

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00596

三角帆蚌精氨酸酶基因的 cDNA 克隆与组织表达分析

刘巧林¹ 许宝红¹ 肖调义¹ 刘敏¹ 钟蕾¹ 苏建明²

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128; 2. 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128)

摘要: 精氨酸酶(Arginase, Arg)是生物体尿素循环当中一种标志性的酶类, 它不但与生物体许多疾病相关, 而且是目前用于治疗肿瘤和癌症的一种重要的工具酶。根据三角帆蚌消减杂交 cDNA 文库获得的 EST 序列, 运用 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术获得三角帆蚌精氨酸酶基因的全长 cDNA 序列。生物信息学方法分析表明精氨酸酶基因 cDNA 序列长 1720 bp, 开放阅读框(65—1072)1008 bp, 编码 335 个氨基酸, 5'端非编码区为 64 bp, 3'端非编码区为 648 bp, 软件推测其编码蛋白相对分子量为 36.81 kD。研究采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)方法分析该基因在不同组织中的表达规律, 结果表明, 该基因在肝脏、胃、肠、鳃、心脏、外套膜、斧足共 7 个组织中都有表达, 但主要集中在肝脏、胃和肠消化器官中表达。这可能说明低等的无脊椎动物三角帆蚌的精氨酸酶兼具有型和型精氨酸酶的特征和功能, 既可以参与尿素循环, 又可以在生理和病理过程中发挥重要作用, 但还需进一步验证。

关键词: 三角帆蚌; 精氨酸酶; RACE; 实时荧光定量 PCR; 组织表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)04-0596-08

精氨酸酶, 又叫做 L-精氨酸尿素水解酶, 其分布广泛, 在细菌、酵母、植物、动物中都存在。精氨酸酶被认为是尿素循环中的标志性酶, 因为在尿素循环中, 几乎所有生物都是利用其他四种酶来合成精氨酸, 而只有含有精氨酸酶的生物才能完成整个的尿素循环。精氨酸酶不但能将精氨酸水解为鸟氨酸和尿素, 起到对体内氨解毒的重要作用^[1,2], 而且能进一步将鸟氨酸分解为精胺、亚精胺、腐胺等多胺及脯氨酸等。研究表明多胺是细胞增殖和分化的必需成分, 在促进细胞增殖中发挥重要作用^[3,4], 脯氨酸则能促进胶原蛋白的生成和伤口的愈合^[5,6]。如果某种生物缺乏精氨酸酶时, 就会产生一系列的精氨酸酶缺陷症, 如发育不良, 神经系统缺陷等^[7-9]。精氨酸酶通过催化水解精氨酸, 对肿瘤细胞进行营养剥夺, 且对正常组织影响较小, 因此被认为是一种良好的抗肿瘤药物。许多实验证明精氨酸酶能显著抑制肿瘤细胞的分裂^[10], 精氨酸酶不但对人急性早幼粒白血病原代细胞有抑制生长和引导分化作

用^[11], 而且对急性非淋巴白血癌细胞生长具有抑制作用^[12]。此外, Vanessa, *et al.*^[13]研究表明, 用细菌感染虹鳟后, 型精氨酸酶的表达明显上调, 从而推断型精氨酸酶可能具有抗菌作用。本文以肖调义等^[14]构建的三角帆蚌肝脏消减文库为基础, 旨在克隆三角帆蚌精氨酸酶基因的 cDNA 全长, 研究精氨酸酶的组织分布情况, 为后续精氨酸酶在三角帆蚌体内的功能研究及三角帆蚌抗病新品系的培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及处理

二年龄健康三角帆蚌购自湖南省常德市三角帆蚌养殖基地, 吊养于湖南农业大学水产养殖基地。确定健康蚌的标准是两壳紧闭, 缩足迅速, 出水管喷水力强, 体色发白, 体质健壮。取健康三角帆蚌置水族箱中暂养一周, 经灭菌 DEPC 水清洗后, 取肝脏、胃、肠、鳃、心脏、外套膜和斧足共 7 种组织, 迅速

收稿日期: 2010-11-26; 修订日期: 2011-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31040083); 湖南省科技厅攻关项目(No.06NK3049)资助

作者简介: 刘巧林(1985—), 女, 湖南宁乡人; 博士研究生; 主要从事水产动物抗病育种研究。E-mail: lq2323@163.com

通讯作者: 肖调义(1964—), 男, 教授, 博导; E-mail: tyx1128@yahoo.com.cn

分装放入液氮中冻存储用。

1.2 三角帆蚌精氨酸酶基因的 cDNA 全长克隆与测序

cDNA 模板的合成

首先根据天根生化科技有限公司动物组织 RNA 提取试剂盒(RNAprep pure Tissue Kit)的操作说明提取三角帆蚌肝脏总 RNA, 分别用凝胶电泳法和核酸蛋白仪检测 RNA 的纯度和浓度; 然后根据 Clontech 公司 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 操作要求合成 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready-cDNA, 备用。

