

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2014.04.03

版纳微型猪近交系 *CD46* 基因克隆、序列及组织表达分析

秦彩艳^{1,2}, 霍金龙^{1,2*}, 王淑燕^{1,2}, 王 配^{1,2}, 潘伟荣^{1,2}, 苗永旺², 曾养志^{1,2}

(1. 云南农业大学云南省版纳微型猪近交系重点实验室 昆明 650201;

2. 云南农业大学动物科学技术学院 昆明 650201)

摘要:根据猪 NM_213888 及 EST 序列,设计特异引物扩增 BMI *CD46* 基因,并进行克隆、测序和生物信息学分析。同时应用半定量 RT-PCR 技术对 BMI 30 个重要组织进行表达谱分析。获得了 BMI *CD46* 1 092 bp 的编码区序列 (GenBank 登录号: KJ513478), 编码 363 个氨基酸。分析表明, *CD46* 蛋白质分子量 (Mw) 为 39.60 kD, 等电点 (pI) 为 5.39, 存在 4 个保守域和 1 个跨膜结构域, N 端有信号肽序列; 其 N 末端疏水, C 末端亲水; 亚细胞定位显示, 该蛋白位于细胞周质的概率是 56.7%。活性位点分析表明, BMI *CD46* 蛋白有 6 类活性位点。系统进化分析表明, BMI 与牛的亲缘关系最近。BMI 30 种组织表达分析表明, *CD46* 基因在十二指肠中高表达; 在睾丸、胸腺、甲状腺、附睾、肺、淋巴结、空肠、回肠、结肠、小脑及舌下腺中中度表达; 在颌下腺、肝、肾上腺、盲肠、直肠、食管、垂体及脑中低表达; 在心、脾、肾、肌肉、胰脏、胃、皮肤、大脑、下丘脑及脊髓中不表达。该结果为进一步研究基因功能奠定基础。

关键词: 补体调节蛋白基因 *CD46*; 版纳微型猪近交系; 生物信息学; 组织表达

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565 (2014) -04-249-08

Cloning, sequence and tissue expression analysis of *CD46* gene in Banna mini-pig inbred line

QIN Caiyan^{1,2}, HUO Jinlong^{1,2*}, WANG Shuyan^{1,2}, WANG Pei^{1,2}, PAN Weirong^{1,2}, MIAO Yongwang², ZENG Yangzhi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Banna Mini-pig Inbred Line of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Based on the NM_213888 and EST sequences of pig, we designed specific primers and amplified BMI *CD46* for cloning, sequencing and bioinformatics analysis. Meanwhile, the expression of *CD46* in 30 important tissues of BMI was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The research obtained 1 092 bp coding sequence (GenBank accession number: KJ513478) of BMI *CD46*, which can encode a protein of 363 amino acids. Analysis showed that the molecular weight (Mw) and isoelectric point (pI) of predicted *CD46* protein were 39.60 kD and 5.39; it contained four conserved domains and one transmembrane region; The N-terminal of the protein existed signal peptide sequences; hydrophobicity analysis indicated that the N-terminal of the protein was hydrophobic and the C-terminal of the protein was hydrophilic; It was a periplasm protein with a probability of 56.7%; The active site analysis showed there were six kinds of active sites in BMI *CD46*; Phylogenetic analysis demonstrated that BMI had the closest relationship with cattle. The analysis of tissue expression showed that the expression of *CD46* examined in 30 tissues had obvious differences. It was highly abundant in the duodenum, moderately expressed in the testis, thymus, thyroid, epididymis, lung, lymph nodes, jejunum, ileum, colon, cerebellum and sublingual gland; and weakly expressed in the submandibular gland, liver, adrenal gland, cecum, rectum, esophagus, pituitary and brain stem; while it was undetected in the heart, spleen, kidneys, muscle, pancreas, stomach, skin, brain, hypothalamus and spinal cord. These results provided a useful foundation for further studies on *CD46* function in swine.

Keywords: Complement regulatory protein gene *CD46*; Banna mini-pig inbred line (BMI); Bioinformatics; Tissue expression

收稿日期: 2014-06-02; 修回日期: 2014-06-30.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31160439; 31460580)。

作者简介: 秦彩艳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物分子生物学; E-mail: caiyanqin615@163.com.

* 通信作者: 霍金龙, 男, 高级实验师, 博士, 研究方向: 动物分子生物学; E-mail: jinlonghuo973@163.com.

补体调节蛋白 CD46 分子, 又称膜辅蛋白 (membrane cofactor protein, MCP), 是由 Cole 等在 1985 年应用 C3b 亲和层析在人外周血淋巴细胞上首次证实的一种膜蛋白^[1], 根据人白细胞分化抗原划分, 定序为 CD46。CD46 属于补体调节蛋白 (CRP) 基因簇的成员, 可以抑制补体的过度激活从而保护自身宿主细胞免遭补体介导的溶解破坏, 在一定程度上可保护正常细胞免遭补体介导的损伤^[2-3]。有研究发现, CD46 还可作为参与 T 细胞激活的共刺激分子, 具有信号转导功能, 可调控同种移植免疫应答, 甚至诱导免疫耐受, 进一步丰富补体系统和 T 细胞免疫、天然免疫系统和获得性免疫系统之间的关联^[4-6], 这些都为异种器官移植提供了新的思路和方法^[7]。

