

## 猪繁殖候选基因 *HoxA10* 的克隆及表达分析

周晓宁<sup>1,2</sup>, 方梅霞<sup>1,3</sup>, 何小梅<sup>1,2</sup>, 聂庆华<sup>1,2\*</sup>, 张细权<sup>1,2</sup>

(1. 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2. 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广东 广州 510642; 3. 暨南大学 医学院, 广东 广州 510632)

**摘 要:** 同源异形盒 *A10* 基因(Homeobox 10 gene, *HoxA10*)是 *Hox* 基因家族中重要一员, 与子宫形态的发生, 生育期子宫内膜的周期性形态发育密切相关, 是与猪繁殖性状相关的重要候选基因。以长白猪为材料, 采用 RT-PCR 方法, 克隆了猪 *HoxA10* 基因, 并用 Real-Time PCR 测定该基因在猪各组织器官中的表达。结果表明, 从猪子宫组织中克隆获得 *HoxA10* 基因 cDNA 长 538 bp, 包括 1 个 285 bp 的开放阅读框, 编码合成 94 个氨基酸残基, 与人和小鼠的 *HoxA* 序列同源性分别为 98.9%和 97.9%; 在猪各组织中, 前肌是 *HoxA10* 基因表达量最高的组织, 其次为肾、子宫、后肌、输卵管、大肠、腹脂等组织, 在垂体、大脑、小脑、丘脑、卵巢、肺、胃、小肠、背肌、背膘中, *HoxA10* 的表达很低或基本无表达。

**关 键 词:** 猪; *HoxA10* 基因; cDNA 克隆; 组织表达

中图分类号: S857.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0060-05

## Cloning and expression analysis of *HoxA10*, a candidate gene influencing reproduction traits in pigs

ZHOU Xiao-ning<sup>1,2</sup>, FANG Mei-xia<sup>1,3</sup>, HE Xiao-mei<sup>1,2</sup>, NIE Qing-hua<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Xi-quan<sup>1,2</sup>

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-Animal Genomics and Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China; 3. Department of Laboratory Animal Science, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** As a key member of *Hox* gene family, the Homeobox A10 gene (*HoxA10*) is an important candidate gene influencing reproduction traits in pigs, which plays important roles in embryonic development and cell differentiation. In this paper, *HoxA10* gene was cloned from a Landrace pig by RT-PCR, and different tissues from the pig were tested by real-time PCR to determine the tissue-specific expression pattern of *HoxA10*. Results showed that the cloned *HoxA10* cDNA of pig was 538 bp long, and it contained an open reading frame (ORF) of 285 bp encoding a peptide of 94 amino acid residues which showed 98.9% and 97.9% sequence identity to that of human and mouse respectively. In all tested pig tissues, *HoxA10* expressed predominantly in forward leg muscle, followed by kidney, uterus, back leg muscle, oviduct, large intestine and abdominal fat. And little or no Expression of *HoxA10* was detected in hypothalamus, cerebrum, cerebellum, thalamus, ovary, lung, stomach, small intestine, dorsal muscles and back fat.

**Key words:** pig; *HoxA10* gene; cDNA cloning; tissue expression

*HoxA10* 是同源框基因(HomeoBox, *Hox*) 亚类 发育等方面有重要作用。*HoxA10* 基因敲除小鼠的腹 B(AbdB)基因成员之一<sup>[1]</sup>, 在生殖与胚胎着床、 子宫输卵管连接处消失, 子宫近侧 25%部分呈输卵

收稿日期: 2010-12-10

基金项目: 农业部转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08006-005; 2009ZX08009-145B); 粤港关键领域重点突破项目(2008A02)

作者简介: 周晓宁(1985—), 女, 陕西宝鸡市人, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种研究, zhouxiaoning.hn@163.com; \*通信作者, nqinghua@scau.edu.cn

