**Zoological Research** 

# 树鼩 CD3ε 全长编码序列的克隆及分子特征分析

李乙江<sup>1,2,3</sup>,高跃东<sup>4,5</sup>,郭 彦<sup>3</sup>,陆彩霞<sup>7</sup>,黄京飞<sup>4,5</sup>,夏雪山<sup>6</sup>,

代解杰7,范泉水2,李作生2,\*,张华堂3,\*

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院,云南 昆明 650201; 2. 成都军区疾病预防控制中心,云南 昆明 650032; 3. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室;免疫生物学实验室,云南 昆明 650223; 4. 中国科学院昆明生物多样性大型仪器区域中心,云南 昆明 650223;
5. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室,云南 昆明 650223; 6. 昆明理工大学 生命科学与技术学院,云南 昆明;
7. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所,云南 昆明 650118)

**摘要:**树鼩可作为人类疾病的良好模型,但缺乏对其免疫功能研究的基本标志和单克隆抗体。该研究应用 RT-PCR 技术,分别从3 只树鼩的肝脏、脾脏和血液中克隆了 CD 3ε 全长编码序列并用 Discovery Studio 等软件对 其分子特征进行了分析。结果显示,树鼩 CD3ε cDNA 的开放阅读框全长 582 bp,编码 193 个氨基酸。树鼩与其 他哺乳动物的 CD3ε 蛋白整体结构近似,与人和恒河猴 CD3ε 的亲缘关系较近,胞内域与跨膜域高度保守,但胞 外域出现 2 个潜在的糖基化位点,表面电荷亦存在差异。该研究为今后制备树鼩 CD3 单克隆抗体及功能研究奠 定初步的基础。

关键词:树鼩;CD3ε; cDNA; 克隆; 结构; 功能; 单克隆抗体 中图分类号: Q959.83; Q951.3; Q75 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)05-0483-07

# Cloning of full-length coding sequence of tree shrew CD3ε and prediction of its molecular characteristics

LI Yi-Jiang<sup>1,2,3</sup>, GAO Yue-Dong<sup>4,5</sup>, GUO Yan<sup>3</sup>, LU Cai-Xia<sup>7</sup>, HUANG Jing-Fei<sup>4,5</sup>, XIA Xue-Shan<sup>6</sup>, DAI Jie-Jie<sup>7</sup>, FAN Quan-Shui<sup>2</sup>, LI Zuo-Sheng<sup>2,\*</sup>, ZHANG Hua-Tang<sup>3,\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201, China; 2. Military Medical Institute of Chengdu Military Garrison Center for Disease Control and Prevention, Kunming Yunnan 650032, China; 3. Immunobiology Laboratory, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kuming Institute of Zoology, the Chniese Academy of Science, Kunming Yunnan 650223, China;

4. Kunming Biological Diversity Regional Center of Large Apparatus and Equipment, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, China;

5. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, China; 6. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China; 7. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: The use of tree shrews (*Tupaia belangeri*) in human disease studies demands essential research tools, in particular cellular markers and their monoclonal antibodies for immunological studies. Here we cloned the full-length cDNAs encoding CD3 $\epsilon$  from total RNA of the spleen, liver and peripheral blood of tree shrews and analyzed their structural characteristics in comparison with other mammals by Discovery Studio software. The results showed that the open reading frame sequence of tree shrew CD3 $\epsilon$  was 582 bp, encoding 194 amino acids. The overall structure of tree shrew CD3 $\epsilon$  protein was similar to its counterparts of other mammals, intracellular and transmembrane domain highly conserved. However, detailed analysis revealed two potential glycosylation sites and different surface charges in the extracellular domain. Availability of the entire open-reading-frame and related sequence information would therefore facilitate the preparation of monoclonal antibodies against tree shrew CD3 and further studies for its function.

