

奶山羊 *POU1F1* 基因 CDs 区的克隆、分析及原核表达

李建华, 罗 军, 张 晓, 樊 睿, 王 伟, 郝 娟, 赵旺生

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**克隆奶山羊垂体特异性转录因子 *POU1F1* 基因 CDs 区, 并对其进行生物信息学分析和原核表达。 **【方法】**采集关中奶山羊垂体组织, 提取其总 RNA, 根据绵羊 *POU1F1* 基因序列, 利用反转录 RT-PCR 克隆 *POU1F1* 基因 CDs 区, 对其进行生物信息学分析, 并构建原核表达载体 pET-32a-*POU1F1*, 在大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 中进行表达。 **【结果】**关中奶山羊 *POU1F1* 基因(GenBank 登陆号: FJ547813)开放读码框由 876 个碱基组成, 编码 291 个氨基酸, 基中包含 1 个 *POU*-specific 结构域(从第 124~198 个氨基酸)和 1 个 Homeobox 结构域(从第 214~276 个氨基酸); 奶山羊 *POU1F1* 基因 CDs 区核苷酸序列与绵羊(NM_001009350)、牛(NM_174579)、人(NM_000306)和小鼠(NM_008849)的同源性分别为 98%, 97%, 91% 和 86%, 其氨基酸序列与绵羊、牛、人和小鼠的同源性分别为 98%, 98%, 96% 和 92%; 成功构建了重组质粒 pET-32a-*POU1F1* 的原核表达系统, 并在体外条件下诱导表达出融合蛋白 His-*POU1F1*。 **【结论】***POU1F1* 基因编码的功能氨基酸在奶山羊、绵羊、牛、人和小鼠上高度保守, 推测奶山羊 *POU1F1* 基因与其他物种的 *POU1F1* 基因具有相似的功能。

【关键词】 关中奶山羊; *POU1F1*; 克隆; 生物信息学分析; 原核表达

【中图分类号】 Q785; Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)01-0041-05

Cloning and analysis of *POU1F1* gene in dairy goat and its prokaryotic expression

LI Jian-hua, LUO Jun, ZHANG Xiao, FAN Rui, WANG Wei,
HAO Juan, ZHAO Wang-sheng

(Key Laboratory for Molecule Biology of Agriculture, College of Animal Science and Technology,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study cloned prokaryotic expression of the CDs of dairy goat pituitary-specific transcription factor *POU1F1* gene and analyzed the biological information. **【Method】** The CDs of goat pituitary-specific transcription factor *POU1F1* gene was amplified and cloned from total RNA of goat pituitary by RT-PCR according to the corresponding sequence in sheep. The biological information analysis was performed with it. The prokaryotic expression vector pET-32a-*POU1F1* was constructed and expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. **【Result】** The gene *POU1F1* CDs is cloned and registered in GenBank (GenBank accession No. FJ547813). The ORF of *POU1F1* gene consisted of 876 nucleotides encoding 291 amino acids with a *POU*-specific (*POUs*) domain from 124—198 amino acids and a Homeobox domain from 214—276 amino acids. The nucleotide sequence homology of *POU1F1* CDs of Guanzhong dairy goat was found to be 98%, 97%, 91% and 86% compared with that of sheep (NM_001009350), bovine (NM_174579), human (NM_000306) and mouse (NM_008849), while the amino acid sequence homology was 98%, 98%, 96% and 92% respectively. The prokaryotic expression system of recombined vector pET-32a-*POU1F1* was con-

* [收稿日期] 2009-05-12

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2008AA10Z135); 国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(nyhyzx07-037)

[作者简介] 李建华(1983—), 女, 山西太原人, 在读博士, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: lijianhua991@gmail.com

[通信作者] 罗 军(1965—), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: luojun@nwsuaf.edu.cn

structed successfully. The fusion protein His-POU1F1 was expressed by inducing *in vitro*. 【Conclusion】 The functional amino acids coded by the gene POU1F1 are highly conserved in goat, sheep, cattle, human and mouse. It is implied that the gene POU1F1 in dairy goat shows the same function as it does in other species.

