

山羊 *FTO* 基因克隆及其表达谱

林亚秋^{1#}, 廖红海^{1,2#}, 贺庆华¹, 李倩^{1,2}, 王永^{1,2*}

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041;

2. 青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室, 成都 610041)

摘要: 本研究旨在阐明山羊 *FTO* 基因的表达特性, 并分析其表达与肌内脂肪沉积的相关性。以简州大耳羊为试验动物, 采用 RT-PCR 方法克隆 *FTO* 基因, 利用实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 技术检测其组织表达差异, 同时检测该基因在不同发育阶段不同部位山羊肌肉组织中的表达水平, 并与 IMF 含量进行相关分析。结果表明, 山羊 *FTO* 基因 CDS 区为 1 518 bp, 编码 505 个氨基酸, 为无跨膜结构的非分泌蛋白。*FTO* mRNA 在山羊的脂肪、脾和肺中表达水平较高 ($P < 0.01$), 在背最长肌中表达最低; *FTO* 蛋白在背最长肌和脾中表达较高 ($P < 0.01$), 脂肪组织中表达次之。同时结果显示, *FTO* mRNA 在 24 月龄山羊背最长肌和股二头肌中表达水平显著高于 1~3 和 8~10 月龄的表达水平 ($P < 0.05$)。 *FTO* mRNA 表达量与背最长肌 IMF 含量呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与股二头肌及臂三头肌 IMF 含量呈不同程度的正相关。本研究指出, *FTO* 基因表达与 IMF 含量存在相关性, 推测可作为 IMF 沉积的候选基因。

关键词: 山羊; *FTO*; 克隆; 组织表达; 肌内脂肪含量

中图分类号: S827; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)05-0888-11

Cloning and Expression Profiling of *FTO* Gene of Goat

LIN Ya-qiu^{1#}, LIAO Hong-hai^{1,2#}, HE Qing-hua¹, LI Qian^{1,2}, WANG Yong^{1,2*}

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Sichuan Province for Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Exploitation, Chengdu 610041, China)

Abstract: The aim of this study was to clarify the expression characteristics of *FTO* gene and investigate the correlation between *FTO* expression and intramuscular fat (IMF) content in muscles. The *FTO* gene was cloned from Jianzhou Da'er goat by RT-PCR method. Quantitative Real-time PCR (qPCR) and Western blotting were used to measure the expression profiles of *FTO* gene in tissues, especially in various parts of muscle of goats at different developmental stages. The correlation analysis was performed between *FTO* gene and IMF content. The results showed that goat *FTO* gene was 1 518 bp in CDS length, encoding 505 amino acids. The *FTO* protein was predicted to be non-secretory and lacking cross-membrane domain. The mRNA level of *FTO* was higher in adipose, spleen and lung ($P < 0.01$), while lowest in *longissimus dorsi*; However, the protein level of *FTO* was higher in *longissimus dorsi* and spleen than that in adipose ($P < 0.01$). The mRNA level of *FTO* was significantly higher in *longissimus dorsi* and *biceps femoris* of 24-month-old goats than that in 1 to 3-month-old and 8 to 10-month-old goats ($P < 0.05$). The

收稿日期: 2015-05-28

基金项目: 四川省“十二五”畜禽育种攻关项目(2011NZ0099-36); 四川省科技创新产业链示范工程重大项目(2014NZ0003); 四川省教育厅项目(15ZA0385)

作者简介: 林亚秋(1976-), 女, 内蒙古海拉尔人, 博士, 副教授, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: linyq1999@163.com; 廖红海(1988-), 男, 仡佬族, 贵州正安人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: liaohonghaivip@163.com; 林亚秋与廖红海为并列第一作者

* 通信作者: 王永, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: wangyong010101@swun.cn

mRNA level of *FTO* was negatively correlated with IMF content of *longissimus dorsi* ($P < 0.05$) but positively correlated with IMF content of *biceps femoris* and *triceps brachii*. In this study, we investigated a significant correlation between *FTO* expression and IMF, which indicates that *FTO* may serve as a candidate gene for IMF.

Key words: goat; *FTO*; clone; tissue expression; intramuscular fat content

近年来,随着人们消费水平的提高及消费观念的转变,对动物肉品质的要求越来越高。山羊肉具有蛋白含量高,脂肪、胆固醇含量低,且含有多种人体必需氨基酸等优点,因此备受人们推崇。我国是山羊养殖的大国,其分布地区广,在我国畜牧业中占有非常重要的地位。肉用山羊是当前养殖业的主体,简州大耳羊是以努比山羊和简阳本地山羊为育种材料培育出的具有自主知识产权的优良地方肉用品种,因此阐明其优良肉质性状形成的分子机制具有重要的理论与实际意义。

肌内脂肪(Intramuscular fat, IMF)是影响其肉质性状的一个极其重要的指标,被认为与肉质呈正相关^[1-2],是山羊的重要经济性状之一。IMF 受多因素影响,其中从分子水平上阐明影响 IMF 的候选基因的调控作用是研究者所关注的焦点问题。脂肪肥胖相关基因(Fat mass and obesity associated gene, *FTO*)又叫 *FATSO*,是 2007 年新发现的与人类肥胖相关的等位基因^[3],属于非血红色加双氧酶基因超家族,编码 2-酮戊二酸依赖的核酸脱甲基酶。研究发现该基因广泛存在于脊椎动物中^[4],并在动物多种组织中均表达,在食物摄入、能量代谢^[5]、肥胖^[3,6-7]和 2 型糖尿病^[8-10]等方面发挥重要的调控作用。关于 *FTO* 的研究比较深入的主要集中在人和鼠的能量平衡,基于该基因的重要性,畜牧工作者对该基因在动物生产中的作用也非常重视, X. Jia 等于 2012 年研究指出,鸡 *FTO* 基因序列的多样性与家禽的体重、肥胖等相关^[11],并且 *FTO* 基因的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)与猪、牛和兔子的肉质性状和生长存在相关性,推测其可作为动物肉质和生长的候选基因^[12-15]。但 *FTO* 基因在山羊上的研究目前尚未见相关报道,NCBI 上仅见山羊 *FTO* 的预测序列,关于山羊 *FTO* 的基因特性,在山羊各组织和不同发育阶段的表达谱,及其是否可作为山羊肉质性状的候选基因皆需要通过试验来阐明。

