

# 绵羊 *TRA2B* 基因的克隆、序列信息与表达分析

赵帅平, 焦小丽\*, 李留安, 郭亮, 田川尧, 王颖, 杨婧, 张品东

(天津农学院动物科学与动物医学学院, 天津 300384)

**摘要:** 旨在研究绵羊 *TRA2B* 基因的结构与功能, 探讨其在两品种脂尾型绵羊脂肪等不同组织中的表达和调控特性。采用 RT-PCR 克隆 *TRA2B* 基因编码区(CDS)并对其进行生物信息学分析; Real-time PCR 检测广灵大尾羊和小尾寒羊 8 月龄公羊共 8 只心、肝、肾、小肠、睾丸、肾周及尾脂肪组织、股二头肌中 *TRA2B* 基因 mRNA 的表达。结果表明, *TRA2B* 基因 CDS 区长 867 bp, 编码 288 个氨基酸。生物信息学分析表明, *TRA2B* 为不稳定的水溶性蛋白, 无信号肽和跨膜域, 有 2 个 O-糖基化位点和 70 个磷酸化位点, 109~196 氨基酸残基为 RRM 保守结构域。*TRA2B* 基因 mRNA 在所检测的组织中均有一定的表达, 睾丸中表达量最高, 显著高于肾、肾周脂肪与尾脂 ( $P < 0.05$ ) 以及肝、股二头肌和小肠中的表达量 ( $P < 0.05$ ), 心中表达量最低 ( $P < 0.05$ )。品种间总 mRNA 表达量差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 品种因素显著影响该基因组织间的表达 ( $P < 0.05$ )。TRA2B 可能在绵羊繁殖及脂质代谢中发挥重要作用。为深入研究 *TRA2B* 在绵羊中的基因功能提供了理论基础。

**关键词:** 绵羊; *TRA2B* 基因; 克隆; 生物信息学; mRNA 表达

中图分类号: S826.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)06-1158-09

## Cloning, Sequence Information and Expression Analysis of *TRA2B* gene in Sheep (*Ovis aries*)

ZHAO Shuai-ping, JIAO Xiao-li\*, LI Liu-an, GUO Liang, TIAN Chuan-yao,  
WANG Ying, YANG Jing, ZHANG Pin-dong

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural  
University, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** The objective of this study was to explore the gene structure and function of *TRA2B* and characterize its expression and regulation properties in adipose and other tissues in two breeds of fat-tailed sheep. The coding sequence (CDS) of *TRA2B* gene was cloned using RT-PCR technology and the sequence was analyzed by bioinformatics. Eight rams from Guangling Large Tailed and Small Tailed Han respectively were slaughtered at 8 months of age, heart, liver, kidney, small intestine, testis, perirenal and tail fats as well as femoral biceps were collected to determine the mRNA expression by real-time PCR technology. The results showed that the CDS of ovine *TRA2B* gene was 867 bp in length, encoding 288 amino acids. The bioinformatics analysis suggested that *TRA2B* was a kind of unstable and hydrophilic protein with 2 potential O-glycosylation sites and 70 phosphorylation sites, while without signal peptide and transmembrane domain, a highly conserved domain of RRM was located at 109-196 amino acid residues in *TRA2B*. *TRA2B* mRNA expressed in all the investigated tissues and the highest expression was found in

收稿日期: 2016-12-30

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(201610061003); 附属动物医院关键技术集成与学生综合能力提升(2017.40); 天津市科委重大种业项目(15ZXZYN00100)

作者简介: 赵帅平(1994-), 男, 河南原阳人, 本科, 主要从事动物科学研究, E-mail: 846719542@qq.com

\* 通信作者: 焦小丽, 博士, 讲师, 主要从事动物分子遗传育种研究, E-mail: jxlwjh@126.com

testis, which was significantly higher than that in kidney, perirenal and tail fats ( $P < 0.05$ ) as well as in liver, femoral biceps and small intestine ( $P < 0.05$ ), with the lowest level in heart ( $P < 0.05$ ). The total mRNA expression between 2 breeds was not significantly different ( $P > 0.05$ ), however, breed significantly affected the mRNA expression patterns in tissues ( $P < 0.05$ ). Taken together, the findings in this study indicated that *TRA2B* was possibly an important regulation factor involving reproduction performance as well as lipid metabolism in sheep. The study would lay a theoretical foundation for further exploration of the gene function of *TRA2B* in sheep.

