

山羊 *ST13* 基因的克隆及表达特性分析

王瑞龙^{1,2}, 李艳艳^{1,2}, 林亚秋^{1,2}, 陈定双^{1,2}, 盛雪晴², 赵楠², 刘伟^{1,2}

1 西南民族大学 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部/四川省重点实验室, 四川 成都 610041

2 西南民族大学 畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

王瑞龙, 李艳艳, 林亚秋, 陈定双, 盛雪晴, 赵楠, 刘伟. 山羊 *ST13* 基因的克隆及表达特性分析. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2959-2973.

WANG RL, LI YY, LIN YQ, CHEN DS, SHENG XQ, ZHAO N, LIU W. Cloning and expression characteristic analysis of goat *ST13* gene. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2959-2973.

摘要:本研究旨在克隆获取山羊 *ST13* 基因完整的蛋白质编码区 (sequence coding for aminoacids in protein, CDS) 序列, 并对其表达特性分析, 同时探究该基因在不同组织和诱导分化不同阶段的山羊皮下前体脂肪细胞中的表达规律。利用逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 技术克隆 *ST13* 基因, 利用在线工具和软件对该基因序列进行生物信息学分析, 利用实时荧光定量 RT-PCR (quantitative RT-PCR, qRT-PCR) 技术检测其在山羊各个组织及皮下前体脂肪细胞不同分化阶段中的表达规律。克隆获得山羊 *ST13* 基因序列长度为 1 380 bp, 其 CDS 区长度为 1 101 bp, 共编码 366 个氨基酸; 蛋白预测结果显示, *ST13* 蛋白存在 26 个磷酸化位点, 部分序列有强烈的亲水性和不稳定性, 并且属于非跨膜和非分泌蛋白; 亚细胞定位预测显示, *ST13* 大部分分布在细胞核中, 占 69.6%; 进化树显示, 山羊 *ST13* 与绵羊的亲缘关系最近; 组织表达谱显示, *ST13* 基因在山羊心、肝、脾、肺、肾等 13 种组织中均有表达, 尤其在臂三头肌和皮下脂肪中的表达量最高 ($P < 0.01$), 在心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠和胰腺中的表达量无显著性差异 ($P > 0.05$); 时序表达谱显示, 该基因在诱导分化后的脂肪细胞中表达上调, 在诱导分化第 108 小时表达最高, 显著高于其他诱导分化时间段 ($P < 0.01$); 研究表明, 该基因在山羊组织中广泛表达, 对山羊皮下脂肪细胞分化过程有重要调控作用。

关键词: 山羊; *ST13* 基因; 基因克隆; 组织表达; 时序表达

Received: November 11, 2021; **Accepted:** March 8, 2022; **Published online:** March 12, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82002817); Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (2020NYB42)

Corresponding author: LIU Wei. E-mail: 22100098@swun.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (82002817); 中央高校基本科研业务费专项基金 (2020NYB42)

Cloning and expression characteristic analysis of goat *ST13* gene

WANG Ruilong^{1,2}, LI Yanyan^{1,2}, LIN Yaqui^{1,2}, CHEN Dingshuang^{1,2}, SHENG Xueqing², ZHAO Nan², LIU Wei^{1,2}

1 Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization, Ministry of Education, Sichuan Province, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 College of Animal & Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: In this study, we cloned the complete sequence coding for aminoacids in protein (CDS) of goat *ST13* gene, analyzed the bioinformation of it, and explored the expression pattern in different goat tissues and goat subcutaneous preadipocytes at different differentiation stages. To be specific, *ST13* gene was cloned by reverse transcription PCR (RT-PCR), and the bioinformation was analyzed by online tools or software. The expression in various goat tissues and subcutaneous preadipocytes at different differentiation stages was detected by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). The results showed that the cloned goat *ST13* gene was 1 380 bp, with CDS of 1 101 bp, encoding 366 amino acids. Protein prediction results showed that *ST13* had 26 phosphorylation sites and that some sequences were highly hydrophilic and unstable. Moreover, *ST13* was a non-transmembrane and non-secretory protein. Subcellular localization demonstrated that *ST13* was mostly distributed in the nucleus (69.6%). Phylogeny analysis suggested that goat *ST13* had the highest identity to sheep *ST13*. Tissue expression pattern showed that *ST13* gene expressed in all of the collected 13 tissues of goat, including heart, liver, spleen, lung and kidney, especially in triceps brachii and subcutaneous fat ($P<0.01$) and that the expression among heart, liver, spleen, lung, kidney, large intestine, small intestine and pancreas was insignificantly different ($P>0.05$). In addition, according to the temporal expression pattern in adipocytes, the expression of *ST13* was up-regulated in differentiated adipocytes, and the expression was the highest at the 108th hour of induction, significantly higher than that at other time points ($P<0.01$). In conclusion, this gene expresses in various tissues of goat and regulates the differentiation of goat subcutaneous adipocytes.

Keywords: goat; *ST13* gene; gene cloning; tissue expression; temporal expression

随着生活水平的不断提高,人们对绿色健康的生活方式越来越重视,对肉制品的需求也发生很大转变,山羊肉因其肉质鲜美、营养丰富和低胆固醇的特点受到越来越多消费者的青睐^[1-3]。肌内脂肪 (intramuscular fat, IMF) 含量是评价肉质的一项重要指标,IMF 含量的高低对肉的嫩度、风味以及多汁性等性状均有至关重要的影响^[4]。挖掘和利用肉羊的遗传资源,

实行分子育种是将来肉羊培育的重要基础和研究方向。而筛选出一种能够调控山羊脂肪沉积的关键基因对于山羊分子育种具有重要意义。

肿瘤抑制基因 13 (suppression of tumorigenicity 13, *ST13*)^[5],是 Zheng 通过消减杂交从健康人大肠 cDNA 文库中筛选得到的与结肠直肠癌发生和发展呈负相关基因^[6]。进一步研究表明,人 *ST13* 基因基因组序列长度为

32 017 bp, 由 12 个外显子、11 个内含子组成, 其 cDNA 全长 3 145 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 编码 369 个氨基酸^[7-8]。经荧光原位杂交结合荧光 R 显带技术鉴定, 该基因位于人类 22 号染色体上^[9]。目前研究表明, 其主要作为热休克蛋白 70 (heat shock protein) 的分子伴侣在各种正常组织及肿瘤组织中发挥生物学功能, 同时与肿瘤细胞转移和细胞增殖有关。过表达研究表明, *ST13* 基因在体外对肿瘤细胞的生长有抑制作用, 尤其对结肠癌细胞的生长抑制作用较强^[10]。另有研究表明, 与正常肠粘膜组织相比, 结直肠癌组织中 *ST13* 基因的表达水平显著降低, 同时抑制结直肠癌细胞的增殖^[11]。因此, *ST13* 是与结肠癌相关的候选抑癌基因^[12-13]。陈吉等研究发现, *ST13* 在胃癌组织中的表达显著降低, 在正常胃黏膜、增生性息肉、腺瘤样息肉、胃癌组织中的表达呈递减趋势^[14]。Vijverberg 等研究发现, *ST13* 基因中的两个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) (rs138335 和 rs138337) 与使用吸入性皮质类固醇 (inhaled corticosteroid, ICS) 的哮喘患者病情恶化的风险呈正相关^[15]。

最近有研究表明, *ST13* 是编码 HSP70 相互作用蛋白 (HIP) 的基因, 是热休克蛋白 (HSC/HSP70) 的分子伴侣^[16]。HSP70 是一种重要的伴侣蛋白, 参与蛋白质折叠、聚集、转运、降解和泛素化等过程, 并可控制许多蛋白的活性^[17-19]。*ST13* 蛋白可与 HSP70 的 ATPase 结构域结合, 帮助稳定 HSP70 的 ADP 构象^[20], 使 HSP70 与底物蛋白亲和力增加, 从而参与 HSP70 与不同靶蛋白的作用。Zhang 等研究发现, HSP70 在 HepG2 细胞中的过表达促进了脂质的合成, 同时还上调了 *SREBP1C*、*Fas*、*Scd* 和 *Acc* 等成脂基因的表达^[21]。张洁蕾研究发现, HSP70 通过诱导脂质合成相关酶 FAS、SCD、

