



黄鳍鲷肌肉中弹性蛋白酶基因全长克隆及生物信息学

钟 婵¹, 吴国平^{1*}, 舒 梅¹, 孙乐常², 曹敏杰²

(1. 江西农业大学食品科学与工程学院, 江西 南昌 330045;

2. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 研究表明弹性蛋白酶 (elastase, Ela) 参与调控嗜水气单胞菌引起的细菌性溃疡病, 对控制鱼类养殖中免疫疾病有重要作用。本研究根据已报道脊椎动物的 *Ela*s 基因序列设计特异性引物, 通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得黄鳍鲷 *Ela* 基因 (*AIeLa*) cDNA 序列全长, 并对其生物信息学分析。结果显示, *AIeLa* 基因全长为 946 bp, 包含 807 bp 的开放阅读框, 编码 269 个氨基酸, 含有 16 个氨基酸信号肽的亲水性稳定膜外蛋白, 定位于细胞外基质, 具有 3 个 *O*-糖基化和 15 个磷酸化的潜在位点。编码的成熟 *AIeLa* 蛋白预测相对分子质量 27 509 u, 等电点为 6.05。氨基酸序列同源性比对发现, *AIeLa* 与鲷和鲟的 *Ela*s2 的同源性为 84.76%~99.26%, 处于系统进化树上同一分支, 表明它们的亲缘性相近。*AIeLa* 具有 *Ela*s 的保守结构, 如 Tryp-SPc 结构域、丝氨酸蛋白酶催化三联体、保守的半胱氨酸残基以及在 C 端含有 GDSGGPL 序列等, 揭示该酶有丝氨酸蛋白酶的催化活性。对 *AIeLa* 蛋白的二级结构分析显示, α -螺旋、 β -转角、 β -折叠和无规则卷曲所占的比例分别为 17.84%、7.06%、24.54% 和 50.56%。三级结构分析推测 α -螺旋和 β -折叠对于 *AIeLa* 蛋白的空间构象可能有着重要作用。本研究从黄鳍鲷肌肉中成功克隆 *AIeLa* 基因并分析其生物信息学特征, 为后续研究 *AIeLa* 参与调控鱼类免疫疾病的机制提供理论基础。

关键词: 黄鳍鲷; 弹性蛋白酶; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: Q 785; S 965.3

文献标志码: A

弹性蛋白酶 (EC 3.4.4.7, elastase, Ela) 是一种以水解不溶性弹性蛋白为特征, 能够水解明胶、血纤维蛋白、血红蛋白、白蛋白等多种蛋白质的广谱性肽链内切酶^[1]。该酶水解底物范围较广, 在生物体中发挥着多种重要的生理功能, 特别与胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等消化蛋白酶共同在消化过程中承担着重要的角色^[2]。目前, 已从人 (*Homo sapiens*)^[3]、绵羊 (*Ovis aries*)^[4]、野猪 (*Sus scrofa*)^[5] 等哺乳动物的胰脏中分离纯化出 Ela, 并对其理化性质及催化动力学开展了相应的研究。关于鱼类 Ela 的研究也多集中于其在消化器

官中的酶活性。已经在多种鱼类, 如欧鲇 (*Silurus glanis*)^[6]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[1]、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[7]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[8] 等的胰脏中发现 Ela。

黄鳍鲷 (*Acanthopagrus latus*) 是一种浅海近岸底层鲷科 (Sparidae) 类, 是我国重要的海水养殖经济品种之一。随着网箱养殖业不断扩展, 病害日益增多, 导致严重的鱼害现象^[9]。研究发现, 细菌性溃疡病是黄鳍鲷养殖中的主要病害, 它是由嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 引起^[10-11]。近年来研究发现, Ela 可能会参与由

收稿日期: 2019-11-23 修回日期: 2020-06-23

资助项目: 国家自然科学基金 (31701676, 31760483); 江西省科技厅自然科学基金 (20192BAB214026); 江西省教育厅科技计划重点项目 (GJJ180173)

第一作者: 钟婵 (照片), 从事水产品加工与质量控制研究, E-mail: zhongchan@jxau.edu.cn

通信作者: 吴国平, E-mail: jdwgp@163.com



嗜水气单胞菌引起的非特异性的免疫疾病代谢过程,具有抵抗外源微生物侵染的作用^[12-13]。但是,对于鱼类肌肉中 *Ela* 的理化性质及其与免疫疾病的关系研究较少。因此,本研究以黄鳍鲷为对象,从其肌肉中克隆 *Ela* 基因,并分析其生物信息学特征,以期为后续揭示该酶调控非特异性的免疫疾病中的机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活黄鳍鲷购买于食品超市(福建,厦门),用手术刀在其背部取约 1 g 肌肉,立即用于提取黄鳍鲷肌肉总 RNA。

TRIzol RNA 提取试剂盒和 Superscriptase III (Invitrogen, 美国), Oligo(dT)₁₈ 引物(ROCHE, 瑞士), AMV 逆转录酶(Promegar, 德国), DNA 凝胶回收试剂盒(Omega, 美国), pBS-T 质粒(TIANGEN, 中国), *rTaq* DNA 聚合酶(本研究室自制), *E. coli* DH5 α 感受态细胞(本研究室保存), 引物合成和测试技术服务由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,其余试剂为分析纯。

组织捣碎机(Kinematica, 瑞士), 高速离心机(Eppendorf, 德国), ABI9700 型 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国), 水平电泳槽(Cleaver, 英国), BIO-PROFIL 型凝胶成像系统(Vilber Lourmat, 法国), ND-1000 微量蛋白核酸测定仪(NanoDrop, 美国)。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中报道的相关物种的 *Ela* 的基因序列,使用 Primer 5.0 软件在基因保守区域设计合成 3 条简并引物(DPF1: 5'-GAGGACAAG ATCRTYGGVGG-3'; DPF2: 5'-GGGTGCTGW CTGCTGCYCACTG-3'; DPR1: 5'-CACACTAC AGGBCCVCC-3')。用此 3 条引物进行 *AlEla* 部分基因片段扩增及测序,并以该基因片段序列为基础,设计用于 5'RACE 和 3'RACE 的特异性片段扩增,设计合成 5 条基因特异性引物(DP3F1: 5'-AGCT GTCTGAGTCTGTGCCTTTGA-3'; DP3F2: 5'-C TGTACACCGGAGGCCCATAGC-3'; DP5R1: 5'-ACAGCGATACCCACCCAGTCAGG-3'; DP5R2: 5'-TCCGGTGTACAGCCTGCCCATCC-3'; DPER1: 5'-TTAGTTGTTCATCATAACCTGG-

3')。同时,根据 Clontech 公司 5'和 3'基因末端扩增试剂盒(RACE 技术),合成 4 条通用引物用于基因 5'RACE 和 3'RACE 扩增,3'RACE 为 Olig(dT)₁₈: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'和 CDS: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀N₋₁N-3'; 5'RACE 为 NUP: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'和 SMARTII: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'。

