

大白猪骨桥蛋白基因的克隆、表达及功能分析

张冬杰^{1,2}, 刘 娣^{2*}, 汪晓鸿², 杨国伟²

(1. 东北林业大学博士后流动站, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省农业科学院畜牧研究所博士后工作分站, 哈尔滨 150086)

摘要: 应用 RT-PCR 方法克隆了全长 909 bp 的大白猪 Osteopontin(OPN)基因。运用生物信息学工具进行的分析显示: OPN 蛋白一级结构中 天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸所占比例最高, 含有特异的 Arg-Gly-Asp 序列(RGD), 二级结构中 α 螺旋占很大比例, 并且亲水性较强, OPN 信号标签位于第一个同源区, 共有的保守性序列为 [KQ]-x-[TA]-x(2)-[GA]-S-S-E-E-K。基于蛋白序列所构建的 2 个分子进化树均表明猪与牛的亲缘关系最近, 而与鸡最远。在 mRNA 水平上, OPN 基因在猪体各组织中广泛表达, 胃、肾、肺、小肠和卵巢相对较高, 而心、脾和大肠则相对较低; 在蛋白水平上, 不同组织内该蛋白的大小不同, 出现了 70 ku, 70 和 45 ku, 70、45 和 24 ku 3 种蛋白。

关键词: 大白猪; 骨桥蛋白基因; 生物信息学; 反转录 PCR; 蛋白质斑点杂交

中图分类号: S828. 89; Q344. 13

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)07-0965-06

Cloning, Expression and Functional Analysis of Osteopontin Gene in Large White Pig

ZHANG Dong-jie^{1,2}, LIU Di^{2*}, WANG Xiao-hong², YANG Guo-wei²

(1. Postdoctoral Research Station, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2. Postdoctoral Research Center, Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: The Osteopontin cDNA in size of 909 bp was cloned by RT-PCR and analyzed by bioinformatics. The results showed that Asp, Glu and Ser occupied the highest proportion and the special sequence Arg-Gly-Asp (RGD) existed in OPN primary structure, α helix occupied the higher proportion in secondary structure and hydrophile was better, OPN signature existed in the first homologous region and the mutual conservative sequence was [KQ]-x-[TA]-x(2)-[GA]-S-S-E-E-K in OPN secondary structure. Two phylogentic trees constructed based on OPN protein sequence showed that the relationship between pig and cow was the closest, but distant from chicken. OPN mRNA was expressed in many tissues of pig: higher in stomach, kidney, lung, small intestine and ovary, lower in heart, spleen and large intestine. The protein size was different in different tissues: 70 ku, 70 and 45 ku, 70, 45 and 24 ku.

Key words: Large White pig; OPN gene; bioinformatics; RT-PCR; Western-blot

骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)最初因其富含唾液酸, 而被命名为唾液酸蛋白(sialoprotein)。由于这种唾液酸蛋白是细胞在骨基质中的产物, 并能在细胞与基质中的矿质形成一种桥连, 人们将其命名为骨桥蛋白。OPN 作为一种基质功能性非胶原蛋白, 主要通过两种机制发挥细胞信号分子的作用。一是以分子内 RGD 基元与 integrin 家族分子结合;

二是与细胞表面黏附性糖蛋白 CD44 以非 RGD 依赖方式结合。它具有多种生理功能, 比如刺激骨的钙化, 参与细胞的移动, 在胚胎着床、生长发育及分化等方面起着重要作用^[1]。本研究主要从大白猪体内克隆 OPN 基因, 根据预测的氨基酸序列, 利用生物信息学方法预测 OPN 蛋白的二维空间结构, 并对其功能域进行分析, 同时在 mRNA 和蛋白水平上

收稿日期: 2008-03-21

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目(GB05B106); 黑龙江省博士后基金(LRB07-392)

作者简介: 张冬杰(1980-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 助理研究员, 博士, 主要从事动物分子遗传研究, E-mail: djzhang8109@163.com

