

牙鲆碱性磷酸酶 cDNA 序列分析与蛋白质高级结构预测

陈晓武, 施志仪*

(上海水产大学生物技术研究中心, 上海 200090)

摘要 为研究碱性磷酸酶(EC 3. 1. 3. 1; alkaline phosphatase, ALP)在牙鲆(*Paralichthys Olivaceus*)发育和变态中的作用,采用 RACE 的方法克隆了牙鲆 ALP 基因 cDNA 全长,通过生物信息学分析了核苷酸序列并进行蛋白结构预测。结果表明,牙鲆 ALP cDNA 全长为 1 811 bp,能编码 476 个氨基酸的蛋白质,分子量为 52 293. 1,等电点为 7. 67。编码区核苷酸 GC 含量在 ALP 同源基因中差异比较大,脊椎动物明显高于非脊椎动物和细菌。分子系统分析显示,牙鲆 ALP 和青黑斑河豚(*Tetraodon nigroviridis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)的组织非特异性 ALP 有较高的同源性,分子进化树和物种进化树是一致的。在蛋白序列中的一些重要的功能位点,包括金属离子结合位点、N 糖基化位点和丝氨酸磷酸化位点等表现了较高的保守性。牙鲆 ALP 和人胎盘 ALP(PALP)在蛋白序列上有 43 % 的相似性,其 3D 结构非常接近。通过氨基酸空间位置比较发现,牙鲆 ALP 中 141 和 203 位半胱氨酸对应于人 PALP 的 121 和 183 位半胱氨酸,推测能形成一个二硫键。在两者酶活性中心,3 个金属离子结合的氨基酸残基非常保守,Zn 离子周围的 9 个氨基酸中有 2 个不同;Mg 离子周围的 7 个氨基酸也只有 2 个不同,包括一对类似的丝氨酸 155 和苏氨酸 175。

关键词 牙鲆; 碱性磷酸酶; 序列分析; 蛋白质结构预测; 生物信息学

中图分类号 Q55;Q71

cDNA Sequence Analysis and Tertiary Structure Prediction of Alkaline Phosphatase from *Paralichthys olivaceus*

CHEN Xiao-Wu, SHI Zhi-Yi*

(Research Center of Biotechnology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract To understand the function of alkaline phosphatase (ALP) in the development and metamorphosis of *Paralichthys Olivaceus*, full-length cDNA of ALP was cloned by the technique of RACE. The cDNA and deduced protein sequence were analyzed by bioinformatics. The results show that the full-length cDNA sequence consists of 1 811 bp, including an ORF encoding for 476 amino acids and a terminator codon. The GC content of coding region is different in selected ALPs. The predicted molecular weight of the deduced protein is 52 293. 1 and the pI is 7. 67. Molecular phylogeny tree shows that the ALP of *Paralichthys Olivaceus* shares high homology with the ALP of *Tetraodon nigroviridis* and *Danio rerio*. Several ALP functional sites, including the metal ion binding sites, phosphoserine intermediate, N-linked glycosylation sites, are conservative in those selected sequences. On tertiary structure prediction and structure alignment with human PALP, the flounder ALP has high similarity with that of human PALP, while 43 % similarity is shared by the primary structure of them. It might possess one disulfide bond, which is composed by the cysteines 141 and 203. Few of the amino acids residues around the Zn and Mg metal ions are different between the above

收稿日期:2006-11-12,接受日期:2007-03-23

国家自然科学基金项目(No. 30271017),国家教育部博士项目基金(No. 20040264001),上海市教委重点科研项目资助项目(No. 052252)

*联系人 Tel:(021)65710284,E-mail:zyshi@shfu.edu.cn

Received: November 12, 2006; Accepted: March 23, 2007

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30271017), Ph. D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20040264001), Key Research Foundation of Education Bureau of Shanghai (No. 052252)

* Corresponding author Tel:(021)65710284, E-mail:zyshi@shfu.edu.cn

mentioned two kinds of ALP, including two similar amino acids, i.e. S155, T175.

