



版纳微型猪近交系 *TDRP1* 基因克隆、鉴定 及 mRNA 的组织表达特性

王配^{1,2}, 霍金龙^{1,2}, 王淑燕^{1,2}, 潘伟荣^{1,2}, 查星琴^{1,2}, 施晨¹, 曾养志^{1,2}

(1. 云南农业大学 云南省版纳微型猪近交系重点实验室, 昆明 650201;
2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 昆明 650201)

【摘要】 目的 克隆版纳微型猪近交系(BMI)不育和可育公猪 *TDRP1* 基因,分析其序列及 mRNA 表达水平上的差异,预测其蛋白质功能,并检测该基因在可育公猪中的组织表达分布情况。方法 以猪 NM_001198925 序列为模板,设计特异引物,采用 RT-PCR 方法结合测序获得 *TDRP1* 的 cDNA 序列并进行生物信息学分析;采用半定量 PCR 方法检测 *TDRP1* 在不育和可育公猪睾丸中的表达规律,分析该基因在可育公猪 17 种组织中的表达特征。结果 获得了 BMI *TDRP1* 基因的编码区序列(GenBank 登录号:KJ186786),生物信息学分析表明其编码 186 个氨基酸,蛋白质相对分子质量(Mw)为 20.49×10^3 ,等电点(pI)为 5.86,无信号肽,有 94.1% 的概率位于细胞核,含有 1 个亮氨酸富集的核输出信号。不同物种的氨基酸序列比对表明猪 *TDRP1* 与人、恒河猴、小鼠和大鼠等哺乳动物的 *TDRP1* 相似性在 73%~83.2% 之间,其中与人、恒河猴的相似性较高。mRNA 表达分析表明,*TDRP1* 在 BMI 不育和可育公猪睾丸间表达水平差异无显著,在精囊腺和前列腺中高表达,在睾丸和小脑中中度表达,在大脑和肾脏中低表达,在其余组织中不表达。结论 成功克隆了 BMI *TDRP1* 基因的全长编码区序列并发现了 BMI 特有的 2 个 SNP 位点;*TDRP1* 基因在 BMI 不育和可育公猪间序列完全一致,睾丸 mRNA 表达水平差异无显著性,多组织转录谱分析表明该基因存在明显的组织差异表达现象,在精囊腺和前列腺中有较高表达量,为深入研究 *TDRP1* 基因在精子发生方面的作用奠定了基础。

【关键词】 精子发生相关蛋白 1;精子发生;版纳微型猪近交系;生物信息学;组织表达特性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0009-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.002

Molecular cloning, sequence characterization and mRNA tissue expression analysis of *TDRP1* gene from the Banna minipig inbred line (BMI)

WANG Pei^{1,2}, HUO Jin-long^{1,2*}, WANG Shu-yan^{1,2}, PAN Wei-rong^{1,2}, ZHA Xing-qin^{1,2}, SHI Chen¹, ZENG Yang-zhi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Banna Mini-pig Inbred Line of Yunnan Province,

2. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

【Abstract】 Objective To get *TDRP1* gene of sterile and fertile boar of the Banna minipig inbred line (BMI), predict its function by bioinformatics analysis, and detect its expression patterns in the fertile boar. **Methods** Based on the NM_001198925 sequence, we designed specific primers and amplified BMI *TDRP1* using RT-PCR method for sequencing and bioinformatics analysis. Meanwhile, the expression of *TDRP1* in 17 organ tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney, thymus, lymph nodes, skin, duodenum, stomach, cerebrum, cerebellum, testis, epididymis, seminal vesicle, prostate, and bulbourethral gland) of fertile BMI boar and in the testis of sterile and fertile BMI boars was analyzed by

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 31160439,31460580)。

[作者简介] 王配(1987-),女,实验师,博士研究生,主要从事动物分子遗传学方面的研究。E-mail: peipei99999@126.com

[通讯作者] 霍金龙(1975-),男,高级实验师,博士,主要从事动物分子生物学方面的研究。E-mail: jinlonghuo973@163.com

semi-quantitative RT-PCR. **Results** The experiment obtained 680 bp cDNA sequence (GenBank accession number: KJ186786) of BMI *TDRP1*, which encodes a protein of 186 amino acids with a predicted molecular weight (Mw) of 20.49 kDa and isoelectric point (pI) 5.86, and no signal peptide. It was a nuclear protein with a probability of 94.1% and had a leucine-rich nuclear export signals. Homology analysis of protein sequences revealed that BMI *TDRP1* showed high identity with that of humans, *macaca mulatta*, mouse and rat. The RT-PCR analysis showed that *TDRP1* had a similar expression in the testes of sterile and fertile BMI boars. It was highly abundant in the seminal vesicle and prostate, moderately expressed in cerebellum and testis and weakly expressed in cerebrum and kidney, while undetected in other 11 organ tissues.