Key words: Guanzhong dairy goat; POU1F1; cloning; biological information analysis; prokaryotic expression

垂体特异性转录因子 POU1F1 (POU domain, class1, transcription factor1, POU1F1) 也叫 PIT-1, 是重要的组织特异性转录因子^[1], 主要在垂体前叶腺中表达。POU 家族蛋白是一类转录调节因子, 其共同特点是: 具有高度保守的 DNA 结合结构域, 即 POU 结构域。所谓“POU”, 是垂体特异性转录因子 Pit-1^[2]、八聚体结合蛋白 Oct-1^[3] 和 Oct-2^[4] 及 caenorhabditis 线虫神经 Unc-86^[5] 4 种转录因子英文名字的首字母。POU1F1 基因在垂体发育和激素表达中起关键作用, 对调控 TSH β 、GH、PRL 3 个细胞系的存活、分化、增殖以及相关基因的表达起主导作用^[6-9]。POU1F1 蛋白能够识别特异的基因序列, 并与之结合, 从而引起细胞内基因转录, 促进垂体前叶 GH、PRL 和 TSH 基因的表达, 其生物学活性由其特有的分子结构决定^[10]。

2000 年, Woollard 等^[11]应用原位核酸分子杂交技术, 将绵羊和山羊的 POU1F1 基因定位于 1 号染色体的 q21~22 区。国内外关于 POU1F1 基因的研究主要集中在鼠、人和猪上, 但近几年羊 POU1F1 基因的相关研究也有陆续报道。2006 年, 绵羊 POU1F1 基因的完整 CDs 序列公布^[12-13]; 2007 年, Lan 等^[14]对山羊 POU1F1 基因的多态性进行了相关报道。为此, 本研究采用反转录 RT-PCR 方法, 对关中奶山羊垂体特异性转录因子 POU1F1 基因的 CDs 区进行克隆, 并对其进行测序和生物信息学分析, 以期研究该基因的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验样品 10 月龄健康雌性关中奶山羊 (Capra hircus), 由陕西杨凌示范区姚安村屠宰场提供, 屠宰后 5 min 内取垂体组织样各 1 g 左右, 立即投入液氮中, 带回实验室。

1.1.2 主要试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, DEPC 购自 Sigma 公司, LA Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、pGEM-T 载体均购自 TaKaRa 公司, 反转录试剂盒 (#K1621) 购自 Fermentas, B 型

质粒小量快速提取试剂盒和胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物公司。

1.2 奶山羊垂体组织总 RNA 的提取

采用 Trizol 试剂一步法提取奶山羊垂体组织总 RNA, 用 Dnase I 去除可能存在的基因组 DNA, 酚-氯仿抽提法纯化, 用紫外分光光度仪于 260 和 280 nm 处检测 RNA 浓度和纯度, 并进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 引物的设计与合成

根据绵羊 POU1F1 基因序列 (NM_001009350), 利用 Oligo 6 软件设计上、下游引物, 用于扩增奶山羊垂体特异性转录因子 POU1F1 基因的 CDs 序列。上、下游引物中分别引入 Hind III 和 Xho I 酶切位点 (序列中的下划线部分), 以方便后续试验。引物由上海英俊生物技术有限公司合成, 其序列如下:

P₁-090103: 5'-AAGCTTCGATGAGTTGCCA AC-3';

