

猪 *BPI* 基因部分 cSNPs 检测及其对蛋白结构功能的影响

吴正常¹, 王靖¹, 朱世平¹, 赵乔辉¹, 刘璐¹, 訾臣¹, 吴圣龙^{1,2*}, 包文斌^{1,2*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;

2. 江苏省现代种猪分子选育工程技术研究中心, 常州 213149)

摘要: 本试验以 98 头苏太猪为研究对象, 检测 *BPI* 基因部分编码区的单核苷酸多态性 (SNPs), 并预测分析碱基突变对 *BPI* 蛋白结构和功能的影响。利用 PCR-SSCP 和 PCR-RFLP 结合测序的方法检测 *BPI* 基因外显子 1、4 和 10 的 SNPs, 运用生物信息学比较分析原蛋白和突变型蛋白的理化性质和结构。结果表明, 以 *BPI* 基因 cDNA 序列作为参照, *BPI* 外显子 1、4 和 10 存在 6 个 SNPs, 3 个同义突变 (c. 24A>G、c. 54T>C 和 c. 522C>T) 和 3 个错义突变 (c. 433C>T (Arg145Trp)、c. 1060A>G (Thr354Ala) 和 c. 1151T>G (Leu384Arg))。3 种错义突变未改变 *BPI* 蛋白的理化性质、信号肽、跨膜区、糖基化位点以及二、三级结构, 但是导致磷酸化位点的改变或存在其他潜在功能位点区域。Western blot 试验发现, *BPI* 蛋白的分子量为 53 ku, 苏太猪 F18 大肠杆菌抗性型猪的 *BPI* 蛋白表达量显著高于敏感型猪。猪 *BPI* 外显子 4 和 10 的碱基突变不同程度影响到蛋白功能, 并可能对机体疾病的抗性/易感性产生影响。

关键词: 猪; *BPI* 基因; SNPs; 生物信息学; 蛋白结构和功能

中图分类号: S828; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)07-1000-08

The Partial cSNPs Detection of Pig *BPI* Gene and Its Influence on Protein Structure and Function

WU Zheng-chang¹, WANG Jing¹, ZHU Shi-ping¹, ZHAO Qiao-hui¹, LIU Lu¹, ZI Chen¹,

WU Sheng-long^{1,2*}, BAO Wen-bin^{1,2*}

(1. Key Laboratory for Animal Genetics, Breeding, Reproduction and Molecular Design of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009,

China; 2. Jiangsu Engineering Research Centre for Molecular Breeding of Breeder Pig,

Changzhou 213149, China)

Abstract: This study was conducted to detect the single nucleotide polymorphism (SNPs) of *BPI* gene in partial coding region in ninety-eight Suta pigs, and to predict the effect of mutation on *BPI* protein structure and function. PCR-SSCP/RFLP combined with sequencing were used to detect the SNPs in exon 1, exon 4 and exon 10 of *BPI* gene, and bioinformatics approach was used to predict the physicochemical properties and structures of original protein or mutant protein. Refer to the cDNA sequence of *BPI* gene, six SNPs existed in exon 1, exon 4 and exon 10 of *BPI* gene, with three synonymous mutations (c. 24A>G, c. 54T>C and c. 522C>T) and three mis-

收稿日期: 2012-12-24

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 国家自然科学基金 (31172183); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目 (BY2012157); 江苏省科技支撑计划 (农业) (BE2010371; BE2012330); 苏州市科技支撑计划 (SN201013; SN201133)

作者简介: 吴正常 (1987-), 男, 江苏南京人, 硕士生, 主要从事猪抗病育种研究, E-mail: 634468202@qq.com

* 通信作者: 包文斌, 博士, 研究员, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: wbbao@yzu.edu.cn; 吴圣龙, 博士, 研究员, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: slwu@yzu.edu.cn

sense mutations (c. 433C > T (Arg145Trp), c. 1060A > G (Thr354Ala) and c. 1151T > G (Leu384Arg)). Three missense mutations had no influence on the physicochemical properties, signal peptide, transmembrane region, glycosylation sites, secondary structure and tertiary structure of the BPI protein, but led to the change of its phosphorylation sites or the existence of other potential function sites domain. The result of Western blot experiment indicated that there was an target band at 53 ku. It was obvious that expression of BPI protein in ETEC F18-resistant group was significant higher than that in susceptible group. The base mutations in exon 4 and exon 10 of pig *BPI* gene affect protein function in one way or another, which may have an influence on resistance/susceptibility of the pig disease.

