

研究简报

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00452

褶纹冠蚌 alpha2 巨球蛋白基因的分子克隆与序列分析

胡宝庆 谢彦海 代功园 文春根

(南昌大学生物科学系, 南昌 330031)

MOLECULAR CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF ALPHA2-MACROGLOBULIN FROM *CRISTARIA PLICATA*

HU Bao-Qing, XIE Yan-Hai, DAI Gong-Yuan and WEN Chun-Gen

(Department of Bioscience, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

关键词: 褶纹冠蚌; alpha2 巨球蛋白; 基因克隆; 序列分析

Key words: *Cristaria plicata*; Alpha2-macroglobulin; Cloning; Sequence analysis

中图分类号: Q959.215 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207 (2010) 02-0452-07

alpha2 巨球蛋白(α 2M)是一类广谱的蛋白酶抑制因子, 存在于许多无脊椎或脊椎动物的血浆中^[1]。它不仅可以与机体内过量的蛋白酶相结合产生 α 2M-蛋白酶复合物, 清除血液中流动的蛋白酶^[2], 还能与细菌内毒素脂多糖, 丝裂原 ConA、PHA 结合, 通过调节释放其活性; 同时还参与抗原递呈^[3]。因此, α 2M 在动物的先天性免疫中起着极其重要的作用^[4]。

从人的血浆中分离出 α 2M 蛋白硫酯区的保守半胱氨酸残基与补体 C3 具有高度的一致性^[5]。非洲钝缘蜱 (*Ornithodoros moubata*) 血细胞中克隆出的 α 2M 基因含有两个不同的亚基可能在早期进化中拥有共同的起源^[6]; 锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 血细胞中克隆出的 α 2M 基因含有三个功能区域^[7]; 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的 α 2M 基因与补体 C3, C4 在进化中拥有共同的起源^[8]; 虽然栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 与美洲鲎 (*Limulus polyphemus*)、鼠 (*Mus musculus*)、人 (*Homo sapiens*) 的 α 2M 基因有较高的同源性, 但它们的 α 2M 基因诱饵区具有较大的差异^[9]。三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 则报道了 α 2M 基因全长序列, 发现该基因仅在血细胞中有表达^[10]。目前, 还有美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*)^[11]、河螯虾 (*Astacus astacus*)^[12]以及真蛸 (*Octopus vulgaris*)^[13]等 α 2M 基因的报道。

褶纹冠蚌 (*Cristaria plicata*) 与三角帆蚌在我国俗称

为“淡水育珠蚌”, 由于褶纹冠蚌容易感染蚌病, 给其育珠能力产生了较大的影响。本文通过对褶纹冠蚌 α 2M 基因的克隆及序列分析, 以期为贝类的抗病品种的选育及病害诊断提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

褶纹冠蚌采自鄱阳湖, 体长 18—25 cm, 暂养于水族箱中, 不间断充氧; 3d 后, 用 5 mL 注射器从蚌闭壳肌血窦中抽取血液 10 mL; 4 , 3600 r/min 离心 5 min; 弃上清, 获得细胞沉淀用于 RNA 提取。

1.2 方法

α 2M 基因受体结合区片段的克隆 总 RNA 的提取采用 Invitrogen 公司的 Trizol 法。RNA 的完整性用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用紫外分光光度计进行定量及纯度分析。取 1 μ g 总 RNA 利用 Clontech 公司的 PowerScriptTM Reverse Transcriptase 进行 cDNA 第一链的合成。受体结合区片段的克隆所用引物参考栉孔扇贝^[9] α 2M 基因受体结合区序列设计, 引物为: α Rup (5'-GGTTGTGGTGAACAAACATG G-3'), α Rdown (5'-GTATCCATCCAAAACCATCTT -3')。采用 *Taq* DNA 聚合酶 (TAKARA 公司), 25 μ L 体系进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 90 s, 35

收稿日期: 2008-09-03; 修订日期: 2009-08-12

基金项目: 国家自然基金(30960296); 江西省科技攻关项目(2004); 江西省自然科学基金(GZN1923)资助

作者简介: 胡宝庆(1972—), 男, 江西鄱阳人; 讲师; 主要从事水产动物疾病研究。E-mail: baoqinghu@sina.com

通讯作者: 文春根(1963—), 男, 江西南昌人; 教授, 博士; 主要从事水产动物疾病研究。E-mail: cgwen@ncu.edu.cn

循环; 72°C 10 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后, 利用 BBI 公司的 Gel Extraction Kit 进行切胶回收后, 转入到 T 载体 pMD18-T 中, 挑选阳性克隆测序。

α2M 基因 5' I 区片段的克隆 根据 Genbank 中已报道的三角帆蚌及栉孔扇贝 α2M 基因序列进行同源性比对, 利用 Prime5.0 软件设计 5' I 区上游简并引物 5'Iup (5'-ACSCCMMAATGKCTAYAGAAC-3'), 再根据所得 α2M 基因受体结合区片段设计 α2M 基因 5' I 区片段下游特异性引物 5'Idown(5'-ATATTGGGGACCAGGATG-3'), 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94°C 5min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 90s, 35 循环; 72°C 10 min。

α2M 基因 5' II 区片段的克隆 采用 α2M 基因 5' I 区片段的克隆同样的方法分别设计出 5' II 区上游引物 5' II up (5'-ATCCWKGGGGTRTGCGRGTT-3') 和下游引物 5' down (5'-TGAGAACCACTGGGTGATAGT-3'), 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 60s, 30 循环; 72°C 10 min。

