

徐淮山羊 *H-FABP* 基因克隆、表达产物亚细胞定位的研究及转基因小鼠的制备

阴彦辉¹, 韦光辉¹, 李伟¹, 朱才业¹, 张亚妮¹, 杜立新², 曹文广², 李碧春^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 旨在克隆徐淮山羊心脏型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)基因的 cDNA, 探讨其生物信息学功能。通过 EGFP 融合蛋白对该基因亚细胞水平的表达定位, 探究该基因在异种生物体内表达情况, 探索制备异种转基因动物的可能性。采用反转录 PCR(RT-PCR)方法克隆徐淮山羊 *H-FABP* 基因 cDNA, 进行生物信息学分析, 构建其融合表达载体 pEGFP-H-FABP。脂质体(LTX)介导基因转染山羊成纤维细胞(GEF), 48 h 后进行荧光检测, RT-PCR 检测 mRNA 在细胞内的表达。利用睾丸注射将目的基因转入小鼠体内, 在 DNA 和蛋白水平上检测目的基因的表达情况。结果, 徐淮山羊 *H-FABP* 基因完整编码区(CDS)大小为 402 bp, 编码 133 个氨基酸, GenBank 登录号为 AY466498.1。徐淮山羊 *H-FABP* 序列与人、鸡、褐家鼠、奶牛、野猪、驴及斑马鱼相应编码区同源性为 89%、76%、85%、84%、93%、91%、70%, 氨基酸序列同源性为 90%、79%、88%、97%、95%、94%、72%。成功构建融合表达载体 pEGFP-H-FABP, 目的基因在 mRNA 水平上成功表达。目的蛋白定位于细胞质中, 与在线预测结果相同(无信号肽, 定位于细胞质中)。通过尾静脉注射和睾丸注射, 该基因可以在小鼠体内实现暂态表达和持续性表达。本研究成功克隆了徐淮山羊 *H-FABP* 基因 cDNA, 而且 *H-FABP* 基因在进化过程中是保守的。该蛋白无信号肽, 在单细胞水平上可表达于细胞质中, 在小鼠体内也可以成功表达。

关键词: 徐淮山羊; 心脏型脂肪酸结合蛋白; 真核表达; 荧光蛋白; 转基因鼠

中图分类号: S827; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)05-0684-09

Gene Clone, Subcellular Localization of Expression Products of *H-FABP* and the Preparation of Transgenic Mice in Xuhuai Goat

YIN Yan-hui¹, WEI Guang-hui¹, LI Wei¹, ZHU Cai-ye¹, ZHANG Ya-ni¹,

DU Li-xin², CAO Wen-guang², LI Bi-chun^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Breeding Reproduction and Molecular Design for Jiangsu Province, College of Animal Science & Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The purpose of this study was to clone heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) gene cDNA of Xuhuai goat, and to explore its bioinformatics function and the possibility of preparation of transgenic animals among heterogeneous species. The subcellular location *H-FABP* was detected by EGFP fusion protein and its expression was observed *in vitro*. Reverse transcription PCR (RT-PCR) technology was used to clone the *H-FABP* gene cDNA of Xuhuai goat, its biological information characteristics was analyzed by online software, then the expression vector pEGFP-H-FABP was constructed. The transfection of goat fibroblasts (GEF) was performed by Liposomes (LTX), and fluorescence was observed under inverted microscope after 48 h. The RT-

收稿日期: 2011-06-14

基金项目: 国家转基因重大专项(2008ZX08008-003; 2009ZX08008-003B)

作者简介: 阴彦辉(1985-), 男, 河北保定人, 硕士生, 主要从事动物胚胎工程与遗传工程研究, E-mail: yinjianbin0312@gmail.com

* 通讯作者: 李碧春, E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

PCR was conducted to detect mRNA expression of *H-FABP* in GEF. The pEGFP-H-FABP was injected into mouse testicular and its expression was detected at the level of DNA and protein. The complete CDS size of *H-FABP* was 402 bp, encoding 133 amino acids with GenBank accession number (AY466498.1). The *H-FABP* cDNA coding sequence was compared with the corresponding regions of human, chicken, brown rat, cow, wild boar, donkey and zebra fish, the similarity was 89%, 76%, 85%, 84%, 93%, 91%, 70%, respectively, amino acid sequence homology was 90%, 79%, 88%, 97%, 95%, 94%, 72%, respectively. The signal peptide was not found in H-FABP protein. The RT-PCR results showed the *H-FABP* mRNA expressed successfully *in vitro*. pEGFP-H-FABP was successfully constructed, and *H-FABP* mRNA was expressed. The H-FABP protein was localized in the cytoplasm which was in line with the result of online prediction. The gene can also be expressed in mice transiently and persistently after intravenous and testicular injection. The *H-FABP* gene cDNA of Xuhuai goat was cloned successfully, and it was conservative during the evolutionary process, there was no signal peptide in protein. The H-FABP protein was located in the cytoplasm, and also could be expressed in mice successfully.