引物设计与 PCR 扩增

通用引物(UPM)为试剂盒自带产品, 5'端(Arg-GSP1)和 3'端(Arg-GSP2)基因特异性引物是根据肖调义等^[14]构建的三角帆蚌消减 cDNA 文库中筛选得到精氨酸酶基因 EST 序列(GenBank 登录号: FE968644)设计后由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(引物序列见表 1)。接着分别以 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready-cDNA 作为模板, 用通用引物(UPM)分别和 5'端(Arg-GSP1)、3'(Arg-GSP2)端基因特异性引物进行 touchdown PCR 扩增反应, PCR 反应体系如下: 10× Advantage 2 PCR Buffer 5 μL, dNTP Mix 1 μL, 5'-RACE-Ready cDNA 或 3'-RACE-Ready-cDNA 2.5 μL, UPM 5 μL, Arg-GSP1 或 Arg-GSP2 1 μL, Advantage 2 Polymerase Mix 1 μL, PCR-Grade Water 34.5 μL, 总体积 50 μL。反应条件: 94 5min 预变性, 94 30s, 70 30s, 72 2min(5 个循环) 94 30s, 68 30s, 72 2min(15 个循环) 94 30s, 65 30s, 72

2min(15 个循环), 最后 72 延伸 10min。

产物回收与测序

扩增产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析并用凝胶回收试剂盒(天根生化)回收。将回收的 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增产物分别与 pUCm-T 载体 16 过夜连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5α, 涂布于含有异丙基硫代 β-半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-Gal)和氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)的 LB 平板, 37 恒温培养过夜, 挑单个阳性克隆菌落接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基, 在 37 条件下, 220 r/min 振荡培养 8h, 以菌液为模板, 用载体通用引物进行 PCR 检测, 挑阳性克隆菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.3 序列分析

测序所得 cDNA 片段先通过软件 DNASTar 与 EST 拼接获得完整 cDNA 全长, 并推导其开放阅读框序列; 氨基酸组成、理化性质和二级结构等由 CLC-ProteinWork-bench 5.3 和 DNAMAN 等软件预测; 在 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 服务器上对三角帆蚌精氨酸酶氨基酸序列进行三级结构同源建模^[15-17], 并应用 Rasmol2.7 分析软件制作 3D 结构图; 用美国国立生物技术信息中心(NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的比对软件进行同源基因的搜索, 查找与其相关的同源序列; 序列同源性比对由 DNAMAN 软件完成; 用系统发育分析软件 MEGA 4 (Version 4.0), 构建邻接树(Neighbour-Joining Tree, NJ Tree), 分析基因在不同物种中的亲缘关系。

表 1 精氨酸酶基因克隆与表达分析的引物
Tab. 1 Primers designed for cloning and expression analysis of the arginase gene

引物名称 Primer name	序列 Sequence
SMART II™ A Oligonucleotide (12 μmol/L)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
3'-RACE CDS Primer A(3' -CDS; 12 μmol/L)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ V N-3' (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)
5'-RACE CDS Primer A (5' -CDS; 12 μmol/L)	5'-(T) ₂₅ V N-3' (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)
10×Universal Primer A Mix (UPM)	
Long Primer (0.4 μmol/L)	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
Short Primer (2 μmol/L)	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC -3'
Random Primer	5'-(dN) ₉ -3'
Oligo (dT) ₂₀	5'-(dT) ₂₀ -3'
Arg-GSP1	5'-CAGCATGAGCGTCGATCCATAACAC-3'
Arg-GSP2	5'-TGCTAAAGACATTGCCTACATTGGT -3'
Arg-PF	5'-TTTGCCTCGGTCTCGGTGGTGA-3'
Arg-PR	5'-GCCGTGGATGTTTCCGCTGTCT-3'
β-actin PF	5'-TCCCCTCAACCCTAAAGCCAACA -3'
β-actin PR	5'-CGGAAGCGTACAGCGACAACACA -3'