因此本研究通过克隆得到山羊 *FTO* 基因,并对该序列进行生物信息学分析,利用实时荧光定量

PCR 和 Western blotting 分析该基因在不同组织中的表达情况,并对该基因的时序表达情况及与肌肉中的 IMF 含量进行关联分析,为进一步研究山羊 *FTO* 基因功能及解析简州大耳羊优质肉质性状形成的分子机制提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物与组织样品采集 本试验选择 1~3 月龄(羔羊)、8~10 月龄(育成羊)和 24 月龄左右(成年羊)的简州大耳羊公羊为试验动物(每个阶段各 9 只),购自四川省简阳市。屠宰后迅速取其皮下脂肪、背最长肌、股二头肌和臂三头肌组织;并同时采集成年公羊心、肝、脾、肺、肾、脂肪、背最长肌、股二头肌和臂三头肌等组织。采集的组织样品用锡箔纸包好,置于液氮内带回实验室, -80 °C 放置备用。用于测定肌内脂肪含量的样品去除结缔组织后带回实验室置于 -20 °C 备用。

1.1.2 主要试剂 Trizol、SYBR® Premix Ex Taq TM (2×)、pMD-19T 载体购自 TaKaRa 公司, Taq DNA 聚合酶和 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo 公司, 2× Taq PCR Master Mix 购自 Fermentas 公司,胶回收试剂盒购于 Axygen 公司,感受态细胞 DH5α 购自天根生化科技有限公司,抗 *FTO* 多克隆抗体购自美国 Abcom 公司,抗 β-actin 购自北京博奥森生物技术有限公司,牛血清白蛋白(BSA)购自 Sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 山羊 *FTO* 基因的克隆测序 按照 Trizol 试剂盒说明书操作步骤提取山羊皮下脂肪组织总 RNA,用紫外分光光度计测得总 RNA 的 OD 值为 1.8~2.0,符合试验要求。然后按照反转录试剂盒说明书以 Oligo (dT) 为引物合成 cDNA 第一链。利用 Primer Premier5.0 软件,根据 GenBank 数据库中登陆的牛、牦牛及山羊预测序列设计 PCR 扩增引物(表 1),产物长度预计为 1 731 bp。PCR 反应体系为 2× Long Taq PCR Master Mix 12.5 μL、

Primer F (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μL 、Primer R (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μL 、DNA 1.0 μL 、ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

目的基因 Target gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ T _m	用途 Utilization
<i>FTO</i>	F1:GGTTAGTAGTGGCGAAGGCG R1:CACTCCCTAATTGTTCCCAACT	57	扩增 <i>FTO</i> cDNA 片段
<i>FTO</i>	F2:GACGGGGACCTTGAATACAT R2:ACTGCCTTGAAACCAGAACTGTC	60	实时荧光定量 PCR
<i>GAPDH</i>	F:CTGCCAGAACATCATCCCA R:TCCGTCAGGCAGCTCATAG	62	扩增内参基因

F. 正义链引物;R. 反义链引物。GAPDH. 3-磷酸甘油醛脱氢酶

F. Sense primer;R. Antisense primer. GAPDH. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

1.2.2 山羊 *FTO* 基因生物信息学分析 利用 NCBI 的 BLAST 在线工具进行同源性比对,利用 MEGA5.0 构建系统进化关系树;利用 ExPASy 分析推导蛋白质的基本理化性质,利用 ProtScale 对山羊 *FTO* 蛋白疏水区进行预测,利用 TMHMM 预测跨膜结构域,利用 SignalP 4.0 预测信号肽序列,利用 NetPhos 2.0、NetOGlyc 3.1、NetNGlyc 1.0 分析预测 *FTO* 蛋白磷酸化位点、O 糖基化位点、N 糖基化位点,通过 Psort II 对亚细胞定位进行预测,相关蛋白相互作用网络由 STRING 交互式数据库所构建, Hopfield 预测二级结构, SWISS-MODEL 预测三级结构。

1.2.3 山羊 *FTO* 基因组织表达谱 提取成年山羊的心、肝、脾、肺、肾、背最长肌和皮下脂肪等组织的总 RNA($n=6$)和总蛋白($n=3$)。采用实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qPCR) 和 Western blotting 检测 *FTO* 基因的组织表达差异。

qPCR 反应体系:SYBR[®] Premix Ex Taq TM (2 \times) PCR 10 μL ,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 0.5 μL ,模板 cDNA 1 μL ,ddH₂O 8 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ /62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,45 个循环。引物序列见表 1。

Western blotting 步骤:将上述提取的各个组织蛋白利用 Bradford 方法对总蛋白质进行定量。提取的总蛋白 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮样 10 min,12% SDS-PAGE

用 DNA 回收试剂盒回收 1%琼脂糖凝胶电泳检测后的目的条带,然后连接于 PMD-19T 载体,转化 DH5 α 后筛选阳性克隆,最后送交生工生物工程上海股份有限公司进行序列测定。

分离蛋白,接着以 200 mA 的电流将蛋白转移到 PVDF 膜上,封闭缓冲液封闭 1 h,用抗 *FTO* 和 β -actin 的抗体 (1:1 000),室温孵育 2 h。再与对应的辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1:2 000)室温下孵育 2 h,最后利用 Bio-Rad GS-800 曝光系统检测目的蛋白,并用 Quantity One 软件分析蛋白表达量。

1.2.4 山羊 *FTO* 基因时序表达谱 分别提取 1~3 月龄、8~10 月龄和 24 月龄左右的公羊皮下脂肪、背最长肌、股二头肌和臂三头肌的总 RNA(每个阶段每个组织 $n=9$),并取 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA。利用 qPCR 检测 *FTO* 在 3 个发育阶段的表达差异。反应体系及反应条件同 1.2.3。

1.2.5 IMF 的测定 采用索氏抽提法测定 1~3 月龄、8~10 月龄和 24 月龄左右的 3 个阶段山羊背最长肌、股二头肌和臂三头肌的 IMF 含量(每个阶段公羊各 9 只),按照公式计算 IMF 含量:

$$\text{IMF 含量}(\%) = \frac{x-y}{x} \times 100\%$$

式中, x 表示浸提前样品干重, y 表示浸提后的样品干重。

1.2.6 数据统计分析 数据用“平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD)”表示,组织差异定量分析结果以脂肪组织的 Ct 值为对照来计算,不同发育阶段以 1~3 月龄为对照,结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行统计分析^[16]。最终结果以 SPSS 18.0 软件中的 One-way ANOVA 进行显著性检验分析,基因的表达量与 IMF 含

量的相关用 Bivariate Correlations 的 Pearson Correlation 进行分析。当 $P < 0.05$ 时,认为差异显著,当 $P < 0.01$ 时,认为差异极显著。

