

MEHRAN Sidra, 董宝霞, 荆海霞. 牦牛 TRIB3 基因克隆、生物信息学及组织表达差异分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (5): 1-9.

MEHRAN S, DONG B X, JING H X. Cloning of TRIB3 gene in yak and analyzing its bioinformatics and tissue expression difference [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (5): 1-9.

# 牦牛 TRIB3 基因克隆、生物信息学及组织表达差异分析

MEHRAN Sidra<sup>#</sup>, 董宝霞<sup>#</sup>, 荆海霞<sup>\*</sup>

(青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016)

**摘要:** 旨在克隆牦牛毛球族同源蛋白 3 (TRIB3) 基因并进行生物信息学分析, 检测其在牦牛各组织中的表达情况, 为后续探究该基因在牦牛中的功能提供理论依据。试验采集牦牛乳腺组织并以其 cDNA 为模板, 克隆牦牛 TRIB3 基因序列, 通过生物信息学分析了解其生物学特征和结构, 运用荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测 TRIB3 基因在牦牛心脏、肝脏、肺脏、骨骼肌、乳腺及脂肪组织中的表达情况。结果显示: 牦牛 TRIB3 基因 CDS 区全长为 1 074 bp, 共编码 357 个氨基酸, 为不稳定性亲水蛋白; 同源性对比结果显示, 牦牛 TRIB3 编码氨基酸与野牦牛的同源性最高; 系统进化树显示, 野牦牛和野牛与牦牛 TRIB3 基因亲缘关系最近, 最远是小鼠; TRIB3 蛋白属于不稳定亲水性蛋白, 主要存在于细胞核中, 不含信号肽和跨膜结构域; TRIB3 蛋白二级结构含有  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角、无规则卷曲, 分别占 35.85%、9.52%、4.48% 和 50.14%; 蛋白互作分析结果显示, TRIB3 与组成型光形态建成蛋白 1 (COP1)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )、CCAAT 增强子结合蛋白  $\beta$  (CEBP $\beta$ )、激活转录因子 3 (ATF3)、DNA 损伤诱导转录因子 3 (DDIT3)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 (AKT2)、AKT3 和 Twist 相关蛋白 1 (TWIST1) 之间均有紧密联系。RT-qPCR 检测发现 TRIB3 基因在牦牛的不同组织中均有表达, 乳腺组织中的表达量最高。研究结果为进一步探究 TRIB3 基因在牦牛乳腺中的作用和其生物功能提供一定的理论数据。

**关键词:** 牦牛; 毛球族同源蛋白 3; 基因克隆; 生物信息学分析; 组织表达

中图分类号: S852.2 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)05-0001-09

## Cloning of TRIB3 gene in yak and analyzing its bioinformatics and tissue expression difference

MEHRAN Sidra<sup>#</sup>, DONG Baoxia<sup>#</sup>, JING Haixia<sup>\*</sup>

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)

**Abstract:** This study was to clone the yak tribbles homologous protein 3 (TRIB3) gene, and to analyze its bioinformatics and detect its expression difference in yak tissues, so as to lay a foundation for further research on the function of this gene in yak. In the experiment, samples of breast tissue were collected from yak and the cDNA of the tissue was used as a template to clone the yak TRIB3 gene sequence, and the biological characteristics and structure of the sequence were analyzed through bioinformatics. Then, RT-qPCR was used to detect the expression of TRIB3 genes in yak heart, liver, lungs, skeletal muscle, breast and adipose tissue. The results showed that the total length of the CDS region of the TRIB3 gene in yaks was 1 074 bp, encoding a total of 357 amino acids, and it was an unstable hydrophilic protein. The results of homology comparison showed that the amino acid encoding TRIB3 of yak was in the highest homology with that of wild yak. The phylogenetic tree showed that wild yak and buffalo had the closest genetic relationship with the TRIB3 gene of yak, and the farthest was mouse. TRIB3 protein was an unstable hydrophilic protein, which mainly existed in the nucleus and did not contain signal peptide or transmembrane domain. The secondary structure of the TRIB3 protein contained  $\alpha$  helix, extended chain,  $\beta$  turn, and random coil, accounting for 35.85%, 9.52%, 4.48%, and 50.14%, respectively. The results of protein interaction analysis showed that TRIB3 was closely related to COP1, PPARA, CEBP $\beta$ , ATF3, DDIT3, AKT2, AKT3, and TWIST1 proteins. RT-qPCR detection revealed that the TRIB3 gene expressed in different tissues of yak, and the highest expression level of the TRIB3 gene was in yak breast tissue. These results provided theoretical data for further exploring the role of the TRIB3 gene in yak mammary gland and its biological function.

**Keywords:** yak; TRIB3; gene cloning; bioinformatics analysis; tissue expression

收稿日期: 2023-07-01; 修回日期: 2024-02-17

基金项目: 青海省科技厅项目 (2019-ZJ-7025)

第一作者: MEHRAN Sidra, 女, 巴基斯坦, 硕士研究生; 董宝霞, 女, 硕士研究生。<sup>#</sup>共同第一作者

<sup>\*</sup> 通信作者: 荆海霞, 博士, 副教授, 研究方向为高原动物适应生理学, E-mail: jinghaixia1@163.com。

牦牛主要分布于青藏高原及其周边的高寒地区, 被称为“高原之舟”<sup>[1-3]</sup>。泌乳是牦牛的一个重要生产性能, 由于牦牛所生活的青藏高原污染较少, 牦牛的养殖多以自然放牧为主, 这就使牦牛乳汁成为纯净、自然、无污染的优良乳<sup>[4]</sup>。牦牛乳浓稠醇香, 富含多种营养物质, 高蛋白质、高乳脂率和富含矿物质等成为了其极大的优势<sup>[5]</sup>。牦牛乳汁营养价值很高, 易于消化吸收, 氨基酸、脂肪酸、微量元素、钙、磷及生物学活性物质的种类齐全且含量较高, 一直以来都是当地牧民的重要食物和营养来源<sup>[6-7]</sup>。但牦牛奶的膻味很浓, 由于缺乏合理的加工技术, 大多数人无法适应牦牛奶的口味, 使牦牛奶产业的发展受到了很大限制。有研究者推测牦牛乳中的膻味和乳脂脂肪酸有着很大的关系, 这与乳腺组织中乳脂代谢有着密切的关系<sup>[8]</sup>。

