

DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202008072](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202008072)

鸡 *TNNI2* 基因的真核表达载体构建及 功能生物信息学分析*

李金炜¹, 史洪岩², 谭 茗¹, 张杉杉¹, 张伟伟¹,
官晓庆¹, 夏靖秋¹, 孙婴宁^{1**}

(1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000;

2. 北京市密云区农业农村局, 北京 101500)

摘要:【目的】构建鸡快骨骼肌亚型肌钙蛋白 I 基因 (fast skeletal muscle troponin I, *TNNI2*) 的真核表达载体, 并在永生鸡前脂肪细胞系 (immortalized chicken preadipocyte cell line, ICP1) 细胞中转染和鉴定。【方法】利用 RT-PCR 方法获得鸡 *TNNI2* 基因的全长 CDS 区序列, 采用定向克隆的方法构建该基因的真核表达载体, 并对基因序列进行功能生物信息学分析, 构建系统发育树。【结果】*TNNI2* 基因 ORF 全长 552 bp, 编码 183 个氨基酸, 蛋白质分子量大小为 21.24 ku, 理论等电点 (pI) 为 9.19; fsTnI 蛋白无信号肽和跨膜区, 亚细胞定位于细胞核, 属于亲水性不稳定蛋白质; 磷酸化预测含有 14 个磷酸化位点; 二级结构主要以 α 螺旋的形式存在; 同源性比对结果表明: 不同物种间的 *TNNI2* 基因具有较高的同源性。【结论】本研究成功构建了 *TNNI2* 基因的真核表达载体 pCMV-HA-*TNNI2*, 并成功转染 ICP1 细胞系, 本结果可为进一步研究鸡 *TNNI2* 基因的功能奠定基础。

关键词: 真核表达载体; *TNNI2*; 前脂肪细胞; 生物信息学分析

中图分类号: S 831.2

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 03-0430-08

Constructing Eukaryotic Expression Vector and Functional Bioinformatics Analysis of Chicken *TNNI2* Gene

LI Jinwei¹, SHI Hongyan², TAN Ming¹, ZHANG Shanshan¹, ZHANG Weiwei¹,
GONG Xiaoqing¹, XIA Jingqiu¹, SUN Yingning¹

(1. College of Life Science and Agriculture Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161000, China;

2. Miyun District Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Beijing Municipality, Beijing 101500, China)

Abstract: [Purpose] To construct the eukaryotic expression vector of fast skeletal muscle troponin I (*TNNI2*) gene, and to transfect and identify in immortalized chicken preadipocyte cell line (ICP1). [Methods] The RT-PCR was used to clone the whole length of CDS sequence of chicken *TNNI2* gene. The eukaryotic expression vector of *TNNI2* was constructed by one-step cloning method. The functional bioinformatics analysis was applied to construct the phylogeny tree and study the nuc-

收稿日期: 2020-08-31

修回日期: 2021-01-12

网络首发时间: 2021-05-20 10:33:34

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31402061); 黑龙江省自然科学基金项目 (YQ2019C025); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (植物性食品加工技术特色学科专项) (YSTSXX201875)。

作者简介: 李金炜 (1996—), 女, 黑龙江宝清人, 在读硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: ljq2810@163.com

**通信作者 Corresponding author: 孙婴宁 (1981—), 女, 辽宁抚顺人, 博士, 教授, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: SunYN@qqhru.edu.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210520.0844.001.html>



leic acid and the protein of *TNNI2*. [Results] The full-length ORF of *TNNI2* was 552 bp, and it encodes 183 amino acids, the theoretical size of the protein was 21.24 ku, the theoretical isoelectric point (pI) was 9.19. Furthermore, the protein had no transmembrane region and no signal peptide region, and was mainly located in the nucleus. It belongs to hydrophilic protein. The protein contains 14 phosphorylation sites, secondary structure of this protein is mainly composed of α -helix. In addition, the *TNNI2* gene shares highly homology among different species. [Conclusion] We constructed the pCMV-HA-*TNNI2* eukaryotic recombinant vector and transfected it into ICP1 cells successfully, which lays a foundation for further study of *TNNI2* function in chicken.

Keywords: eukaryotic expression vector; *TNNI2*; preadipocyte; bioinformatics analysis

脊椎动物肌钙蛋白 I (troponin I, TnI) 基因有 3 个亚型, 包括 *TNNI1*、*TNNI2* 和 *TNNI3*。其中 *TNNI2* 编码快骨骼肌亚型肌钙蛋白 I (fast skeletal muscle troponin I, fsTnI)^[1]。人们最初认为: *TNNI2* 基因只在肌肉中表达, 参与调节肌肉收缩^[2-3]。随后的研究发现: *TNNI2* 基因在多种组织细胞中表达, 并且发挥重要作用。*TNNI2* 在软骨组织中表达, 该基因编码的蛋白 fsTnI 能够抑制软骨形成^[4]。另外, 在角膜上皮中也检测到 *TNNI2* 基因的表达^[5]。在乳腺癌细胞中, fsTnI 蛋白定位于细胞核, 主要作为雌激素相关受体 α 的活化物来发挥功能^[6]。fsTnI 蛋白在哺乳动物的骨骼和肌肉发育中发挥重要的作用, *TNNI2* 基因的错译突变或缺失是导致远端关节病的重要因素^[7]。在人胃癌组织中检测到 *TNNI2* 基因的表达, 该基因可作为预测胃癌腹膜转移的特异性生物标志物, 有助于对患者病理的监测^[8]。

