

网络出版时间:2015-12-02 14:25

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.01.003

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151202.1425.006.html>

猪 NR4A1 基因的克隆、序列分析及表达模式研究

刘林清¹, 李凤娥², 熊远著², 邓昌彦²

(1 安徽省农业科学院 畜牧兽医研究所, 安徽 合肥 230031; 2 华中农业大学 动物科学院, 湖北 武汉 430070)

【摘要】【目的】克隆猪核受体 4A1 (Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1, NR4A1) DNA 序列全长, 并对 CDS 序列及其表达模式进行分析。【方法】以未成年长大母猪的卵巢为材料, 采用电子克隆技术, 对猪 NR4A1 DNA 序列进行分离和测序, 并对猪 NR4A1 基因序列进行生物信息学分析; 利用性腺激素(人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin, HCG)和孕马血清促性腺激素(Pregnant mare serum gonadotropin, PMSG))处理卵巢颗粒细胞, 采用 RT-PCR 方法分析猪 NR4A1 基因的表达模式。【结果】获得猪 NR4A1 基因 4 870 bp 的 DNA 序列, 其中 CDS 全长序列为 1 734 bp, 共编码 572 个氨基酸; 猪 NR4A1 基因编码的氨基酸序列与人的对应氨基酸序列的相似性最高(97%), 其次为小鼠(94%); Expasy 软件预测结果表明, NR4A1 蛋白的氨基酸序列非常保守, 其中包含 2 个锌指特征(NR C4-type), 一个是激素受体超家族, 另一个是 Zf-C4 超家族; 猪卵巢颗粒细胞在性腺激素处理后, 可诱导猪 NR4A1 基因在卵泡发育和排卵时期瞬时表达。【结论】猪 NR4A1 基因的 CDS 区在物种间保守性较强, 推测猪 NR4A1 基因调节卵泡的发育和排卵过程。

【关键词】 猪; NR4A1; 序列分析; 表达模式

【中图分类号】 Q785

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)01-0014-05

Cloning, sequence analysis and expression pattern of porcine NR4A1 gene

LIU Lin-qing¹, LI Feng-e², XIONG Yuan-zhu², DENG Chang-yan²

(1 Institute of Husbandry and Veterinary Medicine, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031, China;

2 College of Animal Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: 【Objective】The genomic sequence of porcine NR4A1 gene was cloned and the temporal and spatial expression patterns were studied. 【Method】Using ovary of minor sow as material, the structure of the porcine NR4A1 gene was analyzed by bioinformatics methods. The expression patterns of NR4A1 gene were analyzed by RT-PCR after ovarian granulosa cells were treated with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (HCG). 【Result】The genomic sequence with 4 870 bp of NR4A1 gene was obtained, which contained 1 734 bp CDS and encoded 572 amino acids. The amino acid sequences exhibited the greatest identity with human (97%), followed by house mouse (94%). Expasy software estimation showed that NR4A1 protein was conservative including 2 NR C4-type, one was hormone receptor superfamily and the other was Zf-C4 superfamily. The porcine NR4A1 gene had a rapid expression pattern after granulosa cells were treated with PMSG/HCG. 【Conclusion】NR4A1 gene was highly conservative among species and it involved in the regulation of follicular development, ovulation and e luteinizing process.

【收稿日期】 2014-04-25

【基金项目】 安徽省农业科学院科技创新团队项目(13C0405); 安徽省农业科学院院长青年基金项目(14B0427)

【作者简介】 刘林清(1980—), 女, 山东莱芜人, 助理研究员, 博士, 主要从事猪的遗传育种研究。E-mail: liulinqingllq@126.com

