

牦牛诱导型一氧化氮 合酶生物信息学分析

王 婧 褚 敏
郝峰鸽 崔东安



一、研究背景

二、iNOS全基因分析

三、iNOS编码蛋白质分析



一、研究背景



◆ 牦牛是高寒地区的特有牛种，草食性反刍家畜。牦牛是世界上生活在海拔最高处的哺乳动物。



◆ 主产于中国青藏高原海拔3000米以上地区。适应高寒生态条件，耐粗、耐劳，有“高原之舟”之称。





NO是重要的血管因子，具有调节血流和血管阻力的作用。

在低氧的诱导下，动物产生NO增加，活化含血红素的cGMP，使血管平滑肌和血小板中的cGMP水平增加，促进血管平滑肌松弛，维持组织毛细血管持久性扩张，减小外周阻力，加速血液循环，改善组织获氧能力。



一氧化氮合成酶（NOS）有三种同工酶：

◇ 神经型NOS(nNOS)

◇ 内皮型NOS (eNOS)

◇ 诱导型NOS (iNOS)

结构型NOS



构成型NOS(cNOS):

Ca²⁺依赖型，产生短时效、少量的NO

iNOS:

非Ca²⁺依赖型，存在于所有组织细胞，以巨噬细胞和血管平滑肌细胞含量最多，病理状态下，产生持续时间长、高浓度的NO。

在低氧的条件下，可以被HIF-1诱导表达。



二、iNOS全基因分析



以大通牦牛为实验动物，通过反转录，克隆测序得到一个3595bp的序列。

首先对该序列进行了BLAST，结果如下：

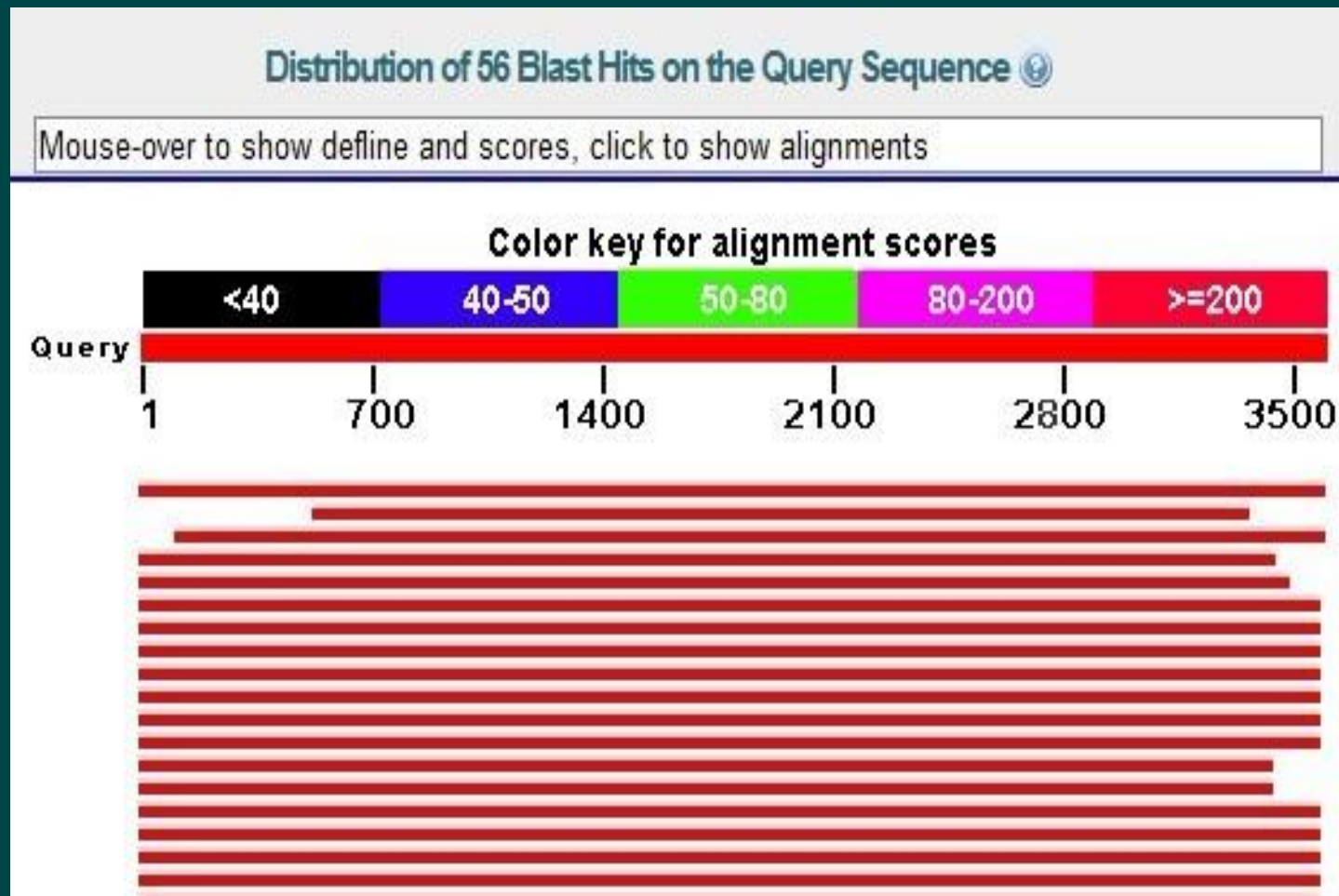


图1、全序列BLAST结果

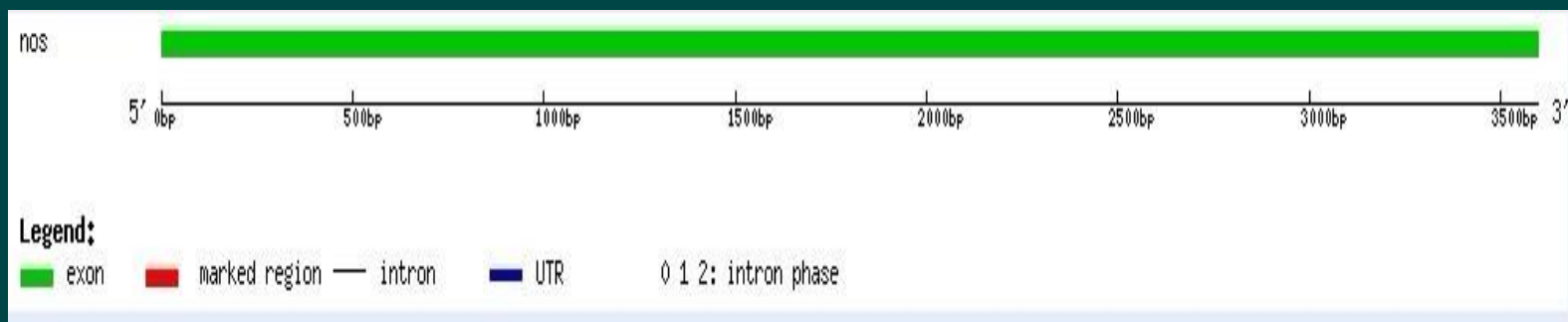


图3、对DNA序列基因结构分析结果



通过GENSCAN对该序列进行翻译预测，得到一个编码1156个氨基酸的蛋白质序列。

```