2 结果

2.1 山羊 *FTO* 基因 CDS 扩增及克隆测序

利用 RT-PCR 方法扩增,1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,获得与预期目的片段大小一致的特异条带,经过测序进一步验证获得山羊 *FTO* 基因核苷酸序列 1 731 bp,其中 5' 非翻译区为 34 bp,3' 非翻译区为 179 bp,ORF 为 1 518 bp,编码 505 个氨基酸(图 1),将获得序列提交 GenBank(KR013052)。进一步分析其碱基组成显示 $A = 25.8\%$, $C = 23.6\%$, $G = 27.9\%$, $T = 22.7\%$, $X = 0.0\%$, $(G + C) > (A + T)\%$,说明该基因 CDS 区 DNA 双链较稳定。

2.2 物种间 *FTO* 同源性比较以及进化树构建

本试验克隆得到的山羊 *FTO* 核苷酸序列与 GenBank 上登陆的山羊序列(XM_005691984.1)比较有 4 个 SNPs 位点,即 139 位的 C-T、865 位的 C-G、1 105 位的 G-A 和 1 573 位的 A-G。利用 NCBI 在线比对程序 BLAST 将山羊 *FTO* 推测的氨基酸序列与绵羊、牛、印度水牛、马、野骆驼、人、猕猴、猪和小鼠的氨基酸序列进行比对,发现同源性较高,为 82%~100%。同时利用各物种的氨基酸序列构建了系统进化树(图 2),结果显示,*FTO* 基因在各物种间具有较高的保守性,山羊 *FTO* 与反刍动物在同一分支,亲缘关系最近。

2.3 山羊 *FTO* 蛋白结构与功能预测

2.3.1 *FTO* 理化性质分析 推测的山羊 *FTO* 蛋白序列经分析发现该蛋白由 505 个氨基酸残基组成,利用 ExPASy 在线工具对该蛋白的理化性质进行分析显示,该蛋白分子式为 $C_{2609} H_{4053} N_{709} O_{771} S_{27}$,分子质量为 58.55 ku,理论等电点为 5.28,说明为酸性蛋白。原子总数为 8 169,不稳定系数为 51.24,为不稳定蛋白。带负电荷的氨基残基(Asp+Glu)总数为 79,带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 60,因此整体上带负电。

2.3.2 *FTO* 蛋白结构与功能的预测 疏水性预测结果显示,山羊 *FTO* 蛋白在 12 位点处存在最小亲水指数 -3.222,在 438 位点存在最大亲水指数 2.000。疏水性平均值 -0.523,为亲水性蛋白。跨

膜结构域分析显示,山羊 *FTO* 蛋白无跨膜结构;信号肽分析发现该蛋白无信号肽,为非分泌蛋白。蛋白修饰分析发现,该蛋白具有 7 个丝氨酸磷酸化位点(分别位于 56、183、229、256、319、355、358 位点)、5 个苏氨酸磷酸化位点(分别位于 4、6、32、282、320)、5 个酪氨酸磷酸化位点(39、108、127、220、475)、2 个 N-糖基化位点,无 O-糖基化位点。蛋白质结构域分析结果显示,山羊 *FTO* 蛋白的 35~326 位氨基酸序列为 *FTO* 催化结构域,329~500 位氨基酸为 C 端结构域(图 1、图 3)。亚细胞定位分析指出,*FTO* 主要在细胞质(73.9%)、细胞核(21.7%)和细胞骨架(4.3%)中发挥生物学作用。*FTO* 二级结构预测显示, α -螺旋为 208 个,占 41.19%,82 个 β 折叠占 16.24%,无规则卷曲 215 个占 42.57%(图 4)。利用网上在线工具 SWISS-MODEL 分析了该蛋白的三级结构(图 5),进一步证明了二级结构的预测。

2.3.3 *FTO* 蛋白相互作用分析 利用 STRING 交互式数据库搜索山羊 *FTO* 蛋白相互作用蛋白(条件限制在 10 个蛋白内),结果表明,*FTO* 蛋白可能与 MC4R、NPY、UCP1、CDKAL1 等存在相互作用(图 6),通过这个分析可为更深入的研究山羊 *FTO* 蛋白的功能提供重要的支持。

2.4 山羊 *FTO* 基因的组织表达分析

qPCR 和 Western blotting 检测结果发现,*FTO* 基因在山羊 7 个不同组织中均存在广泛表达(图 7)。但 *FTO* mRNA 和蛋白表达存在不同,mRNA 结果显示,其中在山羊脂肪、脾和肺中存在高水平表达,极显著高于其他各个组织($P < 0.01$),其次在肝和肾中也存在较高水平的表达($P < 0.01$),在背最长肌中的表达水平最低。但 *FTO* 蛋白表达则在背最长肌和脾中表达最高($P < 0.01$),脂肪组织中表达次之,显著高于肝和肺组织($P < 0.05$)。

