

朱 鹏, 陈集成, 陈 凤, 等. 水牛 *Sohlh2* 基因的克隆分析及其表达[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 399-407.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.025

水牛 *Sohlh2* 基因的克隆分析及其表达

朱 鹏^{1,2}, 陈集成¹, 陈 凤¹, 苏 节^{1,3}, 李海洋¹, 韦英明¹, 杨素芳¹, 石德顺¹
(1. 广西大学亚热带生物资源保护利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004; 2. 中国农业科学院广西水牛研究所, 广西 南宁 530001; 3. 广西医科大学医学科学实验中心, 广西 南宁 530001)

摘要: 为阐明广西沼泽型水牛 *Sohlh2* 基因在水牛不同组织中的表达规律, 根据 GenBank 已公布的牛 *Sohlh2* 基因序列, 设计其编码区(CDS)扩增引物, 应用 RT-PCR 方法扩增克隆获得目的基因片段; 应用生物信息学方法, 系统分析了水牛 *Sohlh2* 的遗传进化以及蛋白质的理化性质、二级和三级结构; 并应用 RT-QPCR 技术对 *Sohlh2* 基因在水牛组织(器官)的表达进行了分析。结果表明: 水牛 *Sohlh2* 基因编码区全长 1 281 bp, 共编码 426 个氨基酸。多重序列比较分析结果显示水牛 *Sohlh2* 核苷酸序列与牛、绵羊、山羊、猪、马、人和小鼠相应序列的相似性分别为 98%、96%、96%、85%、86%、81% 和 72%, 系统进化树显示 *Sohlh2* 基因在不同物种以及进化的过程中具有高度保守性。*Sohlh2* 蛋白质呈弱碱性, 无信号肽, 在细胞中亚定位于细胞核中, 存在 bHLH 结构。水牛 *Sohlh2* 基因在水牛垂体、大脑、肝脏、骨骼、卵巢和睾丸等 11 个组织(器官)细胞中具有不同程度的表达, 其中睾丸细胞中表达量最高, 垂体和生殖腺细胞中表达量次之, 卵丘细胞中表达量低, 心脏、肺脏、肌肉细胞和颗粒细胞中不表达。

关键词: 水牛; *Sohlh2* 基因; 克隆分析; 表达

中图分类号: S823.8⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)02-0399-09

Cloning and expression pattern of buffalo *Sohlh2* gene

ZHU Peng^{1,2}, CHEN Ji-cheng¹, CHEN Feng¹, SU Jie^{1,3}, LI Hai-yang¹, WEI Ying-ming¹,
YANG Su-fang¹, SHI De-shun¹

(1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Guangxi Buffalo Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Nanning 530001, China; 3. Medical Scientific Research Centre, Guangxi Medical University, Nanning 530001, China)

Abstract: To identify the expression pattern of *Sohlh2* gene in different tissues of Guangxi swamp buffalo, a pair of special primers for CDS of *Sohlh2* gene was designed according to the released sequence of bovine *Sohlh2* in GenBank. The *Sohlh2* gene was amplified by RT-PCR, and its genetic evolution, protein physical and chemical properties, the secondary and tertiary structure were systemically analyzed by bio-informatics techniques. A 1 281 bp whole length coding region encoding 426 amino acids of buffalo *Sohlh2* gene was cloned and sequenced. The multiple sequence alignment revealed that buffalo *Sohlh2* gene shared 98%, 96%, 96%, 85%, 86%, 81% and 72% similarities in nucleotide sequence with *Bos Taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus*, *Homo sapiens* and Mice, respectively. Phylogenetic tree analysis showed that *Sohlh2* gene was highly conserved in different species during their evolution. *Sohlh2* protein was weakly alkaline, signal peptide free, and was localized in nuclear. The secondary structure of protein *Sohlh2* contains 20 alpha helixes, 4 beta sheets, 23 beta turns and 18 random coils. RT-qPCR results showed that the expression levels of buffalo *Sohlh2* varied in 11 of 15 tested samples, with the

收稿日期: 2015-05-04

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA100607); 广西自然科学基金(回国重点)项目(2013GXNSFCB019001); 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118114)

作者简介: 朱 鹏(1985-), 男, 江西高安人, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。(E-mail) yijianrudi@163.com。陈集成为并列第一作者。

通讯作者: 杨素芳, (E-mail) ysfang3511@163.com; 石德顺, (E-mail) ardsshi@gxu.edu.cn

aries, *Capra hircus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus*, *Homo sapiens* and Mice, respectively. Phylogenetic tree analysis showed that *Sohlh2* gene was highly conserved in different species during their evolution. *Sohlh2* protein was weakly alkaline, signal peptide free, and was localized in nuclear. The secondary structure of protein *Sohlh2* contains 20 alpha helixes, 4 beta sheets, 23 beta turns and 18 random coils. RT-qPCR results showed that the expression levels of buffalo *Sohlh2* varied in 11 of 15 tested samples, with the

most abundant expression in testis, followed by hypophysis and germinal ridge, and the minimal expression in cumulus cells.

There was no expression in lung, heart, muscle and granular cells.

