

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®

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性与胴体、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.

Premix Ex Taq™ (2 ×)、pMD-19T Vector 均购自大连 TaKaRa 公司,反转录试剂盒 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 均购于 Thermo 公司,Taq 聚合酶、胶回收试剂盒与 *E. Coli* DH5α 感受态细胞均购于天根生化科技有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 合成 按照 Trizol 试剂盒说明书提取藏山羊背最长肌的总 RNA,测定  $D_{260\text{ nm}}$  与  $D_{280\text{ nm}}$  比值在 1.8~2.0 之间,检测 RNA 浓度和质量,然后取 2 μg 按照反转录试剂盒说明书来合成 cDNA 第一链, -80 °C 保存备用。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank 上山羊 *FGF21* 基因预测序列(XM\_005692688),利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 克隆引物(正:5′-ACTGATGGGCTGGGACGA-3′;反:5′-TGCACAGCGGACGCTCTC-3′),产物长度为 650 bp。引物送交四川成都擎科梓熙生物技术有限公司进行合成。

1.2.3 藏山羊 *FGF21* 基因克隆 利用 RT-PCR 技术克隆藏山羊 *FGF21* 基因序列,PCR 反应总体系为:2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL,模板 cDNA 1 μL,上、下游引物各 1 μL (10 μmol/L),最后加水至 25 μL。扩增条件:94 °C 4 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,36 个循环;72 °C 10 min。然后 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,胶回收试剂盒纯化目的片段,然后再将产物与 pMD-19T 载体连接,并转化至感受态细胞中,经菌液 PCR 鉴定后送至四川成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。

1.2.4 藏山羊 *FGF21* 基因和蛋白的生物信息学分析 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白理化性质;ProtParam (<http://Web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白理化性质;NetPhos 2.0 分析预测磷酸化位点;Signal P 4.1 Server 信号肽预测;TMHMM 预测跨膜结构域;NPS 预测二级结构;SWISS-MODEL 三级结构预测;NCBI 在线程序 CDD 预测保守功能域;通过 PSORT II 进行亚细胞定位,利用 STRING

交互式数据库进行搜索蛋白相互作用分析;NCBI 中 Blast 在线比对同源性分析,Clustalx 1.83 和 MEGA 5.0 构建进化树;

## 2 结果与分析

### 2.1 山羊 *FGF21* 基因的克隆

用藏山羊背最长肌组织 cDNA 为模板经 PCR 扩增后获得 *FGF21* 目的片段,经琼脂糖凝胶电泳检测与预期相符(图 1),测序后经 Blast 比对后确定其为藏山羊 *FGF21* 基因序列 650 bp,分析表明 *FGF21* 基因序列起始密码子 ATG 位于 5 bp 处,终止密码子位于 634 bp 处,其中核苷酸序列的碱基组成分别为:A 17.2%,C 34.3%,G 29.8%,T 18.6%。