Key words: Xuhuai goat; heart-type fatty acid binding protein; eukaryotic expression; fluorescent protein; transgenic mice

脂肪酸结合蛋白(FABPs)是一组多元性的低分子量细胞内蛋白质,分子量约为 12~16 ku。该蛋白家族是 1971 年美国加利福尼亚大学的 Ocker 等在研究大鼠小肠脂肪酸吸收调节时,在肠黏膜发现的^[1-3]。目前共发现 11 种类型的脂肪酸结合蛋白,分别为肝型(L)、肠型(I)、心型(H)、脂肪细胞型(A)、脑型(B)、回肠型(I1)、上皮细胞型(E)、髓磷脂型(My)、睾丸型^[2]以及细胞视黄醇结合蛋白(CRBP)和细胞视黄醇酸结合蛋白(CRABP)。心脏型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)是该蛋白家族中分布广泛且具有较强生物学功能的一类蛋白。其主要参与细胞内脂肪酸的运输,能够与疏水性配体分子发生特异性结合,将脂肪酸从细胞膜上运送到甘油三酯和磷脂合成的位点,是关键的脂肪酸载体蛋白^[4]。在动物水平上,*H-FABP* 基因可作为影响畜禽肌间脂肪含量和肉质性状的候选基因^[5-6]。而肌间脂肪是形成肌肉风味的主要前体物质,与肉质及口感呈正相关,因为它影响肉质的嫩度、风味和多汁性,特别是多汁性。而且该性状具有较高的遗传力,因此可以通过分子水平上的改造进而对动物肉质及风味口感进行改良,在动物改良育种上具有广阔的应用前景。

目前,国内已有牛、猪、驴、人、大鼠、小鼠和鸡的 *H-FABP* 基因 cDNA 被克隆^[7-14],而徐淮山羊中该基因的研究还未见有报道。本试验克隆了徐淮山羊

H-FABP 基因的 cDNA 全序列,进行生物信息学分析,并通过融合蛋白的表达,实现该基因在亚细胞水平上的表达定位,为研究 *H-FABP* 基因的生物学功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

徐淮山羊心脏组织采自江苏省镇江市珥陵山羊屠宰场;*E. coli* DH5 α 菌株、质粒 pEGFP-C1、山羊成纤维细胞由本实验室保存培养。

1.2 主要试剂

First Strand cDNA Synthesis Kit、*Hind* III、*Eco*R I 限制性内切酶、T4 DNA Ligase 均购自 MBI 公司;LA *Taq* DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、pMD19-T 试剂盒、TaKaRa Agrose Gel DNA purification Kit 均购自大连宝生物公司;质粒小提试剂盒(北京鼎国);1 kb DNA Marker、3 000 bp DNA Marker (Genescript);脂质体 LTX(上海禾晟);聚乙酰亚胺(北京鼎国);其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 *H-FABP* 基因克隆及其表达产物亚细胞定位

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中已有的山羊 *H-FABP* 序列(AY466498.1)设计扩增全长 *H-FABP* cDNA 序列的引物,并在上下游引入 *Hind* III 和 *Eco*R I 的酶切位点。引物由上海生工合

成,上游引物 F: 5'-CGAAGCTTATGGTGGACGC-CTTCGT-3',下游引物 R: 5'-CCCGAATTC AAGCT-TTCATGCCTCTTTCTCGTAAG-3'。

1.3.2 *H-FABP* 基因 cDNA 的扩增 用 Trizol 法抽提山羊心脏组织总 RNA。以总 RNA(1 μg)为模板进行反转录。以 F、R 为引物, cDNA 为模板, 扩增全长 *H-FABP* 序列。扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物经胶回收试剂盒纯化回收后与 pMD19-T Vector 连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, LB(Amp⁺) 固体培养基培养 12~16 h。挑选阳性克隆经菌液 PCR、酶切鉴定, 将含正确插入片段的重组质粒命名为 pMD19-T-H-FABP, 送上海生工测序。

1.3.3 *H-FABP* 基因序列测定及分析 用在线工具 BLASTn 对克隆得到的 *H-FABP* 序列编码区与 GenBank 上选择的 7 种动物: 人(NM_004102.3)、鸡(NM_001030889)、褐家鼠(NM_024162.1)、奶牛(NM_174313)、野猪(NM_001099931)、驴(GQ244482.1)及斑马鱼(NM_152961)的相应编码区进行同源性比较, 并根据 cDNA 序列对应的氨基酸序列, 用 DNASTar 软件分析其物种间的遗传进化关系。利用 SignalP 3.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析 H-FABP 蛋白的信号肽区域。

1.3.4 融合表达载体的构建 用 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶双酶切鉴定正确的 pMD19-T-H-FABP, 胶回收目的片段。同时用 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶双酶切 pEGFP-C1, 回收目的载体。T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接, 产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆经菌液 PCR、酶切鉴定, 将含正确插入片段的重组质粒命名为 pEGFP-H-FABP, 送上海生工测序。

1.3.5 *H-FABP* 蛋白的初级结构及其亚细胞定位 利用 ExPASy ProtParam tool(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)和 PSORT II Protein Sorting Prediction 工具(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>)进行 H-FABP 蛋白的初级结构和亚细胞定位预测。

1.3.6 重组质粒 pEGFP-H-FABP 转染山羊成纤维(GEF)细胞 采用脂质体(LTX)介导基因转染 GEF 细胞。试验组: 转染重组质粒 pEGFP-H-FABP; 阴性对照组: 转染空载体质粒 pEGFP-C1。空白对照组: 未转染质粒。转染 24 h 后于荧光倒置

显微镜下观察。

1.3.7 融合表达产物中 *H-FABP* mRNA 的 RT-PCR 检测 转染 48 h 后 Trizol 法抽提细胞总 RNA, 以总 RNA(1 μg)为模板进行反转录, 以 cDNA 为模板, F 和 R 为引物进行 PCR 扩增。同时设阴性和阳性对照, 以 *GAPDH* 为内参对照, 阴性对照模板为 ddH₂O, 阳性对照模板为 PEGFP-H-FABP 质粒。

