

内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因的克隆及表达模式分析

王彦凤^{1*}, 吴曼琳^{1*}, 王晓晶², 王婧¹, 李洋¹, 连梦瑶¹, 王志钢¹

1 内蒙古大学生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010021

2 赤峰市医院, 内蒙古 赤峰 024000

王彦凤, 吴曼琳, 王晓晶, 等. 内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因的克隆及表达模式分析. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1743–1752.

Wang YF, Wu ML, Wang XJ, et al. Cloning and expression pattern of *erk2* gene in Inner Mongolia Cashmere Goat. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1743–1752.

摘要: 旨在克隆内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因 cDNA 并分析其基本表达模式。采用 RT-PCR 方法克隆白绒山羊 *erk2* 基因 cDNA。通过在线软件 Blast 进行核酸序列分析, 用 SMART 与 Psite 进行氨基酸序列分析。定量 RT-PCR 检测 *erk2* 基因在绒山羊组织中的表达特异性。免疫组化法检测绒山羊睾丸中 *erk2* 表达。克隆到的内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因 cDNA 片段 (GenBank Accession No. JX569765) 长 1 083 bp, 包含了编码 360 个氨基酸残基的全长 ORF, 氨基酸序列与牛的 ERK2 (Bos Taurus BC133588.1) 同源性为 100%。SMART 分析表明, ORF 编码的蛋白包含了活化位点“TEY”及具有丝氨酸/苏氨酸激酶催化活性的 S-TKc 结构域。Psite 分析表明, 含 2 个 N-糖基化位点、1 个依赖于 cAMP/cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点、3 个蛋白激酶 c 磷酸化位点、5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、2 个 N-豆蔻酰化位点、2 个异戊二烯基结合区 (CAAX box)、7 个微体羧基端靶向信号、2 个蛋白激酶 ATP 结合区标记及一个丝/苏氨酸蛋白激酶活性区域标记。PSORT (k-NN prediction) 程序预测其定位于细胞质中。定量 RT-PCR 分析显示 *erk2* 基因 mRNA 丰度在心脏、皮肤以及乳腺组织中 mRNA 丰度较高, 脾、肾中的表达相对较低。在睾丸中检测到 ERK2 蛋白表达。

关键词: 内蒙古白绒山羊, *erk2*, 基因克隆, 表达模式分析

Received: March 26, 2013; **Accepted:** July 16, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31160469), Natural Science Foundation of Inner Mongolia, China (No. 2011MS0521).

Corresponding author: Zhigang Wang. Tel: +86-471-4992435; E-mail: lswzg@imu.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 31160469), 内蒙古自然科学基金 (No. 2011MS0521) 资助。

网络出版时间: 2013-08-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130816.1713.003.html>

Cloning and expression pattern of *erk2* gene in Inner Mongolia Cashmere Goat

Yanfeng Wang^{1*}, Manlin Wu^{1*}, Xiaojing Wang², Jing Wang¹, Yang Li¹, Mengyao Lian¹, and Zhigang Wang¹

¹ College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, Inner Mongolia, China

² Chifeng Municipal Hospital, Chifeng 024000, Inner Mongolia, China

Abstract: The study aims at cloning the CDS fragment of *erk2* gene cDNA in Inner Mongolia Cashmere Goat and analyzing its tissue-specific expression. *erk2* gene cDNA was cloned by RT-PCR. The nucleotide sequence was analyzed by Blast and amino acid sequence was analyzed by online softwares SMART and Psite. The tissue-specific expression pattern of *erk2* was analyzed by quantitative RT-PCR. The expression of *erk2* in testis of goat was detected by Immunohistochemistry. The cloned *erk2* gene cDNA (GenBank Accession No. JX569765) was 1 083 bp in length, including a complete ORF encoding 360 amino acids residues. The amino acid sequence shares 100% identity with the Bos Taurus ERK2 (Bos Taurus BC133588.1). Analysis by SMART suggests that the encoded protein contained a “TEY” structure and an S-TKc domain possessing serine/threonine kinase catalytic activity. Analysis with Psite indicates one cAMP-/cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site, 3 protein kinase C phosphorylation sites, 5 casein kinase II phosphorylation sites, 2 protein kinases ATP-binding region signatures and one serine/threonine protein kinases active-site signature in this protein. Analysis by Psort (k-NN prediction) suggests that this protein most probably is localized in cytoplasm. The results of quantitative RT-PCR show that the expression of *erk2* mRNA was higher in heart, skin and breast, whereas lower in spleen and kidney. ERK2 protein was detected in testis by immunohistochemistry.

