

猪 *sall4b* 基因的克隆及表达分析

张鑫淼, 韩小娇, 何文腾, 刘世超, 牟彦双, 胡魁, 刘忠华

东北农业大学生命科学学院 胚胎工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030

张鑫淼, 韩小娇, 何文腾, 等. 猪 *sall4b* 基因的克隆及表达分析. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1164–1174.

Zhang XM, Han XJ, He WT, et al. Cloning and gene expression of *sall4b* gene in pig. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1164–1174.

摘 要: *sall4* 基因是 *sall* 基因家族的一个成员, 在胚胎发育、器官形成和干细胞多能性的维持以及重建中都起到重要作用, 有 *sall4a* 和 *sall4b* 两种剪切突变体类型。目前猪的 *sall4* 基因序列尚未获得。鉴于其在多能性细胞调控中的作用, 对猪的 *sall4* 基因进行了克隆测序, 并对其在各组织及胚胎中的表达进行了初步研究。通过 5'和 3'RACE 克隆得到猪 *sall4* 基因 cDNA 全长序列 (2 372 bp), 序列分析证明此基因编码的蛋白结构更接近于小鼠和人 *Sall4B* 亚型, 同源性可达 70%~80%, 而与其他物种的 *Sall4A* 相比则缺少一段含锌指结构域的片段, 同源性降至 30%~55%。Real-time PCR 证明猪 *sall4b* 基因广泛表达于猪的各种器官, 其中除卵巢组织呈高量表达之外, 脾、肺、心和睾丸表达量也相对较高; 在早期胚胎发育过程中除 4-细胞阶段相对表达量较低, 其他阶段呈高量表达。免疫荧光跟踪 *Sall4* 在猪早期胚胎中的表达情况发现 *Sall4* 在着床前胚胎中全程表达并定位于细胞核中, 在囊胚阶段基因表达趋向于定位在内细胞团中。表达分析证明 *sall4b* 基因与多能性紧密相关, 预示着猪 *sall4b* 基因将可能作为新的重编程因子用于诱导猪多能干细胞的体系中。

关键词: *sall4*, 基因克隆, 基因表达, 胚胎, 猪

Cloning and gene expression of *sall4b* gene in pig

Xinmiao Zhang, Xiaojiao Han, Wenteng He, Shichao Liu, Yanshuang Mu, Kui Hu,
and Zhonghua Liu

Laboratory of Embryo Engineering, Department of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: *sall4*, a member of *sall4* gene family, plays important roles in embryo development; organogenesis as well as pluripotency maintenance and re-establishment. There are two isoforms of *Sall4*, *Sall4A* and *Sall4B*. The sequence of porcine *sall4* gene is still not reported. Because of its distinct role in maintaining the pluripotent state of stem cells, we

Received: March 16, 2012; **Accepted:** June 7, 2012

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB941002).

Corresponding author: Zhonghua Liu. Tel/Fax: +86-451-55191747; E-mail: liu086@yahoo.com

国家重点基础研究发展计划(973 计划) (No. 2009CB941002)资助。

cloned and sequenced porcine *sall4* gene and assessed its expression in pig tissues and embryos. One 2 372 bp nucleotide sequence representing the full-length cDNA of pig *sall4* was obtained by 5' and 3'RACE. Analyses of putative protein sequence showed a 70% to 80% identity with isoform Sall4B of human and mouse. Comparing with Sall4A, the identity reduced to 30% to 55% because of the loss of a zinc-finger domain-rich fragment. Assessment of *sall4b* expression in porcine tissues by Real-time PCR showed that it expressed most strongly in ovary and stronger in spleen, lung, heart and testis. For preimplantation embryos, the expression level was lower in 4-cell embryos compared with other stages. Immuno-fluorescence analysis of Sall4 on porcine preimplantation embryos indicated that it expressed in all the preimplantation embryos and located in nucleus, in blastocyst it preferentially limited in ICM cells. Expression pattern in early embryos suggest that pig *sall4b* is associated with pluripotency and might be a new and useful reprogramming factor for establishing pig induced pluripotent stem cell lines.

Keywords: *sall4*, gene cloning, gene expression, embryo, pig

sall4 属于婆罗双树样基因 (*splat-like/sall*) 家族成员, 最初在研究人类常染色体显性遗传病 Okihiro 综合征时被发现并鉴定。*sall4* 基因突变导致四肢畸形、眼球运动缺陷、直肠、耳、心和肾的发育异常^[1-2], 而在小鼠中双敲除 *sall4* 基因则直接导致植入初期胚胎致死^[3-4], 证明 *sall4* 基因对于早期胚胎发育是不可或缺的。*sall4* 基因缺失的小鼠胚胎难以建立胚胎干细胞系^[3,5], 在细胞融合^[6]和多能因子^[5]介导的重编程中都证明了高量表达 *sall4* 基因能够提高重编程效率, 说明 *sall4* 对多能性的维持及重建都起到关键作用。最近在人^[7]和小鼠^[8]中发现 *sall4* 基因由于选择性剪切可以形成两种不同的剪切突变体 *sall4a* 和 *sall4b*。与 *sall4a* 相比, *sall4b* 缺失了第二外显子的大部分区域, 在小鼠胚胎干细胞中更趋于高表达。当只表达一种亚型时, *sall4b* 单独即可维持干细胞的多能性状态^[8], 提示 *sall4b* 可作为建立诱导多能性干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPS cells) 的重要诱导因子。