毛球族同源蛋白 3 (tribbles homologous protein 3, TRIB3) 作为假性激酶, 最早在果蝇体内发现, 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT) 样基因家族<sup>[9]</sup>, 其家族成员包括 TRIB1、TRIB2 和 TRIB3, 三者都含有 70~100 个氨基酸的 N 端和 25 个氨基酸的 C 端, 彼此间两个末端的氨基酸序列并不完全相同, 但是它们的中间区域都是 AKT 的保守结构域。TRIB3 没有能够与 ATP 结合的相关位点和激活激酶的结构域, 使得该基因没有可以检测到的激酶活性, 因此被称为假性激酶<sup>[10]</sup>。TRIB3 虽然没有催化活性, 但是其生物学功能很广泛, 可参与到细胞增殖分化及凋亡、糖代谢、脂代谢和肿瘤的发生发展等过程中, TRIB3 在其中作为调节蛋白而发挥作用。TRIB3 在哺乳动物中表达水平高且随组织器官的不同, 其表达水平也存在明显的差异。然而, 目前的研究报道中关于 TRIB3 基因在牦牛乳腺上皮细胞中表达的研究很少。

有研究表明, TRIB3 可以直接结合到 AKT 的 PH 区域后抑制其 Thr308 (苏氨酸 308) 和 Ser473 (丝氨酸 473) 位点的磷酸化, 从而使胰岛素信号转导通路受到干扰, 进而抑制脂代谢、糖代谢等主要功能机制<sup>[11]</sup>。Qi 等<sup>[12]</sup>的研究表明, 在禁食期间, 脂肪组织中 TRIB3 的含量明显增加, 主要是因为与泛素连接酶组成型光形态建成蛋白 1 (constitutively photomorphogenic 1, COP1) 直接结合后促进了乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, ACC) 的泛素化和降解, 从而使脂肪的分解增加。Koo 等<sup>[13]</sup>研究表明, 过氧化物酶体增殖物活化受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 通过 PPAR $\alpha$  依赖模式, 协同刺激因子 1 $\alpha$  可诱导 TRIB3 mRNA 的表达, 进而在脂肪细胞的分化过程中起重要调控作用, 这一过程通过影响 AKT 的活性来实现<sup>[14]</sup>。钱波

等<sup>[15]</sup>用含油酸的培养液培养, TRIB3 可以减少  $\beta$  细胞内脂滴的形成, 提示 TRIB3 参与细胞内脂质的代谢。有研究者曾在小鼠腹腔内注射不同浓度的血清游离脂肪酸, 发现 TRIB3 蛋白的表达水平随着试验时间以及血清中所含游离脂肪酸浓度的增加而逐渐升高, 且注射高浓度血清游离脂肪酸后 TRIB3 蛋白表达量显著升高<sup>[16]</sup>。这表明 TRIB3 通过两种不同的途径调控脂代谢, 一是通过影响脂肪合成代谢的关键基因, 二是由外部刺激影响。由此可见, TRIB3 在脂代谢的调控过程中发挥着非常重要的作用。

在人、鼠、猪和羊等物种上的相关研究表明, TRIB3 基因对脂质代谢具有重要的调控作用。本课题组前期对不同泌乳期牦牛乳腺组织转录组测序发现, TRIB3 为调控乳脂合成的关键候选基因, 且显著富集到影响脂质合成代谢的磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信号通路中。然而迄今为止, TRIB3 在牦牛乳腺上皮细胞中的表达及其功能鲜见报道, TRIB3 对牦牛乳腺上皮细胞脂质代谢的调控机制尚不清楚。因此, 本研究拟对牦牛 TRIB3 基因进行克隆, 并对克隆出的序列进行测序及利用相关的软件进行生物信息学分析, 利用荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术对牦牛不同组织中 TRIB3 基因的表达情况进行检测, 了解牦牛 TRIB3 基因的结构和生物学特性, 为后续进一步探索牦牛 TRIB3 基因功能提供理论依据, 为深入探究 TRIB3 基因调控牦牛乳脂代谢的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织样品的采集

在青海某屠宰场选择 3 头泌乳中期雌性牦牛, 分别采集牦牛心脏、肝脏、肺脏、骨骼肌、乳腺及脂肪组织, 置于生理盐水中多次涮洗至无多余血迹后, 75% 酒精浸泡 3~5 s, 生理盐水再次涮洗后剪成 1 mm×1 mm×1 mm 左右的小块, 然后迅速投入液氮中保存备用。

### 1.2 主要试剂和仪器

TRIzol Reagent (15596018, Life Technologies), cDNA 反转录试剂盒 (KR118, TIANGEN), 荧光定量试剂盒 (FP205, TIANGEN), PerfectStart<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (AP141-12, TransGen), PrimeSTAR Max DNA 聚合酶 (R045Q, TaKaRa), pMD19-T 载体原核表达载体 (3271, TaKaRa), 琼脂糖 DNA 纯化回收试剂盒 (EG101-01, TransGen), Hind III 限制性内切酶 (1060S, TaKaRa), XbaI (1093S, TaKaRa), 普通质粒提取试剂盒 (EM101-01, TransGen), 高纯度质粒中量提取试剂盒 (EM111-01, TransGen),

DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞 (9057, TaKaRa)。氨苄青霉素、液体 LB 培养基、固体 LB 培养基、50 $\times$ TAE 电泳缓冲液均购自索莱宝生物科技有限公司。引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

RNA 浓度测定仪 (Implen NP80 Mobile, 德国), 梯度 PCR 仪 (ProFlex PCR, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 (RocheLightCycler 480, 德国), Bio-RAD 恒

压恒流电泳仪与电槽 (164-5070, 美国), 凝胶成像仪 (Bio-RADXR, 美国)。

### 1.3 引物设计

根据 NCBI 上公布的 TRIB3 基因 (基因号: 102288142) 及  $\beta$ -actin 基因 (基因号: 102286048) 序列, 利用 Oligo 7.0 软件设计引物 (表 1)。