Conclusions We have cloned *TDRP1* complete coding sequence, and found 2 SNPs, showing no difference in sequences and the testis mRNA expression levels between the fertile and sterile BMI boars. The multi-tissue transcription profile shows different expression levels in different organ tissues, being high in the seminal vesicle and prostate. The results of this study provide a foundation for further insight into the role of this gene in spermatogenesis.

【Key words】 *TDRP1*; Spermatogenesis; Banna minipig inbred line (BMI); Bioinformatics; Tissue expression patterns

版纳微型猪近交系(BMI)从1980年建系以来,一直采用全同胞和亲子交配的高度近交加严格选择的方法进行培育,克服了早期世代中存在的严重近交衰退,于2003年进入20世代,达到了国际和国内实验动物委员会对近交系培育的标准,成为世界上第一个培育成功的大型哺乳动物近交系。2005年通过了由遗传学、实验动物学、医学、动物育种学等专家组成的鉴定委员会的成果鉴定。其解剖、发育、生理、病理、疾病发生等方面与人类极为相似,是生物医学领域研究的理想实验动物模型^[1-4]。版纳微型猪近交系自建系以来有多个亚系断代,通过大量观察、统计以及基础研究发现,繁殖力较差的亚系其公猪精液品质相对较差、畸形率较高。据报道雄性动物不育多由生精障碍造成^[5],而精子发生又是一个复杂的细胞分化过程,受生殖细胞的基因组控制^[6-7],有许多的基因参与调控,这些基因构成了一个有机的空间网络,每个基因都在其中发挥着特定的功能^[8-9]。挖掘、寻找、鉴定生精障碍相关基因,了解雄性不育的遗传病因,阐明发病机制是解决版纳微型猪近交系繁殖障碍的有效途径。

睾丸发育相关蛋白(testis development-related protein, TDRP)是一种新型核因子,于2010年首次从人睾丸cDNA文库中克隆获得^[10],最初称为染色体8开放阅读框42(chromosome 8 open reading frame 42, C8orf42)。TDRP有2个完全不同的转录子,转录子1(*TDRP1*)含有3个外显子,ORF长549 bp,编码183个氨基酸;转录子2(*TDRP2*)含有4个外显子,ORF长594 bp,编码198个氨基酸^[10]。人和鼠的Northern blot、免疫组化和组织Western blot研究结果表明*TDRP1* mRNA和蛋白质都主要在成年个体睾丸组织的生精细胞中表达,尤其在精母细

胞中表达量最高,并且其表达还受发育调控,随着发育成熟,*TDRP1*的表达量逐渐升高;且*TDRP1*在生精功能障碍所致的男性不育患者睾丸组织中的表达明显低于生精功能正常的睾丸组织,说明*TDRP1*在维持哺乳动物精子正常功能方面具有重要作用^[10]。目前关于*TDRP1*基因的研究相对较少,在NCBI Pubmed数据库中,只能搜索到几篇文献,有必要深入研究;另外鉴于其在人类和啮齿类动物精子发生方面取得的进展,认为其可能与BMI公猪的繁殖力有一定的相关性,故本研究应用RT-PCR方法从不育和可育BMI公猪睾丸组织中克隆*TDRP1*基因,分析其序列特征、检测其mRNA表达特性并预测其蛋白质功能,为下一步以BMI为动物模型研究*TDRP1*的功能和阐明BMI公猪生精障碍机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

以成年(15月龄)的BMI不育公猪为实验材料,并以成年(15月龄)的BMI可育公猪为对照,活体去势采集睾丸,液氮速冻,-80℃超低温冰箱保存以备RNA提取,用于克隆目的基因和分析其与BMI公猪繁殖力的关系。

选取正常的BMI可育公猪(12月龄)1头。屠宰后采集心、肝、脾、肺、肾、胸腺、淋巴结、皮肤、十二指肠、胃、大脑、小脑、睾丸、附睾、精囊腺、前列腺和尿道球腺等17种组织,提取RNA,用于目的基因多组织表达谱研究。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取和cDNA合成

利用TaKaRa公司的RNAiso Plus分别提取各

种组织的总 RNA,参考 Invitrogen 公司的逆转录酶 M-MLV 试剂盒操作说明将组织总 RNA 反转录成 cDNA,具体步骤可参照说明书和文献^[11]进行。

1.2.2 设计、合成 PCR 引物

利用 NCBI 已公布的猪的 *TDRP1* 基因(登录号:NM_001198925)序列,综合应用 Primer Premier

表 1 *TDRP1* 和内参基因的 PCR 引物信息和扩增程序

Tab.1 PCR primers information and protocol for amplification of *TDRP1* and internal control genes