Key words *Paralichthys olivaceus*; alkaline phosphatase; sequence analysis; protein tertiary structure prediction; bioinformatics

碱性磷酸酶(ALP)是一个同型二聚体的磷酸单酯酶,它在生物界分布广泛,有众多催化底物和复杂的生理功能^[1,2].所有的ALP催化反应机制都基本相同^[3,4],其活性中心一般有3个金属离子,包括1个镁离子和2个锌离子起着重要作用.自然界存在的或通过基因突变得到的多种ALP突变体均有不同的酶学活性,这些都可以作为研究酶结构和功能的很好模型.人体内有4种ALP,包括组织非特异性ALP(TNALP)、肠ALP(IALP)、胎盘ALP(PALP)和生殖细胞ALP(GCALP)^[5].其中,TNALP分布没有组织特异性,其突变可导致一种先天遗传性疾病,称低碱性磷酸酶症^[6].小鼠基因敲除实验证明,TNALP在出生后对骨骼发育有重要的影响^[7].IALP、PALP和GCALP有组织特异性^[8],统称组织特异性碱性磷酸酶(TSALP),它们分别执行与营养吸收、生殖与发育相关的重要功能^[1].ALP在哺乳动物^[9]和一些水生生物^[10]胚胎发育中也起着重要的作用.

硬骨鱼类真骨总目是目前脊椎动物中物种多样性最为丰富的类群,但现在已经登录到GenBank的ALP仅有斑马鱼(*Danio rerio*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、黑青斑河豚(*Tetraodon nigroviridis*)的基因序列和大西洋鳕(*Gadus morrhua*)的蛋白序列.牙鲆是我国重要的海水养殖鱼之一,其从仔鱼到稚鱼的转变中经历了一个比较特殊的变态过程,身体由左右对称变为不对称,右眼移到左侧,骨骼^[11]、消化道^[12]等器官的形态和功能也都发生了较大的变化.ALP在这些变态发育中的表达和作用目前未见报道.本研究通过分子生物学和生物信息学方法,分析牙鲆ALP的分子特点,旨在为ALP在牙鲆变态发育中的功能以及酶的多态性研究提供资料.

1 材料与方法

1.1 材料

BD RACE Core Set 试剂盒(Clontech)和胶回收试剂盒购自大连宝生物公司. Trizol 试剂购自 Promega 公司. 克隆载体 pUCmr T、T4 连接酶、X-gal、IPTG 购自上海申能博彩公司. 核酸电泳 Marker 购自北京天根生物公司. 大肠杆菌 DH5 感受态由本实验室保存.

1.2 5 RACE 扩增和 3 RACE 扩增

实验用的牙鲆仔鱼来自北戴河牙鲆养殖场. 按

Trizol 试剂说明书提取仔鱼体内总 RNA. 根据牙鲆 ALP 的 EST 片段序列设计 5 RACE 扩增引物: 5-TGAGTTCAGTCCCTTGCAATAGCGF3; 3 RACE 扩增引物: 5-GATTTTGATGCCGTGGACCCTGACA-3, 扩增条件参照 RACE 试剂盒说明书. PCR 产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段经过纯化、TA 克隆、蓝白斑筛选, 每个平板挑取 4 个克隆, 经过菌落 PCR 验证确实有正确大小的插入片段后进行测序, 测序由上海生工生物技术公司完成.

1.3 生物信息学分析

通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 BLASTN、BLASTX 进行核酸和蛋白序列相似性检索, ORFfinder^[13]和 Pfam^[14]进行编码区和结构域预测, SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测, 使用 Clustal X (version 1.83)^[15,16]软件对牙鲆 ALP 及其同源基因编码区及蛋白序列分别进行序列比对, 并且保存为 aln、phy 等不同的格式. 除牙鲆基因由本实验克隆外, 其余序列均来自 GenBank 和 Swiss-prot 蛋白数据库, 其序列号和缩写等见 Table 1.

分子系统进化分析使用 MEGA (version 3.1)^[17]和 Phylip (version 3.63) 软件^[18], 用邻接法 (Neighbor-Joining) 和最大似然法 (Maximum Likelihood) 分别根据上述生物的 ALP 基因编码区和蛋白序列构建分子进化树. Mega 软件中 NJ 算法采用 poisson correction 替换模型和配对删除法. Phylip 软件的 seqboot 程序进行自展, protdist 程序进行距离计算, Neighbor 和 proml 程序分别构树, consense 程序推定一致树, drawtree 程序显示. 不同软件构建的 NJ 树和 ML 树进行比较后综合分析结果. 树分支的可信度测试均采用 1000 次重复抽样检验.