2.5 山羊 *FTO* 基因的时序表达分析

qPCR 结果显示,*FTO* 基因在 3 个生长发育阶段的脂肪和肌肉组织均被检测到表达,其中在 8~10 月龄与 24 月龄的脂肪组织 *FTO* mRNA 表达水平显著高于 1~3 月龄的表达水平($P < 0.05$);*FTO* mRNA 在 24 月龄的背最长肌和股二头肌的表达水平显著高于其他两个阶段的表达水平($P < 0.05$),但在臂三头肌的 3 个阶段该基因表达水平均无显著差异($P > 0.05$)(图 8)。

```

1  GGTTAGTAGTGGOGAAGGGGGCTATATCGGCAGCATGAAGCGGAACCCGAGCGGAGGAAOCGAGAGGOGGAAGCTAAGAAACTGAGGCT
1  M K R T P T A E E R E R E A K K L R L
91  TCTTGAAGAGCTGAAGACACATGGCTTCOCTAOCCTGACCCCAAGACGATGAATTCATCAGCAGTGGCAACTGAAATATGCTAAACT
20  L E E L E D T W L P Y L T P K D D E F Y Q Q W Q L K Y P K L
181  GATTCTCGAGAAGCTGCACAGCGTCCCGAGTTCCTCATAAAGAGGTTCAACAAGCCTTCTCACAACGCAAGCATGGCTGTTTATT
50  I L R E A A S V P E L L H K E V Q Q A F L T L H K H G C L F
271  TCGTGATCTGGTGAGGATCCAGGGCAAAGACTTCTCACTCCAGTCTCTCCATCCTCATCGGTAACCTGGCTGCAACTACAAGTACCT
80  R D L V R I Q G K D L L T P V S R I L I G N P G C T Y K Y L
361  GAACACCGGGCTCTCACGGTACCTGGCTGTGAAAGGCTCTGATGCAAAGTACAATGAGGCGGAAATAGCTGTGGCTGTCAAACCTT
110  N T R L F T V P W P V K G S D A K Y N E A E I A V A C Q T F
451  CCTCAAGCTCAACAGTTACCTGCAGGTAGAGACCATCCAGGCTTGGGAAGAGCTTCTGCAAGGAGAAAGCAACATCGATGCTGTGCC
140  L K L N S Y L Q V E T I Q A L E E L A A K E K A N I D A V P
541  AGTGTGATAGGTCCAGATTTCCAGGGTGGCATGGGGTCTCTTTGATGGGACGATGAGATTGACATGAAGAOCGAGCAGCGTA
170  V C I G P D F P R V G M G S S F D G H D E I D M K N R A A Y
631  TAAGCTCACTTTGTGAATTCATGGATCCOCAGAAAATGCCATACCTGAAAGAGGAAACATATTTGGCATGGGAAAATGGCCGTGAG
200  N V T L L N F M D P Q K M P Y L K E E P Y F G M G K M A V S
721  CTGGCATCATGATGAAAATCTGGTGGACAGGTCAGGGTGGCAGTGTACAGTTATAGCTGTGAGGCGCTGAGAGGAAAGTGGAGATGA
230  W H H D E N L V D R S A V A V Y S Y S C E G P E E E S E D D
811  CCTCAGCTTGAAGGCAGAGATCCTGATATTTGCCAGTTGGTTTTAAGATCTCTCTGGGACATAGAGACACTGGGTGGGATACCCCT
260  P Q L E G R D P D I W H V G F K I S W D I E T P G L A I P L
901  TCACCAAGGAGACTGCTATTTATGCTTGATGATCTCAATGCCACCAACACTGTGTTTTGGCTGGTTTACCACCTGGCTTTAGTTC
290  H Q G D C Y F M L D D L N A T H Q H C V L A G L P R F S S
991  CACCCACCGAGTGGCAGAGTCTCGACGGGACCTTGAATACATCTTACAGCGCTGCCAGTGGCCCTGCAGAATGTCOGGAGAGGGC
320  T H R V A E C S T G T L E Y I L Q R C Q V A L Q N V R E E A
1 081  AGACAACCGTGAATCTCTTTGAAGTCCCTGGAGTCAGTGGTTTTGAAACAAGGAGAAGAGATCCACAACGAGGTGGAGTTTGAATGGCT
350  D N G E I S L K S L E S V V L K Q G E E I H N E V E F E W L
1 171  GAGACAGTCTGGTTTCAAGGCAGTGGATACAAAAGTGGACTGACTGGTGGTGTGAGCCATGAGTCAGCTGGAAGAGATGTGGAGAAA
380  R Q F W F Q G S R Y K K C T D W W C Q P M S Q L E E M W R K
1 261  GATGGAGTGGTTGACAAGCGCTGTCTTGTGAAGTTAGAAGAGAGGGGGTCCCATGGAACAAAAGAAATGAGATGTGACGTCACATCCT
410  M E W L T S A V L R E V R R E G V P M E Q K N E M L T S I L
1 351  CGCCTGATCAOCCOCCGACAACTGAGGAGAGAATGGCATGCCAGGTGCCAGTCTCGAATGCGGGGACTTTACCCGCTGATCAGAA
440  A S I T T R Q N L R R E W H A R C Q S R I A R T L P A D Q K
1 441  GCCAGAGTGGCGCCATACTGGGAAAAGGTGATCCTTGGATGCTCTGCCATTGCACTCACAGAGATGTTTCTGAACTCAGAGGTCT
470  P E C R P Y W E K G D P S M P L P F D L T E I V S E L R G L
1 531  GCTTCTGGAGAACCGGCTAGAGACAGAGCACAGCTCTCAGATGGAGGAGGAGGCTCTTTTCAGTCTCTTCTCCOCCOCTCTCATG
500  L L E T R P *
1 621  GCCTTAGGOGAGGGCAGTGTGGGTAGACTTGGCCTTGAGATTGTAGAAACTGTGAGATGATAGAGAATGGCCTTGAGATTGTTTCTA
1 711  GTTGGGAACAATTAGGGAGTG

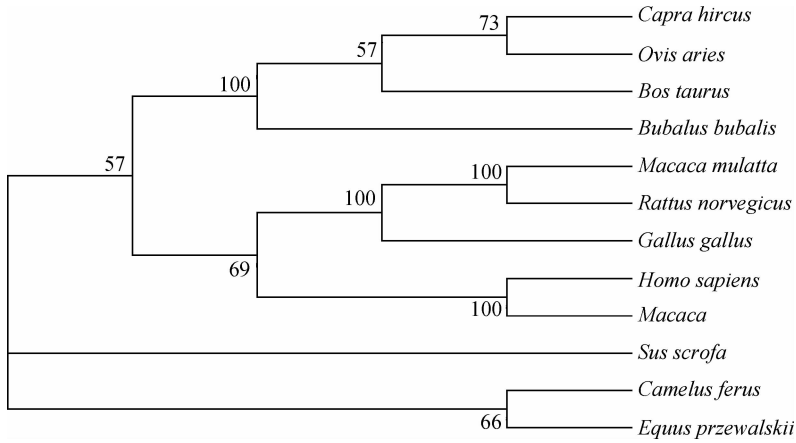
```

上行表示山羊 *FTO* 核苷酸序列,下行表示推测的氨基酸序列。下划线表示起始密码子,方框表示催化结构域,阴影表示 C 端结构域,* 表示终止密码子

The upper line shows the nucleotide sequences and the lower line shows the deduced amino acid sequences. The initial code ATG is underlined, box indicates the catalytic domain, shade indicates the C-terminal domain, * indicates the terminal code TAG

图 1 山羊 *FTO* 核苷酸及其推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of goat *FTO*



所引用的序列均来自 GenBank 数据库:绵羊(NP_001098401)、牛(NP_001091611)、印度水牛(XP_006043112)、马(XP_008511378)、野骆驼(XP_006186034)、人(NP_001073901)、猕猴(EHH31662)、猪(CAP91069)、小鼠(AAH22222)、大鼠(NP_001034802)和鸡(NP_001172076)