管状狭窄卷曲<sup>[2]</sup>。Satokata 等<sup>[3]</sup>的研究证实了这一点, *HoxA10* (−/−) 小鼠可以存活, 但由于子宫内膜缺乏胚胎着床环境, 子宫内膜不能进入容受状态, 导致胚胎死亡, 表现为不孕。雄性动物的研究也显示出生殖障碍。Benson 等<sup>[4]</sup>发现, *HoxA10* (−/−) 突变雄鼠出现双侧隐睾和副性器官以及精子发育障碍等形态异常, 可见, *HoxA10* 基因在生殖器官的完整发育以及胚胎着床过程中有重要的调控作用, 是动物繁殖性状的重要候选基因。近年来, 对 *HoxA* 基因的研究主要集中在对人和啮齿类的研究中。人 *HoxA10* 基因定位于染色体 7p15.3<sup>[2]</sup>。在成人子宫内膜, *HoxA10* 的表达依赖于月经周期, 是子宫蜕膜化过程的一个关键因素<sup>[5]</sup>。李红等<sup>[6]</sup>发现, *HoxA10* 基因在正常育龄妇女和不明原因不孕患者的增殖早、晚期及分泌早期, 子宫内膜腺上皮和间质均有表达, 相互之间无显著差异, 但在分泌中、晚期, 正常育龄妇女子宫内膜的腺体和间质 *HoxA10* 基因 mRNA 有显著高表达。关于啮齿类的研究<sup>[2]</sup>表明, 小鼠 *HoxA10* 基因定位于 6 号染色体。在小鼠胚胎发育过程中, *HoxA10* 基因在苗勒管和成熟子宫内膜中均有表达<sup>[7]</sup>。桂耀庭等<sup>[8]</sup>发现, 在正常人和隐睾症患者的睾丸组织中, *HoxA10* 均有表达, 但是与正常人相比, *HoxA10* 基因在隐睾症睾丸组织的表达显著降低。*HoxA10* 基因在生殖与胚胎着床、发育等方面有重要的作用, 对 *HoxA10* 基因的研究有利于了解猪的繁殖性状, 进而提高猪的繁殖性能。目前对猪 *HoxA10* 基因的研究较少<sup>[9]</sup>, 对猪 *HoxA10* 基因的序列、结构等相关信息都还缺乏研究。笔者在对猪 *HoxA10* 基因生物信息学进行分析

的基础上, 用 RT-PCR、Real-Time PCR 等方法, 研究该基因的克隆及表达, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

于广东省农业科学院畜牧研究所随机选取 120 日龄长白母猪 1 头, 放血屠宰后, 立即采集垂体、大脑、小脑, 丘脑、卵巢、肺、胃、背肌、大肠、腹脂、肝、后肌、淋巴、脾、前肌、肾、输卵管、小肠、子宫、背膘等组织, - 80 ℃ 保存。子宫组织用于 *HoxA10* 基因 cDNA 序列扩增, 所有组织用于基因表达规律分析。

1.2 猪 *HoxA10* 基因预测

将人 *HoxA10* 基因 cDNA 序列 (GeneBank NM\_153715.3) 与猪全基因组序列比对, 定位猪 *HoxA10* 基因。根据人 *HoxA10* 基因信息及外显子-内含子交接的 GT-AG 规则, 对猪 *HoxA10* 基因进行预测, 并对外显子进行拼接, 最终获得猪 *HoxA10* 基因的预测 cDNA 序列及可能的基因结构。

1.3 引物设计

根据预测的猪 *HoxA10* 基因 cDNA 序列, 共设计了 3 对引物 (表 1)。P1 用于猪 *HoxA10* 基因 cDNA 序列扩增; *qs-hoxa* 用于该基因各组织表达分析, *qs-actin* 为内参基因  $\beta$ -actin 引物。所有引物均使用 Genetool 软件设计, 送由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 各引物基本信息  
Table 1 Descriptions of the 3 primers used in this study

