



绵羊 *TGFβ2* 基因及其剪切体的克隆与生物信息学分析

陈磊¹, 倪文浩¹, 李雯雯², 李欣毅², 李文蓉¹

(1. 新疆畜牧科学院 生物技术研究所, 农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室, 自治区重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆生产建设兵团第二中学, 乌鲁木齐 830000)

摘要 旨在克隆绵羊 *TGFβ2* (Transforming growth factor-β2) 基因 CDS, 解析其序列及编码蛋白的生物学特性, 为绵羊生产利用提供理论基础。采用 PCR 技术克隆获得 *TGFβ2* 基因的 CDS, 并进行生物信息学分析。结果表明: 绵羊 *TGFβ2* 基因的 CDS 长度为 1 329 bp, 编码 442 个氨基酸; 其可变剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 由于 CDS 部分缺失分别编码 331 和 414 个氨基酸。绵羊 *TGFβ2* 及其可变剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 编码蛋白的理论等电点分别为 8.74、7.60 和 8.82, 均存在 1 个信号肽和 1 个跨膜结构域, 由 α-螺旋、β-折叠、延伸及不规则卷曲构成; 序列同源性分析发现, 绵羊 *TGFβ2* 基因编码区的核苷酸和氨基酸序列与其他哺乳动物同源性较高, 进化树分析表明, 绵羊 *TGFβ2* 氨基酸序列与人类的进化关系较近, 与斑马鱼较远; 细胞定位分析表明 *TGFβ2* 及其可变剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 主要在细胞外基质中发挥作用, 调控下游靶基因的表达。获得绵羊 *TGFβ2* 及其可变剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 完整的 CDS, 与 *TGFβ2* 转录本相比, *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 分别缺失 111 和 28 个氨基酸序列, 其可能通过与 *TGFβ2* 转录本不同的分子调控机制发挥重要的生物学作用。

关键词 绵羊; *TGFβ2*; 克隆; 编码区; 生物信息学

中图分类号 S826; Q81

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2018)07-0929-09

中国美利奴羊是中国于 1985 年育成的第一个毛用细毛绵羊品种, 具有毛丛密度高、羊毛细长而弯曲和净毛量高的特点。目前, 羊毛纤维产量已经占世界纤维原料的 1.9%^[1], 是细毛羊主要的高附加值产品, 具有重要的经济价值。中国虽是世界羊毛的生产大国, 但优质细毛羊的羊毛产量和品质仍远落后于养羊业发达国家, 主要原因是细毛羊优良品种选育扩繁和羊毛质量控制体系滞后。传统的绵羊育种方法虽然能够改良和提升羊毛产量和品质, 但周期长、进展缓慢, 而运用分子育种技术在筛选获得与细毛羊毛囊发育相关功能基因的基础上, 进一步阐明其对绵羊毛囊发育和毛品质形成的影响, 对推动细毛羊品种选育和提高中国优质细毛羊毛品质具有重要意义。

可变剪接(或选择性剪接, Alternative splicing)是指基因的 mRNA 前体通过不同的剪接方

式(选择不同的剪接位点)拼接产生不同的 mRNA 剪接异构体, 是生物体内一种普遍存在的调控方式^[2-3]。同时, 可变剪接是调节基因表达和产生蛋白质组多样性的重要机制。可变剪接多发生在受体、信号传导通路、转录因子等参与信号转导和表达调节的基因上, 对个体分化发育、凋亡和细胞兴奋等生理过程的精确调控发挥重要作用^[4-6]。此外, 它也是导致真核生物基因和蛋白质数量较大差异的重要原因。已有研究发现, 基因可变剪接发生在动物神经系统、免疫系统、肌肉和毛囊的生长发育过程中均具有关键的生物学功能^[7-11]。

TGFβ2 是 TGF-β 超家族成员之一, 在毛囊形态发生、发育和毛囊周期性调控中发挥重要的生物学功能。Chuong 等^[12] 研究发现 *TGFβ2* 在毛囊基板和凝集簇中表达, 能够诱导胚胎间充质中真皮凝集簇的形成, Soma 等^[13-14] 研究发现

收稿日期: 2017-12-21 修回日期: 2018-02-23

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题(2017D04028); 新疆维吾尔自治区科研机构创新发展专项(2016D04001); 国家国际合作专项(2014DFA30970)。

第一作者: 陈磊, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为绵羊遗传育种。Email: chenlei0991@126.com

通信作者: 李文蓉, 女, 博士, 研究员, 研究方向为绵羊繁殖育种。Email: xjlwr@126.com

TGFβ2 能够抑制毛囊毛干的延长,诱导毛囊发生退行期的形态学改变,同时,免疫组化分析发现 *TGFβ2* 在毛囊真皮乳头、外根鞘、毛球和毛母质细胞中均表达,且在毛囊生长期—退行期过渡阶段, *TGFβ2* 在毛球内的表达具有特异性,调控毛囊发育和毛囊周期性生长过程^[15-17]。此外, *TGFβ2* 基因敲除小鼠模型发现,单拷贝失活的小鼠毛囊数量下降,而 *TGFβ2* 双敲除小鼠毛囊的形成和生长发育受到严重影响^[18]。由此可见, *TGFβ2* 在调控动物毛囊生长发育和周期性循环过程中发挥重要作用,但目前绵羊 *TGFβ2* 基因序列结构和生物学特性尚不清楚,该基因在调控毛囊发生和发育中的作用机制鲜有报道。本研究对绵羊 *TGFβ2* 其剪切体 CDS 进行克隆,利用生物信息学软件对 *TGFβ2* 及其剪切体蛋白的结构和功能进行分析,阐明其生物学特征,为深入研究 *TGFβ2* 在绵羊毛囊生长发育过程中的作用及其表达调控提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