Key words: buffalo; *Sohlh2* gene; cloning; expression

水牛具有适应性强、耐高温高湿、耐粗饲、抗病力强、使用年限长、静默发情、繁殖力低和产奶量低等生物学特点^[1-5]。中国沼泽型水牛发情期人工授精受胎率为 30%~40%,产犊间隔 450 d 以上,而黄牛人工授精受胎率为 70%~80%^[6]。水牛非常适合于中国南方农村饲养,据联合国粮食及农业组织(FAO)2013 年统计数据,2011 年底中国水牛存栏量达 2.338 2×10⁷ 头,仅次于印度 1.129 2×10⁸ 头和巴基斯坦 3.172 6×10⁷ 头,位居世界第 3,在中国畜牧业产业中占有重要地位。近年来,随着中国农业机械化程度的提高,水牛的役用价值逐年降低,而随着人们生活水平的提高,对水牛肉和水牛奶的需求则日益增加,亟待应用动物生物技术尤其是基因改良技术开发利用这一庞大的畜种资源。目前,水牛繁殖性状相关基因研究报道较少^[7-9],因此急需应用动物分子克隆和基因表达生物技术研究阐释影响水牛繁殖性状的重要功能基因,以建立水牛的分子育种和基因改良技术,提高水牛的繁殖力。

精卵发生碱性螺旋-环-螺旋转录因子 2(Spermatogenesis and oogenesis basic helix-loop-helix transcription factor 2, *Sohlh2*),属于碱性螺旋-环-螺旋转录因子家族(Basic helix-loop-helix transcription factor, bHLH)一员^[10]。碱性螺旋-环-螺旋转录因子超家族参与机体的众多生物进程,其中包括细胞分化、细胞周期阻滞、细胞凋亡等^[11]。有研究结果表明 bHLH 通过同源或异源二聚体的形式形成转录因子复合体结合到基因启动子区的 E-Box 结构区域(CANNTG)调节基因的转录^[11]。*Sohlh2* 基因敲除试验结果表明,*Sohlh2* 基因在小鼠 A 型精原细胞向 B 型精原细胞及原始卵泡向次级卵泡转化的生理过程中发挥着不可或缺的功能^[12-14]。但是,目前,关于水

牛 *Sohlh2* 基因的研究鲜有报道。鉴于此,本研究旨在克隆水牛 *Sohlh2* 基因序列并对其特征进行生物信息学分析,研究其组织表达规律,为进一步研究 *Sohlh2* 基因在水牛配子发生过程中的功能及转基因载体构建中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料采集方法参照本课题组前期建立的方案^[7,15]进行。试验用雌、雄水牛(2~3 岁)各 1 头,选自广西南宁市鲁班路屠宰场,采集其新鲜的生殖脊、心、肝、颗粒细胞、肺、卵丘细胞、肾、下丘脑、垂体、大脑、睾丸、皮肤、骨头、卵巢、肌肉等 15 种组织(细胞)放于液氮中,2 h 内运回实验室,液氮罐中保存用于后期 RNA 提取。

1.2 主要试剂

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自天根生化科技有限公司,Reverse Transcriptase(AMV)、LA *Taq* 酶、限制性内切酶、Oligo d(T)18T、pMD18-T Vector 均购自大连 TaKaRa 公司,FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)购自 Roche 公司,DH5a 感受态细胞为广西大学动物繁殖研究所自备。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 上牛 *Sohlh2* 基因序列(XM_597011.5)和内参基因 β -*actin* 序列(NM_001290932.1),利用 Oligo 6.0 软件分别设计 *Sohlh2*-CDS 扩增引物、定量引物及 β -*actin* 定量引物(表 1),其中 *Sohlh2*-CDS 扩增引物扩增水牛 *Sohlh2* 基因部分 5'UTR 区域、全长编码区区域和部分 3'UTR 区域。引物由上海生工生物公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	扩增长度(bp)	退火温度(℃)
<i>Sohlh2</i> -CDS	ATGGCGGCCTCAATTACC	GGCACCCAATAGGTGGTCT	1 327	60
<i>Sohlh2</i> DL	TTGAGAGATGTGTTTACCTCC	ACAATCTTTTCTAATGCCCA	188	55
β - <i>actin</i> DL	ACCGCAAATGCTTCTAGG	ATCCAACCGACTGCTGTC	199	55

1.3.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成 方法参照本课题组前期建立的体系^[5,13]进行。具体如下,Trizol 法提取水牛生殖脊、心、肝、颗粒细胞、肺、卵丘细胞、肾、下丘脑、垂体、大脑、睾丸、皮肤、骨头、卵巢和肌肉等 15 种组织细胞总 RNA。RNA 提取后,通过分光光度计及电泳检测其纯度和完整性,并置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。用 AMV 反转录试剂盒进行反转录反应,反转录体系 $20.0\text{ }\mu\text{l}$: $2\text{ }\mu\text{g}$ Total RNA, $1.0\text{ }\mu\text{l}$ Dnase I, $1.3\text{ }\mu\text{l}$ DNase I Buffer, $1.0\text{ }\mu\text{l}$ EDTA, $1.0\text{ }\mu\text{l}$ dNTP, $2.0\text{ }\mu\text{l}$ 随机引物, $4.0\text{ }\mu\text{l}$ $5\times$ AMV Buffer, $0.5\text{ }\mu\text{l}$ RNase Inhibitor, $1.0\text{ }\mu\text{l}$ AMV 逆转录酶,RNase Free H_2O 补至 $20.0\text{ }\mu\text{l}$ 。反应条件 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min , $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终止。

