

鸡 *FBXO38* 转录剪接体 1 的克隆、 表达和功能分析 *

张志威^{1, 2, 3)} 孙婴宁^{1, 2, 3, 4)} 荣恩光^{1, 2, 3)} 李 辉^{1, 2, 3)} 王 宁^{1, 2, 3)**}

⁽¹⁾ 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030; ⁽²⁾ 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030;

⁽³⁾ 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; ⁽⁴⁾ 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要 F-box 蛋白(F-box proteins)广泛存在于真核生物, 并且成员众多, 功能多样. FBXO 蛋白是一类 C 端没有亮氨酸重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)和 WD 重复序列(WD repeats)的 F-box 蛋白. 本研究利用 PCR 和克隆测序的方法从鸡腹部脂肪组织获得一个未知全长编码区序列(coding sequence, CDS), 序列分析显示, 该序列是鸡 *FBXO38* 的一个转录体, 本研究将其命名为鸡 *FBXO38* 基因转录本 1(gallus gallus *FBXO38* transcript variant 1, *gFBXO38t1*). Real-time reverse transcriptase-PCR 分析显示, *gFBXO38t1* 广泛表达于肉鸡多种组织, 其中胰腺、回肠和腹部脂肪组织中表达水平较高. 进一步分析发现, *gFBXO38t1* 在高、低脂系 1~12 周龄肉鸡腹部脂肪组织中均有表达, 并且在 3 和 4 周龄时, 低脂肉鸡腹部脂肪组织中 *gFBXO38t1* 的表达水平显著高于高脂肉鸡($P < 0.05$), 其余时间点两系间没有显著差异($P > 0.05$). 在鸡前脂肪细胞(stromal-vascular cells, SV)诱导分化过程中, *gFBXO38t1* 的表达量随着脂肪细胞分化而呈现下降趋势, 此外, *gFBXO38t1* 在前脂肪细胞中的表达量明显高于成熟脂肪细胞(fat cells, FC; $P < 0.05$), 暗示 *gFBXO38t1* 可能是鸡脂肪组织形成的负调控因子. 报告基因分析显示, 过表达 *gFBXO38t1* 抑制 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer-binding protein α , *C/EBP α*)、脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, *LPL*)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, *FASN*)和脂肪酸结合蛋白 4(fatty acid-binding protein 4, *FABP4*)基因的启动子活性($P < 0.05$), 从另一个角度提示了 *gFBXO38t1* 对鸡脂肪组织形成具有抑制作用. 同时过表达鸡 *KLF7* 和 *gFBXO38t1* 并不能显著增强过表达 *gFBXO38t1* 对鸡 *LPL*、*FASN* 和 *FABP4* 基因启动子活性的调控作用, 暗示 *gFBXO38t1* 对这些基因的调控不完全依赖于鸡转录因子 *KLF7*. 本研究为进一步研究鸡脂肪细胞分化和 *FBXO38* 的生物学功能提供参考.

关键词 F-box 蛋白, *KLF7*, 鸡, 脂肪组织, 转录调控

学科分类号 Q75, R3, S8

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00402

F-box 蛋白(F-box proteins)家族成员广泛存在于酵母、拟南芥、线虫、果蝇、人及其他哺乳动物等多种生物中. 其结构特征是 N 端含有一段大约由 40~50 个氨基酸组成的 F-box 模序(motif)^[1]. F-box 模序得名于细胞周期蛋白 F(cyclin F), F-box 模序最早被发现介导 cyclin F 与 SKP1 的蛋白互作^[2]. F-box 蛋白在泛素介导的蛋白质降解过程中特异性地识别底物, 并与 SKP1、Cullin 类蛋白组成 SCF(SKP1-Cullin-F-box protein)类 E3, 从而介导蛋白质的泛素化和降解. 目前的研究结果显示, 只有一部分 F-box 蛋白是通过形成 SCF 复合体的方式, 引发蛋白质的泛素化降解或修饰^[3], 其他 F-box 蛋白

并不形成 SCF 蛋白复合体, 而是通过其他方式(如作为转录因子的辅助因子^[4]、酶活性的抑制物^[5]等)来发挥生物学功能^[3]. F-box 蛋白家族成员众多, 功能多样, 它们广泛地参与了泛素 - 蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)^[6]、细胞周期^[7-8]、

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目 (2009CB941604), 国家肉鸡产业技术体系建设资助项目(CARS-42), 黑龙江省高等学校科技创新团队建设资助项目(2010td02).

** 通讯联系人.

Tel: 0451-55191770, E-mail: ningwang2001@yahoo.com

收稿日期: 2013-01-09, 接受日期: 2013-03-28

转录调控^[4]、细胞凋亡^[9]和信号转导^[10]等多个生命过程。

到目前为止,已经发现了68种人类F-box蛋白和74种小鼠F-box蛋白^[3]。F-box蛋白除了具有N端保守的F-box模序外,C端通常还存在一些与蛋白质互作密切相关的二级结构,这些二级结构介导F-box蛋白与底物的特异性识别^[3]。根据C端二级结构的不同,F-box蛋白家族可以分为3个亚家族,即亚家族FBXL、亚家族FBXW和亚家族FBXO^[3]。亚家族FBXL是指C端富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)的F-box蛋白^[11];亚家族FBXW是指C端含有WD重复序列(WD repeats)的F-box蛋白^[12];亚家族FBXO名字中的“O”是英文“other(其他)”的首字母缩写,这个亚家族包括所有C端不具有上述两种结构特征的F-box蛋白^[3]。目前,在哺乳动物体内共发现37种FBXO蛋白。然而F-box蛋白的亚家族分类并不是一成不变的,随着蛋白质结构预测和分析方法的发展,很多以前被认为属于FBXO亚家族的蛋白正逐渐被重新归类到FBXL或FBXW亚家族^[3]。

FBXO38是FBXO蛋白亚家族的一个成员,对哺乳动物研究结果显示,FBXO38蛋白是转录因子KLF7的辅助激活因子,因此又被叫做MoKA(modulator of KLF7 activity)^[4]。小鼠FBXO38通过F-box模序与KLF7蛋白的亮氨酸拉链结构域(第59~119位氨基酸残基之间)发生蛋白质互作,FBXO38蛋白和转录因子KLF7结合后,并不引起转录因子KLF7的泛素化,也不形成SCF蛋白复合体^[4]。FBXO38通过形成KLF7-FBXO38蛋白复合体发挥作用,它利用自身的多个出核信号序列(nuclear export signals, NES)和核定位信号序列(nuclear localization sequence, NLS)调控KLF7在细胞核和细胞质的亚细胞定位,并增强转录因子KLF7对其靶基因(如*p21^{Waf/Cip}*基因)的转录调控作用^[4]。进一步的研究显示,位于小鼠FBXO38蛋白NES和NLS之间的第473~766位氨基酸残基是一个转录激活调控结构域,FBXO38蛋白通过该结构域发挥转录激活作用^[13]。到目前为止,尚未发现FBXO38蛋白具有DNA结合结构域,推测FBXO38是一个转录辅助因子。

虽然哺乳动物*FBXO38*的功能已有了一些报道,但是目前还没有鸟类*FBXO38*的研究报道。本研究从鸡腹部脂肪组织中克隆得到了一个鸡*FBXO38*转录本,将其命名为鸡*FBXO38*转录本1

