

## 猪 *Cystatin B* 基因 cDNA 克隆及遗传多态性分析

陈 磊, 李学伟, 朱 砾, 李 强, 李明洲

(四川农业大学动物科技学院, 四川雅安 625014)

**摘要:** 【目的】研究猪肉嫩度性状候选基因 - 半胱氨酸蛋白酶抑制素 B (*Cystatin B*, *CSTB*) 基因对肌肉宰后嫩化的作用, 为研究嫩度性状的遗传机理提供理论基础。【方法】采用 RT-PCR 结合克隆测序的方法, 从猪肌肉组织总 RNA 中克隆到猪 *CSTB* 基因 cDNA 序列, 并推导出其编码的氨基酸序列。采用 PCR-RFLP 方法, 分析了 84 头猪 *CSTB* 基因多态性及其与嫩度性状的关联性。【结果】*CSTB* 基因开放阅读框全长 294 bp, 编码 98 个氨基酸。同源分析结果表明, 猪与人、鼠、牛的 *CSTB* 基因 cDNA 编码区 (CDS) 同源性分别为 81%、85% 和 89%, 推测氨基酸序列同源性为 83%、76% 和 85%。蛋白质结构同源建模分析表明, 该蛋白与人、鼠 *Cystatin B* 类似, 具有 stefin 类蛋白酶抑制剂的典型空间结构, 包括 5 条平行的  $\beta$ -sheet 和负责与被抑制酶结合的楔形边缘。在 *CSTB* 基因第二内含子内 *PvuII* 酶切位点检测到了 AA、AB 和 BB 这 3 种基因型, 关联性分析表明 AA 基因型个体的各项嫩度指标均极显著低于另 2 种基因型的个体 ( $P < 0.01$ ), 最大剪切力为 5.11 kg, 硬度值为 19.31 kg·s、平均剪切力为 3.26 kg。【结论】*CSTB* 基因在不同物种间具有较高同源性, 猪 *CSTB* 基因多态性与猪肉嫩度性状显著相关。

**关键词:** 猪; *Cystatin B* 基因; 基因克隆; 嫩度

## Cloning, Characterization and Polymorphism of the Porcine (*Sus Scrofa*) *Cystatin B* Gene

CHEN Lei, LI Xue-wei, ZHU Li, LI Qiang, LI Ming-zhou

(College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan)

**Abstract:** 【Objective】The effects of the porcine *cystatin B* (*CSTB*) gene on postmortem tenderization of pork were studied in order to understand genetic mechanism of tenderness traits. 【Method】Utilizing technique of RT-PCR and sequencing, the nucleotide and deduced amino acid sequence of the porcine *CSTB* gene were obtained in this study. And the polymorphisms of porcine *CSTB* gene was detected in 84 pigs by PCR-RFLP. Based on the polymorphism detection, the influence of *CSTB* genotype on tenderness traits were analyzed. 【Result】The open reading frames of the *CSTB* gene were 294bp in length (encoding 98 amino acids). The nucleotide sequence identities of porcine *CSTB* Complete Coding Sequence (CDS) were 81%, 85% and 89% compared to that of human, rat, and bovine *CSTB* CDS, respectively. The deduced amino acid sequence identities of the porcine *CSTB* protein were 83%, 76%, and 85% compared to that of rat, human, and bovine *CSTB* proteins, respectively. The structure of *CSTB* protein predicted by homologous modelling was similar to the results observed previously in humans and mouse. The five-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet and the wedge shaped edge were found in the model structure. The genotype AA in *CSTB* gene *PvuII* locus had significantly lower shear force (5.11 kg), toughness (19.31 kg·s) and mean shear force (3.26 kg) than genotype AB and BB ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】These results indicated that the homology of *CSTB* was high between species. There were significant correlation between the polymorphisms of porcine *CSTB* gene and the tenderness traits.

**Key words:** Pigs; *Cystatin B* gene; Gene cloning; Tenderness

收稿日期: 2007-05-08; 接受日期: 2007-08-26

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”(IRT0555-6); 国家科技支撑计划课题(2007BAD51B03); 教育部高等学校博士学科点专项基金项目(20060626003); 四川省科技厅“十一五”畜禽育种攻关项目(2006-YZGG-15)

作者简介: 陈 磊(1980-), 男, 四川成都人, 博士, 研究方向为猪数量遗传与分子育种。E-mail: sicau.chen@gmail.com。通讯作者李学伟(1963-), 男, 重庆人, 教授, 博士, 研究方向为动物遗传育种。Tel: 0835-2886000; E-mail: lixuewei@ya-public.sc.cninfo.net

