

# 猪 *FBXL8* 基因第二内含子的克隆测序 及 SNP 位点检测

李 勇<sup>1,2,3</sup> 杨述林<sup>3</sup> 崔文涛<sup>3</sup> 牟玉莲<sup>3</sup> 唐中林<sup>3</sup> 储明星<sup>3</sup> 彭克美<sup>2\*</sup> 李 奎<sup>3\*</sup>

(1. 江西农业大学 动物科技学院, 江西 南昌 330045; 2. 华中农业大学 动物科学-动物医学院, 湖北 武汉 430070; 3. 中国农业科学院 畜牧研究所家养动物遗传资源与种质创新重点开放实验室, 北京 100193)

**摘要:** 为探明猪 *FBXL8* 基因的分子结构特征, 本试验以人 *FBXL8* 基因的 mRNA 序列作为信息探针, 搜集猪同源基因 EST 序列, 并构建 EST 重叠群 Contig, 设计出合适的引物, 以湖北通城、大白和长白猪基因组为模板, 应用 PCR 技术克隆测定 *FBXL8* 基因的第二内含子序列。序列分析结果表明猪 *FBXL8* 基因第二内含子为 855 bp。通过运用 SEQMAN 软件对 3 个品种的序列比较分析, 初步发现第二内含子的第 325、361 和 493 位碱基为 SNP 位点。

**关键词:** *FBXL8*; 第二内含子; 克隆测序; SNP 位点检测

中图分类号: S828 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)05-0938-04

## Cloning, Sequencing and SNP Site Detection of the Second Intron of Porcine *FBXL8* Gene

LI Yong<sup>1,2,3</sup>, YANG Shu-lin<sup>3</sup>, CUI Wen-tao<sup>3</sup>, MU Yu-lian<sup>3</sup>,  
TANG Zhong-lin<sup>3</sup>, CHU Ming-xing<sup>3</sup>, PENG Ke-mei<sup>2\*</sup>, LI Kui<sup>3\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. The Key Laboratory for Domestic Animal Genetic Resources and Germplasm Innovation, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In order to explore the molecular structural feature of porcine *FBXL8* gene, the Homo *FBXL8* mRNA sequence was used as an information probe to search for the porcine homologous ESTs sequence in this experiment, and the ESTs contig was constructed. Then the primers were designed according to it. Tongchen, Landrace and large white breeds DNA were used as the genomic template to amplify the second intron of porcine *FBXL8* gene by PCR technique. The sequence analysis result indicates that it is a sequence of 855 bp long. Moreover, SEQMAN software was used to compare and analyze these sequences, and it was preliminarily found that there are three SNPs in the 325<sup>th</sup>, 361<sup>th</sup> and 493<sup>th</sup> site respectively.

**Key words:** *FBXL8*; intron 2; cloning and sequencing; SNP site detection

收稿日期: 2011-08-29 修回日期: 2011-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571330、30700569)、江西省科技支撑计划项目和江西省农业厅项目

作者简介: 李勇(1970—) 男, 副教授, 博士, 主要从事基础兽医学研究, E-mail: liyong@mail.jxau.edu.cn; \* 通讯作者: 李奎 教授, 博士, E-mail: kuili@iascaas.net.cn; 彭克美 教授, 博士, E-mail: pengkm@mail.hzau.edu.cn。

在20世纪80年代初由 Avram Hershko、Aaron Ciechanover 和 Irwin Rose 等科学家发现和认识泛素-蛋白酶体途径,三人以此项成果共享2004年诺贝尔化学奖。泛素-蛋白酶体途径由泛素、泛素活化酶、泛素结合酶、泛素连接酶、26S蛋白酶体和泛素解离酶等组成。靶蛋白的降解必须经由以上酶所形成的级联反应过程<sup>[1]</sup>。泛素-蛋白酶体途径是已知的所有真核生物体内具有高度选择性及最为重要的蛋白质降解途径。而其中泛素连接酶对靶蛋白的特异性识别起关键作用<sup>[2]</sup>。连接酶又分成2种类型,一种是单蛋白,而另一种是多蛋白复合体,包括 SCF 等3种复合体<sup>[1]</sup>。泛素连接酶 SCF 复合物由 F-box、Skp1、Cul1、Rbx1 和 Nedd8 等5种成分构成。其中 F-box 蛋白在其中扮演重要的角色,一方面与 Skp1 结合,另一方面通过蛋白质间的互作区域与很多特异性底物配对<sup>[3]</sup>。SCF 复合物通过 F-box 蛋白捕获不同的底物,是决定泛素化特异性的关键所在<sup>[4]</sup>。随着越来越多的新型泛素连接酶的发现,其在蛋白质降解途径的分子作用机制和功能也成为当今的研究热点。由 *FBXL8* 基因编码的蛋白属于 F-box 蛋白家族,本试验初步探明猪 *FBXL8* 基因的部分分子特征,为进一步深入研究其分子特性和功能奠定基础,丰富了 F-box 蛋白家族的分子生物学信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验样品 采用中国农业科学院畜牧研究所基因与细胞工程室收集的长白猪、大白猪和湖北通城猪的 DNA 样品。

