

# 山羊溶酶体 $\alpha$ -AMA 基因的克隆、生物信息学及组织表达谱分析

孔祥雅, 李 义, 程 敏, 荆新堂, 李勤凡\*

(西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

**摘 要:** 本研究旨在对山羊溶酶体  $\alpha$ -甘露糖苷酶( $\alpha$ -AMA)基因进行组织表达谱和生物信息学分析。参考牛  $\alpha$ -AMA 基因序列设计引物, 采用 PCR 技术克隆山羊  $\alpha$ -AMA 基因序列, 并利用荧光定量 RT-PCR 进行组织表达谱分析以及进行生物信息学预测。首次获得了山羊  $\alpha$ -AMA 基因, 含有完整 CDS 编码区 3 000 bp, 编码 999 个氨基酸, 其中前 50 个氨基酸为信号肽序列。其编码区的核苷酸序列和预测氨基酸序列与牛的  $\alpha$ -AMA 相似性最高, 分别为 95.93% 和 94.79%。组织表达谱分析表明  $\alpha$ -AMA 在山羊各组织均不同程度的表达, 其中在肺脏、肝脏、小脑表达量较高。生物信息学预测发现,  $\alpha$ -AMA 蛋白属于糖苷水解酶 38 家族成员, 有 2 个保守的结构域, 存在 9 个 N-糖基化位点。SWISS-MODEL 同源建模山羊  $\alpha$ -AMA 具有良好的可信度。本研究为探讨酶的作用机理及疯草解毒剂的研制提供了理论依据。

**关键词:**  $\alpha$ -甘露糖苷酶; 基因克隆; 荧光定量 PCR; 生物信息学; 同源建模

中图分类号: S852.23

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)05-826-06

## Cloning, Tissue Specific Expression and Bioinformatics Analysis of Goat Lysosomal $\alpha$ -AMA Gene

KONG Xiang-ya, LI Yi, CHENG Min, JING Xin-tang, LI Qin-fan\*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Goat lysosomal  $\alpha$ -AMA gene was amplified using RT-PCR and the tissue specific expression profile, bioinformatics characteristic of  $\alpha$ -AMA were studied. Primers were designed based on the sequence of bovine lysosomal  $\alpha$ -AMA gene and were used in amplifying the goat  $\alpha$ -AMA, the tissue specific expression profile was analyzed by qRT-PCR, and the bioinformatics analysis of  $\alpha$ -AMA was conducted. The results showed that CDS sequence of goat  $\alpha$ -AMA was 3 000 bp, encoding a deduced protein containing 999 amino acid residues in which the first 50 residues were signal peptide, and this nucleotide sequence of CDS and the deduced amino acids shared 95.93% and 94.79% homology with the  $\alpha$ -AMA mRNA of cattle. The qRT-PCR revealed that the  $\alpha$ -AMA gene was expressed in various tissues at different levels. The expression level of this gene was higher in the lung, liver, and cerebellum. It was predicted that  $\alpha$ -AMA was belonged to Glycosyl hydrolases family 38, and composed of two conserved domains. There were thirty-five phosphorylation sites, one phosphorylation site of specific protein kinase and nine N-glycosylation sites in  $\alpha$ -AMA protein. By SWISS-MODEL homologous modeling, the predicted structure of goat was similar to the template and predictive. These results provide the theoretic basis for the mechanism research of  $\alpha$ -AMA and development of toxin antidote toward locoweed.

**Key words:**  $\alpha$ -mannosidase; gene clone; qRT-PCR; bioinformatics; homology modeling

收稿日期: 2011-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871902); 陕西省科技攻关项目(2008k02-06-2)