>/tmp/12_24_11-01:44:07.fasta|GENSCAN_predicted_peptide_1|1156_aa  
MACPWQFLFKIKSQKVDLATELDINNNVGKIFYQPPSSPVTQDDPKRHSPGKHGNESPQPL  
TGTVKTSPESLSKLDAPPSACPRHVKIKNWGSGVTFQDTLHQKAKGDLSCKSKSCLASIM  
NPKSLTIGPRDKPTPPDELLPQAIEFVNQYYGSFKEAKIEEHLARVEAVTKEIETTGTYQ  
LTGDELIFATKQAWRNAPRCIGRIQWSNLQVFDARSCSTAQEMFEHICRHVRYATNNGNI  
RSAITVFPQRSDGKHDFRVWNAQLIRYAGYQMPDGSIRGDPANAEFTQLCIDLGWKPKYG  
RFDVLPVLQADGRDPELFEIPPDLVLEVPMEHPRYEFRELELKWYALPAVANMLLEVG
```

图4、通过GENSCAN预测蛋白质结果



三、iNOS编码蛋白质分析

◆ 首先对该蛋白质进行BLAST，物种为牛，结果如下：

	名称	全称	片段长度	相似性	ID
1	Inducible NOS	诱导性一氧化氮合成酶	1156	99%	Q27995
2	cNOS	三型一氧化氮合成酶	1205	53%	P29473
3	P450R	细胞色素450还原酶	678	31%	Q3SYT8
4	Full=NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1	NADPH 依赖性氧化还原酶	577	32%	Q1JPJ0
5	MSR	甲硫氨酸合酶还原酶	695	33%	Q4JIJ2

