

猪精氨酸-丝氨酸蛋白激酶 1(SRPK1)克隆表达及功能初步分析

俄广鑫¹, 刘 娣^{2*}, 张冬杰², 杨秀琴¹, 崔 羽³, 祝继原¹, 杨少成¹, 王嘉博¹, 谢宇彤¹

(1. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院畜牧中心, 哈尔滨 150086;

3. 海南大学农学院, 海口 570228)

摘要: 本研究旨在阐明猪 *SRPK1* 基因的分子特点和表达谱。以大白猪为研究对象, 利用 RT-PCR 技术克隆 *SRPK1* 基因 CDS 区域, 同时利用反向 PCR (inverse PCR, I-PCR) 技术得到猪部分 *SRPK1* 的 5' UTR 序列; 利用生物信息学方法分析 *SRPK1* 基因核苷酸序列及编码蛋白序列的结构特点; 利用荧光定量 PCR (real-time PCR) 检测 *SRPK1* 在 1 和 30 日龄大白猪及杜洛克的心脏、肌肉、脾脏、肝脏、肾脏、肺脏、胃、小肠、大肠、脑的表达情况; 构建猪骨骼肌损伤模型, 研究在骨骼肌发育过程中 *SRPK1* 基因的表达特性。结果, 将克隆片段拼接得到长 2 499 bp 的大白猪 *SRPK1* 基因序列, 包含了 1 968 bp 完整 CDS 区域, 分析表明其编码含 656 个氨基酸的蛋白质; 包括 2 个 P_Kc 结构域, 猪 *SRPK1* 蛋白序列与人和黑猩猩的相似性较高。通过生物信息学方法预测所得 5' UTR 含有多个转录结合位点: HSF1、HSF2、Ik-1、IK-2、SRY、SP1 MyoD、USF、E47、p300、CP2、RREB-1、E2F 和 AP-1。利用荧光定量 PCR 研究发现, 表达结果显示猪该基因表达具有组织和种间特异性, 主要都是在胃、大肠和小肠中表达。*SRPK1* 基因在整个损伤修复过程中的表达反复出现升高和降低。5' UTR 处有多个和肌肉生长相关蛋白的转录结合位点, 主要在消化系统组织表达, 在骨骼肌修复中表达上调, 推测其可能与骨骼肌细胞发育或其他肌肉生长相关因子的表达有关。

关键词: 精氨酸/丝氨酸蛋白激酶 1; 猪; 实时荧光定量 PCR; 反向 PCR; 骨骼肌损伤模型; 生物信息学分析

中图分类号: S828; Q527

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)11-1379-08

Cloning and Functional Analysis of Serine/arginine-rich Specific Kinase 1 in Pig

E Guang-xin¹, LIU Di^{2*}, ZHANG Dong-jie², YANG Xiu-qin¹, CUI Yu³, ZHU Ji-yuan¹,

YANG Shao-cheng¹, WANG Jia-bo¹, XIE Yu-tong¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Animal Husbandry Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 3. Hainan University of Agriculture, Haikou 570228, China)

Abstract: The objective of this study was to illuminate the molecular features and the expression profile of the porcine *SRPK1* gene. The *SRPK1* gene from the Yorkshire pig was cloned and sequenced, and then its molecular features were analyzed. Use inverse PCR to clone the partial 5' UTR sequence of *SRPK1* in pig. The mRNA distribution profile of the porcine *SRPK1* gene in ten tissues (heart, muscles, liver, kidney, lung, stomach, small and large intestine, spleen, brain) of Yorkshire and Duroc (one-day, one-month) were examined by real-time PCR. Construct pig skeletal muscle injury model by subcutaneous injection to study the expression characteristics of *SRPK1* gene in repair process of skeletal muscle. A sequence with a length of 2 499 bp was cloned, it contained the CDS (coding sequence) region of 1 968 bp of the porcine *SRPK1*

收稿日期: 2009-11-19

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目“优质瘦肉型猪新品种选育与产业化开发”(2008BADB2B02)

作者简介: 俄广鑫(1984-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖的研究, E-mail: eguangxin@126.com

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

gene, encoded a protein composed of 656 amino acids, including two P_Kc domains. The sequence of the porcine SRPK1 protein shared high similarity with human and chimpanzee, and they were closed in the Phylogenetic tree. The result of bioinformatics analysis showed that 5'UTR obtained in the study contained multiple transcription binding sites: HSF1, HSF2, Ik-1, IK-2, SRY, SP1 MyoD, USF, E47, p300, CP2, RREB-1, E2F and AP-1. The study results showed that, by real-time PCR, pigs had the organization- and species-specific in expression, but highly in stomach, small intestine and large intestine. The expression of SRPK1 gene fluctuated in the injury and repair process. There are several transcription binding sites in 5'UTR related to muscle development, it mainly expressed in digestive system and the expression level increased in injury and repair process of skeletal muscle. It was inferred that SRPK1 gene may be related to skeletal muscle cell development, or other growth-related factor expression.

