

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.12.006

从江香猪 *LMF1* 基因的克隆、 亚细胞定位及组织表达研究^①

赵佳福^{1,2}, 苟维胜³, 段志强^{1,2},
赵焕平^{1,2}, 阮涌^{1,2}, 倪萌萌^{1,2}

1. 贵州大学 高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵阳 550025;
2. 贵州大学 动物科学学院, 贵阳 550025; 3. 贵州露元现代农业发展有限公司, 贵州 湄潭 564100

摘要: 为研究脂肪酶成熟因子 1(*LMF1*) 基因在从江香猪不同组织的表达情况及在真核细胞中的亚细胞定位情况, 采用 RT-PCR, Real-Time PCR, PSORT II Prediction 软件结合荧光共定位的方法, 克隆了从江香猪 *LMF1* 基因 cDNA, 构建了 pEGFP-C1-*LMF1* 真核表达载体, 分析了 *LMF1* 基因在不同组织的表达差异和亚细胞定位情况。结果表明, 从江香猪 *LMF1* 基因与 GenBank 上提交的其他猪种的同源性达到了 100%; *LMF1* 基因在脂肪中表达量最高, 心中最低, 且脂肪和小肠与其他 7 个组织相比, 表达量均存在统计学意义 ($p < 0.01$); 荧光共定位结果表明, *LMF1* 基因主要集中在细胞质中表达。相关结果对后续研究 *LMF1* 蛋白与其互作蛋白在脂质代谢的作用机理奠定的基础。

关键词: 从江香猪; *LMF1*; 基因克隆; 亚细胞定位; 荧光定量

中图分类号: Q953 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2017)12-0038-06

脂肪酶成熟因子 1 蛋白(Lipase maturation factor 1, *LMF1*), 是在脂肪酶成熟过程中发挥重要作用的一种内质网膜蛋白^[1], 在高等动物的大部分组织中均表达, 对动物体脂肪代谢、能量平衡具有非常重要的调节作用, 是机体脂质代谢和血脂稳态调控网络的重要调节因子^[2-3]。研究表明, *LMF1* 基因作为内质网上的分子伴侣参与了脂蛋白脂酶(LPL)、肝脂酶(HL)和内皮脂肪酶(EL)几种血管酯酶的翻译后成熟和催化活化^[4], 且 *LMF1* 基因的突变或缺失会导致人和动物体联合缺乏症(combined lipase deficiency, CLD), 进而诱发严重的高甘油三酯血症, 是肥胖、糖尿病和各种心血管疾病的主要发病原因^[5-7]。然而, 目前关于 *LMF1* 的研究, 主要集中在人类和小鼠脂质代谢紊乱引起的相关疾病方面, 而对猪、马、牛、羊等大家畜上报道相对较少。鉴于 *LMF1* 基因在脂质代谢中的重要作用, 因此可考虑将该基因作为畜禽生产性状的候选基因来进行研究。

从江香猪作为著名的脂肪型小型猪, 具有体型小、基因纯合等特点, 是进一步研究机体脂质代谢紊乱导致人类各种疾病最为理想的模式动物之一。猪的 *LMF1* 基因定位于 3 号染色体上, 全长 3 258 bp, 由 8 个外显子和 7 个内含子构成, 其 CDS 区全长 996 bp, 编码 332 个 AA。本文以从江香猪为研究对象, 克隆分析 *LMF1* 基因, 研究从江香猪 *LMF1* 基因与其他猪种基因的差异, 并通过细胞转染和荧光共定位的技术手段, 验证 *LMF1* 基因在细胞中的亚细胞定位情况, 建立猪 *LMF1* 基因在猪上的基础数据。相关研究结果将为进一步研究 *LMF1* 蛋白与 LPL, HL 和 EL 几种血管酯酶在脂质代谢的作用机理方面奠定基础。

① 收稿日期: 2017-02-21

基金项目: 省校联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7668); 贵州大学青年基金项目(贵大自青基合字[2012]010 号)。