1.3.8 融合表达产物 Western blot 检测 转染 48 h 后采用细胞裂解法提取细胞总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后进行 Western blot 检测, 采用 EGFP 抗体作为一抗, 稀释倍数为 1:500, 二抗稀释倍数为 1:2000, DAB 显色。以转染重组载体为试验组, 转染空载体为阴性对照组, 未转染质粒的为空白对照组。

1.4 睾丸注射法介导的转基因小鼠的制备

1.4.1 重组质粒转染 NIH-3T3 细胞 用聚乙酰胺(PEI)按 PEI(μL)与 DNA(μg)为 3:1 对重组质粒以及空载体进行包裹, 转染生长良好、汇合度达 80%~90% 时的 NIH-3T3 细胞, 24 h 后在荧光显微镜下观察细胞发光情况。

1.4.2 小鼠尾静脉注射重组质粒 取健康的 6 周龄昆明小鼠 6 只, 其中 3 只作为试验组, 3 只作为对照组。用聚乙酰胺(PEI)按 PEI(μL)与 DNA(μg)为 3:1 对重组质粒 pEGFP-H-FABP 进行包裹, 尾静脉注射小鼠, 质粒浓度为 0.12 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 注射剂量为 100 μL 。试验组与对照组小鼠在相同且适宜的条件下进行饲养。

1.4.3 目的基因表达的检测 小鼠尾静脉注射重组质粒 pEGFP-H-FABP 48 h 后, 将试验组和对照组小鼠托颈椎处死, 采集心脏、肝脏、肾脏、睾丸和肌肉样品进行冰冻切片, 荧光显微镜下观察目的基因的暂态表达情况。

1.4.4 小鼠睾丸注射重组质粒 取健康的 6 周龄雄性昆明小鼠 4 只, 用聚乙酰胺(PEI)按 PEI(μL)与 DNA(μg)为 3:1 对重组质粒 pEGFP-H-FABP 进行包裹, 睾丸注射小鼠, 质粒浓度为 0.12 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 单侧睾丸注射剂量为 50 μL , 双侧注射。

将处理过的小鼠单独饲养 5 d 后, 每只公鼠分别与 3 只成年健康空怀母鼠同笼; 见母鼠阴道栓者, 分笼继续饲养, 待母鼠产下 F₁ 代个体后检测子代。

1.4.5 转染效果检测 睾丸注射后 20 d, 取公鼠单侧附睾, 剪碎, 加入 1 mL PBS, 室温放置 10 min, 使

其中的精子游离出来;吸取 10 μ L 涂片,自然风干;荧光显微镜下观察精子绿色荧光蛋白的表达情况。

将剩余组织过滤,收集精液,离心,提取精子 DNA,做 PCR 检测。

1.4.6 目的基因在 F₁ 代中的表达检测 将存活的 15 只 F₁ 代个体用颈椎脱臼法处死,与其同时将出生的未注射质粒的小鼠子代作为对照组一并处死,采集心脏。一部分提取组织 DNA,一部分提取组织蛋白。

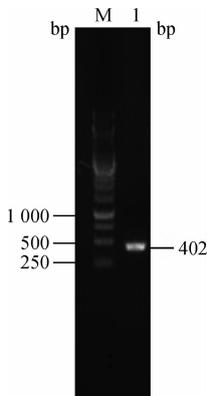
以试验组和对照组小鼠心脏 DNA 为模板,用融合基因(GFP-H-FABP)的特异引物(F_{GFP-H-FABP}: 5'-CCTGAAGTTCATCTGCACCA-3', R_{GFP-H-FABP}: 5'-TCATGCCTCTTTCTCGTAAG-3')进行 PCR 扩增,将扩增产物做琼脂糖凝胶电泳检测。

将试验组和对照组小鼠心脏组织蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后进行 Western blot 检测,采用 EGFP 抗体作为一抗,稀释倍数为 1:500,二抗稀释倍数为 1:2 000。采用 5% 脱脂奶粉封闭, DAB 显色。

2 结果

2.1 *H-FABP* 基因的克隆

提取徐淮山羊心肌组织总 RNA 进行反转录,再以反转录得到的 cDNA 为模板,PCR 扩增出大小为 400 bp 左右的片段(图 1),结果与预期相符。测序结果显示第 383 位碱基发生突变(C→T),但属于同义突变。将测序结果递交至 GenBank,得到登录号 HQ895788。



M. DNA 相对分子质量标准; 1. 目的基因 cDNA 的 PCR 扩增结果

M. 1 kb DNA marker; 1. PCR amplification of target gene cDNA

图 1 *H-FABP* 基因 cDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of *H-FABP* cDNA

2.2 *H-FABP* 基因生物信息学分析

使用 DNASTar 软件对测序结果进行分析,结果表明该基因完整编码区(CDS)长 402 bp,包括起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG,编码 133 个氨基酸。

根据 GenBank 上报道的该基因 cDNA 序列与氨基酸序列将徐淮山羊 *H-FABP* 基因与人、鸡、褐家鼠、奶牛、野猪、驴及斑马鱼进行同源性比较。可知该基因在不同的物种之间具有较高的保守性(表 1)。

