

藏羚羊肌红蛋白(MGB)基因编码区的克隆与分析

马兰 白振忠 杨应忠 靳国恩 韵海霞 格日力*

(青海大学医学院高原医学研究中心 西宁 810001)

摘要:为了探讨藏羚羊低氧适应的分子生物学机制,从藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)骨骼肌组织中提取总RNA,通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术扩增出MGB基因编码区cDNA片段,并与pGEM-T Easy载体连接构建重组质粒,转化DH5 α 菌。扩增培养后鉴定阳性质粒并进行序列测定,结果与NCBI数据库进行比较。结果显示,MGB基因编码区由465 bp组成,编码154个氨基酸。其序列与绵羊、牛、猪、人、小鼠、大鼠的同源性分别是98%、97%、90%、86%、82%、81%。推测出的氨基酸序列与绵羊、牛有98%同源性,而与猪、人、小鼠及大鼠分别有89%、85%、80%、79%的同源性。与NCBI数据库登录的绵羊的MGB cDNA序列比较发现,藏羚羊MGB基因的21位和78位密码子分别发生了突变(GGT \rightarrow GAT和GAA \rightarrow AAG),其对应的氨基酸分别由甘氨酸变为天冬氨酸及谷氨酸变为赖氨酸。至此,成功克隆出藏羚羊MGB基因编码区,为进一步揭示藏羚羊低氧适应的分子机制打下基础。

关键词:藏羚羊 肌红蛋白 基因克隆 低氧适应

中图分类号:Q781 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)05-70-06

Cloning and Sequencing of Myoglobin Coding cDNA from Tibetan Antelope

MA Lan BAI Zhen-Zhong YANG Ying-Zhong JIN Guo-En YUN Hai-Xia GE Ri-Li*

(Research Center of High Altitude Medicine in Qinghai University Medical College, Xining 810001, China)

Abstract: In order to explore the molecular mechanism of Tibetan Antelope (*Pantholops hodgsonii*) adaptation to chronic hypoxia, total RNA was isolated from Tibetan Antelope skeleton muscle, and the coding region of MGB gene was amplified by RT-PCR technique using a general PCR primer based on previously reported cDNA sequence in sheep, cattle, pig, human, mouse and rat. The product of PCR was directly inserted into the pGEM-T Easy vector and sequenced. DNA sequences were compared with Genbank data by Blast. The results showed that MGB gene coding region is composed of 465 bp and codes 154 amino acids. DNA sequencing proved that Tibetan Antelope MGB sequence was highly homologous with that of sheep (98%), cattle (97%), pig (90%), human (86%), mouse (82%) and rat (81%). The deduced amino acid sequence showed 98%, 98%, 89%, 85%, 80% and 79% identity when compared with that of the sheep, cattle, pig, human, mouse and rat. When comparing the MGB sequence of *P. hodgsonii* with that of sheep, two variations could be observed at the codon of 21 (GGT \rightarrow GAT) and 78 (GAA \rightarrow AAG), which leads to two variations on the corresponding amino acid: Gly \rightarrow Asp and Glu \rightarrow Lys, respectively. In summary, we

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30660052),青海省重点科技攻关项目(No. 2003-N-120);

* 通讯作者, E-mail: geriligao@hotmail.com;

第一作者介绍 马兰,女,助教,硕士;主要从事高原医学研究; E-mail: judym1-325@163.com.

收稿日期: 2006-12-21, 修回日期: 2007-07-10

successfully cloned the MGB gene coding region from Tibetan Antelope ,which is important for understanding the molecular mechanism of Tibetan Antelope Adaptation to chronic hypoxia.