虽然 *sall4b* 基因的结构和功能在小鼠和人上得到初步的研究, 但在其他物种中还并没有获得

同样的剪切变异体。猪作为一种重要的动物模型, 在代谢和器官大小方面都与人有极高的相似性, 具有很高的研究价值^[9-11]。多能性干细胞是疾病模型建立、疾病机理研究和医学再生领域的重要的实验材料。但是目前为止, 尚未建立真正具有形成嵌合体能力的猪胚胎干细胞。自 2009 年以来, 先后有几个研究组报道了猪 iPS 细胞的建立^[12-15], 但目前为止只有一个研究组初步证明了他们建立的 iPS 细胞系可能具有形成嵌合体的能力^[16]。其中一个重要的原因可能是目前适用于小鼠和人的重编程因子组合并不足以完全重编程猪的分化细胞至多能性干细胞状态。猪 *sall4b* 基因的克隆对完全重编程 iPS 细胞系的建立和多能性维持机制的研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

新生大白仔猪购买于哈尔滨市三原种猪场, 在实验室解剖取材, 将取得的各器官组织样 (包括肾、肠、脾、胃、肺、肝、脑、心肌、骨骼肌、睾丸、脂肪、卵巢) 保存于液氮中。用于克隆基因的卵巢组织来自于当地屠宰场, 收集后尽快保

存于液氮中,用于提取 RNA。

1.2 主要试剂

TRIzol 试剂盒购自 Invitrogen 公司;PCR 试剂盒、SYBR 荧光实时定量 PCR 试剂盒、pMD18-T 载体均购自 TaKaRa 公司;琼脂糖粉剂购自 Amresco 公司;反转试剂盒购自 ABI 公司和 TaKaRa 公司;免疫荧光抗体一抗购自 GeneTex 公司,二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.3 RNA 提取与反转 cDNA

用 TRIzol 试剂将性成熟猪卵巢按照标准方案提取 RNA,并溶解于 DEPC 处理水中,以此为模板用反转录试剂盒 (ABI) 反转录为 cDNA。新生猪各组织用同样方法获得 RNA,反转为 cDNA 时使用 TaKaRa 公司反转试剂盒,用于 Real-time 检测。引物序列具体见表 2。

1.4 PCR 扩增与 5' RACR 与 3' RACE

反应体系 25 μ L:1 μ L 模板 cDNA,上下游引物混合物 1 μ L (浓度各为 10 μ mol/L),dNTPs 2.5 μ L,*Pfu* 酶 0.2 μ L,10 \times 缓冲液 2.5 μ L 溶解于 17.8 μ L 灭菌去离子水中。引物序列与反应条件详见表 1。5' RACR 与 3' RACE 用于获得 *sall4b* mRAN 全长,按照 TaKaRa 公司试剂盒说明书标准操作。

1.5 序列分析、比对分析与系统树分析

开放读码框分析使用 NCBI 工具 ORF finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/)并翻译为相应的氨基酸序列。蛋白结构域分析使用 SMRAT (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)与 NCBI CDD 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>),序列比对使用 ClustalX2 软件,比对序列由 NCBI 数据库提供。系统树分析采用

MEGA5.1 软件进行。理论 PI 值和预测分子量使用 Prot-Param 工具 (<http://kr.expasy.org/tools/protparam.html>)。

1.6 IVF 胚胎的获取

从哈尔滨市三原种猪场人工采集大白种公猪新鲜精液,回到实验室后离心弃除精清,用 DPBS 悬浮,1 000 r/min 离心洗涤精子,弃上清再悬浮,重复 3 次,最后用预先平衡的受精液悬浮,调节精子浓度到 1.0×10^6 个/mL。同时预先在成熟培养液中培养 42 h 的卵母细胞移至 30 μ L 受精液微滴中,将 20 μ L 受精液与 30 μ L 预先成熟培养 42 h 的卵母细胞以卵母细胞数:精子数=1:200 的比例混合,12 h 后换为胚胎培养液,取不同发育阶段胚胎进行 Real-time PCR 及免疫荧光实验。

1.7 SYBR 实时定量 PCR 测定

反应体系为 25 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,SYBR Mix 12.5 μ L,ddH₂O 10.5 μ L,cDNA 1 μ L。循环参数:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,85 $^{\circ}$ C 8 s 收集荧光,40 个循环。以 18S rRNA 作为内参对照,引物序列具体见表 2。

1.8 免疫荧光

各阶段 IVF 胚胎在四孔板中进行固定,预冷的 4%的多聚甲醛固定 30 min;透膜液 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1 h;封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;移入一抗中(稀释比例为 1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;清洗清洗 5 min,连续 3 次;移入二抗(鼠抗兔稀释比例为 1:200)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;清洗 5 min,连续 3 次;Hoechst 染核 10 min,清洗液清洗;移至涂有防淬灭剂的载玻片上,压片,荧光显微镜下观察。

1.9 统计学分析

Real-time PCR 结果分析方法采用经典的 $2^{\Delta\Delta C_t}$ 法, 基因的表达水平经过 SAS 软件的 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 判定为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *sall4b* 基因的克隆

假设猪 *sall4* 基因也存在两种剪切突变体, 首先选择由基因组测序得到的猪 *sall4* 编码区预测序列 NM_001114673.1 作为 *sall4a* 模板, 另外

通过与小鼠和人的 *sall4b* 编码区比对自行预测了猪 *sall4b* 的编码区序列。为了鉴定两种剪切突变体是否存在, 我们在预测选择性剪切位点两端跨位点设计上下游引物。以猪卵巢 cDNA 为模板, PCR 扩增仅得到一条与预测 *sall4b* 符合的 1 062 bp 条带 (图 1A), 测序结果证明可与 *sall4b* 预测序列匹配。为了获得 *sall4* 基因 mRNA 的全长序列, 在已得序列的基础上进行 5' 与 3' RACE 实验, 5' RACE 的 GSP 引物设计在选择性剪切位点的下游, 以期通过 RACE 实验进一步