(gallus gallus *FBXO38* transcript variant 1, *gFBXO38t1*),并分析了*gFBXO38t1*在肉鸡不同组织中的表达模式和在肉鸡腹部脂肪组织发育过程中的表达规律,此外,还分析了鸡*FBXO38t1*单独过表达以及与鸡*KLF7*同时过表达对多个脂肪组织发育和代谢相关基因启动子活性的影响。本研究为进一步研究鸡脂肪细胞分化和*FBXO38*的生物学功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

采用东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择系(Northeast Agricultural University broiler lines divergently selected for abdominal fat content, NEAUHLF)14世代2~10周龄肉鸡(公鸡共114只,其中包括高脂鸡60只,低脂鸡54只)和爱拔益加(Arbor Acre, AA)12日龄肉仔鸡为实验材料。NEAUHLF群体已经在我们以前的研究报道中有了详细的介绍^[14],经过14个世代的选择,7周龄NEAUHLF群体中,高脂系肉鸡的腹脂率是低脂系肉鸡的4.45倍。

1.2 方法

1.2.1 组织取样。从1~12周龄,每周龄高、低脂系肉鸡各3~6只。屠宰后收集腹部脂肪组织,在7周龄时,屠宰后同时收集肝、十二指肠、空肠、回肠、胸肌、腿肌、心脏、脾、肾、胰腺、腺胃、肌胃、脑和睾丸组织。收集的所有组织马上用液氮冷冻,然后储存到-80℃冰箱。

1.2.2 鸡前脂肪细胞培养。从12日龄AA肉鸡中取腹部脂肪组织(3~5 g),PBS清洗2遍后,用2 g/L的I型胶原酶(Sigma公司)37℃消化1 h,每隔10 min上下颠倒混匀一次。然后让消化后的组织液依次通过100 μm和600 μm的滤网,除去未消化的组织块。收集过滤后的组织消化液,200 g离心10 min。吸取上层中的絮状物即为鸡成熟脂肪细胞(fat cell, FC),之后弃去上层液体,下层细胞再次经过红细胞裂解液处理后,200 g离心10 min,获得鸡前脂肪细胞(stromal-vascular cells, SV)。分离的鸡前脂肪细胞用培养基DMEM/F12(Gibico公司)+10%FBS(Gibico公司)+1%K(penicillin-streptomycin solution; Sigma公司)悬浮,以1×10⁵细胞/cm²接种到细胞培养瓶中,在37℃,5%CO₂条件下培养。待细胞汇合70%~90%(3~4 d)后,用胰酶消化,将细胞以1×10⁵细胞/cm²接种到6孔板。培养12 h后,细胞大约汇合90%,此时添加160 μmol/L油

酸到培养基中诱导鸡前脂肪细胞进行分化。

1.2.3 总 RNA 提取及反转录. 总 RNA 提取利用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂按照操作说明完成. 反转录(reverse transcriptase, RT)以 Oligo(dT) 为引物, 利用 Promega 公司的 ImProm- II reverse transcriptase Kit 完成.

1.2.4 鸡 *FBXO38t1* 克隆及载体构建. 以高、低脂系脂肪组织混合 cDNA 为模板 PCR 扩增 *gFBXO38t1* 全长编码区序列 (coding sequence, CDS), 引物信息和 PCR 条件见表 1. PCR 产物回收纯化后连接到 pMD-18T 载体上(TaKaRa 公司),

转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒酶切鉴定正确后, 进行测序(华大基因). 测序正确后, 利用引物两端的酶切位点(*EcoR* I 和 *Xho* I)将目的片段亚克隆到 pCMV-HA 载体(Clontech 公司)上, 构建 pCMV-HA-*gFBXO38t1* 质粒. 本研究用到的其他质粒包括: pCMV-myc-*gKLF7*、pGL3-basic-*gC/EBP α* (-1863/+332)、pGL3-basic-*gFASN*(-1096/+160)、pGL3-basic-*gLPL* (-1914/+66)和 pGL3-basic-*gFABP4* (-1996/+22)由东北农业大学动物分子遗传实验室制备并提供.

Table 1 Primers and PCR conditions for chicken *FBXO38t1* clone

Gene	Reference sequence	Length (bp)	<i>T_m</i> (°C)	Site	Cycle	Primers (5'~3')
<i>gFBXO38t1</i>	XM_414482	1650	61.5	18	35	CAGAATTCCGATGGGTCCCAGGCGGAAAAATG
				1667		CGCTCGAGTCACAAAGACCAGAGATTACCTC

1.2.5 鸡胚成纤维细胞系(DF1)的培养. DF1细胞培养采用完全培养基(DMEM/F12+10%FBS), 在 37℃, 5% CO₂ 的条件下进行培养.

1.2.6 定量 RT-PCR. Real-time PCR 利用 SYBR Premix Ex Taq (Takara 公司) 和 ABI Prism 7500 sequence detection system(Applied Biosystems 公司)完成, 反应采用 20 μ l 体系, 反应体系在冰上配置, 体系包括: cDNA 2 μ l、2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq 10 μ l、PCR Forward(Reverse) Primer(10 μ mol/L)各 0.4 μ l、50 $\times$ Rox Reference Dye II 0.4 μ l、双蒸水

6.8 μ l; 反应条件为 95℃ 预变性 5 s, 而后进行 40 个循环, 每个循环包括 95℃ 5 s 和 60℃ 34 s. 40 个循环完成后进行融解曲线(dissociation curves)检测, *gFBXO38t1* 和 *gFBXO38t2* 半定量 RT-PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 7 min, 而后进行 33 个循环, 每个循环包括 94℃ 30 s, 53.6℃ 30 s 和 72℃ 30 s. *β -ACTIN* 半定量 RT-PCR 反应: 94℃ 预变性 7 min, 而后进行 25 个循环, 每个循环包括 94℃ 30 s, 56℃ 30 s 和 72℃ 30 s. Real-time PCR 和半定量 RT-PCR 所用到的引物详见表 2.

Table 2 Primers used for RT-qPCR

Gene	Sequence ID	Site	Primer (5'~3')	Product (bp)
<i>gFBXO38t1</i>	XM_414482	1596	AATGAGCTGCGGCAGGATG	88
		1683	TGACTGCCAATAACGTTCAAAAGA	
<i>gFBXO38t2</i>	XM_003642051	2078	GATGTTCATACACGCTAC	158
		3091	TGATACGGTTTCTTTCT	
<i>β-ACTIN</i>	NM_205518	865	TCTTGGGTATGGAGTCCTG	331
		1195	TAGAAGCATTTGCGGTGG	
<i>GAPDH</i>	NM_204305	227	CTGTCAAGGCTGAGAACG	185
		411	GATAACACGCTTAGCACCA	

1.2.7 Western-blot. 在 6 孔板培养的 DF1 细胞中分别转染 2 μ g 的 pCMV-HA-*gFBXO38t1* 质粒、pCMV-myc-*gKLF7* 质粒, 以及 pCMV-HA 和

pCMV-myc 质粒的混合物(empty vector, EV, 两种质粒各 1 μ g)培养 48 h 后, 弃去培养基, 室温下用 PBS 洗 3 次细胞. 按照每孔 0.15 ml 的量加入细胞

