

网络出版时间:2020-09-25 11:33 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.03.001
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200924.1236.001.html

牛 *LATS1* 基因启动子转录调控分析

魏大为¹,张久盘²,杨智燕¹,王兴平¹,罗仍卓么¹,咎林森^{3,4}

(1 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏农林科学院固原分院, 宁夏 固原 756000;
3 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 4 宁夏西海固高端牛产业研究院, 宁夏 中卫 755000)

[摘 要] **【目的】**探究牛大肿瘤抑制基因 1(Large tumor suppressor gene1, *LATS1*)的组织表达规律,并初步鉴定其启动子区关键转录因子,以期阐明其转录调控机制。**【方法】**利用荧光定量 PCR 检测 *LATS1* 基因在牛心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、皮下脂肪、背最长肌、大肠、小肠、大脑、皱胃及睾丸组织中的相对表达量。克隆牛 *LATS1* 基因启动子的全长序列,通过逐段缺失 PCR 技术扩增 7 个缺失不同片段的启动子序列,并构建其双荧光素酶报告载体,分别转染小鼠 C2C12 和 3T3-L1 细胞系,通过检测不同缺失片段荧光素酶报告载体的活性,确定 *LATS1* 启动子核心区域。使用在线软件预测牛 *LATS1* 基因启动子核心区域的关键转录因子。**【结果】***LATS1* 基因在大脑、背最长肌、大肠、皱胃、肾脏中高表达。克隆了 1 950 bp 的 *LATS1* 基因启动子序列及其 7 个逐段缺失片段序列,并成功构建了 p*LATS1*-1783/+167、p*LATS1*-1449/+167、p*LATS1*-1149/+167、p*LATS1*-837/+167、p*LATS1*-555/+167、p*LATS1*-298/+167 和 p*LATS1*-123/+167 双荧光素报告载体。检测到牛 *LATS1* 基因启动子核心区域位于-298/-123 区域。在线软件预测到牛 *LATS1* 基因启动子核心区存在肌细胞增强因子 2(MEF2A)、转录激活因子 5 (STAT5)、同源异型盒基因 5(HOXA5)、肌细胞决定基因 1(Myod1)和靶向叉头框转录因子 1(FoxO1)结合位点。**【结论】**克隆了牛 *LATS1* 基因启动子,明确了其核心区位于-298/-123 区域;MEF2A、STAT5、HOXA5、Myod1 和 FoxO1 可能对牛 *LATS1* 基因转录活性具有重要的调控作用。

[关键词] 牛;*LATS1* 基因;启动子;转录调控
[中图分类号] S823.8⁺1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2021)03-0001-08

Transcription regulation analysis of bovine *LATS1* gene

WEI Dawei¹,ZHANG Jiupan²,YANG Zhiyan¹,WANG Xingping¹,
LUORENG Zhuoma¹,ZAN Linsen^{3,4}

(1 School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2 Guyuan Branch of Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Guyuan, Ningxia 756000, China; 3 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4 Ningxia Xihaigu High-end Cattle Industry Research Institute, Zhongwei, Ningxia 755000, China)

Abstract: **【Objective】** Aiming to elucidate the transcriptional regulation mechanism of bovine large tumor suppressor 1 gene (*LATS1*), this study explored the expression level of *LATS1* gene in different tissues of cattle and identified the key transcription factors in the promoter region. **【Method】** Real time PCR was used to detect the relative expression of bovine *LATS1* gene in heart, liver, spleen, lung, kidney, subcutaneous fat, longissimus dorsi, large intestine, small intestine, brain, abomasum and testicle tissues. The full-length sequence of bovine *LATS1* gene promoter was cloned and the luciferase reporter constructs with

[收稿日期] 2020-02-26
[基金项目] 宁夏重点研发项目(引才专项)(2020BEB04011);宁夏托举人才工程项目(TJGC2019076);宁夏大学科研启动金项目(030900002032);宁夏科技重大专项(2019BEF02004)
[作者简介] 魏大为(1989-),男,甘肃通渭人,副教授,博士,主要从事牛肉品质候选基因筛选及鉴定研究。
E-mail:weidaweiwdw@163.com
[通信作者] 咎林森(1963-),男,陕西扶风人,教授,博士生导师,主要从事牛遗传改良与动物生长发育调控研究。
E-mail:zanlinsen@163.com

seven different deletion fragments of *LATS1* gene promoter were constructed and transfected into C2C12 and 3T3-L1 cell lines, respectively. The key transcription factors in core promoter regions of bovine *LATS1* were also predicted using on-line software. 【Result】 The bovine *LATS1* gene was highly expressed in brain, longissimus dorsi, large intestine, abomasum and kidney. A 1 950 bp promoter region sequence of bovine *LATS1* gene and seven deletion fragments were cloned. The luciferase reporter vectors of pLATS1-1783/+167, pLATS1-1449/+167, pLATS1-1149/+167, pLATS1-837/+167, pLATS1-555/+167, pLATS1-298/+167 and pLATS1-123/+167 were successfully constructed. The core promoter region of bovine *LATS1* gene was located at -298/-123 bp. The online software predicted myocyte enhancer factor 2A (MEF2A), activator of transcription 5 (STAT5), homeobox A5 (HOXA5), myogenic differentiation 1 (Myod1) and forkhead box O1 (FoxO1) transcription factors binding sites on the bovine *LATS1* gene. 【Conclusion】 The bovine *LATS1* gene promoter was cloned and its core promoter was located at -298/-123 bp. MEF2A, STAT5, HOXA5, Myod1 and FoxO1 may play important roles in the regulation of bovine *LATS1* gene transcription activity.