版纳微型猪近交系 (Banna Mini-pig Inbred Line, BMI) 是云南农业大学曾养志教授带领的课题组利用云南特有的地方猪种资源—西双版纳小耳猪, 采用连续全同胞或亲子交配加严格选择的科学方法, 克服了早期世代中存在的严重近交衰退现象, 培育成功的世界上第一个基因高度纯合、遗传背景清楚的大型哺乳类实验动物近交系^[8-11]。BMI 在解剖学、生理学和疾病发生机理等方面与人类极为相似, 可作为异种器官移植、生物医学研究以及生命科学研究的理想实验动物模型^[12]。本研究的目的是采用 RT-PCR 方法克隆 BMI 补体调节蛋白基因 CD46 全长编码区序列, 并进行核酸序列分析、蛋白质功能预测以及基因的多组织表达谱分析。研究结果将为猪 CD46 基因功能的进一步阐明奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验组织样品均来自编号为 413 的版纳微型猪近交系成年公猪, 屠宰后取颌下腺、睾丸、胸腺、甲状腺、附睾、肺、心、肝、脾、肾上腺、淋巴结、肾、肌肉、胰脏、十二指肠、空肠、回肠、结肠、盲肠、直肠、食管、胃、皮肤、大脑、小脑、垂体、下丘脑、脑干、舌下腺和脊髓等 30 种组织样品, 液氮速冻后于 -80 °C 超低温冰柜长期保存。M-MLV 逆转录酶购自 Invitrogen 公司, RNaiso Plus、pMD18-T 克隆载体、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒及 Ex Taq 酶等均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取

称取 100 mg 左右组织样品, 液氮迅速研磨成粉末状, 然后加入 1 mL 的 RNaiso Plus, 收集并转移至

1.5 mL 离心管中, 按操作说明提取出总 RNA。利用核酸蛋白测定仪检测 RNA 的浓度及纯度, 1% 的琼脂糖凝胶 (1 \times TAE 缓冲液) 90 V 电泳 40 min, 检测 28S、18S、5S 三条带是否整齐, 合格的样品于 -80 °C 保存。

1.2.2 cDNA 合成

逆转录反应: ① 在 0.2 mL 的微量离心管中加入 5 μ g 总 RNA, 1 μ L 50 μ mol \cdot L⁻¹ 的 Oligo (dT)₁₈, 1 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹ 的 dNTP, 加入 RNase free dH₂O 补足至 12 μ L, 移液枪垂悬混匀后 65 °C 加热 5 min, 迅速冰浴, 短暂离心。② 继续在上述离心管中加入 4 μ L 5 \times 第一链合成缓冲液, 1 μ L 40 U \cdot μ L⁻¹ 的 RNaseOUTTM 核酸酶抑制剂, 2 μ L 0.1 mol \cdot L⁻¹ 的 DTT, 轻轻混匀各成分, 37 °C 孵育 2 min。③ 接着加入 1 μ L 的 200 U \cdot μ L⁻¹ 的 M-MLV 逆转录酶, 混匀, 依次运行 37 °C 50 min、70 °C 15 min 后终止反应。将各组织 cDNA 母液统一稀释为 50 ng \cdot μ L⁻¹ 的工作液用于 PCR 反应。

1.2.3 设计并合成 PCR 引物

参照 GenBank 上猪 CD46 mRNA 序列 (登录号: NM_213888) 以及猪 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6 软件设计扩增 BMI CD46 基因全长编码区及部分侧翼序列的特异引物。参照猪 18S 序列 (AY265350) 设计内参引物。以上引物均由上海生工有限公司合成 (见表 1)。

表 1 目的基因 CD46 和内参基因 18S 的 PCR 引物信息

Table 1 The PCR primers of target gene CD46 and internal control gene 18S

基因名称 Genes	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	产物大小(bp) Product size (bp)
CD46	F: GCTAGCTGGTGTCCGGTTA	1 182
	R: GGGGCTGGATTCCACGTC	
18S	F: GGACATCTAAGGGCATCACAG	145
	R: AATTCCGATAACGAACGAGACT	

1.2.4 PCR 扩增的反应体系及运行程序

PCR 反应体系 (25 μ L): ddH₂O 17.75 μ L, 10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ 的 dNTP 2 μ L, 50 ng \cdot μ L⁻¹ 的多组织 cDNA 混合池 1.5 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的正、反向引物各 0.5 μ L, 5 U \cdot μ L⁻¹ 的 Ex Taq 酶 0.25 μ L。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 后延伸 10 min。利用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统拍照。

1.2.5 PCR 产物纯化、直接测序

将 PCR 产物用 1% 的低熔点琼脂糖电泳 (1 \times

TAE)后,在紫外透射台上切下含目的基因片段的胶块,用胶回收纯化试剂盒纯化目的基因片段。取一部分纯化产物送上海生工有限公司直接测序。

1.2.6 连接、转化、复苏和培养

另取一部分纯化产物与 pMD18-T 克隆载体连接,连接反应体系(10 μL):5 μL 的连接缓冲液,4 μL 的目的基因,1 μL 的 pMD18-T 载体。取30 μL 大肠杆菌 DH 5 α 感受态细胞(冰浴解冻)与 10 μL 连接产物于 0.2 mL 的微量离心管中混匀,碎冰中静置 30 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热击 45 s,碎冰中静置 2 min。将转化产物全部转入 800 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 恒温振荡复苏培养 1 h。吸取 200 μL 复苏液均匀涂布于含 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ X-Gal、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp 和 23.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ IPTG 的 LB 琼脂固体平板培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 正置培养 1 h 后,倒置过夜培养,筛选孤立的白色阳性菌落接种于含 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp 的 4 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 恒温振荡培养 18 h。

