公司产品;DMEM高糖培养基为美国Gibco公司产品;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司;细胞培养板和培养瓶购自Corning公司;TMB单组分显色液、羊抗兔HRP-IgG抗体均购于上海索莱宝生物技术有限公司;完全福氏佐剂、不完全福氏佐剂均购自美国Sigma公司;抗His标签抗体、羊抗鼠HRP-IgG抗体、彩色预染蛋白质分子量标准购自碧云天生物技术有限公司;增强型DAB-HRP显色液购自TIANGEN公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 rRicin B的表达、纯化和复性 将pET-28a(+)-Ricin B导入大肠杆菌*E. coli* BL21(DE3)(含pET-28a(+)-Ricin B质粒)中,并于30 °C以0.5 mol/L IPTG诱导菌株表达rRicin B蛋白,SDS-PAGE分析表达产物<sup>[9]</sup>,通过Ni<sup>2+</sup>-NTA亲和层析法纯化表达产物、复性液结合分步透析法复性后进行Western blot分析。目的蛋白冷冻干燥成粉末后,-80 °C保存。

1.2.2 多克隆抗体制备 兔抗rRicin B蛋白多克隆抗体的制备、提纯、Western blot和抗体效价分析<sup>[10]</sup>:纯化重组rRicin B蛋白与完全福氏佐剂充分混匀,皮下多点免疫日本大耳兔,2周后,再与不完全福氏佐剂混匀,皮下加强免疫,1周后,心脏采血,收集血清,ELISA法检测抗体效价。免疫血清经饱和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、33% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液盐析沉淀。盐析纯化后的免疫血清再经Sephadex G25除盐纯化。纯化后的兔抗rRicin多克隆抗体<sup>[6]</sup>进行Western blot分析。选取10 μg/mL纯化重组rRicin B蛋白包被酶标板,兔抗重组rRicin B蛋白多克隆抗体和免疫前阴性对照血清均按1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600、1:51 200等浓度倍比稀释,采用ELISA法于450 nm处检测其效价。

1.2.3 Hela细胞的培养及传代 Hela细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液中,置37 °C、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。当细胞生长铺满瓶底时,用0.25%胰酶消化传代,每2~3天更换培养液。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI检测细胞凋亡与坏死率及

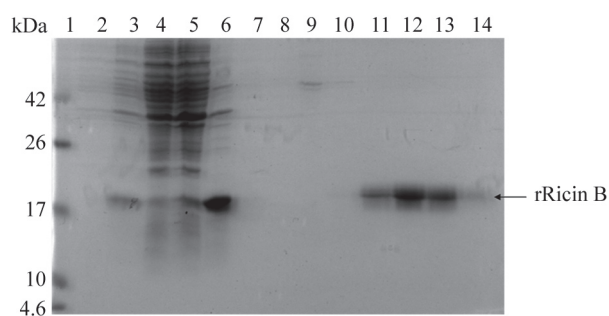
其抗体的保护作用 Hel a细胞按 $2 \times 10^5$ /mL密度接种于48孔板, 200  $\mu$ L/孔, 细胞生长过夜使其贴壁, 改为无血清的基础培养基。蛋白毒性实验分组: 加基础培养液的对照组、35  $\mu$ g rRicin B蛋白作用组、70  $\mu$ g rRicin B蛋白作用组。多克隆抗体保护实验分组: 加基础培养液的对照组、50  $\mu$ L多克隆抗体对照组、70  $\mu$ g rRicin B蛋白作用组、70  $\mu$ g rRicin B蛋白+50  $\mu$ L抗体保护组。将两组实验中分组后的细胞置37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的CO<sub>2</sub>培养箱中作用5 h后, 按Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒提供的操作说明进行, 染色完后1 h内用流式细胞仪检测各组细胞凋亡和坏死的情况。

1.2.5 统计学处理 以上实验均重复3次以上, 采用GraphPad Prism 5.0软件进行作图分析。各实验组与正常组间比较采用*t*检验。

## 2 结果

### 2.1 rRicin B蛋白的表达、纯化、复性及Western blot鉴定结果

表达的rRicin B分子量约为20 kDa, 以包涵体形式存在(图1, 条带5)。经反复洗涤、Ni<sup>2+</sup>-NTA亲和层析法纯化得到rRicin B蛋白<sup>[2-3]</sup>(图1, 条带6、11-14)。利用复性液结合分步透析法对蛋白进行复性干燥(图2)后, 保存于-80  $^{\circ}$ C。洗涤后目的蛋白纯度明显