Key words: SRPK1; pig; real-time PCR; inverse PCR (I-PCR); skeletal muscle injury model; bioinformatics analysis

丝氨酸/精氨酸 (SR) 蛋白特异性激酶 (serine/arginine protein-specific kinase, SRPK) 家族具有磷酸化含有 RS 结构域的 RNA 剪接子的功能, 人类 SRPK1 已被克隆, 并证实在细胞周期中它具有调节 RNA 剪接因子在细胞核中分布的功能^[1]。SRPK1 是一种对 RNA 剪接子的 RS 结构域有高度特异性的激酶, 因为它只识别精氨酸, 且在基质里只磷酸化丝氨酸^[2]。为了进一步研究它的生物学特性, 并试图探讨 SRPK1 是否与人类疾病有关, 制作了染色体图谱。用 SRPK1 做探针, 与鼠和人类多重位点杂交, 试验结果发现 SRPK1 在鼠染色体上出现多个杂交信号 (鼠 17 号常染色体和 X 染色体^[3])。本试验以猪为试验对象, 克隆了猪 SRPK1 基因, 利用 real-time 技术分析 SRPK1 基因在猪不同组织和骨骼肌发育阶段的表达规律。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康大白猪、杜洛克公猪由黑龙江省农科院畜牧研究所提供, 屠宰后, 取其肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、胃、心脏、肌肉、大肠、小肠和脑组织, 立即放入液氮中保存备用。1 月龄大白猪 12 头, 雌雄各半, 体质量 5~10 kg, 由哈尔滨三元猪场提供。

1.1.2 主要试剂与仪器 Trizol 试剂 (Invitrogen)、氯仿、异丙醇、0.1% DEPC 水配制的 75% 乙醇、DEPC (Sigma 分装)、PrimeScript™ RT-PCR Kit、Taq DNA 聚合酶、DL2000、dNTPs、pMD-18T vector、JM109、TE 缓冲液、Hind III 和 EcoR I、

Eae I 均购自大连 TaKaRa 公司。基因引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 无水乙醇、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、微量质粒提取试剂盒购自盖宁生物工程有限公司, 盐酸布比卡因注射液 (5 mL, 37.5 mg), 购自上海朝晖药业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SRPK1 基因 CDS 区克隆 取 1 月龄大白猪背部肌肉组织立即放入液氮中保存以备用。用 Trizol 试剂提取总 RNA, 操作过程中对其中一些环节稍做改进。RT 反应取 7 μ L 提取的总 RNA, 按 PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒推荐的方法以 Oligo(dT) 为引物合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中人 SRPK1 基因序列 NM 014370, 及猪 SRPK1 的 EST 片段设计合成引物, 如表 1 (SE-1、SE-2、SE-3)。20 μ L PCR 反应体系: 14 μ L 去离子水、2 μ L 10 \times PCR Buffer, 1.6 μ L dNTPs, 上下游引物各 0.5 μ L (25 μ mol \cdot L⁻¹), 0.2 μ L rTaq DNA 聚合酶, 1.2 μ L cDNA 模板。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 32 个循环: 95 $^{\circ}$ C 30 s, (SE-1: 56 $^{\circ}$ C、SE-2: 58.5 $^{\circ}$ C、SE-3: 64 $^{\circ}$ C) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 30 min。

1.2.2 反向 PCR 克隆 SRPK1 部分 5'UTR 本研究采用反向 PCR 技术克隆 SRPK1 部分 5'UTR 序列, 具体方法参照文献[4]。本试验对其进行部分改动, 参照限制性内切酶 Eae I Kit (TaKaRa) 的操作方法。对总 cDNA 进行酶切, 酶切反应总体积为 40 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜。连接环化前于 65 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 使各种限制性内切酶失活。参照 T4 DNA 连接酶 Kit (TaKaRa) 的操作方法。反应体系为 400 μ L; 316 μ L ddH₂O、40 μ L T4 DNA ligase buffer、

40 μL 酶切产物和 4 μL T4 DNA 连接酶。20 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,再用冰乙醇沉淀,70%酒精洗脱,烘干后用 40 μL 去离子水溶解,获得酶切 PCR 反应库。用其作为 PCR 反应底物进行 PCR 反应,所用引物 FY-1 序列见表 1。PCR 反应体系包括:2 μL 2 \times GC Buffer,1.6 μL dNTPs,上下游引物各 0.5 μL ,

0.2 μL Taq DNA 聚合酶,1.2 μL 酶切产物,3 μL 去离子水。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;32 个循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,(FY-1:62.5 $^{\circ}\text{C}$)30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。PCR 产物回收纯化后,连接于 PMD18-T 载体转化大肠杆菌 JM109,随机挑取阳性克隆摇菌培养后送英骏生物技术有限公司测序。

