

绵羊胎盘生长因子基因可变剪切 异构体克隆与表达分析

张立春¹ 李梦姝^{1,2} 柳俭强¹ 云巾宴³ 曹 阳¹ 朴庆林¹ 金海国¹

(1. 吉林省农业科学院 畜牧分院, 吉林 公主岭 136100; 2. 黑龙江省农业科学院 畜牧兽医分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161005; 3. 吉林农业科技学院 动物科技学院, 吉林 左家 132101)

摘 要 为克隆绵羊胎盘生长因子(Placental growth factor, PGF)基因,并分析该基因在绵羊组织器官中的表达模式,本研究首先利用 RT-PCR(Reverse Transcript Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)方法从小尾寒羊与新吉细毛羊皮肤组织克隆出 PGF 基因 mRNA 片段,随后利用可变剪切(alternative splicing, AS)鉴别引物和 qRT-PCR(Quantity reverse transcript polymerase chain reaction, qRT-PCR)方法对不同组织器官 PGF 基因 AS 及其表达模式进行分析.以两个品种绵羊皮肤组织 cDNA 为模板,RT-PCR 扩增显示存在 2 条特异性扩增片段,克隆测序结果发现片段长度依次为 1339 bp 和 1276 bp,分析发现 1276 bp 片段是由于主转录本第 7 外显子缺失产生,为编码羧基末端缺失 21 个氨基酸的 PGF 蛋白突变体.该突变体并未引起血小板源生长因子(Platelet derived growth factor, PDGF)结构域改变,可能通过改变 PDGF 结构域下游单位酶切位点来影响 PGF 分子的成熟.PGF 基因 AS 检测及 qRT-PCR 结果发现小尾寒羊与新吉细毛羊不同组织器官 PGF 基因可变剪切突变体组织分布及其表达模式存在明显差异.本研究证明绵羊皮肤组织中表达 PGF 基因且存在 AS 现象,为进一步研究 PGF 基因在绵羊毛囊发育及毛用性状形成中的作用奠定了基础.

关键词 胎盘生长因子基因;新吉细毛羊;小尾寒羊;基因表达;可变剪切

中图分类号 Q953

文献标识码 A

胎盘生长因子(Placental growth factor, PGF)是一种肝素结合酸性蛋白,在体内可由多种间质细胞合成、分泌,以无活性的前体形式分泌出来,在蛋白水解酶作用下,由 1 条 69kD 的 α 链和 34kD 的 β 链通过二硫键连接形成二聚体^[1]. PGF 属于血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)家族成员,具有促进滋养细胞增殖和诱导血管生成等作用,同时还可诱导内皮细胞增殖、迁移,抗内皮细胞凋亡,并能增加血管的通透性,增强低浓度 VEGF 生物学活性等多种功能^[2]. 研究表明 PGF 基因与 VEGF-A 基因相类似,可通过 AS 产生不同的可变剪切突变体,PGF 基因 7 个外显子可通过不同 AS 方式产生 3 种可变剪切突变体^[3-5]. 来源于 PGF 基因和 VEGF-A 基因的不同可变剪切突变体可随意组成同源或异源二聚体并具有体外促细胞增殖活性,证实 PGF 与 VEGF-A 功能具有相似性. 课题组前期相继在绵羊皮肤组织中克隆出 VEGF 家族 A, B, C 和 D 基因 mRNA 并证实大部分 VEGF 基因家族成员存在 AS 的现象^[6-8], 研究表明 VEGF 家族与毛发生长存在密切关系. 但迄今为止除在绵羊胎盘组织证实绵羊 PGF 基因表达的报道外^[9], 其他组织 PGF 表达及功能尚不清晰. 为揭示绵羊 PGF 在皮肤组织中的表达,以小尾寒羊与新吉细毛羊为研究对象,成功地从绵羊皮肤组织中克隆出 PGF 基因 mRNA 并证实该基因在绵羊皮肤组织中存在 AS 现象,为进一步了解绵羊 PGF 基因在皮肤组织,尤其在毛囊生长发育中的功能提供有利条件.

