

## 猪 *SOCS-2* 基因的克隆及序列分析

# Cloning and Sequence Analysis of *SOCS-2* Gene in Pig

杜宝文 杨公社 孙 超\*

DU Bao-Wen, YANG Gong-She and SUN Chao\*

西北农林科技大学 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室 陕西杨凌 712100

Northwest A&F University, Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, YangLing 712100, China

**摘 要** 从中国地方猪品种八眉猪(BaMei)肾脏组织中提取总 RNA,采用 RT-PCR 方法克隆了猪 *SOCS-2*(suppressor of cytokine signaling -2, 细胞因子信号转导抑制因子-2)基因的 cDNA 序列。经 T/A 克隆,插入到 pMD19-T 载体上,导入大肠杆菌 DH-5 $\alpha$  阳性克隆经 PCR 鉴定后进行测序,将测序结果与 GenBank 中已登录的人、大鼠和小鼠 *SOCS-2* 基因的序列进行同源性比较,利用生物信息学和分子生物学软件对猪 *SOCS-2* 基因编码的蛋白进行结构预测。结果表明,首次成功克隆了猪 *SOCS-2* 基因的 cDNA 序列(GenBank 登录号为 EF121242),其长度为 822 bp,该基因 ORF 区核苷酸序列与其他物种相比同源性达到 93% 以上,氨基酸同源性则达到 89% 以上,生物信息学分析表明该蛋白分子量为 22.25kD,等电点 pI = 8.30,包含 199 个氨基酸残基。该基因 cDNA 序列的克隆,有利于进一步研究 *SOCS-2* 调节机体发育的分子机理。

**关键词** 猪, *SOCS-2*, 基因克隆, 序列分析

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1091-06

**Abstract** Total RNA was isolated from kidney of BaMei pig, a local strain of Chinese pig, and then the cDNA sequence of *SOCS-2* gene was cloned by RT-PCR (GenBank accepted number is EF121242). Then the cloned *SOCS-2* gene was inserted into PMD19-T vector by T/A cloning, transformed into DH-5 $\alpha$ , tested by PCR and sequenced. The data show that the homology of the cloned porcine *SOCS-2*, including 822 bp, is more than 93% and that of the deduced amino acid sequence is 89% when compared with human, rat and mice. And the molecular weight of *SOCS-2* protein is about 22.25kD and PI is 8.03. The cloning of *SOCS-2* gene is useful for the further research on the molecular mechanism by which regulating growth and development of organism.

**Key words** pig, *SOCS-2*, gene cloning, sequence analysis

GH(生长激素)信号通路对机体的生长发育具有重要的调控作用,它由垂体前叶分泌,经循环系统到达靶组织,其中 JAK2/STAT5 通路在 GH 信号转导中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。*SOCS-2* 是新近发现的 *SOCS* 家族的成员之一,*SOCS-2* 蛋白由 N 区、SH<sub>2</sub> 区和 C 端的 *SOCS* 盒区组成,多项研究表明 *SOCS* 盒可

能参与了 *SOCS-2* 以及与 *SOCS-2* 结合的其他信号分子的泛素化降解<sup>[2-5]</sup>。有人研究发现,*SOCS-2* 能通过其 SH<sub>2</sub> 结构域与 GHR 的 Tyr<sup>595</sup>、Tyr<sup>487</sup>、Tyr<sup>332</sup> 和 Tyr<sup>534</sup> 位点相互作用,并发现 *SOCS-2* 蛋白的 3 个结构域在 GH 信号通路的调控中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>,但是 *SOCS-2* 调控 GH 信号通路的分子机理还不清楚。

Received: February 9, 2007; Accepted: April 24, 2007.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30471267) and the Key Program of Educational Ministry (No. 105167).