Keywords: Inner Mongolia Cashmere Goat, *erk2*, gene cloning, expression pattern

胞外信号调节激酶 (Extracellular regulated protein, Erk) 是丝裂原激活蛋白激酶 (Mitogen activated protein kinase, MAPK) 家族中的一个亚族, 是 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路的重要成分, 该信号通路介导着多种生物学效应, 如细胞的增殖、分化, 调节细胞周期^[1]。该酶被激活后, 成为磷酸化的 ERK (p-ERK), p-ERK 可以介导信号由胞浆向胞核传递, 参与调节细胞的生长、发育、分化、分裂等多种生理过程, 其异常表达在细胞的恶性转化和肿瘤的发生发展中起重要作用^[2]。对 *erk* 基因的研究不仅可以区别物种间的遗传差异和进化特征, 而且对动物细胞生长及个体发育过程中对外界影响因素的

反应机制研究具有重要意义。早在 1990 年, Boulton 等发现了一种与酵母 KSS1 和 FUS3 激酶有着惊人相似的酶, 被称为 ERK1^[3]。1991 年, Boulton 等继而发现了一类 ERK 酶类, 定义为 ERK1、ERK2 和 ERK3 等。ERK1 和 ERK2 基因有 90% 的同源性, 相对分子量分别为 44 kDa 和 42 kDa^[4]。Srinivasan 等发现在鼠类血管发生中, Ras 介导的信号通路是内皮细胞增殖和迁移的必要条件, 缺乏 ERK1/2 会抑制初期内皮细胞的增殖^[5]。Miltenberger 等应用反义 c-Raf1 或抑制性 Raf1 使 NIH3T3 细胞的增殖受到干扰, 而组成性激活的 Raf1 能加速增殖过程^[6]。在许多肿瘤细胞中, 都能检测到 ERK 信号通路的异常活

化, Boucher 等研究表明胰腺癌组织中的 ERK 活性是癌组织周围正常组织的 2~18 倍。Kang 等研究表明,白血病细胞 K562 凋亡特性与 ERK 基础活性较高有关^[7]。ERK 通路与细胞周期的调控有着紧密的联系。有资料显示, ERK 信号通路是多数生长因子、细胞因子调控靶细胞增殖的重要途径^[8]。运用 MEK 抑制剂 U0126 阻断 ERK 通路, 会抑制细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 表达^[9]。使用 MEK 抑制剂 PD98059 处理 HT1080 细胞, 24 h 后细胞仍然停留在 G2/M 期, 使细胞周期阻滞^[10]。内蒙古白绒山羊是经过长期自然选育形成的优良地方性绒肉兼用型品种, 对营养的需求、利用与代谢有其特殊性。*erk* 基因及其编码的蛋白已在一些动物中得到深入研究, 但尚未有山羊 *erk* 基因研究方面的报道。建立有效地克隆内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因的 RT-PCR 体系及定量 RT-PCR 体系, 获得 *erk2* 基因编码区 cDNA 序列及该基因的基本表达模式, 为进一步研究该基因产物在机体发育中的作用提供条件。

1 材料与方法

1.1 相关载体及试剂

克隆载体 pMD19-T Vector、LA-*Taq* DNA polymerase、T4 DNA 连接酶以及 10×T4 DNA 连接酶缓冲液、常用限制性内切酶及缓冲液、DNA 分子量标准 DL2000、氨苄青霉素、卡那霉素、X-gal、IPTG、MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0 (50 次量)、RNAiso 试剂盒 (TaKaRa, Cat. No. 3124) 等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa); 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (DP209-02 离心柱型) 购自

TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD.; 其余试剂为国产分析纯。

1.2 动物组织及细胞培养

内蒙古白绒山羊 40 d 的胎儿采自内蒙古白绒山羊种羊场, 带回实验室后经原代培养纯化胎儿成纤维细胞, 于液氮中保存。继代培养采用单层培养子代细胞, 实验使用 P1 至 P4 代次之间的胎儿成纤维细胞。所用培养基为含有 10% FBS 的 DMEM/F12, 培养条件为 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件。

脾、睾丸、脑、肝、肺、乳腺和肾等组织样本取自新屠宰羊, 迅速放入-196 °C 的液氮中冷冻后并置-80 °C 冰箱中保存备用。

1.3 总 RNA 的提取及反转录

按总 RNA 提取试剂盒 (RNAiso Reagent) 说明书的操作方法提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性, 经紫外线测定定量后, 用 Oligod(T) 18-Primers 按照反转录酶 AMV 说明书的方法反转录合成第一链 cDNA (cDNA1), 作为下一步 PCR 扩增编码区片段的模板。

1.4 内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因的分子克隆

从 GenBank 中查找出与绒山羊亲缘关系较近的牛、马、小鼠、大鼠、人等物种的 *erk2* 基因的 CDS 区序列, 并进行同源比对。根据 *erk2* 基因的 CDS 区序列设计引物 P1 (表 1), 其中包含的酶切位点为 *Sac* I、*Nde* I (上游), *Xho* I、*Pst* I (下游)。预计扩增片段长度 1 083 bp, 以绒山羊胎儿成纤维细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 16 s, 30 个循环。

