

## 三角帆蚌 alpha-2 巨球蛋白 cDNA 全长的克隆及表达特征

施志仪, 杨显祥, 陈晓武, 李勇

(上海海洋大学生物技术研究中心, 上海 200090)

**摘要:** alpha-2 巨球蛋白是河蚌体内重要的天然免疫因子, 参与广泛的免疫防御和调节。通过 RACE 法克隆了三角帆蚌  $\alpha_2M$  全长 cDNA 序列, 提交 Genbank, 获得核苷酸序列登陆号: DQ993157.1。同时, 采用生物信息学方法对 alpha-2 巨球蛋白进行了系统分析。该基因 cDNA 全长 5 124 bp, 其中编码区 4 836 bp, 5' 端非编码区 35 bp, 3' 端非编码区为 253 bp (含 polyA 尾 31 bp), 该基因能编码 1 611 个氨基酸, 其中前 23 个氨基酸残基为信号肽序列, 成熟蛋白分子量为 177 571.8 u, 等电点为 5.49。蛋白的不稳定系数为 39.53, 表明该蛋白是稳定的。在此基础上, 以 18 S 作为内标, 利用半定量 RT-PCR 法检测  $\alpha_2M$  基因在三角帆蚌不同组织和不同生理状态下的表达情况。结果表明, alpha-2 巨球蛋白仅在血细胞中有表达, 而在外套膜、闭壳肌、肠和性腺中没有表达。经注射大肠杆菌和嗜水气单胞菌 12 h 后, 三角帆蚌体内  $\alpha_2M$  的表达水平都有一定量的升高, 证明  $\alpha_2M$  是三角帆蚌基础免疫系统中的组成部分。本研究丰富了软体动物免疫学研究内容, 为三角帆蚌抗病机理提供理论资料。

**关键词:** 三角帆蚌; alpha-2 巨球蛋白; 基因表达

**中图分类号:** Q 785; S 917

**文献标识码:** A

alpha-2 巨球蛋白 (alpha-2 Macroglobulin,  $\alpha_2M$ ) 为动物血浆中的大分子糖蛋白和光谱蛋白酶抑制剂, 可以结合并清除组织中过量的蛋白酶以及细菌内毒素 LPS、植物凝集素 ConA、PHA 等, 保护组织在病理或感染条件下不受损害, 参与广泛的免疫防御和调节, 是重要的天然免疫因子<sup>[1-2]</sup>。当机体出现炎症或发生感染时,  $\alpha_2M$  进入组织, 与自身组织或病原体释放的过量的蛋白酶结合, 抑制蛋白酶的活性; 结合后的  $\alpha_2M$ -蛋白酶复合物可以通过与巨噬细胞、肝细胞等膜上的  $\alpha_2M$  受体结合后进入细胞, 由溶酶体系统对其清除, 从而阻止组织被进一步破坏<sup>[3]</sup>。除此之外,  $\alpha_2M$  还有其它多种功能, 如在鲎体内的  $\alpha_2M$  可以参与溶血过程<sup>[4]</sup>等。

目前对  $\alpha_2M$  基因克隆及功能研究还比较少, 仅有少数生物得到了  $\alpha_2M$  基因全序列, 如人

(*Homo sapiens*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、猪 (*Sus scrofa*)、鸡 (*Gallus gallus*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、七鳃鳗 (*Lampetra japonica*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、虾 (*Litopenaeus vannamei*)、鲎 (*Tachypleus tridentatus*)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 等。尤其在软体动物中, 只有少数证明  $\alpha_2M$  活性的存在, 如 Armstrong 证明了软体动物的大西洋浪蛤 (*Spisula solidissima*)、沟槽香螺 (*Busycon canaliculatum*) 以及乌贼 (*Loligo pealei* Lesueur) 存在  $\alpha_2M$  活性<sup>[5]</sup>, 但对  $\alpha_2M$  基因的克隆和蛋白功能的研究尚未开展。