## 0 引言

【研究意义】嫩度是肉类食物最重要的食用品质之一,是口感惬意程度的综合指标。调查研究发现 78% 的法国消费者认为嫩度是决定其消费的一个重要因素,口感和气味分别为 83%和 77%<sup>[1]</sup>。猪肉嫩度与消费者对猪肉制品的接受度之间有很高的相关性 ( $r=0.81$ ),远远高于口感 ( $r=0.67$ )、异味 ( $r=-0.43$ ) 和多汁性 ( $r=0.38$ )<sup>[2]</sup>。长期以来,嫩度一直是畜禽育种和肉类科学研究领域内的重要课题,通过候选基因法研究嫩度性状的遗传机理对控制肉制品嫩度与口感有重要意义。【前人研究进展】Cystatin B(又称为 stefin B,简称 CSTB)是半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteinase)的一类特异性可逆抑制因子,广泛分布于多种组织中<sup>[3]</sup>,是最重要的胞内组织蛋白酶抑制剂之一<sup>[4]</sup>。半胱氨酸蛋白酶抑制因子超家族包括 stefin、cystatin 和 kininogen 这 3 类成员<sup>[5]</sup>。CSTB 属于结构最简单的 stefin 家族,由一条长度约为 100 个氨基酸的多肽链构成,不含二硫键和糖基,分子量 11~12 kD<sup>[6]</sup>。CSTB 最早是做为一种组织蛋白酶 B (Cathepsin B) 的特异性抑制因子而被发现<sup>[7]</sup>,随后的研究发现它对组织蛋白酶 B、D、H、S 甚至植物体内的木瓜蛋白酶都有较强的抑制作用<sup>[8]</sup>。在肉类食物中蛋白水解与其嫩度高度相关<sup>[9]</sup>,因此 Russo 等<sup>[10]</sup>提出应将 *CSTB* 作为影响猪肉嫩度性状的候选基因加以研究。动物屠宰后,肌纤维溶酶体破裂,释放出大量组织蛋白酶,包括 Cathepsin B、H、K、L、S 等,它们对肌肉蛋白质有广泛的水解作用,能降解肌球蛋白、肌钙蛋白、原肌球蛋白和肌动蛋白<sup>[11]</sup>。细胞中含有组织蛋白酶抑制因子,这些抑制剂在活体内能保护细胞免受不恰当的蛋白水解作用的伤害<sup>[4]</sup>,在细胞死亡后仍能有效降低组织蛋白酶活性,抑制肌肉蛋白水解。CSTB 还参与体内多种生理过程,与疾病的发生有关,如肿瘤<sup>[12]</sup>、癫痫<sup>[13]</sup>等。CSTB 蛋白早在 1982 年和 1984 年就分别从人脾脏<sup>[14]</sup>和肝脏<sup>[15]</sup>中被纯化出来,1983 年首先测定了鼠 *CSTB* 的氨基酸序列<sup>[16]</sup>,随后报道了人 *CSTB* 的氨基酸序列<sup>[17]</sup>、cDNA 序列<sup>[18]</sup>以及空间结构<sup>[19]</sup>。由于 stefin 家族在进化上的保守性,上述研究结果对猪 *CSTB* 的研究有非常重要的参考价值。【本研究切入点】本试验从猪 *CSTB* 的 cDNA 编码序列入手,对该基因的同源性、遗传结构以及遗传多态性等内容进行了研究。【拟解决的关键问题】通过序列分析与多态性分析,为进一步探索 *CSTB* 的遗传效应提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验选用 8 头梅山猪 (Meishan pig, M)、8 头长白猪 (Landrace, L)、62 头杜洛克×(长白×大约克)的三元杂交猪 (DLY pig, DLY) 以及 6 头长梅二元杂交猪 (L×M, LM), 2 个品种、2 个杂交群体共 84 头猪作为试验动物,在相同条件下饲养管理,根据适时屠宰的要求,各品种(杂交组合)的屠宰月龄在 5~6 月龄,屠宰体重在 55~100 kg 之间。所有样本均来自四川农业大学教学试验猪场。

总 RNA 抽提试剂 TRIZOL 购自 Invitrogen 公司;反转录酶 ReverTra Ace 购自 TOYOBO 公司;PCR 预混试剂 Master Mix 购自 Tiangen 公司;载体试剂盒购自 TAKARA 公司。

### 1.2 EST 电子克隆和分析

以人的 *CSTB* 基因序列 (NM\_000100) 为种子,利用 Blast 程序,在 Tigr 数据库 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>) 中检索,钓取到 38 条在猪体内表达的相似序列。加工去掉载体序列后,将这些序列聚为一类,然后利用 Cap3 在线拼接软件进行拼接,得到一条长 588 bp 的目的序列 Contig。然后将 Contig 提交至 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf.html>),分析可能的 ORF。