ACC 和 *SREBP1C* 的表达增加进而促进脂质合成, 诱导非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的发生^[22]。根据以上研究推测, *ST13* 基因可能在动物脂肪形成中具有重要的调控作用, 然而其在山羊中的表达特性、在羊脂肪细胞中的表达规律及生物学功能尚未见报道。

简州大耳羊是由欧美的努比山羊与简阳本地山羊杂交培育形成的肉用山羊新品种, 具有生长速度快、产肉性能优良、繁殖性能高、体格大、遗传性能稳定、耐粗饲和适应中国南方亚热带气候条件等优势^[23]。以上特点使其成为了一种备受青睐的重要羊肉生产畜种, 因此本研究以地方特色品种简州大耳羊为研究对象, 拟运用 RT-PCR 技术克隆山羊的 *ST13* 基因, 并对其进行详细的生物信息学分析, 了解其表达特性的同时, 利用 qRT-PCR 技术检测 *ST13* 基因在不同组织和各分化阶段皮下脂肪细胞中的表达, 并对其进行统计学分析, 旨在为探究其在山羊生长发育中的生物学功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样品采集

所用动物购自四川省简阳市大哥大牧业有限公司, 随机选取 4 头 1 周岁健康大耳羊, 清晨空腹屠宰后立即收集其心、肝、脾、肺、肾、背最长肌、股二头肌、臂三头肌、皮下脂肪、腹间脂肪、大肠、小肠、瘤胃和胰脏组织样品, 用 PBS 清洗干净后用灭菌剪刀剪成小块, 快速用锡箔纸包裹后装入标记好的冻存管内, 分类装入纱布袋内后置于液氮中保存。动物实验遵守相关实验动物福利规定, 并获得西南民族大学动物伦理学术委员会批准 (批准号: SMU20200724)。

1.1.2 试验试剂

反转录 (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) 试剂盒、TurboFect Transfection Reagent 购自 Thermo 公司; T 载体 (pClone007 Versatile Simple Vector Kit) 和感受态细胞 (*Trelief*TM 5 α Chemically Competent Cell) 购自成都擎科生物技术有限公司; 胶回收试剂盒、DNA Marker D2000、DNA Marker III 购自天根生化科技有限公司; 氨苄青霉素钠 (Ampicillin) 购自 Biosharp 公司; *Hind* III、*Xho* I、TB Green[®] Premix Ex *Taq*TM II、Primer STAR Max DNA Polymerase 和 TRIzol 均购自 TaKaRa 公司; 双抗、PBS、胰蛋白酶、胎牛血清及 DEME/F12 培养基购自 Gibco 公司; DEPC、油酸通过 Sigma 公司购得; 细胞培养皿等耗材由依科赛生物制品有限公司提供; 琼脂糖购自 HydraGene 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 组织 RNA 提取及反转录

取组织约 0.1 g, 加入液氮充分研磨后放入无酶 EP 管中, 参照 TRIzol 法^[24]提取 RNA, 检测 RNA 的浓度和质量, 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。按照反转录试剂盒说明书的步骤进行反转录, 合成的 cDNA 置于-20 °C 保存备用。

1.2.2 引物设计

根据 GenBank 中牛的 *ST13* 基因序列 (登录号: NM_001101926.2), 利用 Primer Premier 5.0

设计克隆引物 (表 1)。引物均由生工生物工程股份有限公司合成。

1.2.3 山羊 *ST13* 基因克隆与测序

以背最长肌组织 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 克隆山羊 *ST13* 基因。PCR 反应体系为: Primer STAR Max DNA Polymerase 12.5 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 反应总体系为 25 μ L。PCR 扩增条件: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 循环数为 35; 延伸 72 °C 5 min, 4 °C 保温。

用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应结果, 再按照胶回收试剂盒步骤进行胶回收和纯化, 并检测回收产物的浓度和纯度。将回收到的目的片段与 pClone007 Versatile Simple Vector 载体在 25 °C 金属浴中连接 5 min, 连接产物转化到 *Trelief*TM 5 α 感受态细胞中, 均匀涂布于 LB 固体培养基 (AMP⁺) 上, 放入 37 °C 培养箱中过夜培养。挑取平板上肉眼可见的表面光滑的单一菌落, 接种于 LB 液体培养基 (AMP⁺) 中摇床培养 6 h。菌液进行 PCR 鉴定, 将鉴定结果呈阳性的菌液 (至少 3 个) 送至成都擎科生物技术有限公司测序。

1.2.4 山羊 *ST13* 基因生物信息学分析

山羊 *ST13* 基因生物信息学分析工具及介绍参见表 2。

表 1 克隆和荧光定量 RT-PCR 引物信息

Table 1 Primers for reverse transcription PCR (RT-PCR) and quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

Gene	Primer sequences (5'→3')	T _m (°C)	Size (bp)	Purpose
<i>ST13</i>	S: TGTATGGAGAGGCAGGCAAC A: CTCCAGCAGGGCTTTACGTC	58	1 409	PCR
<i>ST13</i>	S: TGTATGCCAAGAGAGCCAGT A: CCCTTGGTTGAACTTCCTTC	60	233	qRT-PCR
<i>ST13</i>	A: CCCA <u>AGCTT</u> CATGGACCCCCGCAAAGT S: CCCTC <u>GAGTT</u> GCATTATGCTTGACCTCCAA	58	1 101	PCR
TBP	S: AACAGCCTCCCACCTTATGC A: TGCTGCTCCTCCAAAATAGAC	60	155	qRT-PCR
UXT	S: GCAAGTGGATTGGGCTGTAAC A: ATGGAGTCCTTGGTGAGGTTGT	60	173	qRT-PCR

Note: S: sense primer; A: antisense primer. The underlined bases indicated the restriction enzyme sites.

表 2 生物信息学分析工具

Table 2 Bioinformatics analysis tools and corresponding functions

Analysis software tools	Function	URL
ORF Finder	Open reading frame prediction and translation of amino acid sequence	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
DNAMAN	Alignment of amino acid sequences	
ExPASy-ProtParam	Analysis of protein physical and chemical properties	https://web.expasy.org/protparam/
ExPASy ProtScale	Protein affinity/hydrophobic analysis	https://web.expasy.org/protscale/
SignalP 4.0	Signal peptide analysis	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/
TMHMM Server v.2.0	Protein transmembrane structure analysis	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
NetPhos 3.1 Server	Analysis of protein phosphorylation sites	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
NetNGlyc 1.0 Server	Analysis of protein glycosylation sites	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
SOPMA	Protein secondary structure prediction	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
STRING	Analysis of protein interaction	https://string-db.org/
PSORT II Prediction	Prediction of subcellular location	https://psort.hgc.jp/form2.html
SWISS-MODEL	Prediction of protein tertiary structure	https://swissmodel.expasy.org/
Mega 7.0	Phylogenetic tree construction	
SMART	Domain prediction	http://smart.embl.de

1.2.5 山羊 *ST13* 基因在组织表达差异分析

通过克隆得到山羊 *ST13* 基因完整的 CDS 区进行定量引物的设计 (表 1), 采用 qRT-PCR 检测 *ST13* 基因在简州大耳羊的 13 种组织中的表达水平, 以 *TBP* 作为内参基因用来矫正基因的相对表达水平^[25]。qRT-PCR 反应体系: 上、下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L)、cDNA 1 μ L、TB Green[®] Premix Ex *Taq*[™] II 10 μ L、ddH₂O 7 μ L, 构成 20 μ L 体系。qRT-PCR 运行程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性: 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 循环数为 35 个。

