

文章编号:1674-7054(2011)02-0157-07

# 多脊椎蒙古羊 *Hoxc8* exon-1 和 exon-2 的序列分析

陈琦<sup>1</sup> 赵静<sup>2</sup> 张立岭<sup>3</sup> 马月辉<sup>4</sup>

(1. 内蒙古医学院 分子生物学研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010059;

2. 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018;

3. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 4. 中国农科院 畜牧所, 北京 100193)

**摘要:** 参考牛的 *Hoxc8* 基因序列设计引物, 扩增正常蒙古羊(胸椎数 13) 和多脊椎蒙古羊(胸椎数 14) *Hoxc8* 的 exon-1 和 exon-2 基因, 对得到的序列进行生物信息学分析。结果表明, 经序列比对二者的 DNA 序列除两侧个别碱基有差异外, 中间序列完全一致。蒙古羊 *Hoxc8* 的 exon-1 和 exon-2 序列分别与其他物种进行同源性比对, 蒙古羊 *Hoxc8* exon-1 与人、小鼠、大鼠、犬的同源性达到 96% 以上, 与斑马鱼的同源性为 75.8%; exon-2 与大猩猩、犬、人、小鼠、大鼠的同源性达到 91% 以上, 与斑马鱼的同源性为 74%。

**关键词:** 多脊椎蒙古羊; 序列分析; *Hoxc8* exon-1; *Hoxc8* exon-2

中图分类号: S 826.8<sup>+</sup>2

文献标志码: A

蒙古羊肉质细嫩, 风味独特, 深受广大消费者的欢迎, 具有很高的经济价值。其基因组中蕴藏着大量的遗传变异和多态, 是研究分子遗传学和发育遗传学理想的动物资源。蒙古羊中有许多变异既有适应意义, 又有生产应用价值, 比如多胸椎变异和多腰椎变异就是典型的例证, 但是这一性状的遗传规律不符合经典的孟德尔遗传学理论<sup>[1]</sup>。水生类、两栖类、鸟类、哺乳类等都含有相当保守的 *Homeobox* 基因, 它决定着动物的体节与椎骨的位置、形态与数量<sup>[2-10]</sup>。哺乳动物的 38 个 *Homeobox* 基因分布于 4 条染色体上, 构成 13 个对位组, 这组基因中的 *Hoxc8* 突变可以导致胸椎数增加<sup>[11-12]</sup>。在蒙古羊的遗传育种工作中, 笔者发现蒙古羊的多胸椎性状很可能与 *Hoxc8* 基因的基因组印记相关。但是, 未见关于羊的 *Hoxc8* 基因序列的报道。因此, 笔者扩增了蒙古羊 *Hoxc8* 的 exon-1 和 exon-2 基因, 并对得到的序列进行生物信息学分析, 旨在为深入开展多脊椎蒙古羊的分子遗传学和发育遗传学研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 选择纯种繁育的成年健康蒙古羊 86 只, 屠宰前静脉采血, 用 ACD 抗凝剂抗凝, 编号后迅速置于液氮中冻存。屠宰解剖确定样本个体的胸椎数, 并做好记录。从样本中随机挑选 6 只多脊椎蒙古羊(胸椎数为 14) 和 4 只正常蒙古羊(胸椎数为 13) 进行后续实验。

**1.2 DNA 抽提** 从多脊椎和正常蒙古羊个体血液中, 用 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega) 提取基因组 DNA。提取出的 DNA 利用分光光度计进行定量, 之后每个样本取 2 μg 进行实验。

**1.3 PCR 扩增多脊椎蒙古羊的 *Hoxc8* 的 exon-1 和 exon-2** 根据 NCBI 上已发表的几个物种的 *Hoxc8* 基因序列, 找出其保守区域, 参考牛的 *Hoxc8* 基因序列(Ensembl Gene ID: ENSBTAG00000012149) 设计引物, 设计 2 对引物, 分别扩增正常和多胸椎 2 种类型蒙古羊的 *Hoxc8* 基因的第 1 外显子(exon-1) 和第 2 外显子(exon-2), 引物由 TaKaRa 公司合成, 序列见表 1。

