

槟榔江水牛 *ACVR1* 基因分离鉴定及表达谱分析*

杨云^{1#}, 张自芳^{1#}, 江明星², 钱林东¹, 胡瑀²,
哈福^{2**}, 苗永旺^{2**}

(1. 云南农业职业技术学院 畜牧兽医学院, 云南 昆明 650212;

2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】*ACVR1* 作为一些 TGF- β 超家族成员信号通路的 I 型受体之一, 在器官形成和细胞分化及卵泡形成等调控事件中扮演重要角色。迄今, 有关 *ACVR1* 基因的研究主要集中在人上, 有关水牛 *ACVR1* 基因的研究尚未见报道。【方法】采用 RT-PCR 测序法对槟榔江水牛 *ACVR1* 基因的编码区序列进行了分离鉴定, 进一步对之进行了功能生物信息学和表达谱分析。【结果】水牛 *ACVR1* 基因编码区全长 1 530 bp, 编码 1 个由 509 个氨基酸残基构成的多肽。水牛 *ACVR1* 为弱亲水性蛋白, 含有 1 个信号肽和跨膜区, 定位在质膜上; 该蛋白含有 Activin_recp、TGF_beta_GS 和 STKc_ACVR1_ALK1 三个保守结构域, 其二级结构、三维结构与人的 *ACVR1* 极为相似。水牛的 *ACVR1* 与普通牛、野牦牛、人和猪等 8 个物种的 *ACVR1* 氨基酸序列间一致性 $\geq 99\%$ 。在所检测的水牛 9 个组织中, *ACVR1* 基因在肝脏、脾脏、肾、瘤胃、卵巢、子宫和睾丸中均表达, 其中在卵巢和子宫中表达水平最高。【结论】水牛的 *ACVR1* 与其他物种的 *ACVR1* 具有相近的氨基酸组成和结构特征, 其作为 BMP、AMH 信号通路的 I 型共享受体, 可能参与了水牛的细胞分化及卵泡形成等调控事件。**关键词:** 槟榔江水牛; *ACVR1* 基因; 理化特性; 生物信息学分析; 基因表达谱

中图分类号: S 823.832

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 02-0247-08

Isolation and Identification of *ACVR1* Gene and Its Expression Profile in Binglangjiang Buffalo

YANG Yun¹, ZHANG Zifang¹, JIANG Mingxing², QIAN Lindong¹, HU Yu²,
HA Fu², MIAO Yongwang²

(1. Faculty of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Yunnan Vocational and Technical College of

Agricultural, Kunming 650212, China; 2. Faculty of Animal Science and Technology,

Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] *ACVR1*, as one of the type I receptors of some members of TGF- β super-family signaling pathways, plays an important role in the regulatory events such as organ formation, cell differentiation and follicle formation. Up to now, the studies on *ACVR1* gene mainly focuses on human, and the research on this gene in water buffalo has not been reported yet. [Methods] In this

收稿日期: 2018-02-19

修回日期: 2018-05-08

网络出版时间: 2019-01-21

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460582, 31760659); 云南省应用基础研究重点项目 (2014FA032, 2007C0003Z)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。杨云 (1963—), 男, 云南通海人, 学士, 副教授, 主要从事动物医学教学和科研工作。E-mail: 939854460@qq.com; 张自芳 (1970—), 女, 云南泸西人, 硕士, 副教授, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: qld721213@126.com

**通信作者 Corresponding authors: 哈福 (1974—), 男, 宁夏银川人, 博士, 副教授, 主要从事动物科学研究。E-mail: 119272386@qq.com; 苗永旺 (1964—), 男, 内蒙古通辽人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: yongwangmiao1@126.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201802017](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201802017)

study, the coding region of *ACVR1* gene of Binglangjiang buffalo was isolated and identified by RT-PCR method, and the gene was then subjected to analysis of functional bioinformatics and gene expression profiling. [**Results**] The full coding region of buffalo *ACVR1* gene is 1 530 bp in length, which encodes a polypeptide consisting of 509 amino acid residues. Buffalo ACVR1 is a weakly hydrophilic protein containing a signal peptide and transmembrane region located on the plasma membrane. Structurally, buffalo ACVR1 contains three conserved domains of Activin_recpt, TGF_beta_GS and STKc_ACVR1_ALK1. The secondary structure, three-dimensional structure of this protein are very similar to human ACVR1. The consistency of ACVR1 amino acid sequences between buffalo and 8 other common species such as cattle, wild yak, human and pig was $\geq 99\%$. Among the 9 buffalo tissues assayed, the *ACVR1* gene was expressed in the liver, spleen, kidney, rumen, ovary, uterus and testes with that the highest expression in the ovary and uterus. [**Conclusion**] The buffalo ACVR1 has similar amino acid composition and structural characteristics with that of other species. As one of type I receptor shared by BMP and AMH signaling pathway, ACVR1 may be involved in the regulation of buffalo cell differentiation and follicular formation.