\* Corresponding author. Tel: +86-29-87082424; E-mail: schao@nwsuaf.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30471267),教育部重点项目(No. 105167)资助 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2005年,澳大利亚学者首次从澳洲野猪体内克隆了 *SOCS-2* 基因第三外显子区部分 DNA 序列,并将其定位到猪的第 5 号染色体上,然而有关家猪 *SOCS-2* 基因的研究尚未见到报道<sup>[7]</sup>。本试验旨在克隆猪 *SOCS-2* 基因 cDNA 序列,并对其序列进行分析,为研究 *SOCS-2* 调控猪机体发育的机理提供一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物

6 月龄健康雄性八眉猪 3 头,屠宰于陕西宝鸡苜蓿农场。

### 1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 TRIpure Reagent(百泰克生物技术有限公司),反转录试剂盒 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas),Taq Plus 酶购自北京鼎国生物技术有限公司,dNTP (HUALVYUAN BIOTECHNOLOGY),Marker II 购自(广东东胜生物科技有限公司),H. Q. & Q DNA 回收试剂盒购自(安徽优晶生物工程有限公司),pMD19-T vector (TaKaRa),*E. coli* DH 5 $\alpha$  为本实验室保存、H. Q. & Q 质粒微量提取试剂盒(安徽优晶生物工程有限公司)。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 已发表的 AY31226 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件,按照引物设计的基本要求,设计 *SOCS-2* 基因 PCR 扩增引物,引物由上海生工合成。序列如下:

上游 5' GATTCGTTTTGGGGTTCTC 3' ;

下游 5' TCAGCGTCTTAGCGTT 3'。

### 1.4 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

取八眉猪肾组织在液氮中研碎,然后按百泰克 RNA 提取试剂盒说明书进行提取。提取完成之后,于 1% 的琼脂糖凝胶上进行检测。反转录时,取溶解与 DEPC 水中的总 RNA 5 $\mu$ L, 0.2 $\mu$ g/ $\mu$ L Random hexamers primer 1 $\mu$ L, DEPC 水 6 $\mu$ L, 70 $^{\circ}$ C, 孵育 5min, 置冰上冷却后加入下列试剂: 5 $\times$  Buffer 4 $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP Mixture 2 $\mu$ L, 20u/ $\mu$ L Rnasinhibitor 1 $\mu$ L, 25 $^{\circ}$ C, 孵育 5min, 200u/ $\mu$ L MuLV 反转录酶 1 $\mu$ L, 总体积 20 $\mu$ L。在 PTC-200 热循环仪中, 25 $^{\circ}$ C, 10min, 42 $^{\circ}$ C 反应 60min, 70 $\mu$ L $^{\circ}$ C, 10min 终止反应, 冰上冷却。

### 1.5 PCR 扩增

1.5.1 PCR 反应体系: 25 $\mu$ L 反应体系中含有: 17.7 $\mu$ L 灭菌的二蒸水、2.5 $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer, 2 $\mu$ L

2mmol/L dNTP Mix, 0.8 $\mu$ L 10 $\mu$ mol/L Primer I, 0.8 $\mu$ L 10 $\mu$ mol/L Primer II, 0.4 $\mu$ L 0.5u/ $\mu$ L Plux Taq 酶, 0.8 $\mu$ L cDNA 模板。

1.5.2 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C, 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 29 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 10min。利用 PTC-200 DNA engine (MJ Research, BIO-RAD, Inc.) 进行扩增。

### 1.6 扩增片段的分离和克隆

利用 H. Q. & Q 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 按产品说明书, 从普通的 1.5% 琼脂糖凝胶上回收特异性条带, 回收产物连接于 pMD-19T 载体, 转化感受态 *E. coli* DH 5 $\alpha$  涂布平板, 经蓝白斑筛选, 分别接种于 10mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养。

### 1.7 重组质粒的 PCR 鉴定

挑取阳性克隆接种于 10mL LB 培养基中, 过夜培养后用 H. Q. & Q 质粒微量提取试剂盒抽提质粒 DNA (碱裂解法), PCR 扩增初步鉴定重组质粒并测序。