收稿日期: 2011-04-28

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(2006BDA13B08); 国家自然科学基金项目(30960245)

作者简介: 陈琦(1980-), 女, 山东蓬莱人, 内蒙古医学院分子生物学研究中心副研究员, 博士。

通信作者: 张立岭(1955-), 男, 海南大学农学院教授, 博士, 博士生导师。

表 1 扩增蒙古羊 *Hoxc8* 的 *exon-1* 和 *exon-2* 的引物序列

| 基因名称                | 引物序列                                |
|---------------------|-------------------------------------|
| <i>Hoxc8 exon-1</i> | P1: 5'ATGAGCTCCTACTTCGTCAAC 3'      |
|                     | P2: 5'GGTCTCATCCATGGAAACAT 3'       |
| <i>Hoxc8 exon-2</i> | P1: 5'AAGGCAAACCTTACAGCCGGTATCAG 3' |
|                     | P2: 5'TCAGTCCTTGTTTTCTTCCTTTTCC 3'  |

PCR 反应体系: 0.5  $\mu\text{L}$  LA *Taq* E ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 25  $\mu\text{L}$  GC Buffer I (含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 8  $\mu\text{L}$  dNTP ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 正向、反向引物各 5  $\mu\text{L}$  ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 5  $\mu\text{L}$  基因组 DNA 1.5  $\mu\text{L}$  双蒸水 共 50  $\mu\text{L}$ 。扩增 *exon-1* 的 PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 3 min 35 个 PCR 循环 (94  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 50  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s) 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增 *exon-2* 的 PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 3 min 30 个 PCR 循环 (94  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 52  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s) 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物与 DL 2 000 Marker 用  $w = 1\%$  的琼脂糖凝胶进行电泳 溴化乙锭染色 检出 PCR 产物的目标条带 并用 DNA 纯化试剂盒将目的条带回收 纯化。

1.4 测序 纯化后的 PCR 产物由大连宝生物公司进行测序 将得到的蒙古羊 *Hoxc8 exon-1* 和 *exon-2* 的序列提交 Genbank (Gene ID 分别为: EU817489 和 FJ905472)。

1.5 结果比对 利用 CLC Free Workbench 3 软件对正常和多脊椎蒙古羊样本内的 *Hoxc8 exon-1* 和 *exon-2* 序列进行比对; 利用 DNASTar 软件中 Cluster W Method 将得到的蒙古羊 *Hoxc8 exon-1* 的核苷酸序列与 Genbank 中其他动物的该基因序列进行比较分析; 利用 SeqFacts 对 *Hoxc8* 编码蛋白进行生物信息学分析。

## 2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的检测结果 采用 Promega 血液基因组提取试剂盒 从正常与多脊椎 2 种类型的蒙古羊血液中提取基因组 DNA。取 2  $\mu\text{L}$  基因组 DNA 溶液 用  $w = 0.8\%$  的琼脂糖凝胶电泳检测 结果如图 1 所示。从图 1 可以看出 提取的基因组 DNA 为 1 条整齐、致密、清晰的条带 亮度也比较好 而且无拖尾现象 说明 DNA 的完整性较好 含量较高 符合后续实验的要求。

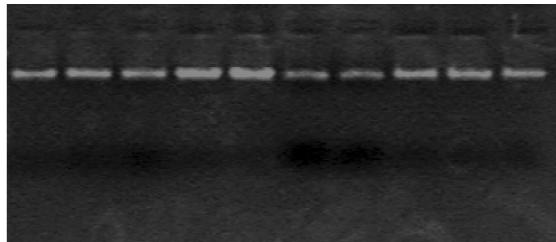


图 1 蒙古羊基因组 DNA 电泳检测结果

2.2 *Hoxc8 exon-1* PCR 扩增结果 以蒙古羊血基因组 DNA 为模板 扩增蒙古羊 *Hoxc8 exon-1* PCR 产物带在 500 bp 之下 与预期结果相符 可以初步判定所得片段即为蒙古羊 *Hoxc8 exon-1* 序列 (见图 2)。

