

林麝、马麝及梅花鹿活化素基因 β_A 亚基成熟肽序列的克隆和分析*

邹方东 张义正 杨楠 岳碧松**

(四川大学生命科学学院, 濒危动物繁育与保护遗传四川省重点实验室 成都 610064)

摘要: 活化素(Activin)对睾丸和卵巢产生多重调节作用,对动物的繁育非常关键。本文参考已克隆的其它物种的活化素基因 β_A 亚基成熟肽序列,设计一对简并引物,通过 PCR 方法从林麝(*Moschus berezovskii*)、马麝(*Moschus chrysogaster*)和梅花鹿(*Cervus nippon*)的基因组 DNA 中直接扩增目的基因片段。将目的片段分别克隆到 pMD18-T 载体中,并进行序列测定。DNA 序列测定及分析表明,林麝、马麝和梅花鹿的活化素基因 β_A 亚基成熟肽序列长 345 bp, 三物种核苷酸序列同源性在 98% 以上,氨基酸序列同源性在 99% 以上,核酸限制性酶切图谱也高度相似。将它们与 GenBank 中已公布的其它物种的活化素序列进行比较,发现该片段在不同进化程度的物种间高度保守。这是首次从麝科动物中成功克隆与生殖相关的核基因,对麝的人工繁育及麝资源的保护利用提供了相关基础资料。

关键词: 林麝;马麝;梅花鹿;Activin 基因 β_A 亚基成熟肽克隆

中图分类号:Q754 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2004)03-22-06

Molecular Cloning and Sequence Analysis of Activin Gene β_A Subunit Mature Peptides from Forest Musk Deer, Alpine Musk Deer and Spotted Deer

ZOU Fang-Dong ZHANG Yi-Zheng YANG Nan YUE Bi-Song

(Key Laboratory for Endangered Animal Reproduction and Conservation Genetics of Sichuan Province, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Activins play very important roles in regulating the physiology of ovary and testis, and are pivotal hormones to organism's reproduction. The sequences of Activin gene β_A subunit mature peptides have been successfully amplified from Forest musk deer (*Moschus berezovskii*), Alpine musk deer (*Moschus chrysogaster*) and Spotted deer (*Cervus nippon*) genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) with a pair of degenerate primers. They were separately cloned to the vector pMD18-T and transformed into JM109 cells. Sequence analysis of Activin gene β_A subunit mature peptides demonstrated that the length of the three target fragments was 345 bp, and there were about

* 科技部重大基础前期研究专项基金资助项目(No. 2003CCA03000);

** 通讯作者, E-mail: bsyue@scu.edu.cn;

第一作者介绍 邹方东,男,33岁,博士研究生,副教授;研究方向:濒危动物分子细胞生物学及分子遗传学;E-mail: fundzou@scu.edu.cn。

收稿日期:2003-11-20,修回日期:2004-03-15

98% DNA homology and 99% amino acid homology among these three species. GenBank blast search results and restriction enzyme maps revealed that sequences of *Activin* gene β_A subunit mature peptide of different species were highly conserved during the evolution process. This is the first report describing the cloning of a reproduction related gene from musk deer.

Key words: Forest musk deer; Alpine musk deer; Spotted deer; *Activin* gene β_A subunit mature peptide cloning

麝科动物是小型偶蹄类,全球共有 1 属 5 种,包括林麝 (*Moschus berezovskii*)、原麝 (*M. moschiferus*)、马麝 (*M. chrysogaster*)、黑麝 (*M. fuscus*) 和喜马拉雅麝 (*M. leucogaster*), 主要分布在亚洲东部^[1], 我国是世界麝科动物的主要分布国, 资源量和麝香产量均占世界的 70% 左右。近年来由于栖息地破坏和过度的猎捕及贸易, 麝的资源量已经下降了近 90%, 已无法承担现在的消耗强度, 物种资源状况十分危机。1988 年, 麝被我国列为 II 级保护动物, 2002 年提升为 I 级保护动物, 这也说明麝的濒危程度越来越严重。

