

# 豬胰脂肪酶相關蛋白質第1型之互補DNA選殖與分析<sup>(1)</sup>

劉芳爵<sup>(2) (3)</sup> 鄭仁君<sup>(2)</sup>

收件日期：96年05月11日；接受日期：96年09月20日

## 摘要

本試驗目的為選殖豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之互補 DNA (cDNA)，並分析其核苷酸酶與轉譯後胺基酸序列與人類和狗之間的同一性。試驗萃取自豬胰臟之 mRNA 經 RT-PCR 後，利用巢式聚合酶連鎖反應 (Nest PCR) 方法增幅豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之互補 DNA，並利用 Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)，進行核苷酸序列與胺基酸序列之比對；結果顯示，此項選殖序列中與人類以及狗之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA，其同一性 (identities) 均為 87%。胺基酸序列比對方面，得知此項選殖序列中與人類以及狗之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型，其同一性為 85%。因此總合上述之結果，推論豬之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型，應與人類以及狗者具有相同之蛋白質結構與來自共同之祖先。同時本試驗選殖豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之 cDNA，將可供後續利用生物反應器，表現胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之重組蛋白質，藉以提升離乳仔豬脂肪之利用率。

關鍵詞：豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型、巢式聚合酶連鎖反應、同一性。

## 緒言

胰脂肪酶 (pancreatic lipase; PTL)、胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 (pancreatic lipase-related protein 1; PLRP1) 以及胰脂肪酶相關蛋白質第 2 型 (pancreatic lipase-related protein 2; PLRP2) 均分泌自胰臟，但是分泌量在物種之間變異甚大。例如狗在胰脂肪酶與胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之分泌量相似，但胰脂肪酶相關蛋白質第 2 型則幾乎沒有分泌；相反地，在馬、天竺鼠以及河狸鼠其胰臟分泌高量之胰脂肪酶相關蛋白質第 2 型，但是胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型分泌量則甚低 (Jayne *et al.*, 2002; Hjorth *et al.*, 1993; Thirstrup *et al.*, 1994)。在小鼠僅分泌少量之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型與胰脂肪酶相關蛋白質第 2 型 (Crenon *et al.*, 1998; Roussel *et al.*, 1998)。在人類亦僅有少量之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型分泌 (De Caro *et al.*, 1977)。另外，De Caro *et al.* (1998)

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1394號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 通訊作者，E-mail: fcliu@mail.tlri.gov.tw。

利用微量定序方法 (microsequencing)，從人類、狗、豬與老鼠之胰液純化出胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型。在水解脂肪活性方面，胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型對甘油三酯、磷脂質並沒有水解能力 (Payne *et al.*, 1994; Giller *et al.*, 1992)，不過 Bezzine *et al.* (1998) 將人類胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之第178與180位置之胺基酸作雙突變 (Ala :: Val; Pro :: Ala)，再利用昆蟲細胞表現重組胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型蛋白質，顯示其具有水解三酸甘油酯之能力，且每 1 mg 可以水解三酯之活性達1800 U。豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之cDNA在基因庫尚未被發表，目前僅知人類之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型編碼基因為 1404 bp 與 468 個胺基酸序列 (accession number: BC025784)，狗之脂肪酶相關蛋白質第 1 型編碼基因亦為1404 bp 與 468個胺基酸序列 (accession number: BC025784)，以及大鼠之脂肪酶相關蛋白質第 1 型編碼基因為 1419 bp 與 473 個胺基酸序列 (accession number: NP\_114470.1)，而豬之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型，其胺基酸序列亦尚未被建立。因此本試驗藉由選殖豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA，供後續利用位置專一突變方法 (sited-directed mutagenesis)，表現具有水解脂肪能力之重組胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型，並應用於改善離乳仔豬之脂肪利用率。

