

# 牛 *BBOX1* 基因 3'UTR 变异体的克隆及其多态性分析

宋雨霏,郭彦,辛友志,崔建伟,周国利\*  
(聊城大学 生命科学学院,山东 聊城 252059)

**摘要:** 为鉴定牛 *BBOX1* 基因选择性多聚腺苷酸化的不同变异体及其 3'UTR 的多态性,采用 3'RACE 的方法检测出 *BBOX1* 基因 3 个不同 3'UTR 全长的 APA 变异体,短 APA 变异体 3'UTR 长度为 229 bp,长 APA 变异体 3'UTR 长度分别为 664 bp 和 678 bp。利用 SSCP 与测序相结合的方法,在 *BBOX1* 基因的 3'UTR 中检测到 10 个多态性,其中 7 个为 SNP,分别为 c.12T>C、c.100A>G、c.241T>C、c.480T>C、c.557T>C、c.606T>C 和 c.650T>C;3 个为插入或缺失突变,分别为 c.28\_29insC、c.434\_435delGT 和 c.512\_513insTGC。SNP c.650T>C 定位在 Poly(A) 加尾信号 PAS3 中,使加尾信号序列 AAUAAA 突变成 AACAAA,导致 3'UTR 长度为 678 bp 的变异体出现。  
**关键词:** 牛; *BBOX1* 基因; 选择性多聚腺苷酸化; 多态性; 3'UTR  
**中图分类号:** S813.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2017)02-0120-04

## Cloning of 3'UTR Isoforms and Polymorphisms in Bovine *BBOX1* Gene

SONG Yufei, GUO Yan, XIN Youzhi, CUI Jianwei, ZHOU Guoli\*  
(College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**Abstract:** The objective of this study was to identify isoforms of 3'UTR and polymorphisms in 3'UTR regions of bovine *BBOX1* gene. Three different alternative polyadenylation (APA) isoforms of 3'UTR in the *BBOX1* gene were identified by 3'RACE. Their lengths were 229, 664, 678 bp, respectively. Ten polymorphisms loci were identified in 3'UTR of *BBOX1* gene by single strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing. There were seven SNPs, including c.12T>C, c.100A>G, c.241T>C, c.480T>C, c.557T>C, c.606T>C, and c.650T>C. Three were deletion/insertion mutations, including c.28\_29insC, c.434\_435delGT, and c.512\_513insTGC. SNP c.650T>C was located in polyadenylation signals sequence PAS3. Moreover, the mutation changed AAUAAA into AACAAA, resulting in presence of 678 bp isoform of 3'UTR in bovine *BBOX1* gene.  
**Key words:** cattle; *BBOX1* gene; APA; polymorphisms; 3'UTR

左旋肉碱是体内脂肪代谢必需的内在物质,其具有促进脂肪酸的  $\beta$ -氧化、降低血清胆固醇及甘油三酯的含量、提高机体耐受力等重要生理功能<sup>[1]</sup>。还可以和线粒体内的短链酰基(乙酰、丙酰、支链酰等)结合,形成酰-肉碱排出细胞外,从而起到调节线粒体内酰基 CoA 与 CoA-SH 的比例的作用,并为细胞质中脂肪酸合成提供乙酰基原料<sup>[2]</sup>。因此,左旋肉碱对动物的生长发育、繁殖、健康具有重要的作用<sup>[3]</sup>。左旋肉碱主要是在 5 种酶的作用下,以赖氨酸和蛋氨酸为原料合成<sup>[4]</sup>。在左旋肉碱

收稿日期:2016-08-20  
基金项目:国家自然科学基金项目(31571274);山东省自然科学基金项目(ZR2015CM025);聊城大学博士启动基金项目(31805)  
作者简介:宋雨霏(1993-),女,山东菏泽人,在读硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学。  
E-mail:448953745@qq.com  
\* 通讯作者:周国利(1975-),男,内蒙古赤峰人,副教授,博士,主要从事动物遗传与功能基因遗传调控研究。  
E-mail:glzhou1975@163.com

的生物合成途径中,最后一步反应由  $\gamma$ -丁酰甜菜碱羟化酶(*gamma-butyrobetaine hydroxylase 1*, *BBOX1*)催化完成<sup>[5]</sup>。研究报道,不同饮食可以改变 *BBOX1* 基因的表达水平和酶的活性,从而影响肉毒碱的利用。增加脂肪酸利用将会相应地提高左旋肉碱合成相关酶的含量及左旋肉碱的水平。禁食时机体将优先利用脂肪酸作为能量来源,所以会引起 *BBOX1* 基因 mRNA 水平、*BBOX1* 酶活性和左旋肉碱含量的上升<sup>[6]</sup>。