裂解液(RIPA 缓冲液), 置于冰上, 轻轻摇动, 作用 15 min 裂解细胞, 裂解完成后, 用干净的细胞刮将细胞刮于培养孔的一侧, 用移液器将细胞裂解液移至 1.5 ml 离心管中. 10 000 g 4℃ 离心 10 min, 上清即为细胞总裂解物. 取细胞总裂解物 40 μ g, 加入等体积的 2 $\times$ 上样缓冲液与细胞裂解物混合, 100℃ 加热 5 min 使蛋白质样品变性. 之后每个变性蛋白质样品取 10 μ l, 用 BIO-RAD 公司的 Mini-PROTEAN3 电泳系统进行 SDS-PAGE. 电泳结束后, 采用 BIO-RAD 公司的 Mini Trans-Blot 系统将蛋白质样品由 PAGE 胶上转移至硝酸纤维素膜. 用含有 5% 脱脂乳的 PBST (含 0.05% 吐温的 PBS) 将硝酸纤维素膜室温封闭 1 h. 然后洗去膜上的封闭液, 将膜孵育在含有一抗(鼠源鸡 GAPDH 蛋白单抗购自碧云天公司: 1:100; 鼠源 myc 标

签单抗或兔源 HA 标签多抗购自 Clontech 公司: 1:200) 的 PBST 溶液, 置于水平摇床上室温作用 1 h. 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 然后将膜孵育在含二抗(山羊抗小鼠或山羊抗兔购自碧云天公司: 1:5 000) 的 PBST 溶液中, 置于水平摇床上室温孵育 1 h. 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 之后进行常规 ECL (碧云天公司) 显色.

1.2.8 细胞转染. 细胞转染采用罗氏 FuGENE HD 转染试剂按照说明书操作完成.

1.2.9 荧光素酶活性检测. 在 12 孔板培养 DF1 细胞系中进行, 每孔细胞转染约 1 μ g 质粒, 每孔细胞的转染体系见表 3, 转染后 48 h, 回收细胞, 用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 公司) 试剂盒检测双报告基因荧光素酶活性.

Table 3 Plasmid DNA transfection for per one well of cells

Promoter luciferase reporter plasmids ¹⁾		pRL-TK (Promega)	<i>gKLF7</i> , <i>gFBXO38t1</i> overexpression or the empty plasmid ²⁾
pGL3-basic- <i>gC/EBPα</i> (–1863/+332)	200 ng	10 ng	800 ng
pGL3-basic- <i>gFASN</i> (–1096/+160)	400 ng	8 ng	600 ng
pGL3-basic- <i>gLPL</i> (–1914/+66)	400 ng	20 ng	600 ng
pGL3-basic- <i>gFABP4</i> (–1996/+22)	400 ng	20 ng	600 ng

¹⁾ pGL3-basic-*gC/EBP α* (–1863/+332): The reporter plasmid pGL3-basic (Promega, Madison, WI) containing the chicken *C/EBP α* gene promoter (nucleotides –1863 to +332 relative to the start site of X66844.1); pGL3-basic-*gFASN* (–1096/+160): The reporter plasmid pGL3-basic (Promega) containing the chicken *FASN* gene promoter (nucleotides –1096 to +160 relative to the start site of J04485.1); pGL3-basic-*gLPL* (–1914/+66): The reporter plasmid pGL3-basic (Promega) containing the chicken *LPL* gene promoter (nucleotides –1914 to +66 relative to the start site of NM_205282.1); pGL3-basic-*gFABP4* (–1996/+22): The reporter plasmid pGL3-basic (Promega) containing the chicken *FABP4* gene promoter (nucleotides –1996 to +22 relative to the start site of AF432507.2). ²⁾ Included the plasmid of pCMV-myc-*gKLF7*, pCMV-HA-*gFBXO38t1*, the plasmids mix of pCMV-myc-*gKLF7* and pCMV-HA-*gFBXO38t1* (the mass ratio of pCMV-myc-*gKLF7* to pCMV-HA-*gFBXO38t1* was 1:1), and the plasmids mix of pCMV-myc and pCMV-HA (the mass ratio of pCMV-myc to pCMV-HA was also 1:1) was used as empty vector (EV).

1.2.10 序列分析. BLAST 分析采用 NCBI 网站在线工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 多序列比对使用 Vector NTI Advance 11 组件 Align X (Invitrogen 公司); Blat 分析采用 UCSC 网站在线工具 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>).

1.2.11 数据分析. 所有统计分析运用 SAS 9.2 软件 (SAS Institute Inc), 数据格式表示为 $\bar{x} \pm s$, 两组数据之间的比较采用双尾不配对 Student's *t*-test, 两组以上数据的分析采用 GLM 过程和 Duncan 多重检验, $P < 0.05$ 被认为差异显著. 分析 *gFBXO38t1* 在不同组织的表达水平差异前, 先利用

公式(1)标准化不同组织中 *gFBXO38t1* 的表达水平.

$$Y = (gFBXO38t1 / gGAPDH) \times N \quad (1)$$

其中 Y 为标准化后的 *gFBXO38t1* 的表达水平, N 为已经报道的不同组织中 *GAPDH* 表达水平^[5].

$$Y = \mu + T + L + e \quad (2)$$

$$Y = \mu + A + L + e \quad (3)$$

公式(2)用来分析 *gFBXO38t1* 表达水平与组织类型的关系, 公式(3)用来分析脂肪组织 *gFBXO38t1* 表达水平与肉鸡周龄的关系, 其中 Y 为 *gFBXO38t1* 的表达水平, μ 为群体平均数, T 为固定效应的组织类型, A 为固定效应的肉鸡周龄, L 为固定效应的肉鸡品系(高、低腹脂含量), e 为

随机误差。

2 结果与分析

2.1 鸡 *FBXO38t1* 全长编码区克隆

利用 Blast 工具在 NCBI Nucleotide 数据库查找与小鼠 *FBXO38*(GenBank accession NM_134136)同源的鸡 cDNA 序列, 发现数据库存在两个鸡 cDNA 序列与小鼠 *FBXO38* 高度同源, 分别是鸡 *FBXO38* (*Gallus gallus FBXO38-like*) 预测 cDNA 序列 (GenBank accession: XM_003642051, 4 060 bp) 和鸡假想基因 LOC416151 (*gallus gallus hypothetical LOC416151*) 预测 cDNA 序列 (GenBank accession: XM_414482, 2 155 bp)。利用 UCSC 网站 Blat 工具分析二者在鸡基因组上的位置, 发现它们都位于鸡第 13 号染色体, 且鸡假想基因 LOC416151 预测 cDNA 序列所在的基因组区域(chromosome="13", 7526570-7533408)包含在鸡 *FBXO38* 预测 cDNA 序列所在的基因组区域(chromosome="13", 7524219-7546884)之内, 并且二者的多个外显子完全一致(图 1a), 此外, Blast 结果还显示二者所在这段基因组区域是鸡 *FBXO38* 所在的基因组区域(图 1a), 表明鸡假想基因 LOC416151 预测 cDNA 序列和鸡 *FBXO38* 预测 cDNA 序列是鸡 *FBXO38* 的两个不同的预测转录本。为了研究方便, 本研究将鸡假想基因 LOC416151 预测 cDNA 序列 (GenBank accession: XM_414482) 命名为鸡 *FBXO38* 基因转录本 1 (*Gallus gallus FBXO38* transcript variant 1, *gFBXO38t1*), 鸡 *FBXO38* 预测 cDNA 序列 (GenBank accession: XM_003642051) 命名为鸡 *FBXO38* 基因转录本 2 (*gallus gallus FBXO38* transcript variant 2, *gFBXO38t2*) (图 1a)。本研究设计了这两种转录本 mRNA 表达的特异性检测引物, 半定量 RT-PCR 显示, 在 6 和 7 周龄肉鸡腹部脂肪组织中 *gFBXO38t1* 和 *gFBXO38t2* 均有表达, 并且 *gFBXO38t1* 的表达水平显著高于 *gFBXO38t2* ($P < 0.01$, 图 2)。

