

中华大蟾蜍皮肤 *galectin-3* cDNA 分子多样性 及氨基酸变异分析

徐 跃, 宋敏国, 杨仙玉, 袁进强

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 以中华大蟾蜍 *Bufo gargarizans* 皮肤总核糖核酸(RNA)反转录第 1 链互补脱氧核糖核酸(cDNA)为模板, 以聚合酶链式反应(PCR)扩增出 *galectin-3* 基因片段并通过 TA 克隆将其插入到 pGM-T 载体, 通过 DNA 测序确定该基因片段序列, 然后利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)中 ORF finder 查找基因的全长开放阅读框(ORF)。筛选到 9 个编码 *galectin-3* 的 cDNA 序列, 其中 2 个序列编码 N-端截短型 *galectin-3*(*galectin-3C*)。Clustal X2.0 多序列比对和 DnaSP 4.0 分析 cDNA 序列的多样性。结果发现: 中华大蟾蜍 *galectin-3C* 区域具有高密度的单核苷酸多态性(SNP), 频率为每 20 bp 为 1 个单核苷酸多态性。推导的氨基酸序列比对显示这 9 个基因在 N 端和糖识别结构域(CRD)有较高同源性, 包括磷酸化位点、糖基结合位点和相关基序, 而在串联重复区则存在较大差异。*galectin-3* 基因及其编码蛋白的多样性很可能赋予中华大蟾蜍很强的环境适应能力。图 3 表 1 参 24

关键词: 动物学; 中华大蟾蜍; *galectin-3*; 分子多样性; 生物适应

中图分类号: Q959.5

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2012)04-0574-07

The *galectin-3* cDNA diversity and amino acid variation of *Bufo gargarizans* skin tissue

XU Yue, SONG Min-guo, YANG Xian-yu, YUAN Jin-qiang

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To obtain the cDNA clone of *galectin-3*, a first-strand cDNA library was synthesized from the total RNA of *Bufo gargarizans* skin and then used as a template for subsequent polymerase chain reaction (PCR) amplification. The PCR product was successfully cloned into pGM-T vector. After sequencing and using the National Center for Biotechnology Information (NCBI), an open reading frame (ORF) finder was utilized to determine the cDNA. Then, Clustal X 2.0 and DnaSP 4 software were used to analyze cDNA diversity and the deduced amino acid variation. Results of the ORF finder showed nine cDNA clones of *galectin-3*, two of which were estimated to encode truncated protein. Clustal X 2.0 and DnaSP 4.0 revealed a high density of single nucleotide polymorphism (SNP) with an average of 1 SNP per 20 bp. For deduced amino acid residues, the N-terminal and carbohydrate recognition domain (CRD) were highly consistent with a phosphorylation site, a CRD, and two related motifs. Meanwhile, the tandem repeated domain showed strong differences. Thus, this study indicated a molecular basis for bio-adaptation of *B. gargarizans* in certain habitat. [Ch, 3 fig. 1 tab. 24 ref.]

Key words: zoology; *Bufo gargarizans*; *galectin-3*; diversity; bio-adaptation

半乳糖凝集素(galectins)是动物凝集素的一类, 具有高度保守的糖识别结构域(carbohydrate recognition

收稿日期: 2011-09-27; 修回日期: 2011-11-15

基金项目: 浙江省 2006 年度留学人员科技活动择优资助项目; 浙江省科技创新活动计划(新苗人才计划)项目(2011R412042, 2010R412003)

作者简介: 徐跃, 从事野生动物保护与利用研究。E-mail: xuyue19852008@163.com。通信作者: 杨仙玉, 教授, 博士, 从事动物形态发育学、动物分子生物学等研究, E-mail: xianyu_yang@hotmail.com

