

绵羊 *IGFBP-6* 基因的克隆及序列分析

周明亮¹,杨平贵¹,吴登俊^{2*},张翔宇³

(1. 四川省草原科学研究院,四川 成都 611743; 2. 四川农业大学 动物科技学院,四川 雅安 625014;
3. 四川省畜牧科学研究院,四川 成都 610066)

摘要:以凉山半细毛羊为研究对象,克隆了其胰岛素样生长因子结合蛋白6基因(*IGFBP-6*),采用生物信息学方法进行遗传进化分析,对*IGFBP-6*蛋白的理化性质进行分析,并对其二级和三级结构进行预测。结果表明,绵羊*IGFBP-6*基因的CDS全长序列为711 bp,编码236个氨基酸,与牛、人、鼠的CDS同源性分别为96%、84%、74%,氨基酸序列同源性分别为95%、80%、69%;*IGFBP-6*蛋白大小为24.9 ku,理论等电点(pI)为8.83。遗传进化分析结果显示,绵羊*IGFBP-6*基因与山羊、牛等哺乳动物关系较近,与鱼类的亲缘关系较远。*IGFBP-6*蛋白存在明显的疏水性区域和亲水性区域,有1个信号肽、14个磷酸化位点、3个N-糖基化位点和7个O-糖基化位点;二级结构分析结果显示,*IGFBP-6*蛋白无规则卷曲、α-螺旋和β-折叠区域比例分别为77.54%、19.92%、2.54%;三级结构分析结果显示,*IGFBP-6*蛋白存在*IGFBP_N*和甲状腺球蛋白-I型功能域。

关键词:绵羊;*IGFBP-6*基因;克隆;生物信息学

中图分类号:S813.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2015)04-0144-05

Cloning and Sequence Analysis of *IGFBP-6* Gene in Sheep

ZHOU Mingliang¹, YANG Pinggui¹, WU Dengjun^{2*}, ZHANG Xiangyu³

(1. Sichuan Academy of Grassland Science, Chengdu 611743, China;
2. College of Animal Sci-Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China
3. Sichuan Animal Science Academy, Chengdu 610066, China)

Abstract: The *IGFBP-6* gene of Liangshan semi-fine wool sheep was cloned and analyzed by bioinformatics method. The physicochemical characteristics of *IGFBP-6* protein was analyzed. The secondary structure and tertiary structure of *IGFBP-6* protein were predicted. The results showed that the CDS sequence of *IGFBP-6* gene was 711 bp, encoding 236 amino acids. CDS homology was 96%, 84% and 74% respectively, amino acid homology was 95%, 80% and 69% respectively compared with bovine, human and rat. The amino acid sequence analysis revealed that its relationship was near with mammals, goat, cattle, and far with fish. The molecular weight was 24.9 ku, isoelectric point was 8.83, with obvious hydrophobic and hydrophilic regions, a signal peptide, one transmembrane region, fourteen sites of phosphorylation, three sites of N-glycosylation and seven sites of O-glycosylation. There were forecast that the random coil, α-helix and β-sheet region were 77.54%, 19.92%, 2.54% respectively in secondary structure, a *IGFBP_N* domain and a thyroglobulin-I type domain were in tertiary structure.

Key words: sheep; *IGFBP-6* gene; clone; bioinformatics

收稿日期:2014-10-08
基金项目:农业部公益性行业科研专项(201003061);四川省畜禽育种攻关项目(01NG029-18)
作者简介:周明亮(1983-),男,重庆人,副研究员,博士,主要从事藏绵羊遗传资源保护与利用研究。
E-mail:zhou760302@163.com
* 通讯作者:吴登俊(1956-),男,四川名山人,教授,博士生导师,主要从事动物分子遗传育种研究。
E-mail:wdengjun@sicau.edu.cn