1.4 实时定量 PCR 分析精氨酸酶基因的组织差异表达

三角帆蚌各组织总 RNA 提取与反转录 用天根生化科技有限公司动物组织 RNA 提取试剂盒操作说明分别提取三角帆蚌肝脏、胃、肠、鳃、心脏、外套膜和斧足共 7 个组织的总 RNA, 用凝胶电泳法和核酸蛋白仪检测 RNA 的纯度和浓度后, 按东洋纺(TOYOBO)反转录试剂盒 (ReverTra Ace qPCR RT Kit)操作说明反转录合成 cDNA 模板。

引物设计与合成 根据本实验室克隆获得的三角帆蚌精氨酸酶基因全长 cDNA 序列和 NCBI 公布的 β -肌动蛋白 (β -actin, GenBank 登录号: HM045420)基因序列运用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成(引物序列见表 1)。精氨酸酶基因上游引物(Arg-PF)和下游引物(Arg-PR)扩增片段大小为 149 bp; β -肌动蛋白基因上游引物(β -actin PF)和下游引物(β -actin PR)扩增片段大小为 113 bp。

扩增效率检测 7 个样品 cDNA 各取 2 μ L 混匀后, 进行 5 倍系列稀释, 选取 6 个稀释度进行荧光实时定量 PCR 扩增反应, 每个稀释度设 3 个重复。PCR 反应体系及条件按东洋纺荧光定量试剂盒 (SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus-)操作指南及荧光定量 PCR 仪(ABI 7900HT)设定。反应体系: SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus- 5 μ L, Plus Solution 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.2 μ L, 各个稀释梯度的待测样品 0.5 μ L, 补加灭菌蒸馏水至终体积为 10 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 60s, 94 15s, 61 30s, 72 60s, 共计 35 个循环, 使用 ABI 7900HT 自带软件 the Sequence Detection System(SDS version2.3)收集和分析数据, 建立标准曲线, 检测精氨酸酶基因和 β -肌动蛋白的扩增效率, 并通过熔解曲线检验引物的扩增特异性。

待测样品检测 以三角帆蚌肝脏、胃、肠、鳃、心脏、外套膜和斧足共 7 个组织的反转录 cDNA 为待测样品, 每个待测样品设置 3 个重复, 以 β -actin 为内参基因, 心脏组织样品为对照, 通过荧光定量 PCR 仪 (ABI 7900HT)测定目的基因的丰度, 应用 2^{-C_t} 分析方法分析精氨酸酶在各组织中的表达情况。

2 结果

2.1 精氨酸酶基因全长扩增与分析

采用 RACE-PCR 技术扩增获得精氨酸酶基因 5'

和 3'端 cDNA 片段, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 结果表明, 5'-RACE-PCR 产物大小在 500—550 bp 之间(第 4 泳道); 3'-RACE-PCR 产物大小在 1000—1500 bp 之间(第 1 泳道)。同时以单引物扩增结果为对照, 检验特异性引物的准确性, 从图 1 可以看出特异性引物 Arg-GSP1 和 Arg-GSP2 扩增产物单一, 单引物扩增结果为阴性, 表明引物特异性高。

RACE-PCR 扩增获得的精氨酸酶基因 5'和 3'端 cDNA 片段经克隆测序后, 5'-RACE-PCR 产物有效序列大小为 471 bp; 3'-RACE-PCR 产物有效序列大小为 1120 bp。比对所得有效序列运用 DNASTar 软件与 EST 拼接, 结果表明精氨酸酶基因全长 cDNA 共 1720 bp, 开放阅读框(65—1072)1008 bp, 编码 335 个氨基酸, 5'端非编码区为 64 bp, 3'端非编码区为 648 bp。基因序列结果已提交 GenBank, 登录号为 GU234181。核苷酸序列的 3'端非编码区还含有 2 个“ AATAAA ”的 mRNA 加尾信号和 2 个 mRNA 不稳定基序“ ATTTA ”。

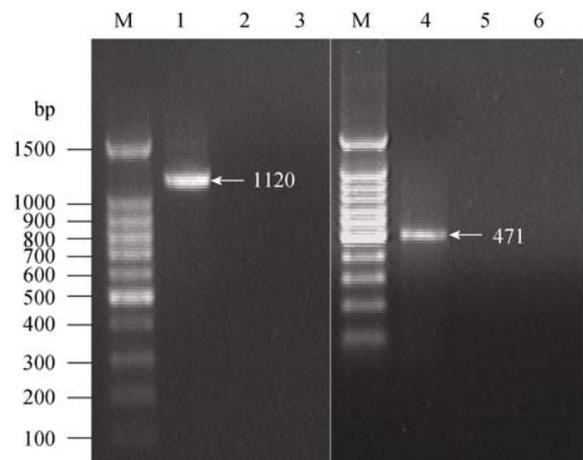


图 1 精氨酸酶基因 RACE-PCR 产物

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of arginase gene RACE-PCR products