图5、牦牛iNOS蛋白质在牛中BLAST的结果



- ◆ 催化活性： $L\text{-精氨酸} + n \text{NADPH} + n \text{H}^+ + m \text{O}^2 = \text{瓜氨酸} + \text{NO} + n \text{NADP}^+$
- ◆ 序列属于NOS家族，包括一个FAD结合的FR型结构域，和一个黄素氧还原蛋白结构域。

cattle-NOS2-P	51	KHGNESPQPLTGTVKTSPELSKLDAPPSACPRHVRIKNWGSVTFQDTL	100
		:	
yak	51	KHGNESPQPLTGTVKTSPELSKLDAPPSACPRHVKIKNWGSVTFQDTL	100
cattle-NOS2-P	251	SDGKHDFRVWNAQLIRYAGYQMPDGSIRGDPANVEFTQLCIDLGWKPKYG	300
		.	
yak	251	SDGKHDFRVWNAQLIRYAGYQMPDGSIRGDPANAEFTQLCIDLGWKPKYG	300
cattle-NOS2-P	451	YRSRGGCPADWIWLVPPISGSITPVFHQEMLNIVLSPFYQQVEPWKTHV	500
		.	
yak	451	YRSRGGCPADWIWLVPPISGSITPVFHQEMLNIVLSPFYQQVEAWKTHV	500
cattle-NOS2-P	501	WQDERRRPQRREIRFKVLVKAVFFASVLMHKAMASRVRATILFATETGRS	550
		.	
yak	501	WQDERRRPQRRGIRFKVLVKAVFFASVLMHKAMASRVRATILFATETGRS	550
cattle-NOS2-P	601	NGEKLKKSLLMLKELTNTFRYAVFGLGSSMYPQFCAFAHDIDQKLSQLGA	650
		.	
yak	601	NGEKLKKSLLTLKELTNTFRYAVFGLGSSMYPQFCAFAHDIDQKLSQLGA	650

图6、普通牛和牦牛iNOS序列比对



◇ 539—677位为黄素氧化还原蛋白结合位点。

512	E→G	712	V→M	1153	A→T
611	M→T	1086	R→H		

表1、与普通牛相比突变位点

实用MEME对该蛋白质进行保守结构域进行分析：

Combined Block Diagrams ?

Non-overlapping sites with a p -value better than 0.0001.

The height of the motif "block" is proportional to $-\log(p\text{-value})$, truncated at the height for a motif with a p -value of $1e-10$.

Click on any row to highlight sequence in all motifs. The motif blocks have tool tips with more information.