基因 Genes	引物序列(5'-3') Primer sequences	产物长度/bp Product length	PCR 程序 PCR protocol				
			95℃	94℃	60℃	72℃	72℃
<i>TDRP1</i>	F: AGCTCGAGTCCGCTCCGCTCTG R: CACTTGGGAGCTGTGTCGTCTC	680	1 min	30 s	30 s	45 s	10 min
<i>GAPDH</i>	F: CCTTCATTGACCTCCACTACATGGT R: CCACAACATACGTAGCACCAGCATC	183	1 min	30 s	30 s	30 s	10 min
<i>18S</i>	F: GGACATCTAAGGGCATCACAG R: AATTCCGATAACGAACGAGACT	145	1 min	30 s	30 s	30 s	10 min

1.2.3 PCR 扩增

利用 TakaRa 的 ExTaq 酶进行扩增,模板为睾丸组织 RNA 反转录的 cDNA,PCR 反应体系为:12.5 μ L 2 \times GC buffer I,2 μ L 的稀释后的 25 ng/ μ L 的 cDNA,10 μ mol/L 的正、反向引物各 0.5 μ L,0.25 μ L 的 5 U/ μ L 的 ExTaq 酶,加水补足至 25 μ L。扩增程序见表 1。PCR 产物利用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像仪照相,产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.2.4 *TDRP1* 蛋白生物信息学分析

根据所获得的 BMI *TDRP1* 基因 cDNA 全序列预测其氨基酸序列,参考 Qin 等^[14]描述的方法进行 *TDRP1* 蛋白分子量(Mw)、等电点(pI)、信号肽、亚细胞定位和二级结构的预测。蛋白磷酸化位点使用 NetPhos2.0 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线预测,亮氨酸富集的核输出信号使用 NetNES1.1 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>)在线预测。

在 Swiss-Prot 中搜索得到人、恒河猴、大鼠和小鼠的 *TDRP1* 的氨基酸序列(NP_778250、NP_001252913、NP_001094261 和 NP_776105)与 BMI 的 *TDRP1* 的氨基酸序列进行同源性和序列比对分析,并进行系统进化分析,其中同源性分析采用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 程序,序列比对分析采用 ClustalX 1.83 和 DNAMAN 软件进行,分子系统进化树利用 MEGA5.2 软件构建。

1.2.5 *TDRP1* 表达分析

用 *TDRP1* F/R 引物检测不育和可育公猪睾丸

5.0 和 Oligo 6 软件设计特异性引物(见表 1),由上海生工生物工程有限公司合成,进行 BMI *TDRP1* 基因的编码区序列扩增。以持家基因 *GAPDH* 或 *18S* 为内参,根据文献引物扩增^[12-13],用于分析目的基因的相对表达量。

的基因表达水平和多组织表达谱,其中 *GAPDH* 作为不育和可育公猪睾丸组织表达水平检测的内参,*18S* 作为多组织表达谱的内参。PCR 扩增参照 1.2.3,在检测 *TDRP1* 基因的多组织表达谱时,PCR 为 32 个循环,*18S* 为 30 个循环。而在分析 *TDRP1* 在不育和可育公猪睾丸组织的差异性表达时,进行了循环数优化,最终 *GAPDH* 和 *TDRP1* 的 PCR 扩增循环数分别为 28 和 30。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后利用 Quantity One 软件测定每个条带灰度值,以 *18S* 或 *GAPDH* 为参照,进行比较获得相对表达水平。

2 结果与分析

2.1 *TDRP1* 基因在不育和可育公猪睾丸中表达水平分析

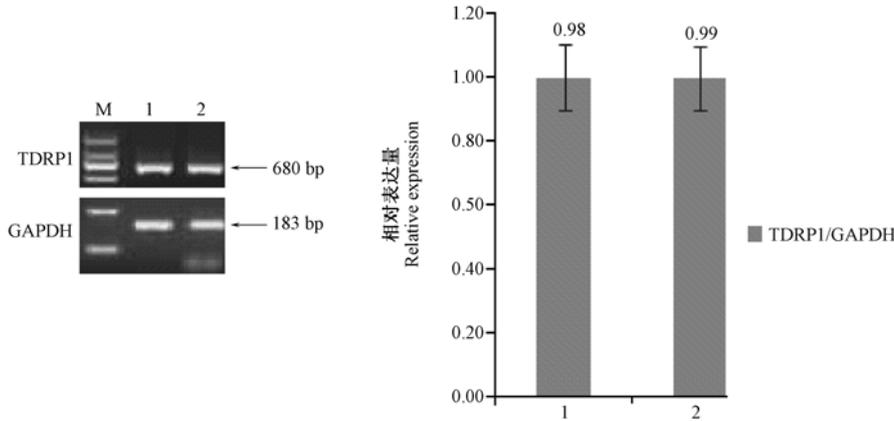
从活体去势采集到的 BMI 不育和可育公猪睾丸组织中提取总 RNA,经反转录反应后,以 cDNA 为模板,以 *TDRP1* F/R 为引物扩增得到了 680 bp 的条带,与预计大小相符,见图 1。*TDRP1* 的表达量用 *GAPDH* 的表达量校正后获得相对表达水平。结果,以 *GAPDH* 基因为内参,*TDRP1* 基因在不育公猪和可育公猪个体的睾丸组织中 mRNA 表达水平接近,差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 *TDRP1* cDNA 序列及蛋白质理化性质预测结果