**Key words:** sheep; *TRA2B* gene; cloning; bioinformatics; mRNA expression

选择性剪接是增加蛋白质多样性的重要机制之一<sup>[1]</sup>。丝氨酸精氨酸富集样(SR-like)蛋白家族选择性剪接因子(Transformer 2 $\beta$ , *TRA2B*),与富含(A)GAA的外显子特异结合,激活外显子进入mRNA,导致外显子的选择性增加<sup>[2]</sup>。*TRA2B*是发育过程重要的剪接因子<sup>[3]</sup>,可调控多种组织如平滑肌、睾丸和神经元功能转录本的选择性剪接<sup>[4-5]</sup>,为小鼠胚胎与大脑发育所必需<sup>[6-7]</sup>。*TRA2B*是应激反应基因<sup>[8]</sup>,选择性剪接作用具有发育阶段性和组织特异性<sup>[3]</sup>。其同源蛋白果蝇 *TRA2* 调控精子发生和性别分化的选择性剪接<sup>[9]</sup>。*TRA2B* 表达异常与人类癌症及神经病变等疾病有关<sup>[10]</sup>。

选择性剪接因子调控人类脂质代谢<sup>[11]</sup>,*TRA2B*基因在胰岛素抵抗的肥胖人群以及肥胖小鼠肝和肌肉中表达下调。*TRA2B*在HepG2细胞和C2C12肌细胞中基因沉默导致脂质生成基因的表达增加以及甘油三酯合成的增加,而过表达显著降低生脂基因的表达<sup>[12]</sup>。*TRA2B*对脂质的调控可部分归结于其对脂质代谢关键基因 *LPIN1* 的选择性剪接<sup>[12]</sup>。*LPIN1*基因编码脂质(Lipins)家族蛋白中的Lipin1,在脂质代谢中具有Mg<sup>2+</sup>依赖的磷脂酸磷酸酶活性,催化磷脂酸生成甘油二酯,以及调控脂质相关基因表达的双重功能<sup>[13]</sup>。*TRA2B* siRNA没有改变 *LPIN1* 总表达量,但改变了其剪接异构体的产生,导致 *LPIN1 $\beta$*  增加而 *LPIN1 $\alpha$*  降低,而Lipin $\beta$ 可促进脂肪合成基因表达<sup>[13]</sup>。研究发现乙醇干扰AML-12肝细胞中Lipin1信号途径,乙醇处理AML-12肝细胞导致 *TRA2B* mRNA水平显著降低,Lipin1 $\beta$  mRNA表达上调以及 *LPIN1 $\beta/\alpha$*  显著升高<sup>[14]</sup>。*TRA2B*基因附近的一个多态位点与人体肥胖相关<sup>[15]</sup>。提示mRNA加工剪接基因可作为肥胖或脂质代谢候选基因进行研究。

*TRA2B*基因表达与脂质表型的生理相关存在

不一致,*TRA2B*或 *LPIN1 $\beta$*  表达水平在人肝活检中,并没有表现出与肥胖或肝组织病理学相关<sup>[16]</sup>,可能与试验手段和生物不同有关<sup>[17]</sup>。本研究选择脂尾表型差异显著的广灵大尾羊和小尾寒羊为研究对象,克隆 *TRA2B* 基因 CDS 区并进行序列分析及功能预测,检测其 mRNA 在脂肪等不同组织中的表达差异性,为揭示该基因在绵羊脂质及其他代谢中的功能活性提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验样本

选择相同饲养管理条件下的广灵大尾羊和小尾寒羊为研究对象,8月龄时屠宰取样,每品种4只公羊,共8只,屠宰程序和饲养管理按照中华人民共和国国家标准(GB 13078-2001和GB/T 17237-1998)和农业行业标准(NY 5148-2002-NY 5151-2002)进行。屠宰后,迅速采集心、肝、肾、小肠、睾丸、肾周及尾部脂肪、股二头肌组织样品,锡纸包好,置于RNase-free冻存管,并立即投入液氮罐中,随后-80℃冰箱保存。

### 1.2 主要试剂及仪器

RNAiso Plus总RNA提取试剂、PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix反转录试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II试剂盒、感受态细胞、pMD<sup>®</sup> 18-T Vector购自宝生物工程(大连)公司;无水乙醇、异戊醇、三氯甲烷、DEPC、琼脂糖等试剂购自北京天根生化科技有限公司;PCR产物回收试剂盒(D6492, Omega),KOD DNA聚合酶(KOD-201, Toyobo公司)。ABI7500实时荧光定量PCR仪(ABI,美国)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 总RNA提取及RT-PCR反应 根据RNAiso Plus总RNA提取试剂说明书提取组织总RNA,通过核酸蛋白仪和凝胶电泳检测所提取总

RNA 的质量。参照反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA,置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.3.2 引物设计与合成 参照 NCBI GenBank 预测的绵羊 *TRA2B* (XM\_004003070) 以及牛 *TRA2B* 基因 mRNA 序列 (NP\_001029948.1),应用 Primer3.0 在线软件设计扩增 CDS 区的特异性引物。参照扩增出的 CDS 设计荧光定量引物,选择 *RPL13A* (XM\_004015371) 和 *ACTB* (NM\_001009784.1) 作为内参基因,引物由苏州金唯智生物科技有限公司北京分公司合成。引物信息见表 1。