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 回收特异性

条带, 将其克隆到 pMD19-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α 。蓝、白菌落筛选阳性克隆, 重组质粒经 PCR 与酶切鉴定正确后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.5 生物信息学方法

基因 cDNA 序列用 NCBI 上的 BLAST 进行序列比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), 开放阅读框 (ORF) 预测采用 ORF Finder 软件 (www.ncbi.nlm.nih.gov/), 蛋白质结构域分析采用 SMART 程序 (<http://smart.embl.de/>), 蛋白质功能位点分析采用 Psite 程序 (<http://www.softberry.com>), 蛋白质亚细胞定位采用 PSORT 程序 (<http://psort.nibb.ac.jp>), 蛋白质等电点及分子量预测采用在线软件 (<http://isoelectric.ovh.org/>) 分析, 用 MEGA4.1 软件进行同源性比对及构建进化树, 利用瑞士模型工作区 (Swiss-Model workspace) 预测蛋白质二级结构 (<http://swissmodel.expasy.org/>)。

1.6 定量 RT-PCR 检测组织表达特异性

根据 *erk2* 基因的 CDS 区序列设计定量 PCR 引物 P2 (表 1), 预期片段长度为 235 bp。选用 2 \times SYBR Premix EX TaqTM II (TaKaRa, Japan) 试剂盒在 Rotor-Gene Q 分析仪对各组织 *erk2* 基因 mRNA 丰度进行定量检测^[11]。不同组织的

erk2 基因 mRNA 拷贝数使用 β -actin 作为内参进行校正, 根据 β -actin 基因序列设计定量 PCR 引物 P3 (表 1), 预期片段长度 229 bp。采用 25 μ L 反应体系, 其中包括 2 μ L cDNA 模板, 12.5 μ L 2 \times SYBR Premix EX TaqTM II, 0.5 μ L 引物, 其余用水补齐。每个样本设 3 个重复, 分别使用 P2 和 P3 进行扩增。优化后的退火温度为 48 $^{\circ}$ C, 产物特异性使用溶解曲线判定。每个组织的 *erk2* 基因 mRNA 相对表达量, 使用 $2^{-\Delta Ct}$ 表示, 其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ 。

1.7 利用免疫组化方法检测组织表达特异性

收集内蒙古白绒山羊睾丸组织材料, 按下列步骤处理: 4% 的多聚醛固定, 酒精脱水, 包埋, 切片, 酒精脱蜡, 免疫动物血清封闭, 一抗 (Rabbit anti-ERK2) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 3 次, 生物素标记的二抗室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次, 依据试剂盒的说明利用 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) 染色, 显微镜观察, 照相, 每种组织设一个负对照。

2 结果与分析

2.1 *erk2* 基因克隆与序列分析

绒山羊 *erk2* 基因 PCR 扩增产物经电泳检测分析, 在预期的 1 083 bp 处有特异性扩增条带 (图 1)。

表 1 本研究中用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>erk2</i>	P1	Forward GCGAGCTCCATATGCGAGCCAACATGGCGG	1 083
		Reverse GCCTCGAGCTGCAGTTAAGATCGGTATCCCGGC	
<i>erk2</i>	P2	Forward ACCTTATTTTGTGTGGA	235
		Reverse CATTCTGGGTATTCTTGG	
β -actin	P3	Forward TGGCACCACACCTTCTACAACGAGC	229
		Reverse CGTCCCCAGAGTCCATGACAATG	

Restriction enzyme cutting sites were underlined.

重组质粒经 PCR 和酶切双重鉴定正确。序列测定结果表明,扩增出的 CDS 全长 1 083 bp, 编码 360 个氨基酸。通过 Blast 比对, 内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因的核苷酸序列与牛 *Bos taurus* (BC133588.1)、狼 *Canis lupus* (NM_001110800.1)、人 *Homo sapiens* (NM_138957.2)、野猪 *Sus scrofa* (NM_001198922.1)、小鼠 *Mus musculus* (NM_011949.3)、大鼠 *Rattus norvegicus* (NM_053842.1) 等物种的同源性分别为 96%、96%、92%、92%、89% 和 89%, 相应的氨基酸序列同源性均达到 96% 以上, 与牛的同源性更达到了 100%。序列提交 GenBank 得到序列登记号为 JX569765。使用 MEGA4.1 软件对上述序列进行比对构建进化树 (图 2), 从图中可以发现, *erk2* 是一个相对保守的基因, 在各物种间的差异非常小。