## 材料與方法

### I. Total RNA 萃取與 RT-PCR

試驗採用剛屠宰之豬胰臟，萃取胰臟之總核糖核酸 (total RNA)，供進行 mRNA 純化。胰臟 total RNA 之萃取方法，主要依據 TRIzol reagent 萃取 RNA 試劑組之建議步驟 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。首先取約 1 g 胰臟加入 TRIzol 後，經離心、75% 酒精清洗、異丙醇沉澱以及風乾等步驟後，得到胰臟之 total RNA。取 300  $\mu$ g total RNA，利用 poly(A<sup>+</sup>) RNA with the FastTrack<sup>®</sup> MAG mRNA 分離 mRNA 套組 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，分離與純化帶有 poly(A<sup>+</sup>) 之 RNA，再取 5  $\mu$ L poly(A<sup>+</sup>) RNA，進行 RT-PCR 產生 cDNA 產物；此步驟之實施方法採用 SuperScrip<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase 試劑組推薦之方法 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。

### II. 胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA 選殖

運用人類與狗之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之 cDNA (編碼基因共 1404 bp) 進行核苷酸比對，並在兩者之保守區域 (conserved region) 設計專一性之引子對，即在人類胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA 第 31-1410 之間設計引子對，再以巢式聚合酶連鎖反應增幅產生豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之 cDNA 產物。並取 10  $\mu$ L 之 PCR 產物，進行 1.0% 瓊脂膠片電泳，以溴化乙錠染色，照像記錄。電泳圖形運用數位式影像分析 (Bio-rad ; Molecular Imager VersaDoc System, CA, USA) 掃描至電腦中儲存。

### III. pGEM-T Easy 載體黏合、轉形至勝任細胞方法以及勝任細胞轉形株之篩選

運用巢式聚合酶連鎖反應方法，將選殖胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之 PCR 產物，利用 T4 結合酶連結於 pGEM-T Easy 載體，置於 4°C 冰箱中過夜，完成 pGEM-T Easy 載體之黏合 (PLRP1/pGEM-T Easy vector)。

取出 PLRP1/pGEM-T Easy vector 載體再利用 42°C 與進行熱衝擊 (heat shock) 45 秒，將 PLRP1/pGEM-T Easy vector 載體轉形至勝任細胞 (DH5  $\alpha$ )，接著立即冰浴 15 分鐘，完成將載體轉形至勝任細胞中。隨後將勝任細胞之轉形株，塗抹於已添加 7  $\mu$ L IPTG (20%; isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside; Sigma, USA)、40  $\mu$ L X-gal (2%; bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside; Sigma, USA) 與 10  $\mu$ L 之 50 pmol/ $\mu$ L Ampicillin 混合於 LB agar 中 (Luria-Bertani agar; Difco, Detroit, MI, USA)，於 37°C 下過夜培養。第二天篩選，外觀呈現白色之菌落，表示其為嵌入 PLRP1/pGEM-T Easy vector 載體之勝任細胞轉形株。

#### IV. 萃取質體DNA與核苷酸序列分析

將呈白色外貌之菌落挑至含 50 pmole/ $\mu$ L ampicillin 的 LB 液體培養基中，在 37°C 下振盪培養 (140 rpm/min) 18小時。取 1.5 mL 菌液於微量離心管中，以 QIAprep plasmid 試劑組 (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) 抽取質體DNA，並以 dideoxy chain termination method 進行核酸序列定序。

#### V. 核苷酸與胺基酸序列比對

利用美國國家生物技術資訊中心 (NCBI) 提供之線上查詢軟體 Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)，進行核酸序列比對 (Nucleotide-nucleotide BLAST; blastn)，以及 BLASTx 進行胺基酸序列之比對 (Translated query vs. protein database BLAST; blastx)。