表 1 克隆及表达用引物

Table 1 Primers of clone and expression

引物 Primer	扩增长度/bp Length	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
SE-1	1 166	R:CAGGATCAGACACTTACGGAACG F:ACCTTGGATGCCCAATAGCC	56
SE-2	823	R:GAAAATCGGAGAATCTATTCAATGGG F:TTCCGTAAGTGTCTGATCCTGGTG	58.5
SE-3	575	R:TGGCGGTTACCGGTCTCGC F:AGGAAGCCCTTGATAATTGGACTTG	64
ST-1	423	F:GGACTTCGAGCAGGAGATGG R:GCACCGTGTTGGCGTAGGG	50
ST-2	316	F:GAACGTGGTGTAGAGGGTGG R:TGCTTCTTGAAGTTGGCTG	51
FY-1	425	F:CTGGATTATTTACACACCAAGTGCCG R:CGTCCCATGGCGAGACCGG	62.5

1.2.3 序列分析 DNAstar 软件进行序列拼接得到最长序列,用 BLASTn 进行核酸序列同源性分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)并构建 NJ 系统树。用 ORF finder 分析核酸序列的开放阅读框架 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)。用 NCBI 的 Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)分析蛋白质的保守结构域。

1.2.4 SRPK1 基因组织表达检测 取大白猪(1月龄、1日龄)和杜洛克(1月龄)的肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、心脏、胃、肌肉、大肠、小肠和脑组织。提取 RNA,反转录参照 1.2.1,使用 STRATAGENEX Mx3000P 仪器和 Real-time PCR Master Mix(ABI)试剂盒对猪 β actin(ST-1)、SRPK1(ST-2)的 cDNA 进行定量。反应总体系为 20 μL ,包括荧光染料 SYBRGreen Mix 10 μL 、上下游引物各 (1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL 、组织 cDNA 1 μL (1 μL RNA 反转录产物 $\times 10^{-1}$)、灭菌双蒸水 8.2 μL 。real-time quantitative PCR 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,共 40 个循

环结束后再加入一个循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s。

1.2.5 骨骼肌损伤模型建立 取 30 日龄的大白猪 12 头(公母各半),采用盐酸布比卡因(Bupivacaine)构建肌肉模型^[5-6]。将 12 头猪分为 4 组,每组 3 头,在相同时间、相同环境下在每只猪后肢左腓肠肌皮下注射 Bupivacaine(3 mL),右侧接种相同剂量的生理盐水作为对照,按作用时间 0.5、72、12、168 h 分别进行屠宰,取损伤处肌肉组织样。

1.2.6 石蜡切片染色 放血处死动物后,立即采集组织样一分为二,一部分马上置于液氮中,另一部分投入 10%中性福尔马林溶液固定 24 h 以上,修块,冲洗,脱水,透明,包埋,常规石蜡切片,HE 染色,光镜观察拍照。

1.2.7 数据分析 目的基因及内参基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算,其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{试验组}} - (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$ 。

2 结果

2.1 猪 SRPK1 的克隆及序列分析

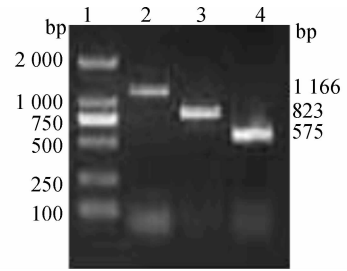
SRPK1 的 PCR 产物经 1.0%的琼脂糖凝胶电

泳,结果显示扩增了 3 个长度分别为 1 166、823、575 bp 的片段(图 1)。送样测序得到 *SRPK1* 基因序列,其中包含 1 968 bp 的 CDS 区域,通过反向 PCR 克隆猪 *SRPK1* 基因部分 5'UTR 序列(图 2、3),将克隆所得序列拼接得到最长序列,并将其提交到 GenBank,得到登录号 FJ476290。经软件分析,目的基因的蛋白质分子量为 74.35 ku,等电点约为 5.89,酸性氨基酸为 105 个,碱性氨基酸为 89 个。获得 320 bp 的 5'UTR 序列通过在线转录因子结合位点预测工具找到了多个功能明确的转录结合位点,如:HSF1、HSF2、Ik-1、IK-2、SRY、SP1、MyoD、USF、E47、p300、CP2、RREB-1、E2F 和 AP-1。