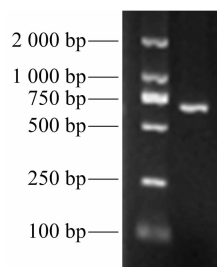


图1 *FGF21* 基因扩增结果

### 2.2 藏山羊 *FGF21* 生物信息学分析

2.2.1 蛋白理化性质分析 蛋白理化性质分析表明,藏山羊 *FGF21* 蛋白由 209 个氨基酸残基组成(图 2),分子式为  $C_{1022}H_{1596}N_{276}O_{296}S_5$ ,分子质量为 22.65 ku。带负电荷的氨基酸残基总数(Asp + Glu)为 22 个,带正电荷的氨基酸残基总数(Arg + Lys)为 20 个,即该蛋白质可能带负电荷。结合不稳定系数(52.87)、理论等电点(6.08)和平均疏水指数(-0.293)可知,*FGF21* 蛋白为不稳定、酸性不溶类蛋白。且分析显示藏山羊 *FGF21* 的 47~164 位氨基酸序列残基存在 FGF 结构域(图 2、图 3)。

```

1      ACTGATGGCTGGGACGAGGCCAAGTTCAAGCACTTGGGACTGTGGTCCCTGTGCTGGC
1      M G W D E A K F K H L G L W V P V L A
61     TGTCTCTCTGTAGGAACCTGCCGGGCGCATCCCATTCCAGACTCCAGCCCCCTCTCCA
21     V L L L G T C R A H P I P D S S L L L Q
121    GTTTGGGGCCCAAGTCCGCCAGCGGTACCTCTACACGGATGATGCCAGGAGACAGAGGC
41     F G G Q V R Q R Y L Y T D D A Q E T E A
181    CCACCTGGAGATCAGGGCCGATGGCAGTGGTGGGGCGGCCCGCAGAGTCCCGAAAG
61     H L E I R A D G T V V G A A R Q S P E S
241    TCTCTTGGAGCTGAAGCCCTGAAGCCAGGCGTCATTGAGATCTTTGGAGTTAAACATC
81     L L E L K A L K P G V I Q I F G V K T S
301    CAGGTTCTCTGTGCCAGGGGCCAGATGGGAAGCTGTACGGATCGTGCACTTTGACCCCAA
101    R F L C Q G P D G K L Y G S L H F D P K
361    AGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTGAAGATGGGTACAATGCTTACAGTCGGAGAC
121    A C S F R E L L L E D G Y N V Y Q S E T
421    CCTGGGCTTCCACTCCGCTGCCCCCGCAGCGTCATCAACCGGGACCCGCGCCCGCG
141    L G L P L R L P P Q R S S N R D S P A L R
481    GGGACCTGCTCGTCTCTGCGCTGCCAGGCTGCCCGGCGCCCCGGATCCTCCAGG
161    G P A R F L P L P G L P P A P P D P P G
541    GATCTTGGCCCCGAGCCTCCCGACGTGGGCTCCTCGGATCCCCTGAGTATGTGGGACC
181    I L A P E P P D V G S S D P L S M V G P
601    CTCGTATGGCCGAAGCCCCAGCTACACTTCTTGAAGACGTCCGCTGTGCA
201    S Y G R S P S Y T S *

```

起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA)用灰色底纹表示;下划线表示FGF结构域

图2 *FGF21* 核苷酸序列及编码氨基酸序列

2.2.2 蛋白磷酸化位点分析 经磷酸化位点预测,在 76、79、122、152、195、200、204 和 206 位共有 8 个丝氨酸(Ser)磷

酸化位点,在 68 和 98 位共有 2 个苏氨酸(Thr)磷酸化位点,在 132、201 和 207 位共有 3 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点。

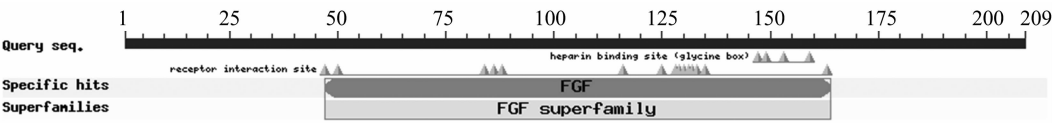


图3 藏山羊 *FGF21* 推测的氨基酸序列生物学功能预测

2.2.3 蛋白跨膜结构分析信号肽 分析结果指出山羊 *FGF21* 蛋白无跨膜螺旋结构。在 1 ~ 28 位氨基酸处存在信号肽。

2.2.4 亚细胞定位及蛋白相互作用分析 通过 PSORT II 预测,主要在细胞质(55.6%)和细胞核(22.2%)发挥生物学作用,少量作用于液泡(11.1%)和线粒体(11.1%)。利用 STRING 交互式数据库进行搜索 *FGF21* 蛋白相互作用,条件限制在 10 个蛋白以内。搜索结果表明,*FGF21* 蛋白可能和 *FGFR1*、*IGF1R*、*FGFR2*、*INSR*、*FGFR*、*PPARA*、*CSF1R*、*CYP7A1*、*FGFR3* 和 *FGFR4* 蛋白存在相互作用。构建蛋白相互作用网络(图 4)。

2.2.5 蛋白二级结构与三级结构预测 通过 SOPMA 在线软件预测藏山羊 *FGF21* 蛋白二级结构(图 5),结果显示,在藏山羊 *FGF21* 的 209 个氨基酸中,33 个(15.7%)氨基酸可能形成  $\alpha$ -螺旋(h),48 个(22.97%)氨基酸可能形成  $\beta$ -折叠占(e),19 个(9.09%)氨基酸可能形成  $\beta$ -转角(t),109 个

(52.15%)氨基酸可能形成无规则卷曲(c)。通过 I-TSSER 软件预测山羊 *FGF21* 蛋白三级结构(图 6),该三级结构与二级结构预测结果基本一致。