随着研究的不断深入, 有关 *TNNI2* 的报道已经不仅限于生理学、运动学和临床医学等方面, 对于 *TNNI2* 的研究趋向于农业领域, 该基因对畜禽类肉品产量和肉质方面具有重要影响^[9]。研究发现: *TNNI2* 在牛臀肌中表达量最高, 在幼猪的肱二头肌和咬肌表达中无明显差异^[10-11]。PARK 等^[12]发现: *TNNI2* 在猪、牛和鸡脂肪组织中表达, 提示该基因在畜禽脂肪组织发育过程中可能发挥重要作用。肉鸡体脂 (尤其是腹脂) 积蓄过多是肉鸡产业的突出问题。肥胖会明显降低饲料转化效率, 降低瘦肉对脂肪组织的比例, 还会影响产蛋率、受精率和孵化率^[13-14]。因此控制肉鸡的体脂积蓄, 进一步提高饲料的转化效率是肉鸡行业急需解决的问题。本研究以鸡脂肪组织为试验材料, 成功克隆 *TNNI2* 基因, 构建 *TNNI2* 的真核

表达载体, 并对其进行功能生物信息学分析, 可为 *TNNI2* 在鸡脂肪组织中的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

反转录试剂盒、定向克隆试剂盒、高保真酶和 Lipofectamin™ 2000 转染试剂均购自南京 Vazyme 公司, Trizol 试剂购于大连 TaKaRa 公司, 胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒 (离心柱型) 均购自北京天根生化科技有限公司, pCMV-HA 载体购自美国 Clontech 生物公司, 限制性核酸内切酶购自美国 NEB 生物公司。*Escherichia coli* DH5 α 菌种购自上海生工生物工程股份有限公司, 细胞培养基 D-MEM/F-12 和胰酶均购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Biological Industries 公司; Western-blot 试剂购自 Biosharp 公司, anti-HA 标签抗体购自美国 CST 公司, β -actin 内参抗体购自上海碧云天生物技术有限公司, 二抗购自美国 LI-COR 公司。

1.1.2 试验动物和组织

爱拔益加 (Arbor Acres, AA) 白羽肉鸡购自北京爱拔益加家禽育种有限公司。取 AA 白羽肉鸡腹部脂肪组织 ($n=5$), 冻存于液氮中, 直至提取 RNA。

1.1.3 细胞系

永生化鸡前脂肪细胞系 (immortalized chicken preadipocyte cell line, ICP1) 由东北农业大学农业农村部鸡遗传育种重点实验室惠赠。ICP1 细胞系由该实验室利用带有鸡端粒酶逆转录酶 (chTERT) 基因的逆转录病毒感染鸡原代前脂肪细胞, 而后通过药物筛选培养获得^[15]。鸡前脂肪细胞使用添加 10% 胎牛血清 (Biological Industries) 和 1% 青

霉素—链霉素溶液 (Beyotime) 的 DMEM/F12 培养基 (Gibco), 于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2 细胞转染

转染按照 Lipofectamin™ 2000 转染试剂 (Vazyme) 说明书进行操作, 待 ICP1 细胞系汇合度至 70% 时进行转染。使用无血清培养基分别稀释 Lipofectamin™ 2000 转染试剂与质粒, 用移液器轻轻混匀, 室温静置 5 min。将质粒—无血清培养基混合物滴加到 Lipofectamin™ 2000 转染试剂—无血清培养基混合物中, 用移液器轻轻混匀, 室温静置 10 min 后立即转染。转染 6 h 后更换 1 次培养基, 48 h 后收集细胞。

1.3 提取总 RNA 及反转录

采用 Trizol 法分别提取 AA 白羽肉鸡脂肪组织 (5 只鸡的 RNA 提取后混合) 和 ICP1 细胞系的总 RNA。脂肪组织取 100 mg, ICP1 细胞培养在 6 孔板中, 分别加入 1 mL RNAiso Plus (Takara), 充分裂解后 12 000 r/min 离心 5 min。将上清液转移至新的离心管中, 加入 200 μL 三氯甲烷, 剧烈震荡混匀后置于冰上静置 5 min, 12 000 r/min 离心 15 min。将上清液转移至新的离心管中, 加入与上清液体积相等的异丙醇, 颠倒混匀后置于冰上静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇清洗沉淀, 7 500 r/min 离心 5 min。RNA 沉淀于室温干燥 3 min, 加入 30 μL DEPC-H₂O 溶解 RNA。

反转录按照 HiScript® II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (Vazyme) 说明书进行操作。首先去除基因组的 DNA, 反应体系为: 总 RNA 0.5 μg, 4×gDNA wipe Mix 2 μL, 加入 RNase free ddH₂O, 总体积为 8 μL。上述体系用移液器轻轻吹打混匀, 42 ℃ 2 min。反转录时向上述反应体系中直接加入 5×HiScript® II qRT SuperMix II 2 μL, 用移液器吹打均匀, 25 ℃ 10 min, 50 ℃ 30 min, 85 ℃ 5 min, 置于-20 ℃ 冰箱中保存待用。