基因	引物	序列	退火温度/℃	产物长度/bp
<i>HoxA10</i>	P1	F: 5'-gtcccgctctctctcatcca-3'	58	538
		R: 5'-agccgatgacagaggaggagaa-3'		
<i>HoxA10</i>	<i>qs-hoxa</i>	F: 5'-cggctctgccaggaact-3'	60	383
		R: 5'-ccagccctgcacagatgtaac-3'		
$\beta$ -actin	<i>qs-actin</i>	F: 5'-tgttcgagaccttcaacacc-3'	60	93
		R: 5'-agcacagcttctccttgatg-3'		

1.4 *HoxA10* 基因 cDNA 序列扩增

用常规 Trizol 方法, 抽提猪各组织中总 RNA, 用 TOYOBO 公司的反转录试剂盒将各组织的总

RNA 反转录成 cDNA, 并以看家基因( $\beta$ -actin)引物扩增, 验证反转录是否成功, 将反转录产物 - 20 ℃ 保存备用。以子宫 cDNA 为模板, RT-PCR 扩增 *HoxA10* 基因 cDNA 序列, 10  $\mu$ L 反应体系中包括: 0.4  $\mu$ L

cDNA、0.25U *Taq* DNA polymerase (东盛生物)、12.5 pmol P1 或 P2、5  $\mu$ L 2 $\times$ PCR Reaction Mix, 其余用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 32 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并切胶纯化后连接至 pMD18-T 载体, 转化至大肠杆菌感受态细胞, 进行克隆测序。

## 1.5 猪 *HoxA10* 基因序列分析与功能预测

### 1.5.1 物种间 *HoxA10* 基因 CDS 的同源性分析

登录 NCBI 的 BLAST 程序<sup>[10]</sup>, 在 GenBank 数据库选择“Nucleotide blast”, 将所得到的猪 *HoxA10* 基因 CDS 序列输入 NCBI/Blast 软件的序列输入框内, 选择程序“Megablast”进行同源性检索; 采用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 对猪 *HoxA10* 基因 CDS 序列与 BLAST 得到的其他物种的 *HoxA10* 基因 CDS 序列(图 2)进行同源性比对。

### 1.5.2 蛋白质功能预测

采用 ExPASy 的 ComputePI/MW 程序和 SAPS(statistical analysis of protein sequences), 对 *HoxA10* 基因蛋白序列的相对分子质量、氨基酸组成、等电点进行分析。

采用网上的 motif 数据库进行 motif、结构位点、机构功能域功能预测。

### 1.5.3 9 个物种 *HoxA10* 基因的系统进化分析

利用 MEGA3.1 程序, 对不同动物 *HoxA10* 或 *pHoxA10* 基因的核苷酸序列进行 BLAST 分析, 再计算物种间的同源距离, 并通过邻近归并法构建物种间系统发生树。

## 1.6 荧光定量 PCR

选用 SYBR Green PCR Master Mix(TOYOBO, Japan)试剂盒, 用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)分析仪对各组织 *HoxA10* 基因 mRNA 丰度进行定量检测。不同组织的 *HoxA10* 基因 mRNA 拷贝数使用  $\beta$ -actin 作为内参进行校正。目的基因荧光定量 PCR 引物为 *qs-hoxa*, 内参基因的引物为 *qs-actin*。采用 20  $\mu$ L 反应体系, 其中包括 5  $\mu$ L cDNA

模板, 10  $\mu$ L 2 $\times$ Q-PCR SYBR Green Mix, 0.5  $\mu$ L 的上下游引物, 其余用蒸馏水补齐。每个样本设 3 个重复, 分别使用引物 *qs-hoxa* 和 *qs-actin* 进行扩增。PCR 按 ABI 公司提供的程序和优化后的退火温度进行。PCR 产物特异性使用溶解曲线判定。每个组织 *HoxA10* 基因 mRNA 的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示, 其中,  $\Delta Ct$ =目的基因 *Ct*-内参 *Ct*;  $\Delta\Delta Ct$ =待测样品中目的基因  $\Delta Ct$ -参照样品中目的基因  $\Delta Ct$ (若无参照样品则选择  $\Delta Ct$  最大的样品为参照进行计算, 本试验中以脾脏中目的基因  $\Delta Ct$  为参照)。

