

猪 *Fosl2* 基因克隆、结构预测及其 mRNA 发育性表达变化

范兴兴, 李新建, 李改英, 郭吉利, 韩雪蕾, 吕刚, 任广志*

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要: 本试验旨在克隆猪 *Fosl2* 基因 CDS 序列并对其进行分析, 研究该基因在猪的不同阶段各种组织(心、肝、脾、肺、肾、背最长肌、背部脂肪)中的发育性表达规律。以豫南黑猪为材料, 利用 RT-PCR 技术克隆猪 *Fosl2* 基因 CDS 区域, 利用生物信息学方法预测蛋白结构, 应用 qRT-PCR 检测豫南黑猪 7~180 日龄上述组织中 *Fosl2* 基因的发育性表达。结果表明, 猪 *Fosl2* 基因的 CDS 区为 984 bp, 编码 327 个氨基酸, 跨膜序列为 17~33 位氨基酸, 该肽链没有信号肽, 为跨膜非分泌型蛋白, 在 122~187 位氨基酸的位置存在亮氨酸拉链结构域, 核苷酸和氨基酸序列同其他种属间的保守性很高。*Fosl2* 基因拥有广泛的组织表达谱, 在心、肝、脾、肾、肺、背最长肌和背部脂肪的不同发育阶段均有不同程度的表达, 而其在肺中的表达量均高于同时期其他组织内的表达量, 推测猪 *Fosl2* 基因可能与肺部组织的发育有关; 其在背部脂肪不同发育阶段的变化趋势表明其可能参与调控猪脂肪的生成进而影响瘦肉率。本研究结果将为进一步研究猪 *Fosl2* 结构及其多功能奠定基础。

关键词: 猪; *Fosl2*; 克隆; 序列分析; 发育性表达

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)02-0211-08

Gene Cloning, Bioinformatics Analysis and Developmental Expression of *Fosl2* Gene in Pig

FAN Xing-xing, LI Xin-jian, LI Gai-ying, GUO Ji-li, HAN Xue-lei, LÜ Gang, REN Guang-zhi*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural

University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The study was conducted to clone and analyze CDS sequence of pig *Fosl2* gene, and to investigate the developmental expression of *Fosl2* in pig various tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney, the longissimus muscle and backfat) at different stages. In this study, Yunan Black pig was used as experimental animal to clone the CDS region of *Fosl2* gene by RT-PCR, the protein structure were predicted by bioinformatics, meanwhile, qRT-PCR was used to analyze developmental expression of *Fosl2* gene in pig from 7- to 180-day-old. The results showed that the CDS of pig *Fosl2* gene was 984 bp, encoding 327 amino acids. It had no signal peptide in peptide chain, but had a transmembrane domain and a basic-domain leucine-zipper, which were from 17 to 33 amino acids and from 122 to 187 amino acids, respectively. The protein of pig *Fosl2* had high conservatism among mammal, and it was transmembrane and non-secretory protein. The *Fosl2* was widely expressed in tissues, the expression of *Fosl2* in lung was higher than other tissues at the same stage, it was deduced that pig *Fosl2* might be related to the process of lung development; the variation trend in backfat showed that *Fosl2* might had the function enhancing adipogenesis and then regulate lean meat percentage. Therefore, the results of this study may lay foundation for further

收稿日期: 2014-05-26

基金项目: 河南省生猪产业技术体系创新团队(S2012)

作者简介: 范兴兴(1988-), 女, 河南三门峡人, 硕士生, 主要从事猪遗传育种与繁殖研究, E-mail: 13643806298@163.com

* 通信作者: 任广志, 教授, 主要从事猪遗传育种与繁殖研究, E-mail: rgzhxt@163.com

research on the structure and the role of *Fosl2* gene in physiogenesis in pig.

Key words: pig; *Fosl2*; cloning; sequence analysis; developmental expression

Fos 基因家族包含 4 个基因: *Fos*、*FosB*、*Fosl1* 以及 *Fosl2* (*Fos*-like antigen 2), 这些基因编码形成的亮氨酸链可以与 *Jun* 基因家族 (包含 *C-Jun*、*Junb* 和 *Jund*) 编码的蛋白二聚成活化因子蛋白 1 (Activator protein-1, AP1)^[1], 而 AP1 与细胞增殖、分化和转化调控, 细胞凋亡的发生, 胚胎发育及器官发生以及体内免疫系统的调控功能相关^[2]。近年来, 随着 AP1 研究的日趋深入, 人们发现 *Fos* 基因家族在细胞的增殖分化, 动物体的新陈代谢、生长性状、免疫系统应答等生理活动中起着重要的调节作用^[3]。V. Foletta 等^[4] 1994 年首次克隆出小鼠 *Fosl2* 基因的 cDNA 序列, 并指出其在卵巢、胃、大肠、小肠、肺、心等内脏器官中呈现高表达状态, 随后的研究更显示出该基因与人和动物的脂肪代谢^[2]、骨骼发育^[5-7] 以及疾病和癌症的发生相关^[8-10], 因此该基因也引起了动物育种界以及医学界的广泛关注。然而目前关于 *Fosl2* 的相关研究都集中在国外, 且多数以人、牛、小鼠为主, 猪上关于该基因的研究未见报导。本试验旨在揭示猪 *Fosl2* 的结构与功能, 为进一步研究猪 *Fosl2* 的生物学功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

