

# 鳊鱼 CRP cDNA 和斜带石斑鱼 AAT cDNA 的克隆与序列分析

刘秀霞 梁旭方\* 李观贵 王琳 李光照

(暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)

**摘要:**采用 RT-PCR 及 RACE 法分别克隆得到鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) cDNA 全序列和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 1-抗胰蛋白酶 (1-antitrypsin, AAT) cDNA 全序列。鳊鱼 CRP 基因 cDNA 全长为 914 bp, 其中 5' 非翻译区 (5'-UTR) 为 49 bp, 3' 非翻译区 (3'-UTR) 为 199 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 666 bp, 编码 222 个氨基酸。序列同源性分析发现, 推测的鳊鱼 CRP 氨基酸序列与小鼠 (*Mus musculus*)、人类 (*Homo sapiens*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、非洲蟾蜍 (*Xenopus tropicalis*) 和中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 的 CRP 氨基酸同源性分别为 33.2%、32.4%、31.5%、24.9% 和 22.4%。斜带石斑鱼肝脏 AAT 基因 cDNA 全序列长 1 785 bp, 其中 5'-UTR 为 13 bp, 3'-UTR 为 530 bp, ORF 为 1 242 bp, 编码 414 个氨基酸。序列同源性分析发现, 推测的斜带石斑鱼 AAT 氨基酸序列与斑马鱼 (*Danio rerio*)、非洲爪蟾 (*X. laevis*)、楔齿蜥 (*Sphenodon punctatus*)、大鼠、人类、狒狒 (*Papio papio*) 和小鼠的 AAT 氨基酸序列同源性分别为 59.2%、40%、38.6%、38.5%、37.7%、37% 和 36%。鳊鱼 CRP 基因和斜带石斑鱼 AAT 基因 cDNA 全序列的获得为其疾病相关分子机理研究奠定了基础, 对今后进一步进行种苗育苗的研发, 并以此为依据提高其人工育苗仔鱼成活率有重要意义。

**关键词:** C-反应蛋白; 1-抗胰蛋白酶; 基因克隆; 序列分析; 鳊鱼; 斜带石斑鱼

**中图分类号:** Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)02-84-08

## Cloning and Sequence Analysis of CRP Gene from *Siniperca chuatsi* and AAT Gene from *Epinephelus coioides*

LIU Xiu-Xia LIANG Xu-Fang\* LI Guan-Gui WANG Lin LI Guang-Zhao

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Two full-length cDNA sequences encoding C-reactive protein (CRP) gene of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) and 1-antitrypsin (AAT) gene of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) were isolated by RT-PCR and RACEs methods, respectively. The CRP cDNA is 914 bp in length, and contains a 666 bp open reading frame (ORF) encoding 222 amino acids. The AAT cDNA is 1 785 bp in length, and contains a 1 242 bp ORF encoding 414 amino acids. Sequence analysis reveals that the identity of CRP amino acids between amphibian and mammals is low, ranging at 22.4% - 33.2%. The identity of AAT amino acid among fish, mammals and amphibian is also low, ranging at 36% - 59.2%. The data are important for future study on molecular structure and function of disease-related genes

**基金项目** 国家科技部 863 项目 (No. 2007AA09Z437), 国家自然科学基金项目 (No. 30670367), 广东省自然科学基金项目 (No. 031886) 及广东省科技计划项目 (No. 2007B020701002);

\*通讯作者, E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn;

**第一作者介绍** 刘秀霞, 女, 硕士研究生; 研究方向: 基因表达调控; E-mail: xiuxia\_791016@163.com.

**收稿日期:** 2008-08-19, **修回日期:** 2008-12-30

in aquatic animals, and for improvement of the larvae survival and fry rearing during artificial propagation.

**Key words:** C-reactive protein; 1-antitrypsin; Molecular clone; Sequence analysis; *Siniperca chuatsi*; *Epinephelus coioides*

C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是目前被认为最有价值的急性时相反应蛋白,属分泌型蛋白质<sup>[1]</sup>。它是由 Tillett 等于 1930 年发现的一种血液蛋白,可以与肺炎球菌细胞壁 C 多糖(C-polysaccharide)结合并发生沉淀反应<sup>[2]</sup>。CRP 有多种生物学功能<sup>[1,3~7]</sup>: 可激活补体和吞噬细胞的吞噬功能; 可以与染色体结合,可能有清除坏死细胞遗传物质的功能; 能与 T 淋巴细胞特异性地结合,抑制 T 淋巴细胞并增强 T 辅助细胞的功能; 抑制血小板的磷脂酶,减少其炎症介质的释放; 有抗坏死性休克的功能,它通过抑制中性粒细胞的迁移和活化,从而达到防止过敏反应的保护功能。白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)对 CRP 的生成有调节作用<sup>[8]</sup>。

1-抗胰蛋白酶(1-antitrypsin, AAT)是一种分泌性的丝氨酸蛋白酶抑制剂(serineprotease inhibitor, serpin), AAT 能对抗多种以丝氨酸为活动中心的蛋白酶,如胰凝乳酶、组织蛋白酶、纤溶酶和凝血酶等,尤其有重要生理意义的是对抗中性白细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE),而且对抗 NE 的作用远比抑制胰蛋白酶的作用大,所以有人把 AAT 称为抗蛋白酶,或称蛋白酶抑制物<sup>[9]</sup>。其功能还涉及激活巨噬细胞及铁离子和脂类代谢的调节<sup>[10~13]</sup>,并与多种癌症的发生、发展有关<sup>[14]</sup>。作为急性时相反应蛋白,在炎症、感染、肿瘤和肝病时 AAT 浓度均显著增加,且与炎症的程度相关。AAT 浓度的增加主要由 IL-6 介导。目前研究显示, AAT 具有 90 多种不同的基因变体,呈现基因多态性。这些基因变体导致血清中 AAT 的分泌浓度异常或不足,从而引发一系列疾病<sup>[15]</sup>。

鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)属于鲈形目,近年来在我

国成为经济价值极高且很有发展前途的重点发展鱼类。然而,斜带石斑鱼的人工繁殖与育苗技术难度极大,在育苗阶段仔鱼大量因疾病死亡,仔鱼成活率低是目前人工育苗亟待解决的技术难题<sup>[16,17]</sup>。鳊鱼在养殖过程中也出现多种疾病而死亡导致成活率降低。人类 CRP、AAT 的结构和功能已有较深入的研究,其在许多疾病的发生、发展过程中起着非常重要的作用。本研究克隆得到鳊鱼 CRP 基因和斜带石斑鱼 AAT 基因 cDNA 全序列,为进一步研究它们在疾病发生时的表现以及在控制疾病中的应用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验鱼 鳊鱼由广州南海鳊鱼养殖池塘提供,斜带石斑鱼由广东省大亚湾水产试验中心提供。

1.1.2 试剂 SV Total RNA Isolation System 为 Promega 公司产品, pMD 18-T Vector、Taq DNA 聚合酶为宝生物工程(大连)有限公司产品, SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司, H. Q. & Q. Gel Extraction Kit 购自 TIANGEN BIOTECH, 其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成 从鳊鱼和斜带石斑鱼快速分离肝组织,使用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒抽提总 RNA。使用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒以鳊鱼和斜带石斑鱼总 RNA 为模板,按其推荐方法合成 cDNA 第一链。

1.2.2 鳊鱼 CRP cDNA 全序列的克隆 根据已知脊椎动物 CRP 基因氨基酸序列的保守区域设计简并引物 CRP01F(表 1),引物由上海英骏生物技术有限公司合成。用引物 CRP01F 和

UPM(表 1) 扩增鳊鱼 CRP 下游序列,PCR 扩增条件为:94 预变性 3 min,94 1 min,40 1 min,72 1 min,共 30 个循环,最后 72 延伸 5 min。PCR 产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳,切割目的条带,使用 H. Q. & Q. Gel Extraction Kit 凝胶回收,与 pMD 18-T 载体连接,转化感受态 *E. coli* DH5 中,挑选阳性克隆,利用 M13 正反向引物,PCR 验证,阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司用 ABI 3730 测序仪进行测序。根据鳊鱼 CRP 3 端序列设计两条引物 CRP02R 和 CRP03R (表 1),用引物 UPM 与 CRP02R 进行鳊鱼 CRP 5 端序列首次 PCR 扩增,PCR 扩增条件为:94 预变性 3 min,94 30 s,63 30 s,72 90 s,共 3 个循环,94 30 s,57 30 s,72 90 s,共 27 个循环,最后 72 延伸 3 min。取首次扩增产物 1  $\mu$ l,用 NUP (Nested Universal Primer A) 和 CRP03R 引物进行第二次 PCR 扩增,扩增条件同首次 PCR。PCR 产物纯化、克隆及测序方法同上。

### 1.2.3 斜带石斑鱼 AAT cDNA 全序列的克隆

根据已知脊椎动物 AAT 基因氨基酸序列的

保守区域设计简并引物 AAT01F (表 1),引物由上海英骏生物技术有限公司合成。用引物 AAT01F 和 UPM 扩增斜带石斑鱼 AAT 下游序列,PCR 扩增条件为:94 预变性 3 min,94 1 min,40 1 min,72 1 min,共 30 个循环,最后 72 延伸 5 min。PCR 产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳,切割目的条带使用 H. Q. & Q. Gel Extraction Kit 凝胶回收,与 pMD 18-T 载体连接,转化感受态 *E. coli* DH5 中,挑选阳性克隆,利用 M13 正反向引物,PCR 验证,阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司用 ABI 3730 测序仪进行测序。根据斜带石斑鱼 AAT 3 端序列设计两条引物 AAT02R 和 AAT03R (表 1),用引物 UPM 与 AAT02R 进行斜带石斑鱼 AAT 5 端序列首次 PCR 扩增,PCR 扩增条件为:94 预变性 3 min,94 30 s,63 30 s,72 90 s,共 3 个循环,94 30 s,57 30 s,72 90 s,共 27 个循环,最后 72 延伸 3 min。取首次扩增产物 1  $\mu$ l,用 NUP 和 AAT03R 引物分别进行第二次 PCR 扩增,扩增条件同首次 PCR。PCR 产物纯化、克隆及测序方法同上。

表 1 鳊鱼 CRP 基因与斜带石斑鱼 AAT 基因 PCR 引物

Table 1 PCR primer sequences for cloning of *Siniperca chuatsi* CRP gene and *Epinephelus coioides* AAT gene

引物名称 Name of primer	引物序列 Sequence of primer
UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAAGGGCAAACAATGGTATCAACGAG-3' (long)
	5'-CTAATACGACTCACTATAAGGC-3' (short)
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGAG-3'
CRP01F	5'-GCTGCTAAACAACTCTGGATCATCTGAAATGTGTTAG-3'
CRP02R	5'-TTATGTGGCTACACTGACTCC-3'
CRP03R	5'-CACTGACTCCCTCTGACTG-3'
AAT01F	5'-GCTGCTAAACAACTCTGGATCATCTGAAAAATGTCTAG-3'
AAT02R	5'-TTGATTGGATCCATGAATC-3'
AAT03R	5'-TGTTGAAACAGCAATACAC-3'