### 1.3 电子克隆序列的 RT-PCR 验证

以 Contig 序列为参考,在阅读框起始密码子和终止密码子两侧设计一对引物 CSN1U、CSN1L (表 1),引物由 Invitrogen 公司合成。

以提取的总 RNA 为模板,用 TOYOBO ReverTra Ace 反转录酶合成 cDNA,并扩增看家基因  $\beta$ -actin 加以验证。然后以该 cDNA 为模板,CSN1U、CSN1L 为引物进行扩增。扩增体系为 100  $\mu$ l: Master Mix 50  $\mu$ l,引物各 1  $\mu$ l (20 pmol· $\mu$ l<sup>-1</sup>),模版 cDNA 7  $\mu$ l,其余用灭菌超纯水补足体积。PCR 反应条件为:95℃预变性 4 min,进入以下循环,94℃变性 30 s、58℃退火 30 s、72℃延伸 45 s,循环 35 次以后 72℃延伸 10 min 结束反应。产物经柱式胶回收试剂盒进行纯化回收,克隆到 JM109 大肠杆菌中,送上海 Invitrogen 公司测序。

以 *CSTB* 基因编码区片段测序结果为参考,设计一条上游特异性引物 3RACE (表 1),用于扩增 *CSTB* 基因 3'端序列。以提取的总 RNA 为模板,Oligo dT-adaptor 为引物合成 cDNA。然后以该 cDNA 为模板,3RACE、M13 Primer M4 为引物进行扩增。扩增

体系同上, 反应条件为: 95℃预变性 4 min, 进入以下循环, 94℃变性 30 s、55℃退火 30 s、72℃延伸 45 s, 循环 35 次以后 72℃延伸 10 min 结束反应。产物纯化回收后, 同样克隆到 JM109 大肠杆菌中, 送上海 Invitrogen 公司测序。

#### 1.4 测序结果分析

将测序结果与测序峰图结合进行校对, 纠正读取错误后输入 Bioedit 软件, 查找开放阅读框并翻译成氨基酸序列。同源性分析选用 NCBI 的 Blast 服务器和 Clustal W 软件。核酸序列与其它物种比对后, 参考人和小鼠 *CSTB* 基因 mRNA 的组装结果, 确定内含子剪切位点。氨基酸序列的等电点、半衰期、分子量预测采用 ExPasy 服务器 (<http://au.expasy.org/tools/>) 相关软件。

#### 1.5 蛋白功能域和高级结构预测

将序列提交到 ExPASy ScanProsite、HNN、SWISS-MODEL 服务器, 分别预测所编码蛋白的功能域和

高级结构。

#### 1.6 多态性分析

通过对已公布的猪 *CTSB* 基因组 DNA 序列 (AJ315562、AJ315563) 进行分析, 发现一处 G→A 突变位于 *CSTB* 基因第二内含子内, 并产生了一个 *PvuII* 酶的切割位点, 可以利用 PCR-RFLP 的方法检测该位点多态性。设计引物 CYS-2F 与 CYS-2R (表 1), PCR 反应体系为 10 μl: Master Mix 5 μl, 引物 1 μl (20 pmol·μl<sup>-1</sup>), 模板总 DNA 1 μl, 其余用灭菌超纯水补足体积。PCR 反应条件为: 95℃预变性 4 min, 进入以下循环, 94℃变性 30 s、56℃退火 30 s、72℃延伸 45 s, 循环 35 次以后 72℃延伸 10 min 结束反应。

PCR 反应产物由内切酶 *PvuII* 酶消化 4 h。反应体系为 10 μl, 其中扩增产物 1 μl, 内切酶 1 μl, Buffer 1 μl, 灭菌超纯水 7 μl。酶切产物用 12%聚丙烯酰胺凝胶检测基因型。

表 1 *CSTB* 基因引物信息表

Table 1 Primer pairs designed for *CSTB* gene

编号 No.	引物序列 (5'-3') Sequence of primer (5'-3')	引物用途 Primer usage	引物位置 Primer position
CSN2F	CACCGCCACGATGATGT	扩增 CDS 区 Amplify CDS	EF397605 1~17
CSN2R	GCCTGCTTTTGTGTGCTG	扩增 CDS 区 Amplify CDS	EF397605 266~284
3RACE	GCTGGAGGAGAAGGAGAATAAGAC	扩增 3'UTR 区 Amplify 3'UTR	EF397605 88~111
Oligo dT	CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN	反转录 mRNA Reverse transcription	
3-site	3'CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	扩增 3'UTR 区 Amplify 3'UTR	
CYS-2F	GAAGGCTGGGCGTGTTCATC	扩增多态片段 Amplify polymorphism fragment	AJ315562 1~19
CYS-2R	GGTCAAGGGCTTGTCTCGTG	扩增多态片段 Amplify polymorphism fragment	AJ315562 209~229