1.1.1 试验材料 选取同等饲养条件下喂养的 7、30、60、180 日龄豫南黑猪各 3 头, 屠宰后立即取心、肝、脾、肺、肾、背最长肌、背部脂肪 7 种组织样品, 迅速放入液氮中, -80°C 保存, 用于组织表达特性分析; 同时, 选取产仔母猪新鲜胎衣样品组织, 放入液氮, -80°C 保存, 用于 *Fosl2* 基因 CDS 的克隆。

1.1.2 主要试剂 DL2000 Marker、*Taq* DNA 聚合酶均购自北京康为试剂公司; 凝胶回收试剂盒 (TIANGel Midi) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; X-gal、IPTG 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; Amp 购自 Sigma 公司; RNAiso Plus Trizol、DEPC、大肠杆菌 DH5 α 、反转录 PCR 试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser、荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, pTA2 Vector 载体购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司。

1.1.3 引物的设计与合成 通过比对 GenBank 上人 *Fosl2* 基因 (BC022791.1)、牛 (NM_001192950.1)、猕猴 (NM_001260911.1) 序列的保守区域后, 利用 Primer5.0 设计克隆猪 *Fosl2* 基因 CDS 区的 PCR 引物, 同时设计该基因以及内参基因 *GAPDH* (AF017079.1) 的荧光定量 PCR 引物, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列信息见表 1。

1.2 猪 *Fosl2* 基因 CDS 区扩增及产物的克隆与测序

提取样品组织总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量。使用 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒及特异性引物对豫南黑猪总 RNA 进行去除基因组 DNA 以及反转录反应, 利用 RT-PCR 方法扩增目的片段, 反应结束后取 PCR 反应液 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。将产物进行凝胶回收后, 将 PCR 产物与 pTA2 载体连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37°C 恒温培养 12~16 h 后, Amp⁺ 平板挑取阳性菌落后提取质粒并进行 PCR 鉴定, 选取阳性重组子送宝生物 (大连) 工程有限公司测序。

表 1 *Fosl2* 基因及内参基因的引物信息

Table 1 The information of primers used in the study

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Length of product	用途 Purpose
<i>Fosl2</i>	F1-GAGGGCGGGGAAGAAAAACA R1-GGTGAAACAAAAGGCACTGAGCATT	1 427	CDS 克隆
<i>Fosl2</i>	F2-AGCAGAAATTCGGGTAGATATGG R2-AGCGAGGGTATGGGTTGGACC	138	组织表达特性分析
<i>GAPDH</i>	F- GGTCACCAGGGCTGCTTTT R- CATTTGATGTTGGCGGGAT	210	组织表达特性分析

1.3 多物种种间 *Fosl2* 进化分析

应用 DNASTar 软件对 8 个不同物种间 *Fosl2* CDS 区域的核苷酸及氨基酸序列进行同源性比较,构建 *Fosl2* 基因序列的进化关系树,*Fosl2* 核苷酸及氨基酸序列信息来源于 GenBank,具体信息为牛(NM_001192950.1)、人(BC022791.1)、猕猴(NM_001260911.1)、大猩猩(XM_004029036.1)、星鼻鼯鼠(XM_004686333.1)、树鼩(XM_006162129.1)、绵羊(XM_004005786.1)、虎鲸(XM_004268168.1)。

1.4 猪 *Fosl2* 蛋白结构和功能预测

用 ExpASy-ProtParam Tool 工具对猪 *Fosl2* 蛋白基本理化性质进行包括氨基酸组成、元素组成、等电点、分子量等的预测,应用 ProtScale 的在线版本对猪 *Fosl2* 蛋白质进行疏水区域预测,应用 TM-PRED 在线软件分析猪 *Fosl2* 蛋白的跨膜区,应用 SignalP4.0 在线软件进行猪 *Fosl2* 的信号肽分析,应用 PHD 在线软件对猪 *Fosl2* 的二级结构进行预测,应用 InterProScan 在线软件对猪 *Fosl2* 蛋白结构域进行预测。

