

• 动物及兽医生物技术 •

## 山羊 *ZFP36L1* 基因克隆及表达特性分析

马箫彤<sup>1#</sup>, 王瑞龙<sup>1,2#</sup>, 王菲<sup>1</sup>, 陈定双<sup>1,3</sup>, 李艳艳<sup>1,3</sup>, 林亚秋<sup>1,3</sup>, 王友利<sup>1,3</sup>, 刘伟<sup>1,3\*</sup>

1 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

2 赤峰应用技术职业学院, 内蒙古 赤峰 024031

3 西南民族大学 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部/四川省重点实验室, 四川 成都 610041

马箫彤, 王瑞龙, 王菲, 陈定双, 李艳艳, 林亚秋, 王友利, 刘伟. 山羊 *ZFP36L1* 基因克隆及表达特性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1696-1709.

MA Xiaotong, WANG Ruilong, WANG Fei, CHEN Dingshuang, LI Yanyan, LIN Yaqiu, WANG Youli, LIU Wei. Cloning and expression profile of *ZFP36L1* gene in goat[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1696-1709.

**摘要:** 本研究旨在克隆获取锌指蛋白家族 36 (zinc finger protein 36-like 1, *ZFP36L1*) 基因, 并明确其表达特性, 阐明其在山羊不同组织中的表达模式。采集简州大耳羊的心、肝、脾、肺、肾等 15 种组织样品, 应用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 扩增获得山羊 *ZFP36L1* 基因, 通过在线工具对基因及蛋白质序列进行生物学分析; 再应用实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 检测 *ZFP36L1* 基因在山羊各个组织及不同分化阶段的肌内前体脂肪细胞中的表达水平, 并分析其组织表达谱以及细胞时序表达谱。结果表明, 克隆获得山羊 *ZFR36L1* 基因序列长度为 1 224 bp, 编码序列(coding sequence, CDS) 区为 1 017 bp, 编码 338 个氨基酸, 是主要定位于细胞核、细胞质的非分泌不稳定蛋白; 组织表达谱显示, *ZFP36L1* 基因在各组织中均有表达, 在内脏组织、小肠表达量最高( $P < 0.01$ )。在肌肉组织以背最长肌表达量最高( $P < 0.01$ )。在脂肪组织中, 皮下脂肪组织的表达量显著高于其他组织( $P < 0.01$ )。诱导分化结果显示, 该基因在肌内前体脂肪细胞成脂分化过程中表达呈上调趋势( $P < 0.01$ )。以上研究为阐明山羊 *ZFP36L1* 基因的生物学功能提供数据支持。

**关键词:** 山羊; *ZFP36L1*; 基因克隆; 肌内前体脂肪细胞; 诱导分化

资助项目: 国家自然科学基金(82002817); 四川省科技厅项目(2022NSFSC0067)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82002817) and the Foundation from Science and Technology Department of Sichuan Province (2022NSFSC0067).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: 22100098@swun.edu.cn

Received: 2022-09-07; Accepted: 2022-10-17; Published online: 2022-10-19

# Cloning and expression profile of *ZFP36L1* gene in goat

MA Xiaotong<sup>1#</sup>, WANG Ruilong<sup>1,2#</sup>, WANG Fei<sup>1</sup>, CHEN Dingshuang<sup>1,3</sup>, LI Yanyan<sup>1,3</sup>, LIN Yaqui<sup>1,3</sup>, WANG Youli<sup>1,3</sup>, LIU Wei<sup>1,3\*</sup>

1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 Chifeng Vocational Institute of Applied Technology, Chifeng 024031, Inner Mongolia, China

3 Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization, Ministry of Education, Sichuan Province, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

**Abstract:** The purpose of this study was to clone and characterize the *ZFP36L1* (zinc finger protein 36-like 1) gene, clarify its expression characteristics, and elucidate its expression patterns in different tissues of goats. Samples of 15 tissues from Jianzhou big-eared goats, including heart, liver, spleen, lung and kidney were collected. Goat *ZFP36L1* gene was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), then the gene and protein sequence were analyzed by online tools. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression level of *ZFP36L1* in intramuscular preadipocytes in different tissues and adipocytes of goat at different differentiation stages. The results showed that the length of *ZFP36L1* gene was 1 224 bp, and the coding sequence (CDS) region was 1 017 bp, encoding 338 amino acids, which was a non-secretory unstable protein mainly located in nucleus and cytoplasm. Tissue expression profile showed that *ZFP36L1* gene was expressed in all selected tissues. In visceral tissues, the small intestine showed the highest expression level ( $P<0.01$ ). In muscle tissue, the highest expression level was presented in longissimus dorsi muscle ( $P<0.01$ ), whereas the expression level in subcutaneous adipose tissue was significantly higher than that in other tissues ( $P<0.01$ ). The results of induced differentiation showed that the expression of this gene was up-regulated during adipogenic differentiation of intramuscular precursor adipocytes ( $P<0.01$ ). These data may help to clarify the biological function of the *ZFP36L1* gene in goat.

**Keywords:** goat; *ZFP36L1*; gene cloning; intramuscular preadipocyte; induced differentiation

随着生活水平的不断提高,人们对肉品质的要求也不断提高;羊肉因其味美、低胆固醇以及营养丰富而越来越受喜爱<sup>[1]</sup>。肌内脂肪(intramuscular fat, IMF)含量指沉积在肌肉内的脂肪含量,可影响肉质的风味、嫩度、色泽和多汁性等感官特征<sup>[2]</sup>。因此,从分子水平寻找影响肉羊脂肪沉积的关键调控分子具有重要意义,可为肉羊分子育种提供基础生物学证据。

RNA结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)是一类通过与RNA特异性结合、调节转录后基

因表达的蛋白质<sup>[3]</sup>。由于全过程参与RNA的成熟、修饰、转运、定位及翻译, RNA结合蛋白决定了RNA的命运及功能,对细胞的生理代谢至关重要<sup>[4]</sup>。C3H1型锌指蛋白36(zinc finger protein 36-like 1, ZFP36L1)是一种高度保守、具有CCCH型RNA结合结构域的RNA结合蛋白<sup>[5]</sup>。作为人类最大的转录因子——锌指蛋白家族(zinc finger protein, ZFP)的一员, ZFP36L1在转录水平调节脂肪细胞的分化。如Liu等<sup>[6]</sup>在使用左旋咪唑治疗再生障碍性贫血(aplastic anemia,

AA)的研究中发现——在左旋咪唑作用下, ZFP36L1 的表达增加, 进而介导 PPARGC1B mRNA 的降解, 最终抑制 AA 患者骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化。Tseng 等<sup>[7]</sup>则在小鼠中证实 ZFP36L1 通过抑制过氧化物酶增殖物激活受体(PPAR $\gamma$ 2)的表达, 促进了成骨细胞的分化, 抑制多能干细胞向脂肪分化。这些证据均暗示, ZFP36L1 在真核生物脂肪代谢中扮演了重要角色。

简州大耳羊, 是由美国于 1940 年赠予我国的努比亚羴羊(*Capra nubiana*)与四川省龙泉山脉一带的麻羊经过 63 年的杂交选育形成的山羊新品种<sup>[8-10]</sup>。作为我国人工培育的第二个肉用山羊品种, 简州大耳羊体格健硕、生长速度快、产羔率稳定、肉质鲜美, 已自我国西南地区逐渐推广至两湖、两广及河南等省区, 并在 2011 年被国家质检总局登记为中国国家地理标志产品<sup>[11-12]</sup>。作为我国优良的肉用山羊品种, 本研究以人类脂肪细胞分化中已证实的关键因子 ZFP36L1 为生物标志, 探究其在简州大耳羊不同组织及时序下的表达规律, 为阐明简州大耳羊脂肪沉积的调控机制, 改善其肉质性状, 推进其分子育种提供科学依据和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验样品采集

