

谢海强,孙岩岩,盘道兴,等. 贵州本地山羊 *STAT5A* 基因第 10 外显子 SNP 研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):30-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.008

贵州本地山羊 *STAT5A* 基因第 10 外显子 SNP 研究

谢海强¹,孙岩岩¹,盘道兴¹,钱 成¹,康建兵¹,胡玲玲¹,龚 俞²,焦仁刚²,刘若余¹

(1. 贵州大学动物科学学院/贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室,贵州贵阳 550025;

2. 贵州省畜牧技术推广站,贵州贵阳 550001)

摘要:利用黔北麻羊、贵州黑山羊和贵州白山羊构建 DNA 池,设计 1 对引物扩增其 *STAT5A* 基因第 10 外显子及部分内含子序列。PCR 产物纯化后进行双向测序。DNASTar 和 BLAST 分析确定多态性位点。利用生物信息学软件分析 SNPs 位点对 *STAT5A* 基因 RNA 二级结构、*STAT5A* 蛋白二级及三级结构的影响。结果表明:在扩增的 *STAT5A* 基因中筛选到 3 个 SNPs:C-32A、G+71A 和 G+158A,其中 G+71A 为错义突变,导致编码的丙氨酸(Ala)变为苏氨酸(Thr);C-32A 和 G+158A 均在内含子区,不参与氨基酸编码。SNPs 位点对 *STAT5A* 基因 RNA 二级结构和 *STAT5A* 蛋白结构均有一定影响。

关键词:*STAT5A* 基因;SNPs;外显子;贵州本地山羊

中图分类号:S827.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0030-03

STAT5 是信号转导和转录激活子蛋白(signal transduction and activator of transcription,STAT)家族中的重要成员之一,它包括 *STAT5A* 和 *STAT5B* 这 2 个亚型,其 STAT 同源性家族成员共有 7 个,分别为 *STAT1*、*STAT2*、*STAT3*、*STAT4*、*STAT5A*、*STAT5B* 及 *STAT6*^[1]。在众多家族成员中,STAT5 肩负着众多功能,它不仅参与细胞增殖、分化与凋亡的过程,调控细胞周期,还对生物体生长和免疫应答起重要调控作用。STAT5 能够实现如此多功能,主要是通过其信号传导机制来完成,主要有 JAK2-STAT5^[2]、JAK3-STAT5^[3]、STAT5-Foxp3^[4] 等信号通路。

STAT5A 和 *STAT5B* 在结构与功能相近,序列具有很高的同源性,它们都拥有高度保守的 N 端结构域,促进蛋白间相互作用的蜷曲螺旋结构域,能与 DNA 直接结合的 DNA 结合结构域,还都具有最具保守性的 SH2 结构域^[5]。但 2 者在 C 端的转录激活结构域略有不同,具体表现为 *STAT5A* 和 *STAT5B* 在 C 端分别拥有 20 个和 8 个独特氨基酸序列^[6]。*STAT5* 的 2 个亚型蛋白不仅在结构上同源性极高,而且在功能上有许多相同点。*STAT5A* 和 *STAT5B* 同时扮演着信号分子和转录因子的角色,它们能被生长激素(growth hormone, GH)、干扰素(interferon, IFN)、催乳素(prolactin)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及白细胞介素(interleukin, IL)等多种因子激活,进而调控相应基因的表达。

STAT5A 最早作为调控乳蛋白的一个乳腺因子(mammary

gland factor, MGF)而被发现,在随后的研究中,发现 *STAT5A* 不仅对调控乳腺正常发育具有重要作用,还在肝细胞活性水平、免疫系统以及肿瘤调控机制^[7-9]等方面都有十分重要作用。近年来,还发现 *STAT5A* 与生物生长性能有着密切联系。如 Yu 等在小鼠上证明了 *STAT5A* 和 *STAT5B* 通过激活 *Cdkn2b* 和 *Cdkn1a* 表达来负调控细胞增殖^[10];方琼等在研究家猪 *STAT5* 时同样发现其介导生长激素进而影响生长性状^[11];此外,在研究崂山奶羊时,刘园峰等发现 *STAT5A* 第 9 内含子上存在 2 个连锁突变位点,这 2 个突变位点显著影响着崂山奶羊的体质量、体长和胸围等生长性状^[12]。