1.3 *AlEla* 基因克隆

按照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂盒说明书提取黄鳍鲷肌肉总 RNA; 利用 Superscript II RNase H 反转录酶,采用 Oligo(dT)₁₈ 为引物进行 cDNA 第一链的合成。以反转录的 cDNA 为模板,进行 PCR、巢式 PCR(Nested-PCR) 扩增。反应体系总体积为 20 μ L: 1 μ L cDNA, 10 μ mol/L 正、反向引物, 0.25 μ mol/L dNTPs, 2.5 U Taq DNA polymerase 和 2 μ L 10 \times PCR buffer(含 2.5 mmol/L MgCl₂)。RACE 扩增采用 Nested-RACE 方法,以 5'/3' RACE-ready cDNA 为模板,使用特异性引物和通用引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 40 s; 51 $^{\circ}$ C 40 s; 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环,之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带切胶回收,连接到 pBS-T 质粒上,转化 *E. coli* DH5 α 菌株,送上海生工生物工程股份有限公司进行测序。用 DNAMAN 软件对测定的序列进行拼接合并,从而获得 *AlEla* 的 cDNA 全长。

1.4 *AlEla* 基因生物信息学分析

利用 DNASTar 软件分析 *AlEla* 基因开放阅读框(ORF),并将其翻译为相应的蛋白氨基酸序列;采用 SignalP 4.1 Server 软件和 CDD 工具分析 *AlEla* 的信号肽和结构域^[14-15];用 ProtParam 对 *AlEla* 蛋白氨基酸组成、分子式、等电点等理化性质进行预测和分析^[16];利用 ProtScale 分析 *AlEla* 蛋白亲/疏水性^[17];利用 NetNGlyc 1.0 Server、NetOGlyc 4.0 Server 和 NetPhos 3.1 Server 软件对 *AlEla* 蛋白的 N-糖基化位点、O-糖基化位点和磷酸化位点进行预测^[18];采用 TMHMM Server v. 2.0 软件预测蛋白跨膜区域^[19];利用 Protcomp 9.0 软件对蛋白的亚细胞定位进行分析^[20];采用 SOPMA 和 COILSserver 软件对蛋白二级结构及卷曲螺旋结构进行分析^[21-22];利用 SWISS-MODEL 软件对 *AlEla* 三级结构进行预测^[23];利用 NCBI 中 BLAST

工具和 DNAMAN 软件进行序列相似性比对和分析; 应用 MEGA 7.0 软件, 采用 Neighbor-Joining(NJ) 法构建 *AIEl*a 与其他动物 *Ela* 蛋白的分子系统进化树^[24]。

2 结果

2.1 *AIEl*a 基因 cDNA 克隆及序列分析

利用简并引物, 通过一系列 PCR 扩增, 获得 *AIEl*a 编码区一个 305 bp 基因保守区片段 (图 1-a)。根据此基因序列, 重新设计特异性引物, 联合 RACE 通用引物, 分别进行 3'-RACE 和 5'-RACE 基因片段的扩增测序 (图 1-b, c), 再设计特异性

引物进行 PCR 扩增 *AIEl*a 基因全长, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1-d)。经 TA 克隆测序, 显示 *AIEl*a 基因序列全长为 948 bp (GenBank: EU117418.1), 包括 70 bp 的 5'端非编码区 (5'UTR), 71 bp 的 3'端非编码区 (3'UTR), 807 bp 的开放阅读框 (ORF), 共编码 269 个氨基酸残基。在 *AIEl*a 核酸序列 3'端非编码区含有 1 个 Poly(A) 典型信号序列 (AATAAA) 和终止密码子 (TAA)。同时, 在 *AIEl*a 氨基酸序列中发现 10 个保守的半胱氨酸残基 (Cys₁₇、Cys₅₈、Cys₇₄、Cys₁₄₁、Cys₁₅₅、Cys₁₈₆、Cys₂₀₂、Cys₂₁₂、Cys₂₂₂、Cys₂₄₃) 和 1 个丝氨酸蛋白酶活性中心的催化三联体 (His₇₃-Asp₁₂₁-Ser₂₁₆) (图 2)。

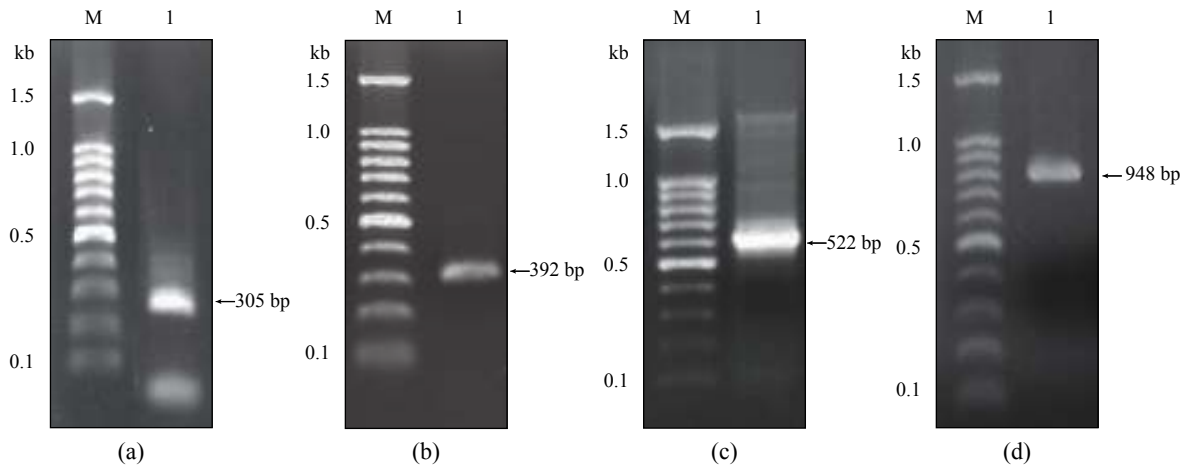


图 1 *AIEl*a 基因克隆电泳图

(a) *AIEl*a 基因保守区片段; (b) 3'-RACE 片段; (c) 5'-RACE 片段; (d) cDNA 全长。M. DNA 标准物质; 泳道 1. *AIEl*a 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 Electrophoresis of amplified elastase fragment from *A. latus*

(a) RT-PCR amplified fragment; (b) 3'RACE amplified fragment; (c) 5'RACE amplified fragment; (d) full length cDNA fragment. M. DNA Marker; lane 1. PCR amplified products of *AIEl*a gene