1.1.2 主要试剂 dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖、大肠杆菌  $DH_{5\alpha}$ 、LB 液体培养基、LB 固体培养基、氨苄青霉素、琼脂糖、酵母浸出物、胰蛋白胨、溴化乙锭、矿物油。

1.1.3 主要仪器 德国 Eppendorf PCR 仪、高速冷冻离心机、电泳仪、台式高速离心机、超净工作台、恒温培养箱、柯达数码凝胶成像系统、高压灭菌锅、旋涡混合器、恒温振荡器、暗箱式紫外投射仪。

1.1.4 主要网站和软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>、Primer Premier 5.0、DNASTAR 5.01 软件。

### 1.2 引物设计

首先查找并运用人 *FBXL8* 基因的 mRNA 序列作为信息探针,利用 NCBI 中的 BLAST 工具在猪的 EST 数据库中搜集同源 EST 序列,构建 EST 重叠群并得出 Contig 序列,并分析其第二和第三外显子的可能片段以用于设计克隆猪 *FBXL8* 基因第二内含子的引物,然后运用 primer premier 5.0 软件设计扩增第二内含子的引物序列,并由北京英骏生物技术有限公司合成,引物预计扩增片段为 1 050 bp。上游和下游序列分别如下:

SENSE PRIMER: 5'-CAACTGCCTGAGGAGGTGCT 3'。

ANTI-SENSE PRIMER: 5'-GCCGTAGATTGTGAACGTGGT 3'。

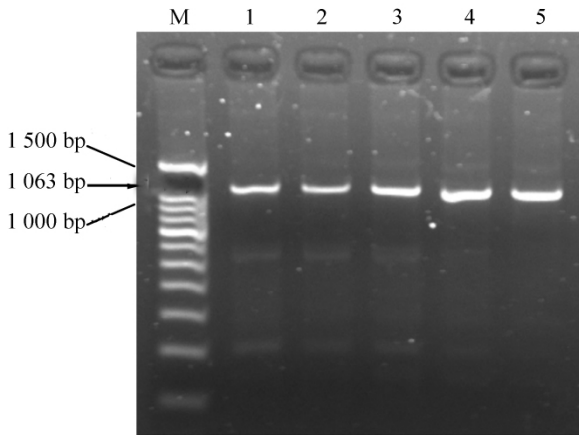
### 1.3 PCR 扩增

在 55~62℃ 温度内设计了5个退火温度梯度进行试扩增,结果表明引物对在不同退火温度条件下均可以扩增获得明显的预期片段,但在 62℃ 时特异性较好,可以得到更多的 PCR 产物。

因此,选择以上最佳扩增条件设计其 PCR 反应体系:以长白猪、大白猪和湖北通城猪的 DNA 为模板,PCR 反应总体积为 20 μL,其中模板 DNA 为 100 ng,含 1×buffer,1.0~1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,dNTP 终浓度为 150 μmol/L,引物终浓度为 0.2 μmol/L,2.5 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增程序:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,循环 30 次,最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 反应产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外灯下拍照。