## 2 结果

### 2.1 猪 *HoxA10* cDNA 克隆

对猪 *HoxA10* 基因预测的结果显示, *HoxA10* 基因位于猪 18 号染色体正链 44195018—44204802, 由 2 个外显子和 1 个内含子组成, cDNA 序列长 2 247 bp, 预计编码合成 94 个氨基酸残基。RT-PCR 结果显示, 从猪子宫组织中克隆获得 *HoxA10* 基因 cDNA 长 538 bp, 包括 1 个 285 bp 的开放阅读框, 共编码合成 94 个氨基酸残基(图 1), 与预测相同。

```
gtcccgctctccatcccaaaaagagggtccaccctcaagaagtgtggtgtgttaattaaagcagagccc
cttcgctaggccttgaggcgtcgccggcgagagccagctctcccttgccagtgatttcggaatgtgtcaggcgaat
H C Q G N
TCCAAAGGCGAAGACGACCACTGCTCACTGCAAGAGCGCGCGGAGAGCGCTGCCCTACACCAAGCACCAGAGC
S K G E N A A N W L T A K S G R K K R C P Y T K H Q T
CTGGAGCTGGAGAGGAGTTTCTGTTCAACATGTACCTTACTCGAGAGCGCGCGCTAGAGATCAGCCGACGCTCCACCTC
L E L E K E F L F N H Y L T R E R R L E I S R S U H L
ACGACAGACAGTAAATCTGTTTCAGACCCGACGATGAACCTGAGAGAAATGAACGAGAGAAACCGATCCGGAG
T D R Q U K I W F Q N R R H K L K H N R E N R I R E
CTCACAGCACTTAAATTTTCTGATgaagctccaggaagtggtttctttcttcttcttcttcttcttctct
L T A N F N F S .
ttttttcttttttccgctccagagagtcgttctctccctctgtcatcgct
```

划线部分为引物序列。

图 1 猪 *HoxA10* 基因 cDNA 序列

Fig. 1 cDNA sequence of pig *HoxA10* gene

### 2.2 猪 *HoxA10* 基因序列分析与功能预测

#### 2.2.1 物种间 *HoxA10* 基因 CDS 的同源性分析

从 NCBI 网站收集了 9 个物种 *HoxA10* 基因的 CDS 及氨基酸序列(表 2)。用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 对各序列间的同源性进行分析(表 3), 发现猪的 CDS 与牛的同源性最高, 达到 94.7%; 猪的 CDS 与人和小鼠的同源性分别为 90.9%和 90.5%; 氨基酸同源性比对显示, 猪与人、牛的氨基酸同源性达到了 98.9%, 与小鼠的同源性为 97.9%。

表 2  9 个物种 *HoxA10* 的蛋白质和 cDNA 序列

Table 2  Protein and cDNA sequences of <i>HoxA10</i> among 9 species					
编号	中文名	英文名	拉丁文名	核酸序列登录号	蛋白质序列登录号
1	牛	cattle	<i>Bos taurus</i>	NM_001105017	NP_001098487
2	狢猴	macaque	<i>Callithrix jacchus</i>	XM_002751450	XP_002751496
3	狗	dog	<i>Canis familiaris</i>	XM_849064	XP_854157
4	斑马鱼	zebra fish	<i>Danio rerio</i>	NM_131155	NP_571230
5	人	Human	<i>Homo sapiens</i>	NM_153715	NP_714926
6	狢猴	macaque	<i>Macaca mulatta</i>	XM_001093087	XP_001093087
7	小鼠	mouse	<i>Mus musculus</i>	NM_001122950	NP_001116422
8	狢狢	baboon	<i>Papio anubis</i>	NM_001169065	NP_001162536
9	猪	pig	<i>Sus scrofa</i>		