Key words :Tibetan Antelope ; Myoglobin ; Gene clone ; Adaptation of hypoxia

氧作为生命活动最重要的自然因素,是人类及许多生物赖以生存的重要条件。机体内氧的结合、转运等过程主要是通过一系列携氧珠蛋白来实现的,其功能是协助将氧分子转运到线粒体中,参与细胞的氧化磷酸化和 ATP 的生成。高寒和缺氧是高原地区的两个重要的特征,生活在高原地区的高原土著动物,在长期的适应进化过程中必将形成自己独特的低氧适应策略^[1]。藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)是青藏高原特有的国家一级重点保护野生动物。它主要分布在西藏和青海大部以及新疆南缘、四川西北部和甘南西南的部分地区。栖息高度在 3 500 ~ 5 500 m,尤以 4 500 ~ 5 500 m 的高原无人区比较常见^[2],常在高寒草甸、高寒草原、高寒荒漠的生态环境中生活,在长期进化过程中,形成了独特的适应高原低温、低氧环境的机制。目前研究显示,脊椎动物中有 4 种携氧珠蛋白,分别为血红蛋白(hemoglobin, HGB)、肌红蛋白(myoglobin, MGB)、脑红蛋白(neuroglobin, NGB)和胞红蛋白(cytoglobin, CGB)^[3]。它们在机体实现氧转运、氧储存、氧利用及氧清除的过程中发挥重要作用。MGB 主要在骨骼肌细胞和心肌细胞中表达,尤其是在 I 型肌纤维细胞中高表达,它在肌肉中的主要功能是携氧(oxygen carry)、储氧(oxygen storage)和氧缓冲(oxygen buffering)作用^[4,5]。以往有许多物种的 MGB 基因序列已有报道,但藏羚羊的 MGB 基因序列尚未见报道。为了进一步在基因水平上揭示 MGB 在藏羚羊高原低氧适应中的作用,探索在低氧环境下 MGB 对氧运输、氧利用和氧储存的调控机制,分析藏羚羊抗缺氧、高运动耐力的机制,本文对藏羚羊肌红蛋白基因编码区进行了克隆与测序。

1 材料与方法

1.1 材料来源

经国家林业局批准(林护批字

[2003]194 号),于 2004 年 9 月在青海省可可西里自然保护区捕捉藏羚羊 1 只,颈总动脉采血后放血处死,就地解剖,取所需组织迅速投入液氮中,低温保存并运回西宁。

1.2 主要试剂 Trizol 试剂及 pGEM-T Easy 载体均购自 Promega 公司, dNTP Mix、Taq DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶 Superscript (200 U/ μ l) 和限制性内切酶 *EcoR* I 均为 TaKaRa 公司产品, QIAquick Gel 回收试剂盒为 QIAGEN 公司产品。

1.3 引物设计 利用 GenBank 中绵羊(*Ovis aries*, DQ995220)、牛(*Bos taurus*, NM_173881)、人(*Homo sapiens*, BC014547)、猪(*Sus scrofa*, NM_214236)、小鼠(*Mus musculus*, BC025172)及大鼠(*Rattus norvegicus*, BC070511)的 MGB cDNA 序列输入到 DNAMAN 软件,通过核酸序列的同源比对,得到 MGB 核酸序列的高度保守区。根据 Xu 等^[2]对藏羚羊的前期研究结果,藏羚羊与绵羊的亲缘关系最近,故参照绵羊的 MGB 基因设计如下引物:上游引物(Mgb-F)序列为 5'-ATGGGGCTCAGCGACGGGGA-3',下游引物(Mgb-R)序列为 5'-TTAGCCCTGGAAGCCCAGC-3'。引物的设计与评价用 DNAMAN 软件进行。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成,使用浓度为 20 μ mol/L。

1.4 总 RNA 提取 藏羚羊骨骼肌组织总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂一步抽提法进行。用 DU800 核酸蛋白含量检测仪(BEAKMAN 公司)测定 A_{260} 和 A_{280} 及浓度,并进行 1% 的甲醛变性凝胶电泳,检测其质量, -80℃ 冰箱保存备用。

1.5 RT-PCR 扩增及序列测定

1.5.1 cDNA 第一链的合成 取总 RNA 1 μ g、OligodT 2 μ l 混匀后置于 70℃ 水浴 5 min,于冰上快速冷却,稍离心,加入 5 \times 逆转录缓冲液 5 μ l, dNTP Mix (2.5 mmol/L) 2.5 μ l, M-MLV 反转录酶 1 μ l, RNA 酶抑制剂 0.5 μ l,其余用无 RNA 酶灭菌水补充至 25 μ l,混匀后 42℃ 反应 90 min,

然后 95℃ 孵育 5 min 结束后 -20℃ 冰箱保存备用。

1.5.2 PCR 扩增反应 取合成的 cDNA 模板 1 μ l, 依次加入 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, dNTP Mix 4 μ l, 引物 Mgb-F 及 Mgb-R 各 0.25 μ l, *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ l, 加无菌去离子水补足至 25 μ l。PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 6 min, 94℃ 40 s, 60.2℃ 40 s, 72℃ 1 min, 循环 30 次, 72℃ 延伸 10 min。

1.5.3 PCR 产物的回收、纯化及序列测定 取 PCR 全部反应液进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 检验扩增结果, 按照 QIAquick Gel 回收试剂盒说明回收纯化特异性扩增片段。将回收纯化的片段连接到 pGEM-T Easy 载体上, 连接产物转化感受态 DH5 α 细胞, 用含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 培养基 37℃ 过夜培养。从转化的平板上挑白斑单克隆, 接种后 37℃ 摇床过夜。提取质粒, 用 *EcoR* I 酶切, 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 选出含有目的片段的克隆, 送上海英骏生物技术有限公司测序。将获得的序列在 GenBank 上进行 Blast 初步比较分析, 并将相关物种绵羊、牛、猪、人、小鼠及大鼠的 MGB 基因 cDNA 序列下载, 在 DNAMAN 软件上进行同源性比较。