【通信作者】 邓昌彦(1949—), 男, 湖北武汉人, 教授, 学士, 博士生导师, 主要从事动物分子遗传学与育种和畜牧环境生物工程研究。

Key words: pig; NR4A1; sequence analysis; expression pattern

NR4A1 基因作为一个孤核受体的转录因子,编码类固醇-甲状腺激素超家族。NR4A1 蛋白是一类配体依赖转录调节蛋白^[1],它在转录过程中起作用的是 N-末端,参与调节核定位和转录激活过程的是 C-末端^[2-4]。在细胞中进行的类固醇合成活性研究结果显示,NR4A1 基因表达与 P450 胆固醇侧链裂解酶 (Cytochrome P450 side chain cleavage enzyme,P450scc)^[5] 和类固醇合成重要调节蛋白^[6] 的空间表达模式相一致。许多研究者还指出,其他编码类固醇生成酶的基因,如细胞色素 P450 11A1 (Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1, CYP11A1)、细胞色素 P450 11B1 (Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1, CYP11B1) 和细胞色素 P450 19 (Cytochrome P450, family 19, CYP19),它们的启动子上存在与 NR4A1 基因相似的 NBRE 序列^[7-8]。随着更进一步的研究发现,NR4A1 基因可以提高 20 α -羟基类固醇脱氢酶 (20 α hydroxysteroid dehydrogenase, 20 α HSD) 在黄体中的转录活性^[9]。从基因的功能方面入手,研究者发现 NR4A1 基因的表达显著抑制了子宫肌瘤的发生^[10],并且 NR4A1 基因的信号在许多癌症中表现出失调现象,被认为是构成靶向药物的重要分子^[11]。此外,还有研究者利用原位杂交方法分析认为,在注射促黄体激素 (Luteinizing hormone, LH)/人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 后,可诱导 NR4A1 基因在卵巢排卵前卵泡颗粒层细胞中快速、短暂的表达^[12-13]。从上述研究结果可以看出, NR4A1 基因可能调节卵泡的发育,在排卵过程中发

挥着重要作用。因此,对 NR4A1 基因进行深入研究,探索其在不同时间点性腺激素处理卵巢细胞中的表达情况具有重要意义。因此,本研究采用电子克隆技术,对猪 NR4A1 DNA 序列进行了分离和测序,并对猪 NR4A1 基因序列进行了生物信息学分析;最后,利用 RT-PCR 方法分析了猪 NR4A1 基因在性腺激素处理后卵巢颗粒细胞中的表达模式,为进一步阐明 NR4A1 基因的繁殖性能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验所需的卵巢组织样本采自华中农业大学精品种猪场的 3 头未成年长大母猪。其中,一部分卵巢组织提取猪基因组 DNA,用于候选基因的 DNA 序列分离鉴定;另一部分采集卵泡液,用于猪卵巢颗粒细胞的培养。

1.2 引物的设计与合成

首先参照 GenBank 中人 NR4A1 (GenBank 登录号 NM_002135. 3) 基因序列,利用 NCBI EST-others 或 Sus scrofa 数据库搜寻到 4 个与猪同源序列 (DB781566. 1、EW505383. 2、EW445784. 2、EW506402. 2),然后将获得的序列进行拼接,以此为模板,利用 Premier 5.0 软件设计 NR4A1 基因引物 (N1F/N1R、N2F/N2R、N3F/N3R、N4F/N4R) 及半定量引物 (NBF/NBR)。NR4A1 基因表达模式分析时以 GAPDH 基因为内参,其引物为 GAP-DHF/GAPDHR。试验所用引物均由上海生物工程公司合成,详见表 1。

表 1 NR4A1 基因引物及半定量引物
Table 1 Sequences of primers used for porcine NR4A1 gene

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	产物大小/bp Product size	模板 Template
N1F	GAAAGTTGGGGGAGTGTG	55	826	DNA
N1R	GGGCTGAAGGAAAAGAAG			
N2F	CTTTTGTGTTGTGATGGCAATAGGA	55	1 150	DNA
N2R	CTGGGGGACAGCTCGGCA			
N3F	CTCCAGCGGCTCTGACTACTACGG	65	1 451	DNA
N3R	CGGCAGAACTGGCAGCGGT			
N4F	CCCCCAGTGACCAGGACC	63. 1	2 060	DNA
N4R	GGGTCAGAAGGGCAGCGT			
NBF	GCCAGCCAATCTCCTCACCT	63. 1	184	cDNA
NBR	AGCCCACTTGCGGATAACCT			
GAPDHF	ACCACAGTCCATGCCATCAC	63. 1	556	cDNA
GAPDHR	TCCACCACCCTGTTGCTGTA			