随机选取成年(1 周岁)、健康简州大耳羊(购自四川省简阳大哥大牧业有限公司)3 头, 清晨空腹屠宰后, 立即采集心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠、背最长肌、股二头肌、臂三头肌、皮下脂肪、肠系膜脂肪、肌间脂肪、心包膜脂肪、内脏脂肪共 15 种组织的样品, 用 PBS (pH 7.4)洗涤后剪成小块, 经锡箔纸、冻存管、纱布袋逐级快速包装后于液氮保存。本研究经动物伦理委员会批准, 编号 SMU20210725。

#### 1.1.2 试验试剂

反转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, 购于 Thermo Scientific 公司); DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒(购于天根生化科技(北京)有限公司); TRIzol 试剂(购自 TaKaRa 公司); 实时荧光定量试剂盒(2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix, 购自 Bimake 公司); *Trelief*<sup>TM</sup> 5 $\alpha$  感受态细胞、T 载体(pClone007 Versatile Simple Vector Kit, 购自北京擎科生物科技有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 山羊组织 RNA 提取及 cDNA 反转录

取冻存的心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠、背最长肌、股二头肌、臂三头肌、皮下脂肪、肠系膜脂肪、肌间脂肪、心包膜脂肪、内脏脂肪共 15 种组织, 按照 TRIzol 法<sup>[13]</sup>提取山羊各组织 RNA, 电泳验证 RNA 完整性, 检测 RNA 的浓度和质量合格后按照反转录试剂盒说明书进行 RNA 反转录合成 cDNA, 合成的 cDNA 置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 1.2.2 引物的设计及合成

根据 GenBank 中的山羊预测序列(登录号: XM\_013967250.2), 利用 Primer Premier 5 软件设计克隆引物(表 1), 扩增其完整的编码序列(coding sequence, CDS)区序列。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

#### 1.2.3 山羊 ZFP36L1 基因克隆与测序

以背最长肌 cDNA 为模板进行逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)反应, 克隆 ZFP36L1 基因。RT-PCR 反应总体系(25  $\mu$ L)为: Primer STAR Max DNA Polymerase 酶 12.5  $\mu$ L; 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L; 模板 cDNA 1  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。RT-PCR 扩增程序: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸

20 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果正确后回收纯化 PCR 扩增产物, 将纯化产物连接至 T 载体, 连接产物转化到 *Trelief*<sup>TM</sup> 5 $\alpha$  感受态细胞并加入 500  $\mu$ L LB 培养基, 摇床复苏 45 min, 取 100  $\mu$ L 转化产物接种于含 Amp 抗性的 LB 固体培养基中, 37 °C 培养过夜, 挑选出固体培养基中单一且呈圆形的阳性菌落于含 1 mL LB 培养基的 EP 管中, 经 37 °C、200 r/min 摇床培养 3–6 h 后进行菌落鉴定, 将鉴定结果呈阳性的菌落送

至北京擎科生物科技有限公司成都分公司进行菌液测序。

#### 1.2.4 山羊 *ZFP36L1* 基因生物信息学分析

运用生物信息学软件及在线工具对山羊 *ZFP36L1* 基因进行生物信息学分析, 分析方法及工具如表 2 所示。

#### 1.2.5 山羊 *ZFP36L1* 基因在组织及分化细胞中的表达检测

以提取的简州大耳羊心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠、背最长肌、股二头肌、臂三头肌、

表 1 文中所用引物信息

Table 1 Primer information used in this study

Gene	Primer sequence (5'→3')	$T_m$ (°C)	Size (bp)	Purpose
<i>ZFP36L1</i>	F: TGTATGGAGAGGCAGGCAAC R: CTCCAGCAGGGCTTTACGTC	58	1 224	RT-PCR
<i>ZFP36L1</i>	F: TGTATGCCAAGAGAGCCAGT R: CCCTTGTTGAACTTCCTTC	60	101	qPCR
<i>ZFP36L1</i>	F: <u>CCCAAGCTT</u> ATGACCACCGCCCTCGT R: C <u>GGGATCCT</u> AGTCATCTGAGATGGAAAGTCTGC	58	1 017	PCR
<i>TBP</i>	F: AACAGCCTCCACCTTATGC R: TGCTGCTCCTCCAAAATAGAC	60	155	qPCR
<i>UXT</i>	F: GCAAGTGGATTTGGGCTGTAAC R: ATGGAGTCCTTGGTGAGGTTGT	60	173	qPCR

F: Sense primer; R: Antisense primer; *Bam*H I restriction site and *Hind* III restriction site are underlined; *TBP*, *UXT*: Ubiquitously-expressed transcript gene.

表 2 序列分析及所使用程序

Table 2 Sequence analysis and procedures used

Analysis content	Analytic software and online tools
Amino acid sequence translation	ORF Finder ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder</a> )
Multiple sequence alignment	NCBI Blast ( <a href="https://www.dnastar.com">https://www.dnastar.com</a> )
Phylogenetic tree	MEGA 7
Computation of physical and chemical parameters	ExpASy-ProtParam ( <a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a> )
Prediction of protein secondary structure	SOPMA ( <a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/">https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/</a> )
Prediction of protein tertiary structure	SWISSMODEL ( <a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a> )
Prediction of the amino-acid glycosylation sites	NetNGlyc 1.0 ( <a href="http://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0">http://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0</a> )
Predictions of the amino-acid phosphorylation sites	NetPhos 3.1 Server ( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a> )
Prediction of the signal peptide sites	SignalP 4.1 ( <a href="http://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1">http://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1</a> )
Subcellular localization analysis	PSORT II ( <a href="https://psort.hgc.jp/form2.html">https://psort.hgc.jp/form2.html</a> )
Protein-protein interaction analysis	STRING ( <a href="https://string-db.org/">https://string-db.org/</a> )
Prediction of transmembrane domain	TMHMM ( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a> )

皮下脂肪、肠系膜脂肪、肌间脂肪、心包膜脂肪、内脏脂肪共 15 种组织 cDNA 为模板, 以 *TBP* 为内参基因, 用实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 检测 *ZFP36L1* 基因在各种组织中的表达水平。复苏前期保存的简州大耳羊肌内前体脂肪细胞并传代培养<sup>[14]</sup>, 待 F3 代细胞长至 80% 时加入 50  $\mu\text{mol/L}$  油酸诱导其分化, 分别于 0、24、48、72、96、120 h 收集细胞, 提取细胞样品总 RNA 并反转录为 cDNA, 进而用 qPCR 扩增 *ZFP36L1* 基因, 检测其表达水平。qPCR 反应体系为 2 $\times$  SYBR Green qPCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 cDNA 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。qPCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s, 35 个循环。

### 1.2.6 山羊 *ZFP36L1* 过表达载体构建及表达效率检测

利用克隆得到的山羊 *ZFP36L1* 基因 CDS 区序列设计亚克隆引物, 选用 *Bam*H I 和 *Hind* III (下划线) 为酶切位点, 设计包含酶切位点且克隆产物包含完整 CDS 区域的引物, 引物信息如表 1 所示。以前述质粒为模板进行 PCR 扩增, 将目的片段与 pClone007 VS 载体连接后进行测序; 选取测序正确的质粒与 pEGFP-Tag 2B 载体分别应用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 纯化后利用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化到 *Trelief*<sup>TM</sup>

5 $\alpha$  感受态细胞进行过夜培养, 筛选阳性克隆并提质粒, 送至成都擎科生物技术有限公司测序。表达效率检测, 将测序成功的质粒转染至 F3 代肌内前体脂肪细胞, 空白组、试验组分别转染 pEGFP-Tag 2B 与 pEGFP-*ZFP36L1* (质粒: 500 ng, opti: 100  $\mu\text{L}$ , TurboFect: 2  $\mu\text{L}$ ), 48 h 时收集细胞并提取总 RNA, 反转录为 cDNA。通过 qPCR 扩增山羊 *ZFP36L1* 基因(体系与程序同 1.2.5), 以 *UXT* 为内参基因, 检测其表达水平。