2 结果

2.1 藏羚羊总 RNA 提取 利用 Trizol 试剂一步抽提法提取藏羚羊骨骼肌组织总 RNA, 经 1% 变性琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色, 紫外灯下显示 28S rRNA 亮度大约是 18S rRNA 亮度的 2 倍, 说明提取的总 RNA 完整, 没有或者很少降解 (图 1), 可以作为逆转录模板用于 RT-PCR。

2.2 RT-PCR 结果 以藏羚羊的肌肉组织总 RNA 为模板, 以寡聚核苷酸为引物, 在逆转录酶的作用下, 合成 cDNA。取 1 μ l 合成的 cDNA 为模板, 采取梯度 PCR 进行预实验, 寻找最佳退火温度。确定 60.2℃ 为最佳退火温度, 得到特异性条带。取 10 μ l 样品进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见一明显的大小约 465 bp 左右的特

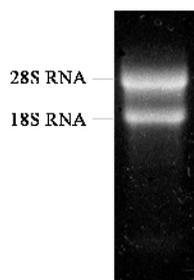


图 1 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析藏羚羊肌肉组织总 RNA

Fig.1 The total RNA of Tibetan Antelope skeleton muscle tissue as revealed by formaldehyde agarose gel electrophoresis

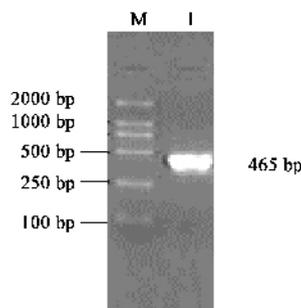


图 2 藏羚羊 MGB 基因编码区 RT-PCR 扩增结果

Fig.2 RT-PCR product band of coding region of the Tibetan Antelope MGB gene

M. DNA 分子量标准 DL2000;

I. 藏羚羊 MGB 基因编码区 RT-PCR 扩增产物。

M. DL2000 DNA marker; I. RT-PCR product of the coding region of the Tibetan Antelope MGB gene.

异性扩增片段 (图 2), 与预期产物的大小一致。
2.3 测序结果及序列分析 将 PCR 产物测序, 其结果经 NCBI 数据库 Blast 搜索, 表明测得的序列与 GenBank 中哺乳动物的 MGB 最为相似。表明本实验所克隆得到的序列为藏羚羊 MGB 基因 cDNA 序列。其开放读码框为 465 bp, 可编码 154 个氨基酸 (图 3), 该基因序列已被 GenBank 序列数据库收录, 序列号为 EF626964。

用 DNAMAN 软件, 将藏羚羊 MGB 基因 cDNA 序列与其他物种进行同源性比较分析, 结果显示藏羚羊的 MGB 基因 cDNA 序列与绵羊的

```

1  ATGGGGCTCAGCGACGGGAATGCCAGTTGGTGTGAATGCCTGGGGGAAGGTGAGGCTG
1  M G L S D G E W Q L V L N A W G K V E A
61  ATGTCGACGGCCATGGCAGGAGGTCTCATCAGGCTCTTACAGGTATCCCGAGACCC
21  D V A G H G Q E V L I R L F T G H P E T
121  TGGAGAAATTGACAAGTTCAGACCTGAAGACAGAGGCTGAGATGAAGGCCCTCCGAGG
41  L E K F D K F K H L K T E A E M K A S E
181  ACCTGAAGAAGCATGGCAACACCGTGCTCACAGCCCTGGGGGTATCTGAAGAAGAAGG
61  D L K K H G N T V L T A L G G I L K K K
241  GTCACCACGAGGCAGAGGTGAAGCACCTGGCCGAGTCACACGCCAACAGCACAAGATCC
81  G H H E A E V K H L A E S H A N K H K I
301  CTGTCAAGTACCTGGAGTTCATCTCGGACGCCATCATCCATGTTCTACATGCCAAGCATC
101  P V K Y L E F I S D A I I H V L H A K H
361  CTTCAGACTTCGGTGTGATGCACAGGCGCCATGAGCAAGCCCTGAACTGTCCGGA
121  P S D F G A D A Q G A M S K A L E L F R
421  ACGACATGGCTGCCAGTACAAGGTGCTGGGCTTCCAGGGCTAA
141  N D M A A Q Y K V L G F Q G *

```

图 3 藏羚羊 MGB 基因编码区的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of coding region of Tibetan Antelope MGB gene

加粗部分为起始密码子与终止密码子。Start codon and termination codon are bolded.