domain, CRD), 能特异性识别并结合 β -半乳糖苷^[1]。目前, 已从动物组织和细胞中分离到 15 个 *galectin* 家族的成员, 在细胞核、细胞质、细胞表面、细胞基质和生物体液中都有发现^[2]。*galectin-3*(gal-3)是该家族中唯一的嵌合型代表^[1], 作为一个多功能蛋白, 参与胚胎发育、细胞黏附和增殖、凋亡、mRNA 剪切、细菌定植、调节免疫反应等^[3-7]。该蛋白由 3 个不同的结构域组成: ①12 个氨基酸残基组成的 N-端结构域, 其中 ser6 磷酸化位点具有调节细胞靶向的作用; ②富含甘氨酸(gly), 酪氨酸(tyr)和脯氨酸(pro)串联重复序列的类胶原结构, 作为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的底物; ③140 个氨基酸残基组成的 CRD, 包含凋亡基因 Bcl-2 家族同源序列 BH1 中的保守基序 NWGR(asp-trp-gly-arg), 该基序被认为是抑制凋亡活性的关键结构^[6,8]。gal-3 通过糖基识别系统与细胞表面受体多糖的结合和交联, 从而介导信号转导^[2], 在不同的生物过程中发挥作用。CRD 区域包含与晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)结合的位点, 和全部的糖基结合位点, 因此被认为是 gal-3 凝集功能的活性中心^[2]。本实验室从中华大蟾蜍 *Bufo gargarizans* 皮肤中克隆到一个 *galectin-3* 基因(登陆号: AEX58672.1)^[9], 并在后续实验中共获得了 9 个不同的 *galectin-3* cDNA 克隆。本研究对其核苷酸序列以及推导蛋白质的氨基酸序列进行比对和分析, 将有助于了解中华大蟾蜍对环境适应性的机制及 gal-3 蛋白的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 试验动物

健康中华大蟾蜍采自浙江农林大学东湖校区。将蟾蜍体表冲洗干净, 处死后剥离皮肤, 投入液氮中冷冻, 保存在-70℃超低温冰箱中备用。

1.2 主要材料和试剂

大肠埃希菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5 α , 聚合酶链式反应(PCR)试剂盒, Quantscript RT kit 及 pGM-T 载体购自 Tiangen 公司, 限制性核酸内切酶 *EcoR* I 购自 Takara, 脱氧核糖核酸(DNA)梯度和质粒小量抽提试剂盒购自碧云天生物技术研究, 核糖核酸(RNA)提取试剂盒购自上海博彩生物技术公司。

1.3 方法

1.3.1 引物 上游引物 P1 为: 5'-ATGTCTGACGGCTTTTCG-3'; 下游引物 P2 为: 5'-TTACACTGTAGTTAAG-GAAG-3', 均由上海桑尼生物科技有限公司合成^[9]。

1.3.2 皮肤总 RNA 的制备 取中华大蟾蜍皮肤组织, 按 RNA 提取试剂盒说明提取皮肤组织总 RNA, 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性, 用紫外分光光度计检测 RNA 溶液浓度和纯度。

1.3.3 反转录反应 采用 Quantscript RT kit(cDNA 第 1 链合成试剂盒)合成第 1 链 cDNA。

1.3.4 PCR 扩增 *galectin-3* 基因片段 以反转录合成的 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR, 各反应成分如下: cDNA 模板 1.0 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 1.0 μ L, 氯化镁(25 mmol $\cdot$ L⁻¹)1.2 μ L, 使用引物 P1 和 P2(2 μ mol $\cdot$ L⁻¹)各 1.0 μ L, 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)(10 mmol $\cdot$ L⁻¹)0.8 μ L, *Taq* 酶(5 $\times$ 16.67 mkat $\cdot$ L⁻¹)0.2 μ L, 补加灭菌去离子水至 20.0 μ L。反应条件为: 94℃ 5 min, (94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 45 s) $\times$ 30 循环, 72℃ 8 min。使用 10 g $\cdot$ L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物(5.0 μ L)。

1.3.5 pGM-T 载体连接和转化 PCR 产物 0.5 μ L, pGM-T 1.0 μ L, 2 $\times$ T4 DNA 快速连接缓冲液 5.0 μ L, T4 Ligase 1.0 μ L, 灭菌去离子水补足至 10.0 μ L, 23℃ 连接 10 min。连接产物 2.0 μ L 电击转化到大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞中(40.0 μ L), 迅速加入 160.0 μ L LB(Luria-Bertani)培养液, 37℃ 振荡培养 45 min, 取 50.0 μ L 培养液均匀涂布于含氨苄青霉素(100 mg $\cdot$ L⁻¹), 异丙基- β -D 硫代半乳糖苷(IPTG, 24 mg $\cdot$ L⁻¹), 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal, 40 mg $\cdot$ L⁻¹)的 LB 平板, 37℃ 倒置培养过夜。