收稿日期:2019-03-07

基金项目:国家“863”项目(2013AA102506);吉林省人才开发资金资助

通讯作者:张立春,男,汉族,博士,副研究员,研究方向:动物生物技术, E-mail:zhanglich@163.com.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RNAlater 购置于 QIAGEN 公司、Trizol 购自于 Invitrogen 公司;pMD18-T 载体、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Agarose Gel DNA Purification Kit 和 Ex Taq 酶均购自大连 Ta KaRa 公司;大肠杆菌工程菌 DH5 α 感受态细胞购自鼎国生物。

1.2 实验样品采集

本实验动物为新吉细毛羊与小尾寒羊,实验群体与实验样品与之前的研究相同^[6]。

1.3 引物设计与合成

目前 GenBank 数据库中存在部分 PGF 基因 mRNA 数据信息(Gene ID: AY157708.1)和预测 AS 序列(Gene ID: XM-012111629.2, XM-012111630.2 和 XM-012182055.2),本实验首先通过 DNASTAR 软件包 MegAlign 软件对已知序列进行同源比对,选取公共保守序列设计克隆引物,再以所克隆到的基因序列设计 AS 鉴定与表达量检测引物(表 1),表达量检测引物检测区域为不同剪切体共同保守区,即一次定量 PCR 反应检测数值为两个类型 PGF 基因的共同表达量,引物合成委托北京华大基因生物公司完成。

表 1 引物序列及扩增条件

引物名称 Primer Name	序列 Sequences(5'-3')	产物 Product/bp	退火温度 Annealing Temperature / $^{\circ}$ C
sPGF-C	F: GGGGCCTCCAGAATCTCC R: GCAGCTCGCTCCATGTCCA	1345	60
sPGF-Vt	F: AGCTTCTCTCAGCACGTCC R: CTCACGTTCTGTTTAAGGCACT	Full:336 Short:247	60
sPGF-Q	F: TGCAGCGATGAGACAATG R: TCCAGAGAGTGGTACTTTCAT	80	60
sGAPDH	F: TCCACGGCACAGTCAAGG R: CACGCCATCACAAACAT	228	60

1.4 皮肤总 RNA 提取与 cDNA 一链合成

皮肤毛囊组织总 RNA 提取参照文献描述进行^[7]。琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性,紫外分光光度计检测其纯度与浓度,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。cDNA 第一链合成反应参照 PrimeScript 反转录试剂盒进行,具体步骤按说明书进行。

1.5 RT-PCR 与基因克隆

RT-PCR 扩增反应体系为:ddH₂O 16.8 μ L,10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,2.5 mmol/L,dNTP Mix 2.5 μ L,10 μ mol/L 引物 F 1 μ L,10 μ mol/L,引物 R 1 μ L,0.5U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L,cDNA 模板 1 μ L。PCR 扩增程序为预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 60 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 1.5 min,共计 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸,反应结束后 12 $^{\circ}$ C 恒温保存。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测进行胶回收,pMD18-T 载体连接及 DH5 α 感受态细胞转化,菌落 PCR 鉴定后阳性克隆送生物公司测序。

1.6 测序结果进行生物信息学分析

测序结果首先用 DNASTAR7.0 软件包 Seqmen 进行序列拼接,拼接序列利用 BlastN 在 GenBank 数据库进行序列比对。核酸及氨基酸多序列比对采用 DNAMAN9.0 软件进行。AS 分析主要将所获得的序列与绵羊基因组数据比对,并参照比对结果绘制 AS 模式图^[10]。蛋白序列功能结构域分析采用 SMART 在线数据库分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)。蛋白氨基酸序列酶切位点分析采用 PeptideCutter 进行(<https://web.expasy.org/peptide-cutter/>)。

1.7 不同组织器官 PGF 可变剪切体分布与表达谱分析

不同组织器官 PGF 可变剪切体分布检验采用可变剪切体检测引物(表 1),以不同绵羊组织器官 cDNA 为模板,采用 RT-PCR 方法检验不同组织器官中可变剪切体分布情况。不同组织器官表达谱分析则在保守