人和鼠的 *BBOX1* 基因的 cDNA 翻译区已被克隆,在这 2 个物种中,开放阅读框(ORF)长度为 1 161 bp,编码 387 个氨基酸<sup>[7-8]</sup>。通过 3'RACE 方法,已经鉴定出人、小鼠的 *BBOX1* 基因存在不同长度的 3'UTR 选择性多聚腺苷酸化(alternative polyadenylation, APA)变异体<sup>[9-10]</sup>。小鼠高脂肪饲喂后, *BBOX1* 基因的近端多聚腺苷酸加尾信号的变异体的 mRNA 表达量增加 2.1 倍,从而导致 *BBOX1* 活性和左旋肉碱产量的提高<sup>[10]</sup>。目前,关于牛的 *BBOX1* 基因的 APA 变异体及该基因遗传变异的研究尚未见报道。为此,鉴定了牛 *BBOX1* 基因的 APA 变异体,并检测该基因 3'UTR 的多态性,以期为该基因在牛肉质性状及脂肪沉积中的功能研究奠定分子生物学基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试动物

供试鲁西黄牛和草原红牛分别来自山东省聊城市张炉集镇牛场和吉林省农业科学院实验牛场。

### 1.2 主要试剂

SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒和 Advantage<sup>®</sup> 2 PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;pGM Simple T Fast 克隆试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、Trizol、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、EDTA、SDS、氯仿、去离子甲酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、琼脂糖均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;其他常规试剂均为分析纯。

### 1.3 组织样品采集、DNA 及总 RNA 的提取

鲁西黄牛和草原红牛各 30 头,用打耳器采集耳组织样品,将其放入 75% 乙醇中带回实验室, -20℃ 保存。用动物组织基因组 DNA 抽取试剂盒提取耳组织的基因组 DNA,溶于 TE 缓冲液中, -20℃ 保存。在山东省聊城市张炉集镇屠宰厂,采集 3 头鲁西黄牛的肝脏组织,屠宰后 20 min 内采集肝脏组织并迅速投到液氮中带回实验室,利用 Trizol 试剂提取总 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测总

RNA 的完整性。

### 1.4 3' RACE 鉴定 *BBOX1* 基因的 APA 变异体

根据 NCBI 中电子克隆的牛 *BBOX1* 基因(NM\_001101881.2)的 mRNA 序列,利用 Oligo 7.0 软件设计 1 条 3'RACE 基因特异性引物,用于扩增 *BBOX1* 基因的不同长度的 APA 剪切变异体。引物序列为 5' - GGCTTATGCTGACTGGGATGTG - 3'。利用方法 1.3 中提取的肝脏组织的总 RNA 为材料进行 3'RACE,操作按试剂盒说明书进行。3'RACE 的产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,然后用凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收,将回收的产物进行 TA 克隆,获得的阳性克隆由生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序,测序结果采用 DNASTar 5.0 进行序列分析。

### 1.5 牛 *BBOX1* 基因 3' UTR 的多态性检测

根据 NCBI 中牛 *BBOX1* 基因(NM\_001101881.2)的 mRNA 序列设计 2 对引物,用于扩增 *BBOX1* 基因 3'UTR 区域。F1 为 5' - ATGCTGACTGGGATGTGG - 3', R1 为 5' - GGGCAAAGAGAGTTCAGGAT - 3'; F2 为 5' - GAAATGAATCCGCCACAGGTAT - 3', R2 为 5' - TTGGTGAGGGCTGGAAAT - 3'。PCR 扩增反应体系为 25  $\mu$ L,包括 50 ng 基因组 DNA, 10 pmol/L 的上、下游引物,200  $\mu$ mol/L 的 dNTPs, 1.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 1.5 U *Taq* 酶。样品经 94℃ 变性 3 min 后,按下列程序进行扩增:94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s,最后 72℃ 延伸 30 s,33 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

