

# 太行山羊 *SPRN* 基因的克隆与半定量 RT-PCR 分析

张军杰<sup>1</sup>, 周荣艳<sup>1\*</sup>, 李祥龙<sup>1</sup>, 陈 辉<sup>1</sup>, 张振红<sup>1</sup>, 锡建中<sup>1</sup>, 李兰会<sup>1</sup>, 李秀岭<sup>2</sup>

(1. 河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071001; 2. 北京市大兴区动物疾病控制中心, 北京 102600)

**摘要:** 为研究太行山羊 *SPRN* 基因的结构及其在不同组织中的表达水平, 参考绵羊和牛 *SPRN* 基因序列设计引物, 应用 PCR 技术获得了太行山羊 *SPRN* 基因的核苷酸序列, 同时对该基因进行生物信息学分析, 并通过半定量 RT-PCR 进行组织表达谱分析。结果显示, 克隆的太行山羊 *SPRN* 基因序列长度为 4 237 bp, 含有 441 bp 的完整开放阅读框, 编码 146 个氨基酸, 与绵羊和牛的对应基因序列同源性分别达到 95% 和 93%。*SPRN* 基因在山羊小脑和大脑中表达水平较高, 在睾丸、肠系膜淋巴结和肺脏中表达量很低。

**关键词:** 山羊; *SPRN* 基因; 克隆; RT-PCR; 组织表达谱

中图分类号: S828 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)09-0116-04

## Cloning and Semi-quantitative RT-PCR Analysis of *SPRN* gene in Taihang Goat

ZHANG Jun-jie<sup>1</sup>, ZHOU Rong-yan<sup>1\*</sup>, LI Xiang-long<sup>1</sup>, CHEN Hui<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-hong<sup>1</sup>,  
XI Jian-zhong<sup>1</sup>, LI Lan-hui<sup>1</sup>, LI Xiu-ling<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Daxing District Center for Animal Disease Control and Prevention of Beijing, Beijing 102600, China)

**Abstract:** To investigate the gene structure and tissue expression profile of *SPRN* gene in Taihang goat, the primers to amplify *SPRN* gene are designed based on sheep and cattle sequences. The genomic sequence of caprine *SPRN* gene was acquired using PCR technology and tissue expression profile was analyzed using semi-RT-PCR technology. The bioinformatics analysis was done based on caprine *SPRN* gene sequence. The results showed that the length was 4 237 bp, including the complete open reading frame. The full-length of coding sequence was 441 bp, encoding 146 amino acid. The similarity between goat and sheep or cattle was 95% or 93% respectively. The expression profile showed that *SPRN* mRNA was highly expressed in cerebrum and cerebellum, low levels in testis, mesenteric lymph node, and lung and no mRNA was detected in other tissues. The result of phylogenetic analysis was consistent with the taxonomy. The high expression level of *SPRN* gene in brain tissue is the important basis for the function research.

**Key words:** goat; *SPRN* gene; clone; RT-PCR; tissue expression profile

动物朊蛋白基因(prion gene, *PRNP*)编码细胞型朊蛋白 PrP<sup>c</sup>。动物传染性海绵状脑病(朊病毒病, transmissible spongiform encephalopathies, TSEs)是由宿主编码的 PrP<sup>c</sup> 的正常构型发生改变

(PrP<sup>sc</sup>), 并在脑组织中积累而引起的。痒病是发生在绵羊和山羊上的一种朊病毒病<sup>[1-4]</sup>。*SPRN* 基因属于 *PRNP* 基因家族, 编码 Shadoo (简称 Sho) 蛋白。该蛋白在结构上与 PrP<sup>c</sup> 类似, 由 130~150 个

收稿日期: 2013-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201775); 河北省教育厅项目(Z2011152)

作者简介: 张军杰(1987-), 男, 河北邢台人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物遗传学。E-mail: mkit@sina.com

\* 通讯作者: 周荣艳(1978-), 女, 河北景县人, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: rongyanzhou@126.com