All sequences come from the GenBank database: *Ovis aries* (NP_001098401), *Bos Taurus* (NP_001091611), *Bubalus bubalis* (XP_006043112), *Equus przewalskii* (XP_008511378), *Camelus ferus* (XP_006186034), *Homo sapiens* (NP_001073901), *Macaca mulatta* (EHH31662), *Sus scrofa* (CAP91069), *Mus musculus* (AAH22222), *Rattus norvegicus* (NP_001034802), *Gallus gallus* (NP_001172076)

图 2 不同物种间 *FTO* 基因的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *FTO* of various species

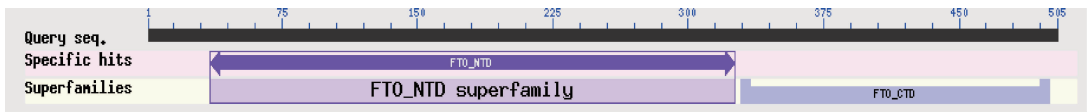
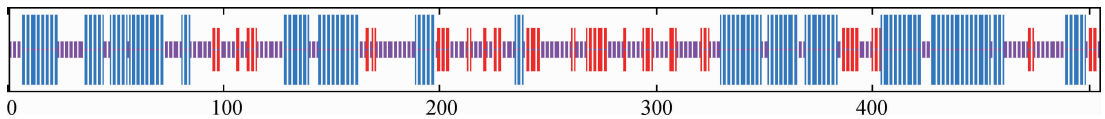


图 3 山羊 *FTO* 推测的氨基酸序列生物学功能预测

Fig. 3 Prediction of biological function of the deduced amino acid sequence of goat *FTO*



图中蓝色线代表 α -螺旋,红色线代表 β -折叠,紫色线代表不规则卷曲

The blue line represent Alpha helix, the red line represent beta sheet, and the purple line represent random coil

图 4 *FTO* 氨基酸序列二级结构预测

Fig. 4 The predicted secondary structure of amino acid sequence of *FTO*



图 5 *FTO* 氨基酸序列三级结构预测

Fig. 5 The predicted tertiary structure of amino acid sequence of *FTO*

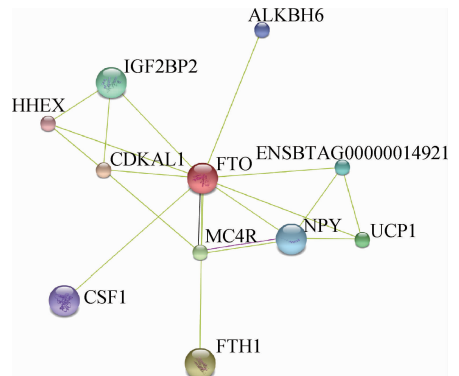
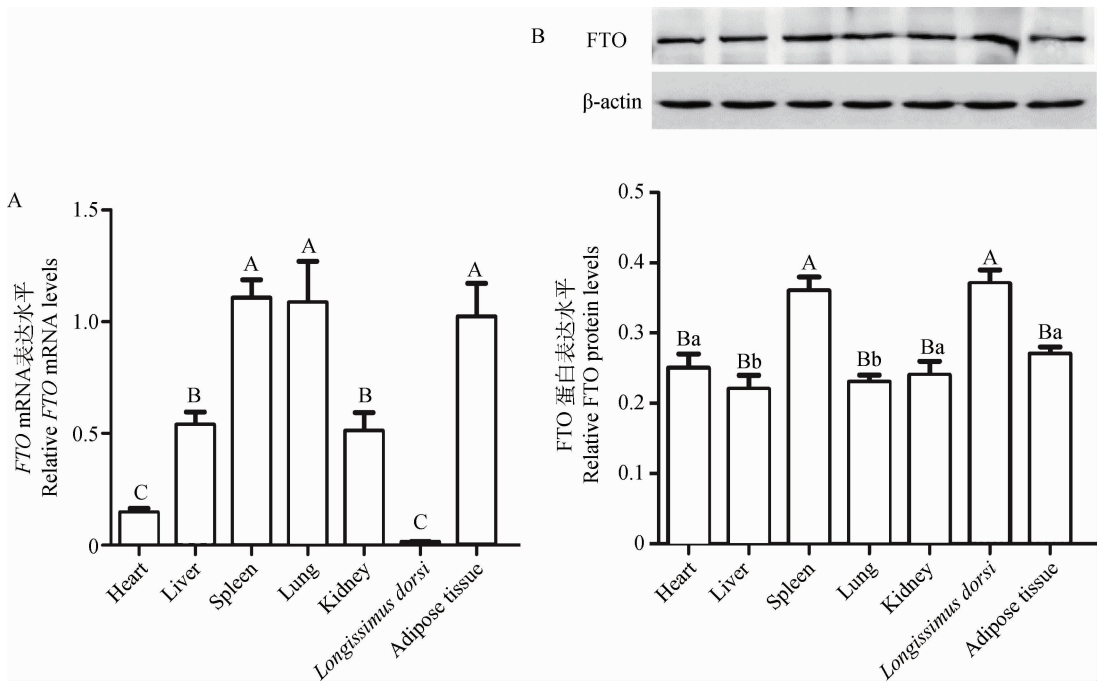


图 6 山羊 *FTO* 蛋白与其他蛋白相互作用网络

Fig. 6 The interaction network of goat *FTO* with other proteins

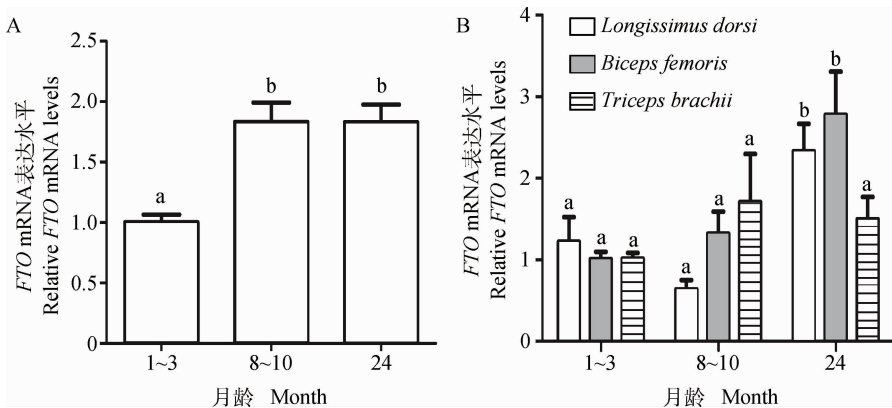


A. 实时荧光定量检测 *FTO* 基因在山羊各组织中的表达水平, *GAPDH* 作为内参 ($n=6$); B. Western blotting 检测在山羊各组织中 *FTO* 蛋白表达水平, β -actin 作为内参 ($n=3$)。不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$), 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