Keywords: Binglangjiang buffalo; *ACVR1* gene; physicochemical properties; bioinformatics analysis; gene expression profile

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族在哺乳动物的形态发生、器官形成和细胞分化及卵泡形成的调控事件中扮演重要角色^[1]。在 TGF- β 超家族中, 骨形态发生蛋白 (bone morphogenic protein, BMP) 已发现有 20 个成员, 构成了其最大的配体亚家族^[1]。激活素 A 受体 1 型 (Activin A Receptor Type 1, ACVR1) 蛋白, 又名激活素受体样激酶 2 (activin receptor-like kinase-2, ALK-2), 是 BMP 信号通路中与 BMP 相互作用的两类跨膜丝氨酸-苏氨酸激酶受体之一^[1-2]。人的 ACVR1 是一种由 *ACVR1* 基因编码的跨膜受体蛋白, 在 BMP 信号通路中发挥重要作用, 其负责骨骼系统的发育和修复^[3-5]。在人类中这个基因的 1 个杂合突变 (617G>A; R206H) 与进行性肌肉骨化症 (fibrodysplasia ossificans progressiva, FOP) 相关联; FOP 是一种常染色体显性遗传病, 表现为结缔组织功能失调, 以整个身体形成异位性骨骼为特征^[3-6]。存在于体细胞和/或卵母细胞中的 BMP/AMH (抗缪勒氏激素, anti-mullerian hormone, AMH) 信号系统近年已被认为是原始卵泡募集的负调控 (AMH) 或正调控 (BMP4 和 BMP7) 路径^[7-8]。ACVR1 作为 AMH/BMP 信号通路共享的 I 型受体之一, 在 BMP/AMH 信号路径中发挥重要作用^[9-10], 推测其参与了卵泡发育过程。

迄今, 有关 *ACVR1* 基因的研究主要集中在人上, 在其他动物上的研究报道较少。人类 *ACVR1* 基因含有 11 个外显子, 基因序列长 139, 417 bp, 定位于染色体 2q24.1^[2]。在猪上有报道 *ACVR1* 基因与腹壁骨化症有关^[11]; ZHAO 等^[12]报道 *ACVR1* 基因与猪的肌肉生成相关。在鸡上, 王文浩等^[13]报道 *ACVR1* 基因可能对京海黄鸡的产蛋和发育有一定的影响。NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 已发表的数据显示: 普通牛 *ACVR1* 基因定位于 2 号染色体, 包含 10 个外显子和 9 个内含子, 其编码区全长 1 530 bp, 编码 509 个氨基酸。

水牛是热带和亚热带地区具有重要经济价值的家养动物。近年由于高档乳制品的市场拉动, 世界水牛乳业得到了高速发展, 水牛奶已经成为世界第二大奶源^[14]。水牛具有隐性发情或不规则发情等特点, 繁殖率偏低^[15]; 同时, 水牛用于产奶可能会遇到普通奶牛中出现的骨病问题。目前, 对水牛 *ACVR1* 基因的研究尚未见报道, 因此, 开展水牛 *ACVR1* 基因的研究, 对于了解水牛异常的骨骼发育及繁殖性状的遗传基础具有重要意义。本研究以中国首例本土河流型奶用水牛——槟榔江水牛为研究对象, 对水牛 *ACVR1* 基因进行了分离鉴定及功能生物信息学和表达谱分析, 以期揭示槟榔江水牛 *ACVR1* 基因的理化特

性和生物学功能,为水牛 *ACVR1* 基因的功能及其参与的信号路径的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

用于基因分离克隆的样品采自云南腾冲市,包括2头成年雄性和2头成年雌性健康槟榔江水牛,且它们相互之间无直接血缘关系,每头牛分别取瘤胃、肾脏、心脏、肝脏、肺脏、脾脏、睾丸、卵巢和子宫组织样品,迅速置于液氮中运回实验室,转存于-80℃冰箱保存。

1.2 总RNA的提取和cDNA的合成

采用RNA提取试剂盒(RNAiso Plus, Takara, 中国大连)提取各种组织样品总RNA。经完整性和纯度检测,然后使用Oligo(dT)₁₈ (500 μg/mL)和逆转录酶试剂盒(M-MLV, Invitrogen)合成各种组织cDNA第1链。将合成的cDNA母液用TE缓冲液稀释成50 ng/μL工作液,于4℃保存备用。

1.3 引物设计与合成

根据NCBI数据库已公布的普通牛 *ACVR1* 基因序列(NM_176663.3),采用Primer 5.0软件设计用于扩增水牛 *ACVR1* 基因完整编码区及用于该基因表达谱分析的引物,并以水牛 *18S* 基因序列(JN412502)设计内参基因PCR引物,送昆明硕擎生物科技有限公司合成(表1)。

1.4 基因克隆

基因克隆采用的PCR体系为25 μL,包含10×Buffer (Mg²⁺ 15 mmol/mL) 4 μL,上、下游引物(10 μmol/μL)各0.7 μL, dNTP (2.5 mmol/mL) 2 μL, rTaq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL(购自大连TaKaRa), DNA模板2 μL(约100 ng), ddH₂O补至25 μL。

PCR程序: 95℃预变性5 min, 94℃变性30 s→退火30 s→72℃延伸2 min, 30个循环, 72℃后延伸10 min, 4℃终止反应。

PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测效果,扩增效果好的PCR产物送昆明硕擎生物科技有限公司进行双向测序。