贵州本地山羊具有繁殖力强、屠宰率高、耐粗饲、易管理等特点,且其肉质鲜美、营养丰富,深受消费者喜爱^[13]。但贵州本地山羊存在生长速度慢、个体生产性能参差不齐等问题,导致养羊效益不佳,因此提高其生长性能是解决上述问题的关键。与传统繁殖饲养方面提高山羊生长性能相比,从分子水平研究效果更明显、周期更短、回报率更高。但能用于育种的有用基因或标记仍然十分紧缺,而 *STAT5A* 则是十分理想的提高家畜生长性能的候选基因。

本试验利用黔北麻羊、贵州黑山羊和贵州白山羊进行 DNA 池构建^[14],进行 *STAT5A* 基因多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)筛选。测序结果由 DNASTar 软件进行序列拼接、校正,BLAST 分析其 SNP,并估算等位基因频率,生物信息学软件研究多态性位点对 *STAT5A* 基因 RNA 二级结构及蛋白质二级、三级结构影响。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验材料为贵州本地的黔北麻羊、贵州白山羊和贵州黑山羊。其中贵州省遵义市习水县富兴牧业种羊场黔北麻羊 103 只,贵州省毕节市纳雍县鹏腾生态农牧综合开发有限公司贵州黑山羊 103 只,贵州省铜仁市沿河县贵州白山羊种羊场贵州白山羊 146 只。

收稿日期:2014-07-24

基金项目:贵州省重大科技专项计划(编号:黔科合重大专项字[2011]6009号);黔西南州种草养羊产业发展省州科技合作专项(编号:黔西南科合字[2011]5-3号);贵州大学研究生创新基金(编号:研农 2014012)。

作者简介:谢海强(1989—),男,江苏常州人,硕士研究生,研究方向为分子遗传与动物育种。E-mail: xiehaiqiang1115@163.com。

通信作者:刘若余,博士,教授,主要从事分子遗传与动物育种研究。E-mail: liury04@163.com。

1.2 试验试剂

生工生物工程(上海)股份有限公司的 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(血液),琼脂糖凝胶,1×TBE 缓冲液。

1.3 DNA 提取与 DNA 池构建

抽取黔北麻羊血样 103 个,贵州黑山羊血样 103 个,贵州白山羊血样 146 个。用生工生物工程(上海)股份有限公司 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(血液)提取 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取效果,紫外分光光度计测定 DNA 样品浓度。贵州黑山羊及贵州白山羊 DNA 样品分别调整相同浓度至 100 ng/μL,各取 3 μL 混合构建 DNA 池。

1.4 引物设计和 DNA 扩增

从 NCBI 数据库中得到绵羊 *STAT5A* 基因 DNA 序列(GenBank 登录号:NC_019468.1),利用 NCBI 在线软件 Primer-BLAST 设计 1 对特异性引物。其上游引物序列(5'→3')为 TTTGCTCGGATGCTCTCAGG,下游引物序列(5'→3')为 AGCAAATAAGCACCAGCAGA,目标基因片段(包含 *STAT5A* 基因第 10 外显子编码区序列及部分 3' UTR 序列)长度 630 bp,最适退火温度 58.3℃。PCR 反应体系为 20 μL:2×Taq PCR Master Mix 试剂 10 μL,基因组 DNA 2 μL,上、下游引物(浓度为 10 pmol/μL)各 1.5 μL,ddH₂O 5 μL。采用 TC-512 PCR 仪进行 DNA 扩增,PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s;58.3℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 30 s,35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶成像仪观察电泳结果。