氨基酸组成,包含碱性区域和疏水区。碱性区域由最多 6 个富含精氨酸(Arg)的四肽 XXRG(X 是 G、A 或 S)重复组成,疏水区与 PrP<sup>c</sup> 高度同源。与 PrP<sup>c</sup> 相比,Sho 蛋白 N 端保守性强,C 端差异较大,包含一个糖基化位点,末端是 GPI 锚的信号肽。其在鱼类和哺乳动物中高度保守<sup>[1]</sup>。Sho 蛋白的神经保护作用与 PrP<sup>c</sup> 相似,因此,*SPRN* 基因是与传染性海绵状脑病有关的一个候选基因<sup>[2]</sup>。2007 年 8 月,确定了这种称为“沙杜”的朊病毒蛋白的存在,同时也确定了该蛋白具有类似于 PrP<sup>c</sup> 的保护中枢神经系统的作用,其能够降低朊蛋白感染的水平<sup>[1,3]</sup>。*SPRN* 基因 mRNA 在小鼠、绵羊、仓鼠、人、大鼠和牛脑组织中转录水平高,在其他组织中较低<sup>[1,4-7]</sup>。山羊 *SPRN* 基因在 TSEs 发生中的作用以及在山羊组织的表达尚未见报道。因此,本研究以太行山羊小脑组织作为试验材料克隆获得了 *SPRN* 基因序列,并对其基因结构进行了分析,同时对该基因的组织表达谱进行了分析,以期研究该基因的结构与功能提供重要的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

取健康成年太行山羊海马、丘脑、小脑、大脑、睾丸、肠系膜淋巴结、肺脏、肾脏、脾脏、肝脏和心脏,立即置于液氮中冷冻,带回实验室后置于 -80 °C 超低温冰箱保存,用于基因组 DNA 和总 RNA 的提取。

### 1.2 主要试剂

GC Buffer、oligo (dT)<sub>18</sub>、LA *Taq* DNA Polymerase、RNAiso Reagent、Ribonuclease Inhibitor、DNase I、PrimeScript Reverse Transcriptase M-MLV、T4 DNA 连接酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品;PCR 产物胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒为生工生物工程(上海)股份有限公司产品。

### 1.3 *SPRN* 基因的克隆

山羊肝脏基因组 DNA 提取采用酚-氯仿抽提法。在绵羊和牛 *SPRN* 基因(GenBank 登录号: DQ870545 和 DQ058606)保守区设计引物(表 1)。

表 1 山羊 *SPRN* 基因扩增引物

引物	序列(5'-3')	扩增长度/bp	退火温度/°C
1	ACCAGGGAGTCCACCAGAGGTAGCAGCAGAGCCCAGCAC	1 884	57.4
2	ACTCCCCACTCCTCCAGCAGCACCGTCCACAGCAC	987	60.0
3	CCGTTACCACCCACGCTGCCACGTTGCTCTA	703	60.0
4	CTGCCTCCCCACGTCCACCCAGCAGGAGAC	748	65.0
5	CCCTCCCCATCTTACATGCAGCAGAGTTTATTTCA	1 857	59.0
6	GCGAGGGTGCGTGTGCCTGAGGTCCACG	230	68.0

PCR 扩增体系为 50 μL,其中 2×GC Buffer II 25 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL,LA *Taq* 0.3 μL,山羊基因组 DNA 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 16.7 μL。PCR 扩增程序:96 °C 预变性 3 min;96 °C 变性 40 s,58~68 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1~2 min,共 40 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 反应产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 山羊 *SPRN* 基因的结构分析

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行拼接;利用 EBI 在线工具 CpGplot(<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cpgplot>) 进行 CpG 岛的预测,利用在线工具 Spidey(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>)进行基因结构预测。

### 1.5 总 RNA 的提取及逆转录反应

从超低温冰箱取出组织样品,称质量后迅速放到用液氮预冷的研钵中,并不断加入液氮,用研杵研

磨成粉末后,用 RNAiso Reagent 提取总 RNA,溶解于无 RNA 酶的水中,用 DNase I 处理后,置于 -80 °C 保存。

cDNA 第一链合成:总 RNA 10 μL,oligo(dT)<sub>18</sub> 5 μL,无 RNase ddH<sub>2</sub>O 15 μL;于 70 °C 保温 10 min,冰上放置 2 min。短暂离心后分别加入 5×M-MLV Buffer 10 μL, Ribonuclease Inhibitor 1.25 μL, dNTPs (10 mmol/L) 2.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 5 μL, Reverse Transcriptase M-MLV 1.25 μL;42 °C 保温 1 h。