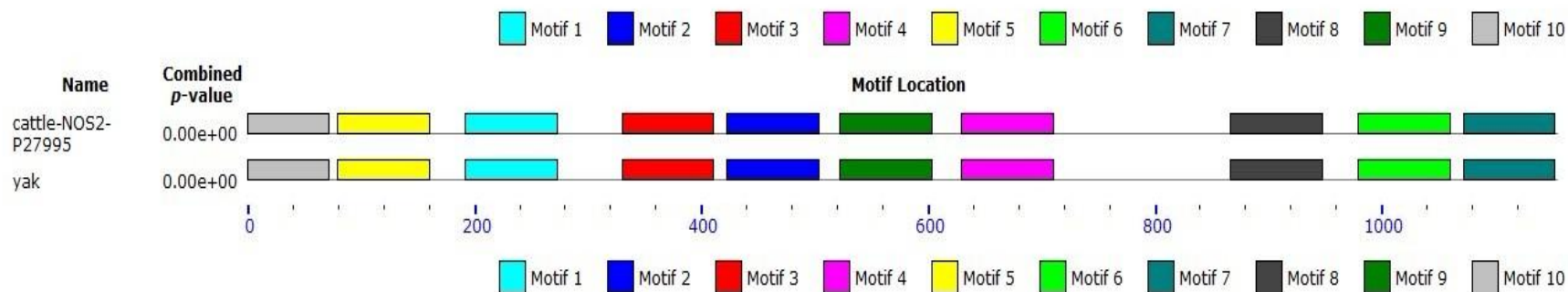


图7、用MEME对牦牛iNOS蛋白进行分析

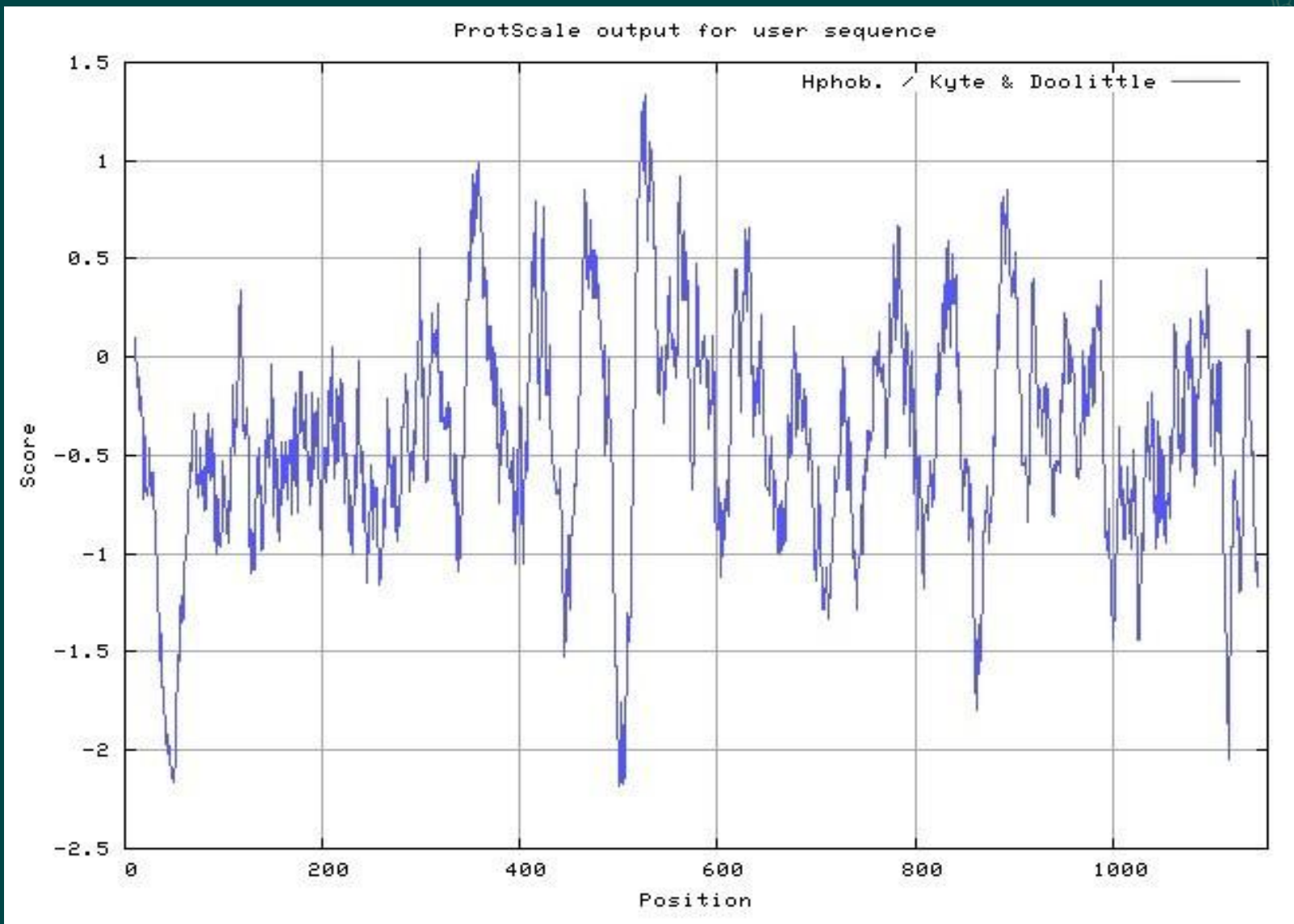


图8、对牦牛iNOS蛋白进行疏水性分析结果

yak	Template	Sequence identity
83-503	3e7gB	95.01%
513-699	3hr4	84.49%
534-1138	1tll	49.84%
cattle	Template	Sequence identity
83-503	3e7gB	95.01%
511-699	3hr4	85.19%
534-1139	1tll	49.92%