1.3.3 RT-PCR 扩增与 TA 克隆 以肾周脂肪组织 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,反应总体系为  $50\text{ }\mu\text{L}$ ;  $10\times\text{KOD Buffer } 5\text{ }\mu\text{L}$ ,  $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ dNTPs } 5\text{ }\mu\text{L}$ , cDNA 模板  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 上下游引物 ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各  $1\text{ }\mu\text{L}$ , KOD DNA 聚合酶  $1\text{ }\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $36\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,  $35$  个循环:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 80 s, 最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  修复延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,用 PCR 产物回收试剂盒回收目的片段。将回收产物与 pMD<sup>®</sup>18-T 载体连接,转化至 *E. Coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  LB 培养基 Amp 抗性平板培养过夜。次日,挑取白色单一菌落于液体 LB 培养基中培养 6~7 h 长出菌落,菌落 PCR 扩增鉴定后,送苏州金唯智生物科技有限公司北京分公司测序。

1.3.4 结构与功能预测 应用 DNAMAN7.0 和 Contig 软件拼接序列,ApE 软件预测开放阅读框

(ORF),并翻译 CDS 区成氨基酸序列。应用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-3.1/>)、NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)、NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>) 在线软件分别预测蛋白质理化性质、信号肽、跨膜域以及 O-糖基化、N-糖基化和磷酸化位点;应用 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 在线软件预测蛋白质二级结构;应用 NCBI 中的 CDD 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测蛋白质功能结构域。

1.3.5 实时荧光定量 PCR 参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒进行荧光定量 PCR 扩增,反应体系为  $20\text{ }\mu\text{L}$ ,包括 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II  $10\text{ }\mu\text{L}$ ,上下游引物各  $0.8\text{ }\mu\text{L}$ ,ROX Reference Dye II  $0.4\text{ }\mu\text{L}$ ,cDNA 模板  $2\text{ }\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O  $6\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火及延伸 30 s, 40 个循环;熔解曲线分析:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 s。每个样品每个基因 3 个重复。

1.3.6 数据分析 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  相对定量分析方法,由 2 个内参基因获得的相对表达量计算几何平均数作为目的基因的相对表达量。运用 SPSS17.0 软件中的一般线性模型 (GLM) 进行单变量方差分

表 1 引物序列、退火温度及 PCR 产物长度

Table 1 Primer sequence, annealing temperature and PCR product size

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	产物长度/bp Length	用途 Usage
<i>TRA2B</i>	F: ATGAGCGACAGCGGCGAGCA	68	867	克隆
	R: TTAATAGCGACGAGGTGAGTA			
<i>TRA2B</i>	F: CAGAAGAAGTTCTCGGAGGC	60	117	
	R: GAATGACGGTGGCTATGC			
<i>RPL13A</i>	F: GAGAAGCGAAAGGAGAAAGC	60	123	mRNA 表达
	R: AGTCTTGAGGACCTCTGTGAAT			
<i>ACTB</i>	F: TTCCAGCCTTCCTTCCTG	60	109	
	R: CCGTGTTGGCGTAGAGGT			

F. Forward primer; R. Reverse primer

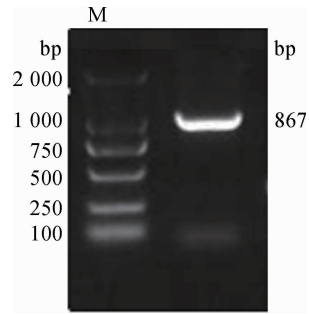
析。考虑的影响因素为品种、组织, GLM 为  $Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + BT_{ij} + e_{ijk}$ 。式中,  $Y_{ijk}$  为 *TRA2B* 基因 mRNA 相对表达量,  $\mu$  为总体均值,  $B_i$  为第  $i$  个 ( $i=1, 2$ ) 品种效应,  $T_j$  为第  $j$  种 ( $j=1, 2, \dots, 8$ ) 组织效应,  $BT_{ij}$  为品种、组织二因素互作效应,  $e_{ijk}$  为残差效应。数据表示为“ $\bar{X} \pm S_x$ ”, 运用 Duncan's 法多重比较分析各因素不同水平间的表达量差异。

## 2 结果

### 2.1 绵羊 *TRA2B* 基因克隆

凝胶电泳检测 RT-PCR 产物为特异性条带(图 1), 测序拼接后, 获得 *TRA2B* 基因 867 bp 的 ORF, 应用 NCBI 中的 Blastn 程序与 GenBank 数据库预测的 mRNA (XM\_004003070) 进行序列比对, 除 289 位 AGT→CGT(Ser→Arg), 590 位 AAA→ACA (Cys→Thr), 675 位 GGA→GGG(Gly→Gly) 3 处不同外, 其余核苷酸序列与预测序列一致。与家牛 (*Bos taurus* (NM\_001034776. 2))、野猪 (*Sus scrofa* (DQ972957. 1))、人 (*Homo sapiens* (NM\_004593. 2))、以及小鼠 (*Mus musculus* (NM\_009186. 5)) *TRA2B* 基因 CDS 区相似性分别高达 98%、96%、94% 和 90%, 表明克隆获得的 ORF 为完整的 CDS

区(图 2)。核酸序列已提交 GenBank (登录号: KT186101. 1)。



M. DNA 相对分子质量标准

M. DL2000 DNA marker

图 1 *TRA2B* 基因 RT-PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of RT-PCR amplification of *TRA2B* gene