Key words: Tree shrews; CD3ɛ; cDNA; Cloning; Structure; Function; Monoclonal antibody

\*通讯作者(Corresponding authors), E-mail: zhanght@post.kiz.ac.cn; jxdxlzs@yahoo.com.cn

第一作者简介:硕士研究生, E-mail: liyijiang88.student@sina.com

收稿日期: 2010-01-22; 接受日期: 2010-09-15

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)分课题(2007CB512807);云南省科技基础条件平台建设计划项目(2006PT07-2);国家科技 支撑计划项目(2009BAI83B02)

树鼩(tree shrews, *Tupaia belangeri*)是外形酷 似松鼠的小型哺乳动物(Cao, 2003),生活在东南亚 热带雨林地区,在我国云南、广西和海南等地区广 泛存在。树鼩曾经被划为食虫目和灵长目。 Novacek(1992)和 Waddell et al(2001)通过哺乳动物 进化关系和重要蛋白氨基酸序列进行的分子进化 分析,认为树鼩是灵长类动物的近亲。中国科学院 昆明动物所细胞库通过与英国剑桥大学等合作,利 用染色体涂色技术建立的染色体同源性图谱表明, 树鼩为单系起源的攀鼩目(Nie et al, 2008)。由于树 鼩体型小、易饲养等优点,已成为研究多种人类疾 患的良好模型,包括 HBV、HCV、HSV、CHIK(Walter et al, 1996; Zhao et al, 2002; Darai et al, 1980; Kampen et al, 2002)等。

哺乳动物的 CD3 分子是 T 淋巴细胞受体(TCR) 复合体的重要组成部分,表达于成熟 T 淋巴细胞表 面,由  $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\varepsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 等 5 种多肽链组成。T 细胞 在胸腺发育过程中,首先表达 CD3 $\gamma$ 、 $\delta$  和  $\varepsilon$  的基因, 经翻译后修饰形成核心结构,在内质网中与后表达 的 TCR $\alpha$ 、 $\beta$ 链形成复合物,转移到 T 淋巴细胞表 面(San et al, 1997)。在 T 细胞介导的免疫应答过程 中,TCR 识别并结合 MHC 分子提呈的抗原肽后,

导致 CD3 分子胞内区免疫活化基序(immune receptor tyrosine activation motif, ITAM)中的酪氨酸 磷酸化,进而与 ZAP-70 等信号分子中 SH2 结构域 (Src homology region 2)结合,活化相关激酶,从而 将识别信号转入 T 细胞肉,即 T 细胞激活的第一信

号(Gong, 2009)。ITAM 的酪氨酸如有突变,则显著 影响 T 淋巴细胞的发育和功能(Wang et al, 1998)。

因此, CD3 是 T 细胞活化信号转导过程中的一 系列重要生化反应的关键分子, 是 T 细胞群的重要 表面标志。目前研究中广为应用的人和小鼠 CD3 单克隆抗体多为抗 ε 链抗体, 但是已有发表的树鼩 CD3ε 分子的 cDNA 序列(http://www.ensembl.org/ index.html, ENSTBEG0000003289)残断不全。为 此,本研究首先以确定树鼩 CD3ε 完整的编码序列 为目的,进而对其进行分子特征分析,为今后制备 树鼩 CD3 单克隆抗体及功能研究奠定基础。

# 1 材料和方法

#### 1.1 动物

滇缅树鼩由中国科学院昆明动物所实验动物 中心提供,这与已发表序列所用树鼩为同一种。

#### 1.2 树鼩 CD3ε cDNA 的分子克隆

由于已发表的树鼩CD3ε分子序列残断不全(图 1),我们首先根据人、恒河猴和小鼠等物种的CD3ε 序列进行简并,设计了下游引物(5'-TCAGATGCC-TCTCTGATTCAG-3'),上游引物则采用已有序列 (5'-ATGCAGTCGGGCACTCTC-3')(图 1)。

而后,分别取 3 只树鼩的各一组织(脾脏、肝脏 和外周血)提取总 RNA,反转录为 cDNA,用设计 的 CD3 $\epsilon$  特异性引物进行 PCR 扩增,PCR 所涉及 的循环参数如下: 93 $^{\circ}$ C,5 min; 93 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。



图 1 树鼩 CD3 E 已知和残缺序列及引物设计

#### Fig. 1 Primers for PCR amplification of tree shrew CD3ε cDNA

所引用序列采自人(NM\_000733)、恒河猴(XM\_001097204)、小鼠(BC145954)、大鼠(NM\_001108140)、犬(DOGCD3E)、牛(BTU25687)、 绵羊(NM\_001009418)、野猪(S82909)。

Sequences used for this study were extracted from *Homo sapiens* (NM\_000733); *Macaca mulatta* (XM\_001097204); *Mus musculus* (BC145954); *Rattus norvegicus* (NM\_001108140); *Canis lupus familiaris* (DOGCD3E); *Bos taurus* (BTU25687); *Ovis aries* (NM\_001009418); *Sus scrofa* (S82909).