绵羊为新疆畜牧科学院绵羊中心羊场的 2~3 岁中国美利奴羊,通过同期发情和人工授精技术分别采集中国美利奴羊妊娠期毛囊发育起始阶段[第 55 天(D55)]、初级毛囊形成阶段[第 75 天(D75)]、次级毛囊形成阶段[第 85 天(D85)]、次级获得性毛囊形成阶段[第 105 天(D105)]和毛发生长成熟阶段[第 135 天(D135)]各 3 只胎羊体侧皮肤组织样本,分别置于冻存管中,保存在液氮中,备用。随机挑选妊娠期第 85 天的 3 只中国美利奴羊体侧皮肤组织样本为模板,进行绵羊 *TGFβ2* 基因克隆。

1.2 主要试剂

Trizol 试剂, Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR cloning kit 购自 Life Technology 公司; PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶,限制性内切酶, T_4 DNA 连接酶购自 TAKARA 公司;反转录试剂盒,感受态细胞 DH5 α ,质粒提取试剂盒,胶回收试剂盒购自全式金科技有限公司;其他试剂为分析纯产品。

1.3 皮肤组织总 RNA 提取及反转录产物合成

参照 TRIzol Reagent 操作步骤分别提取中国美利奴羊体侧皮肤组织总 RNA,10 g/L 非变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,利用 Nandrop

2000 核酸蛋白分析仪测定 RNA 的质量浓度,按照反转录酶试剂盒说明进行 cDNA 合成。

1.4 克隆引物设计

根据 GenBank 中的绵羊 *TGFβ2* 基因序列 (XM_004013602) 设计引物。上游引物: 5'-GTCCGGATCCATGCACTACTGTGTGTTGAGCG-3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点); 下游引物: 5'-CCTGAAGCTTTTAGCTGCATTTGCAAGACTTGAC-3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点),引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.5 绵羊 *TGFβ2* 基因克隆

将 3 只中国美利奴羊皮肤组织总 RNA 等量混合,反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系:cDNA 模板 1.0 μ L, Premix PrimeSTAR[®] HS 聚合酶 25.0 μ L,上、下游引物 (10 mol/mL) 各 1.0 μ L,灭菌去离子水 22.0 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 1.0 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 反应结束后取 6.0 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。利用 DNA 胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物,随后对 PCR 回收产物和 PCR[™] Blunt II-TOP[®] 克隆载体进行双酶切,利用 T_4 连接酶进行连接反应,并将连接产物转化至感受态细胞 DH5 α 中,将细胞悬液涂于含有卡那霉素的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 16 h。挑取培养皿上的单克隆接种于含有卡那霉素的液体培养基中,培养过夜。利用质粒小型提取试剂盒提取质粒,对重组质粒进行双酶切鉴定,将鉴定的阳性质粒送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.6 生物信息学分析

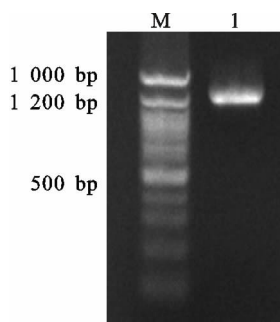
使用 DNASTAR 软件进行克隆序列的拼接和各物种同源性分析;利用 ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析绵羊 *TGFβ2* 氨基酸的理化性质^[19];利用 TMHMM server 2.0 预测绵羊 *TGFβ2* 蛋白的跨膜结构域^[20];利用 SignalP 4.0 软件预测绵羊 *TGFβ2* 蛋白的信号肽;利用在线软件 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 进行绵羊 *TGFβ2* 蛋白亲水性/疏水性分析;利用 NetPhos 分析蛋白质磷酸化位点;利用 NetNGlyc 分析蛋白质糖基化位点;使用 Mega 6.0 软件构建 8 个物种 *TGFβ2* 的系统进化树;利用 PSORT II Prediction 预测蛋白质的亚细胞定位;利用 SOPMA 软件 (

mat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测绵羊 *TGFβ2* 蛋白的二级结构;采用 Phyre 2.0 软件 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 进行绵羊 *TGFβ2* 蛋白的三级结构预测^[21]。

2 结果与分析

2.1 绵羊 *TGFβ2* 基因 CDS 的 PCR 扩增

利用 Trizol 提取 3 只中国美利奴羊总 RNA, 非变性琼脂糖凝胶电泳检测得到 28 S、18 S 和 5 S 3 条带(图略), Nandrop 分光光度计检测吸光度 OD_{260nm}/OD_{280nm} 为 1.9~2.0, 表明总 RNA 完整性较好, 无蛋白质或 DNA 污染。利用设计的特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得 1 200 bp 左右清晰且特异性好的 DNA 片段(图 1), 可以进行后续试验。



M. DNA marker 100 bp; 1. PCR 产物 Product of PCR

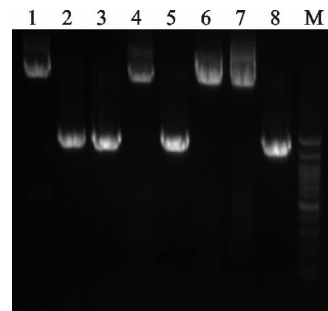
图 1 绵羊 *TGFβ2* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of sheep *TGFβ2* gene