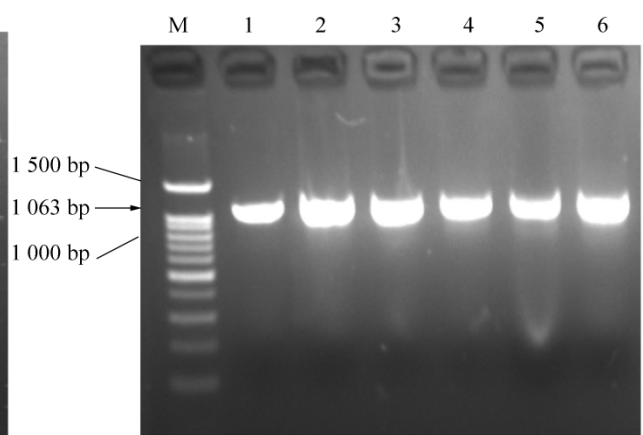
### 1.4 PCR 产物的纯化、克隆、鉴定和测序

在紫外灯下从琼脂糖凝胶找到并切下含目的片段的凝胶,按照凝胶回收试剂盒说明书操作,回收 DNA 目的片段并将其存于 Eppendorf 管中。然后将纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接过夜,次日将其与感受态细胞  $DH_{5\alpha}$  混匀进行转化,涂布于琼脂糖平板上,置于恒温箱中培养。12 h 后挑取平板上的单菌落,接种于 LB 液体培养基中,振荡培养过夜。次日采用菌落 PCR 的方法鉴定后,送北京英骏生物技术有限公司测序<sup>[5]</sup>。



M: 100 bp ladder marker; 1: 55.0; 2: 56.3; 3: 58.0; 4: 60.5; 5: 62.0(不同退火温度)。  
M: 100 bp ladder marker; 1: 55.0; 2: 56.3; 3: 58.0; 4: 60.5; 5: 62.0( different annealing temperatures) .

图1 猪 *FBXL8* 基因第二内含子扩增温度优化  
Fig.1 Amplification temperature optimization for the second intron of porcine *FBXL8* gene



M: 100 bp ladder marker; 1 和 2: 通城猪; 3 和 4: 长白猪; 5 和 6: 大白猪。  
M: 100 bp ladder marker; 1 and 2: Tongcheng pig; 3 and 4: Landrace; 5 and 6: Large White.

图2 猪 *FBXL8* 基因第二内含子的琼脂糖凝胶电泳  
Fig.2 The agarose gel electrophoresis for the second intron of porcine *FBXL8* gene

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

*FBXL8* 第二内含子的 PCR 扩增产物的电泳凝胶图显示在 1 100 bp 附近有一明显的扩增片段条带(图1),与预测目的条带相符。测序得出此序列长度为 1 063 bp,通过多序列对比分析发现其中包含一段长度为 855 bp 的第二内含子序列(图3),*FBXL8* 基因第二内含子的两端具有外显子/内含子的保守拼接位点 GT - AG。

```

GTAAGCCATCTCCTTCCCCTCCCACCTTCTGTCTTGGTGGAGTCGTGGTTGGGAGATGCCATGACT
CTCCCATATTTAAAAGGCATAATCATTCTAACATTTATTGGCTGCCTACTGTGACTAACCATTGTT
CTGAGTGCTTTACATTTAATTGATTAATTAATTAATTTGTCTTTTCTAGGGCCACTCCCTCAGCATATG
GAGGTTCCAGGCTAGGGATCTAAACGGAGCTGTAGCCGCCAGCTACAGCCACGCCAGATCTGAG
CTGCGTCTGCGACCTACACCACAGCTCACAAAACGCTGGATCCTTAACCCACTGA GTGAGGCCA
GGGATCTAGCCCACAACCTCATGGTTC CTAGTCCGATTTCGTTAACCCTGAGCCACGATGGGAACT
CCATTACATATATTTATTTAATCCTCACGAAAACCTTTATGTGATAGGTATCTCCATTGCACAGGTAGA
AAATTGAGGCAGAGAGATTTAATCA ATTTCATCAGCCGTGAAGTAGCAGAGGCGTGTGATGAACCT
GGCAATTCCGGAGGCCACACTTCACCTCCTTAAAGACCCCTGGGAAAGCCTAGTTCTTAAAACATA
ACTGGCTCTCCCTGGCATGTTTCAGCTAGTGGCAGATGCATCTGAAGTCTTCTAAAGGGGTTAGA
TGGGAGATCCCTCCTAGCATCACAATGAAGCGACCAGGCATGCTCGGGAGAGGGAGGTATCTGGG
TAGTGGGCAGGAAGTGGCTATGAAAGTGGGCCAGGCTGAGGGGTGGGTGGAGGCCTCTCTCCAG
GTCGCGGGGACTCTGCCGGCTGGCAGCTGGCCGATGCCTTTTCTCCACCTTTCTACCCCAAG
  
```

粗体 GT - AG: 外显子/内含子的保守拼接位点; 划线部分为突变碱基。

Bold GT - AG: the conserved splice sites of exon/intron; the bases with underline represent the mutation bases.