同时用管家基因 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 作为阳性对照,其引物为 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAGCGAG-3'和 5'-CAAAGGTGGAGGAGTGGGGTGTCG-3',退火温度 为 57℃(以上所用的试剂盒均由天根公司提供)。经 PCR 扩增后的产物,插入 pDM19-T 载体(TaKaRa 公司)。转化 DH5α 感受态细胞后的重组质粒,经酶 切鉴定,采用双脱氧测序法测定序列(北京三博志远 基因技术有限公司)。

# 1.3 分子特征分析

本文用于比较的其他序列采自 GenBank 数据 库,分别采用 DNA MAN 分析核酸序列、Clustal W 分析氨基酸序列和 MEGA 分析物种间亲缘关系, 蛋白质三维结构的模建和分析则通过 Discovery Studio 和 PyMOL 完成,信号肽和跨膜域采用在线 软件预测(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/; http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\_form.h tml)。

# 2 结果与讨论

# 2.1 树鼩 CD3ε 全长编码序列克隆

经 RT-PCR 分别从 3 只树鼩的脾脏、肝脏和外 周血的总 RNA 中扩增出长度约为 580 bp 的片段(图 2)。



Fig. 2 RT-PCR amplification of tree shrew CD3ε cDNA

## 2.2 树鼩 CD3ε 核酸序列测定结果与比较分析

我们将树鼩 CD3ε PCR 产物经 T/A 克隆并双向 测序,得到树鼩 CD3ε 全长编码序列(图 3),确定了 原发表序列中残缺的第 50~70 位和第 532 位之后 的未知序列,两段共 69 个碱基。树鼩 CD3ε 阅读框 全长 582 bp,编码 193 个氨基酸(图 3),GenBank 登录号为 HM007192,HM007191,HM007190。

根据我们确定的序列,原残缺的两段未知序列

GC含量较高(图 3),可能在这之前未能测出序列的 原因。进一步分析可以确定,我们重新测定的序列 在第 103、163、166、167、195、216、229、322、 345 位上与已发表的序列不同,同时未检测到发表 序列中第 154~159 位的 6 个碱基(图 3),不过,以 上所提到的不同的和未检测到的碱基在滇缅树鼩 中均无编码或移码改变。而从树鼩脾中得到的 CD3æ 在第 76、488 位与其他只树鼩肝、血中的序列不同, 其中第 76 位上的差异,具有不同的编码意义 (G→A,Asp26→Asn26)(图 3),可能是同一物种不 同个体之间的差异。由于我们是分别从 3 只树鼩各 取一种组织中扩增基因并双向测序,与已有序列相 比,我们确定的序列应当是比较确切的。

#### 2.3 树鼩 CD3ε 在物种间的亲缘关系分析

我们采用 MEGA 软件对树鼩脾脏 CD3ε 与人、 恒河猴、小鼠、大鼠、犬、牛、绵羊、野猪等 CD3ε 的亲缘关系进行分析。如图 4 所示,树鼩与人和恒 河猴的 CD3ε 聚集在一组内,而与大鼠、小鼠等物 种相对较远,这与树鼩接近灵长类的结论相符(Nie et al, 2008)。

## 2.4 树鼩 CD3ε 氨基酸序列分析

2.4.1 树鼩 CD3ε 一级结构特征 我们采用 Clustal W 对推导出的树鼩 CD3ε 氨基酸序列与其它哺乳动物进行比较。如图 5 所示,与其它动物一样,树鼩 CD3ε 为 I 型跨膜蛋白,总体结构亦可分为信号肽、 胞外域、跨膜域和胞内域等 4 个结构域。

2.4.2 树鼩 CD3ε 胞外域的特征 各物种 CD3ε 蛋 白之间主要差异表现在胞外域。首先,根据我们所 确定的序列,树鼩出现了 2 个潜在的 N-糖基化位点 (图 5)。第一个 N-糖基化位点仅见于树鼩,是由于 树鼩脾 CD3ε 核苷酸序列在第 76 位碱基的差异 (G→A)所致;而第二个 N-糖基化位点则是树鼩与牛 (Bos taurus)共有的(图 3, 5)。