P₂-090103: 5'-CTCGAGTTCTGCATTCAAG ATG-3'。

1.4 奶山羊 POU1F1 基因的 RT-PCR 反应

1.4.1 第一链 cDNA 的合成 按照 Fermentas 公司 RevertiAid 第一链 cDNA 合成试剂盒的说明操作。反转录体系 (20 μ L) 及反应程序为: 加入总 RNA 5 μ L, Oligo(dT)₁₈ primer 1 μ L, DEPC 处理水 6 μ L, 混匀, 瞬时离心, 70 $^{\circ}$ C 温浴 5 min; 再加入 5 $\times$ reaction buffer 4 μ L, RNA 酶抑制剂 1 μ L, dNTP Mix 2 μ L, 混匀, 瞬时离心, 37 $^{\circ}$ C 温浴 5 min; 最后加入 M-MLV Reverse Transcriptase 1 μ L, 42 $^{\circ}$ C 温浴 60 min, 70 $^{\circ}$ C 温浴 10 min, 反应产物于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.2 PCR 扩增 PCR 反应体系为 20 μ L: 10 $\times$ LA Buffer II (含 Mg²⁺) 2 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, LA Taq DNA 聚合酶 (2 U/ μ L) 0.2 μ L, cDNA 第一链模板 (50 ng/ μ L) 1 μ L, 双蒸灭菌水 12.8 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并切胶回收纯化目的片段。

1.5 pGEM-T-*POU1F1* 重组质粒的构建

将回收产物与 pGEM-T 载体连接,连接总体系为 10 μ L: 回收片段 3 μ L, pGEM-T 载体 1 μ L, T_4 DNA ligase (3 U/ μ L) 1 μ L, 2 $\times$ Rapid Ligation Buffer 5 μ L。16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化感受态 *E. coli* DH5 α 菌株,涂布于含 0.1 mg/mL 氨苄青霉素、0.024 mg/mL IPTG、0.04 mg/mL X-gal 的固体 LB 培养皿中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取白色单克隆进行摇菌,提取质粒,以 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定,并将阳性单克隆菌液送 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.6 奶山羊 *POU1F1* 基因 CDs 序列的生物信息学分析

用 BLAST 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)将测序结果与绵羊、牛、人和小鼠的 *POU1F1* 序列进行同源性分析;用 CLUSTALW 软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)分析山羊 *POU1F1* 与绵羊、牛、人和小鼠氨基酸序列的差异,用 BioXM 2.6 进行辅助分析;用 ProtParam 工具(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.htm>)对蛋白质一级结构的生物信息学进行预测,包括蛋白质的相对分子质量、理论 pI 值等;用在线软件 TMPRED(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)作 Tmpred-跨膜结构分析;用在线软件(<http://swissmodel.expasy.org/repository/>)预测蛋白的三级结构模型。

1.7 原核表达载体 pET-32a-*POU1F1* 的构建

采用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 对重组质

粒 pGEM-T-*POU1F1* 和表达载体 pET-32a(+) 同时进行双酶切,将酶切后的目的片段 *POU1F1* 连接到 pET-32a(+) 上,用连接产物 pET-32a-*POU1F1* 转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞,提取质粒进行双酶切鉴定,阳性单克隆送 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司测序鉴定。

1.8 重组表达载体 pET-32a-*POU1F1* 的诱导表达

挑取含有重组表达质粒 pET-32a-*POU1F1* 和空载体 pET-32a(+) 的阳性单克隆各 1 个,加入含 0.1 mg/mL 氨苄抗生素的 4 mL LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇菌 12 h,按体积比 1:100 扩大培养,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇菌培养至菌液 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6 时,加入 1 mol/L IPTG 使其终浓度分别达到 1.5,1,0.75,0.5,0.25 和 0.1 mmol/L,分别转入 20,25,30 $^{\circ}$ C 继续诱导培养,每隔 3 h 取菌液 1 mL。

1.9 融合蛋白 His-*POU1F1* 的 Western Blot 检测

以 anti-His 多克隆抗体作为一抗,检测融合蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 奶山羊垂体组织总 RNA 的检测

紫外分光光度计检测结果显示,提取的奶山羊垂体组织总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 2.01,OD₂₆₀/OD₂₃₀ 为 2.04,表明总 RNA 的提取效果良好。从图 1 可以看出,采用 Trizol 试剂提取法提取的奶山羊总 RNA 有 3 条清晰的电泳条带,分别是 28 S,18 S 和 5 S rRNA,且 28 S 与 18 S 条带的亮度比接近 2:1,表明所提取的总 RNA 完整,符合试验要求。

