

猪 SOCS-2 基因 cDNA 全长序列的克隆与组织表达

杜宝文,杨公社,孙 超

(西北农林科技大学 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 根据 Genbank 已登录的细胞因子信号转导抑制因子(SOCS-2)基因序列同源区设计 1 对引物,从 8 月龄健康雄性八眉猪肾脏组织中提取总 RNA,利用 RT-PCR 技术扩增猪 SOCS-2 基因;用 CLUSTAL W 软件进行同源性分析,利用半定量(Semi-quantitative, SQ) RT-PCR 技术检测八眉猪各组织中 SOCS-2 mRNA 的表达量。结果表明,猪 SOCS-2 基因 cDNA 全长克隆成功(Genbank 登录号为 EF121242);家猪 SOCS-2 基因与澳洲野猪、人、小鼠、大鼠 SOCS-2 核苷酸同源性分别为 99%,94%,91%,89%,SOCS-2 蛋白氨基酸序列同源性分别达到 100%,95%,94%,93%;SOCS-2 基因在心脏、肺、皮下脂肪组织、腹部脂肪组织、肝脏、脾、肾脏和肌肉组织中广泛表达,其中肾脏组织中最高,心脏次之,肌肉组织中表达量最低。表明猪 SOCS-2 序列保守性较高,在体内可能具有多种功能。

[关键词] SOCS-2;猪;SQ RT-PCR;组织表达;

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)10-0039-05

Full cDNA cloning and tissue distribution of SOCS-2 gene in pig

DU Bao-wen, YANG Gong-she, SUN Chao

(Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: SOCS-2 was very important to growth and development of organism and growth hormone signaling. A pair of primers were designed according to the homology region of SOCS-2 among other species. Total RNA was isolated from kidney of Bamei pig, a local strain of Chinese pig, and the complete cDNA sequence of SOCS-2 gene was cloned by RT-PCR technology firstly (Genbank accepted number is EF121242). Thereafter, the distribution of SOCS-2 mRNA in Bamei pig was analyzed by SQ-RT PCR. Compared with others, the homology of SOCS-2 to *Sus scrofa*, human, mouse and rat was 99%, 94%, 91% and 89%, respectively, but the homology of protein reached 100%, 95%, 94% and 93%, respectively. And the data showed that the SOCS-2 could be detected in many tissues extensively, such as heart, lung, subcutaneous adipose, abdominal adipose, liver, spleen, kidney and muscle. Its expression was higher in kidney and heart but lower in muscle tissue.

Key words: SOCS-2; pig; SQ RT-PCR; tissue distribution

细胞因子信号转导抑制因子-2 (Suppressor of Cytokine Signaling-2, SOCS-2) 是新近发现的 SOCS 家族成员之一,该家族最早是由 Yoshimura 等^[1]发现的一类细胞因子诱导产生的蛋白质,因含有 SH2 结构域而被命名为 CIS (Cytokine inducible SH2-

containing protein); 随后,其他科学家相继发现了该家族其他成员:SOCS-1~SOCS-7^[2-5]。SOCS 蛋白家族均具有一个 SH2 结构域和一个位于 C 端的 SOCS-box, SOCS 蛋白通过 SH-2 与 JAK 或相应受体结合,或依赖 SOCS-box 与泛素连接酶结合,经泛

[收稿日期] 2007-05-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(NO30471267);教育部重点项目(NO105167);校青年学术骨干支持计划项目

[作者简介] 杜宝文(1981-),男,陕西汉中,在读硕士,主要从事动物生物技术研究。E-mail:wwen05@yahoo.com.cn

[通讯作者] 孙 超(1968-),男,陕西商南人,副教授,博士,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:schao@nwsuaf.edu.cn.