2.3 *Hoxc8 exon-2* PCR 扩增结果 蒙古羊 *Hoxc8 exon-2* 的 PCR 产物带在 250 bp 之上 目的片段长度 273 bp 与预期结果相符 可以初步判定所得片段即为蒙古羊 *Hoxc8 exon-2* 的序列 (见图 3)。

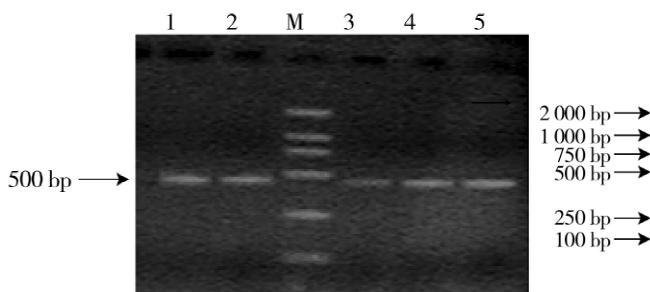


图 2 蒙古羊 *Hoxc8 exon-1* 的扩增产物检测结果  
1 ~ 5: PCR 扩增产物; M: DL 2000 Marker

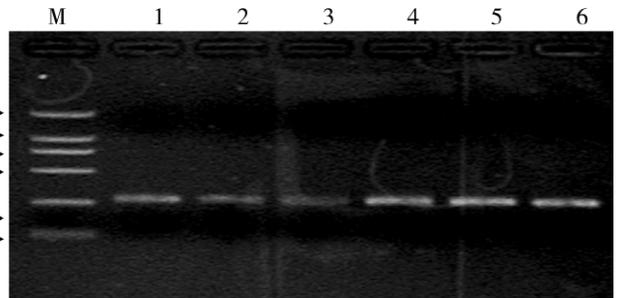


图 3 蒙古羊增产物检测结果  
1 ~ 6: PCR 扩增产物; M: DL 2000 Marker

### 2.4 测序结果

2.4.1 正常与多脊椎蒙古羊的 *Hoxc8* exon-1 的序列比对 利用 CLC Free Workbench 3 软件对正常与多脊椎蒙古羊共 6 个样本的 *Hoxc8* exon-1 序列进行比对 结果显示 ,正常与多脊椎蒙古羊 *Hoxc8* exon-1 序列只有两侧有个别碱基存在差异 ,中间的序列完全一致 结果见图 4。