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 作为一种重要的淡水育珠蚌, 其形成的珍珠, 珠质细腻光滑, 色泽鲜艳, 质量最佳, 在我国南方有大量养殖, 已

收稿日期: 2007-06-08

资助项目: 上海市重点学科建设项目 (Y1101); 上海市科委基础重大项目 (06aj14003)

作者简介: 施志仪 (1954-), 男, 上海人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物生物技术及海洋药物研究。E-mail: zyshi@shou.edu.cn

成为一些地方的支柱产业。近年来,蚌病害频发,尤其以“蚌瘟”病最为猖獗,引起大规模的死亡,造成产量下降,效益降低,严重威胁到育珠业的健康可持续发展,所以对三角帆蚌开展免疫学研究非常需要。其中,抗病基因的克隆和功能研究可为三角帆蚌进行免疫学研究以及抗病新品种的选育提供重要的理论基础和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验采用的三角帆蚌为3龄蚌,由浙江诸暨市阮仕珍珠研究所养殖基地提供,根据实验要求暂养于不同的玻璃缸(45 cm×24 cm×30 cm)中,以小球藻和生豆浆投喂。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)菌种由上海海洋大学病原库提供。菌种取回后接种到LB液体培养基中,37℃过夜振荡培养。

半定量试剂盒购自美国Ambion公司,采用18S rRNA作为半定量PCR的内标。5'和3'RACE购自TaKaRa生物公司。引物合成与测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

### 1.2 三角帆蚌 $\alpha_2$ M基因cDNA全长的克隆

围心腔抽取血淋巴液,汇集至20 mL,4℃,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,获得血细胞。用Trizol法提取血细胞的总RNA,总RNA的完整性利用1%的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,用紫外分光光度计进行纯度分析。

根据已有的栉孔扇贝、鲎、对虾、线虫、鲤、鲫等 $\alpha_2$ M基因序列,这些序列包含受体结合区和诱饵区,在相对保守的区域设计两对引物: $\alpha_2$ M-up I (5'-GGT TGT GGT GAA CAA AAC ATG G-3')和 $\alpha_2$ M-down I (5'-CCT GAG TAG AAG AGA ACC CTC C-3'); $\alpha_2$ M-up II (5'-TCA CTG CCT TCC AGC CTT TC-3')和 $\alpha_2$ M-down II (5'-CCA ACC AGC TCA CAG ATG CAA-3')。这两对引物分别扩增得到三角帆蚌 $\alpha_2$ M基因的受体结合区和诱饵区。

根据上面扩增的基因片段再设计5'和3'RACE引物,扩增两端未知区域。RACE引物如下:GSP-up:5'-TGGAAACAGCCGTGGCCTCAAGAT-3';GSP-down:5'-GTGTTGATGGCA TACATTG

CAGGTGGAC-3'。按照RACE扩增试剂盒使用说明合成RACE cDNA第一链,并按照给定的反应条件进行PCR扩增。PCR产物利用1%琼脂糖凝胶分析,并将所得片段回收,连接于pUCm-T载体,蓝白斑筛选,对阳性克隆进行测序。

利用ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)对基因编码区进行预测。信号肽分析由Signal P 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测。ProtParam在线工具 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)对推测的蛋白质进行生物化学特性分析,包括分子量、等电点和蛋白质稳定性等进行特征分析。

### 1.3 三角帆蚌 $\alpha_2$ M在不同组织中和病理条件下表达分析

取三角帆蚌外套膜、闭壳肌、肠、性腺和血细胞组织,引物 $\alpha_2$ M-up I和 $\alpha_2$ M-down I和18S内参引物在同一管中进行PCR,PCR反应体系为:cDNA第一条链合成液1.5  $\mu$ L,10×PCR Buffer 2.5  $\mu$ L,25 mmol·L<sup>-1</sup>的MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L,2.5 mmol·L<sup>-1</sup>的dNTP 2  $\mu$ L,5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>的上游引物 $\alpha_2$ M-up I和下游引物 $\alpha_2$ M-down I各2  $\mu$ L,18S引物0.5  $\mu$ L,5 U· $\mu$ L<sup>-1</sup>的DNA聚合酶0.25  $\mu$ L,无菌水12.75  $\mu$ L,总体积为25  $\mu$ L。

