



# 黑线仓鼠及其白化突变系肌张力异常蛋白变体 X1 基因的克隆与序列分析研究

易思萌<sup>1,2</sup>, 刘慧芳<sup>1,2</sup>, 曾林<sup>1</sup>, 孙兆增<sup>1</sup>, 王新<sup>2</sup>

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 青岛农业大学, 山东 青岛 266109)

**【摘要】目的** 将黑线仓鼠及其白化突变系肌张力异常蛋白变体 X1 基因编码区进行序列比对分析, 试揭示黑线仓鼠及其白化突变系肌张力异常蛋白变体 X1 基因编码区之间是否存在变异。**方法** 根据小鼠与大鼠的同种型肌张力异常蛋白变体 X1 段基因设计 6 对引物, 采用 RT-PCR 的方法, 从黑线仓鼠及其白化系皮肤中扩增得到 cDNA 基因, 并对其二者进行克隆测序。**结果** 将由 RT-PCR 方法获得的基因序列进行比对后可知, 二者编码区共有 17 处差异, 氨基酸差异共 24 处, 但无关键核酸蛋白出现变异现象。**结论** 黑线仓鼠白化突变系白化性状产生, 并不是由肌张力异常蛋白变体 X1 的这段基因编码区突变造成的, 其白化性状产生的机制尚需要进一步的研究。

**【关键词】** 黑线仓鼠白化突变系; 肌张力异常蛋白; 克隆; 序列比较

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0045-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.009

## Cloning and sequence analysis of dystonin (Dst) variant X1 in *Cricetus barabensis* and albino mutant *Cricetus barabensis*

YI Si-meng<sup>1,2</sup>, LIU Hui-fang<sup>1,2</sup>, ZENG Lin<sup>1</sup>, SUN Zhao-zeng<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>2</sup>

(1. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China;

2. Qingdao Agriculture University, Shandong Qingdao 266109, China)

**【Abstract】Objective** To clone and sequence the dystonin variant X1 gene of *Cricetus barabensis* and the albino mutant *Cricetus barabensis* so as to find out the difference of encoding area of the muscular ribosome between *Cricetus barabensis* and the albino mutant *Cricetus barabensis*. **Methods** According to the same type of abnormal muscle tone protein of the mice and rats, we designed 6 pairs of primers, and got their cDNA genes from skins of the *Cricetus barabensis* and the albino mutant *Cricetus barabensis* by RT-PCR amplification, then cloned and sequenced. **Results** Sequence alignment showed 17 variances in coding areas, and 24 in amino acid, but no in key nucleic acid and protein. **Conclusion** The variances in coding areas will not lead to the albino, and its mechanism requires further investigation.

**【Key words】** Albino mutant *Cricetus barabensis*; Dystonin; Cloning; Sequence analysis

黑线仓鼠白化突变系的建立是为了给人类白化病提供动物模型, 动物白化现象出现的原因多种

多样, 关于基因突变导致白化性状的出现, 已经被很多次报道, 最常见的是有关于酪氨酸酶的研究,

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(31272387; 31030058)。

**【作者简介】** 易思萌(1990-), 女, 硕士, 研究方向: 中兽医学。

**【通讯作者】** 孙兆增(1977-), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物分子微生物学 Email: laxszz@aliyun.com; 王新(1973-), 男, 副教授, 研究方向: 中兽医学。E-mail: xinw2004me@aliyun.com。

但是对于仓鼠尤其是黑线仓鼠的白化性状的相关研究并未出现明确的相关研究报道<sup>[1]</sup>。总而言之,基因的突变导致白化简单来说就是基因控制着酶,这些酶又控制着机体生化反应的过程,最后决定了动物体的性状。但是具体是哪一部分的基因出现突变尚有待进一步的研究<sup>[1-2]</sup>。本文拟以肌张力异常蛋白变体 X1 段基因编码区作为研究对象,依照其设计出 6 对引物,再通过 RT-PCR 的方法,试图证明黑线仓鼠及其白化突变系肌张力异常蛋白变体 X1 基因编码区之间的差异性,以及与白化现象是否存在联系。肌张力异常蛋白是一种大型多域并与细胞骨架相关的蛋白质,它在神经系统中有着重要作用<sup>[3]</sup>。

