

# 斑马鱼3种胰蛋白酶原基因的克隆、 序列分析及组织表达\*

陈文波, 李卫国, 张 珍, 焦春磊, 吴 帆  
(河南理工大学资源环境学院, 河南 焦作 454000)

**摘 要:** 胰蛋白酶是丝氨酸蛋白酶类超家族成员之一, 在动物蛋白消化中起着重要作用。为深入研究胰蛋白酶在鱼类中的蛋白结构和生理功能, 利用 RT-PCR 和 RACE 方法, 成功获得了斑马鱼 3 种胰蛋白酶原 cDNA 序列 (zftry1a、zftry1b 和 zftry2)。结果表明, zftry1a 和 zftry1b 均有 242 个氨基酸残基组成, 其中包括 15 个氨基酸的信号肽和 5 个氨基酸 (LDDDK) 的激活肽。zftry2 由 247 个氨基酸残基组成, 其中包括 15 个氨基酸的信号肽和 9 个氨基酸 (APLGDDDDK) 的激活肽。氨基酸序列比对结果显示, 三者具备胰蛋白酶原的保守结构特征, 如含有催化三联体氨基酸 (His-57、Asp-102 和 Ser-195), 12 个半胱氨酸, 位于底物结合口袋底部 Asp-189 和口袋开口处的 Gly-216、Gly-226 等。进化树结果显示, 斑马鱼 zftry1a 和 zftry1b 属于 group I, 为阴离子胰蛋白酶原; 斑马鱼 zftry2 属于 group II, 为阳离子型胰蛋白酶原。RT-PCR 结果显示, 三者组织分布模式类似, 且在肠中有最高表达量。这些结果为研究鱼类胰蛋白酶原的基因进化和功能以及进一步探讨鱼类消化生理的分子机制奠定了基础。

**关键词:** 斑马鱼; 胰蛋白酶原; 克隆; 组织表达

中图分类号: Q785; S917 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2013) 01-0111-07

## Molecular Cloning, Sequence Analysis and Tissue Expression of Three Forms Trypsinogens in Zebrafish, *Danio rerio*

CHEN Wenbo, LI Weiguo, ZHANG Zhen, JIAO Chunlei, WU Fan

(School of Resource and Environment, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000, China)

**Abstract:** Trypsin, one member of the serine protease family, plays important roles in animal protein digestion. It is synthesized and secreted as proenzyme trypsinogen, and removed the N-terminal activation peptide by enterokinase converting to active form in the intestine. The active trypsin can specifically cleavage at the peptide bond on the carboxyl side of basic L-amino acids such as arginine or lysine residue. For studying the protein structure and physiological functions of trypsinogen in fish, we successfully got three trypsinogen cDNAs (zftry1a、zftry1b and zftry2) from zebrafish by RT-PCR and RACE. The results showed zftry1a and zftry1b consisted of 242 amino acids which contained a signal peptide (SP) of 15 amino acids and an activation peptide (AP) of five amino acids, LDDDK. zftry2 consisted of 247 amino acids which contained a SP of 15 amino acids and an AP of nine amino acids, APLGDDDDK. The alignment based on the amino acid sequences revealed that they had the conserved structural characteristics, such as the catalytic triad (His-57, Asp-102, and Ser-195), 12 cysteines forming 6 disulfide bonds, Asp-189 at the bottom of the substrate-binding pocket and Gly-216 and Gly-226 lining the sides of the binding pocket, and so on. The results from isoelectric and phylogenetic analyses suggested that zftry1a and zftry1b were group with teleost anionic trypsinogen group I, while zftry2 was phylogenetically related to teleost cationic group II. Tissue expression pattern was similar to each other, and all trypsinogen

\* 收稿日期: 2012-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101878); 河南理工大学博士基金资助项目 (B2010-7)

作者简介: 陈文波 (1982 年生), 男, 讲师, 博士, 硕士生导师; E-mail: chenwenbo@hpu.edu.cn

gens were mainly expressed in the intestine. These results from zebrafish trypsinogens can provide the foundations for further study of its expression profiles, the molecular characteristics and evolution of fish trypsinogen.