取15只3龄三角帆蚌[壳高为(5.340±0.418) cm],分为三组,分养于3个玻璃缸中,以小球藻和生豆浆投喂:第一组为对照组(5只),第二组为大肠杆菌注射组(5只),第三组为嗜水气单胞菌注射组(5只),具体步骤如下:取振荡培养后的大肠杆菌和嗜水气单胞菌,分别于5 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,弃上清,然后用灭菌的PBS悬浮分散,调整两种菌液浓度为1×10<sup>8</sup> ind·mL<sup>-1</sup>。以一次性1 mL注射器分别吸取PBS注射对照组,吸取大肠杆菌菌液注射大肠杆菌组,吸取嗜水气单胞菌注射嗜水气单胞菌组,注射时,每只蚌闭壳肌注射1 mL。放回玻璃缸中,感染胁迫12 h后,进行半定量RT-PCR,根据试剂盒的要求重新设计引物: $\alpha_2$ M-up III为:5'-CAC AAT CAC GGC CAT TCA TC-3'和下游引物 $\alpha_2$ M-down III:5'-CCT TCT TCT CCT CCT CTT CTC G-3',扩增长度约为410 bp。PCR反应后,1%琼脂糖凝胶电泳;扫描拍照后通过TotalLabv 1.10生物电泳分析系统定量,计算目的条带与

18 S rRNA 条带的光密度比值。实验设三次重复,取其平均值。统计分析由 SPSS 11.0 软件执行。

## 2 结果

### 2.1 $\alpha_2$ M 基因的克隆

$\alpha_2$ M 基因受体结合区和诱饵区片段的扩增 cDNA 合成后,进行受体结合区片段的扩增,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 841 bp 处出现特异性电泳条带(图 1),回收片段连入 pUCm-T 载体,得到重组质粒,测序得到 841 bp 的序列。

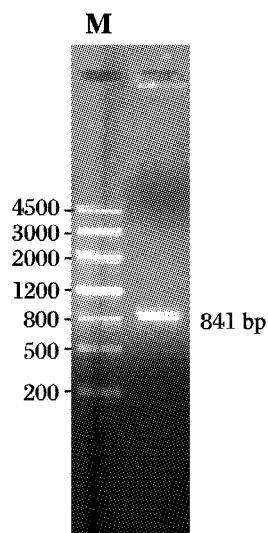


图 1  $\alpha_2$ M 基因受体结合区 RT-PCR 结果  
Fig. 1 RT-PCR result of receptor binding domain containing fragment of  $\alpha_2$ M

根据已经克隆得到的  $\alpha_2$ M 受体结合区序列,在其 5' 端内部设计下游引物。利用物种之间的同源性在上游设计上游引物,PCR 扩增得到诱饵区片段特异性条带(图 2),测序得到 614 bp 的基因片段。

#### $\alpha_2$ M 基因 5' 末端和 3' 末端片段的克隆

图 3 和图 4 即 RACE 扩增结果,经测序得到 5' 末端序列为 3102 bp,3' 末端序列为 1089 bp。将克隆所得的 4 个片段:从 5' 端到 3' 端依次为 5' 末端(5'RF)序列, $\alpha_2$ M 诱饵区片段(BDF), $\alpha_2$ M 受体结合区片段(RBDF)和 3' 末端(3'RF)序列,利用重叠关系拼接成一个连续的序列。三角帆蚌  $\alpha_2$ M 基因的全长 5124 bp,现已收录到 NCBI 数据库,序列号为 DQ993157。

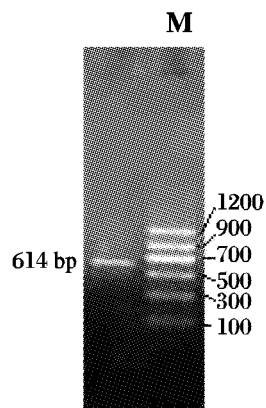


图 2  $\alpha_2$ M 基因诱饵区 RT-PCR 结果  
Fig. 2 RT-PCR result of bait domain containing fragment of  $\alpha_2$ M