表 1 *H-FABP* 基因在徐淮山羊与其他特种之间的同源性对比

Table 1 The similarity of CDS and amino acid of *H-FABP* between Xuhuai goat and other species

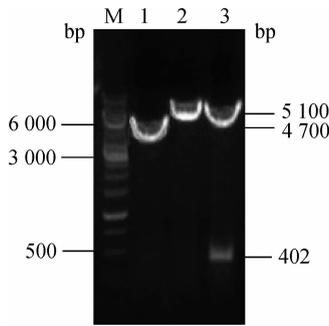
| 特种 Species | 徐淮山羊 Xuhuai goat | | |
|----------------|------------------|--------------|----------------|
| | CDS/% | Amino acid/% | GenBank |
| 人 Human | 89 | 90 | (NM_0041023) |
| 鸡 Chicken | 76 | 79 | (NM_001030889) |
| 褐家鼠 Brown rat | 85 | 88 | (NM_024162.1) |
| 奶牛 Cow | 84 | 97 | (NM_174313) |
| 野猪 Wild boar | 93 | 95 | (NM_001099931) |
| 驴 Donkey | 91 | 94 | (GQ2444821) |
| 斑马鱼 Zebra fish | 70 | 72 | (NM_152961) |

2.3 融合表达载体 pEGFP-H-FABP 的鉴定

PCR 产物与 pMD19-T 连接得到质粒命名为 pED19-T-H-FABP。将 pEGFP-H-FABP 分别进行菌液 PCR 和酶切鉴定(图 2)。PCR 检测扩增片段为 402 bp。用限制性内切酶 *EcoR* I 进行单酶切鉴定,用 *Hind* III 和 *EcoR* I 进行双酶切鉴定,结果显示单酶切在 5.1 kb 左右有明显条带,双酶切在 4.7 kb 和 402 bp 处有清晰条带,与预期结果相符,说明 pEGFP-H-FABP 构建正确。

2.4 *H-FABP* 蛋白的初级结构及亚细胞定位

信号肽区域预测结果表明 *H-FABP* 蛋白无信号肽序列,*H-FABP* 蛋白是一种非分泌型蛋白。初级结构分析表明,该蛋白分子量为 14.76 ku,理论等电点为 6.369。亚细胞定位分析表明该蛋白在细胞质中表达(表 2)。



M. DNA 相对分子质量标准;1. pEGFP-H-FABP 质粒;
2. 单酶切结果;3. 双酶切结果

M. 1 kb DNA marker;1. pEGFP-H-FABP plasmid; 2.
Single enzyme digestion result; 3. The double enzyme
digestion result

图 2 pEGFP-H-FABP 质粒酶切鉴定结果

Fig. 2 Restriction enzyme digestion results of pEGFP-H-FABP plasmid

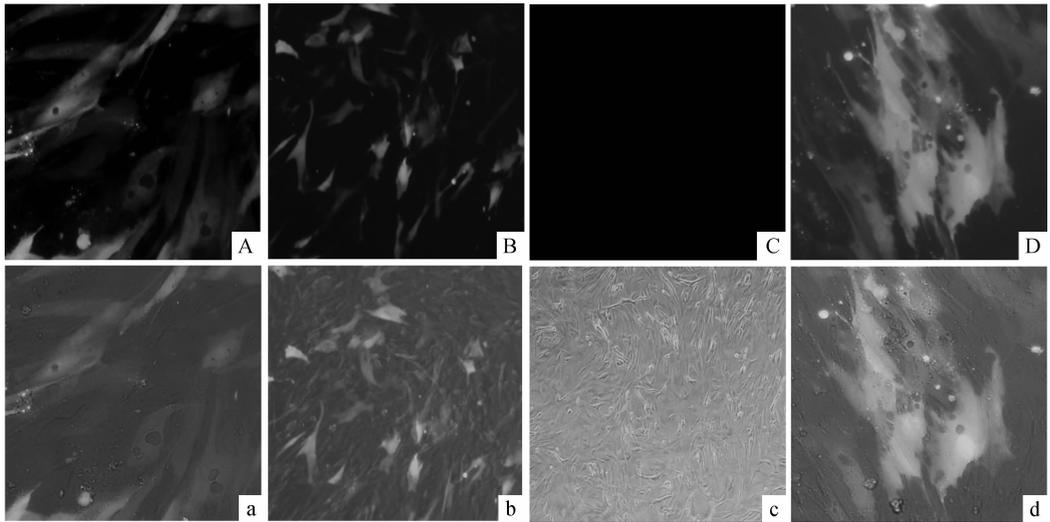
表 2 H-FABP 蛋白亚细胞定位分析结果

Table 2 Analysis result of H-FABP protein subcellular localization

| 项目 Item | 概率/% Probability |
|--------------------|------------------|
| 细胞质 Cytoplasmic | 78.3 |
| 细胞核 Nuclear | 17.4 |
| 过氧化物酶体 Peroxisomal | 4.3 |

2.5 重组质粒 pEGFP-H-FABP 转染山羊成纤维细胞 (GEF) 的检测

重组质粒 pEGFP-H-FABP 转染山羊成纤维细胞 24 h 后于荧光倒置显微镜下观察, 转染 pEGFP-H-FABP 的 GEF 可以观察到绿色荧光, 部分分布于整个细胞, 部分只位于细胞质中(图 3A, a); 转染空载体的细胞, 绿色荧光分布于整个细胞(图 3B, b); 未转染质粒的细胞无荧光(图 3C, c), 转染 pEGFP-H-FABP 质粒的细胞经 G418 筛选 14 d 后与细胞转染 24 h 后结果无显著差异(图 3D, d)。