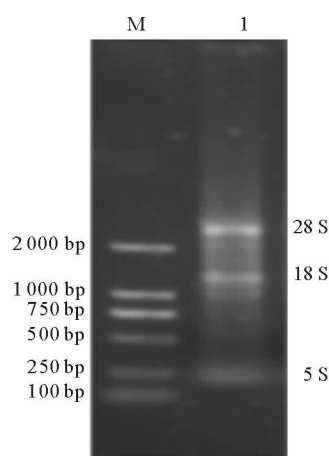


图 1 奶山羊垂体组织总 RNA 的电泳检测

M, DNA Marker DL2000; 1, 总 RNA

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of goat pituitary total RNA

M, DNA Marker DL2000; 1, Total RNA

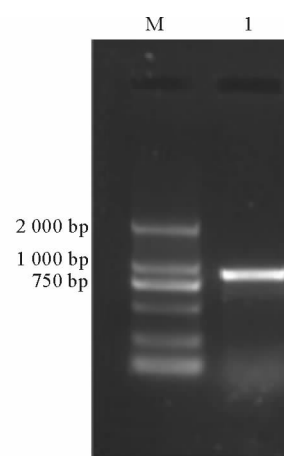


图 2 奶山羊 *POU1F1* 基因 PCR 扩增产物的检测

M, DNA Marker DL2000; 1, 奶山羊 *POU1F1* CDs

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of goat *POU1F1* PCR product

M, DNA Marker DL2000; 1, Goat *POU1F1* CDs

2.2 奶山羊 *POU1F1* 基因 CDs 区的克隆

由图 2 可见,PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后,出现单一条带,片段长度与预期结果一致。片段回收后连接 pGEM-T 载体,测序,并登录 GenBank,获得注册号为 FJ547813。奶山羊 *POU1F1* 基因完整 CDs 区核苷酸序列长 876 bp,编码 291 个氨基酸。

2.3 奶山羊 *POU1F1* 基因 CDs 区的生物信息学分析

经同源性分析发现,奶山羊 *POU1F1* 基因核苷酸序列与绵羊(NM_001009350)、牛(NM_174579)、人(NM_000306)和小鼠(NM_008849)的同源性分别为 98%,97%,91% 和 86%;其氨基酸序列与绵羊、牛、

人、小鼠的同源性分别为 98%,98%,96% 和 92%(图 3);*POU* 结构域所在氨基酸区域(AA 124~198)在山羊、人和牛中完全相同,而在绵羊和小鼠中各存在 1 个氨基酸差异。在山羊 *POU1F1* 蛋白中,潜在的 N 端 Asn-糖基化位点 AA 62~65、AA 277~280,与绵羊和牛的位置相同。山羊 *POU1F1* 蛋白上存在 2 个依赖于 cAMP 的蛋白激酶磷酸化位点:AA 112~115 和 AA 216~219,其在所比对的 5 个物种中完全相同;4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点中,AA 7~10、AA 30~33 和 AA 240~243 在 5 个物种中都存在,仅 AA 103~106 在羊、绵羊、牛和人中有,而小鼠中没有;1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 AA 179~181 在所比对的 5 个物种中完全相同。