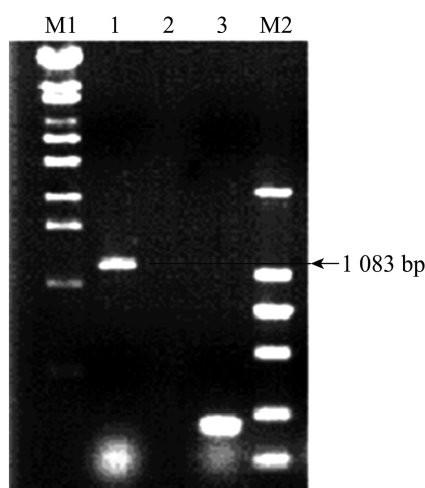


图 1 *erk2* 基因 cDNA 全长的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR product of *erk2* gene. M1: λ -EcoT14 DNA marker; 1: PCR products; 2: negative control; 3: β -actin positive control; M2: DL 2 000 DNA marker.

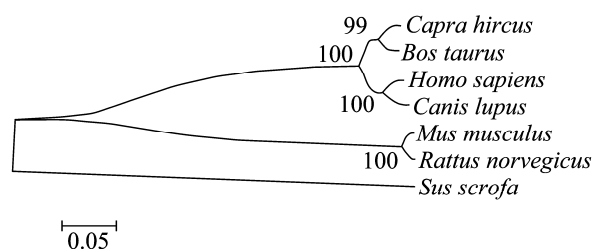


图 2 各物种 *erk2* 核苷酸聚类分析

Fig. 2 Alignment of several species of *erk2* nucleotide sequence.

2.2 生物信息学分析

erk2 基因编码一个由 360 个氨基酸残基组成的蛋白质, 该蛋白理论分子质量 41.38 kDa, 等电点 (pI) 为 6.711, 氨基酸组成中亮氨酸含量最高, 为 11.9%。SMART 分析表明, 在该蛋白质中 25~313 位氨基酸是一个 S_TKc 结构域 (Serine/threonine kinase catalytic domain), 即丝氨酸/苏氨酸激酶结构域 (图 3)。已知的 ERK 蛋白是典型的丝/苏氨酸激酶, SMART 分析结果进一步表明绒山羊 *erk2* 基因被正确克隆。

利用 Swiss-Model workspace^[12-14] 预测蛋白质二级结构 (图 4)。对其编码的氨基酸序列进行 Psite 分析表明, 含 2 个 N-糖基化位点、1 个依赖于 cAMP/cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点、3 个蛋白激酶 c 磷酸化位点、5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、2 个 N-豆蔻酰化位点、2 个异戊二烯基结合区 (CAAX box)、7 个微体羧基端靶向信号、2 个蛋白激酶 ATP 结合区标记及一个丝/苏氨酸蛋白激酶活性区域标记 (图 5)。PSORT (k-NN prediction) 程序预测其定位于细胞质中。

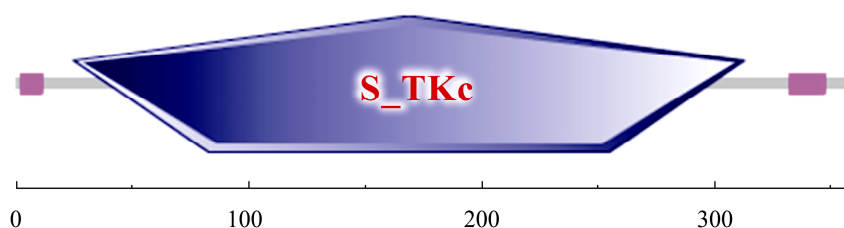


图3 *erk2* 基因编码蛋白质 SMART 分析 (图中数字为氨基酸编号)

Fig. 3 SMART analysis of the protein translated from *erk2* gene (The number shows the location of each domain in protein).

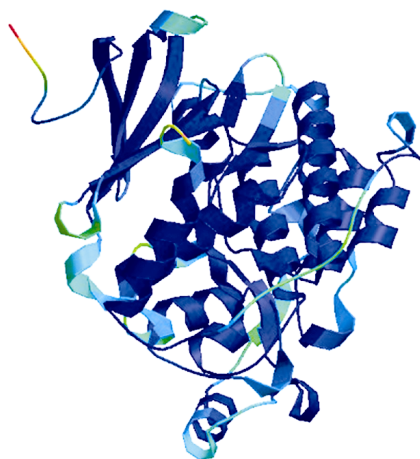


图4 ERK2 蛋白的 3D 图(9-358 氨基酸序列)

Fig. 4 Three-dimensional models of certain regions of ERK2 (amino acid residues 9 to 358).