EF397605, 猪 *CSTB* 基因 mRNA 序列 (本试验); AJ315562, 猪 *CSTB* 基因外显子三部分序列 (10)

EF397605, *Sus scrofa Cystatin B* gene mRNA (this study); AJ315562, *Sus scrofa* partial *CSTB* gene for *cystatin B*, exon 3, allele 1 (10)

#### 1.7 嫩度性状测定

猪屠宰后 45 min 内采集眼肌样品, 于倒数 3~4 肋骨处, 沿肌肉走向割取长度为 12 cm 的肉块, 肉块横切面积应大于 16 cm<sup>2</sup>, 如眼肌横切面积不足 16 cm<sup>2</sup>, 则将整个横切面取下。眼肌样本带回实验室后, 于 4℃贮藏 72 h 进行嫩化。处理完成后, 取中心温度为 0~4℃的肉样, 放入功率为 1 500 W 恒温水浴锅中 80℃加热, 同时用电耦测温仪 (TES-1312 型, 泰仕电子, 台北) 测量肉样中心温度。待肉样中心温度达到 70℃时, 将肉样取出冷却至中心温度为 0~4℃。用直径为 1.27 cm 的圆形取样器沿与肌纤维平行的方向钻切肉样, 孔样长度不少于 2.5 cm, 取样位置应距离样品边

缘不少于 5 mm, 两个取样的边缘间距不少于 5 mm, 剔除有明显缺陷的孔样, 测定样品数量不少于 3 个。用 TA-XY2i 型物性测试仪 (Microstable system, 英国) 加载 Warner-Bratzler Shear 刀具测定肉样剪切力, 记录下肉样最大剪切力 (shear force)、硬度值 (toughness) 和平均剪切力 (mean shear force)。

#### 1.8 *CSTB* 基因型与嫩度性状的关联性分析

结合多态性分析结果与 4 个群体 84 个个体的眼肌嫩度性状, 建立如下统计模型进行关联性分析。

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + G_j + b_{ij} \times X + e_{ijk}$$

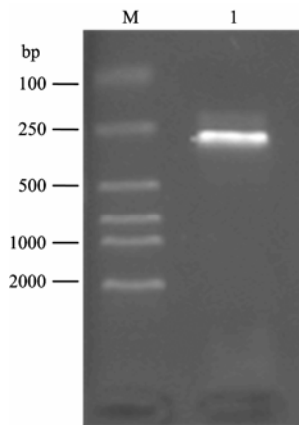
式中,  $Y_{ijk}$  表示各性状表型值;  $\mu$  为各性状总体平均数;  $P_i$  为第  $i$  群体效应 ( $i=1,2,3,4$  分别对应长白猪、梅山猪、

DLY 猪和长梅猪);  $G_j$  为第  $j$  种基因型效应 ( $j=1,2,3$  分别对应 AA、AB、BB 这 3 种基因型);  $X$  为个体的屠宰体重;  $b_{ij}$  为屠宰体重的回归系数 (考虑到本试验中各品种或杂交组合的适时屠宰体重差别较大, 根据本试验室的屠宰测定数据进行屠宰体重与各测定性状值间的回归分析而得) [20,21];  $e_{ijk}$  为随机误差效应。采用 SAS 9.0 统计分析软件包的 PROC-GLM 程序进行重复数不等的方差分析和多重比较 [22]。

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR

以猪肌肉组织 cDNA 为模板, CSN1U、CSN1L 为引物进行扩增后得到一条长度为 284 bp 的条带 (图 1)。以 CDS 区测序结果设计特异性引物进行 3'RACE 扩增后得到一条长度约为 500 bp 的条带 (图 2)。



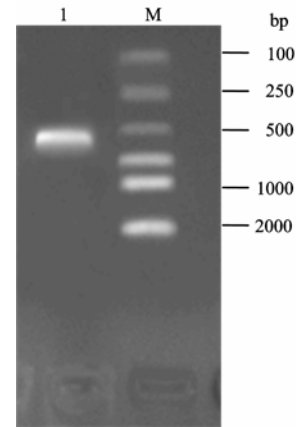
M: Marker DL2000; 1: CDS 区 PCR 产物  
M: Marker DL2000; 1: PCR product of CDS

图 1 CDS 区 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel (1%) result of CDS