通过 PCR 产物原液测序,得到了一条 680 bp 的核苷酸序列,发现 *TDRP1* 基因序列在 BMI 不育和可育公猪个体间完全一致,无变异位点;但与参考序

列 NM_001198925 相比,在编码区有两处同义突变,分别为 c. 33(C > G)和 c. 348(C > T),见图 2。此序列已提交 GenBank,基因登录号为 KJ186786,其中包含了 561 bp 的开放阅读框、87 bp 5'非编码区和 32 bp 3'非编码区,编码 186 个氨基酸,如图 2 所

示。BMI TDRP1 蛋白质分子质量为 20.49×10^3 ,等电点为 5.86,无信号肽,存在 1 个亮氨酸富集的核输出信号(75AA-81AA)(图 2 和 3),亚细胞定位预测显示该蛋白位于细胞核的概率是 94.1%。

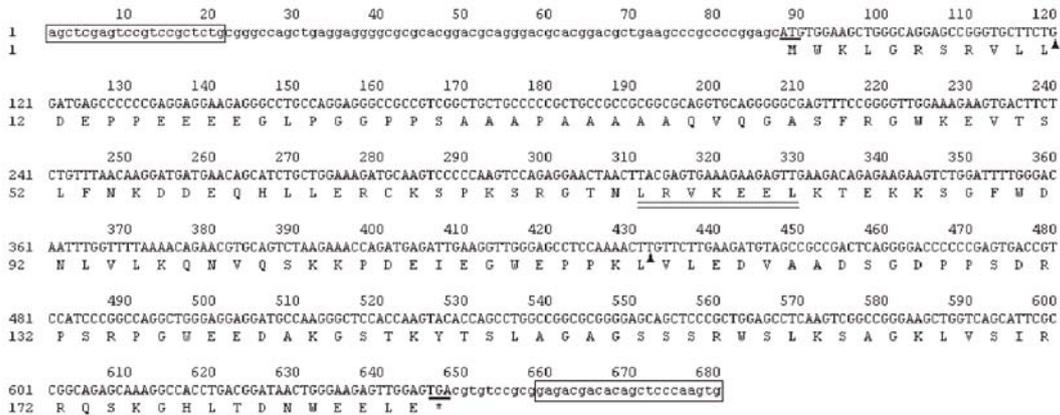


注: M. DL2000 分子量标准; 1. 不育公猪; 2. 可育公猪。

图 1 TDRP1 基因在不育和可育公猪中的 RT-PCR 扩增结果

Note. M. DL2000 marker; 1. Sterile boar; 2. Fertile boar.

Fig. 1 The amplification results of TDRP1 gene in BMI sterile and fertile boars by RT-PCR



注:ATG. 起始密码子; *. 终止密码子;上一行大写字母为核酸序列,对应的下一行为氨基酸序列;小写字母为 5'和 3'侧翼序列;方框为引物序列;双下划线为亮氨酸富集的核输出信号;▲为突变碱基(相对参考序列:NM_001198925)。

图 2 TDRP1 基因编码区序列及其对应的氨基酸序列

Note. ATG. start codon; *. stop codon. The capital letters of upper line are nucleotide sequences and those of the corresponding line are amino acid sequences. Small letters: 5' and 3' flanking sequences. Frame box: primer sequence. Double underline; leucine-rich nuclear export signals. ▲ indicates mutation nucleotide (compared with NM_001198925).

Fig. 2 The coding region sequence and amino acids of TDRP1

2.3 TDRP1 蛋白质二级结构预测结果

通过 SOPMA 程序预测的 BMI TDRP1 蛋白二级结构中含 17 AA 的延伸链结构(9.14%),30 AA 的 β-转角(6.13%),44 AA 的 α-螺旋(23.66%),95 AA 的无规则卷曲(51.08%)(图 4)。

2.4 TDRP1 蛋白质同源性分析

用猪的 TDRP1 氨基酸序列在 Swiss-Prot 中进行同源性搜索,获得了人、恒河猴、小鼠和大鼠等动物的 TDRP1 氨基酸序列,序列比对分析表明,猪 TDRP1 与人 TDRP1 的相似性为 82.7%,与恒河猴

的 TDRP1 相似性为 83.2%，与小鼠的 TDRP1 相似性为 74.0%，与大鼠的 TDRP1 相似性为 73.5% (表 2)。哺乳动物 TDRP1 氨基端和羧基末端均相对保守，中间某些区域变化较大(序列比对见图 5)。

2.5 TDRP1 分子系统进化树

利用 MEGA5.2 构建了 BMI 猪、人、恒河猴、小鼠和大鼠 TDRP1 氨基酸的系统进化树(见图 6)，小鼠和大鼠聚为一支，人和恒河猴聚为一支，猪为另一支，但猪与灵长类比与啮齿类更近。