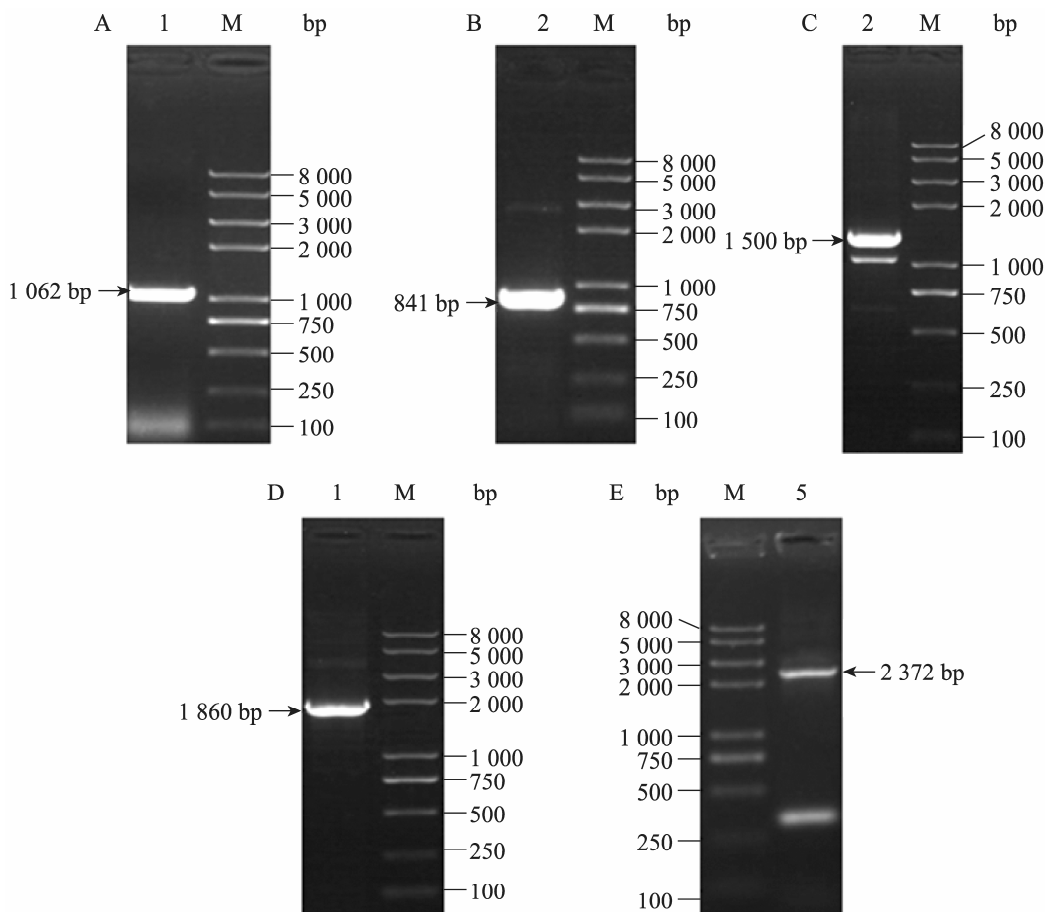


图 1 克隆猪 *sall4b* 基因

Fig. 1 Molecular cloning of pig *sall4b*. M: DNA marker; 1: PCR product for middle part; 2: 3' RACE PCR product; 3: 5' RACE PCR product; 4: overlap PCR product of middle part and 3' RACE PCR product; 5: full-length of *sall4* mRNA.

鉴定 *sall4a* 的存在,但仍然仅得到一条与 *sall4b* 预测长度匹配的 1 500 bp 特异性条带 (图 1B)。3' RACE 实验得到一条 841 bp 的特异性条带产物(图 1C)。经测序分析,分别与已得的 1 062 bp 的中段序列有 988 bp 和 43 bp 的重合,证明 RACE 扩增得到的是特异性条带。为了得到 mRNA 全长序列,我们将三段序列用重叠 PCR 的方式连接起来,中间的保守序列首先与 3'端连接得到 1 860 bp 片段 (图 1D),此 PCR 产物再与 5' RACE PCR 产物进行第二轮重叠 PCR 获

得 2 372 bp mRNA 全长 (图 1E)。我们设计了针对预测 *sall4a* 的特异性鉴定引物, 仍没有获得相应条带。

所获得的含有完整编码区的 cDNA 序列经 NCBI 工具 ORF finder 分析, 找到 1 851 bp 的编码区, 编码 616 aa 的多肽链。经 SMART 工具分析蛋白含有 3 个 ZnF_C2H2 锌指结构域 (分别在 72-92 aa, 432-454 aa 和 460-482 aa 位置)。序列已提交至 GenBank (GenBank Accession No. JQ773336), 序列见图 2。