The mRNA expression levels of *FTO* (A) were quantitated in various tissues by qPCR and normalized using *GAPDH*; The protein expression levels of *FTO* (B) were quantitated in various tissues by Western blotting and normalized using β -actin. Different capital letters show significant differences ($P<0.01$), different small letters show significant differences ($P<0.05$)

图 7 山羊 *FTO* 的组织分布

Fig. 7 Tissue distribution of goat *FTO*



A, B 分别表示荧光定量检测 *FTO* 基因在山羊脂肪和肌肉组织中的表达水平, 同一部位不同年龄的差异用字母表示, 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

The mRNA expression levels of *FTO* in adipose tissue (A) and muscle (B). In the same part of muscle, the same letter indicate no significant difference between ages ($P>0.05$), the different letters indicate significant difference between ages ($P<0.05$)

图 8 *FTO* 在不同发育阶段山羊组织中的表达水平

Fig. 8 *FTO* mRNA expression in tissues of goat at different ages

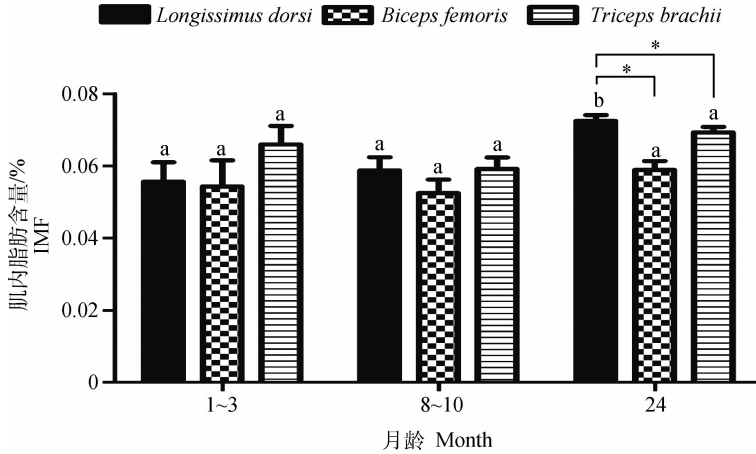
2.6 山羊不同肌肉组织 *FTO* mRNA 表达与 IMF 含量的相关分析

不同部位肌肉 IMF 含量测定结果显示(图 9),

24 月龄背最长肌 IMF 含量显著高于 1~3 月龄与 8~10 月龄的 IMF 含量 ($P<0.05$); 股二头肌和臂三头肌的 3 个阶段 IMF 含量无显著变化; 且 24 月

龄背最长肌的 IMF 含量高于同阶段的股二头肌和臂三头肌的 IMF 含量 ($P < 0.05$)。山羊不同部位肌肉组织 *FTO* 基因表达水平与 IMF 含量的相关分析结果表明, *FTO* 基因在山羊背最长肌各个阶段

的表达水平与相对应的 IMF 含量呈显著负相关 ($P < 0.05$), 相关系数为 -0.415 , 与股二头肌和臂三头肌的 IMF 含量呈正相关, 相关系数分别为 0.014 和 0.093 (表 2)。



$n=9$ 。同一部位不同年龄的差异用字母表示, 相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ($P > 0.05$)。* . $P < 0.05$
 $n=9$. In the same part of muscle, the same letter indicate no significant difference between ages, the different letters indicate significant difference between ages ($P < 0.05$). * . $P < 0.05$

图 9 山羊不同肌肉部位肌肉脂肪含量的发育性变化

Fig. 9 IMF content developmental changes in muscles of different parts of goat

表 2 山羊 *FTO* 基因的表达水平与 IMF 含量的相关性分析

Table 2 The correlation of *FTO* gene expression and IMF content in muscles of different parts in goat

部位 Different part	<i>FTO</i> mRNA 表达 <i>FTO</i> mRNA expression
背最长肌 <i>Longissimus dorsi</i>	$r = -0.415^* (P = 0.034)$
股二头肌 <i>Biceps femoris</i>	$r = 0.014 (P = 0.480)$
臂三头肌 <i>Triceps brachii</i>	$r = 0.093 (P = 0.357)$

3 讨论

FTO 基因最初由科学家 1994 年在脚趾融合的变异小鼠中发现^[17], 并在 1999 年克隆得到该基因^[18], 但前面对该基因一直未引起重视, 直到 2007 年发现其与肥胖相关后才引起科研工作者(包括畜牧研究者)的广泛关注。本研究首先克隆得到山羊 *FTO* 基因序列, 发现其有 4 个多态位点, 并未导致氨基酸序列的改变, 经分析发现, 推测的氨基酸序列含有 *FTO* 特有的结构域, 并且该蛋白属于无跨膜结构的非分泌蛋白。该基因具有多个磷酸化位点和 2 个糖基化位点, 推测这些位点是调控山羊 *FTO* 蛋白功能的关键位点, 这符合蛋白质磷酸化和糖基化

是蛋白质翻译后的修饰方式的说法^[19-20]。同源性分析发现, 山羊 *FTO* 氨基酸序列与绵羊、牛、马、人、猪等动物的同源性较高, 且 2-酮戊二酸的配基结合位点组氨酸(H^{231} , H^{307})、天冬氨酸(D^{233})和精氨酸(R^{316} , R^{322})完全一致, 这与该基因具有高度保守性的报道相一致^[21-23]。

为进一步研究 *FTO* 基因在山羊肉质中的作用, 本研究检测了该基因在山羊各个组织中的表达差异, 获得其组织表达谱。研究结果指出, *FTO* mRNA 和蛋白在所选山羊 7 个组织中均存在广泛表达, 但其 mRNA 和蛋白表达水平在各个组织中存在差异。比如 *FTO* mRNA 在皮下脂肪、脾和肺中表达水平最高, 在背最长肌中表达最低, 但 *FTO* 蛋白在背最长肌中表达水平最高, 其原因可能是由于该基因在肌肉组织中所转录的 mRNA 比较稳定, 降解速度慢, 因此翻译的蛋白质比较多。*FTO* 在山羊各个组织中的表达谱与其他动物存在着一些相似及不同之处。如 *FTO* 基因在人、小鼠与大鼠的下丘脑中表达最丰富, 调控食物摄入和能量平衡^[21-22, 24]; Y. F. Wang 等 2012 年发现, *FTO* 在鸡的下丘脑、肝、内脏脂肪和小脑中高表达, 说明其主要参与鸡的能量调节^[25], 并且 A. Tiwari 等指出, 饲养条件的改变可以导致鸡 *FTO* mRNA 和蛋白水平的

