

牛 Musclin 基因片段克隆与序列分析

王伟杰¹, 马超峰², 李成山¹, 姚雪静¹, 胡益源¹, 杜会坡³, 杨国宇^{4*} (1. 洛阳市动物疫病预防控制中心, 河南洛阳 471002; 2. 信阳市动物疫病预防控制中心, 河南信阳 464000; 3. 伊川县动物疫病预防控制中心, 河南洛阳 471300; 4. 河南农业大学, 河南郑州 450002)

摘要 [目的]对牛 Musclin 基因片段进行克隆与序列分析。[方法]通过电子克隆技术克隆牛 Musclin 基因,并通过软件分析牛 Musclin 基因与小鼠、大鼠、人、猪和鸡的同源性。[结果]通过电子克隆技术成功克隆了牛 Musclin 基因;分析结果表明,牛 Musclin 基因与小鼠、大鼠、人、猪和鸡同源性分别为 81.0%、80.8%、90.0%、89.1% 和 62.4%,预测的氨基酸序列含有“KKKR”结构与小鼠 ANP、BNP、CNP 蛋白的同源性区域,并将克隆的牛 Musclin 基因片段注册 GenBank (EF646361)。[结论]该试验为进一步研究 Musclin 在牛骨骼肌中的生物学功能提供了基础资料。

关键词 牛; Musclin; 克隆; 序列分析

中图分类号 S823 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)27-10926-02

Molecular Cloning and Sequence Analysis of Bovine Musclin

WANG Wei-jie et al (Louyang City Animal Diseases Control and Prevention Center, Luoyang, Henan 471002)

Abstract [Objective] To conduct cloning and sequence analysis of bovine Musclin gene fragment. [Method] Using silicon cloning, bovine Musclin gene was cloned. The homology of bovine Musclin gene and mice, rat, human, pig and chicken was analyzed through software. [Result] The results showed that the bovine nucleotide sequence shared 81%, 80.8%, 90%, 89.1% and 62.4% homology with that of mice, rat, human, pig and chicken. The predicted peptide contained a "KKKR" motif and the region homologous to mouse ANP, BNP, and CNP. The bovine Musclin gene has been submitted to GenBank (EF646361). [Conclusion] The experiment will provide a basic data for further studying the biological function of Musclin in bovine skeletal.

Key words Bovine; Musclin; Cloning; Sequence analysis

Musclin 是由 Nishizawa H, et al. (2004) 利用信号序列捕集 (SST) 技术, 在小鼠首次发现的一种肌源性细胞因子, 与肌肉的营养代谢有关。为了研究 Musclin 基因在骨骼肌的转录调控机制, 试验克隆牛的 Musclin 基因, 分析不同物种之间的同源性, 并通过生物信息学分析软件对牛及其他几种动物 Musclin 基因调控区的潜在调控元件和相应因子进行了预测和比较。目前, 关于牛 Musclin 基因的研究鲜有报道。因此, 笔者利用 RT-PCR 技术克隆牛 Musclin 基因, 并将序列提交 GenBank 收录 (EF646361), 以期为进一步研究 Musclin 在牛骨骼肌中的生物学功能提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材料 引物、反转录体系、RNA 酶抑制剂、载体以及纯化试剂, 均购自宝生物 (大连) 有限公司; RNA 提取试剂动物 RNA OUT, 购自绵阳高新区天泽基因工程有限公司; PCR 所用的 2 × Taq PCR MasterMix (含染料), 购自 TIANGEN 公司。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计。 根据电子克隆技术在 NCBI 网页中获得牛电子克隆的 Osteocrin 基因序列 (861 bp), 并依据该序列设计引物 (由 Takara 公司合成), 分别为 F1: 5'-CCTGATTTT-CACAAGATGC-3', R1: 5'-CATTTCACCCAAGGAAGTTGTGTG-3'; F2: 5'-CACAAGAT-GCTGGACTGGAGATTAG-3', R2: 5'-GGAATCCATTAGCCTCTGGAATTTG-3'。