### 1.8 结果分析

采用 DNASTAR 6.13 软件将测序结果进行分析、拼接, 用 Primer Premier 5.0 软件将序列转化为氨基酸序列。用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行序列搜索和同源性比对。再将测序结果利用 NCBI 中的 CDD (Conserved Domain Database) 进行结构分析, 检测克隆基因的完整性。

### 1.9 猪 SOCS-2 蛋白结构预测

将扩增的猪 *SOCS-2* 基因编码的氨基酸序列提交 ExPASy 网站进行蛋白结构预测<sup>[8-10]</sup>, 用 Kyte-Doolittle 方法和 Emini 原则结合 DNASTAR 6.13 分析软件, 分别对该蛋白疏水区、亲水区、表面暴露区及蛋白体系中的电荷分布进行预测<sup>[11, 12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 组织提取 RNA 的完整性

提取的 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像仪下照像如图 1。由图 1 可见, 从脂肪组织提取的 RNA 三条带均清晰可见, 说明其完整性好, 完全符合后续分子生物学实验要求。

### 2.2 PCR 扩增结果

用所合成的引物和反转录所得 cDNA 模板扩增猪 *SOCS-2* 基因, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测 (见图 2)。由图 2 可见, 其特异性良好, PCR 产物长度约 822bp, 与预期的相符。

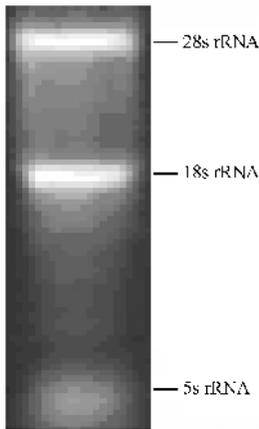


图 1 肾组织提取 RNA 的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis profiles of total RNA from kidney tissue

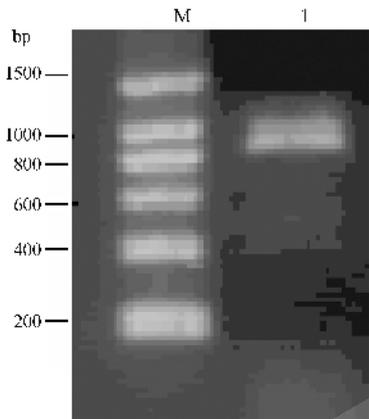


图 2 SOCS-2 基因 PCR 产物的电泳图

Fig. 2 Electrophoresis result of SOCS-2 PCR products

2.3 重组质粒的 PCR 鉴定

PCR 产物连接至克隆载体 pMD19-T 载体后 , 转化感受态 *E. coli* DH 5 $\alpha$  细胞 , 抽提质粒 DNA 后 PCR

方法对阳性克隆进行初步筛选 结果如图 3。由图 3 可知 , 扩增条带特异 , 且大小与预期的目标条带相同 , 重组质粒的 PCR 初步鉴定为阳性克隆。

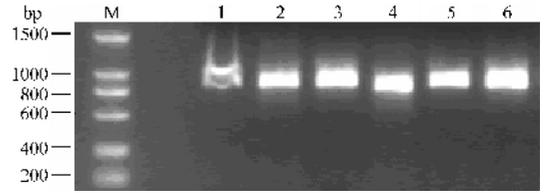


图 3 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of recombinant plasmid  
1, 2, 3, 4, 5, 6 : SOCS-2 ; M : marker.

2.4 克隆所得序列、GenBank 登录号及同源性比对分析

克隆的 SOCS-2 cDNA 经测序和分析发现 , 序列长度为 822bp, 从第 99 位到 696 位为 ORF 区。将克隆测序的序列向 GenBank 提交 , 所得登录号为 EF121242。将编码区与 GenBank 已发表的人、大鼠和小鼠的 SOCS-2 基因序列进行比对 , 并用 CLUSTAL W 软件进行同源性分析发现 , 家猪 SOCS-2 基因与澳洲野猪、人、小鼠、大鼠 SOCS-2 的同源性分别为 99%、94%、91%、89% , 而氨基酸同源性分别达到 :100%、95%、94%、93% 同源性达 93% 以上。猪 SOCS-2 基因测序结果见图 4。