2.2 *SRPK1* 蛋白质进化分析

通过 Swiss-Prot 检索到人(NM_003137)、家鼠(NM_016795)、褐鼠(NM_001025726)、爪蟾(NM_001017351)、牛(XM_590178)、狗(XM_845237)、鸡(XM_419265)、黑猩猩(XM_001172595)、苏门答腊猩猩(NM_001131683)和斑马鱼(NM_199650)的 *SRPK1* 蛋白质序列与所克隆的猪 *SRPK1* 编码的蛋白质列,利用 DNAsar 软件中的 CLUATAL W 程序进行同源性比较并构建分子进化树(图 4)。比较猪与人、家鼠、牛的 *SRPK1* 蛋白序列,发现氨基酸一致性分别为 99.90%、94.38% 和 98.43%。核苷酸和氨基酸同源性分析说明 *SRPK1* 是一个在进化上相对保守的蛋白质。

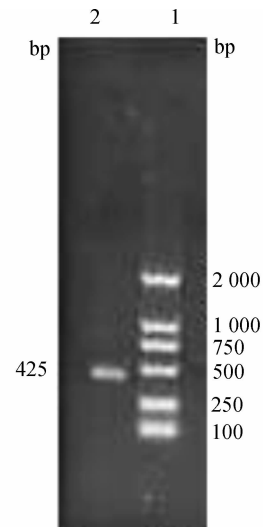
利用 DNAsar 对数据库中已有的 *SRPK1* 基因序列的进化分析发现,猪与黑猩猩和人的亲缘关系最近可归为一类,斑马鱼与猪的进化关系最远,进化关系如图 4。在 NCBI 的 Structure 数据库中对猪 *SRPK1* 蛋白与人 *SRPK1* 进行比较发现了 2 个 PKc_like 激酶区(图 5)。



1. DNA 相对分子质量标准; 2. SE-1 克隆产物; 3. SE-2 克隆产物; 4. SE-3 克隆产物

1. DL2000 Marker; 2, 3, 4. SE-1, SE-2 and SE-3 cloned products

图 1 *SRPK1* CDS 区克隆的 1% 琼脂糖凝胶电泳图片
Fig. 1 1% agarose gel electrophoresis images of *SRPK1* CDS region



1. DNA 相对分子质量标准; 2. 为 FY-1 克隆产物

1. DL2000 marker; 2. The product of FY-1

图 2 FY-1 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图片
Fig. 2 1% agarose gel electrophoresis of I-PCR(FY-1) product

TACACACCAAGTGCCGTATCATCCACACTGACATTAACCCAGAAAACATCTTATTGTCAGTGA
ATGAGCAGTACATCCGGAGGCTGGGCCACGCTCTTCGCCATTCTCAGAAGCAACCGCTCGAAAATAGAA
CAAAGCTGATCTTCCAAGCTTCCAAGTTTGGTTCTCAAACACCCCGGGAACATTCACCCTAGGCGTCTTT
CCTCCCCTTCTCCCCTATTCTCTACGCCCCCCCCCCGCTCTCGGGAGCAGGTGGTAGGCTCCGCGCTCAA
CGCGCAGGCGCGCGCCGTCGTGGGCGGGGCGGGGCGGGAAGTGGGGGGCGGGGTGTGCGCGGGCT
TGGTTTGGGGCCGCGCGGGAGCGGGAGTACCGCCACTCCAGTGCGCAGGCGCCTGGCGGTTACCG
GTCTCGCCATGGAGCG

图中加粗处为引物序列,注有下划线的部分为 5'UTR 序列,没有任何标示的是第 8 外显子序列

The bold parts are the primers, marked with underlined part is 5'flanking sequence, non-underlined regions is the sequence of exon 8