1.4 PCR 扩增及纯化

根据 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中的 *TNNI2* (NM_205417.1) 基因序列设计引物。上游引物: 5'-tgccatggaggcccGAATTCGC-AAGATGTCTGATGAAGAGA-3' (下划线表示 *EcoRI* 酶切位点); 下游引物: 5'-gcgccgcggtac-

AGCTCGGGAGAGACCAGTGCTTAGGAC-3' (下划线表示 *XhoI* 酶切位点)。以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 反应体系为: DNA Buffer 25 μL, dNTP 1 μL, cDNA 5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, ddH₂O 14 μL, 1 个活性单位的 *Taq* 酶。反应条件为 95 ℃ 预变性 3 min, 而后进行 35 个循环, 每个循环包括 95 ℃ 15 s, 55 ℃ 15 s 和 72 ℃ 5 min, 最后 4 ℃ 保存。将上述得到的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 将得到的胶条放到紫外灯下观察, 找到与预期结果最相近的条带进行切胶回收。

1.5 连接与转化

胶回收产物使用定向克隆试剂盒 (Vazyme) 克隆到 pCMV-HA 载体的酶切位点上。操作流程为: 用限制性核酸内切酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 对 pCMV-HA 载体进行双酶切, PCR 产物 5'和 3'末端都含有能使目的片段被引入线性化克隆载体的同源臂 (15~20 bp, 引物序列中小写字母表示)。反应体系为: ddH₂O 12 μL, 5×CE MultiS Buffer 4 μL, 线性化克隆载体 1 μL, 纯化后的扩增产物 1 μL, ExnaseMultiS 2 μL, 37 ℃ 反应 30 min。将得到的连接产物转化到 DH5α 感受态细胞中, 涂布在具有氨苄青霉素抗性的固体 LB 培养基上, 37 ℃ 过夜。第 2 天挑取单克隆菌落至摇菌管中, 将摇菌管放置于摇床中, 培养 8 h 以上, 用质粒小提试剂盒 (TIANGEN) 提取质粒。

1.6 双酶切验证与测序

将提取的质粒进行双酶切鉴定, 反应体系为 CutSmart Buffer 5 μL, 质粒 6 μL, *XhoI* 和 *EcoRI* 各 1 μL, ddH₂O 37 μL。反应条件为 37 ℃ 2 h 后, 65 ℃ 20 min。将双酶切鉴定正确的重组质粒对应的甘油菌液送至苏州金唯智公司进行测序, 完成后将测序结果与 NCBI 网站的预测序列进行对比。

1.7 RT-PCR

RT-PCR 反应按照 ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix (Without ROX) (Vazyme) 说明书进行操作, *TNNI2* 引物序列为 F: 5'-GCTGGGCTCCA-AGCACAAG-3' 和 R: 5'-CCTCCAGTCACCCAC-ATCG-3'。以无 POU 域八聚体结合蛋白 (non-POU domain containing octamer-binding protein, *NONO*) 为内参照基因, *NONO* 引物序列为 F: 5'-AGAAG-CAGCAGCAAGAAC-3' 和 R: 5'-TCCTCCATCCT-

CCTCAGT-3'。反应体系: 2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μL, cDNA 模板 2 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, ddH₂O 7.2 μL。反应程序: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s 及 55 °C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环。每个样品设置 3 个重复, 利用 2^{-ΔΔC_t} 算法将原始 C_t 值转换为基因相对表达量。

1.8 Western-blot

将鸡前脂肪细胞接种至 6 孔板, 分别转染 pCMV-HA-*TNNI2* 及 pCMV-HA 质粒, 转染 48 h 后, 使用 RIPA 裂解液 (含 1% PMSF) (Beyotime) 提取细胞中总蛋白, 4 °C, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清即为总蛋白, 加入 5×蛋白上样缓冲液 (Beyotime) 煮沸 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后将蛋白样品转移至 NC 膜 (Millipore), 室温封闭 1 h, anti-HA 标签抗体孵育 1 h, 二抗孵育 1 h。Odyssey 双红外激光成像系统检测 HA-fsTnI 蛋白表达水平。拍照完成后, 采用一抗二抗洗脱液 (Beyotime) 洗脱 1 h, 采用内参抗体 anti-β-actin 孵育 1 h, 二抗孵育 1 h, 检测内参蛋白 β-actin 的表达水平。