M. 100 bp DNA Ladder; 1. 3'-RACE-PCR 产物; 2. 单引物 Arg-GSP2 对 3'-RACE cDNA 扩增的结果; 3. 单引物 UPM 对 3'-RACE cDNA 扩增的结果; 4. 5'-RACE-PCR 产物; 5. 单引物 Arg-GSP1 对 5'-RACE cDNA 扩增的结果; 6. 单引物 UPM 对 5'-RACE cDNA 扩增的结果

M. 100 bp DNA Ladder; 1. DNA fragment amplified by 3'-RACE-PCR; 2. PCR result using Arg-GSP2 primer only; 3. PCR result using UPM primer only; 4. DNA fragment amplified by 5'-RACE-PCR; 5. PCR result using Arg-GSP1 primer only; 6. PCR result using UPM primer only

2.2 三角帆蚌精氨酸酶推导氨基酸序列分析

运用 ExPASy Proteomics Server-ProtParam(<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>)在线服务软件分

析精氨酸酶基因氨基酸理化性质表明, 推导精氨酸酶相对分子量为 36.81 kD; 理论 pI 为 5.47; 疏水性氨基酸残基包括 A、F、G、I、L、M、P、V 和 W, 共 175 个, 占氨基酸含量的 52.2%, 亲水性氨基酸残基包括 C、N、Q、S、T 和 Y, 共 61 个, 占氨基酸含量的 18.2%, 总平均亲水性为 -0.223。CLC-ProteinWork-bench 5.3 和 DNAMAN 预测精氨酸酶二级结构表明该蛋白含有 17 个 α -螺旋、16 个 β -折叠和 27 个 β -转角结构, 而无规则的卷曲结构将 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角结构连接起来构成了完整的二级结构。

同源建模是预测未知蛋白结构最为有效的方法之一, 当模板序列和目标序列的同源性大于 30% 时, 建模的结构较为可靠^[18]。三角帆蚌精氨酸酶三级结构同源建模的氨基酸范围从第 13 个氨基酸到第 322 个氨基酸; 其建模参考模板为人精氨酸酶(Genbank 登录号为 3gmzB), 目标蛋白与参考蛋白的序列比对同源性为 49.518%; 模型评估 E 值为 0, 表明模型结构可靠。Rasmol2.7 分析软件制作 3D 结构模型中可见 2 个典型的 α -螺旋(红色部分)结构区位于 β -折叠(黄色部分)结构区两侧(图 2)。

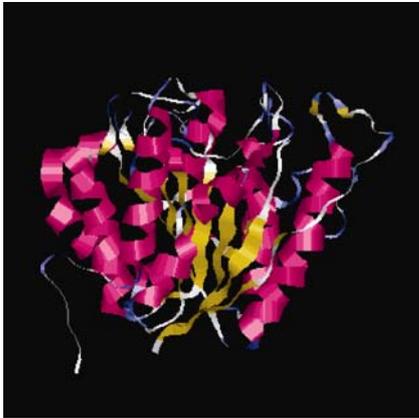


图 2 三角帆蚌精氨酸酶三级结构同源模型

Fig. 2 The homologous model of tertiary structure of *H. cumingii* arginase
红、黄、蓝、白色丝带分别表示 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲结构

The pink ribbon represents α -helices; The yellow ribbon represents β -strands; The blue ribbon represents β -turns; The white ribbon represents coils

2.3 精氨酸酶氨基酸序列同源性分析

三角帆蚌精氨酸酶氨基酸序列经 NCBI 中 Protein Blast 比对, 发现其属于精氨酸酶超基因家族

的成员, 其与多个物种的精氨酸酶家族成员具有较高的同源性, 用于多序列比对和系统发育树构建的精氨酸酶氨基酸序列及 DNAMAN 软件比对不同物种间同源性结果(表 2)。参与比对的序列共有 14 条, 同源性比较结果表明, 三角帆蚌精氨酸酶与其余 13 种物种的精氨酸酶家族成员的同源性较高, 其中相似性最高的有鸭嘴兽、马和人, 相似性都是 53.98%, 其次是山羊、牛蛙、牛、非洲爪蟾、野猪、褐家鼠和小家鼠, 相似性都在 50%, 而与鱼类的同源性最低, 与斑马鱼的同源性为 48.87%, 与卡皮奥鲤的同源性为 47.64%, 而与斑鲟的同源性最低, 为 46.78%。