2.2 *AIEl*a 基因生物信息学分析

氨基酸序列对比 经 Blast 检索比对发现, *AIEl*a 基因编码的氨基酸序列与其他鱼类特别是鲷科鱼类的 *Ela*2 氨基酸序列高度同源, 如海鲷 (*Sparus aurata*) *Ela*2a (99.26%)、黑鲷 (*Spondyliosoma cantharus*) *Ela* (97.77%)、红鲷 (*Pagrus major*) *Ela* (96.28%)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) *Ela* (86.30%)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) *Ela* (84.76%)。此外, *AIEl*a 与其他物种的 *Ela*2 也具有较高的同源性, 如斑马鱼 (*Danio rerio*) *Ela*2 (60.97%)、人 (*Homo sapiens*) *Ela*2a (57.99%)、家鼠 (*Mus musculus*) *Ela*2a (53.14%)。但与其他类型的 *Ela* 同源性较低, 如海鲷 *Ela*1 (57.04%) 和 *Ela*3 (53.53%) (图 3)。

与 39 个已知 *Elas* 蛋白 (1、2、2a、2b、3a 和 3b) 进化分析发现, *AIEl*a 与其他硬骨鱼 *Elas* 处于同一分支上, 如海鲷、黑鲷、红鲷、牙鲆和大菱鲆, 表明它们之间亲缘关系最近 (图 4)。且其他脊椎动物的 *Elas* 聚为一类, 特别是与 *Ela*2 型处于同一簇, 如人 *Ela*2a、人 *Ela*2b、黑猩猩 (*Pan troglodytes*) *Ela*2b、野猪 (*Sus scrofa*) *Ela*2、牛 (*Bos taurus*) *Ela*2a、马 (*Equus caballus*) *Ela*2a、家鼠 *Ela*2a 等。此外, 从进化树可知非脊椎动物的 *Ela*, 如小卷蛾线虫 (*Steinernema carpocapsae*) *Ela*、致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) *Ela*2b、血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) *Ela*、黄热蚊 (*Aedes aegypti*) *Ela*, 比灵长类、啮齿类及鱼类等脊椎动物的 *Ela* 在进

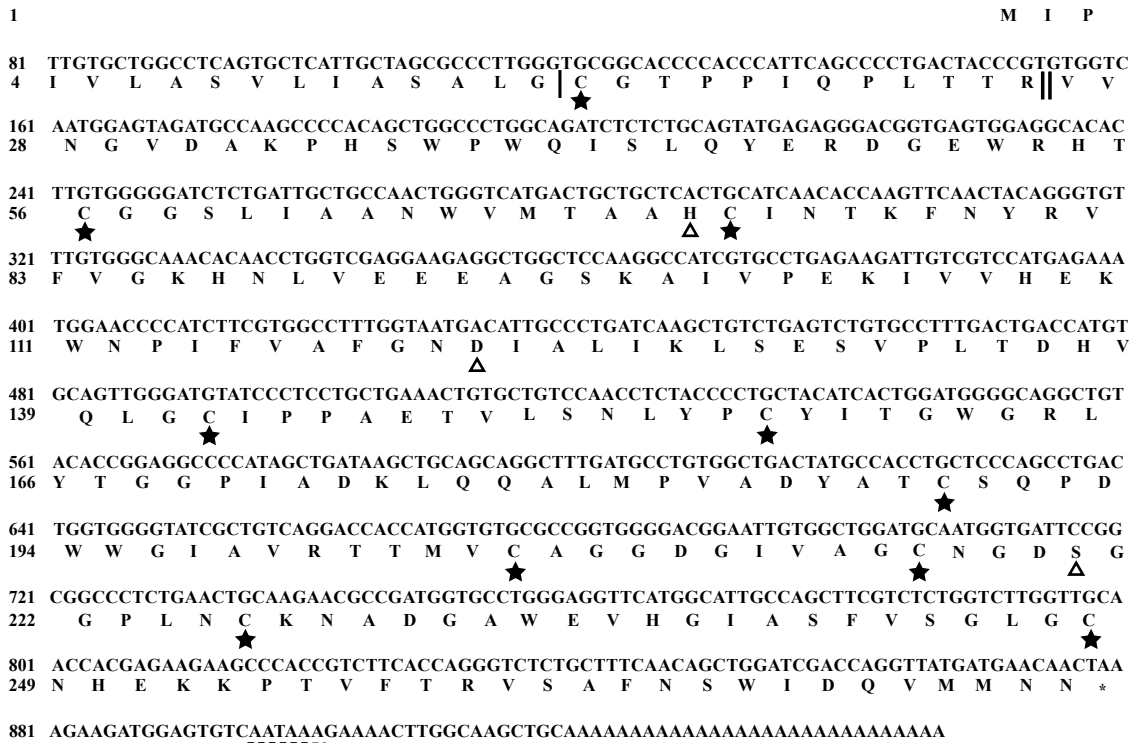


图 2 *AIeIa* 基因 cDNA 全长及其编码的氨基酸序列

Δ. 丝氨酸蛋白酶活性中心催化三联体结构位点; ★. 保守的半胱氨酸残基; |. 分泌信号肽裂解位点; l. 前导肽裂解位点; poly(A) 信号

Fig. 2 Complete cDNA and deduced amino acid sequence of elastase from *A. latus*

Δ. catalytic triad of serine proteinase active site; ★. conserved cysteine residues; |. cleavage site of secreted signal peptide; l. cleavage site of propeptide; poly(A) signal

化时间上分化更早。

蛋白质信号肽及结构域分析 分析 *AIeIa* 氨基酸序列预测信号肽, 结果如图 5-a 所示。原始剪切位点 (C-score) 和综合剪切位点值 (Y-score) 均在 Cys₁₇ 处表现出最大值, 分别为 0.378 和 0.579。信号肽 (S-score) 在 Ile₂ 处表现出最大值 (0.923), 且 Met₁-Gly₁₆ 其 S 值的平均值为 0.879, D (S-mean 和 Y-max 的平均值) 为 0.741 (>0.450), 表明 *AIeIa* 含有 16 个氨基酸残基 (Met₁-Gly₁₆) 的信号肽, 是一种分泌型蛋白。除信号肽外, 在 *AIeIa* 氨基酸序列中包含了一个完整的 Tryp-SPc 结构域 (Val₂₉-Asn₂₆₉) (图 5-b)。在这个结构域中, 有 1 个丝氨酸蛋白酶活性中心的催化三联体 (His₇₃-Asp₁₂₁-Ser₂₁₆) 以及底物结合位点。

蛋白质理化性质预测分析 根据 ProtParam 分析结果, *AIeIa* 的分子式为 C₁₂₃₀H₁₈₈₂N₃₃₄O₃₅₅S₁₅, 相对分子质量为 27 509.40 u, 等电点为 6.05; 基因编码的 253 个氨基酸中, 甘氨酸 (Gly) 含量最

高, 为 9.9%, 其次是缬氨酸 (Val), 为 9.1%, 而蛋氨酸 (Met) 含量最少, 为 2.0%; 带有负电荷的酸性氨基酸天冬氨酸和谷氨酸残基 (Asp+Glu) 22 个, 带有正电荷的碱性氨基酸精氨酸和赖氨酸残基 (Arg+Lys) 18 个; 该蛋白的不稳定指数为 17.04, 脂肪族指数为 82.45。

