

绵羊 CS-1 基因的克隆及在凉山半细毛羊不同组织中的表达

苏强强, 吴登俊*

(四川农业大学动物科技学院 动物遗传育种研究所, 雅安 625014)

摘要: 旨在研究绵羊 CS-1 基因序列及其蛋白质的结构与功能以及其在不同组织中的表达情况, 进而预测其与肉质性状的关联性。Calsarcins (Calcineurin-associated sarcomeric protein, CS) 家族是一个与钙调神经磷酸酶 (Calcineurin, CaN) 相结合的肌纤维特异表达蛋白新成员, CS-1 基因是与畜禽肉质性状密切相关的重要候选基因。本研究根据牛、人和鼠 CS-1 基因 mRNA, 应用比较基因组学技术成功克隆了绵羊 CS-1 基因全长 cDNA, 对序列及编码的氨基酸进行生物信息学分析。结果显示, 该基因 cDNA 全长 951 bp, 完整的开放阅读框 (ORF) 为 79~872 bp, 编码 264 个氨基酸。氨基酸序列中存在 3 个保守结构域, 蛋白质二级结构以无规卷曲和 α -螺旋为主, 富含疏水区, 存在多个磷酸化位点和 1 个蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 的磷酸化位点。通过实时荧光定量 RT-PCR 技术分析 CS-1 基因在凉山半细毛羊部分组织中的表达情况。结果表明: CS-1 基因主要在凉山半细毛羊的心脏和背肌中表达, 15 d 在心脏的表达量最高, 极显著高于其它各组织 ($P < 0.01$); 在心脏和背肌中, CS-1 基因的表达量随着年龄的增长而减少, 其中在 60 d 时心脏中的表达量最高。研究结果为绵羊的肉质性状改善提供科学依据。

关键词: CS-1 基因; cDNA 克隆; 组织表达; 绵羊

中图分类号: S826.92; Q786

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)11-1532-05

Cloning of CS-1 in Ovine and Tissue Expression in Liangshan Semi-fine Sheep

SU Qiang-qiang, WU Deng-jun*

(Research Institute of Animal Genetics and Breeding, College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate CS-1 gene sequences, protein structure, function and its expression in different tissues, so as to predict its association with meat quality traits. Calsarcins (Calcineurin-associated sarcomeric protein, CS) is a family of calcium-binding proteins, CS-1 gene is closely related with meat quality in livestock and poultry. Based on the bovine, *Mus musculus* and *Homo sapiens* CS-1 mRNA sequences, the cDNA of CS-1 gene in ovine was amplified successfully by using comparative genomics technology. The results showed that CS-1 of ovine was 951 bp in length with an open reading frame (ORF) 793 bp in length and encoded 264 amino acids, and there were three conserved domains in amino acids sequences. Bioinformation analysis indicated that its secondary structures mainly were random coil and helical regions, and contained rich hydrophobic regions, certain phosphorylation sites and protein kinase C (PKC) sites. Meanwhile, tissue expression of the CS-1 gene in the Semi-fine wool sheep were analyzed, the results showed that it was expressed in heart and muscle. When the Semi-fine Wool sheep was at fifteen days old, the expression was the highest in heart, and there was a significant difference between heart and other tissues ($P < 0.01$). Furthermore, the expression of CS-1 decreased with the rise of the age and became the highest when the Semi-fine Wool sheep was at sixty days

收稿日期: 2010-12-21

作者简介: 苏强强 (1985-), 男, 安徽淮北人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: suqiangqiang1@sina.com

* 通讯作者: 吴登俊, E-mail: wdj@cnzx.info

old in heart. This result could provide scientific basis for improve meat quality traits.