利用 SSCP 的方法鉴定 *BBOX1* 基因 3'UTR 区的遗传变异。取 2  $\mu$ L PCR 产物和 5  $\mu$ L 上样缓冲液[98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯氰、10 mmol/L EDTA(pH 值 8.0)、10% 甘油]置于 PCR 管中,离心混匀,98℃ 变性 10 min,迅速插入冰中,放置 10 min,使之保持变性状态。样品用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。电泳结束后,进行银染显带。用凝胶成像系统拍照,进行基因型分析并记录结果。然后分别选择 2 个不同电泳条带的纯合基因型个体的 PCR 产物进行克隆测序,用 NCBI 中的 BLAST 程序及 DNASTar 软件比较它们之间的核苷酸变异。应用 RegRNA 2.0 程序(<http://regrna2.mbc.nctu.edu.tw/>)预测 *BBOX1* 基因 3'UTR 区的 miRNA 结合位点。

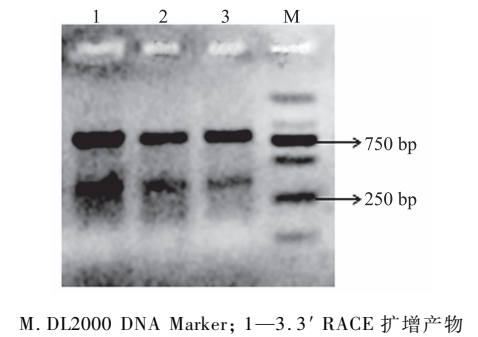
## 2 结果与分析

### 2.1 牛 *BBOX1* 基因 APA 变异体

牛 *BBOX1* 基因 3'RACE 的产物通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,获得了条带清晰、特异性好的

2 条带,片段长度与预期的相符(图 1)。进一步将大小不同的 2 个 3' RACE 产物进行克隆测序验证,结果表明,3' RACE 产物是 *BBOX1* 基因 3' UTR 的不同 APA 变异体,且发现了 3 个不同长度的 APA 变异体(图 2)。通过分析发现,变异体 I 利用的是近端加尾信号 PAS1,而变异体 II 和 III 分别利用远端加尾信号 PAS3 和 PAS4。加尾信号 PAS2 功能未知,需进一步研究。以加 poly(A) 位点为终点,短的 APA 变异体 3' UTR 长度为 229 bp(变异体 I),加尾信号与其加尾位点之间为 15 bp,较长的 APA 变异体 3' UTR 长度为 664 bp(变异体 II)和 678 bp(变异体 III),加尾信号 PAS3、PAS4 与各自的加尾位点之间的距离分别是 11 bp 和 7 bp。而且,PAS3 中的

碱基 T 突变为碱基 C(c. 650T > C),导致变异体 III 的出现。



M. DL2000 DNA Marker; 1—3. 3' RACE 扩增产物  
图 1 鲁西黄牛 *BBOX1* 基因 3' RACE 产物的  
琼脂糖凝胶电泳结果

```

TGACTCTCCTGTTGTTAACCTCAGTAAGAGTCCAATGAGTGTATTTTATAAGATATGACAAGGTTATTTGTCT
TCACAGACCATGAGCCATATCAGTTATGTATTAACTCTTTAACACTGAACATGTCATCTTTCTCACAAGAGT
TCTCTTTTCTTTCTAATCATATACAATGCCAATTTTTAGATGTAGCCATGTTCCCTCTTTTTCAGTAAAGGC
ATCTCTTCTGTTAGATGCATGTATGATCTAATTTCTTTTTTTTTTTAGAAAAGAGGGAACAGTTTATT
ATTGAATAAGCACAAAGGCCATATTACAGTATGCATTGTAAGCAATCCCAAGTTAAGAGAAAGAAAGAAATT
CTAGAAATTCAGGCTAGAAATTAACAGTAGTAATCCTTTACATCATGTTCTTAAGATTTAACAGTAACCTGT
CTTTTTTTTTTAATTTTATTTTATTTTAAACTTTACAATATGTATTAGTTTGCCAAATATCGAAATGAAT
CCGCCACAGGTATACCTGTGTTCCCATCCTGAACTCTCTTTGCCCATCTGTAAGTCTCCAGAATGCCTTC
AAATCACCTTGCACTAAACCAATCTCTCTTCAAATAAGGCTCTTTTGAATAAAAGCTTTGTTTCAGTAAAG
TTTGATTTCAGTAAAGTCTGTCAAAAAAGGCTCTTTTGAATAAAAGCTTTGTTTCAGTAAAG

```

带有双下划线的“TGA”为终止密码子,终止密码子后的第 1 个碱基记为“+1”;矩形方框内的“AATAAA”为多聚腺苷酸加尾信号,依次为 PAS1、PAS2、PAS3 和 PAS4;带单下划线的碱基位置为 poly(A) 加尾位点,并代表不同的剪切变异体,依次为变异体 I、II、III

