

李 维,林家栋,刘若余,等. 加利福尼亚兔和新西兰兔 *UCPI* 基因第 5 外显子多态性和生物信息学研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):41-44. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.010

# 加利福尼亚兔和新西兰兔 *UCPI* 基因第 5 外显子多态性和生物信息学研究

李 维<sup>1</sup>,林家栋<sup>1</sup>,刘若余<sup>1</sup>,谢海强<sup>1</sup>,李 思<sup>1</sup>,杜雪琴<sup>2</sup>,肖超能<sup>1</sup>

(1. 贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室/贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室/贵州大学动物科学学院,贵州贵阳 550025;2. 贵阳市小河第三实验学校,贵州贵阳 550006)

**摘要:**本试验以加利福尼亚兔和新西兰兔为研究对象,分别用磁珠法动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取新西兰兔和加利福尼亚兔的 DNA,通过构建 DNA 池,扩增 *UCPI* 基因的第 5 外显子及第 4 内含子部分序列。扩增产物进行双向测序,利用 DNASTar 和 BLAST 分析测序结果。结果发现:在加利福尼亚兔中没有发现 SNP 位点,在新西兰兔中有 4 个多态性位点,分别为 G743T、A744G、C819A 和 G849T,其中 G743T 为同义突变,A744G 为错义突变,导致编码的苏氨酸(Thr)变为丙氨酸(Ala);C819A、G849T 突变位点位于内含子区。多态位点的出现对 *UCPI* 基因的 RNA 二级结构产生的影响表现在其最小自由能由 -1.93 MJ/mol 变为 -1.932 MJ/mol,同时 SNPs 位点对 *UCPI* 基因蛋白结构也有一定影响。

**关键词:***UCPI* 基因;新西兰兔;加利福尼亚兔;SNPs;RNA 二级结构

**中图分类号:** S829.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0041-03

解耦联蛋白(uncoupling protein, UCPs)是褐色脂肪细胞线粒体内膜上存在的一种质子转运蛋白,它存在于动物的各组织中,在能量平衡、维持体温、机体产热和代谢等方面都起着巨大的作用<sup>[1-6]</sup>。比如,它激活后可以产生质子电化学梯度降低,使呼吸链与 ATP(三磷酸腺苷)合成过程解耦联,使能量以热的形式释放;*UCPI* 基因参与机体能量代谢,对机体能量平衡涉及的食物转化效率、静止代谢率和体重肥胖等性状具有明显的效应,对肌肉生长和品质的改良作用重大<sup>[7-10]</sup>。目前,这个家族的 5 种蛋白质在鱼、禽类、哺乳动物甚至在人类的不同组织线粒体的内膜上都已发现<sup>[11-14]</sup>。其中,*UCPI* 是最早发现的成员。

*UCPI* 是褐色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)中表达的标记基因,它具有解离氧化磷酸化耦联功能,如机体通过在线粒体中产生能量,三羧酸循环产生的还原当量通过电子将能量释放,使 H<sup>+</sup> 从线粒体基质转移至内膜面,形成 1 个跨线粒体内膜的质子电化学梯度,当线粒体的 ATP 合酶将 H<sup>+</sup> 从内膜面顺梯度运回至基质面时,其能量可推动二磷酸腺苷与磷酸结合,促使生成 ATP。*UCPI* 基因的表达增加可能是受到去甲肾上腺素促进,使其与 G 耦联蛋白相关的环磷酸腺苷合成,后者又可使蛋白激酶激活,蛋白激酶作用的靶蛋白包括激素敏感性脂肪酶,这种酶一旦被磷酸化激活就可以抑制

三酰甘油的贮存,使脂肪分解,非脂化脂肪酸增加,促进产热作用。此外,*UCPI* 表达增加还有可能受肾上腺素和甲状腺素等的刺激,从而增加棕色脂肪组织所消耗脂肪酸的活性,因此 *UCPI* 被认为是 2 型糖尿病和抵抗肥胖的重要基因<sup>[15-17]</sup>。