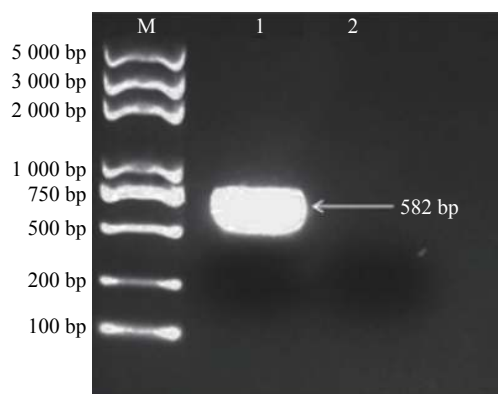
1.9 数据库与软件分析

采用在线网站 ProParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的氨基酸等电点和相对分子质量等理化性质。采用在线工具 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白质的疏水性。预测蛋白结构域采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 在线网站。预测蛋白质三级结构采用 Phyre 在线服务 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html>)。分析蛋白质功能位点采用在线软件 PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>)。分析预测信号肽采用在线工具 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。预测蛋白质跨膜区域采用 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)。亚细胞定位分析采用在线网站 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>)。序列对比采用在线工具 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)。利用 MEGA 5.0 (<https://www.megasoftware.net/index.php>) 工具, 采用邻接法 (neighbor-joining method, NJ 法) 构建系统发育树, 并采用 Bootstrap 对系统发育树进行评估。所有分析参数设置均采用默认值。

2 结果与分析

2.1 *TNNI2* 基因扩增

以 AA 白羽肉鸡的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示: 在 500~750 bp 位置成功扩增出 1 条特异性条带 (图 1), 与预期大小基本一致, 可以用于后续载体连接。



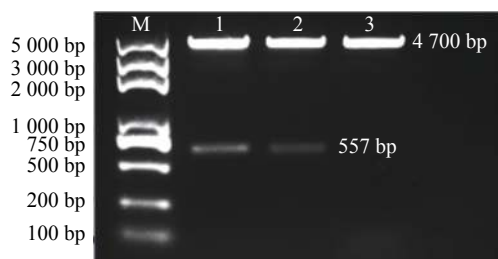
注: M. DL 5000 分子量标准; 1. *TNNI2* 基因扩增产物; 2. 阴性对照。
Note: M. DL 5000 DNA Marker; 1. products of *TNNI2* gene; 2. negative control.

图 1 *TNNI2* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of *TNNI2* gene

2.2 pCMV-HA 重组载体的鉴定

将 pCMV-HA-*TNNI2* 重组载体用 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切鉴定, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 500~700 bp 出现 1 条特异性条带 (图 2), 大小符合预期, 提示 *TNNI2* 基因已插入到 pCMV-HA 载体上。采用 BLAST 将测序结果与数据库中的序列进行比对, 并与 NCBI 数据库中鸡 *TNNI2* 基因预测序列对比, 克隆序列在第 45、84 位存在 2 个同义替换, 其他碱基完全一致 (图 3)。



注: M. DL 5000 分子量标准; 1、2. 重组质粒经 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切; 3. 阴性对照。

Note: M. DL 5000 DNA Marker; 1, 2. recombinant plasmid digested by *Eco*RI and *Xho*I; 3. negative control.

图 2 重组质粒 pCMV-HA-*TNNI2* 的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant expression plasmid pCMV-HA-*TNNI2*

```

1   CGAATTCgaagatgtctgatgaagagaAAAAAGGAGGGCAGCCACGCCGGCCGAG
      M S D E E K K R R A A T A R R Q
61  CACCTGAAGAGTGTATGCTCCAGCTTGTCTCAGCAGAAATAGAAAAGAACAGCTGCT
      H L K S A M L Q L A V T E I E K E A A A
121 AAAGAAGTGAAGCAAACTACCTGGCAGAGCATTGCCCTCTCTGCTCCCTCCAGGA
      K E V E K Q N Y L A E H C P P L S L P G
181 TCCATGCAGGAAGTTCAGGAAGTGTGCAAAAGCTTCATGCCAAGATAGACTCAGTGGAT
      S M Q E L Q E L C K K L H A K I D S V D
241 GAGGAAGGTATGACACAGAGGTGAAGCTACAGAACTAAACAAGGAGCTGGAGGACCTG
      E E R Y D T E V K L Q K T N K E L E D L
301 AGCCAGAAGCTGTTTACCTGAGGGGCAAGTTCAAGAGGCCACCTCTGCGCCGGGTGCGC
      S Q K L F D L R G K F K R P P L R R V R
361 ATGTCTGCTGATGCCATGCTGCGTGCCTGCTGGGCTCCAAGCACAAGGTCAACATGGAC
      M S A D A M L R A L L G S K H K V N M D
421 CTCGGGCAACCTGAAGCAAGTCAAGAGGAGGACACGAGAAGGAGAAGCACTCCGC
      L R A N L K Q V K K E D T E K E K D L R
481 GATGTGGGTGACTGGAGGAAGAATTGAGGAGAAATCTGGCATGGAGGCGAGGAAGAAG
      D V G D W R K N I E E K S G M E G R K K
541 ATGTTTGAGGCCGGCAGgtctctaagcactggtctctccCTCAG
      M F E A G E S *

```

注: ATG 和 * 分别表示起始密码子和终止密码子; 上下行字母分别表示核酸序列和对应的氨基酸序列; 下划线表示限制性内切酶序列; 小写字母为 *TNNI2* 基因的引物序列; 方框表示测序结果中的 2 个同义突变。

Notes: ATG and * represent start codon and stop codon, respectively; the letters of upper line represent nucleotide sequences; the letters of lower line represent amino acid sequences; the letters in underline represent the restriction enzyme sequence; the lowercase letters represent the primer sequence of *TNNI2* gene; the box represents two synonymous mutations in the sequencing results.