否存在显著性. 结果发现 PGF 基因在不同组织器官中的相对表达与 AS 检测结果相似, 在小尾寒羊脑组织中 PGF 基因表达量高于新吉细毛羊且具有统计学意义 ($p < 0.01$), 而新吉细毛羊 PGF 基因则在心脏和肺脏中相对表达量高于小尾寒羊, 尽管表达量没有在脑组织中表现的那么极端, 但同样具有统计学意义 ($p < 0.01$). 其他组织则不同程度地呈现出较皮肤组织低表达的趋势.

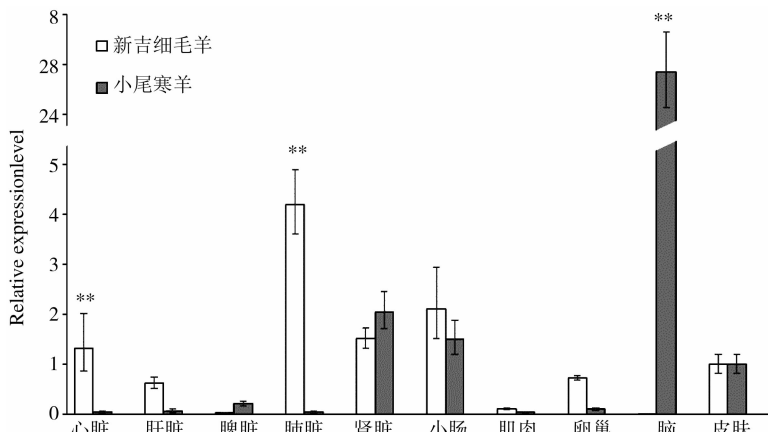


图 8 绵羊不同组织器官 VEGF-B 基因相对表达分析 (** : $p < 0.01$)

3 讨论

VEGF 基因家族成员众多, 包括 A, B, C, D, E 和 PGF 等^[12]. 其中大部分成员均通过基因 AS 产生不同长度的突变体, 使得 VEGF 家族更为复杂^[13]. 课题组前期研究发现在绵羊皮肤组织中存在 VEGF 家族 A, B, C 和 D 基因表达且除 VEGF-D 基因外均存在不同类型 AS 体^[6,7]. 为验证 PGF 是否在皮肤组织中表达, 本文通过克隆绵羊 PGF 基因 mRNA, 证实 PGF 基因在在绵羊皮肤组织中表达, 并鉴定出存在 AS 体及其多组织器官表达特性. 本试验为系统性研究绵羊 VEGF 家族功能, 尤其与毛囊生长发育的关系奠定了基础.

迄今为止除基因预测的序列外, 绵羊中尚未有完整 PGF 基因序列信息的实验报道, 在非胎盘组织中克隆出 PGF 基因更未有报道^[9]. 课题组在皮肤组织中已成功克隆到 VEGF 家族 A, B, C 和 D 基因, 提示 VEGF 家族基因活性激活对维持绵羊皮肤组织功能是不可或缺的. 已有相关证据表明 PGF 在皮肤组织中表达并参与组织损伤修复过程^[14]. 基于此本试验通过 RT-PCR 方法对小尾寒羊与新吉细毛羊皮肤组织进行扩增, 电泳结果显示尽管存在非特异性扩增条带, 但目标条带则更加明显(图 1), 说明 PGF 基因在正常绵羊皮肤组织中存在 mRNA 的表达. 由于 VEGF 家族基因 AS 现象比较普遍^[15], 课题组在绵羊皮肤组织中发现 VEGF-A, B 和 C 基因也存在数量不等的 AS 突变体(VEGF-B 数据待发表)^[7], 凝胶电泳结果(图 1)和克隆测序结果同样证实绵羊皮肤组织中 PGF 基因存在 AS 现象, 该可变剪切体缺失部位恰好为 PGF 基因 Exon6, 且并未造成氨基酸移码突变, 仅仅缺失 PDGF 下游部分 21 个氨基酸(图 3, 4), 因此推测该突变体并未丧失成熟体 PGF 分子功能, 且可能通过改变前体肽蛋白酶切位点及酶切过程来调节 PGF 分子的成熟(图 6). 该突变类型在人类中已有相关报道, 但编码蛋白氨基酸长度存在差异. 与人类中 3 种可变剪切突变体所不同的是, 本试验中仅发现 1 种可变剪切突变体. 提示绵羊皮肤中 PGF 基因 AS 类型存在一定差异.