* 通讯作者: 刘 娣, E-mail: liudi1963@163.com

分析 OPN 在大白猪不同组织的表达差异。上述工作有助于推动后续的猪 OPN 蛋白功能性研究,同时也对运用生物信息学方法进行蛋白质结构和功能预测进行了有益的尝试。

1 材料与方法

1.1 RNA 提取和 RT-PCR

剖取大白猪的心、肝、胃、脾、肾、肺、大肠、小肠、肌肉、子宫和卵巢共 11 个组织,液氮速冻后于 -80°C 分藏。总 RNA 的提取使用 TRIZOL 试剂盒(Invitrogen)。以肝脏组织 mRNA 为模板,使用 BcaBEST RNA PCR Kit Ver. 1.1 (TaKaRa, DRR023)反转录试剂盒,在 Oligo-d(T)18 引导下延伸出第一条 cDNA 链。用基因特异性引物 OPN1 (5'-GTTGATCTCAGAAGACGCACTC-3') 和 OPN2 (5'-ATGAGAATTGCAGTGATAGCCTT-3') 57°C 退火进行 PCR 扩增。扩增片段经纯化后克隆入 pMD18-T 载体(TaKaRa),然后送交上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.2 OPN 的生物信息学分析

使用 DNASTar 软件的 Protean 程序对 OPN 基因编码的蛋白序列进行预测。分别在网络服务器 BLAST (Blastp, TblastX, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 和 Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) 上执行序列同源性搜索,寻找已有的 OPN 相关氨基酸序列;应用 MegAlign(DNASTar 5.0)软件的 ClustalW 计算方法,对包括大白猪在内的相关物种的多肽序列进行比对分析;利用 Lasegene 的 Protean 分析 OPN 蛋白质的二级结构;基于 EBI 的 InterPro 和 Prosite 的 motif 数据库对 OPN 基因的结构和功能域进行预测。

1.3 分子进化树的构建

使用 Clustalx 程序以从 Swiss-Prot 数据库检索到的人、牛、水牛、猕猴、猩猩的 OPN 基因与本研究克隆所得到的猪 OPN 基因进行多重序列比对,构建分子进化树。

1.4 半定量 RT-PCR

根据 GenBank 上猪 β actin 的 cDNA 序列 (U07786)设计特异性引物 actin1 (5'-CGGGACCTGACCGACATCCA-3') 和 actin2 (5'-GGGCCGTGATCTCCTTCTG-3');根据 OPN 的 cDNA 序列 (NM_214023)设计特异性引物 OPN3 (5'-ATAGC-

CTTCTGCCTCTGG-3') 和 OPN4 (5'-CTGCGGAAGTCTCTTAGATT-3')。依照上述方法从不同组织的 mRNA 反转录得到 cDNA,分别在 OPN3/OPN4 (退火温度 57°C) 和 actin1/actin2 (退火温度 58°C) 引导下,以不同的 cDNA 为模板进行 25~35 个循环不等的特异性 PCR 扩增。扩增片段经琼脂糖凝胶电泳分离后,以 ABI (Bio-RAD) 凝胶成像系统获取电泳条带信息,之后以软件 Quantity One 分析统计电泳条带亮度差异。

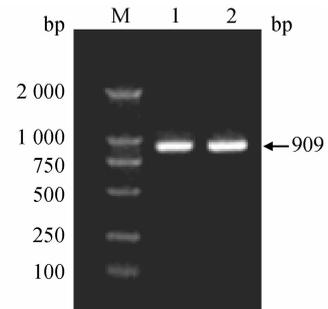
1.5 总蛋白的提取和 Western-blot

总蛋白的提取方法及 Western-blot 的操作流程见参考文献[2],其中一抗是鼠抗人 OPN (Cell-Science) 多克隆抗体;二抗是辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (华特生)。DAB 显色。

2 结果

2.1 OPN 基因的克隆和序列分析

通过 RT-PCR 最终得到 1 条长度为 909 bp 的扩增片段(图 1),为 OPN 基因完整的开放读码框,编码 303 个氨基酸,其中天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸所占比例最高(图 2)。