### 2.2 生物信息学分析

2.2.1 理化性质 绵羊 *TRA2B* 由 288 个氨基酸组成, 分子式  $C_{1407} H_{2225} N_{519} O_{444} S_6$ , 分子质量 33 707.72 u, 理论等电点 (pI) 11.28, 为碱性蛋白质。氨基酸残基中 Arg (R) 频率最高 (22.6%), Ser (S) 频率为 17.7%, Cys 频率最低 (0.7%), 不稳定系数为 117.91, 属不稳定蛋白质。在哺乳动物网织红细胞内的半衰期为 30 h。脂溶指数为 27.12, 总平均亲水性为 -1.619, 为水溶性蛋白。

```

1 atg agc gac agc ggc gag cag aac tac ggc gag cgg gaa tcc cgt tct gct tcc aga agt gga agt gct cat gga tct ggg 81
1 M S D S G E Q N Y G E R E S R S A S R S G S A H G S G 27

82 aaa tct gca agg cat acc cct gca agg tct cgc tcc aag gaa gat tcc agg cgt tcc aga tca aag tcc agg tcc aga tct 162
28 K S A R H T P A R S R S K E D S R R S R S K S R S R S 54

163 gaa tct agg tct aga tcc aga aga agt tct cgg agg cat tat aca agg tca cga tct cgg tcc cgg tcc cat aga aga tct 243
55 E S R S R S R R R S S R R H Y T R S R S R S R S H R R S 81

244 cgc agc aga tct tac agc aga gat tat cga aga cgg cat agc cac cgt cat tct ccc atg tct act cga cgg cgt cat gtt 324
82 R S R S Y S R D Y R R R R H S H R H S P M S T R R R H V 108

325 ggg aat cgg gca aat cct gat cct aac tgt tgt ctt gga gta ttt gga ttg agc ttg tac act aca gaa aga gat cta aga 405
109 G N R A N P D P N C C L G V F G L S L Y T T E R D L R 135

406 gaa gtg ttc tct aaa tat ggc cca att gct gat gta tct att gta tat gac cag cag tct aga cgt tca aga gga ttt gcc 486
136 E V F S K Y G P I A D V S I V Y D Q Q S R R S R G F A 162

487 ttt gtg tac ttt gaa aat gta gat gat gcc aag gaa gca aaa gag cgt gcc aat gga atg gag ctt gat gga cgt agg atc 567
163 F V Y F E N V D D A K E A K E R A N G M E L D G R R I 189

568 aga gtt gac ttc tcc ata cgt aca aga cca cat act cca aca cca gga att tac atg ggg aga cct acc tat ggc agc tca 648
190 R V D F T S I T A T R P H T P T P G I Y M G R P T Y G S S 216

649 cgc cgt cga gat tac tat gac aga ggg tat gat cga ggc tat gat gat cgg gac tat tac agc aga tgg tac aga gga gga 729
217 R R R D Y Y D R G Y D R G Y D D R D Y Y S R S Y R G G 243

730 gga gga gga gga gga gga tgg aga gct gct caa gac agg gat cag ata tac aga aga cgg tca cct tct ccc tac tat agt 810
244 G G G G G G W R A A Q D R D Q I Y R R R S P S P Y Y S 270

811 cgt gga gga tac aga tca cgt tcc aga tct cga tca tac tca cct cgt cgc tat taa 867
271 R G G Y R S R S R S R S Y S P R R Y * 289

```

阴影表示 SR/RS (Ser/Arg 或 Arg/Ser) 重复序列; 下划线表示 *TRA2B* 蛋白 RRM 保守结构域氨基酸序列  
Gray shadows refer to SR/RS (Ser/Arg or Arg/Ser) repeat sequences; Underline represents the peptide sequence of the RRM conserved domain of *TRA2B* protein

图 2 *TRA2B* 基因 CDS 及编码氨基酸序列

Fig. 2 Coding sequence of *TRA2B* gene and its encoding amino acid sequence

2.2.2 信号肽、跨膜域与翻译后修饰 预测绵羊 TRA2B 无信号肽和跨膜域,可能主要分布于细胞质或细胞器中。预测不存在 N-糖基化位点,存在

Thr<sup>33</sup> 和 Ser<sup>48</sup> 两个潜在的 O-糖基化位点以及 48 个 Ser、8 个 Thr 和 14 个 Tyr 共 70 个磷酸化位点,潜力值均大于 0.5(图 3)。