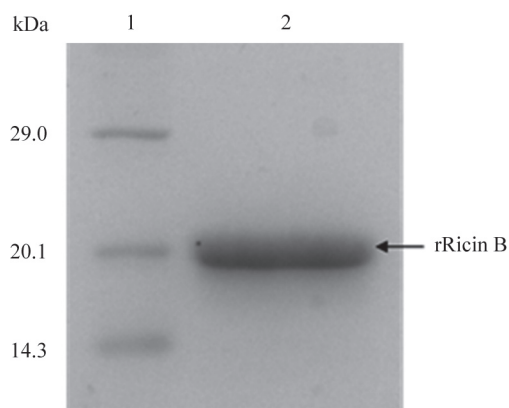
1: 蛋白分子量标准; 2: 未诱导全菌; 3: IPTG诱导后全菌; 4,5: 超声破菌的上清液和沉淀; 6: 洗涤后的rRicin B包涵体; 7: 穿透液; 8-14: 经0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 mmol/L咪唑洗脱液。

1: protein marker; 2: bacteria not induced by IPTG; 3: bacteria induced by IPTG; 4,5: supernatant and sediment of the total bacteria ultrasound; 6: washed inclusion body of rRicin B; 7: total bacteria protein after penetrated through the column; 8-14: total bacteria protein eluted with 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 mmol/L imidazole.

图1 SDS-PAGE分析融合蛋白rRicin B的表达、纯化

Fig.1 Analysis of expression and purification of rRicin B by SDS-PAGE

提高, 100, 200 mmol/L咪唑洗脱后目的蛋白纯度经软件分析已达90%和93.4%以上(图1)。复性后的目的蛋白分子量仍然在20 kDa左右(图2和图3), 样品得到进一步浓缩, 浓度和纯度均较高(图2)。

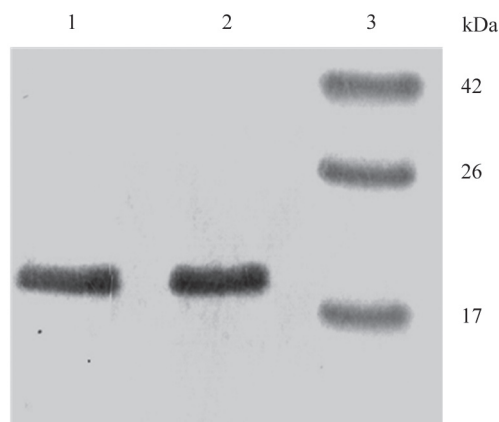


1: 蛋白分子量标准; 2: 复性后rRicin B蛋白。

1: protein marker; 2: renatured rRicin B protein.

图2 SDS-PAGE分析复性后rRicin B蛋白的纯度

Fig.2 Analysis of purification of renatured rRicin B by SDS-PAGE



1: 纯化后的rRicin B; 2: 洗涤后的沉淀; 3: 蛋白分子量标准。

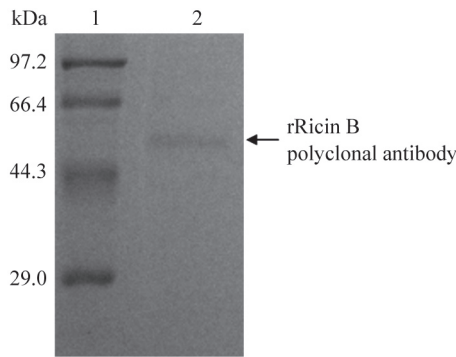
1: purified rRicin B protein; 2: washed inclusion body of rRicin B; 3: protein marker.