1.2.6 山羊 *ST13* 基因在皮下细胞不同分化阶段的表达差异分析

复苏实验室前期保存的皮下前体脂肪细胞^[26], 加入适量完全培养基 (10%胎牛血清, 90% DMEM/F-12 基础培养基, 10 kU/mL 青霉素、链霉素) 培养, 待培养皿中细胞生长至 80 % 时进行传代培养。将 F3 代细胞接种到 12 孔板, 待细胞生长至 80% 时用 (50 μ mol/L) 油酸诱导液进行诱导分化, 然后收集 0、12、

24、36、48、60、96、108 h 的细胞并提取 RNA, 反转录成 cDNA。利用 qRT-PCR 检测 *ST13* 基因在不同分化阶段皮下脂肪细胞中的表达水平, *UXT* 作为内参基因用来矫正基因的相对表达^[27]。qRT-PCR 体系建立及运行程序与组织定量相同。

1.2.7 过表达载体构建及表达效率检测

利用克隆得到的山羊 *ST13* CDS 区序列设计亚克隆引物, 选用 *Hind* III 和 *Xho* I (下划线) 为酶切位点, 引物信息如表 1 所示。以上述提取的质粒为模板进行 PCR 扩增, 将目的片段连接到 007VS 载体后测序, 将测序正确的质粒和 pCMV-Tag 2B 载体分别用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切, 纯化后利用 T4 DNA 连接酶连接, 然后转化到 *Trelief*[™] 5 α 感受态细胞, 挑取阳性菌落并进行 PCR 鉴定, 对鉴定正确的菌落提取质粒并进行测序。将测序成功的质粒转染前期复苏的皮下前体脂肪细胞 (F3), 空白组和试验组分别以 pCMV-Tag 2B 和 pCMV-ST13 转染, 48 h 后收集细胞并提取 RNA, 反转录成 cDNA。转

染体系 (12 孔板): 100 μ L opti, 2 μ L TurboFect Transfection Reagent, 500 ng 质粒。利用 qRT-PCR 技术检测 *ST13* 基因在皮下脂肪细胞中的表达效率, *UXT* 作为内参基因用来矫正基因的相对表达。qRT-PCR 体系建立及运行程序与组织定量相同。

1.2.8 数据统计及分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 qRT-PCR 数据^[28]。利用 SPSS 18.0 中 Duncan 检验对数据进行单因素方差分析, 使用 GraphPad Prism 5 绘制组织与时间表达谱, 参照 Duncan 法分析结果, 并对数据进行差异显著性标记。

2 结果与分析

2.1 山羊 *ST13* 基因克隆

以简州大耳羊背最长肌为模板, 通过 RT-PCR 扩增得到目的条带 (图 1A), 与预期结果一致。测序分析后可知, 克隆所得山羊 *ST13* 基因序列长为 1 380 bp, CDS 区的长度为 1 101 bp, 编码 366 个氨基酸 (图 3C)。经序列比对发现, 山羊 *ST13* 基因 CDS 区序列与 NCBI 数据库预测的山羊基因序列 (XM_018049073.1) 相比存在 3 个碱基的缺失和 4 个碱基的突变 (图

1B)。将测序序列上传到 GenBank, 获得基因登录号为 MW773838。

2.2 山羊 *ST13* 基因生物信息学

2.2.1 氨基酸序列同源性

通过 DNAMAN 比对不同物种 *ST13* 基因所编码的氨基酸序列发现, 简州大耳羊的氨基酸序列与绵羊 (XP_027823941) 的氨基酸序列相似性最高, 达到 99.45%, 其次是狗 (NP_001239347), 相似性为 96.75%, 牛 (NP_001095396)、马 (NP_001296253)、小鼠 (NP_598487) 和人 (NP_001265518) 的相似性依次为 95.66%、95.66%、92.20%和 92.14%, 以上结果表明, 该基因在不同物种间具有较高的保守性 (图 2)。

2.2.2 山羊 *ST13* 蛋白理化性质

使用 ExPASy-ProtParam 在线工具对山羊的 *ST13* 蛋白进行分析, 结果显示, 山羊 *ST13* 蛋白质分子式为 $C_{1774}H_{2844}N_{514}O_{568}S_{20}$, 分子质量为 41.102 4 kDa, 等电点 pI 约为 5.22, 脂肪指数为 65.68, 在氨基酸组成中, 谷氨酸 (Glu) 含量为 12.0%, 是占比最高的氨基酸, 丙氨酸 (Ala) 次之, 占比为 10.1%; 该基因编码的蛋白质中, 带负电荷的氨基酸残基 (Asp+Glu) 数为 69, 带正电荷的氨基酸残基 (Arg+Lys)

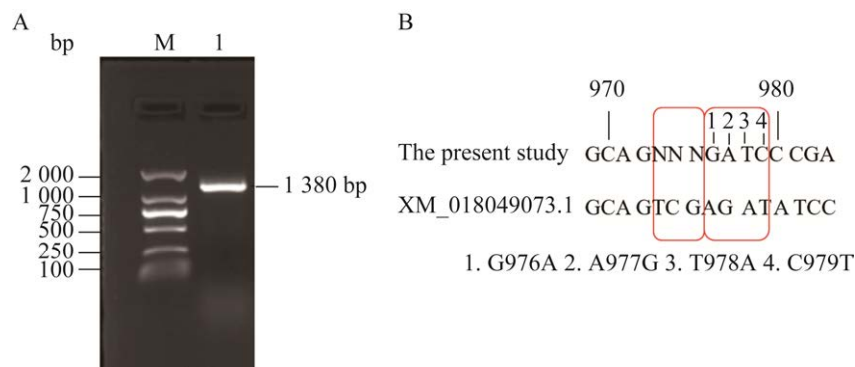


图 1 山羊 *ST13* 基因克隆

Figure 1 Cloning of goat *ST13* gene. (A) M: D2000 DNA marker; lane 1: *ST13* gene. (B) The nucleotide sequence of the CDS region of goat *ST13* gene (XM_018049073.1) is compared with the sequence of the results of this study, and the potential site mutations (1: G976A; 2: A977G; 3: T978A; 4: C979T) are shown in the box middle.