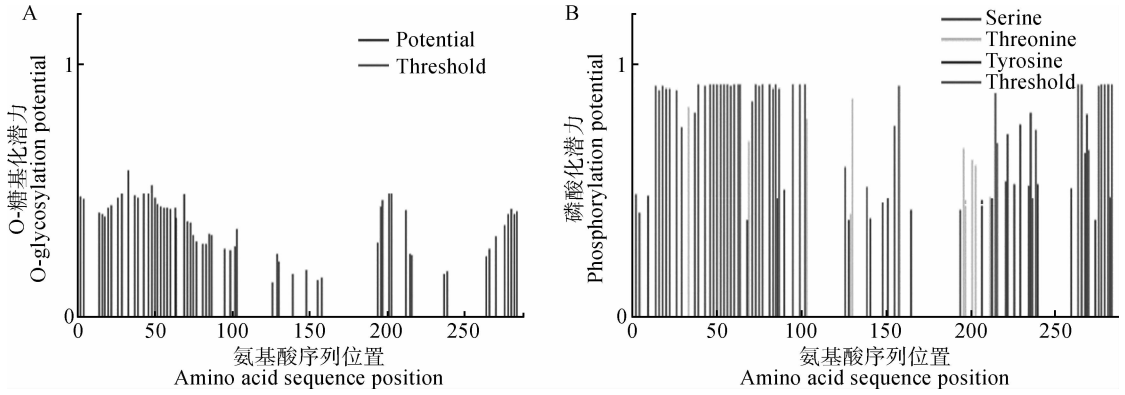


图 3 预测的 TRA2B 蛋白 O-糖基化(A)和磷酸化(B)位点  
Fig. 3 Predicted O-glycosylation (A) and phosphorylation (B) sites of TRA2B protein

2.2.3 结构域、氨基酸序列与二级结构 预测绵羊 TRA2B 蛋白 109~196 氨基酸残基为 RRM\_SF 超家族结构域(图 4),RRM 是 RNA 识别模序。氨基酸序列分析发现,RRM 结构域两侧肽链富集 SR (Ser/Arg)重复序列(图 2)。二级结构包含 8.68%α 螺旋,8.33%β 折叠和 82.99%环;氨基酸残基溶剂可及性中埋藏态为 13.89%,中间态为 5.56%,暴露态为 80.56%;1~105 氨基酸残基有 5 个蛋白质结

合位点,196~288 氨基酸残基有 16 个蛋白质结合区域,而 RRM 中只有 1 个 RNA 结合位点。204~250 氨基酸残基存在 RNA、DNA 与核酸结合位点。预测 1~114、169~171、180、194~288 氨基酸残基为无序结构。α 螺旋、β 折叠以及氨基酸残基溶剂可及性埋藏态主要位于 RRM 结构域,环及无序结构位于 RRM 侧翼肽链(图 5)。



图 4 TRA2B 蛋白保守结构域预测  
Fig. 4 Predicted conserved domain of TRA2B protein

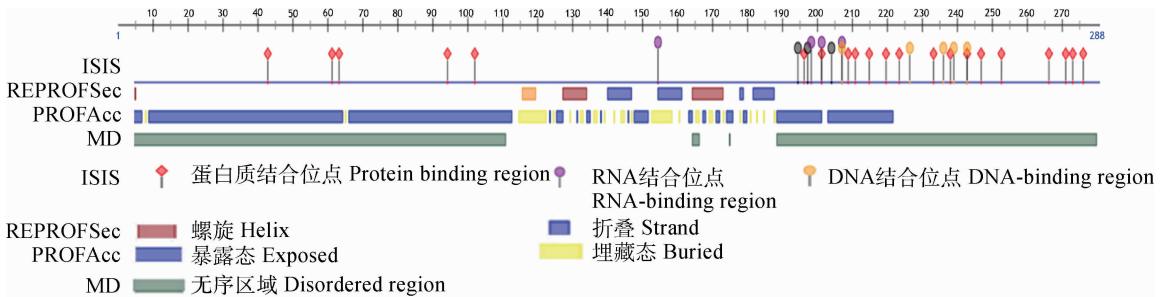


图 5 TRA2B 蛋白二级结构预测  
Fig. 5 Predicted secondary structure of TRA2B protein

2.3 绵羊 TRA2B 基因 mRNA 的表达差异

方差分析表明(表 2),TRA2B 基因 mRNA 相对表达量在广灵大尾羊(1.332)和小尾寒羊(1.511)

品种间差异不显著( $P > 0.05$ ),品种与组织间的交互显著影响了 mRNA 表达( $P < 0.05$ ),表现为小尾寒羊睾丸、肾、尾脂中的表达量高于广灵大尾羊的相

应组织,而肾周脂肪、小肠、肝、心中的表达量无明显差异(图 6)。比较 8 种组织中 mRNA 表达丰度(表 2),发现睾丸中(2.089)表达量最高,显著高于肾、肾周脂肪、尾脂、小肠、股二头肌和肝中的表达量( $P < 0.05$ ),心中表达量最低( $P < 0.05$ ),肾周脂肪与尾脂中的表达量差异不显著( $P > 0.05$ )。