### 1.6 半定量 RT-PCR

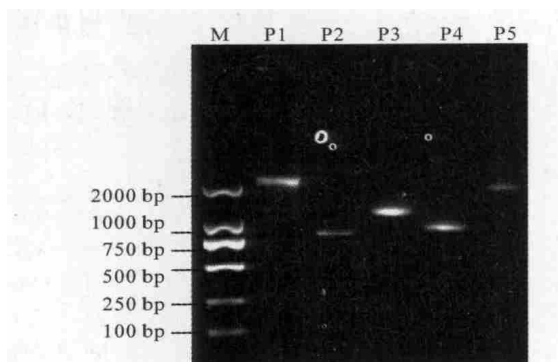
以山羊各个组织的 cDNA 为模板,应用表 1 中 *SPRN* 引物 6 进行扩增,*β-actin* 基因作为内参,每个样品设 3 个重复。扩增 *β-actin* 基因的正向引物序列为:5'-CGCAGACAGGATGCAGAAAGA-3',反向引物序列为:5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3'。PCR 扩增体系为 20 μL,1×GC Buffer II 10

$\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 0.6  $\mu\text{L}$ , LA *Taq* 0.2  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 水 5.6  $\mu\text{L}$ 。*SPRN* 基因扩增程序: 96  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 96  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 68  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s, 共 32 个循环。 *$\beta$ -actin* 基因扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 57.4  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 35 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 太行山羊 *SPRN* 基因的克隆

利用表 1 中的引物 1—5 进行 PCR 扩增, 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中检测, 分别可见到与预期片段大小相符的条带(图 1), 测序后经拼接与比对获得了太行山羊 *SPRN* 基因, 序列长度为 4 237 bp, 其中包含 441 bp 的完整开放阅读框, 编码 146 个氨基酸(GenBank 登录号: GQ267530)。



P1—P5 分别对应表 1 中引物 1—5 的 PCR 扩增结果

图 1 山羊 *SPRN* 基因 PCR 结果

### 2.2 山羊 *SPRN* 基因的结构分析

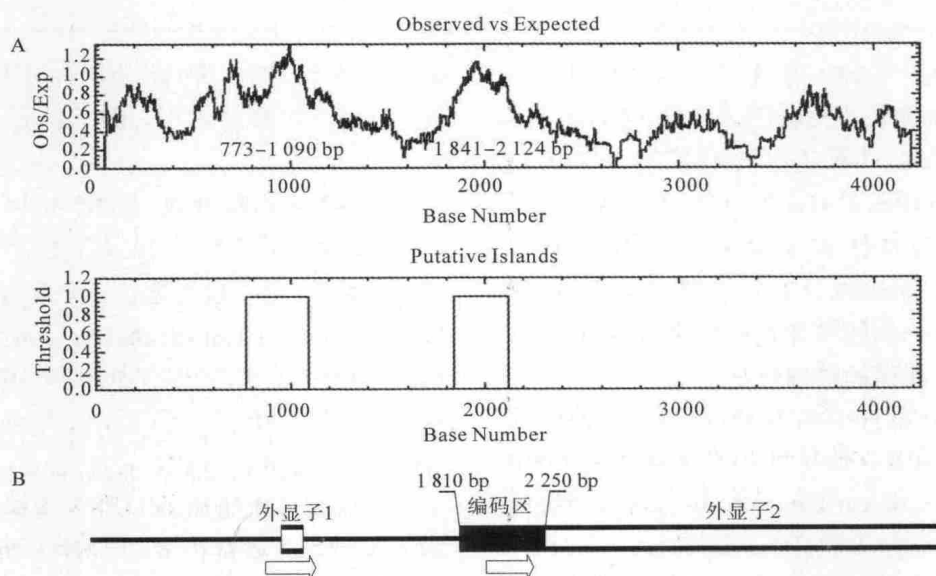
利用所获得的山羊 *SPRN* 基因序列与牛和绵羊基因序列(GenBank 登录号: DQ870545 和 DQ058606)进行同源比对, 同源性分别达到 95% 和 93%。山羊 *SPRN* 基因包含 2 个外显子, 5' UTR 长度为 948 bp, 外显子 1 长度为 108 bp, 内含子 1 长度为 737 bp, 外显子 2 长度为 2 444 bp, 并包含完整的开放阅读框, 编码 146 个氨基酸(图 2)。生物信息学分析结果表明, 在羊 *SPRN* 基因中含有 2 个 CpG 岛区域, 分别位于 773~1 090 bp(包含外显子 1)和 1 841~2 124 bp(编码区内)(图 2)。