2.2 绵羊 *TGFβ2* 基因及其剪切体 CDS 的克隆及重组子鉴定

将纯化回收获得的 PCR 产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落培养后提取质粒, 利用 *TGFβ2* 基因 CDS 特异性引物鉴定重组质粒, 获得约 1 200 bp 的插入片段(图 2), 与预期结果相符, 测序后获得绵羊 *TGFβ2* 基因 CDS 序列全长 1 329 bp, 编码 442 个氨基酸; 另发现 2 个可变剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2, 与主转录本 *TGFβ2* 相比, 可变剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 分别编码 331 和 414 个氨基酸, *TGFβ2*-AS1 缺失全部的第二外显子序列和第六外显子的 115 个碱基, *TGFβ2*-AS2 仅缺失第二外显子(图 3)。此外, 物种间的核苷酸序列相似性分析发现, 克隆获得的 *TGFβ2* 基因 CDS 与人类、小鼠、大鼠、牛、鸡、狗、猪和斑马鱼的相似性分

别为 94.28%、83.37%、88.71%、92.85%、79.53%、94.51%、94.81% 和 67.80%, 表明 *TGFβ2* 基因在各物种间具有较高的相似性。



M. DNA marker 100 bp; 1~8. 菌落 PCR 产物 Product of colony PCR

图 2 绵羊 *TGFβ2* 基因菌落 PCR 扩增结果

Fig. 2 Colony PCR amplification result of sheep *TGFβ2* gene

2.3 绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体蛋白的生物信息学分析

2.3.1 理化性质分析 利用 ProtParam 软件对绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 的理化性质进行分析, 结果发现: 绵羊 *TGFβ2* 蛋白分子质量为 50 550.99 ku, 理论等电点为 8.74, *TGFβ2*-AS1 蛋白分子质量为 37 672.38 ku, 理论等电点为 7.60, *TGFβ2*-AS2 蛋白分子质量为 47 691.71 ku, 理论等电点为 8.82, 绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 蛋白均由 20 种基本氨基酸组成(图 3), 其中: 主转录本 *TGFβ2* 的氨基酸组成中丝氨酸(10.2%)含量最高, 色氨酸(1.1%)最低, 带正电荷的残基 59 个, 带负电荷的残基 49 个, 蛋白的平均亲水系数为 -0.406; *TGFβ2*-AS1 蛋白氨基酸组成中亮氨酸(9.7%)含量最高, 色氨酸(0.9%)最低, 带正电荷的残基 39 个, 带负电荷的残基 38 个, 蛋白的平均亲水系数为 -0.217; *TGFβ2*-AS2 蛋白的氨基酸组成中亮氨酸(9.9%)含量最高, 色氨酸(1.2%)最低, 带正电荷的残基 58 个, 带负电荷的残基 48 个, 蛋白的平均亲水系数为 -0.471。

2.3.2 亲水性/疏水性分析 如图 4 所示, 绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 第 8 位丙氨酸疏水性最强(最高分值 2.856); 绵羊 *TGFβ2* 第 326 位精氨酸亲水性最强(最低分值为 -3.622), *TGFβ2*-AS1 第 94 位丝氨酸亲水性最强(最低分值为 -3.178), *TGFβ2*-AS2 第

TGFβ 2.SEQ	<u>MHYCVLSAFLLLHLVTVLVALSLSTCSTLDMQDMRRRIEAIRGQILSKRLTSPFEDYPEE</u>	60
TGFβ 2-AS1.SEQ	<u>MHYCVLSAFLLLHLVTVLVALSLSTCSTLDMQDMRRRIEAIRGQILSKRLTSPFEDYPEE</u>	60
TGFβ 2-AS2.SEQ	<u>MHYCVLSAFLLLHLVTVLVALSLSTCSTLDMQDMRRRIEAIRGQILSKRLTSPFEDYPEE</u>	60
共有序列 Consensus	mhycvlsafllllhlvtvalslstcstldmqdmrrieargqilskrltspfedypee	
TGFβ 2.SEQ	EEVPPVEISIYNSTRDLLQEKASRRRAACERERSDEEYAKEVYKIDMPSFLPSEIVCFV	120
TGFβ 2-AS1.SEQ	EEVPPVEISIYNSTRDLLQEKASRRRAACERERSDEEYAKEVYKIDMPSFLPSE.....	115
TGFβ 2-AS2.SEQ	EEVPPVEISIYNSTRDLLQEKASRRRAACERERSDEEYAKEVYKIDMPSFLPSE.....	115
共有序列 Consensus	eevppveisiynstrdllqekasrrraaacerererdeeyakevykidmpsflepse	
TGFβ 2.SEQ	VTPSPSGVGLCSRQSQVFCGYLDATPPTFYRPFYFRVRFVSSMEKNASNLVRAEFRVF	180
TGFβ 2-AS1.SEQNAIPPTFYRPFYFRVRFVSSMEKNASNLVRAEFRVF	152
TGFβ 2-AS2.SEQNAIPPTFYRPFYFRVRFVSSMEKNASNLVRAEFRVF	152
共有序列 Consensus	aipptfyrpfrvrvfdvssmeknasnlvraefrvf	
TGFβ 2.SEQ	RLQNPRAVPEQRIELYQILKSRDLTSPTRQRYIDSKVVKTRAECEWLSFDVTDVHVEHLH	240
TGFβ 2-AS1.SEQ	RLQNPRAVPEQRIELYQILKSRDLTSPTRQRYIDSKVVKTRAECEWLSFDVTDVHVEHLH	212
TGFβ 2-AS2.SEQ	RLQNPRAVPEQRIELYQILKSRDLTSPTRQRYIDSKVVKTRAECEWLSFDVTDVHVEHLH	212
共有序列 Consensus	rlqnpkarvpeqrielyqilksrdltsptrqryidskvvkttraeewlsfdvtdavhewlh	
TGFβ 2.SEQ	HKDRNLGFRISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTGSDQRTIKSRK	300
TGFβ 2-AS1.SEQ	HKDRNLGFRISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELARFADLSFNSHTGG..RSVHWLQF	269
TGFβ 2-AS2.SEQ	HKDRNLGFRISLHCPCCTFVPSNNYIIPNKSEELARFAGIDGTSTYTGSDQRTIKSRK	272
共有序列 Consensus	hkdrnlgfkislhpcctfvpsnnyiipnkseelarfagidgtstytgsgdqrtiksrk	
TGFβ 2.SEQ	KNSGKSPHLLMLLFSYFDESSQSNRKKRALDAAYCFRNVQDNCIRPLVDFKRDIGW	360
TGFβ 2-AS1.SEQ	..IALEMCRIIVAYRHFTLSS.....GILGGNGFMSLRGIMPTSVLEHAIICGAGTLL	320
TGFβ 2-AS2.SEQ	KNSGKSPHLLMLLFSYFDESSQSNRKKRALDAAYCFRNVQDNCIRPLVDFKRDIGW	332
共有序列 Consensus1 s r1 1 1	
TGFβ 2.SEQ	KWIHEPKFYNNFCAGACPVLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASAPCCVSDLEPLTILY	420
TGFβ 2-AS1.SEQ	...STVCFSSYIIF.....	331
TGFβ 2-AS2.SEQ	KWIHEPKFYNNFCAGACPVLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASAPCCVSDLEPLTILY	392
共有序列 Consensus	g a	
TGFβ 2.SEQ	YIGKTEPKIEQLSNMIVKSCRC	441
TGFβ 2-AS1.SEQ	331
TGFβ 2-AS2.SEQ	YIGKTEPKIEQLSNMIVKSCRC	413
共有序列 Consensus		