Key words: pig; *BPI* gene; SNPs; bioinformatics; protein structure and function

杀菌通透性增强蛋白(Bactericidal/permeability-increasing protein, BPI)属于抗菌类蛋白,具有中和内毒素、杀灭革兰阴性菌和促进补体活化增强调理(第 142~169 氨基酸)等功能^[1],而编码区是基因负责编码功能蛋白的关键区域,其中碱基发生突变往往会影响到蛋白结构和功能,从而引起某种疾病或抗性/易感性的改变。人 *BPI* 基因 A645G 突变引起第 216 号氨基酸改变(Lys→Glu),与心肌梗塞^[2]、克罗恩病^[3]以及肉芽肿病^[4]等有关。

BPI 蛋白经蛋白酶水解后裂解为 25 ku 的 N 端和 30 ku 的 C 端,N 末端片段具有完整 BPI 分子杀菌及结合/中和内毒素的全部生物学活性^[5],而 BPI 蛋白 N 端杀菌活性区主要由外显子 1 编码。K. T. Christopher 等人研究发现,猪 *BPI* 第 4 和 10 外显子的 RFLP 多态性与沙门氏菌的易感性有关^[6]。鉴于前人的研究基础和 BPI 蛋白的功能特点,本研究将 *BPI* 基因外显子 1、4 和 10 作为检测目标,通过 PCR-SSCP 或 PCR-RFLP 检测 *BPI* 外显子 1、4 和 10 的多态性,利用测序技术检测确定 SNPs 位点,并通过生物信息学对突变型蛋白和原蛋白(来自 GenBank 数据库的 NP_001152779. 1)进行预测比较,分析所检测到的猪 *BPI* 基因编码区部分碱基突变对蛋白结构和功能的影响,并对 BPI 蛋白的功能进行 Western blot 验证,从而为进一步探究 BPI 蛋白功能和选择有效遗传标记奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 *BPI* 基因编码区序列来源

目前公布的猪 *BPI* 基因并没有其外显子的注释,课题组通过 NCBI 的 BLAST 找到猪的 21 条染色体的 mapview,经过 blast search against pig sequences,找 1 段 refseq 序列(非冗余的)*BPI* mRNA

序列 EF436278 并选择高通量测试数据库(HTGS),从而找到 1 条同源性达到 99% 的序列,这是 1 段包含 *BPI* 全序列的高通量测试序列,序列号为 FP339579. 2,但并未注释。然后通过 NCBI 上的 spidey(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>)进行非冗余 mRNA 与此高通量结果比对,得出 *BPI* 所有 15 个外显子的全部序列信息。以 mRNA 序列参照,本试验检测目标外显子 1、4 和 10 分别位于 9~225 bp(片段为 217 bp)、470~632 bp(片段为 163 bp)和 1 089~1 256 bp(片段为 168 bp)。

1.2 多态性分析

选取苏太猪(来自江苏省苏州市苏太猪育种中心)98 头,每个个体采耳组织块约 1.0 g,按照常规苯酚-氯仿法提取 DNA。以 *BPI* 基因序列为参照设计引物 P1、P2 和 P3(表 1),分别扩增 *BPI* 外显子 1、4 和 10,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

采用 PCR-SSCP 方法分析猪 *BPI* 外显子 1 和 4 多态性:基因组 DNA($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1.0 \mu\text{L}$, $10 \times$ Buffer(Mg^{2+}) $2.0 \mu\text{L}$,dNTP 混合物 $1.5 \mu\text{L}$,上下游引物($10 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)各 $1.0 \mu\text{L}$,Taq 酶($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.2 \mu\text{L}$,加灭菌蒸馏水补足至 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s,退火 30 s(退火温度见表 1), $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,共进行 30 个循环;然后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 8 min,最后放入 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。取 $7 \mu\text{L}$ 上样缓冲液与 $4 \mu\text{L}$ PCR 产物混和, $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 min,冰浴 10 min。然后将冰浴的变性混合样全部点入 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中, 110 V 电泳过夜,银染显色。采用 PCR-RFLP 方法分析猪 *BPI* 外显子 10 多态性,具体方法参考文献[7]。根据多态分析结果,选取不同基因型的

PCR 产物,交由上海生工生物工程技术有限公司用 ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪完成序列测定。

