

中国美利奴羊（新疆军垦型）核因子 I/B 基因的克隆及表达

荣恩光¹, 于磊¹, 杨华², 张永胜³, 马春萍³, 李辉¹, 王宁¹

(¹东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; ²新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 新疆石河子 832000; ³新疆西部牧业股份有限公司, 新疆石河子 832000)

摘要: 【目的】研究绵羊核因子 I/B (nuclear factor I/B, NFIB) 基因的组织表达规律, 并克隆中国美利奴羊 (新疆军垦型) NFIB 基因的全长编码区 (coding sequence, CDS 区) 序列。【方法】采用半定量 RT-PCR 的方法分析 NFIB 基因的组织表达谱和皮肤表达特性, 利用 RT-PCR 扩增绵羊 NFIB 基因的全长 CDS 区、克隆测序, 并进行序列分析。【结果】①NFIB 基因在绵羊多种内脏器官和皮肤组织中都有着不同程度的表达, 且在皮肤组织中表达较高; NFIB 基因在超细毛品系体表不同部位皮肤组织中的表达水平不存在显著性差异 ($P > 0.05$); 同时在 6 个不同品系/品种绵羊体侧部皮肤组织中的表达水平也不存在显著性差异 ($P > 0.05$); 超细毛品系绵羊皮肤组织 NFIB 基因的表达水平在不同季节存在显著性差异 ($P < 0.05$); ②绵羊 NFIB 基因编码区至少存在 3 种剪接形式, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的长度依次为 1 263、1 128 和 1 038 bp, 分别编码 420、375 和 345 个氨基酸。【结论】中国美利奴羊 (新疆军垦型) NFIB 基因在皮肤组织中的表达量较高, 其在超细毛品系羊体侧部皮肤组织中的表达量具有显著的季节性差异; 绵羊 NFIB 基因至少可以编码 3 种不同的蛋白剪接体 (protein isoform)。

关键词: NFIB 基因; 基因表达; 中国美利奴羊; 基因克隆; 蛋白剪接体; 超细毛品系

Characterization of Tissue Expression and Cloning of Nuclear Factor I/B Gene in Chinese Merino (Xinjiang Junken Type)

RONG En-guang¹, YU Lei¹, YANG Hua², ZHANG Yong-sheng³, MA Chun-ping³, LI Hui¹, WANG Ning¹

(¹College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; ²Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science, Shihezi 832000, Xinjiang; ³Xinjiang Western Animal Husbandry Co. Ltd, Shihezi 832000, Xinjiang)

Abstract: 【Objective】The objective of this study was to explore the expression level of nuclear factor I/B gene in various sheep tissues, and clone the full-length coding sequence (CDS) of sheep NFIB gene in Chinese Merino (Xinjiang Junken type). 【Method】Tissue expression profile of NFIB gene was detected by semi-quantitative reverse transcription PCR (SqRT-PCR). The full-length CDS region of NFIB gene was amplified by RT-PCR, cloned into T vector, and sequenced. The sequence was analyzed by using bioinformatics software. 【Result】SqRT-PCR analysis showed that the NFIB gene was ubiquitously expressed in sheep internal organs and skin with different degrees. Comparatively, it was highly expressed in skin. The skin expression of NFIB gene in super fine wool strain had significant difference in different seasons ($P < 0.05$), but no significant difference in skins from various anatomic locations. There was no significant difference in the NFIB gene expression of body side skin among the 6 sheep strains/breeds ($P > 0.05$). Sequence analysis indicated that the sheep NFIB gene generated three NFIB protein isoforms of 420, 375 and 345 aa by alternative splicing. 【Conclusion】NFIB gene is highly expressed in the skin of Chinese Merino (Xinjiang Junken type), and its expression in the skin of super fine wool strain has significant difference in different seasons. Sheep NFIB has at least three protein

收稿日期: 2012-03-05; 接受日期: 2012-05-18

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08009-160B, 2011ZX08009-002)

联系方式: 荣恩光, E-mail: reg3641024@163.com. 通信作者李辉, E-mail: lihui@neau.edu.cn; 通信作者王宁, E-mail: ningwang2001@yahoo.com

isoforms. This study not only has laid a foundation for clarifying the function of sheep NFIB gene, but also provided a theoretical basis for creating high quality merino sheep.

Key words: NFIB gene; gene expression; Chinese merino; gene cloning; protein isoform; super fine wool strain

0 引言

【研究意义】经过多年努力,中国成功培育出了中国美利奴羊(新疆军垦型)A品系、B品系、超细毛品系、肉用多胎品系及毛用多胎品系共5个品系。这些品系的育成为中国细毛羊业的发展做出了巨大贡献。同时,各品系之间在毛用和肉用性状上具有显著的差异,为开展细毛羊品质和生长等相关基因的功能研究提供了良好的试验材料^[1]。核因子 I/B (nuclear factor I/B, NFIB) 基因以其在调控基因表达以及组织发育等方面的作用而受到关注,开展 NFIB 基因在中国美利奴羊(新疆军垦型)中的表达和克隆研究不但有助于阐明该基因在绵羊生长发育、毛囊发育以及羊毛生产中的作用,而且对优质细毛羊的培育工作也具有重要意义。【前人研究进展】NFIB 是转录因子 NFI 家族中的一员,该家族由 NFIA、NFIB、NFIC 及 NFIX 共 4 个成员组成,它们在脊椎动物中的表达模式异常复杂。在组织中,一般首先表达其中的一个成员,而后共表达其它成员,因此 NFI 家族各成员间的组织表达存在重叠现象。NFI 转录因子家族的 4 个成员对胚胎发育都具有重要作用^[2]。NFI 蛋白的 N 端具有高度保守的结构域,由 220 个氨基酸组成,主要参与 DNA 结合、二聚化以及起始 DNA 复制等^[3-4]。NFI 家族蛋白的差异主要体现在其 C 端所形成的结构域,该结构域主要参与转录调节功能。由于选择性拼接,NFI 家族蛋白存在不同的剪接体^[5]。Osada 等^[6]在许多物种中都发现了 NFI 家族 4 个成员多种类型的剪接变体。Gronostajski 等^[7]发现,这些蛋白剪接体在生物体内可能发挥不同的生物学功能。Chaudhry 等^[2]通过试验证实,NFIB 基因在小鼠的肺、肝脏、心脏等多种组织中都存在高度表达。Steele-Perkins 等^[8-9]发现,NFIB 基因敲除鼠表现出严重的肺发育不全,并且伴随着脑及其它组织的发育缺陷,在出生后不久死亡。Moon 等^[10]认为,在乳腺癌 HCC1954 细胞中,干扰 NFIB 基因的表达会显著降低细胞的增殖能力,并促进细胞凋亡,最终证明 NFIB 基因对于治疗雌激素受体阴性乳腺癌 (estrogen receptor-negative breast cancers) 具有潜在的作用。中国学者丁振华等^[11]利用报告基因技术证明了 NFIB 基因是 miR-365 的靶基因,并能在细胞凋亡方