1.2.4 序列分析 对测序结果分析整理得到鳊鱼 CRP 基因和斜带石斑鱼 AAT 基因 cDNA 全序列,在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对,确认是 CRP 和 AAT 基因,推测得到它们的氨基酸序列。将推测的鳊鱼 CRP 和斜带石斑鱼 AAT 氨基酸序列与其他不同物种的 CRP、AAT 氨基酸序列于 vector NTI suite 6.0 软件进行序列比对,

并进行同源性分析。用以比对 CRP 的物种及其 GenBank 接受号为非洲蟾蜍 (*Xenopus tropicalis*, NP001011484)、中国鲿 (*Tachypleus tridentatus*, BAA85653)、人类 (*Homo sapiens*, CAA39671)、小鼠 (*Mus musculus*, CAA31928)、大鼠 (*Rattus norvegicus*, NP058792)。用以比对 AAT 的各物种为非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*,

NP001081358)、狒狒 (*Papio papio*, AAA35377)、人类 (CAJ15161)、小鼠 (NM009243)、大鼠 (P17475)、楔齿蜥 (*Sphenodon punctatus*, AAM46107)、斑马鱼 (*Danio rerio*, CAI11574)。

## 2 结 果

### 2.1 鳊鱼 CRP 基因和斜带石斑鱼 AAT 基因 cDNA 全序列的获得与分析 应用 RT-PCR 方法获得鳊鱼 CRP 基因和斜带石斑鱼 AAT 基因

1	ACGTTACACAGCGGGCAGAGTGTACTGTATACACAGTTTACGGAGACGAAATGGGACAT	58
1		M G H 3
59	TCAGCCTTTTCTTTCTCATGACCATCTCCACGGTGTGGCCGGGAGCGGTGTACCATC	118
4	S A F F F L M T I S T V L A G S G V T I	23
119	AAGACCTTGGTATTTCCCACTGAGACCAGTACCAGTTATGTCGAGATGGTCCCTATGAAA	178
24	K T L V F P T E T S T S Y V E M V P M K	43
179	CCCTGAACCTGGCGGCTTCACTCTGTGCATGAATGTGGCCACAGAGCTCACGGAGAG	238
44	P L N L A A F T L C M N V A T E L T G E	63
239	CGCGAGATCATCTCTTTGCGTACCGGACTGCGGACTCTGATGAGCTCAATGTGTGGCGT	298
64	R E I I L F A Y R T A D S D E L N V W R	83
299	GAAGTGGACGGCAGATTGTCCTTCTACTTGGAGTGGAGACGGTGTCTCTCCGAGTCCCT	358
84	E L D G R L S F Y L S G D G V L F R V P	103
359	CAGCTCGGCGCCCTGCAGACCCACCTGTGTGCACCTGGGATCCAGTTCAGGTGCGGCT	418
104	Q L G A L Q T H L C V T W D S S S G A A	123
419	GCCCTCTTCATGGACGGGAAGAGAAGCTTGACCAAAATTTACAAGAAAGGTCACGCCATC	478
124	A L F M D G K R S L T K I Y K K G H A I	143
479	CGCCCGGAGGCAAGGTTCTCCTCGGTCAAGATCCGGATAGTTTCTGGGTGGTTTGTAT	538
144	R P G G K V L L G Q D P D S F L G T G F D	163
539	GCCAAACAGAGTTTTGTTGGGGAGATCGGTGATGTTAATATGTTGGGACACTGTCTCTCA	598
164	A K Q S F V G E I G D V N M W D T V L S	183
599	GACGGCAGATCCAAGACATGTTCTCCGGGAAGACACTGACAATCGGAACCGTGTAGAC	658
184	D G E I Q D M F S G K T L T I G T V L D	203
659	TGGACACTGCACAGCTTAAATTAACGGGGCGGTCGAGGTGTTAATCGTGAGCTGTAG	718
204	W D T A Q L K I N G A V E V V N R E L ***	222
719	CTGTAATGCTCACACGTGACACGACATGCTGCAATAATGTAGGCAACGTCATGACGTCAG	778
779	GTGAGGCAATATAAAGCTCTGCAGTCAGAGGGAGTCAGGTAGCCACATAACACCTACAG	838
839	TTTGTGAAGCAGATTATTCAATGGCATT <u>AATAAA</u> AACCTTTGCTCGAAAAA	898
899	AAAAAAAAAAAAAAAA	914

图 1 鳊鱼 CRP 基因 cDNA 核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA nucleotide and deduced amino acid sequence of *Siniperca chuatsi* CRP

氨基酸序列用单字母于核苷酸序列下对应标示;翻译起始密码子

和终止密码子分别用 ATG 和星号 (\*) 标示;下划线表示 polyA 加尾信号。

The amino acid sequence is shown under the nucleotide sequence in single-lettercode. The translation start codon and termination codon are marked as ATG and asterisk (\*), respectively. Underline denotes polyadenylation signal.

2.2 氨基酸同源性分析 用 vector NTI suite 6.0 软件分析表明,鳊鱼与小鼠、人类、大鼠、非洲蟾蜍及中国鲎的 CRP 氨基酸同源性分别为 33.2%、32.4%、31.5%、24.9% 和 22.4% (图 3)。用同样的方法比较斜带石斑鱼 AAT 氨基

cDNA 全序列。分析表明,鳊鱼 CRP cDNA 全长 914 bp,其中开放阅读框(ORF)长 666 bp,编码 222 个氨基酸,5 非翻译区(5'-UTR)长 49 bp,3 非翻译区(3'-UTR)长 199 bp,polyA 加尾信号为 AATAAA(图 1)。克隆得到的斜带石斑鱼 AAT cDNA 全长 1 785 bp,包括 1 242 bp 的 ORF、13 bp 的 5'-UTR 和 530 bp 的 3'-UTR,该序列编码 414 个氨基酸,polyA 加尾信号为 AATAAA(图 2)。