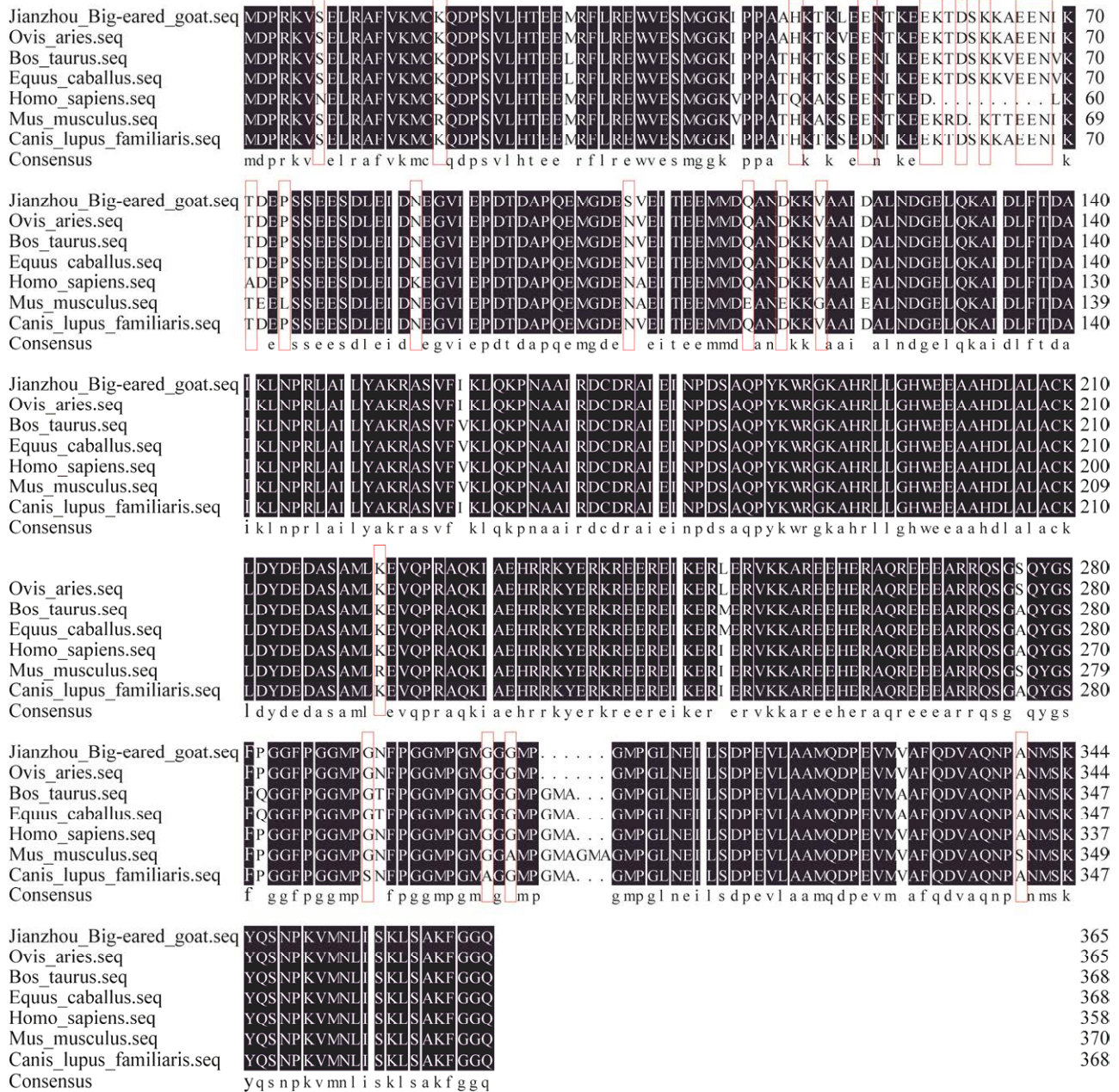


图 2 山羊和其他物种间 ST13 氨基酸序列比对

Figure 2 Alignment of amino acid sequence of ST13 between goat and other species. Black homology=100%. Wireframe section $\geq 75\%$. White homology $< 50\%$.

数为 55, 表明山羊 ST13 蛋白可能带负电荷; 亲水性总平均值为 -0.854 , 不稳定指数为 56.97, 说明该蛋白可能是亲水不稳定蛋白 (表 3)。跨膜结构域预测显示, 山羊 ST13 蛋白没

有明显的跨膜区域, 属于非跨膜蛋白 (图 3A)。山羊 ST13 蛋白的信号肽预测结果显示, S 平均值为 0.135, 低于 0.5, 表示山羊 ST13 蛋白没有信号肽, 属于非分泌蛋白 (图 3B)。蛋

白磷酸化修饰位点预测发现, 山羊 ST13 蛋白的 366 个氨基酸中存在 26 个磷酸化位点, 包括 7 个苏氨酸 (T) 磷酸化位点、4 个酪氨酸 (Y) 磷酸化位点、15 个丝氨酸 (S) 磷酸化位点; 蛋白糖基化修饰位点预测显示, 该蛋白有 12 个 N-糖基化修饰位点, 分别位于序列的第 54、68、85、115、126、144、165、178、292、311、338 和 353 位氨基酸处; 结构域预测显示, 该蛋白有 4 个 TPR 结构域 (图 3C)。

表 3 山羊 ST13 蛋白基本理化性质

Table 3 Basic physical and chemical properties of the ST13 protein of goats

The basic properties of protein	Forecast result
Amino acid number	366
Atom total	5 720
Relative molecular weight	41 102.40
Theoretical pI	5.22
Unstable index	56.97
Fatty index	65.98
Hydrophilicity	-0.85
Half-life	30 h

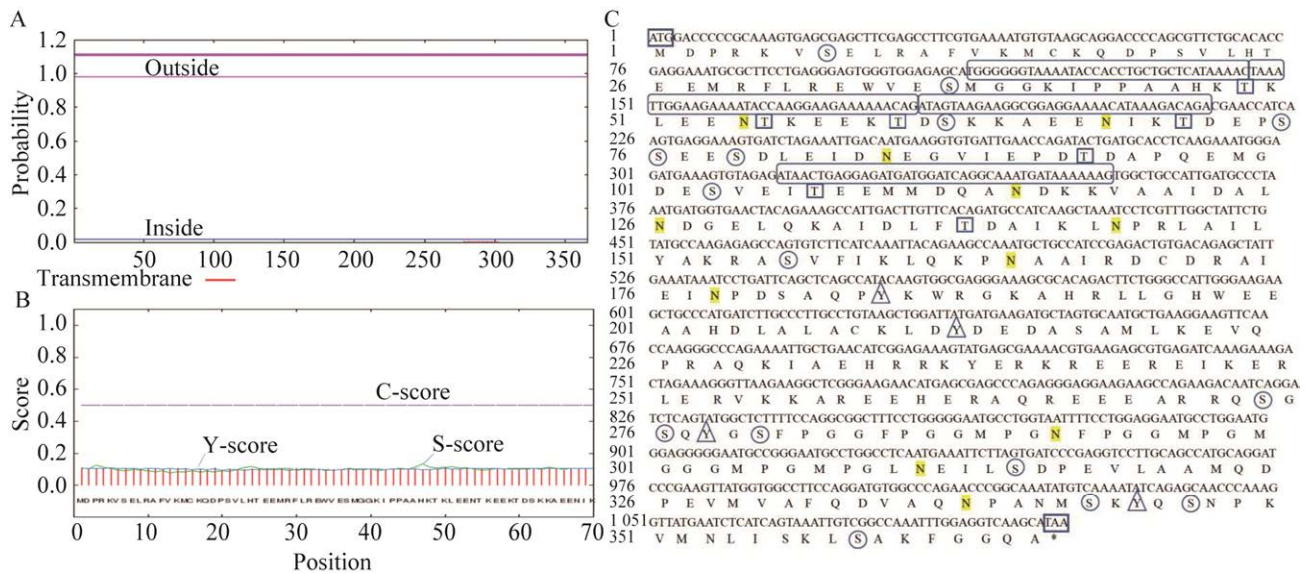


图 3 山羊 ST13 蛋白跨膜结构及序列分析

Figure 3 Transmembrane structure and sequence of goat ST13 protein. Prediction of transmembrane region (A) and signal peptide (B) of the goat ST13 protein. (C) ATG is the start codon and TAA is the stop codon. The solid box is the TPR domain, the square is the Thr (T) phosphorylation site, the triangle is the Tyr (Y) phosphorylation site, the circle is the Ser (S) phosphorylation site, and the shaded part is the N-glycosylation site.

