

# 斑鳅(*Siniperca scherzeri*)胃蛋白酶原 A、 胃质子泵基因的克隆与组织表达分析\*

邓燕飞<sup>1,2</sup> 薛洋<sup>1</sup> 赵金良<sup>1</sup> 钱叶周<sup>3</sup> 吴超<sup>3</sup> 钱德<sup>3</sup>

(1. 农业部淡水水产种质资源重点实验室 上海海洋大学 上海 201306; 2. 江苏省淡水水产研究所 南京 210017; 3. 安徽省池州市特种水产研究所 池州 247100)

**提要** 利用 RACE 技术获得了斑鳅胃蛋白酶原 A(PG A1、PG A2)、胃质子泵  $\alpha$  和  $\beta$  亚基 cDNA 序列。结果表明, PG A1、PG A2 cDNA 序列全长分别为 1361bp、1348bp, 其编码的前肽中均包含信号肽、激活肽和胃蛋白酶 3 个部分, 成熟肽中含有 2 个天冬氨酸残基和 6 个半胱氨酸残基。PG A1 与 PG A2 在氨基酸序列组成、理化性质、功能位点、空间结构上存在明显差异, 暗示它们可能具有不同的生理功能。PG A1、PG A2 的 DNA 序列均由 9 个外显子和 8 个内含子组成。胃质子泵  $\alpha$  和  $\beta$  亚基 cDNA 全长序列分别为 3531bp、1742bp,  $\alpha$  亚基具有高度保守性, 而  $\beta$  亚基具有相对变异性。斑鳅成体组织中 PG A1、PG A2 和胃质子泵  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基的 RT-PCR 检测显示, 它们均一致在食道和胃中大量表达, 推测 PG A1、PG A2 与胃质子泵间的表达关系可能存在一定的协同性。

**关键词** 斑鳅; 胃蛋白酶原 A; 胃质子泵; 序列特征; 组织表达

**中图分类号** Q346

胃蛋白酶原(Pepsinogen, PG)是由胃腺分泌的无活性的胃蛋白酶(Pepsin, EC 34.2.3.1-4)前体, 在胃酸的作用下, PG 自动催化成有活性的胃蛋白酶, 在胃内完成对食物蛋白质的初步消化(Kageyama, 2002)。现有研究表明, 鱼类中仅发现 PG A 和 PG C 两种类型, 且 PG A 同工酶原也广泛存在, 如美洲黄盖鲈 *Pleuronectes americanus* (Gawlicka *et al*, 2001)、大西洋庸鲈 *Hippoglossus hippoglossus* (Murray *et al*, 2006)、伯氏豚鲷虎鱼 *Trematomus bernacchii* (Brier *et al*, 2007)、斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* (Feng *et al*, 2008a)、太平洋蓝鳍金枪鱼 *Thunnus orientalis* (Tanji *et al*, 2009)、鳊 *Siniperca chuatsi* (薛洋等, 2011)等中均发现存在 2 种 PG A 亚型(PG A1, PG A2)。多种 PG 类型的存在反映了鱼类不同发育时期对不同食物的消化生理适应需要(Kageyama, 2002)。

胃质子泵(gastric proton pump), 又称胃  $H^+/K^+$ -ATP

酶(Gastric  $H^+/K^+$ -ATPase), 是胃酸分泌的关键酶(彭国林, 2005)。大多数鱼类 PG 与胃质子泵虽由同一种细胞——泌酸酶原细胞(oxynticopeptic cell)分泌, 但它们之间的明确表达关系尚不清楚(Reifel *et al*, 1985)。有研究报道棕鲷 *Ictalurus nebulosus* (Smit, 1967)、牙鲆 *Merlangus merlangus* (Mazlan *et al*, 2004)、半带波唇鲨 *Triakis semifasciata* (Papastamatiou, 2007)中均未发现 PG 与胃酸分泌间有耦联关系。而另一些研究则发现美洲黄盖鲈 PG b 与胃质子泵在孵化后 20d 同时表达(Douglas *et al*, 1999; Gawlicka *et al*, 2001), 赤鲷 PG 和胃质子泵在孵化后 30d 同时表达(Darias *et al*, 2005)。PG 与胃质子泵表达分泌间是否耦联, 可能反映出它们在调控机制上是否存在关联性。

斑鳅(*Siniperca scherzeri*)是典型的淡水肉食性鱼类, 因其肉质鲜美, 易驯食、适应能力强, 成为近年来鳊鱼养殖的新对象。为深入了解肉食性鱼类消化生

\* 上海市科委基础研究重点项目, 09JC1406900 号; 上海市重点学科建设项目, Y1101 号; 上海海洋大学博士启动基金, 07274 号。邓燕飞, E-mail: yf-deng@163.com