1.5 功能生物信息学分析

ACVR1 基因测序原始数据采用Lasergene软件包(DNAstar Inc.)进行核对,得到其cDNA序列,经ORF Finder程序(<http://www.ncbi.nlm.gov/gorf/>)确定开放阅读框(open reading frame, ORF),并翻译成蛋白序列。水牛 *ACVR1* 基因采用NCBI数据库BLAST程序进行鉴定。水牛 *ACVR1* 相对分子质量和等电点、疏水性、跨膜区和信号肽采用在线软件Compute pI/Mw tool、ProtParam tool、ProtScale、TMHMM server 2.0和SignalP 4.1 Server进行预测分析;采用ProtComp 9.0进行 *ACVR1* 的亚细胞定位;利用SOPMA在线程序预测蛋白质的二级结构;通过NCBI数据库预测蛋白质的保守结构域;基于同源建模法利用SWISS-MODEL在线服务器预测 *ACVR1* 的三维结构。

1.6 表达谱分析

采用半定量PCR方法对槟榔江水牛瘤胃、肾、心脏、肝脏、肺、脾脏、睾丸、卵巢和子宫等9个组织作表达谱分析,并以 *18S rRNA* 基因作为内参对照。

PCR反应体系为25 μL: 10×Buffer (Mg²⁺ 15 mmol/mL) 2.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/μL)各0.5 μL, dNTP (各2.5 mmol/mL) 2 μL, rTaq DNA聚合酶0.25 μL (5 U/μL)(TaKaRa, 中国大连), cDNA模板2 μL(约100 ng), ddH₂O补至25 μL。

表1 引物信息

Tab. 1 The information of primers

引物名称 primer name	扩增区域 amplification region	引物序列(5'→3') primer sequence	产物长度/bp products length	退火温度/℃ T _m	备注 note
ACVR1_F ACVR1_R	CDS 区	F: GAGTGCCTCTCCCACCGCTA R: CCCCAGCACACAGCCGAGT	1 792	60	基因克隆
Acvr1_bdF Acvr1_bdR	CDS 区	F: CGCAATCAAGAACGCCTCAAC R: TCCACACCTCGCCATACCTG	217	56	组织表达谱
<i>18S rRNA</i> (JN412502)	<i>18S rRNA</i>	F: GGACATCTAAGGGCATCACAG R: AATTCCGATAACGAACGAGACT	145	55	组织表达内参

扩增程序: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s→退火 30 s→72 °C 延伸 40 s, 30 个循环, 72 °C 后延伸 5 min, 4 °C 终止反应。

PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 利用 Quantity One 软件对组织表达谱检测胶图进行分析, 得出表达量数据, 然后采用 Excel 软件构建基因表达谱柱状图。

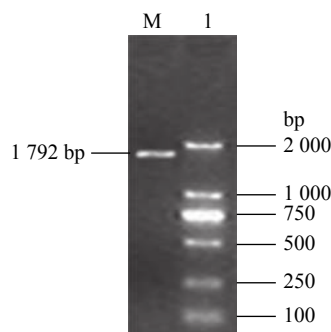
2 结果与分析

2.1 *ACVR1* 基因分离与鉴定

经 RT-PCR 获得目的条带 1 792 bp, 且清晰无杂带 (图 1)。经测序获得 *ACVR1* 基因 cDNA 序列。

所得核苷酸序列经采用 OFR finder 程序预测, 获得目的基因最长开放阅读框为 1 530 bp, 编码 509 个氨基酸 (图 2)。经在 NCBI 数据库中同源搜索, 发现该编码序列与普通牛 (*Bos taurus*) *ACVR1* 基因编码区序列 (NM_176663) 长度一

致, 一致性为 99%, 确定其为水牛 *ACVR1* 基因序列。将获得的水牛 *ACVR1* 基因 CDS 区序列提交至 NCBI 数据库, 获得核苷酸序列登录号为 KF312881.1 (相应的氨基酸序列登录号为 AHL24689.1)。



注: M. DL2000 分子量标准; 1. 水牛 *ACVR1* 基因 RT-PCR 产物。

Note: M. DL2000 marker; 1. RT-PCR product of buffalo gene.