图3 猪 *FBXL8* 基因第二内含子序列

Fig.3 The second intron sequence of porcine *FBXL8* gene

### 2.2 第二内含子 SNP 位点检测

为了预测和分析其 SNP( Single nucleotide polymorphism) 位点,本试验采用通城、长白和大白 3 个不同猪种进行扩增与克隆测序,电泳凝胶图显示三者所扩增出的 PCR 产物目的片段长度均一,引物具有

较好的特异性(图2) 3个不同样品测序结果均含有855 bp长的第二内含子。

通过 SEQMAN 进行序列比较分析发现三不同猪种序列具有以下3个碱基突变位点,在第325位、361位和493位分别具有G与A、C与T、A与G碱基突变,运用 primer premier 5.0 软件分析可知其突变并没有引起酶切位点的改变,因此并不适合应用酶切法进行群体遗传学多态性分析。

### 3 讨 论

FBXL 亚家族作为 E3 连接酶中的一个大家族,可通过蛋白结构域的相互结合识别特异性的不同底物,从而将该种底物泛素化,后将其呈递并经历蛋白降解途径,从而将此蛋白水解。目前通过对同家族中的基因研究发现,这些基因的蛋白遍在化水平会直接影响到底物蛋白在细胞中的水平,甚至很多癌征的发生与此类基因相关。因此涉及遍在蛋白化的这些基因功能和分子生物学特性的研究越来越引起科学家的关注。

通过 NCBI 查询结果显示人同源基因 *FBXL8* 第二内含子序列长度为 910 bp (GeneID: 55336),鼠 *FBXL8* 基因第二内含子序列长度为 844 bp (GeneID: 50788),而猪 *FBXL8* 基因第二内含子序列长度为 855 bp,由此可见,其序列长度在三种属间存在明显的差异性,其序列长度介于两者之间。经过在线 Blast 软件进行与人和鼠的序列比较分析发现,其序列相似性较低。

从人 *FBXL8* 基因组结构信息可知其序列长度较短,mRNA 序列仅为 1 599 bp,基因组结构包括两个内含子和 3 个外显子,据此可推测猪 *FBXL8* 基因的分子结构信息应该较为简单。目前,猪 *FBXL8* 基因的分子生物学特性还没有任何报道,探明猪 *FBXL8* 基因的分子结构信息,将可进一步丰富和完善猪 E3 连接酶的分子生物学信息。

#### 参考文献:

- [1]倪晓光,赵平.泛素-蛋白酶体途径的组成和功能[J].生理科学进展,2006,37(3):255-258.
- [2]杨东叶,刘凯于,余泽华.泛素连接酶 E3[J].细胞生物学杂志,2005,27:281-285.
- [3]沈林海,陈加平,徐立红.SCF 和 APC/C 的结构及功能[J].细胞生物学杂志,2007,29:487-492.
- [4]杨娜,侯巧明,南洁,等.泛素连接酶的结构与功能研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2008,35(1):14-20.
- [5]Shan T L, Tang Z L, Guo D Z, et al. Partial molecular cloning, characterization, and analysis of the subcellular localization and expression patterns of the porcine *OTUB1* gene[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36: 1573-1577.

## 我校校长黄路生教授获“‘十一五’国家科技计划执行突出贡献奖”

根据国家科技部下发的《关于表彰十一五国家科技计划工作先进集体和个人的决定》(国科发计(2011)49号文件),我校黄路生教授荣获“‘十一五’国家科技计划执行突出贡献奖”。这是国家科技部对“十一五”期间国家科技计划执行及完成情况业绩突出的科技工作者的高度肯定与奖励。

“十一五”期间,黄路生教授一直致力于家猪经济性状形成的遗传解析及优质高产猪种培育的基础研究,部分猪育种技术应用生产后产生了良好经济效益。凝聚了一支年轻稳定的科研创新团队。主持完成了国家杰出青年基金、国家 973 及前期项目和子课题、国家 863、国际合作重点项目、欧盟第五框架计划、教育部新世纪优秀人才、教育部高等学校重大项目培育资金、农业部农业结构调整重大技术专项等各 1 项、国家自然科学基金项目 3 项、国家农业科技成果转化项目、国家现代生猪产业技术体系岗位专家专项各 1 项。获省部级以上科技奖励 4 项,其中获得的江西省技术发明一等奖(2010)和江西省自然科学一等奖(2009)各 1 项,均为江西省科技奖励制度设奖以来农业领域迄今唯一的一等奖奖项。发表论文 72 篇,其中 SCI 论文 61 篇。