1.5 猪 *Fosl2* 基因组织表达特性分析

1.5.1 cDNA 合成 取 4 个不同时期(7、30、60、180 日龄)豫南黑猪的心、肝、脾、肺、肾、背最长肌以及背部脂肪分别进行总 RNA 提取,测得总 RNA 的 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比值在 1.8~2.0 即为符合要求,根据 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒进行去除基因组 DNA 反应以及反转录,基因组 DNA 的去除反应体系 10 μL :5 \times gDNA Eraser Buffer 2.0 μL ,gDNA Eraser 1.0 μL ,RNase Free dH₂O 5.0 μL ,总 RNA 2.0 μL 。混匀后短暂离心,42 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,该产物命名为 A。反转录体系为 20 μL :A 10 μL ,5 \times PrimeScript Buffer II 4.0 μL ,PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL ,RT Primer Mix 1.0 μL ,RNase Free dH₂O 4.0 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,该反应产物命名为 B,即为 cDNA 产物。

1.5.2 荧光定量 PCR 反应 根据试剂盒说明,在罗氏荧光定量 PCR Lightcycler 480 仪上进行,荧光定量 PCR 反应体系为 25 μL :SYBR GREEN 12.5 μL ,*Fosl2*-F1(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)1 μL ,*Fosl2*-R1(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)1 μL ,B 反应液 1.5 μL ,加灭菌 ddH₂O 至终体积为 25 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,45 个循环。系统将自动采集荧光强度增长指数,并进行分析绘制每一感应管的扩增动力学曲线。

在 PCR 反应过程中,设定无 cDNA 样品的空白管作为阴性对照。

1.5.3 荧光定量结果分析及数据处理 定量中以 180 日龄肺的 Ct 值为对照进行计算,以 *GAPDH* 为参照进行相对定量数值分析,结果用 Ct 法($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)进行统计计算,最终数据用 Graphpad Prism 5.0 软件进行图形制作以及单因素方差分析(One way ANOVA)和多重比较分析,所有结果均以“平均值 \pm 标准误差(Mean \pm SE)”表示。 $P > 0.05$ 表示差异不显著, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 猪 *Fosl2* 基因的克隆

猪胎衣中的总 RNA 提取后,经测定 OD 值符合要求。反转录后进行 PCR,产物经凝胶电泳显示获得长度为 1 427 bp 的片段(图 1),将产物回收与载体连接后,选取阳性质粒进行测序。结果表明,所得片段长度为 1 427 bp,其中包括猪 *Fosl2* 基因 CDS 区 984 bp(图 2),将序列提交 NCBI,获得登录号 KM191330。通过 BLAST 在线比对,与 GenBank 牛的 *Fosl2* 基因同源性为 91%,所得片段即为猪的 *Fosl2* 基因。

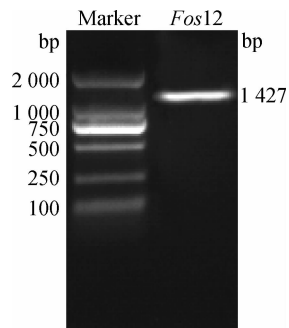


图 1 猪胎衣组织目的片段 RT-PCR 结果

Fig. 1 The RT-PCR results of *Fosl2* of the pig after birth

2.2 多物种间 *Fosl2* 的同源性比较以及进化分析

利用 DNASTar 软件,对猪与牛、人、猕猴、大猩猩、鼯鼠、树鼩、绵羊以及虎鲸的 *Fosl2* 基因的 CDS 区域核苷酸及氨基酸序列进行比对,结果如表 2 所示:猪与牛、人、猕猴、大猩猩、星鼻鼯鼠、树鼩、绵羊、虎鲸的核苷酸序列同源性分别为 91%、92%、92%、100%、91%、92%、94%、94%;猪与牛、人、猕猴、大猩猩、星鼻鼯鼠、树鼩、绵羊、虎鲸的氨基酸序列同源性分别为 95%、97%、96%、100%、95%、96%、95%、96%。利用 GenBank 公布的核苷酸序列,采