1.2.7 菌液 PCR 鉴定、克隆测序

以 0.2 μL 菌液为模板,ddH₂O 更改为 19.05 μL ,其他试剂用量及运行程序同 1.2.4,进行菌液 PCR 鉴定,2%的琼脂糖凝胶电泳检测后,阳性菌液送上海生工有限公司提取重组质粒后用通用引物 M13 测序。

1.2.8 多组织 RT-PCR 扩增

分别以 BMI 30 种组织 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 cDNA 工作液为模板,进行 *CD46* 的多组织转录水平表达谱分析,检测 *CD46* 在 BMI 各组织中的表达差异。扩增的反应体系及运行程序同 1.2.4,同时以看家基因 *18S* 进行校正。

1.2.9 序列确定和数据分析

利用 Lasergene 软件对 PCR 产物直接测序和克隆测序结果进行编辑、比对、校正,确定 BMI *CD46* 编码序列,进而推导出其氨基酸序列。利用 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测氨基酸分子量(Mw)、等电点(pI)、正负电荷残基数、分子式、不稳定系数、平均疏水性和脂肪系数;SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测蛋白质是否含有信号肽;TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) 预测蛋白质的亚细胞定位情况;NCBI 的 Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 预测蛋白质的保守结构域;SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) 预测蛋白质的二级结构;TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 预测蛋白质的跨膜螺旋结

构;ProtScale (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 预测蛋白质的疏水结构;PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 预测蛋白质的活性位点;Lasergene、ClustalX 1.83 和 MEGA 5.2 等软件构建多物种系统进化树;Quantity One 软件分析基因在各组织中的表达量。

2 结果与分析

2.1 BMI *CD46* 基因扩增结果

以 BMI 30 种组织的 cDNA 混合池为模板,采用特异性引物进行 PCR 扩增,电泳检测产物片段在 Marker 的 100~200 bp 之间,与预期的 182 bp 相吻合,为目的片段(见图 1)。

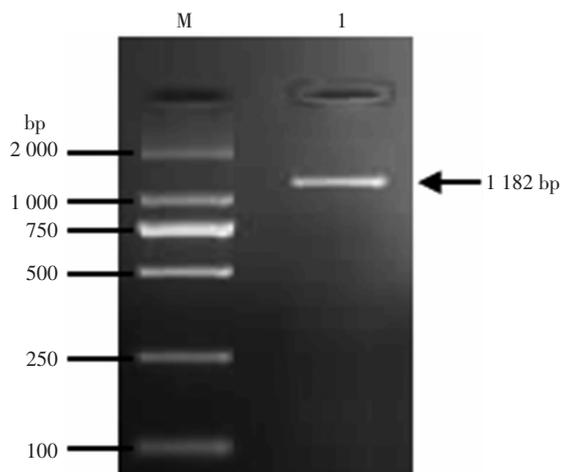


图 1 *CD46* 基因扩增结果

Fig.1 The amplification result of *CD46* gene

注:M;DL2000 DNA 分子量标准;1;*CD46* PCR 产物。

Notes: M;DL2000 DNA Marker; 1;*CD46* PCR product.

2.2 BMI *CD46* 基因序列及其编码的氨基酸序列

RT-PCR 产物原液测序结合克隆测序比对确定了 BMI *CD46* 编码序列,全长 1 092 bp,序列已提交 GenBank 获得认证,登录号为 KJ513478,可编码 363 个氨基酸,对应的氨基酸登录号为 AHZ31601。生物信息学分析表明 BMI *CD46* 存在 4 个保守结构域和 1 个跨膜区,且 N-末端有信号肽序列(见图 2),亚细胞定位显示该蛋白位于细胞周质的概率是 56.7%。