图 2 牛 *BBOX1* 基因不同多聚腺苷酸化位点的 3' UTR 序列

2.2 牛 *BBOX1* 基因 3'UTR 的 SNPs 鉴定

在鲁西黄牛和草原红牛的研究群体中,通过 SSCP 与测序相结合的方法,在 *BBOX1* 基因 3'UTR 中共检测到 10 个多态性(表 1),其中 7 个为 SNPs,分别为 c. 12T > C、c. 100A > G、c. 241T > C、c. 480T > C、c. 557T > C、c. 606T > C 和 c. 650T > C;3 个为插入或缺失突变,分别为 c. 28\_29insC、c. 434\_435delGT 和 c. 512\_513insTGC。SNP c. 650T > C 落在 Poly(A) 加尾信号 PAS3 中,使加尾信号序列 AAUAAA 突变成 AACAAA。这些多态性都能造成某种限制性

核酸内切酶酶切位点缺失。对 *BBOX1* 基因 3'UTR 区的 miRNA 结合位点进行预测发现,bta - miR - 2451、bta - miR - 1343 和 bta - miR - 2454 分别定位在 c. 12T > C、c. 512\_513insTGC、c. 557T > C 突变区域内。

3 结论与讨论

多聚腺苷酸化位点的选择决定着 mRNA 的 3'UTR 的长度,3'UTR 调控序列的呈现或缺失最终可能会影响蛋白质表达水平。mRNA 3'UTR 的不同长度可能会导致 mRNA 不同的稳定性或翻译能力。更长的 3'UTR 包含更多的与 miRNA 和/或 RNA 结合蛋白等结合的顺式作用元件,从而影响 mRNA 的稳定性、定位和翻译<sup>[11-12]</sup>。研究表明,大约有 54% 的人基因和 52% 的小鼠基因存在 APA<sup>[13-14]</sup>。本研究鉴定了 3 个不同长度的 3' UTR,每个多聚腺苷酸化位点前都包含至少 1 个加尾信号(AATAAA),但在加尾过程中具体使用的加尾信号需进一步研究确定。一般情况下,加尾信号位于切割位点上游 10 ~ 30 bp。由此推测,这些加尾信号可能都起到一定的

表 1 牛 *BBOX1* 基因 3' UTR 区的遗传变异

SNPs 位置	发生突变的序列	限制酶
c. 12T > C	TGTTG[ T/C ]TAACC	<i>Hpa</i> I
c. 28_29insC	AGAGT[ -/C ]CCAAT	<i>Faq</i> I
c. 100A > G	TATGT[ A/G ]TTAAT	<i>Ase</i> I
c. 241T > C	ATGTA[ T/C ]GATCT	<i>Rsa</i> I
c. 434_435delGT	AACCT[ GT/- ]CTTTT	<i>Sge</i> I
c. 480T > C	TATTG[ T/C ]ATTAG	<i>Cvi</i> R I
c. 512_513insTGC	TCCGC[ -/TGC ]CACAG	<i>Bbv</i> I
c. 557T > C	GCCCA[ T/C ]CTGTG	<i>Bce</i> I
c. 606T > C	CAAAT[ T/C ]CTCTC	<i>Apo</i> I
c. 650T > C	TTCAA[ T/C ]AAAGT	<i>Hinc</i> II

注:SNPs 位置以 mRNA 序列(NM\_001101881.2)为参考序列,以终止密码子下游的第 1 个碱基定为“1”。

作用。许多加尾信号下游的切割位点是不精确的,且常包含着多个切割位点。这样的情况在 22% 的啮齿动物转录本中也有发现,而且在最近的研究中发现,大约 47% 的鼠科动物基因中存在这种异质性<sup>[15]</sup>。目前,在人类中已经发现有 2 个不同的 3'UTR 变异体,1 个长的和 1 个短的 3'UTR 变异体,每个加尾信号后的切割位点也不精确,存在多个切割位点<sup>[9]</sup>。在小鼠中鉴定出 5 个不同长度的 3'UTR 变异体,4 个较短的 3'UTR 变异体,1 个长的 3'UTR 变异体,其中最短的 3'UTR 变异体包含 2 个加尾切割位点<sup>[10]</sup>。本研究通过 3' RACE 试验,在牛中鉴定了 3 个不同长度的 3'UTR 变异体,1 个短的和 2 个长的 3'UTR 变异体,都与人类的相似性较高,而与小鼠的差别较大。