将牙鲆 ALP 蛋白序列提交英国伦敦大学理工学院生物信息学小组维护的 3D-PSSM 服务器^[19], 运用 1D-3D 序列剖面图并结合二级结构进行蛋白折叠识别和预测, 得到牙鲆 ALP 3D 结构. 人 PALP 结构来自 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>). 使用 PyMol 软件将上面预测的牙鲆 ALP 结构和数据库中人 PALP 的结构进行叠合, 根据人 PALP 中半胱氨酸以及活性中心与镁离子、锌离子结合的关键氨基酸在空间的位置, 找到牙鲆 ALP 相对应的氨基酸, 从

Table 1 Accession number , sequence similarity and GC content of coding region of all ALPs

Species and ALP (abbravation)	Protein accession number	mRNA accession number	Protein similarity	mRNA similarity	GC3s
Hs. TNALP	NP_000469.2	13 787 192	0.464	0.506	0.774
Hs. GCALP	P10696	178 427	0.435	0.502	0.796
Hs. FLAP	AAH09647.1	16 307 117	0.432	0.498	0.793
Hs. IALP	NP_001622.1	13 787 191	0.439	0.505	0.794
Bt. TNALP	NP_789828.2	110 347 573	0.469	0.521	0.809
Rn. TNALP	AAH88399.1	56 789 526	0.469	0.51	0.735
Mm. TNALP	AAC39908.1	11 692 622	0.467	0.499	0.681
Cf. TNALP	XP_535374.2	73 950 651	0.457	0.508	0.804
Mmu. TNALP	XP_001109717.1	108 998 961	0.368	0.413	0.777
Pt. PALP	XP_526062.2	114 583 880	0.307	0.457	—
Rn. PALP	XP_001064732.1	109 487 452	0.361	0.451	—
Bt. PALP	XP_606676.2	76 675 705	0.435	0.510	—
Bt. IALP	AAC33853.1	3 510 650	0.45	0.5	0.74
Xl. ALP	AAN31766.1	23 395 260	0.45	0.498	0.61
Tn. ALP	CAC06385.1	47 224 785	0.685	0.701	0.808
Tr. ALP	NP_001027823.1	74 095 958	0.439	0.486	0.704
Dr. TNALP	XP_692690.1	68 394 265	0.537	0.525	0.546
Dr. ALP	NP_001014375.1	62 122 904	0.471	0.485	0.556
Dr. ALPI	CAK04846.1	52 137 691	0.466	0.519	0.512
Pb. ALP	ABP52090	EF512551	1	1	0.618
Gg. TNALP	AAA92562.1	624 282	0.444	0.509	0.863
Ac. ALP	P83456	—	0.451	—	—
Pb. ALP	CAC35697.1	13 539 554	0.34	0.423	0.499
Dm. ALP	Q24238	4 071 030	0.307	0.388	0.678
Bm. ALP	S19607	12 248 367	0.326	0.362	0.466
Bm. SALP	BAA34926.1	3 986 122	0.339	0.304	0.446
Ab. ALP	Q9KYY4	—	0.179	—	—
Ss. ALP	BAB85685.1	19 071 966	0.188	0.268	0.446
Vs. ALP	AAK94204.1	15 281 409	0.182	0.304	0.463

Species abbrevation: Hs: *Homo sapiens*; Bt: *Bos taurus*; Rn: *Rattus norvegicus*; Mm: *Mus musculus*; Cf: *Canis familiaris*; Mmu: *Macaca mulatta*; Pt: *Pan troglodytes*; Xl: *Xenopus laevis*; Tn: *Tetraodon nigroviridis*; Tr: *Takifugu rubripes*; Dr: *Danio rerio*; Pb: *paralichthys olivaceus*; Gg: *Gallus gallus*; Ac: *Atlantic cod*; Pb: *Pandalus borealis*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Bm: *Bombyx mori*; Ab: *Antarctic bacterium*; Ss: *Shewanella* sp; Vs: *Vibrio* sp

而进行测量和比较.