面发挥效应。Perez-Casellas 等^[12]研究发现,NFIB 可以直接激活 IGFBP5 基因的启动子活性,从而调节成骨细胞的增殖和分化,对骨形成也发挥着重要作用。最近,Dooley 等^[13]认为,NFIB 基因是一个癌基因,并与人和小鼠的小细胞型肺癌 (SCLC) 的形成密切相关。由此可见,NFIB 在调节基因表达、DNA 复制以及细胞增殖和组织发育等多方面具有广泛的生物学作用^[14-16]。【本研究切入点】NFIB 基因在细胞增殖、凋亡以及组织发育中发挥着不可替代的作用。目前,有关 NFIB 基因的研究主要集中在人和鼠上,畜禽 NFIB 基因的序列和结构鲜有研究报道,更没有羊 NFIB 基因在皮肤以及毛囊发育过程中的研究报道。笔者对中国美利奴细毛羊全基因组关联分析的研究发现,NFIB 基因与绵羊羊毛细度、卷曲度等品质性状密切相关。同时,模式动物的研究发现,NFIB 基因可能参与毛囊周期的调控^[17]。【拟解决的关键问题】本文对绵羊 NFIB 基因的表达和克隆进行分析,验证笔者的全基因组关联分析结果,希望为阐明绵羊 NFIB 基因的功能以及开展优质细毛羊的育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

试验于 2011 年 5—12 月在新疆农垦科学院畜牧兽医研究所完成。

1.1 试验材料

分别以中国美利奴羊(新疆军垦型)超细毛品系、毛用多胎品系、A 品系、B 品系、肉用多胎品系及新疆哈萨克羊(粗毛羊)各 3 只为试验材料。采集超细毛品系 5、8 和 10 月这 3 个月的体侧部皮肤组织,屠宰后采集超细毛品系体侧部、肩部、腹部、股部、背部 5 个部位的皮肤组织及骨骼肌、小肠等 11 种内脏组织;同时,采集中国美利奴羊其它 4 个品系(毛用多胎品系、A 品系、B 品系和肉用多胎品系)及哈萨克羊的体侧部皮肤组织,所有组织样于液氮中冻存备用。所有试验羊只均为母羊,相同条件下饲养,屠宰时均处于 20 月龄。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计及合成 以欧洲牛 (*Bos taurus*) NFIB 基因 mRNA 序列 (NM_001076104) 为模板设计的表达检测分析引物 F1 为:(361 bp)TGTATTCTCCC

ATCTGTCTCACTCA(385 bp); R1 为(572 bp)CCAC TTCTGTTTGAATTCAGGCTT(549 bp)。选择 GAPDH 基因作为内参基因,以绵羊(*Ovis aries*) GAPDH 基因 mRNA 序列(NM_001190390)为模板设计的表达检测分析引物 F2 为:(766 bp)CTGACCTGCCGCC TGGAGAAA(787 bp); R2 为(914 bp)GTAGAAGAGT GAGTGTCTGCTGTT(892 bp)。以欧洲牛(*Bos taurus*) NFIB 基因 mRNA 序列(NM_001076104)为模板设计的 NFIB 基因全长 CDS 区的克隆引物 F3 为:(350 bp)CGAAGTCATGATGTATTCTCCCA(372 bp); R3 为:(1 657 bp)GGATGGGTGTCCTATTTGATACTTG (1 633 bp)。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2.2 组织总 RNA 的提取及反转录 PCR 组织总 RNA 的提取按照 Trizol (Invitrogen, Rockville, MD) 试剂盒说明书操作,所得总 RNA 经 1% 甲醛变性凝胶电泳分析合格后进行反转录。反转录 PCR 按照 Promega Improm-II (Promega, Madison, WI, USA) 试剂盒说明书两步法进行操作。第一步反应液包含 RNA 样品 1.0 μg 、Oligo-dT primer 0.5 μL 、用 RNase free water 补至 5 μL ; 反应条件: 70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、冰浴 5 min, 破坏 RNA 的二级结构。第二步反应液总体积为 15 μL , 包含 ImProm-IITM Buffer 4.0 μL 、 MgCl_2 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.5 μL 、dNTP Mixture (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.0 μL 、RNase Inhibitor (40 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、ImProm-IITM Reverse Transcriptase 1.0 μL 、RNase free water 6.0 μL ; 反应条件: 25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min、70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 5 $^{\circ}\text{C}$ 保温。反转录合成的 cDNA 立即进行 PCR 扩增,用混合模板(各组织 cDNA 等比例混合)分别对 NFIB 基因和 GAPDH 基因的 PCR 扩增条件及循环次数进行优化。其中,PCR 体系为 2 \times Taq PCR MasterMix 5 μL (天根,北京),上、下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 0.4 μL , cDNA 1 μL , 补加去离子水至 10 μL 。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 循环数待定; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应 7 min。最佳循环数时内参基因和目的基因产物均在指数增长期内。试验 3 次,独立重复。