蛋白质糖基化和磷酸化位点预测分析 利用 Net NGlyc 1.0 Server 和 NetOGlyc 4.0 Server 软件分析糖基化位点, 发现 *AIeIa* 没有 N-糖基化位点, 但有 3 个 O-糖基化位点 (Ile₂₂、Thr₂₆、His₁₀₈); 采用 NetPhos 3.1 Server 软件分析, 有 15 个磷酸化位点, 其中丝氨酸 10 个 (第 8、39、61、97、128、130、187、216、256 和 260 位氨基酸残基), 苏氨酸 4 个 (第 19、26、77 和 199 位氨基酸残基), 酪氨酸 1 个 (第 81 位氨基酸残基) (图 5-c)。

蛋白质疏水性、跨膜结构以及亚细胞定位分析 由 ProtScale 分析亲/疏水性结果显示, *AIeIa* 疏水性最强出现在 Ser₈ 处, 其值为 3.089;

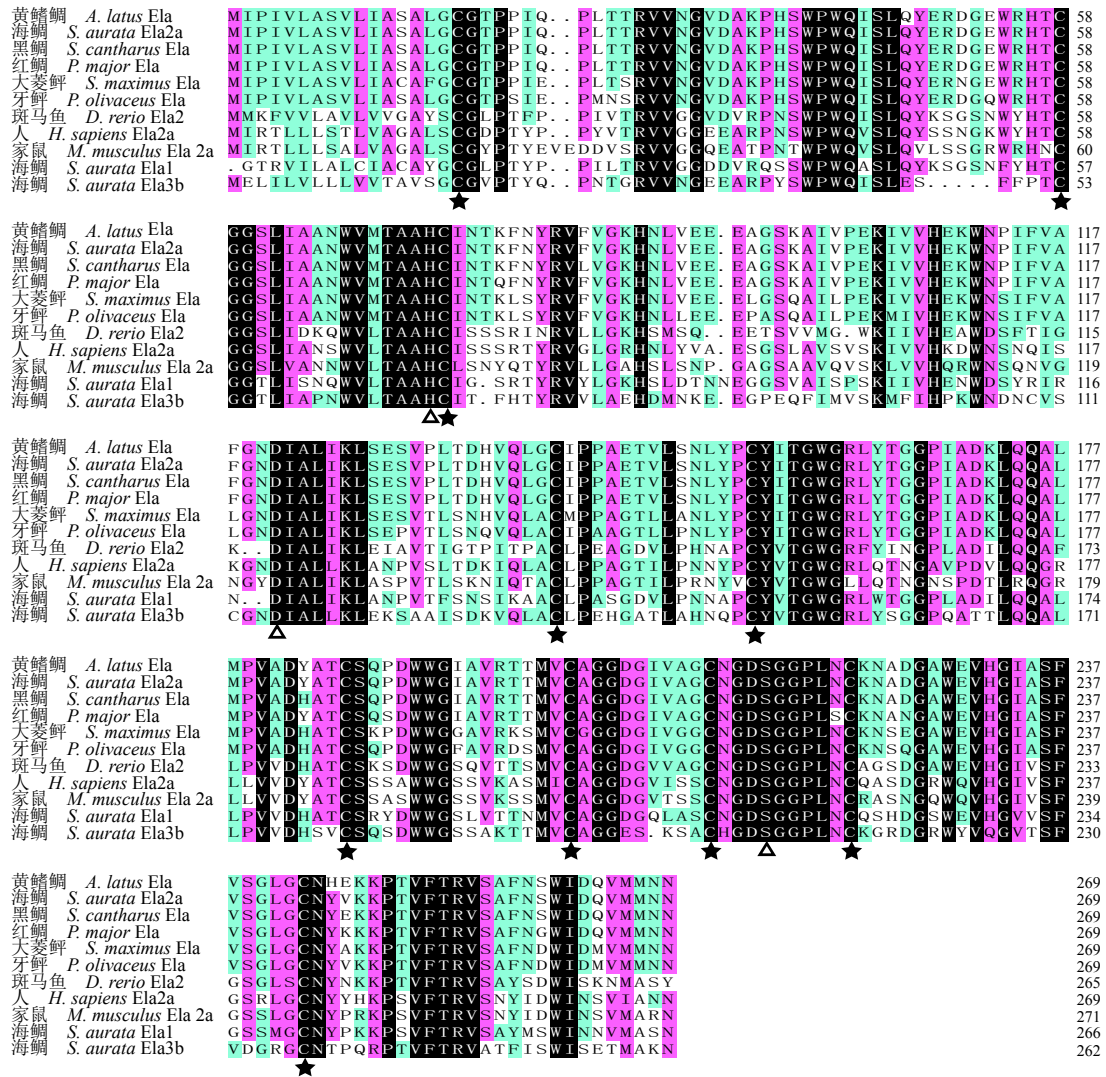


图 3 AIEla 与其他动物 Elas 的同源氨基酸序列比对

以相似性 50% 为阈值, ≥50% 以蓝色标注, ≥75% 以粉色标注, 100% 以黑色标注。△. 丝氨酸蛋白酶活性中心催化三联体结构位点; ★. 保守的半胱氨酸残基

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of elastases from *A. latus* and other animals

Similarity is set at 50% as threshold, greater than or equal to 50% is highlighted blue, greater than or equal to 75% is in pink, and 100% is in black. △. catalytic triad of serine proteinase active site; ★. conserved cysteine residues

亲水性最强在 Asp₅₁ 处, 其值为-2.844; 大部分氨基酸表现为负值, 推测 AIEla 可能是一种稳定的亲水性蛋白(图 5-d)。TMHMM 分析蛋白跨膜结构域显示, AIEla 蛋白不含跨膜结构域, 整条多肽链均处于细胞膜外(图 5-e)。Protcomp 9.0 软件对蛋白亚细胞定位分析显示, AIEla 分布于细胞外基质(5.42)、质膜(2.93)、内质网(1.65)的可能性较大, 分布于细胞核、细胞质、线粒体、溶酶体、高尔基体和液泡的可能性为零(表 1)。

蛋白质二级结构及卷曲螺旋预测 利用 SOPMA 对蛋白质二级结构进行分析, 该蛋白质

的二级结构中, α-螺旋(alpha helix, h)占 17.84%, β-转角(beta turn, t)占 7.06%, 延伸链(extended strand, e)占 24.54%, 无规则卷曲(random coil, c)占 50.56%(图 6-a)。从蛋白质的整体结构来看, 无规则卷曲和延伸链是 AIEla 蛋白质的主要结构元件, 分散于整条多肽链; 而 α-螺旋和 β-转角相对较少, 其中两个明显的 α-螺旋分别位于两端。使用 COILS Server 软件预测了蛋白的卷曲螺旋结构, 结果显示在 3 种不同的窗口宽度下的检测值均较低, 表明蛋白中可能不存在卷曲螺旋结构(图 6-b)。