图 1 槟榔江水牛 *ACVR1* 基因 RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR product of Binglangjiang buffalo *ACVR1* gene

```

1 ATGGTGGATGGAGTGATGATTCTTCCTGTGCTCGTGATGATTGCTTTCCCTTCCCTAGTATGGAAGATGAGAAGCCCAAGGTAAACCCC
1 [M V D G V M I L P V L V M I A F P S P S M E] D E K P K V N P
91 AAGCTTTACATGTGTGTGTCGAAGGCCTCTCCTGTGGGGATGAGGCCCACTGTGAAGGCCAGCAGTGTCTTCTCGCTGAGCATAAAC
31 K L Y M C V C E G L S C G D E A H C E G Q Q C F S S L S I N
181 GATGGCTTCCACGTCTACCAGAAAGGCTGCTTCCAGGTCTACGAGCAGGGGAAGATGACCTGTAAGACCCCGCCGTACCTGGCCAGGCT
61 D G F H V Y Q K G C F Q V Y E Q G K M T C K T P P S P G Q A
271 GTGGAGTGTGCCAAGGGGACTGGTGAACAGGAACATCAGGCCCACTGCCTACTAAAGGAAATCTTTCTGGAACACAGAATTC
91 V E C C Q Q G D W C N R N I T A Q L P T K G K S F P G T Q N F
361 CACTTGGAGGTTGGCCTCATCATTTTGTCTGTAGTGTTCGAGTATGCCTTCTAGCCTGCCTATTGGGAGTCGCTCTCCGAAATTTAAA
121 H L E V G L I I L S V V F A V C L L A C L L G V A L R K F K
451 AGGCGCAATCAAGAAGCCTCAACCCAGAGATGTGGAATATGGCACCATCGAAGGGCTCATCACCACCAAGTTGGAGACAGCACTTTA
151 R R N Q E R L N P R D V E Y G T I E G L I T T N V G D S T L
541 GCAGATTTATTGGATCATTCTGTACGTGGGAAGCGGCTCTGGTCTTCTTTCTGGTACAGAGAAGAGTGGCCCGTCAGATCAGACTG
181 A D L L D H S C T S G S G S G L P F L V Q R T V A R Q I T L
631 CTGAGTGTGTTGGGAAAGCAGGTATGGCGAGGTGTGGAGGGGAGTGGCAAGGGGAGAAGCTCGCTGTGAAGATCTTTCTCCCGG
211 L E C V G K G R Y G E V W R G S W Q G E N V A V K I F S S R
721 GATGAGAAGTCGTGGTTTGGGAAACAGAAATGTACAACACTGTGATGCTGAGGCATGAAAATATCTTAGGTTTCAGTTCAGACATG
241 D E K S W F R E T E L Y N T V M L R H E N I L G F I A S D M
811 ACATCAAGACACTCCAGCACACAGTTGTGGTTGATCACACATTATCATGAAATGGGATCGCTGTACGACTACCTTCAGCTTACTACTCTG
271 T S R H S S T Q L W L I T H Y H E M G S L Y D Y L Q L T T L
901 GATACAGTGAAGTGCCTGAGAATAGTGTCTCCATAGCTAGCGGTCTCGCACATTGACATAGAGATCTTTGGGACCAAGGGAACCG
301 D T V S C L R I V L S I A S G L A H L H I E I F G T Q G K P
991 GCCATTGCTCACCAGATCTAAAAAGCAAAACATCTGGTTAAGAAGAATGGACAGTGTTCATAGCAGATTGGGCTGGCAGTCATG
331 A I A H R D L K S K N I L V K K N G Q C C I A D L G L A V M
1081 CATTCCAGAGCACCAATCAGTCGATGTGGGAACAACCCCGTGTGGGCACCAACGCTACATGGCCCCGAAGTTCTCGATGAACT
361 H S Q S T N Q L D V G N N P R V G T K R Y M A P E V L D E T
1171 ATCCAGGTGGATTGTTTGTATTCTTACAAGAGAGTCGATATTTGGGCCTTTGGACTTGTCTTGTGGGAGGTGGCCAGGCGGATGGTGAGC
391 I Q V D C F D S Y K R V D I W A F G L V L W E V A R R M V S
1261 AATGGTATTGTGGAGGATTACAAGCCACCATCTATGATGTGGTTCCCAATGACCCAAGTTTGAAGATAGAGGAAGGTAGTCTGTGTG
421 N G I V E D Y K P P F Y D V V P N D P S F E D M R K V V C V
1351 GATCAACAGAGGCCTAACATACCCAACAGATGGTCTCTGACCCGACATTAACCTCCCTGGCCAAGCTGATGAAAAGATGCTGGTATCAA
451 D Q Q R P N I P N R W F S D P T L T S L A K L M K E C W Y Q
1441 AATCCATCTGCCAGACTCACAGCCTCGTATCAAAAAGACTTTGACCAAAATTGATAATCCCTAGACAAATTGAAAAGTACTGTTGA
481 N P S A R L T A L R I K K T L T K I D N S L D K L K T D C *

```

注: 信号肽用方框框出, 阴影区域为保守结构域: Activin_recp (33~103AA), TGF_beta_GS (179~206AA), STKc_ACVR1_ALK1 (202~499AA); 高度保守的 GSGSGLP 标签画线标出; “*”表示终止密码子。

Note: Signal peptide sequence is marked by a box. The domains of the ACVR1 that included Activin_recp (33~103AA), TGF_beta_GS (179~206AA) and STKc_ACVR1_ALK1 (202~499AA) are highlighted as shaded regions; highly conserved GSGSGLP signature is underlined; the stop codon is indicated by*.

图 2 槟榔江水牛 *ACVR1* 基因 CDS 区序列及对应的氨基酸序列

Fig. 2 Complete CDS of Binglangjiang buffalo *ACVR1* gene and its encoded amino acid sequence

通过 NCBI-BLAST 比对发现: 已公布的水牛基因没有与该基因 CDS 区序列高度相似的序列, 表明 *ACVR1* 基因在水牛中尚未被克隆。槟榔江水牛 *ACVR1* 基因 CDS 区 A、G、T 和 C 的碱基组成分别为 26.01%、26.41%、24.58% 和 23.01%, CG 含量为 49.42%。

2.2 水牛 ACVR1 基本理化特征

预测的槟榔江水牛 *ACVR1* 的基本理化特征(表 2)与普通牛(*Bos taurus*, NP_788836)的 *ACVR1* 完全一致。水牛 *ACVR1* 亲水性平均值 (GRAVY) 为-0.172, 表明水牛 *ACVR1* 属于弱亲水性的蛋白质。该蛋白第 131AA 残基处有最大疏水值 (3.244), 第 151~152AA 残基处有最大亲水值 (-3.222)。