图 3 鸡 *TNNI2* 基因克隆序列与翻译的氨基酸序列

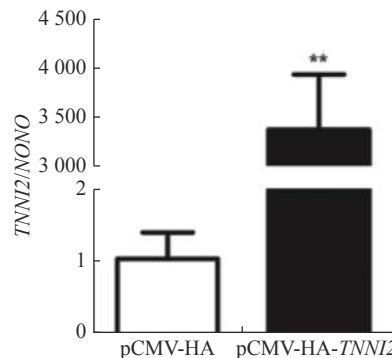
Fig. 3 The nucleotide sequence of the cloned gene and amino acids sequence of chicken *TNNI2*

2.3 重组质粒 pCMV-HA-*TNNI2* 在 ICP1 细胞中的 mRNA 表达

为了确定 *TNNI2* 的过表达效果, 将 pCMV-HA 空载体和 pCMV-HA-*TNNI2* 分别转染至 ICP1 细胞, 48 h 后提取 RNA 进行 RT-PCR 检测, 结果显示: 转染 pCMV-HA-*TNNI2* 载体组的 ICP1 细胞 *TNNI2* 的 mRNA 水平显著高于对照组 (图 4, $P < 0.01$)。在 mRNA 水平证明 *TNNI2* 过表达载体构建成功。

2.4 重组质粒 pCMV-HA-*TNNI2* 在 ICP1 细胞中的蛋白表达

为进一步确定 fsTnI 蛋白在 ICP1 细胞中的过表达效果, 将 pCMV-HA-*TNNI2* 表达载体转染 ICP1 细胞, 48 h 后提取蛋白进行 Western-blot 分析, 由于 pCMV-HA-*TNNI2* 质粒 N 端连有 HA 标签, 所以用 HA 标签抗体检测重组蛋白的表达。结果显示: fsTnI 蛋白在细胞量一致的情况下 (β -actin 为内参), 转染 pCMV-HA-*TNNI2* 质粒的 ICP1 细胞表达出 1 条约 23 ku 的特异蛋白条带, 而转染 pCMV-HA 空载体的细胞没有表达出 23 ku 的特异带 (图 5), 表明 fsTnI 蛋白成功过表达。



注/Note: **, $P < 0.01$ (student's *t*-test)

图 4 qRT-PCR 检测鸡 *TNNI2* 基因过表达效果

Fig. 4 Detection of overexpression of chicken *TNNI2* gene by qRT-PCR



图 5 Western-blot 检测鸡 *TNNI2* 基因过表达效果

Fig. 5 Detection of chicken *TNNI2* gene overexpression by Western-blot

2.5 生物信息学分析

2.5.1 鸡 fsTnI 蛋白质一级结构信息

利用 ProParam 对测序所得鸡 *TNNI2* 基因序列进行理化性质分析, 结果显示: *TNNI2* 基因编码 183 个氨基酸, 其中非极性疏水性氨基酸 (G、A、F、P、V、I 和 L) 54 个, 占 29.5%; 极性氨基酸 (T、S、N、C、Q、Y、W 和 M) 41 个, 占 22.4%; 酸性氨基酸 (D 和 E) 35 个, 占 19.2%; 碱性氨基酸 (K、R 和 H) 45 个, 占 24.6%。*TNNI2* 基因编码的 fsTnI 蛋白相对分子质量为 21.24 ku, 分子式为 $C_{913}H_{1526}N_{276}O_{284}S_{10}$, 理论等电点值 (pI) 为 9.19。精氨酸和赖氨酸残基总数为 41, 天冬氨酸和谷氨酸残基总数为 35, 脂肪系数为 72.02, 不稳定系数为 65.62, 属于不稳定性蛋白。

应用 ProtScale 软件分析 *TNNI2* 编码的 fsTnI 蛋白亲疏水性, 结果显示: fsTnI 蛋白质的疏水性在 24 位点有最大值 0.501, 149 位点有最小值 -2.903, 平均亲水性 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -1.055。根据 GRAVY 数值为负可以推测 fsTnI 为亲水性蛋白。

2.5.2 鸡 fsTnI 蛋白质结构域及三维结构预测

利用 SMART 在线工具预测 fsTnI 蛋白的三级结构, 发现其在 15~109 bp 存在 1 个 coiled coil 结构域。利用在线网站预测鸡 *TNNI2* 基因编码的 fsTnI 蛋白三级结构。提交鸡 fsTnI 蛋白的氨基酸序列, 得到三级结构模型如图 6 所示。有 141 (77% 的序列) 个残基根据 100% 可信度的最高评分模板构建模型; 有 180 (98% 的序列) 个残基根据>90% 的可信度的模板构建模型。