通讯作者: 赵金良, 博士, 教授, E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

收稿日期: 2011-12-05, 收修改稿日期: 2012-02-12

理的分子基础,我们以斑鳊为研究对象,从直接参与消化作用的消化酶研究入手,前期克隆获得了 PG C 及其 5'侧翼调控区序列,并分析了 PG C 的组织表达特征(邓燕飞等,2009;Deng *et al.*,2011)。本研究继续克隆了 2 种斑鳊 PG A (PG A1、PG A2) cDNA 及胃质子泵的 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基 cDNA 序列,并对它们的序列结构与组织表达特征进行了研究,为进一步研究不同类型 PG 的功能特化、PG 和质子泵间的发育表达关系提供分子基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

斑鳊(*Siniperca scherzeri*)成鱼取自安徽省池州市特种水产研究所。活体解剖,取鳃、食道、胃粘膜、幽门垂、前肠、后肠、肝胰脏、脾、肾、心脏、皮肤、肌肉、卵巢、精巢,液氮速冻,于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

总 RNA 抽提试剂 RNAiso Plus、RT-PCR 试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0、pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司,BD SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 购于 Clontech 公司,普通琼脂糖 DNA 回收试剂盒、大肠杆菌感受态 DH5 购自天根生化科技有限公司,其它生化试剂购自上海生工生物工程服务有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA、总 RNA 的提取与 cDNA 合成** 取胃粘膜,按酚/氯仿法提取基因组 DNA。成体各组织液氮研磨后,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,琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测,各组织 RNA 浓度调至 $500\text{ng}/\mu\text{L}$ ,按照 AMV 反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA, $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

**1.2.2 cDNA、DNA 序列的克隆** 通过比对分析 GenBank 数据库中的相关序列,分别设计引物 A1F 和 A1R、A2F 和 A2R、 $\alpha$ F 和  $\alpha$ R,以胃粘膜 cDNA 为模板,分别扩增 PG A1、PG A2 和质子泵 $\alpha$ 亚基的部分 cDNA 序列。根据测序结果,再设计用于 PG A1、PG A2、质子泵 $\alpha$ 亚基的 3' RACE 和 5' RACE 扩增的特异性引物,按照 RACE 试剂盒说明书进行扩增;设计特异性引物 $\beta$ (3')用于质子泵 $\beta$ 亚基 3' RACE 扩增,根据 3' RACE 测序结果设计引物 $\beta$ (5')扩增 5' RACE。分别在 PG A1、PG A2 两端非翻译区(UTR)设计一对引物,以胃 DNA 为模板,扩增其相应的 DNA 序列。引物序列与退火温度见表 1,扩增产物经纯化、克隆后,由

上海生工生物工程服务有限公司测序。

**1.2.3 核苷酸和氨基酸序列分析** 应用 Blastx 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行蛋白质相似度搜索;使用 SeqMan 程序进行序列比对、拼接;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;Spidey 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey>)分析内含子与外显子;SignalP 3.0 server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽;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;以 PDB 数据库(<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>)中猪胃蛋白酶 A(PDB 登录号:2PSG)的晶体结构为模板,通过 Swiss-Model 程序(<http://swissmodel.expasy.org/>)同源建模构建了斑鳊胃蛋白酶 A1、A2 的三维结构模型;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度分析;MEGA 4.1 软件构建 NJ 系统关系树,进行 1000 次自举。

**1.2.4 PG 与质子泵组织表达分析** 通过比对的 cDNA 和 DNA 序列,分别设计跨 PG A1、PG A2 内含子的特异性引物 A1RTF 和 A1RTR、A2RTF 和 A2RTR,设计跨 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基的特异性引物 $\alpha$ RTF 和  $\alpha$ RTR、 $\beta$ RTF 和 RTR,同时,设计内参基因 $\beta$ -actin 的特异性引物 actin RTF 和 actin RTR。采用 RT-PCR 检测鳃、食道、胃粘膜、幽门垂、前肠、后肠、肝胰脏、脾、肾、心脏、皮肤、肌肉、卵巢、精巢各组织中 PG A1、PG A2、质子泵 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基 mRNA 的表达情况。扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染后拍照。

## 2 结果

### 2.1 斑鳊 PG A 序列、结构和系统分析

扩增产物经纯化、克隆、测序和拼接后分别得到全长 1361bp、1348bp 的斑鳊 PG A1、PG A2 cDNA 序列(GenBank 登录号分别为 EU807926、EU807927),长度为 3196bp、2893bp 的斑鳊 PG A1、PG A2 DNA 序列(GenBank 登录号分别为 EU807931、FJ463154)。比对 cDNA 和 DNA 序列,发现斑鳊 PG A1、PG A2 基因均由 9 个外显子和 8 个内含子组成,内含子剪切位点均符合 GT-AG 原则。PG A1 cDNA 全长序列包括 42bp 的 5' UTR、182bp 的 3' UTR 和 1137bp 的开放阅读