1.3.3 RT-PCR 反应 方法参照本课题组前期建立的体系^[7,15]进行。具体如下,以反转录产物作模板进行 PCR 反应,反应体系 $20.0\text{ }\mu\text{l}$:模板 $1.0\text{ }\mu\text{l}$,上、下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{l}$, $10\times$ LA Buffer $2.0\text{ }\mu\text{l}$,dNTP $1.0\text{ }\mu\text{l}$,LA *Taq* $0.3\text{ }\mu\text{l}$,ddH₂O 补至 $20.0\text{ }\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min ,35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终止反应。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并胶回收。

1.3.4 PCR 产物的连接与测序 方法参照本课题组前期建立的体系^[7,15]进行。具体如下,PCR 产物纯化回收后,将目的片段与克隆载体 pMD18-T 连接,然后转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,再将菌液涂布在含有氨苄青霉素 (Amp^+) 的 LB 固体培养基上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取单克隆在含 Amp^+ 的 LB 液体培养基中培养,然后细菌裂解 (Cracking) 鉴定并用天根普通质粒提取试剂盒提取重组质粒,将含有目的片段的重组质粒寄至上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.3.5 生物信息学分析 方法参照本课题组前期建立的体系^[7,15]进行。具体如下,序列测定的结果用 BLAST 程序进行同源序列比对,用 MEGA5.0 软件构建分子进化树,用 EXPASY (<http://web.expasy.org/protparam/>) 服务器分析水牛 *Sohlh2* 编码的蛋白质氨基酸组成、理论分子质量和等电点等,利用 SMART^[16] 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 预测 *Sohlh2* 编码的蛋白质氨基酸序列中可能存在的蛋白质结构域,利用 SignIP 程序^[17] (www.cbs.dtu.dk/

[services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) 进行蛋白质 N-末端信号肽预测,通过 Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>) 服务器分析 *Sohlh2* 蛋白质的亚细胞定位,利用 DNASTar 中的 Protean 程序预测 *Sohlh2* 蛋白质二级结构,通过 I-TASSER 程序^[18] (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 分析预测 *Sohlh2* 蛋白质三级结构。

1.3.6 RT-QPCR 方法参照本课题组前期建立的体系^[7,15]进行。具体如下,反应体系为 $20.0\text{ }\mu\text{l}$: 50 ng RT-PCR 产物, $10.0\text{ }\mu\text{l}$ $2\times$ FastStart Universal SYBR GreenMaster (ROX), $0.3\text{ }\mu\text{l}$ PrimerF/R ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$),RNase Free H_2O 补至 $20.0\text{ }\mu\text{l}$ 。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min ,40 个循环。对每个样品进行 4 次重复,运用 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$ 方法计算目的基因的相对表达量。用内参 β -actin 对其进行标准化,将水牛卵巢组织作为对照品,其他为检测样品。

2 结果与分析

2.1 水牛 *Sohlh2* 基因的克隆与鉴定

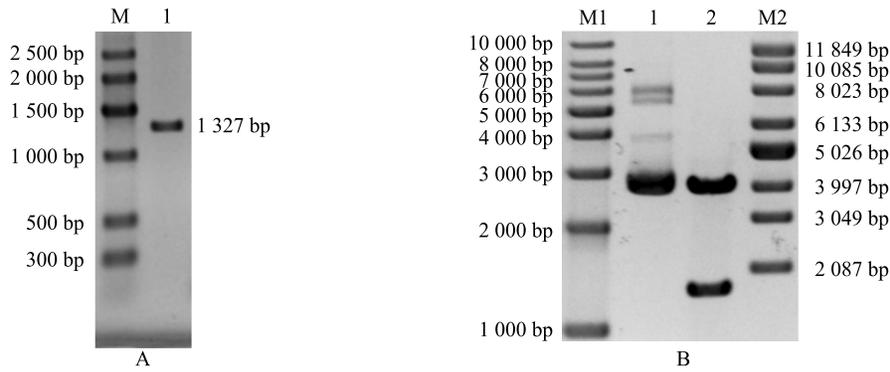
通过 Trizol 法纯化水牛组织的总 RNA,电泳结果显示清晰的 18S 和 28S 条带,说明获得了高质量的 RNA,可用于下一步的反转录试验。应用设计的特异性引物扩增 *Sohlh2* 基因 CDS 序列,经 RT-PCR 扩增获得 $1\text{ }327\text{ bp}$ 的特异性条带 (图 1)。将 PCR 产物连接克隆到 pMD18-T 载体,载体大小 $4\text{ }027\text{ bp}$ 左右,与预期结果一致 (图 1)。

2.2 水牛 *Sohlh2* 基因序列分析

对阳性重组质粒进行测序分析,获得水牛 *Sohlh2* 基因序列,并提交 GeneBank 数据库,登陆号为 JQ326287.1。应用 NCBI 的 ORF Finder 程序分析,发现该基因编码区全长 $1\text{ }281\text{ bp}$,可编码 426 个氨基酸 (图 2)。BLAST 相似性比对分析结果显示,水牛 *Sohlh2* 基因序列与牛、绵羊、山羊、猪、马、人和小鼠相应序列的相似性分别为 98%、96%、96%、85%、86%、81% 和 72%,表明 *Sohlh2* 基因在不同哺乳动物中具有较高的序列保守性。