1 GCGCAATCAGCTGTCTGGGCTCATGATAAATCGCAATGCATTATTGATAATAATAATACATGGGCATCGCGTCTCG

78 GCGGAAGGGGGGTAATTTTCCCAACTCGAGGAATTTTGTTGGTGAGTGGGCAATAACCGCGGCTCTCCAGAGCTCCCGGATCGCGACC

168 ATGTGCGAGCGCAACGAGCGCAAAACCCCAACATACATCTCGGAGGAGGACGAGCGGACGAGCGGACGCGCGCGGGAGTTT

1 M S R R K Q A K P Q H I N S E E D Q G G E Q Q P Q Q P A A E F

258 GCAGATCGGCCCTTCGGCTCGGTCGGCGGGGAGCGGGTGGCCCAATGAACGCCCGGGGACGTGGTACGAGGTGAGCGGCGACGCA

317 A D A A P S A P V A G E P G A P M N R P G T G D E V S A D A

348 GCCCGGATAAAGAGGCTCGGGGACGAGGACCCACATCTGTGAGAAATGCTGTGCCAGTTCCTCAAGTTTCCGAGTTCTTAGACCAT

61 A R I K R P R R E E T H I C E K C C A E F F S E F L D H

438 AAGAAGAAATGGCATAGAGCTCCCCGTGCTCATGAAATGACGAGGAGGGCGCGTCTCGGAAGACTTCCCGGGGCTGTGCTG

91 K K N K T K T P P V L I M N D S E G P V P S E D F P G A V

528 AGCCAGCGCCACACAGCCCAAGCAAGGACATCAACGAGGAGGGGGGCGGCTCGGGGACAGGAAGAGAACGCCGGGACCGAG

121 S Q Q P H S P S R K G D T H S E E G G G S G D T K E K P G T E

618 TCCTGTTGTGACTTGAAGACGGAGGCTGCCCTGCCGCCACACCCGAGCATAACTATTTACCAAAGGAAATGGCCAAACCAAT

151 S V V Y L K T E A L P T P Q Q Q L Q I S Y L P K G K V A N T N

708 GTCACTCTTAAGCACTACGGGGACCAAGTGGCTGTGAACACAGCGGAGTGGGACGCGCCCGCGGCCCCCTGCCCGCGCCAAAGC

181 V T L Q A L R G T K T V A N Q R S A D A P P A C A G A P L G A N S

798 ATCCCTGGGTTCTGGAGCAGATCCTGTGCTGACGACGACGACGTCCAGCAGATCCAGGACAGATCCGTGTTCGAGTGAAC

211 I P W V L E Q I L C L Q Q Q Q L Q Q I Q L T E Q G T I R V Q V N

888 ATGTGGGCTCGCACGCCCTCACTCGGGCGTGGCGGCGCGATGCCCTCAAGACGCTGGGACGCGTGTCCAGCAGGTGTGCGGCC

241 M W A S H A L H S G V A G A D A L K T L G S H V S Q Q V S A

978 GCGCTGGCTCTGCTCAGCCAGAAAGCGGAAGCCCGGGTCTGTCTCGGACCCCTGAAACACGCCAGCTACCTCAGCTAACATCCCT

271 A V A L L S Q K A G S P G L S L D L P L K P A K T L P H A N I P

1068 CCGCGCAGAGCTCCGTGTCCCAAGGCTGACGCCCTTGCCLCTGAAGCGGAGTGGACCGCGGCTGTCCCGGGTGTCTGTGCGGCTCT

301 P A A S S V S P G L T P F A L K K P D G T R V L P G V L S R L

1158 CCGGTCGATTGCTACCTCAGGCGCCGGGCTGTGCTCTTCCAGAGCCCTTCTCCGCGGGGCGTTAGACCCGTCAGGAAAGCAA

331 P G A L L P Q A P G S V L F Q S P F S A G A L D P S R K K

1248 GGAAGACCCCGAGTGTGCCCGGGTGAAGGCAACCAAGGACGAGGCCCTTACAAGACAAGTTCGAAGCATTCATCGACGTTT

361 G K P P S V S P S V D G K P K D E A L Y K H K R C S I P S T F

1338 ATCCGAGCCGACCCACCACTACGTCAAAGTTGAAGTTCCTGGTGCATTTGTTGGTCTGCGACCATGTCCCAGGTATGACACCGTTG

391 I R A Q P T T Y V K V E V P G A F V G P A T T M S P G M T P L

1428 TTAGCGGCAACCCGACGACGAGGCAAGCAGCGGCTGACGAGTGGCGGAAGCACTTCTCATGCGAGCTCTGCGAGTTCAT

421 L A A Q C P R R Q A K Q H G C T R C G K N F S A A S T L Q I H

1518 GAGCGCATCACCTGGGGAGAGCCCTTTGTGTGAATGTATCGGGGAGCGCCTTTACCAACCAAGGCAACTGAAGGTCCATACATG

451 E R T H T G E K P F V C N V C G R A F T T K G N L K H V M

1608 ACGCATGGGGCAACAACAGCTCGGGCGCGCGGGCGGAAGCTGGCCATCGAAGAACCAATTCGTCTGTTAGGACGCGAGCGGAAAGAGA

481 T H G A N N S A R R G R K L A I E N T I A L L T A C D T G K R

1698 GTCCCGGAGTGTGCCCAAGGAAATCTGGGCCCTTCGGTGAACGTGGACCTGGTGTGGAACAGTACACACCTACTCAACCGT

511 V P E M F P K E I L A P S V N V D P V V W N Q Y T T L L N G

1788 GGCGTGGCCATGAAGACCAATGAAATTCCTGTATCGAGCGGTGGCATTCCCACTCCGGTGTCCGTGGGGCGAGCTCCGTGGCC

541 G L A M K T N E I S V I Q S G G I P C T L P V S L G A S S V A

1878 GCTAACACCGCGCTTCCAAGATGATGTTCCGAGTCAGCGATCAGCGCGGAGCGGAGACGCGGCGCGCGCAGCGGGGCGCGCGC

571 A N T A L S K M D G S Q S A I S A E K P G A D D G A A

1968 AAACACCAAGTTTCTCACTTCTTGGAAAGAAAACAGATCGCGGTACGTCAGCATGACCATGGTGGTTCAACACCTTCAACTTGAAATAGGGAC

601 K H Q P P H F I E N E K I A V S *

2058 AGTCTTGGAAACAGTTGCTCTGGGTTGACAAAGATTATGTATAGTTTGTGCAAGTAACAAAACACTTGTGAAGACCCGCTGTGT

2148 TCCAAAAATAAAAACAAAAACAAAAACAAACCAACTAGTCTGTATCTGTCTTTTTCGATGAATGCTGTTGTGTTTGTGCAAGCG

2238 AGCATACACACACTTGAATGAGGAGCTCGCTGAGGTGTGTGTCACAACTGTAAACATTATTGGACATCAATAAGAAAAACAAATGGGA

2328 GATGGGGCTCTTAAAAAATCAAGACTCGGAAAAAATAAAAAA

图2 猪 *sall4b* 核酸序列及预测蛋白序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of pig *sall4b*. The ORF is presented above the amino acid sequences.