## 結果與討論

#### I. 豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型cDNA之選殖

運用比對人類與狗之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之cDNA序列，並在兩者之保守區域 (conserved region) 設計專一性引子對，經巢式聚合酶連鎖反應增幅產生1380 bp之豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之cDNA (如圖1)。因為人類胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之編碼基因為1404 bp (accession number: BC025784)，其中最前端之54 bp為其訊息肽胜 (signal peptide) 區域，因此顯示本次選殖之1380 bp豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型cDNA，已包含其完整之成熟胜肽 (mature peptide)，可供進一步利用其他生物反應器表現豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之重組蛋白質。

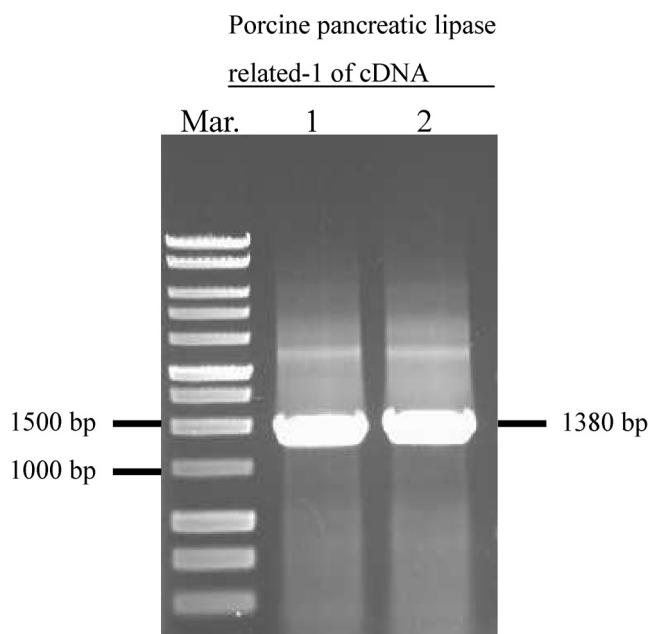


圖 1. 豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之cDNA。

Fig. 1. The cDNA of porcine pancreatic lipase related-1.

Lane Mar. represented DNA marker.

Lane 1 and 2 represented the PCR products of cDNA of the porcine pancreatic lipase related-1.

```

1 CTGCTGGGAG CAGCCAGAGC AAACGAAGTT TGCTATGATT CCATCGGGTG
51 CTTCTCTGAC GATGAGCCCT GGGCCGGGAC AGTAATCAGG CCTCTGAAGA
101 TTCTCCCCTG GAGCCCTGAA AAGATTGGCA CTCGCTTCTT GCTCTACACC
151 AATGAGAACC CAAACAACCTT TCAAATTCTC CTTCCCTCTG ATCCATCAAC
201 GATTGAAGCC TCCAATTTCC AAACAGACAG GAAGACCCGG TTCATCATCC
251 ATGGCTTCAT AGACAAGGGA GATGAGAGCT GGCTGGTGAA CATGTGCCAG
301 AACCTGTTCG AGGTAGAGGA GGTGAACTGC ATCTGCGTGG ACTGGAAGAA
351 AGGCTCCCAG ACGACTTACA CACAGGCCGC CAACAACGTG CGGGTGGTGG
401 GCGCCCAGGT GGCCCAGATG CTGGCCATGC TCCAGTTGAA CTACAGCTAC
451 TCACCGTCCC AGGTCCACCT CATCGGCCAC AGCCTGGGGG CCCACGTGGC
501 GGGAGAGGCA GGGAGCAAGA CTCCAGGCCT GGGCAGGATT ACAGGGTTGG
551 ATCCTGTAGA AGCAAGTTTT GAGGGTACTC CTGAAGAGGT CCGACTCGAT
601 CCCTCCGATG CTGACTTTGT TGATGTGATC CACACGGATG CAGCTTCCCT
651 GATCCCATTG TTGGGCTTTG GAACAAGTCA ACAGTTGGGA CACCTTGACT
701 TCTTCCCAA TGGAGGAGAA GAAATGCCTG GATGCAAGAA GAATGCCCTG
751 TCGCAGATCG TGGACCTAGA CGGCATCTGG TCAGGAACCC GGGACTTTGT
801 GGCTTGCAAC CACCTGAGAA GCTACAAGTA TTAATCAGAG AGCATCCTCA
851 ATCCCGATGG GTTCGCTGCA TACCCCTGCG CTTCTACAG GCCTTTGAGT
901 CTAACAAGTG CTTCCCTGT CCAGATGAAG GATGCCACCA GATGGGTCAC
951 TATGCCGATA GATTTGCTGG CAAGACACAT GAGGAGCAGC AGAAATCTTT
1001 CCTGAACACA GGAGATTCCG AAGATTTTGC TCGCTGGAGA TATGGAGTTA
1051 CTATAACACT GTCTGGAAGA GTAGCCTCGG GTCAAATCAA AGTTGCTTTG
1101 TTTGGAGATA AGGGAAACAC TCGCCAATAC AATATCTTCA CTGGGATTAT
1151 CACACCCGGG TCCACTCATT CCAATGAGTT TGACGCAGAT CTCGATGTTG
1201 GAACAATTGA GAAAGTCAAG TTTCTTTGGA ATAACAACGT GCTAAACCCA
1251 ACTCTCCCCA GAGTGGGTGC AGCCAAAATC ACTGTGCAGA AGGGAGAAGA
1301 TAAGACGGAG TACAATTTCT GTAGCGAACA GACTGTGAGA GAAGGCGTTC
1351 TGCTCACCT CACACCGTGT TAATCACTAG