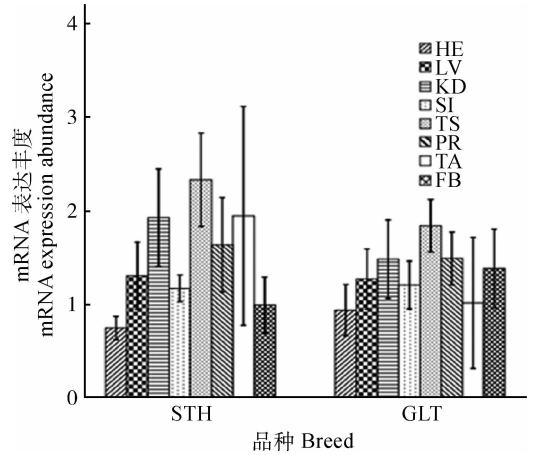
### 3 讨论

#### 3.1 绵羊 *TRA2B* 基因序列分析

绵羊 *TRA2B* 基因 CDS 区长 867 bp,含 8 个外显子,编码 288 个氨基酸,位于 *OAR1*。与牛、猪、人、鼠 *TRA2B* 基因 CDS 相似性在 90% 以上,相似性较高,表明该基因在进化上高度保守。蛋白质半衰期与其稳定性密切相关,半衰期长则蛋白质稳定性高<sup>[18]</sup>。预测绵羊 *TRA2B* 具有较长的半衰期,却属于不稳定蛋白,是否与其广泛参与前体 mRNA 的选择性剪接有关尚待研究。

#### 3.2 绵羊 *TRA2B* 蛋白结构与功能预测

RRM 结构域为 SR-like 蛋白识别前体 mRNA 的区域<sup>[19]</sup>,预测绵羊 *TRA2B* 蛋白 109~196 氨基酸



STH. 小尾寒羊; GLT. 广灵大尾羊; HE. 心; LV. 肝; KD. 肾; SI. 小肠; TS. 睾丸; PR. 肾周脂肪; TA. 尾脂; FB. 股二头肌

STH. Small Tailed Han sheep; GLT. Guangling Large Tailed sheep; HE. Heart; LV. Liver; KD. Kidney; SI. Small intestine; TS. Testis; PR. Perirenal fat; TA. Tail fat; FB. Femoral biceps

图 6 品种与组织二因素交互对 *TRA2B* mRNA 表达丰度的影响

Fig. 6 Effects of two-way interaction between breed and tissue on *TRA2B* mRNA expression abundance

残基为 RRM 结构域,在该区域有 RNA 结合位点,表明 RRM 为绵羊结合前体 mRNA 进行选择性剪

表 2 *TRA2B* 基因 mRNA 表达丰度及方差分析

Table 2 mRNA expression abundance and variance analysis of *TRA2B* gene

mRNA 表达丰度方差分析 Variance analysis of mRNA expression abundance					mRNA 表达丰度 Abundance of mRNA		
变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	F-值 F-values	显著性 Significance	因素 Factor	水平 Level	mRNA 表达丰度 Abundance of mRNA
校正模型 Model	16.608 <sup>a</sup>	15	5.367	***	品种 Breed	广灵大尾羊 GLT	1.332±0.066 <sup>a</sup>
截距 Intercept	193.955	1	940.160	***		小尾寒羊 STH	1.511±0.066 <sup>a</sup>
品种 Breed	0.764	1	3.705	NS	组织 Tissue	心 HE	0.847±0.131 <sup>d</sup>
组织 Tissue	12.064	7	8.354	***		肝 LV	1.291±0.131 <sup>c</sup>
品种×组织 Breed×Tissue	3.780	7	2.618	*		肾 KD	1.708±0.131 <sup>b</sup>
误差 Error	16.504	80				小肠 SI	1.192±0.131 <sup>ed</sup>
总计 Total	227.068	96				睾丸 TS	2.089±0.131 <sup>a</sup>
校正总计 Corrected total	33.112	95				肾周脂肪 PR	1.567±0.131 <sup>bc</sup>
						尾脂 TA	1.484±0.131 <sup>bc</sup>
						股二头肌 FB	1.193±0.131 <sup>ed</sup>

不同字母表示同一因素不同水平间差异显著( $P < 0.05$ )。NS. 差异不显著; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$   
Values with different superscripts within the same factor differ significantly ( $P < 0.05$ ). NS. Not significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$

接的功能结构域。SR 重复序列出现在人类大量的 SR 蛋白或 SR-like 蛋白中<sup>[20-21]</sup>, 分析发现绵羊 TRA2B 蛋白 RRM 侧翼肽链富集 SR 重复序列, 这与上述 SR-like 蛋白结构相符。TRA2B 不仅在细胞核中发挥作用, 激活选择性外显子的增加<sup>[3]</sup>, 还可进入细胞质中发挥作用<sup>[22]</sup>, 这与本研究预测绵羊 TRA2B 不存在信号肽和跨膜域, 位于细胞质或细胞器中相一致。预测 TRA2B 存在 2 个 O-糖基化位点, 由于不含信号肽, 不可能进入内质网(ER)发生糖基化作用。而 O-糖基化除发生在高尔基体和 ER 中之外, 在细胞质和细胞核中还可能存在单低聚糖 O-GlcNAc(O-乙酰葡萄糖胺)方式, O-GlcNAc 常发生在 Ser/Thr 残基并与磷酸化竞争<sup>[23]</sup>, 进而对转录起调控作用<sup>[24]</sup>, 推测可能存在 O-糖基化位点。