Key words: bovine; *LATS1* gene; promoter; transcriptional regulation

我国肉牛产业虽起步较晚、起点较低,但发展势头迅猛。2019 年我国牛肉总产量约 770.0 万吨,同年我国牛肉消费量为 923.3 万吨^[1]。目前我国牛肉消费供不应求,价格持续高位运行,不得不从国外大量进口,2019 年牛肉进口量高达 165.95 万吨,比 2018 年增加 61.99 万吨,首次跃居全球首位^[1]。据预测,未来 5 年内,我国牛肉年消费量将突破 1 000 万吨,如果按照目前的生产水平,至少还有 300 万吨左右的缺口^[1-2]。因此,我国肉牛产业还有很大的发展空间。秦川牛作为我国五大黄牛品种之一,具有耐粗饲、抗逆性强、肉质细嫩且大理石花纹明显等特点^[3],但其产肉率低、生长速度缓慢、后躯不够发达等缺点制约了其产业化发展^[4]。如何提高秦川牛生长速率,增加产肉量,改良和培育优良的肉牛品种成为目前肉牛产业的重要研究方向。研究表明,动物的骨骼肌与其产肉性能密切相关^[5],其发育状况除了与环境及营养水平等有关外,更多地受基因控制^[6]。因此,通过筛选功能基因来提高骨骼肌的生长发育水平并改善肉质成为现代肉牛遗传改良的一项重要研究内容。

大肿瘤抑制基因 1 (*LATS1*) 作为 Hippo 通路主要成员之一,在组织器官的形成及胚胎干细胞的增殖与分化中扮演着重要角色^[7-8]。目前关于 *LATS1* 的研究主要集中在其对肿瘤细胞增殖的作用方面^[9],而有关其调控畜禽骨骼肌生长发育的报道较少,仅见张玉龙^[10]报道, *LATS1* 与湖羊的个体生长性状存在一定的关联性。本研究利用实时荧光定量技术,检测 *LATS1* 基因在牛不同组织中的表达情况,同时克隆 *LATS1* 基因启动子序列,通过逐

段缺失 PCR 扩增获得缺失片段的启动子,并构建双荧光素报告载体,将其转染小鼠成肌细胞和脂肪细胞,检测 *LATS1* 基因的启动子核心区域,进一步通过在线网站预测影响牛 *LATS1* 基因的关键转录因子,以期初步阐明其转录调控机制,为牛的分子育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样品 采集 3 头秦川牛公牛(24 月龄)血液样本及心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、皮下脂肪、背最长肌、大肠、小肠、大脑、皱胃及睾丸组织,于液氮中保存备用。

1.1.2 主要试剂 总 DNA 提取试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、SYBR @ PrimixEx Taq™ II 荧光定量试剂盒、PMD19-T(simple)载体、T4 DNA 连接酶、高保真 PCR 扩增酶 GXL、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,均购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Kpn* I、*Hind* III,购自美国 NEB 公司;DNA 胶快速回收试剂盒、质粒提取试剂盒、pGL3-Basic 质粒及双荧光素酶基因内参 pRL-TK 载体、Dual-Luciferase Reporter Assay System 双荧光素酶报告系统,均购自 Promega 公司;PBS、DMEM 培养基,购自 Hyclone 公司;Lipofectamine 3000 Reagent 转染试剂盒,购自 Invitrogen 公司;胎牛血清、OPTI-MEM 培养基,购自 Gibco 公司。引物由上海生物工程股份有限公司合成。

1.2 牛不同组织中 *LATS1* 基因 mRNA 表达水平的检测

提取牛不同组织总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 RNA 质量。使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,−20 ℃ 冰箱保存备用。

选用 *GAPDH* 作为内参基因,采用实时荧光定量 PCR 检测牛不同组织中 *LATS1* 基因 mRNA 的表达水平。根据 NCBI 公布的牛 *LATS1* 基因序列 (GenBank 登录号:NM_001192866.1) 和 *GAPDH* 基因序列 (GenBank 登录号:NM_001034034.2),采用 Primer premier 5.0 软件设计 *LATS1* 和 *GAP-*

DH 引物 (表 1),用 SYBR® PrimixEx Taq™ II 荧光定量试剂盒进行实时荧光定量 PCR,检测 *LATS1* 基因在各待测组织中的表达情况。PCR 反应体系为 20 μL,其中 PrimixEx Taq II 为 10 μL,上、下游引物各 0.8 μL,ROX Reference Dye II 0.4 μL,cDNA 模板 2 μL,ddH₂O 6 μL。反应在 7500 Real Time PCR 仪 (ABI 公司产品) 上进行。反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 34 s,循环 40 次,进行 3 个生物学重复试验,采用 2^{−ΔΔC_T} 法分析相对表达量^[11],数据使用 SPSS 软件进行单因素方差分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息
Table 1 Primers used in real time PCR

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence(5'→3')	退火温度/℃ T _m	扩增片段长度/bp Product length	扩增区域 Amplified region
<i>GAPDH</i>	F: CCAACGTGTCTGTTGTGGAT R: CTGCTTCACCACCTTCTTGA	60.0	80	320—521
<i>LATS1</i>	F: GTTGGTAGGACAGCCGCTTTC R: GCTTGCGGTGGGATGTGAAGAG	60.0	96	3 310—3 406

1.3 牛 *LATS1* 基因启动子序列分析及蛋白序列进化树构建

利用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中海福特牛 (Hereford) 基因组信息,确定 *LATS1* 基因 DNA 序列。结合 NCBI 公布的牛 *LATS1* 基因转录起始位点及 Ensembl(<https://asia.ensembl.org/index.html>) 网站,初步预测牛 *LATS1* 基因启动子位置。使用 MEGA 5.0 (<https://www.megasoftware.net/index.php>) 和 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 软件分析牛 *LATS1* 基因结构,并构建不同物种 *LATS1* 蛋白进化树。