2.3 水牛 *Sohlh2* 基因的系统进化树

选择克隆得到的水牛 *Sohlh2* 基因序列与牛 (XM_597011.5)、绵羊 (XM_004012121.1)、山羊



A中,M为Marker VII,1为样品 RT-PCR *Sohlh2* 扩增产物;B中,M1为1 kb Marker,1为重组质粒 pMD18-T-*Sohlh2*,2为重组质粒的 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切产物,M2为 Supercoiled DNA Ladder。

图1 水牛 *Sohlh2* 基因的扩增与亚克隆
Fig.1 The amplification and subcloning of buffalo *Sohlh2* gene

```

1 ATGGCGCCTCAATTACCGGCCGAGTTCGGCCAAACCCAGGGCAGGCCAAATATAGACCTCTTATTAGTGGGCGATGTCAGAGTTCAG
1 M A A S I T G P E F G Q T Q G Q A N I D L L L V G D V R V Q
91 TACCTGGCTGACTGTACAGAAATTATTTCAAATATAGCACAAAGTCACCATCATCTTTAGTGATGTGAAGAAGGCAGCAGCACTGTG
31 Y L A D T V Q K L F S N I A Q V T I I F S D V K K A A A L V
181 GATGACTGCACATTTGACATGGTTTTCTGAAAGCTGACTTCTCCACCAACTGCTGAGGAGCTGGAAGTGATCAAATTAATTAGATTGGT
61 D D C T F D M V F L K L T S P P T A E E L E V I K L I R F G
271 GAGGAAAAAATACACATTTGCTGTTTGTGTTTTATAATCCCTGAGAATTTTAAAGGTTGTATTTTCAGAGCACCAGCTGATATTGCTTTA
91 E E K N T H L L F V F I I P E N F K G C I S E H R A D I A L
361 ACTGAACCCCTGACAATGGAATAAATGACTGTTGTTGAAATACTGGAACATATTTCTCACATACTGTTAAGAATGAAATTTCTGTG
121 T E P L T M E K M S V V L K Y W K T Y F S H T V K N E I S V
451 AAGCCTGAAGAACCTGAGTTGCCCTCTGCAGAACTCCTGTGGTGAACACCTGGGATATTTTCTACTGATGATTTGCTGTCTCTGAATCT
151 K P E E P E L P L Q K S C G E H L G Y F S T D V F A C S E S
541 CTAAGAAACGACATTGGATTGATTTAAAGGCTCCATTGCCAAATTTTGAGAAAAGAAAAAGATTCTCTTCTTCATTCAAACAAGGAA
181 L R N D I G F D L K A P L P N F E K R K K I S L L H S N K E
631 AAGCTGAGAAGACAACCAATCAAGTATTGCTGTGAGCAGCTCGCCACCTGCTGCCGTATATGAAGGGGAGAAAGATGATGCGGCTTCC
211 K L R R E R I K Y C C E Q L R T L L P Y M K G R K N D A A S
721 GTCTCGAGGCCACAGTTGATTACGTGAAGTTTGTCCGGGAGAAAAATCCCTCCAGCCATCATGGGCCAGATTACAGAAGTACTTCAGAGC
241 V L E A T V D Y V K F V R E K I P P A I M G Q I T E V L Q S
811 AATAAGAGATTTTGAAGAAACAACAAATGCCCATCCAGCTATCCATCCAGGCATGATCATGGCACAAAGGAAAAACAGTGTGCTGAGA
271 N K R F C K K Q Q M P I Q L S I P G M I M A Q R E N S V L R
901 AGCACTCACTCACTGCGCCAGGCATCAGAGTCTGACTAATGAGCGCTTGAGTGTGCGCTCTGCTCCTACCTCCGAGGATGCGCTGGAT
301 S T H S P A P G I R V L T N E R L S V R S A P T S E D A L D
991 GAAGCTGTGAGAGGTCAGTCCAGCTCTGCGTCAGAGAAGGCTATCGGTGATGTATATAAAACCCGAATCCCCAGCAGCTCTGTCTCTT
331 E A V R G Q S S S A S E K A I G D V Y K T R I P S T A L S L
1 081 AATTCCTTCCATGCTGTGACATACTATTCTAAAGTGGTCCCTTCTATGACCGAGCTACTGTAACAAATCAGAACACTTCAGTGTGTTTC
361 N S F H A V R Y Y S K V V P S Y D A A T V T N Q N T S V C F
1 171 CCAACCGCTGTACCCAAAGTCTCCAAGTTTCTTCTCAGCACTGCAATTTCTGTGTTGGGCCAGGTGTGCACAGCACACCCCAACTGTCTG
391 P T A V P K V S K F L P Q H C N S V L G Q V C T A H P N C L
1 261 CAACAGTTTTGGCCGTATTAA
421 Q Q F W A Y *

```

图2 水牛 *Sohlh2* 基因序列及预测编码的氨基酸序列
Fig.2 Buffalo *Sohlh2* gene sequence and deduced amino acid sequences

(XM_005687614.1)、猪(XM_005668338.1)、猫(XM_006927229.1)、大熊猫(XM_002923460.1)、家犬(XM_543134.4)、非洲象(XM_003409630.1)、猕猴(XM_001082320.2)、黑猩猩(XM_004054373.1)、人(NM_017826.2)、马(XM_005601169.1)、中国仓鼠(XM_003502952.1)、小鼠(NM_028937.3)和大鼠(NM_001034961.1)进行多重序列比较,结果见