1.2.2 总 RNA 的提取。 选取牛骨骼肌组织 0.100 g, 用

RNA OUT 提取肌肉中的总 RNA, 吸取 15 μl DEPC 水溶解, 备用。

1.2.3 RT-PCR 程序反转录体系。 向预混过的反转录体系中加入提取好的总 RNA 2 μl, 最终体系为 20 μl。cDNA 合成程序为: 25 °C 10 min, 42 °C 60 min, 72 °C 15 min, 之后冰浴 2 min。采用巢式 PCR 方法进行目的基因的获得: 第 1 步用 F1 和 R1 进行首轮 PCR 扩增, 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 最后 72 °C 延伸 10 min。以首轮 PCR 产物为模板用 F2 和 R2 进行 2 次 PCR 扩增, 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 最后 72 °C 延伸 10 min。产物经浓度 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后进行纯化。

1.2.4 基因序列测定。 将纯化的 PCR 扩增产物与 pMD19-T 载体连接, 并转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞中, 挑取 3 管阳性菌液进行测序。

1.2.5 基因序列分析。 为获得进一步的信息, 通过在 NCBI 网站中运用 blast 以及使用 DNASTAR、BioXM、SignalP 3.0 Server 这些软件对基因序列进行详细的分析。

2 结果与分析

2.1 牛 Musclin 基因的 RT-PCR 扩增及克隆 采用巢式 RT-PCR 的方法获得的基因, 经电泳检测后, 显示大小为 591 bp (图 1)。将此片段回收纯化后, 与 pMD19-T VECTER 相连, 之后将连接产物转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞中, 挑选阳性菌落, 并进行 PCR 复检, 筛选出阳性克隆 (图 2)。

2.2 牛 Musclin 基因的序列分析 测序结果显示, 获得的

作者简介 王伟杰 (1982 -), 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向: 动物生物化学, E-mail: 1006190648@qq.com。* 通讯作者, 教授, 博士, E-mail: haubiochem@163.com。

收稿日期 2013-08-19

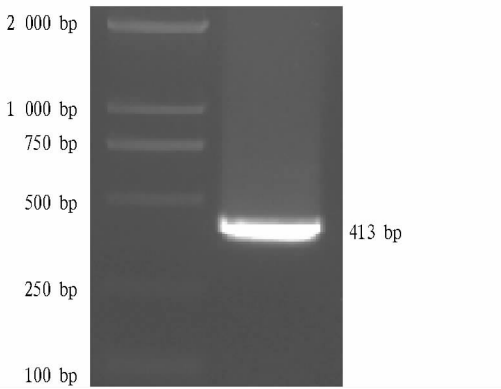


图1 RT-PCR 电泳结果

牛 Musclin 基因包含一个完整的全长为 413 bp 的 ORF, Musclin 前蛋白由 132 个氨基酸残基构成, 含有 19 个酸性氨基酸为, 24 个碱性氨基酸, 大小为 14.53 kDa, 等电点为 10.926。

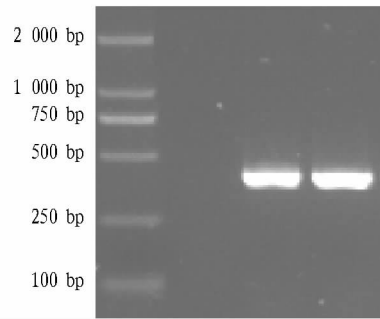


图2 阳性克隆的 PCR 电泳结果

预测的信号肽区为 27 ~ 28 个氨基酸。成熟的 Musclin 由 104 ~ 105 个氨基酸组成。而由翻译出的氨基酸序列来看, 同样含有典型的“KKKR”结构(下划线 1)和与小鼠 ANP、BNP、CNP 蛋白的同源性区域(下划线 2, 图 3)。