红色下划线表示信号肽序列,绿色下划线表示跨膜区 Red underline indicates signal peptide sequence,green underline indicates TGFβ2 protein transmembrane domains

图 3 绵羊 TGFβ2 及其剪切体氨基酸序列分析

Fig. 3 TGFβ2 and its spliced variant amino acid sequences in sheep

298 位精氨酸亲水性最强(最低分值为-3.622)。

2.3.3 磷酸化与糖基化位点分析 利用 Net-Phos 3.1 Server 软件分析发现,绵羊 TGFβ2 蛋白有 33 个丝氨酸,12 个苏氨酸和 7 个酪氨酸;TGFβ2-AS1 有 22 个丝氨酸,8 个苏氨酸和 7 个酪氨酸;TGFβ2-AS2 有 30 个丝氨酸,10 个苏氨酸和 7 个酪氨酸。根据 NetNGlyc 1.0 Server 分析表明,绵羊 TGFβ2 及其剪切体均有 2 个糖基化位点。

2.3.4 信号肽及蛋白跨膜区分析 运用 SignalP server 4.1 对绵羊 TGFβ2 及其剪切体 TGFβ2-AS1 和 TGFβ2-AS2 进行信号肽分析,结果表明,均有 1 个信号肽区域,位于 1~20 位氨基酸(图 3);同时,利用 TMHMM server 2.0 软件进行跨膜结构域分析,绵羊 TGFβ2 及其剪切体 TGFβ2-AS1 和 TGFβ2-AS2 均为单跨膜蛋白(图 3),即绵羊 TGFβ2 1~4 位氨基酸为胞内部分,5~27 位氨基酸为跨膜螺旋部分,28~442 位氨基酸为胞外部分;绵羊 TGFβ2-AS1 1~4 位氨基酸为胞内部分,5~27 位氨基酸为跨膜螺旋部分,28~331

位氨基酸为胞外部分;绵羊 TGFβ2-AS2 1~4 位氨基酸为胞内部分,5~27 位氨基酸为跨膜螺旋部分,28~414 位氨基酸为胞外部分。

2.3.5 亚细胞定位 根据 PSORT II Prediction 预测分析发现,绵羊 TGFβ2 和 TGFβ2-AS2 在细胞中的定位结果是一致的,主要在胞外(44.4%)和细胞核(44.4%)中发挥作用,其余在线粒体中(11.1%)发挥作用,TGFβ2-AS1 主要在胞外(44.4%)发挥作用,少量作用于细胞质(22.2%)、线粒体(22.2%)和细胞核(11.1%)。