α2M 基因 3'末端及 5'末端克隆 采用 Smart RACE PCR 技术, 利用巢式 PCR 方法进行 3'末端及 5'末端克隆, 根据已知中间片段分别设计出 3'末端上游特异性引物 3'out (5'-ACTTGCCCTCCGCAGACCACTCA-3') 及 3' in(5'-AGGTCCAGGTCTGACATCGACAACT-3'); 5'末端下游特异性引物 5'out (5'-GAAAACAGGGTTATCCCACTTGG-3') 及 5'in (5'-CCATCATGGGAAAAGTTGTGCAG-3')。RACE 通用引物采用 Clontech 公司 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 中的引物, 为 Long (5'-

CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATC-ACGCAGAGT-3'), Short (5'-CTAATACGACTCACTA-TAGGGC-3'), Nup (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCA-GAGT-3')。进行 PCR 扩增, 3'末端克隆先采用 3' out 引物与 UPM 引物(short 与 long 的混合引物)进行扩增, PCR 反应条件为: 94°C 5min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s, 30 循环; 72°C 10min。将所得 PCR 产物稀释 50 倍后, 作为 3' in 引物与巢式引物 Nup 扩增所用模板, PCR 反应条件为: 94°C 5min; 94°C 30s, 59°C 30s, 72°C 60s, 30 循环; 72°C 10 min。5'末端克隆先采用 5'out 引物与通用引物 UPM 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94°C 5min; 94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 3min, 25 个循环。将所得 PCR 产物稀释 50 倍用做 5'in 引物与巢式引物 Nup 扩增所用模板, PCR 反应条件为: 94°C 5min; 94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 3min, 25 循环。

α2M 基因序列的生物信息学分析 多序列的比对分析是通过 Clustal X 软件进行。信号肽分析由 SignalP 3.0 Server 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行。保守序列分析由 CDART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>)软件进行, 基于氨基酸序列的系统进化树采用 Mega4.0 软件邻接法建立(表 1), 并用自展法(Bootstrap Method)对其可靠性进行分析验证(100 个假重复数)。

2 结 果

2.1 褶纹冠蚌 α2M 基因序列

褶纹冠蚌 α2M 基因受体结合区长度为 1249 bp, 5'I

表1 用于系统发育分析的17种动物 α2M 氨基酸序列

Tab. 1 17 species and GenBank accession number of α2M proteins sequence to construct the phylogenetic tree

种名 Species	GenBank 登录号 GenBank accession number
褶纹冠蚌 <i>Cristaria plicata</i>	ACF39935
三角帆蚌 <i>Hyriopsis cumingii</i>	ABJ89824
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	AAR39412
美洲鲎 <i>Limulus polyphemus</i>	BAA19844
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	ABI79454
罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	ABK60046
日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i>	BAC99073
锯缘青蟹 <i>Scylla serrata</i>	ABD61456
日本叉牙七鳃鳗 <i>Lethenteron japonicum</i>	BAA02762
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	BAA85038
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AAY98517
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_990557
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NP_036620
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	AAA39508
豚鼠 <i>Cavia porcellus</i>	BAA12316
牛 <i>Bos taurus</i>	NP_001103265
人 <i>Homo sapiens</i>	AAT02228

区片段 1939 bp, 5' 区片段 863 bp, 3'末端 1174 bp 及 5' 末端 807 bp, 序列比对与拼接后, 得到 $\alpha 2M$ 基因全长序列(登录号: EU836052)为 5621 bp, 其中编码区 5226 bp, 5' 端不翻译区 32 bp, 3'端不翻译区 363 bp(含 polyA 尾 31 bp)。 $\alpha 2$ 巨球蛋白基因序列开放阅读框编码 1741 个氨基酸, 其中前 16 个氨基酸残基为信号肽序列, 成熟蛋白含 1725 个氨基酸残基, 分子量为 195 kD, 等电点为 5.12。

氨基酸序列中存在 7 个 N-Linked 糖基化位点，分别位于氨基酸的 120、325、401、632、1147、1482、1662 位置。氨基酸序列中同样存在 α 2M 家族中非常保守的内部硫酯键。

将褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因氨基酸与其他动物的 $\alpha 2M$ 基因氨基酸序列进行比对,发现褶纹冠蚌与三角帆蚌 $\alpha 2M$ 基因具有 78%的一致性,相似性为 85%;与栉孔扇贝 $\alpha 2M$ 基因具有 47%的一致性,相似性为 64%;与美洲鲎 (*Limulus polyphemus*) $\alpha 2M$ 基因具有 37%的一致性,相似性为 58%。