2.3 BMI *CD46* 基因编码氨基酸的一级结构

通过 ProtParam tool 预测 BMI *CD46* 基因编码的氨基酸序列的组成和理化性质(见表 2)。不稳定系数分值小于 40 表示蛋白质稳定,大于 40 表示蛋白质不稳定^[13],本研究结果预测的不稳定系数为 49.69,表示 BMI *CD46* 蛋白质不稳定。

```

1  ATGATGGCGTTTTTGCCGCTGCGCAAGGCACTGCCTGCCTCCCGAGAATCCCTTTTCTTCGAGGTGCTTCGTTGAGATTCTTTGGGTGCG 93
1  M M A F C A L R K A L P C R P E N P F S S R C F V E I L W V S 31
94  TTGGCCTAGTGTTCCTGCTTCCCATGCCTCAGATGCCTGTGATGAGCCACCGAAGTTTGAAGCATGCGGCCCAATTTTGAATACCACT 186
32  L A L V F L L P M P S D A C D E P P K F E S M R P Q F L N T T 62
187  TACAGACCTGGAGACCGTGTAGAGTATGAATGTCGCCCGGGTTCACGCCATGGTTCCTGCGCTTCCACCTCTTCCGCTGTGCAGGACGAT 279
63  Y R P G D R V E Y E C R P G F Q P M V P A L P T S S V C Q D D 93
280  AATACGTGGTCAACCCCTCCAGGAGCTTGTGACGAAAAGCCTGTTCGAATCTACCAGACCCGTTAAATGGCCAAGTTAGCTACCCAAATGGG 372
94  N T W S P L Q E A C R R K A C S N L P D P L N G Q V S Y P N G 124
373  GATACTCTGTTTGGTTCGAAGGCTCAGTTTACCTGTAACACTGGTTTTACATAATGGAGCCGAGACTGTGTATTGTGAGGTTTCTGGGAAT 465
125  F C I G K D E W S S D P P E C K V V K C P Y P V V P N G E I V 155
466  GTTATGGCCTGGAGTGGCCCTCCCGCTATGTGAGAAGATTTGTGTAAACCACCTGGCGARATTCCAAATGGAAAATACACCAATAGCCAT 558
156  V M A W S E P S P L C E K I L C K P P G E I P N G K Y T N S H 186
559  AAGGATGATTTGAATCAATGAAGTAGTAACTTACAGTTGTCTTTCTTCAACTGGACCGGATGAATTTTCACTTGTGGAGAGAGCAGCCTT 651
187  K D V F E Y N E V V T Y S C L S S T G P D E F S L V G E S S L 217
652  TTTTGTATTGGGAAGGACGAGTGGAGTAGTGACCCCTCAGTGTAAAGTGGTCAAAATGTCCATATCCAGTAGTCCAAATGGAGAAAATGTGA 744
218  F C I G K D E W S S D P P E C K V V K C P Y P V V P N G E I V 248
745  TCAGGATTTGGATCAAATTTTACTACAAGCAGAGGTTGATTTAAATGCAATGCTGGTTTACCTTCATGGCAGAGACACAATGTCTGC 837
249  S G F G S K F Y Y K A E V V F K C N A G F T L H G R D T I V C 279
838  GGTCAAAACAGCAGTGGGAGCCTGAGATGCCCAATGTATCAAGATTCCAAGCCTACTGATCCACCTGCAACCCAGGACCAAGCCATCCA 930
280  G A N S T W E P E E M P Q C I K D S K P T D P P A T P G P S H P 310
931  GGACCTCCAGTCCAGTGCATCACCACCTAAAGATGCTGAGAGTSTAGATGGAGGAATCATCGCTGCAATTTGTTGGGCGCTCTTAGCT 1023
311  G P L F G S K A Q F P K D A E E S L D G G I I A A I V V G V L A 341
1024  GCCATTGCAGTAATGTGCTGGTGTATACTTTTTTTCATCAATAAACAACAGAAAAGTTCGAAGTAA 1092
342  A I A V I A G G V Y F F H H K Y N K K R S K * 363
    
```

图2 BMI CD46 基因 CDS 序列及其编码的氨基酸序列

Fig.2 The CDS and amino acids sequence of BMI CD46

注:ATG 表示起始密码子;*表示终止密码子;上一行大写字母表示编码区序列,相对应的下一行大写字母为其翻译的氨基酸序列;单下划线的序列表示蛋白质保守结构域:45-104 AA (CCP), 108-167 AA (CCP), 171-227 AA (CCP), 244-293 AA (CCP); 双下划线标注的为信号肽序列: 1-44 AA; 阴影部分为跨膜区:331-353 AA。

Notes: ATG is start codon; *is stop codon; the capital letters of upper line are coding sequences, and those of the corresponding lower line are amino acid sequences; the conserved domains are underlined: 45-104 AA (CCP), 108-167 AA (CCP), 171-227 AA (CCP), 244-293 AA (CCP); the signal peptide sequences are double lined: 1-44 AA; the transmembrane sequences are shaded: 331-353 AA.

表2 BMI CD46 的一级结构分析

Table 2 Primary structure analysis of BMI CD46

一级结构特性	预测结果
编码的氨基酸数/个	363.00
等电点 (PI)	5.39
分子量 (Mw)/kD	39.60
负电荷残基 (Asp+Glu)	39.00
正电荷残基 (Arg+Lys)	32.00
分子式	C ₁₇₆₉ H ₂₆₉₅ N ₄₅₅ O ₅₂₇ S ₂₆
不稳定系数 (II)	49.69
平均疏水性 (GRAVY)	-0.242
脂肪系数 (AI)	65.51

45-104 AA、108-167 AA、171-227 AA 和 244-293 AA 等保守结构域,均属于 CCP 结构域(见图4)。

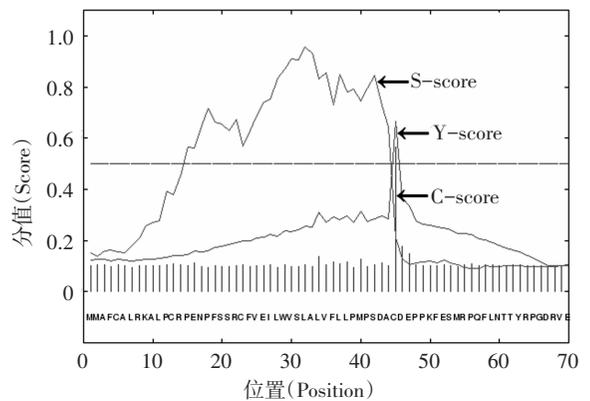


图3 BMI CD46 蛋白的信号肽分析

Fig.3 The signal peptide analysis of BMI CD46 protein

注:C-score 为原始剪切位点的分值,数值越高说明其作为剪切位点的可能性越高;S-score 为信号肽的分值,数值越高说明该氨基酸作为信号肽的可能性越高;Y-score 为综合剪切位点的分值,更准确的确定剪切位点,数值最高处为剪切位点。

Notes: C-score is scores of putative cleavage site, the higher score, the higher possibility of cleavage site; S-score is scores of signal peptide, the higher score, the higher possibility of the amino acid as signal peptide; Y-score is scores of synthesis cleavage site, more accurately determined the cleavage site, the highest score for the cleavage site.