表 3  不同物种 *HoxA10* 基因 CDS 序列及氨基酸序列的同源性比较

Table 3  Homology of <i>HoxA10</i> CDS and its amino acid sequences among different species									
物种	牛	狢猴	狗	斑马鱼	鸡	人	小鼠	狢狢	猪
牛		93.7	95.4	77.5	86.0	96.5	95.8	94.0	94.7
狢猴	95.8		90.4	39.1	60.2	96.1	91.9	96.5	86.3
狗	95.8	95.4		38.2	56.2	91.9	92.3	92.9	88.3
斑马鱼	88.4	52.9	52.0		44.0	78.6	76.5	79.1	70.4
鸡	94.7	70.4	71.6	57.4		84.9	83.2	85.8	79.0
人	98.9	95.8	95.8	88.4	94.7		94.0	96.8	90.9
小鼠	97.9	96.8	96.8	89.4	94.7	97.9		91.8	90.5
狢狢	96.8	96.8	96.8	89.4	95.7	96.8	95.7		88.3
猪	98.9	95.8	95.8	88.4	94.7	98.9	97.9	96.8	

对角线右上部分数字为 CDS 同源性；对角线左下部分数字为蛋白质同源性。

2.2.2  蛋白质功能预测

猪 *HoxA10* 蛋白序列的相对分子质量、氨基酸组成、等电点的分析结果显示，*HoxA10* 蛋白相对分子质量为  $1.15\times10^4$ ，在 94 个氨基酸残基中共包含 22 个强正极性氨基酸(如 K、R)，9 个强负极性氨基酸(如 D、E)，等电点为 10.60，推测为一个碱性氨基酸。

2.3  9 个物种 *HoxA10* 或 *pHoxA10* 基因的系统进化分析

聚类分析显示，9 个物种被划分为界线清晰的 4 个类群，狢猴、狢狢、人等灵长类聚为一类，狗和小鼠聚为一类，鸡和斑马鱼各自成一类(图 2)。

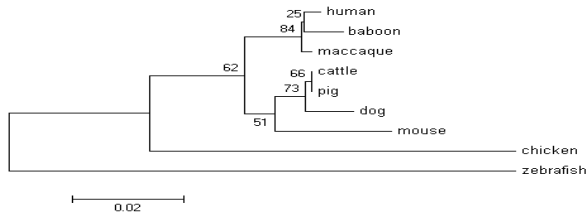


图 2  9 个动物种的系统进化树  
Fig.2  Phylogenetic tree among 9 animal species

2.4  猪 *HoxA10* 基因组织表达

猪 *HoxA10* 基因在很多组织都有表达，其中，前肌的表达量最高，腹脂、后肌、肾、大肠、输卵管、子宫也有较高的表达，脾、淋巴、肝、小肠的表达较低。另外，垂体、大脑、小脑、丘脑、卵巢、肺、胃、小肠、背肌、背膘等 10 种组织中，*HoxA10* 的表达很低或无表达。

3  讨论与结论

本试验中从猪的子宫组织中克隆了 *HoxA10* 基因的 cDNA，其序列长 538 bp，包括一个 285 bp 的 ORF(开放阅读框)，编码 94 个氨基酸残基；144 bp 的 5'UTR 和 109 bp 的 3'UTR；该基因在猪各组织中均有表达，以前肌的表达量最高；其次为肾、子宫、后肌、输卵管等组织；脾、淋巴、肝、小肠的表达较低；在垂体、大脑、小脑、丘脑、卵巢、肺、胃、小肠、背肌、背膘等组织中基本无表达。*HoxA10* 基因在生殖系统的发育以及胚胎着床等生殖过程中有重要作用。*HoxA10* 基因敲除的雌性小鼠会出现胚胎