表 1 TRIB3 引物序列

基因	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃	产物长度/bp	用途
TRIB3	F: <u>CCCAAGCTT</u> ATGCGAGCAAGCCCC R: GCTCTAGATCAGCCATAGACCCATATCTCTTTCT	61	1 074	基因克隆
TRIB3	F: CACCTGCTCCTGTCATGCT R: ACACCTTGCAGATGTACTCCG	60	138	RT-qPCR
$\beta$ -actin	F: TGTTAGCTGCGTTACACCCT R: CTGTCACCTTCACCGTTCC	58	168	RT-qPCR

注: 序列下划线处分别为基因上、下游引物的限制性内切酶 *Hind* III、*Xba* I 的酶切位点。

### 1.4 牦牛各组织总 RNA 的提取

将提取 RNA 所要用的器皿等提前进行消毒灭菌, 在 2 mL 离心管中分别加入 1 mL TRIzol 后在冰上待用。称取 0.1 g 组织块于研钵中研磨, 研磨至粉末后转入有 TRIzol 试剂的 2 mL 离心管中, 混匀, 室温放置 5 min。按照 TRIzol 法提取各组织总 RNA。提取出来的 RNA 用分光光度计测定浓度和质量, 凝胶电泳检测其完整性后, 置于 -80 °C 保存。

### 1.5 牦牛各组织 cDNA 的合成

以上一步得到的 RNA 为模板, 按照反转录试剂盒的相关步骤及体系进行操作合成 cDNA, 检测浓度及质量后 -20 °C 保存备用。

### 1.6 牦牛 TRIB3 基因 CDS 区扩增

以牦牛乳腺组织 cDNA 为模板扩增 TRIB3 基因, 用 TRIB3 基因的特异性引物, 用 PerfectStart<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase 进行 PCR 扩增, 反应总体积为 50  $\mu$ L, 分别加入 cDNA 2  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L, 10 $\times$  TransStart Taq Buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4  $\mu$ L, TransStart Taq DNA Polymerase 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 36  $\mu$ L。

PCR 扩增程序: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增结束后, 琼脂糖凝胶电泳检测产物, 正确的条带进行切胶并称重, 然后用胶回收试剂盒将其纯化并回收。

### 1.7 连接及转化

将回收后的片段与 pMD19-T 载体进行连接, 体系总体积为 10  $\mu$ L, 分别包括上步所回收的片段

4  $\mu$ L, pMD19-T 载体 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L。

轻弹离心管混匀反应物, 离心, 16 °C 过夜连接后进行转化, 步骤如下: 将保存完好的 DH5 $\alpha$  取出后迅速放于冰上待其融化后与连接产物混匀, 放于冰上 30 min。提前将水浴锅温度调至 42 °C, 待静置完成后于其中热激 90 s, 再轻柔放于冰上静置 2 min。将上述混合物与 900  $\mu$ L LB 液体培养基混匀, 置于 37 °C 摇床上, 150 r/min 1 h, 之后离心机 5 000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀并制成悬液; 提前打开无菌操作台的紫外等进行灭菌消毒, 玻璃棒进行仔细擦拭以彻底消毒, 在每个 LB 固体培养基上均匀涂布接种 50  $\mu$ L 混悬液, 37 °C 恒温条件下过夜培养。第 2 天从长出单克隆菌落的培养皿内选择合适的菌落挑进含有氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 液体培养基中, 37 °C 条件下培养 16 h。

### 1.8 质粒提取及鉴定

采用普通质粒提取试剂盒提取菌体质粒, 以质粒为模板克隆 TRIB3 基因, 体系中分别加入 1  $\mu$ L 质粒, 10  $\mu$ L 2 $\times$  PrimeSTAR Max Premix, 上、下引物各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。

反应条件为: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 61 °C 5 s, 72 °C 10 s, 共 30 个循环; 72 °C 3 min, 4 °C 10 min。用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 将大小正确条带的阳性质粒送北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序。

### 1.9 序列分析

对测序所得到的序列进行分析, 分析软件及工具见表 2。

表 2 序列分析工具及内容

分析工具	分析内容
DNAMAN 5.0	氨基酸序列翻译
ProtParam	理化性质
ProtScale	亲/疏水性
NetPhos 3.1 Server	磷酸化位点
SIGNALP-4.1	信号肽
Cell-PLoc2.0	亚细胞定位
TMHMM	跨膜结构域
ExPASy	二级结构
Phyre2	三级结构
STRING	蛋白互作分析
NCBI	同源性比对
MEGA 7.0	构建系统进化树

### 1.10 RT-qPCR 检测

RT-qPCR 体系 (20  $\mu$ L) 按照试剂盒说明书所提供的进行选择。反应程序如下: 95  $^{\circ}$ C 15 min; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。

### 1.11 数据统计与分析

目的基因和内参基因的每个组织样本均设置 9 个重复。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算所检测基因的表达量, 通过 IBM SPSS Statistics 26、GraphPad Prism 5 软件分析 TRIB3 基因在牦牛各组织间的差异显著性并绘制柱状图。试验数据用“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 牦牛 TRIB3 基因克隆

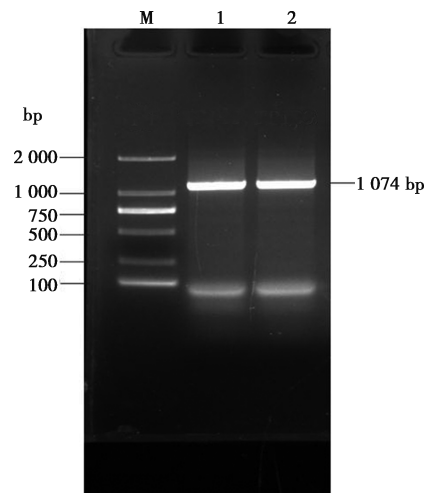
试验以牦牛乳腺组织 cDNA 为模板克隆得到 TRIB3 基因 CDS 区片段, 所得到的产物由琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果显示其条带单一且清晰, 片段长度为 1 074 bp (图 1), 符合预期大小。阳性质粒送公司测序后确定其为牦牛 TRIB3 基因序列。

