

草鱼 APN 基因的克隆及表达特征

冯军广^{1,2}, 聂国兴^{1*}, 刘 臻², 张建社², 王赏初², 鲁双庆²

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007;

2. 长沙学院生物工程与环境科学系, 湖南 长沙 410003)

摘要: 氨肽酶 N (APN) 是肽酶 M1 家族的成员之一, 在蛋白质的消化中发挥重要作用。采用同源克隆和 RACE 技术首次克隆草鱼 APN 基因的全长 cDNA 序列。该 cDNA 全长为 3 258 bp, 包含 27 bp 的 5'UTR 序列, 552 bp 的 3'UTR 序列, 2 679 bp 开放阅读框, 编码 892 个氨基酸; 草鱼与斑马鱼基因同源性和编码氨基酸同源性分别为 81.5%和 75.4%, 与其他动物同源性分别为 58.8%~61.2%和 54.3%~60.2%。经预测, 其编码蛋白的分子量为 100.61 ku, 等电点为 5.14, 该蛋白具有与哺乳动物十分相似的 1 个螺旋跨膜结构, 但跨膜区氨基酸同源性较低; 系统进化分析表明, 草鱼 APN 基因与斑马鱼的亲缘关系最近; 利用 Real-time PCR 技术检测了该基因的发育表达, 结果显示草鱼出膜 4 d 后 APN mRNA 表达量相对稳定; APN 在草鱼前肠、中肠和后肠均有较高的表达量, 以前肠组织表达量最高; 昼夜节律研究发现, 肠道 APN 基因 06:00-18:00 的表达量较 18:00-06:00 高。

关键词: 草鱼; APN cDNA; 分子特征; mRNA 表达模式

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

氨肽酶 N(aminopeptidase N, APN)是肽酶 M1 家族(peptidase family M1)的成员, 含有 1 个螺旋跨膜结构, N 端大约 8~10 个残基的肽链伸入胞浆, 通过 N 端的螺旋跨膜区固定在细胞膜上, 属于肽链端解酶(exopeptidase), 可使氨基酸从多肽链的 N 端依次水解游离出来, 它偏好水解蛋白或寡肽 N 端中性氨基酸, 广泛分布于动物组织中。目前关于氨肽酶研究较多的是兔氨肽酶基因的分子特征及其表达与活性研究, 雏鸡氨肽酶基因组织差异性表达及重组表达, 阿拉斯加鳕 (*Theragra chalcogramma*)、金枪鱼 (*Thunnus albacares*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 氨肽酶蛋白的分离纯化等^[1-8], 这些研究为进一步认识氨肽酶基因及其功能奠定了基础, 但是氨肽酶基因功能与结构的关系及其在生物体内催化蛋白质降解的分子机理研究尚未见报道。

动物摄取的蛋白质经胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶等作用后变成短链的肽和部分游离氨基酸。短肽经羧肽酶和氨肽酶的作用, 分别从肽段的 C 端和 N 端水解成为蛋白质的最小组成单位—氨基酸。在动物消化系统中, 人们发现了氨肽酶 N 以高活力存在, 在降解外源蛋白质过程中发挥重要的作用, 这说明氨肽酶 N 能为机体的新陈代谢提供氨基酸^[9], 在实现蛋白质的转化和新陈代谢的平衡方面具有重要意义。因此, 克隆草鱼氨肽酶 N 基因, 分析该基因在草鱼不同发育时期、不同组织的差异表达及昼夜表达节律, 可反映出其降解蛋白质能力的变化规律, 对深入了解草鱼蛋白质的代谢具有重要的科学意义。

本研究通过同源克隆和 RACE 技术获得在草鱼肠道蛋白质消化过程中起重要作用的氨肽酶 N 基因, 对其 cDNA 序列和推导的氨基酸及蛋白进

收稿日期: 2011-10-14 修回日期: 2012-02-15

资助项目: 国家自然科学基金项目(31001114); 湖南省高校产业化培育项目(10CY017); 河南省高校科技创新杰出人才项目(2010HASTIT020)

通讯作者: 聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn

行了分析,并用实时荧光定量 PCR 技术检测了该基因在草鱼不同发育时期、不同组织及昼夜表达变化,为氨肽酶基因功能与结构的关系及其在生物体内催化蛋白质降解的分子机理研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验鱼 健康无病草鱼 30 尾,平均体长 16.5 cm,平均体质量 55.0 g;发育变化研究所用的受精卵及鱼苗,均购于湖南省水产科学研究所。

主要试剂 E.Z.N.A.TM Total RNA Kit RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购于 Fermentas; TOP10 感受态细胞和 pGM-T 载体购于 TIANGEN; 末端转移酶(TdT)、dATP、TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver210 和 SYBR[®] Premix Ex Taq TM II 购于 TaKaRa。

1.2 实验方法

总 RNA 提取 取草鱼鲜活肠组织,用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,加入 30 μL RNase-free water,60 °C 孵育溶解 RNA 沉淀,-20 °C 保存备用。