**Key words:** zebrafish; trypsinogen; cloning; tissue distribution

胰蛋白酶 Trypsin (EC3. 4. 21. 4) 是丝氨酸蛋白酶家族的重要成员, 是动物消化蛋白质的重要酶类<sup>[1]</sup>。胰蛋白酶以非活性酶原的形式被合成和分泌, 被肠激酶或者激活的胰蛋白酶切割除去氨基端的酸性激活肽, 继而转变成有活性的胰蛋白酶<sup>[2]</sup>。胰蛋白酶是一种肽链内切酶, 主要裂解碱性氨基酸 Arg 或 Lys 羧基侧链肽。激活后的胰蛋白酶不仅可以激活胰蛋白酶原, 而且还可以激活胰凝乳蛋白酶原、弹性蛋白酶原以及羧肽酶原等<sup>[3-5]</sup>。

目前研究认为, 胰蛋白酶主要来源于鱼类的肝脏、肠道和幽门盲囊, 在鱼类消化、生长速率和仔鱼的成活率方面都有着重要的作用。截至到目前, 已在一些鱼类中也克隆得到了胰蛋白酶原的 cDNA 序列, 如大西洋鳕鱼 *Gadus morhua*<sup>[6]</sup>、牙鲆 *Paralichthys olivaceus*<sup>[7]</sup>、蓝鳕鱼 *Paranotothenia magellanica*<sup>[8]</sup>、日本鳗鲡 *Anguilla japonica*<sup>[9]</sup>、冬鲽 *Pseudopleuronectes americanus*<sup>[10]</sup>、塞内加尔鲷 *Solea senegalensis*<sup>[11]</sup>、金头鲷 *Sparus aurata*<sup>[12]</sup>、草鱼 *Ctenopharyngodon idellus*<sup>[1]</sup>、翘嘴鲌 *Culter alburnus*<sup>[1]</sup>等。根据等电点的不同, 目前把硬骨鱼类胰蛋白酶原主要分成了两种类型, 分别为阴离子型胰蛋白酶原和阳离子型胰蛋白酶原, 另外还有一种特殊的类型, 主要是与极端环境相关<sup>[14]</sup>。同时, 在一些海水鱼类中已发现多个编码胰蛋白酶原的基因, 且分属于不同的胰蛋白酶类型, 并展示了不同的组织和发育表达模式, 提示这些胰蛋白酶的功能差异<sup>[6-7, 10-11]</sup>。

目前在淡水鱼类中对胰蛋白酶的研究相对较少, 仅在草鱼和翘嘴鲌中获得了其 cDNA 序列, 且只报道了一种基因<sup>[1]</sup>。是否在淡水鱼类中也含有多个编码胰蛋白酶原的基因还需要进一步研究。本文以模式生物斑马鱼 *Danio rerio* 为研究对象, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术获得了 3 种斑马鱼胰蛋白酶原 cDNA 序列及氨基酸序列, 并对其蛋白结构特征、同源性和进化关系进行了分析。同时, 利用 RT-PCR 检测了三者的组织表达模式。这些结果将为深入研究斑马鱼以及脊椎动物胰蛋白酶原基因的进化和生理功能提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼和样品

实验用健康成年野生型斑马鱼购自花鸟鱼市场。用曝气除氯的自来水饲养于实验室的鱼缸中, 用加热棒控制水温在 24 °C, 控制昼夜时间比为 14 h: 10 h。取样时, 先冰上麻醉斑马鱼, 然后小心取出适量用于基因克隆和组织表达所需样品。样品立即置入预冷的含有 1.0 mL Trizol 的离心管中进行总 RNA 提取。所用各种试剂、消耗品和容器均用 DEPC 处理, 解剖器具和玻璃器皿经 180 °C 烘烤 3 h, 以灭活 RNA 酶。

### 1.2 试剂

Trizol Reagent 购自 Invitrogen (USA) 公司; E. Z. N. A 胶回收试剂盒为 Omega 公司产品; Taq DNA Polymerase、DNase I 购自 Fermentas (USA) 公司; ReverTra Ace- $\alpha$  First-strand cDNA Synthesis Kit 为 Toyobo (Japan) 公司产品。PCR 所用引物和 DNA 测序均由上海英俊生物技术有限公司完成; 其余均为国产分析纯试剂。

### 1.3 斑马鱼胰蛋白酶原基因的克隆

用 Trizol 法提取斑马鱼肝脏总 RNA, 260 nm 下的吸光值衡量 RNA 的浓度, 然后用  $w = 0.8\%$  琼脂糖凝胶, 通过 28S 和 18S 条带的亮度来判断总 RNA 完整性。按照 ReverTra Ace- $\alpha$  First-strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。