表 1 引物序列与退火温度  
Tab.1 Nucleotide sequences and annealing temperature of oligonucleotide primers

引物	核苷酸序列(5' 3')	退火温度(°C)	引物用途	
A1F	TAYGGBACTGGSAGCATG	53.0	部分 cDNA 序列扩增(下同)	
A1R	TTGATGGTAAACRGTGTTCA	53.0		
A2F	CTCGTGGCTTTCGCTGAATGCT	60.5		
A2R	ACGGAGAACAGGGGTTGAGACA	60.5		
$\alpha$ F	ARGGCAGYGARACAGTGGARG	53.0		
$\alpha$ R	GTTYTTGGTCAGTGTASGC	53.0		
A1(3')	ACGCTGTCTGCTTCTGGCGGACA	68.0	3' RACE、5' RACE 扩增(下同)	
A1(5')	GTGTCAACGATAGCCTGGCAACCACCGC	68.0		
A2(3')	TACAACCCAATGGCCAAGTTCCTCC	68.0		
A2(5')	CCGTACTGGATGGACAGAGGCTGGTTGC	68.0		
$\alpha$ (3')	ATGAGCAGTGACGAGTTAGATGATG	68.0		
$\alpha$ (5')	CGGCGTTCTTGGCAGCATCTGACCCC	68.0		
$\beta$ (3')	GTGTCATCATCAAGATGAACAGG	68.0		
$\beta$ (5')	GCTGAACCGAACAGCCACCAATGGG	68.0		
A1FG	CAGAGCCGAGACAATGAA	52.0		DNA 序列扩增(下同)
A1RG	TGTAAAGTGGGTAAGGTGA	52.0		
A2FG	GACACGATGAAGTGGCTCGC	58.0		
A2RG	ACAGGGGTCTTATTGATTACGC	58.0		RT-PCR 检测(下同)
A1RTF	ATGGCCAAGTTTACGAGCG	58.0		
A1RTR	TTGGATTGTGAGAGGACTGC	58.0		
A2RTF	ACCACCTTCAAATGGGGCAAC	58.0		
A2RTR	AAGACAGGCACGACATTATCAG	58.0		
$\alpha$ RTF	GAGTCCAGTGGTGGTTTGTTCCT	60.0		
$\alpha$ RTR	GGTGAATTGGGTAAGGTCCTCTG	60.0		
$\beta$ RTF	TACTGGAAGGACAGGACAATG	60.0		
$\beta$ RTR	GGGTCGTGGAAGTTTTCATAG	60.0		
actin RTF	ATCGCCGCACTGGTTGTTGAC	58.0		
actin RTR	CCTGTTGGCTTTGGGGTTC	58.0		

读框(ORF), 共编码 378 个氨基酸。其 N 端前 16 个氨基酸为信号肽, 第 17—57 个氨基酸为激活肽, 其余 321 个氨基酸为胃蛋白酶 A1(图 1)。胃蛋白酶 A1 的相对分子量为 34344Da, 碱性与酸性氨基酸残基之比为 17/20, 等电点(pI)为 4.89。PG A2 cDNA 全长序列包括 32bp 的 5' UTR、185bp 的 3' UTR 和 1131bp 的 ORF, 共编码 376 个氨基酸。其 N 端前 16 个氨基酸为信号肽, 第 17—57 个氨基酸为激活肽, 其余 319 个氨基酸为胃蛋白酶 A2(图 1)。胃蛋白酶 A2 相对分子量为 34212Da, 碱性与酸性氨基酸残基之比为 11/23, 等电点(pI)为 4.16。斑鳅 PG A1、PG A2 序列中均含有 2 个保守的天冬氨酸残基活性位点和形成 3 个二硫键的 6 个半胱氨酸残基。与其它脊椎动物相比, 鱼类 PG A 激活肽存在 3—5 个氨基酸缺失, 同时, 在胃蛋

白酶第 294—298 位也存在 4—5 个氨基酸的缺失(图 1)。

通过叠加比较胃蛋白酶 A1、A2 氨基酸序列三维结构模型的碳骨架, 发现斑鳅胃蛋白酶 A1 与 A2 的总体碳移位均方根(RMS)为 0.31Å, 局部差异较大的区域有 3 个。