表 2 槟榔江水牛 *ACVR1* 的基本理化特征
Tab. 2 Basic physical and chemical characteristics of Binglangjiang buffalo *ACVR1*

基本理化特征 basic physical and chemical properties	预测结果 predicted results
编码的氨基酸数 number of amino acids	509
等电点 isoelectric point (PI)	7.12
分子量/ku molecular weight	57.13
强酸性氨基酸残基 strongly acidic amino acids (D, E)	55
强碱性氨基酸残基 strongly basic amino acids (K, R)	55
疏水性氨基酸 hydrophobic amino acids (A, I, L, F, W, V)	169
极性氨基酸 polar amino acids (N, C, Q, S, T, Y)	146
分子式 formula	C ₂₅₂₆ H ₃₉₉₆ N ₆₉₄ O ₇₄₅ S ₃₅
不稳定系数 instability index (II)	44.03
平均疏水性 grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.172
脂肪系数 aliphatic index (AI)	87.6

2.3 ACVR1 的细胞定位与结构特征

亚细胞定位分析表明: 槟榔江水牛 *ACVR1* 定位在细胞膜上 (可能性为 100%), 其 N-端具有

信号肽序列, 切割位点位于第 22 和第 23 氨基酸残基之间, 成熟肽由之后的 487 个氨基酸残基构成。预测其具有 1 个跨膜结构域, 该蛋白第 1~123AA 残基属于胞外区, 第 124~146AA 残基属于跨膜区, 其第 147~509AA 残基属于胞内区 (图 3)。

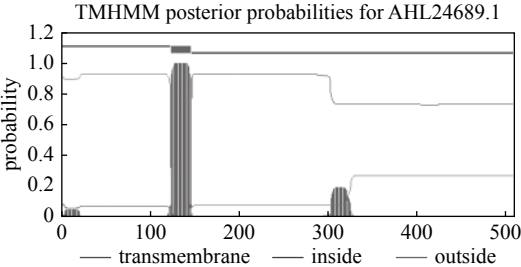


图 3 槟榔江水牛 *ACVR1* 跨膜结构域分析
Fig. 3 Predicted transmembrane helices of Binglangjiang buffalo *ACVR1*

槟榔江水牛 *ACVR1* 在第 33~103AA 残基处含有 1 个 Activin_rec 结构域, 在第 179~206AA 残基处还含有 1 个 TGF_beta_GS 结构域, 在第 202~499AA 残基处含有 1 个 STKc_ACVR1_ALK1 结构域 (图 2、图 4)。

二级结构预测表明: 水牛 *ACVR1* 包含 32.22% 的 α 螺旋、34.77% 的无规卷曲、24.56% 的伸展链和 8.45% 的 β 转折 (图 5)。水牛该蛋白二级结构与普通牛 *ACVR1* (NP_788836.2) 的二级结构组成完全一致, 与人的 *ACVR1* (NP_001096) 基本一致 (含 33.01% 的 α 螺旋、34.97% 的无规卷曲、23.97% 的伸展链和 8.06% 的 β 转折)。基于同源建模方法构建的水牛 *ACVR1* 三维结构见图 6。槟榔江水牛 *ACVR1* 与人 *ACVR1* 模板 (4c02.1.A) 有 100% 的序列一致性。

2.4 序列一致性与系统树构建

将槟榔江水牛 *ACVR1* 序列输入 NCBI 数据库进行 BLAST 同源搜索, 得到下列常见物种的同源序列: 普通牛 (*Bos taurus*, NP_788836)、野牦牛 (*Bos mutus*, XP_005906436)、绵羊 (*Ovis aries*,

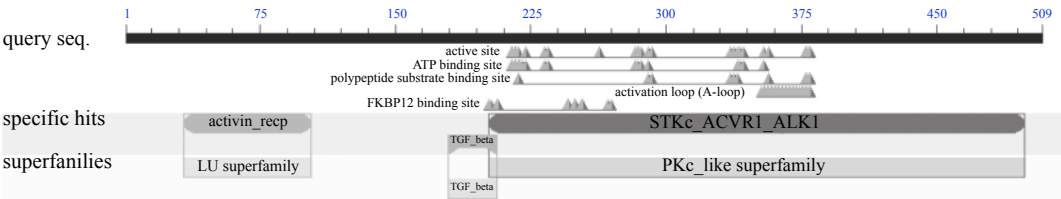
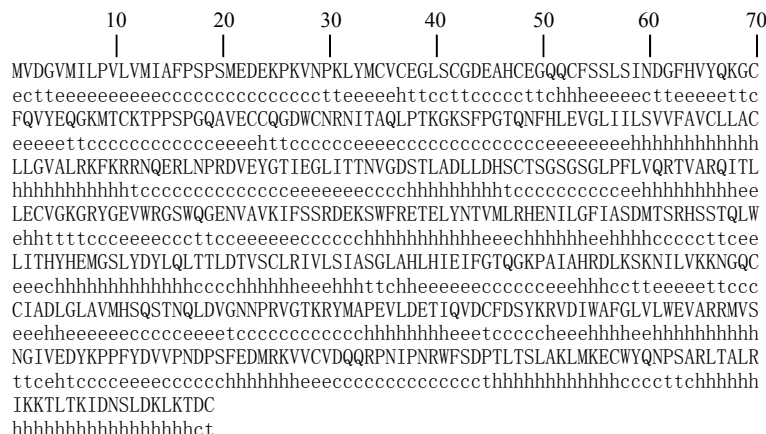


图 4 槟榔江水牛 *ACVR1* 的保守结构域
Fig. 4 Putative conserved domain of Binglangjiang buffalo *ACVR1*



注：二级结构分布列于 ACVR1 氨基酸序列的下面。c. 无规卷曲；h. α 螺旋；e. 伸展链；t. β 转折。

Note: Predicted secondary structure is shown in single letter below the amino acid sequence. c. random coil; h. alpha helix; e. extended strand; t. beta turn.