APN cDNA 中间片段克隆 从 GenBank 中下载相关序列,用 DNAMAN 分析保守性,在保守区内用 Premier5.0 设计特异性引物 P(表 1),引物由上海英骏生物技术有限公司合成。以提取的总 RNA 为模板,按逆转录试剂盒操作说明逆转录成第一条 cDNA 链。PCR 扩增条件为 95 °C 预变性

3 min; 94 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳、切胶和回收纯化后克隆至 pGM-T 载体,转化到感受态 TOP10,进行蓝白斑筛选,菌液 PCR 检测阳性克隆送上海博尚生物技术有限公司测序。

3'端片段克隆 扩增时共设计 4 条引物, GSPP1、NGSPP1、3'RACE Olig(T)-Adaptor 和 3'RACE Adaptor,其中 GSPP1 和 NGSPP1 是根据已获得中间片段序列而设计的特异性引物,并且 GSPP1 在 NGSPP1 的上游; 3'RACE Olig(T)-Adaptor 和 3'RACE Adaptor 是一对通用引物。反转录时,用 3'RACE Olig(T)-Adaptor 代替反转录试剂盒中的 Olig(T)用于 mRNA 反转录; 扩增时,用 GSPP1 和 3'RACE Adaptor 做第一次 PCR,扩增条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 20 个循环; 72 °C 延伸 10 min。产物稀释 50 倍后再用 NGSPP1 和 3'RACE Adaptor 做巢式 PCR,反应条件同上。PCR 产物验证同中间片段的克隆。

5'端片段克隆 扩增时共设计 4 条引物, GSPP2、NGSPP2、5'RACE Olig(T)-Adaptor 和 5'RACE Adaptor,其中 GSPP2 和 NGSPP2 是根据已获得中间片段序列而设计的特异性引物,并且 GSPP2 在 NGSPP2 的下游; 5'RACE Olig(T)-Adaptor 和 5'RACE Adaptor 是一对通用引物。首先,反转录。用特异性引物 GSPP2 代替反转录试剂盒中的 Olig(T)在 Mulv 逆转录酶的作用下合成 cDNA 的

表 1 APN 和 Actin 引物参数
Tab. 1 Parameters of primer pairs for APN and Actin gene

引物 primer	引物序列 primer sequence	用途 usage
P+	5'-GTCGCCACAACCTCAGATG-3'	中间片段扩增
P-	5'-GTAAACCTCBGWGCGRTC-3'	中间片段扩增
GSPP1+	5'-CCGTTATTAACCGGGCACAG-3'	3'端扩增
GSPP2-	5'-TGAGCCACAGGTCATTCC-3'	5'端扩增
NGSPP1+	5'-GTTTGATCGCTCGGAGGTT-3'	3'端扩增
NGSPP2-	5'-GCATCTGAGTTGTGGCGAC-3'	5'端扩增
3'RACE Olig(T)-Adaptor	5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	3'端扩增
3'RACE Adaptor	5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'	3'端扩增
5'RACE Olig(T)-Adaptor	5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	5'端扩增
5'RACE Adaptor	5'-GACTCGAGTCGACATCG-3'	5'端扩增
Nei+	5'-GCCCAAAACTGTGCAAGAAAT-3'	荧光定量
Nei-	5'-CTCTGATGCGTGTCTGGTTAGT-3'	荧光定量
Actin+	5'-GAACACTGTGCTGTCTGGAGGTA-3'	内参引物
Actin-	5'-CTTGGGTTGGTCGTTTGAATC-3'	内参引物

第一链, 用 DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0 (Code: DV807A) 纯化试剂盒将 cDNA 纯化。其次, 在纯化产物 cDNA 3' 端加一个 Poly(A) 尾巴。取纯化 cDNA 10 μ L, 5 \times TdT buffer 10 μ L, 0.1% BSA 5 μ L, dATP (10 mmol/L) 2.5 μ L, TdT 酶 1 μ L, H₂O 21.5 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 min 后 80 $^{\circ}$ C 终止反应 3 min, 产物用 H₂O 稀释为 0.5 mL 后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。最后, 巢式 PCR。方法步骤同 3' 端片段克隆。PCR 产物验证同中间片段的克隆。

1.3 APN mRNA 表达差异分析

不同发育阶段的表达差异性分析 在湖南省水产科学研究所挑选 1 年以上、性成熟、体形良好的雌雄草鱼作为亲鱼, 采用人工湿法授精获得受精卵, 发育温度控制在 20~30 $^{\circ}$ C。分别在囊胚期、原肠期、神经期、器官形成期、出膜前期、出膜期(d0)、出膜后 1 d(d1)、d2、d3、d4、d7、d14、d21、d24、d28、d35 共 16 个时期取样。