### 1.2.7 数据统计分析

定量结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[15]</sup> 处理, 数据以平均值 $\pm$ 标准误表示, 用 SPSS 26.0 中 Duncan 检验对数据进行方差分析,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著; 利用 Graphpad prism 9.0 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 克隆的山羊 *ZFP36L1* 基因

以背最长肌 cDNA 为模板, 扩增 *ZFP36L1* 基因, 扩增片段与预期目的产物大小相符(图 1A), 测序获得山羊 *ZFP36L1* 基因片段长度为 1 224 bp, 经过 ORF Finder 分析发现, *ZFP36L1* 基因的 CDS 区为 1 017 bp, 编码 338 个氨基酸, 与 NCBI 数据库山羊基因序列(XM\_013967250.2)相比存在 2 个碱基的突变(图 1B)。将测序序列上传到 NCBI, 获得基因登录号 OL828166。

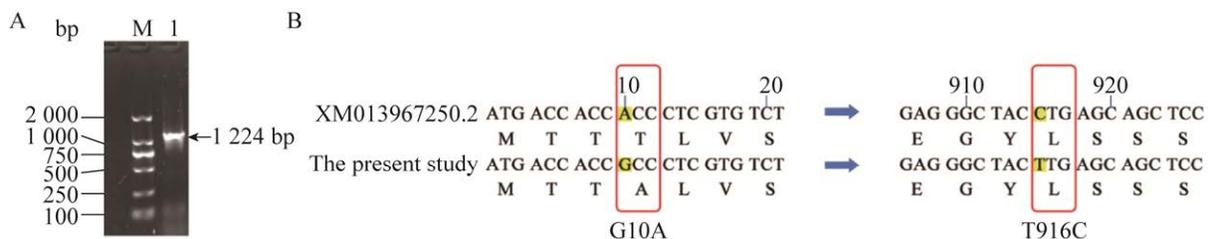


图 1 山羊 *ZFP36L1* 基因结构

Figure 1 Gene structure of goat *ZFP36L1* gene. A: Electropherogram. M: DL2000 DNA marker; 1: *ZFP36L1* targetstrip. B: Comparison of the partial nucleotide sequence of *ZFP36L1*.

## 2.2 山羊 ZFP36L1 基因序列

### 2.2.1 山羊 ZFP36L1 一级结构及理化性质

分析山羊 ZFP36L1 氨基酸序列,其分子式为  $C_{1585}H_{2469}N_{459}O_{498}S_{13}$ , 分子质量为 36.339 6 kDa, 理论等电点为 5.22, 不稳定指数为 68.17, 脂肪指数为 61.30, 亲水性总平均值为-0.485, 说明该蛋白为酸性的不稳定亲水性蛋白。ZFP36L1 蛋白的氨基酸组成如图 2 所示, 其中丝氨酸含量最高(14.8%), 甲硫氨酸和缬氨酸的含量最低(1.5%); 该基因编码的蛋白质中, 带负电荷的残基数(Asp+Glu)为 32, 带正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys)为 34, 表明山羊 ZFP36L1 蛋白质可能带正电荷。

### 2.2.2 山羊 ZFP36L1 蛋白质理化性质

应用在线工具预测 ZFP36L1 蛋白的磷酸化位点, 发现 52 个磷酸化位点, 包括 43 个丝氨酸磷酸化位点(Ser)、7 个苏氨酸磷酸化位点(The)、2 个酪氨酸磷酸化位点(Tyr)。预测糖基化位点, 表明该蛋白可能含有 2 个 N-糖基化位点, 分别位于第 25 位点和第 111 位点。运用在线软件 SMART 对该蛋白结构域进行分析, 发

现 2 个 CCCH 型 RNA 结合结构域和 4 个低复杂性结构域(图 3A)。利用在线软件 TMHMM 分析 ZFP36L1 蛋白质的跨膜结构, 未见明显跨膜区域, 为非跨膜蛋白(图 3B)。信号肽预测结果显示, 无信号肽(S 均值=0.244), 为非分泌蛋白(图 3C)。

### 2.2.3 山羊 ZFP36L1 蛋白高级结构、相互作用蛋白以及亚细胞定位

预测山羊 ZFP36L1 蛋白质二级结构, 发现形成  $\alpha$ -螺旋的氨基酸有 71 个, 占 21.01%; 有 219 个氨基酸形成无规则卷曲, 占 68.05%; 27 个氨基酸形成延伸链, 占 7.99%; 21 个氨基酸形成  $\beta$ -转角, 占 6.21% (图 4A)。山羊 ZFP36L1 蛋白三级结构与二级结构预测结果一致, 如图 4B 所示。预测其相互作用蛋白, 发现 ZFP36L1 蛋白主要与 ZFP36L2、YWHAB、DCP2、ZNF24、EXOSC6、DCP1A、EXOSC2、XRN1、SNX18 等蛋白相互作用, 进而发挥其生物学功能(图 4C)。

预测其亚细胞结构定位, 发现 ZFP36L1 主要分布于细胞核中, 占 43.5%, 其余依次为细胞质(39.1%)、线粒体(8.7%)与细胞骨架(8.7%) (图 4D)。

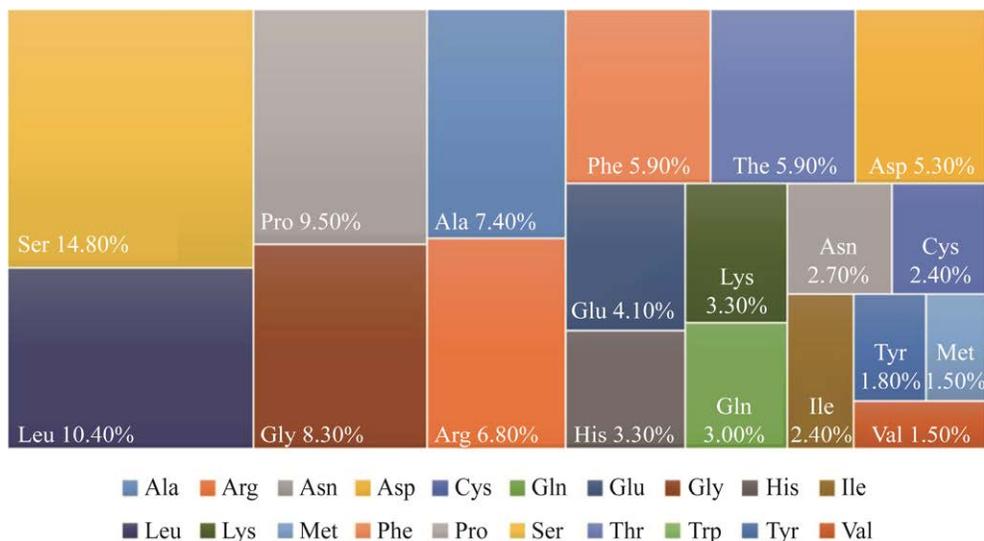


图 2 山羊 ZFP36L1 蛋白的氨基酸组成

Figure 2 Amino-acid composition in ZFP36L1 protein of goat.