Clark 等发现,*UCPI* 基因的表达水平对羔羊出生后的成活率起着重大作用<sup>[18]</sup>。Bassett 等发现,*UCPI* 基因的表达对初生羔羊 BAT 的含量影响重大<sup>[19]</sup>。然而对兔线粒体中 *UCPI* 基因方面的研究很少,本试验以加利福尼亚兔和新西兰兔构建其 DNA 池,对 *UCPI* 基因第 5 外显子及第 4 内含子部分序列进行扩增,BLAST 分析其测序结果筛选多态位点,由 DNASTar 软件进行序列拼接、校正,并预测其对 RNA 结构影响和等位基因频率估算。

## 1 材料与与方法

### 1.1 样品的来源

从贵州贵阳白云牛场大林农牧专业合作社种兔场和贵州贵阳修文盛鑫兔业开发有限公司种兔场采取加利福尼亚兔的组织样 48 个和新西兰兔组织样 48 个,将采取的样品放在已编好序号的自封袋中于 -20 ℃ 冰箱中保存。

### 1.2 构建 DNA 池和引物设计、合成

利用磁珠法动物基因组(组织)DNA 抽提试剂盒提取 DNA,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测所提的 DNA,取 5 μL 构建 DNA 池。以兔 *UCPI* 基因(其 GenBank 登录号为: NC\_013683.1)DNA 序列利用 Primer-BLAST 设计 1 对引物来扩增 *UCPI* 基因第 5 外显子和第 4 内含子的部分序列,将所设计的引物送往生工生物工程(上海)股份有限公司合成。物序列为 F: GAGGTAAGTCCATCCCCACG, R: ACTCTTCTA-ACGATGTAGTGTG;退火温度为 59 ℃;目的片段大小为 809 bp。

收稿日期:2015-01-25

基金项目:贵州省科技支撑计划(编号:黔科合 NY 字[2012]3013 号)。

作者简介:李 维(1988—),男,硕士研究生。E-mail:gzdxliwei@163.com。

通信作者:肖超能,高级兽医师,研究方向为家兔饲养繁育和动物疾病防治。E-mail:xiaocn63110@sina.com。

### 1.3 DNA的扩增和序列的分析

反应体系为 25  $\mu\text{L}$ : 2  $\times$  Taq PCR Master Mix 试剂 12.5  $\mu\text{L}$ , 基因组 DNA 2.5  $\mu\text{L}$ , 三蒸水 7  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 10 pmol/ $\mu\text{L}$  各 1.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并用凝胶成像系统观察结果, 最后拍照保存。

将扩增的产物送往立菲生物技术有限公司进行双向测序。用 DNASTar 软件校正测序结果, 通过 BLAST 软件对 SNPs 进行确定。

### 1.4 测量峰高及等位基因频率估算

利用 MWSnap 软件对 SNP 位点等位基因的相应峰高进行测量, 可依据如下公式  $f_i = h_i / (h_1 + h_2)$ ,  $i = 1, 2$ , 对等位基因频率进行估算。  $f_i$  表示 SNP 位点某等位基因频率,  $h_1$  表示 SNP 等位基因 1 峰的高度,  $h_2$  表示 SNP 等位基因 2 峰的高度。

### 1.5 RNA 二级结构预测和蛋白质二级结构预测

通过在线预测软件: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>, 对 *UCPI* 基因突变前后不同 DNA 序列进行 RNA 二级结构变化的预测, 通过蛋白质二级结构在线预测软件: [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), 对 *UCPI* 基因突变前后不同蛋白氨基酸序列进行蛋白质二级结构预测。