1.2.3 电泳及数据分析 分别取内参基因和目的基因的 PCR 产物各 4 μL , 在 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳。电泳结束后用凝胶成像系统拍照,用 Quantity ID 图像分析软件分析条带灰度值,将目的基因与内参基因条带灰度值求比值,以确定目的基因在各组织中相对于内参基因表达量的相对值。NFIB 基因在不同组织中的

相对表达量数据用统计软件 SPSS 13.0 的 ANOVA 进行分析,并采用 Duncan 氏方法进行多重比较。

1.2.4 绵羊 NFIB 基因 CDS 区的克隆及生物信息学分析 以绵羊不同组织 cDNA 为模板,利用高保真 Taq DNA 聚合酶对绵羊 NFIB 基因全长 CDS 区进行扩增。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 72 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应 7 min。目的片段回收后连接到 pMD-18T 载体上,克隆测序。利用 DNAMAN 和 clustalx 1.83 等软件分别对人、鼠、牛的 NFIB 基因进行比对,分析其在核苷酸和相应氨基酸序列上的同源性;利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 程序对得到的 cDNA 序列进行开放阅读框检测;利用蛋白结构预测和功能分析工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白质结构;利用在线 UCSC 基因组浏览器 (<http://genome.ucsc.edu/>) 分析基因结构;利用 ProtParam 在线工具 (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 推测蛋白质的氨基酸组成、等电点、理论分子质量等;蛋白二级结构及磷酸化预测使用 CBS 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>),并在 EXPASY 网站上 (<http://expasy.org/tools/>) 对该基因进行 3 维结构预测。

2 结果

2.1 组织总 RNA 的质量检测及 RT-PCR 条件优化

所有组织样品总 RNA 经 1% 甲醛变性凝胶电泳后,均可见清晰的 28S 和 18S 两条带,两者比例接近 2:1,并且 5S 条带亮度微弱,可以用于基因组织表达谱的分析。经过 RT-PCR 扩增后,用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,GAPDH 基因和 NFIB 基因的扩增片段大小分别与预期的 149 和 212 bp 一致;GAPDH 基因的 PCR 最佳循环数为 28,NFIB 基因的 PCR 最佳循环数为 30。

2.2 绵羊 NFIB 基因组织表达分析

2.2.1 NFIB 基因在不同组织中的表达 采集 3 只中国美利奴羊(新疆军垦型)超细毛品系 12 种不同组织进行半定量 RT-PCR 检测,结果表明 NFIB 基因在绵羊 12 种组织中都存在着不同程度的表达(图 1-A);其中,在肺中的表达量最高,卵巢中的表达量最低;相比之下,NFIB 基因在皮肤等其它组织中均处于较高的表达水平(图 2-A)。

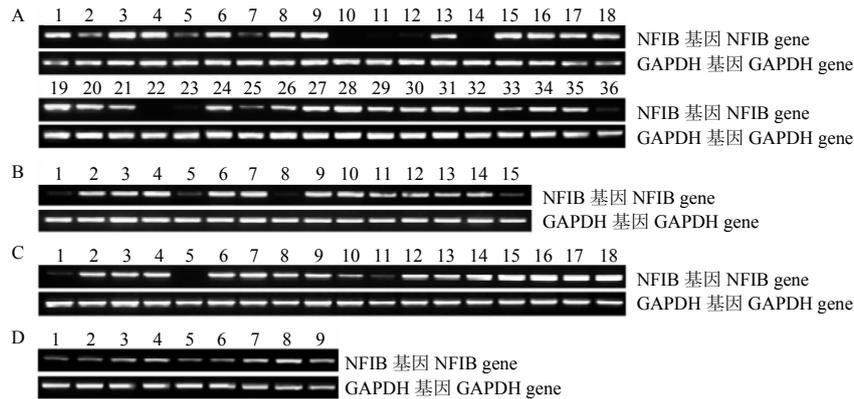
2.2.2 NFIB 基因在不同部位皮肤组织中的表达 采集 3 只中国美利奴羊(新疆军垦型)超细毛品系体侧部、肩部、腹部、股部和背部共 5 个部位皮肤组织,

进行半定量 RT-PCR 试验, 结果显示 NFIB 基因在不同部位皮肤组织中均有表达 (图 1-B), 但其表达量在不同部位皮肤间没有显著性差异 ($P>0.05$, 图 2-C)。

2.2.3 NFIB 基因在不同品系/品种皮肤组织中的表达 为比较不同品系/品种皮肤组织中 NFIB 基因的表达情况, 本研究采集 15 只中国美利奴羊(新疆军垦型) 5 个品系各 3 只以及 3 只新疆哈萨克羊的体侧部皮肤组织。半定量 RT-PCR 结果表明, NFIB 基因在不同品系/品种绵羊皮肤组织中都有较高表达, 其中在哈萨克

羊中的表达量最高 (图 1-C), 但其表达量并没有与其它品种一样达到显著性差异 ($P>0.05$, 图 2-D)。

2.2.4 NFIB 基因在不同季节皮肤组织中的表达 本研究采集了 3 只超细毛品系绵羊在 5 月初 (夏初)、8 月初 (夏末) 和 10 月初 (秋末) 的体侧部皮肤组织。表达分析结果表明, 超细毛品系羊皮肤 NFIB 基因在不同季节都有较高表达 (图 1-D), 并且 NFIB 基因在 10 月份超细毛品系羊皮肤组织中的表达量显著高于 5 月和 8 月 ($P<0.05$, 图 2-B)。