此外, 蛋白质序列分析显示, *gFBXO38t1* 预测蛋白序列 (GenBank accession: XP_414482.2) 和 *gFBXO38t2* 预测蛋白序列 (GenBank accession: XP_003642099.1) 与已经报道的人 *FBXO38* 的两个转录本蛋白序列 (human *FBXO38* isoform a, GenBank accession: NP_110420.3 和 human *FBXO38* isoform b, GenBank accession: NP_995308.1) 以及小鼠 *FBXO38* 蛋白序列 (GenBank accession: NP_598897.2) 同源性高达 80% 以上(图 3)。鉴于较

高的蛋白质序列同源性, 并且小鼠 *FBXO38* 的蛋白质结构已经有了明确的研究报道^[4, 13]。本研究参考小鼠 *FBXO38* 蛋白序列, 对 *gFBXO38t1*、*gFBXO38t2* 和人 *FBXO38* 的两个转录本编码蛋白序列进行了生物信息学分析, 结果显示, 人 *FBXO38* 两个转录本的编码蛋白和 *gFBXO38t2* 编码蛋白均包含小鼠 *FBXO38* 蛋白具有的所有功能结构域, 而 *gFBXO38t1* 编码蛋白仅具有 F-box 模序和 4 个出核信号序列(nuclear export signals, NES), 缺少一个完整的转录激活结构域(transactivating domain)和全部 3 个核定位信号序列(nuclear localization sequence, NLS)(图 3)。进一步的蛋白质结构分析发现, *gFBXO38t2* 的编码蛋白序列、人 *FBXO38* 转录本 2 (human *FBXO38* transcript variant 2, GenBank accession: NM_205836) 的编码蛋白序列 (human *FBXO38* isoform b, GenBank accession: NP_995308.1) 与小鼠 *FBXO38* 蛋白序列 (GenBank accession: NP_598897.2, 即 MoKA) 在结构上更加接近, 并且序列长度也极为接近(图 3)。和小鼠 *FBXO38* 蛋白序列相比, 人 *FBXO38* 的转录本 1 (human *FBXO38* transcript variant 1, GenBank accession: NM_030793) 编码的蛋白序列 (human *FBXO38* isoform a, GenBank accession: NP_110420.3) 缺失了位于转录激活结构域和第二个 NLS 之间的 80 多个氨基酸(图 3)。而 *gFBXO38t1* 预测蛋白序列比两种人 *FBXO38* 转录本和鼠 *FBXO38* 的蛋白序列都短, 并且明显缺失了多个 C 端的重要功能结构域(图 3)。*gFBXO38t1* 显然是一个预测的 *FBXO38* 新转录本, 但尚未实验证实。为证实 *gFBXO38t1* 是否真实存在, 本研究根据序列 XM_414482 的特异性设计了一对扩增 *gFBXO38t1* 全长编码区的克隆引物 *gFBXO38t1-F1/R1*。这对引物的上游引物 *gFBXO38t1-F1* 处于两个转录本序列的同源性很高的保守区域, 而下游引物 *gFBXO38t1-R1* 则位于 *gFBXO38t1* (GenBank accession: XM_414482) 的特有序列上(图 1b)。利用引物 *gFBXO38t1-F1/R1*, 以肉鸡腹部脂肪组织 cDNA 为模板进行 PCR, 琼脂糖凝胶电泳显示, PCR 获得一条长度为 1.6 kb 左右的特异性条带(图 1c), 胶回收连接 pMD-18T 后进行测序, 结果显示获得的序列长 1 650 bp, 与 NCBI 数据库提供的鸡假想基因 LOC416151 (GenBank accession: XM_414482) 的全长 CDS 序列完全一致(DNA 序列相似性 100%), 测序所得序列已经提交 GenBank 数据库 (GenBank accession: JX290204)。

