

郝爱平,庄道福. 欧洲兔 *Pgm1* 基因的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):31-34.

# 欧洲兔 *Pgm1* 基因的生物信息学分析

郝爱平, 庄道福

(牡丹江师范学院生命科学与技术学院,黑龙江牡丹江 157012)

**摘要:** 本研究利用生物信息学方法和工具对 PGM1 蛋白质的理化性质、结构功能域和功能分类进行了分析。结果表明:氨基酸残基的组成中甘氨酸含量最高,分子式为  $C_{2816}H_{4392}N_{738}O_{837}S_{17}$ ,相对分子质量 62.5 ku,等电点为 5.58。PGM1 蛋白质具有一定的亲水性,可能为非跨膜蛋白,主要构件为  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲,含有 4 个功能结构域,说明该蛋白质是生物体内糖代谢中重要的酶类。

**关键词:** 欧洲兔; *Pgm1* 基因; 生物信息学

**中图分类号:** S829.11; S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0031-03

欧洲兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 是体型较小的哺乳动物,存在野生和驯化品种,具有很强的繁殖和生育能力,目前已被广泛用于各个生物医学研究领域,如微生物学、遗传学、免疫学、急性动物试验、皮肤反应试验、心血管和肺心病研究等方面<sup>[1]</sup>。在微生物学方向中,欧洲兔对许多病毒和致病菌非常敏感,如对过敏、免疫、狂犬病、天花、脑炎等的研究;在遗传性疾病方面如进行软骨发育不全、低淀粉酶血症、维生素 A 缺乏、脑小症、动脉硬化等研究;在免疫学的研究中,欧洲兔的作用是产生抗体、制备高效价和特异性强的免疫血清,如病原体免疫血清、间接免疫血清、抗补体抗体血清、抗组织免疫血清。同时,欧洲兔也广泛用于研究药物的致畸作用或其他干扰正常生殖过程的现象、致热源以及生物制药与生物制品检验的研究<sup>[2]</sup>。PGM1 全称为 phosphoglucomutase1,即葡萄糖磷酸变位酶,它可逆地催化磷酸葡萄糖第 1、第 6 位置间磷酸基的转移,是动物体内糖代谢中起重要作用的一种酶<sup>[3]</sup>。本研究利用生物信息学方法和工具对欧洲家兔 *Pgm1* 基因的核苷酸序

列组成、理化性质、蛋白跨膜结构、蛋白亲水性/疏水性、二级结构、结构功能域预测、蛋白质功能分类预测以及三级结构进行分析,以期全面了解 *Pgm1* 基因,为该基因在人体内引起的病变机制提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

数据来自于 NCBI 中 GenBank 数据库已经注册的 *Pgm1* 基因,包括欧洲兔 (NC\_013681.1, NP\_001075785.1)。

### 1.2 方法

PGM1 蛋白质的理化性质用 Protparam 在线分析,跨膜结构使用 TMHMM 分析,疏水性/亲水性使用 protscale 在线分析,二级结构的预测使用 SOPMA,结构功能域分析使用 SMART,蛋白质功能分类用 Protfun,蛋白质三级结构的分析使用 SWISS-MODEL,各个分析软件地址如表 1 所示。

表 1 分析软件名称和地址

软件名称	软件地址
Protparam	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>
TMHMM	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
Protscale	<a href="http://web.expasy.org/protscale/">http://web.expasy.org/protscale/</a>
SOPMA	<a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html</a>
SMART	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1">http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1</a>
Protfun	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/">http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/</a>
SWISS-MODEL	<a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a>