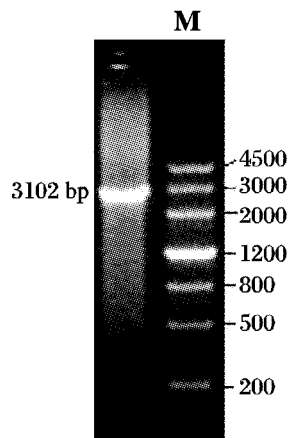


图 3 三角帆蚌  $\alpha_2$ M 基因 5' 末端片段  
Fig. 3 5' RACE of  $\alpha_2$ M in *Hyriopsis cumingii*

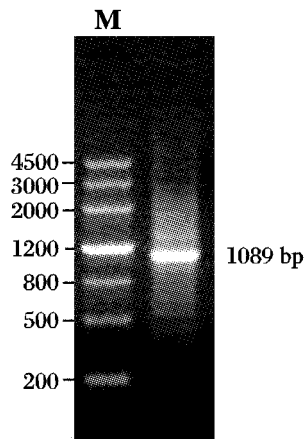


图 4 三角帆蚌  $\alpha_2$ M 基因 3' 末端片段  
Fig. 4 3' RACE of  $\alpha_2$ M in *Hyriopsis cumingii*

## 2.2 生物信息学分析

利用 NCBI 的 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 对序列进行分析,该序列包含一个开放读码框(Open Reading Frame, ORF),长度为 4 836 bp。5'非编码区(5' UTR)核苷酸序列长度为 35 bp,3'非编码区长度

为 253 bp(含 polyA 尾),三角帆蚌  $\alpha_2M$  基因序列推定能编码 1 611 个氨基酸的蛋白质(Genbank 登陆号:DQ993157)。

Signal P 3.0 软件对氨基酸序列进行分析结果显示序列 5' 端前 23 个氨基酸为信号肽序列(图 5)。ProtParam 工具对三角帆蚌  $\alpha_2M$  成熟蛋