2.4 精氨酸酶系统进化树的构建

采用 Mega4.0 软件 Bootstrap Test of Phylogeny 的邻接法(Neighbor-joining)构建三角帆蚌精氨酸酶的进化树, 参与进化树构建的物种经 NCBI 比对后获得, 具体见表 2。重复抽样次数设置数为 100, 以确保所构进化树分枝的稳定性。树枝上列出的是 Bootstrap 检验值, 该数值越大, 越接近于初始设定的重复抽样次数, 即表示可信度越高。系统发育树结果表明, 三角帆蚌精氨酸酶与其他物种亲缘关系比较远, 其独立聚为一支; 其中褐家鼠和小家鼠, 斑鲟、斑马鱼和卡皮奥鲤, 非洲爪蟾和牛蛙, 牛和山羊分别聚为一支, 表明其亲缘关系较近(图 3)。

2.5 扩增效率的检测

根据 6 个稀释系列实时定量 PCR 反应结果, 去掉误差最大的一个结果后, 以循环阈值(Threshold cycle, C_t)为纵坐标, 以稀释倍数值为横坐标, 获得相对定量标准曲线^[19], 精氨酸酶和 β -肌动蛋白基因标准曲线分别为 $y = -2.5085x + 29.565$ 和 $y = -2.4706x + 30.881$, 相关系数分别为 0.9998 和 0.9992, 根据公式 $e = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ 计算二者的扩增效率都为 1.5, 用 $2^{-(C_t)}$ ^[20] 表示目的基因的相对表达量可行。熔解曲线结果显示熔解温度均一, 为尖锐的单一峰, 从而排除了形成引物二聚体和非特异产物对结果带来影响的可能。

2.6 精氨酸酶基因组织差异表达

以 $2^{-(C_t)}$ 法分析各个待测样品的实时荧光定量 PCR 反应结果。结果表明, 三角帆蚌精氨酸酶基因在所取的 7 个组织中都有表达, 其中在肝脏、胃中的表达量最高, 其次在肠、鳃和斧足中的表达量较高, 而在心脏中的表达量最低(图 4)。

表 2 构建系统发育树的序列和三角帆蚌与不同物种的精氨酸酶同源性比较

Tab. 2 The arginase sequences using for establishing phylogenetic tree and the arginase sequence identities between *H. cumingii* and other species

种类 Species	蛋白质 Protein	GenBank 登录号 Accession number	同源性 Identity
三角帆蚌 <i>Hyriopsis cumingii</i>	Arginase	ADA68869	/
鸭嘴兽 <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Similar to arginase	XP_001505820	53.98%
马 <i>Equus caballus</i>	Similar to arginase type I	XP_001503335	53.98%
人 <i>Homo sapiens</i>	Arginase (EC_3.5.3.1)	AAA51776	53.98%
山羊 <i>Capra hircus</i>	Arginase	ACS34711	53.54%
牛蛙 <i>Rana catesbeiana</i>	Arginase	BAA07422	53.13%
牛 <i>Bos taurus</i>	Arginase-1	NP_001039619	53.10%
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	Arginase-1	NP_001080417	52.65%
野猪 <i>Sus scrofa</i>	Similar to arginase type II	XP_001928714	52.58%
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	Arginase-2	EDM03719	52.15%
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	Arginase-1	CAJ18381	50.42%
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	Arginase-1-like	XP_001922598	48.87%
卡皮奥鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	Putative-arginase-1	CAI38845	47.64%
斑鳟 <i>Salmo salar</i>	Arginase-1	NP_001134788	46.78%