A, a. EGFP-H-FABP 融合蛋白在羊成纤维细胞细胞质以及整个细胞表达; B, b. EGFP 荧光蛋白在羊成纤维细胞的细胞质和细胞核部分均有表达; C, c. 无荧光蛋白表达的羊成纤维细胞; D, d. EGFP-H-FABP 融合蛋白经 G418 筛选 14 d 后的表达情况

A, a. EGFP-H-FABP fusion protein expressed in the cytoplasm and the whole cells; B, b. EGFP fluorescent protein expressed in both cytoplasmic and nuclear in goat fibroblasts; C, c. The non-fluorescent protein expressed in goat fibroblasts; D, d. EGFP-H-FABP fusion protein expressed in goat fibroblasts after 14 days screened by G418

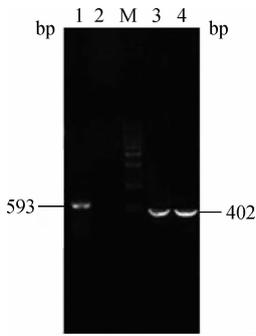
图 3 转染 pEGFP-H-FABP、pEGFP-C1 和未转染质粒的羊成纤维细胞在 24 h 后明、暗场下的图片 (40×)

Fig. 3 Image of goat fibroblasts under light and dark field 24 h after transfection of pEGFP-H-FABP, pEGFP-C1 and non-transfected (40×)

2.6 H-FABP 基因和蛋白的表达检测

转染 48 h 后提取细胞总 RNA 进行 RT-PCR, 扩增产物利用凝胶电泳分析(图 4), 结果显示试验组和阳性对照用 H-FABP 基因引物扩增出 402 bp

的特异性条带, 阴性对照无特异性条带, GAPDH 内参对照用内参引物扩增出 593 bp 条带。表明 EGFP-H-FABP 融合基因转染羊成纤维细胞后发生基因转录。



1. *GAPDH*; 2. 阴性对照; 3. 阳性对照; 4. 试验组; M. DNA 相对分子质量标准

1. *GAPDH*; 2. Negative control; 3. Positive control; 4. The experimental group; M. Marker

图 4 转染重组质粒 48 h 后提取细胞总 RNA 的 RT-PCR 结果

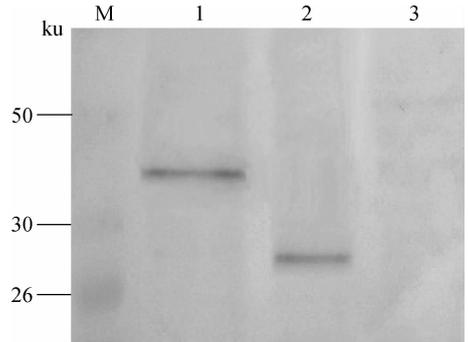
Fig. 4 RT-PCR result of total cellular RNA 48 h after plasmid transfected

转染 48 h 后提取细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳检测,并进一步做 Western blot 检测(图 5)。设转染重组质粒,转染空载体质粒和未转染质粒 3 组。由于目的蛋白(14.76 ku)与 EGFP 蛋白(27 ku)发生融合表达,因此可以采用 GFP 抗体进行检测。结果显示,转染重组质粒试验组在 42 ku 处有条带,转染空载体试验组在 27 ku 处有条带,未转染质粒试验组无条带。

2.7 重组质粒转染小鼠成纤维细胞(NIH-3T3)的检测

重组质粒 pEGFP-H-FABP 转染小鼠成纤维细

胞 24 h 后于荧光倒置显微镜下观察,转染 pEGFP-H-FABP 的 NIH-3T3 可以观察到绿色荧光,部分分布于整个细胞,部分只位于细胞质中;绿色荧光分布于转染 pEGFP 空载体的整个细胞;未转染质粒的细胞无荧光。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 转染重组质粒; 2. 转染空载体; 3. 未转染质粒

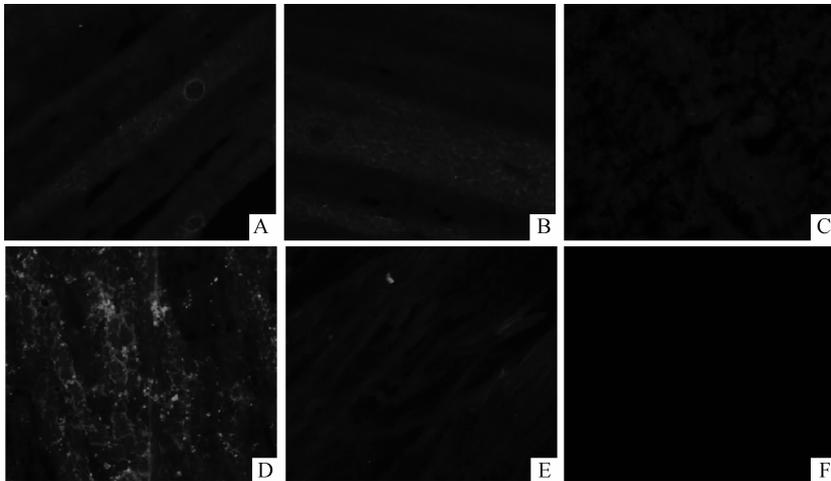
M. Prestained protein marker; 1. Transfection of recombinant plasmid; 2. Transfection with empty vector; 3. Transfection without vector

