

马鲛鱼中精氨酸脱羧酶的基因克隆及生物信息学分析

哈斯, 周家民, 韩玲钰, 邹宇, 马堃, 李婷婷

(大连民族大学生命科学院, 辽宁大连 116600)

摘要: 本研究以马鲛鱼贮藏期内腐败产胺菌-霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*) 为研究对象, 通过基因工程和生物信息学多种分析方法, 探究马鲛鱼种霍氏肠杆菌精氨酸脱羧酶的理化性质。通过 T-A 克隆并测序得到 ADC 基因, 将其翻译成蛋白序列, 然后预测蛋白质一级结构、二级结构以及三维构象, 分析 ADC 蛋白质的理化性质及其功能。结果显示: ADC 蛋白由 93 个氨基酸构成, 预估分子量大小约为 10.82 ku, 理论等电点是 8.64, 原子组成为 $C_{492}H_{746}N_{136}O_{135}S_3$, 半衰期 >10 h (大肠杆菌, 体内), 脂肪系数是 86.02; 总平均亲水性是 -0.35 整体表现为亲水性, 是可溶性蛋白; 不稳定系数为 48.57, 且 ADC 蛋白不存在信号肽, 不是分泌蛋白。这些结果以及同时预测的 ADC 蛋白的二级结构和三维构象, 为后续的深入研究提供参考, 今后在基因克隆的基础上, 将进行蛋白质的表达、分离纯化和性质研究, 进一步解析精氨酸脱羧酶。

关键词: 马鲛鱼; 霍氏肠杆菌; 精氨酸脱羧酶; 生物胺

文章编号: 1673-9078(2021)03-83-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.3.0686

Cloning and Bioinformatics Analysis of Arginine Decarboxylase Gene in *Scomberomorus niphonius*

HA Si, ZHOU Jia-min, HAN Ling-yu, ZOU Yu, MA Kun, LI Ting-ting

(School of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China)

Abstract: In this study, *Enterobacter hormaechei*, a spoilage amine-producing bacteria during storage of mackerel, was used as the research object. The physico-chemical properties of arginine decarboxylase of *Enterobacter hormaechei* in *Scomberomorus niphonius* were examined by various of genetic engineering and bioinformatic methods. The ADC gene was cloned and sequenced by T-A, translated into a protein sequence, before the primary structure, secondary structure and three-dimensional conformation of the protein were predicted, and the physico-chemical properties and functions of the ADC protein were analyzed. The results showed that the ADC protein was composed of 93 amino acids, with the estimated molecular weight roughly as 10.82 ku, the theoretical isoelectric point as 8.64, the atomic composition as $C_{492}H_{746}N_{136}O_{135}S_3$, and the half-life >10 h (*E. coli*, *in vivo*), and the fat coefficient as 86.02. With the total average hydrophilicity as -0.35, the overall performance of the protein was hydrophilic. Behaving like a soluble protein with the instability coefficient as 48.57, the ADC protein did not have a signal peptide and was a secreted protein. These results as well as the simultaneously predicted secondary structure and three-dimensional conformation of the ADC protein provide a reference for subsequent in-depth research. In the future, on the basis of gene cloning, protein expression, separation and purification and properties research should be carried out to analyze further arginine decarboxylase.

Key words: mackerel; enterobacter cholerae; arginine decarboxylase; biogenic amine

引文格式:

哈斯,周家民,韩玲钰,等.马鲛鱼中精氨酸脱羧酶的基因克隆及生物信息学分析[J].现代食品科技,2021,37(3):83-88

HA Si, ZHOU Jia-min, HAN Ling-yu, et al. Cloning and bioinformatics analysis of arginine decarboxylase gene in *Scomberomorus niphonius* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 83-88

由于水产品的开发利用相对较低, 其容易在微生物

收稿日期: 2020-07-21

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (20180551123)