作者简介: 孔祥雅(1987-), 女, 河北衡水人, 硕士, 主要从事中毒病与毒理学研究, E-mail: tongxinkxy@126.com

\* 通讯作者: 李勤凡, E-mail: liqinfan@yahoo.com.cn

$\alpha$ -甘露糖苷酶(EC 3. 2. 1. 24)( $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -AMA)是糖苷水解酶家族成员之一,广泛存在于微生物、动物、植物体内,真核细胞中蛋白质需要经糖苷水解酶加工后才能发挥生物活性<sup>[1]</sup>。溶酶体酸性  $\alpha$ -AMA 具有外切甘露糖苷酶活性,有广泛的底物特异性,催化天冬酰胺连接的  $\alpha$ 1,2-、 $\alpha$ 1,3-、 $\alpha$ 1,6-高甘露聚糖的水解<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -AMA 活性异常可造成细胞内低聚糖大量蓄积,使细胞形成广泛的空泡变性,神经系统尤其是小脑蒲肯野氏细胞最为敏感,出现以运动失调为主的神经症状<sup>[3]</sup>。人类和家畜致命的遗传性疾病甘露糖苷酶贮积症和先天性红细胞生成异常性贫血 II 型就是由于  $\alpha$ -AMA 基因突变引起的<sup>[4]</sup>。Miago 等发现人高尔基体  $\alpha$ -AMA 基因突变可引起先天性红细胞生成异常性贫血 II 型<sup>[5]</sup>;Tollersrud 等发现牛溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因第 961 位 T-C 的转换或者第 662 位 G-C 转换均导致了甘露糖苷酶贮积症<sup>[6]</sup>。

疯草是我国西部草场主要有毒植物,其严重危害草地畜牧业,造成马、山羊、绵羊等动物的中毒死亡<sup>[7]</sup>,同时破坏草地生态,分布范围涉及到我国四川、陕西、山西、云南、内蒙古、甘肃、宁夏、青海、新疆、西藏等省区,危害面积达 400 余万公顷<sup>[8]</sup>,每年经济损失数以亿计,已成为我国西部草原中亟待研究的热点问题<sup>[9]</sup>。疯草主要毒性成分苦马豆素(Swainsonine, SW)能够抑制细胞中  $\alpha$ -AMA 活性,导致动物死亡,但有关  $\alpha$ -AMA 基因与疯草中毒机制的研究较少,目前,已报道了人、小鼠、大鼠、牛等对疯草不敏感动物的溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因序列<sup>[10]</sup>,尚未见到敏感动物山羊溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因的研究报道,本研究克隆了山羊溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因序列并进行组织表达谱的分析,同时用生物信息学软件对溶酶体  $\alpha$ -AMA 蛋白进行结构和功能的预测,为进一步探究酶的作用机理和 SW 抑制  $\alpha$ -AMA 的分子机制、预防和治疗家畜疯草中毒等奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料和试剂

试验用羊是本课题组在西北农林科技大学动物房饲养的莎能奶山羊 3 只。7 月龄屠宰,取其心、肝、脾、肺、肾、大脑、小脑、肌肉、卵巢组织。组织样置于液氮中冻存,用于总 RNA 的提取。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒和 DNA 片段回收纯化试剂盒购自 TransGen 公司,转化载

体 pMD19-T 和 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂购自大连宝生物公司,检测仪器为美国 Bio-rad 伯乐 iQ5, RNase-free DNase 酶购自 Promega 公司,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根生化科技有限公司。

### 1.2 总 RNA 的提取及逆转录反应

Trizol 法提取总 RNA,取等量各组织总 RNA,进行逆转录反应。逆转录体系为 20  $\mu$ L,其中总 RNA 2  $\mu$ g,用 RNase-free DNase 处理以去除 RNA 中的 DNA 污染。逆转录具体过程参照 TransGen 说明书。

### 1.3 山羊溶酶体 $\alpha$ -AMA 基因的克隆

根据 GenBank 发表的牛溶酶体  $\alpha$ -AMA mRNA 序列(GenBank 登录号为 NM\_17456 1.2),设计特异性引物  $\alpha$ -AMA-1、 $\alpha$ -AMA-2 和  $\alpha$ -AMA-3 扩增山羊溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因,引物由南京金斯瑞公司合成,引物序列及特征见表 1。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L,其中模板 DNA 2  $\mu$ L,上下游引物各 0.5  $\mu$ L(10  $\mu$ L  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), SuperMix II 酶 12.5  $\mu$ L,超纯水 9.5  $\mu$ L。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s(退火温度见表 1),72  $^{\circ}$ C 延伸 1~2 kb  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4  $^{\circ}$ C 保存。采用凝胶回收试剂盒回收目的片段,具体步骤参见 TransGen 说明书。PCR 产物纯化回收后,分别克隆到 pMD19-T 载体中,转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,随机挑选阳性克隆送华大基因公司测序。