序列相似度分析表明, 斑鳅 PG A1 与其它鱼类 PG A 的氨基酸序列相似度在 77.8%—94.2%之间, 与两栖类、鸟类以及哺乳类的相似度在 68.8%—74.4%之间; 斑鳅 PG A2 与其它鱼类 PG A 的氨基酸序列相似度在 77.9%—95.5%之间, 与两栖类、鸟类以及哺乳类的相似度则在 68.5%—72.5%之间。斑鳅 PG A1 与 PG A2 的序列相似度为 80.2%。脊椎动物 PG 氨基酸序列的系统关系树表明, PG 分为 PG A 与 PG C 两大分支, PG A 又分两个小支, 斑鳅 PG A1、PG A2 分属



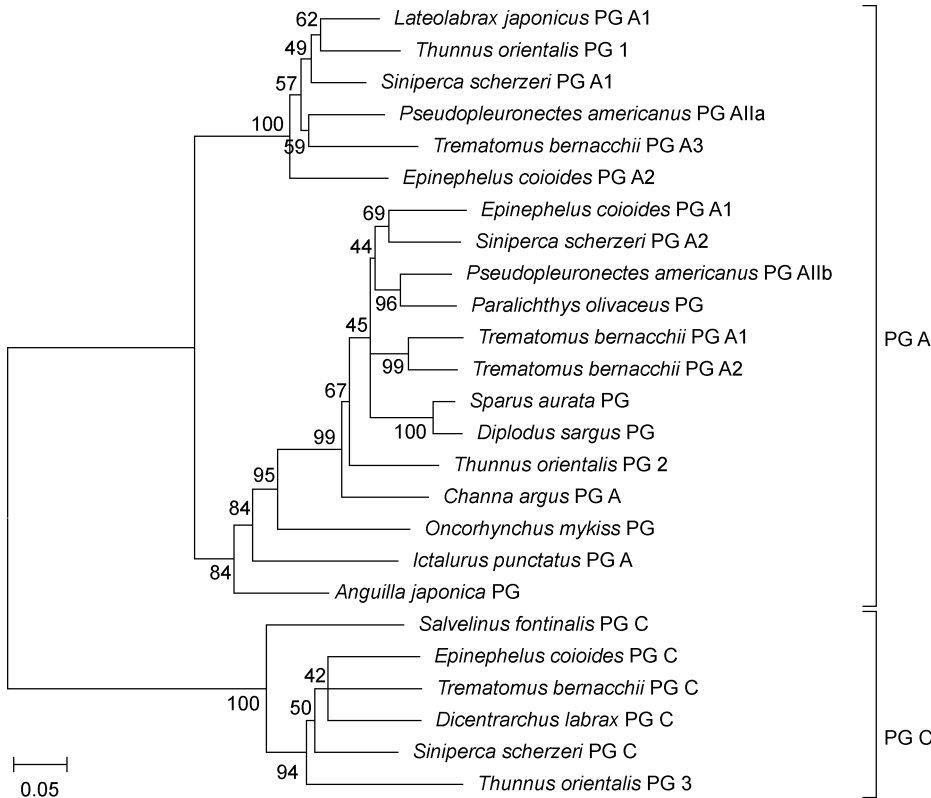


图3 鱼类胃蛋白酶原系统关系树

Fig.3 Phylogenetic tree of fish pepsinogen

注: GenBank 序列号: *Lateolabrax japonicus* PG A1, ADK74002; *Thunnus orientalis* PG A1, BAG48263; *Siniperca scherzeri* PG A1, ACF18588; *Pseudopleuronectes americanus* PG AIIa, AAD56283; *Trematomus bernacchii* PG A3, CAD80097; *Epinephelus coioides* PG A2, ABY87035; *Epinephelus coioides* PG A1, ABY87034; *Siniperca scherzeri* PG A2, ACF18589; *Pseudopleuronectes americanus* PG AIIb, AAD56284; *Paralichthys olivaceus* PG, BAC87742; *Trematomus bernacchii* PG A1, CAD80095 A1; *Trematomus bernacchii* PG A2, CAD80096 A2; *Sparus aurata* PG, ABX89618; *Diplodus sargus* PG, ABX89619; *Thunnus orientalis* PG A2, BAG48264; *Channa argus* PG A, ACT7564; *Oncorhynchus mykiss* PG, NP\_001153947; *Ictalurus punctatus* PG A, ADO29339; *Anguilla japonica* PG, BAI52799; *Salvelinus fontinalis* PG C, AAG47643; *Epinephelus coioides* PG C, ABX44849; *Trematomus bernacchii* PG C, CAD80098; *Dicentrarchus labrax* PG C, ABS76468; *Siniperca scherzeri* PG C, ACF18590; *Thunnus orientalis* PG 3, BAG48265

