

鸡 *Muslin* cDNA 克隆与序列分析

王伟杰, 郭豫杰, 王月影, 乔新安, 杨 森, 王艳玲, 杨国宇

(河南农业大学 动物生理生化实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 基于电子延伸序列, 本试验克隆并分析了鸡 *Muslin* 基因。肌肉组织提取总 RNA, 利用设计的引物进行 RT-PCR, PCR 产物与 pMD19-T 连接后转化 *E. coli* DH5 α , 检测阳性克隆并测序; 克隆的 *Muslin* 基因与人、大鼠、小鼠同源性分别为 74%, 73%, 70%, 推测的氨基酸序列同源性分别为 58%, 54%, 50%, 氨基酸序列含有“KKKR”结构和与小鼠 ANP, BNP, CNP 蛋白的同源性区域。试验成功克隆了鸡 *Muslin* 基因并注册 GenBank(EF551041)。

关键词: 鸡; *Muslin*; 克隆; 序列分析

中图分类号: S811.3, Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0056-03

cDNA Cloning and Sequence Analysis of Chicken *Muslin*

WANG Wei-jie, GUO Yu-jie, WANG Yue-ying, QIAO Xin-an, YANG Sen,

WANG Yan-ling, YANG Guo-yu

(Lab of Animal Physiology and Biochemistry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The coding sequence of chicken *Muslin* gene was amplified based on the *in silico* sequence information in the present study. Total RNA was extracted from muscle tissue and mRNA sequence of gene was amplified by RT-PCR using designed primers. The PCR products were ligated into the pMD-19T vector, and then transformed into competent cells of *E. coli* DH5 α . The sequence was analyzed to identify the recombinant plasmid. Identity analysis show that the chicken *Muslin* nucleotide sequence share 74%, 73% and 70% and the deduced protein sequence share 58%, 54% and 50% homology with that of human, rat and mouse, respectively. The deduced peptide contained a “KKKR” motif and the region homologous to mouse ANP, BNP, CNP. The chicken *Muslin* gene was successfully cloned in the present study and the sequence has been submitted to GenBank(EF551041).

Key words: Chicken; *Muslin*; cDNA Cloning; Sequence analysis

继脂肪组织和血管的内分泌功能被发现后, 传统的内分泌概念被打破, 推测分泌活性物质的功能是各种组织细胞固有的生物学行为之一。近年来, 许多试验研究表明, 骨骼肌能表达、合成和分泌多种生物信号分子, 包括调节肽、细胞因子和生长因子等, 以旁分泌和/或自分泌方式调节骨骼肌的生长、代谢和运动功能, 甚至以血液循环内分泌的方式调节机体远隔器官组织的功能, 因此提出了“肌肉因子(Myokines)”的概念^[1]。目前已证实骨骼肌分泌的细胞因子有 IL-6, TNF- α , IGF-1, Myostatin 等^[2-5]。

Muslin 是由 Nishizawa H 等^[6]利用信号序列捕集(SST)技术, 在小鼠骨骼肌发现的一种新的活性多

肽。小鼠、大鼠、人 *Muslin* 含有 130~133 个氨基酸残基, 分子量为 11 kDa, 其 N-端含有 30 个左右氨基酸残基的信号肽, 在 G-末端还存在与利钠利尿肽家族高度同源的蛋白质片段及“KKKR”模序的丝氨酸蛋白酶切位点。Northern blotting 结果表明, 小鼠 *Muslin* mRNA 仅特异表达于骨骼肌, mRNA 的表达受机体营养状况及胰岛素等激素水平的调节。Banzet S 等^[7]采用 Real-time PCR 检测了 *Muslin* mRNA 在大鼠骨骼肌中的分布及其与肌纤维类型的关系, 证实 *Muslin* 主要在快缩-糖酵解型(Fast-glycolytic fiber)肌纤维中表达, 且随着纤维类型的转换, 其表达量有所变化。

收稿日期: 2007-03-24

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(0523010500)

作者简介: 王伟杰(1982-)男, 河南伊川人, 硕士, 主要从事动物生物化学研究

通讯作者: 杨国宇(1966-)男, 河南新野人, 副教授, 博士, 主要从事动物生物化学研究。

本试验利用鸡 ESTs 拼接序列设计引物, 通过 RT-PCR 克隆了鸡 *Muslin* 基因, 并将序列提交 GenBank 收录(EF551041)。

1 材料和方法

1.1 酶与试剂

试验所用通用引物、反转录酶、RNA 酶抑制剂、pMD19-T 载体、dNTP-mix、TakaRa Agaose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、TakaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 购于宝生物(大连)有限公司。动物 RNA OUT 购于天泽基因工程有限公司。2×Taq PCR MasterMix(含染料) 购于TIANGEN 公司。

1.2 基因克隆

1.2.1 引物设计与合成 以报道的哺乳动物 *Muslin* 基因序列对鸡 ESTs 库和 UniGene 进行搜索, 利用搜索的 ESTs 拼接序列设计引物, 克隆引物序列为 F1: 5'-GCAGGACCATTAAAGGTTGGGATT-3' (5'-UTR), R1: 5'-CATTGTGAAGAAGATTTTCAGGAG-3' (3'-UTR); 鉴定序列为 F2: 5'-GCAAGATGCTGCAGTCCAGCTTG-3', R2: 5'-CCTGTATGGCATCAATCATTCAG-3'。引物由宝生物(大连)有限公司合成。

