

周苗苗, 崔景香. 小肽氨基酸组成对体外培养的奶牛乳腺组织乳蛋白合成的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(18): 166–168.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.042

# 小肽氨基酸组成对体外培养的奶牛乳腺组织乳蛋白合成的影响

周苗苗, 崔景香

(山东潍坊科技学院动物科学研究所, 山东寿光 262700)

**摘要:**为研究不同二肽对奶牛乳腺组织中乳蛋白合成的影响,在体外培养的奶牛乳腺组织培养液中分别添加不同的赖氨酸二肽:赖氨酸-赖氨酸(Lys-Lys)、赖氨酸-组氨酸(Lys-His)、赖氨酸-苯丙氨酸(Lys-Phe)、赖氨酸-亮氨酸(Lys-Leu)和赖氨酸-苏氨酸(Lys-Thr),等量取代培养液中 10% 游离赖氨酸(赖氨酸总浓度为 210  $\mu\text{g/mL}$ ) 进行培养,试验结束后收集乳腺组织和培养液分别检测基因表达和乳蛋白合成。结果表明,同游离 Lys 和 Lys-Thr、Lys-Lys、Lys-His 二肽相比,Lys-Leu 和 Lys-Phe 显著提高了乳腺组织中  $\alpha_{s1}$  酪蛋白基因的表达( $P < 0.05$ );5 种肽结合 Lys 均显著提高了小肽转运载体 2(PepT2)的 mRNA 丰度( $P < 0.05$ ),Lys-Phe 和 Lys-Leu 比等量的 Lys-Thr、Lys-Lys 和 Lys-His 更能促进 PepT2 基因的表达( $P < 0.05$ )。说明小肽不同的氨基酸组成可影响奶牛小肽的摄取和乳蛋白的合成,同亲水性氨基酸组成的小肽相比,疏水性氨基酸组成的小肽更能促进乳腺  $\alpha_{s1}$  酪蛋白基因的表达。

**关键词:**小肽;氨基酸;赖氨酸二肽;乳蛋白;小肽转运载体 2;奶牛乳腺组织;丰度; $\alpha_{s1}$  酪蛋白基因

**中图分类号:** S823.9<sup>+</sup>11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0166-02

乳腺组织能摄取血液循环中的小肽(2~3 个氨基酸组成)作为乳蛋白合成的前体物质,小肽在反刍动物乳蛋白合成中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。很多研究证实,给体外培养的奶牛乳腺上皮细胞培养液中添加适当浓度的必需氨基酸如蛋氨酸(methionine, Met)、赖氨酸(lysine, Lys)、缬氨酸(valine, Val)、亮氨酸(leucine, Leu)、苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)、苏氨酸(threonine, Thr),小肽均能促进酪蛋白的基因表达和乳蛋白合成<sup>[3-9]</sup>。目前关于小肽添加量对乳蛋白合成的影响研究较多,而小肽的氨基酸组成对乳蛋白合成影响的研究较少。因此,本试验初步探讨了不同氨基酸组成的含 Lys 二肽对体外培养的奶牛乳腺组织乳蛋白合成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 奶牛乳腺组织体外培养

取泌乳中期的中国荷斯坦奶牛乳腺组织,清洗并剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小。将组织块种植于 6 孔板上,置于二氧化碳培养箱中(37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ),待组织贴壁后每孔添加 2 mL 培养液。培养液成分为基础培养液 DMEM(dulbecco's modified eagle's medium)-F12(Gibco, 美国)添加 1% 谷氨酰胺、100 IU/mL 青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素、5  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素(Sigma, 美国)、500 ng/mL 催乳素(Sigma, 美国)、1  $\mu\text{g/mL}$  氢化可的松(Sigma, 美国)以及 10% 胎牛血清(FCS, 杭州四季青生物工程公司)。