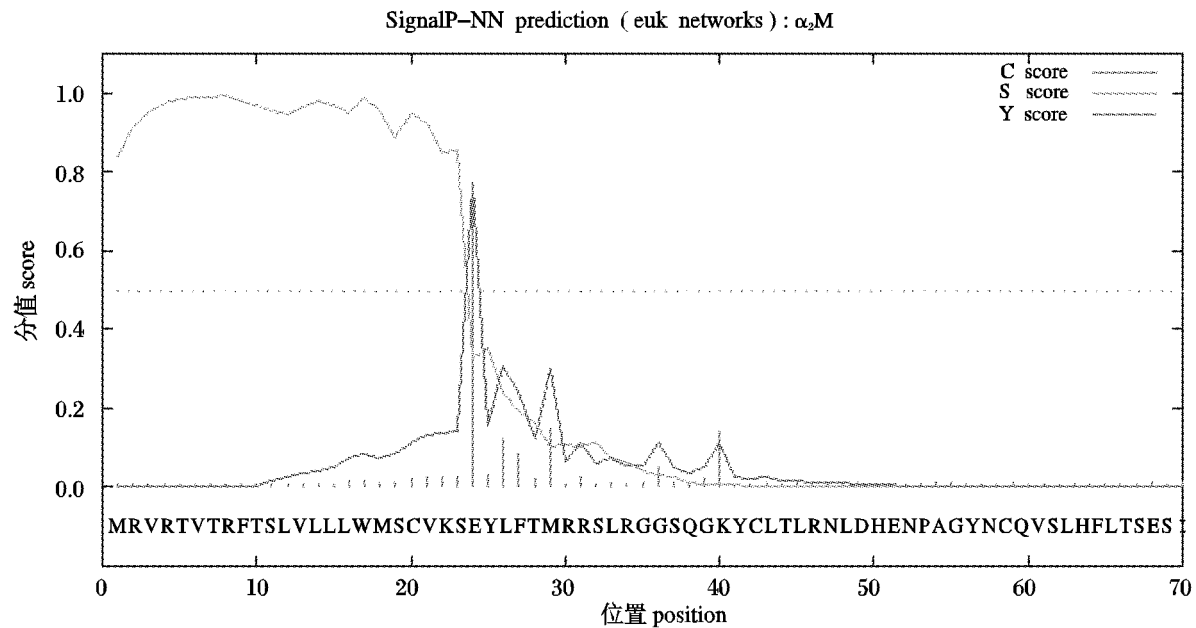


图 5 三角帆蚌  $\alpha_2M$  N 末端前 70 个氨基酸残基的信号肽预测

C score: 原始前切位点的分值; S score: 信号肽的分值; Y score: 综合分值

Fig. 5 Prediction plot based on the first 70 amino acid residuals in N-terminus of  $\alpha_2M$  of *Hyriopsis cumingii*

C score: raw cleavage site score; S score: signal poptide score; Y score: signal peptide score

白序列一级结构分析,蛋白分子量为 177 571.8 u,等电点为 5.49;蛋白的不稳定系数为 39.53,表明该蛋白是稳定的。

## 2.3 三角帆蚌 $\alpha_2M$ 基因在不同组织的表达

采用 18S rRNA 基因(315 bp)作为阳性对照,受体结合区片段为检测片段,在同一管中两组引物进行 RT-PCR 的方法,分析了三角帆蚌  $\alpha_2M$  基因在外套膜、闭壳肌、肠、性腺和血细胞的表达情况,发现除血细胞外,其它组织均未检测到  $\alpha_2M$  基因表达(图 6)。

## 2.4 病理条件下三角帆蚌 $\alpha_2M$ 表达变化

目的 cDNA 与 18S 内标在同一个反应管共扩增后,通过琼脂糖凝胶电泳观察,同一泳道有两条明显不同的条带,如图 7-a 所示,上面条带为目的条带,下面条带为 18S 内标条带,上下条带的光密度比值用来计算目的基因相对于 18S rRNA 在三角帆蚌在病理条件下的相对表达量。

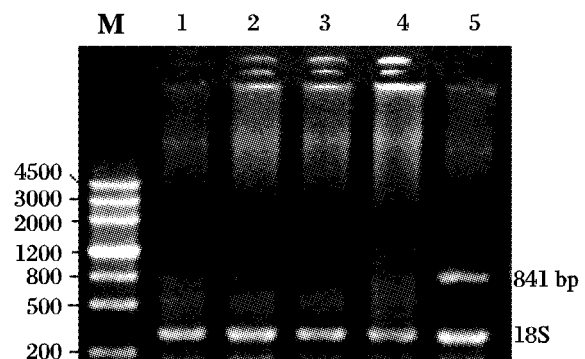


图 6 RT-PCR 检测三角帆蚌  $\alpha_2M$  在不同组织的表达

M:核酸分子标记;1: 外套膜;2: 闭壳肌;3: 肠;4: 性腺;5: 血细胞

Fig. 6 RT-PCR analysis of  $\alpha_2M$  expression in different tissues of *Hyriopsis cumingii*

M:Marker;1: mantle; 2:closing shell muscle; 3: intestine; 4: gonad; 5: blood cell

对照组为注射 PBS 组,其 mRNA 的相对表达水平为  $(0.442 \pm 0.011)$ ;注射大肠杆菌组 mRNA 的相对表达水平为  $(0.939 \pm 0.043)$ ,注射嗜水气单胞菌组的 mRNA 的相对表达水平为  $(1.183 \pm 0.079)$ 。图 7-b 显示了目的基因  $\alpha_2M$

在病理情况下的表达水平变化,经统计分析,闭壳肌注射大肠杆菌和闭壳肌注射嗜水气单胞菌后  $\alpha_2M$  基因的表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ),而闭壳肌注射嗜水气单胞菌  $\alpha_2M$  的表达水平又高于闭壳肌注射大肠杆菌 ( $P < 0.01$ )。

