

金素钰, 王国生, 徐亚欧, 等. 牦牛葡萄糖转运蛋白和单羧酸转运蛋白基因的克隆测序及在肌肉中的表达[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 29–31.

# 牦牛葡萄糖转运蛋白和单羧酸转运蛋白基因的克隆测序及在肌肉中的表达

金素钰, 王国生, 徐亚欧, 林亚秋, 郑玉才

(西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

**摘要:**采用 RT-PCR 方法克隆九龙牦牛 (*Bos grunniens*) 肌肉中葡萄糖转运蛋白 (GLUT) 和单羧酸转运蛋白 (MCT) 基因 *GLUT4*、*MCT1* 和 *MCT4* 的 cDNA 序列, 并与普通牛 (*Bos taurus*) 进行基因序列和肌肉中 mRNA 水平的比较, 以探索牦牛适应高原低氧的分子基础。结果表明, *GLUT4*、*MCT1* 和 *MCT4* 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列与普通牛的相似性均在 99.5% 以上。实时荧光定量 PCR 分析显示, 成年九龙牦牛与黄牛背最长肌中 *GLUT4*、*MCT4* 基因 mRNA 水平无差别, 而牦牛 *PMCT1* 基因 mRNA 水平显著低于黄牛 ( $P < 0.05$ )。乳酸脱氢酶 (LDH) 总活力和同工酶谱测定结果表明, 牦牛背最长肌中 LDH 总活力、LDH5 比例显著高于黄牛, 显示出更强的无氧酵解能力。结合 *MCT1* 基因 mRNA 水平的差异发现, 牦牛背最长肌对乳酸的氧化代谢能力低于黄牛, 更倾向于无氧酵解, 与其适应高原低氧有关。

**关键词:** 九龙牦牛; 葡萄糖转运蛋白; 单羧酸转运蛋白; 肌肉; 低氧适应; 基因表达

**中图分类号:** S823.8<sup>+</sup>52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0029-03

牦牛 (*Bos grunniens*) 是青藏高原特有的牛种, 对高寒、低氧等恶劣生态环境有良好的适应性。低氧环境能导致细胞多种能量代谢通路的适应性变化, 例如无氧酵解增加, 单位葡萄糖产生的能量减少, 进而导致细胞膜葡萄糖转运蛋白 (GLUT) 适应性增加。肌肉组织中最重要 GLUT 家族成员包括 GLUT1 和 GLUT4, 其中 GLUT4 是肌肉和脂肪细胞中的主要葡萄糖转运蛋白<sup>[1]</sup>, 存在于细胞内, 受胰岛素、运动和缺氧等因素影响<sup>[2-3]</sup>。肌肉是产生乳酸的主要组织, 氧化型肌纤维 (红肌) 和心肌能以乳酸为燃料分子为机体提供能量<sup>[4]</sup>。在乳酸转运进入细胞的过程中, 单羧酸转运蛋白 (MCT) 发挥重要作用。*MCT* 有多个家族成员, 其中, 在肌肉中表达的主要有 *MCT1*、*MCT2* 和 *MCT4*, 在乳酸转运中发挥功能<sup>[5-6]</sup>。*MCT1* 在氧化型纤维中表达水平高, 被认为在乳酸向细胞内转运中发挥重要的作用<sup>[5]</sup>。Jurie 等研究表明, 低氧适应能使肌肉组织在能量代谢方面更依赖于葡萄糖<sup>[7]</sup>。因此, 分析 *GLUT*、*MCT* 基因序列及其组织表达规律, 对认识动物低氧适应的分子机制是重要的切入点。目前, 关于暂时性缺氧对 *GLUT*、*MCT* 基因表达影响的研究已有不少, 但对于低氧驯化的牦牛组织中 *GLUT*、*MCT* 还未见报道。因此, 试验假设长期的低氧适应可能导致牦牛 *GLUT*、*MCT* 基因序列或组织表达水平发生改变, 重点分析九龙牦牛 *GLUT4*、*MCT1* 和 *MCT4* 的基因序列及其在肌肉中的表达特点, 并与普通牛比较, 以探索牦牛适应低氧环境的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及样品采集

试验所用九龙牦牛 (*Bos grunniens*) 样品采自四川省甘孜州九龙县, 其中, 0.5 岁犏牛 6 头, 3.5~5.5 岁牦牛 10 头, 7~10 岁牦牛 8 头。屠宰时, 迅速采集背最长肌和股四头肌, 用锡箔纸包好, 置于液氮内带回实验室, -80℃ 保存备用。另外, 从四川省青白江市某屠宰场采集 6 头成年黄牛背最长肌和股四头肌样本作为对照。