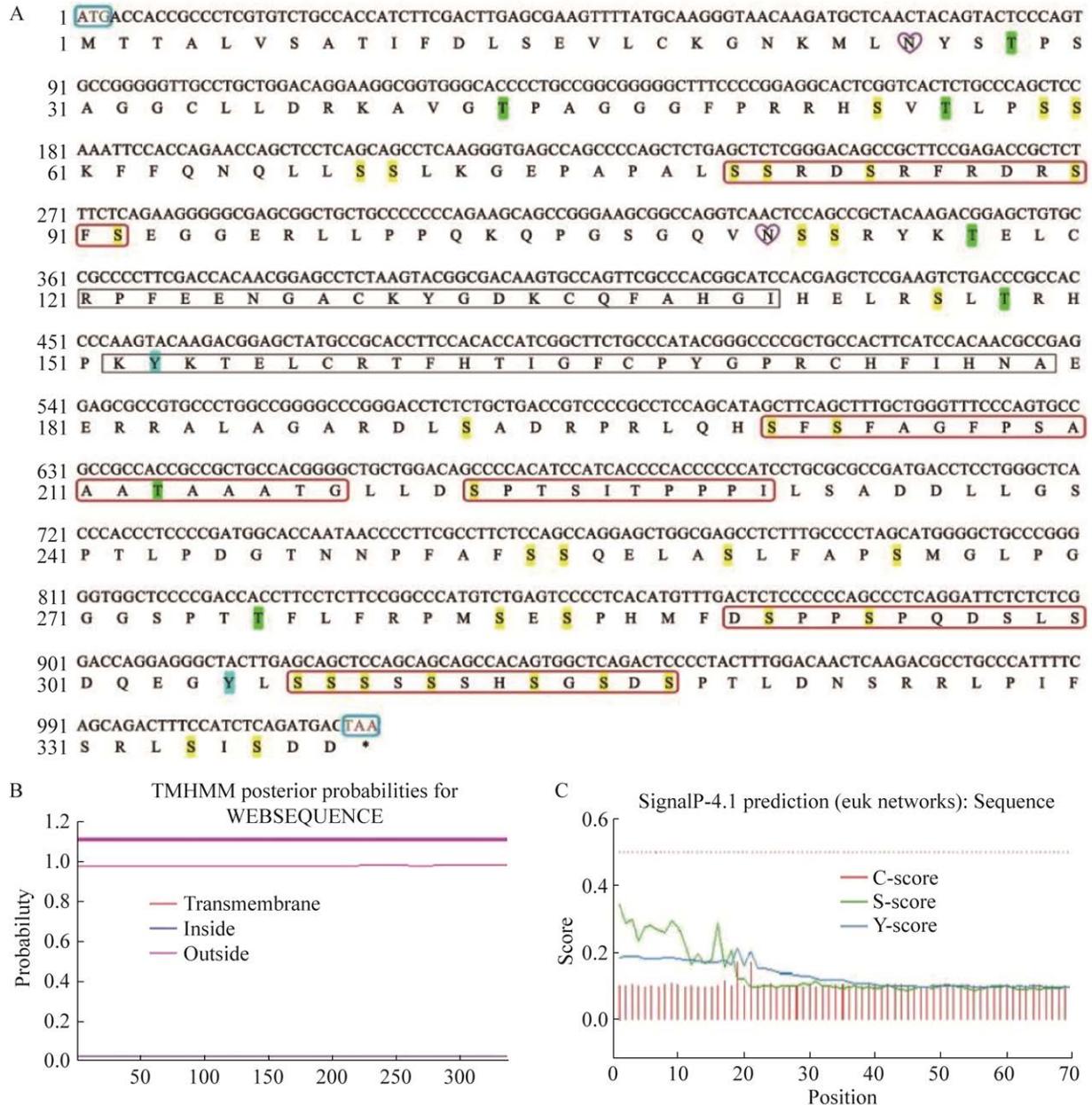


图3 山羊 ZFP36L1 蛋白质修饰位点、结构域、跨膜结构和信号肽

Figure 3 Analysis of protein modification sites, domain (A), transmembrane structure (B) and signal peptide (C) in ZFP36L1 protein of goat. (A) Shadow: Phosphorylation site. Heart-shape: Glycosylation site. Red box: Low-complexity domain. Black box: C-end domain. Blue frame: ATG is the start codon and TAA is the stop codon.

#### 2.2.4 山羊 ZFP36L1 氨基酸序列系统进化

运用 NCBI 在线比对程序对不同物种 ZFP36L1 基因所编码的氨基酸序列进行 BLAST, 发现山羊 ZFP36L1 的氨基酸序列与绵羊、牛、野

牦牛、欧亚野猪、羊驼、大熊猫和马来亚穿山甲的 ZFP36L1 氨基酸序列的相似性分别为 99.70%、99.70%、99.70%、99.41%、99.11%、99.11%、99.11% (图 5A), 表明 ZFP36L1 在不

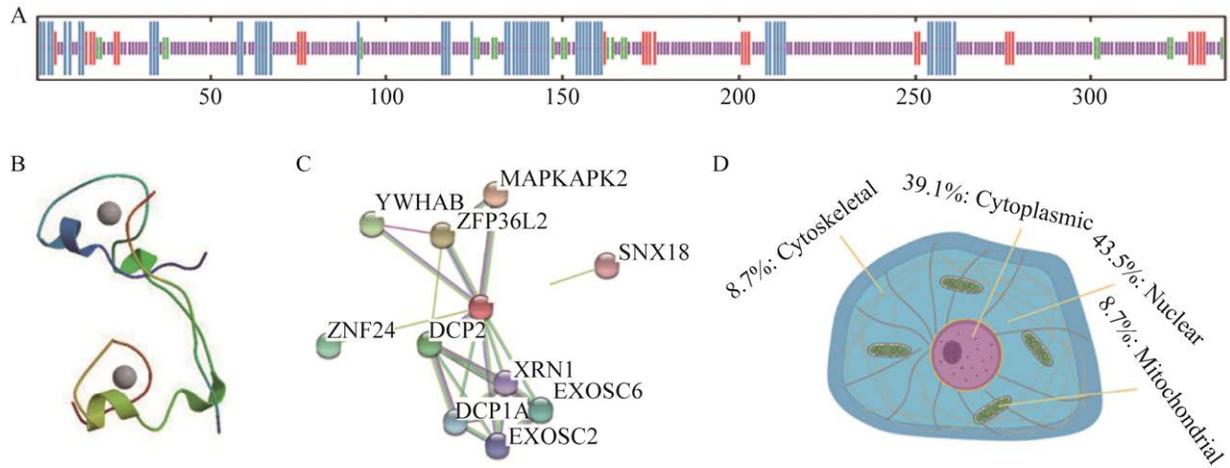


图 4 山羊 ZFP36L1 蛋白二级结构和三级结构预测、互作蛋白分析以及亚细胞定位

Figure 4 Prediction of the secondary (A) and tertiary structure (B), interaction (C) and sub-cellular localization (D) of the goat ZFP36L1 protein.