胰岛素样生长因子结合蛋白 6 (IGFBP-6) 是胰岛素样生长因子结合蛋白家族 (IGFBPs) 的成员之一, 是一种分泌型糖蛋白, 能与类胰岛素生长因子 - II (IGF-II) 特异结合, 将 IGF-II 通过血液循环运送到机体各器官和组织, 从而发挥 IGF-II 的生物学活性。同时 IGFBP-6 也能与 IGF-I 结合, 但结合能力较弱, 与 IGF-II 结合的能力是与 IGF-I 结合能力的 20~100 倍^[1]。IGFBP-6 基因的功能表现为依赖 IGF 或独立于 IGF, 主要参与细胞的发育、分化、粘连以及集落的形成等^[2]。IGFBP-6 与 IGF-II 结合, 阻断了 IGF-II 与细胞表面的受体结合, 抑制 IGF-II 所介导的细胞生长、发育、细胞粘连等功能^[3]。IGFBP-6 在动物的卵巢、睾丸、肌肉、心脏和肺等多组织中表达^[1], 并与抑制肿瘤生长相关^[4-5]。IGF-II 在调控胎儿生长发育和肌肉生长等方面具有重要作用, 是动物生长发育的主要候选基因。鉴于 IGFBP-6 与 IGF-II 具有高亲和力, 推测 IGFBP-6 可能具有重要的生物学作用^[6]。目前, 有关绵羊 *IGFBP-6* 基因的研究较少。为此, 以凉山半细毛羊为研究对象, 克隆了 *IGFBP-6* 基因的 CDS 全长序列, 利用生物信息学方法分析 CDS 序列及相应的氨基酸序列, 为进一步研究该基因在绵羊生长发育过程中的调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试动物

7—9 月龄凉山半细毛羊购自四川省凉山州布拖县的凉山半细毛羊原种场。

1.2 主要试剂

组织保护液、TRIzol 剂、PrimeScript RT 反转录试剂盒、PCR 反应试剂盒等均购自大连 TaKaRa 公司。

1.3 引物设计

参照 NCBI GenBank 数据库中公布普通牛 (*Bos taurus*) 的 *IGFBP-6* 基因 (BC110141) 的 mRNA 序列, 引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件, 引物评价采用 Oligo 6.0 软件, 引物特异性检验采用 NCBI 网站的 BLAST。IGFBP-6 引物序列为 F: 5'-ATGACCCCCACAGGCTG-3', R: 5'-TTAGCCGCTGCCGCCGGT-3', 引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.4 总 RNA 的提取

采用颈静脉放血, 10 min 内收集肝脏组织, 将肝脏组织浸泡于组织保护液中, 并于液氮中保存, 带回实验室后置于 -80℃ 冰箱中保存备用。

取绵羊的肝脏组织约 100 mg, 迅速放入预冷好

的研钵中, 用研杵研磨并不断加入液氮, 直至粉末状。采用 TRIzol 提取法提取总 RNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性, 核酸蛋白检测仪检测 RNA 提取的浓度与纯度, 提取的 RNA 置于 -80℃ 保存备用。

1.5 RT-PCR 扩增

反转录按 PrimeScript RT 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行, 反转录反应的条件为: 37℃, 15 min; 85℃, 5 s。以合成的 cDNA 为模板, 以特异性的 IGFBP-6 引物进行 PCR 扩增, 扩增体系为 50 μL, 扩增条件为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 62℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 16℃ 保存。

1.6 RT-PCR 产物克隆

将回收的 RT-PCR 产物与 PMD 18-T 载体连接, 载体与片段的摩尔比控制在 (1:2)~(1:10), 轻轻涡旋以混合内容物, 并短暂离心, 混合反应液于 16℃ 水浴中连接过夜。连接产物在感受态细胞中转化, 吸 50 μL 到制备的 LB/Amp/X-Gal/IPTG 平板上, 用灭菌推棒将混合物均匀涂开, 将平板倒置, 37℃ 培养 12~18 h。灭菌牙签挑取单个白色菌落, 接种到 LB 培养液中, 37℃、200 r/min 振荡培养过夜, 以菌液作模板进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带, 同时将菌液送往 Invitrogen 公司测序。