1.5 序列分析

PCR 产物委托北京诺萨基因组研究中心有限公司纯化后进行双向测序,3 次独立测序。采用 DNASTAR 软件对测序结果进行校正,BLAST 分析确定 SNPs。

1.6 测序图峰高测量及等位基因频率估算

利用软件 Chromas.exe 查看测序结果,并利用 MWSnap 测量各 SNP 位点等位基因的相应峰高。SNP 常表示二等位多态性,可通过以下公式估算等位基因频率^[15]。

$$f_i = h_i / (h_I + h_{II}), i = I, II。$$

式中: f_i 表示 SNP 位点某等位基因频率, h_I 和 h_{II} 分别表示测序图上该 SNP 等位基因 I、II 峰高度。

1.7 *STAT5A* 的 RNA 二级结构预测及蛋白结构分析

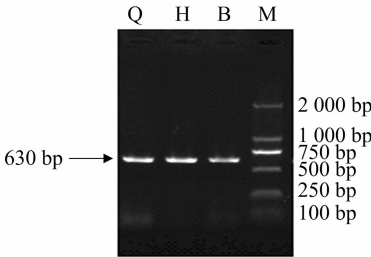
将 *STAT5A* 基因突变前后不同 DNA 序列进行 RNA 二级结构变化分析,并将 *STAT5A* 基因突变前后不同蛋白氨基酸序列进行蛋白质二级结构和三级结构变化分析。phyre2 构建蛋白质三维结构,将 *STAT5A* 与蛋白结构数据库中蛋白质三维结构进行匹配,得到模拟的 *STAT5A* 蛋白三维结构。RNA 二级结构在线分析软件:http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html。蛋白质二级结构在线分析软件:http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html。蛋白质三级结构在线分析软件:<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>。

2 结果与分析

2.1 DNA 池的 PCR 产物测序

设计 1 对特异性引物扩增出贵州本地 3 种山羊 *STAT5A* 基因目的序列共 630 bp,见图 1。扩增产物经胶回收纯化后

进行双向测序,测序结果与绵羊 *STAT5A* 基因 DNA 序列(GenBank 登录号:NC_019468.1)DNA 序列基本吻合,可以确定为山羊 *STAT5A* 基因序列。BLAST 分析共发现 3 个 SNPs,以 *STAT5A* 基因第 10 外显子第 1 位碱基数为 1,SNPs 位点分别为 C-32A、G+71A 和 G+158A,均为新发现位点,详见图 2。这些 SNPs 可能在不同山羊中普遍存在,需要扩大山羊个体数进一步验证。突变位点是否造成其生长性能差异也需后续试验进一步研究。



Q—黔北麻羊; H—贵州黑山羊; B—贵州白山羊

图1 黔北麻羊、贵州黑山羊、贵州白山羊 *STAT5A* 基因第10外显子扩增产物检测结果

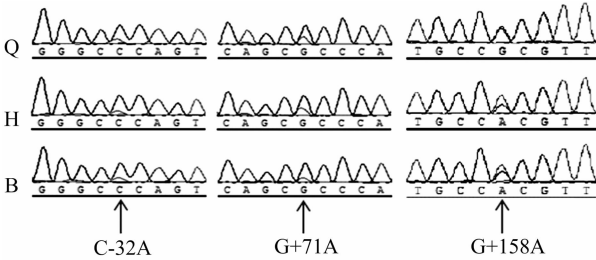


图2 黔北麻羊(Q)、贵州黑山羊(H)、贵州白山羊(B) *STAT5A* 基因 DNA 池的 PCR 产物测序及 BLAST 分析结果

2.2 SNPs 等位基因频率估算

利用 MWSnap 软件分别测量 3 种山羊各 SNPs 等位基因峰高,并估算 SNPs 等位基因频率,结果见表 1。由表 1 可看出,不同品种山羊同一突变位点突变频率近似,不同突变位点突变频率相差较大。

表 1 SNPs 等位基因频率估算结果

品种	等位基因频率(A)		
	C-32A	G+71A	G+158A
黔北麻羊	0.218	0.275	0.471
贵州黑山羊	0.188	0.289	0.330
贵州白山羊	0.216	0.181	0.391

2.3 *STAT5A* 的 RNA 二级结构分析

突变前后 *STAT5A* 基因 RNA 二级结构预测结果表明,SNP 位点突变导致 RNA 二级结构显著改变,详见图 3。该突变导致 RNA 二级结构最小自由能发生改变,由 -914.4 kJ/mol 变为 -937.7 kJ/mol,影响 RNA 二级结构稳定性,可能影响后续蛋白质翻译过程。