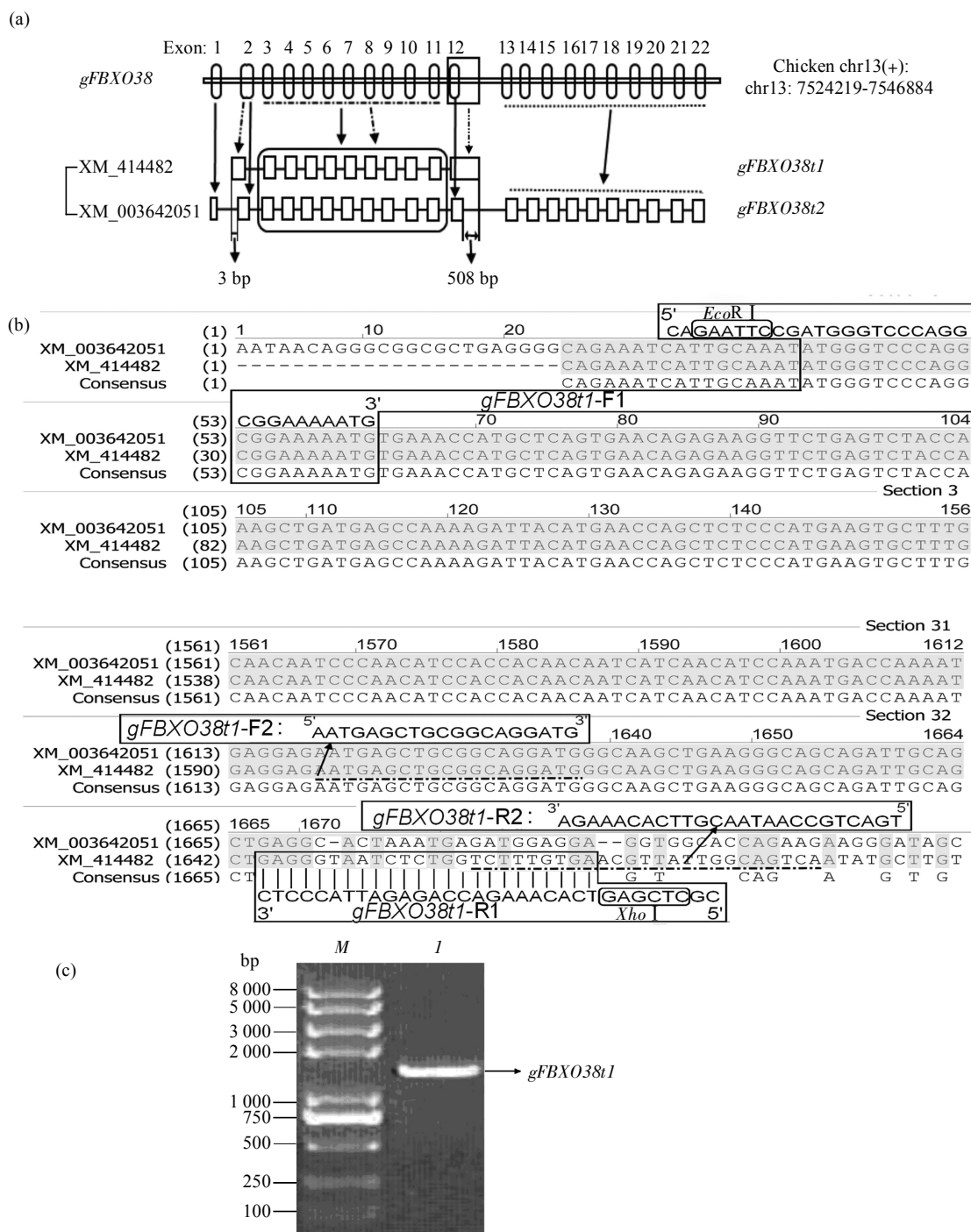


Fig. 1 The schematic representation of the predicted *gFBX038* transcripts (*t1* and *t2*) and primer design for cloning *gFBX038t1*

(a) The schematic representation of the different predicted transcript variants of chicken *FBX038*. (b) The sequences and location of the chicken *FBX038t1* primers on the sequence of XM_414482. (c) Electrophoretic analysis of the PCR amplification of the full-length coding region of chicken *FBX038t1* gene. *M*: DNA marker; *I*: The PCR product of the full-length coding region of the chicken *FBX038t1*.

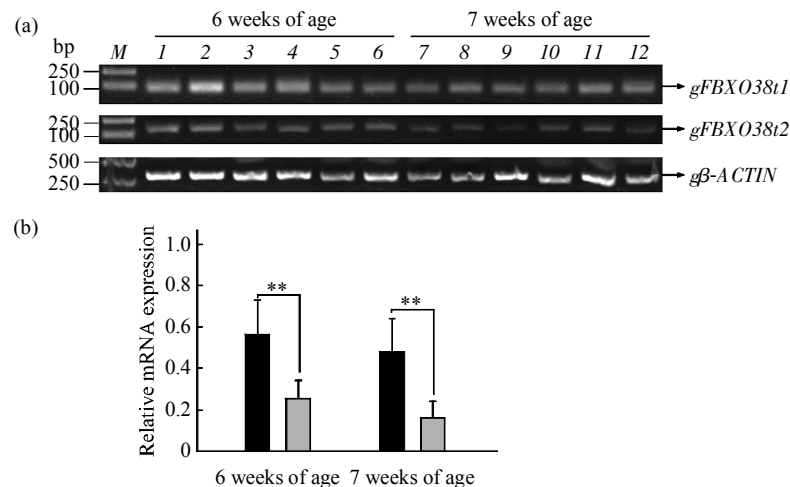


Fig. 2 Expression characterization of *gFBXO38t1* and *gFBXO38t2* in abdominal fat tissues of broilers by Semi-Quantitative RT-PCR

(a) Semi-RT-PCR analysis of *gFBXO38t1* and *gFBXO38t2* in chicken abdominal fat tissues. Lane 1~6 indicate the chicken abdominal fat tissues at 6 weeks of age; Lane 7~12 indicate the chicken abdominal fat tissues at 7 weeks of age; lane M indicates the DL2000 DNA marker. (b) Histogram of relative expression of *gFBXO38t1* and *gFBXO38t2* in chicken abdominal fat tissues as described in Figure 3a; the error bars represent the standard deviations of six biologic replicates; and the asterisks (**) indicate the significantly different expression levels between *gFBXO38t1* and *gFBXO38t2* in chicken abdominal fat tissues (student's *t*-test; $P < 0.01$). ■: IOD(*gFBXO38t1*)/IOD(β -ACTIN); □: IOD(*gFBXO38t2*)/IOD(β -ACTIN).

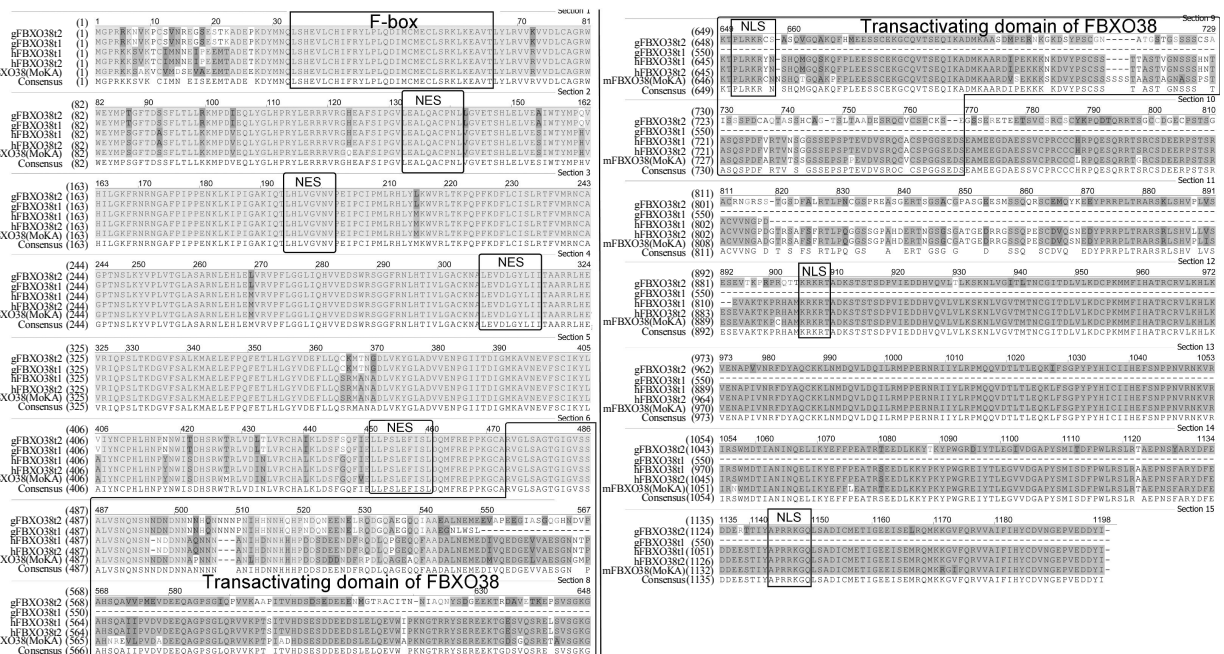


Fig. 3 Sequence analysis of chicken FBXO38t1 protein

Alignment of the chicken FBXO38t1 protein sequence (gFBXO38t1, XP_414482.2) with those of chicken FBXO38t2 (gFBXO38t2, XP_003642099.1), human FBXO38 transcript variant 1 (hFBXO38t1, NP_110420.3), human FBXO38 transcript variant 2 (hFBXO38t2, NP_995308.1) and mouse FBXO38 (mFBXO38, NP_598897.2) using the Align X program of Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). And the sequence information of mouse FBXO38 (MoKa) [4, 13] was used to annotate these protein sequences. F-box=F-box motif, NES=nuclear export signals, NLS=nuclear localization sequence.