素化使相应的蛋白降解,从而在 JAK-STAT 通路中发挥着重要的调控作用^[6]。

GH 在机体出生后的生长发育、脂质代谢、矿物质代谢等众多生理过程中均发挥着重要的调控作用。生长激素受体 (GHR) 属于 I 类细胞因子受体超家族,其本身没有活性,只有与 GH 结合以后才能被活化,然后与其下游信号分子结合,发挥生理作用,其中 JAK-STAT 通路是 GH 发挥调控作用众多途径中最为重要的通路之一^[7]。有研究报道,SOCS-2 能通过 SH2 结构域与 GHR 相互作用,并发现 SOCS-2 蛋白的 3 个结构域在 GH 信号通路的调控中发挥着重要作用^[8]。

综上,SOCS-2 可能通过 GH 信号通路参与机体生长发育的调控,然而在猪上还尚未见有关 SOCS-2 的报道。本实验对猪 SOCS-2 基因 cDNA 全长序列进行了克隆,并利用 SQ RT-PCR 技术研究了其在猪心脏、肺、肝脏等组织中的表达情况,以期研究 SOCS-2 在 GH 调控机体生长发育中的作用及机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 8 月龄健康雄性八眉猪 3 头,在陕西宝鸡茺良农场屠宰后迅速采集肾脏、心脏、肺等组织,置于液氮中备用。

1.1.2 试剂仪和器 RNA 提取试剂盒 TRIpure Reagent,购自百泰克生物技术有限公司;反转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)和 Taq Plus 酶,均购自北京鼎国生物技术有限公司;dNTP、Marker II 和 Marker11,均购自广东东胜生物科技有限公司;H. Q. & Q DNA 回收试剂盒和 H. Q. & Q 质粒微量提取试剂盒,均购自安徽优品生物工程有限公司;pMD19-T 载体,购自 TaKaRa 公司;Ecoli DH 5 α 由西北农林科技大学动物科技学院动物脂肪沉积与肌肉发育实验室保存。

1.2 引物设计与合成

根据 Genbank 发表的 SOCS-2 基因同源区,利用 Primer Premier 5.0 软件,按照引物设计的基本要求,设计 SOCS-2 基因 PCR 扩增引物,并同时设计内参 β actin 基因扩增引物。引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成,序列见表 1。

1.3 猪肾脏组织总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

猪肾脏组织总 RNA 的提取按照 TRIpure Rea-

gent 总 RNA 提取试剂盒操作说明进行,提取的总 RNA 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 β actin、SOCS-2 引物序列

Table 1 Primers sequences of β actin, SOCS-2

基因 Gene	引物 Primer	产物长度/ bp Length of amplified fragments
β actin	S: 5'-ACTGCCGCATCCTCTTCTCG-3' A: 5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACATC-3'	399
SOCS-2	S: 5'-GATTTCGTTTTGGGGTTCTCG-3' A: 5'-TCAGCGTTCTTAGCGTT-3'	822

注:S 为上游引物;A 为下游引物。

Note:S means sense primer;A means anti-primer.

1.4 猪 SOCS-2 基因与 β actin 基因的 RT-PCR 扩增

1.4.1 RT 反应 取 5 mL 提取的总 RNA,按反转录试剂盒推荐的方法以随机六聚体为引物合成 cDNA 第一链。取溶解于 DEPC 水中的总 RNA 5 mL,加 0.2 mg/mL Random hexamers primer 1 mL 和 DEPC 水 6 mL,70 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,置冰上冷却后加入下列试剂:5 $\times$ Buffer 4 μ L,10 mmol/L dNTP 2 μ L,20 U/mL RNA 聚合酶 1 μ L,25 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,加 200 U/mL MuLV 反转录酶 1 μ L。在 PTC-200 热循环仪中,25 $^{\circ}$ C 10 min,42 $^{\circ}$ C 反应 60 min,70 $^{\circ}$ C 10 min 终止反应,冰上冷却。