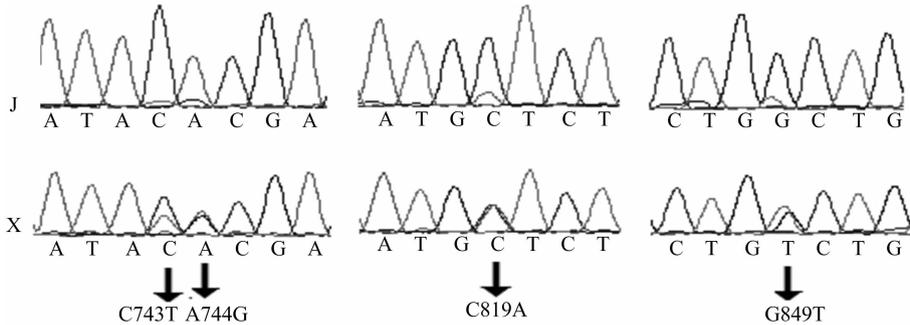


图2 *UCPI* 基因 PCR 产物测序的结果

### 2.2 估算 SNPs 等位基因频率

通过 MWSnap 软件对加利福尼亚兔和新西兰兔 SNPs 等位基因峰高进行测量, 根据公式估算 4 个 SNPs 位点等位基因频率(表 1)。由表 1 可知, 内含子 C819A 和外显子 A744G 在加利福尼亚兔和新西兰兔中有较大差异, 而外显子 G743T 和内含子 G849T 在 2 种兔品种中差异较小, 且加利福尼亚兔的 4 个位点基因频率均高于新西兰兔。

表 1 加利福尼亚兔和新西兰兔 SNPs 等位基因频率估算结果

品种	等位基因频率			
	C743T(C)	A774G(A)	C819A(C)	G849T(G)
加利福尼亚兔	0.942 9	0.875 0	0.814 8	0.809 5
新西兰兔	0.666 7	0.583 3	0.500 0	0.560 0

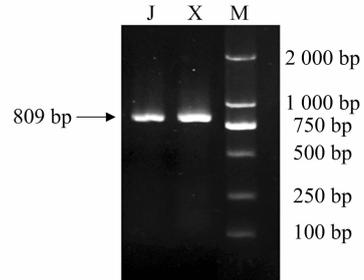
### 2.3 预测 *UCPI* 基因的 RNA 二级结构

预测突变前后 *UCPI* 基因的 RNA 二级结构, 结果表明, SNPs 导致 RNA 二级结构发生改变, 并导致 RNA 二级结构最小自由能发生变化, 由 -1.934 MJ/mol 变为 -1.932 MJ/mol,

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 产物扩增

设计 1 对引物分别扩增加利福尼亚兔和新西兰兔的 *UCPI* 基因第 5 外显子及第 4 内含子部分序列。PCR 扩增(图 1)后送往立菲生物技术有限公司进行双向测序, BLAST 分析共发现 4 个 SNPs(图 2)。NCBI 中 SNP 数据库尚无该基因 SNP 信息, 本试验所筛查的 SNPs 均为新发现多态性位点, 以 *UCPI* 基因第 1 外显子第 1 位为 +1 位, SNPs 位点分别为 G743T、A744G、C819A、G849T, 其中 G743T 为同义突变, A744G 为错义突变, 导致编码的苏氨酸(Thr)变为丙氨酸(Ala); C819A、G849T 突变位点位于内含子区。



M—DL2000 marker; J—加利福尼亚兔; X—新西兰兔

图1 *UCPI* 基因 PCR 产物结果

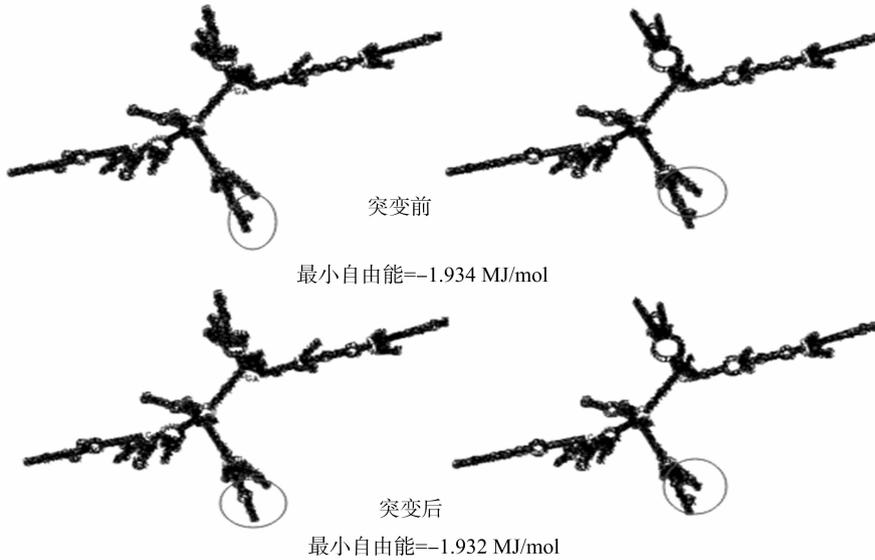
这不仅可能影响 RNA 二级结构的稳定性, 还可能影响后续蛋白质翻译过程(图 3)。