基因 cDNA 序列有 98% 同源性,而与牛、猪、人、小鼠及大鼠分别有 97%、90%、86%、82%、81% 的同源性。推测出的氨基酸序列与绵羊、牛有 98% 同源性,而与猪、人、小鼠及大鼠分别有 89%、85%、80%、79% 的同源性(表 1)。与绵羊的 MGB cDNA 序列比较发现,其密码子发生了两处突变,分别位于 21 位(GGT→GAT)和 78 位(GAA→AAG)其对应的氨基酸分别由甘氨酸变为天冬氨酸及谷氨酸变为赖氨酸(图 4)。

表 1 藏羚羊与不同物种间 MGB 基因 cDNA 序列核苷酸及氨基酸同源性比较

Table 1 Homology comparisons of the nucleotide and amino acid sequences of MGB between *Pantholops hodgsonii* and other species(%)

| | 绵羊 Sheep | 牛 Cattle | 猪 Pig | 人 Human | 小鼠 Mouse | 大鼠 Rat |
|-------------------|-------------|-------------|----------|------------|-------------|-----------|
| 核苷酸 Nucleotide | 98 | 97 | 90 | 86 | 82 | 81 |
| 氨基酸 Amino acid | 98 | 98 | 89 | 85 | 80 | 79 |

```

藏羚羊(Antelope) 1  MGLSDGEWQLVFNWVGKVEADVAGHGQEVFLIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAE
绵羊(Sheep)      1  MGLSDGEWQLVFNWVGKVEADVAGHGQEVFLIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAE
藏羚羊(Antelope) 56  MKASEDLKKHGNVLTALGGIILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPYKYLEFTISD
绵羊(Sheep)     56  MKASEDLKKHGNVLTALGGIILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPYKYLEFTISD
藏羚羊(Antelope) 111  A11HVLHAKHPSDFGADAQGAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFQG
绵羊(Sheep)     111  A11HVLHAKHPSDFGADAQGAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFQG

```

图 4 藏羚羊与绵羊 MGB 氨基酸序列的比较

Fig.4 The comparison of the amino acid sequences of MGB between *Pantholops hodgsonii* and Sheep

图中阴影部分为变异位点。Gray shades are variation sites.

进一步用 DNAMAN 软件对藏羚羊进行系统进化分析(图 5),结果发现藏羚羊与绵羊同属一个进化分支,而与人、猪、小鼠、大鼠的距离相对较远,这一结果与 Xu 等^[2]对藏羚羊线粒体基因组序列的研究中发现藏羚羊与绵羊的亲缘关系最近是相一致的。

3 讨论

低氧适应的本质是机体在低氧的条件下,能够最大程度地摄取和利用有限的氧,完成正常的生理功能^[7]。肌红蛋白作为携氧珠蛋白中的一种,在机体的氧利用中发挥了重要作

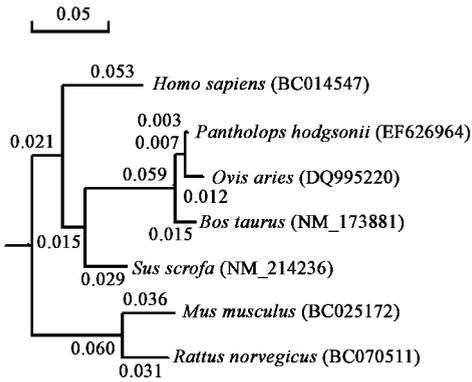


图5 藏羚羊肌红蛋白系统进化树分析

Fig.5 Analysis of phylogenetic evolution of Tibetan Antelope myoglobin gene

标尺及数据:不同物种间肌红蛋白基因的系统进化距离。

Scale and data: Phylogenetic branch distance of MGB between different species.