1.7 生物信息学分析

依据正反测序原理进行校正分析, 确定绵羊 *IGFBP-6* 基因的 CDS 区域, 利用 BioEdit 软件对其碱基组成进行分析。从 GenBank 数据库下载山羊、牛、猪、人、鼠和鲑等物种的 *IGFBP-6* 基因序列, 用 Mega 6.06 软件以 Neighbor-Joining 法构建基因的分子系统发育树。采用 ExPASy 在线平台的 ProtScale 软件分析绵羊 IGFBP-6 蛋白的疏水性, 应用 SignalP 3.0 在线 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析其可能存在的信号肽, 应用 EMBNET 在线 (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED-form.html>) 预测蛋白质的跨膜区, 利用 NetPhos 2.0 软件预测磷酸化位点, 利用 NetNGlyc 1.0 及 NetOGlyc 3.1 软件预测糖基化位点。采用 HNN 软件预测二级结构, 采用 ExPASy ScanProsite 软件预测功能域^[7-9]。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及 RT-PCR 扩增

采用 1.0%~1.5% 琼脂糖电泳检测肝脏中提取到的总 RNA, 可以清晰地观察到 3 条带, 迁移率从大

到小依次是 5S rRNA、18S rRNA、28S rRNA(图 1)。总 RNA 样品完整、质量良好、降解较少。以总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,用 *IGFBP-6* 基因的特异引物进行扩增,可见扩增片段长度约为 700 bp(图 2)。

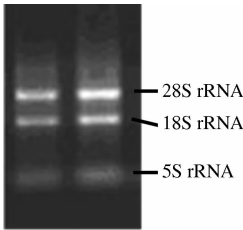


图 1 总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

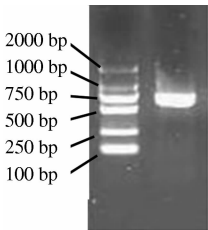


图 2 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 序列分析

对测序结果进行分析发现,*IGFBP-6* 基因的完整 CDS 序列长度为 711 bp,编码 236 个氨基酸。利用 NCBI 中的 BLAST 程序比对克隆基因的碱基序列与近源物种的同源性,结果表明,*IGFBP-6* 基因与牛、人、猪、鼠的 CDS 区的同源性分别为 96%、84%、89%、74%,氨基酸序列同源性分别为 95%、80%、87%、69%;同源性比对结果显示,克隆的基因即为绵羊的 *IGFBP-6*,将 PCR 扩增得到的序列提交到 GenBank,登录号为 EU862545.1。

碱基组成分析显示,*IGFBP-6* 基因的 A、T、C、G 4 种碱基含量分别为 17.02%、15.61%、31.79%、35.58%。*IGFBP-6* 蛋白大小为 24.9 ku,理论等电点(pI)为 8.83。

2.3 *IGFBP-6* 基因的分子进化

由图 3 可知,*IGFBP-6* 基因与其他物种的进化关系跟传统的分类比较一致,绵羊与山羊关系最近,随着亲缘关系的远近逐步与牛、猪、人和鼠等聚合,与鱼类遗传距离较远。

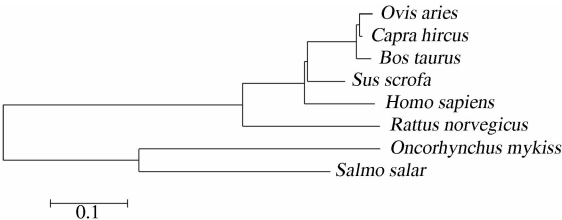


图 3 *IGFBP-6* 基因的分子进化

2.4 蛋白质特性预测

2.4.1 疏水性分析 由图 4 可知,*IGFBP-6* 蛋白的 N 段区域具有明显的疏水性区域,在 C 段及中部区域具有明显的亲水性区域。因此,预测与 IGF-I 和 IGF-II 蛋白的结合部位在 *IGFBP-6* 蛋白的中部区域,根据 *IGFBP-6* 蛋白 N 段的明显疏水性区域判断在该位置可能存在信号肽。