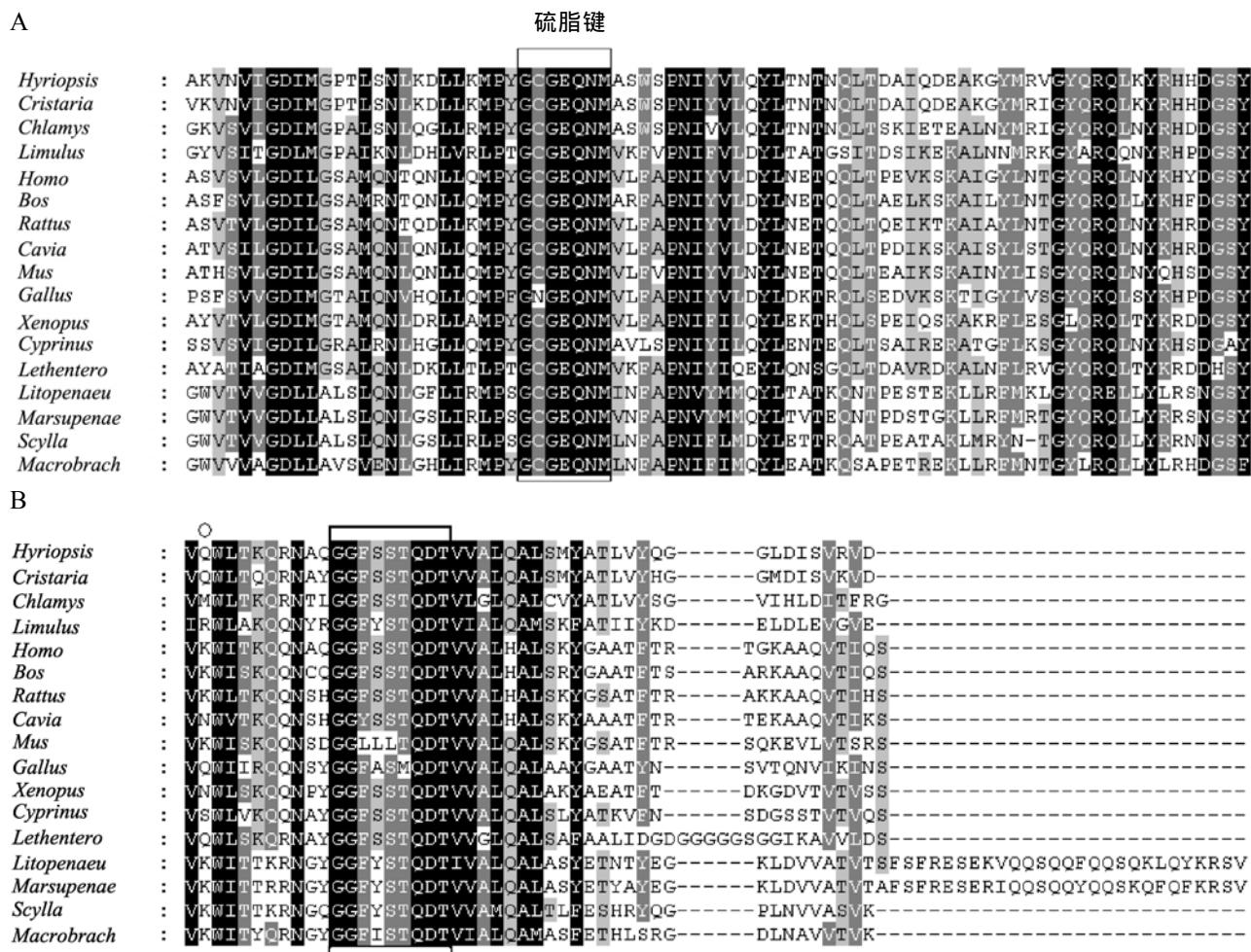
2.2 褶纹冠蚌 $\alpha2M$ 基因功能区域

将褶纹冠蚌与其他动物的 $\alpha 2M$ 基因氨基酸序列进行比对,发现褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因主要的功能区域也分

为：诱饵区，内部硫酯键和受体结合区。诱饵区位于氨基酸的 792—839 位置，与其他动物的诱饵区相似性较低；褶纹冠蚌 $\alpha2M$ 的内部硫酯键氨基酸序列 GCGEQNM 与其他动物 $\alpha2M$ 的内部硫酯键完全一致(图 1)。其内部硫脂键除组成的半胱氨酸残基 1084 和谷氨酰胺残基 1087 非常保守外，周围的序列也具有一定的保守性，并且这段序列中的 Cys 残基也较为保守。褶纹冠蚌和其他动物 $\alpha2M$ 基因受体结合区的 C 末端一样，也显示出较高的相似性，在此区域中也能发现负责受体结合功能的 Lys 残基；褶纹冠蚌与其他动物受体结合区的 N 末端都存在比较保守的 GGFSSTQDT 序列。

2.3 褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 氨基酸序列系统发育分析

利用邻接法(Neighbor Joining)将褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 氨基酸与 16 种动物的 $\alpha 2M$ 氨基酸序列进行系统发育分析,发现褶纹冠蚌与软体动物三角帆蚌、栉孔扇贝的 $\alpha 2M$ 氨基酸亲缘关系最近,并且与其他无脊椎动物聚齐成一大簇(图 2)。



Hyriopsis : --TPSKSYQTGINDSNSVLTTWDIS PQTTC-----LNVQVQGKGCTMVQANMKYNIYKDEEKETGQASFEVKVSVYRSR
Cristaria : --MPNSIYQTGINDSNSVLTTWDIS PQTTC-----LSVNQVQGKGCAMVQANMKYNIKEKKEKE-GPTSFHVRVNLYRSR
Chlamys : --IRNEEKSESIQDNNMLVLOSSP LEVV PDT-----LEAEVYVGVCAMVQAHMKYNIIDE PPAGP-----AFNLRVNAFRSR
Limulus : --SSGFEKKIMLTKDNLIMCQTFRQTVPSP-----VDFEATGSGCGLVQTSLRNVNT PPRK-----GFHLEVTVKRG-
Homo : --SGTFSSKFQVNNRLLQQVSLP-ELPG-----EYSMKVITGEGCVYLQTSLKYNI--LPEKE-EFPFALGVQTLPQTC
Bos : --SGTFSTKFQVNNRLLQQVSLP-EVPG-----EYSMSVTGEGCVYLQTSLKYNI--LPKKD-EFPFALEVQTLPQTC
Rattus : --SGTFSTKFQVNNRLLQQVSLP-TVPG-----DVTVKVTTGEGCVYLQTSLKYSV--LPREE-EFPFTVVVQTLPGTC
Cavia : --SGTFSTNFEVNHNRLLQQVSLP-TVSD-----SYTITVTTGEGCVYLQTSLKYNV--PSEKG-TFPFALEATVQAC
Mus : --SGTFSKTFHVNSGNRLLQQVSLP-DLPG-----NYVTKGSGSGCVYLQTSLKYNI--LPVADGKAPFALQVNTLPLNF
Gallus : --KNTFEVETVNNENRLLQQVSLP-QVPG-----KYSLTVNGTGCVLIQTA LRYNI--HLPEG-AFGF SLSVQTSNASC
Xenopus : --KTGFHQQFHVDTNRLLQQVSLP-DI PG-----EFSLSVTGSGCVYIQTVLRYNI--PPPRS-DATF SVRVTQPDKC
Cyprinus : --VG-DTHFHDVNQDNKLLYQEKQI-Q-NVPA-----KYSIEVKGSTDVSVQVAQFYNI--PTPTE-AKTLSDIADKIEE
Lethentero : --AHTLLREVSIDNSTMAILLHQVQIPEPPVAPMVSSCTVEATGQGCAFLQVSLKYN-----PPKSS-KPKFSLSVETNPANC
Litopenaeu : PTVGNLVLHEFTIINEDNSKLLQQVSLP-DF PTY-----VKISMEQGQGCAVMOAVLRYNV PVAE PSD-----AFSLKVDGDN
Marsupenae : ETANNFVHEFTIINEDNSKLLQQVSLP-DF PTY-----VKITMEQGQGCSVMKA VLRNV PVAE PSD-----AFSLKVDAIN
Scylla : --AEGLEHTENVNDDNKLQLQKLTDEILPTQ-----VNLTMTGDCAVLQGVLRN V PNAE PSD-----AFDLTVNTIT
Macrobrach : --STGLTHSFKVDEQNKLLQQVTVPSF PTT-----ISLNLEGTGCTLMOAVLRYNIPEPE PSD-----AFGLTVSART