肌张力异常蛋白主要分为三种亚型,分别为 dystonin-e、dystonin-a、dystonin-b; 其中的 dystonin-a 又可以通过可变剪接衍生出三种同种型神经元,分别是 dystonin-a1、dystonin-a2、dystonin-a3,肌张力异常蛋白变体 X1 是 dystonin-a 连接细胞骨架中重要的一段,以上三种同种型神经元共享的 N-末端肌动蛋白结合结构域,广泛的卷曲螺旋区域,和一个 C-末端微管结合域,从而允许用于与细胞骨架细丝相互作用并促进它们的功能,如细胞骨架连接。虽然 dystonin-a 同种型具有相似的域机构,但是区分他们并定位其亚细胞定位独特性的 N 端区域; 具体来说,dystonin-a1 是一个短的 N 端结构域,其包括一种肌动蛋白结合结构域,其位于肌动蛋白丝,而 dystonin-a2 具有跨膜结构域,它定位于核膜和核周膜;dystonin-a3 拥有去豆蔻酰化结构域,协助确定等离子体<sup>[4]</sup>。损失肌张力异常蛋白会导致小鼠和大鼠出现肌肉紧张障碍,小鼠会出现神经肌肉功能障碍甚至过早死,该蛋白血小板溶素保守区域决定了该蛋白的亚型特征,但其相互作用尚未有详细的阐述和报道<sup>[3-5]</sup>。本研究旨在明确黑线仓鼠白化突变系肌张力异常蛋白变体 X1 与其白化性状产生机制有无影响,本实验拟通过克隆肌张力异常蛋白变体 X1 段基因编码区设计的 6 对引物,分析其编码区的序列,找出可能存在的突变位点,为与黑线仓鼠及其白化突变系的相关研究,提供相应的研究数据及其理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

大肠菌株 DH5a 为本实验室保存菌种。

#### 1.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 RNases Mini Kit 为 QIAGEN 公司产品; 反转录试剂盒、pMD18-T 载体出自大连 TaKaRa 公司产品; 标准分子量核酸 DNA maker 购自 Biomed; DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒是 QIAGEN 公司的产品。

#### 1.1.3 实验动物

黑线仓鼠及其白化突变系,体重均在 19~20 g,雌性 3 只,5 周龄。均由军事医学院实验动物中心提供【SCXK(军)2007-004】。

## 1.2 方法

### 1.2.1 黑线仓鼠及其白化突变系皮肤组织总 RNA 的制备

采用活体皮肤采取的方法,采取黑线仓鼠及其白化突变系背部皮肤组织 30 mg 用于总 RNA 的制备; 将 30 mg 左右的皮肤组织剪碎移至匀浆器内,再按照说明书的提取方法抽取总 RNA,抽提的总 RNA 取 2 uL 测定 A260/A280 分析提取纯度,之后再使用甲醛变性电泳实验分析总 RNA 确定提取 RNA 的完整性。

### 1.2.2 引物设计与合成

由同种型肌张力异常蛋白设计的 6 对引物扩增全长 cDNA:

d-1-F: 5'-taaacatggagacaaactga-3'; d-1-R: 5'-cagcgattttctgtctccc-3';

d-2-F: 5'-tagcctacaaaatttgaac-3'; d-2-R: 5'-tatacactgaaacttcctga-3';

d-3-F: 5'-tgaggcacagtcagggaagt-3'; d-3-R: 5'-gatacttggtttctcct-3';

d-4-F: 5'-tgtaaaggaacatgaggatg-3'; d-4-R: 5'-aaattggattttctccaca-3';

d-5-F: 5'-tcttaaaagtgtggaggact-3'; d-5-R: 5'-aactgcttaagctgattctt-3';

d-6-F: 5'-tctagaagcttgaagaatc-3'; d-6-R: 5'-tcgttagcttctctcaat-3'。

### 1.2.3 RT-PCR

按照大连 TaKaRa 公司合成试剂盒提供的方法先用逆转录试剂盒合成 cDNA 的第一条链,并且通过 PCR 扩增获得大量的目的基因产物,之后再通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析。25 uL 的 PCR 扩增体积中,组成该体系不同组分的浓度分别为: 10 × loading Buffer 2.5 uL, dNTP 4 uL, 上游引物 1 uL,

下游引物 1 uL, cDNA 模板 2 uL, Lataq 聚合酶 0.25 uL, 最后加无菌蒸馏水至 25 uL。PCR 运行程序为 95℃ 变性 5 min; 95℃ 变性 30 s; 6 对引物的退火温度分别为 d1 55℃、d2 59℃、d3 64℃、d4 58℃、d5 58℃、d6 61℃; 72℃ 复性延伸 2 min; 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min 后终止。