A: NFIB 基因在超细毛品系不同器官和组织的表达检测; 1—3: 皮肤; 4—6: 骨骼肌; 7—9: 小肠; 10—12: 卵巢; 13—15: 心脏; 16—18: 肺; 19—21: 肝脏; 22—24: 脾脏; 25—27: 垂体; 28—30: 肾脏; 31—33: 瘤胃; 34—36: 松果体。B: NFIB 基因在超细毛品系不同部位皮肤中的表达; 1—3: 体侧部皮肤; 4—6: 肩部皮肤; 7—9: 腹部皮肤; 10—12: 股部皮肤; 13—15: 背部皮肤。C: NFIB 基因在不同品系/品种皮肤中的表达; 1—3: 超细毛品系; 4—6: A 品系; 7—9: B 品系; 10—12: 肉用多胎品系; 13—15: 毛用多胎品系; 16—18: 哈萨克羊。D: NFIB 基因在不同季节皮肤中的表达情况; 1—3: 5 月; 4—6: 8 月; 7—9: 10 月。每个组织均有 3 个生物学重复

A: The expression of NFIB gene in various sheep tissues of super fine wool strain; 1—3: Skin; 4—6: Skeletal muscle; 7—9: Small intestine; 10—12: Ovary; 13—15: Heart; 16—18: Lung; 19—21: Liver; 22—24: Spleen; 25—27: Pituitary gland; 28—30: Kidney; 31—33: Rumen; 34—36: Pineal gland. B: The expression of NFIB gene in skins from various anatomic locations of super fine wool strain; 1—3: Body side skin; 4—6: Shoulder skin; 7—9: Ventral skin; 10—12: Thigh skin; 13—15: Dorsal skin. C: The expression of NFIB gene in skins of the six strains/breeds; 1—3: Super fine wool strain; 4—6: A strain; 7—9: B strain; 10—12: Prolific wool strain; 13—15: Prolific meat strain; 16—18: Kazak sheep. D: The skin expression of NFIB gene in super fine wool strain in different seasons; 1—3: May; 4—6: August; 7—9: October. For every tissue, three biological replicates were used

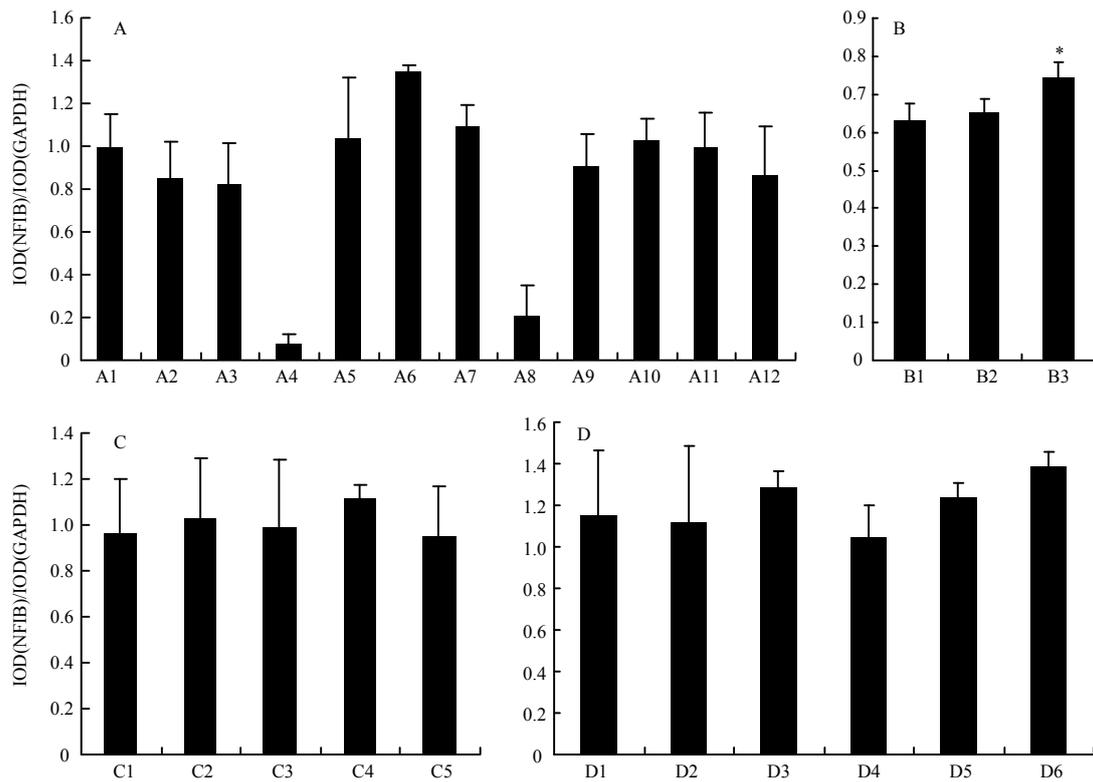
图 1 NFIB 基因在绵羊不同组织中的半定量表达

Fig. 1 SqRT-PCR of NFIB gene in various sheep tissues

2.3 绵羊 NFIB 基因全长 CDS 区的克隆及序列分析

分别以绵羊不同组织 cDNA 为模板, 利用引物(F3 和 R3) 扩增绵羊 NFIB 基因的全长 CDS 区, 然后进行克隆测序。分别从绵羊皮肤、肺、心脏等组织中仅扩增到一种全长 CDS 区片段, 其大小为 1 263 bp; 而在绵羊子宫和卵巢组织中却分别同时扩增到两个片段, 其中子宫中扩增的 NFIB 基因 CDS 区片段大小分别为 1 263 和 1 128 bp; 卵巢中扩增的 NFIB 基因 CDS 区片段大小分别为 1 263 和 1 038 bp。将克隆到的 1 128、1 038 和 1 263 bp 这 3 种序列提交至 GenBank, 基因登录号依次为 JQ348896、JQ348897 和 JQ348895。

序列分析发现, 序列 JQ348896 比序列 JQ348895 恰好缺失 135 bp, 序列 JQ348897 比序列 JQ348895 恰好缺失 225 bp, 其余部分完全相同。同时, 将序列 JQ348895 作进一步分析发现, 其与人 (NM_005596.3)、鼠 (NM_008687.5)、牛 (NM_001190390) NFIB 基因编码区的同源性依次为 97.15%、92.79%和 98.81%。由此可知, 笔者克隆到的 3 条序列为 NFIB 基因编码区的不同剪接变体, 并且 NFIB 基因在物种间高度保守。利用 ORF 在线分析发现, 序列 JQ348896、JQ348897 和 JQ348895 均以 ATG 作为起始编码子, TAG 作为终止编码子, 可编码 3 个大小不同的蛋白,