```

圖 2. 豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之cDNA (1380 bp) 序列。

Fig. 2. The cDNA sequence of porcine pancreatic lipase-related protein 1 (1380 bp).

## II. 豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA 序列分析

利用 nest PCR 選殖豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA，並將其黏合於pGEM-T Easy載體 (pGEM-T Easy vector-PLRP1)，再利用熱衝擊方法將此載體轉形至勝任細胞，接續篩選帶有PLRP1/pGEM-T Easy vector之勝任細胞轉形株，經LB培養液培養 16 小時後，抽出質體DNA進行核苷酸定序。運用BLAST進行核苷酸-核苷酸之比對，得知選殖序列中與人類以及狗之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型cDNA，總評分 (total score) 為 1320-1596、比對涵蓋範圍 (query coverage) 為 87-92%、期望值為 (E-value) 均為 0、同一性 (identities) 均為 87% (如表1)。Claverie and Notredame (2005) 指出，比對不同之基因時，當有超過 75%之同一性核苷酸且期望值低於 0.0001 時，便幾乎可以確定

其基因序列具有相同之構造與共同祖先。因此本試驗利用巢式聚合酶連鎖反應選殖之豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA，應與人類以及狗之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA 具有相同之結構與來自共同之祖先。

表 1. 豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA 與人類以及狗之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA 以 BLAST 進行比對

Table 1. The sequences producing significant alignments with BLAST alignment among porcine and canine and *homo sapiens* of pancreatic lipase-related protein 1 of cDNA

Accession number	Description	Total Score <sup>1</sup>	Query Coverage <sup>2</sup>	E Value <sup>3</sup>	Max. Identities <sup>4</sup>
NM_006229.1	Human pancreatic lipase-related protein 1 (PLRP1) mRNA, complete	1596	92%	0.0	87%
NM_006229.2	<i>Homo sapiens</i> pancreatic lipase-related protein 1 (PNLIPRP1), mRNA	1358	89%	0.0	87%
BC025784.2	<i>Homo sapiens</i> pancreatic lipase-related protein 1, mRNA (cDNA)	1350	89%	0.0	87%
NM_001003319.1	<i>Canis familiaris</i> pancreatic lipase-related protein 1 (PNLIPRP1), mRNA	1320	87%	0.0	87%

<sup>1</sup>Total score defined as the level of alignment between nucleotide and nucleotide through BLAST process.