## 2 结果与分析

### 2.1 PGM1 理化性质分析

用 Protparam 在线软件分析 566 个氨基酸残基构成,氨基

酸残基的组成中含量较高的氨基酸包括甘氨酸(8.8%)、亮氨酸(8.5%)、丙氨酸(7.8%)、异亮氨酸(7.8%),含量较低的氨基酸有色氨酸(0.7%)、半胱氨酸(0.9%)等。带负电荷的氨基酸残基数(天冬氨酸+谷氨酸)为 61 个,带正电荷的氨基酸残基数(精氨酸+赖氨酸)为 62 个。理论等电点为 5.58,该蛋白质的分子式为  $C_{2816}H_{4392}N_{738}O_{837}S_{17}$ ,相对分子质量为 62.5 ku,总共包括 8 800 个原子,不稳定指数为 33.49,蛋白质 N 端序列为蛋氨酸,半衰期为 30 h。

### 2.2 PGM1 蛋白跨膜结构分析

*Pgm1* 基因编码的蛋白质跨膜结构使用在线软件

收稿日期:2013-04-24

基金项目:牡丹江师范学院青年学术骨干项目(编号:G201210);牡丹江师范学院大学生科技创新项目。

作者简介:郝爱平(1979—),女,山东莘县人,硕士,讲师,从事分子生物学研究。E-mail:swxhap@126.com。

TMHMM 分析预测,参数设置为默认值,结果如图 1 所示。预测蛋白质 PGM1 可能为非跨膜蛋白,蛋白质具有 566 个氨基酸,全部在膜外。

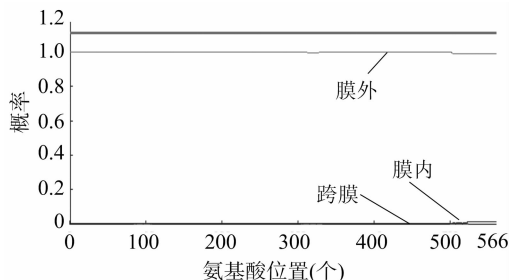


图1 PGM1蛋白的跨膜结构分析

### 2.3 PGM1 蛋白亲水性/疏水性

PGM1 蛋白质的亲水性/疏水性使用在线软件 Portscale 进行预测,结果(图 2)显示,氨基酸的最低分值为 -2.456,氨基酸的最高分值为 2.456。由此可以推测,蛋白质 PGM1 属于亲水性蛋白。从整体来看,亲水性氨基酸残基分布在整条肽链上,且多于疏水性残基。

## 2.4 PGM1 二级结构分析



Sequence length : 566

**SOPMA :**

Alpha helix	(Hh) :	211 is	37.28%
<sub>310</sub> helix	(Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix	(Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand	(Ee) :	92 is	16.25%
Beta turn	(Tt) :	43 is	7.60%
Bend region	(Ss) :	0 is	0.00%
Random coil	(Cc) :	220 is	38.87%
Ambiguous states (?)	:	0 is	0.00%
Other states	:	0 is	0.00%

图3 PGM1蛋白的二级结构

蛋白质的二级结构主要是指多肽链依赖氢键排列在一维方向上具有周期性结构的构象,其预测结果对于认识蛋白质的空间结构具有重要的生物学意义。蛋白质 PGM1 的二级结构使用 SOPMA 在线软件进行分析,结果如图 3 所示。PGM1 蛋白质由 37.28% 的  $\alpha$ -螺旋、16.25% 的折叠延伸、7.6% 的  $\beta$ -转角、38.87% 的无规则卷曲构成,主要由  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲构成, $\beta$ -转角和折叠延伸相对较少,不均匀地分布于整个蛋白质多肽链上。

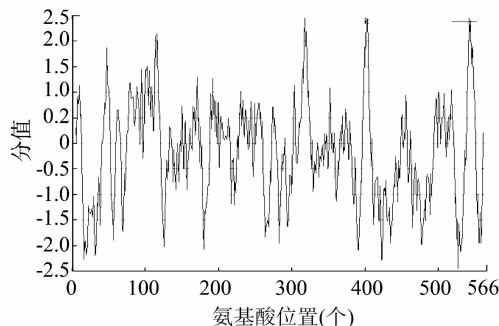


图2 PGM1蛋白亲水性/疏水性

## 2.5 PGM1 蛋白质结构域预测

结构功能域是蛋白质亚基结构介于二级与三级结构之间的一种独立结构的功能单位。常见结构域的氨基酸残基数在 100~400 个之间,各结构域之间区域结构松散,但结构域自身是相对独立的单元,是具有一定功能的紧密结构单位。通过 SMART 预测欧洲兔 PGM1 的结构功能域,发现其有 4 个功