### 1.2 试验设计

试验处理培养液中去胎牛血清、补充几种必需氨基酸

[Phe、Met、Lys、Leu、Val、异亮氨酸(isoleucine, Ile)、苏氨酸(threonine, Thr)、组氨酸(histidine, His)],并按试验设计调整相应氨基酸和小肽的浓度。分别用培养液中 Lys 总量(210  $\mu\text{g/mL}$ ) 10% 肽结合 Lys[Lys-Lys/(LL)、Lys-His/(LH)、Lys-Phe/(LP)、Lys-Leu/(LU)、Lys-Thr/LT]替代等量的 Lys。试验处理 48 h 后,分别收集乳腺组织和培养液用于总 RNA 提取和总蛋白含量测定。每个处理重复 3 次。

### 1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

用 Trizol(Invitrogen, 美国)提取组织中的总 RNA。RNA 纯度以紫外吸光法检测( $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} > 1.80$ )。抽提的 RNA 溶解后立即用于第 1 链 cDNA 的合成(PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit 反转录试剂盒, TaKaRa)。合成的 cDNA 贮存于 -20  $^{\circ}\text{C}$ , 备用。

### 1.4 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)

采用实时荧光定量 PCR 方法检测 mRNA 的表达。 $\alpha_{s1}$  酪蛋白、小肽转运载体 2(oligopeptide transporter 2, PepT2)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的实时荧光定量专用引物见表 1。PCR 反应在 96 孔板中进行,反应体系为 2  $\mu\text{L}$  cDNA 模板 + 18  $\mu\text{L}$  PCR 反应液(SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> Real Time PCR 试剂盒, TaKaRa)。纯水替代 cDNA 模板作为阴性对照。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  10 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 40 个循环; 60  $^{\circ}\text{C}$  34 s。ABI7500 实时定量序列检测软件(Applied Biosystems, 美国)自动读取循环数( $C_T$ )值,GAPDH、 $\alpha_{s1}$  酪蛋白和 PepT2 的扩增效率分别为 100.9%、100.1%、101.3%, mRNA 相对变化值用公式  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  进行计算。

### 1.5 DNA 总量和培养液中总蛋白质含量测定

用 Trizol 提取组织中的 DNA 总量,用紫外吸光度法测定 DNA 的纯度( $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} > 1.80$ )和含量。DNA 含量作为“组织数量/细胞数量”的代表,用于校正培养液中的蛋白质

收稿日期:2016-04-29

基金项目:山东省潍坊市科技发展计划(编号:2015GX077)。

作者简介:周苗苗(1983—),女,山东聊城人,博士,副教授,主要从事反刍动物泌乳生理研究。E-mail:zhoumm0329@163.com。

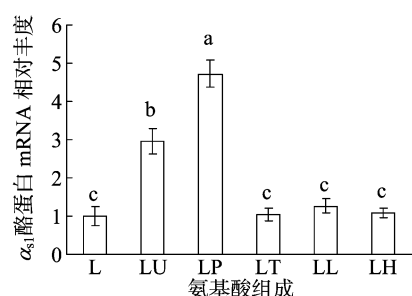
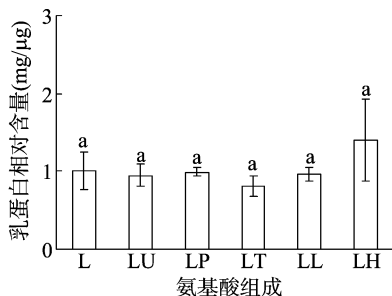
表 1 实时荧光定量专用引物

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	来源
$\alpha_{s1}$ 酪蛋白	CCTAAACATCCTATCAAGCACCAA	ATTGACCTTCCTCTTCCAAACAC	NM_181029
<i>PepT2</i>	ATGGCAATGCCAATGAAG	CACCAACACAGCAACAAACAAA	NM_001079582
<i>GAPDH</i>	GCCAAGAGGTCATCATCTC	GGTCATAAGTCCTCCACGA	AJ_000039