M. DNA maker; 1, 2. The PCR products

图 1 OPN 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR result of porcine OPN gene

2.2 OPN 高级结构预测分析

二级结构中的 α 螺旋、 β 折叠、Turn 转角、Coil 卷曲螺旋、亲水性分布如图 3 所示,可以看出二级结构中 α 螺旋占很大比例,并且亲水性较强。

OPN 基因的结构和功能域的预测结果显示,在其结构上存在骨桥蛋白的结构域,而 Prosite 数据库则提供了 OPN 基因的骨桥蛋白的信号标签,其共有的保守序列为 [KQ]-x-[TA]-x(2)-[GA]-S-S-E-E-K。其中的 S-S-E-E-K 结构序列是 OPN 作为细胞内某些蛋白激酶底物,发生磷酸化修饰的结构基础。

MRIAVIAFCLWGFASALPV[KQTNSGSSEEK]LLSNKYTD AVATLLKPPDPSQKQT
 FLAPQNTISSEETDDFKQETLPSKSNESPEQTDDVDDDDDEHDVDSRDTDSEE
 ADHADDADRSDESHHSDESDELVD FPTDTPADVTPAVPTGDPNDG[RGD]SV
 VYGLRSKSKKFRSEAQQLDATEEDLTSHVESEETDGT PKAILVAQRLHVASD
 LDSQEKDSQETSQPDDRSVETRSQEQSKEYTIKTYDGSNEHSNVIESQENPKV
 SQEFHSHEDKLVPSKSEEDKHLKLRV SHELESASSEIN

信号序列标签(KQTNSGSSEEK)和 RGD 序列(Arg-Gly-Asp, 细胞黏附序列)用方框标出
 The signature sequence (KQTNSGSSEEK) and RGD (Arg-Gly-Asp, sequence for cell attach-
 ment) sequence are boxed

图 2 OPN 基因的氨基酸组成

Fig. 2 Amino acids composition of OPN gene

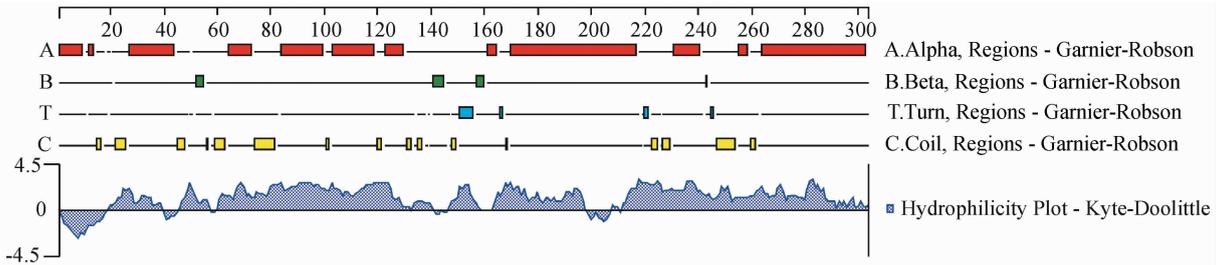


图 3 OPN 基因的二级结构分析

Fig. 3 Analysis of secondary structure of OPN

2.3 分子进化树的构建

多重序列比对结果表明 OPN 在进化上相对保守,存在 3 个主要同源区,OPN 信号标签位于第一个

同源区,用框线标出(图 4)。使用 MEGA3.1 程序,采用 Neighbor-Joining 算法,自抽样值(Bootstrap)设为 1 000,构建分子进化树如图 5。在 Swiss-Prot 数据库