图 3 反向 PCR(I-PCR)克隆猪部分 *SRPK1* 的 5'UTR

Fig. 3 5' flanking sequence of pig *SRPK1* amplified by inverse PCR

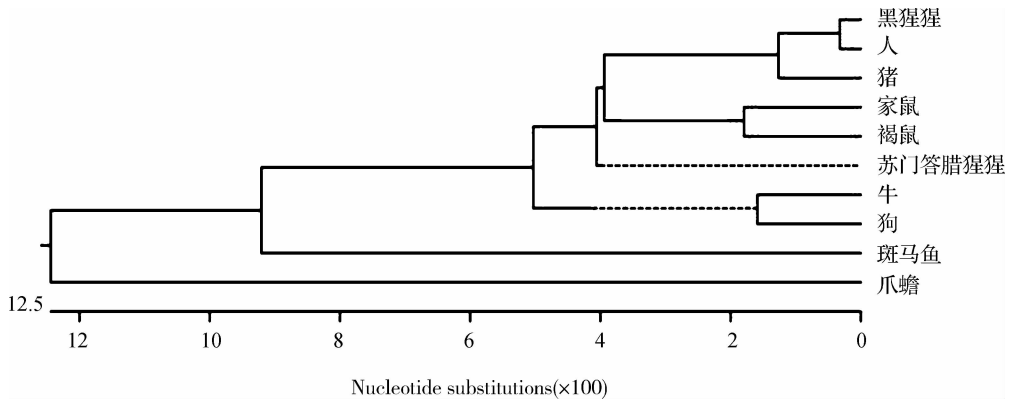


图 4 10 个物种 SRPK1 蛋白编码区序列同源性比较

Fig. 4 Multi-alignment of the SRPK1 CDS of 10 species

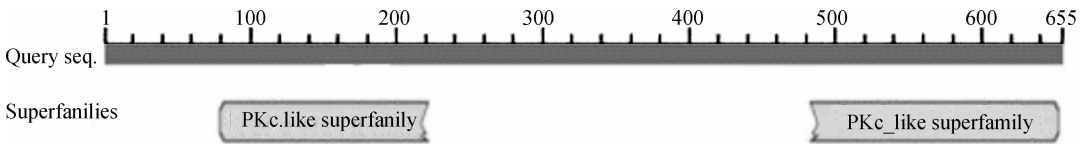


图 5 SRPK1 蛋白序列结构域的分析

Fig. 5 The structure domains analysis of SRPK1

2.3 组织表达谱研究

以持家基因 $\beta actin$ 作为对照,利用基因特异引物进行不同组织间的表达分析,结果见图 6、7。结果表明,1 日龄猪 SRPK1 基因在肾、肺、大肠、小肠、心、肝、肌肉的表达低,在脾、胃和脑的表达较高。1 月龄大白猪 SRPK1 基因在肾、肺、大肠、脾、肝、肌肉、的表达低甚至不表达而在小肠、和胃的表达高。1 月龄杜洛克 SRPK1 基因在肾、小肠、脾、心、肝中表达低甚至不表达而在肺、大肠、胃中表达较高。

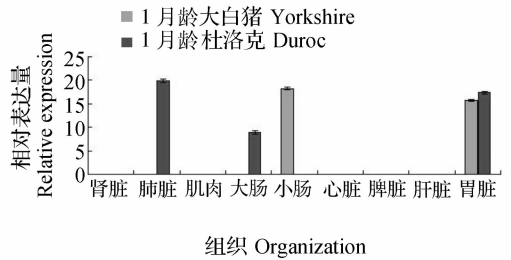


图 7 30 日龄大白猪及杜洛克 SRPK1 基因的组织表达谱
Fig. 7 The tissue expression pattern of SRPK1 in 30-day-old Large White and Duroc pigs



图中没有显示相对表达量低于 0.1 的柱状图。图 7 同
The histograms of the relative expression level less than 0.1 were not showed. The same as Figure7

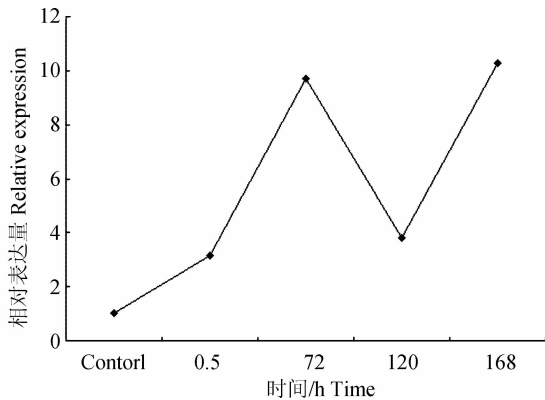
图 6 1 日龄及 30 日龄大白猪 SRPK1 基因的组织表达谱
Fig. 6 The tissue expression pattern of SRPK1 in 1-day-old and 30-day-old Large White pigs

2.4 骨骼肌损伤及肌分化过程中的表达

2.4.1 病理症状 注射盐酸布比卡因后 1 月龄大白猪行为的改变:当把盐酸布比卡因局部注射于大白猪的腓肠肌后,该侧肌肉立即变得松软无力,足背屈爬行时明显呈拖步状态,此观察结果与有关报告相似^[7],这种拖步在 24 h 后仍能见到,48 h 后仅见爬行缓慢,64 h 趋于正常。

2.4.2 病理性结果 肌肉损伤病理切片显示,注射 0.5 h 后即盐酸布比卡因的作用高峰期,切片显示肌细胞细胞核出现不定的聚集,细胞间出现不紧凑的空隙,细胞核在细胞内的排列混乱,大量细胞出

现死亡症状, *SRPK1* 表达量较低(图 8、图 9B、9C)。注射 72 h 显示肌细胞仍呈现损伤状态和局部血管内出血(图 9D), 同时有部分嗜酸性的巨噬细胞迁移到坏死的肌纤维处 *SRPK1* 表达迅速升高(图 8、图 9E)。注射 120 h 后, 坏死纤维及细胞外间隙被大量单核细胞浸润, 出现大量肌管样具有中央核的再生肌纤维, 同时也有血管内出血现象, *SRPK1* 表达量出现下降趋势(图 8、图 9F、9G 和 9H)。注射 168 h 后大部分坏死肌纤维被新生肌纤维所取代(图 9I、9J), 由于肌纤维的新生能力有限, 所以增生出很多结缔组织来填充肌细胞间隙, 此时 *SRPK1* 表达量又快速升高并超过前期最高水平, 由于观察的时间范围有限, 不能确定 168 h 附近是不是 *SRPK1* 表达的高峰期。注射生理盐水(阳性对照)组无肌纤维变性、坏死和炎症浸润, 其肌卫星细胞排列密集, 细胞核分布均匀且位于胞壁侧, *SRPK1* 的表达丰度较注射盐酸布比卡因 0.5 h 的低(图 8、图 9A)。在损伤后的肌细胞分化过程中, *SRPK1* 的表达量也出现反复的升高和降低。