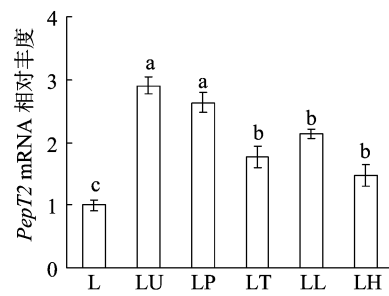
含量。将冷的丙酮沉淀培养液中的蛋白质溶于含 1 mmol/L EDTA 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中,随后根据 Bradford 的方法<sup>[9]</sup>用蛋白质检测试剂盒 (博士德,武汉) 检测培养液中的总蛋白质含量,并以此代表培养液中的乳蛋白含量。以试验组 DNA 校正乳蛋白含量 [蛋白质质量 (mg) 同 DNA 质量 ( $\mu$ g) 的比值] 同对照组 DNA 校正乳蛋白含量的比值作为最终结果进行比较。

### 1.6 统计分析

所有数据用 Excel 软件进行处理,用 SAS 软件 PROC - GLM 程序进行统计分析。当  $P < 0.05$  时,认为差异显著。

A. 含赖氨酸二肽对  $\alpha_{s1}$  酪蛋白基因的影响

B. 含赖氨酸二肽对乳蛋白合成的影响

图1 含赖氨酸二肽对  $\alpha_{s1}$  酪蛋白基因和乳蛋白合成的影响图2 含赖氨酸二肽对 *PepT2* 基因表达的影响

## 3 结论与讨论

小肽的转运是一个复杂的过程,影响因素较多。除肽链长度外,肽的氨基酸残基组成是影响肽吸收的另一个重要因素。一般而言,L 型氨基酸组成的小肽要比 D 型氨基酸组成的小肽更易吸收;中性氨基酸组成的小肽比酸碱性氨基酸组成的小肽更易被动物吸收。在本试验中,同 Lys - His、Lys - Thr、Lys - Lys 相比,Lys - Leu、Lys - Phe 显著增加了乳腺组织中  $\alpha_{s1}$  酪蛋白 mRNA 丰度 ( $P < 0.05$ )。分析小肽的氨基酸组成可以发现,同亲水性和带电荷的氨基酸残基 (如 Thr、Lys 和 His) 组成的小肽相比,疏水性和体积较大的氨基酸残基 (如 Phe 和 Leu) 组成的小肽更能促进乳腺中  $\alpha_{s1}$  酪蛋白的基因表达和乳蛋白合成。这些结果表明,小肽在促进乳蛋白合成方面的效果受其氨基酸组成的影响。

小肽的吸收主要依赖于小肽转运载体系统。哺乳动物体内主要的小肽转运载体包括 *PepT1* 和 *PepT2*。在奶牛乳腺上皮细胞中则仅有 *PepT2* 表达<sup>[7]</sup>。这些肽转运系统不仅可以转运小肽,还可以转运与肽结构类似的药物。与氨基酸 (AA) 转运机制不同,小肽是逆浓度梯度转运,而且主要依赖  $H^+$  或  $Ca^{2+}$  浓度进行转运。与游离氨基酸 (FAA) 吸收慢、吸收时耗能高相比,小肽转运系统具有转运速度快、耗能低等特点。小肽与 FAA 相互独立的吸收机制,有助于减轻由于 FAA 相互竞争共同吸收位点而产生的吸收抑制。小肽载体对底物具有

## 2 结果与分析

同游离 Lys 和其他 Lys 二肽相比,Lys - Leu、Lys - Phe 可显著提高乳腺组织中  $\alpha_{s1}$  酪蛋白基因的表达 ( $P < 0.05$ ),其中 Lys - Phe 组  $\alpha_{s1}$  酪蛋白 mRNA 丰度最高 (图 1 - A)。同对照组相比,Lys 二肽替代组乳蛋白合成量差异不显著 (图 1 - B)。