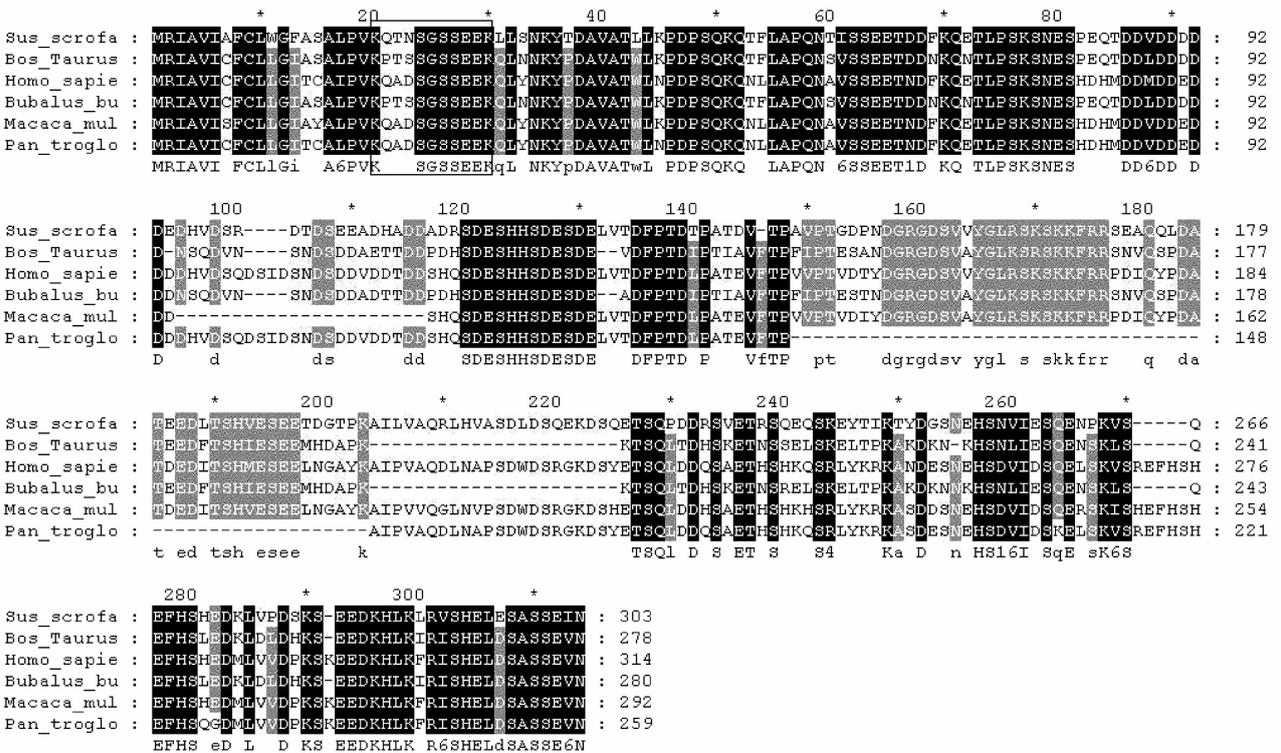


图 4 6 个物种的 OPN 基因编码区之间的同源性比较

Fig. 4 Multi-alignment of the OPN CDS of six species

检索到 OPN 信号标签序列的比对结果(图 6),但没有找到相关基因的完整序列,根据获得的 OPN 信号标签的保守序列,采用 Neighbor-Joining 算法,Bootstrap 设为 1 000,构建分子进化树(图 7)。

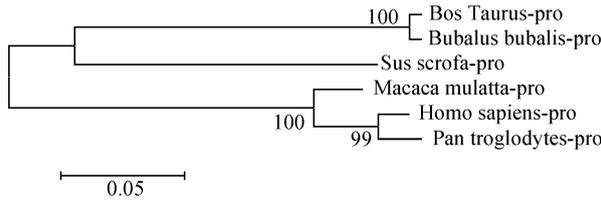


图 5 基于 Neighbor-Joining 算法的 OPN 基因的分子进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed with Neighbor-Joining method based on OPN gene

| | | |
|-------------|-------------|------|
| OSTK_BOVIN | KpTtsGSSEEK | : 11 |
| OSTP_BOVIN | KpTtsGSSEEK | : 11 |
| OSTP_CHICK | QhAisASSEEK | : 11 |
| OSTP_HUMAN | KqAdsGSSEEK | : 11 |
| OSTP_MOUSE | KvTdsGSSEEK | : 11 |
| OSTP_PIG/2 | KqTnsGSSEEK | : 11 |
| OSTP_RABBIT | KhAdsGSSEEK | : 11 |
| OSTP_RAT/2 | KvAefGSSEEK | : 11 |
| OSTP_SHEEP | KpTtsGSSEEK | : 11 |
| | k sGSSEEK | |