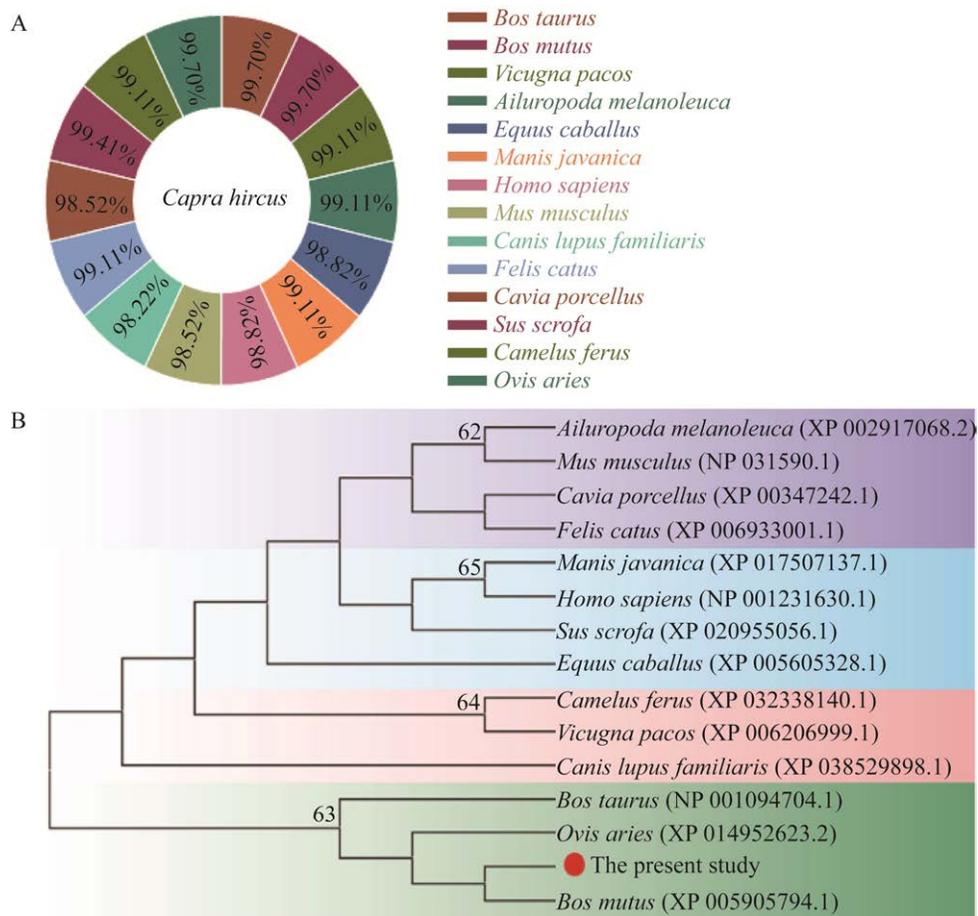


图 5 山羊 ZFP36L1 蛋白的系统发育

Figure 5 Phylogeny of ZFP36L1 protein in goats. A: Amino acid homology comparison. B: Phylogenetic tree based on ZFP36L1 protein.

同物种间具有较高的保守性。基于 *ZFP36L1* 构建的系统发育树显示, 山羊与野牦牛处于同一分支, 亲缘关系最近, 其次是与绵羊和牛亲缘关系较近(图 5B)。

### 2.3 山羊 *ZFP36L1* 基因在不同组织中的表达差异

为明确山羊 *ZFP36L1* 基因在不同组织中的表达差异, 利用 qPCR 方法检测其在山羊心、肝、脾、肺、肾、大肠、小肠、背最长肌、股二头肌、臂三头肌、皮下脂肪、肠系膜脂肪、

肌间脂肪、心包膜脂肪、内脏脂肪共 15 种组织中的 mRNA 表达水平。结果显示, *ZFP36L1* 基因在山羊各组织中均有表达。其中在内脏组织中小肠的表达量极显著高于其他组织( $P<0.01$ ), 肝、肾和大肠也存在较高的表达水平(图 6A)。在肌肉组织中背最长肌的表达量最高( $P<0.01$ ), 臂三头肌的表达量最低(图 6B)。在脂肪组织中, 皮下脂肪组织的表达量最高且极显著高于其他组织( $P<0.01$ ), 内脏脂肪组织和肌间脂肪组织的表达水平无显著差异(图 6C)。

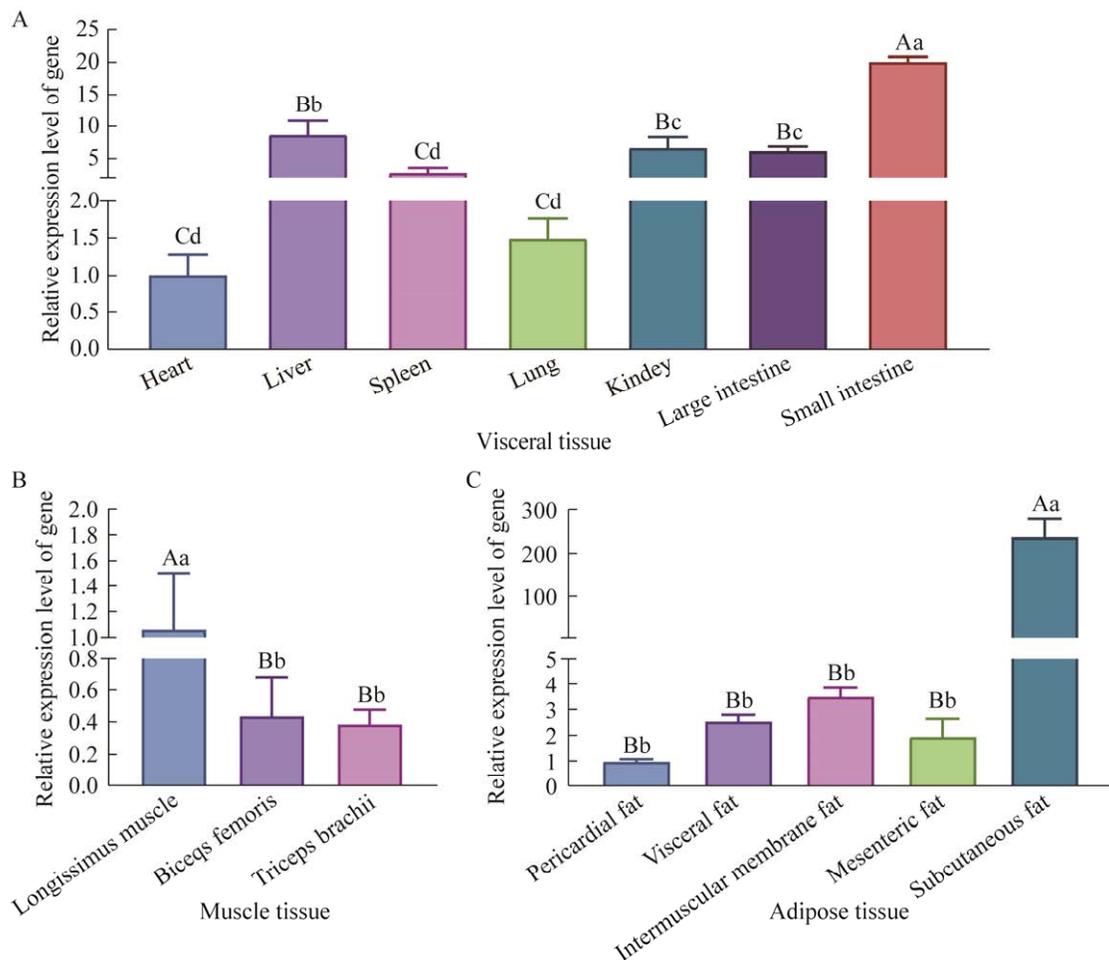


图 6 山羊 *ZFP36L1* 基因在内脏、肌肉和脂肪组织中的相对表达水平

Figure 6 Relative expression levels of goat *ZFP36L1* in visceral tissues (A), muscle tissues (B) and adipose tissues (C). Different capital letters in the superscript indicate that the difference is extremely significant between the data ( $P<0.01$ ), different lowercase letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

## 2.4 山羊 *ZFP36L1* 基因在肌内前体脂肪细胞分化前后的表达差异

为探究 *ZFP36L1* 基因是否在山羊的脂肪沉积过程中充当关键分子,通过 qPCR 检测其在山羊肌内前体脂肪细胞分化过程中的表达水平。结果表明,经 50  $\mu\text{mol/L}$  油酸诱导分化成熟过程中,与诱导分化前相比,分化 24、48、72、96、120 h 的 *ZFP36L1* 的表达水平均呈现上调趋势(图 7)。以上结果表明, *ZFP36L1* 基因可能作为山羊脂肪细胞分化的正调控因子发挥作用。