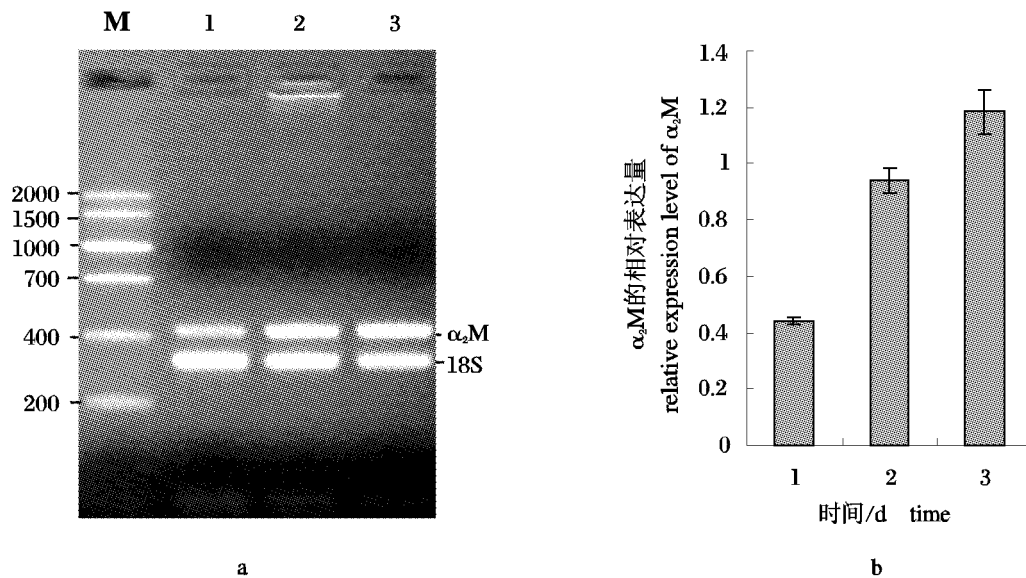


图 7 三角帆蚌  $\alpha_2M$  表达变化半定量 PCR 凝胶电泳结果及数据处理

1. 对照组;2. 大肠杆菌注射组;3. 嗜水气单胞菌注射组

Fig. 7 Analysis of relative RT-PCR of  $\alpha_2M$  under pathologic condition through gel electrophoresis

1. control group; 2. *E. coli* injection group; 3. *Aeromonas hydrophila* injection group

### 3 讨论

#### 3.1 $\alpha_2M$ 基因的克隆及其在不同组织中的表达

目前对  $\alpha_2M$  基因克隆和功能研究还比较少,尤其三角帆蚌是较低等无脊椎动物,其基础的生理、生化特别是遗传背景资料还非常缺乏。对  $\alpha_2M$  克隆分四段进行,首先选择了相对保守的受体结合区,该区域是  $\alpha_2M$  重要的功能区域,具有较高的保守性<sup>[8]</sup>,利用已有物种  $\alpha_2M$  受体区核苷酸序列进行比对,寻找保守序列,设计引物进行克隆。然后在受体结合区克隆片段内部设计一条引物,再在其上游寻找相对保守序列设计另一条引物,克隆诱饵区片段。在获得中间片段的基础上,使用 RACE 的方法分别克隆 5' 末端和 3' 末端核苷酸序列。最后通过重叠的方法,将各个片段连接起来得到  $\alpha_2M$  基因全序列。三角帆蚌  $\alpha_2M$  基因 cDNA 全序列的克隆,更进一步证明了  $\alpha_2M$  在三角帆蚌体内的存在。