2.2 *sall4* 基因同源性分析

将克隆序列测序后得到的 *sall4* 核酸序列翻译为蛋白序列，并与其他物种的 Sall4 蛋白序列进行比对，两两比对相似性结果如表 1 所示，发现我们克隆得到的 *sall4* 基因与 B 类亚型匹配度更高。通过比较保守结构域，也确认猪 Sall4B 蛋白与小鼠和人的 Sall4 两种亚型相比，猪 Sall4B 蛋白结构更接近于小鼠和人的 Sall4B，相比与 Sall4A，缺少 2 个富含锌指的结构域 (图 3)。因此我们将克隆的猪 *sall4* 基因命名为猪

sall4b。

2.3 *sall4* 基因系统树分析

为了阐述猪 *sall4b* 基因及其他物种的 *sall4* 基因的分子进化关系，我们基于氨基酸序列使用邻接法构建系统树。分析发现整个进化树可以分为两个主支：哺乳动物类和非哺乳动物，前者有可分为明显的 3 个分支：灵长类、偶蹄类和啮齿类。整个系统树的分析结果基本符合常规分类学。虽然亚型不同，但 Sall4A 与 Sall4B 在物种内是同源的 (图 4)。

表 1 猪 Sall4 蛋白序列与其他物种 Sall4 蛋白序列对比相似性

Table 1 Sall4 identities between pig and other organisms

Matched species	Isoform A Accession No.	Identity (%)	Isoform B Accession No.	Identity (%)
<i>Callithrix jacchus</i>	XP_002747722.1	50.09	XP_002742630.1	85.44
<i>Homo sapiens</i>	NP_065169.1	49.48	AAO16566.1	83.17
<i>Cavia porcellus</i>	XP_003463705.1	47.34	XP_003463704.1	80.19
<i>Cricetulus griseus</i>	XP_003515126.1	43.77	XP_003515127.1	73.95
<i>Mus musculus</i>	NP_780512.2	43.43	NP_958797.2	73.06
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_543055.2	55.57		
<i>Equus caballus</i>	XP_001914775.2	51.47		
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	XP_002913020.1	49.76		
<i>Pan troglodytes</i>	XP514728.2	49.67		
<i>Macaca mulatta</i>	XP_001093669.1	49.67		
<i>Bos taurus</i>	NP_001179765.1	49.15		
<i>Rattus norvegicus</i>	XP_001074001.2	43.61		
<i>Gallus gallus</i>	NP_001074341.1	31.31		
<i>Danio rerio</i>	NP_001074078.1	24.78		
<i>Xenopus laevis</i>	NP_001082723.1	27.47		