参照金鱼管家基因 β -actin(AB039726) 设计内参引物 Actin, 作为荧光定量内参基因引物; 从已得的序列设计 APN 荧光定量引物 Nei。根据 Kenneth 等^[10]设计的比较阈值法来测定目的基因在不同组织的相对表达量。以混合样的 2 倍稀释浓度梯度作标准曲线样品, SYBR Green II 荧光染料 (TaKaRa) 进行荧光定量检测。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 3 s, 55 $^{\circ}$ C 25 s, 72 $^{\circ}$ C 11 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 30 s 终止; 根据 C_T 值(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)计算基因引物的扩增效率和分析熔解曲线^[10-12], 以确定引物和扩增参数达到进行荧光定量检测组织相对表达量的要求。各样品引物 PCR 扩增的 C_T 值由各自的扩增曲线分别得出, 并根据公式^[10]: $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(C_{T_{\text{目的基因}}} - C_{T_{\text{管家基因}}})}$, 计算出样品中基因 APN mRNA 相对表达丰度, 然后再取其对数作图。

不同组织的表达差异性分析 购买的成鱼饲养一段时间后, 随机抓捕 3 条取材, 分别取前肠、中肠、后肠、肝脏、肾脏、脾脏、心脏和肌肉等 8 个组织。提取总 RNA 并反转录成 cDNA 后, 进行荧光定量检测时所用的反应条件及数据处理同上。

昼夜节律的表达差异性分析 每天 09:00 和 15:00 给草鱼投食, 饲养 10 d 使其适应后, 分别

在 03:00、06:00、09:00、12:00、15:00、18:00、21:00、24:00 取材。取材时快速将草鱼固定在冰上, 用已灭菌的剪刀和镊子将肠道取出, 挤出肠道内的食糜, 用冰浴的 PBS 缓冲液清洗, 剥离掉肠道上附着的肠结缔组织。将肠道分为前、中、后 3 份, 并分别用剪刀剪碎, 快速分成小份置于液氮保存, 用于后续试验的总 RNA 提取。进行荧光定量检测时所用的反应条件及数据处理同上。

2 结果与分析

2.1 APN cDNA 全长序列扩增克隆

提取的总 RNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 有明显的 3 条带(图 1), 经紫外分光光度计检测, $OD_{260}/OD_{280} = 1.9$, 浓度为 65 μ g/mL。运用引物 P 从肠组织中扩增得到 1 520 bp 的特异性条带, 菌液送检测序, 结果在 GenBank 中 BLAST 分析确定为草鱼 APN 目的片段。3' 端和 5' 端经巢式 PCR 扩增得到特异性条带, 测序结果经 DNAMAN 分析, 去掉重叠区后拼接得到 APN cDNA 全长序列(图 2 为其中部分序列, GenBank 登录号: JN088167)。

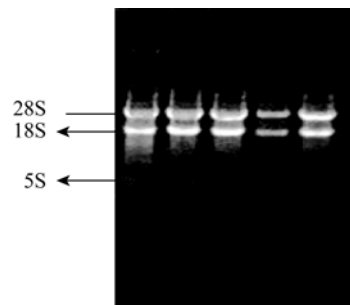


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

2.2 APN cDNA 全长序列分析

APN cDNA 全长序列基本特征 使用 CLC Main workbench 软件分析草鱼 APN cDNA 序列, 结果显示, 全长 cDNA 序列为 3 258 bp, 各碱基含量: A: 1013, C: 698, G: 702, T: 845; 预测开放阅读框与 NCBI 网上分析一致, 包括 27 bp 5'UTR、552 bp 3'UTR, 编码区 2 679 bp, 编码 892 个氨基酸(图 2); 预测蛋白质的分子量和等电点与 DNASTAR 软件预测一致, 分别为 100.61 ku 和 5.14。

APN 基因及预测氨基酸同源性分析 在 GenBank 中进行 BLAST 分析, 获取到斑马鱼(*Danio rerio* NM_001089325)、巨蜥(*Xenopus tropicalis* XM_002932257)、爪蟾(*Xenopus laevis* NM_001095122)、

```

1                               TTGCTCTCATCCTGTCAATCCTCAAGC   27
28  ATGGGAAAGGGTTTCGTCATCAGTAAAGCTGTCGGGATAGTACTGATTGTGGTTGGTGTCT   87
1  M G K G F V I S K A V G I V L I V V G A   20
88  GCAGCAGTGGCCACAATCATTGCCCTCTCTGTGGTCTACTCCCAAGAGAAGTCCAAGAAC   147
21  A A V A T I I A L S V V Y S Q E K S K N   40
2587 AACGTGGTCGGCCAATCGTTGGCTTGGGATTTTGTAGGGCCAAGTGGGAGTACATTTTC   2646
854  N V V G Q S L A W D F V R A N W E Y I F   873
2647 AATCAGTATGGAGGTGGATCTTCTCTTCTCCAATCTGGTCAACGGTGTCAAAAAGTGA   2706
874  N Q Y G G G S F S F S N L V N G V T K ***   893
3199 ATTTTGTCTAATGAAAATAAACACCTAAATCCATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   3258

```

图 2 草鱼 APN cDNA 及预测的氨基酸的部分序列
 Fig. 2 APN cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *C. idellus*