表 1 PCR 引物的信息

Table 1 Information of PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	位置 Position	退火温度/°C T _m	产物长度/ bp Products length
P1	F:GCATCCAATTACCGTAGTC R:TCCTCCTCTCTGCACTCTACT	外显子 1	59.3	249
P2	F:TCAGGTTGGTTACCGCAGAG R:ACCCTGTTGATGTGGCTTCT	外显子 4	62.4	200
P3	F:CCCAACATGGAGATGCAGTTC R:CAATGAATCAATGAGCACACC	外显子 10	57	445

1.3 生物信息学分析

首先利用 DNAMAN 软件分析 SNPs 位点,其

次利用在线预测和软件分析突变前后 BPI 蛋白质的结构和功能,具体蛋白预测分析方法见表 2。

表 2 蛋白结构功能预测方法及相关网址

Table 2 The method of prediction about protein structure or function and related web sites

蛋白结构功能 Protein structure or function	预测网址及相关软件 Predicted web sites and related softwares
蛋白质的理化性质 Physical and chemical properties of protein	ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/)
二硫键 Disulfide bonds	Scratch (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/)
信号肽 Signal peptide	SignalP4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)
跨膜区 Transmembrane region	TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)
O-糖基化位点 O-glycosylation	NetOGlyc (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/)
N-糖基化位点 N-glycosylation	NetNGlyc (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)
磷酸化位点 Phosphorylation	NetPhos (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)
功能区域 Function domain	SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/)
二级结构 Secondary structure	Anthepro 蛋白分析软件基于 Garnier 方法
三级结构 Tertiary structure	SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/)

1.4 Western blot 验证

本课题组前期在苏太猪群体中已经建立了 F18 大肠杆菌抗性型和敏感型群体,从中选取 3 头抗性型猪和 3 头敏感型猪作为试验对象。对于核转运试验,细胞核和细胞质分离都通过厂家生产的 NE-

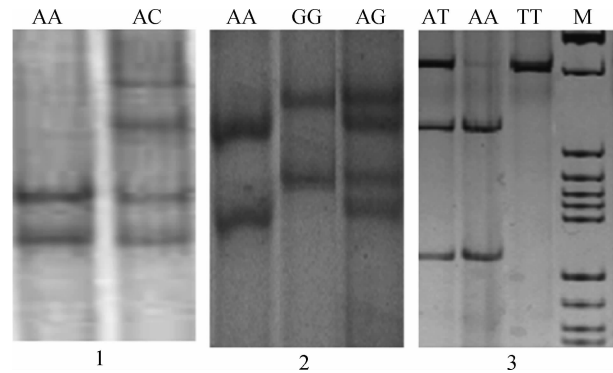
PER 试剂盒(Pierce)获得,蛋白质水平的标准化通过 BCA 试剂盒(Pierce)完成。SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳):取 10 μ L 蛋白质上样,制成 10%凝胶,跑胶条件为 160 V,70 min。Blotting(蛋白印迹):蛋白质转移到 PVDF 膜(聚丙烯二氟乙烯膜)

上,与相关抗体进行免疫印迹,BPI 抗体(ABmart, 1:500)作为一抗,兔原抗体(1:3000)IgG 作为二抗, β -actin(β -肌动蛋白)作为参照。

2 结果

2.1 SNPs 位点分析

对猪 *BPI* 基因外显子 1、4 和 10 分别进行 PCR-SSCP/RFLP 分析,结果见图 1,选取不同基因型的个体进行直接测序和序列比对,结果表明:*BPI* 基因 cDNA 全长序列中 3 个外显子共检测到 6 个 SNPs 位点,位点信息见表 3。



1. 外显子 1 检测出 2 种基因型:AA 和 AC; 2. 外显子 4 检测出 3 种不同基因型:AA、GG 和 AG; 3. 外显子 10 检测出 3 种不同基因型:AA、TT 和 AT, M. DNA 相对分子质量标准 pBR322 DNA marker

1. Genotype AA and AC in exon 1; 2. Genotype AA, GG and AG in exon 4; 3. Genotype AA, TT and AT in exon 10, M. pBR322 DNA marker

图 1 *BPI* 外显子 1、4 和 10 PCR-SSCP/RFLP 分析

Fig. 1 The PCR-SSCP/RFLP analysis of *BPI* gene in exon 1, 4 and 10

表 3 猪 *BPI* 基因外显子 1、4 和 10 的 SNPs 分析

Table 3 The SNPs analysis of pig *BPI* gene in exon 1, 4 and 10

<i>BPI</i> 外显子 <i>BPI</i> exon	突变位点 Mutational site	碱基变化 Base change	氨基酸变化 Amino acid change
外显子 1 Exon 1	c. 24	A→G	同义突变
	c. 54	T→C	同义突变
外显子 4 Exon 4	c. 433	C→T	Arg145Trp
	c. 522	C→T	同义突变
外显子 10 Exon 10	c. 1060	A→G	Thr354Ala
	c. 1151	T→G	Leu384Arg