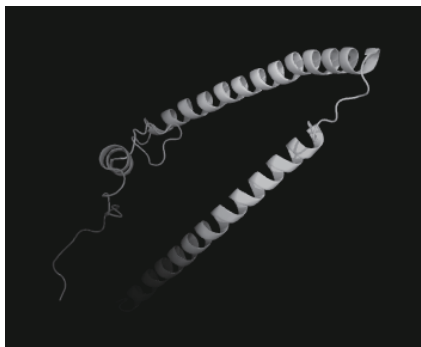


图 6 fsTnI 蛋白的三级结构

Fig. 6 The tertiary structure of chicken fsTnI

2.5.3 鸡 fsTnI 蛋白功能位点分析

利用 Prosite 预测鸡 fsTnI 蛋白的功能位点。

发现鸡 fsTnI 蛋白含有 4 类功能活性位点, 包括酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪氨酸激酶磷酸化位点 1 和酰胺化位点 (表 1)。

2.5.4 鸡 fsTnI 蛋白质跨膜结构、信号肽及亚细胞定位

利用 SignalP 5.0 预测 *TNNI2* 编码的 fsTnI 蛋白的信号肽, 结果显示: fsTnI 蛋白无信号肽。利用 TMHMM 2.0 在线工具预测 fsTnI 蛋白质的跨膜区, 结果显示: *TNNI2* 编码的 fsTnI 蛋白不具有跨膜结构。通过在线网站 WoLF PSORT 对 fsTnI 蛋白进行亚细胞定位发现: fsTnI 蛋白定位于细胞核 (nucl: 21)。

2.5.5 鸡 *TNNI2* 基因同源性对比分析及系统发育树构建

将鸡 *TNNI2* 基因的编码区序列与鸭 (XM_005019741.4)、犬 (XM_022405520.1)、小鼠 (NM_009405.3)、大鼠 (NM_017185.1)、人 (KR_7111-60.1)、猪 (NM_001032359.1)、兔 (NM_0010827-83.1) 和羊 (XM_027959866.1) 等 9 个物种的序列对比并计算相似度 (表 2)。鸡与哺乳动物的相似性均在 70% 以上, 与鸭的相似性为 94.13%。利

表 1 fsTnI 蛋白质功能活性位点

Tab. 1 Fuctional active site of fsTnI protein

活性位点名称 active site name	序列号 serial No.	氨基酸序列 amino acid sequence
酪蛋白激酶II磷酸化位点 casein kinase II phosphorylation site	PS00006	2~5: SdeE; 28~31: TeiE; 57~60: SmqE; 74~77: SvdE; 89~92: TnkE; 149~152: TekE; 169~172: SqmE
蛋白激酶C磷酸化位点 protein kinase C phosphorylation site	PS00005	12~14: TaR; 89~91: TnK; 97~99: SqK; 149~151: TeK
酪氨酸激酶磷酸化位点 1 tyrosine kinase phosphorylation site 1	PS00007	37~44: KevEkqnY
酰胺化位点 amidation site	PS00009	172~175: eGRK

表 2 9 个物种 *TNNI2* 基因编码区序列相似性比对

Tab. 2 The percent identity analysis for *TNNI2* gene coding region sequences of 9 species

物种 species	鸡 chicken	鸭 duck	犬 dog	小鼠 mouse	大鼠 rat	人 human	猪 pig	兔 rabbit	羊 sheep
鸡 chicken		94.93	78.32	77.41	77.78	77.66	76.68	78.69	77.78
鸭 duck	5.25		79.05	77.05	77.41	78.75	79.42	80.33	80.33
犬 dog	25.59	24.57		89.80	89.80	89.74	91.44	89.44	90.89
小鼠 mouse	26.88	27.40	10.96		97.27	90.84	87.80	87.98	88.71
大鼠 rat	26.35	26.88	10.96	2.78		91.21	87.80	88.34	88.34
人 human	26.52	24.99	11.03	9.77	9.35		89.93	91.39	90.48
猪 pig	27.93	24.06	9.09	13.31	13.31	10.81		91.99	92.35
兔 rabbit	25.07	22.81	11.38	13.10	12.67	9.15	8.47		92.71
羊 sheep	26.35	22.81	9.71	12.24	12.67	10.18	8.07	7.67	

注: 对角线以上数值表示一致性百分比; 以下数值表示分歧度。

Note: Upper diagonal values represent consistency, lower diagonal values represent divergence.

用 MEGA 5.0 软件, 采用 NJ 邻接法构建系统进化树, 结果 (图 7) 显示: 鸡 *TNNI2* 基因的编码区与鸭在系统进化关系上最亲密, 小鼠距离其他哺乳动物较远。基因进化比较符合物种进化关系。

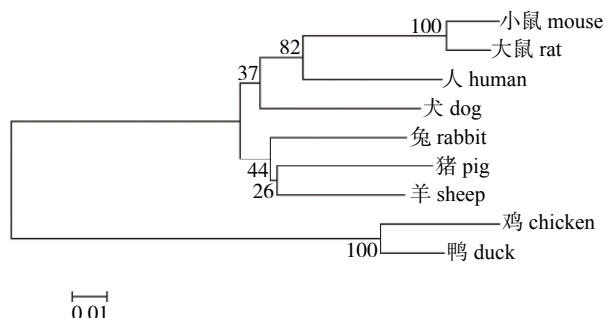


图 7 *TNNI2* 基因系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree based on *TNNI2* gene