变化^[26]; M. B. Madsen 等指出, *FTO* mRNA 在哥廷根小型猪的肌肉、肝、肾、心等均检测到了较高水平的表达, 但还是在小脑中表达水平最高^[27]; S. P. Sébert 等在研究产前营养和肥胖对绵羊 *FTO* 基因表达影响时候发现, *FTO* 在 1 岁绵羊的下丘脑中表达最高, 其次是肌肉, 在胰腺和肾中表达水平最低^[28]。综上所述, *FTO* 基因的组织表达谱具有物种和品种特异性, 这也决定了该基因在各个物种中所发挥的主要作用不同。

由上述 *FTO* 基因的保守性及组织表达特性可以推测, 该基因在进化中可能有着重要调控作用, 并且关于 *FTO* 基因在脂肪组织中的表达与肥胖的关系尤受人关注^[29-30,7], *FTO* 的多态性是通过身体质量指数 (Body mass index, BMI) 来介导肥胖的。研究指出, *FTO* 基因突变小鼠 (*FTO*-/-) 和正常小鼠 (*FTO*+ / +) 相比, 当敲除 *FTO* 基因后, 脂肪含量显著下降^[31]。并且畜牧科研工作者在某些物种上发现 *FTO* 基因与动物肉质性状有关, 如 Z. L. Hu 等研究指出猪 *FTO* 基因位于背膘、平均日增重相关的 QTL 附近^[32], 并且后续有试验证明猪 *FTO* 基因的 c. 594C>G 和 g. 276T>G 两个多态位点与肌肉和肌间脂肪沉积有关^[33,12]。L. A. Rempel 和 S. J. Wei 等分别报道 *FTO* 多态性与牛的体重及背最长肌面积存在显著相关^[34,14]。G. W. Zhang 等指出, 兔 *FTO* SNPs 与生长性状及肉质性状相关^[15]。本试验研究发现, *FTO* 基因在山羊的 3 个典型发育阶段 (羔羊、育成羊和成年羊) 的皮下脂肪、背最长肌、股二头肌和臂三头肌 4 种组织中均存在表达, 推测该基因的作用可能贯穿于山羊的整个生长发育阶段。但该基因在不同肌肉中的表达模式不同, 说明其表达具有部位特异性。为了阐明 *FTO* 基因是否与山羊肌肉脂肪沉积有关, 同时对基因在不同部位肌肉中的表达水平与 IMF 含量进行了关联分析。结果指出, 山羊 *FTO* 的基因表达与不同部位肌肉组织 IMF 含量均存在相关, 且与背最长肌中 IMF 含量相关达到显著水平, 推测其主要参与山羊背最长肌的肌肉脂肪沉积。本研究数据提示, *FTO* 可以作为山羊 IMF 沉积的候选基因, 根据软件预测的 *FTO* 可能相互作用的蛋白质来推测其作用机制可能是通过与 MC4R、NPY 和 UCP1 等与脂代谢相关蛋白的互作来实现的。研究指出, MC4R 可作为肉牛肥育性状及 IMF 相关的候选基因^[35-36], NPY 的受体 NPY2R 多态性与 BMI 呈显著相关^[37], UCP1

基因的 SNPs 与人体脂沉积存在相关性^[38]。并且 S. Cauchi 等 2009 年在肥胖中的研究指出 *FTO* 与 MC4R 基因的多态性对肥胖的影响具有联合效应^[39], 与本试验的预测结果相一致。但这几个相关蛋白是如何与 *FTO* 进行协同作用调控山羊 IMF 沉积的, 其具体的作用机制则需要构建山羊 *FTO* 表达载体, 转染到体外培养的肌肉脂肪细胞, 然后利用免疫共沉淀技术来做进一步阐明。

4 结 论

本研究克隆得到包含完整开放阅读框的山羊 *FTO* 基因序列, 该蛋白是分子量为 58.55 ku 的不稳定亲水性酸性非分泌蛋白, 预测发现具有 17 个磷酸化位点, 2 个糖基化位点, 具有 *FTO* 典型的催化结构域和 C 端结构域。高级结构由 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲组成。*FTO* mRNA 和蛋白广泛表达于各个组织中, 其中 mRNA 水平在山羊的脂肪、脾和肺中存在高水平表达, 在背最长肌中的表达量最低; *FTO* 蛋白表达水平在背最长肌和脾中表达较高, 脂肪组织中表达次之。不同发育阶段山羊不同部位肌肉组织 *FTO* mRNA 表达水平与相应的 IMF 含量呈不同程度的相关性。本试验为进一步研究 *FTO* 基因在山羊脂肪沉积中的调控作用提供重要的基础数据。

参考文献 (References):

- [1] SCOLLAN N, HOCQUETTE J F, NUERNBERG K, et al. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality[J]. *Meat Sci*, 2006, 74(1): 17-33.
- [2] WANG Y H, BYRNE K A, REVERTER A, et al. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle[J]. *Mamm Genome*, 2005, 16(3): 201-210.
- [3] FRAYLING T M, TIMPSON N J, WEEDON M N, et al. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity[J]. *Science*, 2007, 316(5826): 889-894.
- [4] ROBBENS S, ROUZÉ P, COCK J M, et al. The *FTO* gene, implicated in human obesity, is found only in vertebrates and marine algae[J]. *J Mol Evol*, 2008, 66(1): 80-84.