1.2.2 肌肉组织中总 RNA 的提取 取 0.1g 鸡肌肉组织, 采用 RNA OUT 提取总 RNA, 溶解于 15 μL DEPC 水中备用。

1.2.3 RT-PCR 扩增 反转录体系: DEPC 水 6 μL, dNTP-mix 4 μL, 5×AMV Buffer 4 μL, oligo d(T) 18(50 pmol) 1 μL, Ribonuclease Inhibitor(40 U/μL) 1 μL, Total RNA 2 μL。RT 反应程序为: 25℃ 10 min, 42℃ 60 min, 72℃ 15 min, 后冰浴 2 min, 得到 cDNA, 以此为模板进行 PCR 扩增目的基因。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 TakaRa Agaose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 进行纯化。

1.2.4 DNA 序列测定 将 PCR 扩增产物纯化后连接到 pMD19-T 载体上, 转化到 CaCl₂法制备的 *E. coli* DH5α 感受态细胞。序列测定由北京三博远志生物技术有限公司测定。

1.3 序列分析

在 NCBI 上运行 blast, ORF Finder, SignalP 及 BioXM 软件分析。

2 RT-PCR 扩增及克隆结果

以鸡肌肉总 RNA 为模板, 利用上下游克隆引物, 采用 RT-PCR 的方法, 扩增得到相应的基因, 琼

脂糖凝胶电泳检测的结果表明, 得到了长度为 591 bp 的目的片段(图 1)。将此 PCR 扩增产物进行回收纯化后, 与 pMD19-T 载体连接, 构建克隆载体。经 CaCl₂法转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5α 感受态细胞后, 进行蓝白斑挑选, 随后用鉴定引物进行初步鉴定, 再经过电泳结果判定含有插入片段的重组子(图 2), 提取质粒进行酶切进行鉴定(图 3)。

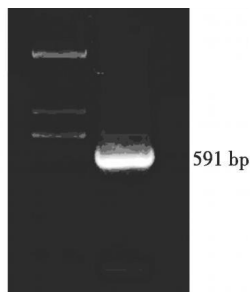


图 1 RT-PCR 扩增片段电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR products

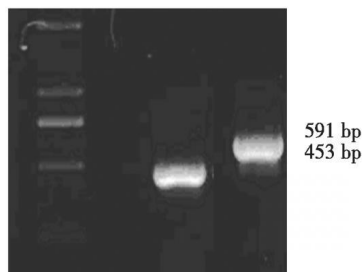


图 2 阳性克隆的 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification of PCR products of positive clones

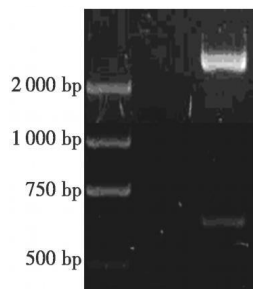


图 3 阳性克隆的限制性酶切图谱

Fig. 3 Identification of the positive clones by restriction enzyme digestion

克隆测序结果(图 4)表明, 克隆的鸡 *Muslin* 基因序列中包含了完整的 ORF, 其 ORF 长度与人基因一致(402 bp), 基因序列与哺乳类人、大鼠、小鼠相比较, 同源性分别为 74%、73% 和 70%。

鸡 *Muslin* 推测编码氨基酸序列长度为 133 aa, SignalP 预测信号肽为 N-端 1~30 aa, 氨基酸序列中含有“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)说明鸡 *Muslin* 结构特征与人、大鼠和小鼠 *Muslin* 相一致(图 5)。氨基酸序列与哺乳类人、大鼠、小鼠的基因相比较, 同源性分别为 58%、54% 和 50%。

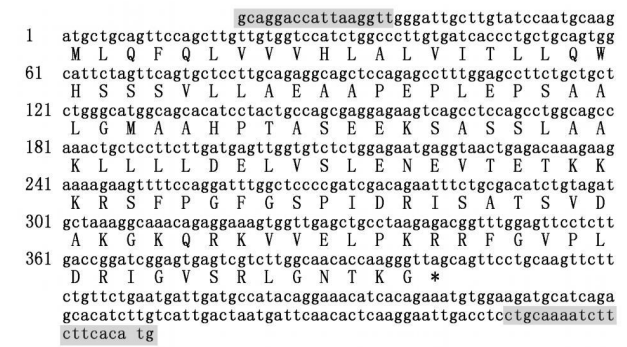


图 4 鸡 *Musclin* 的 cDNA 序列及其推测的氨基酸序列
Fig. 4 Nucleotide sequence and extrapolated amino acid sequences of the chicken *Musclin*