Key words: CS-1 gene; cDNA clone; tissue expression; ovine

羊肉的是人类蛋白质的主要来源之一,其组成单位是肌纤维,与肉质性状存在相关性。尤其是其使用品质直接受肌肉组织学特性的影响。肌纤维分为慢肌纤维(红肌纤维)和快肌纤维(白肌纤维) II a、II b 及 II x 型。肌肉中红肌纤维(慢反应纤维)所占比例越大,白肌纤维(快反应纤维)所占比例越小,肌肉品质相对就越好^[1-2]。在分子水平上研究肌纤维的特异性,有助于阐明羊慢肌纤维和快肌纤维形成与转化的机理,为羊肌肉品质的遗传改良提供理论依据。

Calsarcins (Calcineurin-associated sarcomeric protein, CS) 家族是一个与钙调神经磷酸酶 (Calcineurin, CaN) 相结合的肌纤维特异表达蛋白新成员,现已发现 Calsarcins 包含有 Calsarcin-1 (又名 MYOZ2、C4orf5、CS-1)、Calsarcin-2 (又名 MYOZ1、FATZ^[3]、CS-2) 和 Calsarcin-3^[4] (又名 MYOZ3、CS-3)。CS-1 基因主要在心肌和骨骼肌慢肌纤维中特异表达,而 CS-2 和 CS-3 只在骨骼肌快肌纤维中特异表达^[5-6]。研究表明 CS 家族不仅是 Z 线组成的结构蛋白,而且在信号转导和调节酶活性中也具有重要作用,它不仅在成熟的心肌和骨骼肌细胞中表达,同时也在胚胎发育和分化过程中的其它组织中有表达^[7]。通过对 CS-1 基因敲除小鼠的研究发现,CS-1 能够抑制 CaN 的活性,当肌肉细胞缺乏 CS-1 基因时, CaN 的信号通路增强,慢肌纤维数量明显增加,引发肌肉肥大症状等一系列相关基因的表达上调,但没有明显的心肌肥大症状^[8]。

CS 家族对骨骼肌 Z 线的形成和信号通路的调控具有重要意义^[9],同时其可以同该调节酶催化的亚单位相互作用,诱导细胞内信号传导,调节快慢骨骼肌纤维之间的转化^[5]。然而在羊上,研究比较少,甚至序列还尚未存在。本试验主要运用比较基因组学,从羊的肌肉组织中克隆 CS-1 序列并测序,同时,利用 RT-PCR 技术检测 CS-1 基因在凉山半细毛羊不同年龄、不同组织中的表达情况,为进一步研究该基因的结构与功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

在凉山州布拖县梁山半细毛羊核心育种场采集

成年绵羊的背肌、心脏样,置于液氮中冻存,用于克隆 CS-1 基因。RT-PCR 定量分析的样品是在大群体中随机选择健康的 15、60、105、160、195 和 240 d 凉山半细毛羊各 3 只屠宰,在屠宰过程中,立即采取心脏、背肌、肝脏、大脑 4 个组织样置于液氮中保存。所采取的样品带回实验室后于 -80 °C 冰箱保存,用于后续试验。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

取 100 mg 组织样在液氮中研磨之后,采用 Trizol 法提取总 RNA。按照 Reverse Transcriptase M-MLV 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行反转录反应,反应体系总体积为 20 μ L,包括 5 \times ExScript TM Buffer 4 μ L, dNTP Mixture 1 μ L, Oligo dT Primer 1 μ L, RTase M-MLV 0.5 μ L, RNase Inhibitor 0.5 μ L, Total RNA 4 μ L, RNase Free dH₂O 9 μ L。反转录条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。

1.2.2 PCR 扩增 参考牛和小鼠的 CS-1 基因序列 (GenBank 登陆号分别为 NM_001015676 和 AY013296), 用软件 Primer Premier 5.0 在保守区设计 1 对引物 (引物名 P1, 引物信息见表 1), 以 cDNA 第一链为模板进行 PCR, 反应体系总体积为 50 μ L, 包括引物各 1.5 μ L, 模板 2.5 μ L, Master-Mix 25 μ L, ddH₂O 19.5 μ L。PCR 条件为: 94 °C 30 s, 56 °C 45 s, 72 °C 60 s, 38 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 对目的条带进行回收克隆测序并分析。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