图3。由图3可知,*Sohlh2*基因在不同物种中具有较高的保守性。应用MEGA5.0软件,用NJ法构建系统进化树(图4)。由图4可知,水牛与黄牛的相应序列聚为一支,与绵羊的遗传距离相对较近。进化树的形态与分类学具有较高的一致性,进一步说明克隆的为水牛*Sohlh2*基因。

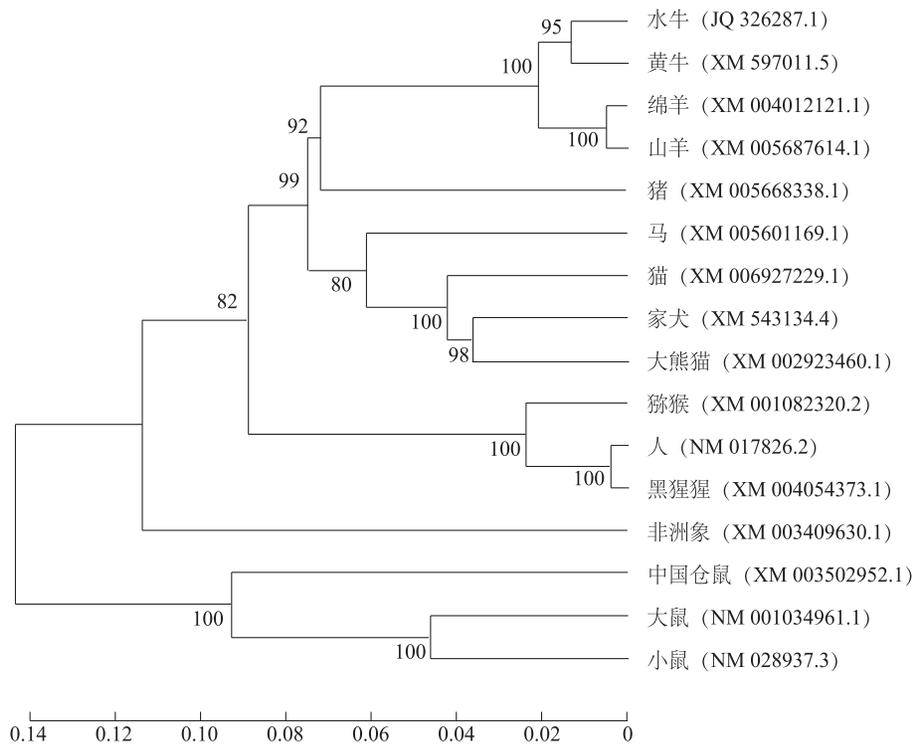


图4 水牛与其他物种 *Sohlh2* 氨基酸序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of buffalo and other species based on amino acid sequence of *Sohlh2*

2.4 水牛 *Sohlh2* 蛋白质特性的生物信息分析

通过 EXPASY 服务器分析 *Sohlh2* 蛋白质的氨基酸组成,该蛋白质含有 426 个氨基酸,其中亮氨酸含量最高(9.2%),其次是丝氨酸(8.2%),色氨酸含量最低(0.5%)。*Sohlh2* 蛋白质理论分子质量为 4.776×10^4 ,等电点为 8.72,为弱碱性蛋白质,分子式为 $C_{2132}H_{3403}N_{575}O_{627}S_{20}$ 。应用 SignIP 程序对 *Sohlh2* 蛋白质 N 末端信号肽进行预测,结果显示,水牛 *Sohlh2* 蛋白质不含信号肽位点。通过 Softberry 服务器分析预测了水牛 *Sohlh2* 蛋白质的亚细胞定位情况,结果表明,水牛 *Sohlh2* 蛋白质位于细胞核内。进一步用 SMART 程序预测 *Sohlh2* 的蛋白质结构域,结果显示 *Sohlh2* 存在 Helix-loop-helix DNA-binding domain 结构,位于第 197~256 位氨基酸(图 5)。随后又对水牛 *Sohlh2* 蛋白质的二级结构和高级结构进行了预测分析。用 DNASTar 中 Protean 程序分析蛋白质的二级结构,结果(图 6)显示,水牛 *Sohlh2* 蛋白质二级结构包含 20 个 α -螺旋、4 个 β -折叠、23 个 β -转角和 18 个无规则卷曲,呈典型的跨膜结构蛋白特征。应用 I-TASSER 程序模拟了水牛、黄牛和人 *Sohlh2* 蛋白质高级结构,3 物种的 *Sohlh2*

蛋白质高级结构相似性很高(图 7)。

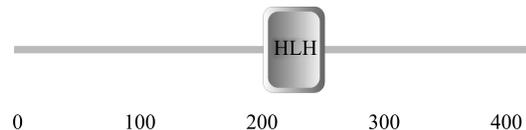
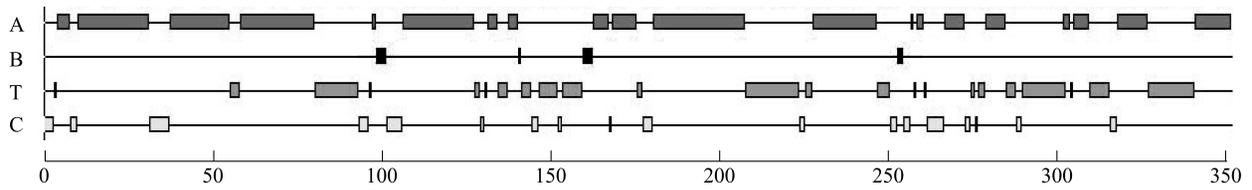