2.6 TDRP1 蛋白质磷酸化位点预测结果

通过 NetPhos2.0 软件在线预测发现 TDRP1 包含一些保守的蛋白质磷酸化位点，包括 14 个丝氨酸磷酸位点，1 个苏氨酸磷酸位点和 1 个酪氨酸磷酸位点，见图 7。结合不同物种的氨基酸比对结果，

发现 8 个丝氨酸(67、70、87、144、149、156、160、169 和 174 位)和 1 个酪氨酸(147 位)磷酸化位点高度保守，见图 5 和图 7。

2.7 TDRP1 多组织表达谱分析结果

以看家基因 18S 为内参，利用 RT-PCR 方法检测 TDRP1 基因在版纳微型猪近交系正常公猪 17 个组织(包括心、肝、脾、肺、肾、胸腺、淋巴结、皮肤、十二指肠、胃、大脑、小脑、睾丸、附睾、精囊腺、前列腺和尿道球腺)的转录水平，多组织表达谱分析表明 BMI TDRP1 基因在各组织中存在明显的差异表达现象(图 8)，在精囊腺和前列腺中高表达，在睾丸和小脑中中度表达，在大脑和肾脏中低表达，在其余 11 种组织中不表达。

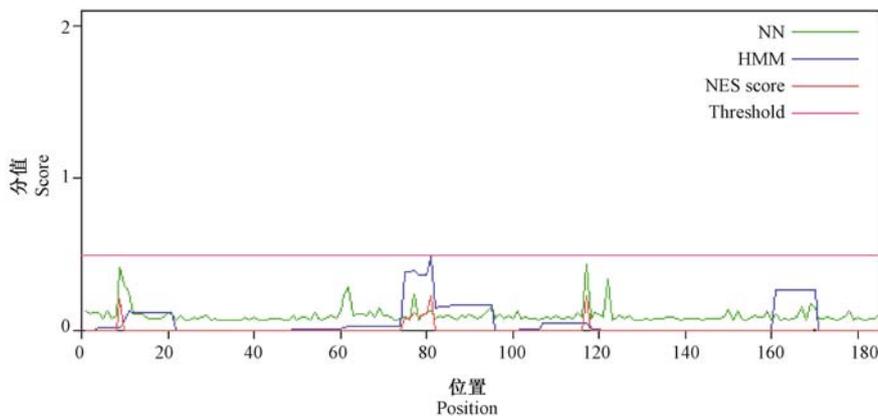
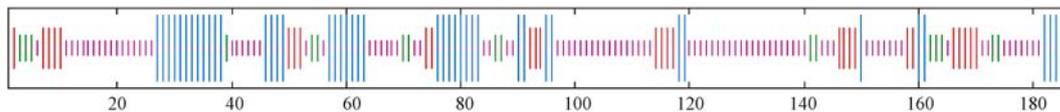


图 3 NetNES1.1 程序预测的 TDRP1 蛋白亮氨酸富集的核输出信号

Fig.3 Predicted leucine-rich nuclear export signals in the TDRP1 protein by NetNES1.1



注：分别用最长、次长、第三长和最短的垂直线表示 α-螺旋、延伸链结构、β-转角和无规则卷曲。

图 4 TDRP1 蛋白的二级结构

Note. The longest, the second longest, the third longest and the shortest vertical lines stand for the alpha helices, extended strands, beta turns and random coils, respectively.