根据 PCR 扩增得到的 cDNA 全序列设计 1 对 CS-1 荧光定量引物 (引物 P2, 引物信息见表 1) 和 1 对内参基因 GAPDH 引物 (引物名 P3, 引物信息见表 1), 荧光定量 PCR 采用 25 μ L 反应体系: 包括第一链 cDNA 1 μ L, SYBR[®] Rremix Ex Taq[™] (TaKaRa 公司) 12.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, ddH₂O 10.5 μ L, 使用伯乐 iq5 荧光定量 PCR 仪进行定量分析。每个样品 CS-1 的表达均以 GAPDH 为对照, 优化处理后 CS-1 基因的最佳反应条件为: 95 °C 预变性 10 s; 95 °C 变性 10 s, 56 °C 退火 30 s, 40 个循环。扩增完成后, 启动溶解曲线测试程序, 以此判断扩增过程特异性。PCR 过程中, 用 1 μ L 灭菌水代替 cDNA 样品作为

阴性对照。每个样品检测做 3 管平行试验。同时,将 cDNA 用 EASY Dilution(TaKaRa 公司)依次稀释成 $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^{-9}$ 10 个浓度(10 倍梯度),反应条件

同上,制作标准曲线,得到斜率和扩增效率。根据系统自动分析荧光信号将其转化为基因的起始拷贝数 C_t 值,根据各样品的 C_t 值,计算其起始模板拷贝数。

表 1 引物序列、退火温度及目的片段长度

Table 1 Primer sequence, annealing temperature and amplified fragment length

基因 Gene	用途 Use	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度/°C Annealing temperature	片段长度/bp Fragment length
CS-1	PCR	P1	F:CATCCATAGTCCATCTCCAGTCT R:AGTGGCTTTGCCAGTAAGTAGAA	56	953
CS-1	荧光定量 (RT-PCR)	P2	F:AGGACAAGGGATGGGAGGA R:AAGCCAGAGAGACGACAGG	52.1	140
GAPDH	荧光定量 (RT-PCR)	P3	F:TTGGATGAAACGGGAGTGG R:CCGTCCACCTTTTGTGTGTTG	59.5	127

1.2.4 统计分析 用 DNAMAN6.0 软件进行序列拼接和同源性分析,用 NCBI 在线 Blast 软件进行序列比对,用 NCBI 在线 CD-Search 工具进行蛋白质保守结构分析,利用 GOR IV 和 ExPASy ProtScale 在线软件预测蛋白质二级结构,用 NetPhosK 1.0 Server 在线软件预测蛋白激酶 C 磷酸化位点,用 NetPhos 2.0 Server 在线软件预测磷酸化位点。利用荧光定量 PCR 分别检出各目的基因和内参基因的 C_t 值后,设置相同的阈值线,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量,用 SAS8.2 软件的 GLM 程序进行最小二乘均值分析和多重比较,结果以“最小二乘均值±标准差”表示。

2 结果

2.1 绵羊 CS-1 基因转录本 cDNA 序列

提取的总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳,显示有明显的 28S、18S、5S 3 个条带(图略),表明总 RNA 提取质量较好,用提取后纯化的总 RNA 为模板,用引物 P1 经 RT-PCR 扩增获得大小为 951 bp 的 cDNA 部分片段(图 1)。

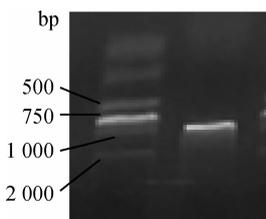


图 1 CS-1 基因 cDNA 序列 PCR 电泳图

Fig. 1 CS-1 gene cDNA sequence in PCR electrophoresis

用 DNAMAN6.0 软件进行序列拼接,得到长度为 951 bp 的绵羊 CS-1 基因全 cDNA 序列,将序列提交 GenBank (登录号: HM628579)。序列分析表明,该基因全 cDNA 序列含 78 bp 的 5'-UTR 和 79 bp 的 3'-UTR,完整的开放阅读框为 79~872 bp,长度为 793 bp,编码 264 个氨基酸。