酸序列与斑马鱼、非洲爪蟾、楔齿蜥、大鼠、人类、狒狒和小鼠的 AAT 氨基酸序列同源性分别为 59.2%、40.0%、38.6%、38.5%、37.7%、37.0% 和 36.0%,表明斜带石斑鱼 AAT 与斑马鱼 AAT 氨基酸同源性最高(图 4)。

1	TGCAGCAAAGGGG <b>ATG</b> TAAAGGCTGTGAAGATGCGTGGGATCTTTGCTAGTGTGCA	58
1	M L K A V K M R G I F A S C A	15
59	CTCGCAGCACTGCTGCTGGCTGCAGCCTGGGCAGACCACGAACATCACCATGGCTCTGAT	118
16	L A A L L L A A A W A D H E H H H G S D	35
119	CACAGCCACGAGGGAGAGATGAGCTGCCACAAGCTCTCTCCTCCAATGCTGACTTTGCC	178
36	H S H E G E M S C H K L S P P N A D F A	55
179	TTTGCCTCTACAAAAATCTGAATGCCACACTGCTGCCGAAAGAACATCTTCTACTCG	238
56	F A L Y K N L N A H T A A G K N I F Y S	75
239	CCACTGGGCATCTCCGAGCCCTGTCCATGCTGTCTACAGGGCCGGTGGTGAACCCAC	298
76	P L G I S A A L S M L S T G A G G E T H	95
299	CGCCAGCTGCTCCTCAGCTTGGGCTACAGCACCCCTACCCAGGCGCAGGTCAACGAAGCA	358
96	R Q L L S S L G Y S T L T Q A Q V N E A	115
359	TACGAGCATCTTTCCACATGTTGGCACACAGCCAGGAGGATCAGCAGCTGAATGTCGGT	418
116	Y E H L F H M L G H S Q E D Q Q L N V G	135
419	AACGCTGTGGCTGTGGCTTCAATCCTTTGGAGAAGTCTCTGAACGACATCAAG	478
136	N A V A V R S G F N P L E K F L N D I K	155
479	CACCACTACGCTGGTGAATCTCAAGGTCGACTTCACCAAACCTGCAGAGGCTGCAGCT	538
156	H H Y A G E I F K V D F T K P A E A A A	175
539	GAGTCAACAGATTCAATGCCACCAACCCAGGACAAGATCAAAGACATGGTGAAGGAC	598
176	E I N R F I A T N T Q D K I K D M V K D	195
599	CTGGACCTGATATGGCCATGGTCTGATCAACTATGCTTCTTTCAGAGGACAGTGGGAG	658
196	L D P D M A M V L I N Y V F F R G Q W E	215
659	AAACCCTCAATGGGAATCTGACACACAAGGAAGACTTCACTGTGGACGAAACCCAACG	718
216	K P F N G N L T H K E D F T V D E T T T	235
719	GTTCAAGTGGACATGATGAGGAGGGTGGTTCGCTACGACTTCTATCAGGACTTCGAAAAAC	778
236	V Q V D M M R R V G R Y D F Y Q D F E N	255
779	CACACCACCGTCAATTATGCTGCCCTACAAGGAACACCTCCATGATGATGCTGCTGCC	838
256	H T T V I M L P Y K G N T S M M I V L P	275
839	GATGAAGCAAGATGACGAGGTTGGAGGCTACATCAACAAGGACTACATCAGGCAGTGG	898
276	D E G K M Q E V E G Y I N K D Y I R H W	295
899	CATGACTCACTTACAGGAGTTCTGTGGATCTGTCTTGCCAAAGTTTCCATCTCTGCT	958
296	H D S L Y R S S V D L S L P K F S I S A	315
959	GAGGCCTCGCTGGGCAGCACACTGACAGAAATGGGCATAACTGATGCTTTTGACAGACAAC	1018
316	E A S L G S T L T E M G I T D A F A D N	335
1019	GCTGATTTCTTGGCATCTTAACGAGATCAAGCTCAAAGTCTCAAAGGATATCCACCAG	1078
336	A D F S G I S N E I K L K V S K V S H Q	355
1079	GCCGTGCTGAGCGTGGATGAAAAGGGAACAGAGGCAGCAGCCGCCACCACCATTTGAGGTC	1138
356	A V L S V D E K G T E A A A A T T I E V	375
1139	ATGCCATGAGCATGCCGAAACCATGAGACTCGACAGGCCCTTCATGGTCTTTATCTCTG	1198
376	M P M S M P E T M R L D R P F M V F I L	395
1199	GAGCACTCGACAGGAGCGTCTCTTCAATGGGAAAGATCAATAACCCACAGCCGTGTAA	1258
396	E H S T R S V L F M G K I N N P T A V ***	414
1259	AGACGAGGGGAATAATGAGGGGTAATTTTACACTGTAGCCGGTTAAGCAGCTGCG	1318
1319	GGACAAGAGCTCATTTTATCTCAGCATCTGTGAGCCCTGTGCGATGTACAGCGATAT	1378
1379	TAAGAACATGGGGAAATGATGAATGGGGATAGTTTGACGGATAAGACAACAGATCCATC	1438
1437	ATCAGAAATGCAGTCTATTAATCTGCTGCAGTCTGTCAGCGTGGGACATTTATTACCA	1498
1499	TCTGTCATCTGAGCCTGGCTAGGTGTATAAATACCTACATGCATCATTATATATTTGTGTC	1558
1559	CAGCTGACTCTATGATACAAATAATAAAACATTAGTAGATATATCACTCAGACCATCTG	1618
1619	CTCACACACTGAGCTAATGTGCTATTGCTGTTTCAACATGCTGAAGTGAATGTTTTTA	1678
1679	ATCTTGAGTTCATGGATCCAATCAATTTAACTGTATGATTTTCAAAACACCAATAATGC	1738
1739	TGAATGCTGAGAAAAGGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1785

图 2 斜带石斑鱼 AAT 基因 cDNA 核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA nucleotide and deduced amino acid sequences of *Epinephelus coioides* AAT

氨基酸序列用单字母于核苷酸序列下对应标示;翻译起始密码子

和终止密码子分别用 ATG 和星号 (\*) 标示;下划线表示 polyA 加尾信号。

The amino acid sequence is shown under the nucleotide sequence in single-letter code. The translation start codon and termination codon are marked as ATG and asterisk (\*), respectively. Underline denotes polyadenylation signal.