对 NCBI GenBank 中已登录的鱼类胰蛋白酶原 cDNA 序列进行比对, 在保守区域设计一对引物 (TryF1 和 TryR1) 进行斑马鱼胰蛋白酶原基因的克隆。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 3 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环后 72 °C 延伸 10 min。根据所获得中间片段序列设计特异引物, 结合 RACE 试剂盒接头引物 AAP 和 AUAP, 进行 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增。将扩增得到的 PCR 产物在  $w = 1.5\%$  琼脂糖凝胶上电泳分离 DNA 片段, 并在紫外光下回收目的条带, 用 E. Z. N. A 胶回收试剂盒纯化目的产物并进行测序。

表 1 用于斑马鱼胰蛋白酶原基因 cDNA 克隆和 RT-PCR 所需引物

Table 1 Primers used for zebrafish trypsinogens gene cloning and expression analysis

引物	序列
扩增保守区域引物	
TryF1	5'GTGCTCTGCTGCTCACTGCTAC 3'
TryR1	5'CCACCAGAGTCACCCTGGCA 3'
克隆 zftry1 3'-RACE 所需引物	
TryF1	5'GTGCTCTGCTGCTCACTGCTAC 3'
zftry1aF2	5'CCAACTATGACTCGTGGGATC 3'
zftry1bF2	5'CCAACTATGACTCCTGGACCA 3'
克隆 zftry1 5'-RACE 所需引物	
TryR1	5'CCACCAGAGTCACCCTGGCA 3'
zftry1aR2	5'ATGTCACTGTCAAGATCCCAC 3'
zftry1bR2	5'CTGTCAATGGTCCAGGAGTCA 3'
通用引物	
AP	5'GGCCACGCGTCGACTAG TACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
AUAP	5'GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'
AAP	5'GGCCACGCGTCGACTA GTACGGGGGGGGGG 3'
zftry2 ORF 克隆所需引物	
zftry2ORF-F	5'CCACTCAACAGCTTACCATTG 3'
zftry2ORF-R	5'AACACGCCATGATAACGACCTC 3'
组织分布引物	
zftry1aF3	5'AACAGGTTCAATCAGCAGTC 3'
zftry1aR3	5'TTTGGAGGCTGTATGTGACTTC 3'
zftry1bF3	5'GTCATGAGGTCTTTGGTGTTTC 3'
zftry1bR3	5'CTATAAAGCTGTA TGTGATCAAGA 3'
zftry2F	5'GGTGTTCATACCAGGTGTCTC 3'
zftry2R	5'TCTGACCAGGCTAGCGCTTTC 3'
18S-F	5'CCTGAGAAACGGCTACCACATCC3'
18S-R	5'AGCAACTTTAGTATA CGCTATTGGAG3'

#### 1.4 序列分析

用 DNAtools 6.0 对开放阅读框进行分析并翻译成蛋白质; 利用 SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>) 进行信号肽的预测; 采用 Clustalx 1.83 软件对多个物种胰蛋白酶原氨基酸序列进行比对, 并用 DNASTAR 软件对各序列

的同源性进行计算; 运用 Mega 3.1 软件, 采用 Neighbor-Joining 法构建脊椎动物胰蛋白酶原蛋白的系统进化树。

#### 1.5 斑马鱼 3 种胰蛋白酶原基因的组织表达分析

提取脑、肝脏、心脏、肌肉、卵巢、脾脏和肠组织的总 RNA, 经 DNase I 处理后, 按照 ReverTra Ace- $\alpha$  First-strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书, 用 1  $\mu$ g RNA 进行反转录。PCR 扩增前, 分别对退火温度和循环数进行优化。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, PCR 程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min。同时, 以 18S rRNA 为内参, PCR 程序同上, 循环数改为 30。PCR 反应结束后, 分别取 5  $\mu$ L 扩增产物进行  $w = 1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳, 用 Alphamager EP (Alpha Innotech, USA) 凝胶成像系统对电泳图像进行拍照和分析。

## 2 结果

### 2.1 斑马鱼胰蛋白酶原 cDNA 克隆

以斑马鱼肝脏总 RNA 为模版, 首先进行斑马鱼胰蛋白酶原基因保守区域的克隆, 得到一条 428 bp 的 DNA 片段, 通过测序我们得到两条相似的序列。然后针对这两个序列的差异设计特异性引物分别进行 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增。把各得到 3 个序列进行拼接得到两条斑马鱼胰蛋白酶原 cDNA 全长序列, 分别命名为 zftry1a 和 zftry1b。zftry1a cDNA 全长 891 bp, 包含一段编码 242 个氨基酸残基的 729 bp 开放读码框 (ORF), 一段 53 bp 的 5'非编码区 (5'-UTR) 和一段 109 bp 的 3'-UTR (GenBank 登录号: JQ999996)。zftry1b cDNA 全长 858 bp, 其中包含一段编码 242 个氨基酸残基的 729 bp ORF, 一段 36 bp 的 5'-UTR 和一段 93 bp 的 3'-UTR (GenBank 登录号: JQ999997)。