2.2 CS-1 基因氨基酸序列分析

用 DNAMAN 软件进行蛋白质分析表明,该蛋白质分子量为 30 ku,理论等电点为 6.99。氨基酸一致性分析显示,该蛋白质序列与牛、人和鼠蛋白质序列的一致性分别为 97.99%、90.27% 和 87.58%。利用 GOR IV 和 ExPASy ProtScale 在线软件预测蛋白质二级结构表明,无规卷曲占总氨基酸数目的 60.98%, α -螺旋为 28.79%,其余 10.23% 的氨基酸组成了延伸主链,并富含疏水区域。NetPhos 2.0 Server 预测磷酸化位点结果:7 个苏氨酸磷酸化位点分别位于氨基酸残基 107、111、141、190、235、249 和 253 位,7 个丝氨酸磷酸化位点分别位于 16、51、65、116、150、227 和 231 位和 4 个酪氨酸磷酸化位点分别位于 68、75、147 和 182 位(图 2)。用 NetPhosK 1.0 Server 预测蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)磷酸化位点,结果发现 1 个特异性 PKC 磷酸化位点,为位于 158 位(分数: 0.80)的苏氨酸。

2.3 荧光定量检测 CS-1 基因在凉山半细毛羊组织中的表达情况

2.3.1 常规 PCR 检测 不同组织的总 RNA,经过 RT-PCR 扩增,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测都有清晰的 CS-1 基因扩增条带,其片段大小与预期

的一致。结果表明:CS-1 基因在所选择的 4 个组织中均有表达(图 3)。

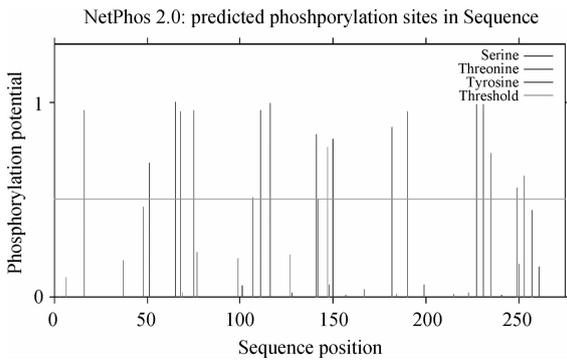
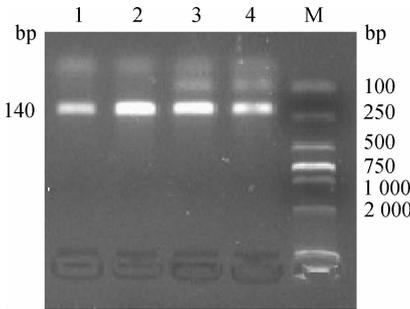


图 2 绵羊 CS-1 蛋白的磷酸化位点
Fig. 2 CS-1 protein phosphorylation sites in sheep



1. 肝脏;2. 心脏;3. 背肌;4. 大脑;M. DNA 相对分子质量标准 DL2000
1. Liver; 2 Heart; 3. Back muscle; 4. Brain; M. DL2000 marker

图 3 CS-1 基因在组织中的表达
Fig. 3 CS-1 gene expression in different tissues

2.3.2 组织表达情况 对 15 d 的凉山半细毛羊组织中 CS-1 基因的表达情况进行检测,结果显示,

以背肌为对照,心脏的表达量最高,与背肌的表达量差异极显著($P < 0.01$),心脏的表达量极显著高于大脑和肝脏($P < 0.01$),大脑与肝脏之间差异不显著($P > 0.05$,表 2);背肌中 CS-1 基因随着年龄的增加表达量呈现下降趋势,以 15 d 时为对照,60 d 时的表达量相对较高,105 d 极显著低于 60 d 的表达量($P < 0.01$),60 d 的表达量极显著低于 15 d($P < 0.01$),195 与 240 d 之间的差异不显著($0.05 < P < 0.1$);心脏中 CS-1 基因随着年龄的增加表达量也有下降的趋势,以 15 d 时为对照,60 d 时的表达量最高,105 d 极显著低于 60 d 的表达量($P < 0.01$),60 d 的表达量极显著高于 15 d($P < 0.01$),195 与 240 d 之间的差异也极显著($P < 0.01$,表 3)。