为了缓解麝资源日趋紧张的现状, 我国从 1958 年开始进行人工养麝, 取得了在饲养条件下繁殖和活体取香的优秀成果。但是, 由于基础研究及资金等方面的问题, 我国的圈养麝规模一直徘徊在 1 000 ~ 3 000 只左右。因此, 加大对麝的人工繁育研究, 特别是基础研究工作力度显得尤为重要。活化素由核基因编码, 属于转化生长因子 β 超家族 (TGF_β), 由 β_A 或 β_B 亚基构成同源二聚体或异源二聚体^[2]。在哺乳动物生殖系统内, 活化素能有效地促进卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 和促性腺激素释放激素 (GnRH) 的分泌活动^[3,4]。不仅如此, 活化素还能调节类固醇激素的生成、精原细胞的增殖、颗粒细胞的增殖以及滤泡细胞的发展和成熟, 对睾丸和卵巢产生多重调节作用^[5]。因此, 近年来, 活化素基因对生殖系统的功能调节成为一个新兴的研究领域。

麝香腺的泌香活动受雄性激素的调控。已有研究表明, 下丘脑-垂体-睾丸系统能调节麝香分泌, 并提高麝香产量^[6], 而活化素正是这条调节路径中很重要的调节因子。因此, 克隆活

化素基因, 为进一步研究其对麝生殖系统的调节作用、探索麝的繁育问题和提高麝香产量奠定一定的分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂 林麝、马麝、梅花鹿 (*Cervus nippon*) 的毛样由四川养麝研究所 (都江堰) 提供。限制内切酶、RNaseA、蛋白酶 K、连接酶、pMD18-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶等购自日本宝生物公司 (TaKaRa)。

1.2 毛囊基因组 DNA 的提取 收集约 300 根毛囊, 置于 EP 管中, 加入 500 μ l TEN [10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0); 1 mmol/L EDTA (pH 8.0); 100 mmol/L NaCl], 按照常规方法用蛋白酶 K 消化及酚/氯仿提取^[7]。

1.3 活化素目的基因的扩增 以林麝、马麝及梅花鹿总 DNA 为模板, 利用合成的一对简并引物进行 PCR 扩增获得目的基因片段。上游引物 (sense primer) 为: 5'-GGA(CT)T(CG)GA(AG)TG(CT)GA(CT)GG-3', 共 17 bp; 下游引物 (antisense primer) 为: 5'-GCAGGCACACTCTTC(ACGT)AC(AGT)AT-3', 共 21 bp, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。PCR 扩增体系如下: 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, dNTP 各 200 μ mol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 上下游引物各 50 ng, 模板 DNA 约 50 ng, *Taq* 酶 1 U。按如下程序进行扩增: 94 $^{\circ}$ C 4 min 后, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 PCR 产物的克隆与鉴定 PCR 产物用 DEAE 纤维素膜回收^[7], 然后与 pMD18-T 载体连接。连接反应体系和连接条件参照厂家提供的试剂盒说明书 (TaKaRa)。用 10 μ l 连接产物转化 JM109 感受态细胞, 涂布到含 100 μ g/ml 的

氨苄青霉素和 IPTG/X-gal 的培养基上。37℃ 避光培养后挑取可能含有靶基因插入片段的白色菌落,用 PCR 方法或酶切方法鉴定重组克隆。

1.5 目的基因片段的测序 核苷酸序列由测序公司采用双向测序。

1.6 序列的同源性比较和限制性酶切图谱分析 运用软件 DNAsis 对测序结果进行限制性酶切图谱分析,运用软件 DNAsis 和 GeneTool 进行物种之间序列同源性的比较。核苷酸和氨基酸序列用 DNAsis v2.5 demo 和 GeneTool 软件分析。物种间基因同源性比较和相关信息从国际互联网美国国家生物工程信息中心 (NCBI) 获得。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 取出 5 μ l PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1。扩增片段大小在 300 ~ 400 bp 之间,与预计的大小相一致。