1.2.4 肌张力异常蛋白 cDNA 的克隆及其序列测定

通过 RT-PCR 大量扩增出目的基因, 再经过凝胶电泳纯化分离目的基因产物, 再用 QIAGEN 公司的胶回收试剂盒进行产物的胶回收, 之后再回收的目的基因产物连接到 pMD-18T 上, 16℃ 连接过夜, 再将连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态里, 通过菌液 PCR 和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳的方法筛选鉴定阳性重组, 随机挑取 3 个阳性克隆分别制备成菌液, 送去 Biomed 测序。测序结果应用 BLAST 对其进行比较分析。

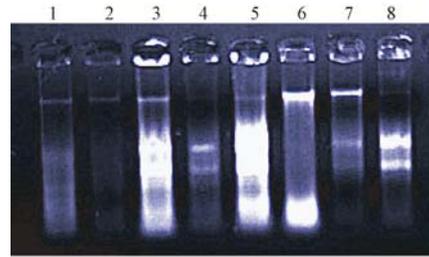
2 结果

2.1 黑线仓鼠及其白化突变系皮肤组织总 RNA 的制备

用 RNases Mini Kit 试剂盒采取黑线仓鼠及其白化突变系皮肤的总 RNA, 其 A260/A280 的值分别为 2.05、1.98、1.94、1.85; 1.95、1.98、2.03、1.88。经琼脂糖电泳后可见较清晰的八条带, 说明所抽提的总 RNA 无明显的降解, 是完整的(图 1)。

2.2 RT-PCR 获取肌张力异常蛋白及其序列测定

以黑线仓鼠及其白化突变系皮肤总 RNA 为模板, 进行反转录省去了纯化 mRNA 的步骤。RT-PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 如图 2 所示, 清晰可见各片段的扩增条带产物, 再用 QIAGEN 公司的胶回收试剂盒回收后, 连接到质粒 pMD18-T 上, 连



注: 1-4 为黑线仓鼠; 5-8 为黑线仓鼠白化突变系。

图 1 总 RNA 的甲醛变性电泳

Note: 1-4 Cricetulusbarabensis; 5-8 Albino mutant Cricetulusbarabensis.

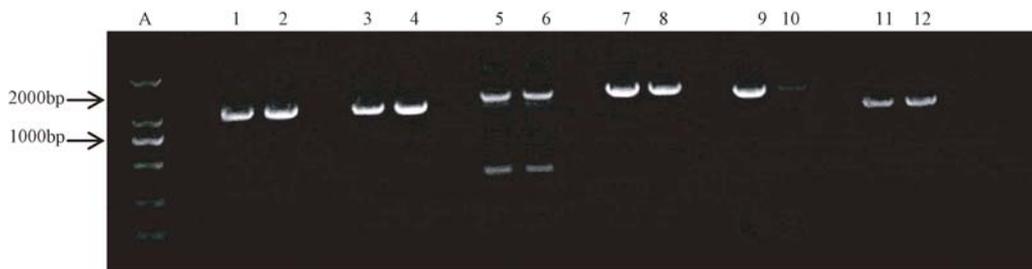
Fig.1 Electrophoresis of formaldehyde-denatured total RNA

接产物转化到大肠杆菌 DH5a 感受态中, 再经菌液 PCR 鉴定成阳性。

2.3 肌张力异常蛋白的序列比对

将 RT-PCR 扩增得到的片段送去 Biomed 公司进行拼接测序, 获得了 6 条的包含大部分编码区的序列, 编码 6 条不同片段大小的氨基酸并且利用 NCBI 的 BLAST 功能比对显示, 该序列与仓鼠的肌张力异常蛋白的基因序列具有 99% 的相似性, 由此可知该序列与仓鼠的肌张力异常蛋白变体 X1 基因序列具有高度保守性, 进一步证实了所分离基因的正确性, 可以断定该序列为黑线仓鼠及其白化突变系肌张力异常蛋白基因的编码区序列。

利用 DNASTAR 软件的 MegAlign 程序, 将黑线仓鼠及其白化突变系的肌张力异常蛋白基因序列进行比对, 发现其编码区序列共 6563 bp 仅存在 17 处突变位点, 翻译成氨基酸序列共 24 处变化, 黑:白差异点有 pos = 99 R:K、pos = 135 Y:N、pos = 140 D:N、pos = 442. :Q、pos = 442. :Q、pos = 643 K:X、pos = 789 R:H、pos = 820 D:N、pos = 851 N:D、pos = 856 G:S、pos = 890 C:Y、pos = 1034 S:P、pos = 1184 W:.、pos = 1269 E:G、pos = 1518 L:F、pos = 1528 P:S、pos



注: A: Marker 2000; 1, 3, 5, 7, 9, 11: 为黑线仓鼠; 2, 4, 6, 8, 10: 为黑线仓鼠白化突变系。

图 2 黑线仓鼠及其白化突变系肌张力异常蛋白的 PCR 电泳结果

Note: A: Marker 2000; 1, 3, 5, 7, 9, 11: Cricetulusbarabensis; 2, 4, 6, 8, 10: the albino mutant Cricetulusbarabensis.