1.3.6 重组质粒的鉴定和序列测定 从 LB 平板随机挑取 16 个白色单克隆, 接种于 3.5 mL LB 培养液中(含氨苄青霉素 100 mg $\cdot$ L⁻¹), 37℃ 振荡培养过夜, 质粒小量提取试剂盒提取质粒, 并对质粒进行 DNA 限制性内切酶 *EcoR* I 消化。酶切反应体系 10.0 μ L: 质粒 1.0 μ L, 10 $\times$ K 缓冲液 1.0 μ L, *EcoR* I 0.2 μ L, 灭菌去离子水补足至 10.0 μ L; 37℃ 1 h。取 5.0 μ L 酶切产物进行 10 g $\cdot$ L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳, 确定阳性克隆及质粒的浓度, 制备 DNA 测序样品。

1.3.7 DNA 测序与序列分析 将确定为阳性的重组质粒命名为 pGM-T-gal-3, 委托上海桑尼有限公司使用载体上游引物 T7 和下游引物 SP6 对目的基因片段分别进行正向和反向测序。测序结果经美国国家生

物技术信息中心 (NCBI) 的 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) 查找 *galectin-3* 基因的 ORF, 推导出氨基酸序列。Clustal X2.0 多序列比对用于蟾蜍皮肤 *galectin-3* cDNA 序列多样性分析与氨基酸位点突变分析; 运用 DnaSP 4.0 软件分析核苷酸多样性; 利用 MEGA 4.0 软件构建进化树。

2 结果与分析

2.1 测序结果

使用 ORF Finder 程序分析序列, 获得 9 个不同的中华大蟾蜍 *galectin-3* 克隆, 分别命名为: *gal-3-1*, *gal-3-2*, *gal-3-3*, *gal-3-5*, *gal-3-6*, *gal-3-7*, *gal-3-9*, *gal-3-11*, *gal-3-13*, 编码区长度分别为 804, 789, 759, 735, 798, 522, 732, 552 和 729 bp, 各自编码 267, 262, 252, 244, 265, 173, 243, 183 和 242 个氨基酸残基(图 1~2)。其中 *gal-3-7* 和 *gal-3-11* 编码 N-端截短型蛋白。本研究选择编码 *galectin-3C* (N 端截短型 *galectin-3*) 区域的 522 bp 进行比对分析(图 1)。

2.2 N-端缺失突变

与 *gal-3-1* 相比, *gal-3-7* 和 *gal-3-11* 在 ORF 的 5' 端前缺失了部分核苷酸, 导致阅读框架发生改变, 从而使 *gal-3-7* 和 *gal-3-11* 编码的蛋白在 N 端失去了部分氨基酸残基, 翻译产物对应 *gal-3C*。*gal-3-7* 和 *gal-3-11* 分别由 522 和 552 个碱基组成, 各自编码由 173 和 183 个氨基酸组成的蛋白质(图 1~2)。N-端缺失突变体的发现将为 *galectin-3* 结构与组成的研究提供参考。

2.3 分子多样性

以 *gal-3-1* cDNA 序列为标准, 进行了核苷酸变异位点的分析(表 1)。在 *galectin-3* C-端的 522 bp 区域共检测到 26 个变异位点, 约占分析位点的 4.98%, 11 个为非同义突变, 15 个为同义突变, 平均每 20 bp 出现 1 个 SNP, 呈现出高密度的单核苷酸多态性(SNP)。SNP 的主要原因包括碱基转换与颠换、插入与缺失(图 1)。9 个 cDNA 序列之间除了个别核苷酸位点发生了突变外, *gal-3-6* 在 81~89 bp 间插入了“TCCAAGTGC”序列(图 1)。

表 1 中华大蟾蜍 *galctin-3C* 基因编码区核苷酸多样性分析

Table 1 Analysis of nucleotide diversity in *galectin-3C* coding region of *Bufo gargarizans*