2.2.3 山羊 ST13 蛋白质二、三级结构及相互作用蛋白

蛋白质高级结构预测结果显示, 山羊 ST13 蛋白质中, 可能形成 α -螺旋的氨基酸有 200 个, 占 54.64%, 有 16 个氨基酸可能形成延伸链, 占 4.37%, 21 个氨基酸可能形成 β -转角, 占 5.74%, 129 个氨基酸可能形成无规则卷曲, 占 35.25% (图 4A)。山羊 ST13 蛋白质三级结构与二级预测结果相符合, 主要由 α -螺

旋、无规则卷曲、 β -转角和延伸链构成 (图 4B)。相互作用蛋白预测分析显示, ST13 蛋白可能与 HSPA1B、HSPA9、HSPA14、HSPA1A、HSPA8、HSPA12B、HSPA1L、HSPA5、HSPA4 和 HSPA6 等蛋白存在相互作用 (图 4C)。亚细胞定位的预测结果显示, ST13 大部分分布在细胞核中, 占 69.60%, 其余分布在细胞质、线粒体和细胞骨架, 占比分别是 13.00%、13.00% 和 4.35% (图 4D)。

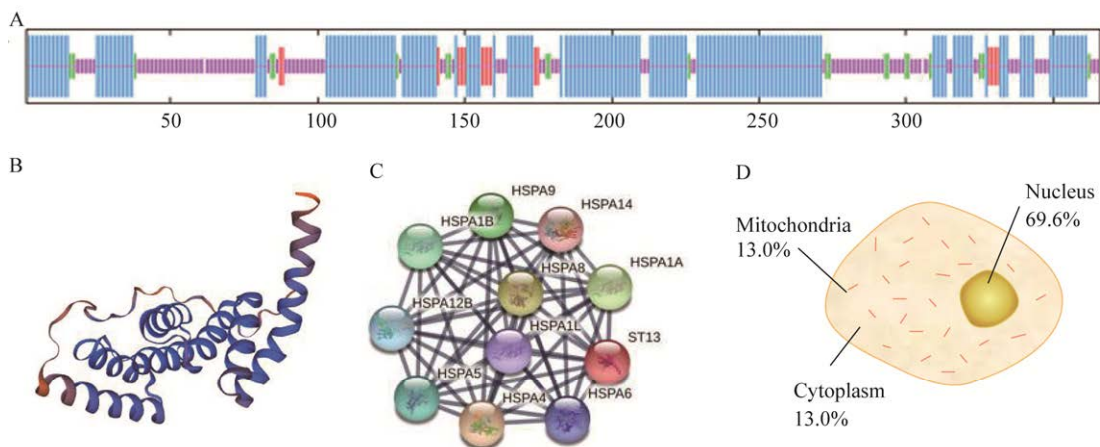


图 4 山羊 *ST13* 蛋白质结构及相互作用预测

Figure 4 Secondary structure and tertiary structure of goat *ST13* and the interaction with other proteins. (A) Prediction of the secondary structure of the *ST13* amino acid sequence and the length from long to short represents α -helix, extended chain and irregular crimp, respectively. Prediction of tertiary molecular model (B), protein network interaction analysis diagram (C), and prediction of subcellular localization (D) of the goat *ST13* protein.

2.2.4 山羊 *ST13* 基因同源比较及进化树

应用 DNASTar 7.1 分析软件对山羊 *ST13* 基因核苷酸序列与 GenBank 中其他物种的 *ST13* 基因序列进行比对分析, 结果表明山羊 *ST13* 核苷酸序列与绵羊和牛的同源性最高, 分别为 99.4% 和 98.6% (图 5A)。用 Mega 7.0 软件中的 NJ 法构建系统进化树, 结果如图 5B 所示, 从垂直方向上可以看出山羊 *ST13* 和绵羊 *ST13* 进化分歧时间更短, 遗传距离更近, 与牛的遗传距离次之, 说明该基因在反刍动物中序列较相似, 而与其他种属动物存在差异, 从而可初步得出 *ST13* 基因的保守性较高这一结论。

2.3 山羊 *ST13* 基因组织表达差异性

为了探讨 *ST13* 基因在山羊生长发育过程中的生物学功能, 首先利用 qRT-PCR 检测其在山羊各组织中的表达情况, 结果表明, 该基因在山羊 13 种组织中均有表达, 其中在臂三头肌和皮下脂肪组织中的表达量极显著高于除腹

部脂肪外的其他组织 ($P < 0.01$), 在心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠和胰腺组织中的表达量无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 6)。

2.4 山羊 *ST13* 基因细胞时序表达差异性

因 *ST13* 基因在山羊皮下脂肪中的表达量较高, 推测 *ST13* 可能在皮下脂肪细胞分化中起到重要的调控作用。因此, 运用 qRT-PCR 技术, 以 *UXT* 为内参基因, 检测 *ST13* 基因在山羊皮下脂肪细胞分化过程中的表达, 以明确其在山羊皮下脂肪细胞分化过程中的表达规律。结果如图 7 所示, 与诱导分化前相比 (0 h), 山羊 *ST13* 基因的相对表达量在诱导分化前期变化差异不显著 (12–84 h), 诱导分化 96–108 h *ST13* 基因的相对表达量呈现明显的上调趋势, 并且在诱导分化第 108 小时的表达量最高 ($P < 0.01$)。证明在山羊皮下脂肪细胞分化过程中, *ST13* 基因可能作为一个正调控因子发挥其生物学功能。

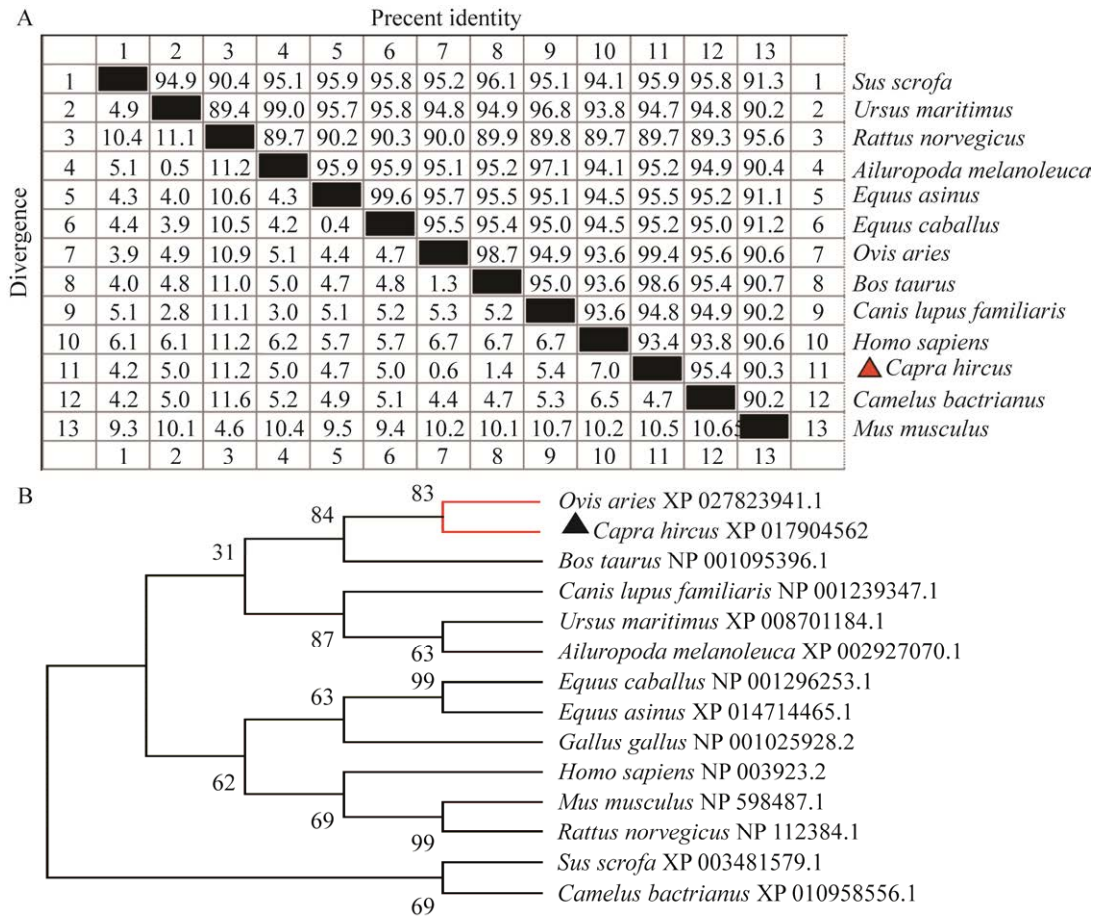


图 5 山羊 *ST13* 基因同源性比对分析及氨基酸同源进化树构建

Figure 5 Homologous alignment of goat *ST13* gene and construction of amino acid phylogenetic tree. (A) Comparison of the homology of goat *ST13* gene with other species, percent identity stands for homology and divergence stands for degree of variation. (B) Phylogenetic tree analysis of *ST13* amino acid sequence, ▲ is the target gene and the referenced sequences are all from the GenBank database.