2.2 *BPI* 蛋白结构和功能的生物信息学分析

2.2.1 *BPI* 蛋白理化性质 猪 *BPI* 蛋白的理化性质分析预测结果表明,*BPI* 原蛋白序列(来自 GenBank 数据库, NP_001152779.1)分子式为 $C_{2433}H_{3866}N_{640}O_{671}S_{17}$, 分子质量约为 53.36 ku, 原子总数为 7 627, 理论等电点 pI 为 9.69, 带正电荷和负电荷的氨基酸残基数分别为 51 和 32 个。*BPI* 蛋白包含 20 种常见的氨基酸, 其中 Leu 含量最高(13.3%), Trp 和 Cys 含量最低(1%), 未发现特殊的吡咯赖氨酸(Pyl)和硒半胱氨酸(Sec)。蛋白质中脂肪链氨基酸含量表示脂溶指数(Aliphatic index), 主要由 Leu、Ile 和 Val 组成, 可以代表蛋白的稳定性, 本研究发现该 *BPI* 蛋白脂溶指数为 100.56, 表明该蛋白是脂溶性蛋白。不稳定系数(Instability index)为 32.70(<40), 表明 *BPI* 蛋白稳定。总平均亲水性(GRAVY)为 0.108, 说明该蛋白疏水性较强。3 种突变型蛋白与原蛋白的理化性质进行比较发现(表 4), 蛋白质分子量、理论等电点、脂溶指数、不稳定系数以及总平均亲水性略微发生改变, 突变后的 *BPI* 蛋白仍然是稳定的脂溶性蛋白。

2.2.2 二硫键、信号肽及跨膜区等特殊结构预测

预测结果表明, 3 种突变型 *BPI* 蛋白均不存在二硫键, 与原蛋白分析结果相同。用 TMHMM Server v. 2.0 预测 3 种突变型 *BPI* 蛋白发现, 跨膜螺旋数均为 1, 跨膜区域位于 12~34 位氨基酸, 与原蛋白预测结果完全一致, 表明这些突变位点并没有对跨膜结构造成影响。

信号肽是分泌蛋白 N 端 10~35 位氨基酸的疏水性区域, 介导蛋白质肽链进入内质网腔^[8]。本研究采用在线工具 SignalP4.0 预测猪 *BPI* 蛋白信号肽, 在线输入前 70 个氨基酸, 并基于神经网络模型 NN 进行分析, 信号肽剪切位点预测通过 Y 最大值(Y-score maximum)来判断, 是否为分泌蛋白通过 S 平均值(Means-score)来判断, 若 S 平均值大于 0.5, 则为分泌蛋白, 存在信号肽。SignalP4.0 预测 3 种突变型 *BPI* 蛋白的信号肽发现, 3 种突变型 *BPI* 蛋白均存在信号肽, Y 值为 0.698, S 平均值为 0.947(>0.5), 并且剪切位点都位于 27~28 位氨基酸, 与原蛋白预测结果完全一致。

2.2.3 糖基化和磷酸化位点预测 通过对 3 种 *BPI* 突变型蛋白的 O-糖基化位点预测发现, 均存在 2 个 O-糖基化位点和 5 个 N-糖基化位点, 且糖基化潜力值和位点均一样。Thr25 和 Thr438 的 O-糖基

化潜力值分别为 0.551 和 0.604(均大于 0.5),表明这 2 个位点的苏氨酸为 O-糖基化位点(图 2);通过对突变型猪 BPI 蛋白 N-糖基化位点预测发现,Asn233、Asn 304、Asn 308、Asn 376 和 Asn 388 的

N-糖基化潜力值分别为 0.662 6、0.716 3、0.500 8、0.503 4 以及 0.528 3(均大于 0.5),表明这 5 个位点的天冬酰胺为 N-糖基化位点(图 3)。经比较发现,突变型蛋白的糖基化位点与原蛋白完全相同。