以人胰蛋白酶原基因和 zftry1a 或 zftry1b 蛋白序列作为种子序列, 选择 tblastn 比对工具在斑马鱼基因组中进行同源比对, 结果搜索到一条同源性较高的基因 (ENSDART00000077661)。根据设计的特异性引物在斑马鱼肝脏中克隆得到了胰蛋白酶原 2 (zftry2) 的 ORF 全长。zftry2 cDNA ORF 全长 744 bp, 编码 247 个氨基酸残基 (GenBank 登录号: JQ999998)。

### 2.2 斑马鱼 3 种胰蛋白酶原的基本特征分析

预测的 zftry1a 和 zftry1b 相对分子质量均 26 400, 等电点 PI 分别为 4.94 和 4.93, 预测的信号肽由 15 个氨基酸组成, 为 MRSLVFLVLL-

GAAFA, 激活肽含有 5 个氨基酸残基, 为 LDDDK。zftry1a 和 zftry1b 在 PH 7.0 下带电荷量分别为 -8.608 和 -6.944。预测的 zftry2 相对分子质量 26500, PI 为 7.46, 15 个氨基酸组成的信号肽 MKAFILLALFAVAYA, 激活肽由 9 个氨基酸残基组成, 为 APLGDDDDK。在 PH 7.0 下带电荷量 +1.209。

### 2.3 氨基酸序列比对和同源性分析

氨基酸序列比对分析发现 (图 1), 斑马鱼 3 种胰蛋白酶原均具有胰蛋白酶原的保守结构特征: 胰蛋白酶催化活性必需的高度保守的催化三联体氨基酸 (His-57, Asp-102 和 Ser-195); 位于底物结合口袋底部的 Asp-189 和口袋开口处的 Gly-216、Gly-226; 具有构成 6 个二硫键所需的 12 个半胱氨酸残基; 决定结合底物特异性的一个关键氨基酸

Tyr-172; 丝氨酸蛋白酶的典型特征序列即位于催化活性部位丝氨酸附近的氨基酸 (Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro) 等。

利用 MegAlign 进行同源性分析显示, zftry1a 和 zftry1b 的同源性高达 96.7%, zftry2 与 zftry1a 和 zftry1b 的同源性为 64.9%。zftry1a 和 zftry1b 与草鱼、青鳉、牙鲆、日本鳗鲡和金头鲷的同源性 (77.3%~88.8%) 高于 zftry2 与它们的同源性 (60.7%~67.4%), 而 zftry1a 和 zftry1b 与翘嘴鲌、石斑鱼和胡瓜鱼的同源性 (64.9%~66.9%) 低于 zftry2 与它们的同源性 (78.8%~89.9%), zftry1a 和 zftry1b 与大西洋鲑鱼和红鳍东方鲀的同源性 with zftry2 与它们的同源性接近, 均低于与上述鱼类的同源性 (表 2)。