对照组为不注射盐酸布比卡因组

Control group is no hydrochloride injected

图 8 *SRPK1* 在骨骼肌发育阶段的表达

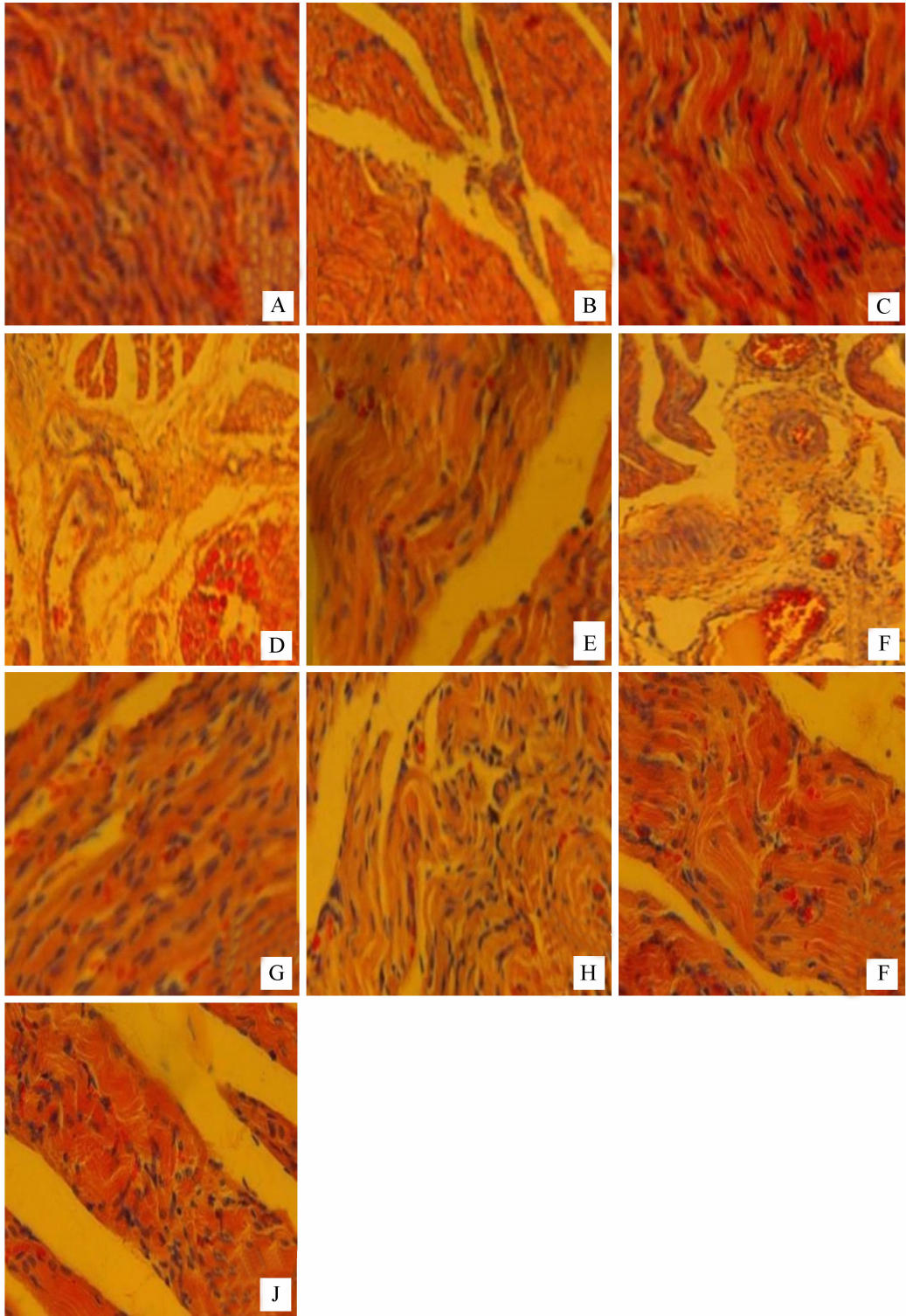
Fig. 8 *SRPK1* expression in skeletal muscle developmental stages