2.3.6 蛋白高级结构预测 绵羊 TGFβ2 及其剪切体 TGFβ2-AS1 和 TGFβ2-AS2 蛋白均由 α-螺旋、延伸、β-折叠和无规则卷曲 4 种结构组成,其中绵羊 TGFβ2 各种结构所占比例分别为 38.69%、16.74%、8.14%和 36.43%,TGFβ2-AS1 为 46.22%、16.62%、7.25%和 29.91%,TGFβ2-AS2 为 39.13%、16.43%、8.70%和 35.75%,其中 α-螺旋主要分布在位于细胞内的氨基酸两端。此外,蛋白三级结构分析发现(图 5),绵羊 TGFβ2 及其剪切体均存在 α-螺旋、β-折叠和

disordred 区域,其中绵羊 *TGFβ2* 蛋白存在 7 个 α -螺旋区和 15 个 β -折叠区, *TGFβ2*-AS1 蛋白存

在 5 个 α -螺旋区和 13 个 β -折叠区, *TGFβ2*-AS2 蛋白存在 6 个 α -螺旋区和 16 个 β -折叠区。

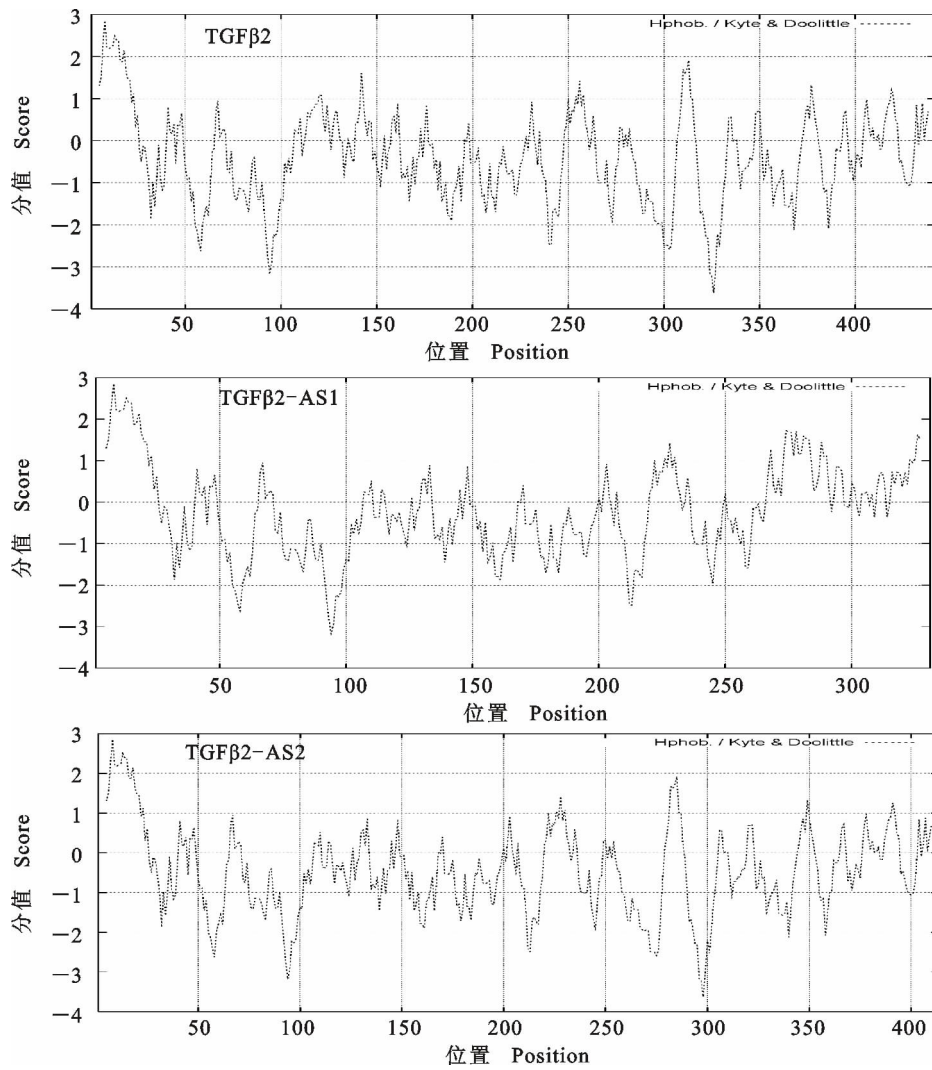


图 4 绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体蛋白亲水性分析

Fig. 4 Analysis of hydrophobicity sheep *TGFβ2* and its spliced variant protein

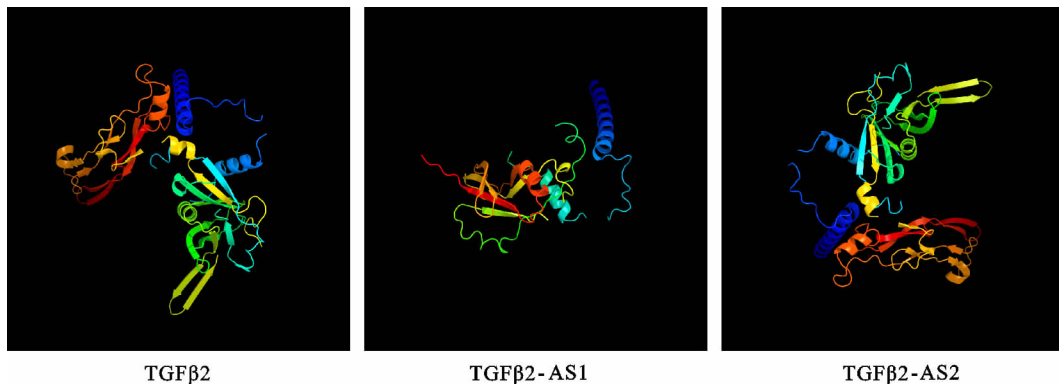


图 5 绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体蛋白三级结构预测

Fig. 5 Prediction of tertiary structure of sheep *TGFβ2* and its spliced variant protein