1.3 猪 NR4A1 基因的克隆及测序

参照熊远著^[14]的方法提取猪卵巢组织基因组

DNA。PCR 反应总体系: 0. 2 mmol/L dNTP, 1. 5~2. 0 μ mol/L 引物 (N1F/N1R、N2F/N2R、

N3F/N3R、N4F/N4R), 1×Buffer, 200 ng DNA 模板, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 加纯净水至 25 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 各引物的退火温度见表 1, 72 °C 延伸 35~120 s, 共计 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用胶回收试剂盒获得目的片段, 与 pMD-18T 载体连接, 转化到 DH5a, 通过白斑菌落筛选进行 PCR 扩增, 扩增产物送上海生物工程公司测序, 测序结果用 DNASTar 软件的 SeqMan 程序进行序列拼接。

1.4 猪 NR4A1 基因的序列分析

NR4A1 基因编码氨基酸序列的同源性比较采用 Blustal W 程序; 氨基酸序列及特征分析通过 Ex-PASy(<http://cnexpasy.org>)来预测。

1.5 NR4A1 基因表达模式的分析

1.5.1 卵巢颗粒细胞的分离、培养 取 3 头未成年长大母猪卵巢, 采集卵泡液, 参照乐凯^[15]的方法培养猪卵巢颗粒细胞, 在培养 24 h 后, 其培养基更换为 2 mL DMEM/F12+2 IU PMSG(孕马血清促性腺激素)+1 IU HCG(人绒毛膜促性腺激素)继续进行培养, 分别在培养后 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 收集细胞, 提取 RNA, 用于 RT-PCR 分析。

1.5.2 猪卵巢颗粒细胞总 RNA 的提取及反转录

猪卵巢颗粒细胞总 RNA 的提取采用 Tizol 一步法, 并将总 RNA 参照刘林清^[16]的方法进行反转录。

1.5.3 NR4A1 基因在猪卵巢颗粒细胞的表达

以 *GAPDH* 基因为内参, 以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。PCR 反应总体系为 25 μL: 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 0. 2 mmol/L dNTP, 1. 5~2. 0 μmol/L 特异引物(NBF/NBR), 50 ng cDNA 模板, 1×Buffer, 加纯净水至 25 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 63. 1 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 300 s, 共计 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 猪 NR4A1 基因的克隆

用 N1F/N1R、N2F/N2R、N3F/N3R、N4F/N4R 引物进行 PCR 扩增, 结果见图 1。扩增产物经回收纯化后测序, 结果显示分别扩增到 826, 1 150, 1 451 和 2 060 bp 的片段。用 DNASTar 软件的 SeqMan 程序进行序列拼接, 得到 1 条包含 CDS 序列及整个内含子序列的共 4 870 bp 的 DNA 序列, GenBank 登录号: FJ548760。