用 DNAMAN 软件建立了系统进化树(图 3)。该进化树显示,猪 *Fosl2* 与大猩猩 *Fosl2* 在一个小分枝

上,2 个物种的分子进化地位最近,同时与其他哺乳动物在一个大分枝上。

```

GAGGGCGGGGAAGAAAAACACCTGTTTCTCTCGGGCCCCCACCGCGGATCATGTACCAGGATTATCCCGGGAACCTTGGACACCTCGT 90
                                     M Y Q D Y P G N F D T S 12
CCCGGGCGAGCAGCGGCTCTCTCGCGCACGCCGAGTCTACTCCAGCGGCGGCGGCCAGCAGAAAATCCGGGTAGATAGCTTGGCT 160
S R G S S G S P A H A E S Y S S G G G G Q Q K F R V D M P G 42
CAGGCAGCGCTTCATCCCCACCATCAACGCCATCACGACCAGCCAGGACCTGCAGCGGATGGTACAGCCACAGTGATCACCTCCATGT 270
S G S A F I P T I N A I T T S Q D L Q R M V Q P T V I T S M 72
CCAACCATACCCCGCTCGCACCCCTACAGCCCTGCGAGGCTGGCTCTGTCCCGGGCACATGGCTCTCCCAAGACCCGGCGTGA 360
S N P Y P R S H P Y S P L P G L A S V P G H M A L P R P G V 102
TCAAGACCATTGGCACCCTGTGGGCGCAGGAGAGAGATGAGCACTGTCCCTGAAGAGGAGGAGAAGCGTCSAATCCGGAGGGAGA 450
I K T I G T T V G R R R R D E Q L S P E E E E K R R I R R E 132
GGAACAAGTTGGCCGAGCCAAAGTCCGGAACTGCGCGGAGCTGACGAGAGAAGCTGCAGCGGAGACAGAGGAGCTGGAGGAAAGAGA 540
R N K L A A A K C R N R R R E L T E K L Q A E T E E L E E E 162
AGTCGGAGCTGCAGAGGAGATGCCCAGCTGCAGAGGAGAGGAGAAGCTGGAGTTTCATGCTGGTGGCCCACGGATCTGTGTGCAAGA 630
K S E L Q K E I A E L Q K E K E K L E F M L V A H G S V C K 192
TCAGCCCTGAGGATCGTCCGTCGCCACCGGCTCTGGGCTGCAGACCTGCGCAGTGGTGGCAGCGGAGGCGTGTCCGCGCTGGTGGTGA 720
I S P E D R R S P P A S G L Q T L R S G G S G G V C A V V V 222
AACAGGATCCCCTGGAAAGAGGACAGCCCTCATCTCTGTCGCGGGGCTGGAGAGGGCCACTGCTCCGTGATCAAGCCCATTAGCATCG 610
K Q D P L E E D S P S S S S A G L D E G H C S V I K P I S I 252
CTCGGGCTTCTATGGGGAGGAGCCCTGACACCCCTCGTGGTGAACCTCCACTCTGCCATCACTCCGGGCACCTCGAACCCTCGTCT 900
A R G F Y G E E P L H T P I V V T S T P A I T P G T S N L V 282
TCACCTACCCAGCGTCTTGGAGCAGGAGTCAACGGGCTCGCCCTCGAGTCTGCTCCAAGGCTCACCGCAGAGCAGTAGCAGTGGGG 990
F T Y P S V L E Q E S P A S P S E S C S K A H R R S S S S G 312
ACCACTCATCAGACTCCTTGAACCTCCCGACTCTGCTGGCTCTGTAACCCAGCTCCCTGGGGGGTCTCGACACTGCTCCTCTCCAGG 1080
D Q S S D S L N S P T L L A L * 327
GACCAGCACCTTCCAGCGCTCCAGGGCCCTGAGGGCAAGAGGGGACCTGTGCCGGAGAGCTTCTCTGGCTCGGTGGAGATCCAGGTGGGA 1170
TTTGGCGGTGATGCATTGGAGGACTTGGATGGTCTCTTGAAGGCGCAAGACCTCCTCCCTCGGACATCCTGGAGAGCAAAATCCTGTTTC 1260
TTGAAAAGCCTTGTAGAACTTGTTTGGTGGACTCGGCATCTCTCTGGCTTCTGAAGAGCCTGAAAGCTGGTGTGACCGCTCGCGCCCAT 1350
TGCTCGTGTGTCTCTGGAGTGATGGTGTCTTTCCCGGCCCAACCAAGCATGCTCAGTGCCCTTTTGGTTTCACC 1427
    
```

上行表示猪 *Fosl2* 核苷酸序列,下行表示推测的猪 *Fosl2* 氨基酸序列;起始密码子 ATG 用下划线标出,“*”代表终止密码子 TAA

The upper line show the nucleotide sequences and the lower line show the deduced amino acid sequences;The initial code ATG is underlined, * indicate the terminal code TAA

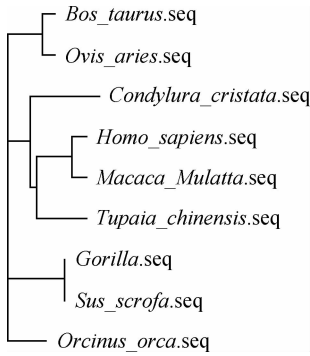
图 2 猪 *Fosl2* 核苷酸序列及推测氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of pig *Fosl2*

表 2 猪 *Fosl2* 与其他动物的核苷酸和氨基酸序列一致性比较

Table2 Comparison of nucleotide and amino acid of *Fosl2* between pig and other animals