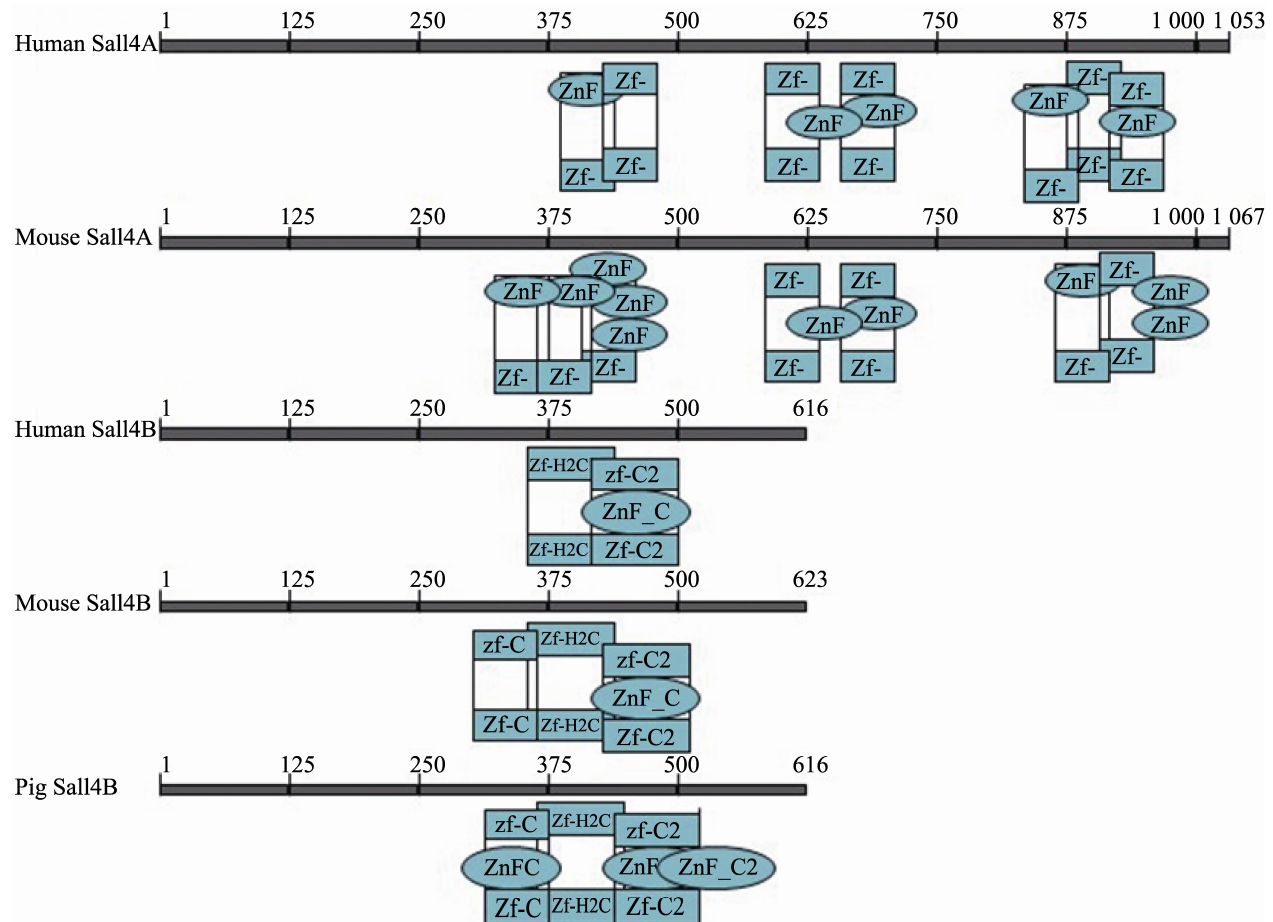


图 3 猪、小鼠和人 *Sall4* 蛋白保守结构域的比对

Fig. 3 Alignment of conserved domain of pig, human and mouse *Sall4*.

2.4 *sall4* 基因定量及定位表达分析

在新生猪各个组织器官和猪早期胚胎的各个发育阶段中检测 *sall4* 基因表达情况如图 5 所示。Real-time PCR 结果证明 *sall4b* 基因在各个组织中均有表达，除卵巢组织表达非常强烈之外，脾、肺、心和睾丸相对表达量较高，而在猪 IVF 早期胚胎发育过程中跟踪检测中发

现，相对于合子阶段胚胎，4-细胞阶段胚胎相对表达量较低，而至 8-细胞至囊胚阶段表达量逐渐升高。免疫荧光实验证明 *Sall4* 蛋白定位于细胞核内，在各个发育阶段均有表达，并且随着发育进行内细胞团与滋养外胚层的表达量出现了差异，*Sall4* 蛋白逐渐限定于内细胞团中表达。

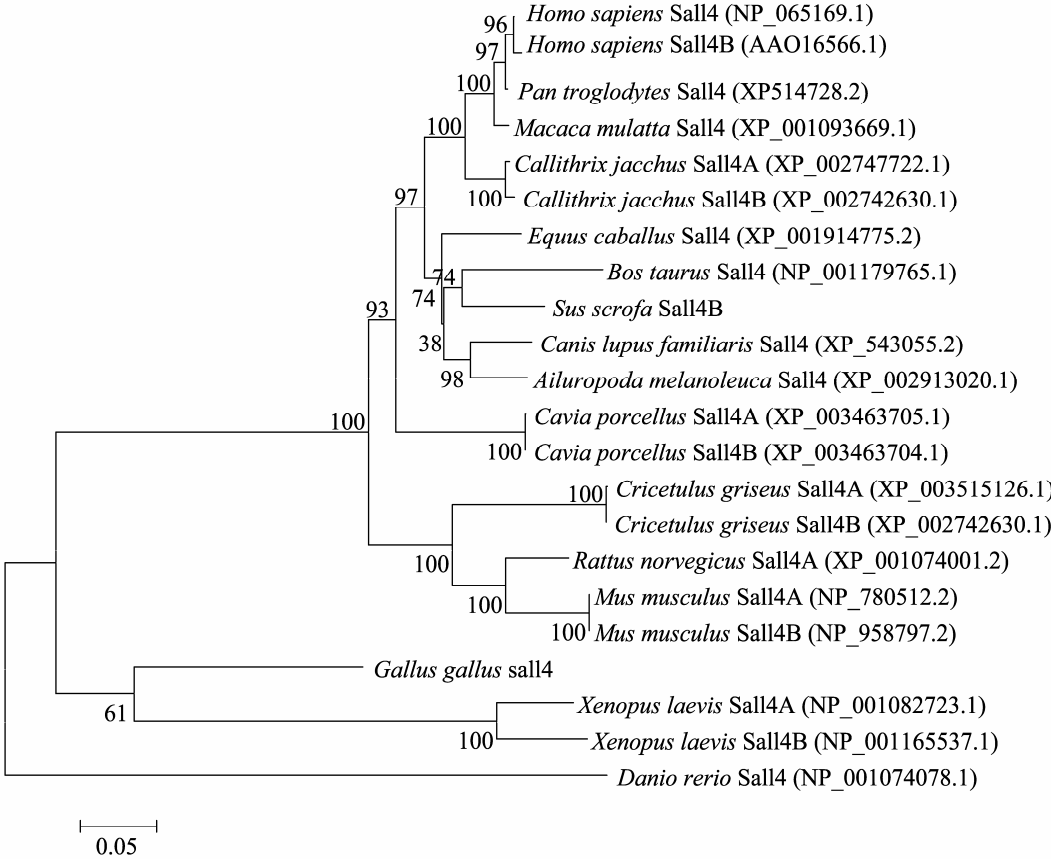


图 4 系统树分析
Fig. 4 Phylogenetic tree analysis.