### 3 讨论

CRP 是正五聚蛋白家族中的一员,在肝细胞内合成,许多低等动物中 CRP 是糖蛋白,而

一些高等动物 CRP 却含糖<sup>[18]</sup>。它在高等动物血清中含量很低,但在感染、炎症、组织损伤、恶性肿瘤等刺激下,血清中 CRP 含量可以成千倍地上升<sup>[19]</sup>,这可能是生物机体免疫防御系统

鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i>	—MGHSATFFLMTISTVIAGSGVTIKTLWFPTETSTSYVMVPMKPLN—LAAFTLCMNVATHJGEREIIIFAYRTADS—	76
非洲蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	-----MSDKVFFIPKESATSYVRLNPMKNGP—FASLTVCLKSYTILT—RAHSLSLATPNKD	55
中国鲎 <i>Tachypleus tridentatus</i>	-----KVGFPPSTASSFPRLVMDGTLPNLHELTLCYWFKARLD—RRLHVFSYAQNATD	53
人类 <i>Homo sapiens</i>	—MEKLLCFLVLTSLSHAFGQTDMSRKAFWPKESDTSYVSLKAPLTKP—LKAFTVCLHFYFTLSSTRGTVPFRMPDRKT	78
小鼠 <i>Mus musculus</i>	MEKLLWCLLIMISFSRTRGHEDMFKKAFWPKESDTSYVSLKESKPP—LNFFTVCLHFYFTLSTVRSFVSFYATKKNK	79
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	MEKLLWCLLITTSFSQARGHEDMSKQAFWFPVGSATAYVSLKESKPP—LFAFTVCLYAHADWS—RSFSIFSYATKTSF	77
	* * *	
鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i>	DELNVWREL DGRLSFYLSGDCVLF RVPQLGALQ—THLCVTDSSGAAALFMDGK—RSLTKIYKKGHAIRPGKVL	151
非洲蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	NDFLLFQKNNKFSVSIQN—QDWYLDIPGTAVV—RSICASWDSLTDGAWWVNGN—PYPRNIFMKGYKVNAPIIII	129
中国鲎 <i>Tachypleus tridentatus</i>	NEILAFVEAGNTIGLIIGGKTQLHIACPSDIEVGKWEHIVCYLWSSWEGSSLMNGYRCYGNITGVTKGKTVQAGGTVVL	133
人类 <i>Homo sapiens</i>	MRPFIWFKSDIGYSFTVGGSEILFEVPEVTYAP—VIIICTSWESASGIVETWVDGK—PRVRKSLKKGFTVGAESIIL	153
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NDILLFWXDKQYTFGVGGAEVRFMVSEIPEAP—THICASWESATGIVEWLDGK—AKVRKSLHKGYTVGPDASLIL	154
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NEILLFWTRGQFSIAVGPEILFSASEIPEVP—THICATWESATGIVEWLDGK—PRVRKSLKQKGYVTCNASIIL	152
	* * * * * * **	
鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i>	GQDPDSFLGGFDAKQSFVGEIGDYNMWDIVLS DGEIQDMFSGKTLTIG—TVLDWDTAQLKINGAVEVNRLE----	222
非洲蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	GQEQDSYCGKFDAAQSLVGEISDVHMWDRVLT SQELKLVLYNRGMVG—DVIWQNLNYETKGEVILIPQVKCIHY	204
中国鲎 <i>Tachypleus tridentatus</i>	GQDQDVTYGGFVASESMEGELSELNWNVNSLNQIHLHNSCADVSRHLVGNIIQWEKTSFMFYDGVV-----	202
人类 <i>Homo sapiens</i>	GQEQDSPCGNFEQSLSLVDIGVNMWDVLS PDEINTIYLGGPFSP—NVLNWRALKYEVQGEVFTKPKQLWP----	224
小鼠 <i>Mus musculus</i>	GQEQDSYGGDFDAKQSLVDIGDYNMWDIVLS PEQINTVYVGGTLPSP—NVLNWRALNYKAQGDVFIKPKQLWS----	225
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	GQEQDSYGGFDANQSLVDIGDYNMWDIVLS PEQINAVYVGRVFPSP—NVLNWRALKYETHGDVFIKPKQLWPLTDC	227
	** * * * * * ** ** * *	
鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i>	-----	222
非洲蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	PDSCYNPTEEHVYV	218
中国鲎 <i>Tachypleus tridentatus</i>	-----	202
人类 <i>Homo sapiens</i>	-----	224
小鼠 <i>Mus musculus</i>	-----	225
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	CES-----	230

图 3 鳊鱼与其他物种 CRP 氨基酸序列同源性比较

Fig. 3 Comparison of the deduced amino acid sequence of CRP from *Siniperca chuatsi* with that from other species

鳊鱼 CRP 为本实验克隆; \* :完全相同的氨基酸; - :此位置缺少氨基酸。

Chinese perch is cloned by our laboratory. The identity amino acid residues are indicated by asterisk. Dashes indicate the amino acid gaps that are necessary to align these sequences.