物种 Species	核苷酸一致性/% Nucleotide identity	氨基酸一致性/% Amino acids identity
牛 <i>Bos taurus</i>	91	95
人 <i>Homo sapiens</i>	92	97
猕猴 <i>Macaca Mulatta</i>	92	96
大猩猩 <i>Gorilla</i>	100	100
星鼻鼯鼠 <i>Condylura cristata</i>	91	95
树鼯 <i>Tupaia chinensis</i>	92	96
绵羊 <i>Ovis aries</i>	94	95
虎鲸 <i>Orcinus orca</i>	94	96



所引用的序列均来自 GenBank 数据库。登录号如下:牛 (NM_001192950.1)、人 (BC022791.1)、猕猴 (NM_001260911.1)、大猩猩 (XM_004029036.1)、星鼻鼹鼠 (XM_004686333.1)、树鼩 (XM_006162129.1)、绵羊 (XM_004005786.1)、虎鲸 (XM_004268168.1)

All sequences come from the GenBank database. *Bos Taurus* (NM_001192950.1), *Homo sapiens* (BC022791.1), *Macaca Mulatta* (NM_001260911.1), *Gorilla* (XM_004029036.1), *Condylura cristata* (XM_004686333.1), *Tupaia chinensis* (XM_006162129.1), *Ovis aries* (XM_004005786.1), *Orcinus orca* (XM_004268168.1)

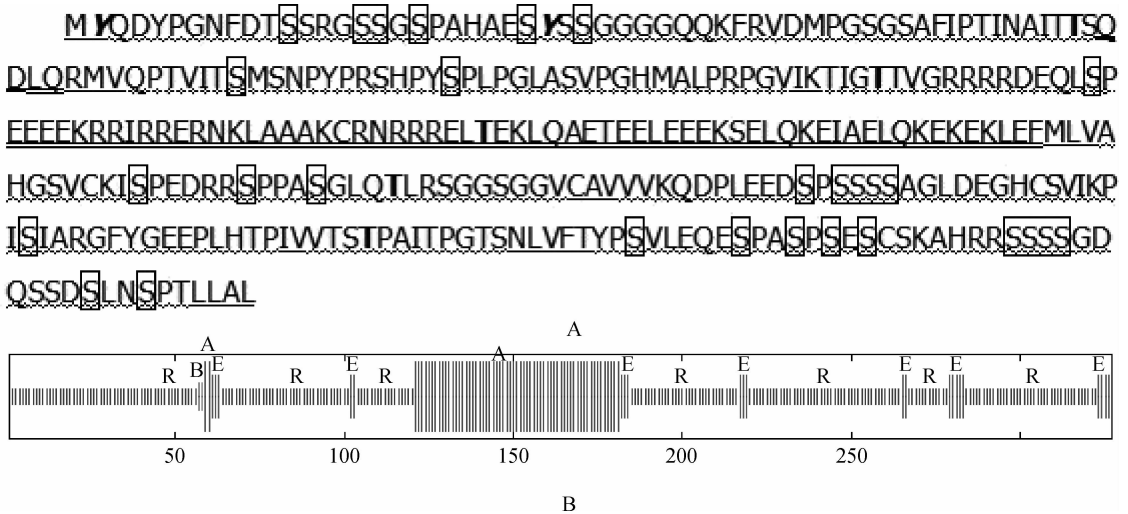
图 3 猪 *Fosl2* 与其他动物之间系统进化树的构建

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Fosl2* between pig and other animals

2.3 猪 *Fosl2* 蛋白理化性质分析以及结构与功能的预测

利用在线软件分析可知,猪 *Fosl2* 蛋白由 327

个氨基酸组成,分子质量为 35.33 ku,理论等电点为 6.42,分子式为 $C_{1512}H_{2447}N_{449}O_{504}S_{11}$,原子总数为 4 923, N 端为蛋氨酸,估计半衰期为 30 h,蛋白质的不稳定指数为 89.94,表明此蛋白的性质不稳定,脂溶系数为 66.51。虽为亲水性蛋白,但在 42、44~54、64~72、85~95、98~100、102~107、181~192、205、213、215~224、246~254、264~272、277~286、321~323 等位点具有疏水性,最大疏水区位于第 218 位氨基酸,最大疏水值为 2.167,最大亲水区位于第 124 位氨基酸,最大亲水值为 -3.256,其亲水性平均值为 -0.669; *Fosl2* 包括 α -螺旋 63 个,百分比为 19.27%,多集中在序列的中间区域, β -折叠共 2 个,位于第 58 和 59 位氨基酸,占 0.61%,延伸主链占 7.34%,无规则卷曲 238 个,占 72.78%; *Fosl2* 蛋白存在 36 个磷酸化位点,其中丝氨酸 29 个,苏氨酸 5 个,酪氨酸 2 个; *Fosl2* 的跨膜序列为 17~33 位氨基酸,序列为 SGSPAHAESYSSGGGGQ,该蛋白为跨膜蛋白,SignalP4.0 信号肽预测工具分析发现存在信号肽的概率为 0,说明该蛋白不存在信号肽,为非分泌型蛋白(图 4)。 *Fosl2* 蛋白在 122~187 位氨基酸的位置含有亮氨酸拉链域。