### 2.2 序列分析

根据两次测序结果中的重叠序列, 利用 bioedit 软件将编码区片段与 3'RACE 片段拼接, 得到一条全长 541 bp 序列, 开放阅读框为 11~307 bp, 共编码 98 个氨基酸 (图 3), 与人、鼠和牛的 CSTB 蛋白长度相等。同源性分析结果表明, 与人、牛、鼠的 *CSTB* 基因 cDNA 编码区 (CDS) 同源性分别为 81%、89% 和 85%, 蛋白质同源性为 83%、85% 和 76% (图 4)。该序列与电子克隆序列 contig 在 CDS 区内相似性达 99.8%。参考人和鼠的内含子剪切位点, 推测猪 *CTSB*



M: Marker DL2000; 1: 3'RACE 产物  
M: Marker DL2000; 1: PCR product of 3'RACE

图 2 3' RACE 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Agarose gel (1%) result of 3'RACE

基因具有 3 个外显子。利用 ExPasy 服务器对 CDS 区编码的蛋白质序列进行分析, 预测分子量为 11.1296 kD; 等电点为 6.27; 在哺乳动物体内的半衰期为 30 h 以上。

### 2.3 蛋白亚细胞定位

将序列递交到 PSORT II 蛋白质亚细胞定位服务器 (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>), 预测结果表明该蛋白位于细胞质中的可能性有 56.5%, 而另外有 17.4% 的可能位于细胞核内, 位于其它细胞器中的可能性较小。

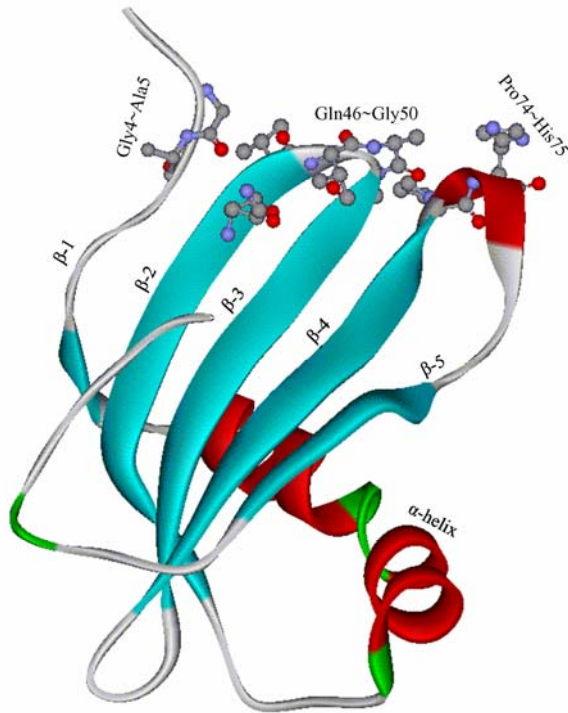
### 2.4 蛋白功能域预测及分析

将序列递交到 ExPASy ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) 结构域分析数据库, 进行蛋白质结构域的查找和分析。结果表明, 在 *CSTB* 蛋白的 45~58 氨基酸残基位置 (SQVVAGRNLfIKVQ) 具有一个半胱氨酸蛋白酶抑制位点 (Prosite 编号为 PS00287)。其中 46~50 位 (QVVAG), 是在 *Cystatin* 家族中高度保守的位点, 其功能是与被抑制酶结合。

### 2.5 蛋白质高级结构同源建模

将序列递交到 ExPASy ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) 结构域分析数据库, 进行蛋白质结构域的查找和分析, 查找数据库中与 *CSTB* 氨基酸序列相似性较高的序列。查找到一条氨基酸同源性高达 82% 的序列, 编号为 1stfI (人 *CSTB* 蛋白), 将其已知的 PDB 结构模型作为模版, 利用距离平方和最小叠合法 (least squares superposition), 进

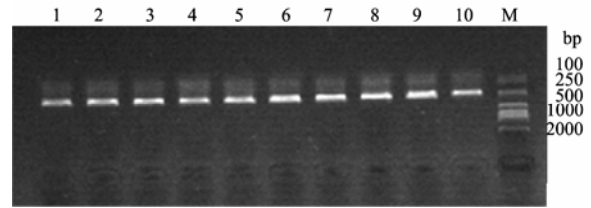




分子骨架结构用带状图表示, 其中 3 段活性相关肽段的氨基酸侧链用黑色表示。分子由一组 5 圈的  $\alpha$ -螺旋和 5 条反向平行的  $\beta$ -折叠片构成, 其顶部纵向排列构成楔形边缘, 并与被抑制酶的底物结合凹槽高度互补  
Ribbon representation of pig cystatin B. Sidechains for the active site residues are shown in black. The main body of the molecule consists of a five-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet, wrapped around a five-turn  $\alpha$ -helix, and the active site peptides form a wedge shaped edge which quite complementary to the substrate-binding cleft of the enzyme