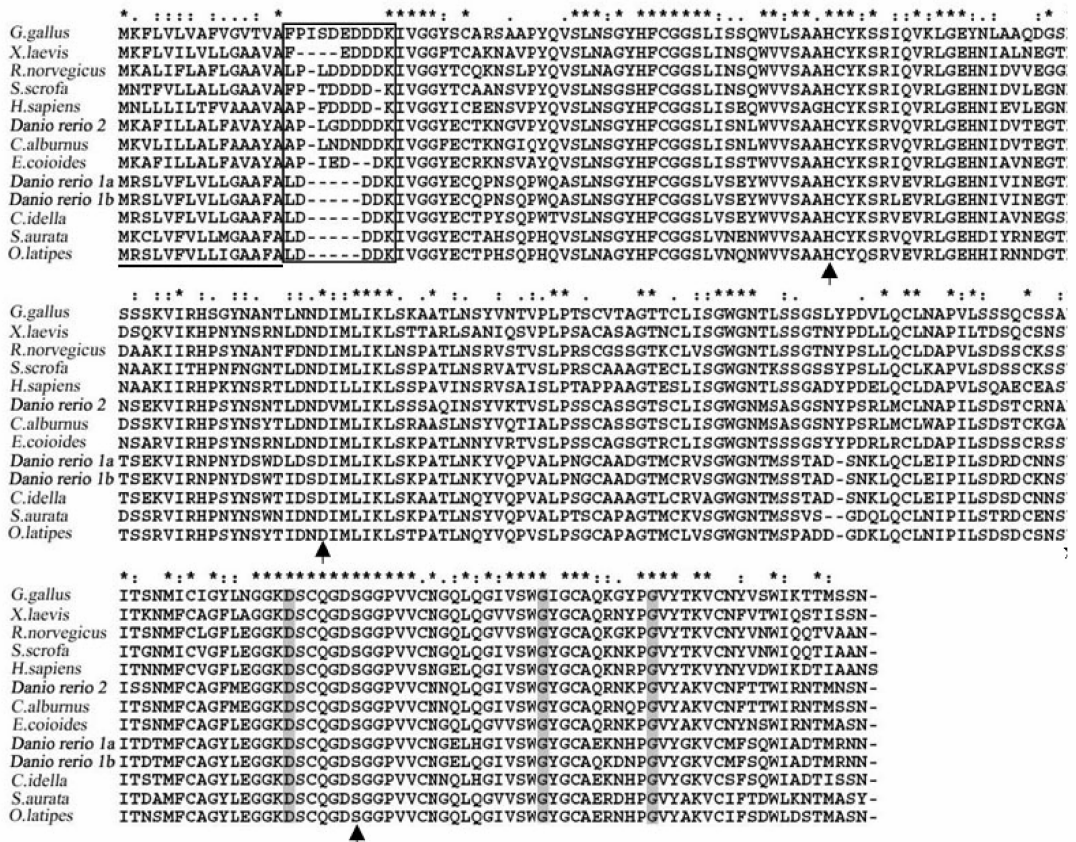


图 1 斑马鱼与其它部分物种的胰蛋白酶原的氨基酸序列比对

Fig.1 Alignment of the deduced amino acid sequences of zebrafish trypsinogens and some other vertebrate trypsinogens deposited in Gen Bank

一致的、高度保守度的和低保守度的氨基酸分别用“\*”，“：”，“.”标出；

激活肽用方框标出，催化三联体氨基酸用上箭头表示；

底物结合口袋 S1 底部天冬氨酸和 S2 开口处的两个甘氨酸用阴影表示

表 2 斑马鱼 3 种胰蛋白酶原与其它部分鱼类的氨基酸相似度

Table 2 Amino acid sequence percent identity of zebrafish trypsinogens compared to several fish

物种	GenBank 登录号	氨基酸相似度/%		
		zftry1a	zftry1b	zftry2
草鱼 <i>C. idella</i>	ACS71745	88.8	87.2	67.4
青鳉 <i>O. latipes</i>	NP_001098370	78.1	77.7	66.9
牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	BAA82362	81.0	79.8	60.7
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	BAI59110	77.3	77.3	62.4
金头鲷 <i>S. aurata</i>	ABX89621	77.6	77.6	67.2
翘嘴鲌 <i>C. alburnus</i>	ACS71744	66.1	66.5	89.9
石斑鱼 <i>E. coioides</i>	ADG29127	66.9	66.9	83.7
胡瓜鱼 <i>O. mordax</i>	ACO09805	64.9	64.9	78.8
大西洋鳕鱼 <i>G. morhua</i>	CAD30543	46.7	46.3	45.7
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i>	AAU06120	56.2	55.8	51.4

2.4 系统进化分析

从 GenBank 上获得已知的脊椎动物胰蛋白酶原的氨基酸序列经 ClustalW 方法比对后，利用 Mega3.1 以邻位相接 (N-J) 构建系统进化树 (图 2)。由图可以得出鱼类胰蛋白酶原分为三支 (Group I、II、III)，按照 Roach *et al* (2002) 有关脊椎动物胰蛋白酶原的聚类方法<sup>[13]</sup>，斑马鱼 zftry1a 和 zftry1b 位于硬骨鱼类 group I，属于阴离子型胰蛋白酶原。斑马鱼 zftry2 位于 group II，属于阳离子型胰蛋白酶原。