样本/个	多态位点	平均核苷酸差异	核苷酸多样性	Tajima's <i>D</i> 值	Fu-Li's <i>D</i> 值	Fu-Li's <i>F</i> 值
9	26	7.166 67	0.013 73	-1.250 43	-1.365 88	-1.500 39

用软件 DnaSP 4.0 对 *galectin-3C* 基因序列进行了中性检验, 9 个样本的平均核苷酸差异数为 7.166 67, 核苷酸多样性为 1.37%, 进行 Tajima's *D*, Fu-Li's *F*, Fu-Li's *D* 检验, 3 种中性检验值均为负值且未达到显著水平($P>0.10$), 表明 *galectin-3C* 序列符合中性突变假说, 呈中性进化。

2.4 氨基酸位点突变

多序列比对分析, 发现中华大蟾蜍与人的 *gal-3* 在 N 端前 16 个氨基酸位点相当保守。*gal-3* 在富含酪氨酸, 脯氨酸和甘氨酸的串联重复序列中保守性较差, 彼此之间表现出较大的差异性。在中华大蟾蜍 *gal-3* 中发现大量富含酪氨酸, 脯氨酸和甘氨酸的串联重复序列“QP(A)QQY(F)PG”和“QQYPG”, 且在各序列中的重复频率不同, 可能暗示了 *gal-3* 是从富含脯氨酸/甘氨酸单元的祖先进化几次之后而来的。中华大蟾蜍与哺乳动物 *gal-3* 氨基酸序列存在差异, 但在糖基结合关键位点和基序上与人 *gal-3* 蛋白具有一定的保守性。中华大蟾蜍 *gal-3* 在 ser6 上高度保守, 可能是其磷酸化位点。对中华大蟾蜍 *gal-3* 的糖识别结构域(CRD)氨基酸序列进行分析发现: 保守基序 HFNPRF 在中华大蟾蜍 *gal-3* 蛋白中变异为 HCNPRF, 而另一保守基序 WGXEXR 在中华大蟾蜍 *gal-3* CRD 中高度保守。