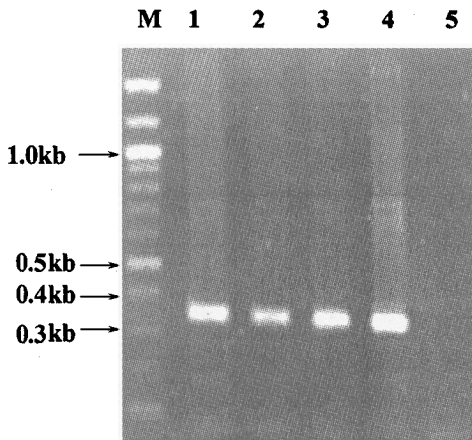


图 1 林麝、马麝和梅花鹿活化素基因 β_A 片段成熟肽序列的 PCR 扩增

M: DNA marker; 1、2: 林麝; 3: 马麝; 4: 梅花鹿; ; 5: 阴性对照

2.2 活化素基因 β_A 片段重组子的 PCR 鉴定

重组转化后,重组质粒用 PCR 方法进行扩增,琼脂糖凝胶电泳显示,在 350 bp 左右有一条扩增电泳带,与理论预期吻合较好,如图 2 所示。

2.3 序列测定与序列分析 测序结果表明,林

麝、马麝及梅花鹿活化素基因 β_A 亚基成熟肽序列均由 345 个碱基对组成,编码一个具有 115 个氨基酸残基的多肽,如图 3、4, GenBank 接收号分别是 AY271261、AY278357、AY354190。

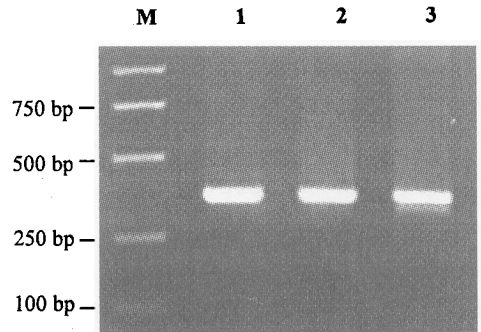


图 2 活化素基因 β_A 片段成熟肽序列重组质粒的 PCR 分析

M: DNA marker; 1: 林麝; 2: 马麝; 3: 梅花鹿

2.3.1 同源性比较 运用 DNAsis 软件分析林麝、马麝及梅花鹿活化素 β_A 亚基成熟肽序列的同源性,发现三个物种活化素 β_A 亚基成熟肽的核苷酸序列和氨基酸序列都具有很高的同源性。345 个碱基对中仅有个别不同,同源性达 98% 以上,其中林麝和马麝核苷酸同源性为 98.3%,氨基酸同源性为 99.0%。而马麝和梅花鹿核苷酸同源性为 98%,氨基酸的同源性高达 100%,结果见图 3、4。

2.3.2 限制性酶切图谱分析 运用 DNAsis 软件中提供的所有的限制性内切酶分析了林麝、马麝和梅花鹿活化素基因 β_A 亚基成熟肽核苷酸序列,发现三个物种的限制性酶切位点大致相当,约 70 个左右,且 90% 以上的酶切位点相同,但是都不含有在实验中常常使用的 *Eco*R I 和 *Hind* III 两种限制性内切酶识别位点。三个物种特有的酶切位点主要集中在序列的前 150 bp (即: 1 ~ 150 bp 区域) 和后 50 bp (即: 300 ~ 350 bp 的区域),而中间区域相对保守,核苷酸序列的变化较少。

2.4 与其它物种之间的比较 通过 GenBank 中的 BLAST,将林麝、马麝及梅花鹿活化素序列与 GenBank、EMBL 以及 DDBJ 世界三大数据库中约 31 万个基因序列进行同源性比较,结果发

现活化素(Activin) β_A 亚基成熟肽序列在不同物种之间具有高度的同源性。运用 GeneTool 软件比较林麝、马麝及梅花鹿与典型低等脊椎动物、

高等哺乳动物及人的活化素(Activin) β_A 亚基成熟肽序列之间的同源性,结果如表 1。

表 1 林麝、马麝及梅花鹿活化素 β_A 亚基成熟肽序列与其它物种同源性比较(%)