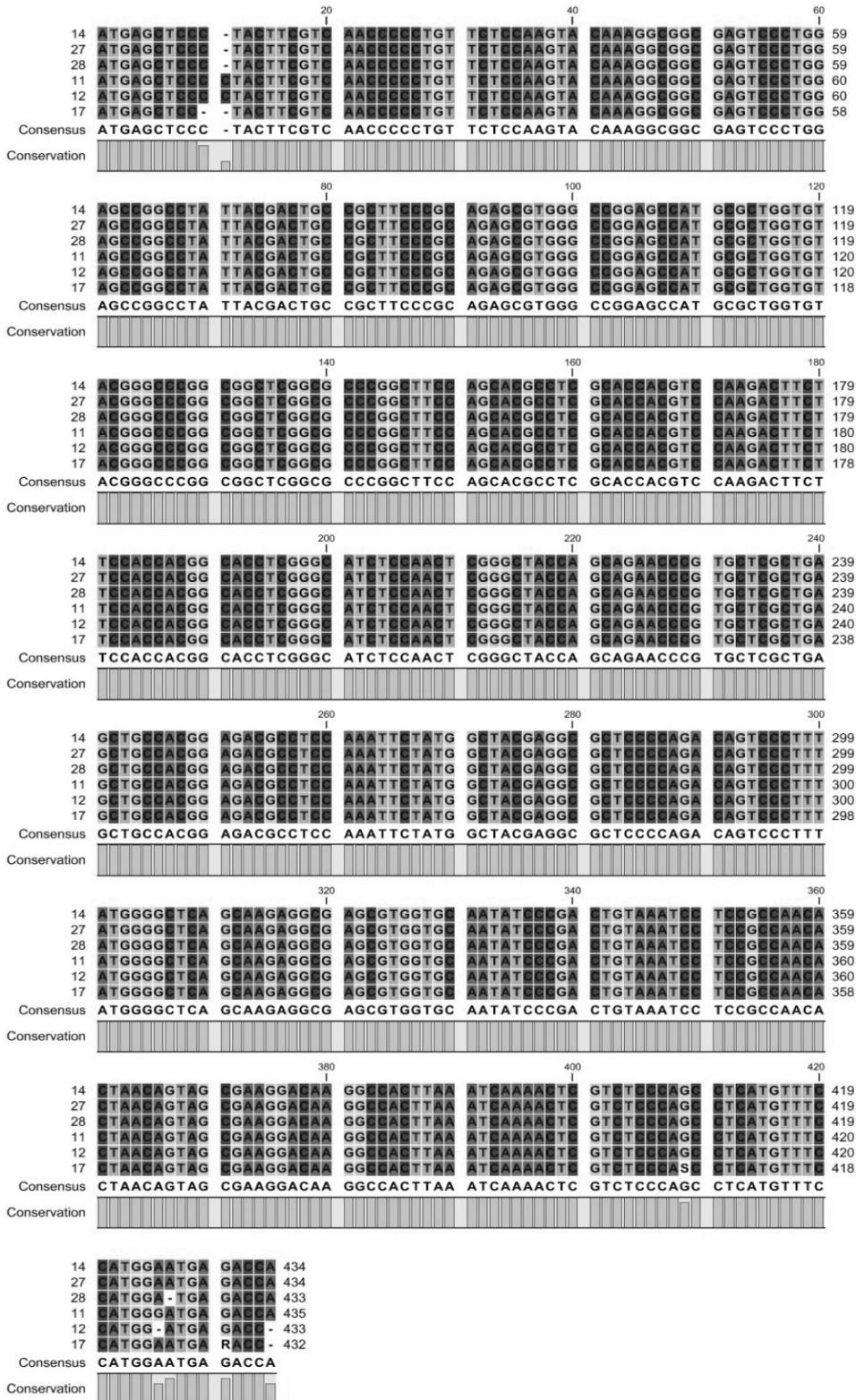


图 4 正常与多脊椎蒙古羊的 *Hoxc8* exon-1 序列比对

2.4.2 正常与多脊椎蒙古羊的 *Hoxc8* exon-2 的序列比对 正常与多脊椎蒙古羊共 7 个样本的 *Hoxc8* ex-

on-2 的序列比对结果见图 5。结果表明,正常与多脊椎蒙古羊序列的同源性是 95.10%,有差异的部分位于前面 17 个碱基和后面近 20 个碱基的区域,而中间序列全部一致。