2.4 绵羊 TGFβ2 蛋白同源性分析

从 NCBI 数据库下载人类、小鼠、大鼠、牛、鸡、狗、猪和斑马鱼 8 个物种的 *TGFβ2* 基因编码蛋白序列,采用 MegAlign 6.0 软件进行蛋白同源性分析,结果发现,绵羊 *TGFβ2* 基因编码蛋白与上述物种具有较高的同源性,绵羊 *TGFβ2* 氨基酸序列与人类、小鼠、大鼠、牛、鸡、狗、猪和斑马鱼的

同源性分别为 98.42%、90.27%、95.02%、92.85%、83.48%、94.51%、94.81% 和 67.80%。同时, *TGFβ2* 编码蛋白的系统进化树分析发现,绵羊与人类在系统进化树中的距离最近,与斑马鱼的距离最远(图 6),提示绵羊 *TGFβ2* 基因可能与人类具有相似的分子进化模式,可能具有相似的分子功能。

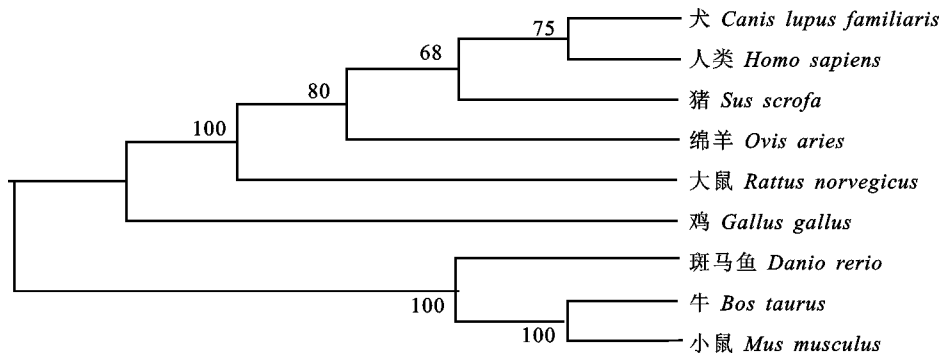


图 6 9 个物种 TGFβ2 蛋白系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree constructed for TGFβ2 protein of 9 species

3 讨论

绵羊毛囊的发育始于胚胎形成时期,与毛囊发育相关的功能基因调控羊毛的形态学发生和毛品质性状的形成^[22-26]。*TGFβ2* 基因在毛囊生长发育和周期调控过程中具有重要作用,是调控毛囊形成、基板向下生长和毛品质性状的重要候选功能基因^[16,27-28],然而,目前该基因对绵羊毛囊发育和周期性调控的分子功能鲜有报道,完整的绵羊 *TGFβ2* 基因编码区全长序列目前仍尚未获得。本试验利用 RT-PCR 法首次克隆获得绵羊 *TGFβ2* 基因及其剪切体 TGFβ2-AS1 和 TGFβ2-AS2 的全长 CDS, *TGFβ2* 基因 CDS 全长 1 329 bp,其剪切体 TGFβ2-AS1 和 TGFβ2-AS2 分别缺失 333 和 84 个核苷酸, CDS 全长分别为 996 和 1 245 bp。绵羊 *TGFβ2* 基因与毛囊周期性转导和毛囊真皮乳头细胞凝集性发生的密切关系^[29-30],使人们日益重视该基因在绵羊毛囊生长发育过程中的作用,但目前针对 *TGFβ2* 基因及其可变剪切体调控绵羊毛囊发育的分子机制研究尚未开展,同时,虽然 NCBI 数据库中有人类和小鼠 *TGFβ2* 基因的一个可变剪接形式,但其对生物体生长发育的作用机制尚未阐明, *TGFβ2* 及其可变剪切体的作用机制仍有待于深入分析。

可变剪切是导致蛋白质功能多样性的重要原

因,其在调控毛囊生长发育过程中具有重要作用。已有研究表明,FGF5 及其剪切体在毛囊真皮乳头细胞中相互拮抗调控毛囊生长发育和周期性转导过程^[31],同时,角蛋白相关蛋白及其剪切体在调控细羊毛品质性状形成过程中也发挥重要作用^[32-33]。由此可知,基因可变剪切的发生能够直接影响基因的功能和作用方式,它们在调控毛囊的生长发育过程中发挥重要功能。本试验首次克隆获得绵羊 *TGFβ2* 基因及其剪切体编码区全长序列,但目前 *TGFβ2* 基因及其剪切体在绵羊毛囊生长发育和毛囊周期发生过程中的生物学功能仍知之甚少,在本研究的基础上深入开展 *TGFβ2* 基因及其剪切体在毛囊类细胞中的表达规律、分子功能和信号网络调控等方面的研究将为阐明毛囊生长发育的分子调控机制奠定理论基础。

绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体 TGFβ2-AS1 和 TGFβ2-AS2 蛋白分别编码 442、331 和 414 个氨基酸,均属于 I 型跨膜蛋白,蛋白结构预测结果表明, *TGFβ2* 及其剪切体蛋白均含有 1 个信号肽区域和 1 个跨膜结构区域。说明 *TGFβ2* 及其剪切体 TGFβ2-AS1 和 TGFβ2-AS2 蛋白是分泌性蛋白,在行使信号功能过程中发挥重要作用;另一方面,该蛋白的单跨膜结构为配体特异性结合相关受体提供分子基础。蛋白二级结构预测表明,绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体蛋白均由 α-螺旋、延伸、β-