作者简介: 赵佳福(1984-), 男, 陕西渭南人, 实验师, 博士研究生, 主要从事分子细胞遗传学的研究。

1 材 料

1.1 菌株、载体及细胞

JM109 感受态细胞, pMD-19-T 载体(Takara 公司); pEGFP-C1 载体, 293T 细胞由贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室段志强博士惠赠。

1.2 试剂和仪器

RNA 提取试剂盒(Omega), 反转录试剂盒(康为); 2×Es Taq Master Mix(康为), 限制性内切酶 Xho I, BamH I 及 T4 DNA ligase (Takara); 质粒抽提试剂盒, 琼脂糖凝胶回收试剂盒(Axygen), 无内毒素质粒提取试剂盒, QuantFast™SYBR® Green PCR Kit(QIAGEN), FuGENE® HD Transfection Reagent 转染试剂(Roche); DL5000, DL15000 Marker (Takara); DMEM 培养基, 优质胎牛血清, Opti-MEM 培养基®(gibco); 倒置荧光显微操作系统(Nikon)。

2 方 法

2.1 引物设计

根据 GenBank 中猪 LMF1(登录 XM_013995772.1)mRNA 序列, 采用 primer Premier 5.0 软件设计基因克隆引物和荧光定量引物, 以 GAPDH 作为内参基因, 并在克隆引物上、下游分别引入 Xho I, BamH I 酶切位点, 设计好的引物送上海英俊生物技术有限公司合成. 引物序列见表 1.

表 1 LMF1 基因克隆引物和荧光定量引物

目的基因	引物序列	产物大小/bp	退火温度/℃
LMF1	F: 5'-CCCTCGAG GCATGGATTTCCACTATGAGAC-3' R: 5'-CGGGATCCACCGTCTTTCCACTTTATT-3'	1 047	60
LMF1	YGF: 5'-CATCACCAAGGAGCGCACAGAG-3' YGR: 5'-ATAGGTCTGGAAGGCAGCGAAC-3'	190	58
GAPDH	F: 5'-TTGTGATGGGCGTGAACC-3' R: 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'	169	58

2.2 LMF1 基因的克隆与序列分析

2.2.1 RNA 的提取和 LMF1 基因的获得

取从江香猪背最长肌 50~100 mg, 加入液氮并研磨成粉, 按照 Omega RNA 提取试剂盒使用说明书进行总 RNA 的提取, 参照康为公司反转录试剂盒说明进行逆转录, 获得的 cDNA 产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应. 采用 LMF1-F 和 LMF1-R 两引物, 设 53℃, 55℃, 56℃, 57℃, 58℃, 60℃ 6 个退火温度, 扩增 LMF1 目的基因。

2.2.2 pMD-19-LMF1 亚克隆载体的构建

根据宝生物公司 pMD-19-T 载体说明, 链接目的片段和 T 载体, 然后转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 进行蓝白斑筛选, 挑取阳性菌落进行 LB 液体培养基培养, 12 h 后进行菌液 PCR 鉴定. 根据菌液 PCR 结果提取质粒, 进行双酶切鉴定. 对菌液 PCR 鉴定和双酶切鉴定均正确的质粒, 送上海英俊生物技术有限公司进行测序鉴定。

2.2.3 LMF1 基因的生物信息学分析

根据测序结果, 采用 STRING 数据库在线系统(<http://string-db.org/>)分析与 LMF1 相互作用的蛋白. 同时运用 PSORT II Prediction 程序分析 LMF1 蛋白氨基酸序列, 对蛋白进行亚细胞定位。

2.3 pEGFP-C1-LMF1 真核表达载体的构建

采用 Xho I, BamH I 限制性内切酶分别酶切 pMD-19-LMF1 和 pEGFP-C1 两质粒, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收目的片段. T4 DNA ligase 16℃ 过夜定向连接胶回收后的 pEGFP-C1 与 LMF1 目的片段. 采用含有卡那霉素的 LB 琼脂平板筛选阳性菌落, 进一步构建 pEGFP-C1-LMF1 真核表达载体, 方法同 2.2.2.