表2、牦牛和普通牛iNOS蛋白三级结构预测模板

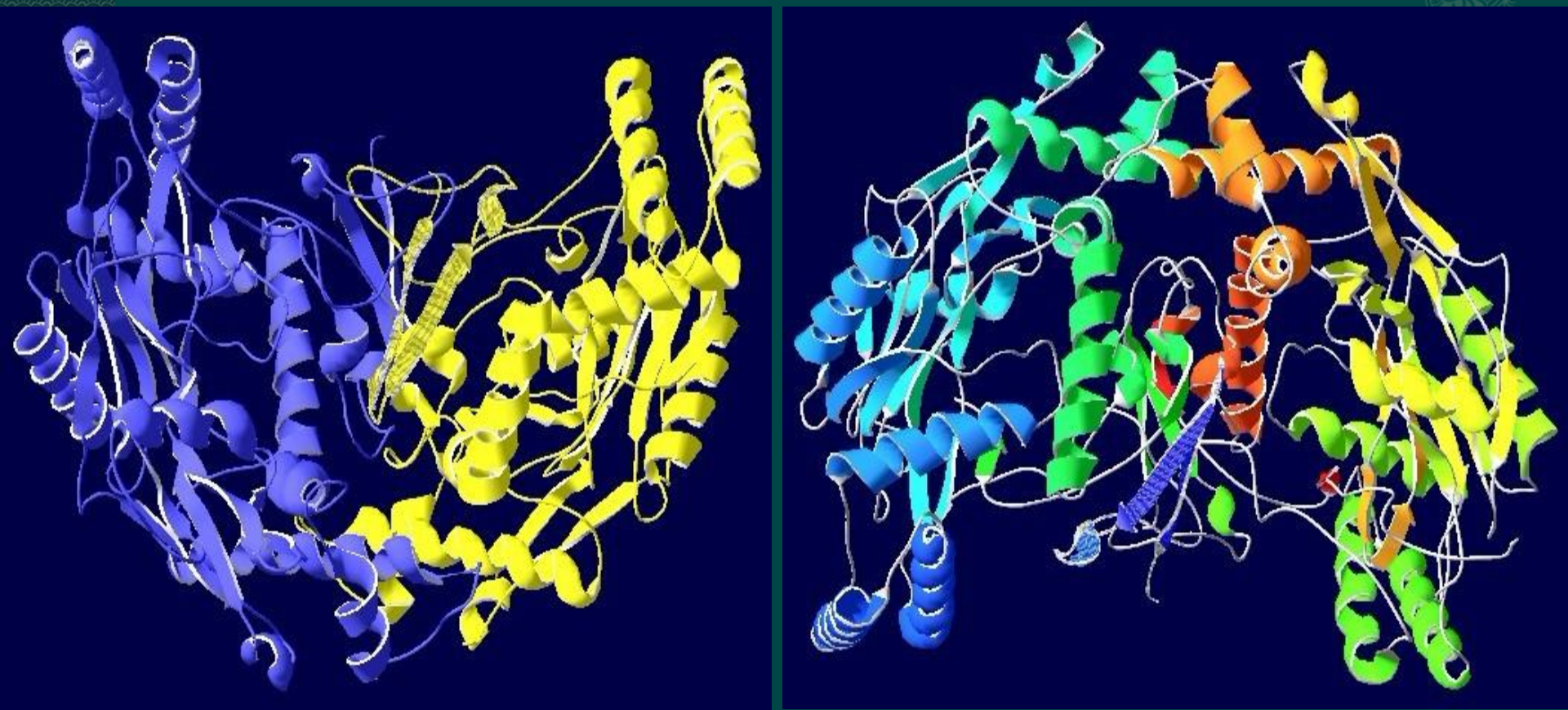


图9、牦牛iNOS蛋白高级结构预测结果

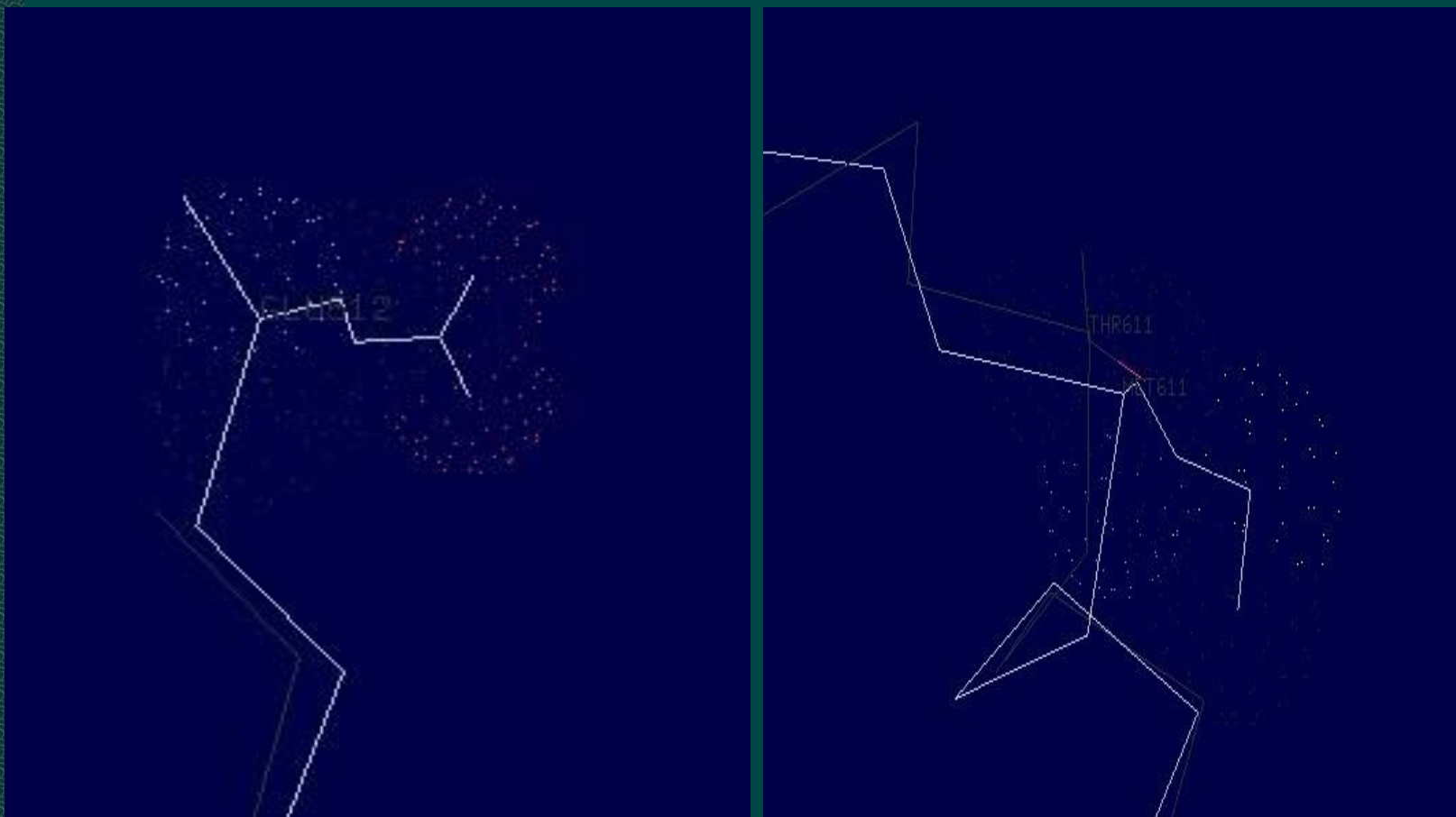


图10、牦牛和普通牛iNOS蛋白512位和611位结构比对



- ◆ 以蛋白质BLAST结果，找出并下载相似性较高的序列进行序列比对，并建立进化树。结果如下：

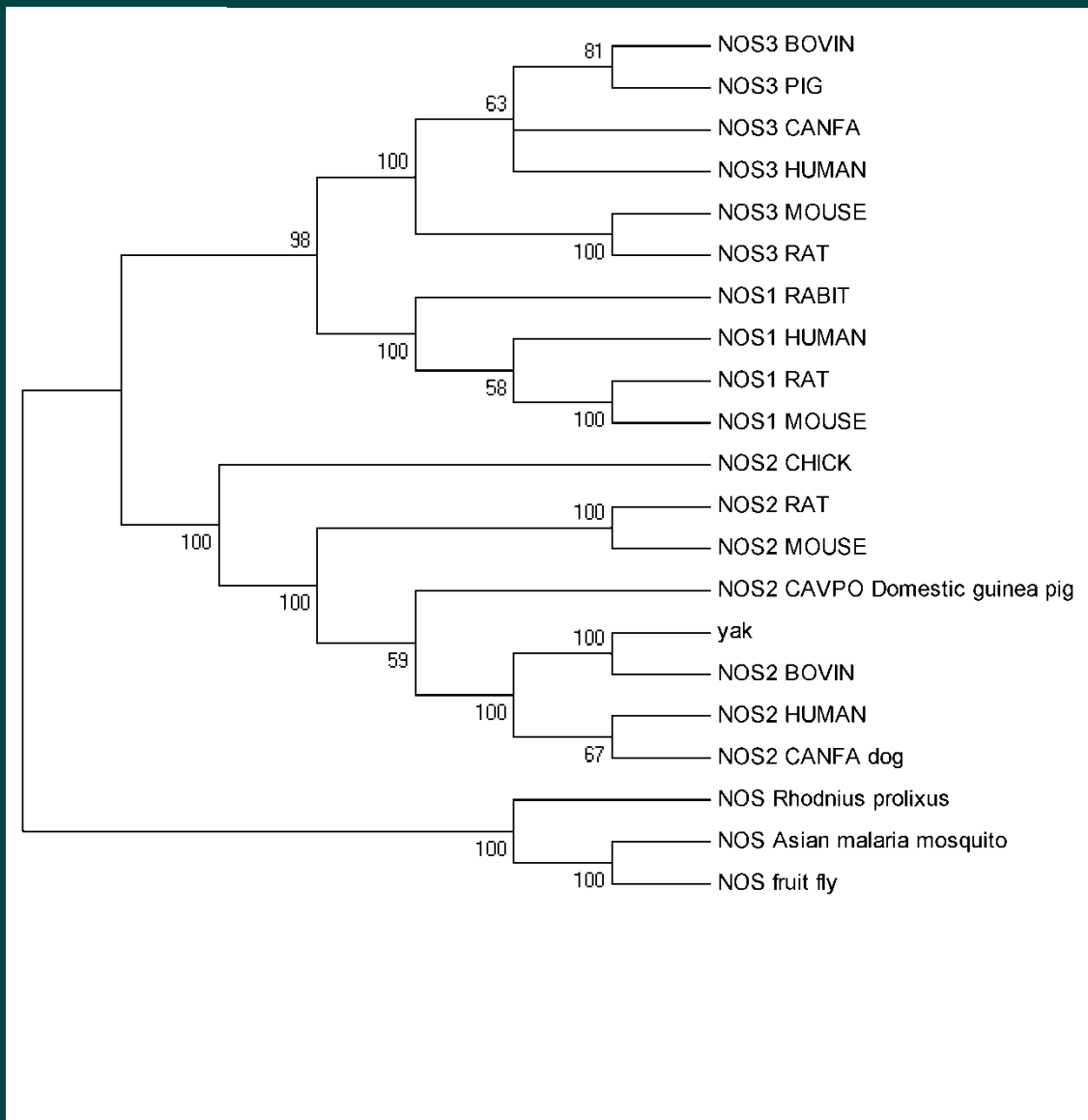


图11、牦牛iNOS蛋白进化树分析

小结：

- ◆ 通过对牦牛iNOS蛋白的分析表明，该蛋白质与普通牛的蛋白质序列相似性较高，但在黄素氧化还原蛋白结合位点有2个氨基酸突变，但这是否是使牦牛iNOS蛋白增加NO的产量的原因尚需实验证实。



参考文献:

- [1] Monge C, Leon-Velarde F. Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol Rev* , 1991, 71(4): 1135 – 1172.
- [2] Weber RE, Jessen TH, Malte H, Tame J. Mutant hemo-globins (alpha 119-Ala and beta 55-Ser): functions related to high-altitude respiration in geese. *J Appl Physiol* , 1993, 75(6): 2646 – 2655.
- [3] Lutfullah G, Ali SA, Abbasi AA. Molecular mechanism of high altitude respiration: primary structure of a minor hemo-globin component from Tufted duck (*Aythya fuligula*, An-seriformes). *Biochem Bioph Res Co*, 2005, 326(1): 123 – 130.
- [4] Gou X, Li N, Lian L, Yan D, Zhang H, Wei Z, Wu C. Hypoxic adaptation of hemoglobin in Tibetan chick embryo: High oxygen-affinity mutation and selective expression. *Comp Biochem Physiol B* , 2007, 147(2): 147– 155.
- [5] 张浩, 吴常信, 强巴央宗, 凌遥, 罗章. 藏鸡高海拔适应与肺组织NOS活力研究. *中国农业大学学报*, 2006, 11(1): 35 – 38.



敬请批评指正！
谢谢！