

鳊胃蛋白酶原 A、胃质子泵基因 cDNA 全长的克隆与细胞表达定位

薛洋¹, 赵金良^{1*}, 邓燕飞¹, 卞云斌², 顾才弟³

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306;

2. 上海市浦东新区水产技术推广站, 上海 201200;

3. 上海市浦东新区孙农水产养殖场, 上海 201203)

摘要: 利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术获得了鳊全长 1 322 bp 的胃蛋白酶原 (pepsinogen, PG) A2 cDNA 序列, 含 1 131 bp 的开放阅读框 (ORF), 共编码 376 个氨基酸, 氨基酸序列包含信号肽、激活肽和胃蛋白酶 3 部分, 胃蛋白酶部分含有 2 个天冬氨酸活性位点和 3 个二硫键。鳊胃蛋白酶 A2 与 A1 在序列组成、理化性质、功能位点、空间结构上存在明显差异, 表明它们可能具有不同的催化功能。胃质子泵 (gastric H^+/K^+ -ATPase) 是胃酸分泌的关键性酶, 研究克隆获得了鳊全长 3 581 bp 和 1 669 bp 的胃质子泵 α 、 β 亚基 cDNA 序列。序列相似性分析显示, 胃质子泵 α 亚基具有高度保守性, 含多个功能位点, 而 β 亚基具有相对可变性。原位杂交 (*in situ* hybridization, ISH) 结果显示, 鳊 PG A1、PG A2 和胃质子泵 α 亚基 mRNA 均在胃腺的同一类型细胞中表达, 该细胞兼有分泌 PG 和胃酸的功能, 鳊胃腺分泌细胞属于泌酸胃酶细胞。

关键词: 鳊; 胃蛋白酶原 A; 胃质子泵; 基因表达定位; 泌酸胃酶细胞

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

胃蛋白酶 (pepsin) 是一种消化性蛋白水解酶, 主要功能是将食物蛋白分解为小的肽片段, 完成食物中蛋白质的初步消化。胃蛋白酶原 (pepsinogens, PG) 是胃蛋白酶的无活性前体, 在胃酸作用下, 激活成为有活性的成熟胃蛋白酶^[1]。胃质子泵, 又名胃 H^+/K^+ -ATP 酶 (gastric H^+/K^+ -ATPase), 是胃酸分泌的关键性酶, 它通过水解 ATP 为离子转运提供能量, 完成 H^+ 、 K^+ 电中性跨膜转运以及胃酸的分泌^[2]。

研究显示, 哺乳动物中存在 5 类 PG: PG A、PG B、PG C (progastricsin)、PG F 和 PG Y (prochymosin)^[1,3]。鱼类中, 目前仅发现 PG A 和 PG C^[4]。与 PG C 的单拷贝不同, 鱼类 PG A 同脊椎动物一样, 普遍存在多拷贝现象^[1]。如岩鳉 (*Trematomus bernacchii*)^[5] 中发现 3 种 PG A, 斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[4]、太平洋蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus orientalis*)^[6]、美洲拟鲈

(*Pleuronectes americanus*)^[7]、大西洋庸鲽 (*Hippoglossus hippoglossus*)^[8]、斑鳊 (*Siniperca scherzeri*)^[9] 中均发现 2 种 PG A。岩鳉 PG A2 在底物结合位点处与 PG A1、PG A3 存在明显差异, 以适应南极低温条件下的消化^[5]; 斜带石斑鱼 PG A1、PG A2 在表达组织分布、发育表达上均存在明显差异^[4]; 太平洋蓝鳍金枪鱼 PG A2 对血红蛋白底物的比活力显著高于 PG A1^[6]。由此可见, 鱼类具有不同 PG A 可适应个体发育、特定生理条件下的不同催化功能需求。

关于 PG 和胃酸分泌细胞的研究表明, 哺乳动物 PG 和胃酸分别由胃腺中的胃酶细胞 (zymogenic cell) 和泌酸细胞 (oxyntic cell) 分泌^[10]。鱼类中则存在 3 种不同类型: (1) PG 和胃酸分别由胃酶细胞和泌酸细胞分泌^[11-12]; (2) PG 和胃酸均由同一类细胞——泌酸胃酶细胞 (oxynticopeptic cell) 分泌^[13-14]; (3) PG 和胃酸

收稿日期: 2011-02-02 修回日期: 2011-05-07

资助项目: 上海市科委基础研究重点项目 (09JC1406900); 上海市重点学科建设项目 (Y1101); 上海海洋大学博士启动基金 (07274)

通讯作者: 赵金良, E-mail: jizhao@shou.edu.cn

既由泌酸胃酶细胞分泌,也可分别由胃酶细胞和泌酸细胞分泌,即 3 种细胞类型同时存在^[15]。不同分泌类型可反映鱼类消化器官(胃腺)的演化与特化,与消化作用的效率高低密切相关。而国内关于鱼类 PG 和胃酸分泌细胞的研究资料较少,尚停留在细胞学研究水平,不同鱼类的细胞分泌类型存在差异^[16],且分泌细胞的超微结构存在多样性^[17]。

鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国重要的淡水名贵经济鱼类,自开口期起,终生以活鱼饵为食,为典型的肉食性鱼类。为了深入了解鳊 PG A 的不同类型与功能特异化,在本实验室前期克隆获得鳊 1 种 PG A (PG A1) cDNA 全长序列的基础上^[18],又克隆获得了鳊 PG A2 cDNA 全长序列,并比较了 2 种 PG A 的氨基酸序列特征和蛋白质结构差异。同时,克隆获得了鳊胃质子泵 α 、 β 亚基 cDNA 全长序列。利用原位杂交技术,设计特异性探针,研究了鳊 PG A1、PG A2 和胃质子泵的表达细胞定位,为鳊胃腺分泌细胞类型确定提供了最直接的分子证据,这也为深入研究 PG 的分泌、表达、激活特征,以及 PG 与胃质子泵间的协同表达与相互作用奠定了细胞与分子基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验鳊成鱼取自上海市浦东新区孙农水产养殖场。总 RNA 抽提试剂 RNAiso Plus、RT-PCR 试剂盒 AMV Ver. 3.0 购自宝生物工程(大连)有限公司, BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购于 BD Biosciences, 探针标记试剂盒 DIG RNA Labeling Kit、标记检测试剂盒 DIG Nucleic Acid Detection Kit、酵母 t-RNA、蛋白酶 K 购自 Roche 公司, 去离子甲酰胺、左旋咪唑、鲑鱼精 DNA、氨基烷基硅烷载玻片购自 Sigma 公司, T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶购于 Promega 公司。

1.2 实验方法

总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成
活体解剖取胃粘膜,液氮速冻后研磨,参照 RNAiso Plus 说明提取总 RNA。RNA 样品经 RNase-free DNase I 消化处理去除基因组 DNA 污染后,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测,按照 AMV 反转录试剂盒说明反转录为 cDNA, -20 °C 保存。

全长 cDNA 的扩增与测序 以胃粘膜 cDNA 为模版,分别以 PGAF、PGAR、PP α F、PP α R 为引物,扩增 PG A2、质子泵 α 亚基部分 cDNA 序列,根据测序结果,设计特异性引物,用于 PG A2、质子泵 α 亚基的 3' RACE 和 5' RACE;设计简并引物用于质子泵 β 亚基 3' RACE,再根据 3' RACE 序列设计特异性引物用于 5' RACE,扩增过程按照 RACE 试剂盒说明进行。引物序列与退火温度见表 1。扩增产物经纯化、克隆后,由上海生工生物工程有限公司测序。

核苷酸序列及氨基酸序列分析 应用 Blastx 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行蛋白质相似性搜索;使用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析开放阅读框并推导氨基酸序列;SignalP 3.0 server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测;Scratch 程序 (<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>) 和 Prosite 程序 (<http://kr.expasy.org/prosite/>) 预测二硫键和活性中心;ProtParam 程序 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析氨基酸组成和理化性质;Swiss-Model 程序 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源建模;Clustalx 2.0 软件和 Needle 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) 进行氨基酸序列比对和相似性分析;MEGA 4.1 软件构建 NJ 系统进化树,进行 1 000 次自举。

原位杂交和 H. E 染色 取胃粘膜组织,切成 0.5 cm \times 0.5 cm 的小块,厚 0.2 ~ 0.3 cm,以 4% 多聚甲醛/0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 固定液固定 4 ~ 6 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,用于原位杂交实验。另取同样大小的组织,以 Bouin 氏液固定,用于常规 H. E 染色。

比对 PG A1、PG A2、胃质子泵 α 亚基 cDNA 序列,设计引物扩增序列特异区 1 138 ~ 1 311 bp (PG A1), 961 ~ 1 229 bp (PG A2), 825 ~ 1 167 bp (α 亚基),作为转录 RNA 探针的模版。杂交探针制备按照 Roche 公司探针标记试剂盒的步骤进行,PG A1、PG A2、胃质子泵 α 亚基标记 RNA 探针长度分别为 174、269 和 343 bp。原位杂交参照 MURRAY 等^[19]的方法稍加改进。石蜡切片厚度 6 μ m,平铺于氨基烷基硅烷载玻片上,37 °C 过夜烘干。组织脱蜡复水后,蛋白酶 K (5 μ g/mL) 37

℃消化 30 min, 甘氨酸处理终止蛋白酶反应。PBS 漂洗, 4% 多聚甲醛固定 5 min。经 0.1 mol/L TEA (三乙醇胺) 处理 5 min 后, 于新配制的 0.25% AA/0.1 mol/L TEA (乙酸酐/三乙醇胺, pH 8.0) 中乙酰化 10 min。PBS 漂洗后, 37 ℃ 预杂交 30 min。倾去预杂交液, 滴加杂交液 (含地

高辛标记正义或反义探针), parafilm 膜覆盖, 湿盒中 45 ℃ 杂交过夜。杂交后经 Rnase A 处理、SSC 漂洗、封闭液封闭、碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体孵育、NBT/BCIP 显色及水性封片剂封片后拍照。