图 6 6 个物种的 OPN 信号标签序列的同源性比较
Fig. 6 Multi-alignment of the OPN signature of six species

最高,划归为一类,而人与猩猩、猕猴划归为一类,大小鼠之间的 OPN 信号序列存在差异,鸡的差异最为明显,第一个位点为 Q,其它为 K。

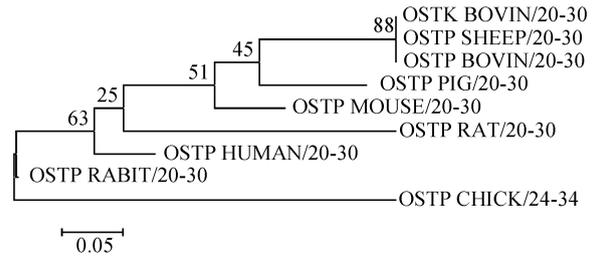


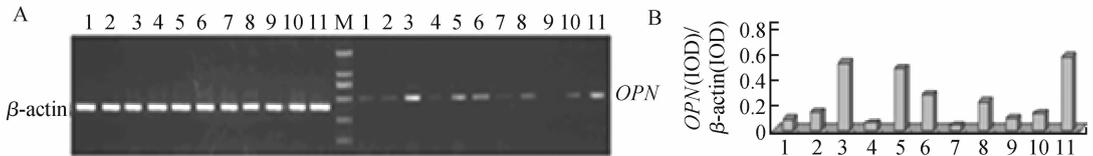
图 7 基于 Neighbor-Joining 算法的 OPN 信号标签的分子进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree constructed with Neighbor-Joining method based on OPN signature

2.4 OPN 在 mRNA 水平上的检测

如图 8A 所示,大白猪不同组织中 OPN 的 RT-PCR 电泳分离条带的亮度存在明显的差异,但作为内参的各组织的 $\beta actin$ 对应的条带却没有亮度上的明显差异。为更直观地说明问题,换算出凝胶中不同组织的 OPN 对 $\beta actin$ 扩增条带的光密度的比值,再量化成柱状图表示(图 8B)。对大白猪 11 种组织考察后发现,胃、肾、肺、小肠和卵巢(图 8B, 3、5、6、8 和 11 泳道)中 OPN 的 mRNA 丰度较高,而在心,脾和大肠(图 8B, 1、4 和 7 泳道)中相对较低。

从获得的 2 个进化树均可看出猪与牛的同源性



A. 不同组织 $\beta actin$ 和 OPN 的 RT-PCR 扩增结果及量化统计分析。1. 心;2. 肝;3. 胃;4. 脾;5. 肾;6. 肺;7. 大肠;8. 小肠;9. 肌肉;10. 子宫;11. 卵巢;M. DL2000 marker。B. 量化成柱状图表示的不同组织的 OPN 对 $\beta actin$ 的扩增条带光密度的比值。B 图中各柱编号与 A 中电泳孔道编号相对应

A. RT-PCR products and quantity analysis of $\beta actin$ and OPN in different tissues;1. Heart; 2. Liver; 3. Stomach; 4. Spleen; 5. Kidney; 6. Lung; 7. Large intestine; 8. Small intestine; 9. Muscle; 10. Uterus; 11. Ovary; M. DL2000 marker。B. $OPN(IOD)/\beta actin(IOD)$, every column number corresponding to the number of A electrophoresis lanes