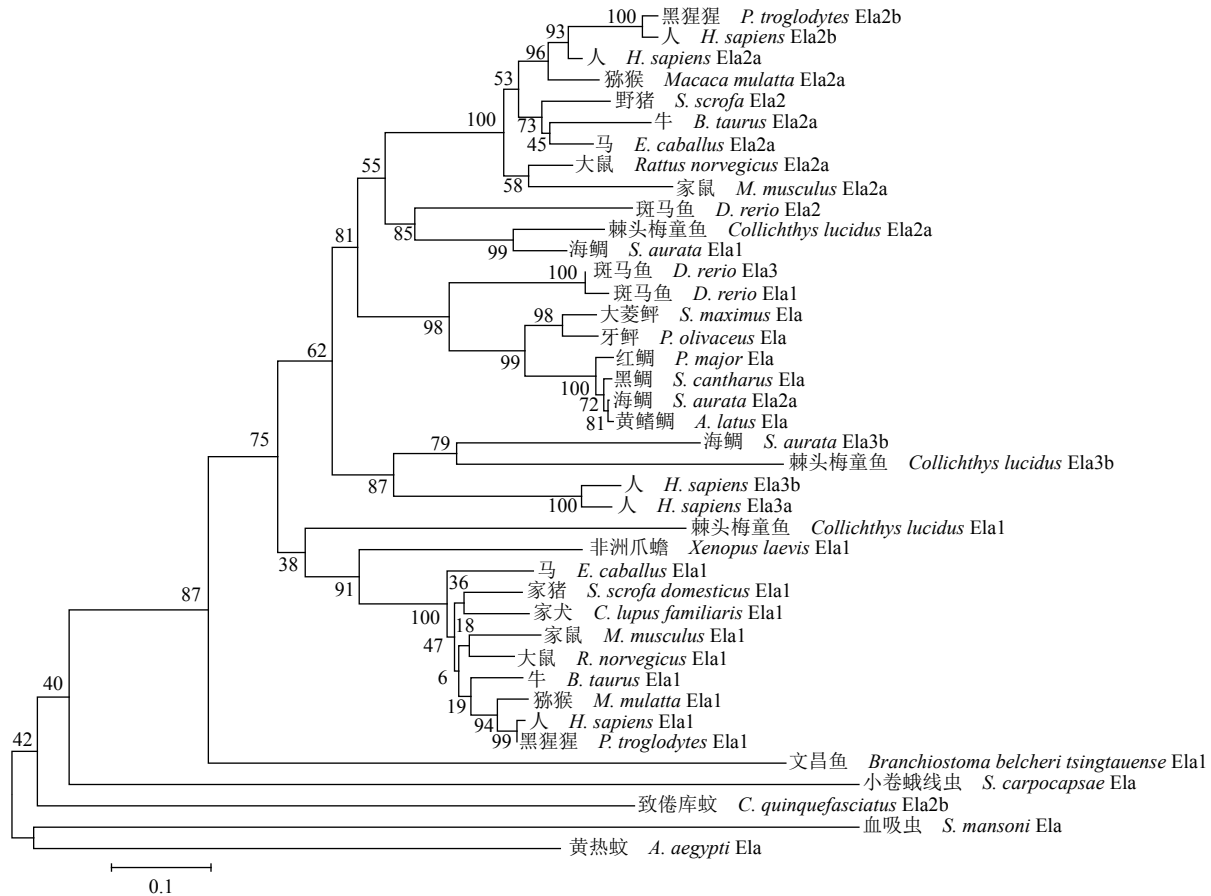


图 4 黄鳍鲷和其他物种 Ela 蛋白的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of elastases amino acid sequence from *A. latus* and other animals

蛋白质三级结构预测 通过在线的 Swiss-model 软件中的 Automated Mode 进行蛋白质的三级结构同源建模, 以猪胰弹性蛋白酶 (1bru.1.A) 为模板, 经 ExPASy structure assessment 程序测评推导的 AI Ela 蛋白序列的相似性达 59.34%。在第 29~269 位氨基酸建模, 模型覆盖度 90%, 蛋白模型的 GMQE 得分为 0.76。

3 讨论

本研究从黄鳍鲷肌肉中克隆得到一全长 948 bp 的 *AI Ela* 基因, 编码 269 个氨基酸残基 (图 2)。与脊椎动物的 Ela1、Ela2 和 Ela3 氨基酸序列进行比对, 发现 *AI Ela* 与海鲷、黑鲷、红鲷、大菱鲆和牙鲆 Ela2 同源性为 99.26%~84.76%, 而与 Ela1 和 Ela3 的同源性最高, 分别为 57.04% 和 53.53%, 表明 *AI Ela* 基因编码的蛋白质属于 Ela2 型 (图 3)。不同物种间的 Elas 具有一定的保守性, 都含有 Tryp-SPc 结构域、丝氨酸蛋白酶催化三

联体、10 个保守的半胱氨酸残基以及在 C 端含有 GDSGGPL 序列, 该结构特征预示 Ela 具有丝氨酸蛋白酶的催化功能^[25]。从物种进化上可知, 相比于无脊椎动物 (如小卷蛾线虫 Ela、致倦库蚊 Ela2b、血吸虫 Ela、黄热蚊 Ela), 脊椎动物 Elas 进化时间更晚, 特别是 Ela2 型, 如人 Ela2a、人 Ela2b、黑猩猩 Ela2b、野猪 Ela2 (图 4)。在脊椎动物中, *AI Ela* 与其他硬骨鱼 Ela2s 处于同一分支上, 也表明它们之间亲缘关系较近, 而与人、黑猩猩等灵长类动物以及猪和牛等家畜间的亲缘关系较远 (图 4)。本研究获得的 *AI Ela* 成熟蛋白推测分子量为 27.509 ku, 与从动物分离纯化的 Elas 蛋白分子量通常为 24~28 ku 相符, 如欧鲆 Elas 为 24 ku^[6]、大西洋鲑 Ela 为 27 ku^[26]、小鼠 Ela 为 25.9 ku^[27]、绵羊 Ela 为 25 ku^[4]。不同物种 Elas 的等电点相差较大, *AI Ela* 成熟蛋白的理论等电点为 6.05, 大西洋鲑 Ela1 pI 超过 9.3^[26], 欧鲆 Ela1 pI 为 6.17、Ela2 pI 为 8.48^[6]、大鼠 pI 为 5.6^[28]、绵羊 pI 为 9.3^[4], 表明不同物种 Ela 的空