A: NFIB 基因在不同器官和组织中的定量表达; A1: 皮肤; A2: 骨骼肌; A3: 小肠; A4: 卵巢; A5: 心脏; A6: 肺; A7: 肝脏; A8: 脾脏; A9: 垂体; A10: 肾脏; A11: 瘤胃; A12: 松果体。B: NFIB 基因在超细毛品系不同季节皮肤中的定量表达; B1: 5 月份; B2: 8 月份; B3: 10 月份。C: NFIB 基因在超细毛品系不同部位皮肤中的定量表达; C1: 体侧部皮肤; C2: 肩部皮肤; C3: 腹部皮肤; C4: 股部皮肤; C5: 背部皮肤。D: NFIB 基因在不同品系/品种皮肤中的定量表达; D1: 超细毛品系; D2: A 品系; D3: B 品系; D4: 肉用多胎品系; D5: 毛用多胎品系; D6: 哈萨克羊。* $P < 0.05$

A: The relative quantification of NFIB gene expression in various organs and tissues of super fine wool strain; A1: Skin; A2: Skeletal muscle; A3: Small intestine; A4: Ovary; A5: Heart; A6: Lung; A7: Liver; A8: Spleen; A9: Pituitary gland; A10: Kidney; A11: Rumen; A12: Pineal gland. B: The relative quantification of NFIB gene expression in skin of super fine wool strain in different seasons; B1: May; B2: August; B3: October. C: The relative quantification of NFIB gene expression in skins from various anatomic locations of super fine wool strain; C1: Body side skin; C2: Shoulder skin; C3: Ventral skin; C4: Thigh skin; C5: Dorsal skin. D: The relative quantification of NFIB gene expression in skins of the 6 sheep strains/breeds; D1: Super fine wool strain; D2: A strain; D3: B strain; D4: Prolific wool strain; D5: Prolific meat strain; D6: Kazak sheep. * $P < 0.05$

图 2 NFIB 基因在绵羊不同器官和组织中的相对表达量

Fig. 2 The relative quantification of NFIB gene expression in various sheep organs and tissues

依次为蛋白剪接体 1 (protein isoform 1, 375 个氨基酸)、蛋白剪接体 2 (protein isoform 2, 345 个氨基酸) 和蛋白剪接体 3 (protein isoform 3, 420 个氨基酸) (图 3-A)。氨基酸序列分析发现, NFIB 的 protein isoform 1 比 protein isoform 3 缺失 45 个氨基酸; protein isoform 2 比 protein isoform 3 缺失 75 个氨基酸 (图 3-A)。绵羊 NFIB 3 个蛋白剪接体都具有 DNA 结合结构域 (Arg37-Arg48) (图 3-A)。SMART 分析显示, 与 protein isoform 3 相比, protein isoform 1 缺失部分 CTF_NF1 结构域; 而 protein isoform 2 则缺失完整的 DWA 结构域, 该结构域磷酸化后可以对 TGF- β 产生应答反应, 并与细胞增殖密切相关^[18-19] (图 3-B)。利用 UCSC 基因组浏览器分析发现, 绵羊 NFIB 基因

JQ348895、JQ348896 和 JQ348897 都位于 2 号染色体的 87 331 279—87 584 352 区域内, 并且内含子的剪接供体形式均符合经典的 GT-AG 法则。此外, 绵羊 NFIB 基因 (JQ348895) 的编码区由 8 个外显子组成 (图 3-C), 其中第 7 外显子恰好编码 protein isoform 1 缺失的 45 个氨基酸, 造成其部分 CTF_NF1 结构域缺失; 部分第 2 外显子恰好编码 protein isoform 2 缺失的 75 个氨基酸, 造成其完整的 DWA 结构域缺失 (图 3-A、3-B 和 3-C)。

对 protein isoform 3 的蛋白预测结果表明, 绵羊 NFIB 基因 (JQ348895) 编码蛋白的分子质量约 47 kD, 等电点为 9.01, 无信号肽区域, 无蛋白跨膜结构。此外, 分析发现 NFIB 的 protein isoform 3 可能存在 41