Mouse	MLDWRLASTH	FILAMIVMLW	SGSKAFSDVL	A...SQEFGT	ASLQSPPTAR
Rat	MLDWRLASAH	FLLAMILMLW	SGSKAFSDVL	AS.EASEFGA	ESLQSPPTTR
Human	MLDWRLASAH	FILAVTLTLW	SSGKVLSDVD	TTTEAFDSGV	IDVQSTPTVR
Chicken	MLQFQLVVVH	LALVITLLQW	HSSSVLLAEA	APPEPLEPSA	LGMAAHPTAS

Mouse	EEKSATELSA	KLRLDDLVS	LENDVFETKK	KRSFSGFGSP	LDRLSAGSVE
Rat	EEKSATELAA	KLILLDDLVS	LENDVFETKK	KRSFSGFGSP	LDRLSAGSVE
Human	EEKSATDLTA	KLILLDELVS	LENDVIETKK	KRSFSGFGSP	LDRLSAGSVD
Chicken	EEKSASSLIA	KLILLDELVS	LENEVTETKK	KRSFPGFGSP	IDRISATSV D

Mouse	HRGKQRKAVD	HSKKRFGIPM	DRIGRNRLSS	SRG
Rat	HRGKQRRVVD	HSKKRFGIPM	DRIGRNRLSS	SRG
Human	HKGKQRKVVD	HPKRRFGIPM	DRIGRNRLSN	SRG
Chicken	AKGKQRKVVE	LPKRRFGVPL	DRIGVSR LGN	TKG

图 5 鸡 *Musclin* 氨基酸序列与小鼠、大鼠和人氨基酸序列的比较
Fig. 5 The comparison of *Musclin* amino acid sequences between mouse, rat, human and chicken

3 讨论

随着近年来 ESTs 库更新速度的加快,采用电子延伸结合 RT-PCR 已成为一种对不同物种新基因进行同源克隆的简便、快速方法。本试验利用搜索的 ESTs 拼接序列,在 5'-UTR 和 3'-UTR 设计引物,成功地克隆了包含 ORF 的鸡 *Musclin* 序列。通过与已报道哺乳动物 *Musclin* 基因序列和推测氨基酸序列比较分析,确定了克隆序列的正确性。

在 *Musclin* 发现之前,Thomas G 等^[8]从骨骼组织中获得一活性多肽,并命名为“osteocrin”,推测可能是成骨细胞的一种调节因子。后证实 *Musclin* 与 *osteocrin* 应为同一基因,只是存在时空性表达差异。GeneBank 已登录了 GNOMON 预测的鸡 *osteocrin* 序列(XM-422718),预测序列与本试验克隆的 *Musclin* 序列对比分析发现,两者的终止密码子位点不同,预测序列比本试验克隆的 ORF 多 6 个密码子,究竟是预测序列存在错误还是鸡 *osteocrin* 与 *Musclin* 基因存在差异尚需进一步研究。

有关 *Musclin* 的生物学功能尚不十分清楚。Nishizawa H^[6]研究证实,进食影响 *Musclin* 的表达,禁食 48 h 后,小鼠腓肠肌中 *Musclin* 的 mRNA 表达几乎消失,重新进食后 24 h, mRNA 表达恢复;STZ 诱导的胰岛素缺陷小鼠腓肠肌 *Musclin* 的 mRNA 表达显著降低;在胰岛素抵抗小鼠模型 *Musclin* 的 mRNA 表达均显著升高;离体试验中发现胰岛素和 IGF-1 呈浓度依赖地升高肌细胞 *Musclin* 的 mRNA 表达,而肾上腺素、异丙肾上腺素及 forskolin 则明显降低 *Musclin* 的 mRNA 表达;在 C2C12 细胞, *Musclin* 明显地抑制胰岛素促进的葡萄糖的摄入及糖元的合成。因此, *Musclin* 可能是肌细胞的能量调节因子。PPAR γ 激动剂 Troglitazone 可诱导人肌细胞 *Musclin* 的表达,但其信号传导途径尚不清楚^[9]。

本试验克隆了鸡 *Musclin* 基因,为下一步 *Musclin* 生物学功能的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Pedersen B K, Steensberg 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.

[2] Pedersen B K, Febbraio M. Muscle-derived interleukin-6: a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain[J]. Brain Behav Immun, 2005, 19(5): 371- 376.

[3] Martin C M, Russell J L, Ferdous A, *et al.* Molecular signatures define myogenic stem cell populations[J]. Stem Cell Rev, 2006, 2(1): 37- 42.

[4] McPherron A C, Lawler 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] 张 靓,唐朝枢. 骨骼肌的内分泌功能[J]. 生理科学进展, 2006, 37(3): 193- 198.

[6] Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, *et al.* Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor [J]. J Biol Chem, 2004, 279(19): 19391- 19395.

[7] 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.

[8] Thomas G, Moffatt P, Salois P, *et al.* Osteocrin, a novel bone-specific secreted protein that modulates the osteoblast phenotype[J]. J Biol Chem, 2003, 278(50): 50563- 50571.

[9] Staiger H, Haas C, Machicao F, *et al.* The PPAR γ agonist troglitazone induces musclin mRNA expression in human myotubes[J]. Horm Metab Res, 2006, 38(9): 614- 616.