1.4.2 PCR 反应 PCR 反应体系为 25 μ L:灭菌二蒸水 17.7 μ L、10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,2 mmol/L dNTP 2 μ L,10 μ mol/L 上、下游引物各 0.8 μ L,0.5 U/ μ L Taq 酶 0.4 μ L,cDNA 模板 0.8 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,29 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 10 min。利用 PTC-200 热循环仪 (MJ Research,BIO-RAD,Inc.) 进行扩增。PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。猪 β actin 基因的扩增方法与上述方法相同。

1.5 猪 SOCS-2 基因的分离和克隆

利用 H. Q. & Q 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,按产品说明书从 15 g/L 琼脂糖凝胶上回收特异性条带。将回收产物与 pMD-19T 载体连接,构建重组质粒 pMD19-T-SOCS-2,转化感受态 E. coli DH 5 α ,涂布 LB 平板,进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆接种于 10 mL LB 培养基中。过夜培养后,用 H. Q. & Q 质粒微量提取试剂盒抽提质粒 DNA (碱裂解法),对重组质粒进行 PCR 扩增鉴定,并将鉴定为阳性的质粒送西北农林科技大学生物技术大平台测序。

1.6 猪 SOCS-2 基因 mRNA 在不同组织的表达丰度

八眉猪心脏、肺、皮下脂肪组织、腹部脂肪组织、肝脏、脾、肾脏和肌肉组织总 RNA 的提取以及 cDNA 的合成参照 1.3 和 1.4。

取 2.5 μ L PCR 扩增产物与微量溴酚蓝混合,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.05 mg/L 溴化乙啶)电泳。电泳条带用 Wealtec 凝胶成像系统拍照,并用 Dophir-1D 凝胶分析软件分析。SOCS-2 基因相对表达丰度用猪 SOCS-2 基因和 β actin 基因电泳条带的灰度值之比表示。

1.7 数据分析

采用 SPSS 11.5 统计分析软件进行分析,组间

差异显著性用 ONE-WAY ANOVA (方差分析) 进行统计分析,实验数据以平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{X} \pm SE$) 表示。

2 结果与分析

2.1 猪肾脏组织总 RNA 的提取及检测

对提取的猪肾脏 RNA 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,5,18 和 28 S 3 条带清晰可见,条带整齐(图 1),表明 RNA 没有降解。

2.2 猪 SOCS-2 基因的 RT-PCR 扩增结果

利用 RT-PCR 技术扩增猪 SOCS-2 基因,PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果在约 800 bp 处得到一特异性条带(图 2)。

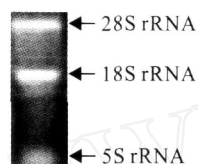


图 1 猪肾组织提取的 RNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis profiles of total RNA from kidney tissue of Bamei pig

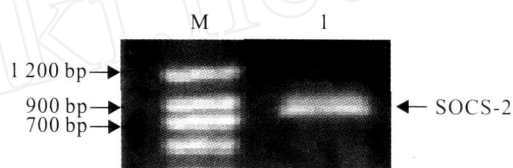


图 2 猪 SOCS-2 基因 PCR 产物的电泳结果

M. Marker; 1. SOCS-2 基因

Fig. 2 Electrophoresis result of SOCS-2 PCR products

M. Marker; 1. SOCS-2 gene

2.3 重组质粒 pMD19-T-SOCS-2 的鉴定

结果显示,阳性克隆抽提的质粒均可以扩增出目的条带,且特异性良好(图 3)。

2.4 猪 SOCS-2 基因序列的结构分析

克隆测序结果证实,所得基因即为猪 SOCS-2 基因(Genbank 登录号为:EF121242)。由于 SOCS 家族成员结构保守,均含有 SH2 结构域和 SOCS-box 盒,因此本试验对测序结果进行分析,确定克隆测序的完整性和准确性。

