

朱小翌,张林,骆芙蓉,等. 牦牛胃蛋白酶原C基因的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):36-38.

牦牛胃蛋白酶原C基因的克隆及序列分析

朱小翌^{1,2}, 张林^{1,2}, 骆芙蓉^{2,3}, 江伟华^{1,2}, 林忠荔^{1,2}, 刘益丽^{1,2}, 江明锋^{1,2}

(1. 动物遗传育种学国家民委-教育部共建重点实验室 四川成都 610041; 2. 西南民族大学青藏高原研究院,四川成都 610041; 3. 青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室,四川成都 610041)

摘要:采用 RT-PCR 技术,成功获得了牦牛胃蛋白酶原 C 基因,用 ProtParam 在线工具对牦牛胃 PGC 蛋白的基本性质进行测定。结果表明,其相对分子质量为 42 931.6, pI 值为 4.45, 半衰期为 30 h, 不稳定系数为 40.76, 总平均亲水性为 0.041。对该蛋白的二级、三级结构分析表明,牦牛胃蛋白酶结构与黄牛没有明显区别,均含有 5 个 α -螺旋、25 个 β -折叠,三维结构也基本一致。

关键词:牦牛;PGC 基因;克隆;序列分析

中图分类号: TS201.2⁺5;Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0036-03

酸性蛋白酶是胃蛋白酶、凝乳酶、微生物蛋白酶等的统称。目前,酸性蛋白酶被广泛应用于食品工业、饲料添加剂、酿造、皮革制造、医药等行业^[1-5]。国际上研究最多的是胃蛋白酶。庞芙蓉等研究发现,胃蛋白酶能有效断裂大豆蛋白质中的肽键,提高溶解度并且消化抗营养因子,提升了大豆的营养价值^[6]。目前,国内对胃蛋白酶的研究主要集中在采用亚硝基胍、紫外线、辐射等方法进行微生物源产酶菌株的选育。通过大肠杆菌、酵母及曲霉表达的重组凝乳酶已经上市,并取得了较好的经济效益^[7]。目前,学者们主要从猪、牛、羊等动物黏膜中提取胃蛋白酶遗传资源。本研究分析了克隆得到的麦洼牦牛胃蛋白酶原 C 基因(PGC)的结构,旨在为研究青藏高原特有动物牦牛的基因资源并拓宽工程胃蛋白酶来源提供依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 牦牛复胃组织样品采自四川省阿坝藏

族羌族自治州红原县;ex Taq 酶、pGEM-T Easy 载体试剂盒、T4 连接酶均购于天根生化科技有限公司;cDNA 合成试剂盒为 Thermo 产品。

1.1.2 引物的设计与合成 根据 GenBank 收录的黄牛 PGC、GAPDH 基因序列设计 2 对引物,序列为 PGC-F:5'-ATGAAGTGGATGGTACTGGCCTT-3';PGC-R:5'-AATAAACAGCTCTTCTCCACGTTGG-3';PGC-qPCR-F:5'-TGAGGACCTACAAGCACGA-3';PGC-qPCR-R:5'-ATAGCCTAAGATGCCAGTGAG-3';YAK-GAPDH-F:5'-GACAAAGATGGTGAAGTCCGGA-3';YAK-GAPDH-R:5'-TTACTCCTTGAGGCCATGTG-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 牦牛复胃组织总 RNA 的提取 按照试剂盒说明书用 TRIzol 法提取牦牛复胃总 RNA,测量其 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 值, -80℃ 密封保存备用。

1.2.2 cDNA 的合成、扩增和回收目的基因 以牦牛复胃总 RNA 为模板,使用 Thermo 反转录试剂盒,合成牦牛复胃 cDNA。以上述反转录 cDNA 为模板,PGC-F、PGC-R 为引物,扩增 PGC 基因。PCR 反应条件为:95℃ 1 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 5 min。PCR 反应体系:cDNA 模板 1.5 μL ,Primer F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ,Primer R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ,EX Taq DNA 聚合酶 0.2 μL ,dNTP 混合物 1 μL , Mg^{2+} 2 μL ,加 ddH₂O 至 20 μL 体系。PCR 产物经 1% Agarose 电泳检测后,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 片段,并用 0.7% Agarose 电泳检测回收片段。

收稿日期:2013-11-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31172198);教育部科学技术研究重点项目(编号:2102654);西南民族大学中央高校基本科研业务费专项(编号:2014NZYQN59);留学归国人员项目;西南民族大学 2013 年研究生创新型科研项目(编号:CX2013SZ64)。

作者简介:朱小翌(1989—),男,湖北洪湖人,硕士研究生,从事遗传学研究。E-mail:604417607@qq.com。

通信作者:江明锋,博士,教授,从事遗传学研究。E-mail:mingfengjiang@vip.sina.com。

[4]王振金,王建民,王桂芝,等. 崂山奶山羊骨桥蛋白基因(OPN)部分片段多态性及其与生产性状的关联分析[J]. 农业生物技术学报,2012,20(10):1168-1177.