在获得的三角帆蚌  $\alpha_2M$  氨基酸序列中,存在典型的硫酯键结构 1081 - GCGEQNM-1087<sup>[8]</sup>。

目前所研究的  $\alpha_2M$  可以分为两类,一类含分子内硫酯键,为  $\alpha_2M$  活性所必须,绝大多数的  $\alpha_2M$  都属于这一类,如人、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)<sup>[9]</sup> 等。小分子亲核试剂如甲胺,可以诱导硫酯键断裂,导致  $\alpha_2M$  的空间结构发生改变,无法与酶分子结合,抑制蛋白酶活性得能力丧失。另一类内部不含分子内硫酯键,目前仅在鸡蛋清中的 Ovostatin 发现分子内部不含硫酯键<sup>[10]</sup>。甲胺处理不会导致 Ovostatin 的蛋白酶抑制活性丢失。由于在氨基酸序列中存在硫酯键区域,所以三角帆蚌  $\alpha_2M$  应属于第一类情况。

$\alpha_2M$  不同组织的表达检测表明,三角帆蚌除血细胞外在其它组织,如外套膜、闭壳肌、肠和性腺中,均未表达。这与鲎组织表达相类似,在鲎的肝胰腺、心脏、胃、肠、肌节腺、脑、骨骼肌等组织也未检测到  $\alpha_2M$  表达<sup>[11]</sup>。

#### 3.2 病理条件下三角帆蚌 $\alpha_2M$ 表达变化

$\alpha_2M$  是人体内一种非常重要的免疫因子。正常情况下,成人每天约有 10% 的  $\alpha_2M$  被代谢分解掉, $\alpha_2M$  保持一定的表达水平。当人体处于糖

尿病、过敏性皮炎、肾炎、毛细血管扩张共济失调等病理状态时,  $\alpha_2$ M 表达显著升高<sup>[12]</sup>, 这是由于当人体处于病理状态时,  $\alpha_2$ M 与毒素、蛋白酶等结合, 迅速地从血循环中被清除, 消耗了  $\alpha_2$ M, 而血浆中  $\alpha_2$ M 需保持一定的浓度, 所以  $\alpha_2$ M 表达量会升高, 来维持  $\alpha_2$ M 血浆浓度。  $\alpha_2$ M 参与了人体在病理情况下的免疫调节, 对人体自身进行保护。

在实验中, 对三角帆蚌进行人为病菌的注射, 使其处于病理条件下, 观察三角帆蚌  $\alpha_2$ M 的表达变化。对照组注射相同体积的 PBS, 实验组注射的两种细菌分别为大肠杆菌(DH<sub>5</sub> $\alpha$ )和嗜水气单胞菌。大肠杆菌(DH<sub>5</sub> $\alpha$ )为一种常用的细菌; 嗜水气单胞菌是一种水生动物致病菌, 广泛分布于自然界的各种水体, 是多种水生动物的原发性致病菌, 八十年代末以来在我国淡水养殖业大规模流行嗜水气单胞菌败血症, 造成极大经济损失, 原因在于嗜水气单胞菌可以产生毒性很强的外毒素, 如溶血素、组织毒素、坏死毒素、肠毒素和蛋白酶等, 对水生动物有很强的侵害作用。

实验结果表明, 闭壳肌注射大肠杆菌和嗜水气单胞菌后  $\alpha_2$ M 的表达水平明显高于对照组, 说明三角帆蚌在病理条件下,  $\alpha_2$ M 参与对外界入侵的病原体的免疫反应, 外源微生物和细胞毒素入侵可以诱导  $\alpha_2$ M 的表达量会升高。同时, 注意到闭壳肌注射嗜水气单胞菌  $\alpha_2$ M 的表达水平要明显高于闭壳肌注射大肠杆菌( $P < 0.01$ )。嗜水气单胞菌在三角帆蚌体内产生的毒性很强的外毒素和蛋白酶, 过多消耗体内的  $\alpha_2$ M, 从而导致  $\alpha_2$ M 的表达水平的升高更加明显, 这与所报道的人体内  $\alpha_2$ M 可以消除细菌外毒素和抑制胞外蛋白酶的功能是相一致的。至于在三角帆蚌体内  $\alpha_2$ M 为基础的免疫系统是行使哪些功能及如何具体作用仍需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] James K. Interactions between cytokines and  $\alpha_2$ -macroglobulin[J]. Immunology Today, 1990, 11(5):163-166.
- [2] Mathew S, Arandjelovic S, Beyer W F, et al. Characterization of the interaction between alpha2-

macroglobulin and fibroblast growth factor-2; the role of hydrophobic interactions[J]. Biochem J, 2003, 374:123-129.