能域,分别是 PGM\_PMM\_I、PGM\_PMM\_II、PGM\_PMM\_III、PGM\_PMM\_IV,是葡萄糖磷酸变位酶 1 的转移酶结构,具有酶活性,是磷酸化转移酶(图 4)。

## 2.6 PGM1 蛋白质功能分类预测

PGM1 蛋白质的功能分类使用 ProtFun 进行预测,结果如图 5 所示,葡萄糖磷酸变位酶 1 具有酶的活性,功能分类结果



图4 PGM1结构功能域预测

Functional category	Prob	Odds
Amino_acid_biosynthesis	0.211	9.596
Biosynthesis_of_cofactors	0.210	2.919
Cell_envelope	0.037	0.614
Cellular_processes	0.062	0.845
Central_intermediary_metabolism =>	0.337	5.343
Energy_metabolism	0.290	3.218
Fatty_acid_metabolism	0.049	3.738
Purines_and_pyrimidines	0.519	2.135
Regulatory_functions	0.025	0.156
Replication_and_transcription	0.184	0.687
Translation	0.138	3.132
Transport_and_binding	0.017	0.042

Enzyme/nonenzyme	Prob	Odds
Enzyme =>	0.749	2.614
Nonenzyme	0.251	0.352

Enzyme class	Prob	Odds
Oxidoreductase (EC 1.-.-.-)	0.138	0.664
Transferase (EC 2.-.-.-)	0.274	0.793
Hydrolase (EC 3.-.-.-)	0.119	0.374
Lyase (EC 4.-.-.-)	0.125	2.665
Isomerase (EC 5.-.-.-)	0.073	2.270
Ligase (EC 6.-.-.-) =>	0.148	2.911

图5 PGM1蛋白质功能分类预测

它由 566 个氨基酸组成,该基因与 *Ic47* 基因相似,两者序列的一致性达到 93.38%。在图 6 (SWISS - MODEL 在线预测结果)中可看到,PGM1 蛋白质由四部分构成,与蛋白质结构功能域预测相符。由图 6 还可看到,该蛋白质主要由  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲构成,与蛋白质二级结构分析结果相似。

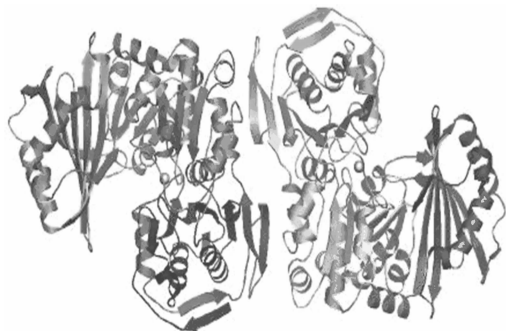


图6 PGM1三级结构分析

### 3 结论与讨论

Spencer 等首先用淀粉凝胶电泳发现 PGM1 与 PGM 为同工酶<sup>[4]</sup>。PGM1 存在于很多生物如人、欧洲兔、小家鼠、褐家鼠、蜜蜂、斑马鱼等中<sup>[5-6]</sup>。*Pgml* 基因在家兔中定位于第 13 号染色体上,这种酶主要参与葡萄糖的分解与合成。它催化葡萄糖-1-磷酸和葡萄糖-6-磷酸之间的相互转化,在糖