作者简介: 哈斯 (1996-), 男, 在读研究生, 研究方向: 水产品贮藏加工及质量安全

通讯作者: 李婷婷 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 水产品贮藏加工及质量安全

物的作用下腐败变质, 而马鲛鱼 (*Scomberomorus niphonius*) 是一种容易在腐败变质后发生生物胺中毒的鱼^[1]。马鲛鱼具有分布较广、产量较高、生长较快等特点, 已经在东北地区成为一种主要的经济鱼类^[2,3]。生物胺 (Biogenic amines, BAs) 是一类低分子质量含氮有机化合物, 广泛存在于富含蛋白质和氨基酸的食物中, 大多可由具有脱羧酶活性的微生物将氨

氨酸分解生成^[4]。生物胺根据结构可划分为芳香族胺、脂肪族胺和杂环族胺；根据组成可分为单胺和多胺。生物胺产生主要有两种方式，一种是游离的氨基酸经微生物的脱羧作用，另一种则通过氨基酸脱羧酶脱羧作用^[5]。水产品运输和贮藏的过程中非常容易受到微生物的污染而产生大量的生物胺，由于其含有大量的氨基酸和蛋白质。一部分微生物可以通过控制氨基酸脱羧酶，产生相应的代谢物质来促进生物胺的产生，从而导致水产品的腐败变质，在水产品中分离得到的肠杆菌科、气单胞菌属、假单胞菌属、弧菌属、梭菌属、肺炎克雷伯氏杆菌、链球菌属、埃希氏菌属、变形杆菌属等多种微生物种群都可以产生生物胺^[6]。含有高浓度生物胺的食物可能是鱼类，鱼类衍生物和发酵产品^[7]。适量的生物胺可维持正常的生理代谢，但过量的生物胺会使人体中毒并引起严重的反应，如头痛、血压变化、呼吸系统疾病、心悸等^[8,9]。因此如何抑制生物胺的产生成为越来越重要的研究问题同时也受到了越来越多人的关注。

通常认为，生物胺的形成能力似乎与菌株有关，而不是特定物种^[10]。肠杆菌科细菌显示通过通过精氨酸脱羧酶分别产生多胺，特别是腐胺的强大能力^[11]。大肠杆菌中腐胺的合成涉及精氨酸脱羧酶将精氨酸脱羧生成胍丁胺，然后将其通过胍丁胺尿素水解酶水解，或通过精氨酸脱羧酶水解精氨酸^[12]。在之前的工作中，发现马鲛鱼体内含有大量腐胺。通过 16s rRNA 鉴定的来自马鲛鱼的菌株为霍氏肠杆菌。因此，在这项研究中，通过聚合酶链式反应 (PCR) 克隆和表达了来自霍氏肠杆菌中精氨酸脱羧酶基因 (ADC)，还对其进行了一系列的生物信息学分析，为后续的深入研究提供参考。今后在基因克隆的基础上，将进行蛋白质的表达、分离纯化和性质研究，进一步解析精氨酸脱羧酶。

1 材料和方法

1.1 材料

马鲛鱼，购置于大连乐购冷鲜超市冷库；霍氏肠杆菌 Ho-01 (分离于马鲛鱼体内) LB 培养基，北京索莱宝生物科技有限公司；PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 高保真酶试剂盒，大连 Takara 公司；50×TAE 缓冲液、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、X-Gal、氨苄青霉素，北京索莱宝生物科技有限公司；Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR® 试剂盒，大连 Takara 公司；TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒，大连 Takara 公司；pMD20-T vector 克隆载体、

E. coli JM109 Competent Cells，大连 Takara 公司；溴化乙锭核酸染色剂、DNA Maker、琼脂糖，上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 实验仪器

防蒸发梯度 PCR 仪，德国 Eppendorf 公司；LRH 型生化培养箱，上海一恒科技有限公司；LDZX-50FBS 立式高压蒸汽灭菌锅，上海申安医疗器械厂；DK-8D 型恒温水浴槽，上海一恒科技有限公司；PE Victor X3 酶标仪，美国 Perkin Elmer 公司；HZQ-X300C 型恒温振荡器，上海一恒科技有限公司；Purifier 生物安全柜，美国 LABCONCO 公司；Legend Micro21R 微量冷冻离心机，美国 Thermo 公司；GelDoc XR+全自动凝胶成像系统，美国 Bio-Rad 公司；PE Victor X3 酶标仪，美国 Perkin Elmer 公司。