图3 牛 Musclin 的 cDNA 序列及其推测的氨基酸序列

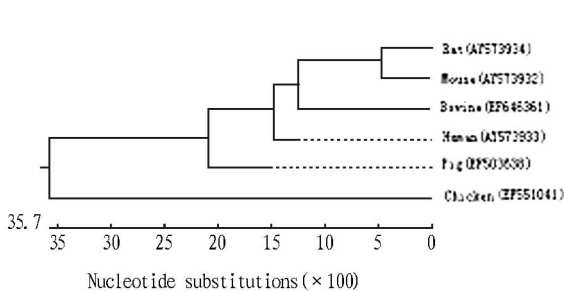


图4 牛 Musclin 基因和其他动物 Myodulin 基因的进化树

2.3 牛 Musclin 基因 cDNA 序列与其他物种间的差异 牛 Musclin 基因(GenBank No. EF646361)的 ORF 与小鼠(GenBank No. AY573932)、大鼠(GenBank No. AY573934)、人(GenBank No. AY573933)、猪(GenBank No. EF503638)和鸡(GenBank No. EF551041)的同源性分别为 81%、80.8%、90%、89.1% 和 62.4%。

2.4 牛 Musclin 基因氨基酸序列与其他物种间的差异 图 4 表明, 牛 Musclin 与人的同源性最高, 与鸡同源性最低。通过 DNASTAR 软件的分析可知, 牛 Musclin 基因编码的氨基酸序列与人、猪、大鼠、小鼠和鸡的同源性分别为 93.2%、84.1%、80.3%、78.5% 和 60.6%。其中牛的信号肽与人、猪、大鼠、小鼠和鸡的同源性分别为 89.3%、82.1%、84.6%、80.8% 和 35.7%。牛的成熟肽与人、大鼠、小鼠、猪和鸡的同源性分别为 93.3%、84.6%、78.8%、76% 和 67.6%。由以上数据可知, 虽然在信号肽的同源性方面猪低于小鼠和大鼠与进化数据有所偏差, 但在预测的成熟肽方面又高于前两者, 整体符合预期, 毕竟成熟肽起主要作用, 但这一点也反映出猪编码 Musclin 蛋白在信号传导方面有可能有其物种的特殊性, 但需要进一步的验证。图 5 表明, 不同物种的 Musclin 氨基酸序列同样存在 2 段一样的序列, 即“KKKR”结构和与小 (下转第 10968 页)

5.4 适当引导、扶持,降低风险和成本 枳壳是一味重要的中药材,关系到人民的健康,在药材生产过程中不能仅仅考虑到经济效益,还应该考虑到社会效益。目前枳壳价格市场波动大,农户栽培枳壳要承担较大的风险。在经济转型阶段,农户抗风险能力差,有关部门有必要加强生产引导,为农户提供产销市场信息和预测,降低农户生产枳壳的经营风险。农户从事枳壳栽培,政府可以给予适当地政策的倾斜或补贴,一方面可以降低农户的生产成本,增加收益,另一方面可以稳定药材产量和质量,为服务人民健康事业发挥作用。

6 小结与展望

道地药材关系到人民的健康事业,是中医药事业发展的基石之一;同时道地药材生产对于增加农民收入,调整经济结构具有重要意义,所以应该重视道地药材生产。多数道地药材是在小农经济时期形成和发展起来的,当前经济转型对

这些道地药材生产造成的较大的冲击,有些道地药材在市场上已基本消失的现状已敲响了警钟。当前,既要看到市场经济给道地药材生产带来的机遇,也要看到潜在的危机。在新的时期,应当通过加强科学研究、创新生产模式、扩大综合效益以及给予适当的引导和扶持等办法来解决道地药材生产中遇到的困境,开拓道地药材生产新局面。

参考文献

- [1] 韩邦兴,彭华胜,黄璐琦. 中国道地药材研究进展[J]. 自然杂志,2011,33(5): 281-285.
- [2] 杨彩忠. 岷县当归产业的现状及发展对策[J]. 甘肃农业,2011(6): 72-74.
- [3] 蔡逸平,陈有根,范崔生. 中药枳壳枳实类原植物调查及商品药材的鉴定[J]. 中国中药杂志,1999,24(5): 259-262.
- [4] 朱培林,郑昭宇,吴金娥,等. 地道药材江枳壳规范化种植技术[J]. 林业科技开发,2004,18(5): 51-54.
- [5] 廖学林,廖洪标,聂建春. 新干“商洲枳壳”优质丰产关键技术[J]. 江西林业科技,2007(1): 59-61.