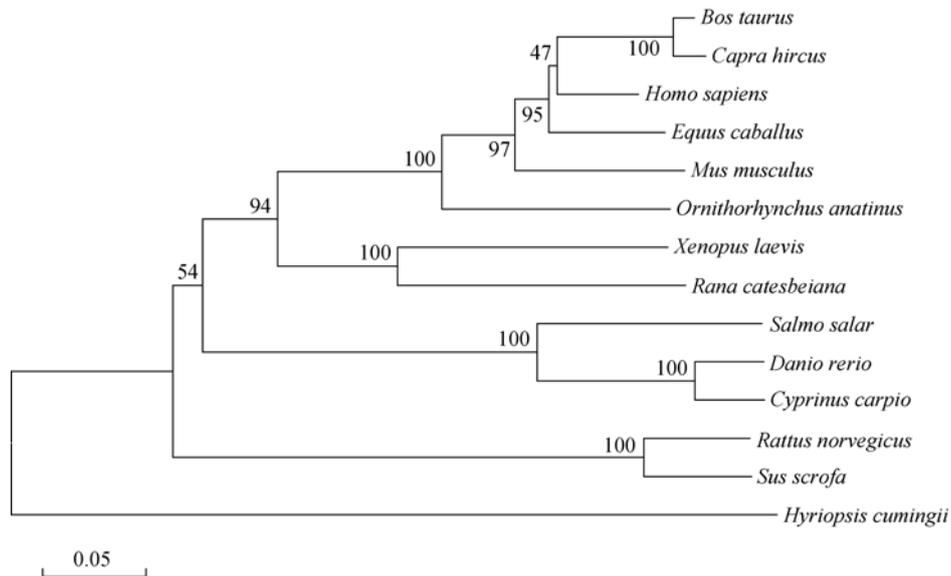


图 3 三角帆蚌精氨酸酶的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic evolution tree of *H. cumingii* arginase

3 讨论

精氨酸酶是广泛分布于生物有机体中以精氨酸为底物的一种水解酶, 精氨酸酶在机体的不同组织中发挥着多种功能^[21-24]。本研究以抑制性消减 cDNA 文库为基础, 运用 RACE-PCR 技术, 从三角帆蚌肝脏中克隆得到三角帆蚌精氨酸酶基因全长 cDNA 序列, 并探讨了其在三角帆蚌个体不同组织中的表达情况。目前, 已有多个物种的精氨酸酶基因被分离和鉴定出来, 但已有的研究报道主要集中在人类精氨酸酶基因的结构和功能的研究。生物有机体蛋白

质的各种氨基酸残基可分为亲水残基和疏水残基两类, 疏水残基一般位于蛋白质内部, 而亲水性残基位于表面, 这样蛋白质的亲水部位与蛋白质的抗原位点有密切的关系。本研究克隆获得的精氨酸酶疏水性氨基酸残基占氨基酸含量的 52.2%, 表明该蛋白亲水性不高, 因而抗原位点有可能比较少。一般认为在蛋白质二级结构中, α -螺旋和 β -折叠结构规则不易变形, 难以与抗体嵌合, 因而一般不作为抗原表面, 其主要功能是作为蛋白质骨架起稳定作用, 无规则卷曲区域则决定蛋白质的功能^[25, 26]。软件预测三角帆蚌精氨酸酶二级结构比较复杂, 具有 17 个

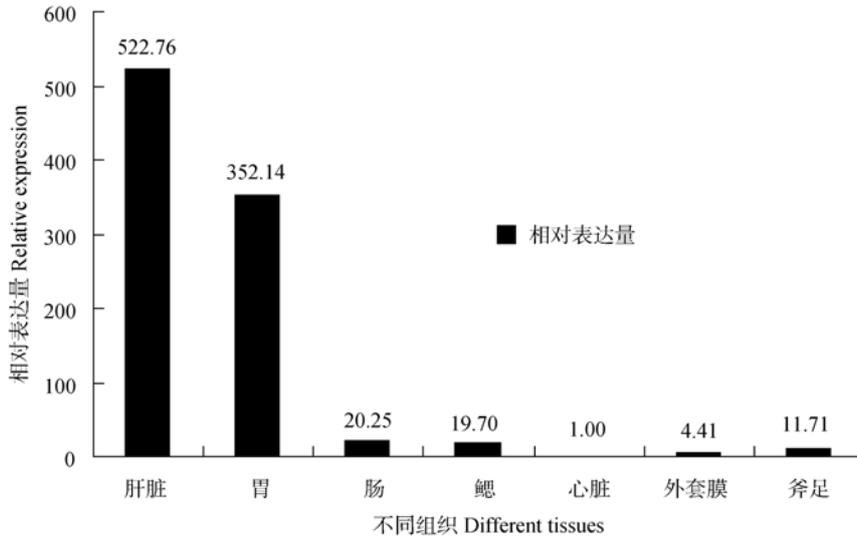


图 4 精氨酸酶基因在不同组织中的相对表达量
Fig. 4 Relative expression of arginase in different tissues

α -螺旋和 16 个 β -折叠结构,可以推断该蛋白结构比较稳固。精氨酸酶同源性比较分析,三角帆蚌与多种脊椎动物的精氨酸酶具有较高的同源性,这一结果表明从低等动物到高等动物,精氨酸酶的变异不大,具有高保守性。而结构的高度保守又可能反应出其功能的保守性,从而为研究三角帆蚌精氨酸酶的功能提供一定的理论基础。系统进化分析表明三角帆蚌精氨酸酶独自聚为一支,这正好与三角帆蚌的进化分类地位相符,因为构树所用的各种动物都是较为高等的脊椎动物,从而验证的三角帆蚌与其他物种的亲缘关系比较远。