[5]张淑君,熊远著,曾凡同,等. 猪八号染色体产仔数微卫星标记的探讨[J]. 养猪,2001(2):31-33.

[6]尚帮华,杨婷,连林生,等. 骨调素基因多态性及其与大河乌猪繁殖性状相关分析的研究[J]. 云南农业大学学报,2007,22(6):843-846.

[7]孙敬礼,武磊,黄涛,等. OPN 和 BMP15 基因与大长杂交一

代母猪产仔数的关系[J]. 猪业科学,2010(4):90-92.

[8] Higashibata Y, Sakuma T, Kawahata H, et al. Identification of promoter regions involved in cell and developmental stage-specific osteopontin expression in bone, kidney, placenta, and mammary gland: an analysis of transgenic mice [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2004, 19(1): 78-88.

[9] Lin C, Tholen E, Jennen D, et al. Evidence for effects of testis and epididymis expressed genes on sperm quality and boar fertility traits [J]. Reprod Dom Anim, 2006, 41(6): 538-543.

1.2.3 重组质粒 pGEM - T/PGC 的构建 将回收 DNA 片段在 T₄ 连接酶的作用下 16 °C 过夜连接到 pGM - T 载体上, 构建重组质粒 pGEM - T/PGC。

1.2.4 重组子的鉴定、测序 将重组质粒转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 涂布在含有 Amp 的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养, 挑选阳性克隆含 Amp 的 LB 液体培养基培养。将菌液送至上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.5 半定量分析 分别以牦牛瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃的基因组 cDNA 为模板, 牦牛 Gapdh 引物为定量对照, 检测 cDNA 质量, 再以 PGC - qPCR - F、PGC - qPCR - R 引物扩增牦牛 PGC 基因。PCR 反应条件为: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 1 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 30 个循环。反应体系与“1.2.2”相同。产物经 0.7% Agarose 电泳检测。

1.2.6 序列分析 利用 DNAMAN 等软件对牦牛 PGC 核苷酸、氨基酸序列进行分析, 并利用 ProtParam、InterProScan、SWISS - MODEL 等在线工具对牦牛基本理化性质、高级结构进行预测。

2 结果与分析

2.1 目的基因扩增

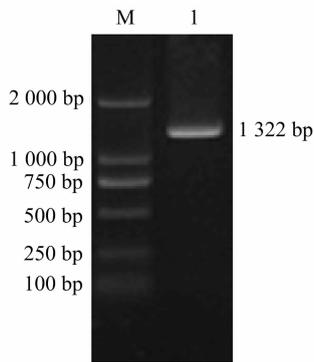
从牦牛复胃组织中提取总 RNA, 经 1% Agarose 电泳检测, 可见 D_{260 nm} / D_{280 nm} 值为 1.9 ~ 2.1, 符合试验质量要求。根据设计的引物, 对 PGC 基因编码区序列进行反转录, 扩增产物经 1% Agarose 电泳检测分析, 可见 1 条大小约 1 300 bp 的带, 与预期片段大小(1 370 bp) 相符(图 1)。测序结果与 GenBank 收录的普通牛 PGC 序列进行比对, 一致性达 99%, 该序列为 PGC 基因。

2.2 半定量分析

由图 2 可知, GAPDH、PGC 基因在牛的各组织中均表达。

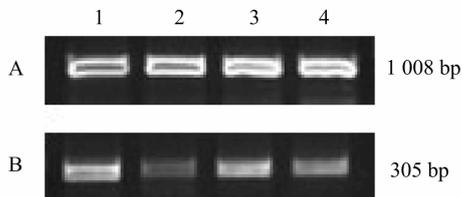
2.3 测序结果

用 ProtParam 在线工具对牦牛胃 PGC 蛋白的基本性质进行测定, 结果表明, 其相对分子质量为 42 931.6, pI 值为



M—DM2000 plus marker; 1—PCR产物

图1 牦牛 PGC 基因 PCR 产物电泳图示



1、2、3、4 分别代表瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃的 RT-PCR 产物; A—牦牛 GAPDH 基因 PCR 产物; B—牦牛复胃 PGC 半定量产物