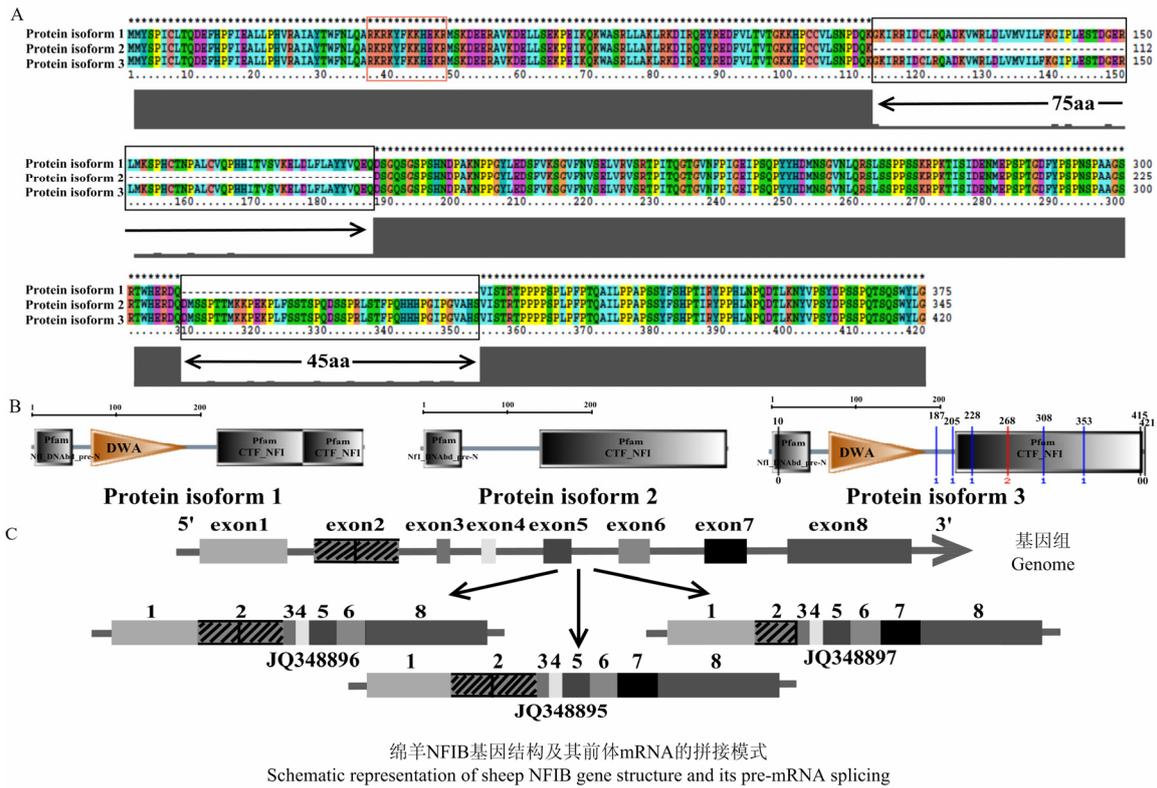


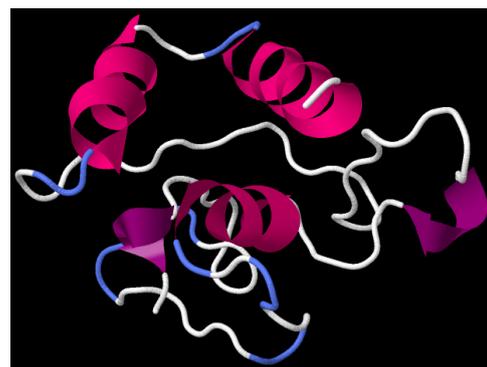
图3 绵羊NFIB基因的序列

Fig. 3 Sequence of sheep NFIB gene

个磷酸化位点（丝氨酸36个、苏氨酸5个和酪氨酸4个）；对NFIB的二级结构预测结果显示，NFIB暴露在外部的水溶性氨基酸比例为51.7%，并且二级结构中 α 螺旋占25.7%， β 转角占4.0%，无规卷曲占65.2%，延伸链占5.1%。由此可见，protein isoform 3的主要结构元件是无规卷曲和 α 螺旋，其它元件在整个蛋白分子中零星分布；从3级结构中也可看出NFIB蛋白包含了3处 α 螺旋区和2处 β 转角区（图4）。

3 讨论

笔者在对中国美利奴细毛羊的全基因组关联分析中发现，NFIB基因与羊毛细度性状以及卷曲度性状都存在显著相关。但是绵羊NFIB基因的表达、基因结构以及序列等尚不清楚，因此开展了NFIB基因的克



“粉红色”代表“ α 螺旋”，“紫色”代表“ β 转角”
“Pink” represents “alpha helix”, “Purple” represents “beta strand”

图4 绵羊NFIB蛋白剪接体3的三级结构预测

Fig. 4 Tertiary structure prediction of sheep NFIB protein isoform 3

隆及该基因在绵羊皮肤等多种组织中时空表达规律的研究。

NFIB 基因的组织表达分析显示, NFIB 基因在绵羊肺、肝脏、心脏等多种组织中都能高度表达,但在卵巢、脾脏中的表达量很低,此结果与在鼠^[2]上的报道一致。目前, NFIB 基因在皮肤和毛囊的表达情况尚无相关报道。笔者发现, NFIB 基因在绵羊皮肤组织中有较高表达。笔者查询 NCBI 的 GEO DataSet 数据库的数据(GDS912)后发现, NFIB 基因在鼠毛囊生长期早期的表达量最高,此时也是毛囊细胞增殖最旺盛的时期;而后毛囊经历生长期中期、生长期晚期进入退行期, NFIB 基因的表达量逐渐降低,这期间毛囊细胞的增殖能力减弱;当经历休止期后,毛囊再次进入下一个周期,毛囊细胞的增殖能力恢复, NFIB 基因的表达量也逐渐上升至最高水平^[17]。NFIB 基因在小鼠毛囊发育过程中的这种表达模式提示,该基因在毛囊细胞增殖中发挥作用,而 NFIB 基因在绵羊皮肤中高表达也在一定程度上支持笔者的全基因组关联分析结果。此外,从对人和小鼠的研究得知, NFIB 基因在细胞增殖、凋亡和组织发育等方面具有广泛的作用^[14-16], NFIB 基因敲除鼠会引起肺表皮以及间充质细胞形态异常,同时伴随细胞增殖和凋亡发生变化^[9]。毛囊同样也是由上皮细胞和间充质细胞构成^[20]。笔者推测,绵羊 NFIB 基因在调控皮肤和毛囊细胞增殖/凋亡以及维持毛囊细胞形态方面发挥重要作用。

动物体表不同部位的毛囊形态以及毛干长度、细度、卷曲等性状并不完全相同^[21-22]。为进一步探究 NFIB 基因在皮肤中的表达特性,笔者采集了超细毛品系不同部位的皮肤组织以及细毛羊(中国美利奴羊)和粗毛羊(新疆哈萨克羊)两个品种的皮肤组织样品。发现 NFIB 基因在超细毛品系羊不同部位皮肤中的表达没有显著性差异;在 6 个不同品系/品种羊体侧部皮肤中的表达也不存在显著性差异。其原因可能是,不同部位、不同品系/品种羊 NFIB 基因在 mRNA 水平的表达确实没有差异,但它们的蛋白水平表达或蛋白修饰却存在差异^[23]。在今后的工作中,笔者需要开展该基因在皮肤中的免疫组化以及蛋白表达和蛋白修饰的分析。