### 2.2 牦牛 TRIB3 基因序列分析

#### 2.2.1 牦牛 TRIB3 基因系统进化树构建

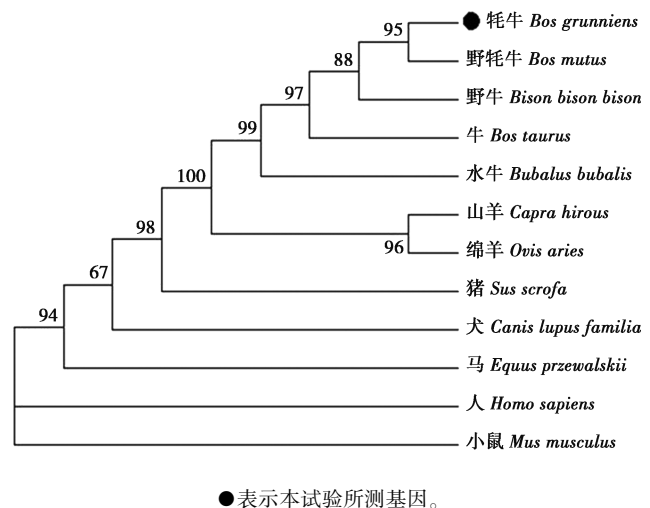
参考 NCBI 中不同物种的 TRIB3 基因序列, 利用 MEGA 7.0 软件对已测序得到的牦牛 TRIB3 基因 CDS 区及野牦牛 (XM\_005887950.2)、牛 (XM\_005887950.2)、野牛 (XM\_010841890.1)、水牛 (XM\_025263714.2)、绵羊 (XM\_042229968.1)、山羊 (XM\_018057667.1)、猪 (XM\_013983169.2)、犬 (XM\_038433403.1)、马 (XM\_008529215.1)、人 (NM\_001301196.1) 和小鼠 (NM\_175093.2) TRIB3 基因编码的氨基酸序列进行同源性对比, 构建系统进化树 (图 2)。依据进化树分析的亲缘关系结果可知, 牦牛 TRIB3 编码的氨基酸与野牦牛、野牛、

牛、水牛、山羊、绵羊、猪、犬、马、人和小鼠编码氨基酸同源性分别为 100%、99.44%、99.91%、98.70%、96.74%、96.09%、86.69%、85.02%、87.89%、82.13%、82.11%。与牦牛 TRIB3 基因亲缘关系最近的是野牦牛和野牛, 最远是小鼠。



M. DNA Marker; 1~2. TRIB3 基因产物。

图 1 牦牛 TRIB3 基因克隆



●表示本试验所测基因。

图 2 牦牛 TRIB3 氨基酸序列进化树

#### 2.2.2 理化性质分析

从理化性质预测结果可知, 牦牛 TRIB3 蛋白编码区共有 5 571 个原子, 分子质量为 39.66 kDa, 分子式为  $C_{1759}H_{2781}N_{515}O_{500}S_{16}$ , pI 是 7.21。编码的 357 个氨基酸 (图 3) 共包含 20 种氨基酸 (表 3), 其中, 亮氨酸 (Leu) 的含量最多, 占比为 13.7%, 而占比均为 1.1% 的天冬酰胺 (Asn) 和色氨酸 (Trp) 含量最少。牦牛 TRIB3 蛋白肽链 N 末端为蛋氨酸 (Met)。氨基酸负电残基 (Asp + Glu) 和正电残基 (Arg + Lys) 的总数相同, 均为 44 个。TRIB3 蛋白半

衰期为 30 h，不稳定性指数为 71.79 (>40)，表明该蛋白质为不稳定蛋白质。脂溶指数为 85.63，总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.335，表明牦牛 TRIB3 蛋白是一个亲水性蛋白。

### 2.2.3 亲/疏水性预测

由 TRIB3 蛋白的亲/疏水性预测结果 (图 4) 可知，其 153 位的 Arg 疏水性最强，分值为 -2.822；251 位的 Leu 是亲水性最强的位置，分值为 2.333。从图中可以看到，TRIB3 蛋白亲水性区域 (负分值) 明显比疏水性区域 (正分值) 多，表明 TRIB3 蛋白为亲水性蛋白。

```

10      20      30      40      50      60
MRASPLAVPA NAPSRRKRL E LDDDLDT ECP SQKQARSQP Q PRLPSCPLTL NPPPAVPHAF

70      80      90      100     110     120
DVTTPSR LQP YVLLPEEGS RTYRALHCPT GTEYICKVYP ACERLAVLEP YWR LPHGHV

130     140     150     160     170     180
ARPAEVLGAT QLLYAFFLRP HGD MHS LVR RRRLPEPEAA ALFRQMAAAL AHCHQHGLVL

190     200     210     220     230     240
RDLKLRRFVF TDRERTKLV ENLEDACVLT GPDDSLWDKH ACPAYVGP EI LSSRASVSGK

250     260     270     280     290     300
AADVWSL GVA LFTMLAGHYP FQDSEPAL LF GKIRRGAFAL PEGLSAPARC LVRCLLRREP

310     320     330     340     350
TERLTASGIL LHPWLR ENAI PAALPRSRHC EADQVVP EGP GLEEAEEEGE RDMGLY
    
```

图 3 TRIB3 基因 CDS 区编码的氨基酸序列

表 3 牦牛 TRIB3 蛋白的氨基酸组成

氨基酸	数量/个	频率/%	氨基酸	数量/个	频率/%
丙氨酸 (Ala, A)	40	11.2	赖氨酸 (Lys, K)	9	2.5
精氨酸 (Arg, R)	35	9.8	蛋氨酸 (Met, M)	5	1.4
天冬酰胺 (Asn, N)	4	1.1	苯丙氨酸 (Phe, F)	9	2.5
天冬氨酸 (Asp, D)	16	4.5	脯氨酸 (Pro, P)	37	10.4
半胱氨酸 (Cys, C)	11	3.1	丝氨酸 (Ser, S)	18	5.0
谷氨酰胺 (Gln, Q)	8	2.2	苏氨酸 (Thr, T)	14	3.9
谷氨酸 (Glu, E)	28	7.8	色氨酸 (Trp, W)	4	1.1
甘氨酸 (Gly, G)	22	6.2	酪氨酸 (Tyr, Y)	10	2.8
组氨酸 (His, H)	14	3.9	缬氨酸 (Val, V)	19	5.3
异亮氨酸 (Ile, I)	5	1.4	吡咯赖氨酸 (Pyl, O)	0	0
亮氨酸 (Leu, L)	49	13.7	硒代半胱氨酸 (Sec, U)	0	0