1.4 牛 *LATS1* 基因启动子的克隆

提取牛血液样本基因组 DNA,4 ℃ 保存备用。

利用牛 *LATS1* 基因的启动子序列 (GenBank 登录号:NC_037336.1),用 Primer 5.0 软件设计引物 *LATS1*-PF 和 *LATS1*-PR (表 2)。以血液基因组 DNA 为模板,PCR 扩增秦川牛 *LATS1* 基因启动子区 −1783/+167 片段。PCR 反应体系为 50 μL,其中含 2×PrimeSTAR GXL Buffer 25 μL,上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL,50 ng 模板,2 U PrimeSTAR GXL DNA Polymerase,用 ddH₂O 补齐。反应条件:98 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,68 ℃ 15 s,35 个循环。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化,连接于 PMD19-T (Simple) 载体并转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,进行单克隆筛选后测序。

表 2 牛 *LATS1* 基因启动子及其逐段缺失片段克隆引物
Table 2 Primers used in promoter and deletion fragment cloning of *LATS1* gene

用途 Useage	引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence(5'→3')	退火 温度/℃ T _m	扩增片段 长度/bp Product length	扩增区域 Amplified region
启动子克隆 Promoter cloning	<i>LATS1</i> -PF	CGACTGAGCGACTGAACTGAAG	65.5	1 950	−1 783/+167
	<i>LATS1</i> -PR	GCCGCCATTTTGCTTTCACTCG			
启动子逐段 缺失片段克隆 promoter deletion fragments cloning	<i>LATS1</i> -P1	CGGGGTACCCGACTGAGCGACTGAACTGAAG	64.0	1 950	−1 783/+167
	<i>LATS1</i> -P2	CGGGGTACCTACACCCGAACTAGCACAA	61.5	1 616	−1 449/+167
	<i>LATS1</i> -P3	CGGGGTACCCTTCACAGGAATAAACCTCTT	63.5	1 316	−1 149/+167
	<i>LATS1</i> -P4	CGGGGTACCGGGTCATATCTTCTACAGACT	65.0	1 004	−837/+167
	<i>LATS1</i> -P5	CGGGGTACCCAAAGGAGCTCTGTACAATG	61.5	722	−555/+167
	<i>LATS1</i> -P6	CGGGGTACCACTGCTAAGCAAAAATTCTAG	62.0	465	−298/+167
	<i>LATS1</i> -P7	CGGGGTACCAGACACTGAAATACTTGAGT	59.5	290	−123/+167
	<i>LATS1</i> -R	CCCAAGCTTGCCGCCATTTTGCTTTCACTCG			

注:斜体碱基 CGGGGTACC 和 CCCAAGCTT 分别为 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切位点。
Note:The italic bases of CGGGGTACC and CCCAAGCTT are *Kpn* I and *Hind* III restriction sites,respectively.

1.5 牛 *LATS1* 基因启动子核心区分析

1.5.1 启动子逐段缺失片段的克隆 为进一步确定牛 *LATS1* 基因启动子核心区域,用 Primer premier 5.0 软件设计 7 条用于启动子逐段缺失片段扩增的上游引物 *LATS1*-P1、*LATS1*-P2、*LATS1*-P3、*LATS1*-P4、*LATS1*-P5、*LATS1*-P6 及 *LATS1*-P7 和 1 条固定的下游引物 *LATS1*-R(上、下游引物 5'端分别添加 *Kpn* I、*Hind* III 双酶切位点,引物信息见表 2)。以测序正确的牛 *LATS1* 基因启动子区-1783/+167 片段作为模板进行启动子逐段缺失 PCR 扩增(扩增条件及体系同上),对扩增片段进行测序鉴定。

1.5.2 双荧光素酶报告载体的构建 使用内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 在 37 ℃下双酶切 pGL3-Basic 载体 1 h,用 T4 DNA 连接酶在 16 ℃恒温仪上与经同样双酶切的 7 个牛 *LATS1* 基因逐段缺失启动子片段连接,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑选阳性单克隆菌落进行双酶切鉴定。将正确的单克隆扩大培养过夜,使用去内毒素试剂盒提取质粒。重组质粒分别命名为: p*LATS1* - 1783/+167、p*LATS1* - 1449/+167、p*LATS1* - 1149/+167、p*LATS1* - 837/+167、p*LATS1* - 555/+167、p*LATS1* - 298/+167 和 p*LATS1* - 123/+167,并进行纯度和浓度测定。

1.5.3 双荧光素酶报告载体活性分析 用含体积分数 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的

DMEM 培养基培养小鼠成肌细胞(C2C12)和脂肪细胞(3T3-L1)系,按每孔 1×10^5 个细胞的量接种至 24 孔板,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞单层长至 70%~80% 融合时备用。分别将构建的 800 ng 牛 *LATS1* 基因启动子 5'端缺失片段重组质粒和 20 ng 内参质粒 pRL-TK 共转染 C2C12 和 3T3-L1 细胞,按照 Lip3000 转染试剂盒说明进行试验操作,以 pGL3-Basic 质粒为阴性对照,每组试验重复 3 次。转染 48 h 后收集细胞。使用 Promega 公司双荧光检测试剂盒检测萤火虫荧光素酶活性(*F* 值)和海肾荧光素酶活性(*R* 值),通过计算其比值(*F/R*)确定 *LATS1* 基因启动子核心区域。数据采用 SPSS 软件中两个独立样本 *t* 检验进行方差分析。