折叠和无规则卷曲 4 种结构组成,但这 4 种结构所占比例各不相同,已有研究发现, *TGFβ2* 氨基酸序列中 6 个高度保守的半胱氨酸(Cys)能够通过链内的二硫键连接 β 片层结构形成一个半胱氨酸结,其在受体与配体的识别和作用方式上具有重要作用^[34],由此推测 *TGFβ2* 及其剪切体 β 片层结构上存在的差异可能影响 *TGFβ2* 及其剪切体与受体的作用方式,从而在生物体内行使不同的生物学功能。同时,蛋白三级结构预测发现,绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体蛋白空间结构比例亦存在差异,表明空间构想的变化可能与蛋白功能的多样性密切相关。此外,绵羊 *TGFβ2* 蛋白序列与人类、小鼠、大鼠、牛、猪和狗等哺乳动物具有较高的同源性,表明 *TGFβ2* 基因可能是由同一个祖先基因遗传进化而来。其中,绵羊 *TGFβ2* 编码的氨基酸序列与人类的序列相似性极高(98.42%),这与系统进化树的结果相一致,推测绵羊 *TGFβ2* 基因可能存在与人类 *TGFβ2* 基因相似的生物学功能。本试验对绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体蛋白信号肽、跨膜结构和蛋白二、三级结构的预测分析为进一步阐明其在毛囊生长和毛品质形成中的分子调控机制提供研究基础。

4 结 论

本试验首次克隆获得绵羊 *TGFβ2* 及其剪切体 *TGFβ2*-AS1 和 *TGFβ2*-AS2 的 CDS,序列分析发现 *TGFβ2* 基因 CDS 在物种间存在高度保守性。对 *TGFβ2* 及其剪切体蛋白理化性质、跨膜结构、信号肽以及蛋白高级结构进行预测分析,为进一步研究 *TGFβ2* 在绵羊毛囊发育和毛品质性状形成中的作用机制提供理论基础。

参考文献 Reference:

- [1] ADELSON D L, CAM G R, DESILVA U, *et al.* Gene expression in sheep skin and wool (hair)[J]. *Genomics*, 2004, 83(1):95-105.
- [2] BLENOWE B J. Alternative splicing: new insights from global analyses[J]. *Cell*, 2006, 126(1):37-47.
- [3] MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7):621-628.
- [4] NILSEN T W, GRAVELEY B R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing[J]. *Nature*, 2010, 463(7280):457-463.
- [5] LUCO R F, ALLO M, SCHOR I E, *et al.* Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing[J]. *Cell*, 2011, 144(1):16-26.
- [6] MAKAROV E M, SHTAM T A, KOVALEV R A, *et al.* The rare nonsense mutation in p53 triggers alternative splicing to produce a protein capable of inducing apoptosis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0185126.
- [7] LABBE P, FAURE E, LECOINTE S, *et al.* The alternatively spliced LRRFIP1 Isoform-1 is a key regulator of the Wnt/beta-catenin transcription pathway[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2017, 1864(7):1142-1152.
- [8] ITO C, SAITOH Y, FUJITA Y, *et al.* Decapeptide with fibroblast growth factor (FGF)-5 partial sequence inhibits hair growth suppressing activity of FGF-5[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2003, 197(2):272-283.
- [9] SALZMAN G S, ACKERMAN S D, DING C, *et al.* Structural basis for regulation of GPR56/ADGRG1 by its alternatively spliced extracellular domains[J]. *Neuron*, 2016, 91(6):1292-1304.
- [10] MATZA D, BADOU A, KLEMIC K G, *et al.* T cell receptor mediated calcium entry requires alternatively spliced cav1.1 channels[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0147379.
- [11] RENGASAMY M, ZHANG F, VASHISHT A, *et al.* The PRMT5/WDR77 complex regulates alternative splicing through ZNF326 in breast cancer[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(19):11106-11120.
- [12] CHUONG C M, WIDELITZ R B, TING-BERRETH S, *et al.* Early events during avian skin appendage regeneration: dependence on epithelial-mesenchymal interaction and order of molecular reappearance[J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1996, 107(4):639-646.
- [13] SOMA T, OGO M, SUZUKI J, *et al.* Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles in vivo and in vitro[J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1998, 111(6):948-954.
- [14] SOMA T, TSUJI Y, HIBINO T. Involvement of transforming growth factor-beta2 in catagen induction during the human hair cycle[J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 118(6):993-997.
- [15] TSUJI Y, DENDA S, SOMA T, *et al.* A potential suppressor of TGF-beta delays catagen progression in hair follicles[J]. *The Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2003, 8(1):65-68.
- [16] HIBINO T, NISHIYAMA T. Role of TGF-beta2 in the human hair cycle[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2004, 35(1):9-18.
- [17] PORRAS-RETES B H, KSANDER G, WEEKS P M. Occurrence and localization of transforming growth factor-beta (TGF-beta 1, beta 2) during rabbit skin development[J]. *Connective Tissue Research*, 1993, 29(3):203-212.
- [18] FOITZIK K, PAUS R, DOETSCHMAN T, *et al.* The TGF-beta2 isoform is both a required and sufficient induc-