显示具有中间中央代谢作用 (central\_intermediary\_metabolism),在酶分类中属于连接酶。

#### 2.7 PGM1 三级结构分析

蛋白质的生物学功能很大程度上取决于其空间结构,PGM1 蛋白质使用同源构建,通过同源模建得到的结果可知,

代谢中具有重要作用,并在大多数组织中均可发现<sup>[7]</sup>。在糖酵解的反应中,反应若是从糖原开始时,糖原经糖原磷酸化酶、转移酶和脱支酶的作用产生葡萄糖-1-磷酸,再经葡萄糖磷酸变位酶的作用转化成葡萄糖-6-磷酸。

Hu 等通过聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳研究中国 5 个区域汉族 *Pgml* 基因的多态性时发现,*Pgml* 的基因频率由北至南分别是:陕西西安 0.625 6,河南郑州 0.598 2,内蒙古呼和浩特 0.642 9,甘肃兰州 0.623 2,广东 0.600 0<sup>[8]</sup>。如果缺少该酶则会引起毒性肝炎或使中毒性黄疸型肝炎病人血清 PGM1 活性明显升高,阻塞性黄疸病人血清 PGM1 活性中度升高。乳腺癌转移至肝后,部分病人血清 PGM1 活性升高。肌源性疾病患者的血清 PGM1 活性约为对照的 1/3。肝炎患者服用强的松后血清 PGM1 活性明显下降,24 h 内恢复。PGM1 的先天性缺陷与一些溶血性疾病有密切相关<sup>[9]</sup>。

本研究通过对 *Pgml* 基因的生物信息学分析,预测该酶有 4 个结构域,是酶类中具有转移酶的功能。说明 PGM1 蛋白是体内糖代谢中重要的酶,如果缺少该酶则会引起生物体内组织器官的病变,研究结果为进一步研究该基因功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 孙全文,杜建华,常宝. 家兔在生物医学研究中的应用[J]. 中国养兔,2004(2):35-37.

于建宁,宋小敬,王公金,等. 乳酸乳球菌电转化方法的优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):34-36.

# 乳酸乳球菌电转化方法的优化

于建宁<sup>1</sup>,宋小敬<sup>2</sup>,王公金<sup>1</sup>,潘伟芹<sup>1</sup>,徐小波<sup>1</sup>,于峰祥<sup>3</sup>,李 燕<sup>3</sup>

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏南京 210014; 2. 山东省荣成市畜牧兽医局,山东荣成 264300;

3. 南京师范大学医学分子生物学重点实验室,江苏南京 210097)

**摘要:**乳酸菌转化效率不高是制约其广泛应用的关键因素。为建立乳酸乳球菌的高效电转化方法,主要从电压、电阻、细菌生长时期及电击缓冲液等影响电转化的因素入手,根据每微克 DNA 获得的转化子的多少,评价乳酸乳球菌的电转化效率。结果显示:当电压为 2.0 kV、电阻为 400  $\Omega$ 、细菌处于对数生长期、电击缓冲液为磷酸缓冲液时,电击乳酸乳球菌 MG1363 的转化效率最高,为 1 300 个/ $\mu$ g。表明通过优化电转化参数,可以提高乳酸乳球菌的转化效率,为拓展乳酸乳球菌的应用范围奠定基础。

**关键词:**乳酸乳球菌;电转化;电压/电阻;生长时期;电击缓冲液

**中图分类号:**Q939.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)08-0034-03

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类广泛分布于自然界,在工业、农业和医学等领域与人类生活密切相关,微好氧,能够发酵碳水化合物、产生乳酸的革兰氏阳性菌。乳酸菌包括乳球菌和乳杆菌,其中乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是乳球菌属(*Lactococcus*)中最重要、最典型的一个种,乳酸乳球菌为兼性厌氧的革兰氏阳性球菌,细胞对称生长,因易于培养、生长迅速等优点而成为表达外源基因的理想菌株,因此常作为乳酸菌基因工程受体菌的标准菌株。与目前日益完善的大肠杆菌-酵母菌表达系统相比,乳酸菌的分子生物学研究起始较晚。但是近年来,随着乳酸菌各类表达调控元件的分离,相继发展了一批适用于乳酸菌的克隆载体与表达载体<sup>[1]</sup>。pMG36e 是最常用于乳酸乳球菌的一种表达型质粒,1989 年由 Vander 等学者构建成功<sup>[2]</sup>,可在大肠杆菌(*E. coli*)与乳酸菌中进行复制,质粒大小为 3.61 kb,由强启动子 P32 及其下