### 2.3 总 RNA 的提取和检测结果

从成年太行山羊组织样品中提取的总 RNA, 经 1.0% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测。各个组织总 RNA 样品 28 S rRNA 的亮度为 18 S rRNA 的 2 倍, 5.8 S rRNA 条带较弱, 所提取的总 RNA 可用于后续 cDNA 合成。

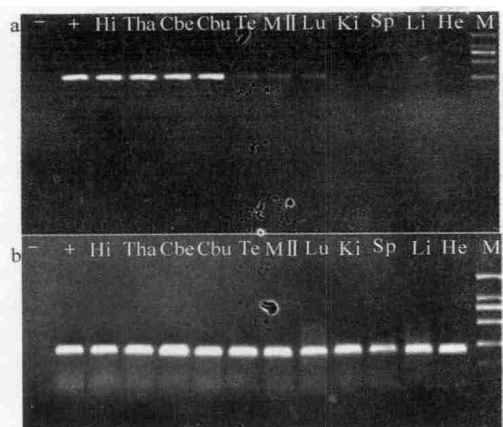
### 2.4 半定量 RT-PCR 组织表达谱分析

以成年太行山羊各个组织 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 同时以  *$\beta$ -actin* 基因为内参基因, 电泳检测结果如图 3 所示。山羊 *SPRN* 基因表达水平在其小脑和大脑中较高, 在睾丸、肠系膜淋巴结和肺脏中很低, 在心脏、肝脏、脾脏和肾脏中未检测到表达。山羊 *SPRN* 基因在脑组织中的特异表达表明, 该基因在这些组织中可能具有重要作用。



A. 利用 EBI 中的 CpG plot 工具分析得到的 CpG 岛信息; B. 山羊 *SPRN* 基因结构; 箭头指示的是 CpG 岛

图 2 山羊 *SPRN* 基因结构



M, DL2000 Marker; Hi, 海马; Tha, 丘脑;  
Cbe, 小脑; Cbu, 大脑; Te, 睾丸; Mil, 肠系膜淋巴结;  
Lu, 肺脏; Ki, 肾脏; Sp, 脾脏; Li, 肝脏; He, 心脏  
a, 山羊 *SPRN* 基因的 RT-PCR 结果;  
b, 山羊  $\beta$ -actin 基因的扩增结果

图3 山羊 11 个组织中 *SPRN* 基因表达谱

### 3 结论与讨论

*SPRN* 基因属于朊蛋白基因家族中的一员, 编码 Sho 蛋白。该蛋白在物种间高度保守, 与其在体内的神经保护功能有关。已有报道表明, *SPRN* 基因/Sho 蛋白的变异与传染性海绵状脑病的发生相关<sup>[2]</sup>。利用比利时 25 个不同绵羊品种群体进行研究发现, Sho 蛋白疏水区 2 个甘氨酸残基的缺失增强了绵羊对自然痒病的易感性 ( $P = 0.022$ )<sup>[8]</sup>。*SPRN* 基因单个碱基的插入引起移码突变, 这一突变与人变异克雅氏病相关, 内含子 1 和第 7 个密码子的单核苷酸多态性与克雅氏病有关<sup>[9]</sup>。山羊中枢神经系统痒病阳性与 *SPRN* 基因 3'UTR 区 CTC-CC 插入存在显著相关<sup>[10]</sup>。本研究首次克隆并获得了太行山羊 *SPRN* 基因的全长序列, 包括 2 个外显子, 其中外显子 2 中包含完整开放阅读框, 预测编码 146 个氨基酸, 与人、小鼠、绵羊和牛的结构相似。