1.3 菌种活化及基因组 DNA 提取

霍氏肠杆菌的活化，从 -80 °C 超低温冰箱中取出保存的菌种，平板划线于 LB 固体培养基，28 °C 倒置培养 12~16 h，挑取单菌落于 10 mL LB 液体培养基中，28 °C、160 r/min 摇床过夜培养用。将细菌溶液放入 1.5 mL EP 管中，离心 10 min 以弃去上清液。加入 1 mL TE 缓冲液重悬菌体，旋涡使菌体充分混匀。将细菌溶液置于 1.5 mL EP 管中，并在沸水浴中加热 10 min，离心并以上清液为模板。得到的 DNA 用 50~100 μL TE Buffer 溶解，于 -20 °C 保存备用。

1.4 霍氏肠杆菌 Ho-01 目的基因 ADC 的克隆及测序

根据 NCBI 数据库中的霍氏肠杆菌基因序列 (GenBank: CP036310.1)，利用 primer primer 5 软件进行扩增引物的设计。在上海生工生物工程股份有限公司合成基因扩增引物序列 (表 1 所示)。

表 1 ADC 基因扩增引物序列

Table 1 ADC gene amplification primer sequence

引物名称	碱基序列 (5'→3')
ADC-F (上游)	TCCGAGGAAGCCAGCAAG
ADC-R (下游)	CGGGTAAACGAGGAAATAGTC

以霍氏肠杆菌 Ho-01 的基因组 DNA 为模板，利用高保真酶试剂盒 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 进行 PCR 实验，并根据使用说明书及优化试验确定 PCR 扩增反应体系及条件。ADC 基因扩增反应条件为：98 °C，10 s；58 °C，5 s；72 °C，5 s；30 个循环；4 °C 恒温。

表 2 生物信息学分析工具

Table 2 Bioinformatics analysis tools

工具	用途	网址
ORFfinder 工具	核酸序列翻译为氨基酸序列	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder
MEGA 7.0	同源性比对, 构建系统发育树	-
ProtParam 工具	理化性质预测	https://web.expasy.org/protparam
ExPASy-ProtScale	分析蛋白亲疏水性	http://ca.expasy.org/tools/protscale.html
TMHMM Server v. 2.0 在线预测工具	分析蛋白跨膜区	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
SignalP 4.0 Server	信号肽预测分析	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SOPMA	二级结构预测	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
SWISS MOD	三级结构预测	http://swissmodel.expasy.org/

扩增所得的目的片段, 通过大连 Takara 公司的 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction 试剂盒进行 PCR 产物纯化, 然后与 pMD20-T 载体进行连接, 重组的质粒转化到 E.coli JM109 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选挑取阳性克隆子, 送至 Takara 公司进行测序, 测序结果利用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行比对分析。

1.5 精氨酸脱羧酶的生物信息学分析

将测序获得的 ADC 核酸序列使用 NCBI 网站中的 ORFfinder 工具翻译为氨基酸序列, 翻译得到的 ADC 蛋白的氨基酸序列上传至 NCBI 网站, 进行序列 BLAST 分析, 蛋白数据库选用 Swiss-Prot Database, 将高相似性蛋白比对序列下载至本地, 按照系统发育分析软件 MEGA 7.0 进行序列同源性比对, 构建系统发育树。生物信息学分析工具如表 2 所示。