表 4 BPI 蛋白的理化性质分析

Table 4 The physical and chemical properties analysis of BPI protein

理化性质 Physical and chemical property	蛋白类型 Protein type			
	原蛋白 Original protein	Arg145Trp 突变型蛋白 Mutant P Arg145Trp	Thr354Ala 突变型蛋白 Mutant P Thr354Ala	Leu384Arg 突变型蛋白 Mutant P Leu384Arg
分子量/u Molecular weight	53 364.3	53 394.3	53 334.3	53 407.3
理论等电点 Theory isoelectric point	9.69	9.64	9.69	9.73
脂溶性指数 Aliphatic index	100.56	100.56	100.77	99.75
不稳定系数 Instability index	32.70	33.05	32.70	32.70
总平均亲水性 Grand average of hydropathy	0.108	0.116	0.114	0.091

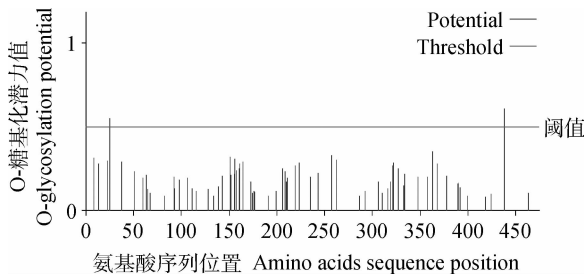


图 2 BPI 蛋白的 O-糖基化位点预测
Fig. 2 Predicted O-glycosylation sites of BPI protein

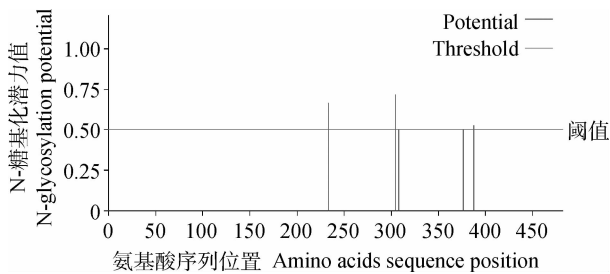


图 3 BPI 蛋白的 N-糖基化位点预测
Fig. 3 Predicted N-glycosylation sites of BPI protein

磷酸化位点预测分析发现,BPI 原蛋白中有 19 个丝氨酸(Ser93, 98, 106, 111, 115, 134, 139,

152, 155, 160, 161, 174, 177, 199, 211, 319, 358, 392, 483 位)、5 个苏氨酸(Thr8, 37, 51, 219, 354 位)和 2 个酪氨酸(Tyr43, 72 位)存在潜在的磷酸化位点(阈值大于 0.5)(图 4),经比较发现,Thr354Ala 突变型蛋白少了 1 个 Ser358 和 1 个 Thr354,而其他突变型蛋白的磷酸化位点与原蛋白完全一致。

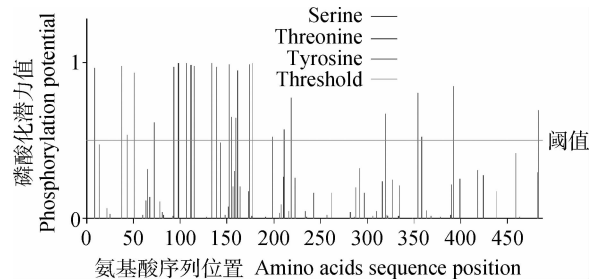


图 4 BPI 蛋白的磷酸化位点预测
Fig. 4 Predicted phosphorylation sites of BPI protein

2.2.4 功能位点区域预测 用 SMART 预测猪 BPI 蛋白的功能位点区域,结果主要从保守功能域和潜在功能域两方面来分析,原蛋白和 3 种突变型蛋白的保守功能区域完全一致,都具有 2 个锌指结构域 BPI1(N 端保守区域)和 BPI2(C 端保守区域),

以及 1 个跨膜区域(位于 12~34 位氨基酸)。原蛋白的潜在功能域只存在 3 个 LCR(Low complexity

region),而 3 种突变型蛋白除了 LCR 区域,还存在其他潜在功能位点区域,具体信息见表 5 和表 6。

表 5 BPI 蛋白的功能域预测

Table 5 The prediction of BPI protein function domains

蛋白类型 Protein type	功能区域 Function domain	
	保守的功能域 Conservative function domain	潜在的功能域 Potential function domain
原蛋白 Original protein	跨膜区, BPI1 和 BPI2	LCR
Arg145Trp 突变型蛋白 Mutant P Arg145Trp	跨膜区, BPI1 和 BPI2	LCR, BH4, WGR, ZnF_ZZ, IG_FLMN
Thr354Ala 突变型蛋白 Mutant P Thr354Ala	跨膜区, BPI1 和 BPI2	LCR, BH4, WGR, ZnF_ZZ, ArfGap
Leu384Arg 突变型蛋白 Mutant P Leu384Arg	跨膜区, BPI1 和 BPI2	LCR, BH4, WGR, ZnF_ZZ, ArfGap, IG_FLMN