### 1.2 试剂及器材

主要仪器包括高速冷冻离心机 (日立)、超声波破碎仪 (Sonics)、分光光度计 (Cary 50, Varian)、电动匀浆器 (PT-1200E, Kinematica)、凝胶成像系统 (Gel Doc 2000, Bio-Rad)。荧光定量 PCR 试剂 SYBR® Premix Ex Taq™ (2×) 购自 TaKaRa 公司; 反转录试剂盒购自 MBI 公司; 2×LongTaq Mix、Trizol 试剂均购自天根公司。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.3 牦牛 *GLUT4*、*MCT1* 和 *MCT4* 基因的克隆测序

取 RNA 8 μL, 用 Random hexamer 引物按 Fermentas 反转录试剂盒说明书进行反转录。根据 GenBank 中普通牛 *GLUT4*、*MCT1* 和 *MCT4* 基因 mRNA 序列 (序列号依次为 AY458600、BC104598 和 NM\_001109980), 用 Primer premier 5.0 软件设计引物。*GLUT4* - F: 5'-CTAAGACAAGATGCGCTCG-3', *GLUT4* - R: 5'-TCAGTCATGCTCATCTGG C-3'; *MCT1* - F: 5'-CGAGCCGCGTATAACGAT-3'; *MCT1* - R: 5'-CCACAGGTTCAAACCTGGACTCT-3', *MCT4* - F: 5'-CTT-GGAACAGCCTCTGTCA-3', *MCT4* - R: 5'-GAGCGTTGACG-GTCTCTG-3'。预期片段长度: *GLUT4* 为 1 540 bp, *MCT1* 为 1 574 bp, *MCT4* 为 1 483 bp。PCR 反应体系: 2×Long Taq Mix 12.5 μL, 灭菌水 8.5 μL, 正、反引物各 1 μL, cDNA 2 μL。PCR 条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 45 s, 53℃ (*GLUT4*)/

收稿日期: 2013-11-07

基金项目: 国家“973”计划前期研究专项 (编号: 2007CB116204)。

作者简介: 金素钰 (1965—), 女, 重庆人, 高级实验师, 主要从事生物技术研究。

通信作者: 郑玉才, 博士, 教授, 主要从事高原动物分子遗传研究。

E-mail: yucaizheng65@hotmail.com。

55 ℃ (MCT1)/56 ℃ (MCT4) 1 min, 72 ℃ 2 min, 共 40 个循环; 72 ℃ 10 min。扩增产物用 1 % 琼脂糖凝胶电泳检测, 然后经胶回收试剂盒纯化, 按常规基因克隆技术进行克隆, 每个基因的阳性克隆取 3 ~ 5 个菌液送上海英骏生物技术有限公司进行双向测序。

1.4 定量 PCR 分析牦牛肌肉中 GLUT4、MCT1 和 MCT4 mRNA 水平

根据获得的九龙牦牛 3 个基因的 cDNA 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件跨内含子设计引物。GLUT4 - F1: 5' - TGGGGACACTCAATCAACT - 3'; GLUT4 - R1: 5' - TCAGC-CAACACCTCAGACA - 3', MCT1 - F1: 5' - AAACGCTGATG-GACCTTG - 3'; MCT1 - R2: 5' - TATGCCACATGCCAGTA - 3'; MCT4 - F1: 5' - GTCCACTGCCAGCAACTAC - 3', MCT4 - R1: 5' - AGCACCAGCACAAGGGA - 3'。内参基因的引物根据 GenBank 中普通牛 GAPDH 序列 (NM\_001034034) 设计, GAPDH - F: 5' - CACCCTCAAGATTGTCAGC - 3', GAPDH - R: 5' - TCATAAGTCCCTCCACGAT - 3'。根据荧光定量 PCR 试剂盒说明配制 20 μL 的反应体系, 其中, 正、反向引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL。PCR 条件: 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 10 s, 58 ℃ (GLUT4、GAPDH)/62 ℃ (MCT1、MCT4) 10 s, 72 ℃ 30 s, 共 45 个循环。采用目的基因、内参基因的质粒作为标准品, 制作标准曲线, 目的基因的表达水平用内参基因校正。