2.5 蛋白结构预测

由于 SOCS 家族成员的结构保守 , 均含有 SH<sub>2</sub> 结构域和 SOCS-box , 因此对测序结果进行分析 , 确定克隆测序的完整性。将测序所得序列利用 GenBank 中的 CDD 分析 ( 所得结构见图 5 ) ; 通过蛋白结构预

```

M T L R C L E P S G N G A E G T
ATGACC CTG CGG TGC CTC GAG CCC TCC GGG AAT GGC GCG GAAGGG ACG
Q S Q W G T S G S A E E P S P E
CAG AGC CAG TGG GGG ACC TCG GGG TCG GCG GAG GAG CCG TCC CCA GAG
A A R L A K A L R E L S H T G W
GCG GCC CGA CTG GCG AAA GCC CTG CGG GAG CTT AGT CAC ACA GGT TGG
Y W G S M T V N E A K E K L K E A
TAC TGG GGA AGT ATG ACT GTT AAT GAA GCC AAA GAG AAA TAAAA GAG GCA
P E G T F L I R D S S H S D Y L L
CCC GAA GGA ACT TTC TTG ATT AGA GAT AGT TCG CAC TCA GAC TAC TACTACTA
T I S V K T S A G P T N L R I E Y
ACA ATA TCT GTT AAA ACA TCA GCT GGA CCA ACT AAT CTG CGC ATC GAA TAC
Q D G K F R L D S I I C V K S K L
CAA GAC GGG AAA TTC AGA TTG GAC TCT ATC ATA TGT GTC AAG TCC AAG CTT
K Q F D S V V H L I D Y V V Q M C
AAG CAA TTT GAC AGT GTG GTT CAT CTG ATC GAC TAC TAT GTT CAG ATG TGC
K D K R T G P E A P R N G T V H L
AAG GAT AAG CGG ACG GGC CCA GAA GCC CCC CGG AAC GGC ACC GTT CAC CTC
Y L T K P L Y T S A P P L Q H L C
TAT CTG ACC AAA CCG CTC TAC ACA TCA GCA CCA CCC CTG CAG CAT CTC TGT
R L T I N K C T G T I W G L P L P
AGACTC ACC ATT AAC AAA TGT ACC GGT ACT ATC TGG GGA CTG CCT TTA CCA
T R L K D Y L E E Y K F Q V
ACAAGACTAAAA GAT TAC TTG GAA GAA TAT AAA TTCCAGGTGTAA
    
```

图 4 猪 SOCS-2 基因序列及推导的编码氨基酸序列

Fig. 4 Sequence of the SOCS-2 gene and predicted amino acid in pig



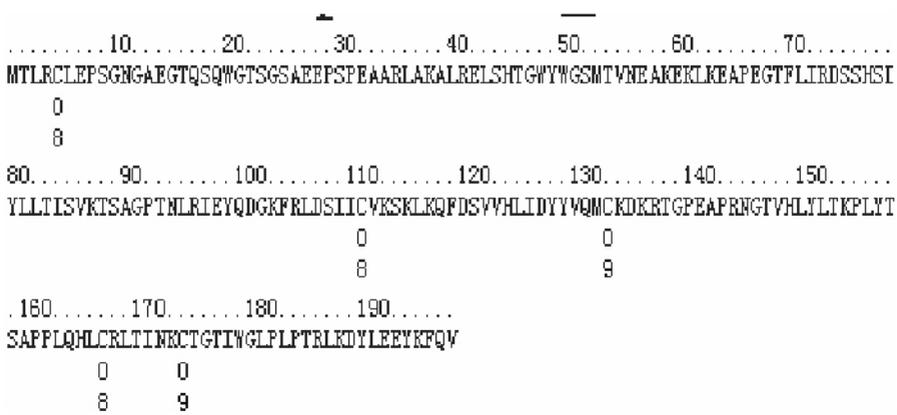


图 7 猪 SOCS-2 蛋白链内二硫键形成预测

Fig. 7 Cysteines bonding state and connectivity predictor of SOCS-2 protein in pig (0 = Not Bonded , 1 = Bonded )