图5 水牛 *Sohlh2* 蛋白质结构域预测

Fig.5 The prediction of protein domain of buffalo *Sohlh2*

2.5 水牛不同组织中 *Sohlh2* 基因表达分析

以 β -actin 为内参基因,应用 RT-QPCR 技术对水牛 *Sohlh2* 基因在大脑、卵巢、肝脏、皮肤、肌肉和肾脏等组织细胞中的表达情况进行分析,结果显示用于 RT-QPCR 检测基因表达的定量引物熔解曲线峰图单一(图 8)。定量分析结果表明水牛 *Sohlh2* 基因表达于所检测的 11 种组织细胞中,其中睾丸中表达量最高,垂体、生殖脊次之,卵丘细胞表达量最低,在心脏、肺脏、肌肉和颗粒细胞中没有检测到其表达(图 9)。定量 PCR 产物电泳结果一方面显示 β -actin 和 *Sohlh2* 没有杂带和引物二聚体,另一方面也显示 *Sohlh2* 基因高表达于广西本地水牛睾丸、垂体和生殖脊等组织中(图 10)。



A:螺旋;B:折叠;T:T-转角;C:无规则卷曲。

图6 水牛 *Sohlh2* 蛋白质二级结构预测

Fig.6 The secondary structure of buffalo *Sohlh2* protein

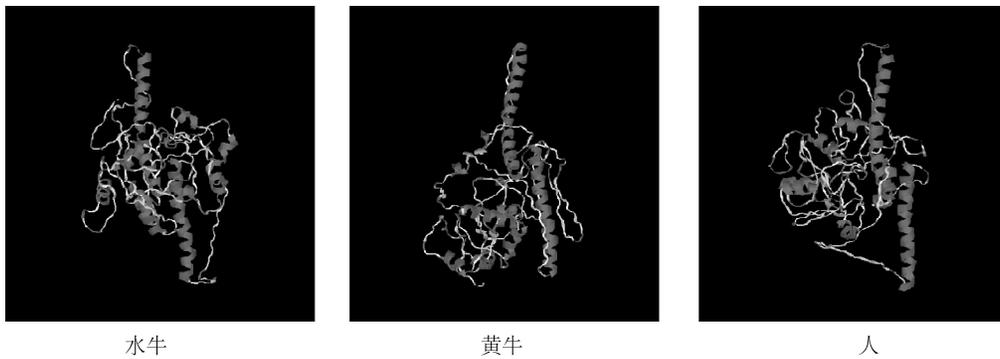


图7 不同物种 *Sohlh2* 蛋白质三级结构预测

Fig.7 The tertiary structure of *Sohlh2* protein of different species

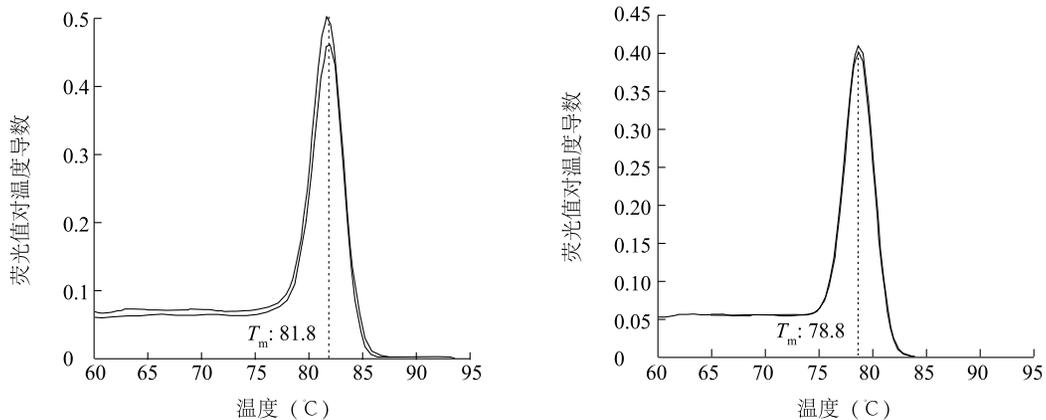


图8 β -actin (A) 和 *Sohlh2* (B) 基因的熔解曲线

Fig.8 The melt curve of *Sohlh2* (B) and β -actin (A)

3 讨论

水牛是中国南方重要的肉、乳和役兼用畜种资源,目前关于水牛繁殖性状相关基因的研究报道相对较少。本研究克隆得到了沼泽型水牛 *Sohlh2* 基

因 cDNA 共 1 726 bp,其中编码区全长 1 281 bp,共编码 426 个氨基酸。多重序列比较分析结果显示水牛 *Sohlh2* 核苷酸序列与牛、绵羊、山羊、猪、马、人和小鼠相应序列的相似性分别为 98%、96%、96%、85%、86%、81%和 72%,表明该序列在不同动物中