CD3ε 糖基化的生物学意义尚不清楚, 但是这 2 个 N-糖基化位点和其后序列的差异,可能会导致 人和树鼩 CD3ε 相应区域在结构上有所不同。经 Discovery Studio 构建的模型显示,人 CD3ε 在相应 部位可能形成 2 个 α-螺旋结构,而树鼩 CD3ε 则呈 现环状结构(图 6A 和 B、C 和 D 中)。

而且,糖基化与其它序列的差异,可能导致分 子表面电荷的改变。我们采用 PyMOL 软件对以上 模型建的立体结构进行了表面绝对电荷分析,表明 各物种 CD3ε 胞外域总体带负电荷(图 6E 和 F,

ENSTBEG00000003289 HM007192 HM007191 HM007190	ATGCAGTCGGGCACTCTCCGGAGAGTTCTGGGTCTCTGCTTCCTAGTAGNNNNNNNNNN
ENSTBEG00000003285 HM007192 HM007191 HM007190	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
ENSTBEG00000003289 HM007192 HM007191 HM007190	TCAGGAATCAGCGTAACGCTGACGTGCCCTCTGCAACTCGAAACGAGTATAACATGGGAA   18    tga   17    tga   17    tga   17    tga   17
ENSTBEG00000003289 HM007192 HM007191 HM007190	AAAAACGGTAAAGACATCCCCGATGACCATGAAAACGTCCTAGTCCTGAATAACTTCTCG     244
ENSTBEG00000003289 HM007192 HM007191 HM007190	GAAATCGAGGACAGCGGTTATTACACCTGCTTCACCAATGAAGAAGAAGAACCACTATCTC 29 
ENSTBEG00000003289 HM007192 HM007191 HM007190	TACCTGAAAGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCATGGAGGTGGACCTAATGACCGTGGCCACT     36      gggg
ENSTBEG00000003289 HM007192 HM007191 HM007190	GTGGTGGTAATCGACATCGGCCTCACTCTGGGCCTGCTGCTGCTGGTGTACTACTGGAGC   420
ENSTBEG00000003289 HM007192 HM007191 HM007190	ANGNGTANGANGGCCANGGCCANGCCTGTGACGCGAGGAGCGGGTGCCGGCGGCAGGCCC     48
ENSTBEG00000003289 HM007192 HM007191 HM007190	CGGGGACAAAAGAAGGAGGAGGCCACCACCTGTCCCCAACCCAGACTATGACNNNNNNNN 53 gcccatccgg 53 cccatccgg 53 cccatccgg 53 cccatccgg 53
ENSTBEG00000003289 HM007192 HM007191 HM007190	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

## 图 3 树鼩 CD3ε 核酸序列比对分析

Fig. 3 Alignment of the published and new nucleotide sequences of tree shrew CD3c chains

粗线黑框表示克隆出的未知序列,细线黑框表示可能引起 N-糖基化位点的核苷酸, "-"表示相同序列, "."表示未检测到的序列。 Thick black frame show cloning unknown sequences. Thin black frame show nucleotide which may cause N-glycosylation sites. "-" show the same sequence. "." show undetected sequence.





Fig. 4 Phylogentic relationships between CD3c chains from tree shrews and other mammals