3 讨论

目前, 肌钙蛋白已在人类^[16-18]、鸭^[19]、猪^[1]、羊^[20]和牛^[10]等物种中成功克隆并开展研究。在鸡的脂肪组织中检测到 *TNNI2* 基因的表达^[12], 提示该基因在脂肪组织中发挥作用, 但该基因在鸡脂肪组织中的结构和功能还不清楚。本研究通过 PCR 扩增鸡的 *TNNI2* 基因, 成功构建了真核过表达载体 pCMV-HA-*TNNI2*, 并在 ICP1 细胞中进行了表达。

fsTnI 是一种快骨骼肌蛋白, 属于肌钙蛋白 I 基因家族, 是包括肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 C 和肌钙蛋白 I 亚基在内的肌钙蛋白复合体的 1 个亚基^[1]。肌钙蛋白复合物与原肌凝蛋白共同参与横纹肌收缩的钙依赖调节。fsTnI 也存在于血管平滑肌中, 可能对平滑肌功能发挥起调节作用^[2-3]。除了肌肉组织外, fsTnI 还存在于角膜上皮^[5]和软骨中, 在软骨中它是血管生成的抑制剂, 以抑制肿瘤生长和转移^[4]。此外, fsTnI 还作为核受体共同激活剂与人类乳腺癌细胞中的雌激素受体相关受体 α (estrogen receptor-related receptor α , ERR α) 相互作用^[6], 并作为转录因子通过增加 Hif3a 的表达参与骨骼发育^[21]。本研究亚细胞定位预测结果同样显示: 在鸡前脂肪细胞系中, fsTnI 蛋白定位于细胞核, 说明 fsTnI 可能作为转录因子在脂肪组织中发挥作用。此外, *TNNI2* 在脂肪组织中的表达结果显示: 其 mRNA 在蛋鸡中的表达高于脂肪系肉鸡^[22], 可以推测

fsTnI 蛋白在细胞核中作为转录因子对脂肪发育起到抑制作用。脂肪形成是一个复杂网络的调控过程, 其中 PPAR γ 和 C/EBP α 是脂肪形成过程中的 2 个关键因子, 其他的转录因子或多或少会通过影响 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达来影响脂肪形成^[23-24]。fsTnI 可能通过影响这 2 个关键因子的表达, 或者在蛋白水平与 PPAR γ 或 C/EBP α 形成复合物, 来影响鸡前脂肪细胞分化。另外, fsTnI 也有可能与其他转录因子形成蛋白水平的复合物, 影响 PPAR γ 或 C/EBP α 的表达, 最后影响前脂肪细胞分化。总之, 后续有必要开展 fsTnI 在脂肪形成过程中的作用, 进一步揭示 fsTnI 的调控机制。

由同源性分析可知: 鸡与鸭的 *TNNI2* 基因编码区差异性最小, 只有 28 个核苷酸有差异, 鸡与哺乳类序列具有较高的相似性 (均>70%), 说明该基因在不同物种中可能具有相同的功能。另外, 大鼠和小鼠的 *TNNI2* 基因编码区序列完全相同, 说明同一基因在亲缘性相近的不同物种中具有保守性。综上所述, *TNNI2* 基因在各物种中有较高的同源性。

4 结论

本研究成功构建了鸡 *TNNI2* 基因的真核表达载体 pCMV-HA-*TNNI2*, 在 ICP1 细胞中进行了真核表达, 同时对该基因序列进行了功能生物信息学预测。研究结果为 *TNNI2* 基因在鸡脂肪细胞中的进一步研究奠定基础。

致谢: 感谢东北农业大学农业农村部鸡遗传育种重点实验室王宁教授提供永生鸡前脂肪细胞系。

[参考文献]

- [1] SHENG J J, JIN J P. *TNNI1*, *TNNI2* and *TNNI3*: evolution, regulation, and protein structure-function relationships[J]. Gene, 2016, 576(1): 385. DOI: 10.1016/j.gene.2015.10.052.
- [2] BERSON G, SAMUEL J L, SWYNGHEDAUW B. A comparative study of the cardiac troponin inhibitory factor (TNI) from mammals[J]. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 1978, 374(3): 277. DOI: 10.1007/BF00585605.
- [3] MALHOTRA A, NAKOUZI A, BOWMAN J, et al. Expression and regulation of mutant forms of cardiac TnI in a reconstituted actomyosin system: role of kinase dependent phosphorylation[J]. Molecular and Cellular Bio-