Hyriopsis : TNIDNCRKRTLRLICARVYALP-NFSNMAIVEVKMITGWIPVMSVTKELLAAK--QI QKYEINPDNVDFYFDEFDSQERCFA
Cristaria : SDIDNCRKRTLRLICRVKXALS-NVSNMAIVEVKMVSGWIPVMSVVKELAATK--QI QKFEINPDNVDFYFDEFDSQERCFA
Chlamys : EMGNDCRKRTLNLICASETGP-GGS-VILV DVMITGRV EVT STLDELVNQD SLEI QKYEVDGNLVHIIYFDKFDSAGQCFY
Limulus : -LYRDCINAHIACTVKYDGKGGVSNSM AIVEEMKMSVWIEDEESI KNI VDREELNLR RYEVDGNQNL NLYFSELT DQNL CFN
Homo : DEPKAHTSFQIISLSVSYTGSRSA SNSM AIVE DVMKMSVGFIPKPTVKMILE--RSNHVSRT E VSSN HVL IYLDK VSN-QT LSL
Bos : DGPKAHTSFQIISLSVSYTGSRSA SNSM AIVE DVMKMSVGFIPKPTVKMILE--RSN-VSRT E VSSN HVL IYLDK VTN-ETL TL
Rattus : EDPKAHTSFQIISLSVSYTGSRSA SNSM AIVE DVMKMSVGFIPKPTVKMILE--RSVHVSRT E VSSN HVL IYLDK VSN-QT VNL
Cavia : DGPKAHTSFQIISLSVSYTGSRSA SNSM AIVE DVMKMSVGFIPKPTVKMILE--KSEHISRT E VSSN HVL IYLDK VSN-QT LSL
Mus : DKAEDHRTFQIIRNVSYTGGERPSSN M V DVMKMSVGFIPKPTVKMILE--DQPNIQT E VNTN HVL IYIEKL TN-QT LGF
Gallus : PRDQPGK-FDIVL I S YTGKRS SNSM V DVMKMSVGFIPKPTVKMILE--DDHTV M QVEYKKHVL IYLDK VDN QL KRR KEV
Xenopus : P-QHPLEVIKINITA E YTGSR E KNSM AIVTECKM LSGFIPKPTVKMILE--KSKTIKRSEI QTDMV TLYL D E L G H-EPLNL
Cyprinus : DCKTLGQNFILNFTVKKDGLQERTN M V D KLLSG E TAD T M L G TSS GKY APL V E R V D A K D D H V I V Y L K E I P N N I P M N Y
Lethentero : S-KAARKGQI N V E V S Y H G E R G E S N M A I V E V M V M I S G Y S A V K S S L K E L Q T - F Y D F V K K V E V D A S R V V I Y L D K V D K - K P I A I
Litopenaeu : A P G R D C A R K R I R A C S A V I L P D G E S N M A I V E V M V M I S G Y S A V K S S L K E L Q T - F Y D F V K K V E V D A S R V V I Y L D K V D K - K P I A I
Marsupenae : A P G R D C D R K R I R A C S A V I L P D G E S N M A I V E V M V M I S G Y S A V K S S L K E L Q T - F Y D F V K K V E V D A S R V V I Y L D K V D K - K P I A I
Scylla : V P D R L C A T K R I T A C A S Y R L P D G A S N M V V I E V D L I S G Y I E D K D D L K L L T K Q D - K N I T R Y E V D G S K I N F Y I N E L T V - K D T C V
Macrobrach : V R D K A C V T K Q M E F C A S Y L L S D G K S N M V V I E V D L I S G Y I E N K D D L K R I V G S S - N R V K R Y E V D G S K V S F Y V D E L T S - E R L C G