2.5 中华大蟾蜍 *galectin-3* 的进化树分析

以 *Xenopus (Silurana) tropicalis* (NP_988986.1) 和 *Xenopus laevis* (NP_001079643.1) 的氨基酸序列为外群, 与本实验获得的 9 个中华大蟾蜍 *galectin-3* 的 cDNA 推导的氨基酸序列构建了 N-J 系统进化树(图 3)。结果显示本研究中的 9 个克隆聚为一枝, 与 *Xenopus (Silurana) tropicalis* 和 *Xenopus laevis* 的 *galectin-3* 分属 2 枝。提示中华大蟾蜍与 *Xenopus (Silurana) tropicalis* 和 *Xenopus laevis* 的 *galectin-3* 之间存在种属差异性。


```

gal-3-1 ATG CCT GCA GGT GGA CAG CAG TAC CCA GCA TAT CCA GGT TTC CCA GGG CCA GGG CAG TCA TAC CCA GGG GCT CCA ACT
gal-3-2 ... ..C ... ..G. ... ..
gal-3-3 ... ..C ... ..T ... ..G. ... ..
gal-3-5 ... ..G ... ..
gal-3-6 ... ..C ... ..G. ... ..
gal-3-7 ... ..
gal-3-9 ... ..C ... ..G. ... ..A ... ..
gal-3-11 ... ..C ... ..G. ... ..
gal-3-13 ... ..G ... ..C ... ..G. ... ..G ... ..

gal-3-1 GC- --- --A GGA CAA ACA GTA CCC TCA GCA CCT TCT GGT CCA AAG AAA GTA CCA TGT GAA ATA CCC TTG CCC TTG
gal-3-2 ..- --- --- ..G. ... ..
gal-3-3 ..- --- --- ..
gal-3-5 ..- --- --- ..
gal-3-6 ..T CCA ACT GC. ... ..G. ... ..A..
gal-3-7 ..- --- --- ..
gal-3-9 ..- --- --- ..G. ... ..
gal-3-11 ..- --- --- ..G. ... ..
gal-3-13 ..- --- --- ..G. ... ..

gal-3-1 GGG TGC ACA AAA GGA CTG CTG TTG AAT ATC AGT GGC GTA CCG AAT GGC AAA AGG TTT GTT ATT GAC TTT AAA GAA GGA
gal-3-2 ... ..
gal-3-3 ... ..
gal-3-5 ... ..
gal-3-6 ... ..A ... ..
gal-3-7 ... ..
gal-3-9 ... ..
gal-3-11 ... ..
gal-3-13 ... ..

gal-3-1 AAT GAT ATT GCT TTC CAC TGC AAT CCC CGT TTT GAT GAA CGG CCT AAT GTC CTT GTG CGC AAT TCA ATG ATT CGT GGC
gal-3-2 ... ..T
gal-3-3 ... ..
gal-3-5 ... ..
gal-3-6 ..A.. ... ..C ... ..A.. ... ..G.. ..T
gal-3-7 ... ..
gal-3-9 ... ..
gal-3-11 ... ..T
gal-3-13 ... ..A ... ..T

gal-3-1 GAA TGG GGA AGA GAG GAA CGT GAA TGT CCG AAG TTT CCA TTT CAG CAG GGA CAA CCA TTC AGG CTT CAA ATT CTC TGT
gal-3-2 ... ..
gal-3-3 ... ..
gal-3-5 ... ..T ... ..
gal-3-6 ... ..A.. ... ..G ... ..
gal-3-7 ... ..
gal-3-9 ... ..
gal-3-11 ... ..
gal-3-13 ... ..

gal-3-1 GAA CAA GAA GCC TTT AAA GTG GCT GTG AAC AAC GAG AAC ATC TGC CAG TAC CAG CAC AGG CTG AAA AAC TTA GCA GGG
gal-3-2 ... ..
gal-3-3 ... ..
gal-3-5 ... ..
gal-3-6 ... ..G. ..G ... ..G ... ..
gal-3-7 ... ..
gal-3-9 ... ..
gal-3-11 ... ..C ... ..
gal-3-13 ... ..C ... ..

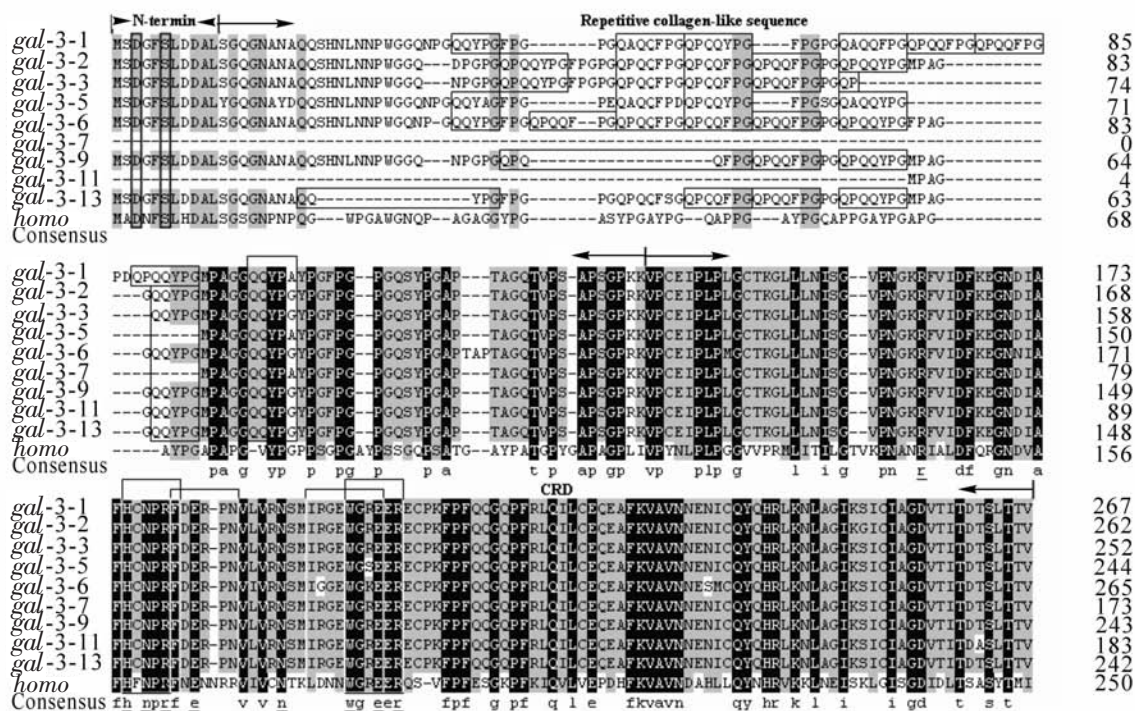
gal-3-1 ATT AAG AGT ATA TGC ATT GCT GGT GAC GTC ACC ATC ACT GAC ACT TCC TTA ACT ACA GTG TAA
gal-3-2 ... ..G.. ... ..
gal-3-3 ... ..T ... ..
gal-3-5 ... ..
gal-3-6 ... ..T ... ..
gal-3-7 ... ..
gal-3-9 ... ..
gal-3-11 ... ..G.. ... ..
gal-3-13 ... ..