精氨酸酶是一种双核含锰金属的酶,目前研究表明其具有两种亚型: 型和 型,二者的氨基酸序列同源性约为 60%,主要区别在于二者的免疫反应性、组织分布和亚细胞定位不同。 型精氨酸酶主要在肝脏中表达,主要行使将精氨酸水解为鸟氨酸和尿素的功能,参与尿素循环,起到对体内氨解毒的重要作用。 型精氨酸酶是一种线粒体酶,在多种组织包括脑、内皮、肠、肾、巨噬细胞和乳腺等进行表达,将精氨酸分解成鸟氨酸后,进一步分解为多胺及脯氨酸等。研究表明多胺是细胞增殖和分化所必需的重要成分,在促进细胞增殖中发挥重要作用,脯氨酸则能促进胶原蛋白的生成和伤口的愈合^[5,6]。另一些研究还表明,血管系统中也分布有精氨酸酶,如在血管平滑肌细胞中有 型精氨酸酶的选择性表达^[27],而在许多血管内皮细胞中 型

和 型精氨酸酶均有表达^[28]。实时荧光定量 PCR 结果表明,三角帆蚌精氨酸酶是一类广谱表达的蛋白,这可能说明低等的无脊椎动物三角帆蚌的精氨酸酶兼具有 型和 型精氨酸酶的特征和功能,但还需进一步验证,这是我们接下来研究的重点。研究三角帆蚌精氨酸酶在不同生理和病理条件下的表达变化规律及其在三角帆蚌机体内的具体功能和作用机制,以期三角帆蚌抗病新品系的遗传改良提供新途径。

参考文献:

- [1] Chen Y J, Qi Y M. Research advancement of arginine in immunonutrition [J]. *Chinese Journal of Clinical Nutrition*, 2007, **15**(5): 310—314 [陈亚军, 齐玉梅. 精氨酸免疫营养作用的研究进展. 中国临床营养杂志, 2007, **15**(5): 310—314]
- [2] Atkinson DE. Function roles of urea synthesis in vertebrates [J]. *Physiological Zoology*, 1992, **65**: 243—267
- [3] Durante W, Tulis D A, Keswanil A N, et al. Arginase promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation [J]. *Circulation*, 2006, **114**: 69
- [4] Peyton K J, Ensenat D, Azam M A, et al. Arginase promotes neointima formation in rat injured carotid arteries [J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2009, **29**(4): 488—494
- [5] Morris S M Jr. Arginine metabolism in vascular biology and disease [J]. *Vascular Medicine*, 2005, **10**(Suppl.1): S83—S87
- [6] Tong B C, Barbul A. Cellular and physiological effects of