2 结果

2.1 RACE 结果及序列特征

PCR 产物经过电泳 (Fig. 1), 克隆测序, 得到 1 811 bp cDNA 全长, 5 端和 3 端各有 65 和 315 个核苷酸的非编码区. 起始密码子为 ATG, 起始密码子区域碱基特征符合 Kozak 规则, 并且在起始密码子前 51 位同一编码框有 1 个终止密码子 TGA. 3 端有 polyA 尾, polyA 前 15 个核苷酸处为 AATAAA 的加尾信号. 推测编码区为 1 431 bp, 包括 1 个终止密码子 TGA (Fig. 2). 编码区 GC 含量为 54.8 %. 在 Table 1 所

列的各种酶的编码区, GC 含量有一定的差异, 最高的是鸡, 达到 65.8 %, 最低的是 2 种细菌, 只有 47 %, 脊椎动物均超过 50 %, 无脊椎动物均低于 50 %. 密码子第 3 位碱基 GC 含量差异较大, 高等动物明显高于低等动物, 最高达 86.3 %, 最低只有 44.6 % (Table 1).

编码区能编码 476 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 52 293.1, 理论等电点为 7.67. Ala、Gly、Leu 和 Thr 含量比较高, 分别占总氨基酸 9 % 左右. 蛋白质含 6 个 Cys, 前 22 个氨基酸为信号肽, 109 ~ 117 (IPDSAATAT) 位是 ALP 活性位点. 各种生物 ALP 序列中, Ala 都比较高, 平均为 9.93 %. 其次为 Gly、

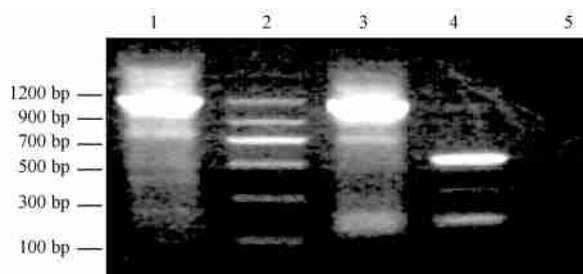


Fig. 1 Full-length cDNA cloning of ALP from *Paralichthys olivaceus* by the technique of 5'- and 3' RACE

Lanes 1 and 3 are the products amplified by 5'- and 3' RACE;

Lane 2 is 1200 bp marker;

Lane 4 is positive control (RACE product of TRF from human);

Lane 5 is a negative control (without GSP primer)

Leu, 平均含量接近 9%。不同生物 ALP 长短差别也比较大,最长的为猕猴 TNALP,有 652 个氨基酸,最短的是南极细菌,为 375 个氨基酸。在这些 ALP 序列中,Cys 有比较大的差异,特别是 *Shewanella. sp* 细菌 ALP 中,没有 Cys。猕猴 TNALP 中,有 12 个 Cys,是所选取的序列中最多的,在人 PALP 和牙鲆 ALP 中,分别有 5 个和 6 个 Cys。