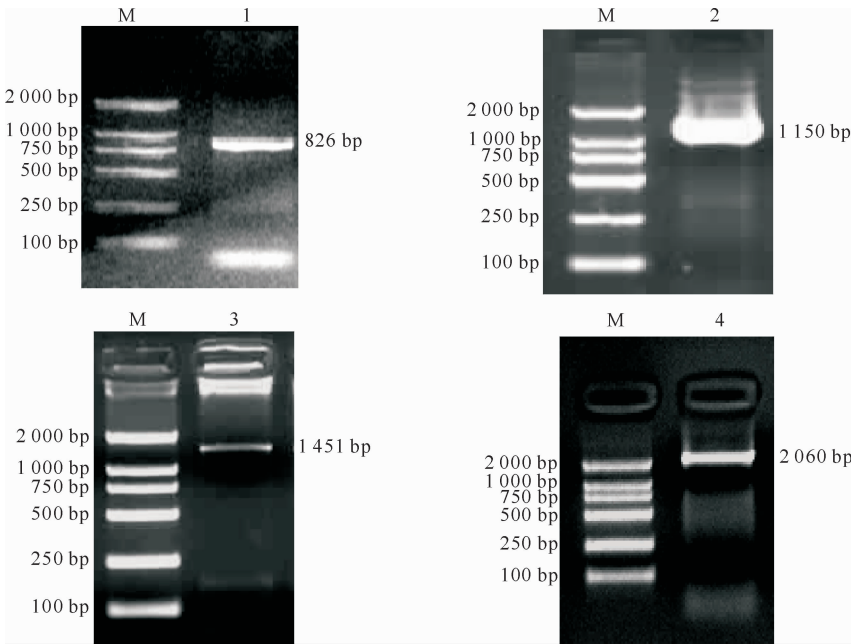


图 1 猪 NR4A1 基因 PCR 扩增结果

M. DL2000 Marker; 1. 引物 N1F/N1R 的扩增产物; 2. 引物 N2F/N2R 的扩增产物;
3. 引物 N3F/N3R 的扩增产物; 4. 引物 N4F/N4R 的扩增产物

Fig. 1 PCR amplification of porcine NR4A1 gene

M. DL2000 Marker; 1. Product of N1F/N1R; 2. Product of N2F/N2R;
3. Product of N3F/N3R; 4. Product of N4F/N4R

2.2 猪 NR4A1 基因的序列分析

ORF Finder 软件分析结果表明,猪 NR4A1 基因 ORF 为 1 734 bp,编码 572 个氨基酸。采用 Blustal W 程序对猪、人、小鼠 3 种动物 NR4A1 基因编码的氨基酸序列的同源性进行比较,结果(图

2)显示,该序列与人 NR4A1 (GenBank 登录号: NM_002135.3)和小鼠 NR4A1 (GenBank 登录号: NM_010444.1)基因编码的氨基酸序列相似性分别为 97%和 94%,表明该蛋白的氨基酸序列非常保守。