表 6 BPI 蛋白潜在的功能域信息

Table 6 The information about BPI protein potential function domains

潜在的功能域 Potential function domain	名称 Definition	功能注释 Gene ontology
BH4	Bcl-2 同源区域 4	参与细胞凋亡过程, GO:0042981
WGR	核酸结合区域	较保守的 motif, 主要参与 polyA 聚合酶合成以及大肠杆菌钼酸盐代谢
ArfGap	GTP 酶(ARF)激活蛋白区域	GTP 酶 ARF 促进 GTP 的水解作用, GO:0008060
ZnF_ZZ	锌离子结合蛋白区域	主要是肌营养不良蛋白和反应元件结合蛋白, 参与锌离子相互作用和非共价结合, GO: 0008270
IG_FLMN	细丝型免疫球蛋白功能区域	参与蛋白结合, GO:0005515

2.2.5 BPI 蛋白空间结构预测 利用 Anthepro 蛋白分析软件基于 Garnier 方法对 BPI 蛋白进行二级结构预测,结果表明,3 种突变型蛋白的二级结构元件均由 32%的 α 螺旋(Helix),31%的 β 折叠(Sheet),17%的 β 转角(Turn)和 20%的自由卷曲(coil)构成,每个二级结构元件的比例与原蛋白完全一致。

SWISS-MODEL 根据同源建模分析 BPI 蛋白的三级结构,发现 C 末端区和 N 末端区结构非常相似,并形成特殊的“飞回棒”状,原蛋白模型残基由 29~482 个氨基酸组成,与 PDB 蛋白质数据库中模板 1bp1A(2.40Å)的相似性为 64.1%,衡量其机误的校准值为 $3.06e-167$ 。模型质量评分的复合评分函数 QMEAN 的 Z 值为 -0.95,该数值偏低,说明该 BPI 蛋白为跨膜蛋白。3 种突变型蛋白的三级结

构分析情况与原蛋白大体一致。

2.3 Western blot 分析结果

Western blot 试验结果显示(图 5),在 53 ku 处发现 1 个目的条带,同时可以看出抗性型猪的 BPI

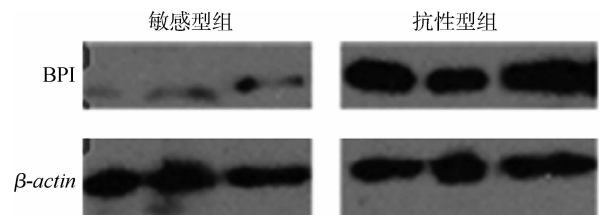


图 5 Western blot 分析 BPI 蛋白在抗性组和敏感型组的表达差异

Fig. 5 Differentiation expression of BPI protein between resistant and susceptible groups analyzed by Western blot

蛋白表达水平高于敏感型猪,前面通过生物信息学预测发现 BPI 蛋白的分子量约为 53.36 ku,与 Western blot 试验结果基本一致。

3 讨论

关于 BPI 蛋白结构的研究发现,人完整的 BPI 蛋白的分子量为 55 ku(N 端 25 ku,C 端 30 ku),由 456 个氨基酸组成^[9],是等电点为 9.0~10.0 的碱性蛋白^[10]。在一级结构中,带电残基分布不对称,N 端酸性氨基酸残基比碱性氨基酸残基少 16 个,C 端酸性残基却比碱性残基多 2 个^[11],这种差异使 BPI 分子带正电荷的 N 端与革兰氏阴性菌带负电荷的内毒素结合更稳定。人 BPI 蛋白三维分子结构显示,C 末端区和 N 末端区主要包含 α 螺旋和 1 个反平行 β 折叠,C 末端区和 N 末端区结构非常相似,并形成了特殊的“飞回棒”状,由各 200 个氨基酸左右的 N 末端区和 C 末端区及中间 21 个氨基酸的连接区组成^[12]。本试验中对猪 BPI 蛋白结构和功能进行预测分析,发现猪 BPI 蛋白的基本理化性质(分子量、等电点以及氨基酸组成)与人的 BPI 基本相同,二级结构(主要是 α 螺旋和 β 折叠)和三级结构(呈“飞回棒”状)也与人的 BPI 相似。