图 5 转染细胞蛋白 Western blot 检测

Fig. 5 Detection transfected cells protein by western blot

2.8 尾静脉注射小鼠冰冻组织切片及精子涂片荧光检测

小鼠尾静脉注射 48 h 后颈椎脱臼处死,采集心脏、肝脏、肾脏、睾丸和肌肉样品进行冰冻切片,荧光显微镜下发现目的基因在以上组织中均有不同程度的表达(图 6)。



A. 心脏; B. 肝脏; C. 肾脏; D. 睾丸; E. 肌肉; F. 阴性对照

A. Heart; B. Liver; C. Kidney; D. Testicular; E. Muscle; F. Negative control

图 6 尾静脉注射小鼠 48 h 后组织冰冻切片荧光检测(100×)

Fig. 6 Fluorescence detection of frozen section of mice tissue 48 h after the intravenous injection(100×)

睾丸注射 20 d 后,取小鼠精子涂片,在荧光显微镜下观察,结果显示试验组小鼠精子部分头部发光,未注射的对照组小鼠无荧光。

2.9 精子 DNA 检测

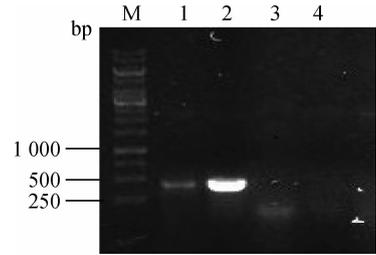
提取试验组和对照组小鼠精子 DNA,以其为模板,利用 *H-FABP* 特异性引物扩增。琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示试验组和阳性对照组在 402 bp 处有明显条带,阴性对照组和空白对照组无条带(图 7)。

2.10 F₁ 代小鼠心脏组织 DNA 检测和蛋白的 Western blot 检测

提取试验组和对照组小鼠 F₁ 代个体心脏组织 DNA,以其为模板,利用 EGFP-*H-FABP* 特异性引物扩增。琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 15 只试验组子一代中有 9 只呈阳性,在 402 bp 处有明显条带,阴性对照组和空白对照组无条带(图 8)。

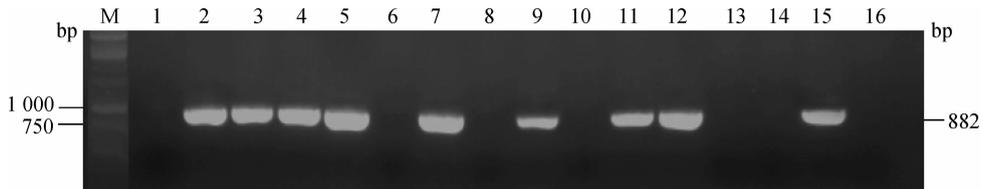
提取试验组和对照组小鼠 F₁ 代个体心脏组织蛋

白,以 EGFP 蛋白抗体作为一抗进行 Western blot 检测,结果显示,经 DNA 检测得到的 9 只阳性个体中有 7 只呈阳性,条带大小为 42 ku(图 9)。



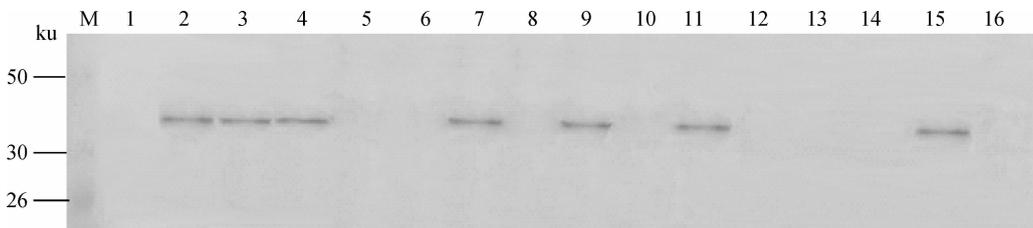
M. DNA 相对分子质量标准;1. 试验组;2. 阳性对照;3. 阴性对照;4. 空白对照
M. 1 kb marker; 1. Experimental group; 2. Positive control; 3. Negative control; 4. Blank control

图 7 小鼠精子 DNA PCR 扩增结果
Fig. 7 PCR amplification of sperm DNA



M. DNA 相对分子质量标准;1. 阴性对照;6、8、10、13、14、16. 空白对照组;2~5、7、9、11、12、15. 试验组
M. 1 kb marker; 1. Negative control; 6、8、10、13、14、16. Blank control; 2-5、7、9、11、12、15. Experimental groups

图 8 F₁ 代小鼠心脏组织 DNA PCR 检测
Fig. 8 DNA PCR detection of heart tissue in F₁ generation



M. DNA 相对分子质量标准;1. 阴性对照;2~16. 试验组存活下来的 15 只 F₁ 代个体;2~4、7、9、11、15. 经过检测呈阳性的个体
M. DL2000 marker; 1. Negative control; 2-16. The survival 15 F₁ individuals in experimental group. 2-4、7、9、11、15. The positive individuals

图 9 F₁ 代小鼠心脏组织 DNA PCR 检测
Fig. 9 DNA PCR detection of heart tissue in F₁ generation

3 讨论

相关研究表明,不同物种的 *H-FABP* 存在较高的同源性:牛与羊、猪、马、人、鼠、鸡等的基因序列的同源性在 76.6%~96.8% 之间^[7]。本试验从徐淮