	林麝	马麝	梅花鹿	牛	马	羊	大熊猫	马来熊	人	老鼠	鸡	火鸡	蝾螈	金鱼
林麝		98.3	98.3	95.7	91.0	96.5	94.8	94.5	91.3	90.1	84.4	79.6	80.3	78.4
马麝	98.3		98.8	96.8	91.9	96.5	94.2	94.2	91.0	89.9	84.9	80.4	79.4	79.1
梅花鹿	98.3	98.8		96.2	92.2	96.5	94.2	94.2	91.0	89.6	84.1	80.0	78.8	78.8

序列分析表明,脊椎动物的活化素 β_A 亚基成熟肽具有很高的同源性,麝的氨基酸序列与

包括人在内的大量脊椎动物的 β_A 亚基成熟肽氨基酸序列之间同源性均在 90% 以上。

Consensus	GGA-T-GAGTG-GA-GGCAAGGTCAACATCTGCTGTAAGAAACAGTTCCTTTGT-AGTT	58
林麝	GGATTGGAGTGTGATGGCAAGGTCAACATCTGCTGTAAGAAACAGTTCCTTTGTAAGTT	58
马麝	GGACTGGAGTGCATGGCAAGGTCAACATCTGCTGTAAGAAACAGTTCCTTTGTTAGTT	58
梅花鹿	GGACTCGAGTGCACGGCAAGGTCAACATCTGCTGTAAGAAACAGTTCCTTTGTAAGTT	58
Consensus	TCAAGGACATTGGCTGGAATGACTGG-TCATCGCTCCCTCCGGCTACCACGCCAACTA	116
林麝	TCAAGGACATTGGCTGGAATGACTGGGTCATCGCTCCCTCCGGCTACCACGCCAACTA	116
马麝	TCAAGGACATTGGCTGGAATGACTGGATCATCGCTCCCTCCGGCTACCACGCCAACTA	116
梅花鹿	TCAAGGACATTGGCTGGAATGACTGGATCATCGCTCCCTCCGGCTACCACGCCAACTA	116
Consensus	CTGTGAGGGTGAGTGCCCCAGCCACATAGCAGGCAC-TCGGGCTCATCCCTCTCCTTC	174
林麝	CTGTGAGGGTGAGTGCCCCAGCCACATAGCAGGCACGTGGGGCTCATCCCTCTCCTTC	174
马麝	CTGTGAGGGTGAGTGCCCCAGCCACATAGCAGGCACATCGGGCTCATCCCTCTCCTTC	174
梅花鹿	CTGTGAGGGTGAGTGCCCCAGCCACATAGCAGGCACGTGGGGCTCATCCCTCTCCTTC	174
Consensus	CACTCGACCGTCATCAACCCTACCGCATGCGGGGTACAGCCCCTTCGCCAACCTCA	232
林麝	CACTCGACCGTCATCAACCCTACCGCATGCGGGGTACAGCCCCTTCGCCAACCTCA	232
马麝	CACTCGACCGTCATCAACCCTACCGCATGCGGGGTACAGCCCCTTCGCCAACCTCA	232
梅花鹿	CACTCGACCGTCATCAACCCTACCGCATGCGGGGTACAGCCCCTTCGCCAACCTCA	232
Consensus	AGTCGTGCTGTGTGCCACCAAGCTGAGACCCATGTCCATGTTGTACTATGATGATGG	290
林麝	AGTCGTGCTGTGTGCCACCAAGCTGAGACCCATGTCCATGTTGTACTATGATGATGG	290
马麝	AGTCGTGCTGTGTGCCACCAAGCTGAGACCCATGTCCATGTTGTACTATGATGATGG	290
梅花鹿	AGTCGTGCTGTGTGCCACCAAGCTGAGACCCATGTCCATGTTGTACTATGATGATGG	290
Consensus	GCAGAACATCATCAAGAAGGACATCCAGAACATGAT-GTCGAAGAGTGTGGCTGC	345
林麝	GCAGAACATCATCAAGAAGGACATCCAGAACATGATAGTCGAAGAGTGTGGCTGC	345
马麝	GCAGAACATCATCAAGAAGGACATCCAGAACATGATCGTCGAAGAGTGTGGCTGC	345
梅花鹿	GCAGAACATCATCAAGAAGGACATCCAGAACATGATCGTCGAAGAGTGTGGCTGC	345