### 1.4 荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)检测不同组织 mRNA 表达水平

选择 GAPDH 为 qRT-PCR 试验的内参基因,以山羊的 GAPDH 基因(GenBank 登录号:AJ431207)为模板设计引物。根据克隆后山羊溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因序列设计 qRT-PCR 引物  $\alpha$ -AMA-4。qRT-PCR 引物的序列及退火温度见表 1。进行 PCR 反应时,以 RNA 为模板的体系和用 RNase-free DNase 处理过的 RNA 为模板的体系进行对照,以排除 DNA 污染造成的假阳性。qPCR 反应体系:SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 12.5  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L,加水到 25  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 30 s 预变性,随后 95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。荧光素设定为 SYBR Green,反应结束后进行熔解曲线分析。qPCR 结果用 Bio-Rad iQ5 软件的比较 Ct 法(2 <sup>$\Delta\Delta$ Ct</sup>)法)进行分

析<sup>[11]</sup>,计算溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因在山羊各组织中的相对表达量,采用 SPSS 软件进行统计分析。

表 1 克隆和荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for cloning and qRT-PCR

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	片段长度/bp Length of fragment	退火温度/°C Annealing temperature
$\alpha$ -AMA-1	F: CTGCAGAGCCATGGTTGGTG	680	57
	R: CCCGCACTTTCTTGTCTTGATAAT		
克隆 PCR Cloning PCR	F: GCTGGGTGATGAACGATGA R: CCATTGCTGTCAGTGTAGAAGAGT	1 850	55
$\alpha$ -AMA-3	F: GGTGCCTACATCTTCAGAC	1 180	56
	R: CGGTAGTGACATTTTAATGGCTTTC		
$\alpha$ -AMA-4	F: GAGAAGGCTGGGGCTCACTTR	93	60
	R: GTTCACGCCCATCACAAACA		
荧光定量 PCR qPCR	F: TGACCCTGGACTTGACGAACR R: AAGGAGAAGGATGGGGTGTG	144	60

### 1.5 生物信息学分析

用 DNAMAN 6.0 对不同物种的溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因序列进行同源性比对,构建溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因核苷酸的进化关系树,分析不同物种之间的序列差异;用 ProtParam tool 进行氨基酸组成、理化性质分析<sup>[12]</sup>;用 NCBI 的 Conserved Domains 程序预测结构域<sup>[13]</sup>;用 TMHMM Server v. 2.0 预测蛋白的跨膜结构;用 PredictProtein 预测二级结构和糖基化位点;用 SWISS-MODEL 预测三维结构<sup>[14]</sup>。

## 2 结果

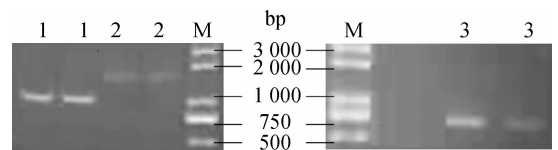
### 2.1 山羊溶酶体 $\alpha$ -AMA 基因序列

$\alpha$ -AMA-1、2、3 的 3 对引物 PCR 扩增产物,在 1% 琼脂糖凝胶电泳中分别可见目的片段大小的特异性条带(图 1)。克隆和测序结果获得山羊溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因 3 078 bp 的核苷酸序列,序列分析发现包括 3 000 bp 的 CDS 编码区,共编码 999 个氨基酸,通过 Blast N 比对将此 mRNA 序列已提交 GenBank(JN 602369)