山羊心脏组织中克隆出山羊 *H-FABP* 基因 cDNA 全序列,全长 402 bp。与 GenBank 中人、鸡、褐家鼠、奶牛,野猪、驴及斑马鱼的基因序列同源性为 70%~93%^[15-18],氨基酸的同源性为 72%~97%,除了亲缘关系较远的鸟类和鱼类之外,其余物种间

氨基酸序列同源性都在 85% 以上。这充分说明,反映在蛋白质水平的核苷酸突变多属同义突变,表明该基因在物种间有很高的保守性,也显示出 *H-FABP* 基因在生物遗传过程中对于维护机体正常生理功能具有重要的意义。

H-FABP 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成^[3]。该蛋白的主要功能是参与体内脂肪酸代谢,它与脂肪酸结合后,将脂肪酸从细胞膜上运到脂肪酸被氧化和磷脂及甘油三酯的合成位置,从而进入线粒体的能量代谢体系之中,使脂肪酸在此氧化分解并最终生成三磷酸腺苷(ATP),为心脏和其他肌肉组织收缩提供能量^[19]。它在体脂含量,特别是肌间脂肪含量调节方面起着重要作用。有研究表明,心型脂肪酸结合蛋白表达量与肌间脂肪含量呈正相关,该蛋白的高效表达可以明显提高机体对于脂肪酸的利用率^[20]。

转基因育种是近些年逐步形成和完善的一种新型育种方法,与传统的育种方法相比,该方法时间短,效率高,针对性强,可以同时改良若干个不同性状。因此,利用分子生物学手段和转基因育种方法将外源性 *H-FABP* 基因导入家畜体内,具有广泛的应用前景。

目前,国内关于徐淮山羊 *H-FABP* 基因的研究大部分停留在该基因多态性及 mRNA 表达水平上,其细胞水平上的研究尚属空白。*H-FABP* 蛋白表达的组织特异性不明显,生理功能尚不完全清楚。本研究以徐淮山羊胎儿成纤维细胞为宿主细胞,转染带有目的基因和增强型荧光蛋白基因的重组质粒,以此来研究目的基因在细胞中的定位,并在 mRNA 水平上分析其初步表达,结果发现大部分细胞中融合蛋白只在细胞质中表达,少量在细胞质和细胞核中都有表达。这与细胞定位软件预测的结果(只在细胞质中表达)不一致,笔者认为,由于 EGFP 蛋白和 *H-FABP* 蛋白发生融合表达,且无论从基因片段大小(*EGFP* 为 72 bp, *H-FABP* 为 402 bp)还是从表达的蛋白大小(*EGFP* 为 27 ku, *H-FABP* 为 14.76 ku)来说,EGFP 均占据优势。相关研究也表明,某些因素可以影响蛋白正常定位,例如蛋白表达系统、标签蛋白(GFP、EGFP 等)、紫外照射及热应激等。标签蛋白的表达量过高会影响目的蛋白的正常定位。由于 EGFP 蛋白在细胞质和细胞核中均有表达,而且属于加强型绿色荧光蛋白,笔者推测可能是标签蛋白对目的蛋白的表达产生了影响。采用

Western blot 进行进一步检测,并采用未转染质粒的细胞作为空白对照。结果显示重组载体只有 42 ku 一条带,空载体对照组条带大小为 27 ku,空白对照组无条带,这就说明确实是由于标签蛋白的表达影响了目的蛋白的正常定位。除此之外,本研究还对转染重组载体的细胞进行 G418 筛选,14 d 后仍有大量细胞发光,Western blot 检测结果显示仍有大量融合蛋白表达。这说明重组载体成功整合到细胞基因组中并可以进行持续性表达,这为转基因动物的研究奠定了基础。

蛋白的生物学功能与其表达部位关系密切,因此 *H-FABP* 蛋白在细胞质中表达便于结合和转运长链脂肪酸,进而调节脂肪酸对各种代谢酶、受体和细胞内信号传导、基因表达的影响。保护细胞膜不受高浓度游离脂肪酸及其 CoA 衍生物的影响,因为在高浓度条件下,脂肪酸很容易改变脂蛋白细胞膜的功能和活性。对于 *H-FABP* 表达组织中的脂肪沉积及脂肪相关功能的发挥具有重要的意义。

通过尾静脉和睾丸注射小鼠^[21-25],使徐淮山羊 *H-FABP* 基因分别实现了暂态表达和稳定整合表达。本研究在 F₁ 代小鼠 DNA 水平检测时,针对融合基因设计特异引物进行序列扩增,由于 *EGFP* 基因是小鼠本身不存在的,这样检测出的阳性个体就可以排除内源性 *H-FABP* 基因的干扰,同样利用 Western blot 检测子代目的蛋白表达情况时,未采用山羊 *H-FABP* 抗体而是 EGFP 抗体。主要原因在于小鼠与徐淮山羊 *H-FABP* 基因序列同源性为 85%,但是大小相同。抗体表面存在不同种类和数量的抗原决定簇,抗体正是靠抗原决定簇来识别相应抗原。小鼠本身也表达 *H-FABP* 蛋白,虽然同源性不是很高(88%),但是不排除抗原决定簇相同或者存在较高的同源性。而 EGFP 蛋白则是小鼠本身不表达的,采用 EGFP 抗体可以有效的消除内源性蛋白给试验结果带来的干扰,保证了试验结果的可靠性^[26]。