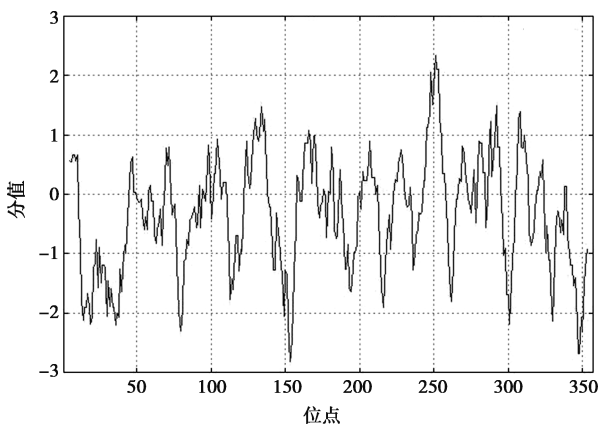


图 4 牦牛 TRIB3 蛋白亲/疏水性预测

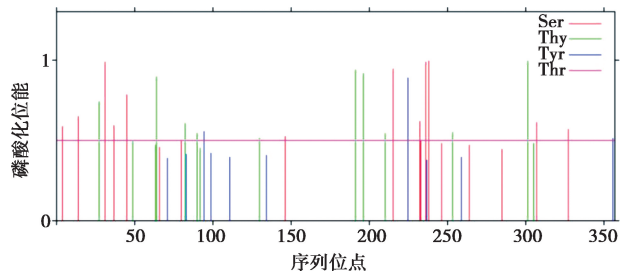


图 5 牦牛 TRIB3 蛋白磷酸化位点预测

### 2.2.4 磷酸化位点和信号肽预测

牦牛 TRIB3 蛋白的磷酸化位点分析结果显示 (图 5)，Ser、Thr、Tyr 磷酸化位点分别为 12、10 和 3 个。牦牛 TRIB3 蛋白信号肽预测发现其不存在信号肽 (图 6)。

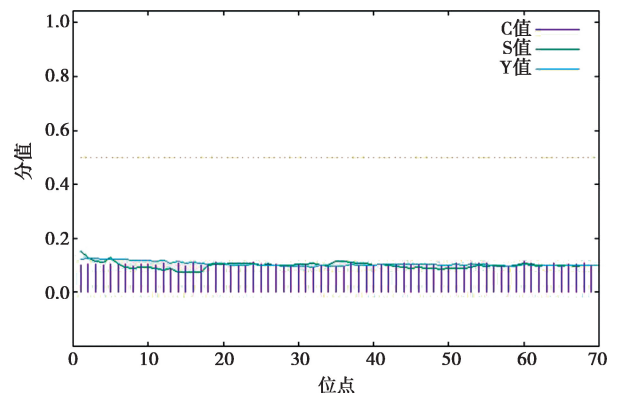


图 6 牦牛 TRIB3 蛋白信号肽预测

### 2.2.5 亚细胞定位和跨膜结构域预测

亚细胞定位结果显示牦牛 TRIB3 蛋白主要定位在细胞核中。跨膜区预测后发现该蛋白不存在跨膜结构域 (图 7)。

### 2.2.6 保守结构域预测

利用相应的预测软件对 TRIB3 蛋白保守结构域进行预测, 结果显示 (图 8), 该蛋白 74~315 位氨基酸处属于 PKc 类 (PKc-like) 超家族, 主要的组成包括 Ser/Thr 特异性蛋白激酶及 Tyr 特异性 PK 域。这些蛋白质能够催化 ATP 发生反应, 将  $\gamma$ -磷酸基转移到特定底物 (如蛋白质的 Ser、Thr 或 Tyr 残基)