图 3 林麝、马麝和梅花鹿活化素基因 β_A 亚基成熟肽核苷酸序列同源性分析比较

- 表示碱基差异

	10	20	30	40	50
林麝	1 GLECDGKVINI	CCKKQFFVVSF	KDIGWNDWVI	APSGYHANYC	EGECPSHIAG
马麝	1 GLECDGKVINI	CCKKQFFVVSF	KDIGWNDWII	APSGYHANYC	EGECPSHIAG
梅花鹿	1 GLECDGKVINI	CCKKQFFVVSF	KDIGWNDWII	APSGYHANYC	EGECPSHIAG
*			
	60	70	80	90	100
林麝	51 TSGSSLSFHS	TVINHYRMRG	HSPFANLKSC	CVPTKLRPMS	MLYYDDGQNI
马麝	51 TSGSSLSFHS	TVINHYRMRG	HSPFANLKSC	CVPTKLRPMS	MLYYDDGQNI
梅花鹿	51 TSGSSLSFHS	TVINHYRMRG	HSPFANLKSC	CVPTKLRPMS	MLYYDDGQNI

	110	115			
林麝	101 IKKDIQNMIV	EECGC			
马麝	101 IKKDIQNMIV	EECGC			
梅花鹿	101 IKKDIQNMIV	EECGC			

图 4 林麝、马麝及梅花鹿活化素 (Activin) β_A 亚基成熟肽氨基酸序列
表示氨基酸相同, * 表示氨基酸差异

3 讨论

3.1 PCR 简并引物的设计 简并引物 (degenerate primer) 是指碱基序列不同, 但有相同碱基数的一组针对某一个基因相同区域的寡核苷酸混合物。

对于仅仅知道部分物种某种基因的序列, 而要在其它物种克隆该基因的最佳方法是利用已知基因推导的氨基酸序列设计引物, 用此引物进行 PCR 扩增靶基因。在整个生物界, 作为蛋白质组成成分的氨基酸仅有 20 种, 而它所对应的遗传密码子却有 64 种之多, 因而大多数氨基酸具有一种以上的密码子。对于某段氨基酸序列, 它所对应的寡核苷酸序列数量往往很多。近年来, 研究者们利用统计学作为基础, 把目的基因最有可能的编码序列集合起来, 形成数量不很大的简并库。当待研究基因序列不明, 但在部分物种已经被克隆时, 就能根据推导的氨基酸序列合成一组简并引物来克隆这一基因。此外, 当研究一个基因家族中新的或未确定的成员时, 如果已知序列保守区, 简并引物也十分有用。

然而, 在实际操作中, 简并引物的设计显得尤其重要。较之常规引物设计, 其设计更多的

是凭借经验。根据实验中积累的经验, 我们认为在设计简并引物时需要考虑以下因素:

首先, 应选氨基酸序列中具有最少简并性的区域, 尽可能选择氨基酸序列中富含 Met 和 Trp 的区域, 因为这两种氨基酸仅一个密码子; 其次尽可能选择氨基酸序列中富含 Cys、Asp、Glu、Phe、His、Lys、Gln、Tyr 的区域, 尽量避免富含 Leu、Arg、Ser 的区域; 且应避免富含 GC 或 AT 碱基的区域, 因为它们会导致非特异性的扩增。第二, 确定在核苷酸序列中置换的数目。考虑哺乳动物对氨基酸密码子的偏好性, 氨基酸具有三种或三种以上的同义密码子, 选择该物种偏爱的两种密码子来应用, 对核苷酸序列进行合理的推测。应用猜测体 (guessmer) 法能降低其简并度。必要时可考虑使用次黄嘌呤 (I) 进一步降低其简并性, 因为它能与胞嘧啶、胸腺嘧啶和腺嘌呤稳定配对, 但注意 I 带来的缺点是退火温度较低。第三, 寡核苷酸末端尽可能应用 Met 和 Trp 密码子。这种策略能够保证寡核苷酸兼并库中的所有寡核苷酸的 3' 末端的三个碱基能与靶基因形成精确配对; 其次也可选择 Cys、Asp、Glu、Phe、His、Lys、Gln、Tyr, 这样也能保证所有寡核苷酸的 3' 末端的三个碱基能与靶基因形成正确配对。第四, 通常长度为 17 ~ 21 bp

的寡核苷酸序列就足够了,应检查两个引物之间的退火温度,其温度应控制在 52 ~ 62℃ 的范围内。

本实验据此原则设计的简并引物,不仅能特异性地在麝及梅花鹿中扩增得到活化素基因,而且能够在孔雀等物种中扩增到活化素基因(待发表)。

3.2 活化素 β_A 亚基成熟肽序列的保守性 如结果所述,将林麝、马麝及梅花鹿活化素序列与 GenBank、EMBL 以及 DDBJ 世界三大数据库中的基因序列进行同源性比较,发现活化素(Activin) β_A 亚基成熟肽序列在不同物种之间具有高度的同源性。

在麝及梅花鹿的活化素 β_A 亚基成熟区共发现 9 个半胱氨酸残基(图 4),与鸟类及哺乳类相应区段的半胱氨酸残基数目相同且位置一致^[8-10]。这揭示在各类动物中,活化素均存在一个保守的 β_A 亚基结构,暗示该亚基具有非常重要的生理功能,以致在长期的进化中保持非常慢的进化速度。

β_A 或 β_B 亚基构成同源二聚体或异源二聚体, β_A - β_A 亚基形成活化素 A, β_A - β_B 亚基形成活化素 AB, β_B - β_B 亚基形成活化素 B^[2]。与活化素 β_B 亚基相比, β_A 亚基具有不同的变异性。在哺乳动物体内,活化素 A 和活化素 B 在促进垂体分泌 FSH 和红细胞成熟过程中发挥的作用是相同的,这使我们很难解释在进化过程中,脊椎动物为什么始终保持着两种活化素不同的保守性。

参 考 文 献

- [1] 盛和林,大秦司纪之,陆厚基. 中国野生哺乳动物. 北京:中国林业出版社,1999,168 ~ 173.
- [2] Ying S Y. Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev*, 1988, 9: 267 ~ 293.
- [3] Calogero A E, Burrello N, Ossino A M, et al. Activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens. *Journal of Endocrinology*, 1998, 156(2): 269 ~ 274.
- [4] Philip G, Knight, Claire Glistler. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, 2001, 121: 503 ~ 512.
- [5] Mather J P, Moor A, Li R H. Activins, inhibins and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine*, 1997, 215: 209 ~ 222.
- [6] 毕书增, 颜于宏, 金络忠等. 下丘脑-垂体-睾丸系统调节麝香分泌和提高麝香产量研究. 中药材科技, 1980, 4: 18.
- [7] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: CSHL Press, 2001.
- [8] 汪晓晶, 王小行, 王亚军等. 大熊猫及其近种活化素基因 β_A 亚基成熟肽序列的克隆分析及其在分类地位上的应用. 遗传学报, 2002, 29(9): 782 ~ 786.
- [9] Kwan M Y, Kei Li Y B, Ge W. Cloning and characterization of goldfish activin β_A subunit. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1999, 154: 45 ~ 54.
- [10] Chen C C, Johnson P A. Expression of inhibin α and inhibin/activin β_A subunits in the granulosa layer of the large preovulatory follicles of the hen. *Biology Production*, 1996, 55(2): 450 ~ 454.