2.4 pEGFP-C1-LMF1 真核表达载体在 293T 细胞中的表达及亚细胞定位

本实验采用 24 孔细胞培养板转染, 待细胞达到 90% 丰度时开始转染. 以 pEGFP-C1 空载体为对

照组, pEGFP-C1-LMF1 为实验组, 具体转染步骤参照 FuGENE[®] HD Transfection Reagent 的操作说明书进行, 转染结束后将培养板置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养. 转染 24 h 后进行荧光共定位实验. 首先, PBS 浸洗细胞培养孔 3 次, 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min; 然后用 0.25% Triton X-100 室温通透 5 min(注: 后续实验步骤尽量在暗处进行); 最后滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 再在荧光显微镜下采集图像, 并采用 PhotoshopCS3 软件分析融合蛋白的亚细胞定位.

2.5 *LMF1* 基因在从江香猪不同组织的表达分析

Trizol 法提取从江香猪心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠、脂肪、背最长肌、胃 10 个器官组织的总 RNA, 稀释至同一浓度. 以 *GAPDH* 基因作为内参, 参照 QuantFast[™] SYBR[®] Green PCR 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR, 每个样品设 3 个重复. 反应体系为 10 μL: PCR Mix 6 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 1.2 μL; 反应程序: 95 °C 5 min, (95 °C 10 s, 58 °C 30 s, 65 °C 0.05 s) × 40 个循环, 95 °C 0.5 s.

3 结果与分析

3.1 pMD-19-LMF1 亚克隆载体鉴定结果

对挑取的阳性克隆子, 进行菌液 PCR 鉴定, 琼脂糖凝胶电泳显示, 1, 2, 4, 5 泳道在 1 047 bp 左右出现目的条带, 见图 1; 提取 1, 2, 4, 5 泳道对应菌株的质粒 DNA, 采用 Xho I, BamH I 进行双酶切鉴定, 结果见图 2, 4 株菌结果均在 1 047 bp 和 2 692 bp 处出现两条亮带, 表明 1, 2, 4, 5 号泳道对应的菌株已成功将目的基因克隆进载体 pMD19-T 载体中.

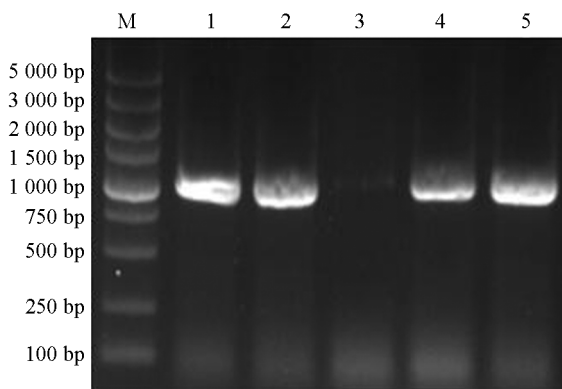


图 1 菌液 PCR 鉴定结果

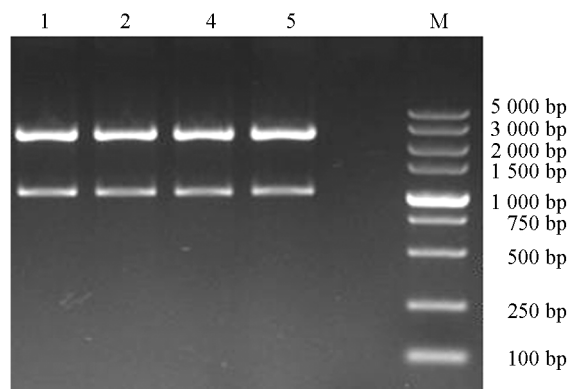


图 2 双酶切鉴定结果

3.2 生物信息学分析结果

3.2.1 序列比对结果

采用 DNASTAR 生物分析软件中的序列比对软件 MegAlign 对测序得到的从江香猪 *LMF1* 基因编码序列与 GenBank 发表的其他猪种的 *LMF1* 基因 cDNA 序列进行同源性比较, 结果发现从江香猪 *LMF1* cDNA 序列与 GenBank 上发表的野猪 *LMF1* 基因 cDNA 序列同源性达到了 100%.