用 Genbank 中的 CDD 软件对测序所得序列进行分析,结果见图 4。从图 4 可以看出,试验中所克隆的基因序列有 SOCS 家族成员基本的结构域 SH2

和 SOCS-box。

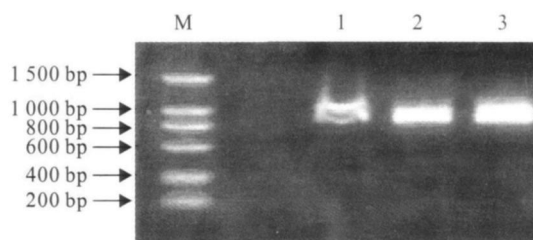


图 3 pMD19-T-SOCS-2 重组质粒的 PCR 鉴定结果

1~3. SOCS-2; M. Marker II

Fig. 3 PCR identification of recombinant plasmid

1~3. SOCS-2; M. Marker II

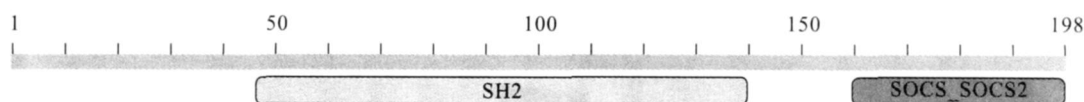


图 4 SOCS-2 的结构域分析

Fig. 4 Structure domain analysis of SOCS-2

2.5 猪 SOCS-2 基因同源性比对分析

克隆的猪 SOCS-2 cDNA 序列长度为 822 bp,从第 99 位到 696 位为 CDS 区。将克隆测序的序列向 Genbank 提交,登陆号为 EF121242。将编码区

与 Genbank 已发表的 SOCS-2 基因序列进行比对,结果发现,本试验克隆的家猪 SOCS-2 基因与野猪、人、小鼠和大鼠 SOCS-2 基因的同源性分别为 99%,94%,91%和 89%,SOCS-2 蛋白氨基酸同源性分别

为 100 % ,95 % ,94 % 和 93 %。表明 SOCS-2 基因和 SOCS-2 蛋白在不同物种间同源性均较高。

2.6 猪各组织总 RNA 的提取

猪各组织提取的总 RNA 的电泳结果见图 5。由图 5 可知,各组织总 RNA 条带均完整,没有被降解,可以满足后续实验的要求。

2.7 猪各组织 SOCS-2 基因 mRNA 的表达丰度

对 SOCS-2 和 β actin 进行异管扩增(扩增体系及条件见 1.4),各组织扩增结果见图 6,SOCS-2 基因的相对表达丰度见图 7。由图 6 和图 7 可见,SOCS-2 基因在猪肌肉组织、肾脏、脾、肝脏、腹部脂肪、皮下脂肪、肺和心脏组织中广泛表达,其在肾脏组织中表达量最高,心脏次之,肌肉组织最低。