2.5 斑马鱼 3 种胰蛋白酶原基因的组织表达

采用 RT-PCR 方法，以 18S 作为内参，对 3 种胰蛋白酶原基因在成年斑马鱼脑和 6 个外周组织中的表达进行了检测。结果如图所示 (图 3)，3 种

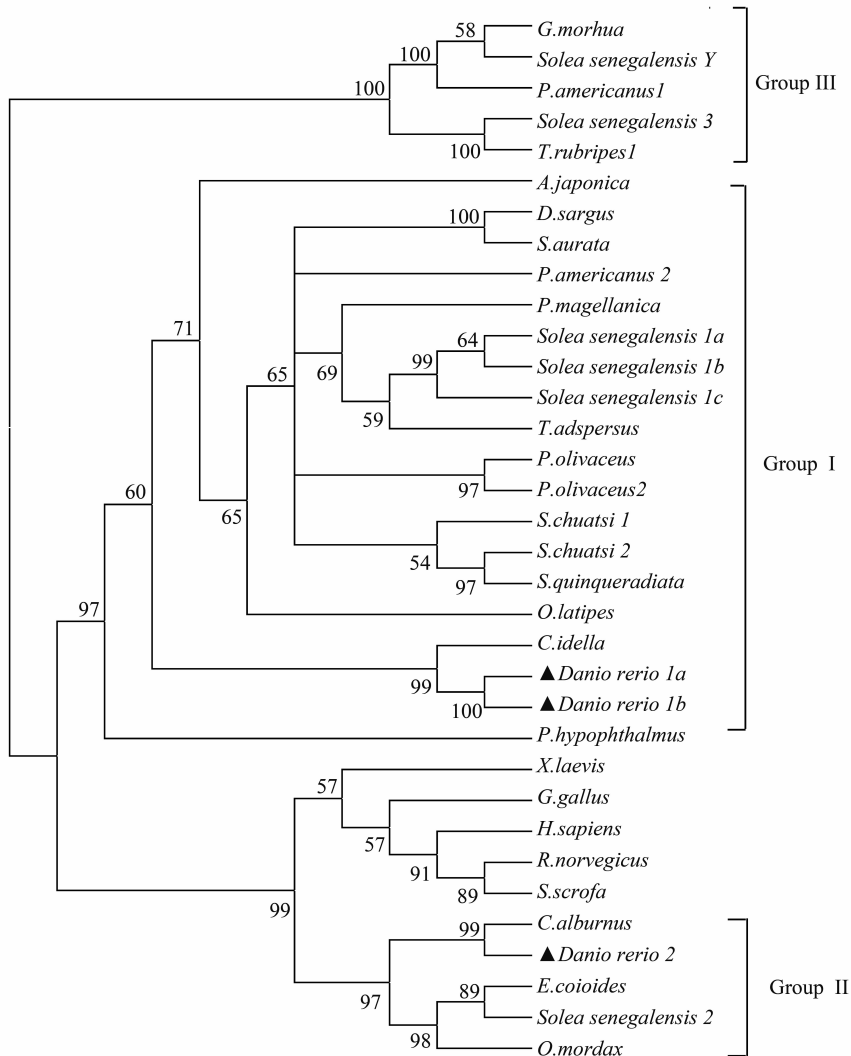


图 2 胰蛋白酶原的进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree based upon the alignment of amino acid sequences from a wide range of vertebrates 各物种胰蛋白酶原序列均来自 GenBank 数据库，采用 Mega3.1 软件 (Neighbor-Joining 法) 构建；图中各分支数值代表置信度 (%)；斑马鱼 3 种胰蛋白酶原用 ▲ 标出

胰蛋白酶原基因表达分布基本类似, 在肠中的表达量均显著高于其他组织, 特别是 *zftry1a* 和 *zftry1b*。同时, 在脾脏中没有检测到三者基因的表达。但是, *zftry1a* 和 *zftry1b* 不同的是, 除在脾脏没有检测到表达之外, 在肌肉中也没有检测到其 mRNA 分布。

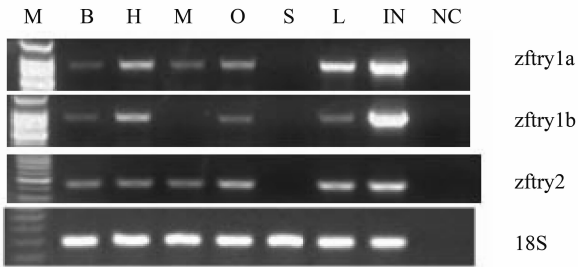


图 3 RT-PCR 方法检测胰蛋白酶原基因在成年斑马鱼各组织中的表达

Fig. 3 RT-PCR analysis of the expression of trypsinogens mRNA in the adult zebrafish tissues.