用^[8-11]其主要功能是通过可逆性地与氧结合和释放,促进氧从细胞质弥散到线粒体,为肌肉组织储存和转运氧^[12]。有研究报道,肌红蛋白与氧的亲合力高于血红蛋白,在同样的氧分压下,肌红蛋白结合的氧量是血红蛋白的6倍。李庆芬^[13]在人与动物呼吸系统对高海拔低氧适应的研究中发现,高原的动物和人骨骼肌中的肌红蛋白含量比平原地区的水平高,而平原居民与平原动物,如大鼠和豚鼠(*Cavia porcellus*)经过3 100~5 000 m海拔驯化后,骨骼肌中的肌红蛋白则会显著增加。反之,Reynafarje^{*}则发现,高山羊驼(*Lama pacos*)移至平原后,其肌红蛋白在6个月内降为原来的一半。显然,肌红蛋白表达水平的增加是动物对低氧适应的机制之一。

藏羚羊作为青藏高原特有的土著哺乳动物,常年生活在海拔4 500 m以上的高寒、缺氧地区,却能够以60 km的时速连续奔跑70~100 km,具有极强的耐缺氧能力。因此从基因组学角度考虑,低氧适应相关基因的克隆与鉴定对于了解高原土生动物低氧适应的分子机制尤为重要^[14]。目前,对于藏羚羊低氧适应机制的研究仅有 α -珠蛋白的研究报道^[15],但对于MGB的研究尚未见报道,因此我们克隆了藏羚羊

MGB基因编码区并测序,得到藏羚羊MGB基因cDNA序列,其开放读框为465 bp,可编码154个氨基酸。同源序列比较发现藏羚羊与绵羊的同源性最高,这与Xu等人对藏羚羊线粒体基因组序列的研究报道^[21]是一致的。将本研究的藏羚羊MGB基因cDNA序列与NCBI数据库登录的绵羊MGB cDNA序列比较发现,其密码子发生了两处突变,分别位于21位(GGT→GAT)和78位(GAA→AAG),其对应的氨基酸分别由甘氨酸变为天冬氨酸及谷氨酸变为赖氨酸。这一突变是否对肌红蛋白的结构与功能有影响,尚需要进一步的蛋白结构及功能的研究,目前我们正在进行MGB cDNA全序列的克隆和表达研究,以期填补该项研究领域的空白。

致谢 承蒙军事医学科学院基础医学研究所范明研究员、范文红博士、王晓文博士、吴燕老师、吴海涛硕士、马鑫硕士等在实验过程中提供帮助,谨此致谢!

参 考 文 献

- [1] Burmester T, Ebner B, Weich B, et al. Cytoglobin: A novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissue. *Mol Biol Evol*, 2002, **19**(4): 416~421.
- [2] Xu S Q, Yang Y Z, Zhou Z, et al. A mitochondrial genome sequence of the Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*). *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2005, **3**(1): 5~17.
- [3] Trent J T 3rd, Hargrove M S. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem*, 2002, **277**(22): 19 538~19 545.
- [4] Hoppeler H, Vogt M. Muscle tissue adaptation to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, **204**(18): 3 133~3 139.
- [5] Garry D J, Kanatous S B, Mammen P P. Emerging roles for myoglobin in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 2003, **13**(3): 111~116.
- [6] 赵同标, 赵全新, 常智杰等. 高原鼠兔低氧诱导因子-1 α 的初步研究. *兽类学报* 2003, **23**(3): 273~276.
- [7] Vogt M, Puntschart A, Geiser J, et al. Molecular adaptation in

* Reynafarje C. Kinetics of red cell formation and destruction in high altitude adapted animals. 23th international Congress of Physiological Sciences. 1965, 182.

- human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic condition. *J Appl Physiol* 2001 **91**(1):173 ~ 182.
- [8] Mammen P P , Kanatous S B , Yunhanna I S , *et al* . Hypoxia-induced left ventricular dysfunction in myoglobin-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 **285**(5):H2 132 ~ H2 141.
- [9] Grange R W , Meeson A , Chin E , *et al* . Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. *Am J Physiol Cell Physiol* ,2001 ,**281**(5):C1 487 ~ C1 494.
- [10] Merx M W ,Flogel U ,Stumpe T ,*et al* . Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *The FASEB Journal* ,2001 ,**15**(6):1 077 ~ 1 079.
- [11] Wittenberg J B , Wittenberg B A. Myoglobin function reassessed. *The Journal of Experimental Biology* ,2003 ,**206** (12) 2 011 ~ 2 020.
- [12] 马兰 格日力.高原鼠兔低氧适应分子机制的研究进展.生理科学进展 2007 **38**(2):143 ~ 146.
- [13] 李庆芬.人与动物呼吸系统对高海拔低氧的适应.生物学通报 ,1991 (10):19 ~ 31.
- [14] 陈婷方 白振忠 侯冰等.青藏高原高原鼠兔肌红蛋白(MGB)基因编码区的克隆与分析.高原医学杂志 2005 , **15**(4) 4 ~ 7.
- [15] Yang Y Z ,Droma Y D ,Jin G E ,*et al* . Molecular cloning of hemoglobin Alpha-chain gene from *Pantholops hodgsonii* , a hypoxic tolerance species. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2007 **40**(3) 426 ~ 431.