## 2.5 山羊 *ZFP36L1* 基因过表达载体的表达效率

为进一步验证 *ZFP36L1* 基因的生物学功能,以 *BamH* I 和 *Hind* III 作为酶切位点设计亚

克隆引物(表 1),进而构建 pEGFP-*ZFP36L1* 过表达载体。pEGFP-*ZFP36L1* 质粒经 *BamH* I 和 *Hind* III 酶切,电泳得到长度约 4.7 kb 的 pEGFP-N1 载体片段与 1.0 kb 的目的片段(图 8A)。测序后结果显示,插入的序列与目的基因完全匹配。该载体转染肌内前体脂肪细胞后,运用 qPCR 技术检测,结果显示,与空白组相比, *ZFP36L1* 基因表达量上调了 84.7 倍(图 8B),表明 pEGFP-*ZFP36L1* 过表达载体构建成功。

## 3 讨论

*ZFP36L1* 是一种广泛存在于真核生物的 RNA 结合蛋白,通过对基因转录后的调控,在多种细胞的生长分化中扮演着重要角色<sup>[16]</sup>。*ZFP36L1* 自

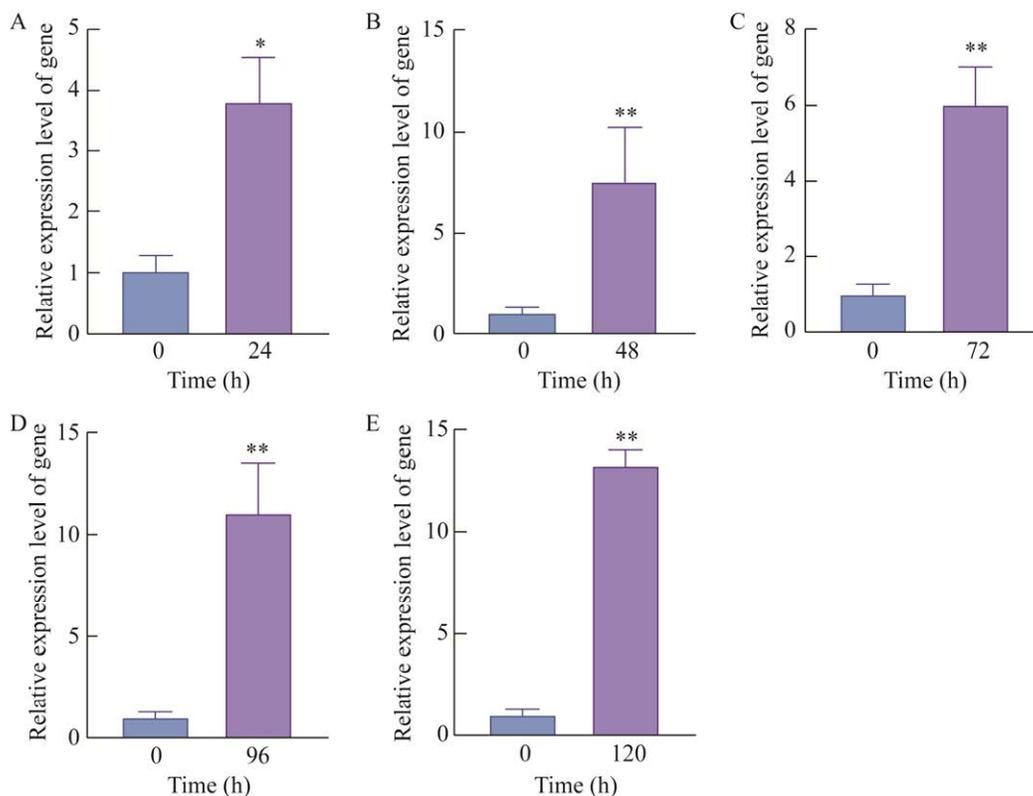


图 7 山羊 *ZFP36L1* 基因在肌内前体脂肪细胞分化过程中的相对表达水平

Figure 7 Relative expression levels of *ZFP36L1* gene in goat intramuscular preadipocyte during differentiation process. Relative expression level of *ZFP36L1* gene at 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C), 96 h (D) and 120 h (E). \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

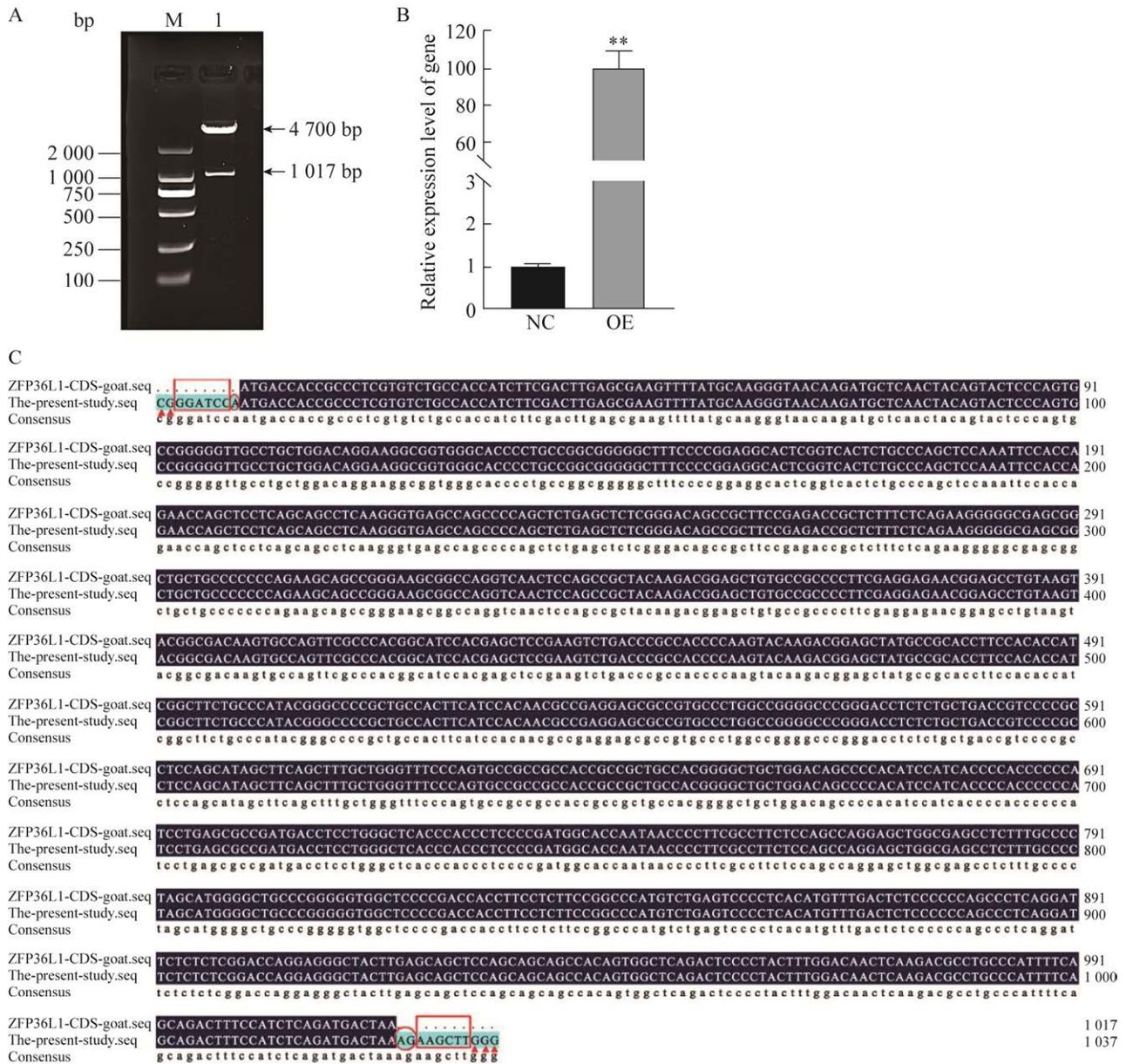


图 8 山羊肌内前体脂肪细胞中 ZFP36L1 基因的过表达

Figure 8 Overexpression of ZFP36L1 gene in goat intramuscular preadipocytes. A: Electropherogram. M: DL2000 DNA marker; 1: Digestion identification of pEGFP-ZFP36L1. B: Relative mRNA expression levels of ZFP36L1 gene. \*\*: P<0.01. C: Overexpression vector sequence alignment. Square frame: Restriction site. Round circle: Inserted base (to prevent a frameshift mutation). Triangle: Protective bases.