中的羟基上。

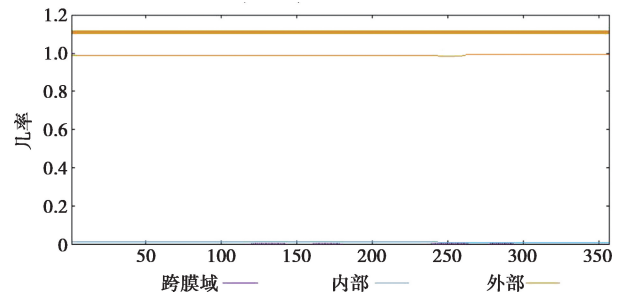


图 7 牦牛 TRIB3 蛋白跨膜结构域预测

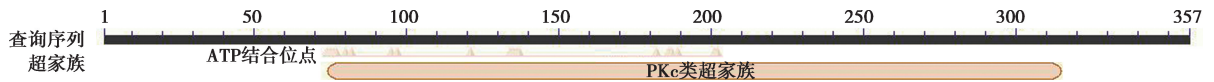
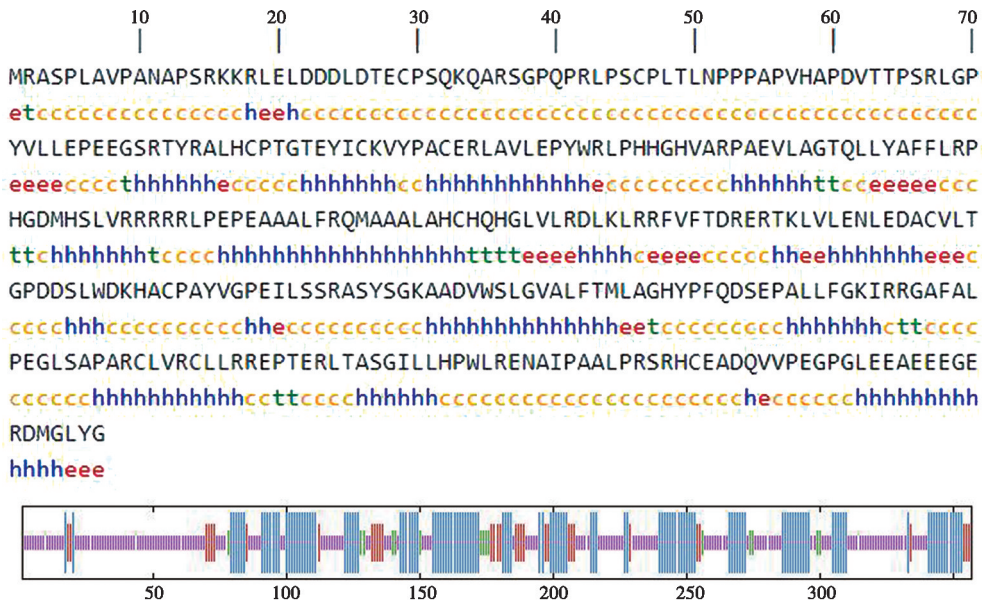


图 8 牦牛 TRIB3 蛋白保守结构域预测

### 2.2.7 二级结构和三级结构预测

牦牛 TRIB3 蛋白二级结构预测结果显示, 其中包含  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角、无规则卷曲, 数量分别为 128、34、16、179, 占比分别为 35.85%、

9.52%、4.48%和 50.14% (图 9)。利用 Phyre2 在线软件对牦牛 TRIB3 蛋白的三级结构进行预测, 所构建出来的三级结构与预测的一致, 而且其与二级结构的预测结果也是相符的 (图 10)。



线条从长到短依次代表  $\alpha$ -螺旋 (h)、延伸链 (e)、 $\beta$ -转角 (t) 及无规则卷曲 (c)。

图 9 牦牛 TRIB3 蛋白二级结构预测

### 2.2.8 TRIB3 蛋白质互作分析

运用 STRING 在线软件对牦牛 TRIB3 蛋白进行蛋白互作分析, 结果显示 TRIB3 与 COP1、PPAR $\alpha$ 、CCAAT 增强子结合蛋白  $\beta$  (CEBP $\beta$ )、激活转录因子

3 (ATF3)、DNA 损伤诱导转录因子 3 (DDIT3)、AKT2、AKT3 和 Twist 相关蛋白 1 (TWIST1) 之间有着相互作用 (图 11)。

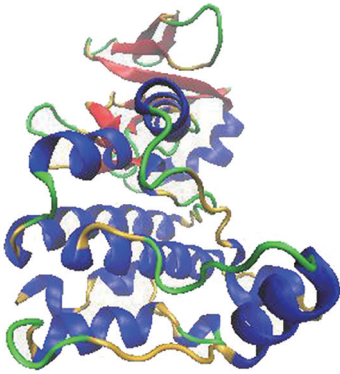


图 10 牦牛 TRIB3 蛋白三级结构预测

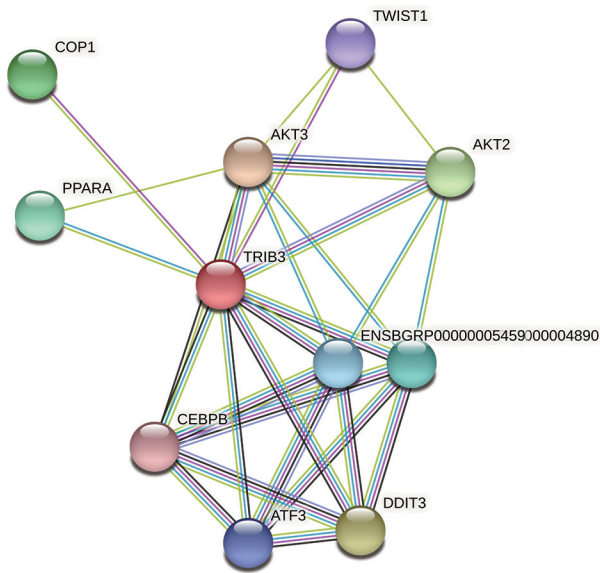


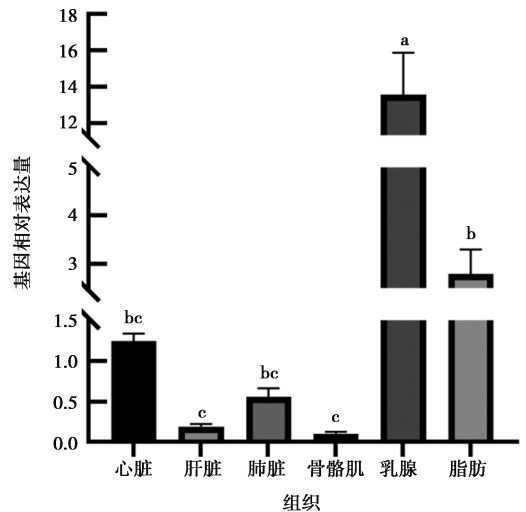
图 11 牦牛 TRIB3 蛋白网络互作分析

### 2.3 牦牛 TRIB3 基因组织表达

如图 12 结果显示, 乳腺组织中 TRIB3 基因的表达量显著高于其他组织 ( $P < 0.05$ ), 骨骼肌组织其表达量最低, 显著低于乳腺和脂肪组织 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

TRIB3 是一种蛋白激酶抑制剂, 参与细胞凋亡、应激反应、转录、调控等一系列生物过程。TRIB3 基因含有 3 个结构区域: 中心假性蛋白激酶区, N 末端及 C 末端蛋白结合域。C 末端是蛋白同源区域, 分为 E3 泛素连接酶 COP1 结合域和激酶结合域<sup>[17-19]</sup>。N 末端具有蛋白结合位点, 可使蛋白定位于细胞核。中心区因为缺少 ATP 特异性结合位点和催化核心, 因此称为中心假性蛋白激酶区, 但中心区可与多种底物蛋白结合, 抑制激酶与底物反应, 从而参与调控多条信号通路<sup>[20]</sup>, 使 TRIB3 在代谢、应激、增殖及分化过程中都占据重要地位<sup>[21-26]</sup>。