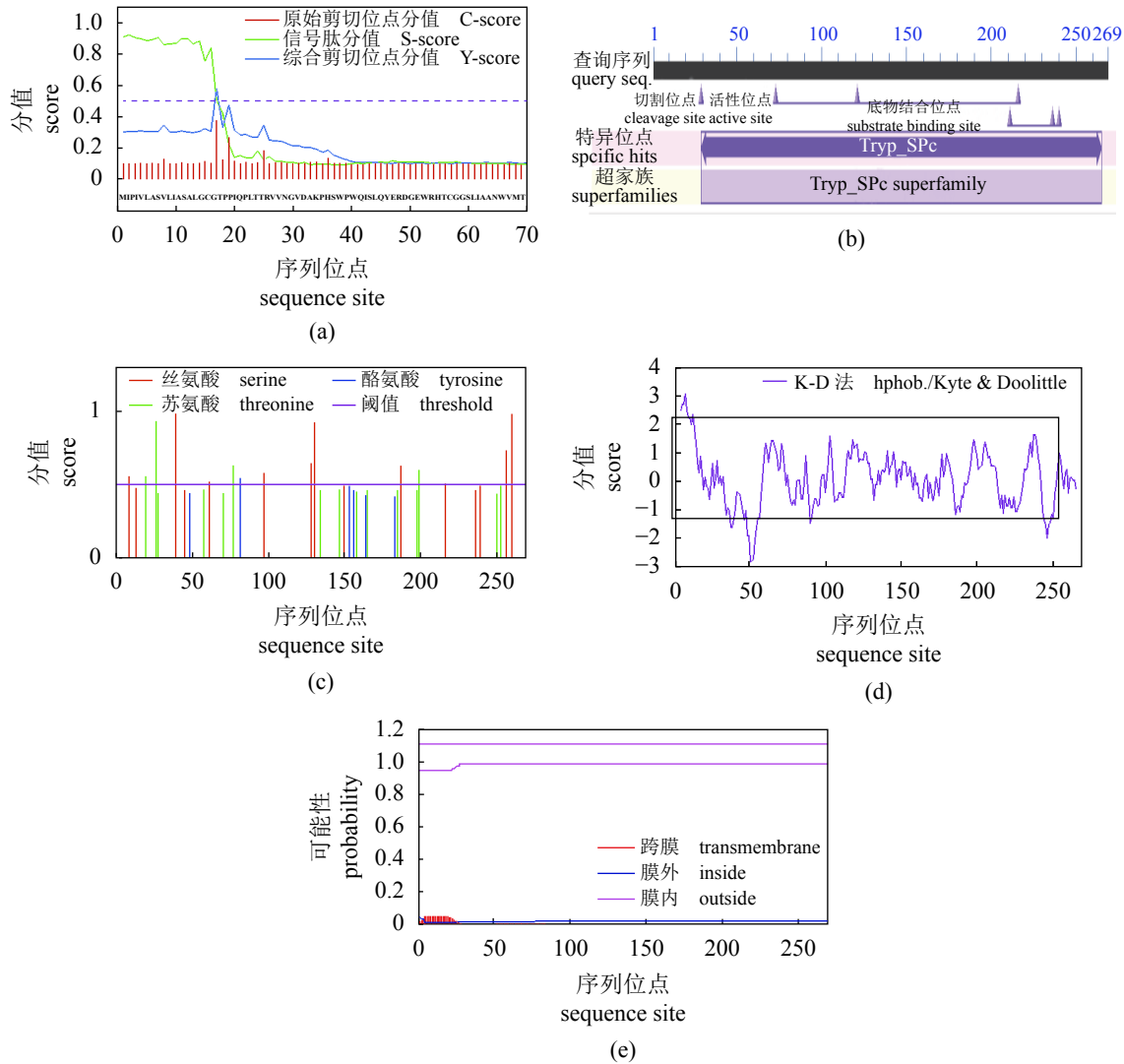


图 5 *Ela* 基因编码蛋白质的信号肽切割位点 (a)、保守结构域 (b)、磷酸化位点 (c)、亲水性/疏水性 (d) 和蛋白跨膜区 (e) 预测

Fig. 5 Predicted signal peptide cleavage site (a), conserved protein domains (b), phosphorylation sites (c), hydrophilicity/hydrophobicity (d) and protein transmembrane (e) of elastase from *A. latus*

间结构有明显差异。糖基化和磷酸化是蛋白质翻译后普遍存在的修饰方式, 影响蛋白质折叠的正确性及其构象的稳定性, 调节和控制蛋白质的活力和多种生理功能, 如信号转导、免疫应答、受体激活等。AIEla 没有 *N*-糖基化位点, 但有 3 个 *O*-糖基化位点以及 15 个磷酸化位点 (图 5-c)。

蛋白质氨基酸序列由氢键促进折叠形成二级结构, 并进一步折叠成其三级结构。常见的二级结构元件有 α -螺旋、 β -折叠 (延伸链)、 β -转角和无规则卷曲等。无规则卷曲 (50.56%) 和 β -折叠 (24.54%) 是 AIEla 蛋白质的主要结构元件, 表明它是一种混合型结构蛋白质 (图 6-a)。 α -螺旋

(17.84%) 和 β -转角 (7.06%) 相对较少, α -螺旋位于两端, 中间有若干的 β -折叠连接, 折叠成 AIEla 的 $\alpha+\beta$ 折叠空间结构^[29], 与 AIEla 蛋白的三级结构模型推测结果相一致 (图 7), 也与大西洋鳕消化道中鉴定的 4 种 Elases 都具有相似的结构特征相吻合^[30-31]。研究发现, Ela 与其他物质结合时, 三级结构中 α -螺旋和 β -折叠会发生明显变化^[32-33], 表明这两种二级结构对于它的空间结构有重要的作用。通常转录因子、膜蛋白、酶等蛋白质具有 2~7 条 α -螺旋链互相缠绕形成类似麻花状结构的卷曲螺旋, 使蛋白质执行分子识别、膜通道和代谢调控等生物学功能。AIEla 蛋白质不存在卷曲螺旋结构, 表明该蛋白不具备膜蛋白的

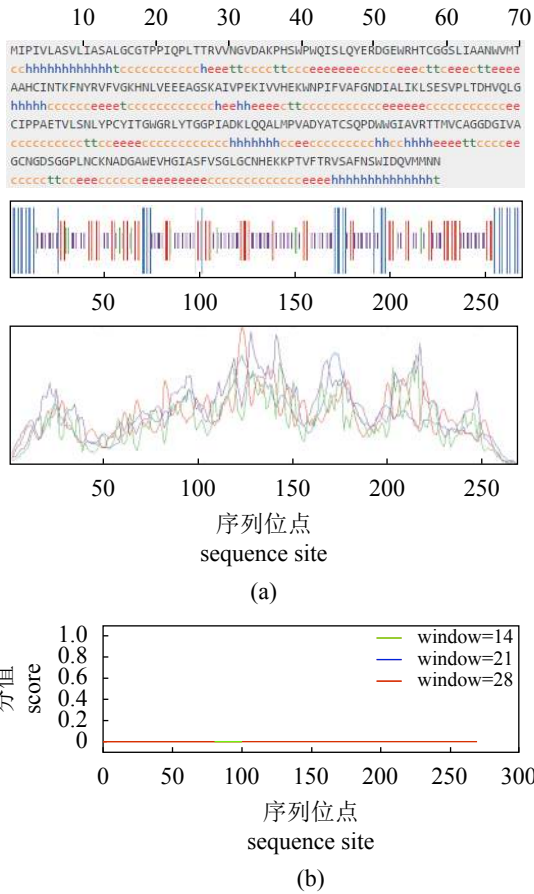


图 6 AIEla 的二级结构 (a) 和卷曲螺旋结构 (b) 预测

(a) 中上图和中图为预测二级结构分布和比例图, 下图为预测二级结构相似性峰图; 大写字母表示氨基酸, 小写字母表示二级结构。蓝色. α -螺旋; 绿色. β -转角; 红色. 延伸链; 橘色. 无规则卷曲