图3 rRicin B蛋白的Western blot分析

Fig.3 Identification of expression of rRicin B by Western blot

### 2.2 兔抗重组蛋白rRicin B多克隆抗体的制备、提纯和Western blot分析

兔抗rRicin B蛋白多克隆抗体经盐析法、分子筛法纯化后, 得到较纯的IgG分子(图4)。免疫印迹分析证实纯化多克隆抗体能够特异性识别rRicin抗原, 具有较好的免疫反应性(图5), 其效价为1:3 200(图6)。

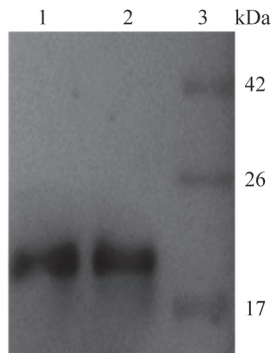


1: 蛋白分子量标准; 2: 纯化后的多克隆抗体。

1: protein marker; 2: purification of polyclonal antibody.

图4 SDS-PAGE分析rRicin B蛋白多克隆抗体的纯化

Fig.4 Analysis of purification of rRicin B polyclonal antibody by SDS-PAGE



1: 洗涤后的沉淀; 2: 纯化后的rRicin B; 3: 蛋白分子量标准。

1: washed inclusion body of rRicin B; 2: purified rRicin B protein; 3: protein marker.

图5 Western blot检测兔抗重组蛋白rRicin B的免疫反应性  
Fig.5 Analysis of rabbit anti-rRicin B immunoreactivity by Western blot

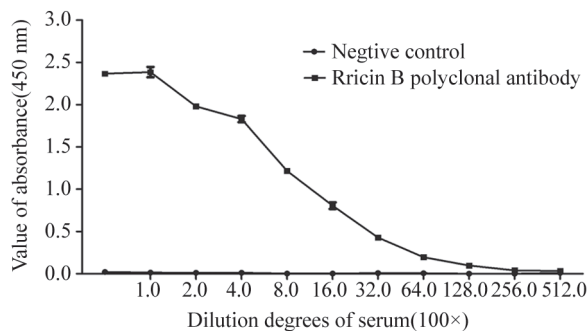


图6 不同稀释度纯化血清和阴性对照血清ELISA法检测结果  
Fig.6 ELISA results of different dilution degrees of serum and negative control

### 2.3 流式细胞仪定量检测细胞凋亡率

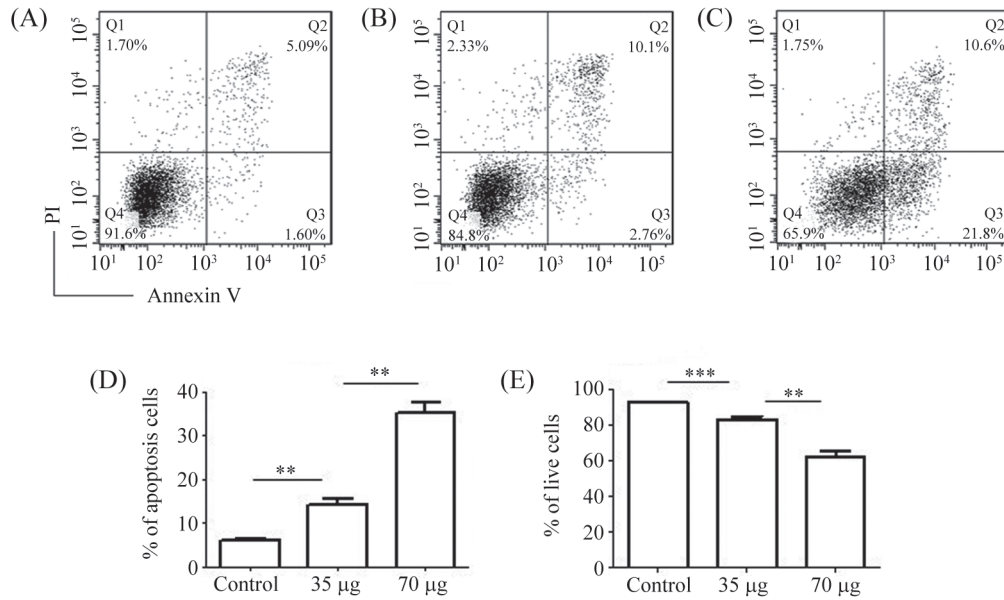
流式细胞术结合Annexin V-FITC/PI检测rRicin B作用于Hela细胞5 h后, 35  $\mu$ g、70  $\mu$ g rRicin B处理组的凋亡率, 随处理浓度的升高凋亡率增高, 较正常组相比, 差异具有统计学意义(图7)。由此可见, rRicin B能诱导Hela细胞凋亡, 且具有剂量依赖性。