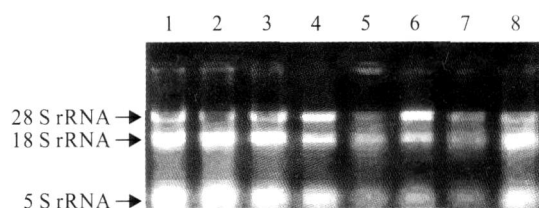


图 5 猪各组织提取的 RNA 的电泳结果

1. 肌肉;2. 肾脏;3. 脾;4. 肝脏;5. 腹部脂肪;
6. 皮下脂肪;7. 肺;8. 心脏

Fig. 5 Electrophoresis profiles of total RNA from different tissues of BaMei pig

1. Muscle;2. Kidney;3. Spleen;4. Liver;5. Abdominal adipose;
6. Subcutaneous adipose;7. Lung;8. Heart;M. Marker II

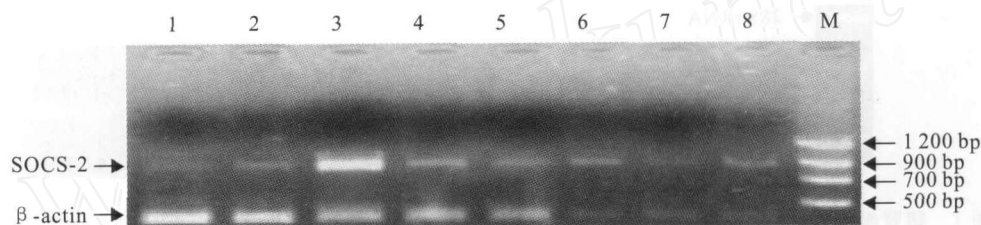


图 6 猪各组织中 SOCS-2 及 β actin 基因的 PCR 扩增电泳结果

1. 肌肉;2. 肾脏;3. 脾;4. 肝脏;5. 腹部脂肪;6. 皮下脂肪;7. 肺;8. 心脏;M. Marker II

Fig. 6 Amplification result of SOCS-2 and β actin from different tissues in Bamei pigs

1. Muscle;2. Kidney;3. Spleen;4. Liver;5. Abdominal adipose;6. Subcutaneous adipose;7. Lung;8. Heart;M. Marker II

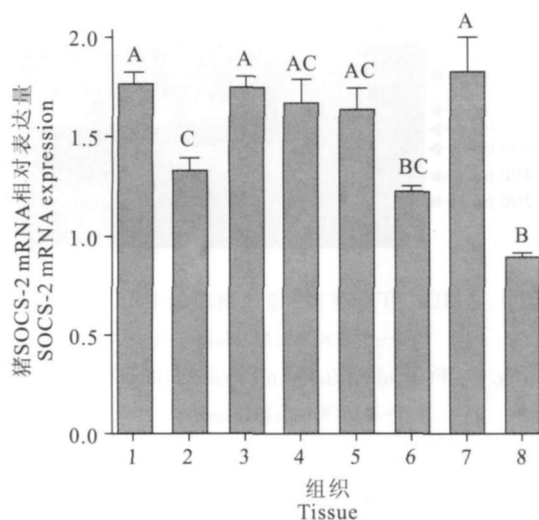


图 7 猪各组织 SOCS-2 基因 mRNA 的相对表达丰度

1. 心;2. 肺;3. 皮下脂肪;4. 腹部脂肪;5. 肝;6. 脾;7. 肾;8. 肌肉

Fig. 7 Significance tests of SOCS-2 mRNA expression in different tissues from Bamei pigs

1. Heart;2. Lung;3. Subcutaneous adipose;

4. Abdominal adipose;5. Liver;6. Spleen;7. Kidney;8. Muscle

3 讨论

多种细胞因子通过 JAK/STAT 通路发挥其生

物学作用,如调节机体生长、发育及维持自身内环境的稳定等。SOCS-2 作为 JAK/STAT 通路中一种重要的负调控因子,从其被发现以来,一直被学者所关注,许多科学家采用多种方法研究其功能。Metcalfe 等^[9]研究发现,雄性 SOCS-2^{-/-} 小鼠断奶后质量明显增加,多种组织质量成比例显著增加,且质量比同窝野生型鼠大 40 %,多项表型与 GH 和 IGF(胰岛素样生长因子)转基因小鼠表型相似。Greenhalgh 等^[10]研究发现,缺乏外源 SOCS-2 蛋白的 T293 细胞在 CH 刺激下,其 STAT5 依赖型荧光素报告基因转录活性增加了 16 倍,而在转染低水平 SOCS-2 基因后,STAT5 依赖型荧光素报告基因转录活性为缺乏外源 SOCS-2 蛋白时 GH 刺激下的 40 %,但转染高浓度 SOCS-2 基因则使 STAT5 依赖型荧光素报告基因转录活性显著增加;Greenhalgh 等^[8]进一步利用转基因技术研究发现,SOCS-2 转基因小鼠并未表现出预期的生后生长停滞,相反,雄性 SOCS-2 转基因小鼠质量比正常小鼠增加 13 %~15 %。这些试验结果表明,体内 SOCS-2 对 GH 信号通路可能具有双向调节作用^[8,10]。