1989 年首次报道以来<sup>[17]</sup>, 主要关注在于其与人类疾病的关系<sup>[16,18-19]</sup>, 在其他哺乳动物中鲜有报道, 且对于反刍动物脂肪细胞的作用尚未见报道。

本研究成功克隆山羊 ZFP36L1 基因, 全长

为 1 224 bp, 编码 338 个氨基酸。Tréguer 等<sup>[17]</sup> 对爪蟾发育过程中的调控基因研究时发现, ZFP36 家族(包括 ZFP36、ZFP36L1、ZFP36L2) 在脊椎动物进化过程中较为保守, 这与本研究

的结论一致——氨基酸序列比对得到简州大耳羊与绵羊、牛、野牦牛相似性较高,说明该蛋白在不同物种间具有较高的保守性。Hitti 等<sup>[20]</sup>在对肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)转录调控的研究中发现, *ZFP36L1* 的磷酸化对其亚细胞定位、蛋白稳定性及 mRNA 去稳定化至关重要。这一结论在 Lin 等<sup>[21]</sup>对 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中 *ZFP36* 家族的表达调控研究中得到证实——*ZFP36L1* 的磷酸化显著影响了细胞分化。本研究在对山羊 *ZFP36L1* 蛋白理化性质的分析中发现, 丝氨酸与苏氨酸占其总氨基酸组成的 20.7%, 存在 52 个磷酸化位点, 具有广泛的磷酸化潜力, 而磷酸化作为蛋白翻译后修饰的方式之一, 参与调节细胞的生长、分化、凋亡等功能<sup>[22]</sup>, 这或许是 *ZFP36L1* 发挥其生物学功能的重要机制。

*ZFP36* 家族具有高度保守的 CCCH 型锌指结构域, 对于控制 mRNA 稳定性至关重要, 被认为是调控基因精确表达的重要靶点<sup>[23-24]</sup>, 而 *ZFP36L1* 蛋白的结构域显示, 其含有 2 个 CCCH 型 RNA 结合结构域和 4 个低复杂性结构域, 且其锌指结构中的 Zn 离子可提高  $\alpha$ -螺旋的稳定性使其得以嵌合在 DNA 分子上发挥其对 DNA 或 mRNA 的调控功能<sup>[16]</sup>, 对 *ZFP36L1* 蛋白特殊结构的研究为探索其作用机制具有重要意义。

除以上发现外, 蛋白互作网络分析显示, 机体内与 *ZFP36L1* 存在相互作用关系的蛋白质有许多且均已被证实为重要的转录调控元件。如 *ZFP36L2*、*YWHAB*、*DCP2*、*EXOSC6*、*DCP1A*、*XRN1* 均通过不同形式介导 mRNA 的降解, *ZNF24*、*EXOSC2* 则通过对转录激活因子(activating transcription factor, ATF)的正调控启动转录, 其中 *MAPKAPK2*、*YWHAB* 与 *SNX18* 还与蛋白质的磷酸化有关<sup>[25-26]</sup>。结合前人研究结果, 表明 *ZFP36L1* 主要于转录水平调控生物

学进程, 表明其作为转录因子发挥其转录调控作用是调节细胞生物学功能的重要途径。

组织表达研究发现, *ZFP36L1* 基因表达于山羊的各组织, 在内脏组织中, 小肠的表达量极显著高于其他组织( $P < 0.01$ ), 心脏的表达量最低; 在肌肉组织中, 背最长肌的表达量最高( $P < 0.01$ ), 肱二头肌的表达量居于次位; 在脂肪组织中, 皮下脂肪组织的表达量最高, 且极显著高于其他组织( $P < 0.01$ )。人类的 *ZFP36L1* 蛋白高表达于卵巢、胎盘、脂肪等组织, 低表达于骨髓、心脏、胰腺等组织<sup>[16]</sup>, 由此可见, *ZFP36L1* 基因在各组织具有广谱表达的特征, 但因物种的较大差异, 在其他动物特别是反刍动物中的组织表达特性还需进一步研究证实。

研究表明 *ZFP36L1* 蛋白参与众多的生理过程如细胞周期的转换、细胞分化和衰老<sup>[16]</sup>。为探究 *ZFP36L1* 是否参与调控了山羊的脂肪细胞分化, 本研究探讨了经油酸诱导后其在肌内前体脂肪细胞的分化进程中的表达情况, 其间 *ZFP36L1* 保持显著的上调趋势, 表明 *ZFP36L1* 在脂肪细胞的分化中充当效应因子, 可能正调控肌内脂肪沉积。这一结论与 Lin 等<sup>[21]</sup>和 Kaehler 等<sup>[19]</sup>的发现一致——细胞中 *ZFP36L1* 的敲低抑制了脂肪的形成。然而 Liu 等<sup>[6]</sup>、Tseng 等<sup>[7]</sup>则认为 *ZFP36L1* 过表达后, 通过下调过氧化物酶体增殖物激活受体(如 *PPAR-GC1B*、*PPAR- $\gamma$ 2*)的表达, 抑制骨髓间充质干细胞向脂肪细胞的分化。这些结果的矛盾性表明 *ZFP36L1* 可能在不同的物种及不同的细胞类型中, 发挥不同的生物学功能及相应的调控作用。但根据 *ZFP36L1* 基因在山羊肌内前体脂肪细胞分化过程中的表达水平, 推测 *ZFP36L1* 可能会促进山羊脂肪细胞分化。并且可以肯定的是其一定在真核生物脂肪细胞的形成中充当重要的调控因子。以上结论将为阐明山羊 *ZFP36L1* 的

生物学功能及肉用山羊肉质改良的基础研究工作提供理论依据。

## 4 结论

本研究成功扩增获得全长为 1 224 bp 的山羊 *ZFP36L1* 基因, 其中 CDS 区长为 1 017 bp, 编码 338 个氨基酸, 理论等电点为 5.22, 不稳定指数为 68.17, 为不稳定亲水性蛋白。*ZFP36L1* 在山羊的 15 个组织中均有表达, 在内脏组织中小肠的表达量最高( $P < 0.01$ ), 在肌肉组织中背最长肌的表达量最高( $P < 0.01$ ), 在脂肪组织中皮下脂肪组织的表达量极显著高于其他组织( $P < 0.01$ )。通过定向诱导, *ZFP36L1* 基因在分化后的肌肉脂肪细胞中的表达水平显著高于未分化的肌肉前体脂肪细胞, 推测 *ZFP36L1* 可能作为正调控因子, 在山羊肌肉前体脂肪细胞的分化中发挥作用。