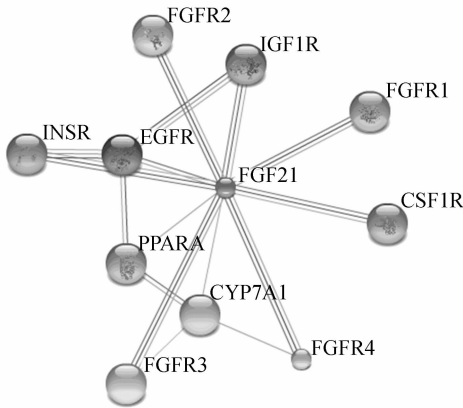
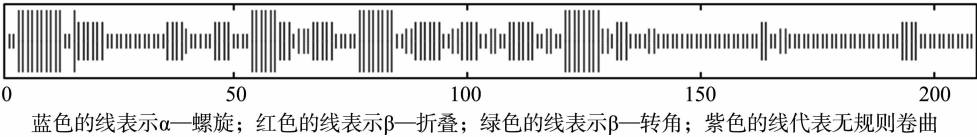


图4 藏山羊 *FGF21* 蛋白与其他蛋白相互作用网络



蓝色的线表示 $\alpha$ -螺旋;红色的线表示 $\beta$ -折叠;绿色的线表示 $\beta$ -转角;紫色的线代表无规则卷曲

图5 *FGF21* 蛋白二级结构预测

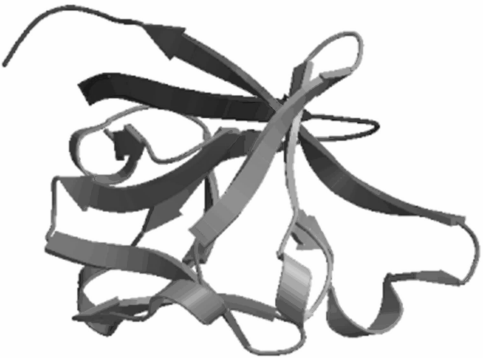


图6 *FGF21* 蛋白三级结构预测

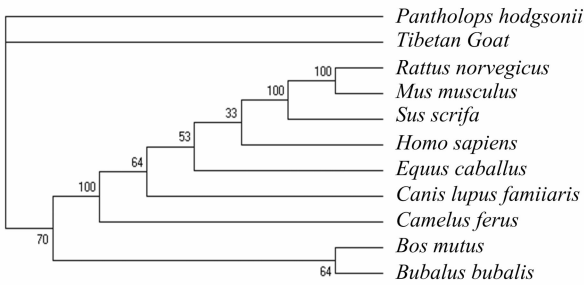


图7 *FGF21* 基因氨基酸进化树

2.3 藏山羊 *FGF21* 预测的氨基酸序列与其他物种同源性比较

通过 NCBI 中 BlastN 程序和 BlastP 程序分别进行同源性在线分析,结果表明,藏山羊 *FGF21* 推测的氨基酸序列与藏羚羊(XP\_005955412)、牛(XP\_005895443)、印度水牛(XP\_006050969)、猪(NP\_001156882)、马(XP\_001489202)、人(NP\_061986)、小鼠(NP\_064397)、大鼠(NP\_570108)、家犬(XP\_541510)和野骆驼(XP\_006173890)的同源性分别为 99%、99%、99%、91%、86%、85%、75%、74%、90% 和 90%,表明藏山羊与藏羚羊的亲缘关系最近(图 7)。

3 讨论与结论

*FGF21* 是近年来发现的一种与糖脂代谢关系密切的内源性脂肪细胞因子<sup>[12,13]</sup>,有助于脂肪的代谢,是饥饿时抑制生长的重要因子。并且体外研究表明它可以降低血糖、抑制胰高血糖素的分泌、改善脂代谢<sup>[9,14]</sup>。Varady 等指出 *FGF21* 在猪的脂肪控制中具有调控作用<sup>[15]</sup>,并且生长激素可以直接刺激牛肝脏中 *FGF21* 的表达<sup>[16]</sup>。基于此,畜牧工作者对 *FGF21* 在动物脂代谢中的作用也非常关注。因此本试验通过克隆得到藏山羊 *FGF21* 基因序列,为后续在山羊中的研究奠定基础。

本试验通过 RT-PCR 技术克隆得到藏山羊 *FGF21* 基因

序列 650 bp, 编码 209 个氨基酸, 具有 FGF 家族典型的结构。推测的氨基酸序列与藏羚羊的同源性最近, 这符合物种的进化规律。同时利用生物信息学分析了藏山羊的磷酸化位点、信号肽、跨膜结构、亚细胞定位、二级和三级结构以及蛋白相互作用等。结果发现, 藏山羊 FGF21 没有跨膜结构, 具有信号肽结构, 含有 13 个磷酸化位点, 并主要发生在丝氨酸残基上(8 个), 推测其翻译后修饰主要是通过此来进行的。二级结构预测发现在藏山羊 FGF21 氨基酸序列主要有 33 个  $\alpha$ -螺旋、48 个  $\beta$ -折叠、19 个  $\beta$ -转角和 109 个无规则卷曲结构, 并且三级结构预测也证明了二级结构的预测<sup>[17]</sup>, 有利于进一步阐明藏山羊 FGF21 的功能。