18S 作为内参基因, 双蒸水代替 cDNA 模板作为阴性对照。M: 100 bp DNA 相对分子质量标准; B: 脑; H: 心脏; M: 肌肉; O: 卵巢; S: 脾脏; L: 肝脏; IN: 肠; NC: 阴性对照

### 3 讨论

本文利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 结合基因组数据库, 成功克隆得到了编码斑马鱼 3 种胰蛋白酶原的 cDNA 序列, 并对其蛋白结构、同源性和进化关系以及组织表达进行了研究。根据蛋白质序列以及同源性分析主要归为两类: *zftry1* (*zftry1a* 和 *zftry1b*) 和 *zftry2*。分析发现, 斑马鱼 3 种胰蛋白酶原均具有: 催化活性必需的高度保守的催化三联体氨基酸 (His-57, Asp-102 和 Ser-195); 位于底物结合口袋底部的 Asp-189 和口袋开口处的 Gly-216、Gly-226; 具有构成 6 个二硫键所需的 12 个半胱氨酸残基; 决定结合底物特异性的一个关键氨基酸 Tyr-172; 丝氨酸蛋白酶的典型特征序列即位于催化活性部位丝氨酸附近的氨基酸 (Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro)。功能氨基酸以及基序的一致性表明斑马鱼 3 种胰蛋白酶原功能的保守性。Hedstrom 等<sup>[14]</sup>研究发现丝氨酸蛋白酶所形成的两个口袋 (S1 和 S2) 对底物的结合至关重要。比对发现, 斑马鱼 3 种胰蛋白酶原形成 S1 口袋的氨基酸组成完全相同, 但是组成 S2 口袋的氨基酸略有差异。这些结果提示, 斑马鱼 3 种胰蛋白酶可能有不同的

底物选择特异性。

胰蛋白酶原被合成和分泌后, 在小肠中存在  $\text{Ca}^{2+}$  情况下被肠激酶切去激活肽转变成有活性的胰蛋白酶<sup>[2]</sup>。肠激酶能够识别包含一簇阴离子氨基酸残基的激活肽<sup>[15]</sup>。在大部分鱼类中激活肽包含 3 个酸性氨基酸 (D 或 E), 而在哺乳动物中则是连续 4 个天冬氨酸<sup>[1]</sup>。我们的氨基酸序列比对发现, 斑马鱼 *zftry1* 和 *zftry2* 的激活肽长度和组成氨基酸不同。*zftry1a* 和 *zftry1b* 激活肽含有 3 个酸性氨基酸残基簇 (DDD), 而 *zftry2* 与哺乳动物类似, 含有 4 个天冬氨酸组成的激活肽。这与我们进化分析的结果相一致, *zftry1a* 和 *zftry1b* 归为 group I, 属于阴离子型胰蛋白酶; 斑马鱼 *zftry2* 位于 group II, 属于阳离子型胰蛋白酶。这些不同物种的激活肽序列及其组成的差别可能是由于在进化过程中选择性压力造成的结果<sup>[16]</sup>。

目前, 在海水鱼类冬鲷<sup>[10]</sup> 和塞内加尔鲷<sup>[11]</sup> 中分别已克隆得到 2 和 6 种编码胰蛋白酶原的 cDNA 序列。目前在淡水鱼类中还没有发现多种胰蛋白酶原基因。本文通过 RT-PCR 结合基因组数据库成功克隆到 3 种斑马鱼胰蛋白酶原基因。组织表达分析发现, 3 种胰蛋白酶原基因在肠中表达量最高, 提示其主要具有消化功能。另外, 尽管同属阴离子型, *zftry1a* 和 *zftry1b* 的组织表达分布也略有差异, *zftry1a* 在肌肉有表达, 而 *zftry1b* 则无, 这表明二者在组织中可能存在功能差异。一个有意思的结果是, 在脑中均检测到了三者的表达, 且 *zftry2* 的表达量要高于 *zftry1a* 和 *zftry1b* 的表达量。这与在塞内加尔鲷中得到的结果相一致<sup>[11]</sup>。尽管 6 种塞内加尔鲷胰蛋白酶原基因 (*ssetryp1*, *ssetryp1a*, *ssetryp1b*, *ssetryp1c*, *ssetryp2*, *ssetryp3*, *ssetrypY*) 在脑中都有表达, 但是以 *ssetryp2* 的表达量为最高, 分别是 *ssetryp1* 和 *ssetrypY* 表达量的 8.7 和 69.3 倍。因为 *zftry2* 和 *ssetryp2* 同属阳离子型胰蛋白酶, 是否阳离子型胰蛋白酶在脑中有着特殊的功能还需要进一步研究。总之, 胰蛋白酶原基因组织表达的广泛性以及在同一组织中各基因表达量的差异表明胰蛋白酶除了扮演主要的消化功能外, 在神经系统<sup>[17]</sup>、生殖系统<sup>[18]</sup>等都具有一定的功能。