糖基化和磷酸化是真核生物常见的蛋白质翻译后修饰过程,真核细胞中的蛋白质磷酸化可以改变激酶、离子通路等,从而改变细胞应激或新陈代谢。磷酸化也能够调节许多蛋白质在信号转导中的作用,调节转移因子与共激活剂和 DNA 的结合吸引力,改变基因表达、细胞生长和分化^[13],本研究在猪 BPI 原蛋白中共发现有 26 个(19 个 Ser,5 个 Thr 以及 2 个 Tyr)潜在的磷酸化位点,而 Thr354Ala 突变型蛋白少了 1 个 Ser³⁵⁸和 1 个 Thr³⁵⁴,可能影响到某些代谢调控过程。糖基化主要是修饰天冬酰胺上的 N 端,其氨基酸的特征序列为 Asn-X-Ser/Thr(X 代表任何一种氨基酸)。蛋白糖基化影响免疫分子的结构和功能,从而影响机体对抗原的应答反应^[14],同时蛋白糖基化作用与某些疾病也有紧密关系,如艾滋病患者所携带的 HIV gp120 位点上的寡甘露糖位点可以成为潜在的治疗靶位点^[15]。本研究在猪 BPI 蛋白中共发现有 7 个糖基化位点(2 个 O-糖基化位点和 5 个 N-糖基化位点)并结合蛋白二级结构分析结果来看,其中 Thr438 位于 α 螺旋(Helix)上,Thr25、Asn233 和 Asn304 位于凹面 β -折叠片上,这些位点的糖基化可能会影响 BPI 与病原相关

分子的连接绑定。

功能域是蛋白质分子中能独立存在的功能单位,主要从保守功能域和潜在功能域两方面来分析。保守功能域是指在生物进化或者一个蛋白家族中具有不变或者相同的功能区域,是蛋白核心作用区域,还具有起介导蛋白之间相互作用的功能。本试验发现 3 种错义突变,即 Arg145Trp 位于外显子 4, Thr354Ala 和 Leu384Arg 位于外显子 10。本研究进一步发现,猪 BPI 蛋白存在 2 个保守功能域 BPI1(N 端区域)和 BPI2(C 端区域),Arg145Trp 突变发生在 BPI1 区域,Thr354Ala 和 Leu384Arg 突变发生在 BPI2 区域。研究发现,N 末端区具有 BPI 的全部杀菌活性和中和 LPS 活性^[5,16],C 末端区主要起到增强 BPI 的稳定性,以及增强机体细胞免疫的调理作用^[17],因此这些突变可能与机体抗病或易感性有关。K. T. Christopher 等^[6]研究发现,猪 BPI 基因第 4 和 10 外显子的 RFLP 多态性与沙门氏菌的易感性有关,这进一步说明该 BPI 蛋白的保守功能域影响了 BPI 蛋白的主要功能。除此之外,本研究还在 3 种突变蛋白中发现了一些潜在的功能域,如 GTP 酶激活蛋白区域 ArfGap 和细丝型免疫球蛋白功能区域 IG_FLMN 等,GTP 酶激活蛋白与 Ras 蛋白及 G 蛋白 α 亚基结合,可以激活其 GTP 酶活性,促进其从活化型转化为非活化型,终止信号转导;IG_FLMN 区域对机体的免疫调控等起一定的作用。本课题组前期在苏太猪群体中建立了大肠杆菌病抗性和敏感性资源家系群体,并发现 BPI 基因对苏太断奶仔猪抗肠道大肠杆菌 F18 菌株的感染可能具有直接作用,并且个体对大肠杆菌 F18 菌株的抗性可能与 BPI 基因在肠道中表达量上调有关^[18],同时本试验通过 Western blot 分析发现,苏太猪抗性型猪的 BPI 蛋白表达量高于敏感型猪,这进一步说明 F18 大肠杆菌与 BPI 基因的表达水平有着密切的关系。此外本试验还在苏太猪群体中检测出 BPI 基因编码区多态性,进一步发现存在于外显子 4 和 10 的 3 个错义突变影响了 BPI 的蛋白功能,下一步我们将重点分析这些变异位点对基因表达和大肠杆菌抗性的影响,为有效分子标记的筛选和确定提供更加直接的依据和指导。