### 2.4 流式细胞仪定量检测多克隆抗体对细胞凋亡的保护作用

流式细胞术结合Annexin V-FITC/PI检测rRicin B蛋白作用Hela细胞5 h后空白对照组、50  $\mu$ L多克隆抗体处理组、70  $\mu$ g rRicin B蛋白处理组、70  $\mu$ g rRicin B+50  $\mu$ L多克隆抗体保护组的凋亡率, 结果显示: 多克隆抗体成功阻断了rRicin B蛋白的Hela细胞毒性(图8)。

## 3 讨论

创伤弧菌溶细胞素作为创伤弧菌重要的致病因子之一, 是以溶血为特征且具有较强细胞毒活性的外毒素。Yamanaka等<sup>[11]</sup>和Kim等<sup>[12]</sup>发现, 单体形式的创伤弧菌溶细胞素能通过寡聚化与靶细胞膜表面的胆固醇特异性结合, 发挥溶胞作用。而利用SMART、Motif Scan、Motif Genome、ExPASy中的PROSITE、SWISS-MODEL等数据库对其进行同源性比对和预测分析, 得知溶细胞素第313-445位氨基酸与蓖麻毒素B链有很高的同源性。而RTB不仅是结合链, 且与细胞膜表面的受体结合后, 能诱导细胞凋亡、细胞因子的产生和脂质体过氧化等毒性作用<sup>[13]</sup>。Olson等<sup>[14]</sup>报道, 创伤弧菌溶细胞素单体由451个氨基酸组成, 其Gln<sup>1</sup>-Ala<sup>318</sup>与该毒素的细胞毒活性有关, 而His<sup>319</sup>-Leu<sup>451</sup>具有类蓖麻毒素结构域。Senoh等<sup>[15]</sup>通过将创伤弧菌溶细胞素第438位苏氨酸突变后, 发现该突变位点与该毒素与胆固醇的结合有关。Kashimoto等<sup>[16]</sup>对该毒素第314位苯丙氨酸突变后, 虽该突变位点位于细胞毒活性结构域中, 但由于其又毗邻类蓖麻毒素功能域这一特殊位置, 突变后的溶细胞素会造成溶细胞素的寡聚化功能。而我们发现, 通过克隆表达溶细胞素第313-445位氨基酸的类蓖麻毒素结构域, 其对Hela细胞亦具有明显的细胞毒性, 能引起Hela细胞发生细胞凋亡, 并呈剂量依赖性, 而通过多克隆抗体阻断该毒素活性后, 细胞凋亡率明显降低。我们的结果表明, 创伤弧菌溶细胞素类蓖麻毒素功能域可能具有引起细胞凋亡