Fig. 6 Predicted secondary structure (a) and coiled coil structure (b) of elastase from *A. latus*

The distribution and proportion of predicted secondary structures were shown in upper and middle of (a), and the similarity peaks of predicted secondary structures were shown in bottom of (a). Capital letters indicate amino acids and lower case letters indicate secondary structures. Blue. α -helix; green. β -turn; red. extended chain; orange. irregular coil

结构特征, 这与该蛋白跨膜结构分析以及亚细胞定位分析的结果相一致 (图 6-b)。AIEla 蛋白质为膜外蛋白, 推测其主要在细胞外基质、质膜和内质网上发挥其生理功能 (图 5-e, 表 1)。除氢键外, 疏水相互作用是驱动蛋白质折叠的主要动力。AIEla 亲/疏水曲线表明其氨基酸大部分为亲水氨基酸 (图 5-d), 疏水氨基酸相对较少, 该结果与大西洋鳕 Ela 的研究结果相似^[31]。与哺乳动物 Ela 相比, 鱼类 Ela 平均疏水性氨基酸残基更少, 分子的疏水核心中存在较弱的相互作用, 可以更好地适应低温环境^[29, 31]。研究发现, 猪 Ela 更趋向水解在 P1 位有丙氨酸的合成底物; 而

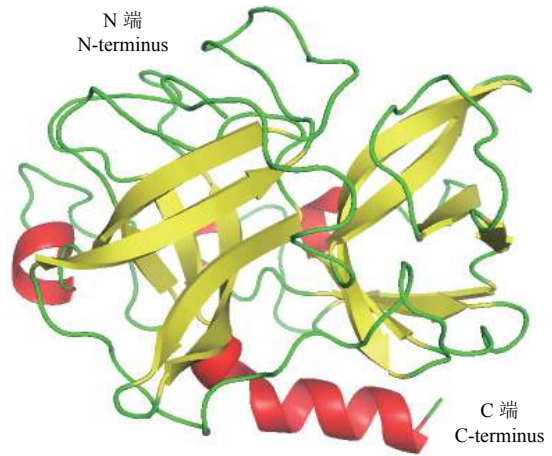


图 7 AIEla 的三级结构预测模型

红色. α -螺旋, 黄色. β -折叠, 绿色. 其他结构

Fig. 7 Predicted tertiary structure model of elastase from *A. latus*

Red. α -helix, yellow. β -fold, green. other structures

表 1 AIEla 亚细胞定位预测

Tab. 1 Predicted subcellular location of elastase from *A. latus*

位置 location	积分 integral
细胞核 nucleus	0.00
质膜 plasma membrane	2.93
细胞外基质 extracellular matrix	5.42
细胞质 cytoplasm	0.00
线粒体 mitochondria	0.00
内质网 endoplasmic reticulum	1.65
溶酶体 lysosome	0.00
高尔基体 Golgi body	0.00
液泡 vacuoles	0.00

鱼类 Ela 可以水解在 P1 位具有更大氨基酸残基的合成底物, 如大西洋鳕 Ela 结合口袋比猪 Ela 具有更多的支链的脂肪族氨基酸残基, 构成更大的结合口袋^[1]。AIEla 蛋白质含有相对少的疏水性氨基酸, 表明它也可能与其他鱼类一样, 较弱的疏水相互作用导致更松散的结构与底物结合。

4 结论

本研究从黄鳍鲷肌肉中克隆的 AIEla 基因全长 946 bp, 编码 269 个氨基酸残基。成熟的 AIEla

蛋白质分子质量为 27 509 u, 等电点为 6.05, 具有 3 个 O-糖基化和 15 个磷酸化的潜在位点。AIEla 蛋白是一种亲水性稳定膜外蛋白, 定位于细胞外基质, 发挥其丝氨酸蛋白酶水解活性。氨基酸序列同源性比对及系统进化树表明, 它属于 Ela2 型且与鲷和鲆的 Ela2 高度同源。AIEla 蛋白含有 α -螺旋、 β -转角、 β -折叠和无规则卷曲 4 种二级结构元件, 是一种混合结构的蛋白质。 α -螺旋和 β -折叠对于 AIEla 蛋白的空间构象有着重要的作用。

参考文献 (References):

- [1] Sočan J, Kazemi M, Isaksen G V, *et al.* Catalytic adaptation of psychrophilic elastase[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(20): 2984-2993.
- [2] Dau T, Gupta K, Berger I, *et al.* Sequential digestion with trypsin and elastase in cross-linking mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(7): 4472-4478.
- [3] Tóth A Z, Szabó A, Hegyi E, *et al.* Detection of human elastase isoforms by the ScheBo pancreatic elastase 1 test[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2017, 312(6): G606-G614.
- [4] Erlendsson L S, Filippusson H. Purification and characterization of ovine pancreatic elastase[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 120(3): 549-557.
- [5] Sadeghi-Kaji S, Shareghi B, Saboury A A, *et al.* Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction between spermidine and pancreatic elastase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 473-483.
- [6] Ulitina N N, Khablyuk V V, Proskuryakov M T. Purification and properties of serine proteinases from European catfish *Silurus glanis* L. pancreas[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2005, 41(2): 139-144.
- [7] Ásgeirsson B, Bjarnason J B. Properties of elastase from Atlantic cod a cold-adapted proteinase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1993, 1164(1): 91-100.
- [8] Suzuki T, Srivastava A S, Kurokawa T. cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(1): 63-70.
- [9] 朱丽敏, 吴泽阳, 张俊, 等. 黄鳍鲷细菌性溃疡病致病菌研究[J]. 湛江海洋大学学报, 1998, 18(2): 5-9.
- Zhu L M, Wu Z Y, Zhang J, *et al.* Study on the pathogenic bacteria of the muscle ulceration of *Sparus latus*[J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 1998, 18(2): 5-9(in Chinese).
- [10] Azadbakht F, Shirali S, Ronagh M T, *et al.* Assessment of gill pathological responses in yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*) under aeromonas *hydrophila* exposure[J]. *Archives of Razi Institute*, 2019, 74(1): 83-89.
- [11] Xiong X M, Chen Y L, Liu L F, *et al.* Estimation of genetic parameters for resistance to *Aeromonas hydrophila* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Aquaculture*, 2017, 479: 768-773.
- [12] Cascón A, Yugueros J, Temprano A, *et al.* A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(6): 3233-3241.
- [13] 刘胜军, 周静文, 杨代勤, 等. 名特水产养殖对象黄鳍免疫基因的研究现状[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(19): 131-133.
- Liu S J, Zhou J W, Yang D Q, *et al.* The study status of immune genes in *Monopterus albus*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(19): 131-133(in Chinese).
- [14] Nielsen H. Predicting secretory proteins with SignalP[M]/Kihara D. Protein function prediction. New York: Humana Press, 2017: 59-73, doi: 10.1007/978-1-4939-7015-5_6.
- [15] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L Y, *et al.* CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D200-D203.
- [16] Seyedjavadi S S, Khani S, Zare-Zardini H, *et al.* Isolation, functional characterization, and biological properties of MCh-AMP1, a novel antifungal peptide from *Matricaria chamomilla* L.[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2019, 93(5): 949-959.
- [17] Sharma V, Srinivasan A, Roychoudhury A, *et al.* Characterization of protein extracts from different types of human teeth and insight in biomineralization[J]. *Sci-*