3.2.2 与 *LMF1* 相互作用的蛋白

通过 STRING 蛋白质相互作用分析软件分析, 结果表明, *LMF1* 基因与脂蛋白脂酶(LPL)、马胰腺甘油三酯脂酶(PNLIP)、肝脂肪酶(LIPC)、(钙联接蛋白)CANX、(突触融合蛋白 11)STX11 等(标识要一致)10 种蛋白具有蛋白质间的相互作用, 如图 3.

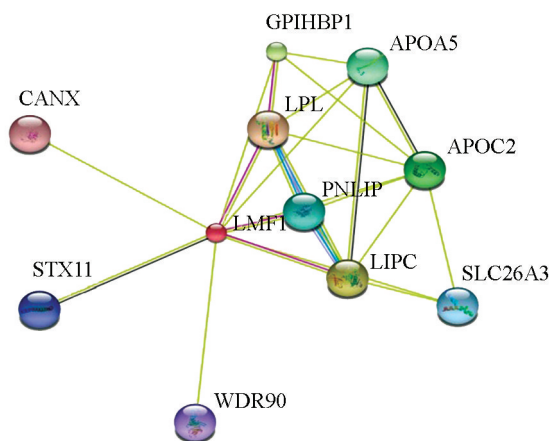


图 3 与 *LMF1* 相互作用的蛋白网络

3.2.3 LMF1 蛋白的亚细胞定位预测

PSORT II Prediction 对 LMF1 蛋白的亚细胞定位分析表明, LMF1 蛋白主要集中在细胞质中表达, 其中质膜占 43.6%, 内质网占 30.4%, 液泡中占 17.4%, 高尔基体占 4.3%, 线粒体占 4.3%.

3.3 pEGFP-C1-LMF1 重组质粒鉴定

提取阳性菌体质粒 DNA, 经 PCR 鉴定和双酶切鉴定结果均正确, 分别见图 4 和图 5, 说明携带有绿色荧光蛋白的 pEGFP-C1-LMF1 重组真核表达载体构建成功, 并已成功地导入大肠杆菌 JM109 中.