	信号肽	胞外域	
Homo sapiens Macaca mulatta Mus musculus Rattus norvegicus Canis lupus familiaris Bos taurus Ovis aries Sus scrofa HM007192	* * * * MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQD MQSGTRWRVLGLCLLSIGVWGQD MRWNTFWGILCLSLLAVGTCQDD MQWNAFWSILGLSLLAVGTCQE MQSRNLWRILGLCLLSVGAWGQDED MQSGNLWRALGLCLLLVGAWAQD MQTCMLWQVLGLCLLLVGAWAQD MPSGNLWKVLGLCLLSVGAWGQE MQSGTLRRVLGLCFLVVGAWGED	****** * *** GNEEMGGITQT PYKVS ISGTTVILTCP QYPGS GNEEMGSITQT PYHVS ISGTTVILTCS QHLGS AENIEYKVS ISGTSVELTCP - LDSD EYEVS ISGTSVELTCP - LENE FKASDDLTS ISPEKRFKVS ISGTE VVVTCP DVFGY ADE QK PYEVS ISGNTVELTCP REFEG DTE QN PYEVS ISGNS VELTCP KD FEN DIERPDEDTQKTFKVS ISGDKVELTCP EDPES DN <u>NKT</u> GDSKPASYKVS ISGISVTLTCP LES <b>†</b> 糖基化位点 1	55 55 47 42 60 49 49 55 53
Homo sapiens Macaca mulatta Mus musculus Rattus norvegicus Canis lupus familiaris Bos taurus Ovis aries Sus scrofa HM007192	: *::*. -EILWQHNGKNIGGDEDDKNIGSDED -EVQWQHNGKNGEDSG ENLKWEKNGQELPQKHD DNLKWEKNDKVLPDKNE DNIKWEKNDNLVEGASN -EIHWKQNDEQMKGYTG -GIQWKRNNEQMKGHNE EKMTWKRNDMQIY-ESYD -DITWEKNGKEIPDDHE	****: ***** * **** DHL SLKEFSELEQS GYYVCYPRGSKPEDAN FYLYL DRL FLPEFSEMEQS GYYVCYPRGSNPEDASHHLYL KHLVLQD FSEVEDS GYYVCYTPASNKNTYLVL KHLVLED FSEVKDS GYYVCYTESSRKNTYLVL KULLENFSEVDDS GYYACYADSIKEK SYLYL KQL LLENFSEMDNS GYYQCYMTE-GNKEAAHTLYL KYL LLDQFSEMESS GYYQCLATE-GNTEAAHTLYL NYMLLERFSEVENS GYYTCTVGE-KHTHRLYL KVL VLDNFSEIEDS GYYTCFTNEEKNHYLYL # 糖基化位点 2	114 105 96 91 109 99 99 103 100
Homo sapiens Macaca mulatta Mus musculus Rattus norvegicus Canis lupus familiaris Bos taurus Ovis aries Sus scrofa HM007192	RARVCENCMEMDVMSVATIVIVDIC KARVCENCMEMDVMSVATIVIVDIC KARVCENCMEMDVMAVATIVIVDIC KARVCEYCVEVDLTAVAIIIIVDIC KARVCENCMEVDLTAVSIIIIVDIC KARVCANCIEVNLMAVVTIIVADIC KARVCONCMEVNLMEVATIVVDIC KARVCENCVEVDLMAVVTIIVVDIC KARVCENCVEVDLMAVVTIVVDIC KARVCENCVEVDLMAVVTIVVDIC	胞内域	174 165 156 151 169 159 163 163
Homo sapiens Macaca mulatta Mus musculus Rattus norvegicus Canis lupus familiaris Bos taurus Ovis aries Sus scrofa HM007192	QNKERPPPV FNPDYEPIRKGQ QNKERPPPV FNPDYEPIRKGQ QNKERPPV FNPDYEPIRKGQ KAQGQNKERPPV FNPDYEPIRKGQ QNKERPPV FNPDYEPIRKGQ QNRERPPV FNPDYEPIRKGQ QNRERPPV FNPDYEPIRKGQ QNRERPPV FNPDYEPIRKGQ QNRERPPV FNPDYEPIRKGQ QNRERPPV FNPDYEPIRKGQ RKKERPPPV FNPDYEPIRKGQ	RDLWSGLNQRRI 207 QDLWSGLNQRRI 198 RDLWSGLNQRAV 189 RDLWSGLNQRAV 188 QDLWSGLNQRGI 202 RDLWSGLNQRGV 192 RDLWSGLNQRGV 192 RDLWSGLNQR 194 RDLWSGLNQRGI 193	

图 5 树鼩 CD3ε 推导氨基酸序列比对分析

Fig. 5 Alignment of deduced amino acid sequences of tree shrew CD3ε with those from other mammals 高度保守的胞外区半胱氨酸残基、跨膜区天冬氨酸残基和胞浆区酪氨酸残基用方框标注; SH3 结合基序、ITAM 基序、ER 基序和 SH2 结合基序用单实线标注和▲标注; \*显示的是序列上 100%保守区域;:显示保守替换;.显示的是非保守替换。

The boxes show the highly conserved cysteine residues in the extracellular domain, the aspartic acid residues in the transmembrane domain and the tyrosine residues in the cytoplasmic domain.  $\blacktriangle$ , show the SH3 (Src homology region 3) binding motif, the ITAM( immune receptor tyrosine activation motif), the ER motif (Endoplasmic reticulum retention motif) and the SH2 (Src homology region 2) binding motif. \*, show the 100% conserved regions, conservative replacement and non-conservative replacement, respectively.