表 1 引物序列与退火温度

Tab. 1 Primer sequences and annealing temperature of oligonucleotide primers

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/℃ annealing temperature	引物用途 usage
PGAF	CTCGTGGCTTTCGCTGAATGCT	60.5	部分序列的扩增
PGAR	ACGGAGAACAGGGGTTGAGACA	60.5	
PP α F	ARGGCAGYGARACAGTGGARG	53	
PP α R	GTTYTTGGTCAGTGTGTASGC	53	
PGA(3')	TACAACCCAATGGCCAAGTTCCTCC	68	3' RACE 和 5' RACE
PGA(5')	CCGTACTGGATGGACAGAGGCTGGTTGC	68	
PP α (3')	ATGAGCAGTGACGAGTTAGATGATG	68	
PP α (5')	CGGCGTTCTTGGCAGCATCTGACCCC	68	
PP β (3')	ATCCATACRCVCTGACTACCARGAC	68	
PP β (5')	GGGCTCCAGGAACCTTATCAAGGATG	68	
PGA1PF	TGCAAGCTTCAGCAGAGCCCAGAATAT	47.5	探针片段扩增
PGA1PR	GGCGAATTCTAGGACAAGGAAAAGATT	47.5	
PGA2PF	TCGAAGCTTTGCCGTCACCTTCACACTC	55.5	
PGA2PR	CGCGAATTCCTTCAATCAGACAAGCCCC	55.5	
PP α PF	TGCAAGCTTTGACAGGGGAGTCTGAACC	53.5	
PP α PR	CCGGAATTCACATAAGCCACCACGATAG	53.5	

2 结果

2.1 PG A2 序列、结构和系统分析

鳊 PG A2 部分 cDNA 和 RACE 扩增产物经测序、拼接后, 获得全长 1 322 bp 的 PG A2 cDNA 序列 (GenBank 登录号: FJ463155)。该序列包括 31 bp 的 5' 非翻译区 (UTR), 160 bp 的 3' UTR 和 1 131 bp 的开放阅读框 (ORF), 共编码 376 个氨基酸。氨基酸序列含 16 个氨基酸残基 (aa) 的信号肽、41 aa 的激活肽和 319 aa 的胃蛋白酶。理化性质分析显示, 胃蛋白酶 A2 的分子量为 34 065 ku, 碱性氨基酸与酸性氨基酸比为 0.41, 理论等电点为 4.04。序列相似性比对显示, 鳊 PG A2 与 PG A1 的相似度为 80.3%, 与其他鱼类 PG A 的相似度为 67.4% ~ 94.4%, 与两栖类 (非洲爪蟾、牛蛙)、鸟类 (鸡)、哺乳类 (人、猪、狗) 的相似度为 68.5% ~ 72.5%。脊椎动物 PG A 氨基

酸序列比对 (图 1), 结果显示 PG A 含有 2 个保守的天冬氨酸残基活性位点和 3 个二硫键; 同时发现鱼类 PG A 在第 304 ~ 308 位存在 4 ~ 5 个 aa 的缺失, PG A1 在 S₁' 底物结合位点处存在 1 个 aa 的缺失。

以 PDB 数据库 (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) 中猪胃蛋白酶 A (登录号: 2PSG) 的晶体结构为模版建立鳊胃蛋白酶 A1、A2 的三维结构模型。通过叠加胃蛋白酶 A1 和 A2 氨基酸序列 α 碳骨架, 发现鳊胃蛋白酶 A1 和 A2 之间 α 碳的总体移位均方根 (RMS) 为 0.3 Å, 局部差异较大的区域有 3 个 (图 2)。

脊椎动物 PG 氨基酸序列的系统关系树显示, PG 分为 PG A 与 PG C 两大支, 鱼类 PG A 又分为 PG A1 和 PG A2 两小支。PG A、PG C 两大支中, 哺乳类、鸟类、两栖类、鱼类均分别聚类, 各物种间的亲缘关系与传统分类一致 (图 3)。