利用半定量 RT-PCR 对山羊 *SPRN* 基因在组织中的表达进行分析, 结果显示, 该基因在山羊大脑和小脑中表达量较高, 在睾丸、淋巴结和肺脏中表达量极低, 这与该基因在其他物种中的表达谱一致。对牛、大鼠、绵羊 *SPRN* 基因组织表达进行研究以及利用 cDNA、EST 和 SAGE 数据对人和小鼠的 *SPRN* 基因进行分析, 均表明 *SPRN* 基因在脑组织中高水平表达<sup>[1]</sup>。在绵羊脑组织中 *PRNP* 基因和 *SPRN* 基因表达水平之间存在关联<sup>[1,5,11-13]</sup>。朊蛋白感染未影响到小鼠或绵羊的 *SPRN* mRNA 转录水平, 但降低了 Sho 蛋白的表达水平<sup>[1,12-13]</sup>。以上结果表明, *SPRN* 基因或 Sho 蛋白在脑组织或朊病毒感染中起作用, 但 *PRNP* 基因和 *SPRN* 基因及

其蛋白在山羊脑组织中的表达水平与朊蛋白感染间的关系尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, et al. Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein[J]. Gene, 2003, 314:89-102.
- [2] Westaway D, Daude N, Wohlgemuth S, et al. The PrP-like proteins Shadoo and Doppel[J]. Top Curr Chem, 2011, 305:225-256.
- [3] Watts J C, Drisaldi B, Ng V, et al. The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections[J]. EMBO J, 2007, 26(17):4038-4050.
- [4] Daude N, Westaway D. Biological properties of the PrP-like Shadoo protein[J]. Front Biosci, 2011, 16:1505-1516.
- [5] Lloyd S E, Grizenkova J, Pota H, et al. Shadoo (Sprn) and prion disease incubation time in mice[J]. Mamm Genome, 2009, 20(6):367-374.
- [6] Lampo E, Van Poucke M, Hugot K, et al. Characterization of the genomic region containing the Shadow of Prion Protein (*SPRN*) gene in sheep[J]. BMC Genomics, 2007, 8:138.
- [7] Ubaldi C, Paulis M, Guidi E, et al. Cloning of the bovine prion-like Shadoo (*SPRN*) gene by comparative analysis of the predicted genomic locus[J]. Mamm Genome, 2006, 17(11):1130-1139.
- [8] Lampo E, Duchateau L, Schepens B, et al. Identification of polymorphisms in the ovine Shadow of prion protein (*SPRN*) gene and assessment of their effect on promoter activity and susceptibility for classical scrapie[J]. Anim Genet, 2010, 41(2):169-178.
- [9] Beck J A, Campbell T A, Adamson G, et al. Association of a null allele of *SPRN* with variant Creutzfeldt-Jakob disease[J]. J Med Genet, 2008, 45(12):813-817.
- [10] Peletto S, Bertolini S, Maniaci M G, et al. Association of an indel polymorphism in the 3'UTR of the caprine *SPRN* gene with scrapie positivity in the central nervous system[J]. J Gen Virol, 2012, 93(7):1620-1623.
- [11] Lampo E, Van den Broeck W, Willemarck N, et al. Distribution of the Shadoo protein in the ovine brain assessed by immunohistochemistry[J]. Res Vet Sci, 2011, 90(3):372-378.
- [12] Lampo E, Van Poucke M, Vandesompele J, et al. Positive correlation between relative mRNA expression of *PRNP* and *SPRN* in cerebral and cerebellar cortex of sheep[J]. Mol Cell Probes, 2009, 23(1):60-64.
- [13] Gossner A G, Bennet N, Hunter N, et al. Differential expression of *Prnp* and *Sprn* in scrapie infected sheep also reveals *Prnp* genotype specific differences[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378(4):862-866.