人 Human	MPCIQAYQYGTAPSPGPRDHLASDPLTPEFIKPTMDLASPEAAAPALTALPSFSTFMDGY	60
小鼠 House mouse	MPCIQAYQYGTAPSPGPRDHLTGDPLALEFGKPTMDLASPETAPAAPATLPSFSTFMDGY	60
猪 Porcine	MPCIQAYQYGTAPSPGSRAPPKG--PPDPRAQQAHHGPGQPRGGPRRHRPAELQHLHG--	57
人 Human	TGEFDTFLYQLPGTVQPCSSASSASSTSSSS---ATSPASASFKFEDFQVYGCYPGPLSG	118
小鼠 House mouse	TGEFDTFLYQLPGTTQPCSSACSSASSTSSSSSSATSPASASFKFEDFQVYGCYPGTLSG	120
猪 Porcine	---RLRRGV-HLPLPAAGHSPAVFIQVRG-----LPGVRLLSRHPQRXAG	98
人 Human	---PVDEALSSSGSDYYGSPCSAPSPSTPSFQPPQLSPWDGSFGHFSPSQTYEGLRAWTEQ	176
小鼠 House mouse	---PLDETLLSSSGSEYYGSPCSAPSPSTPNFQPSQLSPWDGSFGHFSPSQTYEGLWAWTEQ	178
猪 Porcine	-DPVLQRL-----LLRQPLLSPPVVTQLPAAPALPLG-WFLRPLLAQPDLRPPAGMDR	150
人 Human	LPKAS-GPPQPPAFFSFSPPTGPPSPLAQSPCLKLFPQATHQLGEGESYSMPATAFPGLAP	235
小鼠 House mouse	LPKASSGPPPPPTFFSFSPPTGPPSPLAQSSLKLFPPPATHQLGEGESYSMPAAFPGLAP	238
猪 Porcine	AAAQGFWAPPATGLLLFLQPPTGPPSPLAQSPCLKLFPSTTHQLGEGESYSMPATAFPGLVP	210
人 Human	TSPHLESGILDTPVTSTKARSGAPGGSEGRCAVCGDNASCQHYGVRTCEGCKGFFKRTV	295
小鼠 House mouse	TSPNRDTSGILDAPVTSTKSRGASGGSEGRCAVCGDNASCQHYGVRTCEGCKGFFKRTV	298
猪 Porcine	TSPHLDGSGMLDAPVTSAKARSGAPGGGEGRCACVCGDNASCQHYGVRTCEGCKGFFKRTV	270
人 Human	QKNAKYICLANKDCPVDKRRNRNRCQFCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSLKGRRGRLPSKPKQ	355
小鼠 House mouse	QKSAKYICLANKDCPVDKRRNRNRCQFCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSLKGRRGRLPSKPKQ	358
猪 Porcine	QKNAKYICLANKDCPVDKRRNRNRCQFCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSLKGRRGRLPSKPKQ	330
人 Human	PPDASPANLLTSLVRAHLDSGPSTAKLDYSKFQELVLPFHGKEDAGDVQQFYDLLSGSLE	415
小鼠 House mouse	PPDASPTNLLTSLIRAHLDSGPSTAKLDYSKFQELVLPFRFGKEDAGDVQQFYDLLSGSLD	418
猪 Porcine	SPDASPANLLTSLVRAHLDSGPSTSKLDYSQFQELVLPFHGKEDAGDVQQFYDLLSGSLE	390
人 Human	VIRKWAKEIPGFAELSPADQDILLLESFALELFILRLAYRSKPGEGKLIFCSGLVLHRLQC	475
小鼠 House mouse	VIRKWAKEIPGFIELCPGDQDILLLESFALELFILRLAYRSKPGEGKLIFCSGLVLHQLQC	478
猪 Porcine	VIRKWAKEVPGFAELSPSDQDILLLESFALELFILRLAYRSKPAEGKLIFCSGLVLHRLQC	450
人 Human	ARGFGDWIDSILAFSRSLHSLLDVDPVAFACLSALVLITDRHGLQEPRRVEELQNRIASCL	535
小鼠 House mouse	ARGFGDWIDNILAFSRSLHSLGVDVPAFACLSALVLITDRHGLQDPRRVEELQNRIASCL	538
猪 Porcine	ARGFGDWIDSILAFSRSLHSLVDVPAFACLSALVLITDRHGLQEPRRVEELQNRIASCL	510
人 Human	KEHVAAVAGEPQPASCLSRLLGKLPRLTLCTQGLQRIFYLKLEDLVPPPPPIVDKIFMDT	595
小鼠 House mouse	KEHMATVAGDPQPASCLSRLLGKLPRLTLCTQGLQRIFCLKLEDLVPPPPPIVDKIFMDT	598
猪 Porcine	KEHVSAEAGEPQPASCLSRLLGKLPRLTLCTQGLQRIFYLKLEDLVPPPPPIVDKIFMDT	570
人 Human	LPF-598	
小鼠 House mouse	LSF-601	
猪 Porcine	LPE-573	

图 2 NR4A1 蛋白氨基酸序列比对结果

阴影部分为猪 NR4A1 蛋白的氨基酸保守序列

Fig. 2 Amino acid sequence of NR4A1

The conserved amino acids residues from the porcine sequence are in shade

通过 ExPASy (<http://cnexpasy.org>) 预测猪 NR4A1 蛋白的结构,结果显示,该蛋白包含主要的 2 个锌指特征(NR C4-type),一个是激素受体超家族,另一个是 Zf-C4 超家族。

2.3 猪卵巢颗粒细胞中 NR4A1 基因的表达情况

猪卵巢颗粒细胞经性腺激素 PMSG 和 HCG 处

理后,不同时间收集细胞,提取 RNA,反转录成 cDNA,利用引物 NBF/NBR、GAPDHF/GAPDHR 进行 RT-PCR 扩增,结果见图 3。由图 3 可知,PMSG 和 HCG 加入猪颗粒细胞后 2 h, NR4A1 基因达到显著性表达,之后迅速下降直到不表达,16 h 以后又有微量表达。