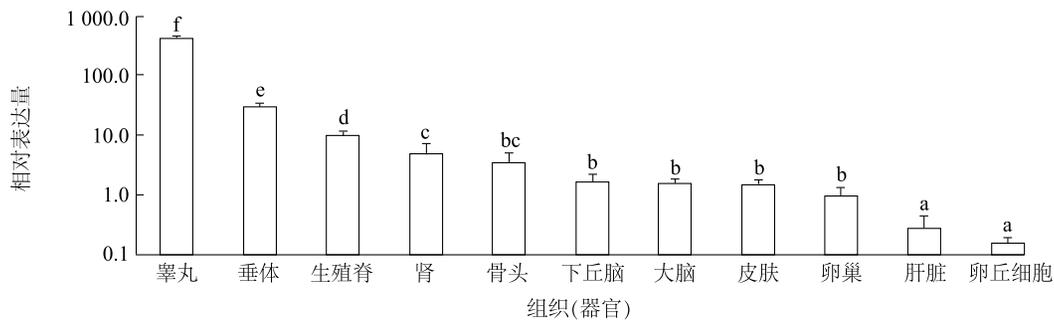
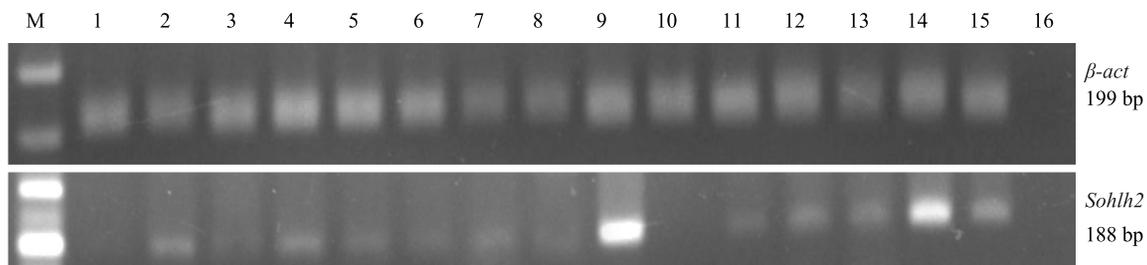


图9 *Sohlh2* 基因在水牛不同组织(器官)中的相对表达量

Fig.9 The relative expression levels of *Sohlh2* mRNA in different tissues of buffalo



M: Marker I; 1: 心脏; 2: 肝脏; 3: 肺脏; 4: 肾脏; 5: 大脑; 6: 皮肤; 7: 骨头; 8: 肌肉; 9: 睾丸; 10: 颗粒细胞; 11: 卵丘细胞; 12: 生殖脊; 13: 下丘脑; 14: 垂体; 15: 卵巢; 16: 水。

图10 *Sohlh2* 在水牛不同组织(器官)细胞中的定量 PCR 电泳图

Fig.10 Agarose gel electrophoresis of buffalo *Sohlh2* in different tissues by RT-QPCR

具有较高的保守性;通过生物信息学方法对 *Sohlh2* 蛋白质的一级结构、二级结构和高级结构进行分析预测发现,*Sohlh2* 蛋白质呈弱碱性,无信号肽,细胞亚定位于细胞核中,符合其作为转录因子的特征,存在典型的 bHLH 结构,具备 bHLH 转录因子家族调节基因表达的功能,能够识别多个基因启动子区的 E-Box 顺式作用元件^[19-20],其蛋白质三级结构与牛和人的相似。

Sohlh2 作为碱性螺旋-环-螺旋转录因子超家族中的重要一员,通过作用于众多基因启动子区 E-Box 顺式作用元件,调节基因的转录,从而参与机体的细胞分化和凋亡^[11]。有研究表明,*Sohlh2* 基因在卵巢早衰^[21]、肿瘤增殖^[11,22] 和精卵发生^[10,12-14,19-20,23] 等系列重要生命活动中发挥重要功能。Qin 等^[21] 2014 年报道 *Sohlh2* 的 3 种突变与中国妇女的卵巢早衰相关,这 3 种突变为 p.Glu79Lys、p.Glu105Gly 和 c.-210G>T。Zhang 等^[22] 2014 年的研究表明 *Sohlh2* 通过上调 p21 和下调 cyclin D1 的表达来抑制上皮性卵巢癌 (Epithelial ovarian

carcinoma, EOC) 的增殖。而 *Sohlh2* 小鼠雌雄不育,主要体现在其配子发生过程受阻。*Sohlh2* 通过调节 *Sohlh1*^[19]、*Kit*^[20]、*Gfra1*^[14]、*Sox3*^[14]、*Nobox*、*Figla*、*Gdf9*、*Pou5f1*、*Zp1*、*Zp3*、*Kit*、*Oosp1*、*Nlrp14*、*Hlfoo* 和 *Stra8*^[23] 等基因的表达,影响动物精子和卵子发生。雄性敲除小鼠^[12] 因 A 型精原细胞不能分化为 B 型精原细胞,雌性敲除小鼠^[23] 因原始卵泡不能生长发育为初级卵泡而不育。本研究应用 RT-QPCR 技术检测了 *Sohlh2* 基因在水牛不同组织中 mRNA 的表达情况,结果显示在所检测的 15 种组织细胞中,*Sohlh2* 表达于其中的 11 种。其中在水牛睾丸组织中表达最高,其表达量是卵巢的 418.5 倍;其次是垂体和生殖脊,其表达量分别是卵巢组织的 30.6 倍和 10.7 倍;表达量最低的是的卵丘细胞。提示 *Sohlh2* 基因在水牛的繁殖性腺轴,即垂体、下丘脑、卵巢和睾丸中起着重要的调节作用,参与水牛的配子发生,尤其是精子发生。此外,本研究结果显示 *Sohlh2* 表达不仅仅局限于水牛的繁殖器官,还表达于其他组织结构,这与 *Sohlh2* 在人^[23,24-25] 的组织中的表达规律