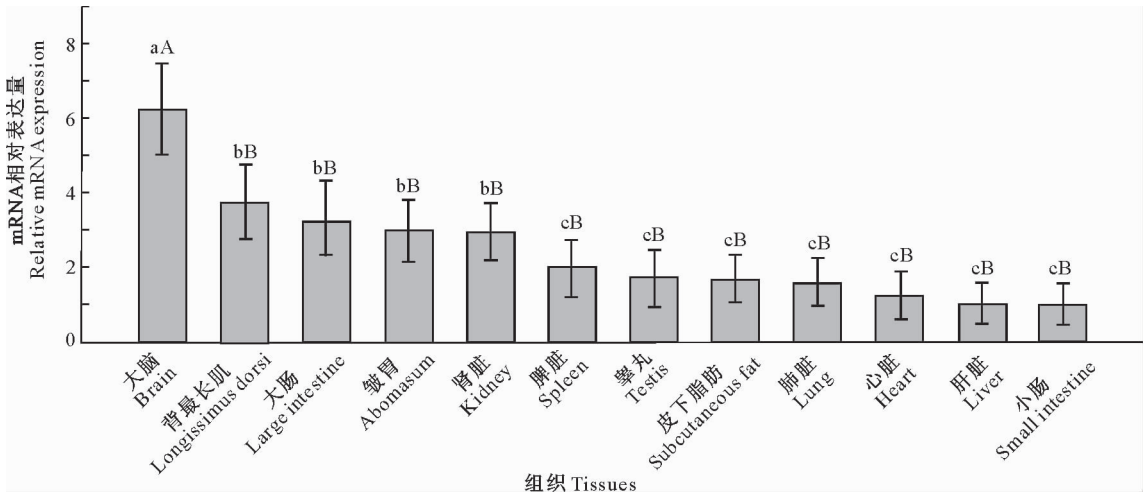
1.6 关键转录因子预测

通过在线软件 Genomatix(<http://www.genomatix.de/cgi-bin//mat-inspector>)、JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>)预测启动子核心区潜在转录结合因子,设置阈值大于 90%,根据预测结果进行数据库比对并取交集进行筛选,标注牛 *LATS1* 基因启动子核心区转录因子结合序列。

2 结果与分析

2.1 牛不同组织 *LATS1* 基因的表达规律

LATS1 基因 mRNA 在秦川牛不同组织中的相对表达量如图 1 所示。



图柱上标不同小写字母表示组织间差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)
Different lowercase letters mean significant difference among different tissues at $P<0.05$ and different capital letters mean extremely significant difference at $P<0.01$

图 1 *LATS1* 基因 mRNA 在牛不同组织中的相对表达量

Fig. 1 mRNA expression of *LATS1* gene in different tissues of cattle

图 1 显示,*LATS1* 基因在牛 12 个不同组织中均有表达,以小肠中的表达量为参照,*LATS1* 基因

在大脑中的相对表达量极显著高于其他组织($P<0.01$);在背最长肌、大肠、皱胃、肾脏的表达量显著高于脾脏、睾丸、皮下脂肪、肺脏、心脏、肝脏及小肠组织($P<0.05$)。结果表明,*LATS1* 基因可能与秦川牛器官发育紧密相关,尤其在大脑以及肌肉组织发育中起重要作用。

2.2 牛 *LATS1* 基因结构及蛋白序列进化分析

牛 *LATS1* 基因位于 9 号染色体 (ENS-BTAG00000015076, 86860562-86897588), 全长 37 027 bp。*LATS1* 基因开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 为 3 372 bp, 包括 8 个外显子 (外显子

1—8) 和 7 个内含子 (内含子 1—7), 编码 1 123 个氨基酸, 分子质量为 126. 19 ku。在线网站预测到牛 *LATS1* 为不稳定水溶性蛋白, 无潜在的信号肽剪切位点。以 NCBI 及 Ensembl 数据库公布的牛 *LATS1* 基因信息, 确定其转录起始位点胞嘧啶 (C) 为 +1 位置, 向上游查找 2 000 bp 的序列, 初步预测其启动子区。利用 MEGA 软件构建不同物种 (绵羊、山羊、马、猪、小鼠) *LATS1* 蛋白质序列进化树, 结果 (图 2) 表明, *LATS1* 蛋白在不同物种中相似度较高, 尤其在复胃动物 (牛、绵羊和山羊) 间进化保守。

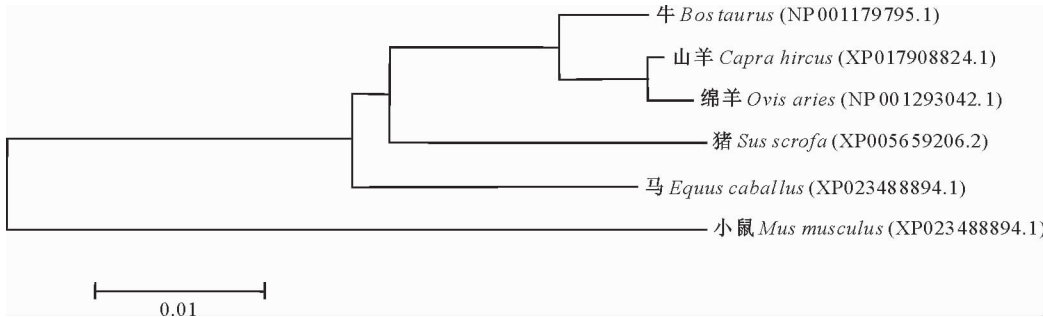
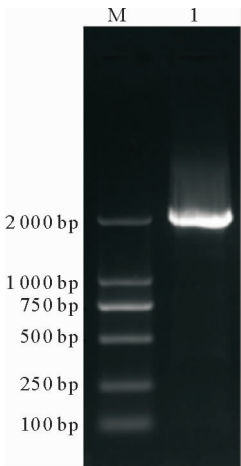