表 2 CS-1 基因在凉山半细毛羊不同组织中的相对表达量
Table 2 The expression of CS-1 gene in tissues in Liangshan Semi-fine Wool sheep

心脏 Heart	背肌 Back muscle	肝脏 Liver	大脑 Brain
5.546 ± 0.091 ^C	1.000 ± 0.000 ^A	0.003 ± 0.001 ^{Bb}	0.008 ± 0.002 ^{Bb}

同行上标大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$),大写字母相同,小写字母不同表示差异显著($0.01 < P < 0.05$),大写字母相同,小写字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。下同
Different capital letters in the same row means significant difference between the treatments ($P < 0.01$), the same uppercase letter and the different lowercase letters indicate significant difference($0.01 < P < 0.05$), the same uppercase letters and the same lowercase letters indicate no significant difference($P > 0.05$). The same as below

表 3 CS-1 基因在凉山半细毛羊不同年龄段背肌和心脏中的相对表达量

Table 3 The expression of CS-1 gene in back muscle and heart at different ages of Liangshan Semi-fine Wool sheep

组织 Tissue	15 d	60 d	105 d	160 d	195 d	240 d
背肌 Back muscle	1.000 ± 0.000 ^{Aa}	0.580 ± 0.067 ^{Bb}	0.160 ± 0.022 ^{Dd}	0.453 ± 0.020 ^{Cc}	0.0743 ± 0.016 ^{De}	0.084 ± 0.0201 ^{Dde}
心脏 Heart	1.000 ± 0.000 ^{Bc}	4.079 ± 0.162 ^{Aa}	1.158 ± 0.058 ^{Bcb}	0.940 ± 0.061 ^{Dd}	1.242 ± 0.084 ^{Bb}	0.883 ± 0.142 ^{Cc}

3 讨论

NCBI 数据库显示,牛、人和小鼠等物种的 CS-1 基因的 cDNA 序列已经被克隆。而该基因的 cDNA 序列在绵羊上至今还未见报道。本试验参考牛和小鼠 CS-1 基因 mRNA 序列,利用比较基因组学技术成功克隆了绵羊 CS-1 基因 cDNA 全序列,并提交至

GenBank 获得登录号为 HM628579。序列同源性分析表明,CS-1 基因在大多数哺乳动物中表达,而在果蝇和非哺乳动物中不表达,不同哺乳动物 CS-1 基因 cDNA 保守性比较稳定。说明该基因是哺乳动物肌细胞的一个重要组成部分^[10]。利用 DNAMAN 软件将绵羊 CS-1 氨基酸序列与人、牛和鼠的 CS-1 蛋白相比发现它们的同源性很高,分别为 90.27%、97.99%

和 87.58%，由此可见 CS-1 蛋白在哺乳动物中相当保守。CS-1 蛋白共有 3 个结构区域，含有 2 个 α 螺旋区域，中间是 1 个富含 Gly 的区域，其 N 端和 C 端的氨基酸序列比较保守，中间的氨基酸变化较大^[6]。由此表明，人、鼠、牛和绵羊的 CS-1 基因是同一个祖先趋势分化而来的，具有相似的生物学功能。

磷酸化是蛋白质生物合成后活性调节的一种化学修饰方法，是控制酶活性的重要步骤，许多情况下，磷酸化的蛋白质酶活性大大提高，而有些情况下，磷酸化后酶活性下降甚至消失。本试验通过生物信息学软件预测表明，CS-1 蛋白存在 17 个苏氨酸磷酸化位点，没有丝氨酸磷酸化位点和酪氨酸磷酸化位点，并且有 1 个特异性蛋白激酶 C(PKC)磷酸化位点。这些磷酸化位点也许同 CS-1 蛋白参与的信号通路有关。