<i>gPOU1F1</i>	MSCQPF TSDT F I PLNSE S SA TL PLI MH P SAAE CL PVSNHATNMSTATGLHY SVP SCHY	60
<i>sPOU1F1</i>	MSCQPF TSDT F I PLNSE S SA TL PLI MH P SAAE CL PVSNHATNMSTATGLHY SVP SCHY	60
<i>bPOU1F1</i>	MSCQPF TSDT F I PLNSE S SA TL PLI MH P SAAE CL PVSNHATNMSTATGLHY SVP SCHY	60
<i>hPOU1F1</i>	MSCQAF TSADT F I PLNSDA SA TL PLI MH H SAAE CL PVSNHATNMSTATGLHY SVP SCHY	60
<i>mPOU1F1</i>	MSCQSE TSADT F I TLNSDA SA AL PLR MH H SAAE CL PASNHATNMSTATGLHY SVP SCHY	60
<i>gPOU1F1</i>	GNQSS TYGV MAG SL TPCLYK F PDH TL SHG F PPMHQ PLL SEDPTA AD FKQELRRK SKLI EE	120
<i>sPOU1F1</i>	GNQSS TYGV MAG SL TPCLYK F PDH TL SHG F PPMHQ PLL SEDPTA AD FKQELRRK SKLI EE	120
<i>bPOU1F1</i>	GNQSS TYGV MAG SL TPCLYK F PDH TL SHG F PPMHQ PLL SEDPTA AD FKQELRRK SKLI VEE	120
<i>hPOU1F1</i>	GNQPSTYGV MAG SL TPCLYK F PDH TL SHG F PPI HQ PLLAEDPTA AD FKQELRRK SKLI VEE	120
<i>mPOU1F1</i>	GNQPSTYGV MAG SL TPCLYK F PDH TL SHG F PBL HQ PLLAEDPA ASE FKQELRRK SKLI VEE	120
<i>gPOU1F1</i>	PIDMDS PEIRE LEKFANE FKVRR IKLGY TQ TNVGEALAAVHGSE FSQ TT I CRFENLQLSF	180
<i>sPOU1F1</i>	PIDMDS PEIRE LEKFANE FKVRR IKLGY TQ TNVGEALAAVHGSE FSQ TT I CRFENLQLSF	180
<i>bPOU1F1</i>	PIDMDS PEIRE LEKFANE FKVRR IKLGY TQ TNVGEALAAVHGSE FSQ TT I CRFENLQLSF	180
<i>hPOU1F1</i>	PIDMDS PEIRE LEKFANE FKVRR IKLGY TQ TNVGEALAAVHGSE FSQ TT I CRFENLQLSF	180
<i>mPOU1F1</i>	PIDMDS PEIRE LEKFANE FKVRR IKLGY TQ TNVGEALAAVHGSE FSQ TT I CRFENLQLSF	180
<i>gPOU1F1</i>	KNACKLKAILSKWLEAEQVGALYNEKVGANERKRKRRTTISIAAKDALERHFGEQNKPS	240
<i>sPOU1F1</i>	KNACKLKAILSKWLEAEQVGALYNEKVGANERKRKRRTTISIAAKDALERHFGEQNKPS	240
<i>bPOU1F1</i>	KNACKLKAILSKWLEAEQVGALYNEKVGANERKRKRRTTISIAAKDALERHFGEQNKPS	240
<i>hPOU1F1</i>	KNACKLKAILSKWLEAEQVGALYNEKVGANERKRKRRTTISIAAKDALERHFGEQNKPS	240
<i>mPOU1F1</i>	KNACKLKAILSKWLEAEQVGALYNEKVGANERKRKRRTTISIAAKDALERHFGEHKS	240
<i>gPOU1F1</i>	SQEIL RMAEELNLEKEVVRVWFCNRRQREKRVKTSLNQSLFISKEHLECR	291
<i>sPOU1F1</i>	SQEIL RMAEELNLEKEVVRVWFCNRRQREKRVKTSLNQSLFISKEHLECR	291
<i>bPOU1F1</i>	SQEIL RMAEELNLEKEVVRVWFCNRRQREKRVKTSLNQSLFTISKEHLECR	291
<i>hPOU1F1</i>	SQEIMRMAEELNLEKEVVRVWFCNRRQREKRVKTSLNQSLFISKEHLECR	291
<i>mPOU1F1</i>	SQEIMRMAEELNLEKEVVRVWFCNRRQREKRVKTSLNQSLFISKEHLECR	291