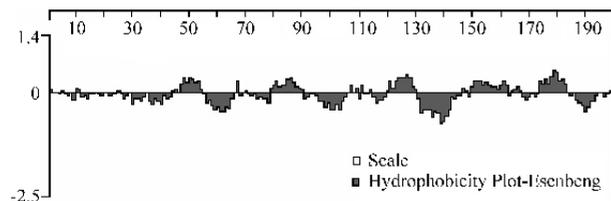


图 8 猪 SOCS-2 的亲水性预测

Fig. 8 Predicted hydrophilicity of SOCS-2 protein in pig

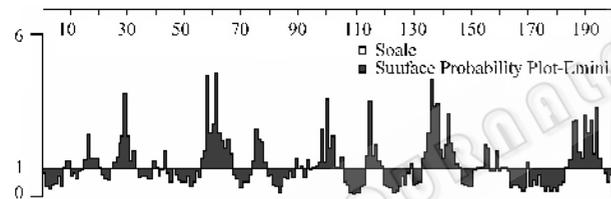


图 9 猪 SOCS-2 蛋白表面暴露区预测

Fig. 9 Surface probability of SOCS-2 protein in pig

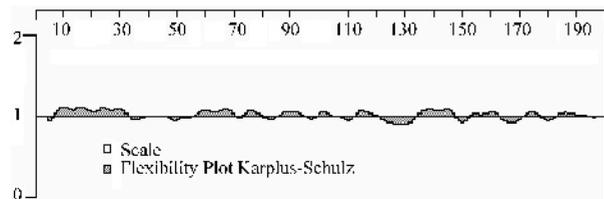


图 10 猪 SOCS-2 骨架柔韧性预测

Fig. 10 Predicted flexibility of SOCS-2 protein in pig

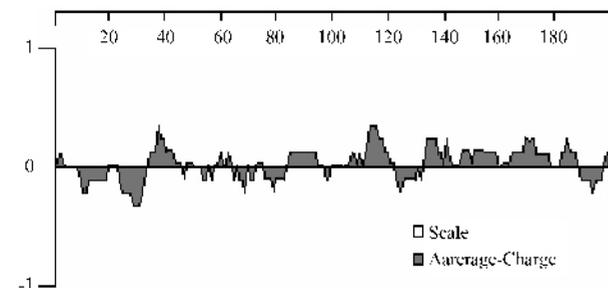


图 11 猪 SOCS-2 蛋白电荷密度预测

Fig. 11 Predicted charge density of SOCS-2 protein in pig

因小鼠体重比正常小鼠增加 13% ~ 15% ,这些数据表明了 ,体内 SOCS-2 对 GH 信号通路可能具有双向调节作用<sup>[7,13,14]</sup>。最近有研究报道 ,SOCS-2 能促进 C2C12 细胞系成肌细胞的增殖 ,抑制肌管的形成<sup>[15]</sup>。以上研究表明 ,SOCS-2 可能通过 GH 信号通路调节机体的生长发育。

目前 DNA 测序的技术已经非常成熟 ,但是由于蛋白质结构测定和分析难度大、费用高 ,某些蛋白质难以形成晶体而无法进行结构分析 ,因此 ,依据蛋白质序列预测蛋白质可能的结构就显得非常重要<sup>[16]</sup>。另外蛋白结构预测的方法及程序比较多 ,而欧洲分子生物学实验室提供的 PHD 系统被认为是目前最好的蛋白二级结构预测程序 ,其采用在蛋白质数据库中搜索相似序列和神经网络技术相结合的方法 ,从而大大地提高了预测的准确度 ,此技术平均准确率超过 72% ,最佳者达 90% 以上<sup>[17,18]</sup>。