2.4 BMI CD46 蛋白信号肽序列

通过 SignalP 4.1 server 程序对 BMI CD46 蛋白质 N-末端信号肽序列进行分析,表明 BMI CD46 蛋白质 N-末端前 1-44 AA (MMAFCA L R K A L P C R P E N P F S S R C F V E I L W S L A L V F L L P M P S D A) 为信号肽序列,切割位点位于第 44 AA 与第 45 AA 之间(见图3)。

2.5 BMI CD46 蛋白保守结构域

利用 NCBI 网站的 Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART) 预测的 BMI CD46 蛋白包含

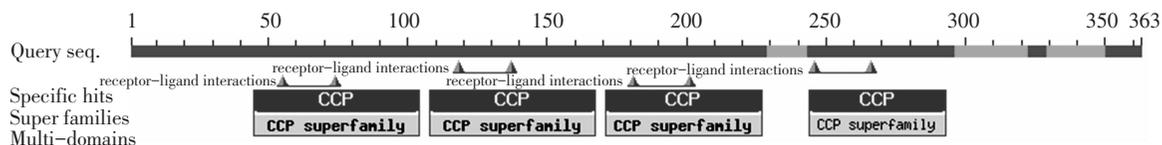


图4 BMI CD46 蛋白保守结构域

Fig.4 The conserved domains of BMI CD46 protein

2.6 BMI CD46 蛋白二级结构

通过 SOPMA 程序预测的 BMI CD46 蛋白的二级结构中含 40 AA 的 α -螺旋(11.02%), 77 AA 的

延伸链结构(21.21%), 22 AA 的 β -转角(6.06%), 224 AA 的无规则卷曲(61.71%)(见图 5)。

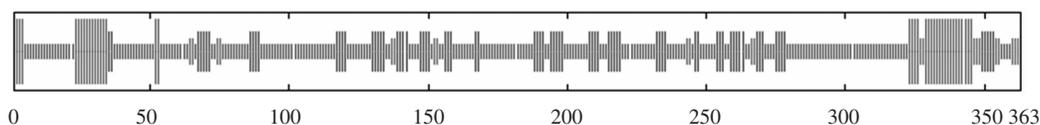


图5 BMI CD46 蛋白二级结构

Fig.5 The secondary structure of BMI CD46 protein

注:分别用最短、次短、最长和次长的垂直线表示无规则卷曲、 β -转角、 α -螺旋和延伸链结构。

Notes: The shortest, the second shortest, the longest and the second longest vertical lines stand for the random coils, beta turns, alpha helices and extended strands, respectively.

2.7 BMI CD46 蛋白跨膜结构

通过 TMHMM Server version 2.0 程序对 BMI

CD46 蛋白进行跨膜结构预测,发现其在 331-353 AA 处存在 1 个跨膜螺旋结构(见图 6)。

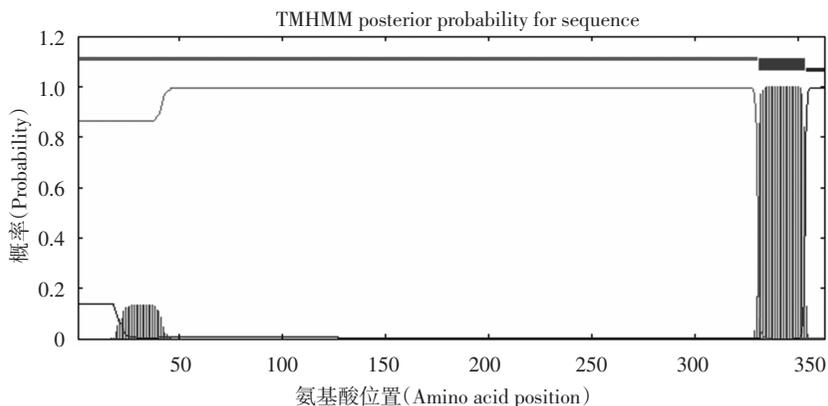


图6 BMI CD46 蛋白跨膜分析

Fig.6 Transmembrane analysis of BMI CD46

2.8 BMI CD46 蛋白的疏水性

利用 ProtScale 程序预测 BMI CD46 蛋白的疏水性,其分值的大小代表疏水性的大小。CD46 蛋白在第 335 AA 处具有最大疏水值(3.256),在第 359 AA 处具有最小疏水值(-3.211),蛋白的 N 末端疏水,C 末端亲水(见图 7)。

2.9 BMI CD46 蛋白活性位点的分析

通过 PROSITE 程序对 BMI CD46 蛋白进行活性位点预测,结果显示 BMI CD46 蛋白存在 6 类活性位点(见表 3),分别是 N-糖基化位点、cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、蛋白酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、N-十四酰化位点和酪氨酸激酶磷酸化位点。

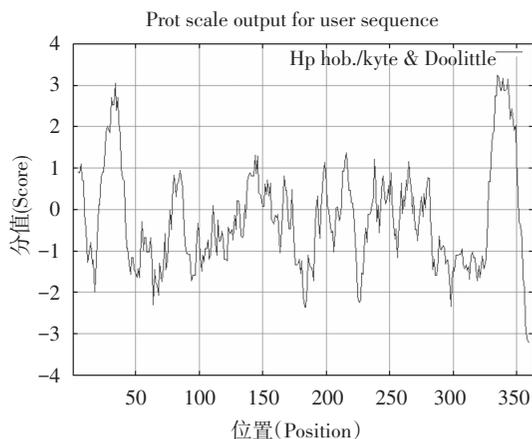


图7 BMI CD46 蛋白疏水性分析

Fig.7 Hydropathy analysis of BMI CD46

注:预测分值小于 0 表示氨基酸亲水,大于 0 表示氨基酸疏水。

Notes: Score<0 means hydrophilic, Score>0 means hydrophobic.