一致,其表达不仅仅局限于人的繁殖组织,还表达于人的其他组织,尤其是上皮组织,但 *Sohlh2* 基因在水牛不同组织中表达差异的分子调控机制仍需要进一步的研究。总之,本研究成功克隆了水牛 *Sohlh2* 基因并分析了其组织表达规律,为后续进一步根据其序列设计 TALEN/SiRNA 位点,研究其功能,探索其下游调控基因以及转基因动物的制备等提供了一定理论基础。

参考文献:

- [1] NANDI S, RAGHU H M, RAVINDRANATHA B M, et al. Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in vitro: premises and promises[J]. *Reprod Domest Anim*, 2002, 37(2): 65-74.
- [2] 庞春英,陆杏蓉,朱 鹏,等. 水牛透明带 3 基因启动子克隆及转录活性检测[J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(6): 1350-1356.
- [3] ZICARELLI L, ESPOSITO L, CAMPANILE G, et al. Effects of using vasectomized bulls in artificial insemination practice on the reproductive efficiency of Italian buffalo cows[J]. *Anim Reprod Sci*, 1997, 47(3): 171-180.
- [4] 邓廷贤,庞春英,王 建,等. 水牛分子生物学技术研究新进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(4): 79-84.
- [5] 李婷婷,左二伟,李孟琪,等. 基于 *AMEL* 基因位点差异的水牛性别 PCR 鉴别方法[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(8): 1516-1521.
- [6] 李忠权. 水牛繁殖季节及情期适时输精的研究[J]. *广西畜牧兽医*, 2007(3): 116-117.
- [7] 苏 节,刘庆友,朱 鹏,等. 沼泽型水牛 *CYP19A1* 基因克隆、序列分析及组织表达研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(4): 514-521.
- [8] 龚 云,乔树叶,林 浪,等. 水牛 *YY1* 基因克隆及其 shRNA 片段的筛选[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(1): 62-68.
- [9] 崔奎青,张会娜,刘 帅,等. 沼泽型水牛 *NANOG* 基因 5' 调控序列克隆与功能分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(3): 387-394.
- [10] BALLOW D J, XIN Y, CHOI Y, et al. *Sohlh2* is a germ cell-specific bHLH transcription factor[J]. *Gene Expr Patterns*, 2006, 6(8): 1014-1018.
- [11] SUN H, GHAFFARI S, TANEJA R. bHLH-orange transcription factors in development and cancer[J]. *Transl Oncogenomics*, 2007, 2: 107-120.
- [12] HAO J, YAMAMOTO M, RICHARDSON T E, et al. *Sohlh2* knockout mice are male-sterile because of degeneration of differentiating type A spermatogonia[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(6): 1587-1597.
- [13] TOYODA S, MIYAZAKI T, MIYAZAKI S, et al. *Sohlh2* affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia[J]. *Dev Biol*, 2009, 325(1): 238-248.
- [14] SUZUKI H, AHN H W, CHU T, et al. SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation[J]. *Dev Biol*, 2012, 361(2): 301-312.
- [15] 朱 鹏,栗小平,苏 节,等. 沼泽型水牛 *ALK3* 基因克隆分析与表达模式研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2015(3): 516-524.
- [16] LETUNIC I, DOERKS T, BORK P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 302-305.
- [17] PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(10): 785-786.
- [18] ROY A, KUCUKURAL A, ZHANG Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction[J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(4): 725-738.
- [19] TOYODA S, YOSHIMURA T, MIZUTA J, et al. Auto-regulation of the *Sohlh1* gene by the SOHLH2/SOHLH1/SP1 complex: implications for early spermatogenesis and oogenesis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101681.
- [20] BARRIOS F, FILIPPONI D, CAMPOLO F, et al. SOHLH1 and SOHLH2 control kit expression during postnatal male germ cell development[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(6): 1455-1464.
- [21] QIN Y, JIAO X, DALGLEISH R, et al. Novel variants in the SOHLH2 gene are implicated in human premature ovarian failure[J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(4): 1104-1109.
- [22] ZHANG H, ZHANG X, JI S, et al. *Sohlh2* inhibits ovarian cancer cell proliferation by upregulation of p21 and downregulation of cyclin D1[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(8): 1863-1871.
- [23] CHOI Y, YUAN D, RAJKOVIC A. Germ cell-specific transcriptional regulator *sohlh2* is essential for early mouse folliculogenesis and oocyte-specific gene expression[J]. *Biol Reprod*, 2008, 79(6): 1176-1182.
- [24] SU A I, WILTSHIRE T, BATALOV S, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16): 6062-6067.
- [25] LUKK M, KAPUSHESKY M, NIKKILA J, et al. A global map of human gene expression[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(4): 322-324.

(责任编辑:张震林)