本研究根据 GenBank 已发表的 SOCS-2 基因序列 ,设计并合成 PCR 引物 ,通过 RT-PCR 方法克隆猪 SOCS-2 基因的 cDNA 全长。测序后同源性比对发现 ,猪 SOCS-2 基因在核苷酸水平和氨基酸水平 ,同源性均较高。结构分析结果显示 ,所得序列结构完整 ,含有 SOCS 家族的保守结构 SH<sub>2</sub> 和 SOCS-box ,通过生物信息学和分子生物学软件分析 ,表明了猪 SOCS-2 蛋白含有 199 个氨基酸残基 ,分子量约为 22.25kD ,等电点 pI = 8.30 ,呈结构松散的非球状结构。这些结果为研究 SOCS-2 与 GH 信号通路的相互关系以及它们调控机体生长发育的机理提供了一定的基础。

致 谢 本实验是在西北农林科技大学动物脂肪沉积与肌肉发育实验室完成 ,试验过程中 ,得到吉红副

教授 奥克桑(日本)研究员及实验室同学的指导和帮助,在此表示感谢!

## REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Zhu T, Goh EL, Graichen R, *et al.* Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal*, 2001, **13**:599-616.

[ 2 ] Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem*, 2004, **279**:821-824.

[ 3 ] Starr R, Willson TA, Viney EM, *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature*, 1997, **387**:917-921.

[ 4 ] Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, *et al.* A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 1997, **387**:921-924.

[ 5 ] Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, *et al.* Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**:114-119.

[ 6 ] Greenhalgh CJ, Rico-Bautista E, Lorentzon M, *et al.* SOCS-2 negatively regulates growth hormone action *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 2005, **115**(2):397-406.

[ 7 ] Piper E, Chen Y, Moran C. Assignment of suppressor of cytokine signaling-2(SOCS2) to porcine chromosome 5 with radiation hybrids. *Cytogenet Genome Res*, 2005, **111**:96B.

[ 8 ] Hu SN(胡松年),Xue QZ(薛庆中). Handbook of Genomic Data Analysis. Hangzhou Zhejiang University Press 2003 pp.134-148.

[ 9 ] Liu F(刘飞),Fang BS(方柏山). Cloning and sequence analysis of the gene encoding NiFe-hydrogenase from *Klebsiella pneumonia*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报)2007, **23**(1):133-137.

[ 10 ] Wang JR(王际睿),Yan ZH(严泽洪),Wei YM(魏育明), *et al.* Sequence analysis of  $\alpha$ -amylase inhibitors genes with resistance to insects in wheat and aeilo. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报)2005, **21**(5):737-742.

[ 11 ] Kyte J,Doolittle RF. A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, **157**(1):105-132.

[ 12 ] Du X(杜晶),Liu GF(刘戈飞),Wang GL(王桂铃), *et al.* Sequencing and bioinformatic analysis of NRDRiso cDNA. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报),2004, **20**(4):520-525.

[ 13 ] Metcalf D, Greenhalgh CJ, Viney E, *et al.* Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signaling-2. *Nature* 2000, **405**:1069-1073.

[ 14 ] Greenhalgh CJ, Metcalf D, Thaus AJ, *et al.* Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J Biol Chem*, 2002, **277**(43):40181-40184.

[ 15 ] Ouyang X, Fujimoto M, Nakagawa R. SOCS-2 interferes with myotube formation and potentiates osteoblast differentiation through upregulation of JunB in C2C12 cells. *Journal of Cell Physiology*, 2006, **207**(2):428-436.

[ 16 ] Hao BL(郝柏林),Zhang ST(张淑誉). Handbook of Bioinformatics. Shanghai Shanghai Sci-Tech Press(上海科技出版社)2002, pp.250-256.

[ 17 ] Rost B, Sander C. Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins*, 1994, **19**(1):55-72.

[ 18 ] Rost B, Yachdav G, Liu J. The predict protein server. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:W321-326.