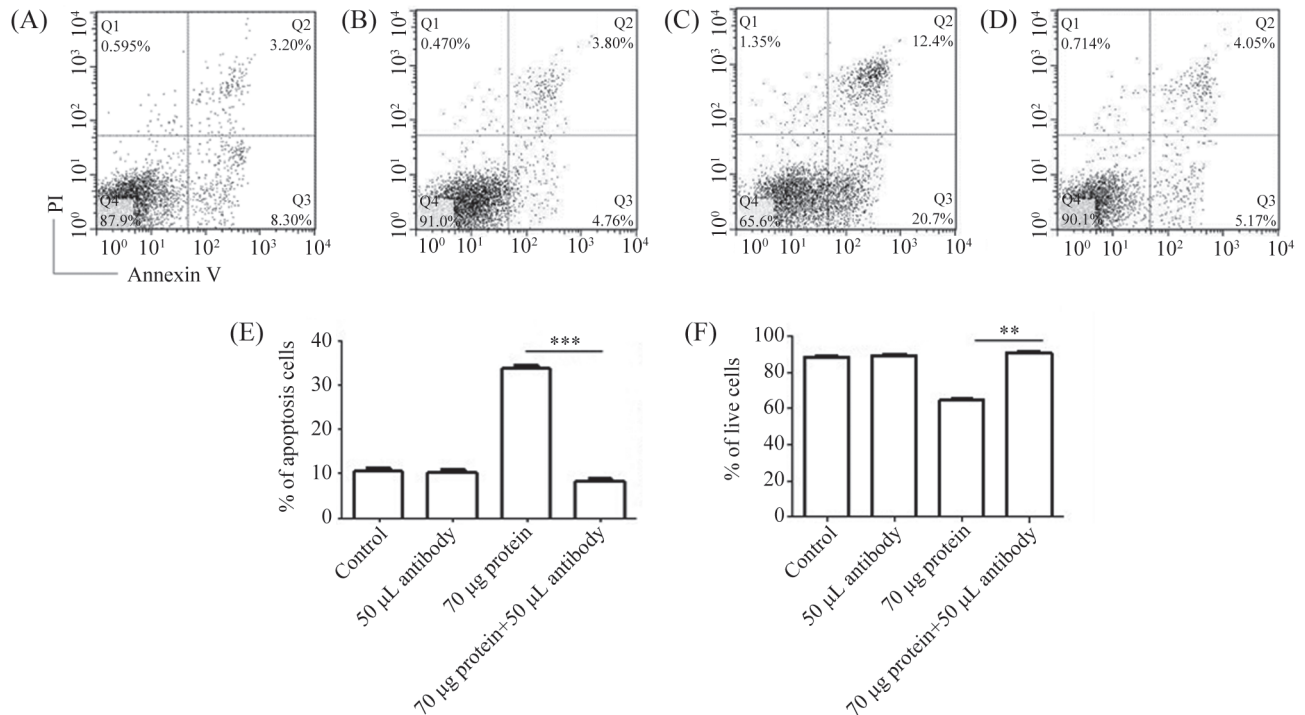


A: 空白对照组; B: 35 µg蛋白实验组; C: 70 µg蛋白实验组; D: rRicin B蛋白作用5 h后细胞凋亡数; E: rRicin B蛋白作用5 h后活细胞数。 \*\* $P < 0.003$ , \*\*\* $P < 0.0001$ 。

A: blank control; B: cells treated with 35 µg rRicin B; C: cells treated with 70 µg rRicin B; D: apoptosis cells after rRicin B treatment for 5 h; E: live cells after rRicin B treatment for 5 h. \*\* $P < 0.003$ , \*\*\* $P < 0.0001$ 。

图7 流式细胞仪分析细胞凋亡

Fig.7 Analysis of cell apoptosis by flow cytometry



A: 空白组; B: 抗体组; C: 70 µg rRicin B蛋白组; D: 70 µg rRicin B+50 µL抗体保护组; E: rRicin B蛋白作用5 h后的细胞凋亡数; F: rRicin B蛋白作用5 h后的活细胞数。 \*\* $P < 0.003$ , \*\*\* $P < 0.0001$ 。

A: blank control; B: antibody control; C: cells treated with 70 µg rRicin B; D: cell treated with 70 µg rRicin B+50 µL polyclonal antibody; E: apoptosis cells after rRicin B treatment for 5 h; F: live cells after rRicin B treatment for 5 h. \*\* $P < 0.003$ , \*\*\* $P < 0.0001$ 。

图8 rRicin B蛋白多克隆抗体对细胞的保护作用

Fig.8 Cell apoptosis after protected by polyclonal antibody of rRicin B

的功能。且其细胞毒性亦能被rRicin B免疫日本大耳兔获得的特异性多抗成功阻断。因此, 创伤弧菌溶细胞素虽然由溶细胞结构域和类蓖麻毒素结构域组成(前者与细胞毒性有关, 后者与细胞膜表面胆固醇结合形成寡聚化有关), 但我们的发现表明, 类蓖麻毒素结构域在创伤弧菌溶细胞素可能也有单独的细胞毒活性, 其细胞毒活性不仅局限于溶细胞素第1-318位氨基酸中的细胞毒结构域中<sup>[1]</sup>。

创伤弧菌溶细胞素单体的寡聚化是其发挥毒性的重要方式, 类蓖麻毒素结构域在体外发挥活性是单体形式还是多聚体形式? 类蓖麻毒素结构域为何不仅具有国外曾报道过的胆固醇结合功能<sup>[17]</sup>, 还具有细胞毒性? 其机制如何? 从溶细胞素整体功能上研究, 该段结构域又有何作用? 这些问题还需要我们深入的研究去加以明确。而我们目前的研究, 特别是rRicin B多抗(具有免疫特异性, 并能成功阻断rRicin B重组蛋白细胞毒性)的成功制备对进一步深入明确创伤弧菌溶细胞素功能和开发相应的疫苗有积极意义, 有望为阐明创伤弧菌的致病机理奠定基础, 为今后以此开发新药提供科学依据。