家鼠(*Mus musculus* NM_008486)、鼠(*Rattus norvegicus* NM_031012)、兔(*Oryctolagus cuniculus* NM_001082326)、狗(*Canis lupus familiaris* NM_001146034)、马(*Equus caballus* XM_001917489)、猴(*Macaca mulatta* XM_001093727)、黑猩猩(*Pongo abelii* XM_002825814)和人(*Homo sapiens* NM_001150)等 11 个物种 APN 基因序列。使用 DNAMAN 软件的 Kimura 模式分析 12 条基因同源性、氨基酸同源性和氨基酸跨膜区同源性。结果(表 2)显示,草鱼与斑马鱼的基因同源性为 81.5%,而与其他物种的基因同源性则为 58.8%~61.2%;编码氨基酸与其他物种之间的同源性都为 54.3%~60.2%,而与斑马鱼的高达 75.4%;跨膜区的氨基酸同源性较低,且变化较大。

构建 APN 基因系统进化树 使用 DNASTAR 构建 12 个物种 APN 基因系统进化树,与 MEGA4.0 软件^[13]的最小进化法的最大组合法构建的结果一致(图 3)。鱼纲中草鱼和斑马鱼独立形成一支;爬行纲中的巨蜥和爪蟾独立形成一支;但在哺乳纲

中除家鼠和鼠单独分支外,其他哺乳动物形成一大支。系统发育树显示的亲缘关系与传统分类学基本一致。

APN 核酸及蛋白预测结构特征 LCL Main workbench 6.0 和 RNA structure 4.5 对 APN mRNA 二级结构进行综合分析显示,5'端不存在二级结构,而在 3'端存在大量的茎-环结构,编码区只有少量茎-环结构。用 Anthe_2000 和 TMHMM Server 2.0 软件对编码氨基酸跨膜结构进行分析发现,草鱼 APN 具有 1 个螺旋跨膜结构,从 N 端的第 11 个氨基酸残基开始,至第 33 个氨基酸残基完成跨膜,其 N 端在细胞内,C 端在细胞外;TMpred Server 在线分析草鱼 APN 蛋白序列,结果表明与 Anthe_2000 软件分析结果相似,其它 11 个物种分析都存在 1 个跨膜区。除此共同特征外,在哺乳动物中,马的氨肽酶氨基酸序列从 274 到 280 处存在另外 1 个跨膜区。草鱼 APN 蛋白结构与哺乳类动物 APN 蛋白结构十分相似。

表 2 APN 基因和氨基酸同源性
 Tab. 2 Homology of APN gene and amino acid

种名 species	基因全长同源性/% homology of gene full-length	氨基酸同源性/% homology of amino acid	跨膜区氨基酸同源性/% homology of transmembrane area amino acid
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	100	100	100
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	81.5	75.4	73.7
巨蜥 <i>Xenopus tropicalis</i>	58.8	54.3	57.9
爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	59.8	58.6	57.9
家鼠 <i>Mus musculus</i>	59.2	58.5	57.9
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	59.4	58.0	68.4
家兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	61.2	58.3	57.9
家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	60.1	57.5	47.4
家马 <i>Equus caballus</i>	60.6	56.6	52.6
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	60.4	56.0	47.4
苏门答腊猩猩 <i>Pongo abelii</i>	60.3	60.2	57.9
人 <i>Homo sapiens</i>	59.4	58.4	57.9

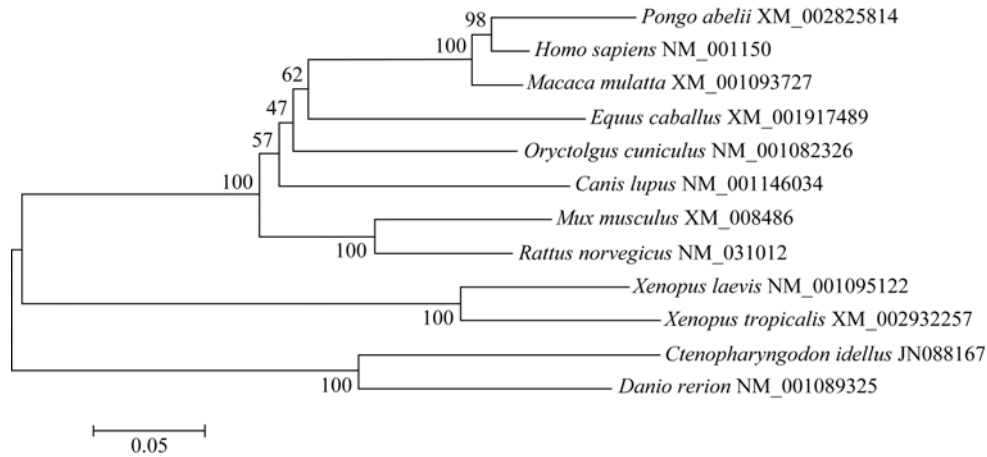


图 3 APN 基因系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of the APN gene

2.3 APN mRNA 表达特征

草鱼发育过程中, 不同发育阶段的表达量相差较大(图 4), APN mRNA 从囊胚期到原肠期表达量增加, 随后降低, 从器官形成期到出膜第 1 天, 表达量逐渐增加, 并在出膜第 1 天达到最大值, 随后表达量减少, 并趋于稳定。