游的部分开放阅读框、多克隆位点、来自乳酸乳球菌乳脂亚种蛋白酶基因的转录终止子及 PWV01 复制子、红霉素抗性基因 Emr 等组成。近来,科研工作者以 pMG36e 为基本质粒进行了很多改造,如加上 *lacZ* 基因、*Nsr* 基因、*Nisin* 基因等,替代原有的红霉素抗性,使该质粒得到了更深入的应用<sup>[3-6]</sup>。

由于乳酸乳球菌属于革兰氏阳性菌,具有厚且致密的刚性细胞壁,常规的化学方法无法使外源 DNA 进入受体细胞。目前,乳酸菌转化外源 DNA 的方法主要有原生质体转化法和电转化法。原生质体转化法操作繁琐、耗时较长、转化效率低,而电转化法则具有省时、简便、受体范围广泛等优点,已成为目前乳酸菌转化的主导方法。然而影响电转化效率的因素较多,如乳酸菌是否经过前期处理(甘氨酸、溶菌酶、醋酸锂、DTT 等)<sup>[7-9]</sup>、乳酸菌所处的生长周期及电转化的参数都会对转化效率产生重要影响<sup>[10]</sup>。因此,本试验以乳酸乳球菌为研究对象,从影响电转化效率的几个因素入手,探讨常用乳酸菌质粒 pMG36e 转化到乳酸乳球菌中的效率,建立并优化乳酸乳球菌的电转化方法,为后期乳酸菌的深入研究和广泛应用奠定基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 培养基的配制

GM17 液体培养基:分别称取大豆蛋白胨 5 g、胰蛋白胨 5 g、酵母浸提物 2.5 g、维生素 C 0.5 g、MgSO<sub>4</sub> 0.25 g、磷酸氢

收稿日期:2013-01-17

基金项目:农业部转基因生物新品种培育重大专项(编号:2011ZX08006-004);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(10)421]。

作者简介:于建宁(1980—),女,山东烟台人,博士,副研究员,主要从事动物发育生物学研究。Tel:(025)84390341;E-mail:jianningyu@yahoo.com.cn。

通信作者:王公金,博士,研究员,主要从事动物胚胎工程研究。E-mail:wgjphd@yahoo.cn。

[2] 庞有志. 家兔的实验动物学价值[J]. 中国养兔,2011(9):15-18.

[3] 张 志,杜若甫. 磷酸葡萄糖变位酶 1 的群体遗传学研究[J]. 国外医学:遗传学分册,1989(2):61-67.

[4] 伍新尧,郭云荣,陈丽娟,等. 精液/斑的 PGM-1 亚型分型研究[J]. 中山医科大学学报,1988,9(4):65-67.

[5] Douglas G R, McAlpine P J, Hamerton J L. Regional localization of loci for human PGM and 6PGD on human chromosome one by use of hybrids of Chinese hamster-human somatic cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973,70(10):2737-2740.

[6] Whitehouse D B, Putt W, Lovegrove J U, et al. Phosphoglucosylase

1: complete human and rabbit mRNA sequences and direct mapping of this highly polymorphic marker on human chromosome 1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992,89(1):411-415.

[7] 陈良忠,颜永杉. 我国几个民族中毛发根葡萄糖磷酸变位酶-1 的亚型分布[J]. 人类学学报,1984,3(3):285-289.

[8] Hu J, Du R. Polymorphism of phosphoglucosylase 1 (PGM1) in five Han subpopulations in China[J]. Gene Geography, 1995,9(1):1-4.

[9] 魏小文,韦石松,齐和平,等. 肿瘤患者血清 PGM 测定结果分析[J]. 海军医学,1994(1):49-51.