4 结论

本研究采用 PCR-SSCP/RFLP 方法检测出猪 BPI 基因外显子 1、4 和 10 存在 6 个 SNPs,即 3 个

同义突变(c. 24A>G 和 c. 54T>C 位于外显子 1, c. 522C>T 位于外显子 4)和 3 个错义突变(c. 433C>T (Arg145Trp) 位于外显子 4, c. 1060A > G (Thr354Ala)和 c. 1151T>G (Leu384Arg)位于外显子 10)。功能位点区域研究发现,BPI 蛋白存在 2 个保守功能域 BPI1(N 端区域)和 BPI2(C 端区域), Arg145Trp 突变发生在 BPI1 区域, Thr354Ala 和 Leu384Arg 突变发生在 BPI2 区域,这 3 种错义突变未改变 BPI 蛋白的理化性质、信号肽、跨膜结构、糖基化位点以及二、三级结构,但是导致磷酸化位点的改变或存在其他潜在功能位点区域,从而影响了 BPI 蛋白的功能。经 Western blot 验证,发现 BPI 蛋白分子量为 53 ku,苏太猪 F18 大肠杆菌抗性型猪的 BPI 蛋白表达量显著高于敏感型猪。

参考文献:

- [1] FISHER C J, MARRA M N, PALARDY J E, et al. Human neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein reduces mortality rate from endotoxin challenge: a placebo-controlled study [J]. *Crit Care Med*, 1994, 22(4): 553-558.
- [2] JAGIELLO P, KLEIN W, SCHULTZ H, et al. Association study of Wegener granulomatosis and the functionally relevant A645G polymorphism in the bactericidal/permeability increasing protein (BPI) gene[J]. *Int J Immunogenet*, 2005, 32(1): 3-6.
- [3] KLEIN W, TROMM A, FOLWACZNY C, et al. A polymorphism of the bactericidal/permeability increasing protein (BPI) gene is associated with Crohn's disease[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2005, 39(4): 282-283.
- [4] HUBACEK J A, PITHA J, SKODOVA Z, et al. Polymorphisms in the lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein in patients with myocardial infarction[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2002, 40(11): 1097-1100.
- [5] OOI C E, WEISS J, ELSBACH P, et al. A 25-kDa NH₂-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability increasing protein[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(31): 14891-14894.
- [6] CHRISTOPHER K T, THOMAS J S, SHI X W, et al. Genetic markers for improved disease resistance in animals (BPI) [J]. *United States, Kind Code: A1, Patent Application*, 2004, 23: 49-80.
- [7] 朱 璟,潘章源,訾 臣,等. 11 个猪种群 BPI 基因第 10 外显子 Hpa II 遗传变异分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(23): 14-17.
- [8] 杨 静,李成云,王云月,等. 酿酒酵母分泌蛋白组的计算机分析[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(3): 516-522.
- [9] DENTENER M A, FRANCOT G J, BUURMAN W A. Bactericidal/permeability-increasing protein, a lipopolysaccharide-specific protein on the surface of human peripheral blood monocytes[J]. *J Infect Dis*, 1996, 173(1): 252-255.
- [10] MANNION B A, KALATZIS E S, WEISS J, et al. Preferential binding of the neutrophil cytoplasmic granule-derived bactericidal/permeability increasing protein to target bacteria. Implications and use as a means of purification [J]. *J Immunol*, 1989, 142(8): 2807-2812.
- [11] TAKAHASHI M, HORIUCHI Y, TEZUKA T. Presence of Bactericidal/permeability increasing protein in human and rat skin[J]. *Exp Dermatol*, 2004, 13(1): 55-60.
- [12] BEAMER L J, CARROLL S F, EISENBERG D. Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution[J]. *Science*, 1997, 276(5320): 1861-1864.
- [13] ZOR T, MAYR B M, DYSON H J, et al. Roles of phosphorylation and helix propensity in the binding of the KIX domain of CREB-binding protein by constitutive (c-Myb) and inducible (CREB) activators[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 42241-42248.
- [14] CALARESE D A, SCANLAN C N, ZWICK M B, et al. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition[J]. *Science*, 2003, 300(5628): 2065-2071.
- [15] 朱立平. 蛋白质糖基化与 B 细胞免疫[J]. *上海免疫学杂志*, 2001, 21(4): 193-194.
- [16] HUBACEK J A, BUCHLER C, ASLANIDIS C, et al. The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharide binding protein (LBP) and bactericidal permeability increasing protein (BPI) is highly conserved[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 1997, 236(2): 427-430.
- [17] IOVINE N M, ELSBACH P, WEISS J. An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(20): 10973-10978.
- [18] 叶 兰,訾 臣,刘 璐,等. 仔猪 BPI 基因表达水平与大肠杆菌 F18 菌株感染的关系[J]. *遗传*, 2011, 33(11): 1225-1230.