图 5 猪 CSTB 蛋白分子骨架结构预测图

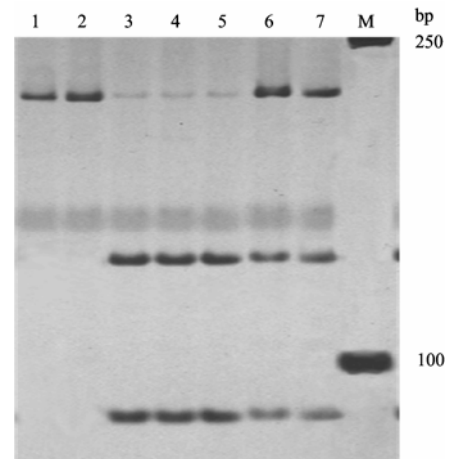
Fig. 5 Predicted backbone structure of pig cystatin B mature protein



1~10: 引物 CYS-2 扩增产物; M: Marker DL2000  
1-10: PCR product of primers CYS-2; M: Marker DL2000

图 6 引物 CYS-2 产物的 1%琼脂糖凝胶电泳

Fig. 6 Agarose gel (1%) image about CYS-2 product



1,2: AA 基因型; 3~5: BB 基因型; 6, 7: AB 基因型; M: Marker DL2000  
1, 2: AA genotype; 3-5: BB genotype; 6, 7: AB genotype; M: Marker DL2000

图 7 *PvuII* 酶切产物的 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 7 Polyacrylamide (12%) result of digest product with *Pvu II*

表 2 *CSTB* 基因 *PvuII* 酶切位点基因型及等位基因在不同猪群体中的分布

Table 2 The distribution of the genotypes and the allele of *CSTB* gene in different pig populations

群体 Populations	样本数 Sample size	基因型频率 Genotype frequency			基因频率 Gene frequency	
		AA	AB	BB	A	B
长白猪 L	8	0.13(1)	0.13(1)	0.74(6)	0.20	0.80
梅山猪 M	8	1.00(8)	0.00(0)	0.00(0)	1.00	0.00
长梅猪 LM	6	0.17(1)	0.33(2)	0.50(3)	0.33	0.67
DLY 猪 DLY	62	0.00(0)	0.34(21)	0.66(41)	0.17	0.83
合计 Total	84	0.12(10)	0.28(24)	0.60(50)	0.26	0.74

括号内数字表示不同基因型的个体数

Bracket means the number of different genotypes

不同基因型各性状最小二乘均数多重比较见表 3。在眼肌嫩度方面, 本试验所分析的 3 个指标均表现出一致的变化趋势, 为 AA 基因型个体的各项指标均

极显著的低于 AB 和 BB 基因型个体 ( $P < 0.01$ ), 而 AB 和 BB 基因型个体间各指标差异虽不显著, 但表现出 AB 个体高于 BB 个体的趋势。

表 3 *CSTB* 基因 *Pvu* II 位点不同基因型间嫩度性状的最小二乘均数和多重比较

Table 3 Least square means and standard errors for tenderness quality traits as altered by *Pvu* II locus genotype

性状 Traits	AA	AB	BB
样本数 Sample size	10	24	50
最大剪切力 Shear force (kg)	5.11±1.61 A	7.13±2.21 B	6.76±1.69 B
硬度值 Toughness (kg·s)	19.31±6.21 A	26.42±9.17 B	24.95±7.37 B
平均剪切力 Mean shear force (kg)	3.26±1.14 A	5.21±2.29 B	4.70±1.86 B

表达式为最小二乘平均值±标准误, 同行中不同字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

Score values are LSM±standard error (SE). In rows, individual genotypes bearing different capital letters differ significantly at  $P < 0.01$

### 3 讨论

Cystatin B 属于 I 类半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 最初被认为是组织蛋白酶 B 的特异性抑制剂<sup>[7]</sup>, 而后发现它对木瓜蛋白酶家族的许多成员有广泛的抑制作用, 其 mRNA 序列在不同物种间高度保守。有研究报道人、鼠的 *CSTB* 基因 CDS 区长度为 294 bp, 含有 3 个外显子, 两个内含子, 3'端非编码区内具有 PloyA 尾巴<sup>[23,24]</sup>。本试验得到的猪 *CSTB* 基因 mRNA 序列 CDS 区与其它物种有较高的相似性, 长度同样为 294 bp, 也具有 PloyA 尾巴结构, 但 3'端非编码区长度较人和鼠短 34 个碱基。