PGF 基因最早发现于人胎盘组织中, 主要参与胎盘组织的发育, 迄今为止研究发现 PGF 参与胚胎发育, 肿瘤发育与转移, 下肢缺血及伤口修复等病理生理过程, 提示 PGF 组织分布广泛性及分子功能的多样性^[16]. 为进一步探讨绵羊 PGF 组织器官的表达分布, 首先采用 AS 鉴定引物对不同组织器官 PGF 表达模式进行检测, 结果发现 PGF 可变剪切体在绵羊不同组织器官存在较大差异, 其中在新吉细毛羊和小尾寒羊肝脏, 脾脏和卵巢组织中完全检测不到基因表达(图 5), qRT-PCR 检测也发现在上述组织中 PGF 基因 ct 值接近或大于 35, 这种情况基本默认为该组织不表达此基因. 人 PGF 则特异性的在胎盘组织和甲状腺组织高表达^[17], 但在成年小鼠体内除胎盘组织外, 还在生殖器脂肪垫中高表达^[18], 新吉细毛羊和小尾寒羊不同组织 AS 及定量分析得到相类似的结果(图 6, 7), 说明不同物种 PGF 基因表达模式存在差异. 事实上, 本试验结果与采用 RNA-seq 技术得到的绵羊组织器官 PGF 基因表达分布结果仍存在较大差异^[19], 究其原因可能

是品种或个体间差异所致。由于本试验中所检测的样本并未涉及绵羊胎盘组织,尚不能判定绵羊胎盘组织的表达模式,但鉴于 PGF 功能的保守性,不难推测在绵羊胎盘组织 PGF 基因活性状态。综合 VEGF 家族基因在绵羊皮肤组织表达,说明 VEGF 基因家族各成员在绵羊皮肤组织中均处于功能激活的状态,VEGF 家族各基因在皮肤组织中的功能活性,尤其是对毛用性状是否存在潜在影响是作者重点关注的目标,也是未来进一步研究的重点。

4 结论

本研究成功克隆了绵羊 PGF 基因,并检测到该基因存在一种类型的剪切突变体。突变体并未产生氨基酸序列移码突变,也未破坏 PDGF 功能结构域,推测其通过改变 PDGF 结构域下游蛋白酶切位点来影响 PGF 蛋白加工。新吉细毛羊和小尾寒羊不同组织器官表达分布发现两种类型 PGF 基因具有多组织器官表达特性。qRT-PCR 检测还证明新吉细毛羊和小尾寒羊不同组织器官 PGF 基因表达模式存在较大差异。证实 PGF 除参与胎盘组织发育外,还可能参与其他组织器官生理过程。