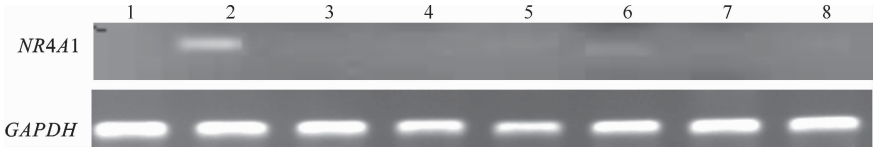


图 3 RT-PCR 方法检测猪 NR4A1 基因在卵巢颗粒细胞中的表达情况

1~8. 分别代表在 0,2,4,8,12,16,20,24 h 后收集的细胞

Fig. 3 Expression pattern of porcine NR4A1 gene in granular cells by RT-PCR

1—8. Indicate 0,2,4,8,12,16,20,24 h after collection of cell, respectively

3 讨 论

本研究结果显示,NR4A1 基因编码的氨基酸序

列在不同物种间相似性很高,表明该蛋白的氨基酸序列非常保守。本研究通过 ExPASy 预测猪 NR4A1 蛋白的结构,发现其包含主要的 2 个锌指特

征(NR C4-type),一个是激素受体超家族,另一个是 Zf-C4 超家族。以上的预测结果与其他研究者的结论^[2,4]相符合。

对 NR4A1 基因在猪卵巢颗粒细胞中表达模式的研究发现,在性腺激素处理后,可诱导猪 NR4A1 基因在卵泡发育和排卵时期瞬时表达,与 Park 等^[12-13]的研究结果是一致的。推测猪 NR4A1 基因调节卵泡的发育和排卵过程。

[参考文献]

[1] Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade [J]. Cell, 1995, 83: 835-839.

[2] Davis I J, Hazel T G, Chen R H, et al. Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77 [J]. Mol Endocrinol, 1993, 7: 953-964.

[3] Paulsen R E, Weaver C A, Fahrner T J, et al. Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 16491-16496.

[4] Kuang A A, Cado D, Winoto A. Nur77 transcription activity correlates with its apoptotic function *in vivo* [J]. Eur J Immunol, 1999, 29: 3722-3728.

[5] Zlotkin T, Farkash Y, Orly J. Cell specific expression of immunoreactive cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 during follicular development in the ovary [J]. Endocrinology, 1986, 119: 2809-2820.

[6] Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, King S R, et al. Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary [J]. Endocrinology, 1998, 139: 303-315.

[7] Morohashi K I, Honda S I, Inomata Y, et al. A common transacting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 17913-17919.

[8] Rice D A, Mouw A R, Bogerd A M, et al. A shared promoter

element regulates the expression of three steroidogenic enzymes [J]. Mol Endocrinol, 1991, 5: 1552-1561.

[9] Stocco C O, Zhong L, Sugimoto Y, et al. Prostaglandin F2a induced expression of 20a hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor Nur77 [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 37202-37211.

[10] Yin H, Lo J H, Kim J Y, et al. Expression profiling of nuclear receptors identifies key roles of NR4A subfamily in uterine fibroids [J]. Mol Endocrinol, 2013, 27(5): 726-740.

[11] To S K, Zeng J Z, Wong A S. Nur77: A potential therapeutic target in cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(6): 573-585.

[12] Park J I, Park H J, Lee Y I, et al. Regulation of NGFI-B expression during the ovulatory process [J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 202: 25-29.

[13] Park J I, Park H J, Choi H S, et al. Gonadotropin regulation of NGFI-B messenger ribonucleic acid expression during ovarian follicle development in the rat [J]. Endocrinology, 2001, 142: 3051-3059.

[14] 熊远著. 猪的生化及分子遗传实验导论 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 39-51.

Xiong Y Z. Pig biochemistry and molecular genetics: Experimental introduction [M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1999: 39-51. (in Chinese)

[15] 乐凯. 猪 ADAMTS1 基因分离、定位以及对其表达规律、遗传效应和调控机理的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.

Yue K. Cloning, radiation hybrid mapping, promoter regulation and genetics effect analysis of porcine adamts1 gene [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008. (in Chinese)

[16] 刘林清. 猪 HSD17B1、NR4A1、ALAS1 基因的分离、鉴定及功能初步研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.

Liu L Q. Isolation, identification and initial functional analysis of porcine HSD17B1, NR4A1, ALAS1 genes [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009. (in Chinese)