<sup>2</sup>Query coverage defined as positive alignment between nucleotide and nucleotide through BLAST process.

<sup>3</sup>E-value defined as expectancy value between nucleotide and nucleotide through BLAST process.

<sup>4</sup>Max. identities defined as the level of identity between nucleotide and nucleotide through BLAST process.

### III. 豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA 轉譯後之胺基酸序列分析

利用美國國家生物技術資訊中心 (NCBI) 提供之線上查詢軟體 BLASTx 進行胺基酸序列之比對，豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA 序列轉譯後之胺基酸序列，與人類以及狗之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型胺基酸序列進行比對 (表2)；評分為 836-937、比對涵蓋範圍 91-93%、期望值均為 0 以及同一性均為 85%。Claverie and Notredame (2005) 指出，在比對 100 個胺基酸以上之序列，其中有超過 25% 為同一性胺基酸且期望值低於 0.0001 時，便幾乎可以確定比對之胺基酸序列具有相同之構造與祖先。因此本試驗選殖之豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA，應與人類以及狗之胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA 具有相同之結構與來自共同之祖先。雖然 De Caro *et al.* (1998) 利用 microsequencing 方法，從豬之胰液純化出胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型，但是胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型對甘油三酸酯、磷脂質等均沒有水解能力 (Payne *et al.*, 1994; Giller *et al.*, 1992)。不過 Bezzine *et al.* (1998) 研究發現，如果將人類胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之第 178 與 180 位置胺基酸作雙突變 (Ala :: Val; Pro :: Ala) 再利用昆蟲細胞表現重組胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型蛋白質，顯示其具有水解三酸甘油酯之能力。因此本試驗選殖之豬胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型 cDNA，將供後續利用致突變與基因重組方法轉形至酵母細胞，藉以產生胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之重組蛋白質，並運用於改善離乳仔豬脂肪之利用率。

表 2. 利用 BLASTx 分析比對豬轉譯後胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之胺基酸序列與人類以及狗胰脂肪酶相關蛋白質第 1 型之胺基酸序列

Table 2. The sequences producing significant alignments with BLASTx among *Sus scrofa* and Canin and *Homo sapiens* of pancreatic lipase-related protein 1 of amino acid residues

Accession number	Description	Score (bits) <sup>1</sup>	Query Coverage <sup>2</sup>	E Value <sup>3</sup>	Max. Identities <sup>4</sup>
AAH25784.1	Pancreatic lipase-related protein 1 ( <i>Homo sapiens</i> )	836	91%	0.0	85%
NP_006220.1	pancreatic lipase-related protein 1 ( <i>Homo sapiens</i> )	937	91%	0.0	85%
NP_001003319.1	pancreatic lipase-related protein 1 ( <i>Canis familiaris</i> )	843	93%	0.0	85%

<sup>1</sup>Score defined as the levels of alignment through translated query using BLASTx process.

<sup>2</sup>Query coverage defined as positive alignment through translated query using BLASTx process.

<sup>3</sup>E value defined as expectancy value through translated query using BLASTx process.

<sup>4</sup>Max. identities defined as the level of identity between amino acid residues using BLASTx process.