2.2 鸡 *FBXO38t1* 基因组织表达谱

利用 Real-time RT-PCR 方法, 分析 7 周龄高、低脂系肉鸡 15 种组织中 *gFBXO38t1* 的表达水平, 结果显示, 鸡 *gFBXO38t1* 在所选的 15 种组织和器官(胸肌、脾、肝、肾、腿肌、肌胃、心脏、腺胃、十二指肠、腹脂、空肠、回肠、睾丸、脑、胰腺)中均有一定程度的表达, 并且在胸肌、腿肌、

肌胃、脾脏、睾丸和肾脏组织中, 高脂肉鸡 *gFBXO38t1* 的表达量要显著高于低脂肉鸡, 而在腺胃中, 高脂肉鸡 *FBXO38t1* 的表达量要显著低于低脂肉鸡($P < 0.05$, 图 4a). 比较 *gFBXO38t1* 在肉鸡不同组织中的相对表达水平可见, 相对于其他组织, *gFBXO38t1* 在腹部脂肪、回肠和胰腺中的表达水平较高($P < 0.05$, 图 4b).

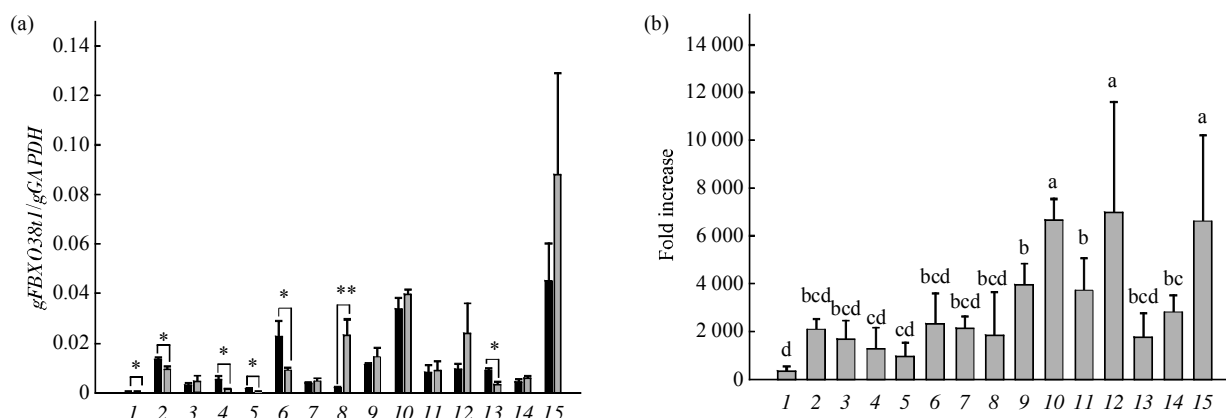


Fig. 4 Tissue expression characterization of *gFBXO38t1* in 7-week-old broilers of NEAUHLF

(a) The *gFBXO38t1* mRNA expression was detected with Real-time RT-PCR in various tissues of 7-week-old NEAUHLF male broilers, and the *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used as an internal control. Diagrams show the relative quantification of *FBXO38t1* expression. Error bars represent the standard deviations of three replicates. Asterisks indicate significant difference between fat and lean broilers (student's *t*-test), $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**). ■: Lean line; ▒: Fat line. (b) The relative *GAPDH* expression level in these tissues reported in human^[15] was used to normalize the expression level of *gFBXO38t1*. Diagrams show the relative quantification of *gFBXO38t1* expression. Error bars represent the standard deviations of six replicates. The different lowercase letters above histograms indicate statistically significant expression differences among various tissues (GLM followed by Duncan's multiple test, $P < 0.05$). 1: Pectoralis; 2: Spleen; 3: Liver; 4: Kidney; 5: Leg muscle; 6: Gizzard; 7: Heart; 8: Proventriculus; 9: Duodenum; 10: Abdominal fat; 11: Jejunum; 12: Ileum; 13: Testis; 14: Brain; 15: Pancreas.

2.3 鸡 *FBXO38t1* 基因在高、低脂肉鸡 1~12 周龄的表达规律

为了分析 *gFBXO38t1* 在肉鸡脂肪组织中的表达模式, 本研究采用东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择系 14 世代 1~12 周龄肉鸡为实验材料(图 5a, b). 利用 Real-time RT-PCR, 以 *gβ-ACTIN* 为内参, 分析 *gFBXO38t1* 在高、低脂系第 14 世代 1~12 周龄肉鸡腹部脂肪组织中的表达规律, 结果表明: *gFBXO38t1* 在高、低脂系 1~12 周龄肉鸡腹部脂肪组织均有表达, 统计分析显示, 随着周龄的

变化, 肉鸡腹部脂肪组织 *gFBXO38t1* 的表达量呈现出先上升后下降的趋势, 在 3 周龄时鸡 *FBXO38t1* 基因的表达量达到最高, 而后开始下降($P < 0.05$, 图 5c). 此外, *gFBXO38t1* 的表达水平在高、低脂系间的 2 个时间点存在显著差异($P < 0.05$), 即在 3 和 4 周龄时, 低脂肉鸡腹部脂肪组织中 *gFBXO38t1* 的表达水平显著高于高脂肉鸡($P < 0.05$, 图 5c), 其他时间点两系间没有显著差异($P > 0.05$, 图 5c).