表3 BMI CD46 的活性位点分析

Table 3 Active site analysis of BMI CD46

活性位点名称	序列号	氨基酸序列
N-糖基化位点	PS00001	60-63: NTTY
		282-285: NSTW
cAMP 和 cGMP 依赖性 蛋白激酶磷酸化位点	PS00004	359-362: KKRS
		20-22: SsR
蛋白酶 C 磷酸化位点	PS00005	53-55: SmR
		62-64: TyR
		185-187: ShK
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点	PS00006	185-188: ShkD
		204-207: TgpD
		283-286: StwE
		314-317: SpsD
N-十四酰化位点	PS00008	154-159: GNvmAW
		280-285: GAnsTW
		329-334: GGiiAA
		330-335: GIiaAI
酪氨酸激酶磷酸化位点	PS00007	338-343: GVlaAI
		64-71: Rpg.DrveY

2.10 BMI 等 6 个物种的 CD46 氨基酸序列进化关系

NCBI 网站下载牛 (AAI49006)、大鼠 (NP_062063)、小鼠 (NP_034908)、猴 (NP_001182675) 和

人 (NP_002380) 等物种的 CD46 氨基酸序列, 通过 Lasergene、Cluster1.83 和 MEGA5.2 等生物信息学软件构建包括 BMI CD46 氨基酸序列在内 6 个物种的分子系统进化树 (见图 8), BMI 猪与牛聚为一类, 大鼠和小鼠聚为一类, 人和猴聚为一类。

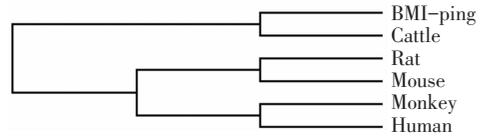


图 8 BMI 猪、牛、大鼠、小鼠、猴和人的 CD46 氨基酸序列系统进化树

Fig.8 The phylogenetic tree of CD46 amino acids from BMI-pig, cattle, rat, mouse, monkey and human

2.11 多组织表达谱

以 18S 为内参基因, 检测的 CD46 基因在 BMI 30 种组织中的表达谱说明, BMI CD46 基因在十二指肠中高表达, 在睾丸、胸腺、甲状腺、附睾、肺、淋巴结、空肠、回肠、结肠、小脑及舌下腺中中度表达, 在颌下腺、肝、肾上腺、盲肠、直肠、食管、垂体及脑中低表达, 在心、脾、肾、肌肉、胰脏、胃、皮肤、大脑、下丘脑及脊髓中不表达 (见图 9)。

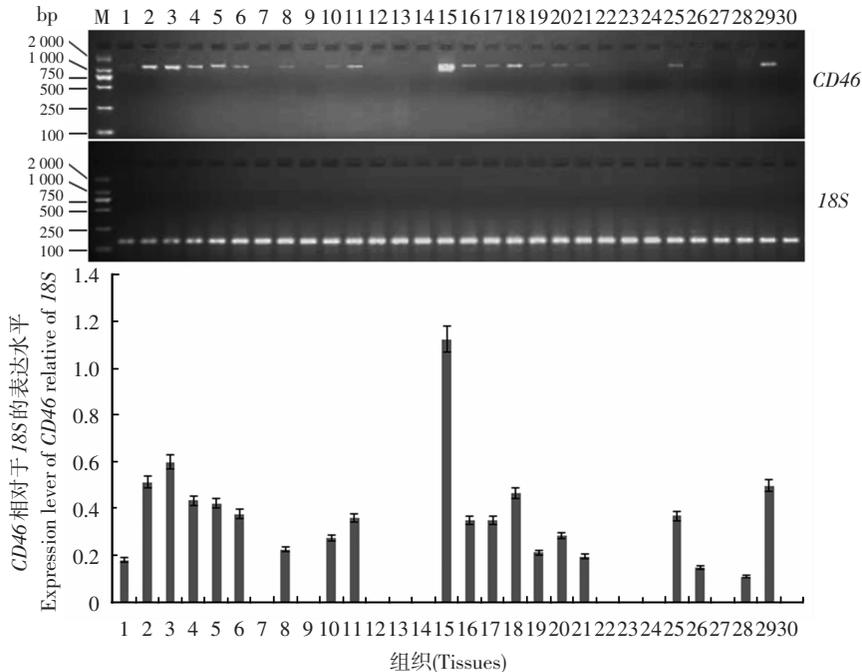


图 9 BMI CD46 基因多组织表达谱

Fig.9 The multi-tissue expression profile of BMI CD46 gene

注: M; DL2000 DNA 分子量标准; 1: 颌下腺; 2: 睾丸; 3: 胸腺; 4: 甲状腺; 5: 附睾; 6: 肺; 7: 心; 8: 肝; 9: 脾; 10: 肾上腺; 11: 淋巴结; 12: 肾; 13: 肌肉; 14: 胰脏; 15: 十二指肠; 16: 空肠; 17: 回肠; 18: 结肠; 19: 盲肠; 20: 直肠; 21: 食管; 22: 胃; 23: 皮肤; 24: 大脑; 25: 小脑; 26: 垂体; 27: 下丘脑; 28: 脑干; 29: 舌下腺; 30: 脊髓。

Notes: M; DL2000 DNA marker; 1; submaxillary gland; 2; testis; 3; thymus; 4; thyroid gland; 5; epididymis; 6; lung; 7; heart; 8; liver; 9; spleen; 10; adrenal gland; 11; lymph node; 12; kidney; 13; muscle; 14; pancreas; 15; duodenum; 16; jejunum; 17; ileum; 18; colon; 19; cecum; 20; rectum; 21; esophagus; 22; stomach; 23; skin; 24; cerebrum; 25; cerebellum; 26; pituitary gland; 27; hypothalamus; 28; brainstem; 29; sublingual gland; 30; spinal cord.