图 2 牛 *LATS1* 蛋白序列进化树

Fig. 2 Evolutionary tree of bovine *LATS1* protein sequence

2.3 牛 *LATS1* 基因启动子片段的扩增

据牛 *LATS1* 启动子序列信息设计引物 PCR 扩增其启动子区, 结果 (图 3) 获得了约 1 950 bp 的单一一条带, 无杂带。目的片段经测序证实其长度为 1 950 bp。



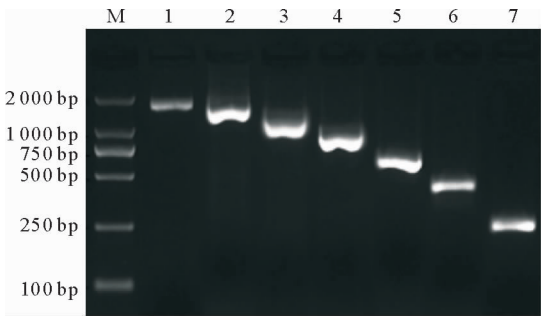
M. DL2000 DNA Marker, 1. 启动子-1 783/+167 片段扩增结果
M. DL2000 DNA marker; 1. Amplification of
-1 783/+167 promoter region

图 3 牛 *LATS1* 基因启动子片段的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of bovine *LATS1* gene promoter

2.4 牛 *LATS1* 基因启动子核心区分析

2.4.1 启动子逐段缺失片段的扩增 使用 *LATS1*-P1/*LATS1*-R~*LATS1*-P7/*LATS1*-R 等 7 对逐段缺失引物进行牛 *LATS1* 启动子区扩增, 结果 (图 4) 分别获得了 1 950, 1 616, 1 316, 1 004, 722, 465 和 290 bp 的单一一条带, 与预期片段长度一致。



M. DL2 000 DNA Marker; 1~7. 分别为 *LATS1*-P1/*LATS1*-R~
LATS1-P7/*LATS1*-R 扩增产物, 长度分别为 1 950, 1 616,
1 316, 1 004, 722, 465, 290 bp
M. DL2 000 DNA marker; 1~7. Amplified products of *LATS1*-P1/
LATS1-R~*LATS1*-P7/*LATS1*-R, with lengths of 1 950, 1 616,
1 316, 1 004, 722, 465 and 290 bp, respectively

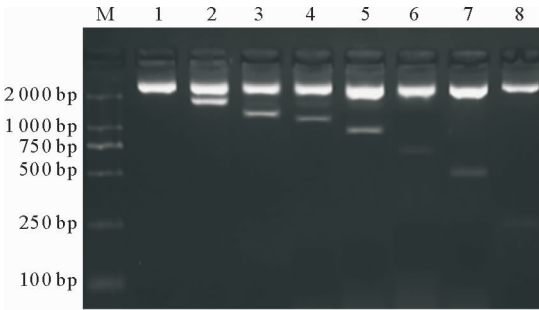
图 4 牛 *LATS1* 基因启动子逐段缺失片段扩增电泳图

Fig. 4 Gel electrophoresis of deletion fragments of
bovine *LATS1* gene promoter

2.4.2 双荧光素酶报告载体的鉴定 重组质粒 pLATS1-1783/+167、pLATS1-1449/+167、pLA-TS1-1149/+167、pLATS1-837/+167、pLATS1-555/+167、pLATS1-298/+167 和 pLATS1-123/+167 经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,结果(图 5)显示,酶切获得了 2 条条带,其中包括 4 818 bp 空载体及 1 950,1 616,1 316,1 004, 722,465 和 290 bp 目的条带,条带长度与预期一致。进一步对各重组质粒进行纯度和浓度测定,结果显示重组质粒在 260 nm 处吸光值与 280 nm 吸光值之比(OD_{260}/OD_{280})均在 1.7 左右,质量浓度均高于 800 ng/ μ L,可用于下一步试验。

2.4.3 *LATS1* 基因启动子核心区的确定 结果(图 6)显示,逐段缺失启动子活性片段发现,当缺失 *LATS1* 基因启动子区-298/-123 片段后,双荧光素报告载体 pLATS1-123/+167 在 C2C12 及 3T3-L1 细胞中的活性较 pLATS1-298/+167 极显著下降($P<0.01$),分别下降了 78.2%和69.6%。结果说明,*LATS1* 基因 5'端上游 1.7 kb 序列是启动子区,具有调控基因转录活性功能,-298/-123 区域为 *LATS1* 基因启动子核心区,且 *LATS1* 基因在C2C12细胞系的转录活性高于3T3-L1,这