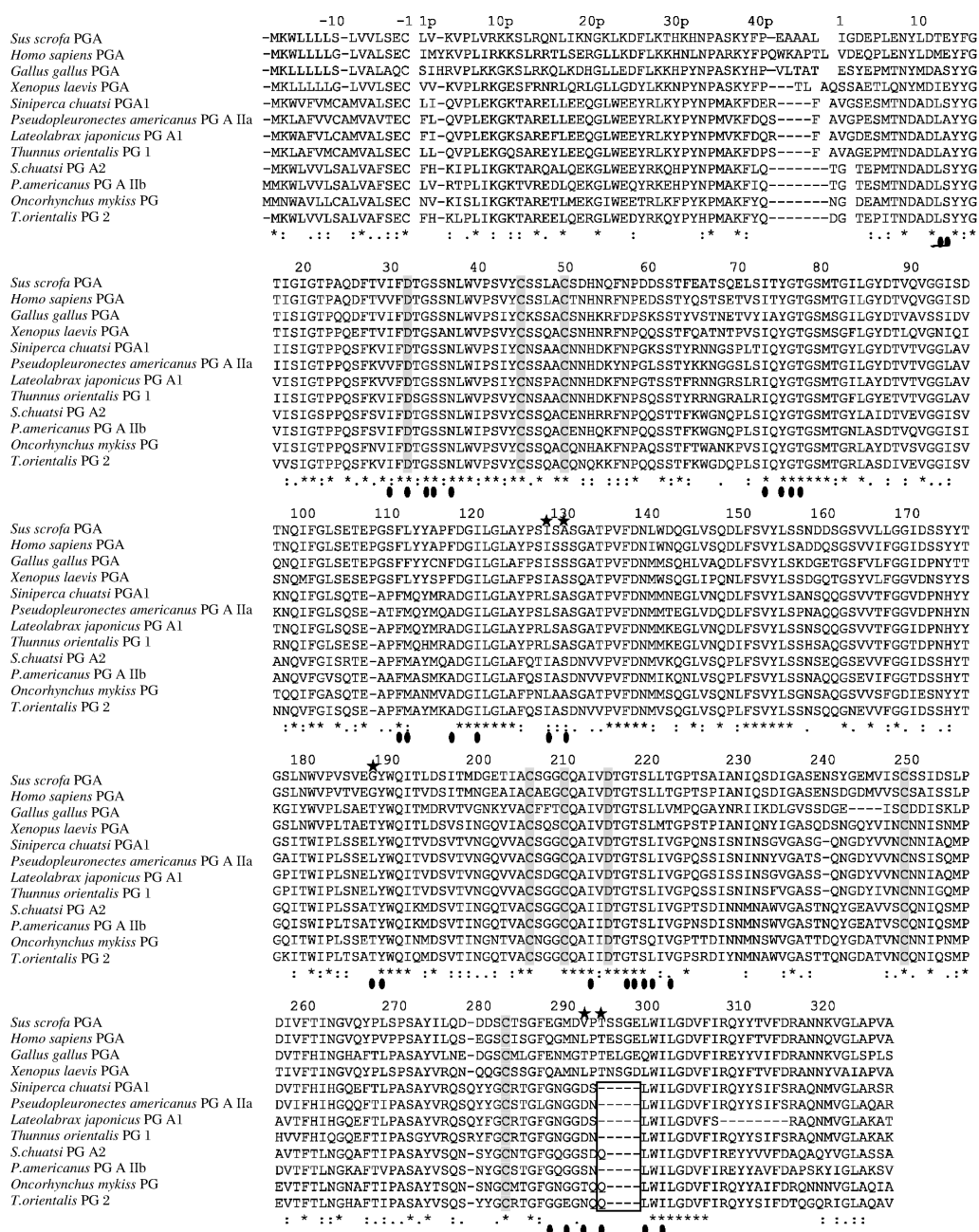


图 1 脊椎动物 PG A 氨基酸序列比对

信号肽部分序列以负数表示,激活肽部分标以后缀 p。天冬氨酸活性位点以阴影和粗体表示。形成 3 个二硫键的半胱氨酸残基以阴影表示。鱼类 PG A 的缺失以方框标出。序列下的椭圆标表示底物结合位点。序列上的星号指示鳃 PG A1、PG A2 底物结合位点处的差异。

Fig. 1 Amino acid sequences alignment of vertebrate pepsinogens A

The residues in the signal peptide are indicated by negative numbers, and those in the activation segment are characterized by the suffix p. Two catalytic-site aspartates are shown in bold and shadowed. The six cysteine residues that are involved in forming three disulfide bonds are also shadowed. Deletion part of amino acids of fish PG A is shown in box. The ellipses under the aligned sequences indicate the positions of residues that contact with residues of an ideal heptapeptide substrate. Stars above the sequences indicate the differences on substrate-binding subsites between PG A1 and PG A2.

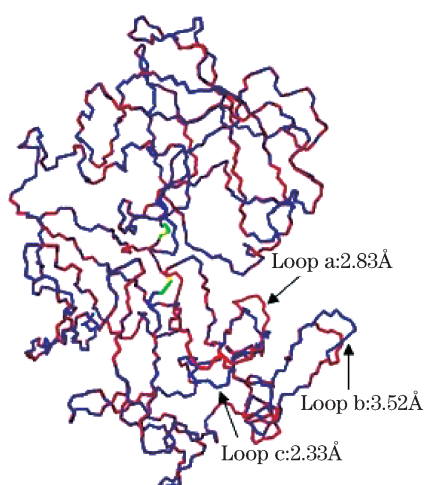


图2 鳊胃蛋白酶 A1(红)、A2(蓝)叠加比对,黄色和绿色分别显示鳊胃蛋白酶 A1、A2 的天冬氨酸活性中心

Fig. 2 Overlay comparison of mandarin fish pepsin A1 (red) and A2 (blue), yellow and green indicate aspartates catalytic sites of pepsin A1 and pepsin A2 respectively