着床障碍, 雄性小鼠会出现双侧隐睾和副性器官以及精子发育障碍等; 因此, 推测 *HoxA10* 基因在胚胎形成过程中参与调节泌尿生殖管的发育, 也是维持个体生殖力的重要因素<sup>[11]</sup>。通过对本试验获得的 *HoxA10* 序列进行分析, 结果显示, 该基因的 CDS 与牛的同源性最高, 达到 94.7%; 与人和小鼠的同源性分别为 90.9%、90.5%。聚类分析也显示, 猪与牛的亲缘关系最近, 与斑马鱼亲缘关系较远。9 个物种的 *HoxA10* 氨基酸序列系统进化树也与几类动物(灵长类、低等哺乳动物、禽类、鱼类)的分类学及人类对于动物进化的认识一致; 因此, 所获序列为猪 *HoxA10* 基因序列, 与预测的结果相同。据报道, 在人和小鼠中, *HoxA10* 基因均有 2 个转录本, 本试验中只利用人的其中一种转录本为参照进行猪 *HoxA10* 基因的序列预测。同样, 根据人 *HoxA10* 基因的另一种转录本进行预测, 猪 *HoxA10* 基因也与人和小鼠一样存在另一种转录本, 本课题组拟对此预测结果进行验证。

从基因的表达规律看, *HoxA10* 基因在猪的各组织中分布不是很广泛, 以前肌的表达量最高, 肾、子宫、后肌、输卵管等组织也有较高的表达。Blitek 等<sup>[12]</sup>用促性腺激素诱导猪动情, 检测猪早期妊娠在第 10、11、12、15 d 中 *HoxA10* 基因在子宫内膜和孕体中的表达, 发现 *HoxA10* 的表达在第 12 天和第 15 天均明显上调, 表明 *HoxA10* 基因在成年猪的子宫内膜是有表达的。Taylor 等<sup>[7]</sup>也发现, 在小鼠胚胎发育过程中, *HoxA10* 基因在苗勒管和成熟子宫内膜中均有表达。本研究结果也显示, 猪 *HoxA10* 基因在子宫和输卵管中也有较高的表达, 与人和小鼠等类似。猪 *HoxA10* 基因在肾中表达较高, 预示该基因参与调节泌尿生殖管的发育。猪 *HoxA10* 基因在子宫和输卵管的较高表达, 表明该基因与猪的繁殖性状有显著的相关性, 可能是影响猪生殖调控以及与繁殖性状相关的重要的候选基因。

#### 参考文献:

- [1] 周生建, 贾咏存, 杨戎, 等. *HoxA10* 基因在小鼠胚胎着床过程中的作用[J]. 解剖学报, 2008, 4(39): 248-251.
- [2] Apiou F, Flagiello D, Cillo C, et al. Fine mapping of human *Hox* gene clusters [J]. Cytogenet Cell Genet, 1996, 73: 114-115.
- [3] Satokata I, Benson G, Mass R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in *Hoxa-10* deficient mice [J]. Nature, 1995, 374(6521): 460-463.
- [4] Benson G V, Lim H, Paria B C, et al. Mechanisms of reduced fertility in *Hoxa-10* mutant mice: Uterine homeosis and loss of maternal *Hoxa-10* expression[J]. Development, 1996, 122: 2687-2696.
- [5] Modi D, Godbole G. *HOXA10* signals on the highway through pregnancy[J]. J Reprod Immunol, 2009, 83(1/2): 72-78.
- [6] 李红, 陈士岭, 邢福祺, 等. *HOXA10* 基因在子宫内膜组织中的表达及与不孕的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(1): 30-32.
- [7] Taylor H S, Arici A, Olive D, et al. *HOXA10* is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium [J]. J Clin Invest, 1998, 101(7): 1379-1384.
- [8] 桂耀庭, 张立兵, 张键荣, 等. 同源盒基因 *A10* 在人体睾丸组织的表达及其临床意义[J]. 中国男科学杂志, 2006(10): 8-11.
- [9] Zhao X, Du Z Q, Vukasinovic N, et al. Association of *HOXA10*, *ZFPM2*, and *MMP2* genes with scrotal hernias evaluated via biological candidate gene analyses in pigs[J]. Am J Vet Res, 2009, 70(8): 1006-1012.
- [10] 王哲, 黄高升. NCBI 的数据库资源及其应用[J/OL]. 生命科学, 2002, 14(1): 59-62 [2002-02-15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>.
- [11] 陆阳杰, 王介东. *HoxA10* 基因与生殖[J]. 生殖医学杂志, 2000, 6(9): 187-191.
- [12] Blitek A, Kaczmarek M M, 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.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