### 2.2 山羊溶酶体 $\alpha$ -AMA 基因的组织表达谱分析

对于各组织样本的目的和内参基因检测结果显示,所获得的熔解曲线熔解峰单一,说明该方法具有良好的特异性(图 2、图 3)。qRT-PCR 结果表明,该

基因在心、肝、脾、肺、肾、大脑、小脑、肌肉、卵巢 9 个组织中均有表达,但不同组织表达量存在明显的差异;在肺脏和肝脏中表达量明显高于其他组织( $P < 0.05$ ),肌肉和心脏组织中的表达量最低,小脑、大脑和卵巢组织中也有较高表达(图 4)。



1、2、3. 分别为  $\alpha$ -AMA-3、2、1 的 PCR 产物;M. DNA 相对分子质量标准

1, 2, 3. PCR products of  $\alpha$ -AMA-3, 2, 1; M. DNA marker

图 1  $\alpha$ -AMA 基因的 PCR 产物电泳

Fig. 1 Electrophoresis of  $\alpha$ -AMA gene PCR products

### 2.3 不同物种 $\alpha$ -AMA 基因的相似性比较

克隆的山羊溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因的 CDS 编码区序列与食蟹猴(AB125178.1)、牛(NM\_174561.2)、豚鼠(AY036154.1)、猫(NM\_001009222.1)、人(U68567.1)、小家鼠(U29947.1)、褐鼠(NM\_199404.1)、猩猩(NM\_001133934.1)的  $\alpha$ -AMA 基因的相应序列进行比对,结果表明,该序列山羊与牛的相似性最高,为 95.93%;与小家鼠、褐鼠、豚鼠和人相应序列之间的相似性较低,分别为 72.60%、

73.87%、76.68%和 79.98%;与猫、猩猩和食蟹猴相应序列的相似性分别为 83.86%、81.49%和 81.10%。用 DNAMAN 软件将各物种的  $\alpha$ -AMA 基因的核苷酸序列作进化树分析,结果表明山羊  $\alpha$ -AMA 基因在分子进化上与牛的  $\alpha$ -AMA 基因较近(图

5)。通过 BlastP 比对,其编码的氨基酸序列与牛相应序列(NP\_776986.2)的相似性最高,为 94.79%;与猫、猩猩、食蟹猴、人、豚鼠、褐鼠和小家鼠相应序列之间的相似性较低,分别为 82.66%、79.27%、78.87%、78.18%、75.27%、72.13%和 71.53%。

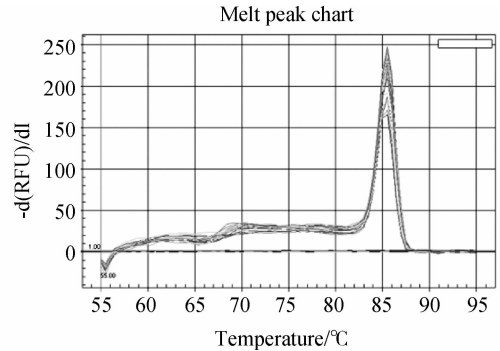
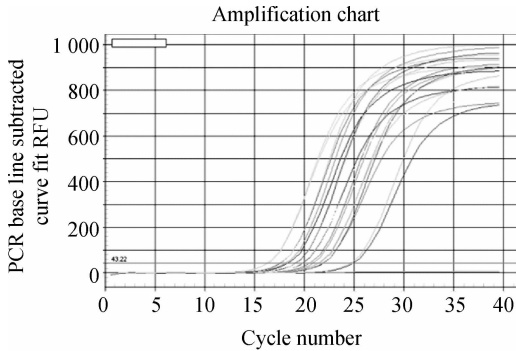