```

• 表示与第1个序列的碱基相同，—表示对应的碱基缺失

图 1 中华大蟾蜍编码 *galectin-3C* 的 cDNA 多序列比对

Figure 1 Multiple sequence alignment of cDNAs of *galectin-3C* of *Bufo gargarizans*



X 表示直接参与糖结合的氨基酸残基

图2 中华大蟾蜍编码 *galectin-3* 多序列氨基酸比对

Figure 2 Multiple sequence alignment of amino acid sequences of *galectin-3* of *Bufo gargarizans*

3 讨论

3.1 *galectin-3* 分子多样性与两栖类动物的生物学适应意义

两栖类动物皮肤裸露、潮湿，利于微生物生长，为了抵御病原微生物的侵袭，在长期自然进化过程中形成了独特的防御微生物侵袭机制^[10]。两栖类皮肤功能基因组具有多样性丰富、快速重组突变的特征，是探讨生物适应的基因基础、基因形成机制和进化特性等生物学基本问题的优秀模型^[11]。有研究表明，一些生物有机体能快速地改变表型特征来适应各种逆境的环境，就是与基因中的重复序列在 DNA 和 RNA 或者蛋白质合成过程中产生的滑动错配而诱导产生有关^[12]。

本实验发现在同一个中华大蟾蜍个体中出现多个不同 *galectin-3* 序列的情况，呈现出分子多样性(图 1 和表 1)，从而导致了 *gal-3* 在氨基酸组成上的多样性(图 2)，这或许是生物快速适应外界环境变化的分子基础。本研究的研究结果与前人对大蹼铃蟾 *Bombina maxima* 皮肤分泌物 Maximin 及 Maximin H 抗菌肽分子多样性，滇蛙 *Rana pleuraden* 皮肤抗感染多肽 cDNA 序列多样性，黑带蛙 *Rana nigrovittata* 皮肤中缓激肽类似肽(bradykinin-related peptides, BRP)结构多样性等的研究结果共同揭示了两栖动物的生物学适应的分子生物学机制^[11,13-14]。

3.2 中华大蟾蜍 *gal-3* 的功能预测

推导的氨基酸序列比对显示这 9 个序列在串联重复区存在较大差异，主要是重复单元“QP(A)QY(F)PG”和“QQYPG”出现频率不同(图 2)，但与人 *gal-3* 在 N 端和 CRD 域有较高一致性，主要表现在磷酸化位点、糖基结合位点和相关基序上。

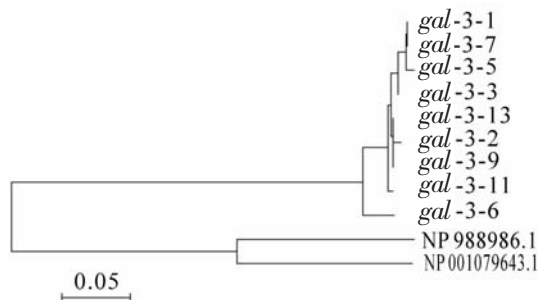


图3 中华大蟾蜍和爪蟾 *galectin-3* 分子进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of *galectin-3* composed by comparing *Bufo gargarizans* with two *Xenopus* spp.