中的一种组分。现较多研究显示 CRP 与三酰甘油 (triglyceride, TG) 等脂代谢相关<sup>[20, 21]</sup>。与人等哺乳动物习惯于利用糖类不同,鱼类优先并大量使用脂类作为能源,对 CRP 基因结构和功能的研究有助于进一步了解鱼类的脂代谢,促进鱼类的健康生长。

AAT 是一种含有碳水化合物的单链糖蛋白,主要由肝产生,单核细胞、肺部巨噬细胞和上皮细胞也能合成 AAT,这些肝外合成的 AAT 在局部组织损伤的调节中起着重要作用<sup>[22]</sup>。在炎症、组织坏死或损伤时,AAT 可代偿增加 2~4 倍,以对抗各类细胞和细菌所释放的过多蛋白溶解酶,保护正常组织细胞免受蛋白溶解酶的溶解损害<sup>[23]</sup>。AAT 不仅与多种良性疾病的发生、发展有关,并且与多种恶性肿瘤的发

生、发展关系密切,AAT 纯合子缺乏 (homozygous deficiency of 1-antitrypsin, PiZZ) 与慢性肝病及肝癌有关<sup>[24]</sup>。

本研究克隆得到鳊鱼 CRP 基因和斜带石斑鱼 AAT 基因两种重要疾病相关基因的 cDNA 全序列,并推测出它们所编码的氨基酸序列。鳊鱼 CRP 氨基酸序列与小鼠、人类、大鼠、非洲蟾蜍和中国鲎的 CRP 氨基酸序列同源性较低。斜带石斑鱼 AAT 氨基酸序列与斑马鱼、非洲爪蟾、楔齿蜥、大鼠、人类、狒狒和小鼠的 AAT 氨基酸序列也具有较低的同源性。二者结构与功能的关系有待于进一步研究。鳊鱼 CRP 基因和斜带石斑鱼 AAT 基因 cDNA 全序列的获得为其疾病相关分子机理研究奠定了基础,对今后进一步进行种苗育苗的研究,并以此为依据提

斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	MI.KAVRMGRGTASCALAAIJ.AAAWAD-HIHIHIGSDH-----SUEGEMSCIKI.SPPN	51
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	-----MKVFLAVSLALLCAGVLDHDKHKGKNGKHGDHGDHGDHDEHNGKGDHDKHDKHHHSDEHMSCHKI.IAPFN	70
猪獾 <i>Papio papio</i>	-----LII.LLGLCCLLP.GSLAEDPQ.GDA-----AQKIDTPIPHQHP.LNK.I.TPSL	45
人类 <i>Homo sapiens</i>	-----MPSVSWG.LLL.LAGL.CCL.VP.VSLAEDPQ.GDA-----AQKIDTSHHDQHP.NK.I.TP.NL	54
小鼠 <i>Mus musculus</i>	-----MTPSISWGL.LL.LAGL.CCL.VPSFLAED-----VQETDTSQKDKS-PASHE.IAT.NL	48
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	-----MAPSISRGL.LL.LAAL.CCL.LAPSFLAED-----AQETDTSQKDKS-PYTRK.ISS.NL	48
楔齿蜥 <i>Sphenodon punctatus</i>	-----MTPTLHCL.LLAWFC.FAYSHHFDHGIDHDDH-----KDKQETHAGAPPSKNMTC.HK.I.APSN	58
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	-----MWGNTYCCA.TAAL.I.VATAWA.PIDG.IVGHDKSHTADH-HIHI-----L.II.HGRDEPIPSIKGV.DACT.I.I.APIN	66
*		
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	ADFAFALYKNLNAHTAA-GKNIFYSPLGISAA.SML.STGAGGETHRQLLSSGLSTLTQ-AQVNEAYEHLHMLGHSQE	128
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AQFAFEYRQAVDHS-ENLFFSPVSI.TS.LL.SL.GAKGQTLNQI.VEGLDFNTEISEEDIHKGFQHLHMLNDPDS	148
猪獾 <i>Papio papio</i>	AEFAPSLYRQLAHQSN-TNIFPSPVSIATAFAMLSLGT.KADHSELEGLNFNLTEIPEAQVHEGFQELRLTNK.PDS	123
人类 <i>Homo sapiens</i>	AEFAPSLYRQLAHQSN-TNIFPSPVSIATAFAMLSLGT.KADHDELEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELRLTNK.PDS	132
小鼠 <i>Mus musculus</i>	GDFALSYREL.VHQSN-TSNIFFSPVSIATAFAMLSLGS.KGDTHQTILEGLQFNLTQTSEADIHKS.FQLHLQTLNRPDS	126
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	ADFAFSLYREL.VHQSN-TSNIFFSPVSIATAFAMLSLGS.KGDTRKQLEGLQFNLTQTPEADITHKAFHLLQTLNRPDS	126
楔齿蜥 <i>Sphenodon punctatus</i>	ADFAFTRFKQTAADAPA-KNVFFSPVSIATAFAM.LT.GAKSTTQSQYDGLAFNLTEIPEAQITLIGRIFMQM.I.SDR	136
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	ADFAFSLYKLIASNPDGQGNTPFSPVGSMAI.SL.I.AVGAKASTLSQYVSLGYSALTP-EQVNGEYGIH.II.MI.GISQD	144
** * * * * *		
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	DQQLNQNANAVRSGNPLEKFLNDLRHHYACELFRVDFTKPAEAAAEINRF.IATNTQDKIKDMVKDLDPDMVLLNYV	208
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	ELQLNSGNALFRNRLK.LKQFLEDVRYLYGSEAFSTDFQNAEEAKQINSYVEKKTGKIDLLSSVDESTALLI.NYI	228
猪獾 <i>Papio papio</i>	QLQLTIGNGLFLNKLXVVDKFLLEDVRYLYHSEAFVNFDETEAKKQINNYVEKGTQKRVLDYKELDRDVFALV.NYI	203
人类 <i>Homo sapiens</i>	QLQLTIGNGLFLSEGLKLVKFLLEDVRYLYHSEAFVNFDETEAKKQINNYVEKGTQKRVLDYKELDRDVFALV.NYI	212
小鼠 <i>Mus musculus</i>	ELQLSTIGNGLFVNNDLKLVEKFL.EEARNHYQAEVFSVNF.AESEAKVINDYVEKGTQKRVLDYKELDRDVFALV.NYI	206
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	ELQLSTIGNGLFVNNDLKLVEKFL.EEARNHYQAEVFSVNF.AESEAKVINDYVEKGTQKRVLDYKELDRDVFALV.NYI	206
楔齿蜥 <i>Sphenodon punctatus</i>	ETLLNMGALFIDEKIKPFIKPI.DDTSFYASFGSSNF.TS.AGACQINDYTKKTKGTEVDI.VKNI.GPDTVMVLYNYI	216
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AMQLEAGAGVA.I.RDGHVVDQFLKDAQHYNS.EA.FGVDFSKPEIAAAEINKF.IARKTHDKITMVKDLDAIDV.MLLI.NYM	224
* * * * *		
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	FFRQWQKPPFNGLTHKEDTVDETTIVQVDMRVRGVRDFYQDFENHTVIMLPY-KGNTSMMLVLPDGRMQVEGY	286
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	YFRGKWRKPPDEELTQGETFYVDENTNVTVMRRRTGMVNAFDRKIGCTVVQTPY-KGNASALFTLPDGRKQVEEA	306
猪獾 <i>Papio papio</i>	FFKGGWRPPEVEATEDEDFHVDQATTVKVPMMRRI.GMFINVHCCKI.SSIVLIMKY-LGNATAITPFPDGRKQIIE.NE	281
人类 <i>Homo sapiens</i>	FFKGGWRPPEVEATEDEDFHVDQATTVKVPMMRRI.GMFINVHCCKI.SSIVLIMKY-LGNATAITPFPDGRKQIIE.NE	290
小鼠 <i>Mus musculus</i>	LFKGGWRKPPDPEATEDEDFHVDGSTTVKVPMMTISGM.IHIIIHCS.TI.SSIVLIMDY-AGNATAVPLIPDGRMQIIE.EQT	284
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	FFKGGWRPPEVEATEDEDFHVDGSTTVKVPMMNRLGM.DMHHCS.TI.SSIVLIMDY-LGNATAITPFPDGRMQIIE.EQT	284
楔齿蜥 <i>Sphenodon punctatus</i>	LLKAYWHPPEVEATEDEDFHVDGKTSVKVDMNPDSDRNLSLHDKLSCLVQVVDLPLQRNVAATPILP.DGRKMQVEEA	296
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	YFRGKWRKPPDAKLTAKADFKVDQDTIVQVDMRRTGRDLYQDPVNGTIVMMVPPY-KGNTSMMLVLPDGRKMQVEEA	302
* * * * *		
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	INKDYIRHWHDSLY-RSSVDLSLKPFSISABEASLSTLTEMGI.TDAFADNDFSGISNE-IKLVKYSVSHQVLSVDEK	363
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	LERPTMSWKKLFR-YQSVRLSIPKFSISAEALDLEVFVKLGVDFVFSDEADLTGLIVEE-AKLVKSKAVHRAVL.TIDEK	383
猪獾 <i>Papio papio</i>	LTHDITIKFLENEN-RRSANLHLPKLIATGTYDLKTVLGHILGITKVFNSGADLSGVTEE-APLKVSKAVHRAVL.TIDEK	358
人类 <i>Homo sapiens</i>	LTHDITIKFLENED-RRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGLGILGITKVFNSGADLSGVTEE-APLKVSKAVHRAVL.TIDEK	367
小鼠 <i>Mus musculus</i>	LSKELISKFLNRR-RRLAQIHPRLSISGEYNLRTMSPLGITRIFPNAGDLSGITEENAPLKVSKAVHRAVL.TIDEK	362
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	LTKDLISRFLNRR-TRSAITLYPPKLSISGTYNLRTI.SSLGITRIFPNADLSGITEE-APLKVSKAVHRAVL.TIDEK	361
楔齿蜥 <i>Sphenodon punctatus</i>	LSVYVLRLEKSLRKRFSRTHLSTPRISISGTYDVKIFRMRGVTVEFVFNQADLSGTTGS-PDLKVSRAVHRAVLI.VIDEN	375
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	LCRIILKNIWHDKLFI-RSSVDLSPKFSISATSKGLILKDMGMTDAFNDAKDFSGMTEE-VKYSVQVLIQAVMSVDEK	379
* * * * *		
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	GTEAAATTELVMPMSMPTMRLDRPMAVFLLEHSTRVSLFMGKINNPVAV	414
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	GTEAAARTAFELMPLMPPNIQYNRPHLLTIYDMETKHLFLGRIANPAN-	433
猪獾 <i>Papio papio</i>	GTEAAGAMFLEAIPMSIPEVKNPKPVLMIEQNTKSPFLGKVVNP.TQK	409
人类 <i>Homo sapiens</i>	GTEAAGAMFLEAIPMSIPEVKNPKPVLMIEQNTKSPFLGKVVNP.TQK	418
小鼠 <i>Mus musculus</i>	GTEAAAVTVLQMVPMSPPLTRFDHPFLFIFEEHTQSPITFLGKVVDP.THK	413
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	GTEAAGATVVEAVPMSLPPQVQFDHPFLFIVESETQSPFLGKVVDP.THR	411
楔齿蜥 <i>Sphenodon punctatus</i>	GTEASATVIELVPMSPVPPVVKLNRPLFSDVKTAVHSLFMGKVVNP.PEK	426
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	GTEAAATTEIMPMSLPTVLLNRPFLVLI.VEDSTMSLIFMGIINPTA-	429
**** * * * * *		