## 參考文獻

- Bezzine, S., A. Roussel, J. De Caro, L. Gastinel, A. De Caro, F. Carriere and S. Leydier. 1998. An inactive pancreatic lipase-related protein is activated into a triglyceride-lipase by mutagenesis based on the 3-D structure. *Chem. Phys. Lipids* 93:103-114.
- Claverie, J. M. and C. Notredame. 2005. *Bioinformatics for Dummies* : Chapter 8. comparing two sequence. Indianapolis, Indiana. Wiley pressed. pp. 247-278.
- Crenon, I., E. Foglizzo, B. Kerfelec, A. Verine, D. Pignol, J. Hermoso, J. Bonicel and C. Chapus. 1998. Pancreatic lipase-related protein type I: a specialized lipase or an inactive enzyme. *Protein Eng.* 11: 135-142.
- De Caro, A., C. Figarella, J. Amic, R. Michel and O. Guy. 1977. Human pancreatic lipase: A glycoprotein. *Biochem. Biophys. Acta* 490:411-419.
- De Caro, J., F. Carriere, P. Barboni, T. Giller, R. Verger and A. De Caro. 1998. Pancreatic lipase-related protein 1 (PLRP1) is present in the pancreatic juice of several species. *Biochem. Biophys. Acta* 387:331-341.
- Giller, T., P. Buchwald, D. Blum-Kaelin and W. Hunziker. 1992. Two novel human pancreatic lipase related proteins, hPLRP1 and hPLRP2: differences in colipase dependency and in lipase activity. *J. Biol. Chem.* 267:16509-16516.

- Hjorth, A., F. Carriere, C. Cudrey, H. Woldike, E. Boel, D. M. Lawson, F. Ferrato, C. Cambillau, G. G. Dodson, L. Thim and R. Verger. 1993. A structural domain (the lid) found in pancreatic lipase is absent in the guinea pig (phospho) lipase. *Biochemistry* 32:4702-4707.
- Jayne, S., B. Kerfelec, E. Foglizzo, C. Chapus and I. Crenon. 2002. High expression in adult horse of PLRP2 displaying a low phospholipase activity. *Biochem. Biophys. Acta* 1594:255-265.
- Lindemann, D., S. G. Gornelius and S. M. Kandelleg. 1986. Effect of age, weaning and diet digestive enzyme levels in the piglet. *J. Anim. Sci.* 62:1298-1307.
- Payne, R. M., H. F. Sims, M. L. Jennens and M. E. Lowe. 1994. Rat pancreatic lipase and two related proteins: enzymatic properties and mRNA expression during development. *Am. J. Physiol.* 266:G914-G921.
- Roussel, A., J. deCaro, S. Bezzine, L. Gastinel, A. de Caro, F. Carriere, S. Leydier, R. Verger and C. Cambillau. 1998. Reactivation of point mutations. *Proteins* 32:523-531.
- Thirstrup, K., R. Verger and F. Carriere. 1994. Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. *Biochemistry* 33:2748-2756.

# Cloning and alignment of cDNA of porcine pancreatic lipase-related protein 1 <sup>(1)</sup>

Fang-Chueh Liu<sup>(2)(3)</sup> and Jen-Chun Cheng<sup>(2)</sup>

Received : May 11, 2007 ; Accepted : Sept. 20, 2007

## Abstract

The aim of this study was to clone cDNA of porcine pancreatic lipase-related protein 1. The mRNA was derived from porcine pancreas by RT-PCR, and the cDNA product of pancreatic lipase-related protein 1 was amplified by nested PCR. The nucleotide sequences and amino acid residues of porcine pancreatic lipase-related protein 1 were aligned by the Basic Alignment Search Tool (Blast). The results showed that the identity of porcine cDNA of pancreatic lipase-related protein 1 was 87% either between swine and human or between swine and canine. Similar results were also found that the identities were 85%, while comparison of pancreatic lipase-related protein 1 of amino acid residues either between swine and human or between swine and canine. According to the very high identities (87% and 85%) in protein conformation of pancreatic lipase-related protein 1 between swine and human and canine, we could speculate that all of them stemmed from the common ancestor. Meanwhile, we will also transform the novel of porcine pancreatic lipase-related protein 1 of cDNA into the appropriate bioreactor to yield the recombinant pancreatic lipase-related protein 1 to improve fat digestion for postweaning piglets.

Key words: Porcine pancreatic lipase-related protein 1, Nested PCR, Identity.

---

(1) Contribution No. 1394 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author, E-mail: fcliu@mail.tlri.gov.tw