- arginine [J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004, **4**(8): 823—832
- [7] Bao M Z. Urea cycle disorder disease [J]. *Foreign Medical Sciences* (Section of Endocrinology), 2002, **22**(5): 276—279 [包美珍. 尿素循环障碍疾病. 国外医学内分泌学手册, 2002, **22**(5): 276—279]
- [8] Christopher R, Rajivnath V, Shetty T K. Arginase deficiency [J]. *The Indian Journal of Pediatrics*, 1997, **64**(2): 266—269
- [9] Grody W W, Klein D, Dodson A E, *et al.* Molecular genetic study of human arginase deficiency [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1992, **50**: 1281—1290
- [10] Cao W J, Sun B, Lian Z R, *et al.* Effect of arginase I expression on hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma cells [J]. *Journal of Diagnostics Concepts and Practice*, 2007, **6**(4): 319—322 [曹文俊, Bill Sun, 连兆瑞, 等. 精氨酸酶 I 在 HCV 转染肝癌细胞增殖中的作用. 诊断学理论与实践, 2007, **6**(4): 319—322]
- [11] Liang S. The effects of arginase on human primary APL cell's growth and differentiation [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2000, **7**(3): 184—186 [梁实. 精氨酸酶对人 APL 原代细胞生长和分化的影响. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2000, **7**(3): 184—186]
- [12] Liang S. The inhibition of arginase on U937 and K562 cell's growth [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 1994, **10**(7): 776 [梁实. 精氨酸酶对 U937、K562 细胞生长的抑制. 中国病理生理杂志, 1994, **10**(7): 776]
- [13] Vanessa I C, Severin H S, Mansour E M. Expression of immune-regulatory genes, arginase-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS), in two rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains following exposure to *Myxobolus cerebralis* [J]. *Parasitology Research*, 2010, **106**(2): 325—334
- [14] Xiao T Y, Ge X K, Xu B H, *et al.* Construction and analysis of subtracted cDNA library by suppression subtractive hybridization from *Hyriopsis cumingii* digestive gland [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(5): 856—864 [肖调义, 葛熹凯, 许宝红, 等. 三角帆蚌肝脏瘟病感染期抑制性消减 cDNA 文库的构建与分析. 水产学报, 2009, **33**(5): 856—864]
- [15] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, 2006, **22**: 195—201
- [16] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology- modeling server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**: 3381—3385
- [17] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 2714—2723
- [18] Orengo C A, Jones D T, Thornton J M. Protein superfamilies and domain superfolds [J]. *Nature*, 1994, **372**: 631
- [19] Wang R, Chen M, Huang J, *et al.* Sequence and expression analysis of the gene encoding progranulin in Tilapia [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(5): 949—955 [王瑞, 陈明, 黄钧, 等. 罗非鱼颗粒蛋白前体 cDNA 序列与表达分析. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 949—955]
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [21] Liu H W, Guo Y W, Morris S M Jr, *et al.* Elevated arginase I expression in rat aortic smooth muscle cells increases cell proliferation [J]. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 2001, **98**(16): 9260—9264
- [22] Li H, Meininger C J, Kelly K A, *et al.* Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation [J]. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2002, **282**(1): 64—69
- [23] Romero M J, Platt D H, Tawfik H E, *et al.* Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity [J]. *Circulation Research*, 2008, **102**(1): 95—102
- [24] Steppan J, Ryoo S, Schuleri K H, *et al.* Arginase modulates myocardial contractility by a nitric oxide synthase 1-dependent mechanism [J]. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 2006, **103**(12): 4759—4764
- [25] Lü F L, Zhu X H. Analysis of characteristics and predication of B-cell epitopes for the human C5a receptor [J]. *Immunological Journal*, 1998, **14**(3): 153—155 [吕凤林, 朱锡华. 人 C5aR (CD88) 序列结构及其 B 细胞表位预测. 免疫学杂志, 1998, **14**(3): 153—155]
- [26] Song J X, Zhu X H, Chen K M. Prediction of B-cell epitopes of human Fas (H-Fas) antigen [J]. *Immunological Journal*, 1999, **15**(1): 14—16 [宋建勋, 朱锡华, 陈克敏. 人 Fas 抗原表位预测. 免疫学杂志, 1999, **15**(1): 14—16]
- [27] Wei L H, Jacobs A T, Morris S M Jr, *et al.* IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells [J]. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, 2000, **279**(1): C248—C256
- [28] Bachetti T, Comini L, Francolini G, *et al.* Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2004, **37**(2): 515—523

FULL-LENGTH CDNA CLONING AND TISSUE EXPRESSION ANALYSIS OF ARGINASE GENE FROM *HYRIOPSIS CUMINGII*

LIU Qiao-Lin¹, XU Bao-Hong¹, XIAO Tiao-Yi¹, LIU Min¹, ZHONG Lei¹ and SU Jian-Ming²

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. College of Animal Veterinary and Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Arginase (Arg) is a sign enzyme among organisms of urea cycle. It is not only related to many diseases in organisms, but also used to treat tumors and cancer as an important tool enzyme. According to the *Hyriopsis cumingii* (*H. cumingii*) expressed sequence tags (EST) obtained by constructing subtractive hybridization cDNA library of *H. cumingii* liver, the gene full-length cDNA sequence of arginase from *H. cumingii* was cloned by RACE-PCR technique based on the designed gene-special primers. After analyzed by the software DNA Star and the bioinformatics technology, the results showed that the length of arginase gene cDNA sequence was 1720 bp, containing a complete open reading frame (65—1072) which was 1008 bp, encoding a peptide of 335 amino acid residues (aa), flanked by a 64 bp of 5' untranslated region (UTR) and a 648 bp of 3'-UTR. The deduced molecular weight of arginase was about 36.81 kD. At the transcriptional level, quantitative real-time PCR (qPCR) was used to detect the expression of the arginase gene in different tissues. The result revealed that *H. cumingii* arginase gene could be expressed in seven kinds of tissue containing liver, stomach, intestine, gill, heart, mantle, axe foot collected from *H. cumingii*, especially strongly expressed in digestive organs, such as liver, stomach and intestine, but weakly in heart and mantle. So it concluded that the arginase from the *H. cumingii* which belongs to lower invertebrate could possess the same characteristics and functions of arginase type and from the higher animals. That means the arginase from the *H. cumingii* may not only participates in urea cycle, but also plays an important role in the processes of physiology and pathology. And the deduction will be verified in the next experiment.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; Arginase; Rapid amplification of cDNA ends; Quantitative real-time PCR; Tissue expression