Fig.2 Electrophoretic results of PCR products of Dystonin of Cricetulusbarabensis and albino mutant Cricetulusbarabensis

= 1883 L;. \pos = 1884 E;R\pos = 1885 A;L\pos = 1886 L;. \pos = 1887 K;R\pos = 1888 N;I\pos = 1890 Q;S\pos = 1892 K;S\pos = 2024 H;R;但关键核酸蛋白并未见突变(图 3,彩插 3)。

### 3 讨论

本实验扩增了黑线仓鼠及其白化突变系肌张力异常蛋白变体 X1 段较完整的基因编码区,该序列通过 NCBI 的 BLAST 可知,其与黑线仓鼠的肌张力异常蛋白变体 X1 段基因序列具有 99% 左右的相似性,通过对该序列的数据分析和生物信息学方法,鉴定了分离基因的正确性,黑线仓鼠及其白化突变系肌张力异常蛋白变体 X1 段基因编码区有与仓鼠等动物类似的结构序列,通过研究肌张力异常蛋白变体 X1 段基因序列,可以进一步证实该类基因是否就是影响黑线仓鼠出现退行性白化突变的原因,但通过对该蛋白基因片段的研究可知,我们通过 RT-PCR 手段扩增得出肌张力异常蛋白变体 X1 段基因序列并进行多态分析,进而为研究肌张力异常蛋白基因与黑线仓鼠白化性状产生机制提供了相应的理论基础。

通过 DNASTAR 的 MegAlign 软件,分析了黑线仓鼠及其白化突变系肌张力异常蛋白基因编码区的序列,发现其编码区序列存在 17 个突变位点,翻译成氨基酸序列比对发现 24 处不同,分别为:pos = 99 R;K\pos = 135 Y;N\pos = 140 D;N\pos = 442. : Q\pos = 442. :Q\pos = 643 K;X\pos = 789 R;H\pos = 820 D;N\pos = 851 N;D\pos = 856 G;S\pos = 890 C;Y\pos = 1034 S;P\pos = 1184 W;. \pos = 1269 E;

G\pos = 1518 L;F\pos = 1528 P;S\pos = 1883 L;. \pos = 1884 E;R\pos = 1885 A;L\pos = 1886 L;. \pos = 1887 K;R\pos = 1888 N;I\pos = 1890 Q;S\pos = 1892 K;S\pos = 2024 H;R;但是没有关键蛋白出现变化。说明黑线仓鼠白化突变系白化性状产生的原因与该基因导致的神经退行性疾病的产生原因不同,并不编码区序列的突变造成的,可

能是与其他基因的突变有关,黑线仓鼠白化性状产生的机制仍有待进一步的研究。

### 参考文献:

- [ 1 ] Spritz RA, Chiang PW, Naoki Oiso N, *et al.* Human and mouse disorders of Pigmentation[J]. *Curr Opin Genetics Dev* 2003, 13: 284 - 289.
- [ 2 ] Carden SM, Boissy RE, Schoettker PJ, *et al.* Albinism: modern molecular diagnosis [ J ]. *Brit J Ophthalmol*, 1998, 82: 189 - 195.
- [ 3 ] Bhanot K, Young K G, Kothary R. MAPIB and clathrin are novel interacting partners of the giant cyto-linker dystonin [ J ]. *Journal of proteome research*, 2011, 10(11): 5118 - 5127.
- [ 4 ] Ryan S D, Bhanot K, Ferrier A, *et al.* Microtubule stability, Golgi organization, and transport flux require dystonin-a2 - MAPIB interaction [ J ]. *The Journal of cell biology*, 2012, 196 (6): 727 - 742.
- [ 5 ] Duchon L W, Falconer, D. S. Dystonia Musculorum. A hereditary neuropathy of mice affecting mainly pathways [ C ]. *Journal of Physiol. Ysiology-London*. 40 West 20th Street New York, NY 10011 - 4211: Cambridge Univpress, 1963, 165 (1): 7 - 9.

[ 修回日期 ] 2014-10-22