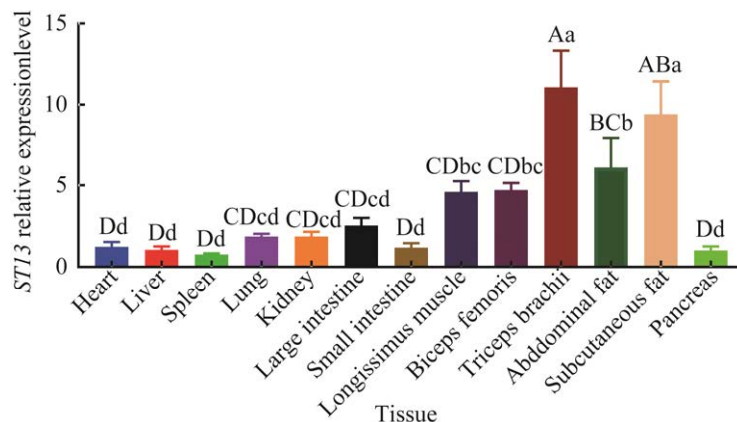


图 6 *ST13* 基因在山羊不同组织中的相对表达水平

Figure 6 Relative expression level of *ST13* gene in different tissues of goat. Different capital letters in the superscript indicate that the difference is extremely significant between the data ($P < 0.01$). Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

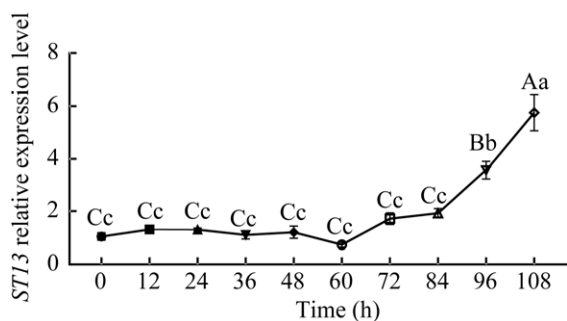


图7 *ST13* 基因在山羊皮下前体脂肪细胞分化过程中的相对表达量

Figure 7 Relative expression level of *ST13* gene in the differentiation of subcutaneous preadipocytes. Different capital letters in the superscript indicate that the difference is extremely significant between the data ($P < 0.01$); different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.5 过表达载体构建及效率检测

为了进一步研究 *ST13* 基因的生物学功能, 我们构建了过表达载体。使用 *Hind* III 和 *Xho* I 限制性内切酶对 pCMV-*ST13* 质粒进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分别得到长度约为 4.3 kb 的 pCMV-Tag 2B 载体片段和 1.1 kb 的目的基因片段 (图 8A), 测序结果显示, 插入序列与预期目的基因序列完全一致, 证明载体 pCMV-*ST13* 构建成功 (图 8B)。将 pCMV-*ST13* 过表达载体转染至山羊皮下前体脂肪细胞后, 利用 qRT-PCR 检测 *ST13* 表达, 结果显示, 与对照组相比, *ST13* 基因表达量上调了 79 倍 (图 8C)。以上结果表明, pCMV-*ST13* 过表达载体构建成功。

3 讨论

本研究成功克隆了山羊 *ST13* 基因序列, 并获得完整的 CDS 区, 其 CDS 区长度为 1 101 bp, 编码 366 个氨基酸, Cai 等研究表明, 人 *ST13* 基因 cDNA 全长 3 145 bp, 开放阅读框 1 110 bp,

编码 369 个氨基酸^[9], 说明该基因编码的蛋白质在人类和山羊两者之间存在一定的差异性。核苷酸序列比对和进化树结果一致, 其与绵羊和牛的同源性最高, 说明该基因在山羊、绵羊与牛这 3 个物种间具有较高的保守性。Zheng 等^[29]研究结果显示, *ST13* 蛋白广泛分布于各组织细胞的细胞质内, 本研究通过亚细胞定位预测结果显示, *ST13* 在细胞核、细胞质、线粒体和细胞骨架中均有分布, 进一步证实了上述研究结果。有研究表明, *ST13* 基因在人大肠、胃、肝脏、肺脏和胰腺等组织中均有表达^[29], 通过对收集的山羊组织样本进行 qRT-PCR 分析, 结果表明, 其在山羊心、肝、脾、肺、肾等 13 种组织中均有表达, 结合前人研究结果, 表明 *ST13* 基因在各组织中具有广谱表达的特征。

通过构建时序表达谱发现, 在山羊皮下脂肪细胞分化过程中, *ST13* 表达呈上调趋势, 表明其在山羊脂肪细胞分化过程中可能发挥重要的正调控作用, 但其具体的生物学功能有待进一步研究证实。Bai 等研究显示, 慢病毒介导的 *ST13* 过表达可抑制结直肠癌细胞的增殖、集落形成和细胞迁移。相反, 干扰 *ST13* 的表达则显著促进结直肠癌细胞增殖和克隆形成^[30]。根据 *ST13* 基因在山羊皮下脂肪细胞分化中的表达水平以及结合其互作蛋白在脂肪中研究结果, 推测 *ST13* 基因可能会促进山羊脂肪细胞分化。

结构域预测显示, *ST13* 蛋白中包含 4 个 TPR 结构域 (tetratricopeptide repeat domain)。TPR 结构域是一种独特的、完全由螺旋结构组成的结构域, 主要由 34 个氨基酸组成^[31-32]。高等生物基因组中, TPR 结构域是蛋白与蛋白间相互作用的常见媒介。热休克蛋白是一类重要的分子伴侣, 相互作用蛋白预测分析