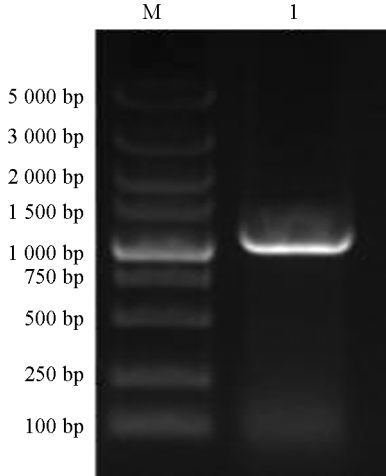


图 4 PCR 凝胶电泳鉴定结果

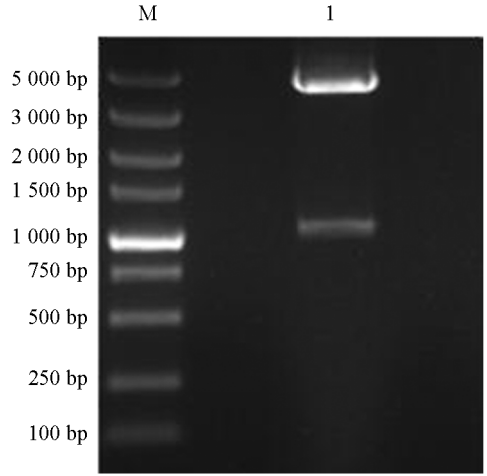
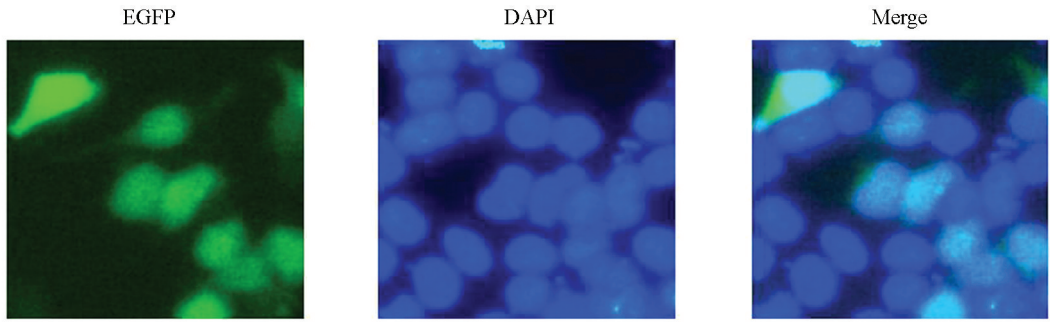


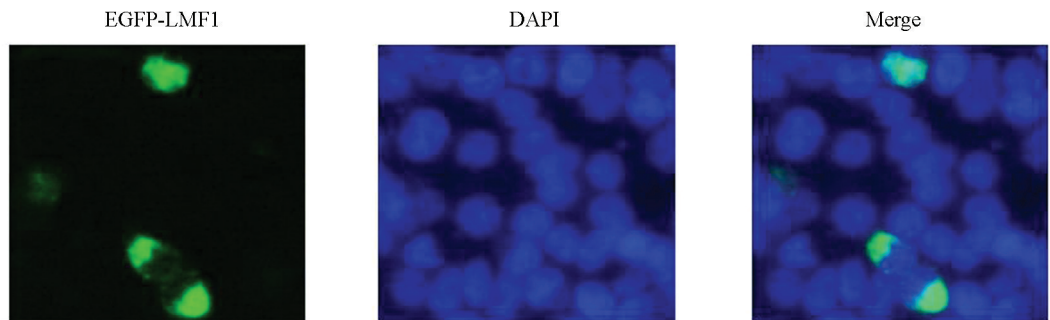
图 5 双酶切凝胶电泳鉴定结果

3.4 荧光共定位检测 LMF1 基因在细胞中的定位

通过 DAPI 染核及荧光共定位发现, LMF1 蛋白与对照组 EGFP 蛋白相比, 主要集中在细胞质中表达, 见图 6.



(a) 转染 pEGFP-C1 空载体 36 h 后荧光结果



(b) 转染 pEGFP-C1-LMF1 真核载体 36 h 后荧光结果

图 6 瞬时转染 293T 细胞荧光显微镜观察

3.5 *LMF1* 基因在从江香猪不同组织的表达

经 SPSS17, GraphPad Prism 5 两个生物统计软件的分析, 结果见图 7. 由图 7 可见, *LMF1* 基因在从江香猪 9 个组织中的表达量由高到低为脂肪, 小肠, 大肠, 肝, 脾, 肺, 肾, 胃, 心, 其中脂肪与小肠与其他 7 个组织相比, 表达量存在统计学意义 ($p < 0.01$); 同时, 脂肪与小肠相比, 表达量也存在统计学意义 ($p < 0.01$). 结果与 *LMF1* 基因在调节动物体脂肪代谢、能量平衡、参与机体脂质代谢和血脂稳态调控网络的重要调节因子等方面的生理机能相一致.