2.3 组织表达特异性检测

经定量 RT-PCR 显示检测, *erk2* 基因在内蒙古绒山羊的心脏、脾、肾、肺、皮肤及乳腺组织中均有不同程度的表达。其中心脏、皮肤以及乳腺组织中 mRNA 丰度较高, 脾、肾中的表达相对较低 (图 6)。利用免疫组化方法检测 ERK2 蛋白在睾丸中有特异性的表达 (图 7)。

3 讨论

ERK 属于丝裂原激活蛋白激酶 (Mitogen activated protein kinase, MAPK) 家族中的一个

亚族, 包括 ERK1 与 ERK2, 后者研究更加深入。人类的 ERK2 蛋白包括 360 个氨基酸残基, 而鼠类包括 358 个氨基酸残基^[15]。该家族的蛋白一级结构具有两个典型的特征: 一是 TXY 三肽基, 被称为“磷酸化唇”或“活化唇”, ERK2 的上游信号分子通过识别这一结构来活化 ERK2, 已报道的 ERK2 三肽基为“TEY”; 另一个是丝氨酸/苏氨酸激酶催化活性的 S_TKc 结构域。本试验所克隆的内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因 ORF 推测编码 360 个氨基酸残基, 蛋白质经 SMART 程序分析具有这两种保守位点, 与其他物种的 ERK2 蛋白相符, 证明内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因被正确克隆。

Boulton 等^[2]通过 Northern blotting 方法研究 *erk* 基因的组织特异性表达情况, 发现其在小鼠的各种组织中均有表达, 对于 *erk2* 来说, 发现其在肌肉、胎盘以及大脑中的表达量最高。而且利用 Western blotting 的方法研究得到了相同的结果。本研究利用定量 RT-PCR 检测结果表明, *erk2* 基因在内蒙古白绒山羊的心脏、脾、肾、肺、皮肤及乳腺组织中均有不同程度的表达。表明 *erk2* 基因可在多种组织中表达, 进一步证明该基因在哺乳动物中具有保守的功能。

<i>Capra hircus</i>	MAAAAAAGAG	PEMVRGQVFD	VGPRYT <u>NLSY</u>	<u>IGEGAYGMVC</u>	<u>SAYDNVNKVR</u>	<u>VAIKK</u> <u>SPFE</u>	60
<i>BOS Taurus</i>	MAAAAAAGAG	PEMVRGQVFD	VGPRYT <u>NLSY</u>	<u>IGEGAYGMVC</u>	<u>SAYDNVNKVR</u>	<u>VAIKK</u> <u>SPFE</u>	60
<i>Homo sapiens</i>	MAAAAAAGAG	PEMVRGQVFD	VGPRYT <u>NLSY</u>	<u>IGEGAYGMVC</u>	<u>SAYDNVNKVR</u>	<u>VAIKK</u> <u>SPFE</u>	60
<i>Mus musculus</i>	MAAAAA--G	PEMVRGQVFD	VGPRYT <u>NLSY</u>	<u>IGEGAYGMVC</u>	<u>SAYDNVNKVR</u>	<u>VAIKK</u> <u>SPFE</u>	58
<i>Capra hircus</i>	HQTYCQR <u>TLR</u>	<u>EIKILLRFRH</u>	ENIIGINDII	RAPTIE QMKD	VYIVQDLMET	DLYKLLKTQH	120
<i>BOS Taurus</i>	HQTYCQR <u>TLR</u>	<u>EIKILLRFRH</u>	ENIIGINDII	RAPTIE QMKD	VYIVQDLMET	DLYKLLKTQH	120
<i>Homo sapiens</i>	HQTYCQR <u>TLR</u>	<u>EIKILLRFRH</u>	ENIIGINDII	RAPTIE QMKD	VYIVQDLMET	DLYKLLKTQH	120
<i>Mus musculus</i>	HQTYCQR <u>TLR</u>	<u>EIKILLRFRH</u>	ENIIGINDII	RAPTIE QMKD	VYIVQDLMET	DLYKLLKTQH	118
<i>Capra hircus</i>	LSNDHICYFL	YQILRGLKYI	HSANVLHRDL	<u>KPSNLLLNTT</u>	<u>CDLKICDFGL</u>	ARVADPDHHDH	180
<i>BOS Taurus</i>	LSNDHICYFL	YQILRGLKYI	HSANVLHRDL	<u>KPSNLLLNTT</u>	<u>CDLKICDFGL</u>	ARVADPDHHDH	180
<i>Homo sapiens</i>	LSNDHICYFL	YQILRGLKYI	HSANVLHRDL	<u>KPSNLLLNTT</u>	<u>CDLKICDFGL</u>	ARVADPDHHDH	180
<i>Mus musculus</i>	LSNDHICYFL	YQILRGLKYI	HSANVLHRDL	<u>KPSNLLLNTT</u>	<u>CDLKICDFGL</u>	ARVADPDHHDH	178
<i>Capra hircus</i>	TGFL TEYVAT	RWYRAPEIML	NSKGYTKSID	IWSVGCILAE	<u>MLSNRP</u> IFPG	KHYLDQLNHI	240
<i>BOS Taurus</i>	TGFL TEYVAT	RWYRAPEIML	NSKGYTKSID	IWSVGCILAE	<u>MLSNRP</u> IFPG	KHYLDQLNHI	240
<i>Homo sapiens</i>	TGFL TEYVAT	RWYRAPEIML	NSKGYTKSID	IWSVGCILAE	<u>MLSNRP</u> IFPG	KHYLDQLNHI	240
<i>Mus musculus</i>	TGFL TEYVAT	RWYRAPEIML	NSKGYTKSID	IWSVGCILAE	<u>MLSNRP</u> IFPG	KHYLDQLNHI	238
<i>Capra hircus</i>	LGILGSP <u>SQE</u>	<u>DLNCHNLKA</u>	RNYLLSLPHK	NKVPWNRLFP	NADSKALDLL	DKMLTFNPHK	300
<i>BOS Taurus</i>	LGILGSP <u>SQE</u>	<u>DLNCHNLKA</u>	RNYLLSLPHK	NKVPWNRLFP	NADSKALDLL	DKMLTFNPHK	300
<i>Homo sapiens</i>	LGILGSP <u>SQE</u>	<u>DLNCHNLKA</u>	RNYLLSLPHK	NKVPWNRLFP	NADSKALDLL	DKMLTFNPHK	300
<i>Mus musculus</i>	LGILGSP <u>SQE</u>	<u>DLNCHNLKA</u>	RNYLLSLPHK	NKVPWNRLFP	NADSKALDLL	DKMLTFNPHK	298
<i>Capra hircus</i>	RIEVEQALAH	PYLEQYYDPS	DEPVAEAPFK	FDMELDDLPK	EKLKELIFEE	<u>TARFQPGYRS</u>	360
<i>BOS Taurus</i>	RIEVEQALAH	PYLEQYYDPS	DEPVAEAPFK	FDMELDDLPK	EKLKELIFEE	<u>TARFQPGYRS</u>	360
<i>Homo sapiens</i>	RIEVEQALAH	PYLEQYYDPS	DEPVAEAPFK	FDMELDDLPK	EKLKELIFEE	<u>TARFQPGYRS</u>	360
<i>Mus musculus</i>	RIEVEQALAH	PYLEQYYDPS	DEPVAEAPFK	FDMELDDLPK	EKLKELIFEE	<u>TARFQPGYRS</u>	358