2 结果与分析

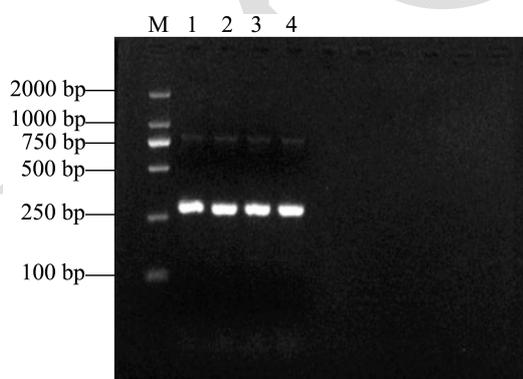


图 1 重组质粒 ADC 目的片段的 PCR 产物

Fig.1 The PCR amplification products of ADC fragments

2.1 ADC 基因克隆及测序

如图 1 所示, 通过 PCR 从霍氏肠杆菌的总 DNA 中扩增了一个基因片段, 目的片段大小约为 260 bp, 与测序结果基本吻合, 在 NCBI 网站对测序结果比对分析, 由霍氏肠杆菌中克隆测序获取的基因片段序列与 GenBank 中登录的霍氏肠杆菌精氨酸脱羧酶基因 speA 序列的同源性达 99%, 可初步确定菌株中存在精氨酸脱羧酶基因, 为精氨酸脱羧酶基因的后续表达及其编码蛋白的功能探究奠定了基础。

2.2 ADC 蛋白一级结构的确定及序列比对分析

利用 NCBI 网站中 ORFfinder 工具将 ADC 核酸序列分别翻译为氨基酸序列, 将翻译得到的 ADC 蛋白的氨基酸序列分别上传至 NCBI 网站, 进行序列 BLAST 分析, 比对结果显示该序列与 GenBank 中登录的霍氏肠杆菌精氨酸脱羧酶基因 (speA) 序列的同源性达 100% (图 2)。

2.3 ADC 蛋白的同源性分析

通过 NCBI 数据库的 smart BLAST 工具搜索 ADC 蛋白的相似性较高的序列, 将下载的序列用 DANMAN 8.0 软件进行多序列比对, 结果如图 3 所示, ADC 蛋白与肠杆菌科生物合成精氨酸脱羧酶 (登录号: WP_001295380.1) 相似度较高。基于 ADC 的多序列比对结果, 利用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树 (图 4)。

arginine decarboxylase [Enterobacter hormaechei]

Sequence ID:PHZ99935.1 Length:658 Number of Matches:1

Range 1:35 to 125 [GenPept Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
199 bits(507)	2e-61	Compositional matrix adjust.	91/91(100%)	91/91(100%)	0/91(0%)

Query 1 MLRTYNIAWWGNNYYDVNELGHISVCPDPVPEARVDLAKLVKTREAQQRPLALFCPPQ 60
MLRTYNIAWWGNNYYDVNELGHISVCPDPVPEARVDLAKLVKTREAQQRPLALFCPPQ
Sbjct 35 MLRTYNIAWWGNNYYDVNELGHISVCPDPVPEARVDLAKLVKTREAQQRPLALFCPPQ 94