图 8 OPN 在大白猪不同组织内 mRNA 水平上的表达

Fig. 8 Expression of OPN mRNA in different tissues of Large White pigs

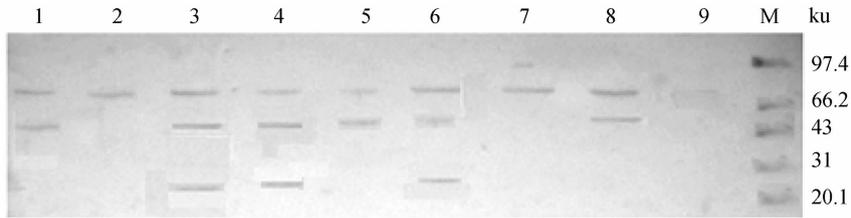
2.5 OPN 在蛋白水平上的检测

骨桥蛋白在大白猪所检测的 8 个组织中表达情况不同,心、肺、子宫表达 70 和 45 ku 的蛋白,胃、肾、小肠表达 70、45 和 24 ku 的蛋白,而肝和肌肉只表达 70 ku 的蛋白(图 9)。

3 讨论

3.1 OPN 基因的序列和结构分析

通过对 OPN 基因多肽序列的分析,我们发现该基因所编码的氨基酸中,天冬氨酸、谷氨酸和丝氨



1. 心;2. 肝;3. 胃;4. 肾;5. 肺;6. 小肠;7. 肌肉;8. 子宫;9. 阴性对照;M. 蛋白质相对分子质量标准

1. Heart; 2. Liver; 3. Stomach 4. Kidney; 5. Lung; 6. Small intestine; 7. Muscle; 8. Uterus; 9. Negative control; M. Protein marker

图 9 OPN 在大白猪不同组织内蛋白水平上的表达

Fig. 9 Expression of OPN protein in different tissues of Large White pigs

酸所占比例最高,分别占到 13.2%、11.2% 和 13.6%,略低于大鼠(天冬氨酸,谷氨酸和丝氨酸分别占 19%、17%和 24%)。其中也含有人们早在大鼠上发现的特异的 Arg-Gly-Asp 序列(RGD)(图 2)^[3],这个序列是蛋白质分子中与细胞黏附有关的重要功能域,是 OPN 分子发挥黏附功能的结构基础^[4],具有高度保守性,如果变异或缺失,将丧失促黏附功能。其氨基端有 9 个天冬氨酸,组成一个高度酸性区域,它对羟基磷灰石有结合能力,是联系骨细胞与羟基磷灰石间的“桥梁”。含有 RGD 氨基端的 OPN 分子片段比全长 OPN 分子促黏附作用更强,其增强的促黏附作用可被不含有 RGD 的 OPN 羧基端片段所抑制。不同种属的 OPN cDNA 序列比对显示,该基因具有中度同源性,在氨基末端区域、羧基末端区域和含 RGD 基元的 50 个氨基酸序列区域呈高度保守。

3.2 分子进化分析

目前只在 6 个物种上获得了 OPN 基因的完整序列,还有 12 个带有完整信号标签结构域的序列。根据本试验所测得的序列,同时结合这些已有序列构建的进化树表明,OPN 基因在进化上比较保守,符合进化关系,猩猩和鸡的变异程度较大,猪与牛和水牛的最为接近。

3.3 OPN 基因的表达

本研究采用 RT-PCR 技术检测了 OPN 基因在大白猪不同组织的表达情况,RT-PCR 技术自身因其灵敏度高、操作简单和价格低廉等优点而被广泛采用,但它同时也具有假阳性率过高的缺点。本试验中为了最大限度的降低这种假阳性结果,对每个组织扩增出的阳性条带都进行了克隆测序,在一定程度上保证了结果的准确性。