(上接第 10927 页)

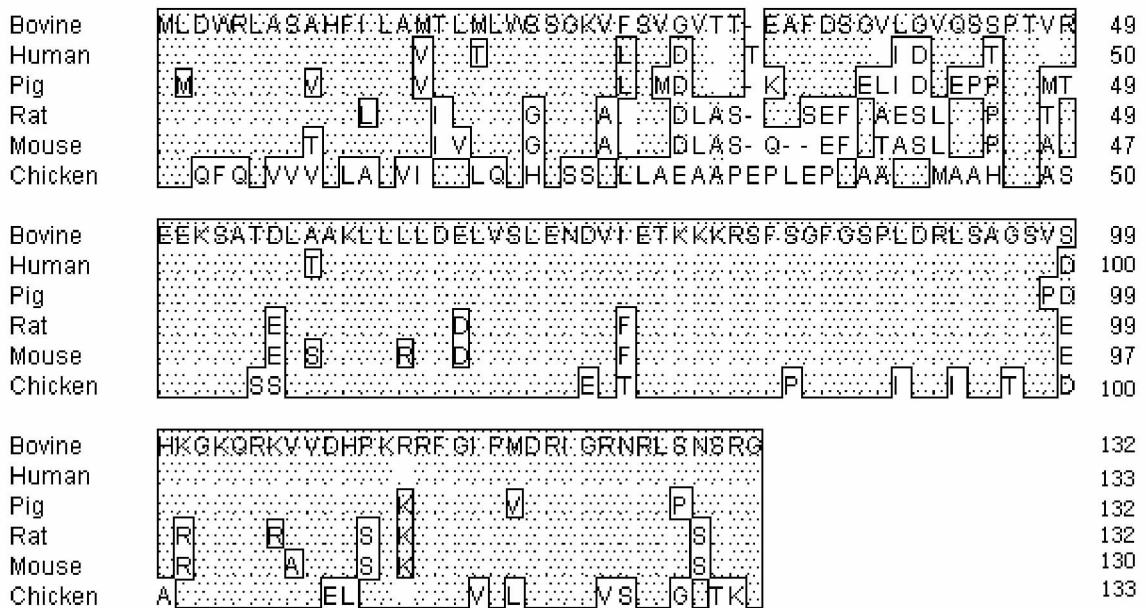


图5 牛 Musclin 氨基酸序列与猪、小鼠、大鼠、人和鸡的氨基酸序列的比较

鼠 ANP、BNP、CNP 蛋白的同源性区域,进一步证明了这 2 个区域可能是 Musclin 的标志性功能结构域。

3 结论与讨论

研究表明, Musclin 是骨骼肌分泌的一种生物活性因子,调控机体的糖代谢与脂质代谢。通过自分泌和旁分泌的作用,可能与一些代谢病疾病的发生有一定关联。而牛多发代谢性疾病,因代谢疾病导致的死亡也不在少数。现在对牛只的治疗依据的是原有的代谢理论,如果能够进一步深入的了解 Musclin 对机体的代谢作用,就有望在牛的代谢性疾病的治疗方面做出一些突破,减少损失。试验克隆了牛 Musclin 基因,为下一步 Musclin 基因的蛋白表达和蛋白的生物学活

性研究奠定了基础。

参考文献

- [1] NISHIZAWAW H, MATSUDA M, YAMADA Y, et al. Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor[J]. J Biol Chem, 2004, 279(19): 19391-19395.
- [2] BANZET S, KOULMANN N, SANCHEZ H, et al. Musclin gene expression is strongly related to fast-glycolytic phenotype[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(3): 713-718.
- [3] PEDERSEN B K, STEENBERG A, FISCHER C, et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor[J]. Proc Nutr Soc, 2004, 63(2): 263-267.
- [4] MCPHERRON A C, LWALER A M, LEE S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. Nature, 1997, 387: 83-90.
- [5] 刘军,邓玉强. Musclin 与运动的研究进展[J]. 运动, 2010(12): 25-27.