- chemistry, 1997, 170(1/2): 99. DOI: [10.1023/a:1006865600519](https://doi.org/10.1023/a:1006865600519).
- [4] MOSES M A, WLEDERSCHAIN D, INMN W U. Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(6): 2645. DOI: [10.1073/pnas.96.6.2645](https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2645).
- [5] KINOSHITA S, ADACHI W, SOTOZONO C, et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium[J]. Progress in Retinal and Eye Research, 2001, 20(5): 639. DOI: [10.1016/s1350-9462\(01\)00007-6](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(01)00007-6).
- [6] LI Y P, CHEN B, CHEN J, et al. Fast skeletal muscle troponin I is a co-activator of estrogen receptor-related receptor alpha[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 369(4): 1034. DOI: [10.1016/j.bbrc.2008.02.147](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.147).
- [7] WANG B, ZHENG Z J, WANG Z G, et al. A novel missense mutation of *TNNI2* in a Chinese family cause distal arthrogryposis type 1[J]. American Journal of Medical Genetics, 2016, 170(1): 135. DOI: [10.1002/ajmg.a.37391](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37391).
- [8] SAWAKI K, KANDA M, MIWA T, et al. Troponin I2 as a specific biomarker for prediction of peritoneal metastasis in gastric cancer[J]. Annals of Surgical Oncology, 2018, 25(7): 2083. DOI: [10.1245/s10434-018-6480-z](https://doi.org/10.1245/s10434-018-6480-z).
- [9] 李伯江, 李平华, 吴望军, 等. 骨骼肌纤维形成机制的研究进展[J]. 中国农业科学, 2014, 47(6): 1200. DOI: [10.3864/j.issn.0578-1752.2014.06.016](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2014.06.016).
- [10] 向娅, 柴志欣, 王吉坤, 等. 牦牛肌钙蛋白 I 基因家族的克隆及组织表达分析[J]. 华北农学报, 2020, 35(2): 228. DOI: [10.7668/hbxb.20190667](https://doi.org/10.7668/hbxb.20190667).
- [11] XU Z Y, YANG H, LI Y, et al. Temporal expression of TnI fast and slow isoforms in biceps femoris and masseter muscle during pig growth[J]. Animal, 2010, 4(9): 1541. DOI: [10.1017/S1751731110000649](https://doi.org/10.1017/S1751731110000649).
- [12] PARK B S, OH Y K, KIM M J, et al. Skeletal muscle troponin i (Tni) in animal fat tissues to be used as biomarker for the identification of fat adulteration[J]. Korean Journal for Food science of Animal Resources, 2014, 34(6): 822. DOI: [10.5851/kosfa.2014.34.6.822](https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.6.822).
- [13] 李辉. 鸡体脂肪及其控制的研究进展[J]. 新疆农业科学, 1995(5): 228.
- [14] ZEREHDARAN S, VEREIJEN A L J, VAN ARENDONK J A M, et al. Estimation of genetic parameters for fat deposition and carcass traits in broilers[J]. Poultry Science, 2004, 83(4): 521. DOI: [10.1093/ps/83.4.521](https://doi.org/10.1093/ps/83.4.521).
- [15] WANG W, ZHANG T M, WU C Y, et al. Immortalization of chicken preadipocytes by retroviral transduction of chicken TERT and TR[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177348. DOI: [10.1371/journal.pone.0177348](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177348).
- [16] SUN Y, WANG G Z, JI Z B, et al. Three slow skeletal muscle troponin genes in small-tailed han sheep (*Ovis aries*): molecular cloning, characterization and expression analysis[J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43(9): 999. DOI: [10.1007/s11033-016-4027-6](https://doi.org/10.1007/s11033-016-4027-6).
- [17] DE MATTEIS A, DELL'AQUILA M, MAIESE A, et al. The troponin-I fast skeletal muscle is reliable marker for the determination of vitality in the suicide hanging[J]. Forensic Science International, 2019, 301: 284. DOI: [10.1016/j.forsciint.2019.05.055](https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.055).
- [18] BOLLEN I A, SCHULDT M, HAKALOVA M, et al. Genotype-specific pathogenic effects in human dilated cardiomyopathy[J]. Journal of Physiology, 2017, 595(14): 4677. DOI: [10.1113/JP274145](https://doi.org/10.1113/JP274145).
- [19] 姬改革, 束婧婷, 单艳菊, 等. 高邮鸭 *TNNI1* 基因克隆及组织表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(6): 970. DOI: [10.3969/j.issn.1674-7968.2018.06.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-7968.2018.06.007).
- [20] 张毫其. 天府肉羊 *TNNT1*、*TNNT2* 和 *TNNI2* 基因的克隆以及组织表达[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.
- [21] ZHU X Q, WANG F C, ZHAO Y Y, et al. A gain-of-function mutation in *Tnni2* impeded bone development through increasing *Hif3a* expression in DA2B mice[J]. PLoS Genetics, 2014, 10(10): e1004589. DOI: [10.1371/journal.pgen.1004589](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004589).
- [22] WANG H B, LI H, WANG Q G, et al. Microarray analysis of adipose tissue gene expression profiles between two chicken breeds[J]. Journal of Biosciences, 2006, 31(5): 565. DOI: [10.1007/BF02708408](https://doi.org/10.1007/BF02708408).
- [23] WU Z D, ROSEN E D, BRUN R, et al. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity[J]. Molecular Cell, 1999, 3: 151. DOI: [10.1016/s1097-2765\(00\)80306-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80306-8).
- [24] SUN Y N, JIN Z, ZHANG X Y, et al. GATA binding protein 3 is a direct target of kruppel-like transcription factor 7 and inhibits chicken adipogenesis[J]. Frontiers in Physiology, 2020, 11: e610. DOI: [10.3389/fphys.2020.00610](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00610).

责任编辑: 何承刚