1.5 肌肉组织 LDH 总活力及其同工酶谱分析

准确称取 0.2 g 肌肉组织, 加匀浆液 (含 10 mmol/L Tris、pH 值为 8.0, 0.25 mol/L 蔗糖, 2 mmol/L EDTA) 2.8 mL, 用电

动匀浆器在冰上匀浆 30 s, 取 1 mL 以转速 10 000 g 于 4 ℃ 离心 10 min, 参照 Marchat 等方法<sup>[8]</sup>测定上清液 LDH 活力。酶活力的定义为: 在 25 ℃ 条件下, 1 g 新鲜组织 1 min 催化 1 μmol 底物转化为 1 个单位。LDH 同工酶采用非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 酶活性染色<sup>[9]</sup>。

2 结果与分析

2.1 牦牛 GLUT4、MCT1 和 MCT4 基因的克隆测序

采用 RT-PCR 方法扩增九龙牦牛背最长肌的 GLUT4、MCT1 和 MCT4 基因, 均得到 1 条特异的扩增条带, 并分别均与预期分子量大小相符 (图略)。测序结果证实得到了 GLUT4、MCT1 和 MCT4 等 3 个基因的编码序列 (CDS 序列), 并提交 GenBank。

由表 1 可见, 牦牛 GLUT4 基因 (HM055486) CDS 全长 1 530 bp, 编码 509 个氨基酸, 与普通牛相比有 5 个碱基差异和 1 个氨基酸差异, 牦牛第 293 位为 Val (缬氨酸), 而普通牛为 Met (甲硫氨酸), 核苷酸和氨基酸相似性分别为 99.67% 和 99.8%; 牦牛 MCT1 基因 (HM061149) CDS 全长 1 506 bp, 编码 501 个氨基酸, 与普通牛相比有 6 个碱基差异和 2 个氨基酸差异, 牦牛第 325 位、354 位分别为 Iso (异亮氨酸)、Val (缬氨酸), 而普通牛分别为 Val、Iso, 核苷酸和氨基酸相似性均为 99.6%; 牦牛 MCT4 基因 (HM583655) CDS 全长 1 386 bp, 编码 460 个氨基酸, 与普通牛相比有 6 个碱基差异, 核苷酸相似性为 99.56%, 但氨基酸序列完全相同。牦牛 3 个基因与普通牛的碱基差异类型主要是转换。

表 1 牦牛与普通牛 GLUT4、MCT1 和 MCT4 基因序列的比较

牛的种类	GLUT4 核苷酸位置					MCT1 核苷酸位置					MCT4 核苷酸位置						
	189	237	804	877	987	603	768	973	1005	1060	1089	87	180	279	525	933	1059
九龙牦牛	A	C	A	G	T	G	C	A	A	G	C	T	G	A	C	C	A
普通牛	G	A	G	A	C	A	T	G	G	A	T	C	A	G	A	T	G

2.2 牦牛肌肉 GLUT4、MCT1、MCT4 基因的发育谱

3 个目的基因和内参基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线扩增效率为 94.5% ~ 102.9%, 符合分析要求。在牦牛背最长肌和股四头肌中, GLUT4、MCT1、MCT4 mRNA 水平在各年龄段 (0.5、3.5 ~ 5.5、7 ~ 10 岁) 均无显著差异。

2.3 牦牛与黄牛肌肉 GLUT4、MCT1、MCT4 基因表达比较

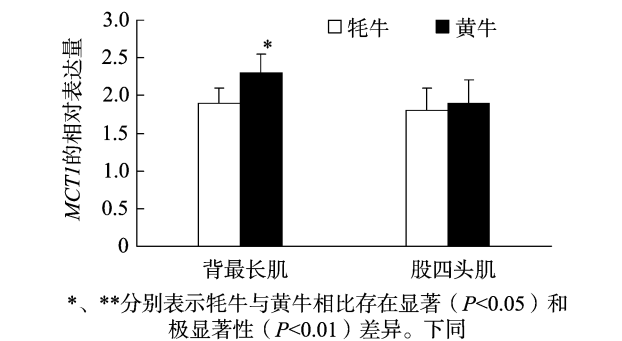
实时荧光定量 PCR 分析显示, 成年九龙牦牛 (n = 10) 与黄牛 (n = 8) 背最长肌中, GLUT4、MCT4 mRNA 水平无差别, MCT1 mRNA 水平黄牛显著高于牦牛 (P < 0.05, 图 1); 而在股四头肌中, GLUT4、MCT1、MCT4 的 mRNA 水平均未见显著差异。