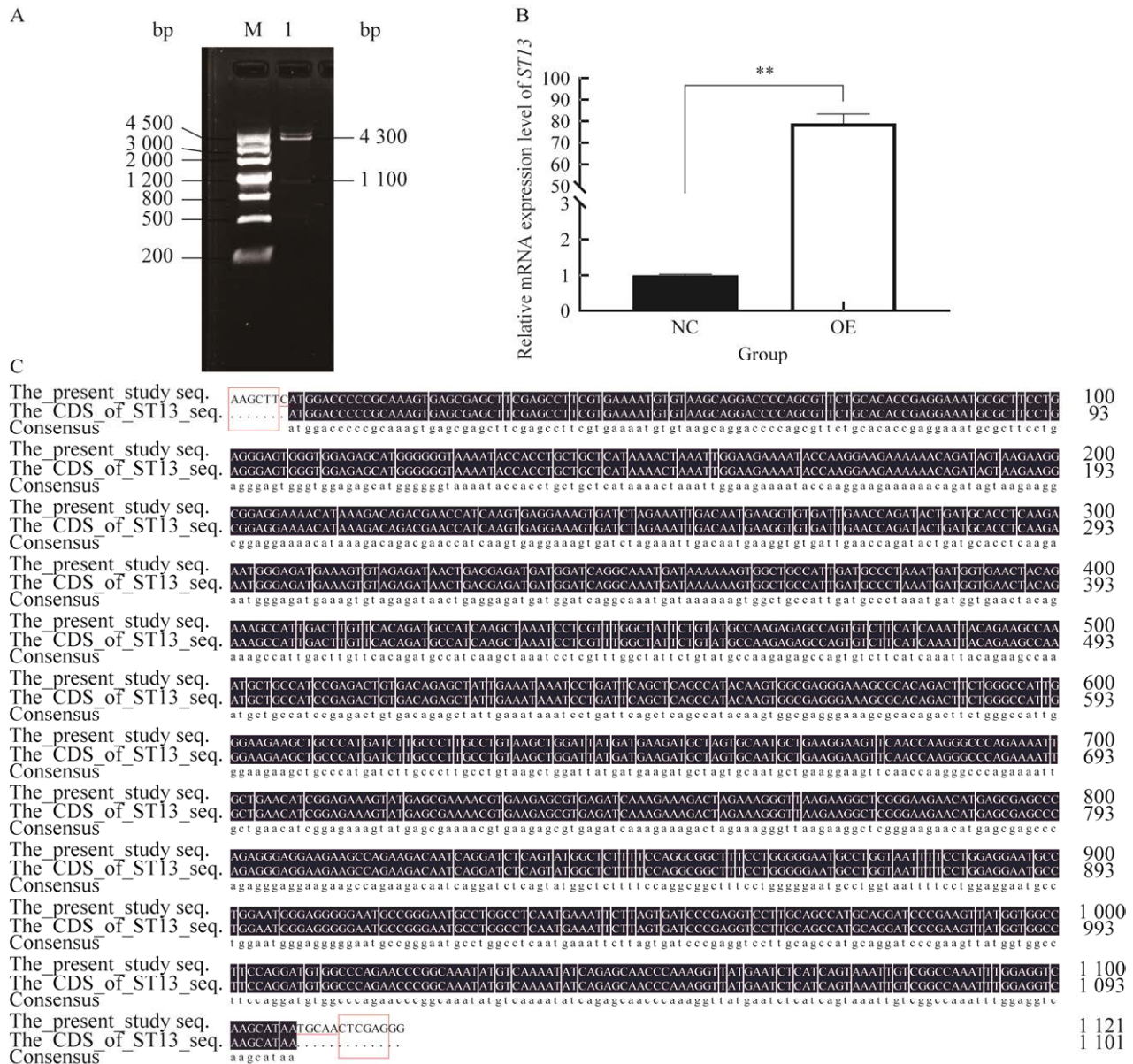


图 8 *ST13* 过表达载体构建及山羊皮下脂肪细胞中的表达效率

Figure 8 Construction of *ST13* overexpression vector and the expression efficiency in goat subcutaneous adipocytes. (A) M: marker III; lane 1: pCMV-*ST13* plasmid double digestion. (B) The overexpression efficiency of *ST13* gene. $**P < 0.01$; $*P < 0.05$. (C) Comparison of sequencing results with CDS region of *ST13* gene, the underline indicates the base to prevent the insertion of frameshift mutation and the line frame is the restriction site.

结果显示, *ST13* 蛋白与 *HSP70* 存在相互作用。*HSPs* 是一个高度保守的分子伴侣蛋白家族, 其中一些由亚致死细胞应激诱导, 包括温度升高、氧化损伤和缺氧^[33-34]。此外, 已知它们可

以促进新生多肽的折叠, 诱导疏松蛋白质聚集体的溶解, 防止蛋白质聚集, 参与受损蛋白质的重折叠, 隔离受损蛋白质并针对它们进行降解^[35-38]。*HSP70* 家族包括: *HSPA1A*、*HSPA1B*、

HSPA1L、HSPA2、HSPA5、HSPA6、HSPA7、HSPA8、HSPA9、HSPA12、HSPA13、HSPA14^[39-44]。Hartl 等于 1995 年报道一个与 HSP70 相互作用蛋白 HIP (HSC7-interacting protein), 证实该蛋白为伴侣蛋白^[45]。Zheng 等研究发现, HIP 和 *ST13* 的 cDNA 同源性超过 90%, 两者的表观分子质量和细胞定位相似, 可以确定 *ST13* 和 HIP 为同一蛋白分子^[29]。*ST13* 被证实是 HSC/HSP70 的阳性辅助因子 HIP 的编码基因, HIP 可能促进 HSP70 在蛋白质折叠中的伴侣功能, 并控制调节蛋白的活性, 如类固醇受体和增殖或凋亡调节因子^[16]。Mulyani 等研究表明, 抑制 HSP70 表达可通过 JNK 通路的激活诱导炎症发生过程, 通过线粒体自噬减少和线粒体生物发生抑制线粒体脂肪酸氧化, 并激活内质膜应激中脂质体基因转录因子之一 SREBP1C 的表达^[46]。

4 结论

本研究成功克隆山羊 *ST13* 基因序列 1 380 bp, 其中 CDS 区 1 101 bp, 共编码 366 个氨基酸, 编码的蛋白在不同物种间有较高的保守性, 属于亲水不稳定非分泌蛋白。该基因在山羊心、肝、脾、肺、肾、肌肉和脂肪等组织中均有表达, 其中在臂三头肌和皮下脂肪中的表达量显著高于其他组织, 时序表达分析结果表明在诱导分化后 108 h 的脂肪细胞中表达量最高。通过以上可以推断 *ST13* 基因可能在山羊的皮下脂肪分化过程中发挥作用, 而 *ST13* 对山羊脂肪细胞分化的具体调控作用及调控机制, 则需通过进一步实验证实和阐明。本研究为进一步深入研究该基因在脂肪分化过程中的功能和机制提供基础实验数据。

REFERENCES

[1] Pophiwa P, Webb EC, Frylinck L. A review of factors

affecting goat meat quality and mitigating strategies. *Small Rumin Res*, 2020, 183: 106035.

- [2] Mazhangara IR, Chivandi E, Mupangwa JF, et al. The potential of goat meat in the red meat industry. *Sustainability*, 2019, 11(13): 3671.
- [3] Ebrahimi M, Rajion MA, Jafari S, et al. Effects of dietary n-6: n-3 polyunsaturated fatty acid ratios on meat quality, carcass characteristics, tissue fatty acid profiles, and expression of lipogenic genes in growing goats. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0188369.
- [4] Martínez-Álvaro M, Blasco A, Hernández P. Effect of selection for intramuscular fat on the fatty acid composition of rabbit meat. *Animal*, 2018, 12(10): 2002-2008.
- [5] Zhang Y, Cai X, Schlegelberger B, et al. Assignment1 of human putative tumor suppressor genes *ST13* (alias *SNC6*) and *ST14* (alias *SNC19*) to human chromosome bands 22q13 and 11q24→q25 by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 83(1/2): 56-57.
- [6] Zheng S. Recent study on colorectal cancer in China: early detection and novel related gene. *Chin Med J (Engl)*, 1997, 110(4): 309-310.
- [7] 刘凤琴, 李素红, 李建民. *SNC6* 基因在大肠癌中的表达及与其生物学行为的关系研究. *山西医药杂志*, 2006, 35(11): 967-968.
- Liu FQ, Li SH, Li JM. Relationship between expression of *SNC6* and biological behavior of colorectal cancer. *Shanxi Med J*, 2006, 35(11): 967-968 (in Chinese).
- [8] 叶锋, 郑树, 方士昌, 等. 原位杂交检测新基因 *ST13(SNC6)* 在大肠癌中的表达及临床意义. *实用肿瘤杂志*, 2001, 16(5): 318-321.
- Ye F, Zheng S, Fang SC, et al. Detection of expression of novel gene *ST13 (SNC6)* in colorectal cancer by *in situ* hybridization and clinical significance. *J Pract Oncol*, 2001, 16(5): 318-321 (in Chinese).
- [9] 蔡心涵, 张颜明, 耿礼义, 等. 大肠癌新相关基因 HSU17714 的染色体定位研究. *中华肿瘤杂志*, 1997, 19(3): 177-179.
- Cai XH, Zhang YM, Geng LY, et al. Assignment of a novel colorectal cancer associated gene HSU17714 gene to human chromosome band 22q13 by *in situ* hybridization. *Chin J Oncol*, 1997(3):177-179 (in Chinese).
- [10] 郑树, 曹江, 张苏展, 等. 两个大肠癌负相关新基因的研究. *中国肿瘤*, 2001, 10(3):137-138.
- Zheng S, Cao J, Zhang SZ, et al. Study of two colorectal cancer negatively related genes. *China*