Query 61 ILQHRLRSINAAFKRARESYGYNGDYFLVYP 91
ILQHRLRSINAAFKRARESYGYNGDYFLVYP
Sbjct 95 ILQHRLRSINAAFKRARESYGYNGDYFLVYP 125

图2 ADC蛋白的氨基酸序列比对

Fig.2 Amino acid sequence alignment of ADC protein

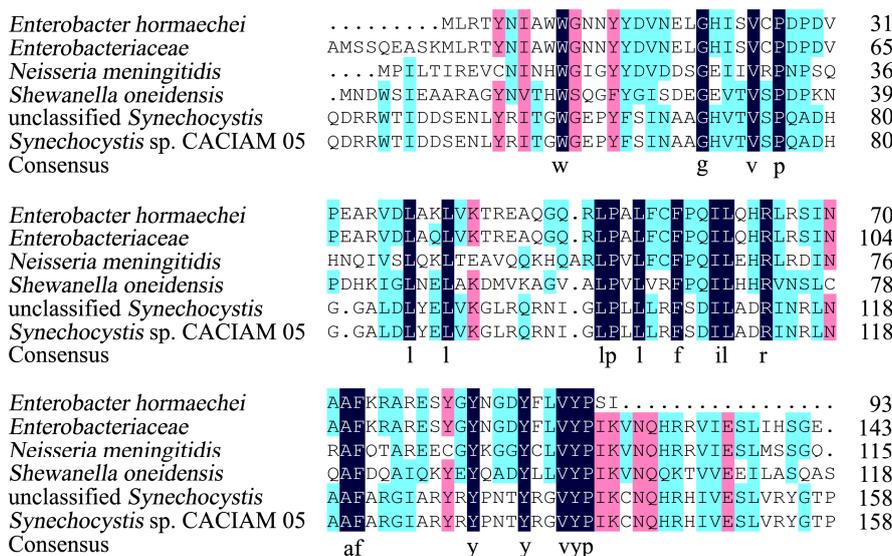


图3 ADC蛋白多序列比对

Fig.3 ADC protein multiple sequence alignment

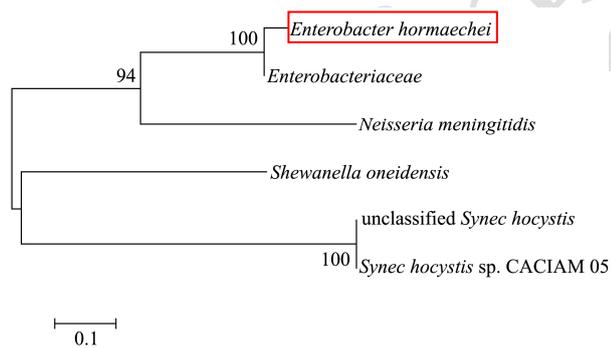


图4 ADC基因系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of ADC gene

2.4 ADC蛋白理化性质预测

将目的蛋白的氨基酸序列输入至 ExPASy-ProtParam 在线分析软件中进行蛋白质理化性质预测, 结果如表 2 所示, ADC 蛋白由 93 个氨基酸构成, 预估分子量大小约为 10.82 ku、理论等电点是 8.64、原子组成为 C₄₉₂H₇₄₆N₁₃₆O₁₃₅S₃、半衰期>10 h(大肠杆菌, 体内)、脂肪系数为 86.02; 总平均亲水性是-0.35 整体

表现亲水性, 属于可溶性蛋白; 不稳定系数为 48.57, 根据不稳定系数数值<40 属于稳定蛋白的标准, 推断 ADC 蛋白为不稳定蛋白。

表 2 ADC 蛋白理化性质的预测

Table 2 The prediction of physicochemical properties of ADC proteins

Analysis	Hall
Number of amino acids	93
Molecular weight	10822.35 u
Theoretical pI	8.64
Extinction coefficients	1.080
Instability index	48.57
Formula	C ₄₉₂ H ₇₄₆ N ₁₃₆ O ₁₃₅ S ₃
Aliphatic index	86.02
Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.35
Estimated half-life	>10 hours (Escherichia coli, <i>in vivo</i>)

2.5 ADC 蛋白亲疏水分析

使用 ProtScale 工具分析 ADC 蛋白亲疏水性, 由图 3 可知, 其中负值代表亲水, 数值越小亲水性越强, 而正值代表疏水, 数值越大疏水性越强。疏水区最大值为第 58 位氨基酸 (1.878), 亲水区最小值为 47 位氨基酸 (-2.522), 图中可以看出在 0 以下的区域有很多氨基酸, 即亲水性区域, 所以 ADC 蛋白为亲水性蛋白质, 这与 ExPASy Protaram 预测得到的总平均疏水指数 (GRAVY=-0.35) 结果是一致的。