哺乳类的相似度在 89.7%—93.2%之间, 说明 $\alpha$ 亚基在进化过程中比较保守。 $\beta$ 亚基与其它鱼类的序列相似度在 89.1%—92.1%之间, 与两栖类、鸟类和哺乳类的相似度在 59.4%—67.7%之间, 相对变异较大。脊椎动物胃质子泵 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基氨基酸序列系统发育树表明(图 4), 哺乳类、鸟类、两栖类、鱼类分别聚支, 支持传统分类关系。

### 2.3 PG A 与质子泵 mRNA 的组织表达特征

RT-PCR 结果表明, 斑鳕 PG A1 在食道、胃中大量表达, 心脏、皮肤和精巢中也有表达; PG A2 主要在食道、胃中表达, 心脏、皮肤、卵巢和精巢中也有表达。胃质子泵  $\alpha$ 亚基除在肝胰脏和肌肉中未检测到

表达外, 其它组织中均有表达, 尤其是食道和胃;  $\beta$ 亚基在食道、胃中表达较强, 卵巢和精巢中表达较弱(图 5)。

## 3 讨论

### 3.1 PG A 序列结构分析

对狼鲈 *Dicentrarchus labrax* (Temva *et al*, 2007)、斜带石斑鱼(Feng *et al*, 2008a, b)、斑鳕(Deng *et al*, 2011)和本研究中的 PG 基因结构分析表明, 鱼类 PG 基因结构与其它脊椎动物一样, 均由 9 个外显子和 8 个内含子组成, 且鱼类 PG 基因中内含子的剪切位点在不同物种之间也十分保守 (Takahashi, 1992), 表现出天冬氨酸蛋白酶家族基因结构的共同特征(Kageyama, 2002)。斑鳕 PG A1、PG A2 前肽均包括信号肽、激活肽和胃蛋白酶 3 个部分, 胃蛋白酶部分含催化基团所必需的 2 个天冬氨酸残基活性位点以及构成 3 个二硫键的 6 个半胱氨酸残基, 且它们的氨基酸序列位置也非常保守(Kageyama, 2002)。

与 PG C 为单基因不同 (Pals *et al*, 1989), PG A 普遍存在多种同工酶原形式, 它们分别由不同的基因编码或由相同转录本经不同剪接加工而来(Evers *et al*, 1989; Kageyama, 2002)。本研究发现, 斑鳕 PG A1 与 PG A2 在基因组序列、氨基酸组成与结构上均存在明显差异。尽管内含子在 DNA 序列上的剪切位点十分保守, 但 PG A1、PG A2 基因组序列中内含子的长度和碱基组成存在较大差异, 说明斑鳕 PG A1 和 PG A2 分别是由不同基因编码的。胃蛋白酶 A1、A2 分别由 321 和 319 个氨基酸组成, 序列相似度为 80.2%, 胃蛋白酶 A1 的碱性/酸性氨基酸残基之比(17/20)大于胃蛋白酶 A2(11/23), 胃蛋白酶 A1 的等电点(pI=4.89)大于胃蛋白酶 A2 (pI=4.16)。胃蛋白酶 A1、A2 在底物结合位点(S1'、S2'、S3')上存

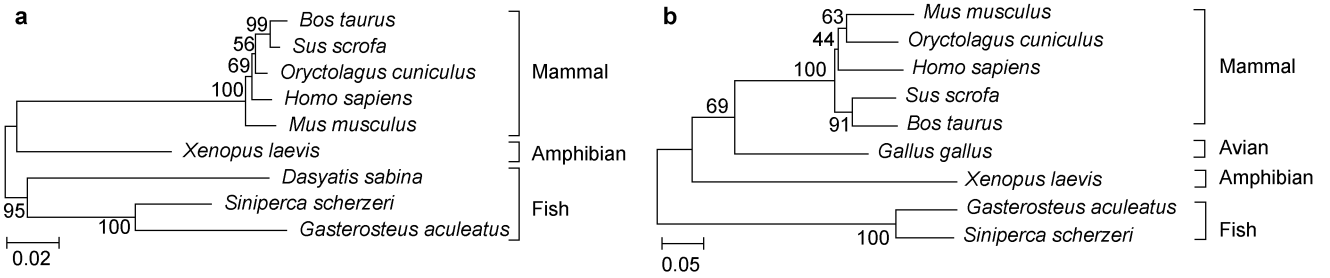


图 4 脊椎动物胃质子泵  $\alpha$ 亚基(A)、 $\beta$ 亚基(B)系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of vertebrate gastric proton  $\alpha$  subunit (A) and  $\beta$  subunit (B)