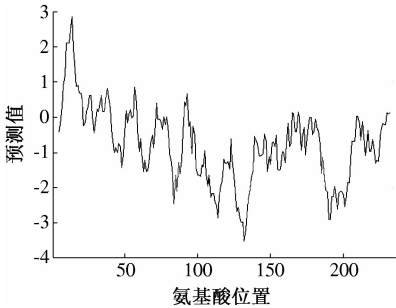


图 4 *IGFBP-6* 蛋白的疏水性预测

2.4.2 信号肽分析 信号肽预测结果显示(图 5),*IGFBP-6* 蛋白的 N 段存在信号肽的概率为 1.000,其长度为 25 个氨基酸残基,切割位置在 Ala—Arg。

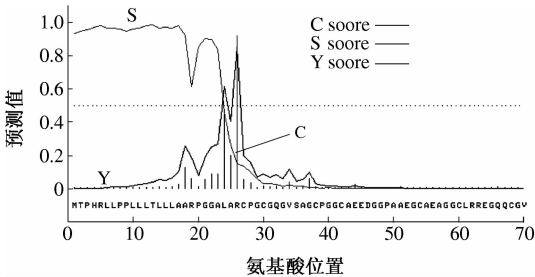


图 5 *IGFBP-6* 蛋白的信号肽预测

2.4.3 跨膜区分析 由图 6 可知,*IGFBP-6* 蛋白存在 1 个跨膜区,由于跨膜区与信号肽位置重叠,因此,*IGFBP-6* 蛋白无跨膜区。

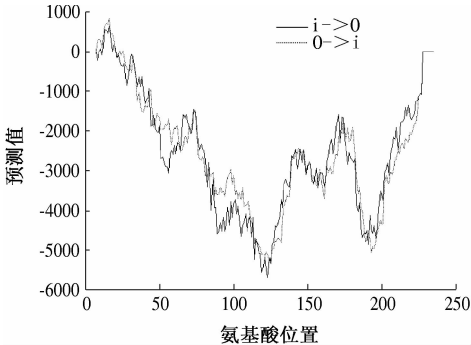


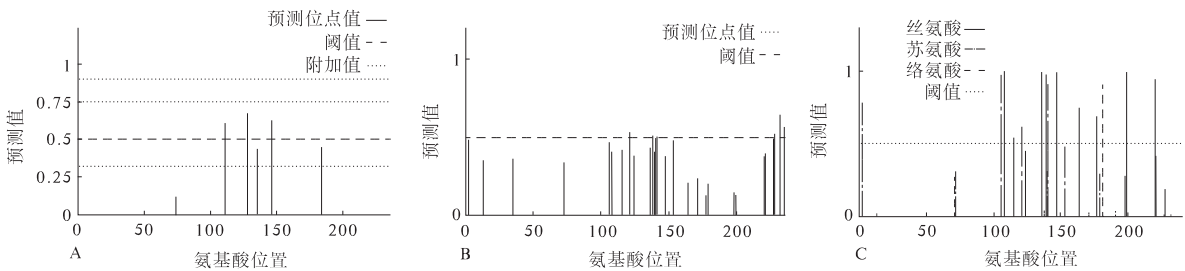
图 6 *IGFBP-6* 蛋白的跨膜区预测

2.4.4 磷酸化和糖基化位点 利用 NetPhos 2.0 在线预测 *IGFBP-6* 蛋白的磷酸化位点,结果如图 7 所示,在 *IGFBP-6* 蛋白中共发现了 14 个磷酸化位点,位点分别为 Ser(9)、Thr(4)、Tyr(1)。