不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 12 牦牛 TRIB3 基因在不同组织中的表达

克隆得到的序列测序验证比对结果正确之后, 紧接着对其进行生物信息学的相关分析。分析结果显示, 克隆得到的牦牛 TRIB3 基因 CDS 区长 1 074 bp, 所编码的 357 个氨基酸共包含 20 种氨基酸, 其中 Leu 的含量最多, Asn 和 Trp 含量最少, 其肽链 N 末端为 Met。负电荷氨基酸总数和正电荷氨基酸总数都是 44 个。Leu 在生物机体内的作用很大, 其可以作为能量来源给机体供能, 激活机体内的细胞, 还能帮助抵抗有害细菌和微生物的入侵或伤害。另外, Leu 还可以参与蛋白质合成, 与其他氨基酸协同作用调控糖代谢和脂代谢的相关基因, 达到控制血糖的作用以及促进体内脂肪的燃烧, 减少脂肪的沉积<sup>[27-30]</sup>。这与 TRIB3 调控脂代谢的作用也是相符合的。

TRIB3 蛋白的不稳定性指数为 71.79 ( $> 40$ ), 半衰期为 30 h, 脂溶指数为 85.63, 亲水性总平均值为 -0.335, 说明牦牛 TRIB3 蛋白为不稳定亲水性蛋白。该蛋白中 Ser 和 Thr 的磷酸化位点占总磷酸化位点的 88%, 表明牦牛 TRIB3 蛋白可能是通过 Ser 和 Thr 的磷酸化来调控牦牛的乳脂代谢, 这与 Du 等<sup>[31]</sup>的研究结果相似。分析结果发现该蛋白完全不包含任何信号肽和跨膜结构域, 于是推测 TRIB3 蛋白不属于分泌性蛋白, 且其在合成之后不需要进行跨膜转运。二级结构预测结果显示, 其  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角、无规则卷曲占比分别为 35.85%、9.52%、4.48% 和 50.14%, 无规则卷曲的占比最大, 表明该蛋白在结构上不稳定。预测结果显示 TRIB3 蛋白没有跨膜结构域, 表明 TRIB3 发挥其对机体的生物调控作用是通过作用或者影响其他蛋白质来实现的。目前已有大量的研究表明, TRIB 蛋白家族的所有成员都是具有

激酶区的,但是,该区域内本应该有的关键催化序列被其他序列取而代之,因此并不具有相应的激酶催化活性,本研究的预测分析结果与此结论一致。从蛋白互作预测的结果来看,TRIB3与COP1、PPAR $\alpha$ 、CEBP $\beta$ 、ATF3、DDIT3、AKT2、AKT3和TWIST1等蛋白彼此间均有紧密联系,这可能就是TRIB3参与生物机体的各种代谢过程的一个途径。目前,已经有相关的研究表明,TRIB3能够使AKT的磷酸化活性降低或被抑制<sup>[32-33]</sup>。此外,有研究报道TRIB3可以负向调控脂肪细胞的分化增殖,且在脂肪细胞的分化过程中TRIB3基因的表达显著降低,这一作用可能是由于对ACACA、PPAR $\alpha$ 等的表达产生阻碍作用而影响其作用的发挥。本研究还发现,与牦牛TRIB3基因亲缘关系最近的是野牦牛,并且在反刍动物中的同源性均在96%以上,说明该基因的进化过程在反刍动物中具有高度的保守性。在郭忠秀<sup>[34]</sup>的研究中提到,在多种生物的不同器官组织中都有发现并检测到该基因,但是表达水平有着组织细胞特异性,他们发现人和小鼠体内的TRIB3在肝组织中的表达量最高。在本研究中发现牦牛TRIB3基因在乳腺组织中表达量比其他组织高,而且差异极显著。根据这些结果可以推断出,TRIB3可能在牦牛乳腺的发育及乳脂生成的生物过程中发挥着重要的调控功能。

#### 4 结论

本试验成功克隆了牦牛TRIB3基因,全长1 074 bp,其编码的357个氨基酸共包含20种氨基酸,Leu的占比为13.7%,为含量最多的氨基酸;TRIB3蛋白质的分子量为39.66 kDa,属于不稳定亲水性核蛋白质,没有发现任何信号肽和跨膜结构域,共有25个磷酸化位点,其与多种蛋白之间存在互作关系;与牦牛TRIB3亲缘关系最近的是野牦牛。TRIB3基因在牦牛心脏、肝脏、肺脏、骨骼肌、乳腺、脂肪组织中均有表达,且在乳腺中表达量最高,表明TRIB3基因可能对牦牛乳腺泌乳有重要的作用。

#### 参考文献:

[1] 张越杰,王芳.我国牦牛市场与产业调查分析报告[J].农产品市场,2021,23:54-55.

[2] 马志杰,钟金城,韩建林,等.牦牛分子遗传多样性研究进展[J].遗传,2013,35(2):151-160.

[3] 施奇静,王静,孙军平,等.中国牦牛资源保护及可持续利用:驯化与品种培育[J].家畜生态学报,2016,37(1):81-86.

[4] 李亚茹,郝力壮,刘书杰,等.牦牛乳与其他哺乳动物乳常规营养成分的比较分析[J].食品工业科技,2016,37(2):

379-383.

[5] 郭宪,裴杰,王宏博,等.牦牛乳及乳产品的研究与开发利用[J].安徽农业科学,2014,42(19):6256-6257.

[6] 崔光欣.青藏高原高寒植物及牦牛奶抗氧化特性研究[D].兰州:兰州大学,2016.

[7] SUN W, LUO Y, WANG D H, et al. Branched chain fatty acid composition of yak milk and manure during full-lactation and half-lactation [J]. Prostag Leukotr Ess, 2019, 150: 16-20.

[8] HA J K, LINDSAY R C. Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases [J]. J Dairy Sci, 1993, 76(3): 677-690.