A. 猪 *Fosl2* 氨基酸序列理化性质; B. 猪 *Fosl2* 氨基酸二级结构预测图。A 图中上行字母表示推测的猪 *Fosl2* 氨基酸序列; 下行中的下划线表示延伸主链,波浪线表示无规则卷曲,双划线表示 α -螺旋,加重加粗下划线表示 β -折叠; 上行中字母加粗斜体表示该位点为酪氨酸磷酸化位点,字母外加方框表示丝氨酸磷酸化位点,字母本身只加粗表示苏氨酸磷酸化位点。B 图中 R 表示无规则卷曲, B 表示 β -折叠, A 表示 α -螺旋, E 表示延伸主链

A. The physicochemical properties of *Fosl2* amino acid sequence in pig; B. The prediction graph of *Fosl2* amino acid sequence in pig. The upper line showed deduced amino acid sequences; The lower line extended strand was underlined, random coil was marked by wavy lines, alpha helix was double underlined, beta turn was bold underlined; The bold italic letter indicated Tyr phosphorylation sites, the blocked letter showed Ser phosphorylation sites, the only bold letter indicated Thy phosphorylation sites. In Fig. B, R showed random coil, beta turn was showed by B, alpha helix was showed by A, the extended strand was showed by E.

图 4 猪 *Fosl2* 氨基酸序列理化性质分析及二级结构预测

Fig. 4 Physical and chemical properties analysis and secondary structure prediction of pig *Fosl2* amino acids sequence

2.4 猪 *Fosl2* mRNA 组织表达特性

Fosl2 基因在不同时期猪心、肝、脾、肺、肾、背最长肌、背部脂肪中的发育性表达量见表 3。结果表明, *Fosl2* 基因在上述 7 种组织的 4 个不同时期(7、30、60 和 180 日龄)都有不同程度的表达: 肺不同时期的表达量均不同程度的高于同时期的其他组织表达量, 其中 7 日龄为表达量最高值, 且显著高于其他日龄 ($P < 0.05$), 随后 30 日龄表达量骤然下降 ($P < 0.05$) 并达到最低值, 随后开始逐渐上升。其余组织在 7 日龄为表达量最大值的还有肝、脾和肾,

肝在 7 日龄后表达量逐渐下降, 且到 60 日龄时为最低值, 180 日龄时又有回升; 脾则表现出先降低后升高, 然后再降低的曲折线表达模式; 肾则是从 7 日龄后, 表达量一直呈下降的趋势。心和背部脂肪在 4 个不同发育时期呈现出一致的变化规律, 均为 30 日龄时表达量降低, 随后逐渐增加, 直到 180 日龄时表达含量达到最高值。背最长肌内的表达量在 30 日龄时达到最大值, 随后又逐渐降低直至 180 日龄时达到最低值。

表 3 猪 *Fosl2* 基因的组织表达量

Table 3 The expression of pig *Fosl2* in different tissues

组织 Tissue	7 日龄 7 d	30 日龄 30 d	60 日龄 60 d	180 日龄 180 d
心 Heart	0.018±0.001 0 ^{ab}	0.0071±0.001 3 ^a	0.019±0.004 4 ^{ab}	0.026±0.003 9 ^b
肝 Liver	0.076±0.021 ^b	0.037±0.003 6 ^a	0.011±0.005 6 ^a	0.036±0.004 1 ^a
脾 Spleen	0.22±0.042 ^b	0.064±0.013 ^a	0.21±0.065 ^b	0.12±0.012 ^{ab}
肺 Lung	1.4±0.17 ^c	0.21±0.023 ^a	0.55±0.12 ^{ab}	0.87±0.059 ^b
肾 Kidney	0.095±0.01 ^b	0.063±0.036 ^{ab}	0.058±0.0051 ^{ab}	0.022±0.002 1 ^a
背最长肌 Longissimus muscle	0.007 1±0.000 21 ^b	0.015±0.000 51 ^c	0.004 1±0.001 1 ^a	0.003 7±0.000 95 ^a
背部脂肪 Backfat	0.021±0.004 8 ^a	0.088±0.004 3 ^b	0.041±0.001 5 ^a	0.14±0.012 ^c

同行数据后所标数字相同表示差异不显著 ($P > 0.05$), 所标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

In the same tissue, values with the same letter show no significant difference ($P > 0.05$); value with the different letter show significant difference ($P < 0.05$)