2.4 突变前后 *STAT5A* 蛋白二级、三级结构分析

利用在线 SOPMA 服务器预测黔北麻羊、贵州黑山羊和贵州白山羊 *STAT5A* 基因突变前后蛋白质二级结构变化。结果显示,突变前后,β 转角由 1.76% 增至 2.02%,α 螺旋由 52.64% 减少到 52.27%,自由卷曲由 34.51% 上升到 35.01%,延伸链由 11.08% 下降为 10.71%(表 2)。

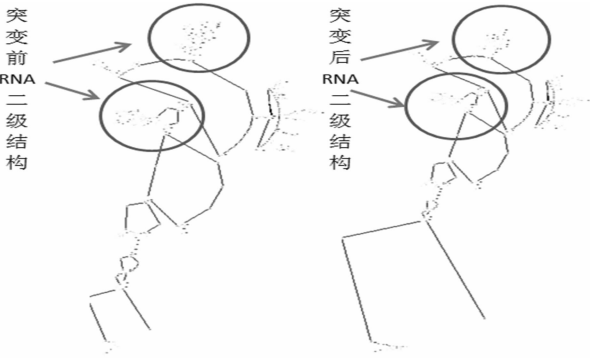


图3 STAT5A 基因 SNP 位点突变前后 RNA 二级结构变化

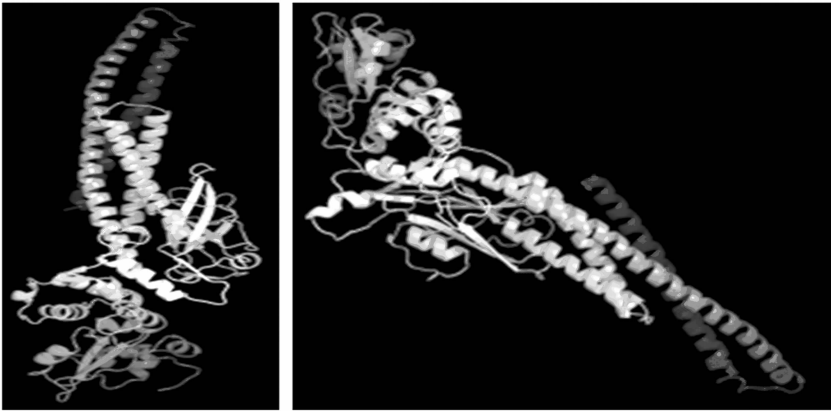


图4 STAT5A 基因 SNP 位点突变前后蛋白质三级结构变化

3 讨论

STAT5A 作为 STAT 家族中重要成员,具有多种生物学功能。STAT5A 能够显著影响生物体乳腺发育功能、肝功能、妊娠反应、免疫系统及肿瘤发生机制^[16],STAT5A 与 STAT5B 共同影响了细胞增殖、生长、分化、凋亡,以及细胞周期的调控^[17]。提高肉质性能与生长性能一直是畜牧业品种选育的最终目标,在家猪、小鼠、奶牛和崂山奶羊上的研究都表明,STAT5A 拥有影响动物生长性能的能力^[18-19]。因此,对 STAT5A 的深入研究有望改善贵州本地山羊个体生长性能较差的现状,同时对加快品种选育有着十分重要的现实意义。

本试验首次在贵州本地山羊 STAT5A 基因中鉴定得到 SNP 位点。其中 G + 71A 突变,将丙氨酸(Ala)错义编码为苏氨酸(Thr);C - 32A 和 G + 158A 均在内含子区,不参与氨基酸编码。比较 3 个多态性位点等位基因频率,发现不同山羊品种同一突变位点突变频率近似,不同突变位点突变频率相差较大,这一发现是否在其他山羊中也有不同,需要进一步扩大山羊的品种及数量进行研究。突变前后 STAT5A 基因 RNA 二级结构发生改变,并影响到蛋白质二级、三级结构。为深入探究 STAT5A 基因对山羊生长性能的调控作用,有必要扩大山羊数量,并分析上述多态性位点与山羊各项生长指标关联性,从而为山羊的选育工作以及整个 STAT 家族在山羊中的调控研究奠定基础。

参考文献:

[1]张诗赞,徐亚明,宋一超,等. Stat5: 多功能的转录因子[J]. 生命

表 2 突变前后 STAT5A 蛋白二级结构分析结果

分类	β 转角 (%)	α 螺旋 (%)	自由卷曲 (%)	延伸链 (%)
突变前	1.76(14)	52.64(418)	34.51(274)	11.08(88)
突变后	2.02(16)	52.27(415)	35.01(278)	10.71(85)

蛋白质三维结构的预测及突变分析对理解蛋白质结构与功能的相关性有重要作用,采用同源比较建模原理,将突变前后氨基酸序列提交 Phyre2 三级结构预测服务器,结果详见图 4。由图 4 可以看出,多态性位点突变导致 STAT5A 蛋白三维结构构象发生改变。其中 β 折叠链保持 11% 未变化, α 螺旋保持 50% 未发生变化,混乱度则由 27% 上升到 28%。

的化学,2012,32(2): 180 - 184.

[2]Nevalainen M T, Gu L, Liao Z, et al. Pharmacological inhibition of JAK2 - STAT5 signaling by JAK2 inhibitor AZD1480 potently suppresses growth of both primary and castrate - resistant prostate cancer [J]. Clinical Cancer Research, 2013, 19(20): 5658 - 5674.

[3]Elisabetta C, Margherita G, Vito M, et al. JAK3/STAT5/6 pathway alterations are associated with immune deviation in CD⁸⁺ T cells in renal cell carcinoma patients [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, 2010: 935764

[4]李海燕,裴建,刘志丹,等. 针灸对荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖及 Stat5 - Foxp3 通路影响[J]. 上海针灸杂志, 2010(3): 62 - 66.

[5]Song L, Schindler C. JAK - STAT signaling [M]//Bradshaw P A, Dennis E D. Regulation of organelle and cell compartment signaling: cell signaling collection. New York: Academic Press, 2011: 99 - 106.

[6]Krämer O H, Moriggl R. Acetylation and sumoylation control STAT5 activation antagonistically[J]. JAK - STAT, 2012, 1(3): 203 - 207.

[7]Vafaizadeh V, Klemmt P, Brendel C, et al. Mammary epithelial reconstitution with gene - modified stem cells assigns roles to STAT5 in luminal alveolar cell fate decisions, differentiation, involution, and mammary tumor formation[J]. Stem Cells, 2010, 28(5): 928 - 938.

[8]Liang Q C, Xiong H, Zhao Z W, et al. Inhibition of transcription factor STAT5b suppresses proliferation, induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human glioblastoma multiforme cells[J]. Cancer Letters, 2009, 273(1): 164 - 171.

[9]Xiong H, Su W Y, Liang Q C, et al. Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells [J]. Laboratory Investigation, 2009, 89(6): 717 - 725.

段文斌, 金 刚, 代建国, 等. Trizol 法提取普通小球藻总基因组 DNA[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 33–34.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2015.07.009

Trizol 法提取普通小球藻总基因组 DNA

段文斌^{1,2}, 金 刚¹, 代建国¹, 张丽君¹, 栾崇林¹, 于化泓²

(1. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳 518055; 2. 南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西南昌 330030)

摘要: Trizol 法主要应用于动植物 RNA 提取, 由于其在提取 RNA 的过程中将 DNA 有效分离到有机相中, 并且在有机相中 DNA 未被降解, 因此本研究采用 Trizol 法提取具有细胞壁的小球藻的基因组 DNA, 发现提取得到的 DNA 纯度和产率高, 且 DNA 完整性好。经检测: $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} = 1.86$, 平均得率为 977 $\mu\text{g/g}$ 鲜质量; 琼脂糖电泳检测其条带清晰, 未发生降解。该方法具有简单快速获得高纯度和高产率的小球藻基因组 DNA 的优点。