图 3 山羊、绵羊、牛、人和小鼠 *POU1F1* 野生型转录本的氨基酸序列比对结果

gPOU1F1. 奶山羊 *POU1F1*; *sPOU1F1*. 绵羊 *POU1F1*; *bPOU1F1*. 牛 *POU1F1*; *hPOU1F1*. 人 *POU1F1*; *mPOU1F1*. 小鼠 *POU1F1*

Fig. 3 Multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequence of goat *POU1F1*

with the sequences of sheep, bovine, human and mouse

gPOU1F1. Dairy goat *POU1F1*; *sPOU1F1*. Sheep *POU1F1*; *bPOU1F1*. Cattle *POU1F1*;

hPOU1F1. Human *POU1F1*; *mPOU1F1*. Mouse *POU1F1*

用 ProtParam 工具预测分析表明,该蛋白分子式为 $C_{1447}H_{2301}N_{413}O_{439}S_{15}$,由 4 615 个原子组成,相对分子质量为 32 988.5,理论 pI 为 8.36;共包含 291 个氨基酸, Glu 和 Leu 含量最高,各 28 个,分别占总数的 9.6%。

Tmpred-跨膜结构分析表明,奶山羊 *POU1F1* 蛋白第 63~82 个氨基酸区段的理论得分为 744,显著高于软件默认得分 500。由此揭示,该蛋白 N 端可能在外侧,第 63~82 个氨基酸肽段为由外向内的

跨膜螺旋。

蛋白结构域预测表明,奶山羊 *POU1F1* 蛋白的第 124~198 个氨基酸区域为 *POU* 结构域,第 214~276 个氨基酸区域为 Homeodomain 结构域。

2.4 重组质粒 pET-32a-*POU1F1* 的 SDS-PAGE 检测结果

将重组质粒 pET-32a-*POU1F1* 于不同诱导条件下在宿主菌 BL21(DE3)pLysS 中诱导表达,目的蛋白大小为 32 ku,表达载体 pET-32a(+)的标签蛋

白共有 20 ku,故融合蛋白大小约为 52 ku。SDS-PAGE 检测结果如图 4 所示,箭头所指为融合蛋白 His-*POU1F1*。

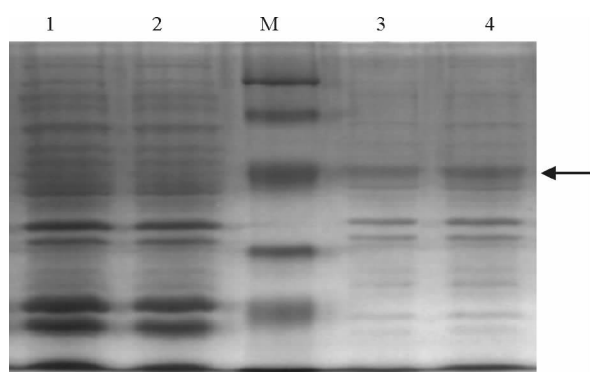


图 4 重组质粒 pET-32a-*POU1F1* 的诱导表达
1,2. 质粒 pET-32a(+);M. 标准蛋白分子量
预染 Marker(各条带从上到下依次为 117,85,49,34,25,19 ku);
3,4. 重组质粒 pET-32a-*POU1F1* 的诱导

Fig. 4 Induced expression results of pET-32a-*POU1F1*
1,2. Induced pET-32a(+);M. Protein LMW Marker
(Bands are 117,85,49,34,25,19 ku up to down);
3,4. Induced pET-32a-*POU1F1*

2.5 融合蛋白 His-*POU1F1* 的 Western Blot 检测结果

将重组质粒 pET-32a-*POU1F1* 于不同诱导条件下在宿主菌 BL21(DE3)pLysS 中诱导表达,结果显示,在诱导条件为 30 ℃、1 mmol/L IPTG、12 h 时表达量最高,Western Blot 检测结果如图 5 所示。