Fig.4 The secondary structure of TDRP1 protein

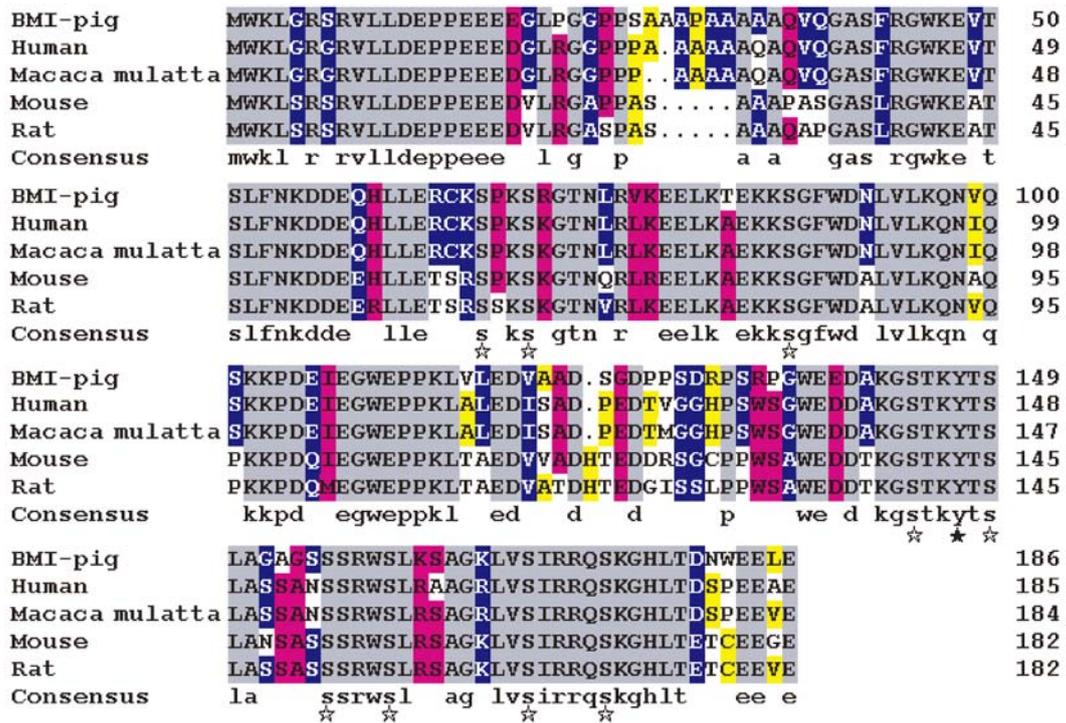
表 2 BMI 和其他 4 个物种 TDRP1 氨基酸序列的同源性分析

Tab.2 Homology analysis for TDRP1 amino acid sequences of BMI and other 4 species

基因 Genes	pTDRP1	hTDRP1	mmTDRP1	mTDRP1	rTDRP1
pTDRP1	1	0.827	0.832	0.740	0.735
hTDRP1		1	0.984	0.773	0.757
mmTDRP1			1	0.779	0.768
mTDRP1				1	0.907
rTDRP1					1

注：版纳微型猪近交系(p)，人(h)，恒河猴(mm)，小鼠(m)和大鼠(r)。

Note. BMI-pig (p), human (h), *Macaca mulatta* (mm), mouse (m) and rat (r).



注:保守的丝氨酸磷酸位点用空五角形标记(☆),保守的酪氨酸磷酸位点用实五角形标记(★)。

图5 哺乳动物 TDRP1 氨基酸序列比对分析

Note. Serine phosphorylation sites are shown with white sparks (☆), and tyrosine phosphorylation sites are shown with black sparks (★).

Fig. 5 Multiple alignments of amino acids sequences of mammalian TDRP1 protein

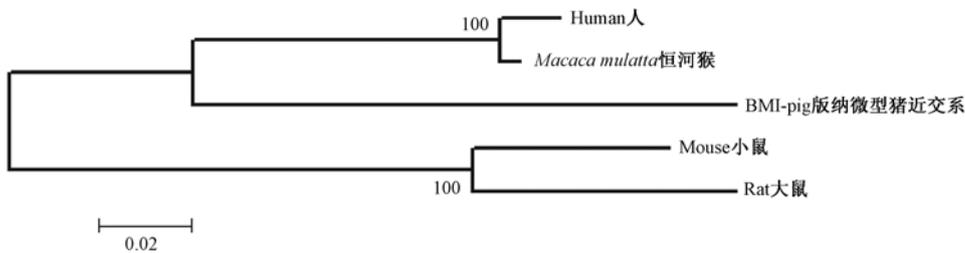


图6 BMI猪、人、恒河猴、小鼠和大鼠的 TDRP1 氨基酸序列构建的分子系统进化树

Fig. 6 The phylogenetic tree for TDRP1 amino acid sequences from BMI-pig, human, *Macaca mulatta*, mouse and rat

3 讨论

本研究以 *TDRP1* 为公猪繁殖性状的候选基因,分析其在 BMI 不育和可育公猪中的序列和 mRNA 表达水平的差异性,并进一步研究了该基因在近交系公猪重要组织中的表达规律。通过分析发现, BMI 不育和可育公猪 *TDRP1* 基因编码序列完全一致,但和参考序列 NM_001198925 相比,在编码区有 2 处同义突变,是一种新的单倍型,已提交 GenBank,基因登录号为 KJ186786,对应的蛋白质登录号为 AHV91001。由于发现的 SNP 位点在不育公猪

和可育公猪中都存在;另外, *TDRP1* 基因在不同个体的睾丸组织中 mRNA 表达水平接近,差异无显著性;故认为 *TDRP1* 基因点突变与 BMI 不育公猪的低繁殖力关系不大。

以 18S 为内参校正的多组织表达谱说明 BMI *TDRP1* 基因在各组织中存在明显的差异表达现象,在精囊腺和前列腺中高表达,在睾丸和小脑中中度表达,在大脑和肾脏中低表达,在其余 11 种组织中不表达,这与 *TDRP1* 在约克夏和香猪中研究结果不太一致^[15-16],但由于在约克夏和香猪没有进行精囊腺和前列腺 *TDRP1* mRNA 表达水平的检测,所以不