2.4 肌肉组织 LDH 活力和酶谱

试验结果表明, 牦牛背最长肌中 LDH 总活力显著高于黄牛 [牦牛 (510 ± 30) U/mg, 黄牛 (407 ± 35) U/mg], 而腿肌中 LDH 总活力接近 [牦牛 (305 ± 31) U/mg, 黄牛 (282 ± 47) U/mg]。由图 2 可见, 牦牛背最长肌中 LDH5 的比例显著高于黄牛, 而 LDH2 比例极显著低于黄牛。股四头肌中 LDH 同工酶比例无显著差异。

3 结论与讨论

研究结果表明, 牦牛 GLUT4、MCT1、MCT4 基因的核苷



\*、\*\* 分别表示牦牛与黄牛相比存在显著 (P < 0.05) 和极显著性 (P < 0.01) 差异。下同

图 1 牦牛和黄牛肌肉中 MCT1 基因 mRNA 相对水平

酸序列及推导的氨基酸序列与普通牛相似性很高, 均在 99.5% 以上, 与其他很多功能基因研究结果<sup>[10-11]</sup>一致, 这也说明牦牛与普通牛的亲缘关系很近。牦牛和普通牛存在氨基酸差异的有 2 个基因 GLUT4 和 MCT1, 存在差异的氨基酸性质相似 (Val、Iso、Met), 推测这些氨基酸的变化对相应载体蛋白功能影响很小, GLUT4、MCT1 和 MCT4 基因序列具有保守性。

牦牛背最长肌和股四头肌中, GLUT4、MCT1 和 MCT4 mRNA 水平在各年龄段 (0.5、3.5 ~ 5.5、7 ~ 10 岁) 均无显著差异。Hatta 等研究了大鼠骨骼肌和心肌中 MCT1、MCT4 随

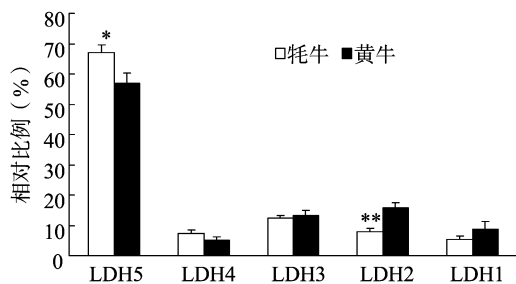


图2 牦牛和黄牛背最长肌中LDH同工酶比例

年龄增长的变化趋势,发现在骨骼肌中 *MCT1* 和 *MCT4* mRNA 水平随年龄增加而发生不同程度的改变<sup>[12]</sup>; Kirat 等研究发现 *MCT1* 在成年牛肝脏的表达量极显著高于犏牛<sup>[13]</sup>。本试验结果与 Hatta 等研究结论存在差异,原因尚不清楚。

有关低氧刺激对 *GLUT*、*MCT* 基因表达影响的研究已有很多报道。Wood 等研究发现,低氧能提高人的脂肪细胞 *GLUT1* 水平,但不会改变 *GLUT4* 水平<sup>[14]</sup>。Ullah 等研究了体外培养的细胞 (HeLa、COS、HL-1) 中 *MCT1*、*MCT2*、*MCT4* 对缺氧刺激的反应,结果表明,*MCT4* mRNA 和蛋白质表达水平均增加,*MCT1* 和 *MCT2* 水平未见变化<sup>[15]</sup>。本研究中由于牦牛对低氧的长期驯化,相关能量代谢机制可能与暂时性缺氧有所不同。

*MCT1* 在氧化型纤维中表达水平高,帮助乳酸向细胞内转运,参与乳酸的氧化利用<sup>[5]</sup>。McCullagh 等研究了 *MCT1* 的表达,证实 *MCT1* 在红肌的表达与肌肉中乳酸吸收相关,与柠檬酸合成酶活性呈相关 (肌肉氧化能力的标志),这说明 *MCT1* 能促进肌纤维细胞对乳酸的吸收,与 *LDH* (心型) 及氧化代谢相关酶协同表达<sup>[16]</sup>。由于 *LDH* 参与无氧酵解,而且 *LDH5* 倾向于将丙酮酸还原成乳酸<sup>[17]</sup>。九龙牦牛背最长肌中 *MCT1* mRNA 表达量显著低于黄牛,背最长肌中 *LDH* 总活力、*LDH5* 比例显著高于黄牛,这说明牦牛背最长肌糖代谢中乳酸的氧化低于黄牛,更倾向于无氧酵解,与牦牛生活环境中的氧含量是相适应的。然而,由于肌肉组织中可表达多种 *MCT*<sup>[18]</sup>,因此,牦牛和黄牛对乳酸的利用及其转运的分子基础比较,需要更加精细和全面的分析。