图 5 内蒙古白绒山羊 ERK2 氨基酸序列与牛、小鼠及人的氨基酸序列比较及 Psite 活性位点分析 (1 个依赖于 cAMP/cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点 (氨基酸序列为 KKLS), 以双波浪线标记; 3 个蛋白激酶 c 磷酸化位点 (氨基酸序列为 TLR、TAR 及 SNR), 以灰色底纹标记; 5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (氨基酸序列为 SAYD、SPFE、TLRE、TTCD 及 SQED), 以方框标记; 2 个蛋白激酶 ATP 结区 (氨基酸序列为 IGEGAYGMVCSAydnvnkvrVAIK、IGEGAYGMVCSAydnvnkvrVAIKK), 以点下划线标记; 1 个丝/苏氨酸蛋白激酶活性区域 (氨基酸序列为 VLHRDLKPSNLLL), 以灰色下划线标记; 2 个 N-糖基化位点 (氨基酸序列为 NLSY、NTTC), 以波浪线标记)

Fig. 5 Alignment of protein ERK2 amino acids sequence between Inner Mongolia Cashmere Goat and *Bos taurus*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*. The active sites are searched by Psite. A cAMP/cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (KKLS) is marked by double wavy line; Three protein kinase C phosphorylation sites (TLR/TAR/SNR) are marked by gray shadow. Five casein kinase phosphorylation sites (SAYD/SPFE/TLRE/TTCD/SQED) are marked by pane. Two protein kinase ATP-binding regions (IGEGAYGMVCSAydnvnkvrVAIK/IGEGAYGMVCSAydnvnkvrVAIKK) are marked by hidden underline; A Ser/Thr protein kinase activity region (VLHRDLKPSNLLL) is marked by gray underline. Two N-glycosylation site (NLSY/NTTC) are marked by wavy line.

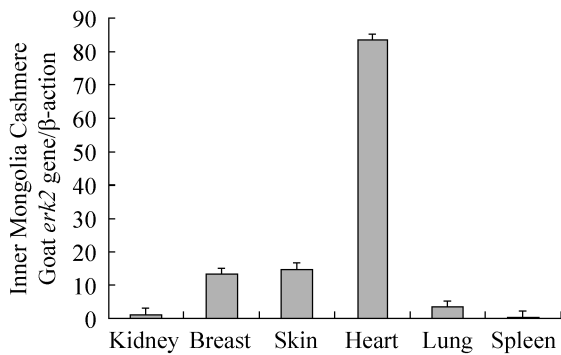


图6 定量RT-PCR检测内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因组织表达特异性

Fig. 6 Tissue-specific expression of *erk2* gene of Inner Mongolia Cashmere Goat by quantitative RT-PCR.