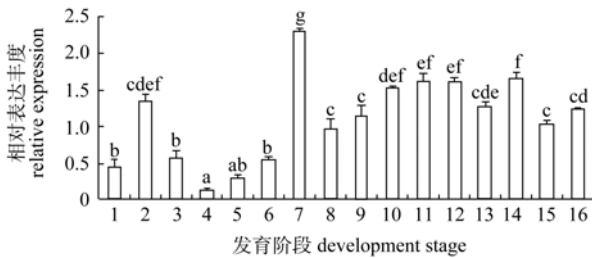


图 4 发育阶段 APN mRNA 的相对表达丰度
图中数据表示为平均值±标准差(n=3), 不同字母表示差异显著 (P<0.05)。1.囊胚期; 2.原肠期; 3.神经期; 4.器官期; 5.出膜前期; 6.出膜期; 7.出膜 1 天; 8.出膜 2 天; 9.出膜 3 天; 10.出膜 4 天; 11.出膜 7 天; 12.出膜 14 天; 13.出膜 21 天; 14.出膜 24 天; 15.出膜 28 天; 16.出膜 35 天。

Fig. 4 The relative abundance of APN mRNA in different development stage

Error bars indicate the mean and standard deviation(n=3). Different letters indicate statistical difference(P<0.05). 1.blastula stage; 2.gastrul stage; 3.neural stage; 4.organ stage; 5.pre-hatching; 6.hatching stage; 7.hatching 1 day; 8.hatching 2 days; 9. hatching 3 days; 10.hatching 4 days; 11.hatching 7 days; 12.hatching 14 days; 15.hatching 21 days; 16.hatching 28 days.

APN 在草鱼前肠、中肠、后肠、肝脏、肾脏、脾脏、心脏和肌肉等组织中均有表达, 但在前肠组织表达最高, 在中肠、后肠和肝脏组织表达差异不显著, 心脏和脾脏的表达量显著低于其它组织(图 5)。

草鱼 APN 在 06:00-18:00 的表达量较 18:00-06:00 高, 中肠和后肠尤为显著。中肠的表达量从

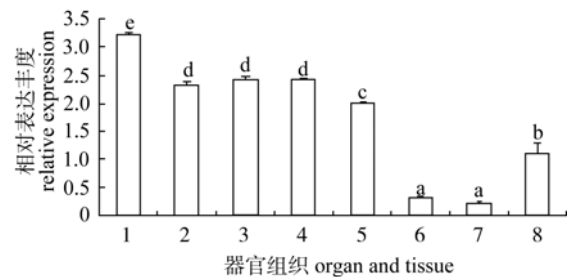


图 5 APN mRNA 的各组织相对表达丰度

图中数据表示为平均值±标准差(n=3), 不同字母表示差异显著 (P<0.05)。1.前肠; 2.中肠; 3.后肠; 4.肝脏; 5.肾脏; 6.脾脏; 7.心脏; 8.肌肉。

Fig. 5 The relative abundance of APN mRNA in different tissues

Error bars indicate the mean and standard deviation(n=3). Different letters indicate statistical difference(P<0.05). 1.foregut; 2.midgut; 3.hidgut; 4.liver; 5.kidney; 6.spleen; 7.heart; 8.muscle.

03:00 开始逐渐增加, 在 12:00 达到最大值, 随后逐渐下降, 并在 18:00 后表达趋于稳定; 后肠的表达量从 24:00 至 09:00 表达变化不明显, 但在 12:00 表达量达到最高, 随后逐渐减少, 并在 21:00 表达量达到最低(图 6~图 8)。

3 讨论

氨肽酶是一类从蛋白质或肽链的 N 端选择性切割氨基酸残基的外肽酶的总称, 对维持细胞的正常生理功能有重要作用^[14-16]。目前, APN 基因在人^[4]、猪^[17]、鸡^[5]、昆虫^[3]等多种动物中已被克隆。本研究以草鱼为材料, 成功克隆了草鱼 APN 基因 cDNA 全序列。通过碱基和预测的氨基酸序列多重比对发现, 草鱼 APN cDNA 碱基和氨基酸残基与低等脊椎动物斑马鱼具有很高同源性, 而与其他

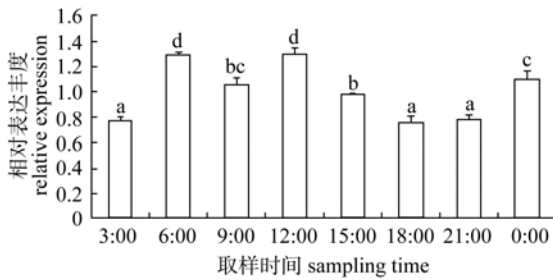


图 6 APN mRNA 前肠的相对表达丰度
图中数据表示为平均值±标准差(n=3), 不同字母表示差异显著(P<0.05).