3 讨论

补体系统是天然免疫系统的重要组成部分,在机体免疫应答过程中起着重要的作用。补体激活是一个多途径的过程,C3活化是激活补体途径的重要环节。因此,有效阻止C3活化是克服超急性排斥反应,实现异种器官移植临床应用的关键步骤^[14-15]。综合多种不同的补体调节蛋白,利用补体分子不同的作用机理,从多靶点、多功能的角度去研制补体活化抑制剂,是目前继敲除 $\alpha(1,3)$ 半乳糖苷转移酶基因后克服异种器官移植超急性排斥反应的主要方案之一^[16-18]。

BMI *CD46* 蛋白保守结构域的预测结果显示,该蛋白含有4个保守结构域,且均属于补体调节蛋白(CCP)超家族成员。*CD46* 通过 GPI(糖基磷脂酰肌醇)锚定蛋白固定于细胞上,作为 C4b/C3b 裂解酶 I 因子(一种丝氨酸蛋白酶)的辅助因子灭活 C4b 或 C3b,进而抑制 C3 转化酶的活性,尤其是抑制补体旁路激活途径中 C3 转化酶的活性。因此,*CD46* 被认为是补体旁路激活途径中极为有效的抑制因子,可抑制 C3 的激活,阻断补体级联反应过程,使宿主自身细胞免受补体介导的攻击和损伤^[3,19]。

BMI *CD46* 蛋白信号肽预测显示该蛋白 N 末端存在信号肽序列,说明它属于分泌性蛋白。由美国科学家 Gunter Blobel 提出的信号肽假说认为,编码分泌蛋白的 mRNA 翻译复合体在翻译时首先合成的是 N 末端带有疏水氨基酸残基的信号肽(与我们 BMI *CD46* 蛋白疏水性预测结果一致),接着它被内质网膜上的 SRP 受体(一种信号识别蛋白)识别并与其结合,经由膜孔到达内质网内腔,之后被位于腔表面的信号肽酶水解切除,由于它的引导,新生的分泌蛋白就能够通过内质网膜进入腔内,并且最终被分泌到胞外^[20-21]。

从包括 BMI 猪在内 6 个物种 *CD46* 氨基酸序列构建的系统进化树来看,BMI 与牛聚为一类,猪为猪科动物,牛为牛科动物,它们二者均为偶蹄目动物;小鼠和大鼠聚为一类,它们同为啮齿目动物;人和猴聚为一类,均为灵长目。6 个物种 *CD46* 氨基酸序列构建的系统进化树完全符合它们的分类学地位。

本研究通过 RT-PCR 技术,从版纳微型猪近交系中克隆出了 *CD46* 基因的全长编码区序列 1 092 bp,编码 363 个氨基酸。经过序列分析后与 GenBank 数据库中普通猪的 *CD46*(NM_213888) 序列比较,共发现 5 个碱基突变位点,其中有 2 个为同义突变,3 个为错义突变。在编码区的 c. 33 位存在

一个 G>T 的 SNP(c. 33 G>T),是亮氨酸的同义突变;c. 260 位存在一个 C>T 的 SNP(c. 260 C>T),导致普通猪的苯丙氨酸错义突变为 BMI 的丝氨酸;c.377 位存在一个 C>T 的 SNP(c.377 C>T),c.378 位存在一个 T>G 的 SNP(c.378 T>G),导致普通猪的甲硫氨酸错义突变为 BMI 的苏氨酸;c.390 位存在一个 G>A 的 SNP(c.390 G>A),是丝氨酸的同义突变。这些变异位点是否会影响 BMI *CD46* 的功能还需要进一步研究才能确定。人 *CD46* 分布甚广,在除红细胞之外的几乎所有组织细胞中都有分布,但不同类型的细胞中其表达量有所差异^[22-23]。多组织表达谱分析表明 BMI *CD46* 基因在免疫器官如胸腺、淋巴结中都有表达,但在脾中几乎不表达,且在被检组织中存在明显的表达差异,这可能与组织功能差异有关,也可能是受其他因素的影响所致。

综上所述,我们成功分离了 BMI *CD46* 基因,对其序列的基本信息进行了分析,并进一步对其编码的氨基酸序列进行了必要的功能预测,最后采用 RT-PCR 检测了其在 BMI 30 种组织中的表达情况,这些工作为下一步构建版纳微型猪近交系 *CD46* 真核表达载体并研究其功能奠定了基础,也为异种器官移植的研究提供了实验依据。

参考文献(References)