3 讨论

Jumma 等研究发现, *SRp20* 存在于小鼠卵和胚胎发育的早期, 失去 *SRp20* 的小鼠受精卵难以形成胚泡, 并死于桑椹胚期^[8]。在使用 RNAi (RNA interference) 抑制 *SR* 基因 *CeSF2/ASF* 后会导导致线虫胚胎晚期的死亡。如果同时阻碍两种或更多 *SR* 蛋白的作用, 将会导致线虫的死亡或其他类型的发育缺陷^[9]。Stickeler 等对肿瘤的研究发现, 在肿瘤形成之前, 不同组织细胞中 *SR* 蛋白的表达类型各

不相同, 一般只表达 1 个家族中的 1 个亚型; 随着肿瘤的发展, *SR* 蛋白表达类型逐渐增多, 各不相同; 以至最后恶性肿瘤中 *SR* 蛋白的表达类型变得十分复杂^[10]。Zahler 等^[11] 研究不同组织的细胞发现, *SR* 蛋白各有不同的一套表达型调节着拼接位点的选择, 从而决定组织的特异性。 *SRPK1* 基因作为 *SR* 蛋白特异性激酶为研究其相关调控因子的关系, 以及肌肉、肿瘤细胞形成的过程带来了新的研究视角和着手点, 具有重要意义。本研究克隆了猪 *SRPK1* 的核苷酸序列(包含开放阅读框架及其部分 5' UTR 序列), 并进行了初步的序列分析, 推测分析了其氨基酸序列特点及转录结合位点。为该基因在其它物种中的克隆表达鉴定起到重要的参考作用, 并为后续的多物种同源性分析, 物种间高度保守标签序列的确定奠定了基础, 丰富了其功能研究的基础。本研究中, 我们为克隆 *SRPK1* 的 5' UTR 序列而采用了反向 PCR 的方法, I-PCR 法操作简单, 避免了文库筛选、克隆、亚克隆等繁琐步骤, 对试验条件要求不高, 花费少, 无需设计和合成大量昂贵的核苷酸接头, 克服了产生非特异性产物的麻烦, 特异性较好。对其组织表达的研究发现, 较大日龄(1 月龄)猪的消化系统是 *SRPK1* 基因的高表达甚至是特异表达区域。本试验中发现相同日龄杜洛克猪消化系统 *SRPK1* 的表达较大白猪的高, 目前已有研究表明, 杜洛克的脂肪含量比一些瘦肉型猪的脂肪含量高, 所以推测 *SRPK1* 可能在动物的消化功能及营养吸收利用等方面起到一定的作用, 最近有研究证明 *SP1* 位于控制肥胖的 QTL 区域可能起到了脂肪调节的作用^[12]。而我们在 *SRPK1* 的部分 5' UTR 序列上找到了多个 *SP1* 蛋白转录结合位点, 因此推测其可能与猪的肥胖有关。

有研究发现 *SRPK1* 基因由 *MEF2* 直接调控进行特异表达的, 缺少该基因的表达会发生中央核肌病, 在骨骼肌中过度表达会产生肌纤维退化和早期胚胎死亡^[13]。骨骼肌在胚胎期的发育是非常复杂的过程, 包括对骨骼肌前体细胞迁移、增殖和分化在时间和空间上进行有序的调节。骨骼肌的再生是成年骨骼肌受到损伤后出现的一种生理性反应, 是骨骼肌组织中的肌卫星细胞受到刺激信号发生活化, 进入细胞周期进行增殖, 随后分化融合形成新生肌纤维。目前已知多种生长因子参与了骨骼肌的分化和再生的调节, 这些生长因子在胚胎肌肉形成和成年骨骼肌损伤再生过程中高表达, 能刺激肌前体细



A 为注射相同剂量生理盐水的对照组;B、C 为盐酸布比卡因注射 0.5 h 骨骼肌特征;D、E 为盐酸布比卡因注射 72 h 骨骼肌特征;F、G、H 为盐酸布比卡因注射 120 h 后骨骼肌特征;I、J 为盐酸布比卡因注射 168 h 骨骼肌特征

A is the control group with the same injection dose of normal saline; B, C are the skeletal muscle characteristics 0.5 h later after the injection of bupivacaine hydrochloride; D, E are the skeletal muscle characteristics 72 h later after the injection of bupivacaine hydrochloride; F, G, H are the skeletal muscle characteristics 120 h later after the injection of bupivacaine hydrochloride; I, J are the skeletal muscle characteristics 168 h later after the injection of bupivacaine hydrochloride

图 9 猪骨骼肌损伤模型石蜡(HE 染色)切片及其电镜图(40×)

Fig. 9 Porcine skeletal injury modeling paraffin (HE dyeing) section and its TEM (40×)