本研究利用实时荧光定量 RT-PCR 检测了 CS-1 基因在凉山半细毛羊各组织中的表达情况，结果显示，CS-1 基因在所选择的凉山半细毛羊 4 个组织中都有表达，研究表明，CS-1 基因可能通过与钙调神经磷酸酶结合调节其活性，参与肌细胞内由 Ca^{2+} 调控的信息传递功能，从而调控其它相关基因的表达，在肌纤维的分化和发育过程中发挥重要的作用，在肌肉和心脏中尤为突出^[3]。同年龄段不同组织中，CS-1 基因在肌肉和心脏中的表达量要高于内脏其他组织，内脏各组织间表达差异也较大，这可能与基因本身的功能有关，对 CS-1 基因在猪不同组织中表达情况的研究也得出类似结论，揭示出 CS-1 基因在不同物种间组织内表达具有某种程度的一致性；而随着年龄的增长 CS-1 基因在相同组织中的表达量减少，这可能与肌纤维发育规律有关^[11]。相关报道证实，畜禽出生后肌肉量的增加主要靠已有纤维的卫星细胞相互融合而使纤维膨大^[12]，肌纤维的组织学特性与肌肉量直接相关，随着年龄的增长，肌纤维分化加粗，直径增大，肌肉量增加，嫩度降低^[13-14]，进而影响肉质风味。结合本研究可以推知肌纤维分化可能与 CS-1 基因在体内的表达量密切联系。

4 结 论

本研究初步完成了 CS-1 基因的克隆和序列的生物信息学分析，并讨论了该基因在凉山半细毛羊各组织和各时期的表达情况，下一步将对 CS-1 蛋白及结合的蛋白的功能，维持细胞结构的稳定性以及影响其结合蛋白对钙离子的结合功能，钙离子浓度的变化与控制肌纤维分化的因子的内在联系，进一步影响与其相关的调控通路，共同参与骨骼肌快慢肌纤维的形成与转化进行深入研究。

参考文献：

- [1] 王继英,王怀中,张 印,等.猪肌纤维特性的研究进展[J].养猪,2004,3:46-48.
- [2] 苏玉红,刘东鑫,宋慧娟,等.猪 Calsarcin-2 基因编码区的克隆及组织表达谱分析[J].辽宁医学院学报,2008,29(5):385.
- [3] FAULKNER G, PALLAVIEMI A, COMELH A, et al. FATZ, a β -tubulin-, actinin-, and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle[J]. *Biol Chem*, 2000, 275(52):41234-41242.
- [4] FREY N, OLSON E N. Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family interacts with multiple Z-disc proteins[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(16):13998-14004.
- [5] FREY N, RICHARDSON J A, OLSON E N. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 14632-14637.
- [6] TAKADA F, VANDER WOUDE D L, TONG H Q, et al. Myozenin: an α -actinin- and γ -filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1595-1600.
- [7] AHMAD F, GONZALEZ O, RAMAGLI L, et al. Identification and characterization of a novel gene (C4orf5) located on human chromosome 4q with specific expression in cardiac and skeletal muscle[J]. *Genomics*, 2000, 70: 347-353.
- [8] FREY N, BARRIENTOS T, SHELTON J M, et al. Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress[J]. *Nat Med*, 2004, 10: 1336-1343.
- [9] 杨 铨,朱文娟,伍晓熊,等.利用酵母双杂交系统筛选猪 Calsarcin-1 基因相互作用蛋白[J].中国农业科学,2009,42(2):663-668.
- [10] 刘东鑫,朱宝芹,巴彩凤.猪 calsarcin-2 基因 cDNA 的克隆与测序[J].繁殖育种,2006,4:19-21.
- [11] WANG H, ZHU Z, WANG H, et al. Characterization of different expression patterns of calsarcin-1 and calsarcin-2 in porcine muscle[J]. *Gene*, 2006, 374: 104-111.
- [12] REMIGNON H, GARDAHAUT M F, MARCHE G, et al. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres without changing their typing in chickens[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 1995, (16): 95-102.
- [13] 曾勇庆,王 慧,储明星.小尾寒羊肉品理化性状及食用品质的研究[J].中国畜牧杂志,2000,36(3):6-8.
- [14] 曾勇庆,孙玉民,王 慧,等.青山羊肉品理化性状及其食用品质的研究[J].山东农业大学学报,1999,30(4):384-389.