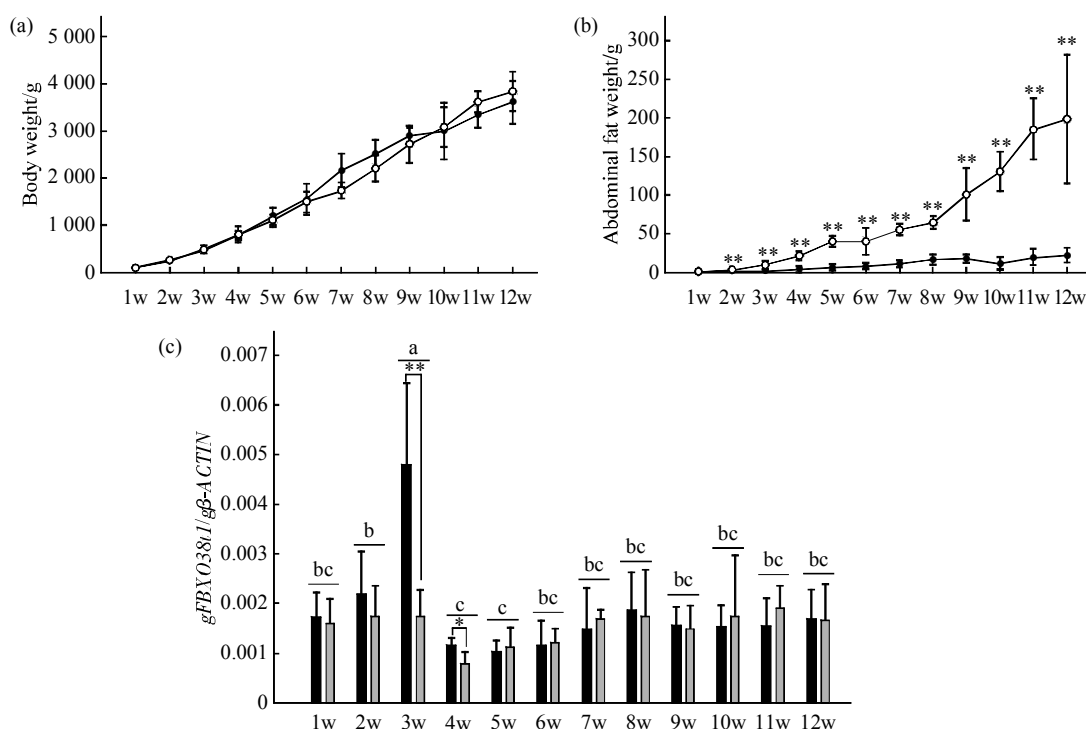


Fig. 5 Expression characterization of *gFBXO38t1* in abdominal fat tissue of male broilers of NEAUHLF

(a), (b) The body weight and abdominal fat weight of the NEAUHLF male broilers used in the current study. (a) The diagrams show the body weight of the NEAUHLF male broilers, and the error bars represent the standard deviations of replicates ($n \geq 3$). (b) The diagrams show the abdominal fat weight of the NEAUHLF male broilers. Error bars represent the standard deviations of replicates ($n \geq 3$). Asterisks indicate significant difference between fat and lean broilers (student's *t*-test) $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**). ●—●: Lean line; ○—○: Fat line. (c) The *gFBXO38t1* mRNA expression in abdominal fat tissue of male broilers at various ages (each age, each line $n \geq 3$) was analyzed by Real-time RT-PCR. β -ACTIN was used as internal control. The diagrams show the relative quantification of *gFBXO38t1* expression. Error bars represent the standard deviations of *gFBXO38t1* expression among individuals of the same age and line. Asterisks indicate significant different expression level between fat and lean broilers (student's *t*-test) $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**). The different lowercase letters above histograms indicate statistically significant expression differences among various ages (GLM followed by Duncan's multiple test, $P < 0.05$), 1~12 w = 1~12 weeks of age. ■: Lean line; ■: Fat line.

2.4 鸡 *FBXO38t1* 基因在脂肪细胞分化过程中的表达规律

以 β -ACTIN 为内参, 利用 Real-time RT-PCR 分析 *gFBXO38t1* 在鸡脂肪细胞分化过程的表达规律, 发现在油酸诱导鸡脂肪细胞分化过程中, 随着诱导时间的增加, *gFBXO38t1* 的表达量除 72 h 时间点外, 总体呈现出下降的趋势 ($P < 0.05$, 图 6a). 此外, 发现 *gFBXO38t1* 在直接分离(未经培养)的前脂肪细胞(stromal-vascular cells, SV)中的表达水平显著高于在成熟脂肪细胞的表达水平 ($P < 0.01$, 图 6b).

2.5 过表达鸡 *FBXO38t1* 对脂肪组织重要功能基因启动子活性的影响

哺乳动物的研究表明, FBXO38 的主要功能是

增强转录因子 KLF7 的转录调控作用^[4]. 为了解 *gFBXO38t1* 在脂肪组织生长发育中的作用, 本研究利用 *gFBXO38t1* 克隆引物两端的酶切位点(*EcoR* I 和 *Xho* I), 在保证阅读框正确的情况下, 将鸡 *gFBXO38t1* 全长 CDS 区序列亚克隆到 pCMV-HA 载体上, 成功构建了 pCMV-HA-*gFBXO38t1* 表达质粒. Western blot 分析显示, 转染了 pCMV-myc-KLF7 和 pCMV-HA-*gFBXO38t1* 质粒的 DF1 细胞, 分别成功地过表达了鸡 KLF7 和鸡 FBXO38t1 蛋白(图 7b). 启动子报告基因分析显示, 与对照组(转染空质粒的细胞)相比, 单独过表达 *gFBXO38t1* 对鸡增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer-binding protein α , C/EBP α)、脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FASN)和脂

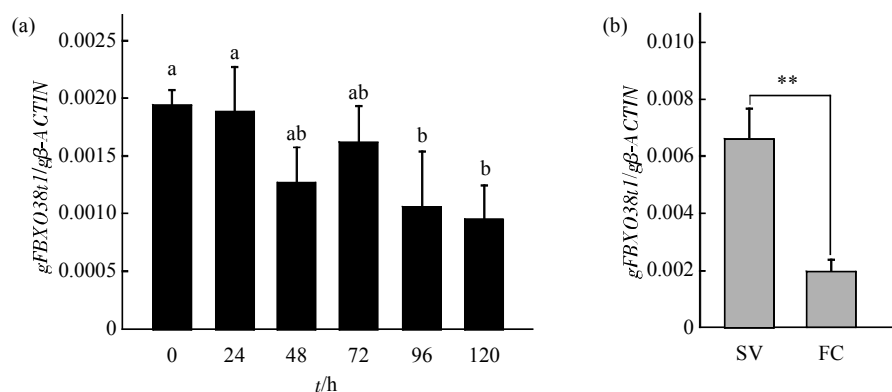


Fig. 6 Expression of *gFBXO38t1* during chicken preadipocyte differentiation

(a) The *gFBXO38t1* expression during chicken preadipocyte differentiation, induced by oleate *in vitro*, was detected by real-time RT-PCR. Cells were harvested at designated time points after treatment with oleate. The β -ACTIN was used as an internal control. The diagrams show the relative quantification of *gFBXO38t1* expression. Error bars represent the standard deviations of three replicates. The different lowercase letters above histograms indicate statistically significant differential expression of *gFBXO38t1* among various time points (GLM followed by Duncan's multiple test, $P < 0.05$). ■: Oleate induced. (b) The *gFBXO38t1* gene expression in chicken preadipocytes (stromal-vascular cells, SV) and mature adipocytes (fat cells, FC) was detected by Real-time RT-PCR; the β -ACTIN gene was used as an internal control. The diagrams show the relative quantification of *gFBXO38t1* expression. Error bars represent the standard deviations of eight biology replicates. Asterisks (**) indicate significant differences between SV and FC (student's *t*-test, $P < 0.01$).