中华大蟾蜍与人的 *gal-3* 在 N 端前 16 个氨基酸位点相当保守(图 2)。有研究表明：缺失开始的 11 个氨基酸会导致 *gal-3* 的分泌封闭^[15]，而 *ser6* 在哺乳动物 *gal-3* 中承担着调节成纤维细胞的磷酸化的任务^[16-17]，磷酸化可以大大降低 *gal-3* 与多价配基的结合^[18]。*ser6* 是酪蛋白激酶 I(CKI)在体外的有效底物^[19]，并且 *ser6* 附近保守的 *asp3* 对于 CKI 底物的识别非常重要^[20]。而突变 *ser6* 则封闭了 *gal-3* 抑制失巢凋亡(anoikis)的能力^[21]。氨基酸序列比对表明，中华大蟾蜍 *gal-3* 在 *ser6* 与 *asp3* 高度保守(图 2)，可能具有类似哺乳动物 *gal-3* 中 *ser6* 磷酸化位点的功能。

gal-3 在糖识别结构域(CRD)的保守性主要表现在糖基结合位点和相关基序上。不同 *galectins* 之间 CRD 的氨基酸序列存在差异，但它们都享有 2 个保守的氨基酸基序 HFNPRF 和 WGEXR(X 为任意氨基酸)。HFNPRF 基序中的组氨酸(H)，天门冬酰胺(N)和精氨酸(R)，WGEXR 基序中的色氨酸(W)，谷氨酸(E)和精氨酸(R)已经被 X-射线晶体衍射和氨基酸定点突变证明它们参与 *galectins* 的糖结合过程^[22]。我们对来自中华大蟾蜍和人的 *gal-3* CRD 氨基酸序列进行分析发现：人 *gal-3* 蛋白中存在的保守基序 HFNPRF，在中华大蟾蜍 *gal-3* 蛋白中变异为 HCNPRF，所有 *gal-3* 氨基酸序列中均存在保守基序 WGEXR(图 2)。核磁共振显示，配体能诱导人 *gal-3* 糖基结合位点附近回路(loop 环)的构象改变，163~169 位氨基酸之间的回路(FNENRR)并不直接参与糖基结合，但在凋亡机制中对调节 *gal-3* 与其他蛋白作用是必需的，177~184 位氨基酸间的回路(LDNNWGRE)包含 NWGR 基序，直接参与糖基结合^[23]。中华大蟾蜍 *gal-3* 在这 2 个回路的氨基酸位点上保守性略低(图 2)，是否影响到这些区域的功能还有待研究。X-射线衍射分析表明：人 *gal-3* 的关键糖基结合位点有 *arg144*, *his158*, *asn160*, *arg162*, *glu165*, *asn174*, *trp181*, *glu184* 和 *arg186*^[24]。通过多序列对比分析，发现中华大蟾蜍的 9 条推导氨基酸序列在 9 个关键糖基结合位点上完全保守(图 2)，预测中华大蟾蜍 *gal-3* 具有结合糖基的功能。