*CSTB* 的抑制作用主要体现在对组织蛋白酶的抑制上, 该酶主要位于溶酶体中, 因而 *CSTB* 蛋白合成后的去向对其抑制作用的发挥有至关重要的影响。Riccio 等<sup>[25]</sup>通过显微共聚焦分析发现, 人 *CSTB* 在分生组织细胞内主要聚集在细胞核中, 而在已分化细胞中主要位于细胞核与胞质中, 这与本试验所预测猪 *CSTB* 亚细胞定位结果一致。

本试验通过蛋白质高级结构同源建模预测发现, 猪的 *CSTB* 蛋白分子由 5 个折叠片 ( $\beta$ -sheet) 和 1 个 5 圈的螺旋 ( $\alpha$ -helix) 组成, 分子内不含二硫键, 折叠片 2~5 形成两个 3 面封闭的发夹环 (hairpin loop) 结构, 并且与折叠片 1 纵向平行排列, 在空间上构成一个楔形结构的边缘,  $\alpha$ -helix 与肽链的羧基端则分别位于该楔形结构的腹侧与背侧 (图 6), 这种空间结构与 Stubbs 等<sup>[19]</sup>所报道的人、Pennacchio 等<sup>[24]</sup>所报道的鼠 *CSTB* 蛋白高级结构高度一致。Cystatin B 的楔形结构与被抑制蛋白酶的底物结合凹槽高度互补<sup>[19]</sup>, 两者间可以紧密形成酶抑制因子复合物, 阻止底物结合,

从而抑制蛋白酶活性。

位于 *CSTB* 基因第二内含子内的 *Pvu* II 酶切多态位点, 是 Russo<sup>[10]</sup>等于 2002 年首先发现的, 该研究报告 BB 个体的日增重显著高于 AB 个体; 2004 年孙万元等<sup>[26]</sup>对 27 头中国地方猪种长金猪该位点进行了检测, 报道日增重和眼肌 pH 值性状在各基因型间无显著差异。本试验在该位点检测到了 2 种等位基因, 3 种基因型, 关联性分析结果表明, AA 基因型的个体, 在各项嫩度指标上均极显著的优于其它两种基因型的个体 ( $P < 0.01$ )。造成这种差异的原因可能有两方面, 首先由于在嫩度表现较差的 DLY 群体内没有检出 AA 基因型的个体, 从而造成品种效应与基因型效应相互嵌合, 统计分析时不能排除品种效应的干扰; 其次结合 *CSTB* 的生理功能分析, 推测 AA 基因型个体的 *CSTB* 对组织蛋白酶的抑制作用相对较弱, 造成宰后肌肉内蛋白水解程度更高, 从而表现更好的嫩度。

### 4 结论

(1) 本试验在猪肌肉组织中克隆得到一条长度为 541 bp 的 mRNA 序列, 其中包含一个完整的 CDS 区, 编码一个长度为 98 氨基酸残基的肽链。该序列在核酸序列、蛋白质一级和高级结构、蛋白功能域等方面, 均与人、鼠、牛的 *CTSB* 基因及蛋白质有极高的相似性, 因此可以确定该序列为猪 *CTSB* 基因 mRNA 序列, 将其递交到 GenBank 数据库中, 登录号为 EF397605。

(2) 位于 *CSTB* 基因第二内含子内的 *Pvu* II 酶切多态位点, 在所检测的群体中表现出较丰富的多态性, 共检测出 2 种等位基因, 3 种基因型。其中 AA 基因型的个体较其它两种基因型的个体具有更好的肌肉嫩度。

### References

- [1] Van Oeckel M J, Warnants N, Boucqué Ch V. Pork tenderness estimation by taste panel, Warner-Bratzler shear force and on-line methods. *Meat Science*, 1999, 53: 259-267.
- [2] Enfalt A C, Lundstrom K, Hansson I, Lundeheim N, Nystrom P E. Effects of outdoor rearing and sire breed (Duroc or Yorkshire) on carcass composition and sensory and technological meat quality. *Meat Science*, 1997, 45(1): 1-15.
- [3] Pennacchio L A, Bouley D M, Higgins K M, Scott M P, Noebels J L, Myers R M. Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nature Genetics*, 1998, 20: 251-258.
- [4] Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine

- proteinases. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1991, 285: 213-219.
- [5] 郑海音. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂与免疫调节. 国外医学免疫学分册, 2005, 28(3): 129-132.
- Zheng H Y. Cysteine proteinase inhibitor and immunomodulatory. *Foreign Medical Sciences (Section of Immunology)*, 2005, 28(3): 129-132. (in Chinese)
- [6] Barrett A J, Fritz H, Grubb A, Isemura S, Jarvinen M, Katunuma N, Machleidt W, Muller-Esterl W, Sasaki M, Turk V. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochemical Journal*, 1986, 236(1): 312.
- [7] Lenney J F, Tolan J R, Sugai W J, Lee A G. Thermostable endogenous inhibitors of cathepsins B and H. *European Journal of Biochemistry*, 1979, 101(1): 153-161.
- [8] Ritonja A, Machleidt W, Barrett A J. Amino acid sequence of the intracellular cysteine proteinase inhibitor cystatin B from human liver. *Biochemical Biophysics Research Communications*, 1985, 131: 1187-1192.
- [9] Koohmaraie M. The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 1992, 74: 239-245.
- [10] Russo V, Fontanesi L, Davoli R, Nanni C L, Cagnazzo M, Buttazzoni L, Virgili R, Yerle M. Investigation of candidate genes for meat quality in dry-cured ham production: the porcine cathepsin B (*CTSB*) and cystatin B (*CSTB*) genes. *Animal Genetics*, 2002, 33(2): 123-131.
- [11] 卢士英. 大腹园蛛组织蛋白酶 B 相关 cDNA Avg1 克隆及表达研究. 东北林业大学硕士学位论文, 2004: 7-8.
- Lu S Y. Study on cloning and expression of *Araneus ventricosus* cathepsin B-like cDNA Avg1. Ph.D. Dissertation of Northeast Forestry University, 2004: 7-8. (in Chinese)
- [12] Trinkaus M, Vranic A, Dolenc V V, Lah T T. Cathepsins B and L and their inhibitors stefin B and cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas. *International Journal of Biological Markers*, 2005, 20(1): 50-59.
- [13] Vaarmann A, Kaasik A, Zharkovsky A. Altered tryptophan metabolism in the brain of cystatin B-deficient mice: a model system for progressive myoclonus epilepsy. *Epilepsia*, 2006, 47: 1650-1654.
- [14] Jarvinen M, Rinne A. Human spleen cysteineproteinase inhibitor. Purification, fractionation into isoelectric variants and some properties of the variants. *Biochimica Biophysica Acta*, 1982, 708(2): 210-217.
- [15] Green G D, Kembhavi A A, Davies M E, Barrett A J. Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors from human liver. *Biochemical Journal*, 1984, 218: 939-946.
- [16] Takio K, Kominami E, Wakamatsu N, Katunuma N, Titani K. Amino acid sequence of rat liver thiol proteinase inhibitor. *Biochemical Biophysics Research Communications*, 1983, 115: 902-908.
- [17] Ritonja A, Popovic T, Turk V, Wiedenmann K, Machleidt W. Amino acid sequence of human liver cathepsin B. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1985, 181(1): 169-172.
- [18] Jerala R, Trstenjak M, Lenarcic B, Turk V. Cloning a synthetic gene for human stefin B and its expression in *E. coli*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1988, 239(1): 41-44.
- [19] Stubbs M T, Laber B, Bode W, Huber R, Jerala R, Lenarcic B, Turk V. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 1990, 9: 1939-1947.
- [20] 朱 砾, 李学伟. MyoG 基因的遗传效应分析. 遗传, 2005, 27: 710-714.
- Zhu L, Li X W. The genetic effects of *MyoG* gene. *Hereditas*, 2005, 27: 710-714. (in Chinese)
- [21] Gerry Q, Michael K. 生物实验设计与数据分析. 北京: 高等教育出版社, 2003: 78-88.
- Gerry Q, Michael K. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Beijing: Higher Education Press, 2003: 78-88. (in Chinese)
- [22] 彭昭英. SAS 系统应用开发指南. 北京: 希望电子出版社, 2000: 547-580.
- Peng Z Y. *Guide Book of Application and Development of SAS*. Beijing: Hope Electronic Press, 2000: 547-580. (in Chinese)
- [23] Pennacchio L A, Lehesjoki A E, Stone N E, Willour V L, Virtaneva K, Miao J, D'Amato E, Ramirez L, Faham M, Koskiniemi M, Warrington J A, Norio R, de la Chapelle A, Cox D R, Myers R M. Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science*, 1996, 271: 1731-1734.
- [24] Pennacchio L A, Myers R M. Isolation and characterization of the mouse cystatin B gene. *Genome Research*, 1996, 6: 1103-1109.
- [25] Riccio M, Di Giaimo R, Pianetti S, Palmieri P P, Melli M, Santi S. Nuclear localization of cystatin B, the cathepsin inhibitor implicated in myoclonus epilepsy (EPM1). *Experimental Cell Research*, 2001, 262(2): 84-94.
- [26] 孙万元. 长金猪及其肉质性状候选基因的研究. 浙江大学硕士学位论文, 2004: 44-45.
- Sun W Y. Study on the hybrid of landrace and Jinhua pig and it's candidate genes influencing meat quality traits. Ph. D. Dissertation of Zhejiang University, 2004: 44-45. (in Chinese)