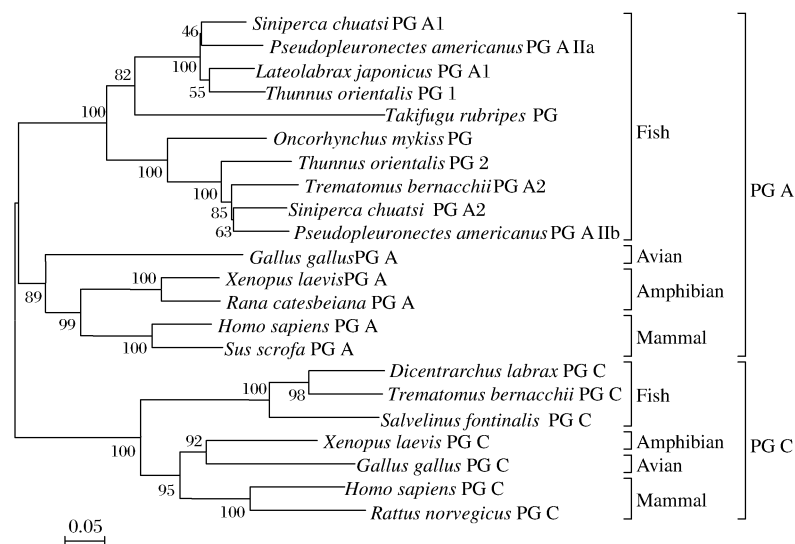


图3 脊椎动物 PG A、C 系统关系树

Fig. 3 Phylogenetic tree of vertebrate pepsinogen A and pepsinogen C

序列相似性比对显示,胃质子泵 α 亚基在不同脊椎动物(鱼类、两栖类、哺乳类)之间表现出较高的保守性,序列相似度均大于 90%;而 β 亚基在不同脊椎动物(两栖类、鸟类、哺乳类)之间的差异较大,相似度仅为 59.1% ~ 68.0%。

2.3 胃组织 H. E 染色和原位杂交

H. E 染色结果显示,鳊胃粘膜含有 3 种类型细胞:表层的表面粘膜细胞、中间的粘液颈细

2.2 胃质子泵 α 和 β 亚基序列分析

扩增产物测序、拼接后,分别获得长度为 3 581 bp 和 1 669 bp 的鳊胃质子泵 α 和 β 亚基 cDNA 全长序列(GenBank 登录号为:HMI65261、HMI65262)。 α 亚基序列包括 178 bp 的 5' UTR 和 334 bp 的 3' UTR,3 069 bp 的 ORF,共编码 1 022 个氨基酸。 β 亚基序列包括 220 bp 的 5' UTR 和 573 bp 的 3' UTR,876 bp 的 ORF,共编码 291 个氨基酸。

α 亚基具有 10 个跨膜结构域,第 374 ~ 380 位 aa(DKTGTLT)是 E1 - E2 型 ATP 酶磷酸化位点,N 端 21 ~ 28 位 aa(KKKKMKKK)具有赖氨酸/甘氨酸簇结构。 β 亚基仅有 1 个跨膜结构域,1 ~ 37 aa 位于胞质区,38 ~ 60 aa 为跨膜区,61 ~ 291 aa 为膜外区。膜外区的 6 个半胱氨酸残基($C_{133} - C_{154}$ 、 $C_{164} - C_{180}$ 、 $C_{205} - C_{263}$)共形成 3 个二硫键。糖基化分析显示, β 亚基含有 7 个潜在的糖基化位点($N^{23,99,132,186,195,244,274}$)。

胞和下层的胃腺细胞(图 4)。为避免不同组织块间差异,原位杂交所用切片均来自同一蜡块,结果表明:(1)鳊 PG A1、PG A2、胃质子泵 α 亚基反义杂交探针均出现杂交信号,正义探针对照均无杂交信号;(2)鳊 PG A1、PG A2 和胃质子泵 α 亚基 mRNA 均在同一类型细胞——泌酸胃酶细胞中表达,表明该细胞兼有分泌 PG 和胃酸的功能。