图2 牦牛复胃 PGC 半定量分析结果

4.45, 半衰期为 30 h, 不稳定系数为 40.76, 总平均亲水性为 0.041。对 PGC 跨膜区的分析结果表明, 牦牛 PGC 只有信号肽区域具有疏水区特征, 其余部分不具备跨区域, 表明该蛋白是一个分泌到胞外发挥功能的蛋白。用 InterProScan 工具对该蛋白的结构域进行了预测分析^[8], 结果表明, 该蛋白是天冬氨酸家族的成员^[9]。在其蛋白结构中发现 4 个保守的结构域分别在氨基酸序列的 80 ~ 100、225 ~ 238、275 ~ 286、364 ~ 379, 其蛋白酶的活性位点在氨基酸序列的 89 ~ 100、275 ~ 286, 由此可知, 其酶活位点与保守结构域重叠(图 3)。

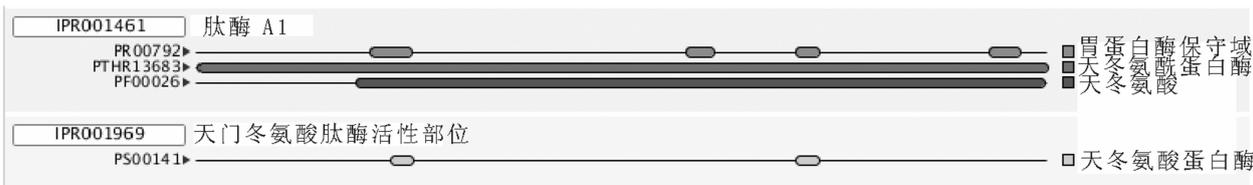
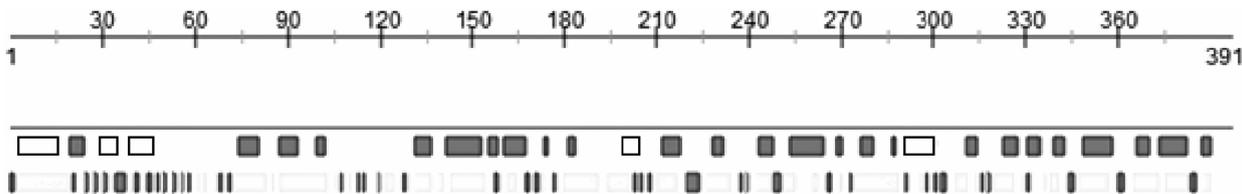


图3 牦牛 PGC 蛋白的保守区分析

2.4 二级结构预测

由图 4 可知, 该蛋白中 α - 螺旋结构占 10.49%, β - 折叠

占 32.23%, Loop 结构占 57.29%。其中共有 5 个 α - 螺旋, 25 个 β - 折叠^[10]。



图中空白部分是 α-螺旋, 灰色部分是 β-折叠

图4 牦牛 PGC 蛋白的二级结构预测

2.5 高级结构预测

利用 SWISS - MODEL 在线服务器对牦牛 *PGC* 基因的三级结构进行预测,并用 DeepView、Raswin 软件对预测结构进行分析,绘制牦牛 *PGC* 蛋白三维结构图如图 5 所示^[11-12]。结果表明,该蛋白的三维结构以蛋白数据库中的 1htB 蛋白为模板。预测得到的牦牛胃蛋白酶空间结构与普通牛的基本一致。预测结果表明,牦牛与普通黄牛的胃蛋白酶结构相似,是一个具有较多 β 片层结构的蛋白。牦牛与黄牛胃蛋白酶结构基本一致,均含有 5 个 α - 螺旋、25 个 β - 折叠,二者具有相似的功能。



图5 牦牛*PGC*基因的三级结构预测结果

2.6 牦牛与其他哺乳动物 *PGC* 序列比对

笔者对牦牛、黄牛、兔、猪、大鼠、小鼠、人类、黑猩猩、狗进行多序列联配,并运用 Mega 软件用邻接近法构建了这些物种的进化树图。由图 6 可知,牦牛与黄牛的 *PGC* 先聚为一类,大鼠与小鼠聚为一类,人类与黑猩猩聚为一类,然后与兔、猪的 *PGC* 聚为一类,再与狗在一起,表明用胃蛋白酶氨基酸序列构建的进化树与物种间的进化关系较为一致。