## REFERENCES

- [1] 朱武政, 林亚秋, 江明锋, 王永, 廖红海, 李倩, 朱江江. 肉用山羊脂代谢相关基因与肌肉脂肪含量的相关性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(7): 1333-1341.  
ZHU WZ, LIN YQ, JIANG MF, WANG Y, LIAO HH, LI Q, ZHU JJ. Association analysis of intramuscular fat content and the expression of genes related to lipid metabolism in meat goat[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2016, 47(7): 1333-1341 (in Chinese).
- [2] 谢光杰, 王永, 许晴, 朱江江, 林亚秋. 简州大耳羊肌肉脂肪细胞成脂分化差异表达基因的筛选与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(7): 1525-1536.  
XIE GJ, WANG Y, XU Q, ZHU JJ, LIN YQ. Selection and validation of the differentially expressed genes during the adipogenic differentiation of Jianzhou da'er goat intramuscular adipocytes[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2020, 51(7): 1525-1536 (in Chinese).
- [3] GERSTBERGER S, HAFNER M, TUSCHL T. A census of human RNA-binding proteins[J]. Nature Reviews Genetics, 2014, 15(12): 829-845.
- [4] HENTZE MW, CASTELLO A, SCHWARZL T, PREISS T. A brave new world of RNA-binding proteins[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018, 19(5): 327-341.
- [5] LYKKE-ANDERSEN J, WAGNER E. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1[J]. Genes & Development, 2005, 19(3): 351-361.
- [6] LIU LL, LIU L, LIU HH, REN SS, DOU CY, CHENG PP, WANG CL, WANG LN, CHEN XL, ZHANG H, CHEN MT. Levamisole suppresses adipogenesis of aplastic anaemia-derived bone marrow mesenchymal stem cells through ZFP36L1-PPARGC1B axis[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22(9): 4496-4506.
- [7] TSENG KY, CHEN YH, LIN S. Zinc finger protein ZFP36L1 promotes osteoblastic differentiation but represses adipogenic differentiation of mouse multipotent cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 20588-20601.
- [8] 陈珊珊. 简州大耳羊胎儿期生长发育规律的研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2016.  
CHEN SS. Study on the fetal growth and development of Jianzhou Da'er goats (*Capra hircus*)[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [9] 熊朝瑞, 范景胜, 王永, 郑水明, 陈天宝, 俄木曲者. 简阳大耳羊的种质特性[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, 5: 40-41.  
XIONG CR, FAN JS, WANG Y, ZHENG SM, CHEN TB, EMU QZ. Germplasm characteristics of Jianzhou big ears sheep[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary, 2013, 5: 40-41.
- [10] 俄木曲者, 熊朝瑞, 范景胜, 王永, 陈天宝, 张红平. 简州大耳羊产肉性能世代选育进展及肉品质研究[J]. 中国草食动物科学, 2014, 34(3): 9-12.  
EMU QZ, XIONG CR, FAN JS, WANG Y, CHEN TB, ZHANG HP. Research on breeding progress and meat quality of Jianzhou big ear sheep[J]. China Herbivore Science, 2014, 34(3): 9-12 (in Chinese).
- [11] 董恩妮. 简州大耳羊主要生长和繁殖性状遗传参数估计及各世代生长规律比较[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2014.  
DONG EN. Estimation of genetic parameters of the main growth and reproductive traits and the comparison of growth rules among generations in Jianzhou flap-eared goat[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [12] 范景胜, 熊朝瑞, 郑水明, 王永, 俄木曲者, 陈天宝. 简阳大耳羊生长发育规律研究[J]. 四川畜牧兽医, 2012, 39(9): 31-32, 35.  
FAN JS, XIONG CR, ZHENG SM, WANG Y, EMU

- QZ, CHEN TB. Research on the growth-development law of Jianyang daer goat[J]. Sichuan Animal & Veterinary Sciences, 2012, 39(9): 31-32, 35 (in Chinese).
- [13] ROY D, TOMO S, MODI A, PUROHIT P, SHARMA P. Optimising total RNA quality and quantity by phenol-chloroform extraction method from human visceral adipose tissue: a standardisation study[J]. *MethodsX*, 2020, 7: 101113.
- [14] 李倩, 林亚秋, 朱江江, 林森, 张小玉, 王永. 山羊 *FGF21* 基因克隆及其在肌肉脂肪细胞中的表达模式研究[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(1): 31-38.  
LI Q, LIN YQ, ZHU JJ, LIN S, ZHANG XY, WANG Y. Cloning of goat *FGF21* gene and its expression pattern in intramuscular adipocyte[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2017, 48(1): 31-38 (in Chinese).
- [15] 汪伟, 杜倩, 韩知晓, 辛佳亮, 闫修魁, 梁莹莹, 朱远致, 曹亮, 孙文超, 胡传活, 郑敏. 山羊关节炎脑炎病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(3): 294-299.  
WANG W, DU Q, HAN ZX, XIN JL, YAN XK, LIANG YY, ZHU YZ, CAO L, SUN WC, HU CH, ZHENG M. Establishment and application of SYBR green I real-time PCR for CAEV[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(3): 294-299 (in Chinese).
- [16] 胡杨兮, 马超群, 荆清. RNA 结合蛋白 Zfp36L1 的研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(6): 760-762, 765.  
HU YX, MA CQ, JING Q. Research progress in Zfp36L1, a RNA binding protein[J]. Chinese Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine, 2019, 11(6): 760-762, 765 (in Chinese).
- [17] TRÉGUER K, FAUCHEUX C, VESCHAMBRE P, FÉDOU S, THÉZÉ N, THIÉBAUD P. Comparative functional analysis of *ZFP36* genes during *Xenopus* development[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54550.
- [18] WANG G, ZHOU F, OU T, SUN H, SHAN Z, LU Y, CHEN G, YUAN S, ZHANG X, WU S. The oncogenic role of HIF-1 $\alpha$ /miR-182-5p/*ZFP36L1* signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Cell International, 2021, 21(1): 462.
- [19] KAEHLER M, DWORSCHAK M, RODIN JP, RUEMENAPP J, VATER I, PENAS EMM, LIU C, CASCORBI I, NAGEL I. *ZFP36L1* plays an ambiguous role in the regulation of cell expansion and negatively regulates *CDKN1A* in chronic myeloid leukemia cells[J]. Experimental Hematology, 2021, 99: 54-64.e7.
- [20] HITTI E, IAKOVLEVA T, BROOK M, DEPPENMEIER S, GRUBER AD, RADZIOCH D, CLARK AR, BLACKSHEAR PJ, KOTLYAROV A, GAESTEL M. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element[J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(6): 2399-2407.
- [21] LIN NY, LIN TY, YANG WH, WANG SC, WANG KT, SU YL, JIANG YW, CHANG GD, CHANG CJ. Differential expression and functional analysis of the tristetraprolin family during early differentiation of 3T3-L1 preadipocytes[J]. International Journal of Biological Sciences, 2012, 8(5): 761-777.
- [22] HUMPHREY SJ, JAMES DE, MANN M. Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2015, 26(12): 676-687.
- [23] 罗利云, 凌莉, 王潇蓉, 石乐娟, 宋莹, 郑国涛, 李楠. *ZFP36L1* 通过下调细胞周期蛋白 D1 抑制舌癌细胞增殖[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(1): 67-73.  
LUO LY, LING L, WANG XR, SHI LJ, SONG Y, ZHENG GP, LI N. *ZFP36L1* inhibits proliferation of tongue cancer cells by down-regulating cyclin D1[J]. Chinese Journal of Biochemistry Molecular Biology, 2019, 35(1): 67-73.
- [24] KONDO M, NOGUCHI A, MATSUURA Y, SHIMADA M, YOKOTA N, KAWAHARA H. Novel phosphorelay-dependent control of *ZFP36L1* protein during the cell cycle[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 501(2): 387-393.
- [25] HODSON DJ, JANAS ML, GALLOWAY A, BELL SE, ANDREWS S, LI CM, PANNELL R, SIEBEL CW, MACDONALD HR, de KEERSMAECKER K, FERRANDO AA, GRUTZ G, TURNER M. Deletion of the RNA-binding proteins *ZFP36L1* and *ZFP36L2* leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia[J]. Nature Immunology, 2010, 11(8): 717-724.
- [26] SAFRAN M, DALAH I, ALEXANDER J, ROSEN N, INY STEIN T, SHMOISH M, NATIV N, BAHIR I, DONIGER T, KRUG H, SIROTA-MADI A, OLENDER T, GOLAN Y, STELZER G, HAREL A, LANCET D. GeneCards Version 3: the human gene integrator[J]. Database: the Journal of Biological Databases and Curation, 2010, 2010: baq020. Doi: 10.1093/database/baq020.

(本文责编 陈宏宇)