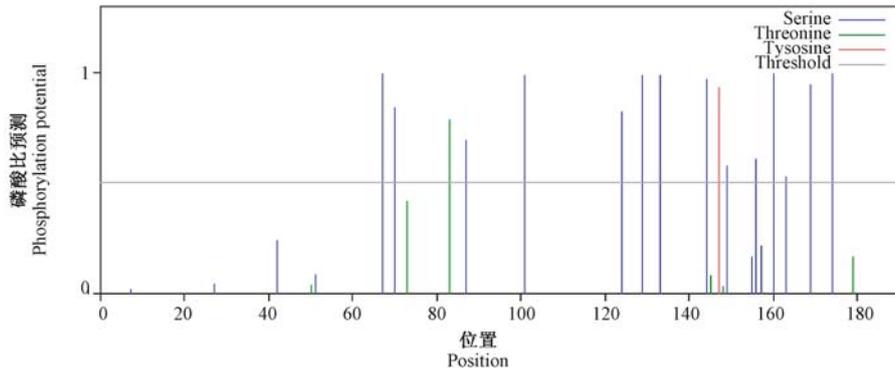
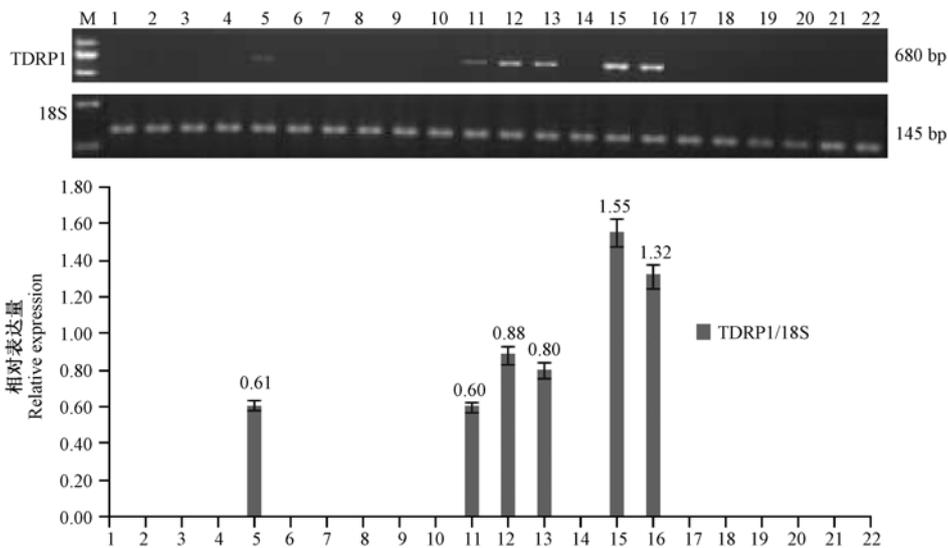


图 7 NetPhos2.0 程序预测的猪 TDRP1 蛋白磷酸化位点

Fig.7 Predicted phosphorylated sites of TDRP1 protein by NetPhos2.0



注: M. DL2000 分子量标准, 1. 心, 2. 肝, 3. 脾, 4. 肺, 5. 肾, 6. 胸腺, 7. 淋巴结, 8. 皮肤, 9. 十二指肠, 10. 胃, 11. 大脑, 12. 小脑, 13. 睾丸, 14. 附睾, 15. 精囊腺, 16. 前列腺, 17. 尿道球腺。

图 8 TDRP1 基因多组织表达谱

Note. M: DL2000 marker; 1: Heart; 2: Liver; 3: Spleen; 4: Lung; 5: Kidney; 6: Thymus; 7: Lymph node; 8: Skin; 9: Duodenum, 10: Stomach; 11: Cerebrum; 12: Cerebellum, 13: Testis; 14: Epididymis; 15: Seminal vesicle; 16: prostate; 17: Bulbourethral gland.

Fig.8 The multi-tissue expression profile of TDRP1 gene

能确定是物种还是试验技术原因造成的差异, 需要进一步的研究确认。人和小鼠的研究认为 TDRP1 发挥功能的主要部位是睾丸^[10], 故关于 TDRP1 基因在 BMI 精囊腺和前列腺高表达的生物学意义尚不清楚。

生物信息学分析显示 BMI TDRP1 蛋白无信号肽, 说明它属于非分泌性蛋白, 是在游离的核糖体上合成的, 会直接释放到细胞质基质中, 不需经过内质网-高尔基体分泌途径的修饰, 只用于构成细胞的自身结构。预测 BMI TDRP1 存在 1 个亮氨酸富集的核输出信号(NES), 而人和猪的 TDRP1 蛋白同样也

有 1 个亮氨酸富集的核输出信号(NES)^[10,17], 该信号的主要功能在于蛋白亚细胞定位, 与精子生成相关; 亚细胞定位预测显示该蛋白位于细胞核的概率是 94.1%, 两者结果基本一致。BMI TDRP1 氨基酸与人、恒河猴、小鼠和大鼠的氨基酸序列比对分析表明相似性高于 73%, 在不同物种间存在较高的同源性。从包括 BMI 在内的 5 个物种 TDRP1 构建的分子系统进化树看, 小鼠和大鼠是啮齿目, 聚为一类; 人和恒河猴均为灵长目, 聚为一类; 猪相对于啮齿目, 与灵长目更为接近, 与其聚为一大类。获得的 5 个物种 TDRP1 蛋白质序列系统进化树与其分类学