利用 NetNGlyc 1.0 及 NetOGlyc 3.1 对 *IGFBP-6*

蛋白进行 N - 和 O - 糖基化位点预测。由图 7 可知,IGFBP - 6 蛋白 N - 糖基化位点共有 3 个,分别

位于 111、128、146 位置;O - 糖基化位点共有 7 个,分别位于 121、138、141、227、228、232、235 位置。



A. N - 糖基化位点; B. O - 糖基化位点; C. 磷酸化位点

图 7 IGFBP - 6 蛋白的磷酸化与糖基化位点预测

2.5 二级结构分析

采用 HNN 在线二级结构预测服务器,对 IGFBP - 6 蛋白进行预测,结果如图 8 所示,IGFBP - 6 以无

规则卷曲为主,其次为 α - 螺旋, β - 折叠最少,IGFBP - 6 蛋白的无规则卷曲、 α - 螺旋、 β - 折叠区域分别占 77.54%、19.92%、2.54%。

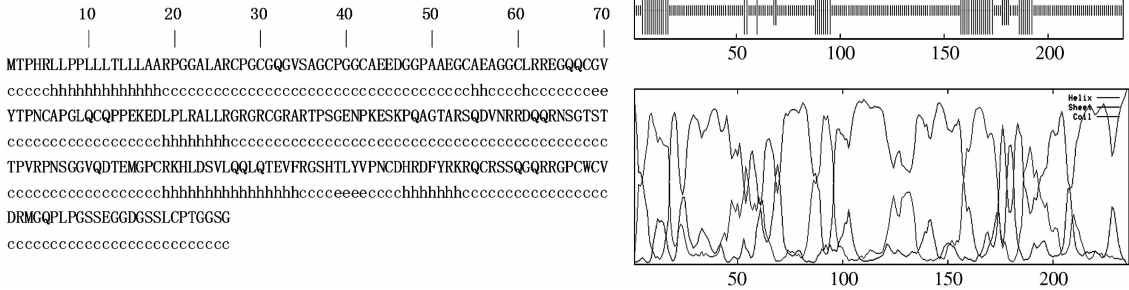


图 8 IGFBP - 6 蛋白的二级结构

2.6 蛋白质功能域预测及分析

由图 9 可以看出,IGFBP - 6 蛋白的 N 端具有 1 个 IGFBP_N 功能域序列,位于 13—104 位;在 C 端,具有 1 个甲状腺球蛋白 - I 型域,位于 155—230 位,在该域中,具有 3 个二硫键,分别位于 158—185 位、196—207 位、209—230 位,还存在大量的酪蛋白激酶 II、蛋白激酶 C 和 N - 豆蔻酰化等磷酸化位点。

发现,IGFBP - 6 蛋白存在 14 个磷酸化位点,分别为 Ser(9)、Thr(4)、Tyr(1),有 3 个 N - 糖基化位点、7 个 O - 糖基化位点。磷酸化是蛋白质磷酸化激酶将 ATP 的磷酸基转移到蛋白质的特定位点上的过程。实际上大部分的细胞过程是被可逆的蛋白质磷酸化所调控的,至少 30% 的蛋白质被磷酸化修饰,在磷酸化调节过程中,细胞的形态和功能都会发生改变,可逆的磷酸化过程几乎涉及到生物所有的生理及病理过程,这些过程包括细胞信号转导、新陈代谢、神经活动、肌肉收缩、肿瘤发生以及细胞的发育、增殖和分化等。在细胞信号转导过程中,细胞信号的一些激素或细胞因子与细胞内受体或细胞膜受体结合并被激酶激活,然后随着激酶的磷酸化也被磷酸化,引起细胞内的信号效应^[10-11]。

绵羊 IGFBP - 6 蛋白氨基酸序列的二硫键结构与在人 IGFBP - 6 蛋白上的研究结果一致^[12-13],经二硫键折叠形成稳定的精细的球状结构,保证了与 IGFs 结合的亲和力。绵羊 *IGFBP-6* 基因以 GCAE-AXXC 取代了 GCGCCXXC 序列^[14],导致丢失 2 个 Cys,从而缺少 1 个二硫键,影响 *IGFBP-6* 与 IGFs 的结合。本研究结果为 *IGFBP-6* 基因功能的研究奠定了基础,其具体的功能有待进一步研究。