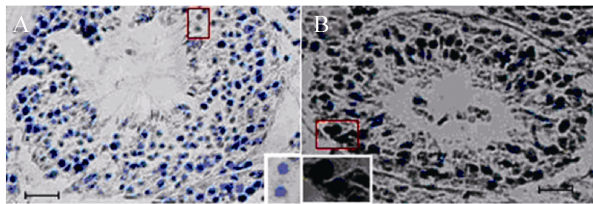


图7 睾丸中 ERK2 的表达

Fig. 7 Expression of ERK2 protein in testis. (A) Negative control. (B) ERK2 is expressed in brown tissue cells. Scale bars=25 μ m.

Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路可以感应多种信号分子, 参与多种细胞进程, 与多种疾病发生密切相关, 如: 脑损伤^[16]、癌症^[17]、肥胖^[18]、糖尿病^[19]以及炎症^[20-21]等。近年来随着 ERK 的深入研究, 一些新的功能也被相继报道。研究发现, 长期的压力会降低小鼠海马体以及前额皮质中 ERK 的表达, 而利用氟西汀处理会抵消这种反应^[22], 这一新功能的发现为抗抑郁症药物的研发带来了新的思路^[23]。Zhu 等研究发现, MAPK/ERK 信号通路与血清饥饿引起的人成骨细胞凋亡相关^[24]。

内蒙古白绒山羊 (Inner Mongolia Cashmere

Goat) 是经过长期的自然选择和人工选育而形成的优良产绒品种, 但近年来由于草场退化, 种群数量增加, 舍饲比例加大, 导致其生产性能降低, 这其中机体对营养和能量信号刺激的敏感性起着重要的作用, 但机制尚不清楚。多项研究显示 ERK 通路在营养摄入与调节过程中发挥着重要的作用, 如 ERK 通路可以调节氨基酸刺激细胞后的信号传递过程^[25]; 动物食料中缺乏必需氨基酸时, 会激发 ERK 信号通路而不是 mTOR 信号通路^[26]; ERK 信号通路可以调节氨基酸运输从而调节细胞的增殖^[27]。本研究正确克隆了内蒙古白绒山羊 *erk2* 基因并对其基本表达模式进行了分析, 这些结果将为进一步研究 ERK 在绒山羊细胞生长和早期胚胎发育中的功能及发挥作用的分子机制提供条件。

REFERENCES

- [1] SL Abrams, Steelman LS, Shelton JG, et al. The Raf/MEK/ERK pathway can govern drug resistance, apoptosis and sensitivity to targeted therapy. *Cell Cycle*, 2010, 9(9): 1781–1791.
- [2] Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2): 105–43.
- [3] Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, 1991, 65(4): 663–675.
- [4] Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, 1990, 249(4964): 64–67.
- [5] Srinivasan R, Zabuawala T, Huang H, et al. Erk1 and Erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLoS ONE*, 2009, 4(12): e8283.

- [6] Miltenger RJ, Cortner J, Famham PJ. An inhibitory Raf-1 mutant suppresses expression of a subset of v-raf-activated genes. *J Biol Chem*, 1993, 268(21): 15674–15680.
- [7] Kang CD, Yoo SD, Hwang BW, et al. The inhibition of ERK/MAPK not the activation of JAK/SAPK is primarily required to induce apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cell. *Leuk Res*, 2000, 24(6): 527–534.
- [8] Lv C, Sun W, Sun H, et al. Asperolide A, a marine-derived tetranorditerpenoid, induces G2/M arrest in human NCI-H460 lung carcinoma cells, is mediated by p53-p21 stabilization and modulated by Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway. *Mar Drugs*, 2013, 11(2): 316–331.
- [9] Zhao Y, Lv M, Lin H, et al. Rho-associated protein kinase isoforms stimulate proliferation of vascular smooth muscle cells through ERK and induction of cyclin D1 and PCNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(3): 488–493.
- [10] Zhang YX, Kong CZ. The role of mitogen-activated protein kinase cascades in inhibition of proliferation in human prostate carcinoma cells by raloxifene: an *in vitro* experiment. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(4): 271–275.
- [11] Fang MX, Zhang W, Hu YS, et al. Cloning, expression and polymorphism analysis of pig *erk2* gene for reproduction traits. *Sci Agri Sin*, 2011, 44(1): 210–217 (in Chinese).
方梅霞, 张伟, 胡永胜, 等. 猪繁殖候选基因 *erk2* 的克隆、表达及基因多态分析. *中国农业科学*, 2011, 44(1): 210–217.
- [12] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195–201.
- [13] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3381–3385.
- [14] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714–2723.
- [15] Roskoski Jr R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2): 105–143.
- [16] Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(4): 396–405.
- [17] Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(3): 230–236.
- [18] Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(6): 753–762.
- [19] Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett*, 2009, 283(2): 125–34.
- [20] Chico LK, Van Eldik LJ, Watterson DM. Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 892–909.
- [21] Muslin AJ. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci*, 2008(115): 203–218.
- [22] First M, Gil-Ad I, Taler M, et al. The effects of fluoxetine treatment in a chronic mild stress rat model on depression-related behavior, brain neurotrophins and ERK expression. *J Mol Neurosci*, 2011, 45(2): 246–255.
- [23] Chandran A, Iyo AH, Jernigan CS, et al. Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. *Prog Neuropsychopharm Biol Psychi*, 2013, 40(10): 240–245.
- [24] Zhu X, Jiang Y, Shan PF, et al. Vaspin attenuates the apoptosis of human osteoblasts through ERK signaling pathway. *Amino Acids*, 2013, 44(3): 961–968.
- [25] Casas-Terradellas E, Tato I, Bartrons R, et al.