本试验结果初步表明,牦牛 *GLUT4*、*MCT1* 和 *MCT4* 基因序列与普通牛相似性高;与普通牛比较,牦牛背最长肌中较低的 *MCT1* mRNA 水平与其较强的无氧代谢能力相吻合,可能是牦牛从分子水平上适应低氧环境的表现之一。

#### 参考文献:

- [1] Ishiki M, Klip A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter - 4 traffic: new signals, locations, and partners [J]. *Endocrinology*, 2005, 146 (12): 5071 - 5078.
- [2] Roy D, Marette A. Exercise induces the translocation of *GLUT4* to transverse tubules from an intracellular pool in rat skeletal muscle [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 223 (1): 147 - 152.
- [3] Cartee G D, Douen A G, Ramlal T, et al. Stimulation of glucose transport in skeletal muscle by hypoxia [J]. *Journal of Applied Physiology*, 1991, 70 (4): 1593 - 1600.

- [4] Gladden L B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium [J]. *The Journal of Physiology*, 2004, 558 (1): 5 - 30.
- [5] Wilson M C, Jackson V N, Heddle C, et al. Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform *MCT3* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (26): 15920 - 15926.
- [6] Dimmer K S, Friedrich B, Lang F, et al. The low - affinity monocarboxylate transporter *MCT4* is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells [J]. *The Biochemical Journal*, 2000, 350 (1): 219 - 227.
- [7] Jurie C, Ortigues - Marty I, Picard B, et al. The separate effects of the nature of diet and grazing mobility on metabolic potential of muscles from Charolais steers [J]. *Livestock Science*, 2006, 104 (1/2): 182 - 192.
- [8] Marchat L, Loiseau P M, Petek F. Purification and characterization of lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 2 from *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea) [J]. *Parasitology Research*, 1996, 82 (8): 672 - 680.
- [9] He Q H, Hong J, Zheng Y C, et al. Cloning and sequence analysis of multiple splice variants of lactate dehydrogenase C in yak testes [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2008, 54 (3): 229 - 232.
- [10] Zhang L P, Ma B Y, Wu J P, et al. Cloning and characterization of the yak gene coding for calpastatin and in silico analysis of its putative product [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2010, 57 (1): 35 - 41.
- [11] Bai W L, Yin R H, Zheng Y C, et al. Cloning and molecular characterization of a yak  $\alpha$  - lactalbumin cDNA from mammary tissue [J]. *Livestock Science*, 2010, 129 (1/3): 122 - 128.
- [12] Hatta H, Tonouchi M, Miskovic D, et al. Tissue - specific and isoform - specific changes in *MCT1* and *MCT4* in heart and soleus muscle during a 1 - yr period [J]. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2001, 281 (4): E749 - E756.
- [13] Kirat D, Inoue H, Iwano H, et al. Monocarboxylate transporter 1 (*MCT1*) in the liver of pre - ruminant and adult bovines [J]. *The Veterinary Journal*, 2007, 173 (1): 124 - 130.
- [14] Wood I S, Wang Bohan, Lorente - Cebrián S, et al. Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (*GLUT*) and 2 - deoxy - D - glucose uptake in human adipocytes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 361 (2): 468 - 473.
- [15] Ullah M S, Davies A J, Halestrap A P. The plasma membrane lactate transporter *MCT4*, but not *MCT1*, is up - regulated by hypoxia through a HIF - 1 $\alpha$  - dependent mechanism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (14): 9030 - 9037.
- [16] McCullagh K J, Poole R C, Halestrap A P, et al. Role of the lactate transporter (*MCT1*) in skeletal muscles [J]. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 1996, 271 (1): E143 - E150.
- [17] Holbrook J J, Liljas A, Steindel S J, et al. Lactate dehydrogenase [M] // Boyer P D. The enzymes. New York: Academic Press, 1975: 191 - 291.
- [18] Bonen A, Heynen M, Hatta H. Distribution of monocarboxylate transporters *MCT1* - *MCT8* in rat tissues and human skeletal muscle [J]. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2006, 31 (1): 31 - 39.