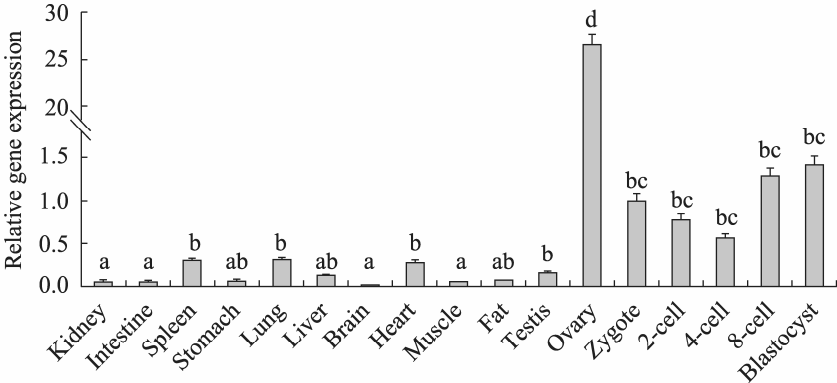


图 5 *sall4b* 基因在组织和胚胎中的表达情况
Fig.5 *sall4b* expression in tissues and embryos.

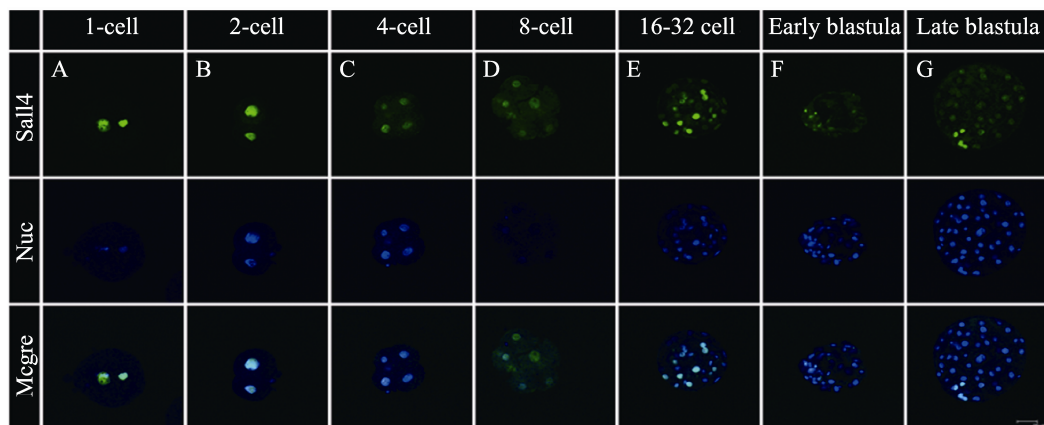


图 6 Sall4 在猪 IVF 胚胎中的表达模式

Fig. 6 Sall4 expression pattern in pig IVF embryos.

表 2 引物序列与 PCR 条件

Table 2 Primers and PCR conditions

Primer name	Primer (5'–3')	Annealing temperature (°C)×cycle number	Product size (bp)
S-mid	Forward: CCCCGGGGCTGTGCTGAGC	57×37	1 064
	Reverse: AAAGGCTCGCCCGCATACTACAC		
S-5'RACE	5' RACE outer: CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	55×20	1 500
	5' GSP outer: TTACACACAAAAGGCTTCTCCCCAG		
	5' RACE inner: CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	58×30	
	5' GSP inner: CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG		
	3' RACE outer: TACCGTCGTTCCACTAGTGATT		
S-3'RACE	3' GSP outer: ACCATGTCCCCAGGTATGACACCGT	55×20	841
	3' RACE inner: CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	62×30	
	3' GSP inner: ACTGGGGAGAAGCCTTTTGTGTGTA		
	S4b-SYBR	Forward: CCCTGCCGCCACACCC	
Reverse: GCTCCAGAACCCAGGGGATGCT			
S4a- RT	Forward: CCCACCGACCCCAACGAA	60×40	300
	Reverse: ATTCTCGGGCAGAGGCGTGT		
18S- SYBR	Forward: GCCCGAAGCGTTTACTTTGA	60×40	93
	Reverse: CCGCGGTCCTATTCCATTATT		

3 讨论

在本实验中我们获得了猪 *sall4* 基因的 mRNA 全长序列,经结构分析并与其他物种的 *Sall4* 蛋白亚型的序列比对发现,获得的基因编码的蛋白与小鼠和人 *Sall4B* 匹配,而与小鼠 *Sall4A* 蛋白序列相比则缺少一段锌指结构富集区。我们在从猪卵巢组织中克隆 *sall4* 基因时并没有获得与小鼠和人 *sall4a* 相匹配的转录变异体,利用针对于 *sall4a* 特异序列设计的鉴定引物在检测的各组织中也并没有扩增出相应 PCR 产物。有可能是由于检测的各组织中 *sall4a* 的表达量较低,或者在猪中并不存在 *sall4a* 型的转录变异体。*Sall4A* 和 *Sall4B* 两种亚型结构的差异决定了两者结合 DNA 和其他蛋白的位点可能有所不同,在小鼠 *sall4b* 的研究中也证明了在整个基因组中 *sall4a* 与 *sall4b* 的靶位点有交叉,但不完全相同^[8]。而猪 *sall4b* 特异性的表达模式,可能是猪与小鼠和人在早期胚胎发育和多能性维持机制的差异形成的重要原因之一。例如,与小鼠和人的胚胎中 *oct4* 基因限定在内细胞团中的表达模式不同,猪早期胚胎中 *oct4* 基因在滋养外胚层中也有所表达,小鼠中的研究已经证明 *sall4* 与 *oct4* 互相激活形成正反馈机制^[17],在猪中 *sall4a* 亚型的低表达或缺失可能是猪 *oct4* 基因特异性表达模式的原因之一。因此,比较小鼠和人与猪 *sall4* 基因靶位点的差异可能对于揭示小鼠和人与猪早期胚胎及多能性维持机制的差异具有重要意义。