### 2.4 突变前后 *UCPI* 蛋白二级的预测

通过在线 SOPMA 服务器预测新西兰兔 *UCPI* 基因突变前后蛋白质二级结构变化, 结果表明: 突变前后  $\alpha$  螺旋由 109 变到 110, 而  $\beta$  转角由 39 变成 40, 延伸链由 86 变到 83, 自由卷曲由 72 变到 73(表 2)。

## 3 讨论

大量的研究表明, *UCP* 基因家族与畜禽肉质关系密切。涂荣剑等对猪的 *UCP3* 基因研究发现, 突变可能导致相应编码氨基酸序列的改变, 从而影响胴体、肉质性状<sup>[20]</sup>。韩瑞华等对牛的 *UCP3* 基因进行研究, 发现 *UCP3* 基因不仅对肉牛胴体、肉质性状等方面具有重要影响, 而且对肉牛的育种工作具有指导作用<sup>[21]</sup>。王涛等研究了 *UCP* 基因对鸡肉质和猪肉质量的影响<sup>[10]</sup>。肌内脂肪沉积是兔肉肉质标记辅助选择中重要的选择指标, 筛选出对家兔肌内脂肪沉积有影响的基因

图3 *UCP1* 基因突变前、后的 RNA 二级结构表2 *UCP1* 突变前后蛋白二级结构预测结果

突变	$\beta$ 转角 (%)	延伸链 (%)	$\alpha$ 螺旋 (%)	自由卷曲 (%)
A744G(A)	12.75(39)	28.10(86)	35.62(109)	23.53(72)
A744G(G)	13.07(40)	27.12(83)	35.95(110)	23.86(73)

有助于加快品种选育进程和提高家兔肉质性能。

目前对兔的 *UCP1* 基因多态性研究报道很少,本试验以加利福尼亚兔和新西兰兔为研究,对 *UCP1* 基因第5外显子及第4内含子部分序列进行扩增,将扩增的PCR产物进行双向测序,结果发现4个新的多态性位点:G743T、A744G、C819A、G849T,其中G743T为同义突变,A744G为错义突变,导致编码的苏氨酸(Thr)变为丙氨酸(Ala);C819A、G849T突变位点位于内含子区。比较加利福尼亚兔和新西兰兔多态性位点等位基因频率发现,内含子C819A和外显子A744G在加利福尼亚兔和新西兰兔中有较大差异,而外显子G743T和内含子G849T在2个兔品种中差异较小,且加利福尼亚兔的4个位点基因频率均高于新西兰兔。

突变前后 *UCP1* 编码蛋白二级结构也发生了改变, $\beta$ 转角由39变成40, $\alpha$ 螺旋由109变到110,延伸链由86变到83,自由卷曲由72变到73。突变前后 *UCP1* 基因RNA二级结构发生改变,其最小自由能由-1.934 MJ/mol变为-1.932 MJ/mol。这说明该位点可能影响2个品种的肌内脂肪沉积等肉质性状差异,下一步工作将分析该多态性位点与兔肌内脂肪沉积性状的关联性,就 *UCP1* 基因对兔肉质性能的调控作进一步探究,从而为线粒体中相关基因对兔肌内脂肪沉积影响提供一定的依据。

#### 参考文献:

- [1] Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP [J]. The Biochemical Journal, 2000, 345: 161-179.
- [2] Hernandez A, Obregon M J. Triiodothyronine amplifies the adrenergic

stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocyte [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab 2000, 278(5): 769-77.