图 2 *GAPDH* 基因的扩增曲线和熔解曲线

Fig. 2 Dissociation and amplification curve of *GAPDH*

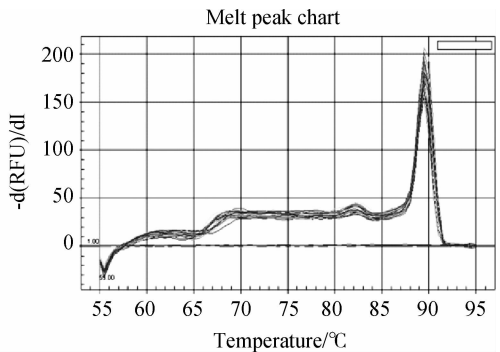
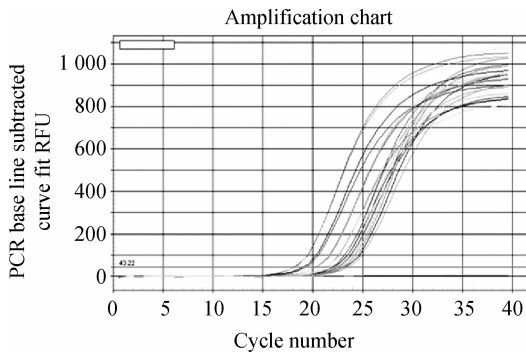


图 3  $\alpha$ -AMA 基因的扩增曲线和熔解曲线

Fig. 3 Dissociation and amplification curve of  $\alpha$ -AMA

## 2.4 山羊 $\alpha$ -AMA 氨基酸序列的生物信息学分析

克隆的山羊  $\alpha$ -AMA 基因序列包含有 1 个完整的 CDS 编码区,编码 999 个氨基酸残基。利用 SignalP 3.0 预测山羊的  $\alpha$ -AMA 基因编码蛋白在 50—51 aa 处存在潜在的裂解位点,结合已知牛  $\alpha$ -AMA 的信号肽定位,确定山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白信号肽序列应定位于 1—50 aa。用 Proaram tool 程序分析去除信号肽后的成熟蛋白,结果显示其分子结构为  $C_{4825}H_{7440}N_{1350}O_{1392}S_{29}$ ,理论 pI 值为 8.01,相对分子质量为 107.56 ku,体外半衰期哺乳动物细胞为 4.4 h,酵母大于 20 h,不稳定系数为 38.18,属于稳定型蛋白。以 TMHMM Server v. 2.0 预测山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白为非跨膜蛋白。二级结构预测结果表明山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白  $\alpha$ -螺旋结构占 23.13%, $\beta$ -折叠结构占 24.04%。

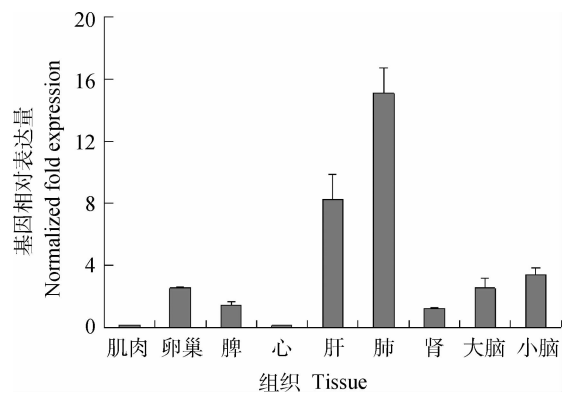


图 4  $\alpha$ -AMA 在山羊各组织中的相对表达量

Fig. 4 The relative mRNA expression level of  $\alpha$ -AMA gene in different tissues

用 NCBI 的 Conserved Domains 程序预测山羊

$\alpha$ -AMA 蛋白为糖苷水解酶 38 家族成员,有 2 个保守的结构域分别为糖苷水解酶 38 家族 N-端结构域和  $\alpha$ -AMA 中间结构域。PredictProtein 预测山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白存在 9 个 N-糖基化位点分别为 134、347、371、499、634、640、681、755 和 919 位天冬酰胺。蛋白糖基化和很多疾病有紧密关系,在疾病诊断治疗和药物研制等方面有重要意义。