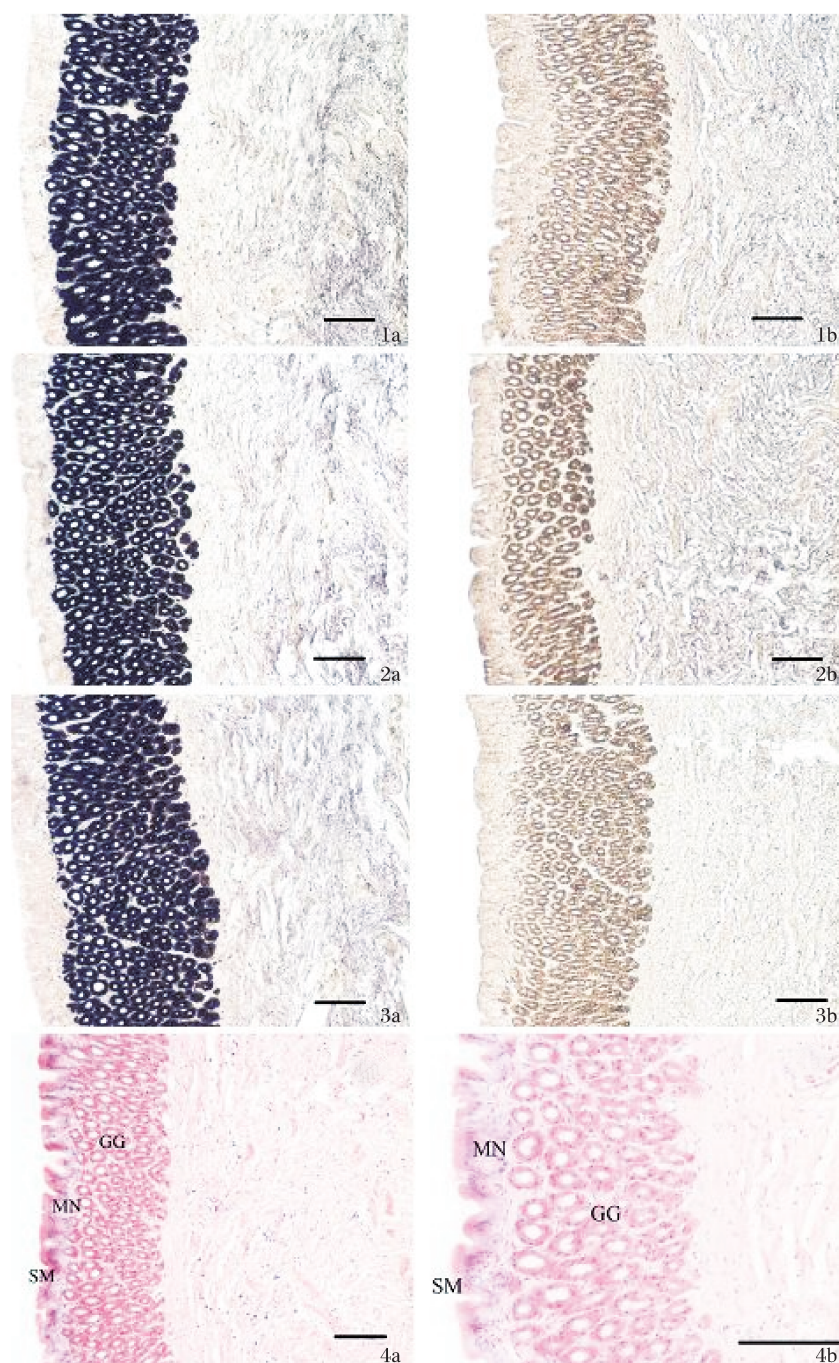


图4 鳊胃粘膜 PG A1、PG A2、质子泵 α 亚基原位杂交

1a,2a,3a 显示鳊 PG A1、PG A2、质子泵 α 亚基反义探针杂交,杂交信号为蓝紫色;1b,2b,3b 为相应的正义探针对照。4a,4b 显示胃粘膜组织 H. E 染色。SM,表面粘膜细胞;MN,粘膜颈细胞;GG,胃腺细胞。标尺长度为 100 μm 。

Fig. 4 In situ hybridization of PG A1,PG A2,proton pump α -subunit in gastric mucosa of mandarin fish

1a,2a,3a show the positive results(dark - blue dye) of hybridization with the antisense probe for PG A1,PG A2 and α -subunit of proton pump; 1b,2b,3b show the negative results of hybridization with the sense probe. 4a and 4b show gastric mucous structure by H. E staining. SM,surface mucous cells; MN,mucous neck cells; GG,gastric gland cells. Scale bar = 100 μm .

3 讨论

本研究表明,鳊胃蛋白酶 A2 与 A1 在氨基酸

序列组成、理化性质、功能位点及空间结构上存在明显的差异。鳊胃蛋白酶 A1、A2 分别含 321 aa 和 319 aa,序列相似性为 80.3%,一致性为

66.6%。胃蛋白酶 A1 碱性/酸性氨基酸残基之比(17/20)大于胃蛋白酶 A2(9/22)。胃蛋白酶 A1 等电点($pI = 4.89$)大于胃蛋白酶 A2($pI = 4.04$)。胃蛋白酶 A1、A2 在底物结合位点上存在 5 个 aa 的差异:2 个位于 S'_1 亚位点,1 个位于 S'_2 亚位点,2 个位于 S'_3 亚位点,尤其是胃蛋白酶 A1 在 S'_1 亚位点处出现 1 个 aa 的缺失。由于底物结合位点处的氨基酸残基直接与底物接触,对于酶促反应存在较大影响,该处少数关键氨基酸残基的差异就可以使酶的催化功能发生改变^[6]。空间结构上,鳕胃蛋白酶 A1 和 A2 存在 3 个差异较大的区域,其中 2 个(图 2 中 a、c)靠近底物结合位点(S_2 、 S'_1),对胃蛋白酶的催化功能影响较大^[20-21]。上述差异可能会导致鳕胃蛋白酶 A1、A2 催化活性与底物特异性方面的不同。不同催化特性的胃蛋白酶间可以相互配合,更好地消化多种食物蛋白,以提高食物蛋白质的消化和利用效率。

通过比对脊椎动物 PG A 氨基酸序列发现,鱼类 PG A 第 294~298 位存在 4~5 个 aa 的缺失,而在其它脊椎动物(两栖类、鸟类、哺乳类)中均未见此缺失。该位置包含部分 S'_1 底物结合位点,在其它脊椎动物中形成环状结构(S'_1 环)^[22]。鱼类此处部分氨基酸的缺失,使 S'_1 环明显小于其它脊椎动物,这为鱼类胃蛋白酶 A 结合底物提供了更大的空间,可更为有效地容纳较大的底物^[6]。