图 4 斜带石斑鱼与其他物种 AAT 氨基酸序列同源性比较

Fig. 4 Comparison of the deduced amino acid sequence of AAT from *Epinephelus coioides* with that from other species

斜带石斑鱼 AAT 为本实验克隆; \* :完全相同的氨基酸; - :此位置缺少氨基酸。

Orange-spotted Grouper is cloned by our laboratory. The identity amino acid residues are indicated by asterisk.

Dashes indicate the amino acid gaps that are necessary to align these sequences.

高其人工育苗仔鱼成活率有重要意义。

参 考 文 献

[ 1 ] 金惠铭. 病理生理学. 北京: 人民卫生出版社, 2001, 113.  
 [ 2 ] Tillett W S, Francis T. Sero logical reaction in pneumonia with

a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*, 1930, 52: 561 ~ 571.

[ 3 ] 朱水山, 余戎, 张弘英等. 肝硬化合并感染的 C-反应蛋白水平及其临床意义. 江西医学院学报, 2004, 44 (1): 48.  
 [ 4 ] Volanakis J M. Complement activation by C-reactive protein

- complexes. *Ann NY Acad Sci*, 1982, **389**:235 ~ 250.
- [ 5 ] Kilpatrick J M, Volanakis J M. Opsonic properties of C-reactive protein stimulation by phorbol myristate acetate enables human neutrophils to phagocytize C-reactive protein-coated cell. *J Immunol*, 1985, **134**:3 364 ~ 3 370.
- [ 6 ] Mørtensen R F, Duszkiewicz J A. Mediation of CRP dependent phagocytosis through mouse macrophage Fe<sub>2</sub>-receptors. *J Immunol*, 1977, **119**:1 611 ~ 1 616.
- [ 7 ] Xia D Y, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:2 575 ~ 2 580.
- [ 8 ] Kushner I, Feldmann G. Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *J Exp Med*, 1978, **148**:466 ~ 477.
- [ 9 ] Georgina R, Bibiana N, Guillemo P. Isolation of alpha-1-antitrypsin from human plasma by partitioning in aqueous biphasic systems of polyethyleneglycol-phosphate. *Journal of Chromatography B*, 2002, **780**:389 ~ 396.
- [ 10 ] Janciauskiene S, Moraga F, Lindgren S. C-terminal fragment of alpha-1-antitrypsin activates human monocytes to a pro-inflammatory state through interactions with the CD36 scavenger receptor and LDL receptor. *Atherosclerosis*, 2001, **158**(1):41 ~ 51.
- [ 11 ] Mashiba S, Wada Y, Takeya M, et al. In vivo complex formation of oxidized alpha (1)-antitrypsin and LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**(11):1 801 ~ 1 808.
- [ 12 ] Graziadei I, Weiss G, Egger C, et al. Modulation of iron metabolism in monocytic THP-1 cells and cultured human monocytes by the acute-phase protein alpha-1-antitrypsin. *Exp Hematol*, 1998, **26**(11):1 053 ~ 1 060.
- [ 13 ] Moraga F, Lindgren S, Janciauskiene S. Effects of noninhibitory alpha-1-antitrypsin on primary human monocyte activation *in vitro*. *Arch Biochem Biophys*, 2001, **386**(2):221 ~ 226.
- [ 14 ] Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol*, 2004, **5**(3):182 ~ 190.
- [ 15 ] Schmechel D E. Art, alpha-1-antitrypsin polymorphisms and intense creative energy: Blessing or curse? *Neuro Toxicology*, 2007, **28**:899 ~ 914.
- [ 16 ] 周仁杰, 林涛. 斜带石斑鱼人工育苗技术试验. 台湾海峡, 2002, **21**(1):57 ~ 62.
- [ 17 ] 周立斌, 邓妹芳, 张海发等. 斜带石斑鱼亲鱼培育和胚胎发育的研究. 惠州学院学报, 2006, **12**(6):36 ~ 41.
- [ 18 ] 杜锦珠, 夏东元. 河蚌 C 反应蛋白的性质研究. 生物化学杂志, 1988, **4**:296 ~ 300.
- [ 19 ] Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann NY Acad Sci*, 1982, **389**:39 ~ 48.
- [ 20 ] 李新胜, 许金秀, 张金城等. 2 型糖尿病肾病患者血清 C 反应蛋白与脂代谢异常的相关性研究. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, **8**(8):475 ~ 476.
- [ 21 ] Mendll M A, Patel P, Ballam L, et al. C-reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. *BMJ*, 1996, **312**(7038):1 061 ~ 1 065.
- [ 22 ] Hafeez W, Ciliberto G, Perlmutter D H. Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation sites used in three different cell types. *J Clin Invest*, 1992, **89**(4):1 214 ~ 1 222.
- [ 23 ] Perlmutter D H, Burrows J A J, Willis L K, et al. Method for the treatment of alpha-1-antitrypsin deficiency and related pathologies. *US Patent*, 2002, **11**(11):3 ~ 13.
- [ 24 ] Needham M, Stockley R A. Alpha 1-antitrypsin deficiency 3: Clinical manifestations and natural history. *Thorax*, 2004, **59**:441 ~ 445.