Brown 等^[5]曾报道过人的 OPN 广泛分布于消化系统,特别是与外界相通的腔道的上皮表面,比如:胃、小肠、阑尾、大肠、胆囊上皮、肝内胆管、胰腺、唾液腺管和唾液腺粘液细胞;大鼠、小鼠及人的肾脏均有 OPN 的表达;兔子的整个生殖周期子宫内 OPN 的表达具有波动性^[6]。综合前人的研究结果,我们可以看出 OPN 基因的表达具有组织细胞特异性,并且受多种激素、生长因子、肿瘤促进剂及原癌基因表达产物的调控。本研究所检测的 11 个组织中,在 mRNA 水平上均表达该基因,但表达水平存在明显差异,胃、肾、肺、小肠和卵巢中的 mRNA 丰度较高,而在心、脾和大肠中相对较低,这与已有的研究结果基本一致。至于 OPN 在各种组织中表达水平的高低则与大白猪的健康状况、采样日龄以及饲养条件等诸多外在因素有关,同时也与各个组织内的调控网络有关,因此推测它在各个组织的表达在整个生长发育期内是变化的。

在蛋白水平上的表达经 Western-blot 检测后发现,不同组织内该蛋白的大小不同,出现了 70 ku,70 和 45 ku,70、45 和 24 ku 这 3 种蛋白。这种情况在人、鼠和羊上都曾有报道。例如大鼠成熟的成骨细胞中合成 44 ku 的 OPN,而未分化成熟的前成骨细胞则合成一种 55 ku 的低磷酸化蛋白^[7]。在羊的子宫内膜提取物中就检测到了 70、45 和 24 ku 这 3 种蛋白^[8]。本研究结果表明,在同一物种的不同组织中,OPN 的大小与形式也不完全相同,推测这可能是 mRNA 不同剪切的结果。

目前,关于 OPN 基因的研究集中于它在人类的病理和生理过程中所起的作用,例如,Xu 等研究报道,OPN 基因的突变可能导致全身性红斑狼疮^[9];OPN-c 可能是乳腺癌的一个可选择性生物标

记^[10]。其次是在骨组织的病理和生理中所起作用的研究,如 Franzen 等研究发现骨桥蛋白的缺失会最终导致骨质疏松^[11]。OPN 的另外一个研究热点集中在神经疾病方面^[12]。由此可见,OPN 在人全身性疾病的进化和发展中起着重要的作用,而在猪病中可能起到的作用还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 范 哲,李鸿雁,龙 毅.骨桥蛋白的研究进展[J].中国实验诊断学,2005,9(2):307-309.
- [2] KUYKINDOLL R J, NISHIMURA H, THOMASON D B, et al. Osteopontin expression spontaneously developed neointima in fowl (*Gallus gallus*) [J]. *J Exp Biol*, 2000, 203: 273-282.
- [3] OLSBERG A, FRANZEN A, HEINEGARD D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83: 8819.
- [4] NAKAMURA I, DUONG LE T, RODAN SB, et al. Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function [J]. *J Bone Miner Metab*, 2007, 25(6): 337-344.
- [5] BROWN LF, PAPADOPOUL OS-SERGIU A, BERSE B, et al. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas[J]. *Am J Pathol*, 1994, 145(3): 610.
- [6] APPARAO KB, ILLERA MJ, BEYLER SA, et al. Regulated expression of osteopontin in the peri-implantation rabbit uterus [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 1484-1490.
- [7] KASUGAI S, ZHANG Q, OVERALL CM, et al. Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter [J]. *Bone Miner*, 1991, 13(3): 235-250.
- [8] JOHNSON G R, BURGHARDT R C, SPENCER T E, et al. Ovine Osteopontin; II. Osteopontin and $\alpha_v\beta_3$ integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period[J]. *Biol Reprod*, 1999, 61: 892-899.
- [9] XU A P, BAI J, LU J, et al. Osteopontin gene polymorphism in association with systemic lupus erythematosus in chinese patients [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(23): 2124-2128.
- [10] MIRZA M, SHAUGHNESSY E, HURLEY J K, et al. Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(4): 889-897.
- [11] FRANZEN A, HULTENBY K, REINHOLT F P, et al. Altered osteoclast development and function in osteopontin deficient mice[J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(5): 721-728.
- [12] GOLLEDGE J, MULLER J, SHEPHARD N, et al. Association between osteopontin and human abdominal aortic aneurysm [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(3): 655-660.