Hyriopsis : F E V E Q T D I V V T D P K P A I I K -----V Y D Y Y E T K D S V M I L Y D I K T
Cristaria : F E V E Q S D I E V S N P K P A I I K -----V Y D Y Y E I K H S L M I L Y E I K T
Chlamys : F D V E Q - D I K V T D P K K A F I K -----V F D Y Y E T D L Q V V I Q N L R T
Limulus : F W L E Q - D I E V Q E T K P A T I R -----L Y D Y Y E L E Q E V V T S Y S I D E
Homo : F F T V L Q D V P V R D L K P A I V K -----V Y D Y Y E T D E F A I A E Y N A P C
Bos : T E T V L Q D I P V R D L K P A I V K -----V Y D Y Y E T D E F A V A E Y S A P C
Rattus : S E T V V Q D I P I R D L K P A V V K -----V Y D Y Y E K D E F A V A K Y S A P C
Cavia : S E F V V Q D I E V R D L K P A I I K -----V Y D Y Y E T N E F A I A E Y H A P C
Mus : S F A V E Q D I P V K N L K P A P I K -----V Y D Y Y E T D E F T V E E Y S A P F
Gallus : T E S V E Q D F V V T H E K P A D V Q -----I Y D Y Y E T E E Y A V A E Y M S L C
Xenopus : F E T V E Q D I V V K N L K P A T V K -----V Y D Y Y E T G E E A V A E Y N S P C
Cyprinus : Q I Q M K Q V L P V K N L K P A V V K -----V Y D Y Y Q T S D Q S E T E Y S F H C
Lethentero : K L S V T Q D I A V D N L Q P A T V R -----V Y D Y Y A T E D A A T S M Y S A P C
Litopenaeu : A F N I L R E V E V E N T K P G T V -----V V Y D Y Y E P D F A V S T T Y A F P Y
Marsupenae : T F G I L R A V K I E D T K P G S V -----V V Y D Y Y E P D F A V S Q S Y T F P Y
Scylla : N E R V T R T V D V E D V K P G T V G G V R L L P G G V L H L H G G T R C H L T T S A A N A R P S R S P S R T T N P P N
Macrobrach : D I G I I R E V T V E D V K P G S V -----V V Y D Y Y Q P E F S L S K S F T L P P

C

125-142

Hyriopsis : GKKLFMHDEKDVWTAKNITL I Q T D K E Q Y K P G Q T V K F R I L R M D Y R L L P L - T D L F E L I T I D N E G G V R V M O W K N M D V S K -----
Cristaria : GKEFLSHEKTVDWTAKNITL I Q T D K E Q Y K P G Q T V K F R I L R M D Y R L L P L - T D L F E L I T I D N E G G V R V M O W K N M D V S K -----
Chlamys : N G E E F T H K T E V T I Q E S S T I L I Q C D K E M Y K P G Q T V K F R I M T I D A M L K P K - T E T I S M V S I E N P S G I R V R Q W R D V M N M S K -----
Limulus : S S N D F F E K D I N M H D K D L I V E V Q T D K E I Y K P G Q T V K F R I V V S M D E N F H P L - N E L I P L V Y I Q D P K G N R I A Q W Q S F Q L E G -----
Homo : P T Q E F K K R T T V M V M K N E D S L V E V Q T D K S I Y K P G Q T V K F R I V V S M D E N F H P L - N E L I P L V Y I Q D P K G N R I A Q W Q S F Q L E G -----
Bos : P T Q E F K K R T T V M V M K N E D S L V E V Q T D K S I Y K P G Q T V K F R I V V S M D E N F H P L - N E L I P L V Y I Q D P K G N R I A Q W Q S F Q L E G -----
Rattus : A T H E F R R R S T V M V M K K E S L V E A Q T D K E I Y K P G Q T V R E R V V S L D E S F H P L - N E L I P L V Y I Q D P K G N R I A Q W Q S F Q L E G -----
Cavia : P T H G F R S R K T V M V M K S D L S V E V Q T D K E I Y K P G Q T V K F R I V V S M D E N F H P L - N E L F P L I F I Q D P K G N R V M O W Q N I K L E R -----
Mus : P T Q R E I K K K S I Q I I K A E S P V E V Q T D K E I Y K P G Q I V K F R I V V S D I S F R P L - N E T F P V V Y I E T P K R N R I F Q W Q N I H L A G -----
Gallus : T T F D L K E R R S V M I W N M E S F V E V Q T D K E I Y K P G Q S V M E R V V A L D F N F K P V - Q E M Y P L I A V Q D E Q N N R I F Q W Q N V T S E I -----
Xenopus : G G E T I S N S S K V L V K K A R T S I F V Q T D K A I Y K P G Q T V R F R V V S L K E N L Q P E - E S Q V P T I E L Q D E G K N R I G Q W Q N V S L Q Q -----
Cyprinus : E S P K M T E E R K V I F R S Y H P L T F I Q T D K E I Y I P G Q T V N R V V T M D T H F A P L - D Q Q Y G S V V L E D S Q G N R I G Q W Q N V S S T R -----
Lethentero : E G L N E T K T H A V V V R K V K D V V F Q T D K E V Y K P G Q S V K F R V V T L D E N F A T V - L K T Y A L I Y I E D E Q R N R I A Q W R N A S G R A -----
Litopenaeu : G G A S V E E T V E V S L I R R S R N L T F I Q T D K Y L Y Q P G Q E V K F R I L T V Y G W K S L V S R E K Y S E I W V T S P S Q T R I A Q W K R V D N S A -----
Marsupenae : N G A S V E E T V E V A L R N N R N K T F I Q T D K Y L Y Q P G Q E V K F R I L T V Y G W K S L V Y T E K Y S E I W V T S P S Q T G I G O W K R V D N S A G L V -----
Scylla : N G T S V E E T V E V A L R N N R N K N E I K T D K E I Y Q P G Q E V K F R I L T V Y G W K S L V Y T E K Y S E I W V T S P S Q T G I G O W K R V D N S A G L V -----
Macrobrach : G G V S V N Y T E S I E V E N Q K K V T V I Q T D K Y L Y Q P G Q T V K F R I L S F S G F M D I S T K D Y P I V W V T S P S Q T R I A Q W R N V D N S N -----