3 讨论

本试验通过 RT-PCR 技术获得猪 *Fosl2* 基因的 CDS 区, 其包含 984 个碱基, 编码 327 个氨基酸。人 *Fosl2* 全长 25.17 kb, cDNA 为 981 bp, 编码由 326 个氨基酸残基组成的蛋白^[11]。小鼠的 *Fosl2* 全长 22.05 kb, 编码由 326 个氨基酸残基组成的蛋白^[12]。研究预测猪 *Fosl2* 基因编码蛋白质的理论分子量为 35.33 ku, 为跨膜非分泌型蛋白, 具有 14 个疏水区, 但其属于亲水性蛋白, 由此可推测, *Fosl2* 可能存在膜结合形式, 并作为机体某些调控机制的载体通道。通过不同脊椎动物种间 *Fosl2* 基因的同源性比较, 发现 *Fosl2* 基因物种间的同源性很高, 尤其与大猩猩核苷酸序列的同源性高达 100%, 与虎鲸的同源性也高达 94%, 这表明该基因的进化保守性非常高。同时发现, *Fosl2* 蛋白在 122~187 位氨基酸含有亮氨酸拉链结构域, 正是通过该区域,

Fosl2 蛋白与 *Jun* 基因家族编码的蛋白聚合成 AP1, 进而发挥其作用。

本试验利用实时荧光定量 PCR 技术对 7、30、60 和 180 日龄豫南黑猪的心、肝、脾、肺、肾、背最长肌以及背部脂肪中 *Fosl2* 基因的表达规律进行了研究, 结果显示, *Fosl2* 基因拥有广泛的表达谱, 在上述组织的不同发育阶段均有不同程度的表达, 7 日龄肺内的表达量明显高于其他组织, 因此推测该基因与胚胎肺部组织的早期发育相关。一些病理的研究发现, *Fosl2* 基因的不同表达量与肺部组织的阶段性发育调节或病变相关, R. Eferl 等^[13] 发现, *Fosl2* 基因参与调控肺纤维化病变过程中的细胞外基质生成, 并认为该基因是引起肺纤维化的一种致病因子, *Fosl2* 转基因小鼠较正常小鼠更易患上严重的非特异间质性肺炎等肺病, 本试验中, 肺 *Fosl2* 基因的表达量在 30 日龄下降、后又上升的规律, 反映出该基因可能在猪肺的发育过程中有某些特殊意义, 其在病理研究中的发现提示该基因可能参与猪

肺部疾病的发生,这还需要更深入的试验佐证。

C. Wrann 等^[2]证实,哺乳动物类细胞 *Fosl2* 基因的敲除会导致瘦素基因 (*Leptin*, *LEP*) 表达量的降低, *Fosl2* 的过量表达会促进小鼠脂肪细胞内 *LEP* 基因表达量的增加,而瘦素与哺乳动物的能量代谢、脂肪生成息息相关。C. Wrann^[14]发现 *Fosl2* 基因对离体培养的细胞以及小鼠体内 *LEP* 基因的表达发挥重要的调控作用。本试验中,背部脂肪内 *Fosl2* 基因在 30 日龄时的表达量较 7 日龄显著升高,60 日龄时又有显著下降,180 日龄的表达量显著上升,结合猪的整个生长阶段分析其原因:30 日龄是仔猪的哺育阶段,体内脂肪或者细胞分裂有较快且明显的增加,因而 *Fosl2* 表达量升高;随后 60 日龄保育阶段,仔猪的饲料结构、生长环境发生变化,导致仔猪掉膘,其体内脂肪的蓄积略有降低,因而 *Fosl2* 表达量降低;180 日龄时 *Fosl2* 基因的表达量骤然上升,这可能是由于育肥猪此阶段生长迅速、营养充足、体内脂肪快速蓄积^[15];综合该基因的变化趋势与猪脂肪的生长规律,推测该基因可能通过与 *LEP* 基因的相互协调作用影响猪的脂肪生成,同时参与调控育肥期猪的瘦肉率,进而影响其生长速度,这种推测如果得到证实,将对猪育种工作发挥一定的作用。

N. Reich 等发现, *Fosl2* 转基因小鼠从 12 周开始,皮肤发生纤维化病变,成肌纤维细胞的分化增强^[16],另外, *Fosl2* 基因的沉默表达促进了肌肉肌酸激酶和肌球蛋白重链表达含量的升高^[17]。猪肉品质的评判指标中,嫩度是肉的主要食用品质之一,而嫩度是由肌肉中各种蛋白质的结构决定的。同时肌肉系水力是一项重要的肉质性状,它不仅影响肉的颜色香味、营养成分、多汁性、嫩度等食用品质,而且有着重要的经济价值,而系水力大部分是由肌肉的纤维结构和毛细血管张力而定。本试验中,肌肉内 *Fosl2* 基因的表达量在 30 日龄达到最大值,而此时正是肌肉细胞的快速分裂增长期^[15],60 和 180 日龄该基因的表达量较 30 日龄有显著降低,原因可能是肌肉的生长速度降低,因此推测 *Fosl2* 基因可能参与猪肌肉生成的调控过程,进而对猪肉的品质产生一定的影响。