红色),但与人的相应区域对比,树鼩 CD3ε 胞外域 氨基端所带正电荷相对较少(图 6E 和 F,蓝色),是 否仅体现物种间的差异或能否影响 CD3ε 与 γ、δ 链 的结合,有待探讨。 不过,根据我们所确定的序列,树鼩 CD3ε 序 列中第 49、88、105、108 位可形成二硫键的 4 个 Cys 完全保守(图 5)、因此,推测树鼩 CD3ε 可形成 与其它物种近似的稳定的总体结构。 2.4.3 树鼩 CD3ε 跨膜域特征 与其它哺乳动物一 样,树鼩 CD3ε 跨膜域的 20 个残基高度保守,特别 是在第 123 位带负电荷保守的 Asp 残基未发生改变 (图 5)。已有研究表明,这一残基通过与 TCRα 和 TCRβ 链跨膜区的赖氨酸残基形成盐桥(Samelson, 2002),参与 TCR/CD3 复合物的形成和稳定,但其 后的 Cys(即其它物种 CD3ε 成熟蛋白中的第 5 个 Cys,信号肽中的 Cys 未计)在树鼩为 Gly,其影响和 意义尚不清楚。

2.4.4 树鼩 CD3ε 胞内域特征 各物种 CD3ε 蛋白 胞内域差异甚小,5个与 TCR/CD3 复合体信号转导 所必需的基序,即 SH3 (Src homology region 3)结合 基序、ITAM 基序、ER 基序(endoplasmic reticulum retention motif,内质网潴留基序)和 2个 SH2 结合 基序完全保守。

如前所述, ITAM 基序 YxxI/Lx(6-8) YxxI 是 TCR



图 6 人和树鼩 CD3 ε 胞外域蛋白三维结构模建和表面电荷比较

Fig. 6 Modeling of three-dimensional structures and surface charges of the extracellular domain of human and tree shrew CD3c chains

左、右分别为人和树鼩 CD3ε 蛋白三维结构模建; A、B 和 C, D, 以及 E、F 分别为空间构象的表面图和飘带图,以及表面绝对电荷分 布图(负电荷显示为红色,正电荷为蓝色)。

Modeled structures and surface charges of human (left) and tree shrew (right) CD3 $\epsilon$  chains. Shown on A and B, C and D, E and F are surface views, ribbon structures and surface charges, respectively. Shown in red are negative charges and in blue positive charges.

识别抗原后淋巴细胞活化信号转导的关键基序。其中的 Tyr174 和 Tyr185 为两个潜在的酪氨酸磷酸化位点(图 5),磷酸化后可与下游分子 PTK 和 ZAP-70的 SH2 结构域特异性结合,转导细胞内信号。这一基序在树鼩中完全保守,表明树鼩 CD3ε 分子具有参与 T 细胞信号转导功能的基本结构基础。

介于 Arg165 和 Pro170 之间富含 Pro 的 SH3 结 合基序(xPPxP),可与下游信号分子的 Src 同源区 3(SH3)结合(Koch et al, 1991; Myung et al, 2000),位 于 ITAM 之前(图 5)。而 2 个 SH2 结合基序(YxxL/I) 位于 Tyr174 和 Ile189 之间,分别与 ITAM 和 ER 基 序重叠(图 5)。这 3 个 SH 结合基序在树鼩中亦完全 保守,进一步说明树鼩 CD3ε 可同样参与下游分子 的结合和信号转导。

而最接近羧基端的 ER 基序(YxxLxxR),与 TCR/CD3 复合体的装配、上膜和内化直接相关。特 别是在与抗原或单克隆抗体结合后,TCR/CD3 复合 体可被引回胞内(internalization)和降解,下调在细 胞表面 CD3 的表达以防止细胞过度活化。而 CD3 回胞过程需要这一特殊的 ER 基序(Jacobs et al,

# 参考文献:

Borroto A, Lama J, Niedergang F, Dautry-Varsat A, Alarcón B, Alcover A. 1999. The CD3 epsilon subunit of the TCR contains endocytosis signals [J]. *J Immunol*, **163**(1): 25-31.