ERK and p38 pathways regulate amino acid signaling. Biochim Biophys Acta, 2008 1783(12): 2241–2254.

- [26] Hao S, Ross-Inta CM, Gietzen DW. The sensing of essential amino acid deficiency in the anterior piriform cortex, that requires the uncharged

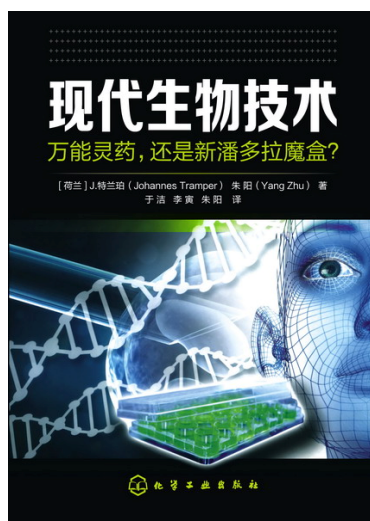
tRNA/GCN2 pathway, is sensitive to wortmannin but not rapamycin. Pharmacol Biochem Behav, 2010, 94(3): 333–340.

- [27] Bulus N, Feral C, Pozzi A, et al. CD98 increases renal epithelial cell proliferation by activating MAPKs. PLoS ONE, 2012, 7(6): e40026.

(本文责编 陈宏宇)

化学工业出版社书讯

现代生物技术——万能灵药，还是新潘多拉魔盒？



作者：(荷)J.特兰珀、朱阳 著；于洁、李寅、朱阳 译

ISBN: 9787122174994

定价：49.0 元

开本：16 装帧：平装 页码：248

初版时间：2013 年 10 月

读者对象：可供生物类专业的本科生及其他专业拟了解该技术的人士阅读参考。

内容介绍

现代生物技术在解决人类社会面临的人口、健康、资源和环境等重大问题上表现出了巨大的应用潜力。然而，与历史上任何新兴技术面世的时候一样，广大民众对现代生物技术这样一种新兴高技术的内涵并不清楚，因此容易产生怀疑、误解，甚至恐惧，阻碍了现代生物技术的正常发展和应用。

为了更好地认识现代生物技术的科技内涵，本书以现代生物技术食品 and 医疗领域的发展和应用为主线，希望以事实为依据，为读者提供一个丰富且可靠的信息来源，从而消除偏见，正确判断现代生物技术对人类带来的福音还是灾难。

本书共分 4 部分。第一部分是引言，重点介绍了现代生物技术的两面性。第二部分“日常饮食”，分别从奶酪、烘烤食品、葡萄酒、生物技术肉制品和所谓“妖魔食品”等入手，阐述生物技术和各种日常饮食之间的渊源。第三部分“健康也有极限”，则从抗生素、荷尔蒙、基因治疗、异种器官移植、人类基因组计划和干细胞治疗等 6 个与健康与医学相关的方面，分析现代生物技术与人类的密切关系。最后一部分是“尾声”，希望给读者留下一个印象和认识：“生物技术不一定是有害的！”

本书主要选材于日常生活中与现代生物技术密切相关的实例，所参考的文献多来自《自然》、《科学》等国际知名期刊或杂志，将专业的理解和大众的视角结合起来，向人们介绍现代生物技术的基本原理及其利弊；语言通俗易懂，大量使用简明易懂的插图和插页，深入浅出地解释生物技术的热门话题。

订购方式：网上购书

化工出版社: <http://shop.cip.com.cn/product/20131001/283979787122174994.html>