- [3] van Leuven F. Human  $\alpha_2$ -macroglobulin[J]. Mol Cell Biochem, 1984,58: 121-128.
- [4] Armstrong P B, Melchior R, Swarnakar S, et al.  $\alpha_2$ -Macroglobulin does not function as a C3 homologue in the plasma hemolytic system of the American horseshoe crab, *Limulus* [J]. Mol Immunol,1998,35:47-53.
- [5] Armstrong P B. Humoral Immunity: alpha2-macroglobulin activity in the Plasma of Mollusks [J]. Veliger, 1992, 35(3): 161-164.
- [6] Goidin D, Mammessier A, Staquet M J, et al. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations [J]. Anal Biochem, 2001, 295:17-21.
- [7] Iwaki K, Kawabata S, Miura Y, et al. Molecular cloning of *Limulus* alpha 2-macroglobulin [J]. Eur J Biochem, 1996, 242(3): 822-831.
- [8] Armstrong P B, Quigley J P. Alpha2-macroglobulin; an evolutionarily conserved arm of the innate immune system[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1999,23:375-379.
- [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 Immunology, 2005, 18: 345-349.
- [10] Nielsen K L, Sottrup-Jensen L. Evidence from sequence analysis that hen egg-white ovomacroglobulin (ovostatin) is devoid of an internal beta-Cys-gamma-Glu thiol ester [J]. Biochim Biophys Acta, 1993,1162(2),230-232.
- [11] Iwaki K, Kawabata S, Miura Y, et al. Molecular cloning of *Limulus* alpha 2-macroglobulin [J]. Eur J Biochem, 1996, 242(3): 822-831.
- [12] Bowen M E, Armstrong P B, Quigley J P, et al. Comparison of *Limulus* alpha-macroglobulin with human alpha2-macroglobulin; thiol ester characterization, subunit organization, and conformational change [J]. Arch Biochem Biophys,1997,337(2):191-201.

---

## Full-length cDNA cloning and expression characterization of alpha-2 macroglobulin from *Hyriopsis cumingii*

SHI Zhi-yi, YANG Xian-xiang, CHEN Xiao-wu, LI Yong

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

**Abstract:** As an important nature immunological factor in *Hyriopsis cumingii*, alpha-2 macroglobulin plays necessary role in immunological defence and immunoregulation. In this study,  $\alpha_2M$  gene from *Hyriopsis cumingii* was cloned by RACE approach. The accession number in the Genbank is DQ 993 157. 1. After systematic analysis through bioinformatics approaches, The results showed that the full-length cDNA spans 5 124 bp, which contains an open reading frame of 4 836 bp, 5' untranslated region of 35 bp and 3' untranslated region of 253 bp. The open reading frame encodes a protein of 1 611 amino acids. The first 23 amino acids in the N-terminus are recognized as a signal peptide. The relative molecular weight of the deduced protein is 177 571. 8 u, isoelectric point is 5. 49, and instability index is 39. 53, which is classified as stable. Based on the results above, expression of  $\alpha_2M$  in different tissues and physiological states of *Hyriopsis cumingii* was determined by relative quantitative RT-PCR, the internal standard gene is 18 S. The result showed no expression was detected in mantel, conductor muscle, intestine, sexual gland except in hemocyte. After injecting with *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila*,  $\alpha_2M$  expression level had a certain amount of rise 12 h later, which fully proved the existence of  $\alpha_2M$  immune system in *Hyriopsis cumingii*. The disease-resistant gene cloning and functional study provide new theoretical foundation and technical support for *Hyriopsis cumingii*'s immunology research and disease-resistant varieties of breeding.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; alpha-2 macroglobulin; gene expression