由于并没有检测到 *sall4a* 的表达,因此本实验体系验证下的 *sall4* 基因 Real-time 检测结果可以认为即是 *sall4b* 的检测结果。表达分析证明各

种组织中均有所表达,但在卵巢中表达尤其高,另外脾、肺、心和睾丸也相对表达量较高。这一结果与在人 *sall4b* 的研究一致^[7]。*sall4b* 基因在这些组织中的高量表达提示了 *sall4b* 可能参与这些组织的发育及功能维持等。在人的研究中发现 *sall4* 的突变可导致卵巢早衰^[18],而 *sall4b* 在猪卵巢中相对于其他组织和胚胎的极高量表达可能预示着 *sall4b* 对猪卵巢发育及功能维持具有重要作用。卵母细胞质量是影响核移植重编程最重要的因素,结合 *sall4b* 在猪受精卵中的表达情况,猜测 *sall4b* 的高量表达可能有助于提高猪核移植效率。另外有文章证明 *sall4* 作为原癌基因可能是睾丸^[19]和肺^[20]肿瘤形成主要诱导因素之一,提示猪 *sall4b* 基因可能对睾丸和肺中某种或某些细胞的增殖能力及发育具有调控作用。另外 *sall4* 基因在血细胞生成以及造血干细胞多能性的维持上具有重要作用^[21-22],而我们检测的组织来自于新生猪,新生猪脾可能还具有残留的部分造血功能,因此这些组织表达 *sall4b* 的含量较高。在猪早期胚胎的跟踪实验中证明 *sall4b* 基因表达及定位随着发育而有所变化。在受精卵中, *sall4b* 的表达量高于 2 细胞及 4 细胞阶段,可能在合子基因启动之前,母源 *sall4b* mRNA 是主要来源。而到桑葚胚至囊胚阶段, *sall4* 基因表达量逐渐上升,并且趋于表达限制在内细胞团中。说明与小鼠和人一致,猪 *sall4b* 基因与多能性也具有紧密相关性。

综上所述,我们首次克隆了猪 *sall4b* 基因,并用实验方法证明了除小鼠和人之外在其他哺乳动物中 *sall4b* 型剪切形式。初步获得了猪 *sall4b* 基因的表达模式,表达分析证明 *sall4b* 基因与多能性紧密相关,预示着 *sall4b* 基因将有可能作为

新的重编程因子应用于猪多能性细胞的诱导体系中。

REFERENCES

- [1] Al-Baradie R, Yamada K, St Hilaire C, et al. Duane radial ray syndrome (Okihiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *Am J Hum Genet*, 2002, 71(5): 1195–1199.
- [2] Kohlhasse J, Heinrich M, Schubert L, et al. Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(23): 2979–2987.
- [3] Elling U, Klasen C, Eisenberger T, et al. Murine inner cell mass-derived lineages depend on Sall4 function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(44): 16319–16324.
- [4] Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, et al. The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development*, 2006, 133(15): 3005–3013.
- [5] Tsubooka N, Ichisaka T, Okita K, et al. Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells*, 2009, 14(6): 683–394.
- [6] Wong CC, Gaspar-Maia A, Ramalho-Santos M, et al. High-efficiency stem cell fusion-mediated assay reveals Sall4 as an enhancer of reprogramming. *PLoS ONE*, 2008, 3(4): e1955.
- [7] Ma YP, Cui W, Yang JC, et al. *SALL4*, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. *Blood*, 2006, 108(8): 2726–2735.
- [8] Rao S, Zhen S, Roumiantsev S, et al. Differential roles of Sall4 isoforms in embryonic stem cell pluripotency. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(22): 5364–5380.
- [9] Esteban MA, Peng M, Deli Z, et al. Porcine induced pluripotent stem cells may bridge the gap between mouse and human iPS. *IUBMB Life*, 2010, 62(4): 277–282.
- [10] Montserrat N, Bahima EG, Batlle L, et al. Generation of pig iPS cells: a model for cell therapy. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011, 4(2): 121–130.
- [11] Roberts RM, Telugu BP, Ezashi T. Induced pluripotent stem cells from swine (*Sus scrofa*): Why they may prove to be important. *Cell Cycle*, 2009, 8(19): 3078–3081.
- [12] Esteban MA, Xu J, Yang J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from tibetan miniature pig. *J Biol Chem*, 2009, 284(26): 17634–17640.
- [13] Wu Z, Chen JJ, Ren JT, et al. Generation of pig-Induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1(1): 46–54.
- [14] Ezashi T, Telugu BPVL, Alexenko AP, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(27): 10993–10998.
- [15] Telugu BP, Ezashi T, Roberts RM (2010) Porcine induced pluripotent stem cells analogous to naive and primed embryonic stem cells of the mouse. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(11/12): 1703–1711.
- [16] West FD, Terlouw SL, Kwon DJ, et al. Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(8): 1211–1220.
- [17] Yang JC, Gao C, Chai L, et al. A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 2010, 5(5): e10766.
- [18] Wang B, Li L, Ni F, et al. Mutational analysis of SAL-Like 4 (SALL4) in Han Chinese women with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15(9): 557–562.
- [19] Cao D, Li J, Guo CC, et al. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol*, 2009, 33(7): 1065–1077.
- [20] Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, et al. Overexpression of SALL4 in lung cancer and its importance in cell proliferation. *Oncol Rep*, 2011, 26(4): 965–970.
- [21] Chai L. The role of HSAL (SALL) genes in proliferation and differentiation in normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Transfusion*, 2011, 51(S4): 87S–93S.
- [22] Oikawa T, Kamiya A, Kakinuma S, et al. Sall4 regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1000–1011.