- [5] TUNG Y C, AYUSO E, SHAN X, et al. Hypothalamic-specific manipulation of *Fto*, the ortholog of the human obesity gene *FTO*, affects food intake in rats[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8771.
- [6] DINA C, MEYRE D, GALLINA S, et al. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(6): 724-726.
- [7] MERKESTEIN M, LABER S, MCMURRAY F, et al. *FTO* influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6792.
- [8] SCOTT L J, MOHLKE K L, BONNYCASTLE L L, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants[J]. *Science*, 2007, 316(5829): 1341-1345.
- [9] FAWWAD A, SIDDIQUI I A, ZEESHAN N F, et al. Association of SNP rs9939609 in *FTO* gene with metabolic syndrome in type 2 diabetic subjects, recruited from a tertiary care unit of Karachi, Pakistan[J]. *Pak J Med Sci*, 2015, 31(1): 140-145.
- [10] ZHOU D, LIU H, ZHOU M, et al. Common variant (rs9939609) in the *FTO* gene is associated with metabolic syndrome[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(6): 6555-6561.
- [11] JIA X, NIE Q, LAMONT S J, et al. Variation in sequence and expression of the avian *FTO*, and association with glucose metabolism, body weight, fatness and body composition in chickens[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2012, 36(8): 1054-1061.
- [12] FONTANESI L, SCOTTI E, BUTTAZZONI L, et al. The porcine fat mass and obesity associated (*FTO*) gene is associated with fat deposition in Italian Duroc pigs[J]. *Anim Genet*, 2009, 40(1): 90-93.
- [13] ZHANG B, ZHANG Y, ZHANG L Z, et al. Allelic polymorphism detected in the bovine *FTO* gene[J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 49(3): 257-262.
- [14] WEI S J, ZAN L S, UJAN J A, et al. Novel polymorphism of the bovine fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene are related to backfat thickness and longissimus muscle area in five Chinese native cattle breeds[J]. *AFR J Biotechnol*, 2012, 10(5): 2820-2824.
- [15] ZHANG G W, GAO L, CHEN S Y, et al. Single nucleotide polymorphisms in the *FTO* gene and their association with growth and meat quality traits in rabbits[J]. *Gene*, 2013, 527(2): 553-557.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] VAN DER HOEVEN F, SCHIMMANG T, VOLKMANN A, et al. Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (*Ft*) [J]. *Development*, 1994, 120(9): 2601-2607.
- [18] PETERS T, AUSMEIER K, RÜTHER U. Cloning of *Fatso* (*Fto*), a novel gene deleted by the Fused toes (*Ft*) mouse mutation [J]. *Mamm Genome*, 1999, 10(10): 983-986.
- [19] KIM J H, LEE J, OH B, et al. Prediction of phosphorylation sites using SVMs [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(17): 3179-3184.
- [20] GUPTA R, BRUNAK S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function [J]. *Pac Symp Biocomput*, 2002: 310-322.
- [21] FREDRIKSSON R, HÄGGLUND M, OLSZEWSKI P K, et al. The obesity gene, *FTO*, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(5): 2062-2071.
- [22] GERKEN T, GIRARD C A, TUNG Y C, et al. The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase [J]. *Science*, 2007, 318(5855): 1469-1472.
- [23] STRATIGOPOULOS G, PADILLA S L, LEDUC C A, et al. Regulation of *Fto*/*Ftm* gene expression in mice and humans [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(4): 1185-1196.
- [24] QI L, KANG K, ZHANG C, et al. Fat mass- and obesity-associated (*FTO*) gene variant is associated with obesity: longitudinal analyses in two cohort studies and functional test [J]. *Diabetes*, 2008, 57(11): 3145-3151.
- [25] WANG Y F, RAO K Q, YUAN L X, et al. Chicken *FTO* gene: Tissue-specific expression, brain distribution, breed difference and effect of fasting [J]. *Comp Biochem Physiol AMol Integr Physiol*, 2012, 163(3-4): 246-252.
- [26] TIWARI A, KRZYSIK-WALKER S M, RAMACHANDRAN R. Cloning and characterization of chicken fat mass and obesity associated (*Fto*) gene: fasting affects *Fto* expression [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2012, 42(1): 1-10.
- [27] MADSEN M B, BIRCK M M, FREDHOLM M, et al. Expression studies of the obesity candidate gene *FTO* in pig [J]. *Anim Biotechnol*, 2010, 21(1): 51-63.

- [28] SÉBERT S P, HYATT M A, CHAN L L, et al. Influence of prenatal nutrition and obesity on tissue specific fat mass and obesity-associated (FTO) gene expression[J]. *Reproduction*, 2010, 139(1): 265-274.
- [29] KLÖTING N, SCHLEINITZ D, RUSCHKE K, et al. Inverse relationship between obesity and FTO gene expression in visceral adipose tissue in humans[J]. *Diabetologia*, 2008, 51(4): 641-647.
- [30] ZABENA C, GONZÁLEZ-SÁNCHEZ J L, MARTÍNEZ-LARRAD M T, et al. The FTO obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients[J]. *Obes Surg*, 2008, 19(1): 87-95.
- [31] CHURCH C, LEE S, BAGG E A, et al. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(8): E1000599.
- [32] HU Z L, REECY J M. Animal QTLdb; beyond a repository. A public platform for QTL comparisons and integration with diverse types of structural genomic information[J]. *Mamm Genome*, 2007, 18(1): 1-4.
- [33] FAN B, DU Z Q, ROTHSCHILD M F. The fat mass and obesity-associated (FTO) gene is associated with intramuscular fat content and growth rate in the pig [J]. *Anim Biotechnol*, 2009, 20(2): 58-70.
- [34] REMPEL L A, CASAS E, SHACKELFORD S D, et al. Relationship of polymorphisms within metabolic genes and carcass traits in crossbred beef cattle[J]. *J Anim Sci*, 2012, 90(4): 1311-1316.
- [35] WANG W, XUE W, JIN B, et al. Candidate gene expression affects intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs[J]. *J Appl Genet*, 2013, 54(1): 113-118.
- [36] 黄 萌, 许尚忠, 李俊雅, 等. 中国西门塔尔牛 MC3R 和 MC4R 基因组织表达谱及其在脂肪组织中表达水平与背膘厚度的相关性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(4): 489-494.
- HUANG M, XU S Z, LI J Y, et al. The tissues profile of MC3R and MC4R and the association of their expression in the adipose with backfat thickness in Chinese Simmental cattle [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(4): 489-494. (in Chinese)
- [37] HUNT S C, HASSTEDT S J, XIN Y, et al. Polymorphisms in the NPY2R gene show significant associations with BMI that are additive to FTO, MC4R, and NPFFR2 gene effects[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2011, 19(11): 2241-2247.
- [38] SHIN H D, KIM K S, CHA M H, et al. The effects of UCP-1 polymorphisms on obesity phenotypes among Korean female subjects [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(2): 624-630.
- [39] CAUCHI S, STUTZMANN F, CAVALCANTI-PROENÇA C, et al. Combined effects of MC4R and FTO common genetic variants on obesity in European general populations[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2009, 87(5): 537-546.

(编辑 郭云雁)