一般而言, 鱼类蛋白质消化酶和代谢酶活性越高, 其对营养物质的消化吸收和利用的能力越强, 从而提高其生长发育的速度。目前对胰蛋白酶的研究还主要集中在基本特性分析和基因克隆上, 对相关营养物质对胰蛋白酶的表达调控研究相对较少。王桂芹等最近研究认为饲料能量和维生素 B6 对肝

脏蛋白酶活性有影响, 但是否对胰蛋白酶的表达调控有无影响还未知<sup>[19]</sup>。要想进一步了解斑马鱼 3 种胰蛋白酶原基因的表达调控机制, 启动子序列的克隆则是必须的。

总之, 本文克隆得到了 3 种斑马鱼胰蛋白酶原基因。氨基酸序列比对和进化树分析表明, 三者在功能上是保守的, 且 zft1a 和 zft1b 属于阴离子型胰蛋白酶原, zft2 属于阳离子型胰蛋白酶原。RT-PCR 结果显示, 三者的组织表达模式略有不同, 提示它们的功能既有共性又有特异性。

### 参考文献:

- [1] RUAN Guoliang, LI Yang, GAO Zexia, et al. Molecular characterization of trypsinogens and development of trypsinogen gene expression and tryptic activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and topmouth culter (*Culter alburnus*) [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2010, 155 (1): 77–85.
- [2] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长发. 生物化学 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 405.
- [3] CHEN J M, KUKOR Z, LEMARECHAL C, et al. Evolution of trypsinogen activation peptides [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(11): 1767–1777.
- [4] RUST M B. Nutritional physiology [M] // HALVER J E, HARDY R W. *Fish nutrition*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2002: 367–452.
- [5] RYPNIEWSKI W, PERRAKIS A, VORGIAS C E, et al. Evolutionary divergence and conservation of trypsin [J]. *Protein Eng*, 1994, 7 (1): 57–64.
- [6] GUDMUNSDOTTIR A, GUDMUNSDOTTIR E, OSKARSSON S, et al. Isolation and characterization of cDNAs from Atlantic cod encoding two different forms of trypsinogen [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 217 (3): 1091–1097.
- [7] SUZUKI T, SRIVASTAVA A S, KUOKAWA T. cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2002, 131 (1): 63–70.
- [8] GENICOT S, RENTIER – DELRUE F, EDWARDS D, et al. Trypsin and trypsinogen from an Antarctic fish: molecular basis of cold adaptation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1298 (1): 45–57.
- [9] KUOKAWA T, SUZUKI T, OHTA H, et al. Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *Fish Sci*, 2002, 68 (4): 736–744.
- [10] DOUGLAS S E, GALLANT J W. Isolation of cDNAs for trypsinogen from the winter flounder, *Pleuronectes americanus* [J]. *J Mar Biotechnol*, 1998, 6 (4): 214–219.
- [11] MANCHADO M, INFANTE C, ASENSIO E, et al. Molecular characterization and gene expression of six trypsinogens in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) during larval development and in tissues [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008, 149 (2): 334–344.
- [12] PSOCHIOU E, SARROPOULOU E, MAMURIS Z, et al. Sequence analysis and tissue expression pattern of *Sparus aurata* chymotrypsinogens and trypsinogen [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007, 147 (3): 367–377.
- [13] ROACH J C. A clade of trypsins found in cold-adapted fish [J]. *Proteins*, 2002, 47(1): 31–44.
- [14] HEDSTROM L, SZILAGYI L, RUTTER W J. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops [J]. *Science*, 1992, 255 (5049): 1249–1253.
- [15] LOUVAR D M N, PUIGSERVER A. On bovine and porcine anionic trypsinogens [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 371 (1): 177–185.
- [16] ROACH J C, WANG K, GAN L, et al. The molecular evolution of the vertebrate trypsinogens [J]. *J Mol Evol*, 1997, 45 (6): 640–652.
- [17] KOSHIKAWA N, HASEGAWA S, NAGASHIMA Y, et al. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153 (3): 937–944.
- [18] MIURA C, OHTA T, OZAKI Y, et al. Trypsin is a multifunctional factor in spermatogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (49): 20972–20977.
- [19] 王桂芹, 李子平, 牛小天, 等. 饲料能量和维生素 B6 对乌鳢生长和蛋白质代谢酶活性的影响 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2012, 50(4): 96–99.