- [3] Larose M, Cassard - Doulier A M, Fleury C, et al. Essential cis - acting elements in rat uncoupling protein gene are in an enhancer containing a complex retinoic acid response domain [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(49): 31533-31542.
- [4] Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, et al. The uncoupling protein UCP: a membranous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue [J]. The International Journal of Biochemistry, 1991, 23(9): 791-801.
- [5] Gong D W, He Y, Karas M, et al. Uncoupling protein - 3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone,  $\beta$  3 - adrenergic agonistic, and leptin [J]. J Biol Chem 1997; 272: 24129-32.
- [6] Enerback S, Jacobsson A, Simpson E M, et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold - sensitive but not obese [J]. Nature, 1997, 387(6628): 90-93.
- [7] 赵建国, 李辉, 孟和, 等. 解偶联蛋白基因(*UCP*)作为影响鸡脂肪性状候选基因的研究 [J]. 遗传学报, 2002(6): 481-486.
- [8] 于磊, 邹飞. 解偶联蛋白在能量代谢和体温调节中的作用研究进展 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(13): 1950-1951.
- [9] 刘丽, 田建云, 李琦华, 等. 解偶联蛋白与动物的能量代谢 [J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(4): 504-510.
- [10] 王涛, 罗敏, 李成洪. *UCP* 基因在肉质方面的研究现状 [J]. 四川畜牧兽医, 2009(7): 35-37.
- [11] 张雷, 文生萍, 谷大海, 等. *UCPs* 基因多态性与脂肪代谢的相关性研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2010(8): 78-83.
- [12] 李秋玲, 许尚忠, 竺林森, 等. 3个牛品种 *UCP3* 基因第5内含子和第6外显子部分序列的多态性研究. [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(11): 11-14, 20.
- [13] 何茹. 解偶联蛋白家族成员 *UCP2* [J]. 北京教育学院学报: 自然科学版, 2009, 4(2): 19-22, 65.
- [14] 孙国权, 高树新, 吴慧光, 等. 解偶联蛋白1、2和3基因在中国西门塔尔牛组织器官中的表达水平及其与胴体品质关系分析 [J]. 华北农学报, 2014, 29(4): 116-120.

沈 阅,林亚秋,梅 寒,等. 藏山羊 *FGF21* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):44-47.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.011

# 藏山羊 *FGF21* 基因克隆及生物信息学分析

沈 阅,林亚秋,梅 寒,李 想,张小玉  
(西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

**摘要:**为探讨藏山羊 *FGF21* 基因的分子结构特征,利用 RT-PCR 技术对该基因进行克隆、测序及相关生物信息学分析。结果表明:获得藏山羊 *FGF21* 基因序列 650 bp,ORF 长度为 634 bp,编码 209 个氨基酸。氨基酸序列分析显示,藏山羊 *FGF21* 编码蛋白属于不稳定酸性蛋白,分子式为  $C_{1022}H_{1596}N_{276}O_{296}S_5$ ,分子质量为 22.65 ku。预测该蛋白含有 13 个磷酸化位点,并与多种蛋白存在相互作用;无跨膜结构域,有信号肽结构。在 47~164 位氨基酸残基存在 FGF 结构域。亚细胞定位显示,*FGF21* 蛋白大部分位于细胞质内。同源性分析指出山羊 *FGF21* 氨基酸序列保守性较高,与 GenBank 中藏羚羊、牛、印度水牛及猪等的同源性在 90%~99%。本研究结果为阐明 *FGF21* 基因在藏山羊中的作用提供重要的基础数据。

**关键词:**藏山羊;*FGF21* 基因;克隆;生物信息学分析

**中图分类号:**S827.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)01-0044-04

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)是一类由 FGF 基因家族编码的结构相关的蛋白质。人类的 FGF 家族包括 22 个成员,按种系和序列又分为 7 个亚科,大部分 FGF 因子对细胞的生长和分化具有调节作用<sup>[1]</sup>。成纤维细胞生长因子 *FGF21*(fibroblast growth factor 21)是 FGF 家族的一个新成员,属于 FGF 家族中 FGF19 亚家族成员之一。*FGF21* 主要在肝脏、脂肪和其他组织表达,它对机体的能量平衡调节和糖代谢具有重要作用,已经成为全球糖脂代谢研究的热点基因<sup>[2-5]</sup>。