鱼类蛋白质的初步消化是通过胃中胃蛋白酶和胃酸的协同作用完成的。胃质子泵所分泌的胃酸不仅是 PG 激活的前提,也是胃蛋白酶保持活性和结构稳定的必要条件。比对鳕与其他脊椎动物胃质子泵 α 、 β 亚基氨基酸序列发现, α 亚基氨基酸序列具有高度保守性,而 β 亚基具有相对可变性。这可能与 α 亚基是整个离子转运的关键部位,含有 ATP 结合位点^[23]、酰基磷酸化位点^[23]、离子识别位点^[24]以及抑制剂结合位点^[25]等多种结合位点,为正常行使酶功能所必需有关;而 β 亚基的功能仅限于全酶的装配、细胞膜定位以及全酶的稳定,故而结构可变性较大^[26]。

研究表明,鱼类胃粘膜中除了泌酸胃酶细胞外,还存在另外 2 种细胞类型:表层的表面粘膜细胞和中间的粘液颈细胞,泌酸胃酶细胞位于下层^[14]。表面粘膜细胞主要起保护作用,防止胃蛋白酶和胃酸对胃粘膜上皮的破坏,粘液颈细胞可

分泌粘液,胃腺细胞主要起分泌 PG 和胃酸的作用^[27]。美洲拟鲈 PG 和胃质子泵均在泌酸胃酶细胞中表达,此外,还发现胃质子泵在表面粘膜细胞和粘液颈细胞中表达^[14]。本研究中,鳕 PG 和胃质子泵同在胃腺泌酸胃酶细胞中表达,在其他细胞中未见表达。电镜研究表明,鱼类泌酸胃酶细胞兼有哺乳动物胃酶和泌酸细胞的结构特征^[27-28],既含有大量的粗面内质网,核上区含有电子致密颗粒(类似胃酶细胞);同时在细胞顶部又有发达的微管泡系(与泌酸细胞类似)。鱼类 PG 与胃质子泵在同一种细胞——泌酸胃酶细胞中表达,有利于二者更好的协同配合,分泌的 PG 可在胃酸的作用下迅速激活,发挥蛋白水解功能。但泌酸胃酶细胞兼具泌酸和胃酶细胞的功能,尚未完全特化,属于一种原始形态,其分泌胃酸和 PG 的能力不如充分特化的泌酸和胃酶细胞,这也从细胞水平解释了鱼类胃腔酸化水平比哺乳动物低的原因^[29]。

参考文献:

- [1] KAGEYAMA T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002, 59: 288-306.
- [2] 彭国林,李兆申,屠振兴. 胃质子泵研究进展[J]. 国外医学:消化系疾病分册, 2005, 25(2): 83-85.
- [3] FOLTMANN B. Gastric proteinases: structure, function and evolution and mechanism of action[J]. Essays Biochem, 1981, 17: 52-84.
- [4] FENG S Z, LI W S, LIN H R. Identification and expression characterization of pepsinogen A in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Journal of Fish Biology, 2008, 73: 1960-1978.
- [5] VINCENZO C, FRANCESCA T, CLEMENTE C, et al. Gene amplification and cold adaptation of pepsin in Antarctic fish: A possible strategy for food digestion at low temperature [J]. Gene, 2004, 336: 195-205.
- [6] TANJI M, YAKABE E, KUBOTA K, et al. Structural and phylogenetic comparison of three pepsinogens from Pacific bluefin tuna: Molecular evolution of fish pepsinogens [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 152(1): 9-19.
- [7] DOUGLAS S E, GAWLICKA A, MANDLA S, et al. Ontogeny of the stomach in winter flounder:

- characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity [J]. Journal of Fish Biology, 1999, 55: 897 - 915.
- [8] MURRAY H M, GALLANT J W, JOHNSON S C, *et al.* Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality [J]. Aquaculture, 2006, 252: 394 - 408.
- [9] 邓燕飞. 斑鳕胃蛋白酶原及相关基因的克隆与组织表达特征 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2009.
- [10] HELANDER H F. The cells of the gastric mucosa [J]. International Review of Cytology, 1981, 70: 217 - 289.
- [11] FARALDI G, TAGLAFIÈRO G, FELUGI C. Istochimica ed ultrastruttura della cellula ghiandolare gastrica di raja asterias delarochae (Elasmobranch) [J]. Bollettino-Società Italiana Biologica Sperimentale, 1984, 60: 967 - 973.
- [12] MICHELANGELO F, RUIZ M C, DOMINGUEZ M G, *et al.* Mammalian-like differentiation of gastric cells in the shark *Hexanchus griseus* [J]. Cell and Tissue Research, 1988, 251 (1): 225 - 227.
- [13] DARIAS M J, MURRAY H M, GALLANT J W, *et al.* Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): Determination of stomach functionality [J]. Aquaculture, 2007, 270: 369 - 378.
- [14] GAWLICKA A, LEGGIADRO C T, GALLANT J W. Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by in situ hybridization [J]. Journal of Fish Biology, 2001, 58: 529 - 536.
- [15] SMOLKA A, HELANDER H F, SACHS G. Monoclonal antibodies against gastric H⁺/K⁺-ATPase [J]. American Journal of Physiology, 1983, 245: 589 - 596.
- [16] 王韞明, 王文. 几种淡水鱼的胃腺细胞显微与超微结构的研究 [J]. 水生生物学报, 1989, 13 (4): 334 - 339.
- [17] 舒妙安, 徐海圣, 朱有法, 等. 黄鳝胃肠的生长抑素分泌细胞及超微结构 [J]. 水产学报, 2002, 26 (3): 202 - 216.
- [18] 吴雪峰, 赵金良. 鳕胃蛋白酶原基因 cDNA 全长的克隆与序列分析 [J]. 水产学报, 2008, 32 (6): 971 - 976.
- [19] MURRAY H M, GALLANT J W, PÉREZ-CASANOVA C, *et al.* Ontogeny of lipase expression in winter flounder [J]. Journal of Fish Biology, 2003, 62: 816 - 833.
- [20] KAGEYAMA T. Roles of Tyr13 and Phe219 in the unique substrate specificity of pepsin B [J]. Biochemistry, 2006, 45: 14415 - 14426.
- [21] SUZUKI J, SASAKI K, SASAO Y, *et al.* Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis [J]. Protein Engineering, 1989, 2: 563 - 569.
- [22] KAGEYAMA T. Role of S₁' loop residues in the substrate specificities of pepsin A and chymosin [J]. Biochemistry, 2004, 43: 15122 - 15130.
- [23] SHULL G E, LINGREL J B. Molecular cloning of the rat stomach (H⁺/K⁺)-ATPase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1986, 261: 16788 - 16791.
- [24] ASANO S, TEGA Y, KONISHI K, *et al.* Functional expression of gastric H⁺, K⁺-ATPase and site-directed mutagenesis of the putative cation binding site and the catalytic center [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271: 2740 - 2745.
- [25] ASANO S, MATSUDA S, TEGA Y, *et al.* Mutational analysis of putative SCH 28080 binding sites of the gastric H⁺, K⁺-ATPase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272: 17668 - 17674.
- [26] TYAGARAJAN K, CHOW D C, SMOLKA A, *et al.* Structural interactions between alpha- and beta-subunits of the gastric H, K-ATPase [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1236 (1): 105 - 113.
- [27] MURRAY H M, WRIGHT G M, GOFF G P. A comparative histological and histochemical study of the stomach from three species of pleuronectid, the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferruginea*, and the winter flounder, *Pleuronectes americanus* [J]. Canadian Journal of Zoology, 1994, 72: 1199 - 1210.
- [28] MATTISSON A, HOLSTEIN B. The ultrastructure of the gastric glands and its relation to induced secretory activity of cod, *Gadus morhua* (Day) [J]. Acta Physiologica Scandinavica, 1980, 109 (1): 51 - 59.
- [29] SHOZO H S, PRABIR K R, RONALDO P F. Dietary acidification enhances phosphorus digestibility but decreases H⁺/K⁺-ATPase expression in rainbow trout [J]. Journal of Experimental Biology, 2006, 209: 3719 - 3728.

Full-length cDNA cloning and cellular expression of the pepsinogen A and gastric proton pump genes of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)

XUE Yang¹, ZHAO Jin-liang^{1*}, DENG Yan-fei¹, BIAN Yun-bin², GU Cai-di³

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Fishery Technology Promotion Station, Pudong New District, Shanghai 201200, China;

3. Sunnong Aquaculture Farm, Pudong New District, Shanghai 201203, China)

Abstract: Pepsinogens (PGs) are inactive precursors of pepsins, which convert to mature pepsins in gastric acidic environment. In this study, the complete cDNA sequence of PG A2 was obtained from the stomach of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). The full length of PG A2 cDNA was 1 322 bp, which contained an open reading frame (ORF) of 1 131 bp encoding a peptide of 319 amino acids. Three regions were identified in PG A2 amino acid sequence: the signal peptide, the activation segment and the pepsin moiety. The pepsin moiety had two aspartates functioned as catalytic residues and three disulfide bonds. There were significant differences in sequence composition, physical and chemical properties, functional sites and spatial structure between pepsin A2 and pepsin A1 of mandarin fish, suggesting that they may have divergent functions. Gastric proton pump (gastric H⁺/K⁺-ATPase) is a key enzyme involved in the secretion of gastric acid. Both cDNAs of α and β subunits of the gastric proton pump were also isolated and cloned, with a length of 3 581 bp and 1 669 bp, respectively. High sequence conservation was revealed in α subunits which had multiple functional sites, while moderate variability was in β subunits. mRNA expressions of PG A1, PG A2 and α subunit of the gastric proton pump were detected in the same gastric gland cells of gastric mucosa using in situ hybridization, which implies these cells not only synthesized pepsinogens but also secreted hydrochloric acid, thus, they belonged to the oxynticopeptic cells.

Key words: mandarin fish (*Siniperca chuatsi*); pepsinogen A; gastric proton pump; cellular expression; oxynticopeptic cells

Corresponding author: ZHAO Jin-liang. E-mail: jlzha@shou.edu.cn