图 5 槟榔江水牛 ACVR1 的二级结构

Fig. 5 Secondary structure of the ACVR1 in Binglangjiang buffalo

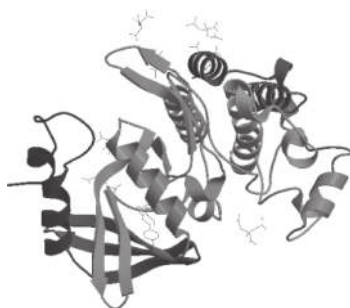


图 6 槟榔江水牛 ACVR1 成熟肽的三级结构

Fig. 6 Tertiary structure of the mature peptide of Binglangjiang buffalo ACVR1

XP_004004730)、人 (*Homo sapiens*, NP_001096)、猪 (*Sus scrofa*, XP_001927833)、家马 (*Equus caballus*, XP_001491599)、野骆驼 (*Camelus ferus*, XP_006176838)、单峰驼 (*Camelus dromedarius*, XP_010983904)、小鼠 (*Mus musculus*, NP_031420) 和褐家鼠 (*Rattus norvegicus*, NP_077812)。水牛与上述物种序列的一致性分别为 100%、99%、99%、99%、99%、99%、99%、99%、98% 和 97%。各物种 ACVR1 氨基酸序列具有较高的保守性，特别是在 70~509AA 残基处更为保守。

基于以上物种氨基酸序列，构建槟榔江水牛及其他 10 个物种间的 NJ-系统树以揭示各物种间的进化关系和 ACVR1 功能上的相似性，结果表明：牛科物种中水牛、牦牛和普通牛之间聚在一起，且有较高的支持率 (87%) (图 7)。

2.5 组织表达谱分析

采用半定量 RT-PCR 方法对槟榔江水牛 ACVR1 基因组织表达进行检测 (图 8)。结果表明：在所

检测的水牛 9 个组织中，ACVR1 基因在肝脏、脾脏、肾、瘤胃、卵巢、子宫和睾丸中均表达，在卵巢和子宫中表达量最高，但在心脏和肺中几乎不表达。

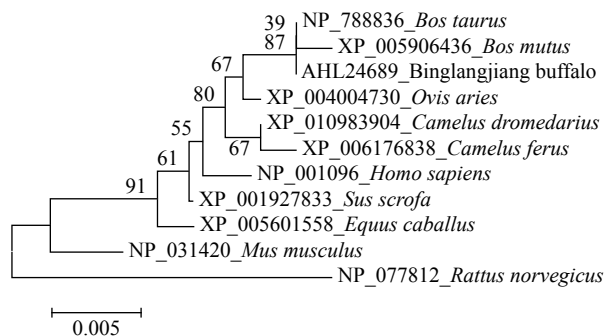
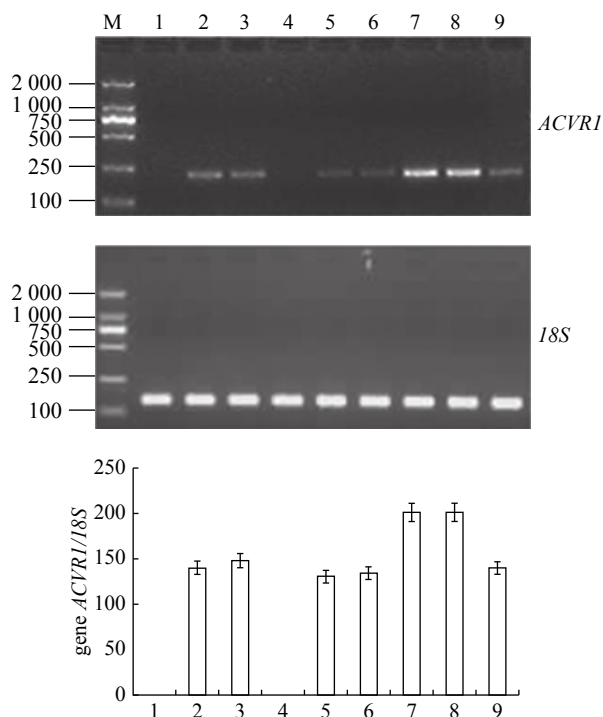