Fosl2 基因在脾、肾、肝、心等组织中也有适量表达。但 4 种内脏中 *Fosl2* 的表达规律却不尽相同:脾呈现 30 日龄稍有下降、60 日龄小幅上升、180 日龄再降低的曲折线表达规律;7 日龄的肾表达量

最高,随后其表达量缓慢降低;肝是自 7 日龄后开始降低,60 日龄为最低表达量,随后的 180 日龄又有所回升;心内 30 日龄为最低表达量,后又有所回升,直到 180 日龄时其表达量达到最大值。*Fosl2* 基因在不同内脏组织中表达规律的差异性也预示着该基因可能参与多种内脏的发育过程,这需要更深入的试验验证。

4 结 论

本试验成功克隆猪 *Fosl2* 基因 CDS 区,分析其种间高度保守性,该基因编码肽链无信号肽,为跨膜非分泌型蛋白,第 122~187 位氨基酸位点存在亮氨酸链结构域。猪 *Fosl2* 基因在肺组织内的表达量均高于同时期在心、肝、肾、脾、背最长肌和背部脂肪内的表达量,推测该基因可能参与肺组织的生长发育过程;另外该基因在脂肪组织内的表达变化规律与猪发育阶段的脂肪生长规律一致,预测该基因可能参与猪的脂肪生长调控进而影响瘦肉率;该基因在猪的心、肝、脾、肾、背最长肌中的功能作用,还需要进一步的研究证实。

参考文献 (References):

- [1] CHINENOV Y, KERPPOLA T. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity [J]. *Oncogene*, 2001, 20(19):2438-2452.
- [2] WRANN C, EGUCHI J, BOZEC A, et al. FOSL2 promotes leptin gene expression in human and mouse adipocytes [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3):1010-1021.
- [3] EFERL R, WAGNER E. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(11): 859-868.
- [4] FOLETTA V, SONOBE M, SUZUKI T, et al. Cloning and characterisation of the mouse Fra-2 gene [J]. *Oncogene*, 1994, 9(11):3305-3311.
- [5] BOZEC A, BAKIRI L, JIMENEZ M, et al. Fra-2/AP-1 controls bone formation by regulating osteoblast differentiation and collagen production [J]. *J Cell Biol*, 2010, 190(6):1093-1106.
- [6] KARRETH F, HOEBERTZ A, SCHEUCH H, et al. The AP1 transcription factor Fra2 is required for efficient cartilage development [J]. *Development*, 2004, 131(22):5717-5725.
- [7] BOZEC A, BAKIRI L, HOEBERTZ A, et al. Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-re-

- ceptor signalling and hypoxia[J]. *Nature*, 2008, 454(7201):221-225.
- [8] MILDE-LANGOSCH K, JANKE S, WAGNER I, et al. Role of Fra-2 in breast cancer: influence on tumor cell invasion and motility [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 107(3):337-347.
- [9] KHARMAN-BIZ A, GAO H, GHIASVAND R, et al. Expression of activator protein-1(AP-1) family members in breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:441.
- [10] NAKAYAMA T, HIGUCHI T, OISO N, et al. Expression and function of FRA2/JUND in cutaneous T-cell lymphomas[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(4):1367-1373.
- [11] MOLVEN A, HOUGE G, BERGER R. Chromosomal assignment of the human gene encoding the Fos-related antigen-2 (FRA2) to chromosome 2p22-p23[J]. *Genomics*, 1996, 38(1):72-75.
- [12] POIRIER C, LALOUETTE A, FOLETTA V, et al. The gene encoding the Fos-related antigen 2 (Fosl2) maps to mouse chromosome 5 [J]. *Mamm Genome*, 1997, 8(3):223.
- [13] EFERL R, HASSELBLATT P, RATH M, et al. Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30):10525-10530.
- [14] WRANN C, ROSEN E. New insights into adipocyte-specific leptin gene expression[J]. *Adipocyte*, 2012, 1(3):168-172.
- [15] 金山虎. 猪的四个生长期[J]. *现代农业*, 2002, 5:24.
JIN S H. Four growth periods of pigs[J]. *Modern Agriculture*, 2002, 5:24. (in Chinese)
- [16] REICH N, MAURER B, AKHMETSHINA A, et al. The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(1):280-290.
- [17] ALLI N, YANG E, MIYAKE T, et al. Signal-dependent fra-2 regulation in skeletal muscle reserve and satellite cells [J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4(6):e692.

(编辑 郭云雁)