- entific Reports, 2019, 9(1): 9314.
- [18] Fan Z B, Zhang H F, Rong M, *et al.* Molecular cloning and bioinformatics analysis of *DQA* gene from mink (*Neovison vison*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(5): 1037.
- [19] Almeida J M, Martini V P, Iulek J, *et al.* Biochemical characterization and application of a new lipase and its cognate foldase obtained from a metagenomic library derived from fat-contaminated soil[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137: 442-454.
- [20] Fan H Y, Wang L Y, Wen H S, *et al.* Genome-wide identification and characterization of toll-like receptor genes in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and their involvement in the host immune response to *Vibrio harveyi* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 782-791.
- [21] Kim T S, Zhang L, Il Ahn J I, *et al.* Molecular architecture of a cylindrical self-assembly at human centrosomes[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1151.
- [22] Kashani-Amin E, Tabatabaei-Malazy O, Sakhteman A, *et al.* A systematic review on popularity, application and characteristics of protein secondary structure prediction tools[J]. *Current Drug Discovery Technologies*, 2019, 16(2): 159-172.
- [23] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [24] Yao Y F, Shi L, Yu J K, *et al.* Distribution of killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and combinations of their human leucocyte antigen ligands in 11 ethnic populations in China[J]. *Cells*, 2019, 8(7): 711.
- [25] Sun T H, Zhang S C, Ji G D. Identification and expression of an elastase homologue in *Branchiostoma belcheri* with implications to the origin of vertebrate pancreas[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(7): 3303-3309.
- [26] Berglund G I, Smalås A O, Outzen H, *et al.* Purification and characterization of pancreatic elastase from North Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, 7(2): 105-114.
- [27] Nadarajah D, Atkinson M A L, Huebner P, *et al.* Enzyme kinetics and characterization of mouse pancreatic elastase[J]. *Connective Tissue Research*, 2008, 49(6): 409-415.
- [28] Szilagyi C M, Sarfati P, Pradayrol L, *et al.* Purification, characterization and substrate specificity of rat pancreatic elastase II[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1995, 1251(1): 55-65.
- [29] Jayaraman G, Srimathi S, Bjarnason J B. Conformation and stability of elastase from Atlantic cod, *Gadus morhua*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2006, 1760(1): 47-54.
- [30] Gudmundsdóttir E, Spilliaert R, Yang Q, *et al.* Isolation and characterization of two cDNAs from atlantic cod encoding two distinct psychrophilic elastases[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 113(4): 795-801.
- [31] Ásgeirsson B, Leth-Larsen R, Þórólfsson M., *et al.* The third serine proteinase with chymotrypsin specificity isolated from Atlantic cod (*Gadus morhua*) is a type-II elastase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 255(3): 638-646.
- [32] Sadeghi-Kaji S, Shareghi B, Saboury A A, *et al.* Investigation on the structure and function of porcine pancreatic elastase (PPE) under the influence of putrescine: a spectroscopy and molecular simulation study[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 289: 111115.
- [33] Brás N F, Gonçalves R, Fernandes P A, *et al.* Understanding the binding of procyanidins to pancreatic elastase by experimental and computational methods[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(25): 5097-5108.

Cloning and bioinformatic analysis of elastase gene from skeletal muscle of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*)

ZHONG Chan¹, WU Guoping^{1*}, SHU Mei¹, SUN Lechang², CAO Minjie²

(1. College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Researches show that elastase (Ela) is involved in regulation of bacterial ulcer caused by *Aeromonas hydrophila*, and plays an important role in control of immune diseases during fish culture. The full-length cDNA sequence of elastase gene was cloned from *Acanthopagrus latus* based on the reported sequencing data of other vertebrates by using RT-PCR and RACE, which was further analyzed by bioinformatics analysis. The cloned *AIEl*a gene was 946 bp, containing a 807 bp open reading frame which encoded 269 amino acids. *AIEl*a protein was a hydrophilic stable extracellular protein containing a signal peptide with 16 amino acid residues, which might be located in extracellular matrix. Furthermore, *AIEl*a protein has 3 predicted *O*-glycosylation sites and 15 predicted phosphorylation sites. The theoretical molecular weight of mature protein was 27 509 u and its isoelectric point was 6.05. The analysis of amino acid sequence homology showed that it has high similarity with *Sparus aurata*, *Spondylisoma cantharus*, *Pagrus major*, *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus* (84.76%-99.26%). They were also in the same branch in phylogenetic tree, indicating that they are the close relatives. Moreover, *AIEl*a has the conserved structures of *Elas*, including conserved region Tryp-SPc superfamily, catalytic triad of serine proteinase active site, conserved cysteine residues and the sequence of "GDSGGPL" in C-terminal, which revealed that *AIEl*a might show serine proteinase catalytic activity. In the secondary structure of *AIEl*a protein, the proportion of alpha helix, beta turn, extended strand and random coil was 17.84%, 7.06%, 24.54% and 50.56%, respectively. The result of predicted tertiary structure of *AIEl*a indicated that alpha helix and extended strand might play an important role in its conformation structure. In the present study, *AIEl*a gene was successfully cloned from *Acanthopagrus latus* and we analyzed its bioinformatics, providing theoretical basis for further elucidation of mechanism of regulation of fish immune diseases by *AIEl*a protein.

Key words: *Acanthopagrus latus*; elastase; gene cloning; bioinformatic analysis

Corresponding author: WU Guoping. E-mail: jdwgp@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31701676, 31760483); Jiangxi Provincial Department of Science and Technology (20192BAB214026); Education Department of Jiangxi Province (GJJ180173)