图 7 槟榔江水牛 ACVR1 基因组织表达谱

Fig. 7 Tissue expression profile of the ACVR1 gene in Binglangjiang buffalo

3 讨论

通过 RT-PCR 扩增测序，本研究获得了槟榔江水牛 ACVR1 基因的编码区序列。槟榔江水牛该基因编码区序列长为 1 530 bp，与普通牛 ACVR1 基因编码区序列长度相同，一致性为 99%。该基因编码 1 个由 509 个氨基酸残基构成的多肽，其 N-端 22 肽为信号肽。生物信息学分析显示：水牛 ACVR1 为弱亲水性蛋白，含有 1 个跨膜区，定位在质膜上；在结构上，水牛 ACVR1 含有 Activin_recp、TGF_beta_GS 和 STKc_ACVR1_ALK1 三个保守结构域，其二级结构与普通牛的完全一致，与人的 ACVR1 极为相似；



注: 18S 表达作为内参。M. DL2000 DNA marker。1.心脏; 2.肝脏; 3.脾脏; 4.肺; 5.肾; 6.瘤胃; 7.卵巢; 8.子宫; 9.睾丸。

Note: The 18S expression served as an internal control. M. DL2000 DNA Marker; 1. heart; 2. liver; 3. spleen; 4. lung; 5. kidney; 6. rumen; 7. uterus; 8. ovary; 9. testis.

图8 槟榔江水牛 *ACVR1* 基因组织表达谱

Fig. 8 Tissue expression profile of the *ACVR1* gene in Binglangjiang buffalo

其三维结构与人 *ACVR1* 模板 (4c02.1.A) 有 100% 的序列一致性。经氨基酸序列比对发现: 水牛与普通牛、野牦牛、人和猪等 8 个物种 *ACVR1* 序列一致性为 99%。以上进一步确证本研究所分离的基因为水牛 *ACVR1* 基因, 水牛 *ACVR1* 与其他物种的 *ACVR1* 的理化性质和结构特征基本一致, 揭示水牛与其他物种 *ACVR1* 功能的一致性。物种间序列比对表明: *ACVR1* 序列具有高度的保守性。在系统树上, 水牛与普通牛、野牦牛和绵羊聚在一起, 表明水牛的 *ACVR1* 与其他牛科物种的在功能上更接近。

ACVR1 基因编码产物是活化素 I 型受体蛋白, 该蛋白是 BMP 路径信号传递所必需的, 被磷酸化和激活的 *ACVR1* 触发了 BMP 信号路径中的下游事件^[1-2]。在 *ACVR1* 含有的 3 个保守的结构域中, *Activin_recp* 结构域为亲水性的富含 Cys 的结构域, 位于细胞膜外, 负责与配体的特异性结合^[2, 16]; *TGF_beta_GS* 结构域含有 1 个高度保守的 *GSGSGLP* 序列标签, 是调节细胞生长

和分化的 I 型 TGF- β 中都具有的结构域, 位于跨膜区^[2, 17]; *STKc_ACVR1_ALK1* 结构域位于胞内, 负责催化 γ -磷酸基从 ATP 转移到底物蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基上, 为丝氨酸/苏氨酸激酶的催化结构域^[2, 18-19]。近年研究发现 *ACVR1* 第 206 位的组氨酸被精氨酸取代导致了人的 FOP 症的发生, 原因是该突变发生在关键的 *STKc_ACVR1_ALK1* 结构域处, 导致了 *ACVR1* 发生功能改变, 进而使 BMP 信号路径在不应该触发的时候发动, 导致骨头在整个身体的软组织中形成, 引起人的 FOP 症^[5, 20]。此外, 多项研究证据显示: 包括 TGF- β 超家族成员在内的各种肽生长因子在不同的发育阶段由卵母细胞、颗粒细胞和卵泡膜细胞表达产生, 它们为卵泡内调控分子, 参与卵泡募集、颗粒细胞和卵泡膜细胞增殖/闭锁、类固醇生成、卵母细胞成熟、排卵和黄体化等过程^[1]。属于 TGF- β 超家族的 BMP 和 AMH 是在早期和晚期卵泡发育中起重要作用的卵巢内生长因子^[21]。BMP/AMH 信号系统已被确认为原始卵泡募集的负调控 (AMH) 或正调控 (BMP4 和 BMP7) 路径^[7-8]。*ACVR1* 作为该信号系统共享的 I 型受体之一, 在 BMP/AMH 信号路径中发挥重要作用^[9-10]。KEVENAAR 等^[22]研究发现 *ACVR1* 基因内的 SNP 位点与人的多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS)、女性的 AMH 水平和卵泡数相关, 揭示 *ACVR1* 的信号传递与 PCOS 患者的紊乱卵泡形成有密切关系。本研究水牛的 *ACVR1* 序列也含有上述 3 个保守结构域, 与人的一致性较高, 特别是 *TGF_beta_GS* 和 *STKc_ACVR1_ALK* 两个结构域与人的序列完全一致。这表明水牛的 *ACVR1* 在功能上与人的 *ACVR1* 极为相似, 推测其可能参与了水牛 BMP、AMH 路径信号传递, 进而在水牛骨形态发生、细胞分化及卵泡形成等调控事件中发挥重要作用。至于在人中发现的 R206H 替换或其他类型的氨基酸替换, 在水牛中是否存在及其对水牛骨骼及卵泡发育的影响, 需进一步做大样本深入研究才能确定。

以往研究表明: *ACVR1* 基因在一些组织的实质细胞、内皮细胞、成纤维细胞及肿瘤来源的上皮细胞中广泛表达, 其在人体各种组织中也表现为广泛的组织表达模式^[2]。本研究表明该基因在水牛的肝、脾、肾、瘤胃、卵巢、子宫和睾丸等