2.2 序列比对和分子系统发育分析

ALP 蛋白序列比对的结果如 Fig. 3。以人 PALP 序列为参考,选取 10 段功能区进行比较,中间省略的序列用问号(?)表示。这 10 段功能区包括:D61、E330、D335、H339、D376、H451,共 6 个可能的金属离子结合位点;1 个丝氨酸磷酸化位点(S111);2 个 N

```

GACTTCAGTCGAGGAGCTGATTGTTAGGAAGGACGGAGGAGCTCATCTCCAGCCTGAACCTTGACC
1 M E S A K G A I L V L F L L V A F A S S W A K V E E E N P E
1 ATGGAGTCAGAAAAGGGCCATTTTGGTTCTTTTCTGCTGGTGGCGTTCGCGTCATCTGGGCCAAAGTTGAAGAGAGAATCCAGAG
31 F W R S Q A R K T L Q S A L D R K L N T N V A R N I L L Y L
91 TTCTGGAGGTCACAGGCACGGAAGACACTGCAGTCGGCTTGGACAGGAAGCTCAACACCAACGTTGCCAGGAACATCTGCTCTATCTC
61 G D G M G I T T Y T A A R I L K G Q L Q N Q T G E E T V M T
181 GGAGATGGGATGGGAATCACAACCTACACAGCGCTCGTATCTCAAGGACAGCTGCAGAACAGAGAGAGAGAGCGGTGATGACC
91 M D T F P S V G L A K T Y S V D F Q I P D S A A T A T A Y L
271 ATGGACACCTTCCCGAGCGTGGGATTGGCTAAACCTATAGTGTGGACTTCCAGATTCCAGACAGTGCAGCCACAGCCACAGCGTATCTG
121 C G V K T N L N T I A V N A A A R N G A C R T Q K G N E V T
361 TGTGGAGTGAAACCAACCTGAACACCATCGCAGTGAACGACAGCTCGCAACGGAGCCTGCCGACACAGAAGGGCAACGAGGTACG
151 S I L K A G K S V G I V T T T R V Q H A T P A A S Y
451 TCCATTCTAAAGTGGGCCAAGATGCAGGCAAGTCTGTGGCATCGTCACAACACACGCGTGAACATGCTACCCAGCAGCCAGCTAT
181 A H S A S R K W Y S D A N M P E A A K R D G C T D I A S Q L
541 GCCCAGACGCGCAGGAGAGTGGTACAGTGACGCTAACATGCTGAGGCCGCCAAGAGGACGGGTGACCCGACATCGCCTCTCAGCTC
211 L N N T D I D V I I G G G R K Y M T P R G T K D P E Y P S D
631 CTCAACAACACTGACATCGATGTGATCATTGGTGGTGGCAGAAAGTACATGACCCCCAGGGGACCAAGGACCCGAGTATCCAGCGAT
241 F S S R G K R K D G R N L I N E W Q S M K T G K V A H Y V W
721 TTCTCCTCCAGGGGCAAGAGAAAGGATGGACGCAATCTCATCAATGAGTGGCAGAGCATGAAACTGGGAAGGTAGCCCATATGTGTGG
271 N R T D F D A V D P D T T D Y L M A L F E P G D L R F E V E
811 AACAGAACAGCTTTTGATGCGGTGACCCCTGACACCACTGACTACCTCATGGCTCTGTTTGAACCTGGGGACCTGCGCTTCGAGGTGAG
301 R D P S M D P S I V E T T E K A I R I L Q K N P N G F F L L
901 AGGGACCAAGCATGGACCGTCCATTGTTGAGACCACAGAAAAAGCGATCCGATCCTCCAGAAAAACCCGAATGGCTTCTCTCTGCTA
331 V E G G R I D Q A H H A G Q A Y M A L H E T V A F D Y A I A
991 GTGGAGGGTGGCGTATCGACACAGGCTACACAGCTGGCCAGGCGTACATGGCCCTCCATGAGACGGTTGCCTTTGACTACGCTATTGCC
361 K G L E L T K E H E T L T L V M A D H S H P V T F N G Y P F
1081 AAGGACTGGAACACCAAAGACGAGACTCTCACTTTAGTGATGGCTGACCACTCCACCCGGTTACCTTCAATGGATACCCCTTTT
391 R G Q S I L G K S P L W A T D M L P Y T T L M Y G N G P G H
1171 CGAGGACAAAGCATTCTGGGTAATCCCACTGTGGGCCACAGACATGCTGCCTTATACCACACTGATGACGCAACGACCTGGACAC