- Cancer, 2001, 10(3):137-138(in Chinese).
- [11] 徐伟乐. ST13 基因多态性与结直肠癌发病风险的关联研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.
Xu WL. The association of ST13 polymorphism with the risk of colorectal cancer [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2010 (in Chinese).
- [12] Yang M, Cao X, Yu MC, et al. Potent antitumor efficacy of ST13 for colorectal cancer mediated by oncolytic adenovirus via mitochondrial apoptotic cell death. *Hum Gene Ther*, 2008, 19(4): 343-353.
- [13] Zheng S, Cai X, Cao J. Application of subtractive hybridization in screening for colorectal cancer negatively related genes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 1997, 77(4): 256-259.
- [14] 陈吉, 牛昊书. ST13 和 HSP70 在胃息肉及胃癌中的表达及相关性. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(29): 3059-3066.
Chen J, Niu HS. Expression of *ST13* and *HSP70* in gastric polyps and gastric cancer. *World Chin J Dig*, 2013, 21(29): 3059-3066 (in Chinese).
- [15] Vijverberg SJH, Koster ES, Tavendale R, et al. ST13 polymorphisms and their effect on exacerbations in steroid-treated asthmatic children and young adults. *Clin Exp Allergy*, 2015, 45(6): 1051-1059.
- [16] Shi ZZ, Zhang JW, Zheng S. What we know about ST13, a co-factor of heat shock protein, or a tumor suppressor? *J Zhejiang Univ Sci B*, 2007, 8(3): 170-176.
- [17] Zhu XT, Zhao X, Burkholder WF, et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 1996, 272(5268): 1606-1614.
- [18] Esser C, Alberti S, Höfheld J. Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1695(1-3): 171-188.
- [19] Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(6): 670-684.
- [20] Höfheld J, Minami Y, Hartl FU. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell*, 1995, 83(4): 589-598.
- [21] Zhang JL, Fan NG, Peng YD. Heat shock protein 70 promotes lipogenesis in HepG2 cells. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 73.
- [22] 张洁蕾. HSP70-FTO 轴在非酒精性脂肪性肝病中的作用及机制研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
Zhang JL. Study on the role and mechanism of HSP70-FTO axis in non-alcoholic fatty liver disease[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2018 (in Chinese).
- [23] 俄木曲者, 熊朝瑞, 范景胜, 等. 简州大耳羊产肉性能世代选育进展及肉品质研究. *中国草食动物科学*, 2014, 34(3): 9-12.
Emu QZ, Xiong CR, Fan JS, et al. Research on breeding progress and meat quality of Jianzhou Da'er goat. *China Herbiv Sci*, 2014, 34(3): 9-12 (in Chinese).
- [24] Roy D, Tomo S, Modi A, et al. Optimising total RNA quality and quantity by phenol-chloroform extraction method from human visceral adipose tissue: a standardisation study. *MethodsX*, 2020, 7: 101113.
- [25] 何长晟, 王永, 许晴, 等. KLF2 对山羊肌肉前体脂肪细胞分化的影响. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(1): 64-73.
He CS, Wang Y, Xu Q, et al. The effect of KLF2 on the differentiation of goat intramuscular preadipocyte. *Chin J Animal Vet Sci*, 2020, 51(1): 64-73 (in Chinese).
- [26] 李倩, 林亚秋, 朱江江, 等. 山羊 *FGF21* 基因克隆及其在肌肉脂肪细胞中的表达模式研究. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(1): 31-38.
Li Q, Lin YQ, Zhu JJ, et al. Cloning of goat *FGF21* gene and its expression pattern in intramuscular adipocyte. *Chin J Animal Vet Sci*, 2017, 48(1): 31-38 (in Chinese).
- [27] 许晴, 林森, 朱江江, 等. 山羊肌肉前体脂肪细胞诱导分化过程中内参基因的表达稳定性分析. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(5): 907-918.
Xu Q, Lin S, Zhu JJ, et al. The expression stability analysis of reference genes in the process of goat intramuscular preadipocytes differentiation in goat. *Chin J Animal Vet Sci*, 2018, 49(5): 907-918 (in Chinese).
- [28] 汪伟, 杜倩, 韩知晓, 等. 山羊关节炎脑炎病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的建立及应用. *中国兽医科学*, 2020, 50(3): 294-299.
Wang W, Du Q, Han ZX, et al. Establishment and application of SYBR Green I real-time PCR for CAEV. *Chin Vet Sci*, 2020, 50(3): 294-299 (in Chinese).
- [29] Zheng S, Shao JM, Dong Q, et al. Characterization of ST13 protein expression in human colorectal cancer tissues. *Chin Ger J Clin Oncol*, 2005, 4(1): 2-7.
- [30] Bai R, Shi Z, Zhang JW, et al. ST13, a proliferation regulator, inhibits growth and migration of colorectal cancer cell lines. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(11): 884-893.
- [31] Hirano T, Kinoshita N, Morikawa K, et al. Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe*

- nuclear protein nuc2+. *Cell*, 1990, 60(2): 319-328.
- [32] Fauser J, Gulen B, Pogenberg V, et al. Specificity of AMPylation of the human chaperone BiP is mediated by TPR motifs of FICD. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2426.
- [33] Young JC, Agashe VR, Siegers K, et al. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 781-791.
- [34] Mahalingam D, Swords R, Carew JS, et al. Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer*, 2009, 100(10): 1523-1529.
- [35] Horwich AL. Molecular chaperones in cellular protein folding: the birth of a field. *Cell*, 2014, 157(2): 285-288.
- [36] Csermely P. Proteins, RNAs and chaperones in enzyme evolution: a folding perspective. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(5): 147-149.
- [37] Elmallah MIY, Cordonnier M, Vautrot V, et al. Membrane-anchored heat-shock protein 70 (Hsp70) in cancer. *Cancer Lett*, 2020, 469: 134-141.
- [38] Bolhassani A, Agi E. Heat shock proteins in infection. *Clin Chim Acta*, 2019, 498: 90-100.
- [39] Vos MJ, Hageman J, Carra S, et al. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA and DNAJ chaperone families. *Biochemistry*, 2008, 47(27): 7001-7011.
- [40] Tian GY, Hu C, Yun Y, et al. Dual roles of HSP70 chaperone HSPA1 in quality control of nascent and newly synthesized proteins. *EMBO J*, 2021, 40(13): e106183.
- [41] Sojka DR, Gogler-Piğłowska A, Klarzyńska K, et al. HSPA2 chaperone contributes to the maintenance of epithelial phenotype of human bronchial epithelial cells but has non-essential role in supporting malignant features of non-small cell lung carcinoma, MCF7, and HeLa cancer cells. *Cancers*, 2020, 12(10): 2749.
- [42] Kim HJ, Kim SY, Kim DH, et al. Crosstalk between HSPA5 arginylation and sequential ubiquitination leads to AKT degradation through autophagy flux. *Autophagy*, 2021, 17(4): 961-979.
- [43] Eichelberger EJ, Alves CRR, Zhang R, et al. Increased systemic HSP70B levels in spinal muscular atrophy infants. *Ann Clin Transl Neurol*, 2021, 8(7): 1495-1501.
- [44] He YD, Xu RN, Zhai B, et al. Hspa13 promotes plasma cell production and antibody secretion. *Front Immunol*, 2020, 11: 913.
- [45] Hartl FU, Martin J. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr Opin Struc Biol*, 1995, 5(1): 92-102.
- [46] Mulyani WRW, Sanjiwani MID, Sandra, et al. Chaperone-based therapeutic target innovation: heat shock protein 70 (HSP70) for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 559-568.

(本文责编 陈宏宇)