- Cao J, Yang EB, Su JJ, Li Y, Chow P. 2003. The tree shrews: Adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research [J]. J Med Primatol, 32(3): 123-130.
- Darai G, Zöller L, Matz B, Schwaier A, Flügel RM, Munk K. 1980. Experimental infection and the state of viral latency of adult tupaia with herpes simplex virus type 1 and 2 and infection of juvenile tupaia with temperature-sensitive mutants of HSV Type 2 [J]. Arch Virol, 65(3-4): 311-318.
- Gong FL. 2009. Medical Immunology [M]. 3<sup>rd</sup> ed. Beijing: Science Press, 64-65. [龚非力. 2009. 医学免疫学[M]. 3 版. 北京: 科学出版社,, 64-65.]

Jacobs H, Vandeputte D, Tolkamp L, de Vries E, Borst J, Berns A. 1994. CD3 components at the surface of pro-T cells can mediate pre-T cell development *in vivo* [J]. *Eur J Immunol*, **24**(4): 934-939.

Kampen MV, Kramer M, Hiemke C, Flügge G, Fuchs E. 2002. The chronic psychosocial stress paradigm in male tree shrews: Evaluation of a novel animal model for depressive disorders [J]. Stress, 5(1): 37-46.

Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. 1991. SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins [J]. *Science*, 252(5006): 668-674.

Myung PS, Boerthe NJ, Koretzky GA. 2000. Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling [J]. Curr Opin Immunol, 2(3):

1994; Borroto et al, 1999)。这一基序在树鼩位于 Tyr174 和 Arg191 之间,完全保守(图 5),表明树鼩 CD3 功能亦可受同样的基序调控。

此外,树鼩 ER 基序在第 168 位上的氨基酸与 牛相同,为 Ala,而其他物种为 Ser。结合上述树鼩 与牛共有的潜在糖基化位点,进一步提示树鼩和牛 CD3ε 在进化过程中上发生了相同的核酸和编码变 异。

本研究首次较为精确地确定了树鼩 CD3ε 的全 长编码序列,并对其分子特征进行了推测和分析。 我们的研究表明,树鼩 CD3ε 链的整体序列和结构 与其它哺乳动物近似,特别是可以形成二硫键及盐 桥的残基和胞内域的 5 个与信号转导功能调节直接 相关的关键基序高度保守,应推测为具有相应的重 要功能。但在胞外域的 2 个 α-螺旋区和表面电荷分 布的差异较为明显,除对相关功能的可能影响值得 进一步研究外,也较好地解释了我们和多个实验室 发现的小鼠和人 CD3 单克隆抗体与树鼩无明显交 叉反应的现象。

256-266.

- Nie W, Fu B, O'Brien PC, Wang J, Su W, Tanomtong A, Volobouev V, Ferguson-Smith MA, Yang F. 2008. Flying lemurs—the 'flying tree shrews'? Molecular cytogenetic evidence for a Scandentia-Dermoptera sister clade [J]. *BMC Biol*, **6**: 18.
- Novacek MJ. 1992. Mammalian phylogeny: Shaking the tree [J]. *Nature*, **356**(6365): 121-125.
- Samelson LE. 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins [J]. *Annu Rev Immunol*, **20**: 371-394.
- San José E, Sahuquillo AG, Bragado R, Alarcón B. 1998. Assembly of the TCR/CD3 complex: CD3 epsilon/delta and CD3 epsilon/gamma dimers associate indistinctly with both TCR alpha and TCR beta chains. Evidence for a double TCR heterodimer model [J]. *Eur J Immunol*, **28**(1): 12-21.
- Waddell PJ, Kishino H, Ota R. 2001. A phylogenetic foundation for comparative mammalian genomics [J]. Genome Inform, 12: 141-154.
- Walter E, Keist R, Niederöst B, Pult I, Blum HE. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Hepatology*, 24(1): 1-5.

Wang B, Levelt C, Salio M, Zheng D, Sancho J, Liu CP, She J, Huang M, Higgins K, Sunshine MJ. 1995. Over-expression of CD3 epsilon transgenes blocks T lymphocyte development [J]. *Int Immunol*, **7**(3): 435-448.

Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, Wolff-Vorbeck G, Barth H, Levy S, von Weizsäcker F, Blum HE, Baumert TF. 2002. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection [J]. *J Clin Invest*, 109(2): 221-232.