421 K L T N G T A R N K L F T P P P P P V I H R E H G S R F S G
1261 AAACCTACCAATGGCACTGCCAGGAACAACTGTTACACCACCGCCACCACTGATACATCGGGAACACGGCTCACGGTTCAGCGGC
451 S A Q C P P Q F T A G T C T A D V R S L F P C E S H *
1351 TCTGCTCAGTGTCTCTCAGTTCAGTGTGTCACATGCACTGTGATGTAAGATCCCTTTCCCTTGTGAATCTCATGAG
TCTCATTCCACTGGCAATGATACAGGGGTGAGAGGTGAGGGCCTTAAGGGAGCGGGCTGGGAATCAGACACTTG
GCTCAGAGACACAGGAAGTGTGTGTGCTACTTTGACAGAAATCAGCCAAGGTTGAAAGAAATCTTTTAAATTAGAC
ACAGACATCCTTCTTCATCAGTTGAAGAAGACTGAATGGATGATAACTTATTGAAAGTGAATTTGTCTTTGTTTTTA
CTTTCATCGTTCTTGAATCCTTGTGTGTACCAATAAAAGCTGTGCTGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 2 Full-length cDNA and deduced amino acids sequence of alkaline phosphatase from *Paralichthys olivaceus*

The amino acids sequence underlined from 1 to 22 is signal peptide. The poly(A) signal (AATAAA) and the stop codon (TGA) are boxed.

Six cysteine residues are grey. TGA is a terminator codon before the original codon(ATG) at the same ORF

糖基化位点(N141 和 N268); 1 个 GPI 锚定位点(D503)

(氨基酸编号包括了 PALP 的 N 端信号肽部分)。

2.3 牙鲆 TNALP 高级结构分析

通过 NCBI 的 ORFfinder 和 Pfam 在线分析,牙鲆的 ALP 从 47 位到 408 位含有 alkPPc 的核心结构(图略). alkPPc 是 ALP 基因家族所共有的结构域.

3D-PSSM 服务器模拟牙鲆 ALP 显示有 20 个螺旋,24 个折叠,64 个转角和 280 个氢键. 在这个结构中,不包括蛋白前体中的信号肽,所以 N 端第 1 个氨基酸是 24 位的 Val. 人 PALP 结构来自 PDB 数据库,有 23 个螺旋,29 个折叠,64 个转角和 308 个氢键. 牙鲆 ALP 与人 PALP 叠合结果如 Fig. 5A,结构非常

类似. 牙鲆 ALP 中 6 个 Cys 位置见 Fig. 5B,人 PALP 的两个二硫键分别由 121 和 183 位的 Cys,467 和 474 位的 Cys 构成,牙鲆 ALP 中,C141 和 C203,距离为 7.29 Å,对应于人 PALP 的 C121 和 C183;牙鲆 ALP 中 C473 对应与人 PALP 的 C467,而和其它 3 个 Cys 距离都比较远,约在 15 Å

人 PALP 的活性中心和 2 个 Zn 离子和 1 个 Mg 离子结合的氨基酸残基如 Fig. 6 所示(其氨基酸编号不包括蛋白 N 端 22 个氨基酸的信号肽),分别有 9 和 7 个. 在牙鲆 ALP 空间结构中相对应的氨基酸

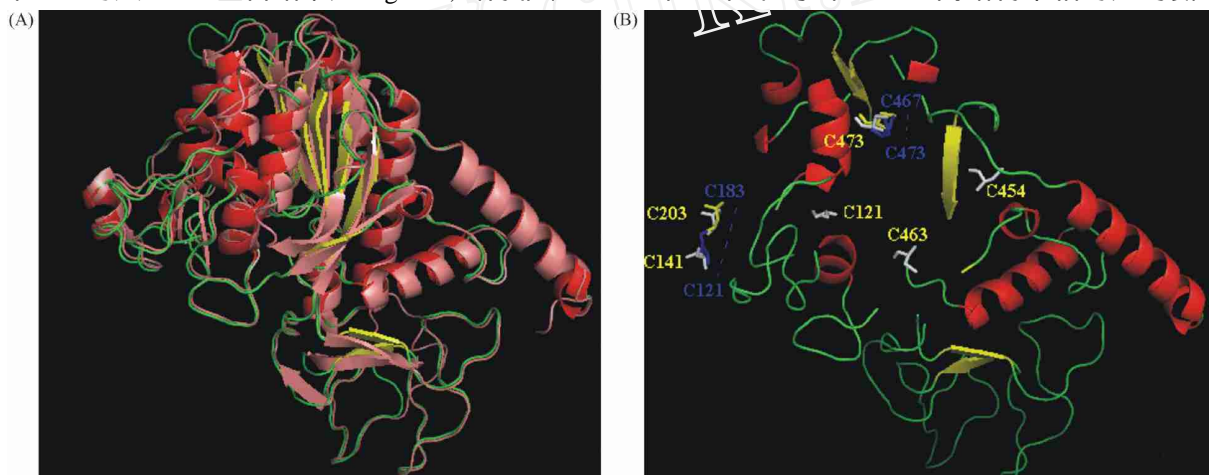


Fig. 5 Tertiary structure alignment and cysteine residues comparison of PALP and ALP from *Paralichthys olivaceus*

(A) Three dimensional model of ALP from *Paralichthys olivaceus* (with red -helix) overlapped with X-ray structure of human PALP (with pink -helix);

(B) Dimensional position comparison of six cysteine residues (yellow) from *Paralichthys Olivaceus* and four cysteine (blue) from human PALP

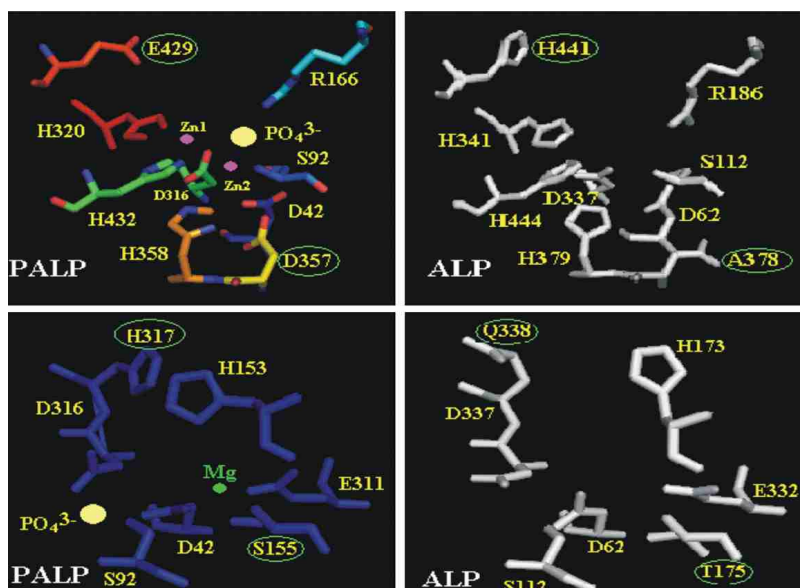


Fig. 6 Comparison of the residues coordination to the active metal ion sites in PALP (colored) and ALP from *Paralichthys Olivaceus* (white)

The upper panels focus on the surrounding amino acids residues of the Zn 1 and Zn 2 metal ion sites; the lower panels display the associated amino acids residues of the Mg metal ion sites.