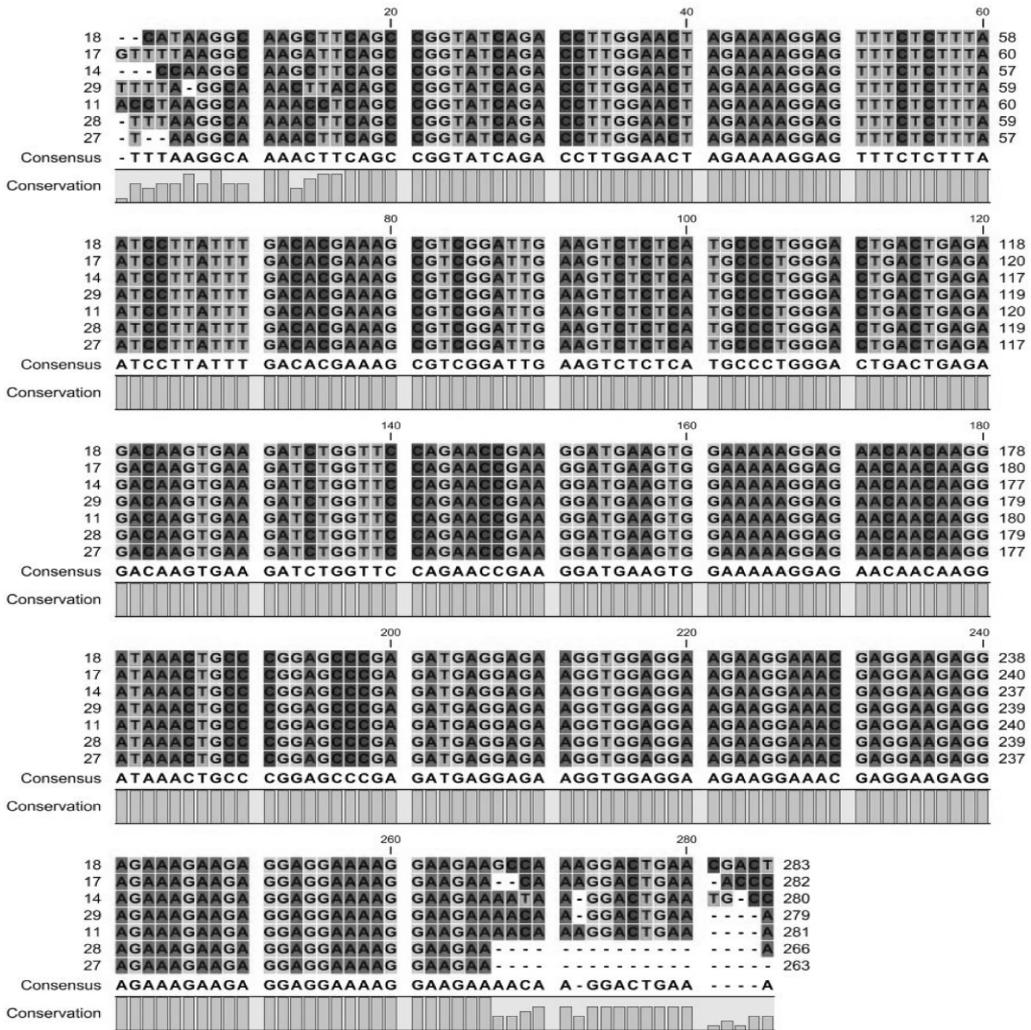


图 5 正常与多脊椎蒙古羊的 *Hoxc8* exon-2 序列比对

**2.4.3 蒙古羊与其他物种 *Hoxc8* 的 exon-1 和 exon-2 序列的比较分析** 利用 DNASTar 软件中 Cluster W Method 将得到的蒙古羊 *Hoxc8* exon-1 的核苷酸序列与 Genbank 中其他动物的该基因序列进行比较分析 (见图 6)。从图 6 中可以看到,蒙古羊 exon-1 与狗、人、小鼠及大鼠的同源性均非常高,达到 96% 以上,与斑马鱼的同源性较低,只有 75.8%;蒙古羊 *Hoxc8* exon-2 与大猩猩、狗、人、小鼠、大鼠的同源性均在 91% 以上,与斑马鱼的同源性同样比较低,只有 74%。此结果说明各哺乳动物之间 *Hoxc8* 基因保守性高,但是与鱼类之间差异较大。