胞的发育和分化成熟^[14]。研究结果显示,自骨骼肌注射心肌毒素后 0.5 h,SRPK1 的表达即会明显上调,这种高表达一直维持至损伤后的第 72 小时后出现下降,但在注射 120 h 后又出现表达上调的现象。通过与空白对照(control)比较发现在注射盐酸布比卡因后 0.5 h 即肌细胞刚刚出现明显损伤症状时,其表达量要明显低于正常情况下即空白对照(control)的表达量,而到了 72 h 左右达到了第一个表达高峰,而这个时间大致是 Myogenin 损伤后到达表达高峰的时间,而在 72 h 前,大致 48 h 是 MyoD 肌肉损伤表达的高峰。由于 SRPK1 对 SR 蛋白的磷酸化是 RNA 剪切的先决条件,而 SR 的重复区段参与了蛋白与蛋白的相互作用。不仅如此,SRPK1 还可能是选择性剪切的调控因子,是参与基因表达的重要因素。所以由 SRPK1 基因的表达特征可以推测 SRPK1 可能参与了对肌卫星细胞增殖分化的调控。

4 结 论

4.1 本研究中克隆了大白猪 SRPK1 基因(FJ476290)的全长 CDS 序列,并利用反向 PCR 技术克隆了部分 5'UTR 序列,其包含 2 个 PKc_like 功能域。系统发育分析表明,猪与黑猩猩和人的亲缘关系最近,与斑马鱼进化关系最远。

4.2 本研究利用 real-time PCR 方法分析大白猪和杜洛克猪 SRPK1 基因在心脏、肝脏、脾脏、肺脏、大肠、小肠、胃、肌肉和脑的表达情况,发现 1 日龄猪 SRPK1 基因在肾、肺、大肠、小肠、心、肝、肌肉中表达低甚至不表达,在脾、胃和脑中有所表达。1 月龄大白猪 SRPK1 基因在肾、肺、大肠、脾、肝、肌肉中表达低甚至不表达,在小肠和胃中有所表达。1 月龄杜洛克 SRPK1 基因在肾、小肠、脾、心、肝中表达低甚至不表达,在肺、大肠、胃中有表达。

4.3 本研究通过猪骨骼肌损伤模型,发现 SRPK1 基因在肌肉损伤修复过程中转录水平出现明显的变化,在骨骼肌细胞损伤修复过程中 SRPK1 基因表达出现反复增高和降低。

参考文献:

[1] GUI J F, LANE W S, FU X D, et al. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle [J]. *Nature*, 1994, 369(6482):678-682.
[2] GUI J F, TRONCHERE H, CHANDLER S D, et al. Purification and characterization of a kinase specific for the

serine and arginine rich pre-mRNA splicing factors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(23):10824-10828.

- [3] WANG H Y, ARDEN K C, BERMINGHAM J R, et al. Localization of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in mouse and human chromosomes [J]. *Genomics*, 1999, 57(2):310-315.
[4] 凌 飞, 李加琪, 梅盈洁, 等. 反向 PCR 技术克隆猪 H-FABP 基因 5 侧翼序列 [J]. *广东农业科学*, 2007, (6): 75-76.
[5] NONAKA I, TAKAGI A, ISHIURA S, et al. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaïne) [J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 60(2):167-174.
[6] AKIYAMA C, KOBAYASHI S, NONAKA I, et al. Comparison of behavior in muscle fiber regeneration after bupivacaine hydrochloride- and acid anhydride-induced myonecrosis [J]. *Acta Neuropathol*, 1992, 83(5):584-589.
[7] 曾 纓, 张 成, 刘克玄, 等. 成肌调节因子 MyoD 与 myogenin 在肌肉损伤修复过程的动态变化 [J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(5):542-545.
[8] JUMMA H, WEI G, NIELSEN P J, et al. Blastocyst formation is blocked in mouse embryo lacking the splicing factor SRp20 [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(16):899-902.
[9] LONGMAN D, JOHNSTONE I L, CACERES J F, et al. Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans* [J]. *EMBO J*, 2000, 19(7):1625-1637.
[10] STICKELER E, KITTRELL F, MEDINA D, et al. Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumori genesis [J]. *Oncogene*, 1999, 18(24):3574-3582.
[11] ZAHLER A M, NEUGEBAUER K M, LANE W S, et al. Distinct functions of SR proteins in alternative pre 2mRNA splicing [J]. *Science*, 1993, 260(5105):219-222.
[12] FURBASS R, WINTER A, FRIES R, et al. Alleles of the bovine DGAT1 variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromosome 14 can stimulate gene expression [J]. *Physiol Genomics*, 2006, 25(1):116-200.
[13] NAKAGAWA O, ARNOLD M, NAKAGAWA M, et al. Centro nuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2 [J]. *Genes & Dev*, 2005, 19: 2066-2077.
[14] 叫 玮, 袁葵洲, 吴秀山. 骨骼肌发育的分子遗传学 [J]. *生命科学研究*, 2001, 3 (Suppl):63-67, 72.