The different residues are circled

用白色表示在左边.可见,其中大多数氨基酸是保守的,仅有4个位置的氨基酸不同:E429和H441,D357和A378,H317和Q338,以及性质接近的S155和T175.

3 讨论

人ALP的研究比较早且比较深入,主要分为组织特异性ALP和非组织特异性ALP 2大类,分别位于不同的染色体上:TNALP位于1号染色体,而TSALP位于2号染色体.斑马鱼ALP有3种,分别位于第1、11和20号染色体上,说明斑马鱼体内有比较细致的分化.大西洋鳕IALP^[20]和高等动物的TNALP生化特性表现较高相似性,其它低等生物由于已知的序列信息比较少,目前还不能确定有多少同源的种类.从本研究构建的分子系统树来看,高等动物的TNALP单独聚在一起,其分子进化关系和物种进化关系基本吻合;PALP和GCALP聚在一起,哺乳动物IALP和PALP表现了比较高同源性,同属于TSALP. TNALP和TSALP在ALP家族中属于2个直系同源基因家族.鱼类ALP和高等生物2大类ALP间聚类的bootstrap值均比较低,说明低等生物体内ALP分化还比较原始.本实验克隆的ALP在牙鲆体内广泛分布于肝、肾、皮肤、皮下肌肉和胃肠内表层等很多组织中(结果待发表),从其分布特点和分子进化特征来看,可认为其更接近与组织非特异性ALP.

大肠杆菌ALP(EALP)的晶体结构一直是了解此类酶三维结构的依据^[4].随着人PALP3D晶体结构的建立,促进了对动物ALP的认识.本研究采用3D-PSSM网络服务器对牙鲆ALP进行结构预测,并将其和人PALP的结构进行叠合,发现牙鲆ALP和人PALP蛋白序列具有高度相似性(43%),三维结构也非常接近.二硫键是维持ALP空间结构和发挥催化功能的重要条件,本研究比较牙鲆和人ALP的半胱氨酸的空间位置可见,牙鲆C141和C203分别对应人PALP的C121和C183,形成二硫键可能性很大.牙鲆C473对应于与人C467,但是和另外3个半胱氨酸C121、C454和C463距离比较远,形成二硫键可能比较小.所以,牙鲆ALP可能存在一个二硫键,这和大西洋鳕IALP结构类似,后者也只有1个二硫键^[20].这种特性一种可能的作用是使酶分子有更强的柔韧性,适应其生活在低温环境. Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 及其周围结合的氨基酸残基是构成酶活性中心的主要部分,对于维持酶的功能有重要作用.人PALP的

Zn^{2+} 及 Mg^{2+} 周围的关键氨基酸分别有9个和7个^[21],比较牙鲆ALP和人PALP的结果表明,在 Zn^{2+} 及 Mg^{2+} 周围的关键氨基酸分别各有2个氨基酸不同,其中包括1对性质类似的丝氨酸和苏氨酸的替换.

相对于高等动物ALP研究,水生生物ALP研究资料比较缺乏.目前,较多地集中在酶的分离、活性检测等方面,关于分子生物学方面的资料比较少,但随着斑马鱼、河豚等鱼类模式生物的研究,将对相关的研究提供一些参考.在牙鲆变态发育中,我们发现抑制ALP活性则能影响牙鲆的变态发育(结果待发表).通过RACE法克隆牙鲆TNALP的cDNA全长,5'端非编码区发现终止密码子TGA,3'端有PolyA结构,这些都说明,通过RACE得到的是cDNA全长.在此基础上,采用生物信息学方法对其推测蛋白序列进行分析和预测,特别是一些功能位点的比较,这些结果将为分子水平上进一步研究牙鲆ALP,包括ALP在变态发育中时空表达及其与激素的关系等研究奠定基础.

致谢 在本次研究中,复旦大学罗祖玉教授、复旦大学遗传所黄强博士在分子系统进化和蛋白结构模拟中给予了非常大的帮助及悉心指导,特此感谢!

参考文献 (References)

- [1] McComb R B, Bowers G N, Posen S. Alkaline Phosphatase [M]. New York: Plenum Press, 1979
- [2] Coleman J E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase [J]. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1992, 21: 441-483
- [3] Kim E E, Wyckoff H W. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures [J]. J Mol Biol, 1991, 218: 449-464
- [4] Sec B, Holtz K M, Kantrowitz E R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions [J]. J Mol Biol, 2000, 299(5): 1303-1311
- [5] Llinas P, Masella M, Sigbrand T, et al. Structural studies of human alkaline phosphatase in complex with strontium: Implication for its secondary effect in bones [J]. Protein Sci, 2006, 15: 1691-1700
- [6] Henthorn P S, Raducha M, Fedde K N, et al. Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 9924-9928