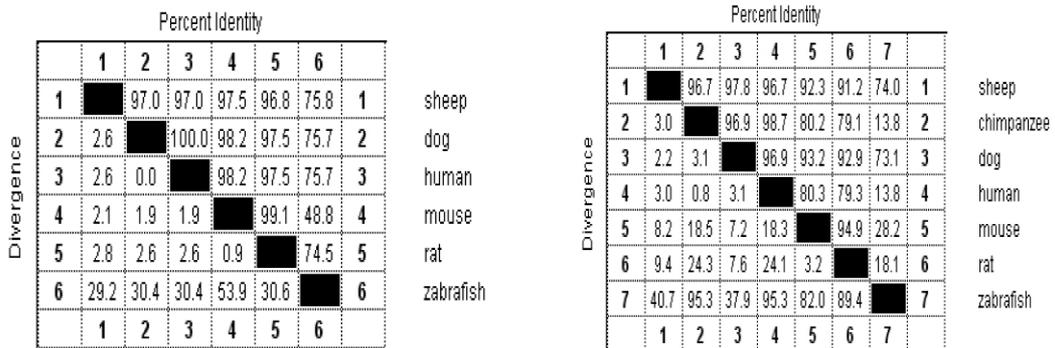


图 6 蒙古羊 *Hoxc8* 的 exon-1(左)和 exon-2(右)与其他物种的序列比较

**2.4.4 *Hoxc8* 基因核苷酸序列分析** 采用 PCR 方法从蒙古羊基因组 DNA 中扩增到 *Hoxc8* 基因 exon-1 (430 bp) 和 exon-2(273 bp) 测序得到的序列已提交至 GenBank(序列号分别为 EU817489 和 FJ905472)。对蒙古羊样本 *Hoxc8* 基因的 exon-1 和 exon-2 进行序列分析(见图 7) exon-1 中 A ,T ,C ,G 的比例分别为 20.8% ,18.1% 35.6% 25.5% ,G + C 含量 61.1% ,高于 A + T 的含量 38.9%。exon-2 中 A ,T ,C ,G 的比例分别为 37.7% ,16.5% ,15.4% 30.4% ,G + C 含量 45.8% ,低于 A + T 的含量 54.2%。

```

ATGAGCTCCC TACTTCGTCA ACCCCCTGTT CTCCAAGTAC AAAGGCGGCG
M S S L F V N P L F S K Y K G G E
AGTCCCTGGA GCCGGCCTAT TACGACTGCC GCTTCCCGCA GAGCGTGGGC
S L E P A Y Y D C R F P Q S V G R
CGGAGCCATG CGCTGGTGTA CGGGCCCGGC GGCTCGGCGC CCGGCTTCCA
S H A L V Y G P G G S A P G F Q
GCACGCCTCG CACCACGTCC AAGACTTCTT CCACCACGGC ACCTCGGGCA
H A S H H V Q D F F H H G T S G I
TCTCCAACTC GGGCTACCA G CAGAACCCT GCTCGCTGAG CTGCCACGGA
S N S G Y Q Q N P C S L S C H G
GACGCCTCCA AATTCTATGG CTACGAGGCG CTCCCAGAC AGTCCCTTTA
D A S K F Y G Y E A L P R Q S L Y
TGGGGCTCAG CAAGAGGCGA GCGTGGTGCA ATATCCCGAC TGTAATCCT
G A Q Q E A S V V Q Y P D C
CCGCCAACAC TAACAGTAGC GAAGGACAAG GCCACTTAAA TCAAAACTCG
K S S A N T N S S E G Q G H L N Q N S
TCTCCAGCC TCATGTTTC ATGGAATGAG AC
S P S L M F P W M R P

```

图 7 蒙古羊 *Hoxc8* exon-1 序列及推测的氨基酸序列

**2.4.5 *Hoxc8* exon-1 氨基酸序列组成分析** 将得到的蒙古羊 *Hoxc8* 基因外显子序列运用 DNASTar 进行蛋白质预测,得到蒙古羊 *Hoxc8* 翻译的部分蛋白序列及其氨基酸组成(见图 7)。蛋白质的氨基酸组成与含量分析结果表明 20 种氨基酸的含量差异很大,含量从高到低依次为: Ser( S) 16.0% > Gly( G) 10.4% > Pro( P) = Gln( Q) 7.6% > Ala( A) = Leu( L) = Tyr( Y) 6.2% > Phe( F) = His( H) 5.6% > Asn( N) 4.9% > Val( V) 4.2% > Glu( E) 3.5% > Cys( C) = Asp( D) = Lys( K) = Arg( R) 2.8% > Met( M) 2.1% > Thr( T) 1.4% > Ile( I) = Trp( W) 0.7%。