注: 亚基序列登录号: 牛(*Bos taurus*), NP\_001137561; 猪(*Sus scrofa*), P19156; 兔(*Oryctolagus cuniculus*), NP\_001095171; 人(*Homo sapiens*), NP\_000695; 鼠(*Mus musculus*), Q64436; 爪蟾(*Xenopus laevis*), NP\_001084343; 大西洋鲑(*Dasyatis sabina*), AP35241; 三刺鱼(*Gasteosteus aculeatus*), ENSGACP00000011775; 斑鳊(*Siniperca scherzeri*), ACT35619。 亚基序列登录号: 鼠(*Mus musculus*), P50992, 兔(*Oryctolagus cuniculus*), NP\_001075758; 人(*Homo sapiens*), P51164; 猪(*Sus scrofa*), P18434; 牛(*Bos taurus*), XP\_869846; 鸡(*Gallus gallus*), AAA19790; 爪蟾(*Xenopus laevis*), AAB97472; 三刺鱼(*Gasteosteus aculeatus*), ENSGACP00000020219; 斑鳊(*Siniperca scherzeri*), ACQ90249

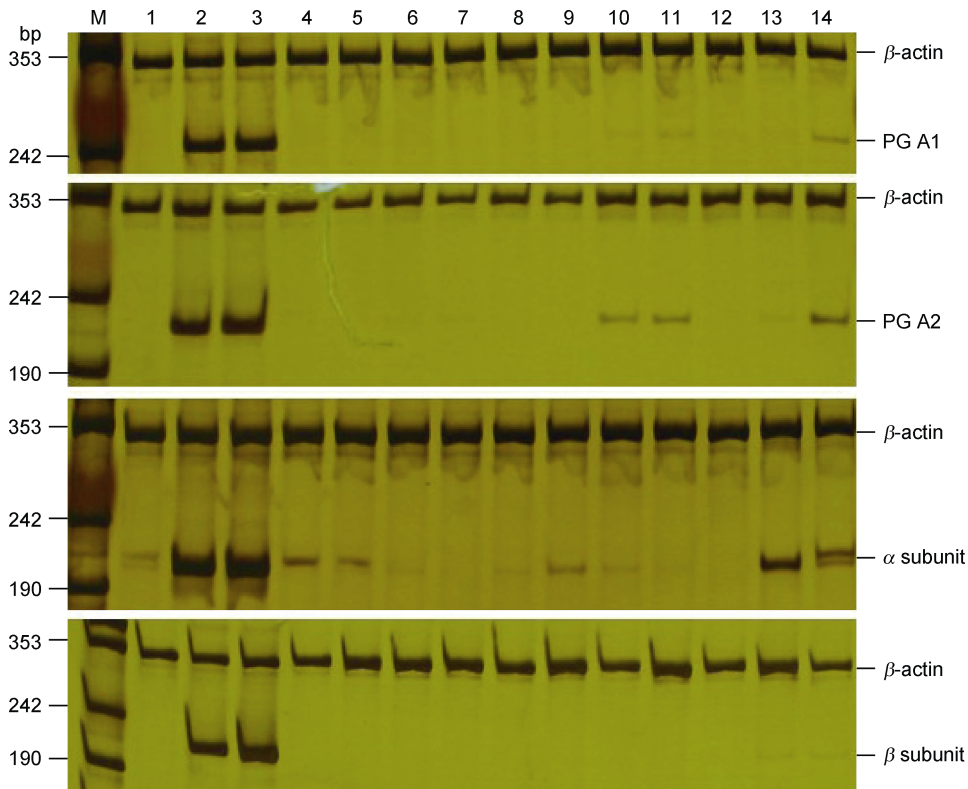


图 5 斑鳊 PG A1、PG A2 和胃质子泵  $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基组织表达

Fig.5 Expression of PG A1, PG A2 and gastric proton pump  $\alpha$  and  $\beta$  subunits mRNA in adult tissues of *S. scherzeri*

注: 1: 鳃; 2: 食道; 3: 胃; 4: 幽门垂; 5: 前肠; 6: 后肠; 7: 肝胰脏; 8: 肾; 9: 脾; 10: 心脏; 11: 皮肤; 12: 肌肉; 13: 卵巢; 14: 精巢; M: pUC 18 DNA/MspI 分子量标记

在 5 个氨基酸的差异, 2 个位于 S1' 亚位点, 1 个位于 S2'亚位点, 2 个位于 S3'亚位点。胃蛋白酶 A1 和 A2 在 3-D 结构上存在 3 个差异较大的区域, 其中 2 个靠近底物结合位点(S2'、S1')。氨基酸组成与结构差异可能引起斑鳊胃蛋白酶 A1、A2 在底物结合特异性、

催化活性功能等方面产生差异。

### 3.2 胃质子泵序列特征

斑鳊胃质子泵  $\alpha$ 亚基 N 端第 20—27 位(KKKK MKKK)肽段具有脊椎动物胃质子泵  $\alpha$ 亚基赖氨酸/甘氨酸结构簇的典型结构(Maeda *et al*, 1988), 第 373—