关键词: Trizol 法; 普通小球藻; DNA 提取

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2015)07–0033–02

Trizol 法最早由 Chomczynski 等提出, 用于提取细胞或组织中的总 RNA^[1]。经过 Trizol 处理过的样品, 其总 RNA、DNA 及蛋白质分别分布在上层水相、中间层、下层有机相。Trizol 试剂中含有的苯酚、异硫氰酸胍等物质, 将细胞迅速破碎, 并抑制释放出来的核酸酶, 同时能够保持 RNA、DNA 的完整性, 因此对 RNA、DNA 的同时提取纯化十分有用^[2], 大大节约试验时间, 提高试验效率。小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 作为一种单细胞绿藻, 具有极强的光合自养能力; 含有丰富的脂质、蛋白质、维生素、核酸、食物纤维、叶绿素等, 都是人体健康不可或缺的营养物。小球藻还生产多种生物活性物质^[3]。由于其脂类可以达到细胞干质量的 10%~30% 而被用于生产生物柴油^[4–5]; 通过转基因小球藻可以被用来生产病毒抗体^[6]; 也发现小球藻具有抗菌活性^[7]; 小球藻可以治理重金

属、有机物以及氮磷污染^[8]。因此, 科研工作者开始对小球藻进行深入研究。本研究尝试使用 Trizol 法^[9]提取小球藻基因组 DNA, 以期获得简单快速获取高纯度高产率基因组 DNA 的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

普通小球藻购自中国科学院典型培养物种保藏委员会海洋生物种质库, 使用 SE 培养基培养, 在三角瓶中培养, 培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 光照强度条件为 2 000 lx, 光暗周期设置为 12 h/12 h; 培养至对数后期取样, 试验前将普通小球藻 4 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗处理 24 h, 将细胞内储存的淀粉消耗掉, 将有利于 DNA 的提取。

1.2 试剂

Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司, 氯仿、无水乙醇及异丙醇均为国产分析纯, 10 mol/L NH_4Ac , TE (10 mmol/L Tris–HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 值 8.0), 70% 乙醇。

1.3 仪器

离心机: 德国 Eppendorf 公司生产; 凝胶成像系统: 美国 SYNGENE 公司生产; 核酸/蛋白分析仪: BECKMAN COUL-

收稿日期: 2014–05–02

基金项目: 广东省自然科学基金 (编号: 10151805501000007); 广东省深圳市科技项目 (编号: JC201005280534A, JCY20130331151022276)。

作者简介: 段文斌 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物技术。

E-mail: 394050313@163.com。

通信作者: 金 刚, 教授。E-mail: jingang@szpt.edu.cn。

[10] Yu J H, Zhu B M, Wickre M, et al. The transcription factors STAT5A and STAT5B negatively regulate cell proliferation through the activation of Cdkn2b and Cdkn1a expression[J]. Hepatology, 2010, 52(5): 1808–1818.

[11] 方 琼, 李 娟, 吕学斌, 等. 家猪信号转导及转录激活因子基因 3、5a 及 5b 的克隆、剪切变体鉴定及组织表达图谱分析[J]. 四川大学学报, 自然科学版, 2012, 49(4): 879–886.

[12] 刘云峰, 王桂芝, 李秋梅, 等. 崂山奶山羊 *LEP* 和 *STAT5a* 基因对泌乳和生长性状的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(18): 3946–3954.

[13] 宋章会. 贵州山羊生产现状调查与发展对策[J]. 贵州畜牧兽医, 2007(5): 15–16.

[14] Sham P, Bader J S, Craig I, et al. DNA pooling: a tool for large-scale association studies [J]. Nature Reviews Genetics, 2002, 3(11): 862–871.

[15] Suliman H B, Carraway M S, Piantadosi C A. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2003, 167(4): 570–579.

[16] 陈焕珍, 王 晓, 李凤英, 等. JAK2/STAT5 通路在胰岛对妊娠适应中的作用[J]. 上海交通大学学报, 2012, 32(5): 555–559.

[17] Shain K H, Yarde D N, Meads M B, et al. $\beta 1$ Integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation[J]. Cancer Research, 2009, 69(3): 1009–1015.

[18] 褚 敏, 阎 萍, 裴 杰, 等. STATs 家族基因多态性在奶牛育种中的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(2): 25–26.

[19] Huang Y L, Zhao F, Luo C C, et al. SOCS3-Mediated blockade reveals major contribution of JAK2/STAT5 signaling pathway to lactation and proliferation of dairy cow mammary epithelial cells *in vitro* [J]. Molecules, 2013, 18(10): 12987–13002.