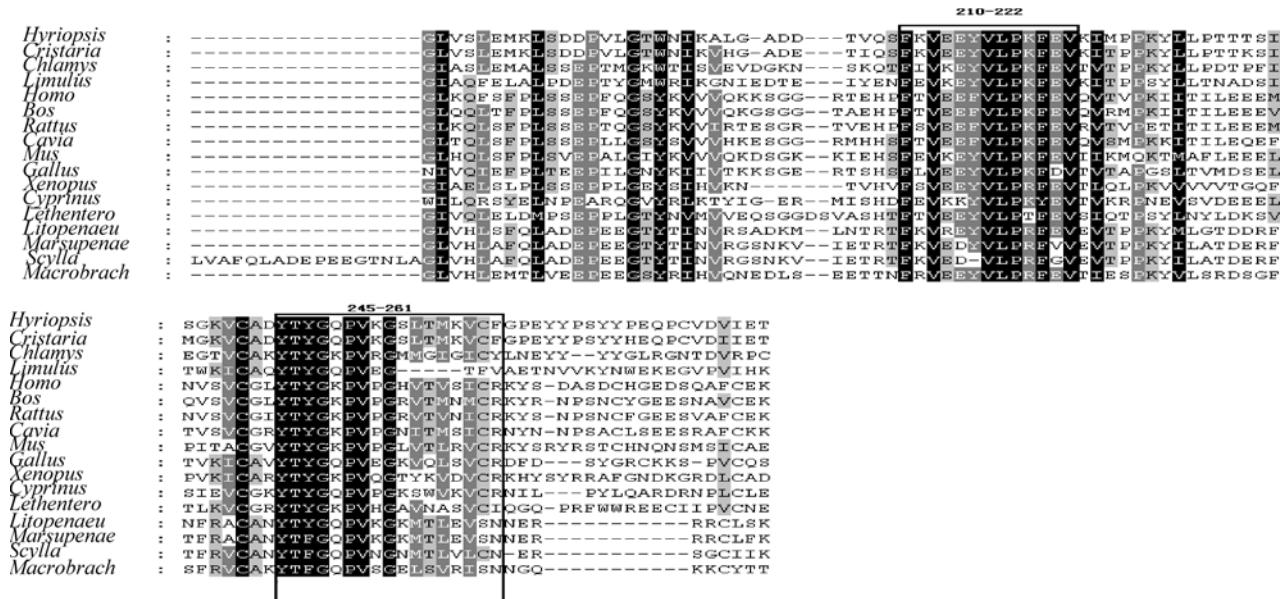


图 1 利用 Clustal X 软件将褶纹冠蚌与其他动物的 α2M 氨基酸序列进行多序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of α2M amino acid sequences of *Cristaria plicata* with other animals using ClustalX

A. 内部硫酯区; B. 受体结合区 N 末端序列比对结果, 实线框中表示保守的 GGFSSTQDT 序列, 实心圈代表保守的赖氨酸位点, 空心圈则代表褶纹冠蚌 α2M 中被替代的赖氨酸位点; C. 褶纹冠蚌 α2M 基因 N 末端的保守的氨基酸序列 (125—142, 210—222, 245—261), 分别用黑色框框起表示; 图中用下划线标示的为褶纹冠蚌 α2M 基因

A. The thiol ester domain; B. The N-terminus of the receptor-binding domain; The conserved GGFSSTQDT sequence is shown in solid boxes; The conserved lysine position is shown in filled circle. The replaced lysine positions in *Cristaria plicata* is shown in hollow circle; C. The conserved amino acid blocks (125—142, 210—222, 245—261) are boxed; The *Cristaria plicata* α2M is denoted by a single underline

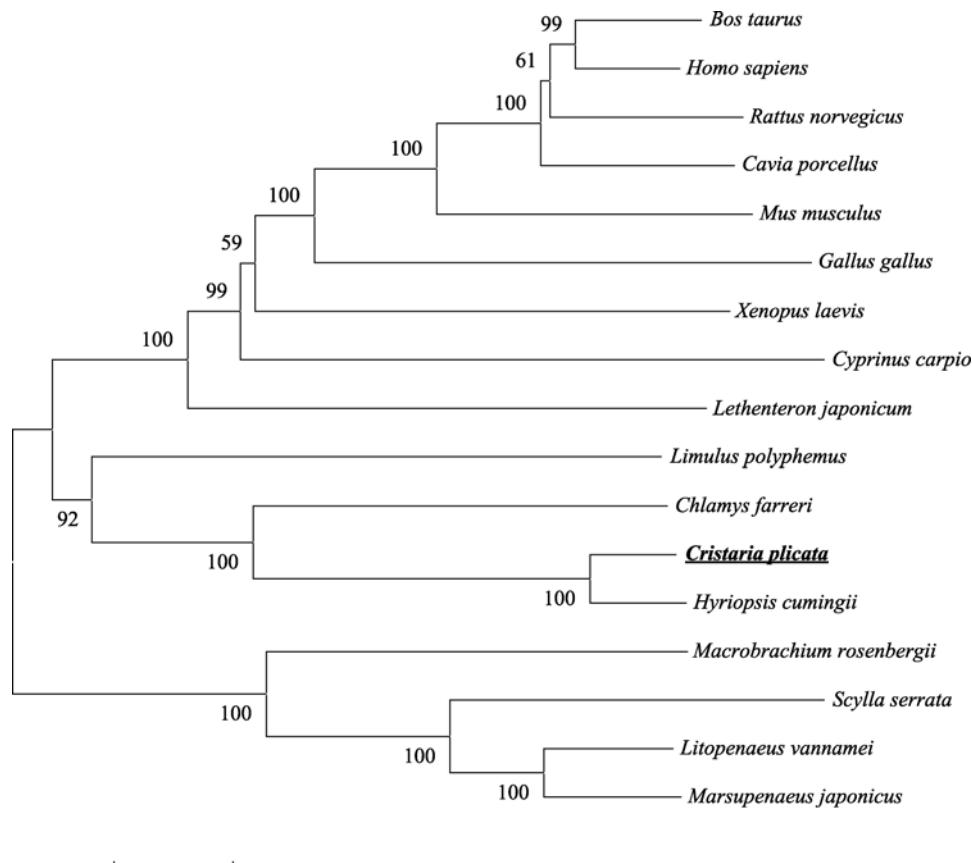


图 2 利用邻接法建立 17 种动物 α2M 氨基酸序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed with the neighbor joining method from α2M amino acid sequence of 17 species animals