- [7] Fedde K N, Blair L, Silverstein J, et al. Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia [J]. J Bone Miner Res, 1999, 14: 2015-2026
- [8] Le Du M H, Millan J L. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases [J]. J Biol Chem, 2002, 277(51):

- 49808-49814
- [9] Hahnel A C, Rappolee D A, Millan J L, *et al.* Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo[J]. *Development*, 1990, **110**(2): 555-564
- [10] Whittaker J R. Segregation during cleavage of a factor determining endodermal alkaline phosphatase development in ascidian embryos [J]. *J Exp Zool*, 1977, **202**(2): 139-153
- [11] Minami T. The early life history of a flounder *Paralichthys Olivaceus* [J]. *Bull Japan Soc Sci Fish*, 1982, **48**(11): 1581-1588
- [12] Miwa S, Yamano K, Inui Y. Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis[J]. *J Exp Zool*, 1992, **261**(4): 424-430
- [13] Wheeler D L, Barrett T, Benson D A, *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**: D5-12
- [14] Bateman A, Birney E, Cerruti L, *et al.* The Pfam protein families database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(1): 276-280
- [15] Higgins D G, Sharp P M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer[J]. *Gene*, 1988, **73**(1): 237-244
- [16] Chenna R, Sugawara H, Koike T, *et al.* Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(13): 3497-3500
- [17] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, **5**(2): 150-163
- [18] Felsenstein J. PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2) [J]. *Cladistics*, 1989, **5**: 164-166
- [19] Kelley L A, MaCallum RM, Sternberg MJ. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM[J]. *J Mol Biol*, 2000, **299**: 499-520
- [20] Asgeirsson B, Nielsen BN, Højrup P. Amino acid sequence of the cold-active alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003, **136**(1): 45-60
- [21] Kozlekov A, Manes T, Hoylaerts MF, *et al.* Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatase [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(25): 22992-22999

沉痛悼念李玉瑞教授

中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所博士生导师李玉瑞研究员因病医治无效,于 2007 年 5 月 15 日在北京逝世,享年 86 岁。

李玉瑞教授是我国预防医学领域生物化学与分子生物学学科带头人,德高望重的老前辈。李玉瑞教授曾任本刊编委会常务编委和名誉编委,为《中国生物化学与分子生物学报》的创刊和发展作出了贡献。

李玉瑞教授为我国的预防医学和生物化学与分子生物学贡献了毕生精力。我们要学习她对事业执著追求,全心全意为人民服务的高尚品德,学习她治学严谨、诲人不倦的科学态度。

李玉瑞教授永垂不朽!

《中国生物化学与分子生物学报》编委会
2007 年 6 月