- er of murine hair follicle morphogenesis[J]. *Developmental Biology*, 1999, 212(2): 278-289.
- [19] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 1999, 112: 531-552.
- [20] MOLLER S, CRONING M D, APWEILER R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions [J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2001, 17(7): 646-653.
- [21] TYAGI N, SRINIVASAN N. Recognition of nontrivial remote homology relationships involving proteins of *Helicobacter pylori*: implications for function recognition [J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 2013, 993: 155-175.
- [22] ROGERS G E. Biology of the wool follicle: an excursion into a unique tissue interaction system waiting to be re-discovered [J]. *Experimental Dermatology*, 2006, 15(12): 931-949.
- [23] PLOWMAN J E, HARLAND D P, GANESHAN S, *et al.* The proteomics of wool fibre morphogenesis [J]. *Journal of Structural Biology*, 2015, 191(3): 341-351.
- [24] SCHNEIDER M R, SCHMIDT-ULLRICH R, PAUS R. The hair follicle as a dynamic miniorgan [J]. *Current Biology*, 2009, 19(3): 132-142.
- [25] 奈日乐, 高丽霞, 刘志红, 等. 内蒙古阿尔巴斯绒山羊角蛋白 5 在毛囊生长周期中的表达 [J]. *西北农业学报*, 2015, 24(6): 16-20.
- NAI R L, GAO L X, LIU ZH H, *et al.* Expression of keratin 5 in hair follicle growth cycle of inner mongolia cashmere goat [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2015, 24(6): 16-20.
- [26] 陈 磊, 贺三刚, 刘书东, 等. 绵羊 EDAR 基因的克隆、序列分析及其在毛囊发育过程中的表达 [J]. *西北农业学报*, 2017, 26(10): 1415-1421.
- CHEN L, HE S G, LIU SH D, *et al.* Cloning, sequencing and quantitative expression of EDAR gene in sheep during hair follicle development period [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2017, 26(10): 1415-1421.
- [27] TOMANN P, PAUS R, MILLAR S E, *et al.* Lhx2 is a direct NF-kappaB target gene that promotes primary hair follicle placode down-growth [J]. *Development*, 2016, 143(9): 1512-1522.
- [28] INOUE K, AOI N, YAMAUCHI Y, *et al.* TGF-beta is specifically expressed in human dermal papilla cells and modulates hair folliculogenesis [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2009, 13(11/12): 4643-4656.
- [29] HIBINO T, NISHIYAMA. Role of TGF-beta2 in the human hair cycle [J]. *Journal of Dermatological Science*, 2004, 35(1): 9-18.
- [30] SARI A R, RUFAUT N W, JONES L N, *et al.* Characterization of ovine dermal papilla cell aggregation [J]. *International Journal of Trichology*, 2016, 8(3): 121-129.
- [31] HE X, CHAO Y, ZHOU G, *et al.* Fibroblast growth factor 5-short (FGF5s) inhibits the activity of FGF5 in primary and secondary hair follicle dermal papilla cells of cashmere goats [J]. *Gene*, 2016, 575(2 Pt 2): 393-398.
- [32] ZHOU H, GONG H, LI S, *et al.* A 57-bp deletion in the ovine KAP6-1 gene affects wool fibre diameter [J]. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2015, 132(4): 301-307.
- [33] GANDOLFI B, ALHADDAD H, JOSLIN S E, *et al.* A splice variant in KRT71 is associated with curly coat phenotype of Selkirk Rex cats [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2000.
- [34] XIAO Y T, XIANG L X, SHAO J Z. Bone morphogenetic protein [J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2007, 362(3): 550-553.

Cloning and Bioinformatic Analysis of *TGFβ2* and Its Spliced Variant

CHEN Lei¹, NI Wenhao¹, LI Wenwen², LI Xinyi² and LI Wenrong¹

(1. Biotechnology Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Science, Livestock Breeding and Biotechnology Laboratory of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China; 2. No. 2 Middle School of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi 830000, China)

Abstract The objective of this study is to reveal the biological property of *TGFβ2* gene in sheep and to provide the theoretical data for application by cloning *TGFβ2* coding region sequence (CDS) and analyze its sequence as well as genetic features. The CDS of sheep *TGFβ2* was cloned using RT-PCR technique, and then, its genetic characteristics were analyzed by bioinformatics methods. The results showed that the encoding sequence of sheep *TGFβ2* gene was 1 329 bp, encoding 442 amino acids; due to partial deletion of sequences, the variant spliced *TGFβ2*-AS1 and *TGFβ2*-AS2 encoding respectively

encoded 331 and 414 amino acids. Sheep *TGF β 2* and variable isoform TGF β 2-AS1 and TGF β 2-AS2 protein isoelectric point were 8.74, 7.60 and 8.82 respectively, which had a signal peptide and a transmembrane domain and contained alpha helix, beta - fold, extension and random curl; the analysis of sequence homology found that the nucleotide and amino acid sequence of sheep *TGF β 2* CDS had higher homology with other mammals, the phylogenetic tree analysis indicated the sheep TGF β 2 was closely related to human, but distantly related to the zebrafish; cell location analysis showed that TGF β 2 and its variable shear body structure played a biological role in extracellular matrix, and regulate downstream target gene expression. This research obtained the *TGF β 2* and its spliced variant TGF β 2-AS1 and TGF β 2-AS2 of complete encod region sequence. However, compared with TGF β 2 transcript, 111 and 28 amino acid sequences were missing from TGF β 2-AS1 and TGF β 2-AS2, respectively, which it probably involved in different physiological functions.

Key words Sheep; *TGF β 2* ; Cloning; Coding region; Bioinformatics

Received 2017-12-21

Returned 2018-02-23

Foundation item Key Laboratory Open Projection Xinjiang(No. 2017D04028); Innovative Development Project of Scientific Research Institutions in Xinjiang(No. 2016D04001); National International Cooperation Project(No. 2014DFA30970).

First author CHEN Lei, male, Ph. D, assistant research fellow. Research area: sheep breeding. E-mail: chenlei0991@126.com

Corresponding author LI Wenrong, female, Ph. D, research fellow. Research area: sheep breeding. E-mail: xjlwr@126.com

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)