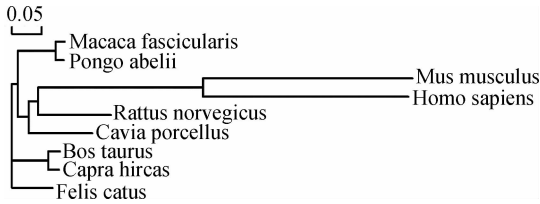


图 5  $\alpha$ -AMA 基因核苷酸的进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of nucleotide from  $\alpha$ -AMA gene of different species

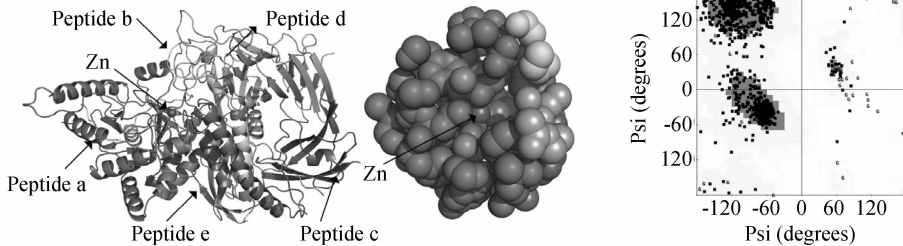


图 6 山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白的同源建模和  $\alpha$ -碳与酰胺平面交角图

Fig. 6 Homology model goat  $\alpha$ -AMA protein and the ramachandran plot

### 3 讨论

$\alpha$ -AMA 属于糖苷水解酶家族,在寡糖链合成、代谢过程中起着重要的作用。本研究根据 GenBank 上登录的牛溶酶体  $\alpha$ -AMA mRNA 基因序列,设计 3 对特异性引物,首次成功克隆了山羊  $\alpha$ -AMA cDNA 序列(GenBank: JN 602369),含有 3 000 bp 完整开放阅读框。采用 qRT-PCR 研究山羊  $\alpha$ -AMA 基因的组织表达谱,结果显示在所检测的山羊组织中均有表达,由此推断山羊  $\alpha$ -AMA 基因可能是一个广泛表达的基因,其中在肺、肝、小脑、卵巢、大脑组织中表达量较高。文献中也报道疯草中毒时, $\alpha$ -AMA 活性异常时能迅速引起肺、小脑、肝、大脑等细胞的空泡变性,并检测出低聚糖<sup>[9, 15]</sup>。

目前治疗甘露糖苷酶贮积症的方法有骨髓移植、酶替代疗法(Enzyme replacement therapy, ERT)、底物整复疗法、基因疗法等。在疯草中毒研

以牛  $\alpha$ -AMA 蛋白晶体结构(PDB: 1O7D)为模型,利用 SWISS-MODEL 蛋白质结构同源建模工具对山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白的三维结构进行预测。如图 6 左图所示预测所得山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白与模板蛋白三维结构均方根偏差(Root-mean-square deviation, RMSD)分别为 0.551 Å,说明与模板很好的重叠在一起。利用 PROCHECK 软件检查同源建模结果的质量。如图 6 右图所示同源建模山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白  $\alpha$ -碳与酰胺平面交角图,预测结果显示其与模板相似,其中 99.1% 的氨基酸在喜好或者允许的位置,相对小百分比的氨基酸存在扭转的角度,一个模型如果大于 90% 的数据点在喜好的区域,说明模型是正确的。另外,99.8% 的键长和 98.3% 的键角在允许的范围内,证明模型基本符合几何学和立体化学。总体而言,评估结果表明此模型可用于山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白结构及疯草中毒机制的研究。