地位一致。蛋白质磷酸化是调节和控制蛋白质活力和功能的最基本、最普遍,也是最重要的机制^[18],预测发现了 BMI TDRP1 存在 16 个保守的蛋白质磷酸化位点,其中有 8 个丝氨酸和 1 个酪氨酸磷酸化位点在哺乳动物中高度保守,这些氨基酸基序可能在 TDRP1 蛋白参与精子发生过程中发挥重要的作用。

综上所述,本研究克隆了 BMI *TDRP1* 基因的 cDNA 序列,并对其进行了一些必要的功能预测,研究了其在不育和可育公猪间序列和 mRNA 表达水平的差异性,并进行了多组织表达谱分析。揭示了精囊腺和前列腺是 *TDRP1* 基因 mRNA 表达最高的部位,且发现了 2 处 BMI 特有的 SNP 位点,是一种新的单倍型。研究结果为深入研究 *TDRP1* 基因的功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Zhang L, Li YP, Cheng JQ, et al. Banna minipig inbred line (BMI) liver-derived clotting factors and plasminogen could activate human coagulation and fibrinolysis system [J]. *Transplantation*, 2004, 78(2): 187.
- [2] Wei H, Qing Y, Pan W, et al. Comparison of the efficiency of Banna miniature inbred pig somatic cell nuclear transfer among different donor cells [J]. *PIOS ONE*, 2013, 8(2): e57728.
- [3] Huo JL, Wang P, Zhao Y, et al. Molecular cloning, mRNA expression and characterization of a novel *FAIMI* gene from Chinese Banna mini-pig inbred line (BMI) [J]. *J Anim Vet Adv*, 2012, 11(8): 1080-1086.
- [4] Zeng R, Zeng YZ. Molecular cloning and characterization of *SLA-DR* genes in the 133-family of the Banna mini-pig inbred line [J]. *Animal Genet*, 2005, 36(3): 267-269.
- [5] O' Flynn O' Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(1): 1-12.
- [6] Kimmins S, Kotaja N, Davidson I, et al. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation [J]. *Reproduction*, 2004, 128(1): 5-12.
- [7] Tenaka H, Baba T. Gene expression in spermatogenesis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(3): 344-354.
- [8] 李博, 兰风华. 精子特异性表达基因的遗传多态性与男性不育 [J]. *中华男科学杂志*, 2008, 14(4): 360-363.
- [9] Sutton KA. Molecular mechanisms involved in the differentiation of spermatogenic stem cells [J]. *Rev Reprod*, 2000, 5(2): 93-98.
- [10] Wang X, Jiang H, Zhou W, et al. Molecular cloning of a novel nuclear factor, *TDRP1*, in spermatogenic cells of testis and its relationship with spermatogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(1): 29-35.
- [11] 王配, 霍金龙, 李莲军, 等. 版纳微型猪近交系 *AQP3* 克隆、序列分析及组织表达研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(5): 366-371.
- [12] Wang P, Huo JL, Xiao H, et al. cDNA cloning, sequence identification and tissue expression profile of a novel gene *FAR1* from Banna mini-pig inbred line (BMI) [J]. *J Anim Vet Adv*, 2012, 11(3): 393-399.
- [13] Blitek A, Kaczmarek MM, Kiewisz J, et al. Endometrial and conceptus expression of HoxA10, transforming growth factor beta1, leukemia inhibitory factor, and prostaglandin H synthase-2 in early pregnant pigs with gonadotropin-induced estrus [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2010, 38(4): 222-234.
- [14] Qin CY, Wang P, Wang SY, et al. Complementary DNA cloning, sequence characterization and expression analyses of a novel gene *MFN1* from Chinese Banna mini-pig inbred line (BMI) [J]. *Res J Biotechnol*, 2014, 9(5): 1-8.
- [15] Zhang W, Fang M, Li Y, et al. Identification of *TDRP1* gene and its association with pig reproduction traits [J]. *DNA Cell Biol*, 2012, 31(3): 371-377.
- [16] Liu M, Zhang W, Luo W, et al. Overexpression of *TDRP1* gene in swine testis cell and its global transcriptome analysis [J]. *DNA Cell Biol*, 2013, 32(9): 511-516.
- [17] 张伟, 方梅霞, 聂庆华, 等. 猪 *TDRP1* 基因的电子克隆及生物信息学分析 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2010, 36(6): 672-677.
- [18] 梁前进, 王鹏程, 白燕荣. 蛋白质磷酸化修饰研究进展 [J]. *科技导报*, 2012, 30(31): 73-79.

[收稿日期] 2014-06-21