3 讨 论

3.1 褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 氨基酸序列

$\alpha 2M$ 基因存在于各类低等和高等动物中, 其基因大小及编码的氨基酸数具有一定的差异。人的 $\alpha 2M$ 基因全长 4596 bp, 编码 1499 个氨基酸; 柄孔扇贝的 $\alpha 2M$ 基因全长 6420 bp, 编码 1719 个氨基酸^[9]; 三角帆蚌 $\alpha 2M$ 基因全长 5124 bp, 编码 1611 个氨基酸^[10], 而褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因全长 5621 bp, 编码 1741 个氨基酸。 $\alpha 2M$ 基因的 3' 非编码区的部位也存在较大的差异。褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因 3' 非编码区 PolyA 之前含有 332 个碱基, 在三角帆蚌 $\alpha 2M$ 基因中 3' 非编码区 PolyA 之前仅含有 222 个碱基^[10], 但在柄孔扇贝中却发现此部位含有 1209 个碱基^[9]。 $\alpha 2M$ 是一类糖蛋白, 许多动物 $\alpha 2M$ 基因中都发现相应的 N-linked 的糖基化位点, 凡纳滨对虾 $\alpha 2M$ 基因中含有 9 个 N-linked 糖基化位点^[8], 锯缘青蟹 $\alpha 2M$ 基因中含有 11 个 N-linked 糖基化位点^[7], 非洲钝缘蜱 $\alpha 2M$ 基因中含有 13 个 N-linked 糖基化位点^[12], 日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 和斑节对虾 (*Penaeus monodon*) $\alpha 2M$ 基因中都含有 8 个 N-linked 糖基化位点^[14,15]。褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因中则含有 7 个 N-linked 糖基化位点。

3.2 褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因功能区域

$\alpha 2M$ 基因具有内部硫酯区、受体结合区和诱饵区三个保守的功能区^[16]。褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因同样含有这三个功能区。哺乳动物 $\alpha 2M$ 基因硫酯区中的硫脂键是由 Cys 和 Gln 所组成, 并且硫脂区周围的基因具有非常高的保守性^[8], 在柄孔扇贝中也发现其硫酯区及其周围的基因与其他动物 $\alpha 2M$ 基因一样具有非常高的保守性^[9]。将褶纹冠蚌与其他动物的 $\alpha 2M$ 基因硫酯区比对, 结果发现褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因的硫酯键是由 Cys (1084) 和 Gln (1087) 组成, 并且环绕着褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因内部硫酯区序列的保守性也非常高。将凡纳滨对虾与其他动物的 $\alpha 2M$ 基因比对, 结果发现其基因的 N 末端中有三个保守性较高的氨基酸序列段^[4], 而褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因与其他动物 $\alpha 2M$ 基因比对, 同样发现在 N 末端具有三个保守性较高的氨基酸片段, 推测这些区域的氨基酸在结构或功能上具有共同的作用。 $\alpha 2M$ 基因在动物的早期进化中是一个非常重要的先天性免疫相关蛋白, 并且其“捕获”蛋白酶的能力对物种本身具有重要的生理学意义^[17]。 $\alpha 2M$ 基因的受体结合区位于 C 末端, 具有通过结合外源细胞表面受体, 从而产生一种受体介导的胞吞作用的功能^[18]。日本囊对虾与其他动物的 $\alpha 2M$ 基因受体结合区比对, 发现其受体结合区具有高度的保守性, 并含有许多保守赖氨酸残基^[14], 这些保守的赖氨酸残基被认为与 $\alpha 2M$ 基因受体结合功能有重要的关联^[19,20]; 将褶纹

冠蚌与其他动物的 $\alpha 2M$ 基因比对, 同样发现其受体结合区具有高度的保守性, 并且包含了 7 个保守赖氨酸残基 (1345、1436、1492、1501、1505、1552、1557), 其中 1345 位点和 1557 位点分别被谷氨酰胺和苏氨酸替代。这些氨基酸的替代现象在三角帆蚌和鲎 $\alpha 2M$ 基因中也能发现, 这可能会导致低等动物与哺乳动物 $\alpha 2M$ 基因的受体结合能力有一定程度的差异^[21]。另外, 受体结合区 N 末端也非常的保守, 其中的序列 GGFYSTQDT 在其他各种动物 $\alpha 2M$ 基因中也能发现。人、鼠等 $\alpha 2M$ 基因受体结合区 C 末端有一段非常保守的氨基酸序列 GFIPLKPTVK, 该序列可能与其受体结合功能有直接关系^[18]。此序列在褶纹冠蚌中则被 GWIPVKSSVK 代替, 推测其保守的几个氨基酸在功能上起决定性作用, 而发生变化的氨基酸则可能是在物种的进化中受到各种因素的影响发生了适应的变异。褶纹冠蚌与其他动物 $\alpha 2M$ 基因诱饵区在氨基酸的组成和序列长短都具有较大的不同, 将凡纳滨对虾^[8]、斑节对虾^[15]、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)^[22]、锯缘青蟹^[7]以及人的 $\alpha 2M$ 基因诱饵区比对, 同样发现存在这样的差异。这种诱饵区的差异性可能是由于宿主与病原菌之间的协同进化引起, 从而清除由特异性病原菌产生的蛋白酶而不会破坏宿主自身的所必需的蛋白酶^[23]。