究方面,主要集中于疯草毒素苦马豆素的来源、毒性及脱毒等方面的研究。根据本研所得敏感动物山羊  $\alpha$ -AMA 的信息,在动物疯草中毒的研究上也可以借鉴 ERT 方法。根据所得山羊溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因序列,可以通过酵母表达获得大量本源  $\alpha$ -AMA。Crawley 等用 ERT 方法在豚鼠模型上的研究有较好的预期结果,但是多次注射人源  $\alpha$ -AMA 蛋白导致了体液免疫反应,故使用本源  $\alpha$ -AMA 可能会产生较长时间的疗效<sup>[16]</sup>。另外,可以通过对山羊溶酶体  $\alpha$ -AMA 基因定点突变等改造方法,得到对 SW 免疫的蛋白,更利于 ERT 方法的治疗效果。在三维结构方面,预测山羊  $\alpha$ -AMA 蛋白包括 2 个结构域,其中包括活性位点的 N-端结构域由肽 a 和肽 b 组成,同源建模所得结构表明活性位点组成一个包含  $Zn^{2+}$  的凹槽区,推断这个结构使其有利于与其它分子进行结合,并且  $Zn^{2+}$  对酶的活性有重要的影响<sup>[17]</sup>。PROCHECK 软件检查同源建模结果可

信度很高,因此可以利用此模型可以研究 SW 抑制  $\alpha$ -AMA 活性的作用部位与方式,揭示 SW 毒性作用的分子机制,为动物疯草中毒病防治提供重要的理论依据。

### 参考文献:

- [1] UNO Y, HASHIDUME S, KURITA O, et al. *Dioscorea opposita* Thunb.  $\alpha$ -mannosidase belongs to the glycosyl hydrolase family 38 [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32: 713-718.
- [2] MERKLE R K, ZHANG Y, RUES P J, et al. Cloning, expression, purification, and characterization of the murine lysosomal acid  $\alpha$ -mannosidase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1336: 132-146.
- [3] ROCES D P, LULLMANN R, PENG J. Efficacy of enzyme replacement therapy in  $\alpha$ -mannosidosis mice: a preclinical animal study [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(18): 1979-1988.
- [4] ELLINWOOD N M, VITE H, HASKINS E. Gene therapy for lysosomal storage diseases: the lessons and promise of animal models [J]. *J Gen Med*, 2004, 6: 481-506.
- [5] MIAGO M, LIAO Y F, KUDO S, et al. Molecular cloning and expression of cDNAs encoding human  $\alpha$ -mannosidase II and a previously unrecognized  $\alpha$ -mannosidase IIx isozyme [J]. *Biochemistry*, 1995, 12(92): 11766-11770.
- [6] TOLLERSRUD K, BERG T, HEALY T, et al. Purification of bovine lysosomal  $\alpha$ -mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause  $\alpha$ -mannosidosis [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 246: 410-419.
- [7] STEGELMEIER B L, JAMES L F, PANTER K E, et al. Dose response of sheep poisoned with locoweed [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1999, 11: 448-456.
- [8] 李建科. 中国疯草研究现状与展望[J]. 中国农业科学, 2003, 36(9): 1091-1099.
- [9] DANTASA A F M, RIETI C F, GARDNER D R, et al. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil [J]. *Toxicon*, 2007, 49(1): 111-116.
- [10] COSTANZI E, BALDUCCI C, CACAN R, et al. Cloning and expression of mouse cytosolic  $\alpha$ -mannosidase (Man2c1) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(10): 1580-1586.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> method [J]. *Method*, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] GASTEIGER E, GATTIKER A, HOOGLAND C, et al. ExPasy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 3784-3788.
- [13] MARCHLER B A, BRYANT S H. CD-Search: protein domain annotations on the fly [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 327-331.
- [14] KIEFER F, ARNOLD K, KUNZLI M, et al. The SWISS-MODEL repository and associated resources [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 387-392.
- [15] NOVIKOFF P M, TOUSTER O, NOVIKOFF A B, et al. Effects of swainsonine on rat liver and kidney: Biochemical and morphological studies [J]. *J Cell Biol*, 1985, 101: 339-349.
- [16] CRAWLEY A C, KING B, BERG T, et al. Enzyme replacement therapy in  $\alpha$ -mannosidosis guinea-pigs [J]. *Mol Gen Metabol*, 2006, 89: 48-57.
- [17] NOK J, SHUAIBU M N, KANBARA H, et al. Purification and partial characterization of  $\alpha$ -mannosidase from a *Trypanosoma rangeli* [J]. *Parasitol Res*, 2000, 86: 923-928.

(编辑 白永平)