5 种肽结合 Lys 的添加均显著提高了 *PepT2* 的 mRNA 丰度 ( $P < 0.05$ ,图 2)。不同氨基酸残基组成的小肽对 *PepT2* 基因表达的影响不同。由图 2 可见,Lys - Phe 和 Lys - Leu 比等量的 Lys - Thr、Lys - Lys 和 Lys - His 更能促进 *PepT2* 基因的表达 ( $P < 0.05$ )。

广泛的适应性,几乎能够转运所有的二肽和三肽<sup>[10]</sup>。但肽载体对底物构象具有严格的特异性,它对 N 末端含 D 型 AA 的耐受性比 C 末端为 D 型的高,而全 D 型的肽不能作为底物。另外,小肽转运载体对由疏水性和体积较大的氨基酸残基组成的小肽具有高亲和力;而对由亲水性和带电荷的氨基酸残基组成的小肽亲和力较低<sup>[11]</sup>。本试验中 5 种肽结合 Lys 的添加均显著提高了 *PepT2* 的 mRNA 丰度 ( $P < 0.05$ )。 *PepT2* 是一种底物亲和力高,但易饱和的转运载体,当底物浓度增加,同时乳腺组织又有摄取小肽的需求时,只能通过增加 *PepT2* 的数量来实现。 *PepT2* 在奶牛乳腺小肽摄取过程中发挥着关键作用,其蛋白数量同其转运小肽的多少呈正相关关系<sup>[6,12]</sup>。因此, *PepT2* 的表达增强也说明了乳腺对小肽的摄取增加。此外,不同氨基酸残基组成的赖氨酸小肽对 *PepT2* 基因表达的影响不同。 Lys - Phe 和 Lys - Leu 比等量的 Lys - Thr、Lys - Lys、Lys - His 更能促进 *PepT2* 基因的表达 ( $P < 0.05$ )。这一结果同 Lys - Phe 和 Lys - Leu 对  $\alpha_{s1}$  酪蛋白的基因表达影响结果一致。以上结果说明,小肽不同的氨基酸残基组成可以影响奶牛乳腺上皮细胞小肽的摄取,进而影响乳蛋白的合成。

Lys - Lys、Lys - His、Lys - Leu、Lys - Phe、Lys - Thr 对奶牛乳腺组织乳蛋白合成的促进作用依赖于其氨基酸残基的理化性质。同亲水性氨基酸组成的小肽相比,疏水性氨基酸组成的小肽更能促进乳腺  $\alpha_{s1}$  酪蛋白基因的表达。

杨红洋,朱晓庆,商云霞,等. 中药复方多糖对不同 *MHC B-L $\beta$  II* 基因型鸡新城疫抗体和免疫球蛋白 IgG、IgM 含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2017,45(18):168-172.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.043

# 中药复方多糖对不同 *MHC B-L $\beta$ II* 基因型鸡新城疫抗体和免疫球蛋白 IgG、IgM 含量的影响

杨红洋,朱晓庆,商云霞,谷新利,郭 晓

(石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832003)

**摘要:**为探究 *MHC B-L $\beta$  II* 基因多态性对中药复方多糖免疫调节剂量的影响,采用 PCR-SSCP 方法将 500 羽黄麻肉鸡按不同 *MHC B-L $\beta$  II* 基因型分组,再将各组分高、中、低剂量中药复方多糖组和空白对照组。分别于 8 日龄皮下注射 50.0、25.0、12.5 mg/mL 中药复方多糖和生理盐水各 0.2 mL/只,连续注射 7 d,于 21、42、56、70 日龄各组随机取 5 只试验鸡,翅静脉采血分离血清,测定血清中新城疫(newcastle disease,简称 ND)抗体和 IgG、IgM 的含量。结果显示,多糖能提高 *MHC B-L $\beta$  II* 不同基因型鸡新城疫抗体和 IgG、IgM 含量,且高剂量组中药复方多糖组中 AB 基因型个体血清中新城疫抗体含量最高,AA 基因型个体血清中 IgG、IgM 含量最高;中、低剂量中药复方多糖组中 AB 基因型个体血清中新城疫抗体含量和 IgG、IgM 含量最高。表明中药复方多糖能提高不同 *MHC B-L $\beta$  II* 基因型鸡的免疫力,且中药复方多糖对不同 *MHC B-L $\beta$  II* 基因鸡的最适免疫调节剂量不同。