也反映出 C2C12 细胞系更适合 *LATS1* 基因转录活性测定。

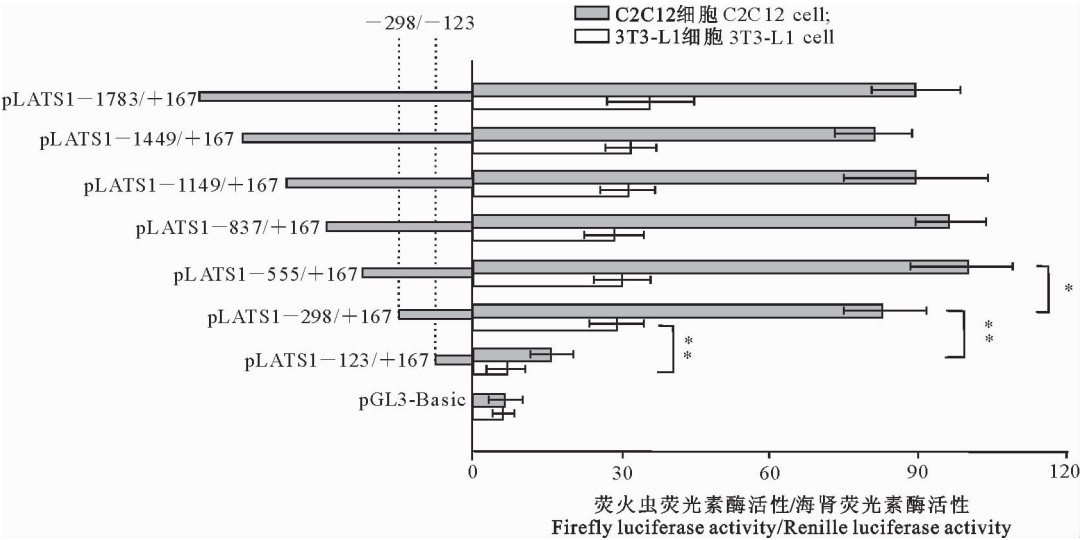


M. DL2000 DNA Marker;1~8. 分别为 pGL3-Basic、pLATS1-1783/+167、pLATS1-1449/+167、pLATS1-1149/+167、pLATS1-837/+167、pLATS1-555/+167、pLATS1-298/+167 和 pLATS1-123/+167 质粒的 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切结果

M. DL2000 DNA Marker;1-8. The results of double digestion of *Kpn* I and *Hind* III for pGL3-Basic,pLATS1-1783/+167, pLATS1-1449/+167,pLATS1-1149/+167,pLATS1-837/+167,pLATS1-555/+167,pLATS1-298/+167 and pLATS1-123/+167 plasmid, respectively

图 5 牛 *LATS1* 基因启动子双荧光素报告重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 5 Electrophoretic diagram of double digestion dual-luciferase plasmid of bovine *LATS1* promoter



* 和 ** 分别表示差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)

* and ** indicate significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$), respectively

图 6 逐段缺失检测牛 *LATS1* 基因启动子核心区

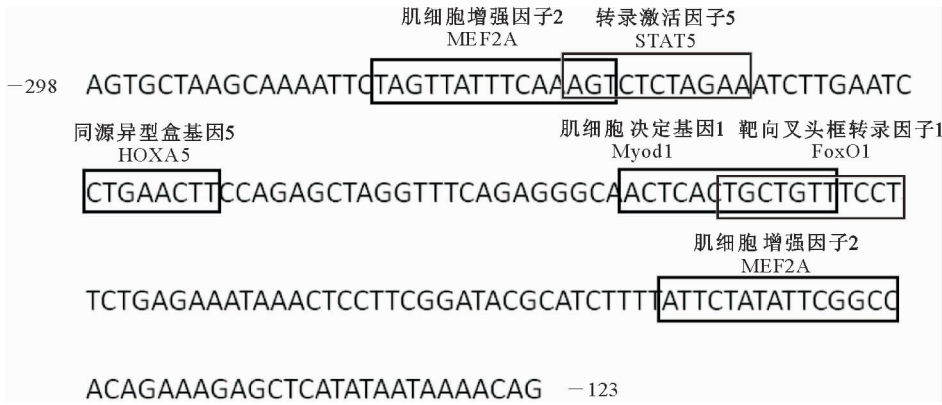
Fig. 6 Detection of core promoter region of bovine *LATS1* gene using series deletion

2.5 关键转录因子预测

结合 Genomatix、JASPAR 软件对牛 *LATS1* 基因启动子核心区域(-298/-123 片段)的关键转录因子进行预测分析,结果(图 7)显示,牛 *LATS1*

基因启动子核心区包含肌细胞增强因子 2 (MEF2A)、转录激活因子 5(STAT5)、同源异型盒基因 5(HOXA5)、肌细胞决定基因 1(Myod1)和靶向叉头框转录因子 1(FoxO1)等关键转录因子的结

合位点。结果说明,MEF2A、STAT5、HOXA5、Myod1 和 FoxO1 转录因子可能对 *LATS1* 基因的



方框表示转录因子结合位点

The box represents relative transcription factor binding site

图 7 牛 *LATS1* 基因核心区域转录因子预测

Fig. 7 Prediction of transcription factors in the core region of bovine *LATS1* gene

3 讨 论

Hippo 通路也称为 Salvador/Warts/Hippo (SWH)通路,是一个高度保守的传导通路,对细胞增殖、分化和凋亡具有重要的调控作用^[12-13]。哺乳动物 Hippo 信号通路的主要成员有 MST1、MST2、Salvador1(Sav1)、LATS1、LATS2、Mob1 和 Yes 相关蛋白基因(YAP/TAZ)^[14]。*LATS1* 基因作为 Hippo 信号通路主要成员之一,参与多种器官组织的发育调控,主要表现在调节心脏体积大小和调控心肌发育^[15]。最新研究发现,*LATS* 基因家族除了调控癌细胞增殖和分化外,还可以调控动物肌肉生长发育,如 *LATS1*^[10] 和 *LATS2* 基因^[16] 对湖羊肌肉生长发育有显著影响。本研究发现,在牛的不同组织中 *LATS1* 基因在大脑、背最长肌、大肠、皱胃、肾脏中高表达,且 *LATS1* 蛋白在不同物种进化过程中高度保守,由此推测,*LATS1* 基因在个体生长发育过程中扮演着重要角色。