本研究发现经过蛋白质相互作用分析预测与藏山羊 FGF21 相互作用的蛋白可能是 FGFR1、IGF1R、FGFR2、INSR、FGFR、PPAR $\alpha$ 、CSF1R、CYP7A1、FGFR3 和 FGFR4 等。

有研究指出 *FGF21* 的启动子上有 PPAR $\alpha$  结合位点, 具有上调 *FGF21* 表达的功能, 禁食和饲喂可以通过 PPAR $\alpha$  促进 *FGF21* 在肝脏中的大量表达<sup>[6]</sup>, 本试验的预测结果与之一致。但关于 *FGF21* 在藏山羊中的具体的作用机制需要试验来进一步证明。

#### 参考文献:

- [1] 于浩泳, 贾伟平. 成纤维细胞生长因子 21 与糖脂代谢的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(42): 3019–3021.
- [2] 侯玉婷, 李晋南, 任桂萍, 等. 人 *FGF-21* 基因的克隆、表达及其调节脂肪细胞糖代谢的活性[J]. 遗传, 2010, 32(6): 583–587.
- [3] Berti L, Irmeler M, Zdichavsky M, et al. Fibroblast growth factor 21 is elevated in metabolically unhealthy obesity and affects lipid deposition, adipogenesis, and adipokine secretion of human abdominal subcutaneous adipocytes[J]. Molecular Metabolism, 2015, 4(7): 519–527.
- [4] Slusher A L, Whitehurst M, Zoeller R F, et al. Attenuated fibroblast growth factor 21 response to acute aerobic exercise in obese individuals[J]. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, 2015, 25(9): 839–845.
- [5] Grunwald T, De Luca F. Role of fibroblast growth factor 21 (*FGF21*) in the regulation of statural growth[J]. Current Pediatric Reviews, 2015, 11(2): 98–105.
- [6] Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR $\alpha$ -mediated induction of fibroblast growth factor 21[J]. Cell Metabolism, 2007, 5(6): 415–425.
- [7] Badman M K, Koester A, Flier J S, et al. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis[J]. Endocrinology, 2009, 150(11): 4931–4940.
- [8] Coskun T H, Schneider M. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice[J]. Endocrinology, 2008, 149(12): 6018–6027.
- [9] Kharitonov A, Wroblewski V J, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21[J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 774–781.
- [10] 朱蓓, 蒋艺兰. 肥胖者血清成纤维细胞生长因子 21 的水平及其临床意义[J]. 同济大学学报: 医学版, 2014, 35(4): 97–100.
- [11] 谈旭霞. 藏山羊产业发展现状及持续发展的可行性[J]. 畜牧兽医杂志, 2010, 29(3): 56–58.
- [12] Kharitonov A, Shiyanova T L, Koester A, et al. *FGF-21* as a novel metabolic regulator[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(6): 1627–1635.
- [13] Kharitonov A, Wroblewski V J, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21[J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 774–781.
- [14] Badman M K, Pissios P, Kennedy A R, et al. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR $\alpha$  and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states[J]. Cell Metabolism, 2007, 5(6): 426–437.
- [15] Varady J, Ringseis R, Eder K. Dietary moderately oxidized oil induces expression of fibroblast growth factor 21 in the liver of pigs[J]. Lipids in Health and Disease, 2012, 11: 34.
- [16] Yu J, Zhao L, Wang A, et al. Growth hormone stimulates transcription of the fibroblast growth factor 21 gene in the liver through the signal transducer and activator of transcription 5[J]. Endocrinology, 2012, 153(2): 750–758.
- [17] 张成岗, 贺福初. 生物信息学方法与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 158–230.
- [18] Gao W H, Tan B P, Mai K S, et al. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to long-term low salinity stress[J]. Aquaculture, 2012, 364/365: 186–191.
- [19] Wang W A, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, 44(6): 842–846.
- [20] Ghebrehiwet B, Peerschke E I. cC1q-R (calreticulin) and gC1q-R/p33: ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection[J]. Molecular Immunology, 2004, 41(2/3): 173–183.
- [21] Wang F I, Chen J C. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20: 671–681.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.

(上接第 40 页)

- [14] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [15] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340(4): 783–795.
- [16] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [17] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software[M]. Tempe, Arizona, USA: Arizona State University, 2001.
- [18] Gao W H, Tan B P, Mai K S, et al. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus van-*