参 考 文 献

- [1] Iyer S, Leonidas D D, Swaminathan G J, et al. The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(15): 12153-12161.
- [2] De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2012, 44(1): 1-9.
- [3] Hauser S, Weich H A. A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta[J]. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 1993, 9(4): 259-268.
- [4] Cao Y, Ji W R, Qi P, et al. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 235(3): 493-498.
- [5] Yang W, Ahn H, Hinrichs M, et al. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells[J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 2003, 60(1): 53-60.
- [6] 张立春, 马惠海, 曹阳, 等. 绵羊血管内皮生长因子 D 基因克隆与表达分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016, 11: 1-6+11.
- [7] 张立春, 李梦姝, 曹阳, 等. 绵羊 VEGF-C 基因可变剪切体克隆与序列分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2018, 54(04): 89-92.
- [8] 张立春, 李梦姝, 柳俭强, 等. 绵羊皮肤组织 VEGF-A 基因可变剪切体存在的证实与鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2019(11): 20-24.
- [9] Regnault T R H, Orbus R J, De Vrijer B, et al. Placental expression of VEGF, PlGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR)[J]. *Placenta*, 2002, 23(2-3): 132-144.
- [10] Liu J, Sun Y, Yang C, et al. Functional SNPs of INCENP Affect semen quality by alternative splicing mode and binding affinity with the target Bta-miR-378 in Chinese holstein bulls[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(9): 101-110.
- [11] Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14[J]. *Oncogene*, 1993, 8(4): 925-931.
- [12] Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttua S. Biology of vascular endothelial growth factors[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(12): 2879-2887.
- [13] Tarallo V, De Falco S. The vascular endothelial growth factors and receptors family: up to now the only target for anti-angiogenesis therapy[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015, 64: 185-189.
- [14] Odorisio T, Cianfarani F, Failla C M, et al. The placenta growth factor in skin angiogenesis[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2006, 41(1): 11-19.
- [15] Biselli-Chicote P M, Oliveira A R C P, Pavarino E C, et al. VEGF gene alternative splicing: pro-and anti-angiogenic isoforms in cancer[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2012, 138(3): 363-370.
- [16] Kay V R, Tayade C, Carmeliet P, et al. Influences of placental growth factor on mouse retinal vascular development[J]. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 2017, 246(9): 700-712.
- [17] Fagerberg L, Hallström B M, Oksvold P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, MCP, 2014, 13(2): 397-406.
- [18] Yue F, Cheng Y, Breschi A, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome[J]. *Nature*, 2014, 515(7527): 355-364.
- [19] Jiang Y, Xie M, Chen W, et al. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism[J]. *Science (New York)*, 2014, 344(6188): 1168-1173.

The Cloning and Expression Pattern Analysis of Alternative Splicing Isoforms of Placental Growth Factor Gene from Sheep

ZHANG Li-chun¹ LI Meng-shu^{1,2} LIU Jian-qiang¹ YUN Jin-yan³
CAO Yang¹ PIAO Qing-lin¹ JIN Hai-guo¹

(1. Branch of Animal Husbandry, Jilin Academy of Agricultural Science, Gongzhuling 136100, China; 2. Branch of Animal Husbandry and Veterinary, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihaer 161005, China; 3. School of Animal Technology, Jilin Agricultural Science and Technology University, Zuoqia 132101, China)

Abstract In order to clone the placental growth factor (PGF) gene and explore the expression pattern in different organs of sheep. In the present study, the PGF mRNAs were cloned by RT-PCR from skin cDNAs in both Small-tail Han sheep (STH) and Xin-ji Fine Wool sheep (XJ). The alternative splicing (AS) isoforms were verified by specific primers, and total PGF mRNA expression level was tested by qRT-PCR in different organs in both STH and XJ respectively by conserved region primers. The RT-PCR showed there were two specific amplicons when the skin cDNAs were template, and they were identified as PGF mRNA with a length of 1339 bp and 1276 bp respectively. The 1276 bp isoform was produced by AS proceeded by deleting the Exon 7 and coding a novel PGF protein with 21 amino acids deletion in C end. However, the deletion mutant didn't destroy the PDGF (Platelet derived growth factor, PDGF) domain and might to affect the mature of PGF protein by changing the protein enzyme site close to the PDGF domain. The AS isoforms and total mRNA expression measurement results showed that there were remarkable distinct both on AS isoforms and mRNA expression between STH and XJ sheep. In conclusion, this study approved the existence of PGF and its AS isoform in sheep skin and it had different expression pattern among organs between STH and XJ sheep. These data provide an opportunity to explore the PGF function on hair follicle development and wool traits.

Key words PGF; Xinji fine wool sheep; Small-tail Han Sheep; gene cloning; alternative splicing