Fig. 6 The relative abundance of APN mRNA in foregut

Error bars indicate the mean and standard deviation(n=3). Different letters indicate statistical difference(P<0.05).

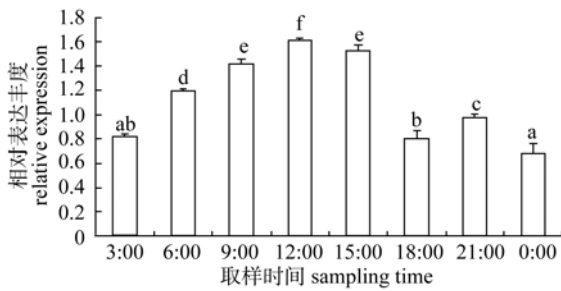


图 7 APN mRNA 中肠的相对表达丰度
图中数据表示为平均值±标准差(n=3), 不同字母表示差异显著(P<0.05).

Fig. 7 The relative abundance of APN mRNA in midgut

Error bars indicate the mean and standard deviation(n=3). Different letters indicate statistical difference(P<0.05).

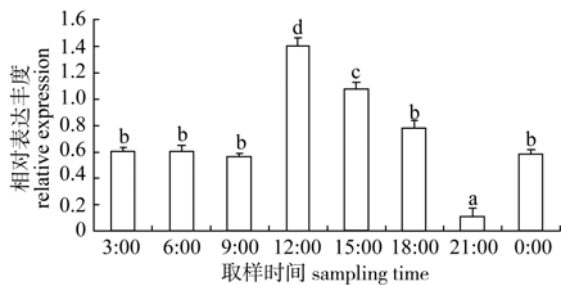


图 8 APN mRNA 后肠的相对表达丰度
图中数据表示为平均值±标准差(n=3), 不同字母表示差异显著(P<0.05).

Fig. 8 The relative abundance of APN mRNA in hindgut
Error bars indicate the mean and standard deviation(n=3). Different letters indicate statistical difference(P<0.05).

10 种高等脊椎动物相比较, 同源性偏低。通过构建氨肽酶系统进化树分析发现, 草鱼 APN 位于鱼纲动物这一支, 与斑马鱼的亲缘关系最近, 这与传统分类学方法得到的结果基本一致。

通过生物软件对草鱼氨肽酶氨基酸序列结构预测分析显示, 该蛋白具有与哺乳动物十分相似的 1 个螺旋跨膜结构, 通过一段近 N 端的螺旋跨膜区域固定在细胞膜上, 只有一小段 N 端肽链伸入

细胞浆, 8~10 个残基, 23~24 个氨基酸组成跨膜区, 包含有活性中心的大部分残基存在于细胞外, 因此, 草鱼基因与哺乳动物一样, 亦是一种外肽酶, 在细胞外发挥其催化活性^[18]。

APN 主要分布于肾、小肠、呼吸道上皮细胞、成纤维细胞、内皮细胞、血脑屏障处的脑外膜细胞以及中枢神经系统突触膜等处^[19], 且基因表达呈现不同的规律^[20]。本研究发现 APN 基因在草鱼前肠、后肠、肝脏、中肠、肾脏、肌肉、脾脏、心脏等多种组织中均有表达, 但肠道组织中的表达量最高, 与成年小鼠^[21]、猪^[22]等的研究结果相一致。了解动物肠道氨肽酶基因的表达特征, 在一定程度上有助于分析动物蛋白质消化和吸收的规律。一些研究者发现 APN 在鸡^[9]和兔^[23]的小肠中, 从前端到后端氨肽酶的活性和蛋白表达量均递增, 而我们的研究结果却发现 APN 基因在草鱼肠道的前端表达最高, 可能与物种肠道组织氨肽酶基因表达模式具有差异性相关。在草鱼肾脏中, APN 参与肾素—血管紧张素系统, 降解血管紧张素, 并在刷状缘膜中起阴离子交换剂的作用^[24], 通过干扰血管紧张素与其受体的相互作用以及信号通路, 降低 Na⁺/K⁺-ATP 酶的水平。因此, APN 与肾脏近曲小管对钠的摄入及重吸收关系密切^[25], 此外, 草鱼 PepT2 在近曲小管纹状缘细胞中的对小肽重吸收的代谢担任一定的转运任务^[26], 重吸收的小肽经过氨肽酶水解成氨基酸后重新利用, 这为氨肽酶在肾组织中有较高的表达量提供了理论依据。肝脏是动物的主要代谢器官, 所以草鱼肝脏中, 氨肽酶基因也有较高的表达量。