为深入探究 NFIB 基因在毛囊发育中的作用,针对新疆的地域特点,笔者采集了区分相对比较明显的、不同季节的超细毛品系羊体侧部皮肤组织。结果发现, NFIB 基因在皮肤中的表达存在显著的季节性差异。对

细毛羊的研究发现,季节对绵羊毛囊的发育和毛发生长均有明显的作用,即在夏秋季羊毛纤维长度的增长速度、净毛生长率和纤维直径及断裂强度均达到一年中的最大^[24-25];同时,对内蒙古绒山羊的研究表明,次级毛囊受到光周期的影响也呈很强的季节性变化,绒山羊毛囊生长期为 4—11 月,这期间伴随许多细胞的增殖/凋亡以及许多基因的表达变化^[26]。尽管美利奴羊的毛囊形态可能会受到年龄等因素影响,但研究表明,美利奴羊的毛囊主要处在生长期(其生长期可长达 2 年以上)^[21]。因此,在本研究中笔者推测,绵羊 NFIB 基因在不同季节皮肤中的表达差异主要受光照、温度等季节性因素的影响,并有可能反映不同季节毛囊细胞的增殖差异情况。NFIB 基因在不同季节的差异表达提示, NFIB 在毛囊发育和毛发生长中发挥作用,与笔者的全基因组关联分析结果一致。

此外,本研究首次克隆到了绵羊 NFIB 基因的全长 CDS 区序列,并首次报道了绵羊 NFIB 基因的 3 种蛋白剪接体。本研究所发现的 NFIB 基因的 3 种剪接形式不同于在人和小鼠上已发现的剪接类型^[4,6,15],既非提前转录又非延后终止,都是序列内部区域的剪接缺失。综合分析目前 NFIB 基因在其它物种中所报道的剪接类型,发现绵羊 NFIB 基因的不同剪接形式可能具有物种或组织特异性。SMART 分析结果显示,绵羊 NFIB 3 种蛋白剪接体都具有完整的 Nfl_DNAbd_pre-N 结构域,该结构域包含 DNA 结合区和二聚体化功能区。因此,笔者推测,绵羊 NFIB 不同蛋白剪接体很可能以同源和异源二聚体的形式在不同组织或细胞中发挥作用^[3];此外,分析还发现,这 3 种蛋白剪接体之间同时存在天然的结构域构成差异;其中,CTF_NF1 和 DWA 都是 NF1 家族的特征性结构域,它们在转录激活、DNA 复制以及细胞增殖等多方面发挥重要作用^[18-19,27]。绵羊的这些 NFIB 蛋白剪接体的发现为开展 NFIB 基因在皮肤等多种组织中的功能研究奠定了基础。

4 结论

4.1 中国美利奴羊(新疆军垦型) NFIB 基因在绵羊多种组织中都有不同程度地表达,其中在皮肤中的表达处于较高水平;

4.2 超细毛品系皮肤组织中 NFIB 基因的表达存在显著的季节性差异;

4.3 绵羊 NFIB 基因 mRNA 存在选择性拼接, NFIB 至少有 3 种独特的蛋白剪接体。

References

- [1] 杨 华, 杨永林, 刘守仁, 王 宁, 李 辉, 石国庆, 张永胜, 冯静. 中国美利奴羊(新疆军垦型)品系间羊毛理化性能及性状相关分析. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(6): 37-40.
- Yang H, Yang Y L, Liu S R, Wang N, Li H, Shi G Q, Zhang Y S, Feng J. Correlation analysis of the physical and chemical properties of wool among strains of Chinese Merino (Xinjiang Junken type). *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2011, 38(6): 37-40. (in Chinese)
- [2] Chaudhry A Z, Lyons G E, Gronostajski R M. Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Developmental Dynamics*, 1997, 208(3): 313-325.
- [3] Kruse U, Sippel A E. Transcription factor nuclear factor I proteins form stable homo- and heterodimers. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1994, 348(1): 46-50.
- [4] Goyal N, Knox J, Gronostajski R M. Analysis of multiple forms of nuclear factor I in human and murine cell lines. *Molecular and Cellular Biology*, 1990, 10(3): 1041-1048.
- [5] Kruse U, Sippel A E. The genes for transcription factor nuclear factor I give rise to corresponding splice variants between vertebrate species. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 238(5): 860-865.
- [6] Osada S, Imagawa M, Nishihara T. Organization of gene structure and expression of nuclear factor I family in rat. *DNA Sequence*, 2005, 16(2): 151-155.
- [7] Gronostajski R M. Roles of the NF1/CTF gene family in transcription and development. *Gene*, 2000, 249(1/2): 31-45.
- [8] Steele-Perkins G, Plachez C, Butz K G, Yang G, Bachurski C J, Kinsman S L, Litwack E D, Richards L J, Gronostajski R M. The transcription factor gene Nfib is essential for both lung maturation and brain development. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(2): 685-698.
- [9] Grunder A, Ebel T T, Mallo M, Schwarzkopf G, Shimizu T, Sippel A E, Schrewe H. Nuclear factor I-B (Nfib) deficient mice have severe lung hypoplasia. *Mechanisms of Development*, 2002, 112(1/2): 69-77.
- [10] Moon H G, Hwang K T, Kim J A, Kim H S, Lee M J, Jung E M, Ko E, Han W, Noh D Y. NFIB is a potential target for estrogen receptor-negative breast cancers. *Molecular Oncology*, 2011, 5(6): 538-544.
- [11] 丁振华, 郭 玲, 郑 莉, 吕 超, 何英杰. Hsa-miR-365 在 UVB 诱导 HaCaT 凋亡中的作用及靶基因 NFIB 的验证. *生物物理学报*, 2009, 16(25): 147-148.
- Ding Z H, Guo L, Zheng L, Lü C, He Y J. The role of Hsa-miR-365 in HaCaT apoptosis induced by UVB and the validation of target genes of NFIB. *Acta Biophysica Sinica*, 2009, 16(25): 147-148. (in Chinese)
- [12] Perez-Casellas L A, Wang X, Howard K D, Rehage M W, Strong D D, Linkhart T A. Nuclear factor I transcription factors regulate IGF binding protein 5 gene transcription in human osteoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1789(2): 78-87.
- [13] Dooley A L, Winslow M M, Chiang D Y, Banerji S, Stransky N, Dayton T L, Snyder E L, Senna S, Whittaker C A, Bronson R T, Crowley D, Barretina J, Garraway L, Meyerson M, Jacks T. Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer. *Genes Development*, 2011, 25(14): 1470-1475.
- [14] de Jong R N, van der Vliet P C. Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene*, 1999, 236(1): 1-12.
- [15] Grunder A, Qian F, Ebel T T, Mincheva A, Lichter P, Kruse U, Sippel A E. Genomic organization, splice products and mouse chromosomal localization of genes for transcription factor nuclear factor one. *Gene*, 2003, 304: 171-181.
- [16] Hsu Y C, Osinski J, Campbell C E, Litwack E D, Wang D, Liu S, Bachurski C J, Gronostajski R M. Mesenchymal nuclear factor I B regulates cell proliferation and epithelial differentiation during lung maturation. *Developmental Biology*, 2011, 354(2): 242-252.
- [17] Lin K K, Chudova D, Hatfield G W, Smyth P, Andersen B. Identification of hair cycle-associated genes from time-course gene expression profile data by using replicate variance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(45): 15955-15960.
- [18] Kim J, Johnson K, Chen H J, Carroll S, Laughon A. Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by decapentaplegic. *Nature*, 1997, 388(6639): 304-308.
- [19] Yingling J M, Das P, Savage C, Zhang M, Padgett R W, Wang X F. Mammalian dwarfins are phosphorylated in response to transforming growth factor beta and are implicated in control of cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(17): 8940-8944.
- [20] Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *New England Journal of Medicine*, 1999, 341(7): 491-497.
- [21] Galbraith H. Fundamental hair follicle biology and fine fibre production in animals. *Animal*, 2010, 4(09): 1490-1509.
- [22] Schlake T. Determination of hair structure and shape. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2007, 18(2): 267-273.
- [23] Ideker T, Thorsson V, Ranish J A, Christmas R, Buhler J, Eng J K, Bumgarner R, Goodlett D R, Aebersold R, Hood L. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed

- metabolic network. *Science*, 2001, 292(5518): 929-934.
- [24] 汪诗平, 王艳芬, 陈佐忠. 影响内蒙古细毛羊羊毛生产的主要因素. 草业学报, 2001, 10(2): 78-86.
Wang S P, Wang Y F, Chen Z Z. The factors influencing wool production of Inner Mongolia Fine sheep. *Acta Prataculturae Sinica*, 2001, 10(2): 78-86. (in Chinese)
- [25] 李 勇, 狄 江, 拉扎提, 李武臣, 陈为江, 苏爱国. 超细型羊毛季节性生长规律研究. 家畜生态学报, 2008, 29(5): 36-38.
Li Y, Di J, Lazhati, Li W C, Chen W J, Su A G. Study on seasonal growth of super fine wool. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2008, 29(5): 36-38. (in Chinese)
- [26] 刘志红, 任立明, 郭 英, 胡晓湘, 崔文涛, 李 宁, 尹 俊, 李金泉. 毛囊的周期性变化和分子调控及其在绒山羊上的研究进展. 中国畜牧兽医, 2009, 36(4): 103-107.
Liu Z H, Ren L M, Guo Y, Hu X X, Cui W T, Li N, Yin J, Li J Q. The cyclical variation and regulation of hair follicles and the study on cashmere goat. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2009, 36(4): 103-107. (in Chinese)
- [27] Gaussin A, Modlich U, Bauche C, Niederlander N J, Schambach A, Duros C, Artus A, Baum C, Cohen-Haguenuer O, Mermod N. CTF/NF1 transcription factors act as potent genetic insulators for integrating gene transfer vectors. *Gene Therapy*, 2012, 19(1): 15-24.
- (责任编辑 周晓艳)

《广东农业科学》征订启事

《广东农业科学》(半月刊)是由广东省农业科学院和华南农业大学主办的农业科技期刊,主要刊登农业各学科领域的基础理论研究成果,农业新品种、新技术等应用科学研究论文、简报,以及高水平综述或评论。设有粮食作物、经济作物、园艺园林、土壤肥料、植物保护、贮藏加工、畜牧水产、生物技术、生态环境、农业工程、产业经济、三农研究、专论·综述等栏目。2011年改为半月刊后,本刊信息量增大、发表周期缩短,使农业各学科领域的重大科研成果得到更快速广泛的宣传推广。

《广东农业科学》入选全国中文核心期刊(2011版)、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)、中国自然科学核心期刊、中国科技核心期刊、中国农业核心期刊(2010版)和中国期刊方阵双效期刊,被中国学术期刊全文数据库、万方数据-数字化期刊群、中文科技期刊数据库三大数据库,以及中文农业科技文献数据库、联合国FAO农业数据库、IRRI数据库等多个国内外权威数据库与检索系统收录。曾荣获全国优秀农业期刊一等奖、全国农业期刊金犁奖一等奖、广东省优秀期刊奖、广东省优秀科技期刊一等奖。

《广东农业科学》大16开,每月10日、25日出版,国内外公开发行,定价16元,全年定价384元,国内统一刊号CN 44-1267/S,国际标准刊号ISSN 1004-874X,邮发代号:46-43。

本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加3元。

投稿邮箱:gdnykx@vip.163.com; 投稿网址: <http://www.gdnykx.cn/>

地址:广东省广州市天河区五山金颖路31号《广东农业科学》编辑部(邮编:510640)

联系电话:(020)38319946(兼传真),38319941,38319948,38319942,38319943