预测绵羊 TRA2B 存在 70 个磷酸化位点, 且主要分布于 RRM 侧翼序列, 二级结构预测发现, 大多数磷酸化位点以及 2 个 O-糖基化位点位于无序结构, 而无序结构为磷酸化和糖基化的热点区域<sup>[25]</sup>。SR 模序在 RNA 剪接中可促进 RRM 与 RNA 结合<sup>[26]</sup>以及调节蛋白质间的互作<sup>[20]</sup>, 进而在 RNA 剪接中发挥重要作用。SR 模序预测为无序结构, 磷酸化促其向有序结构转移<sup>[21,27]</sup>。磷酸化调控 TRA2B 的亚细胞定位, 且 SR 模序可能通过磷酸化依赖方式调控 RRM 与前体 mRNA 的互作<sup>[28]</sup>。因此, 认为磷酸化位点和 O-糖基化位点存在, 在选择性剪接中发挥作用。二级结构预测发现 RRM 侧翼存在多个蛋白质、RNA、DNA 及核酸结合位点, 与 SR 模序功能相一致。绵羊 TRA2B 具有 RRM 保守功能域, 生理功能保守。

### 3.3 绵羊 TRA2B 基因组织表达差异

TRA2B 基因在小鼠不同组织中广泛均匀表达<sup>[5]</sup>。本研究 TRA2B 基因在绵羊 8 种组织中均有一定的表达量, 表明 TRA2B 可能广泛参与绵羊不同组织的选择性剪接, 表达量差异可能与 TRA2B 选择性剪接具有发育阶段性和组织特异性有关<sup>[3]</sup>。研究发现小鼠 TRA2B 通过调节 *Nasp* 基因外显子剪接进而在雄性生殖细胞中发挥调控作用<sup>[3]</sup>, 绵羊 TRA2B 基因在睾丸中有高的表达量, 可能与 TRA2B 调控绵羊精子发生有关。小尾寒羊睾丸表达量高于广灵大尾羊, 是否与繁殖力或品种差异相关有待进一步研究。

TRA2B 基因在肥胖人群以及肥胖小鼠肝和肌肉中表达下调<sup>[12]</sup>。本研究中尽管品种间的表达量

差异不显著, 但品种与组织间的互作显著影响了 TRA2B 基因表达, 表现为小尾寒羊尾脂中的表达量高于广灵大尾羊。研究表明, TRA2B 调控脂质关键基因 *LPIN1* 的选择性剪接<sup>[12]</sup>。TRA2B siRNA 导致 *LPIN1* $\beta$  异构体表达增加, 而 *LPIN1* $\alpha$  异构体表达相应降低, *lipin* $\beta$  可促进脂肪合成基因的表达<sup>[13]</sup>。广灵大尾羊脂肪沉积较多, 而小尾寒羊蓄脂能力弱<sup>[29]</sup>, *LPIN1* 基因在广灵大尾羊和小尾寒羊尾脂和肾周脂肪中均有高的表达<sup>[30]</sup>。尾脂中 TRA2B 基因的表达差异可能与 TRA2B 参与调控绵羊脂质代谢有关。两品种中股二头肌、肾周脂肪、肝中 TRA2B 基因表达量无较大差异, 可能与二品种绵羊 8 月龄适逢 12 月份, 冬季牧草质量差影响脂质沉积有关。

## 4 结论

绵羊 TRA2B 基因 CDS 区长 867 bp, 编码 288 个氨基酸, TRA2B 是一种不稳定的亲水性蛋白, 无信号肽和跨膜域, 有两个 O-糖基化位点和 70 个磷酸化位点, 含有 RRM 结构域, 该基因高度保守。TRA2B 基因在广灵大尾羊和小尾寒羊 8 个组织中的总表达量无显著差异, 高表达于睾丸、肾、肾周脂肪及尾脂中, 小尾寒羊睾丸、肾、尾脂中的表达量高于广灵大尾羊相应组织, 可能与其参与调控繁殖性能及脂质代谢有关。

### 参考文献(References):

- [1] NILSEN T W, GRAVELEY B R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 457-463.
- [2] TSUDA K, SOMEYA T, KUWASAKO K, et al. Structural basis for the dual RNA-recognition modes of human TRA2- $\beta$  RRM[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(4): 1538-1553.
- [3] ELLIOTT D J, BEST A, DALGLIESH C, et al. How does TRA2 $\beta$  protein regulate tissue-specific RNA splicing? [J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(4): 784-788.
- [4] KARUNAKARAN D K, CONGDON S, GUERRETTE T, et al. The expression analysis of *Sfrs10* and *Celf4* during mouse retinal development [J]. *Gene Expr Patterns*, 2013, 13(8): 425-436.
- [5] GRELLSCHEID S, DALGLIESH C, STORBECK M, et al. Identification of evolutionarily conserved