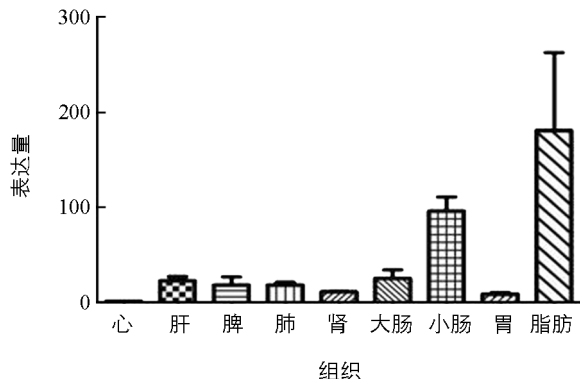


图 7 *LMF1* 基因在从江香猪不同组织中的差异表达分析

4 讨论

LMF1 基因作为机体脂质代谢和血脂稳态调控网络的重要调节因子, 其作为内质网上的分子伴侣在运输脂蛋白脂酶(LPL)到活性位置和对肝脂酶(HL 或 LIPC)翻译后修饰中起到调节脂质代谢的作用^[8], 然而此过程中哪些蛋白与 *LMF1* 共同完成了调节脂质代谢的生理作用尚不清楚. 论文采用 STRING 蛋白质相互作用分析软件, 发现 LPL, APOC2, GPIHBP1, PNLIP, LIPC, CANX, STX11, APOA5, WDR90, SLC26A3 10 种蛋白与 *LMF1* 存在相互作用. 此外, 研究表明患者体内 *LMF1* 及 LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 等与其存在互作基因的突变, 会导致严重的高甘油三脂血症(HTG)^[9-11], 然而其发病机制和作用机理并不清楚. 目前对 *LMF1* 蛋白的研究发现, *LMF1* 作为跨膜蛋白在把 LPL 运送到活性位置的过程中起作用, LPL 作为体内脂质和脂蛋白代谢的关键酶, 其主要功能是催化水解 CM 与 VLDL 中的甘油三脂(TG), 向组织提供产能所需的游离脂肪酸^[12]. LPL 上拥有 APOC2 的结合和活化位点, 其在 *LMF1* 的运输作用下, 通过 GPIHBP1 定位在毛细血管内皮细胞的表面, 进一步将血液中的 TG 水解成游离的脂肪酸和甘油^[13]. 然而其他与 *LMF1* 存在相互的蛋白在脂质代谢过程中的作用及其机制还尚不清楚, 需开展进一步的实验研究.

此外研究表明, *LMF1* 作为一种跨膜蛋白, 以内质网上分子伴侣的形式参与了 LPL, HL, EL 等酯酶的翻译后修饰, 说明该蛋白主要集中在质膜和内质网中表达, 论文通过荧光共定位和 PSORT II Prediction 亚细胞定位软件进一步获得了验证, 表明 *LMF1* 蛋白主要集中在细胞质中表达, 其中质膜占 43.6%, 内质网占 30.4%. 实时荧光定量 PCR 结果表明, *LMF1* 基因在从江香猪 9 个组织均有表达, 且在脂肪和小肠中表达量最高, 达统计学意义, 在心脏中最低, 这一结果与 *LMF1* 基因在参与机体脂质代谢和血脂稳态调控网络等方面的生理机能相一致, 相关结果也暗示, 可将 *LMF1* 基因作为筛选畜禽相关生产性状的重要候选基因进行研究.

参考文献:

- [1] DOOLITTLE M H, NEHER S B, BEN-ZEEV O, et al. Lipase Maturation Factor LMF1, Membrane Topology and Interaction with Lipase Proteins in the Endoplasmic Reticulum [J]. J Biol Chem, 2009, 284(48): 33623-33633.
- [2] 任 刚. 中国四个牛品种 LHX4、LMF1 基因遗传变异及其与生长性状相关分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [3] PÉTERFY M, BEN-ZEEV O, MAO H Z, et al. Mutations in LMF1 Cause Combined Lipase Deficiency and Severe Hypertriglyceridemia [J]. Nat Genet, 2007, 39(12): 1483-1487.
- [4] EHRHARDT N, BEDOYA C, PÉTERFY M. Embryonic Viability, Lipase Deficiency, Hypertriglyceridemia and Neonatal Lethality in A Novel LMF1-Deficient Mouse Model [J]. Nutrition & Metabolism, 2014, 11(1): 37.
- [5] AUSTIN M A, HOKANSON J E, EDWARDS K L. Hypertriglyceridemia as A Cardiovascular Risk Factor [J]. Am J Cardiol, 1998, 81(4): 7B-12B.
- [6] GINSBERG H N, STALENHOF A F. The Metabolic Syndrome: Targeting Dyslipidaemia to Reduce Coronary Risk [J]. J Cardiovasc Risk, 2003, 10(2): 121-128.

- [7] PEJIC R N, LEE D T. Hypertriglyceridemia [J]. J Am Board Fam Med, 2006, 19(3): 310–316.
- [8] ATTIE A D. High-Maintenance Proteins and Hypertriglyceridemia [J]. Nat Genet, 2007, 39(12): 1424–1425.
- [9] SURENDRAN R P, VISSER M E, HEEMELAAR S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in Patients with Severe Hypertriglyceridaemia [J]. Journal of Internal Medicine, 2012, 272(2): 185–196.
- [10] CASTRO-ORÓS I D, MD F C, PUEYO M J, et al. Rare Genetic Variants with Large Effect on Triglycerides in Subjects with a Clinical Diagnosis of Familial vs Nonfamilial Hypertriglyceridemia [J]. Journal of Clinical Lipidology, 2016, 10(4): 790–797.
- [11] SPINA R, CEFALU' A B, NOTO D V, et al. Identification of a Novel LMF1 Nonsense Mutation Responsible for Severe Hypertriglyceridemia by Targeted Next-Generation Sequencing [J]. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2017, 27(1): e39.
- [12] 赵佳福, 许厚强, 乜玉丽, 等. pEGFP-N3-LPL 重组真核表达载体的构建及在 Vero 细胞中的表达 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(4): 40–45.
- [13] BEIGNEUX A P, BRANDON S J, DAVIES P G, et al. Glycosyl-Phosphosphatidylinositol-Anchored High-Density Lipoprotein-Binding Protein 1 Plays a Critical Role in the Lipolytic Processing of Chylomicrons [J]. Cell Metab, 2007, 5(4): 279–291.

Cloning, Subcellular Localization and Tissue Expression of *LMF1* Gene in Congjiang Xiang Pig

ZHAO Jia-fu^{1,2}, GOU Wei-sheng³, DUAN Zhi-qiang^{1,2},
ZHAO Huan-ping^{1,2}, RUAN Yong^{1,2}, NI Meng-meng^{1,2}

1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region of Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

3. Guizhou Luyuan Modern Agriculture Development Limited Company, Meitan Guizhou 564100, China

Abstract: In order to study the expression of lipase maturation factor 1 (*LMF1* gene) in different tissues of Congjiang Xiang pig and its subcellular localization, RT-PCR (real-time PCR), PSORT II Prediction and fluorescent co-location were used to clone the cDNA of *LMF1* gene, construct the recombinant eukaryotic vector of pEGFP-C1-*LMF1*, and analyze the difference of its expression in various tissues and subcellular localization, so as to provide a foundation for researching the mechanism of *LMF1* protein and its interaction proteins in lipid metabolism. The results showed that the cDNA region of *LMF1* gene of Congjiang Xiang pig and that of other pig breeds in GenBank submission shared a 100% homology. *LMF1* gene had the highest expression in the fat and the lowest in the heart, and its expression in the fat and the small intestine was highly different from that in the other 7 tissues ($p < 0.01$). Fluorescent co-location demonstrated that *LMF1* gene was mainly expressed in the cytoplasm.

Key words: Congjiang Xiang pig; lipase mature factor 1 (*LMF1*); gene cloning; subcellular localization; fluorescent quantitation