4 结 论

本研究克隆了徐淮山羊 *H-FABP* 基因 cDNA 序列,同时对该基因进行生物信息学分析,实现了该基因的体外重组表达,初步探索 *H-FABP* 基因在山羊胎儿成纤维细胞中的表达定位,为进一步研究该基因在脂肪细胞分化及脂肪代谢过程中的调控方式和生物学功能研究奠定基础,也为羊肉肉质性状

的选育和生产提供分子生物学基础。将外源基因导入小鼠体内,制备出转基因鼠,这为近缘家畜间转基因改良畜种,提高畜产品品质提供了新思路。

参考文献:

- [1] 范树虹,杨曙光.心肌型脂肪酸结合蛋白的临床应用进展[J].心血管病学进展,2011,32(2):281-284.
- [2] 蒋金津,陈立祥,邹增丁.脂肪酸结合蛋白的研究进展[J].畜牧与饲料科学,2009,30(2):6-8.
- [3] 韩新燕,汪以真,许梓荣.脂肪酸结合蛋白的研究进展[J].生物学通报,2000,35(11):7-9.
- [4] 韦吉春,徐亚欧,毛亮,等.藏绵羊脂肪酸结合蛋白(H-FABP)基因的克隆及序列分析[J].西南民族大学学报,2010,32(1):214-219.
- [5] 张淑华,王丽萍,侯巍.心肌型脂肪酸结合蛋白的研究进展[J].中国实验诊断学,2005,9(1):152-154.
- [6] 郝称莉,李齐发,乔永,等.湖羊肌肉组织 H-FABP 和 H-FABP γ 基因表达水平与肌肉脂肪含量的相关研究[J].中国农业科学,2008,41(11):3776-3783.
- [7] 李雷,孙玉江,柳林,等.德州驴心脏脂肪酸结合蛋白 H-FABP 基因的克隆及序列分析[J].中国畜牧兽医,2010,37(3):131-136.
- [8] 徐力致,李励芸,齐秋锋,等.小鼠 FABP3 基因全长 cDNA 的克隆、真核表达载体的构建及其在 COS-7 细胞中的表达[J].解放军医学杂志,2010,35(5):537-539.
- [9] 李兴芳,柏学进,董懿为,等.布莱凯特牛心脏脂肪酸结合蛋白基因的序列测定及分析展[J].中国畜牧兽医,2010,37(9):112-118.
- [10] 杨文平,李超,张红梅,等.猪 H-FABP 基因内含子 3 多态片段的序列分析[J].安徽农业科学,2009,37(9):3972-3973.
- [11] 钟金城,马志杰,陈智华,等.牦牛心脏脂肪酸结合蛋白 H-FABP 基因的克隆及序列分析[J].中国农业科学,2006,39(8):1639-1650.
- [12] 王启贵,李宁,吴常信,等.鸡脂肪酸结合蛋白基因的克隆和测序分析[J].遗传学报,2002,29:115-118.
- [13] 马志杰,钟金城.牦牛心脏脂肪酸结合蛋白基因分子克隆和进化分析[J].四川畜牧兽医学报,2007,38(1):14-19.
- [14] 王阳,冉雪琴,王嘉福,等.糯谷猪解耦联蛋白 3 和心脏型脂肪酸结合蛋白在骨骼肌中的表达和定位[J].中山大学学报,2011,50(1):99-103.
- [15] 叶满红.鸡脂肪酸结合蛋白基因的克隆及其与肌肉脂肪含量关系的研究[D].北京:中国农业科学院,2003.
- [16] 乔海云.滩羊 H-FABP 基因和 ADD1 基因遗传多态性及其与肌肉脂肪含量的关联分析[M].北京:中国农业科学院,2009.
- [17] 黄大鹏,黄玉兰,陈建华.三江白猪心脏脂肪酸结合蛋白(H-FABP)基因多态性及多态片段的序列分析[J].中国兽医学报,2008,23(3):336-342.
- [18] GERBENS F, VERBURG F J, VAN MOERKERK H T, et al. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs[J]. J Anim Sci, 2001, 79(2): 347-354.
- [19] CHMURZYNSKA A. The multigene family of fatty acid binding proteins(FABPs): function, structure and polymorphism[J]. Appl Genet, 2006, 47(1): 39-48.
- [20] 李文娟,李宏宾,文杰,等.鸡 H-FABP 和 A-FABP 基因表达与肌肉脂肪含量相关研究[J].畜牧兽医学报,2006,37:417-423.
- [21] 袁进,安靓,顾为望,等.睾丸内注射和体内电穿孔法建立转基因小鼠的实验研究[J].南方医科大学学报,2006,27(2):168-171.
- [22] 谢畅,于明举,惠楠,等.通过睾丸内注射转染外源 DNA 在小鼠精子的表达[J].动物学杂志,2010,45(2):151-157.
- [23] 刘羞菲.脂质体包裹质粒直接打点注射睾丸和卵巢生产转基因小鼠的研究[M].雅安:四川农业大学,2008.
- [24] 王杰.脂质体介导质粒 pEGFP-N1 转染对小鼠睾丸生精功能的影响[M].汕头:汕头大学,2006.
- [25] 丁晓麟,张寒莹,王锋,等.睾丸网注射法建立转基因小鼠[J].中国男科学杂志,2008,22(7):5-8.
- [26] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M].黄培堂等译.第3版.北京:科学出版社,2002.

(编辑 郭云雁)