- [1] COLE J L, DYKMAN T R, MACDERMOTT R P, et al. Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(3): 859-863.
- [2] CARROLL M C. The complement system in regulation of adaptive immunity [J]. Nat Immunol, 2004, 5(10): 981-986.
- [3] KRAUS D, MEDOF M E, MOLD C. Complementary recognition of alternative pathway activators by decay-accelerating factor and factor H [J]. Infect Immun, 1998, 66(2): 399-405.
- [4] ASTIER A L. T-cell regulation by *CD46* and its relevance in multiple sclerosis [J]. Immunology, 2008, 124(2): 149-154.
- [5] ALFORD S K, LONGMORE G D, STENSON W F, et al. *CD46*-induced immunomodulatory $CD4^+$ T cells express the adhesion molecule and chemokine receptor pattern of intestinal T cells [J]. J Immunol, 2008, 181(4): 2544-2555.
- [6] 陈栋, 张艳, 李明, 等. 补体调节蛋白 *CD46* 对 $CD4^+$ T 细胞的免疫调控 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(15): 2413-2415.
CHEN Dong, ZHANG Yan, LI Ming, et al. Immunoregulation of complement regulatory protein *CD46* on $CD4^+$ T

- cells [J]. The Journal of Practical Medicine, 2009, 25 (15): 2413-2415.
- [7] 徐莉. 人补体调节蛋白基因的克隆、共表达及其功能研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2005.
- XU Li. Cloning, co-expression and function of human complement regulatory proteins [D]. Wuhan: Wuhan University, 2005.
- [8] YU P, ZHANG L, LI S, et al. Screening and analysis of porcine endogenous retrovirus in Chinese Banna minipig inbred line [J]. Transplant Proc, 2004, 36(8): 2485-2487.
- [9] ZENG R, ZENG Y Z. Molecular cloning and characterization of *SLA-DR* genes in the 133-family of the Banna mini-pig inbred line [J]. Anim Genet, 2005, 36(3): 267-269.
- [10] HUO J L., WANG P, ZHAO Y, et al. Molecular cloning, mRNA expression and characterization of a novel *FAIM1* gene from Chinese Banna mini-pig inbred line (BMI) [J]. J Anim Vet Adv, 2012, 11(8): 1080-1086.
- [11] WEI H J, QING Y B, PAN W R, et al. Comparison of the efficiency of Banna miniature inbred pig somatic cell nuclear transfer among different donor cells [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57728.
- [12] 王配, 霍金龙, 曾养志, 等. 版纳微型猪近交系 *AQP3* 克隆、序列分析及组织表达 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 366-371.
- WANG Pei, HUO Jinlong, ZENG Yangzhi, et al. Cloning, sequence analysis and tissue expression of *AQP3* in the Banna mini-pig inbred line (BMI) [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2011, 19(5): 366-371.
- [13] 陈珊珊, 郭晋隆, 李国印, 等. 甘蔗过氧化氢酶基因的电子克隆及生物信息学分析 [J]. 生物信息学, 2012, 10(1): 65-70.
- CHEN Shanshan, GUO Jinlong, LI Guoyin, et al. Electronic cloning and characterization of *CAT* gene from *Saccharum officinarum* using bioinformatics tools [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2012, 10(1): 65-70.
- [14] MAKRIDES S C. Therapeutic inhibition of the complement system [J]. Pharmacol Rev, 1998, 50(1): 59-87.
- [15] MOLLNES T E, FIANE A E. Role of complement in xenotransplantation [J]. Allergy, 2002, 72: 75-78.
- [16] 徐莉, 赵宙宙, 刘辉, 等. 人补体调节蛋白 DAF、MCP 在细胞中的共表达及协同作用研究 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(2): 220-225.
- XU Li, ZHAO Zhouzhou, LIU Hui, et al. Co-expression and synergic effect of human complement regulatory proteins DAF and MCP [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(2): 220-225.
- [17] NAGAHAMA M, SHIRAISHI M, OSHIRO T, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of triple human complement regulating proteins (DAF, MCP and CD59) in the xenogeneic porcine-to-human transplantation model. Part I: in vitro assays using porcine aortic endothelial cells [J]. Transpl Int, 2002, 15(5): 205-211.
- [18] XU L, WU W, ZHAO Z, et al. Cooperation between human DAF and CD59 in protecting cells from human complement-mediated lysis [J]. J Biochem Mol Biol, 2006, 39(6): 743-748.
- [19] 王仕忠, 王勇, 关乃富, 等. 人非小细胞肺癌 *CD46* 分子的表达及临床意义研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(6): 1117-1120.
- WANG Shizhong, WANG Yong, GUAN Naifu, et al. Expression and significance of *CD46* in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Journal of Modern Oncology, 2011, 19(6): 1117-1120.
- [20] 郑斌, 詹希美. 信号肽序列及其在蛋白质表达中的应用 [J]. 生物技术通讯, 2005, 16(3): 296-298.
- ZHENG Bin, ZHAN Ximei. Signal peptide sequence and its application to protein expression [J]. Letters in Biotechnology, 2005, 16(3): 296-298.
- [21] 赵慧, 郑文岭, 马文丽. 信号肽对外源蛋白分泌效率的影响 [J]. 生物学杂志, 2003, 20(5): 1-3.
- ZHAO Hui, ZHENG Wenling, MA Wenli. The effects of signal peptide on efficiency of foreign protein secretion [J]. Journal of Biology, 2003, 20(5): 1-3.
- [22] LISZEWSKI M K, POST T W, ATKINSON J P. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster [J]. Annu Rev Immunol, 1991, 9: 431-455.
- [23] 李国才, 王劲松, 焦红梅, 等. 人 *CD46* 启动子真核表达载体的构建 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(11): 11-15.
- LI Guocai, WANG Jinsong, JIAO Hongmei, et al. Construction of eukaryotic expression vectors by use of human *CD46* promoter [J]. China Biotechnology, 2007, 27(11): 11-15.