参考文献：

- [1] DUMIC J, DABELIC S, FLÖGEL M. Galectins: an open-ended story [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1760** (4): 616 – 635.
- [2] ARGÜESO P, PANJWANI N. Focus on molecules: galectin-3 [J]. *Exp Eye Res*, 2011, **92** (1): 2 – 3.
- [3] HUGHES R C. Galectins as modulators of cell adhesion [J]. *Biochimie*, 2001, **83** (7): 667 – 676.
- [4] RABINOVICH G A, RIERA C M, LANDA C A, *et al.* Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology [J]. *Brazil J Med Biol Res*, 1999, **32** (4): 383 – 393.
- [5] RABINOVICH G A, BAUM L G, TINARI N, *et al.* Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? [J]. *Trends Immunol*, 2002, **23** (6): 313 – 320.
- [6] LIU Futong, PATTERSON R J, WANG J L. Intracellular functions of galectins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1572** (2/3): 263 – 273.
- [7] KRZESLAK A, LIPINSKA A. Galectin-3 as a multifunctional protein [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2004, **9** (2): 305 – 328.
- [8] 徐跃, 杨仙玉. Galectin-3 及其相关抑制剂的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2011, **32** (5): 417 – 421.
XU Yue, YANG Xianyu. Recent development in galectin-3 and its inhibitors [J]. *Chin J Biochem Pharm*, 2011, **32** (5): 417 – 421.
- [9] 徐跃, 宋敏国, 杨仙玉, 等. 中华大蟾蜍 *galectin-3* 基因的克隆、序列分析及其原核表达载体的构建[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, **34** (4): 46 – 52.
XU Yue, SONG Minguo, YANG Xianyu, *et al.* Cloning and analysis of *Bufo gargarizans galectin-3* gene and construction of its prokaryotic expression vector [J]. *J Southwest Univ Nat Sci Ed*, 2012, **34** (4): 46 – 52.
- [10] 赖仞, 冉永禄. 两栖类皮肤活性肽与活性生物胺[J]. 大自然探索, 1999, **18** (67): 71 – 74.
LAI Ren, Ran Yonglu. Active peptides and biological amines distributed in amphibian skin secretions [J]. *Explor Nat*, 1999, **18** (67): 71 – 74.
- [11] 张云. 两栖类动物皮肤分泌物及其生物学适应意义: 大蹼铃蟾皮肤分泌物蛋白质多肽组的启示[J]. 动物学研究, 2006, **27** (1): 101 – 112.
ZHANG Yun. Amphibian skin secretions and bio-adaptive significance-implications from *Bombina maxima* skin secretion proteome [J]. *Zool Res*, 2006, **27** (1): 101 – 112.

- [12] ROCHA E P, MATIC I, TADDEI F. over-representation of repeats in stress response genes: A strategy to increase versatility under stressful conditions [J]. *Nucl Acid Res*, 2002, **30** (9): 1886 – 1894.
- [13] 王旭. 滇蛙皮肤抗感染多肽的分离纯化、分子克隆及多样性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
WANG Xu. *Purification, Characterization, Molecular Cloning and Diversity Analysis of Anti-infective Peptides from Rana pleuraden Skin* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.
- [14] 陈利华. 黑带蛙(*Rana nigrovittata*)皮肤中胆囊收缩素和缓激肽的分离纯化、分子克隆及结构研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
CHEN Lihua. *Molecular Diversity, Structures and Functions of Antimicrobial Peptides from Skin of Rana nigrovittata* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.
- [15] GONG H C, HONJO Y, NANGIA-MAKKER P, *et al.* The NH₂ terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1999, **59**: 6239 – 6245.
- [16] YAMAZAKI K, KAWAI A, KAWAGUCHI M, *et al.* Simultaneous induction of galectin-3 phosphorylated on tyrosine residue, p21WAF1/CIP1/Sdi1, and the proliferating cell nuclear antigen at a distinctive period of repair of hepatocytes injured by CCl₄[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **280** (4): 1077 – 1084.
- [17] TSAY Y G, LIN N Y, VOSS P G, *et al.* Export of galectin-3 from nuclei of digitonin-permeabilized mouse 3T3 fibroblasts [J]. *Exp Cell Res*, 1999, **252** (2): 250 – 261.
- [18] MAZUREK N, CONKLIN J, BYRD J C, *et al.* Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (46): 36311 – 36315.
- [19] HUFLEJT M E, TURCK C W, LINDSTEDT R, *et al.* L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268** (35): 26712 – 26718.
- [20] SONGYANG Z, LU K P, KWON Y T, *et al.* A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1 [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, **16** (11): 6486 – 6493.
- [21] YOSHII T, FUKUMORI T, HONJO Y, *et al.* galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (9): 6852 – 6857.
- [22] 王婧. 捻转血矛线虫 galectin C 端 CRD 差异氨基酸突变对其生物学活性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
WANG Jing. *The Mutation of the Diversity Amino Acid in the C Terminal CRD of Galectins of Haemonchus Contortus Affects the Bioactivities of the Recombinant*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.
- [23] UMEMOTO K, LEFFLER H, VENOT A, *et al.* Conformational differences in liganded and unliganded states of galectin-3 [J]. *Biochemistry*, 2003, **42** (13): 3688 – 3695.
- [24] SEETHARAMAN J, KANIGSBERG A, SLAABY R, *et al.* X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (21): 13047 – 13052.