**关键词:**中药复方多糖;*MHC B-L $\beta$  II* 基因;新城疫;免疫球蛋白 IgG 和 IgM;鸡

**中图分类号:**S853.74 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)18-0168-05

免疫能力的高低决定了机体抵抗病原能力的大小,直接

收稿日期:2016-11-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460673)。

作者简介:杨红洋(1987—),男,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向为临床兽医学。E-mail:hongyang527@126.com。

通信作者:商云霞,高级实验师,从事动物疫病防治研究,E-mail:shangyunxia@shzu.edu.cn;谷新利,博士,教授,从事中药制剂开发与应用方面研究,E-mail:xlgu@shzu.edu.cn。

## 参考文献:

- [1] Tagari H, Webb K, Theurer B, et al. Mammary uptake, portal - drained visceral flux, and hepatic metabolism of free and peptide - bound amino acids in cows fed steam - flaked or dry - rolled sorghum grain diets[J]. Journal of Dairy Science, 2008, 91(2): 679 - 697.
- [2] Mabjeesh S J, Kyle C E, MacRae J C, et al. Vascular sources of amino acids for milk protein synthesis in goats at two stages of lactation[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(4): 919 - 929.
- [3] Wang S. Peptide - bound methionine can be a source of methionine for the synthesis of secreted proteins by mammary tissue explants from lactating mice[J]. The Journal of Nutrition, 1996, 126(6): 1662.
- [4] Pan Y, Bender P K, Akers M, et al. Methionine - containing peptides can be used as methionine sources for protein accretion in cultured C2C12 and MAC - T cells[J]. The Journal of Nutrition, 1996, 126(1): 232.
- [5] Wu H H, Yang J Y, Zhao K. Effects of methionine - containing dipeptides on casein  $\alpha_s1$  expression in bovine mammary epithelial cells [J]. Journal of Animal Feed Science, 2007, 16(S2): 7 - 12.
- [6] Zhou M M, Wu Y M, Liu H Y, et al. Role of oligopeptide transporter

影响经济动物的生长和生产。注射疫苗能有效地提高机体抵抗病原的能力,并且当疫苗与免疫增强剂配合使用时能显著增强疫苗的防疫效果。目前,国内外广泛使用的油乳剂、铝胶类等化学性免疫增强剂常具有副作用大、局部刺激性强、致癌等弊端。大量研究表明,从中草药中提取的多糖不仅能增强机体免疫力,还具有毒副作用小、残留量低等优点,成为开发疗效确定、低毒免疫增强剂的理想药物。

鸡主要组织相容性复合体(major histocompatibility

- 2 in bovine mammary gland phenylalanine dipeptide uptake[J]. Chin Anim Nutr, 2011, 23(8): 1303 - 1308.
- [7] Zhou M M, Wu Y M, Liu H Y, et al. Effects of tripeptide and lactogenic hormones on oligopeptide transporter 2 in bovine mammary gland[J]. J Anim Physiol An N, 2011, 95(6): 781 - 789.
- [8] Zhou M M, Wu Y M, Liu H Y, et al. Effects of phenylalanine and threonine oligopeptides on milk protein synthesis in cultured bovine mammary epithelial cells[J]. J Anim Physiol An N, 2015, 99(2): 215 - 220.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72(1-2): 248 - 254.
- [10] Daniel H, Kottra G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology[J]. Pflügers Archiv, 2004, 447(5): 610 - 618.
- [11] Matthews D M. Protein absorption[M]. New York: Development and Present State of the Subject, 1991.
- [12] Takahashi K, Masuda S, Nakamura N, et al. Upregulation of H<sup>+</sup> - peptide cotransporter *PepT2* in rat remnant kidney[J]. American Journal of Physiology (Renal Physiology), 2001, 281(6): 1109 - 1116.