3.3 褶纹冠蚌 $\alpha 2M$ 基因氨基酸序列系统发育

褶纹冠蚌与三角帆蚌和柄孔扇贝同属于软体动物, 系统发育树也显示褶纹冠蚌与两者的 $\alpha 2M$ 基因亲缘关系最近; 另外, 褶纹冠蚌与节肢动物的鲎及日本囊对虾、凡纳滨对虾、锯缘青蟹的 $\alpha 2M$ 基因也聚集为一大簇; 而与两栖类和哺乳类动物的 $\alpha 2M$ 基因亲缘关系较远, 这与动物的经典分类一致。推测也可能是 $\alpha 2M$ 基因在进化过程中在环境、疾病和免疫系统的选择性等压力支配下发生了演化, 以适应不同物种的免疫系统及更有利于发挥其生物学功能。

参考文献:

- [1] Starkey P M, Barrett A J. Evolution of $\alpha 2$ -macroglobulin; the demonstration in a variety of vertebrate species of a protein resembling human $\alpha 2$ -macroglobulin [J]. *J. Biol. Chem.*, 1982, **205**: 91—95
- [2] Melchior R, Quigley J P, Armstrong P B. $\alpha 2$ -macroglobulin-mediated clearance of proteases from the plasma of the American horseshoe crab *Limulus polyphemus* [J]. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**: 13496—13502
- [3] Mei C F, Ma H M, Mai K S. Progress on the research of the α -macroglobulin [J]. *Marine Sciences*, 2002, **26**(9): 16—19 [梅承芳, 马洪明, 麦康森. α -巨球蛋白研究进展. 海洋科学, 2002, **26**(9): 16—19]
- [4] Armstrong P B, Melchior R, Quigley J P. Humoral immunity

- in long-lived arthropods [J]. *J. Insect. Physiol.*, 1996, **42**: 53—64
- [5] Sottrup-Jensen L, Hansen H F, Mortensen S B, *et al*. Sequence location of the reactive thiol ester in human α 2-macroglobulin [J]. *FEBS Lett.*, 1981, **123**: 145—148
- [6] Kopacek P, Weise C, Saravanan T, *et al*. Characterization of an α -macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata* [J]. *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**: 465—475
- [7] Vaseeharan B, Lin Y C, Ko C F, *et al*. Molecular cloning and characterisation of a thioester-containing α 2-macroglobulin (α 2-M) from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata* [J]. *Fish Shellfish Immunol.*, 2007, **22**: 115—130
- [8] Lin Y C, Vaseeharan B, Chen J C. Molecular cloning and phylogenetic analysis on α 2-macroglobulin (α 2-M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Dev. Comp. Immunol.*, 2008, **32**: 317—329
- [9] Ma H M, Mai K S, Xu W, *et al*. Molecular cloning of alpha2-macroglobulin in sea scallop *Chlamys farreri* (Bivalvia, Mollusca) [J]. *Fish Shellfish Immunol.*, 2005, **18**: 345—349
- [10] Shi Z Y, Yang X X, Chen X W, *et al*. Full-length cDNA cloning and expression characterization of alpha-2 macroglobulin from *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, **32**(4): 526—532 [施志仪, 杨显祥, 陈晓武, 等. 三角帆蚌 α 2-巨球蛋白 cDNA 的克隆及表达特征. *水产科学*, 2008, **32**(4): 526—532]
- [11] Spycher S E, Arya S, Iseman D E, *et al*. A functional, thioester-containing alpha 2-macroglobulin homologue isolated from the hemolymph of the American lobster (*Homarus americanus*) [J]. *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**: 14606—14611
- [12] Stocker W, Breit S, Sottrup-Jensen L, *et al*. α 2-macroglobulin from the haemolymph of the freshwater crayfish *Astacus astacus* [J]. *Comp. Biochem. Physio.*, 1991, **98**(4): 501—509
- [13] Thogersen I B, Salvesen G, Brucato F H, *et al*. Purification and characterization of an α -macroglobulin proteinase inhibitor from the mollusc *Octopus vulgaris* [J]. *J. Biol. Chem.*, 1992, **265**: 521—527
- [14] Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, *et al*. Molecular cloning and expression analysis of α 2-macroglobulin in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish Shellfish Immunol.*, 2004, **16**: 599—611
- [15] Lin Y C, Vaseeharan B, Ko C F, *et al*. Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, α 2-macroglobulin (α 2-M) from the haemocytes of tiger shrimp *Penaeus japonicus* [J]. *Mol. Immunol.*, 2007, **44**: 1065—1074
- [16] Sottrup-Jensen L. α -Macroglobulin: Structure, Shape, and Mechanism of Proteinase Complex Formation [J]. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**: 11539—11542
- [17] Hall M, Soderhall K, & Sottrup-Jensen L. Amino acid sequence around the thioester of α 2-macroglobulin from plasma of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus* [J]. *FEBS Lett.*, 1989, **54**: 111—114
- [18] Masaru Nonaka. Evolution of the complement system [J]. *Curr. Opin. Immunol.*, 2001, **13**(1): 69—73
- [19] Van Leuven F, Marynen P, Cassiman J J, *et al*. The epitopes of two complex-specific monoclonal antibodies, related to the receptor recognition site, map to the COOH-terminal end of human α 2-macroglobulin [J]. *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**: 6933—6937
- [20] Huang W, Dolmer K, Liao X, *et al*. Localization of basic residues required for receptor binding to the single alpha-helix of the receptor binding domain of human alpha 2-macroglobulin [J]. *Protein Sci.*, 1998, **7**: 2602—2612
- [21] Iwaki D, Kawabata S I, Miura Y, *et al*. Molecular cloning of *Limulus* α 2-macroglobulin [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1996, **242**: 822—831
- [22] Onara D F, Forlenza M, Gonzalez S F, *et al*. Differential transcription of multiple forms of alpha-2-macroglobulin in carp (*Cyprinus carpio*) infected with parasites [J]. *Dev. Comp. Immunol.*, 2008, **32**: 339—347
- [23] Armstrong P B. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense [J]. *Trends Immunol.*, 2001, **22**: 47—52