### 参考文献 (References)

- Hollis DG, Weaver RE, Baker CN, Thornsberry C. Halophilic vibrio species isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* 1976; 3(4): 435-31.
- Lee SE, Ryu PY, Kim SY, Kim YR, Koh JT, Kim OJ, *et al.* Production of *Vibrio Vulnificus* hemolysin *in vivo* and its pathogenic significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(1): 86-91.
- 李桂军, 楼永良, 严杰. 创伤弧菌溶细胞素基因在大肠杆菌中的表达及溶血活性鉴定. *中国人兽共患病学报*(Li Guijun, Lou Yongliang, Yan Jie. Expression of the cytolsin gene from *Vibrio vulnificus* in *E.coli* and identification of its hemolytic activity. *Chinese Journal of Zoonoses*) 2007; 23(9): 852-9.
- 李桂军, 谢旦立, 楼永良. 创伤弧菌溶细胞素基因重组蛋白复性条件的优化及溶血活性鉴定. *温州医学院学报*(Li Guijun, Xie Danli, Lou Yongliang. Optimization of fusion protein VVC condition of renaturation and identification of hemolytic activity. *Journal of Wenzhou Medical College*) 2007; 37(4): 320-3.
- 李桂军, 桂静, 肖美英, 楼永良. 创伤弧菌溶细胞素VvhA基因在大肠杆菌中的表达及其对应激因子的调控. *中华微生物学和免疫学*(Li Guijun, Gui Jing, Xiao Meiyang, Lou Yongliang. Expression of fusion protein VVC *E.coli* and its regulatory effect on the stressors. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*) 2008; 28(1): 24-8.
- Olsnes S, Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry* 1973; 12(16): 3121-6.
- 马嘉惠. 蓖麻毒素的研究与应用. *氨基酸和生物资源*(Ma Jiahui. *Amino Acids & Biotic Resources*)1999; 21(2): 54-8.
- Hegde R, Podder SK. Studies of the variants of the protein toxins ricin and abrin. *Eur J Biochem* 1992; 204(1): 155-64.
- 郭雅君, 叶美萍, 王帅. 重组创伤弧菌溶细胞素缬氨酸V201和V289突变对其活性的影响. *中国细胞生物学学报*(Guo Yajun Ye Meiping Wang Shuai. The mutation of valine 201 and valine 289 influences the activity of recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2012; 34(7): 659-66.
- 姚蔚, 周建娟, 李桂军, 谢旦立, 楼永良. 抗重组蛋白rVVC多克隆抗体的制备及其保护作用的鉴定. *温州医学院学报*(Yao Wei, Zhou Jianjuan, Li Guijun, Xie Danli, Lou Yongliang. Preparation of polyclonal antibody against recombinant protein rVVC and identification of its protection. *Journal of Wenzhou Medical College*) 2008; 38(6): 502-4.
- Yamanaka H, Satoh T, Katsu T, Shinoda S. Mechanism of haemolysis by *Vibrio vulnificus* haemolysin. *J Gen Microbiol* 1987; 133(10): 2859-64.
- Kim BS, Kim JS. Cholesterol induces oligomerization of *Vibrio vulnificus* cytolsin specifically. *Exp Mol Med*. 2002; 34(3): 239-42.
- Hegde R, Podder SK. Studies of the variants of the protein toxins ricin and abrin. *Eur J Biochem* 1992; 204(1): 155-64.
- Olson R, Gouaux E. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolsin (VCC) pro-toxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore. *J Mol Biol* 2005; 350: 997-1016.
- Senoh M, Okita Y, Shinoda S, Miyoshi S. The crucial amino acid residue related to inactivation of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Microb Pathog* 2008; 44(1): 78-83.
- Kashimoto T, Ueno S, Koga T, Fukudome S, Ehara H, Komai M, *et al.* The aromatic ring of phenylalanine 334 is essential for oligomerization of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *J Bacteriol* 2010; 192(2): 568-74.
- Miyoshi S, Abe Y, Senoh M, Mizuno T, Maehara Y, Nakao H. Inactivation of *Vibrio vulnificus* hemolysin through mutation of the