利用逐段缺失双荧光素酶活性的方法检测到 *LATS1* 基因启动子核心区位于-298/-123 区域,在线软件预测其核心区域有 MEF2A、STAT5、HOXA5、Myod1 和 FoxO1 等 5 个重要转录因子的结合位点。*MEF2A* 是 *MEF2* 基因家族中的一员,该基因家族还包括 *MEF2B*、*MEF2C* 和 *MEF2D*^[17]。*MEF2A* 是具有碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix,bHLH)结构域的转录因子,在脑、骨骼肌和心肌中高丰度表达,对肌纤维形成、肌纤维稳态、心肌细胞增殖、骨骼肌干细胞和成肌细

胞的分化和再生具有促进作用^[18-21]。最新研究发现,牛 *MEF2A* 基因沉默会抑制成肌细胞分化,并显著下调 *MYOZ2* 表达量^[22]。综上所述,*MEF2A* 基因对肌肉生长发育过程具有至关重要的调控作用。本研究发现,牛 *LATS1* 基因启动子核心区有 *MEF2A* 结合位点,据此推测 *MEF2A* 对 *LATS1* 基因的转录有重要的调控作用。

信号转导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)家族包括 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6 共 7 个成员^[23],该家族在细胞内信号转导和转录激活中发挥着关键作用^[24]。STAT5 作为 STAT 家族的一员,参与调控细胞的增殖、分化和凋亡,也是生长激素(GH)、生长激素释放肽(GHR)、胰岛素样生长因子(IGF)、催乳素以及胰岛素信号通路的重要调控因子^[25-27]。研究发现,STAT5 基因多态性与鸡的生长和繁殖性状具有一定的相关性^[28-29]。*HOXA5* 基因是同源框基因(homeobox genes)家族中重要发育转录因子之一,是个体组织和器官发育所必需的,该基因缺失会导致神经发育异常、肌肉萎缩和新生儿死亡^[30]。*HOXA5* 基因在脂肪组织形成和脂肪细胞分化过程中发挥着重要的调控作用,主要参与 BMP4/Samd1 信号通路,促进白色脂肪组织的棕色化^[31]。生肌调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs)对肌细胞具有重要的调控作用^[32]。*Myod1* 是 MRFs 家族成员之一,是肌细胞分化、肌纤维形成的重要调控因子,可参与肌细胞增殖、分化以及再生,是肌肉生

长发育的核心基因^[33]。*FoxO1* 基因是叉头框转录因子家族中一类重要的转录因子,其主要调控细胞凋亡、氧化应激、脂质代谢等^[34]。研究发现,*FoxO1* 参与骨骼肌的发育和 I 型纤维正常发生,敲除 *FoxO1* 基因的小鼠骨骼肌功能受损,全身肌肉发育不全^[35]。综述所述,STAT5、HOXA5、Myod1 和 *FoxO1* 在个体生长发育以及肌肉形成过程中起着重要的作用。本研究发现,牛 *LATS1* 基因启动子核心区有 STAT5、HOXA5、Myod1 和 *FoxO1* 结合位点,据此推断 STAT5、HOXA5、Myod1 和 *FoxO1* 在牛生长发育过程中对 *LATS1* 基因具有重要的转录调控作用。

【参考文献】

- [1] 国家肉牛牦牛产业技术体系. 2019 年度肉牛牦牛产业技术发展报告 [R]. http://www.beefsys.com/report_detailss120.html. National Technical System of Beef Cattle and Yak Industry. Report on technical development of national beef cattle and yak industry in 2019 [R]. http://www.beefsys.com/report_detailss120.html
- [2] 中国畜牧业协会牛业分会. 2018 年我国肉牛产业发展回顾与 2019 年展望 [J]. 饲料与畜牧, 2019, 374(5): 33-39. Cattle Branch of China Animal Husbandry Association. Review of the development of beef cattle industry in China in 2018 and prospect in 2019 [J]. Feed and Husbandry, 2019, 374(5): 33-39.
- [3] 咎林森. 牛生产学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007. Zan L S. Cattle production [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2007.
- [4] 咎林森, 梅楚刚, 王洪程. 我国肉牛产业经济发展形势及对策建议 [J]. 西北农林科技大学学报(社会科学版), 2015, 15(6): 48-52. Zan L S, Mei C G, Wang H C. Current situation, existing problems and countermeasures on development of beef cattle industry in China [J]. Journal of Northwest A&F University (Social Science Edition), 2015, 15(6): 48-52.
- [5] Camporez J G, Petersen M C, Abudukadier A, et al. Anti-myostatin antibody increases muscle mass and strength and improves insulin sensitivity in old mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(8): 2212-2217.
- [6] Hocquette J F. Endocrine and metabolic regulation of muscle growth and body composition in cattle [J]. Animal, 2010, 4(11): 1797-1809.
- [7] Yi J, Lu L, Yanger K, et al. LATS1 and LATS2 regulate mouse liver progenitor cell proliferation and maturation through antagonism of the coactivators YAP and TAZ [J]. Hepatology, 2016, 64(5): 1757-1772.
- [8] Heallen T, Martin J F. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size [J]. Science, 2011, 332(6028): 458-461.
- [9] Harvey K F, Zhang X, Thomas D M. The Hippo pathway and human cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(4): 246-257.
- [10] 张玉龙. Hippo 信号通道中 *Lats1* 基因对湖羊肌肉生长性状遗传调控的初步研究 [D]. 江苏扬州: 扬州大学, 2013. Zhang Y L. Preliminary study of the genetic regulation of Hu sheep muscle growth traits in *Lats1* gene in Hippo signal channel [D]. Yangzhou, Jiangsu: Yangzhou University, 2013.
- [11] Livak. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] Halder G, Johnson R L. Hippo signaling: growth control and beyond [J]. Development, 2011, 138(1): 9-22.
- [13] Yu F X, Zhao B, Panupinthu N, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-Protein-Coupled receptor signaling [J]. Cell, 2012, 150(4): 780-791.
- [14] Pan D. Hippo signaling in organ size control [J]. Genes Dev, 2007, 21(8): 886-897.
- [15] Chabu C, Nguyen D, Turenchalkb G, et al. Lats in organ size regulation and cancer [M]. Berlin: Encyclopedia of Cancer, 2017.
- [16] 王利宏, 王庆增, 鲍建军, 等. Hippo 信号通道中 *Lats2* 基因表达与湖羊肌肉生长发育的关系 [J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(3): 519-525. Wang L H, Wang Q Z, Bao J J, et al. Relationship between *Lats2* gene in Hippo signaling pathway and Hu sheep muscles growth traits [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(3): 519-525.
- [17] Shore P, Sharrocks A D. The MADS-Box family of transcription factors [J]. Eur J Biochem, 1995, 229(1): 1-13.
- [18] Estrella N L, Desjardins C A, Nocco S E, et al. MEF2 Transcription factors regulate distinct gene programs in mammalian skeletal muscle differentiation [J]. J Biol Chem, 2015, 290(2): 1256-1268.
- [19] Ewen E P, Snyder C M, Wilson M, et al. The Mef2A transcription factor coordinately regulates a costamere gene program in cardiac muscle [J]. J Biol Chem, 2011, 286(34): 29644-29653.
- [20] Liu N, Nelson B R, Bezprozvannaya S, et al. Requirement of MEF2 A, C, and D for skeletal muscle regeneration [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(11): 4109-4114.
- [21] Medrano J L, Naya F J. The transcription factor MEF2A fine-tunes gene expression in the atrial and ventricular chambers of the adult heart [J]. J Biol Chem, 2017, 292(51): 20975-20988.
- [22] Wang Y N, Yang W C, Li P W, et al. Myocyte enhancer factor 2A promotes proliferation and its inhibition attenuates myogenic differentiation via myozenin 2 in bovine skeletal muscle myoblast [J]. Plos One, 2018, 13(4): e196255.
- [23] Darnell J E. STATs and gene regulation [J]. Science, 1997, 277(5332): 1630-1635.