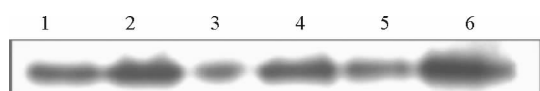


图 5 融合蛋白 His-*POU1F1* 的 Western Blot 检测
1~6. 融合蛋白 His-*POU1F1*

Fig. 5 Western Blot analysis of fusion protein His-*POU1F1*
1-6. Fusion protein His-*POU1F1*

3 讨 论

反转录 RT-PCR 是将 cDNA 合成与 PCR 技术结合,来分析基因表达的一种快速灵敏的方法,主要用于表达信息的检测,其特点是准确、可靠。本试验借助 RT-PCR 技术,以奶山羊垂体组织为材料,根据绵羊 *POU1F1* 基因设计引物,克隆了关中奶山羊 *POU1F1* 基因的 CDs 区。Lan 等^[14]也曾克隆得到山羊 *POU1F1* 基因的 CDs 全长序列,但他们以全血为材料,分别克隆了山羊 *POU1F1* 基因的外显子和内含子,然后通过电子拼接的方法将 6 个外显子拼接得到该基因的 CDs 全长序列,这与本研究直接克

隆得到该基因 CDs 全长序列有很大区别。本研究发现,奶山羊 *POU1F1* 基因与绵羊、牛、人和小鼠的编码区域一致,CDs 区域全长 876 bp,编码 291 个氨基酸,第 124~198 个氨基酸区域为 *POU* 结构域,第 214~276 个氨基酸区域为 Homeodomain 结构域,这与 Lan 等^[14]的研究结果一致。通过核苷酸序列和氨基酸序列同源性分析发现,奶山羊 *POU1F1* 基因 CDs 区核苷酸序列与绵羊、牛、人和小鼠的同源性分别为 98%,97%,91%和 86%,*POU1F1* 蛋白氨基酸序列的同源性分别为 98%,98%,96%和 92%。*POU1F1* 基因编码的功能氨基酸在绵羊、牛、人和鼠上非常保守,特别是 *POU* 结构域所在氨基酸区域,在山羊、人和牛中完全相同,在绵羊和小鼠中各存在 1 个氨基酸差异。由此推测,山羊 *POU1F1* 基因与其他物种的 *POU1F1* 基因具有相似的功能,能够影响垂体中 *TSH β* 、*GH*、*PRL* 3 个细胞系的分化、存活、增殖以及相关基因的表达。

本研究成功构建了重组融合蛋白 His-*POU1F1* 的原核表达系统,得到优化后的诱导条件为:温度 30 ℃,诱导剂 IPTG 浓度 1 mmol/L,诱导培养时间 12 h。这为下一步研究 *POU1F1* 蛋白的功能奠定了基础,也为 *POU1F1* 蛋白产品的开发提供了理论和实践依据。

[参考文献]

- [1] Tuggle C K, Trennkle A. Control of growth hormone synthesis [J]. Domestic Animal Endocrinol, 1996, 13: 1-33.
- [2] Bodner M, Castrillo J L, Theill L E, et al. The Pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein [J]. Cell, 1988, 55: 505-518.
- [3] Sturm R A, Das G, Herr W. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box sub-domain [J]. Genes, 1988, 2: 1582-1599.
- [4] Muller M M, Ruppert S, Schaffner W, et al. A cloned octamer transcription factor stimulates transcription from lymphoid-specific promoters in non-B cells [J]. Nature, 1988, 336: 544-551.
- [5] Finney M, Ruvkun G. The unc-86 gene product couples cell lineage and cell identity in *C. elegans* [J]. Cell, 1990, 63: 895-905.
- [6] Cohen L E, Radovick S. Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 1996, 25: 523-540.
- [7] Crenshaw I S, Rawson E B, Simmons D M, et al. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene Pit-1 [J]. Nature, 1990, 347: 528-533.

(下转第 52 页)