组织中均表达, 揭示该基因在水牛这些组织中发挥功能作用。该基因在卵巢和子宫中表达量最高, 推测水牛 *ACVR1* 基因对水牛卵泡和胚胎的发育具有重要作用。

[参考文献]

- [1] FATEHI A N, VAN DEN HURK R, COLENBRANDER B, et al. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development[J]. *Theriogenology*, 2005, 63(3): 872. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2004.05.013](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.013).
- [2] CLÁUDIA A S. ACVR1-activin A receptor, type I[J]. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 2013, 17(10): 670. DOI: [10.4267/2042/51532](https://doi.org/10.4267/2042/51532).
- [3] SHORE E M, XU M Q, FELDMAN G J, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva[J]. *Nature Genetics*, 2006, 38(5): 525. DOI: [10.1038/ng1783](https://doi.org/10.1038/ng1783).
- [4] DANDARA C, SCOTT C, URBAN M, et al. Confirmation of the recurrent ACVR1 617G>A mutation in South Africans with fibrodysplasia ossificans progressiva[J]. *South African Medical Journal*, 2012, 102(7): 631. DOI: [10.7196/SAMJ.5519](https://doi.org/10.7196/SAMJ.5519).
- [5] PIGNOLO R J, SHORE E M, KAPLAN F S. Fibrodysplasia ossificans progressiva: diagnosis, management, and therapeutic horizons[J]. *Pediatric Endocrinology Reviews*: PER, 2013, 10(S2): 437.
- [6] ERESEN YAZICIOĞLU C, KARATOSUN V, KIZILDAĞ S, et al. *ACVR1* gene mutations in four Turkish patients diagnosed as fibrodysplasia ossificans progressiva[J]. *Gene*, 2013, 515(2): 444. DOI: [10.1016/j.gene.2012.12.005](https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.005).
- [7] ERICKSON G F, SHIMASAKI S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, 1(1): 9.
- [8] NILSSON E E, SKINNER M K. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 69(4): 1265. DOI: [10.1095/biolreprod.103.018671](https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018671).
- [9] VISSER J A. AMH signaling: from receptor to target gene[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2003, 211(1/2): 65.
- [10] DI CLEMENTE N, JOSSO N, GOUÉDARD L, et al. Components of the anti-Müllerian hormone signaling pathway in gonads[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2003, 211(1/2): 9.
- [11] 高先栋. 猪腹壁(腹膜)骨化症初报[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(3): 177. DOI: [10.3969/j.issn.1672-5190.2010.03.088](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-5190.2010.03.088).
- [12] ZHAO X, MO D L, LI A N, et al. Comparative analyses by sequencing of transcriptomes during skeletal muscle development between pig breeds differing in muscle growth rate and fatness[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19774. DOI: [10.1371/journal.pone.0019774](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019774).
- [13] 王文浩, 王金玉, 张跟喜, 等. *ACVR1* 基因对京海黄鸡生长和繁殖性状的遗传效应研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(7): 70. DOI: [10.3969/j.issn.1671-7236.2012.07.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-7236.2012.07.016).
- [14] MICHELIZZI V N, DODSON M V, PAN Z A, et al. Water buffalo genome science comes of age[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2010, 6(4): 333.
- [15] 哈福, 李大林, 袁跃云, 等. 牛物种 *FSHB* 基因外显子 1 和外显子 2 遗传特征分析[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2013, 28(1): 61. DOI: [10.3969/j.issn.1004-390X\(n\).2013.01.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-390X(n).2013.01.011).
- [16] KINGSLEY D M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms[J]. *Genes & Development*, 1994, 8(2): 133.
- [17] FENG X H, DERYNCK R. A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity[J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(13): 3912. DOI: [10.1093/emboj/16.13.3912](https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3912).
- [18] KAPLAN F S, PIGNOLO R J, SHORE E M. The FOP metamorphogene encodes a novel type I receptor that dysregulates BMP signaling[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20(5/6): 399. DOI: [10.1016/j.cytogfr.2009.10.006](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.006).
- [19] KAPLAN F S, SHEN Q, LOUNEV V, et al. Skeletal metamorphosis in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)[J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2008, 26(6): 521. DOI: [10.1007/s00774-008-0879-8](https://doi.org/10.1007/s00774-008-0879-8).
- [20] VAN DINTHER M, VISSER N, DE GORTER D J, et al. ALK2 R206H mutation linked to fibrodysplasia ossificans progressiva confers constitutive activity to the BMP type I receptor and sensitizes mesenchymal cells to BMP-induced osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010, 25(6): 1208. DOI: [10.1359/jbmr.091110](https://doi.org/10.1359/jbmr.091110).
- [21] SHIMASAKI S, MOORE R K, OTSUKA F, et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction[J]. *Endocrine Reviews*, 2004, 25(1): 72. DOI: [10.1210/er.2003-0007](https://doi.org/10.1210/er.2003-0007).
- [22] KEVENAAR M E, THEMME A P, VAN KERKWIJK A J, et al. Variants in the *ACVR1* gene are associated with AMH levels in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Human Reproduction*, 2009, 24(1): 241. DOI: [10.1093/humrep/den353](https://doi.org/10.1093/humrep/den353).

责任编辑: 何承刚