[9] OHOKA N, YOSHII S, HATTORI T, et al. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death [J]. EMBO J, 2005, 24(6): 1243-1255.

[10] MATSUSHIMA R, HARADA N, WEBSTER N, et al. Effect of TRB3 on insulin and nutrient-stimulated hepatic p70 S6 kinase activity [J]. J Biol Chem, 2006, 281(40): 29719-29729.

[11] 谢国璐. TRIB3 基因沉默改善 2 型糖尿病大血管病变的实验研究 [D]. 济南: 山东大学, 2012.

[12] QI L, HEREDIA J, ALTAREJOS J, et al. TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 312(5781): 1763-1766.

[13] KOO S, SATOH H, HERZIG S, et al. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- $\alpha$ -dependent induction of TRB-3 [J]. Nat Med, 2004, 10(5): 530-534.

[14] LEAVENS K, EASTON R, SHULMAN G, et al. Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance [J]. Cell Metab, 2009, 10(5): 405-418.

[15] 钱波,余瑞,汤铜,等. TRIB3 在高糖诱导的胰岛细胞凋亡中的作用及机制 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43(7): 90-93.

[16] QIN J, FANG N, LOU J, et al. TRB3 is involved in free fatty acid-induced INS-1-derived cell apoptosis via the protein kinase C  $\delta$  pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96089.

[17] MANNING G, WHYTE D B, MARTINEZ R, et al. The protein kinase complement of the human genome [J]. Science, 2002, 298(5600): 1912-1934.

[18] 蔡曼妮,韩向阳,黄咏东,等.假性蛋白激酶3在结肠息肉癌变过程中的表达意义[J].中华普通外科学文献(电子版),2020,14(6):439-442.

[19] EYERS P A, KEESHAN K, KANNAN N. Tribbles in the 21st century: the evolving roles of tribbles pseudokinases in biology and disease [J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(4): 284-298.

[20] YOKOYAMA T, NAKAMURA T. Tribbles in disease: signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation [J]. Cancer Sci, 2011, 102(6): 1115-1122.

[21] BASATVAT S, CARTER D A, KISS-TOTH E, et al. Tribbles role in reproduction [J]. Biochem Soc Trans, 2015, 43(5): 1116-1121.

[22] PRUDENTE S, TRISCHITTA V. The TRIB3 Q84R polymorphism, insulin resistance and related metabolic alterations [J]. Biochem Soc T, 2015, 43(5): 1108-1111.

[23] JOHNSTON J, BASATVAT S, ILYAS Z, et al. Tribbles in inflammation [J]. Biochem Soc Trans, 2015, 43(5): 1069-1074.

[24] HUA F, HU Z W. TRIB3-P62 interaction, diabetes and autophagy

- [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (33): 47.
- [25] TI Y, XIE G L, WANG Z H, et al. Tribbles 3: a potential player in diabetic aortic remodelling [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2016, 13 (1): 69-80.
- [26] MONDAL D, MATHUR A, CHANDRA P K. Tripping on TRIB3 at the junction of health, metabolic dysfunction and cancer [J]. *Biochimie*, 2016, 124: 34-52.
- [27] 代文婷. 亮氨酸对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白合成影响和机理研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [28] NORTON L E, LAYMAN D K, BUNPO P, et al. The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats [J]. *J Nutr*, 2009, 139 (6): 1103-1109.
- [29] SUGAWARA T, ITO Y, NISHIZAWA N, et al. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet [J]. *Amino Acids*, 2009, 37 (4): 609-616.
- [30] FREUDENBERG A, PETZKE K J, KLAUS S. Dietary *L*-leucine and *L*-alanine supplementation have similar acute effects in the prevention of high-fat diet-induced obesity [J]. *Amino Acids*, 2013, 44 (2): 519-528.
- [31] DU K, HERZIG S, KULKARNI R N, et al. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver [J]. *Science*, 2003, 300 (5625): 1574-1577.
- [32] IYNEDJIAN P B. Lack of evidence for a role of TRB3/NIPK as an inhibitor of PKB-mediated insulin signalling in primary hepatocytes [J]. *Biochem J*, 2005, 386 (Pt 1): 113-118.
- [33] SALAZAR M, LORENTE M, GARCÍA-TABOADA E, et al. TRB3 suppresses tumorigenesis by controlling mTORC2/AKT/FOXO signaling [J]. *Mol Cell Oncol*, 2015, 2 (3): e980134.
- [34] 郭忠秀. 高糖刺激下 Tribble3 在人脐静脉内皮细胞中的表达及其与凋亡的关系 [D]. 济南: 山东大学, 2009.

· 广告 ·

## 倡导健康养殖新理念 解读疫病防控新技术

### 欢迎订阅 2024 年《畜牧与兽医》

ISSN 0529-5130, CN 32-1192/S

《畜牧与兽医》月刊由教育部主管、南京农业大学主办。1935 年创刊，由原中央大学畜牧兽医系编辑出版，著名兽医学家罗清生教授任主编，至今已有 89 年的办刊历史。始终遵循“为社会服务，为畜牧生产服务”和“理论与实践相结合，普及与提高并举”的办刊宗旨。本刊连续入选中国科技核心期刊（中国科技论文统计源期刊）、《中文核心期刊要目总览》，先后荣获华东地区优秀期刊、江苏期刊方阵双效期刊、江苏省优秀科技期刊、全国高校优秀期刊、全国畜牧兽医类优秀期刊等。

**读者对象：**畜牧、兽医科技工作者和大专院校师生等。

**主要内容：**主要刊登畜牧、兽医两学科各领域的研究报告、文献综述等。主要栏目有遗传繁育、动物营养、环境卫生、基础兽医、预防兽医、临床兽医和专题综述等。

**征订办法：**本刊为月刊，大 16 开，定价：28.00 元，全年 12 期共 336.00 元。邮发代号：28-42，全国各地邮局均可订阅。邮局漏订者可直接汇款至本刊杂志社补订。

地 址：江苏省南京市卫岗 1 号南京农业大学内 邮 编：210095

电话：025-84395701（编辑部） E-mail: muyizz@njau.edu.cn