**2.4.6 *Hoxc8* 编码蛋白的生物信息学分析** 通过 SeqFacts 程序预测 *Hoxc8* 外显子编码蛋白理论等电点 pI 为 6.795 0 相对分子质量为 15 700.20 ,*Hoxc8* 蛋白有 6 个抗原性位点,分别位于 105 ~ 117 氨基酸之间,74 ~ 84 氨基酸之间,4 ~ 12 氨基酸之间,20 ~ 42 氨基酸之间,48 ~ 62 氨基酸之间,88 ~ 103 氨基酸之间(见图 8)。

```

(1) Score 1.183 length 13 at residues 105->117
      *
Sequence: EASVVQYPDCKSS
      |           |
      105         117

(2) Score 1.181 length 11 at residues 74->84
      *
Sequence: QNPCSLSCHGD
      |           |
      74         84

(3) Score 1.129 length 9 at residues 4->12
      *
Sequence: LFNPLFSK
      |           |
      4          12

(4) Score 1.129 length 23 at residues 20->42
      *
Sequence: EPAYYDCRFPQSVGRSHALVYGP
      |           |
      20         42

(5) Score 1.113 length 15 at residues 48->62
      *
Sequence: GFQHASHHVQDFHH
      |           |
      48         62

(6) Score 1.089 length 16 at residues 88->103
      *
Sequence: FYGYEALPRQSLYGAQ
      |           |
      88         103

```

图 8 SeqFacts 软件对 *Hoxc8* 蛋白的抗原性位点预测

### 3 讨论

从正常蒙古羊和多脊椎蒙古羊测序结果的比对中,可以看到,除了序列起始和结尾的部分略有不同外,中间的部分在不同个体中没有碱基变化,是完全一致的,仅仅在序列两侧个别碱基不同。这可能是测序的原因。由于测序仪自身缺陷,紧接引物之后的测序结果信号较弱,一般在测序用引物后面几个乃至数十个(严重时40~50个)碱基会读不出来(或者读错)。

同源性比较分析结果表明,蒙古羊 *Hoxc8 exon-1* 与人、小鼠、大鼠、犬的同源性达到96%以上,与斑马鱼的同源性为75.8%; *exon-2* 与大猩猩、狗、人、小鼠、大鼠的同源性达到91%以上,与斑马鱼的同源性为74%。这说明 *Hox* 基因在物种的进化中比较保守,但是哺乳动物与鱼类的差别比较大。根据不同种属动物 *Homeobox* 基因在进化上的同源性和保守性,完全可以依据 *Homeobox* 基因突变导致鼠类以及其他高等动物脊椎变异的类型和位置,来推测蒙古羊等其他哺乳动物脊椎数量变异与哪些 *Homeobox* 基因有关系<sup>[13]</sup>。按照上述思路可以断定,蒙古羊的胸椎数和腰椎数的增加,跟某些 *Homeobox* 基因有关联。从 *Homeobox* 基因的表达位置和表型效应来看,应该是 *Homeobox* 基因中的 C 组的 8 对位组的基因(*Hoxc8*),使绵羊的胸椎数从13变为14。

国内外的同类实验,都发现多脊椎亲本的后代中,总会出现10%左右的普通型个体。因此,无法解释这种非孟德尔遗传现象。近年来,随着动物分子发育遗传学研究的深入,新的发育遗传机制的发现,特别是基因组印记对哺乳动物发育过程的调控机理的逐渐阐明,使我们有了新的理论和方法,来说明蒙古羊脊椎数量变异的分子发育遗传学机制<sup>[14]</sup>。张立岭根据文献综述和交配实验推断,蒙古羊多脊椎的遗传具有亲本基因组印记特征,以非孟德尔遗传方式影响多胸椎基因的表达或缄默<sup>[1]</sup>。本研究得出的比对结果验证了这种假设,即蒙古羊多脊椎性状与 *Hoxc8* 基因的突变无关,很可能与表观遗传学有关。因为表观遗传修饰就是指在基因的 DNA 序列不发生变化的条件下,基因表达发生的改变可以遗传,导致可遗传的表观型变化。这一结果为后续的研究提供了有利的支持,奠定了基础,笔者将对 *Hoxc8* 基因进行表观遗传学研究,探索蒙古羊多胸椎性状的分子发育遗传学机制。