379位(DKTGTLT)肽段是第4和第5跨膜区之间的E1-E2型ATP酶磷酸化位点(Maeda, 1994), 通过该磷酸化位点的磷酸化和去磷酸化、E1与E2型构象互转完成胃酸的分泌(Bindu *et al*, 2004)。斑鳕胃质子泵 $\beta$ 亚基上的N-糖基化位点也具有脊椎动物共同的特征序列Asn-X-Ser/Thr, 研究表明, 兔胃质子泵 $\beta$ 亚基上N-糖基链可调控 $H^+/K^+$ -ATPase酶的装配与活性(Asano *et al*, 2000)。

与其它脊椎动物比对结果表明, 斑鳕胃质子泵 $\alpha$ 亚基的相似度高于 $\beta$ 亚基的相似度, 说明胃质子泵 $\alpha$ 亚基在进化上较 $\beta$ 亚基更为保守。这可能与 $\alpha$ 亚基是整个离子转运的关键部位, 含有ATP结合位点、酰基磷酸化位点、离子识别位点等功能位点, 为正常行使酶功能所必需(Shull *et al*, 1986; Asano *et al*, 1996), 而 $\beta$ 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, 故而序列变异性相对较大(Tyagarajan *et al*, 1995)。

### 3.3 PGA与胃质子泵的组织表达特征

本研究中, 斑鳕PG A1、PG A2的组织表达特征基本一致, 在食道和胃中大量表达, 同时, 在心脏、皮肤、精巢等组织中也有表达。PG A1、PG A2在胃中大量表达, 表明它们的主要生理功能是参与食物蛋白的消化作用。PG A1、PG A2在食道中大量表达的现象与斜带石斑鱼的表达特征相似(Feng *et al*, 2008a), 这或许表明一些肉食性鱼类的消化作用可能自食道后段就已开始。斑鳕胃质子泵 $\alpha$ 亚基、 $\beta$ 亚基主要在食道、胃中表达,  $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基间的表达组织一致性, 有助于胃质子泵迅速完成装配、细胞定位并开始泌酸活动。而胃质子泵与PG A1、PG A2间的表达组织一致性, 可保证PG的迅速激活、并行行使消化功能。

### 参 考 文 献

- 邓燕飞, 赵金良, 吴雪峰, 2009. 斑鳕胃蛋白酶原C及其5'侧翼区的克隆及序列特征分析. 上海海洋大学学报, 18(6): 641—648
- 彭国林, 2005. 胃质子泵研究进展. 国外医学(消化系疾病分册), 25(2): 83—85
- 薛洋, 赵金良, 邓燕飞等, 2011. 鳕胃蛋白酶原A、胃质子泵基因cDNA全长的克隆与细胞表达定位. 水产学报, 35(7): 992—1000
- Asano S, Kawada K, Kimura T *et al*, 2000. The roles of carbohydrate chains of the beta-subunit on the functional expression of gastric  $H^+/K^+$ -ATPase. *J Biol Chem*, 275(12): 8324—8330
- Asano S, Tega Y, Konishi K *et al*, 1996. Functional expression of gastric  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase and site-directed mutagenesis of the putative cation binding site and the catalytic center. *J Biol Chem*, 271: 2740—2745
- Bindu P H, Sastry G M, Murty U S *et al*, 2004. Structural and conformational changes concomitant with the E1-E2 transition in  $H^+-K^+$ -ATPase: a comparative protein modeling study. *Biochem Biophys Res Commun*, 319(2): 312—320
- Brier S, Maria G, Carginale V *et al*, 2007. Purification and characterization of pepsins A1 and A2 from the Antarctic rock cod *Trematomus bernacchii*. *FEBS J*, 274 (23): 6152—6166
- Darias M J, Murray H M, Martínez-Rodríguez G *et al*, 2005. Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture*, 248: 245—252
- Deng Y F, Zhao J L, Lu G Q *et al*, 2010. Cloning, characterization and expression of the pepsinogen C from the golden mandarin fish *Siniperca scherzeri* (Teleostei: Perciformes). *Fish Sci*, 76: 819—826
- Douglas S E, Gawlicka A, Mandla S *et al*, 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: Characterisation and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *Fish Biol*, 55: 897—915
- Evers M P, Zelle B, Bebelman J P *et al*, 1989. Nucleotide sequence comparison of five human pepsinogen A (PGA) genes: evolution of the PGA multigene family. *Genomics*, 4: 232—239
- Feng S Z, Li W S, Lin H R, 2008a. Identification and expression characterization of pepsinogen A in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *J Fish Biol*, 73: 1960—1978
- Feng S Z, Li W S, Lin H R *et al*, 2008b. Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp Biochem Physiol B*, 149: 275—284
- Gawlicka A, Leggiadro C T, Gallant J W, 2001. Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by in situ hybridization. *J Fish Biol*, 58: 529—536
- Kageyama T, 2002. Pepsinogen, progastricsin, and prochymosin: structure, function, evolution and development. *Cell Mol Life Sci*, 59: 288—306
- Maeda M, 1994. Gastric Proton Pump ( $H^+/K^+$ -ATPase): Structure and gene regulation through GATA DNA-binding protein(s). *J Biochem*, 115(1): 6—14
- Maeda M, Ishizaki J, Futai M, 1988. cDNA cloning and sequence determination of pig gastric ( $H^+/K^+$ )-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun*, 157(1): 203—209
- Mazlan A, Grove D, 2004. Quantification of gastric secretions in the wild whiting fed on natural prey in captivity. *J Appl Ichthyol*, 20: 295—301
- Murray H M, Gallant J W, Johnson S C *et al*, 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic

- halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture*, 252: 394—408
- Pals G, Azuma T, Mohandas T K *et al*, 1989. Human pepsinogen C (progastricsin) polymorphism: evidence for a single locus located at 6p21.1-pter. *Genomics*, 4:137—145
- Papastamatiou Y P, 2007. The potential influence of gastric acid secretion during fasting on digestion time in leopard sharks (*Triakis semifasciata*). *Comp Biochem Physiol A*, 147: 37—42
- Reifel W, Marin-Sorensen M, Samloff I M, 1985. Cellular localization of pepsinogens by immunofluorescence in the gastrointestinal tracts from four species of fish. *Can J Zool*, 63(7): 1692—1694
- Shull G E, Lingrel J B, 1986. Molecular cloning of the rat stomach ( $H^+K^+$ )-ATPase. *J Biol Chem*, 261: 16788—16791
- Smit H, 1967. Influence of temperature on the rate of gastric acid secretion in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus*. *Comp Biochem Physiol*, 21: 125—132
- Takahashi K, 1992. Gene structures of pepsinogens A and C. *Scand J Clin Lab Invest*, 52(Suppl 210): 97—110
- Tanji M, Yakabe E, Kubota K *et al*, 2009. Structural and phylogenetic comparison of three pepsinogens from Pacific bluefin tuna: molecular evolution of fish pepsinogens. *Comp Biochem Physiol B*, 152: 9—19
- Temva G, Rimoldi S, Larghi S *et al*, 2007. Regulation of progastricsin mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in response to fluctuations in food availability. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(3): 591—596
- Tyagarajan K, Chow D C, Smolka A *et al*, 1995. Structural interactions between alpha- and beta-subunits of the gastric  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase. *Biochim Biophys Acta*, 1236(1): 105—113

## CLONING AND TISSUE EXPRESSION ANALYSIS OF THE PEPSINOGEN A AND GASTRIC PROTON PUMP GENES FROM *SINIPERCA SCHERZERI*

DENG Yan-Fei<sup>1,2</sup>, XUE Yang<sup>1</sup>, ZHAO Jin-Liang<sup>1</sup>, QIAN Ye-Zhou<sup>3</sup>,  
WU Chao<sup>3</sup>, QIAN De<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing, 210017; 3. Chizhou Institute of Special Aquaculture, Anhui Province, Chizhou, 247100)

**Abstract** Pepsinogens (PG), precursors of pepsins, are activated into mature pepsins in gastric acid, which are secreted by the gastric proton pump (Gastric  $H^+/K^+$ -ATPase). In this study, the complete cDNA sequences and genomic DNA sequences of PG A1 and PG A2 were obtained by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) from the stomach of *Siniperca scherzeri*. Both PG A1 and PG A2 genes were deduced to have nine exons and eight introns. The full length of PG A1 cDNA was 1361bp, which contained an open reading frame (ORF) of 1137bp and encoded a peptide of 378 amino acids; the full length of PG A2 cDNA was 1348bp, which contained an ORF of 1131bp and encoded a peptide of 376 amino acids. Three regions were identified in PG A1 and 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 A1 and pepsin A2, suggesting that they may be encoded by different genes and have divergent functions. Both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the gastric proton pump were also isolated and cloned, with a length of 3531bp and 1742bp, respectively. Higher conservative sequence was revealed in  $\alpha$  subunits which had multiple functional sites, while moderate variability existed in  $\beta$  subunits. The PG A1, PG A2, together with gastric proton pump  $\alpha$  and  $\beta$  subunits mRNA were mainly expressed in stomach and esophagus detected by RT-PCR, which indicated gastric proton pump were expressed in a coordinate pattern with PG A1 and PG A2.

**Key words** *Siniperca scherzeri*; Pepsinogen A; Gastric proton pump; Sequence characterization; Tissue expression