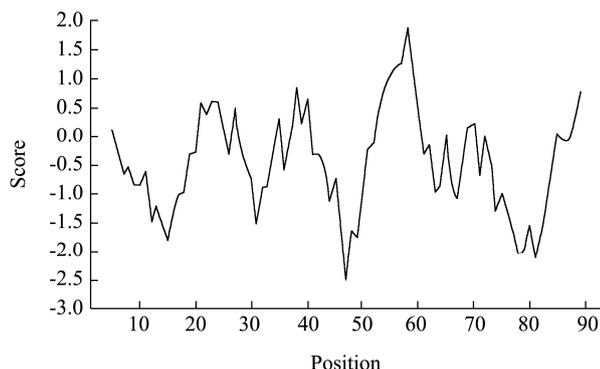


图 5 ADC 蛋白的疏水性分析

Fig.5 The Hydrophobic forecast of ADC proteins

2.6 ADC 蛋白跨膜结构及信号肽预测

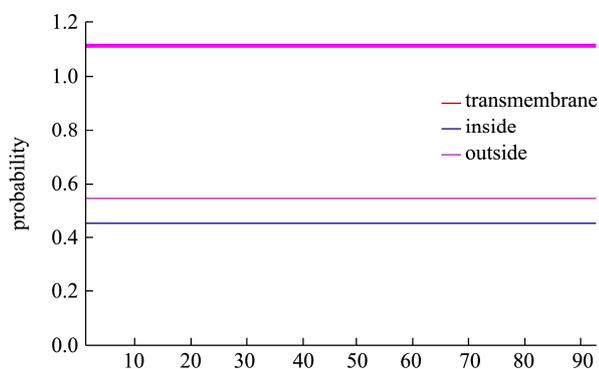


图 6 ADC 蛋白的跨膜区预测

Fig.6 The transmembrane region prediction of ADC proteins

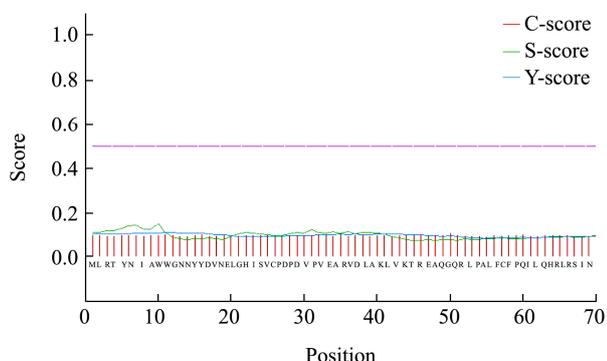


图 7 ADC 蛋白的信号肽预测

Fig.7 The signal peptide prediction of ADC proteins

通过 TMHMM Serverv. 2.0 在线工具预测跨膜与跨膜螺旋结构特征, ADC 蛋白预测的跨膜螺旋

(Transmembrane Helix, TMH) 数为 0, N'末端在膜的细胞质侧的总概率为 0.45, 可以推测 ADC 蛋白都处于膜外, 为非跨膜蛋白(图 6)。用 Signal P 4.0 Server 软件预测 ADC 蛋白信号肽, 通过综合剪切点分值 C 的最大值来预测信号肽的剪切位点, 通过信号肽分值 (S>0.5) 来判断 ADC 蛋白是否为分泌蛋白, 第 50 位氨基酸 C_{Max}=0.11, S 平均值为 0.13 (<0.5), 说明 ADC 蛋白均不具有分泌信号肽的特征 (图 7)。

2.7 ADC 蛋白的二级结构预测



图 8 ADC 蛋白的二级结构

Fig.8 The secondary structure prediction of ADC proteins

蛋白质的二级结构预测有利于探究氨基酸序列和三维构象之间的联系。利用 SOPMA 在线工具分析 ADC 蛋白的二级结构 (图 8), 由预测结果可知, ADC 蛋白中 α -螺旋 (h 表示) 为 38.71%, β -转角 (t 表示) 为 9.68%, 氨基酸残基构成的延伸链 (e 表示) 为 24.73%, 无规则卷曲 (c 表示) 占 26.88%。蛋白质肽链中构成配体/受体结合的活性部位是无规则卷曲, 容易受到侧链相互影响而改变空间构象, ADC 蛋白二级结构中如果含有大量的无规则卷曲可能影响蛋白质肽链的活性, 从而影响蛋白质的功能。

2.8 ADC 蛋白的三维构象模型预测

经 SWISS-MODEL 在线分析平台, ADC 蛋白与生物合成的精氨酸脱羧酶有 98.90%相似, 能够用于同源建模。由图 9 可知, ADC 蛋白主要有 α -螺旋和无规则卷曲构成, 与二级结构预测的结果是一致的。