- exons as regulated targets for the splicing activator tra2 $\beta$  in development[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(12): e1002390.
- [6] STORBECK M, HUPPERICH K, GASPAR J A, et al. Neuronal-specific deficiency of the splicing factor tra2b causes apoptosis in neurogenic areas of the developing mouse brain[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89020.
- [7] MENDE Y, JAKUBIK M, RIESSLAND M, et al. Deficiency of the splicing factor *Sfrs10* results in early embryonic lethality in mice and has no impact on full-length *SMN/Smn* splicing[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(11): 2154-2167.
- [8] KARUNAKARAN D K, BANDAY A R, WU Q, et al. Expression analysis of an evolutionarily conserved alternative splicing factor, *Sfrs10*, in age-related macular degeneration[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75964.
- [9] ROBERTS J M, ENNAJDAOUI H, EDMONDSON C, et al. Splicing factor TRA2B is required for neural progenitor survival[J]. *J Comp Neurol*, 2014, 522(2): 372-392.
- [10] BEST A, DAGLIESH C, EHRMANN I, et al. Expression of TRA2  $\beta$  in cancer cells as a potential contributory factor to neoplasia and metastasis[J]. *Int J Cell Biol*, 2013, 2013: 843781.
- [11] MEDINA M W, KRAUSS R M. Alternative splicing in the regulation of cholesterol homeostasis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24(2): 147-152.
- [12] PIHLAJAMAKI J, LERIN C, ITKONEN P, et al. Expression of the splicing factor gene *SFRS10* is reduced in human obesity and contributes to enhanced lipogenesis[J]. *Cell Metab*, 2011, 14(2): 208-218.
- [13] CSAKI L S, DWYER J R, FONG L G, et al. Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling[J]. *Prog Lipid Res*, 2013, 52(3): 305-316.
- [14] YIN H Q, HU M, LIANG X M, et al. Deletion of SIRT1 from hepatocytes in mice disrupts lipin-1 signaling and aggravates alcoholic fatty liver[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(3): 801-811.
- [15] CHEUNG C Y, TSO A W, CHEUNG B M, et al. Obesity susceptibility genetic variants identified from recent genome-wide association studies; implications in a Chinese population [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(3): 1395-1403.
- [16] BROSCHE M, VON SCHONFELS W, AHRENS M, et al. *SFRS10*-a splicing factor gene reduced in human obesity?[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(3): 265-266.
- [17] PIHLAJAMAKI J, LERIN C, KAMINSKA D, et al. Response to Brosch et al[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(3): 267-269.
- [18] 贾浩, 张小白, 宋晓峰. 人类胞内蛋白半衰期与其亚细胞定位的相关性研究[J]. *计算机与应用化学*, 2011, 28(4): 411-414.
- JIA H, ZHANG X B, SONG X F. Relationship between intracellular protein half-life and subcellular localization in human cells[J]. *Computers and Applied Chemistry*, 2011, 28(4): 411-414. (in Chinese)
- [19] ZHOU Z, FU X D. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases[J]. *Chromosoma*, 2013, 122(3): 191-207.
- [20] SHEPARD P J, HERTEL K J. The SR protein family[J]. *Genome Biol*, 2009, 10(10): 242.
- [21] JARVELIN A I, NOERENBERG M, DAVIS I, et al. The new (dis)order in RNA regulation[J]. *Cell Commun Signal*, 2016, 14: 9.
- [22] KAJITA K, KUWANO Y, KITAMURA N, et al. Ets1 and heat shock factor 1 regulate transcription of the *Transformer 2 $\beta$*  gene in human colon cancer cells [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(11): 1222-1233.
- [23] HART G W, SLAWSON C, RAMIREZ-CORREA G, et al. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation; roles in signaling, transcription, and chronic disease[J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 825-858.
- [24] HU P, SHIMOJI S, HART G W. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(12): 2526-2538.
- [25] MCDOWELL G S, HINDLEY C J, LIPPENS G, et al. Phosphorylation in intrinsically disordered regions regulates the activity of Neurogenin2[J]. *BMC Biochem*, 2014, 15: 24.
- [26] JAMROS M A, AUBOL B E, KESHWANI M M, et al. Intra-domain cross-talk regulates serine-arginine protein kinase 1-dependent phosphorylation and splicing function of transformer 2 $\beta$ 1 [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(28): 17269-17281.
- [27] XIANG S, GAPSYS V, KIM H Y, et al. Phosphorylation drives a dynamic switch in serine/arginine-rich proteins[J]. *Structure*, 2013, 21(12): 2162-2174.
- [28] AUBOL B E, JAMROS M A, MCGLONE M L, et



- al. Splicing kinase SRPK1 conforms to the landscape of its SR protein substrate[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(43): 7595-7605.
- [29] JIAO X L, JING J J, QIAO L Y, et al. Ontogenetic expression of *Lpin2* and *Lpin3* genes and their associations with traits in two breeds of Chinese fat-tailed sheep[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016, 29(3): 333-342.
- [30] 魏琳琳, 高晋生, 王景霖, 等. 绵羊 *LPIN1* 基因的克隆和 mRNA 表达研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(9): 1371-1379.
- WEI L L, GAO J S, WANG J L, et al. Study on the cloning and ontogenetic mRNA expression of ovine *LPIN1* gene[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(9): 1371-1379. (in Chinese)
- (编辑 程金华)