### 参考文献:

- [1] 张立岭, 菊林花, 杨丽君. 蒙古羊胸椎数的亲本印记遗传研究[J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2000, 21(2): 1-4.
- [2] KRUMLAUF R. *Hox* genes in vertebrate development [J]. Cell, 1994, 78: 191-201.
- [3] CRAWFARD M. Transformations in null mutants of *Hox* genes: do they represent intercalary regenerates? [J]. BioEssays, 1995, 17: 1065-1073.
- [4] DAVIS A P, CAPECCHI M R. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11* [J]. Development, 1994, 120: 2187-2198.
- [5] BURKE A C, NELSON C E, MORGAN B A, et al. *Hox* genes and the evolution of vertebrate axial morphology [J]. Development, 1995, 121: 333-346.
- [6] BELTING HG, SHASHIKANT C S, RUDDLE F H. Modification of expression and cis-regulation of *Hoxc-8* in the evolution of diverged axial morphology [J]. Proc. Natl. Acad. Sci, 1998, 95: 2355-2360.
- [7] 张立岭. 绵羊基因组印记遗传研究进展 [J]. 中国草食动物, 2001(4): 38-40.
- [8] MILLER A H, SUZUKI D T, LEWONTIN R C. An Introduction to Genetic Analysis [M]. 6th ed. Los Angeles: University of California, Los Angeles, USA, 1996.
- [9] MCPHERRON A, LAWLER A M, LEE S J. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor II [J]. Nature Genetics, 1999, 22: 260-264.
- [10] GEHING W J. Master control genes in development and evolution: The *Homeobox* Story [M]. New Haven: Yale University Press, 1998: 182-193.

- [11] 张立岭,斯琴毕力格,张世铨. 多脊椎蒙古羊的胸腰椎长度对产肉性能的影响[J]. 中国畜牧杂志,1998,34(3): 24-25.
- [12] MILLER A H. An Introduction to Genetic Analysis[M]. 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company,1996:772.
- [13] 张立岭,斯琴毕力格. 动物脊柱的进化与蒙古羊脊椎变异间的关系[J]. 内蒙古农牧学院学报:自然科学版,1997,18(3):1-6.
- [14] HAJKOVA P, EI-MAARRI O, ENGEMANN S, et al. DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method[J]. Methods Mol Biol 2000 200:143-154.

## Sequence Analysis of *Hoxc8 Exon-1* and *Exon-2* of Multi-Vertebrae Mongolia Sheep

CHEN Qi<sup>1</sup>, ZHAO Jing<sup>2</sup>, ZHANG Li-ling<sup>3</sup>, MA Yue-hui<sup>4</sup>

1. Research Center of Molecular Biology, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, China;
2. College of Animal Science and medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China;
3. College of Agriculture, Hainan University, Haikou, 570228, China;
4. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In our study, according to the *Hoxc8* sequence of cow, the specific primers were designed, and the sequences of *Hoxc8 exon-1* (432 bp) and *exon-2* (273 bp) of normal and multi-thoracic vertebrae mongolia sheep were obtained (Genebank accession number: EU817489 and FJ905472). Alignment results of them indicated that the sequences were conformity except a little difference in two sides of sequences. *Hoxc8 exon-1* and *exon-2* were aligned with other species and the results showed that compared with other mammals (human, dog, mouse, rat and chimpanzee), the homology were above 96% (*exon-1*) and 91% (*exon-2*); compared with zebra fish, the homology were 75.8% and 74%.

**Key words:** Multi-Vertebrae Mongolia sheep; sequences analysis; *Hoxc8 exon-1*; *Hoxc8 exon-2*