本研究发现, *SOCS-2* 基因在猪肌肉、肺脏、脾、肝脏、腹部脂肪、皮下脂肪、肺和心脏组织中均有表达, 这与 *SOCS-2* 在体内能够发挥多种作用有关。多项研究表明, *SOCS-2* 在肌肉、睾丸、神经、骨骼等多种组织发育中发挥着重要的调控作用, 并参与脂质代谢, 还与生长激素、胰岛素和催产素、雌激素信号通路有密切的关系^[11-14]。本试验利用 SQ RT-PCR 技术检测了猪各个组织中 *SOCS-2* mRNA 的相对表达丰度, 结果发现, 其在心脏、肝脏、脂肪组织中表达量较高, 而在肌肉组织中表达量较低, 这与 Tollet 等^[12] 的研究结果一致。最近有研究报道, *SOCS-2* 能促进 C2C12 细胞系成肌细胞的增殖, 抑制肌管的形成^[11], 而本研究发现, *SOCS-2* 基因在肌肉组织中表达量较低, 这可能是因为 *SOCS-2* 在低水平表达时抑制了肌管形成关键因子表达的结果。日本科学家的一项研究显示, *SOCS-2* 与糖尿病人的肥胖现象有密切的关系^[15]。本试验发现, *SOCS-2* 基因在猪腹部脂肪组织和皮下脂肪组织中表达量均较高, 可以推测, *SOCS-2* 基因的表达水平与中国地方猪品种生长较慢, 体脂沉积过快有一定的关系。总之, *SOCS-2* 在猪肌肉组织发育以及体脂沉积中可能发挥着重要的调控作用, 但其具体机理还不清楚, 有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Yoshimura A T, Ohkubo T, Kiguchi N, et al. A novel cytokine inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors[J]. EMBO J, 1995, 14(12): 2816-2826.
- [2] Naka T, Narazaki M, Hirata M, et al. Structure and function of a new STAT induced STAT inhibitor[J]. Nature, 1997, 387(26): 924-929.
- [3] Starr R, Willson T A, Viney E M, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling[J]. Nature, 1997, 387(6636): 917-921.
- [4] Endo T A, Masuhara M, Yokouchi M, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases[J]. Nature, 1997, 387: 921-924.
- [5] Hilton D J, Richardson R T, Alexander W S, et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(1): 114-119.
- [6] Wormald S, Hilton D J. Inhibitors of cytokine signal transduction[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 821-824.
- [7] Zhu T, Goh E L, Graichen R, et al. Signal transduction via the growth hormone receptor[J]. Cell Signal. 2001, 13, 599-616.
- [8] Greenhalgh C J, Rico-Bautista E, Lorentzon M, et al. SOCS-2 negatively regulates growth hormone action in vitro and in vivo[J]. J Clin Investing, 2005, 115(2): 397-406.
- [9] Metcalf D, Greenhalgh C J, Viney E, et al. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signaling-2[J]. Nature, 2000, 405: 1069-1073.
- [10] Greenhalgh C J, Metcalf D, Thaus A J, et al. Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling[J]. J Biol chem, 2002, 277(43): 40181-40184.
- [11] Ouyang X, Fujimoto M, Nakagawa R. SOCS-2 interferes with myotube formation and potentiates osteoblast differentiation through upregulation of JunB in C2C12 cells[J]. Journal of Cell Physiology, 2006, 207(2): 428-36.
- [12] Tollet E P, Flores M A, Stavreus E A, et al. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat[J]. Endocrinology, 1999, 140: 3693-704.
- [13] Pezet A, Favre H, Kelly P A, et al. Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling[J]. J Biol Chem, 1999, 274(35): 24497-24502.
- [14] Campbell I L. Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease-associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2005, 48(2): 166-177.
- [15] Hitoshi K, Kyoko N, Dai O, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in the suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) gene with type 2 diabetes in the Japanese[J]. Genomics, 2006, 87: 446-458.