通过草鱼孵化及出膜之后不同发育阶段 APN mRNA 的表达变化发现, 出膜前, 除原肠期外, 草鱼胚胎的 APN mRNA 表达量较低, 这是否由于在胚胎期, 卵黄囊含有大量的蛋白所致^[27-28], 还有待进一步研究。草鱼出膜后, APN 的表达量增加以满足机体对蛋白的消化利用需要, 随后有所降低但趋于稳定, 这可能与草鱼的消化道发育有关^[29], 因为草鱼从出膜后第 3 天起, 消化道各部分开始分化, 而且出现了许多雏形结构, 在出膜后第 7~9 天草鱼已具完善的摄食能力。整体水平上, APN mRNA 的表达量随着发育而逐渐增加, 与鸡发育过程中的研究结果相似^[30-31]。

小肠内的消化酶、转运营养物质的载体基因

的节律性表达已在哺乳动物和家禽中有了大量研究, 这种节律性与动物的肠道功能及疾病控制密切相关^[32-36], 在实际生产中, 对调整养殖动物饲料组成与饲养模式, 提高养殖效益具有重要指导价值^[37-39]。

参考文献:

- [1] 李月廷, 祝学光, 许漫山, 等. 氨肽酶 N 在兔肝脏的表达及胆汁中活性的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(6): 594.
- [2] 明晓波, 尹鑫, 张颖, 等. 氨肽酶 N mRNA 在雏鸡不同组织中的表达情况[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(12): 1089-1093.
- [3] 刘京国, 赵晓萌, 杨爱珍, 等. 棉铃虫氨肽酶 N 基因片段克隆、表达和内源蛋白检测[J]. 北京农学院学报, 2010, 25(1): 20-23.
- [4] 涂向东, 谢飞, 吴玉水, 等. 人氨肽酶 N 基因克隆和原核表达[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(8): 691-693.
- [5] 赖庆安, 刘树滔, 卢苑华, 等. 鸡氨肽酶 H 在大肠杆菌中的表达、纯化与部分酶学性质分析[J]. 生物工程学报, 2008, 24(3): 381-386.
- [6] Chiou T K, Matsui T, Konosu S. Purification and properties of an aminopeptidase from Alaska pollack, *Theragra chalcogramma*, roe[J]. Journal of Biochemistry, 1989, 105(4): 505-509.
- [7] Hajjou M, Gal Y L. Purification and characterization of an aminopeptidase from tuna (*Thunnus albacares*) pyloric caeca[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1994, 1204(1): 1-13.
- [8] 刘冰心, 曹敏杰, 蔡秋凤, 等. 草鱼肌肉亮氨酸氨肽酶的分离纯化与性质研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2008, 13(1): 24-29.
- [9] Garber O G, Uni Z. Chicken intestinal aminopeptidase: Partial sequence of the gene, expression and activity[J]. Poultry Science, 2000, 79(1): 41-45.
- [10] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] Chillaron J, Roca R, Valencia A, et al. Heteromeric amino acid transporters: Biochemistry, genetics, and physiology[J]. American Physiological Society, 2001, 281(6): 995-1018.
- [12] Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream[J]. Experimental Hematology, 2002, 30(6): 503-512.
- [13] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(30): 11030-11035.
- [14] Sjostrom H, Noren O, Olsen J. Aminopeptidases: Structure and function[J]. Biomedical and Life Sciences, 2002, 477(1): 25-34.
- [15] Taylor A. Aminopeptidases: towards a mechanism of action[J]. Trends Biochemical Science, 1993, 18(5): 167-171.
- [16] Gonzales T, Baudouy J R. Bacterial aminopeptidases: properties and functions[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1996, 18(4): 319-344.
- [17] 刘博奇, 李广兴, 王衡, 等. 猪传染性胃肠炎病毒特异性受体 APN 功能区的初步鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009, 6: 21-23.
- [18] Rawlings N D, Morton F R, Barrett A J. MEROPS: The peptidase database[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(1): 270-272.
- [19] Albiston A L, Ye S, Chai S Y. Membrane bound members of the M1 family: More than aminopeptidases[J]. Protein and Peptide Letters, 2004, 11(5): 491-500.
- [20] Angel V M, Uribe R M, Cisneros M, et al. Thyrotropin-releasing hormone regulates the diurnal variation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity in the male rat adenohypophysis[J]. European Journal of Endocrinology, 2002, 147(3): 363-369.
- [21] Jardinaud F, Banisadr G, Noble F, et al. Ontogenic and adult whole body distribution of aminopeptidase N in rat investigated by *in vitro* autoradiography[J]. Biochimie, 2004, 86(2): 105-113.
- [22] Pflleiderer G, Celliers P G. Isolation of an aminopeptidase from kidney particles[J]. Biochemische Zeitschrift, 1963, 339(12): 186-189.
- [23] Kramer W, Girbig F, Corsiero D, et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(2): 1306-1320.
- [24] Vlahovic P, Stefanovic V. Kidney ectopeptidases: Structure, functions and clinical significance[J]. Pathologiebiologie, 1998, 46(10): 779-786.
- [25] Kotlo K, Shuea S, Tawar U, et al. Aminopeptidase N reduces basolateral Na^+/K^+ -ATPase in proximal tubule cells[J]. American Journal of Physiology Renal physiology, 2007, 293(4): 1047-1053.
- [26] Saito H, Terada T, Okuda M, et al. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PepT2[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1280(2): 173-177.
- [27] Noy Y, Sklan D. Yolk and exogenous feed utilization in the posthatch chick[J]. Poultry science, 2001, 80(10): 1490-1495.
- [28] Noy Y, Uni Z, Sklan D. Routes of yolk utilisation in the newly-hatched chick[J]. British Poultry Science, 1996, 37(5): 987-995.
- [29] 龚启祥, 杨文鸽. 草鱼消化道发育的组织学观察[J]. 浙江水产学院学报, 1990, 9(2): 85-94.
- [30] Gilbert E R, Li H, Emmerson D A, et al. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA

- abundance in the small intestine of broilers[J]. Poultry Science, 2007, 86(8): 1739–1753.
- [31] Uni Z, Tako E, Gal-Garber O, *et al.* Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo[J]. Poultry Science, 2003, 82(11): 1747–1754.
- [32] Dunlap J C. Molecular bases for circadian clocks [J]. Cell, 1999, 96(2): 271–290.
- [33] Tavakkolizadeh A, Berger U V, Shen K R, *et al.* Diurnal rhythmicity in intestinal SGLT-1 function, V(max), and mRNA expression topography[J]. Gastrointestinal Liver Physiology, 2001, 280(2): 209–215.
- [34] Balakrishnan A, Steams A T, Rounds J, *et al.* Diurnal rhythmicity in glucose uptake is mediated by temporal periodicity in the expression of the sodium-glucose co-transporter (SGLT1)[J]. Surgery, 2008, 143(6): 813–818.
- [35] Steamd A T, Balakrishnan A, Rhoads D B, *et al.* Diurnal rhythmicity in the transcription of jejunal drug transporters[J]. Journal of Pharmacological Science, 2008; 108(1): 144–148.
- [36] Pan X, Terada T, Irie M, *et al.* Diurnal rhythm of H⁺-peptide cotransporter in rat small intestine[J]. American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology, 2002, 283(1): 57–64.
- [37] Houghton S G, Duenes J A, Fatima J, *et al.* Coordinated, diurnal hexose transporter expression in rat small bowel: Implications for small bowel resection[J]. Surgery, 2008, 143(1): 79–93.
- [38] Pan X, Terada T, Okuda M, *et al.* The diurnal rhythm of the intestinal transporters SGLT1 and PEPT1 is regulated by the feeding conditions in rats[J]. Journal of Nutrition, 2004, 134(9): 2211–2215.
- [39] Fatima J, Iqbal C W, Houghton S G, *et al.* Hexose transporter expression and function in mouse small intestine: Role of diurnal rhythm[J]. Journal Gastrointestinal Surgery, 2009, 13(4): 634–641.

Clone of aminopeptidase N gene and its expression analysis in *Ctenopharyngodon idellus* tissues

FENG Jun-chang^{1,2}, NIE Guo-xing^{1*}, LIU Zhen², ZHANG Jian-she², WANG Shang-chu², LU Shuang-qing²

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Department of Biotechnology & Environment Science, Changsha University, Changsha, 410003, China)

Abstract: Aminopeptidase N is a member of the peptidase M1 family, and plays an important role in the digestion of protein. In this study, a full-length cDNA of APN gene was cloned from *Ctenopharyngodon idellus* with RT-PCR and RACE techniques, and its mRNA expression profile at different tissues was analyzed by real-time PCR method. The full-length of cDNA sequence of APN had 3 258 nucleotides, including 27 nucleotides at 5'UTR and 552 nucleotides at 3'UTR. Its open reading frame(ORF) had 2 679 nucleotides encoding a 892-amino-acid peptide. The deduced amino acid sequences of APN gene from *C. idellus* displayed the highest similarity with *Danio rerio* (75.4%), but varied to other animals from 61.2% to 58.8%. The encoded protein molecular weight was predicted at 100.61 ku with pI at 5.14. Phylogenetic analysis showed that the sequence of APN gene was clustered with *D. rerio* as its closest neighbor, which shared a sequence similarity of 81.5%, and had lower similarity with other animals from 60.2% to 54.3%. The APN protein had one helix trans-membrane region, but its amino acid sequence of the region demonstrated a low homology relationship to other vertebrates. The abundances of APN mRNA assayed by real-time PCR were differentially expressed at different tissues with a gradient from higher to lower among the tissues of fore-intestine, hind-intestine, liver, mid-intestine, kidney, muscle, spleen and heart, respectively. However, the APN mRNA expression was relatively stable after incubation for 4 days. The effects of the circadian rhythms on APN expression of *C. idellus* showed that there was a time-dependent pattern at higher rhythm during 06:00-18:00 and lower rhythm during 18:00-06:00. Therefore, our study could serve as an important research tool to study the relationship between APN gene's function and its structure, and investigate its molecular mechanism for protein degradation *in vivo*.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; APN cDNA; molecular characteristics; mRNA expression profile

Corresponding author: NIE Guo-xing. E-mail: niegx@htu.cn