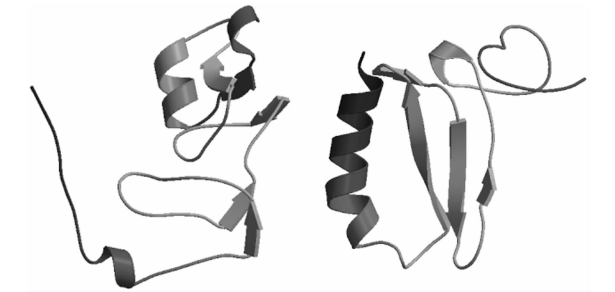


图 9 IGFBP - 6 蛋白三级结构预测

3 讨论

本研究结果显示,绵羊 *IGFBP-6* 基因 CDS 序列全长 711 bp,与山羊的遗传进化距离最近,其编码的 IGFBP - 6 蛋白大小约为 24.9 ku。

蛋白质翻译后修饰过程存在泛素化、磷酸化、糖基化、脂基化、甲基化和乙酰化等修饰方式。本研究

参考文献:

- [1] Roghani M, Lassarre C, Zapf J, *et al.* Two insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins are responsible for the selective affinity for IGF-Ⅱ of cerebrospinal fluid binding proteins[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, 73: 658-666.
- [2] Ewton D Z, Florini J R. IGF binding proteins-4, -5 and -6 may play specialized roles during L6 myoblast proliferation and differentiation [J]. *Journal of Endocrinology*, 1995, 144(3): 539-553.
- [3] Murphy L J. Insulin-like growth factor-binding proteins: Functional diversity or redundancy? [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1998, 21(2): 97-107.
- [4] Bach L A. *IGFBP-6* five years on; not so 'forgotten'? [J]. *Growth Horm IGF Res*, 2005, 15: 185-192.
- [5] Bach L A. Insulin-like growth factor binding protein 6: The "forgotten" binding protein [J]. *Horm Metab Res*, 1999, 31(2/3): 226-234.
- [6] 房希碧, 贾泓瑶, 张昕, 等. 西藏小型猪与军牧一号白猪 *IGFBP-6* 基因表达差异分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2013, 35(6): 727-731.
- [7] 钞安军, 吴宇阳, 李坤, 等. 猪 TOLL 样受体 7 全基因的扩增、克隆及生物信息学分析[J]. *华北农学报*, 2013, 28(1): 112-116.
- [8] 高歌, 孙荡, 茅翔. 猪Ⅱ型圆环病毒江苏株全基因进化及 ORF3 蛋白的生物信息学分析[J]. *山西农业科学*, 2012, 40(8): 881-885.
- [9] 唐中伟, 周志江. 产志贺毒素 EHEC 国内分离株 *Stx2* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. *山西农业科学*, 2011, 39(2): 167-169.
- [10] Ficarro S B, McClelland M L, Stukenberg P T. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(3): 301-305.
- [11] Krupa A, Preethi G, Srinivasan N. Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: Distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases [J]. *J Mol Biol*, 2004, 339: 1025-1039.
- [12] Neumann G, Bach L. The N-terminal disulfide linkages of human insulin-like growth factor-binding protein-6 (hIGFBP-6) and hIGFBP-1 are different as determined by mass spectrometry [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 14587-14594.
- [13] Hashimoto R, Fujiwara H, Higashihashi N, *et al.* Binding sites and binding properties of binary and ternary complexes of insulin-like growth factor-Ⅱ (IGF-Ⅱ), IGF-binding protein-3 and acid-labile subunit [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 27936-27942.
- [14] Vivian H, Youngman O, Ron G, *et al.* The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily [J]. *Endocrine Reviews*, 1999, 20(6): 761-787.