ed enzymes activities at leaf-drying stage during the bulk curing process [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(8): 2875-2881.

[28] 张福平,李秋红. 温度对黄皮果实 PAL、POD 和 PPO 活性的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(11): 69-71.
Zhang F P, Li Q H. Effects of different storage temperatures on pal, pod and ppo activity of wampee fruit [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008, 34(11): 69-71.

[29] 宫长荣,李艳梅,李常军. 烘烤过程中烟叶脂氧合酶活性与膜脂过氧化物的关系 [J]. *中国烟草学报*, 2000, 6(1): 40-42.
Gong C R, Li Y M, Li C J. Relationship between lox activity and lipid peroxidation in tobacco leaf [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2000, 6(1): 40-42.

[30] 盛浩,周萍. 树干/枝呼吸作用对环境变化的响应 [J]. *生态学报*, 2011, 30(8): 1822-1829.
Sheng H, Zhou P. Responses of stem/branch respiration to environmental change: a review [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(8): 1822-1829.

[31] 孟莉. 晒烟主要次生代谢物质及其烟叶品质的关系 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2015.
Meng L. Main secondary metabolism substance and its relationship with the quality of sun-cured tobacco [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2015.

(上接第 8 页)

[24] Papatriantafyllou M. Gene regulation; STATs control subset-specific enhancer activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(1): 7.

[25] Bachelot A, Binart N. Reproductive role of prolactin [J]. *Reproduction*, 2007, 133(2): 361-369.

[26] Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, et al. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells [J]. *Embo J*, 2014, 18(17): 4754-4765.

[27] Furigo I C, Melo H M, Nm L E S, et al. Brain STAT5 signaling modulates learning and memory formation [J]. *Brain Structu Funct*, 2018(5): 1-13.

[28] 赵秀华,王金玉,张跟喜,等. *STAT5b* 基因 2 个 SNPs 位点与京海黄鸡生长和繁殖性状的关联分析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2012, 48(1): 1-5.
Zhao X H, Wang J Y, Zhang G X, et al. Two SNPs of the *STAT5b* gene and its relationship with growth and reproductive traits in Jinghai Yellow chicken [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2012, 48(1): 1-5.

[29] 徐龙鑫,朱丽莉,陈浩林,等. 瑶山鸡 *STAT5* 基因多态性及其与繁殖性状的关联性 [J]. *西南农业学报*, 2017, 30(6): 1462-1466.
Xu L X, Zhu L L, Chen H L, et al. Polymorphism of gene *STAT5* in Yaoshan chicken and its association with reproduction traits [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 30(6): 1462-1466.

[30] Jeannotte L, Gotti F, Landry-truchon K. *Hoxa5*: a key player in development and disease [J]. *J Dev Biol*, 2016, 4(2): E13.

[31] Yamamoto Y, Gesta S, Lee K Y, et al. Adipose depots possess unique developmental gene signatures [J]. *Obesity*, 2010, 18: 872-878.

[32] Kang J S, Krauss R S. Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis [J]. *Curr Opin Clin Nutr*, 2010, 13(3): 243-248.

[33] Narashimhan M, Hong J, Atieno N, et al. Nrf2 deficiency promotes apoptosis and impairs Pax7/MyoD expression in aging skeletal muscle cells [J]. *Free Radical Biol Med*, 2013, 65(2): S118.

[34] Altomonte J, Richter A, Harbaran S, et al. Inhibition of FoxO1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice [J]. *Am J Physiol-Endoc M*, 2003, 285(4): E718-728.

[35] Kamei Y, Miura S, Suzuki M, et al. Skeletal muscle FoxO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(39): 41114-41123.