SNPs 是指在基因组上单个核苷酸的变异,包括转换、颠换、缺失和插入,但通常所说的 SNPs 并不包括后 2 种情况。SNPs 形成的遗传标记,其数量很多,多态性丰富。SNPs 是指变异频率大于 1% 的单核苷酸变异,在人类基因组中大概每 1 000 个碱基就有 1 个 SNP。因此,SNPs 成为第 3 代遗传标志,人体许多表型差异、对药物或疾病的易感性等都可能与 SNPs 有关<sup>[16-18]</sup>。本研究在牛 *BBOX1* 基因的 3'UTR 中检测到了 10 个多态性,如此高的多态性数量可能与 3'UTR 区变异程度较高有关。其中,c. 650T>C 定位在 Poly(A)加尾信号中,使加尾信号序列 AAUAAA 突变成 AACAAA,推测该 SNP 可能对 APA 的形成及基因的表达有影响。另外,bta - miR - 2451、bta - miR - 1343 和 bta - miR - 2454 分别位于 c. 12T>C、c. 512\_513insTGC、c. 557T>C 突变区域内,推测这些突变位点可能是成因性突变,对基因的表达调控及基因的功能有重要影响。通过对牛 *BBOX1* 基因的 APA 变异体的鉴定及 3'UTR 的 SNPs 检测,可以为牛 *BBOX1* 基因的功能研究奠定基础,也为牛肉质及脂肪沉积的研究提供了分子生物学素材。

参考文献:

[1] Le Borgne F, Ben Mohamed A, Logerot M, et al. Changes in carnitine octanoyltransferase activity induce alteration in fatty acid metabolism [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 409(4): 699-704.

[2] Ramsay R R. The role of the carnitine system in peroxisomal fatty acid oxidation [J]. American Journal of the Medical Sciences, 1999, 318(1): 28-35.

[3] Vaz F M, Wanders R J. Carnitine biosynthesis in mammals [J]. Biochemical Journal, 2002, 361(Pt 3): 417-429.

[4] Tanphaichitr V, Broquist H P. Site of carnitine biosynthe-

sis in rat [J]. Journal of Nutrition, 1974, 104(12): 1669-1673.

[5] Hausinger R P. Fe(II)/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 39(1): 21-68.

[6] Vlies N V, Ferdinandusse S, Turkenburg M, et al. PPAR alpha-activation results in enhanced carnitine biosynthesis and OCTN2-mediated hepatic carnitine accumulation [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2007, 1767(9): 1134-1142.

[7] Vaz F M, VanGool S, Ofman R, et al. Carnitine biosynthesis: Identification of the cDNA encoding human gamma-butyrobetaine hydroxylase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 250(2): 506-510.

[8] Galland S, Le Borgne F, Bouchard F, et al. Molecular cloning and characterization of the cDNA encoding the rat liver gamma-butyrobetaine hydroxylase [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1999, 1441(1): 85-92.

[9] Rigault C, Le Borgne F, Demarquoy J. Genomic structure, alternative maturation and tissue expression of the human *BBOX1* gene [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2006, 1761(12): 1469-1481.

[10] Rigault C, Le Borgne F, Tazir B, et al. A high-fat diet increases L-carnitine synthesis through a differential maturation of the *Bbox1* mRNAs [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2013, 1831(2): 370-377.

[11] Akman H B, Erson-Bensan A E. Alternative polyadenylation and its impact on cellular processes [J]. MicroRNA, 2014, 3(1): 2-9.

[12] Sandberg R, Neilson J R, Sarma A, et al. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites [J]. Science, 2008, 320: 1643-1647.

[13] Shepard P J, Choi E A, Lu J, et al. Complex and dynamic landscape of RNA polyadenylation revealed by PAS-Seq [J]. RNA, 2011, 17(4): 761-772.

[14] Tian B, Hu J, Zhang H B, et al. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(1): 201-212.

[15] Mandel C R, Kaneko S, Zhang H, et al. Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease [J]. Nature, 2006, 444: 953-956.

[16] Allais S, Journaux L, Levéziel H, et al. Effects of polymorphisms in the calpastatin and  $\mu$ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds [J]. Journal of Animal Science, 2011, 89(1): 1-11.

[17] Capon F, Allen M H, Ameen M, et al. A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups [J]. Human Molecular Genetics, 2004, 13(20): 2361-2368.

[18] Kimchi-Sarfaty C, Oh J M, Kim I W, et al. A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity [J]. Science, 2007, 315(5811): 525-528.