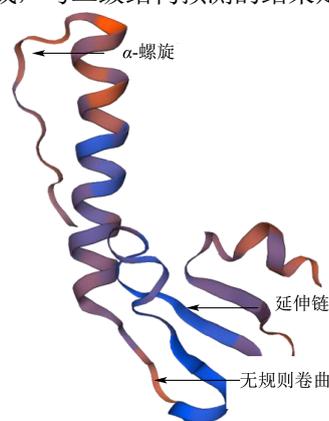


图 9 ADC 蛋白的三级结构

Fig.9 The tertiary structure prediction of ADC proteins

3 结论

3.1 本实验对马鲛鱼中霍氏肠杆菌鸟氨酸脱羧酶基因进行研究,包括基因克隆和生物信息学分析。通过PCR扩增获得目的基因,构建T-A克隆重组质粒进行检测最终获得ADC基因的碱基序列。同时预测了ADC蛋白质一级结构、二级结构、理化性质、ADC蛋白质功能、三维构象五项内容。

3.2 实验结果表明ADC蛋白质一级结构由93个氨基酸组成,二级结构由螺旋结构、折叠结构、无规卷曲和氨基酸残基构成的延伸链组成,其中螺旋结构占38.71%占总结构的三分之一以上。在理化性质和功能预测中我们得知其分子量大小约为10.82 ku、理论等电点为8.64、原子组成为 $C_{492}H_{746}N_{136}O_{135}S_3$ 、半衰期>10h(大肠杆菌,体内)、脂肪系数为86.02;总平均亲水性为-0.35整体表现亲水性,属于可溶性蛋白,而且不存在信号肽及跨膜区。上述研究首次报道马鲛鱼中产胺菌-霍氏肠杆菌中精氨酸脱羧酶的生物信息学特性,今后在基因克隆的基础上,将进行蛋白质的表达、分离纯化和性质研究,进一步解析精氨酸脱羧酶。

参考文献

- [1] 赵中辉,林洪,李振兴.不同温度储藏条件下鲛鱼生物胺变化的研究[J].食品工业科技,2011,32(6):358-360
ZHAO Zhong-hui, LIN Hong, LI Zhen-xing. Study on changes of Spanish mackerel biogenic amines under different temperature storage conditions [J]. Food Industry Technology, 2011, 32(6): 358-360
- [2] Spano G, Russo P, Lonvaudfunel A, et al. Biogenic amines in fermented foods [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2010, 64(11): 95-100
- [3] Aymerich T, Martín B, Garriga M, et al. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(1): 40-49
- [4] 王光强,俞剑桑,胡健.食品中生物胺的研究进展[J].食品科学,2016,37(1):269-278
WANG Guang-qiang, YU Jian-shen, HU Jian. Research progress of biogenic amines in food [J]. Food Science, 2016, 37(1): 269-278
- [5] Laly S J, Kumar K N A, Sankar T V, et al. Quality of monosex tilapia under ice storage: gutting effects on the formation of biogenic amines, biochemical, and microbiological characteristics [J]. International Journal of Food Properties, 2016, 20(6): 1368-1377
- [6] 张进杰.中国南方传统腊鱼加工、品质及安全性研究[D].杭州:浙江大学,2012
ZHANG Jin-jie. Research on processing, quality and safety of traditional cured fish in southern China [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012
- [7] Halász A, Baráth A, Simon-Sarkadi L, et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food [J]. Trends in Food Science & Technology, 1994, 5(2): 42-49
- [8] Gomes M B, Pires B A D, Fracalanza S A P, et al. The risk of biogenic amines in food [J]. Ciencia & Saude Coletiva, 2014, 19(4): 1123-1134
- [9] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Food Research International, 1996, 29(7): 675-690
- [10] Coton E, Rollan G, Bertrand A, et al. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution [J]. Am. J. Enol. Vitic, 1998, 49(2): 199-204
- [11] Durlu-Özkaya F, Ayhan K, Vural N U. Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products [J]. Meat Science, 2001, 58(2): 163-166
- [12] Morris D R, Pardee A B. Multiple pathways of putrescine biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1966, 241(13): 3129-3135