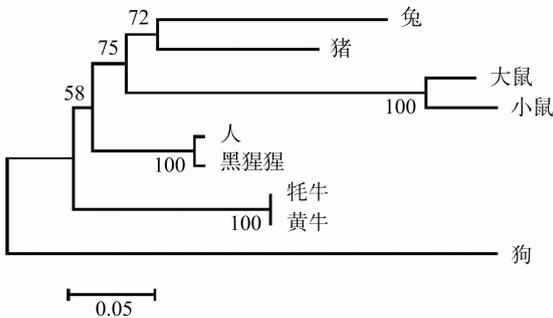


图6 牦牛等动物*PGC*基因同源进化树

3 结论与讨论

胃蛋白酶是由动物胃黏膜主细胞分泌的一种消化性蛋白酶,以无活性的胃蛋白酶原形式分泌,其主要功能是将食物中的蛋白质分解为小肽从而完成消化功能。目前,胃蛋白酶大多提取自猪、羊、牛的胃黏膜。该类酶制剂也可用于工业添加剂等领域^[13]。用 ProtParam 在线工具对牦牛胃 *PGC* 蛋白的基本性质进行测定,结果表明,其相对分子质量为 42 931.6, pI 值为 4.45,半衰期为 30 h,不稳定性系数为 40.76,总平均亲水性为 0.041。对该蛋白的生物信息学分析表明,除前导肽区段

外,该蛋白没有明显的跨膜螺旋区域。对该蛋白的二级、三级结构分析表明,牦牛胃蛋白酶结构与黄牛没有明显区别,均含有 5 个 α - 螺旋、25 个 β - 折叠,三维结构也基本一致。对牦牛胃蛋白酶保守区域分析表明,该蛋白为天冬氨酸家族的成员,含 4 个保守的结构域。对该基因在牦牛复胃表达谱的检测表明,该基因在牦牛的瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃中均有表达,除在网胃中表达量稍低外,在其余 3 个胃中表达水平基本一致。由此可以推测该蛋白除在皱胃中发挥功能外,在其他胃中也执行一定的功能。同源进化分析表明,牦牛等动物的 *PGC* 蛋白由共同的祖先基因进化而来,并且具有相似的功能。从进化关系看,牦牛与黄牛胃蛋白酶关系最近。目前,胃蛋白酶制剂主要从动物的胃黏膜中提取,来源受限制。

参考文献:

- [1] 易翠平,周素梅,潘艳艳. 胃蛋白酶水解大米蛋白的研究[J]. 食品科学,2010,31(10):129-132.
- [2] Liu S Y, Selle P H, Court S G, et al. Protease supplementation of sorghum-based broiler diets enhances amino acid digestibility coefficients in four small intestinal sites and accelerates their rates of digestion[J]. Animal Feed Science and Technology, 2013, 183(3/4): 175-183.
- [3] Kanth S V, Venba R, Jayakumar G C, et al. Kinetics of leather dyeing pretreated with enzymes; role of acid protease[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(8): 2430-2435.
- [4] Banga - Mboko H, Suchodolski J S, Steiner J M. Pepsinogen C in farm animals: a review [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2007, 6(6): 776-786.
- [5] 张学峰,刘达玉,夏兵兵,等. 酒用酸性蛋白酶在甜酒酿生产中的应用[J]. 中国酿造,2009(2):122-124.
- [6] 庞美蓉,丁秀臻,孔祥珍,等. 胃蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J]. 食品与发酵工业,2012,38(7):103-107.
- [7] Muñoz R, García J L, Carrascosa A V, et al. Cloning of the authentic bovine gene encoding pepsinogen a and its expression in microbial cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(5): 2588-2595.
- [8] Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, et al. InterProScan: protein domains identifier[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: W116-W120.
- [9] 曹健,师俊玲. 食品酶学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2011.
- [10] Bigelow H R, Petrey D S, Liu J, et al. Predicting transmembrane beta-barrels in proteomes[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(8): 2566-2577.
- [11] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS - MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.
- [12] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [13] Gerson K D, Foster C D, Zhang P, et al. Pepsinogen C proteolytic processing of surfactant protein B[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(16): 10330-10338.