研究指出生酮饲喂小鼠可使小鼠体质量减轻,并且用生酮饲喂 *FGF21* 基因敲除大鼠,则老鼠出现体质量明显上升现象<sup>[6-7]</sup>。Coskun 等报道 *FGF21* 过表达的转基因鼠对多食诱导的肥胖有明显的改善作用,并可逆转肝脏脂肪变性及胰岛素抵抗,使体质量下降约 20%<sup>[8]</sup>。学者在给患糖尿病的恒河猴注射 *FGF21* 后发现其不仅对血糖有控制作用,还具有轻度的减重作用<sup>[9]</sup>。研究发现肥胖患者空腹血清 *FGF21* 表达水

平显著高于正常对照组,*FGF21* 表达水平与腰围以及 WHR、FPG、HbA1c、FINS、TG、hsCRP 的表达水平呈显著正相关,与 HDL-C 呈显著负相关<sup>[10]</sup>。上述研究结果都反映出,*FGF21* 在脂肪代谢和控制体质量方面都起了非常重要的作用,但上述研究均集中在人和小鼠等动物及细胞系上进行,在动物脂肪沉积方面的研究尚不深入。在山羊上尚未见相关报道,仅见山羊 *FGF21* 的预测序列,因此需要进行更深入的研究。

藏山羊是我国青藏高原特有畜种,又称为“克什米尔”山羊,其肌肉细嫩、风味好,是藏族同胞重要的生产和生活资料<sup>[11]</sup>。且藏山羊一般不需要专门肥育,是研究山羊优良肉质性状形成的理想材料。因此本研究以藏山羊为研究对象,应用 RT-PCR 技术获得 *FGF21* 基因序列,同时进行生物信息学分析,为进一步研究 *FGF21* 基因在藏山羊脂肪代谢及能量平衡中的作用机制,对提高藏山羊的育肥效率、提高肉品质提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物与组织的采集 以四川省若尔盖种羊场饲养的成年健康公藏山羊为试验动物,现场屠宰,迅速采集背最长肌组织样本,立即置于液氮中保存带回实验室备用。

1.1.2 主要试剂 Trizol 试剂盒、荧光定量试剂盒 SYBR<sup>®</sup>

收稿日期:2015-07-15

基金项目:中央高校基本科研业务费专项青年基金(编号:11NZYQN08)。

作者简介:沈 阅(1984—),女,湖南龙山人,硕士,实验师,主要从事分子生物学研究。E-mail:ssyue31@qq.com。

[15]张慧敏,程旭光. 解偶联蛋白与肥胖及运动的关系[J]. 中国临床康复,2005,9(4):193-195.

[16]刘志诚,孙凤岷,赵东红,等. 针刺对肥胖大鼠褐色脂肪组织产热作用的影响[J]. 中国临床康复,2003,7(27):3665-3667.

[17]袁亚男,刘文忠,刘建华,等. 绵羊 *UCPI* 基因碱基突变与其蛋白结构和功能[J]. 中国农业科学,2012,45(14):2973-2980.

[18]Clarke L, Bryant M J, Lomax M A, et al. Maternal manipulation of brown adipose tissue and liver development in the ovine fetus during late gestation[J]. The British Journal of Nutrition, 1997, 77(6): 871-883.

[19]Bassett J M, Bomford J, Mott J C. Photoperiod: an important regulator of plasma prolactin concentration in fetal lambs during late gestation[J]. Quarterly Journal of Experimental Physiology, 1988, 73(2):241-244.

[20]涂荣剑,邓昌彦,熊远著. 猪 *UCP3* 基因部分编码区序列分析及其单核苷酸多态与胴体、肉质性状的遗传效应[J]. 遗传学报, 2004,31(8):807-812.

[21]韩瑞华,咎林森. 秦川牛及其杂种牛 *UCP3* 基因 SNPs 检测及其与胴体、肉质性状的相关性[J]. 畜牧兽医学报,2009,40(6): 806-812.