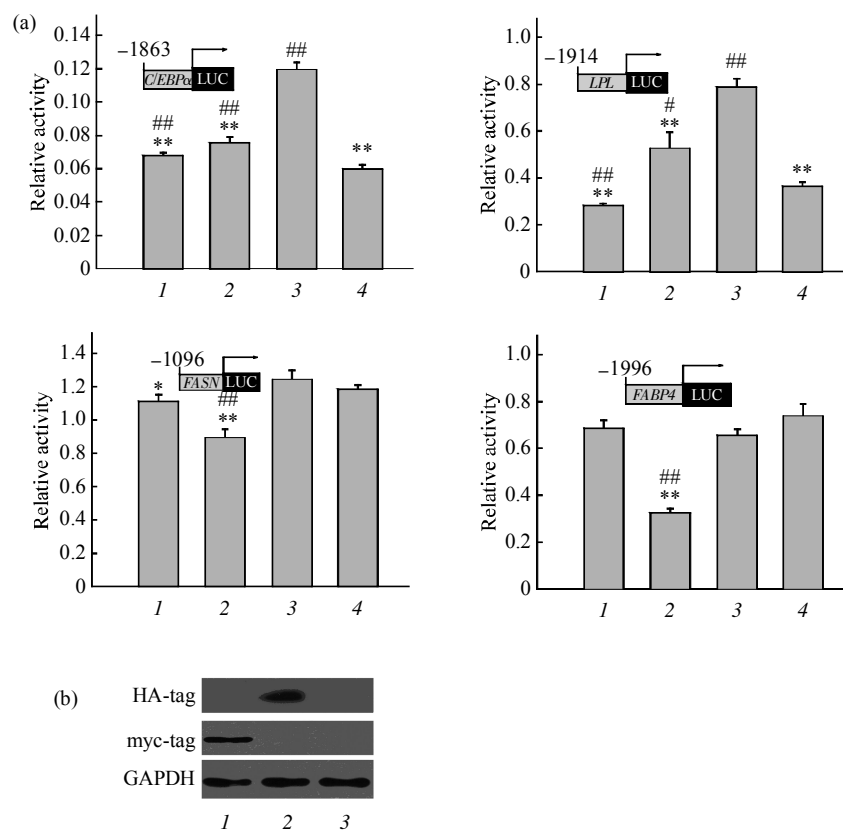


Fig. 7 Effects of individual and combined overexpression of *gKLF7* and *gFBXO38t1* on the promoter activities of chicken *LPL*, *C/EBPα*, *FABP4* and *FASN* genes

(a) Luciferase assays were conducted in DF1 cells, the promoter activities were expressed as ratios of firefly/Renilla luciferase activity. The diagrams show the quantification of promoter activities. Error bars represent the standard deviations of three replicates. Asterisks indicate significant difference between these dedicated groups and control group (EV, DF1 cells transfected with the plasmids mix of pCMV-myc and pCMV-HA), $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**, Student's *t*-test). Number signs indicate significant difference between these dedicated groups and the group transfected with the plasmids mix of pCMV-myc-*gKLF7* and pCMV-HA-*gFBXO38t1*, $P < 0.05$ (#) or $P < 0.01$ (##, Student's *t*-test). 1: *KLF7*; 2: *FBXO38t1*; 3: EV; 4: *FBXO38t1* + *KLF7*. (b) Western blot analysis of *KLF7* and *gFBXO38t1* in the DF1 cells transfected with pCMV-myc-*gKLF7*, pCMV-HA-*gFBXO38t1* and empty vector (EV, the mix of the empty pCMV-myc and pCMV-HA plasmids). GAPDH was used a loading control. 1: *KLF7*; 2: *FBXO38t1*; 3: EV.

脂肪酸结合蛋白 4(fatty acid-binding protein 4, *FABP4*) 的启动子活性具有显著的抑制作用($P < 0.05$, 图 7a); 过表达鸡 *KLF7* 对 *FABP4* 启动子活性没有显著影响($P > 0.05$, 图 7a), 对 *C/EBPα*、*LPL* 和 *FASN* 启动子活性具有显著抑制作用($P < 0.05$, 图 7a). 但 *gFBXO38t1* 和鸡 *KLF7* 同时过表达时, *C/EBPα* 启动子活性显著低于对照组和单独过表达鸡 *KLF7* 或 *gFBXO38t1* 的实验组($P < 0.05$, 图 7a), *LPL* 启动子活性显著低于单独过表达 *gFBXO38t1* 的实验组和对照组, 但是高于单独过表达鸡 *KLF7* 的实验组($P < 0.05$, 图 7a), *FASN* 和 *FABP4* 的启动子活性显著高于单独过表达 *gFBXO38t1* 的实验组($P < 0.05$, 图 7a), 但是与对照组和单独过表达鸡 *KLF7* 的实验组均没有显著差别($P > 0.05$, 图 7a).

3 讨 论

对小鼠的研究结果表明, *FBXO38* 不参与形成 SCF 复合体, 它通过与 *KLF7* 形成 *KLF7-FBXO38* 蛋白复合体发挥转录调控作用^[4]. 人体的研究结果表明, *FBXO38* 是一个具有多种转录本的基因, 目前已鉴定出两种人 *FBXO38* 转录本, 分别是人 *FBXO38t1* (human *FBXO38* transcript variant 1, GenBank accession: NM_030793) 和人 *FBXO38t2* (human *FBXO38* transcript variant 2, GenBank accession: NM_205836), 本研究利用鸡腹部脂肪组织 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增克隆了一个鸡 *FBXO38* 转录本(*gFBXO38t1*), 其所编码的蛋白没有 NLS 序列, 并且转录激活结构域也不完整(图 3). 这是目前第一个被克隆测序证实的鸡 *FBXO38* 转录本, 同时这这也是一个全新 *FBXO38* 基因转录本, 它和已经报道的所有人和小鼠 *FBXO38* 转录本都不一样. 序列分析结果显示, *gFBXO38t1* 产生的原因是, 鸡 *FBXO38* 基因在选择性转录拼接时缺失了第 1 和第 13~22 外显子, 并且第 12 外显子和部分第 12 内含子序列被剪接成了一个带有翻译终止密码子的新外显子.

检索鸡数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)数据库发现, 鸡 *FBXO38* 所在的基因组区域(chromosome="13", 7524219-7546884)附近存在两个与鸡脂肪性状显著相关的 QTL, 分别是 QTL (ADL0147-ADL0225, QTL 区域: 32~70 cm) 和 QTL (MCW340, QTL 区域: 22 cm 附近). QTL (ADL0147-ADL0225) 与腹部脂肪重和皮肤脂肪重都显著相关^[16], QTL (MCW340) 只与腹部脂肪重显著

相关^[17], 但是目前还无法确定鸡 *FBXO38* 是否确实处于这两个 QTL 之中, 也没有鸡 *FBXO38* 基因单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP) 与鸡脂肪性状显著相关, 或鸡 *FBXO38* 基因位于脂肪性状显著 SNP 连锁不平衡区间的研究报道. 本研究发现 *gFBXO38t1* 和 *gFBXO38t2* 在 6 和 7 周龄肉鸡腹部脂肪组织中均有表达(图 2), 暗示了鸡 *FBXO38* 基因可能对鸡腹部脂肪发育具有调控作用. 而 *gFBXO38t1* 的 mRNA 表达水平显著高于 *gFBXO38t2* 的 mRNA 表达水平(图 2), 进一步提示相对于 *gFBXO38t2*, 转录体 *gFBXO38t1* 可能在鸡脂肪组织发育过程中起着更重要的作用.

因为 *GAPDH* 在同种组织中表达水平相对恒定, 在不同组织中的表达水平已经有了详细报道^[18]. 所以本研究选择 *GAPDH* 作为内参基因来分析 *gFBXO38t1* 的组织表达规律. 结果显示, *gFBXO38t1* 在本研究选择的 15 种肉鸡组织中均有一定程度的表达, 表明 *gFBXO38t1* 的表达规律与 *KLF7* 基本一致^[18], 两者都在多种组织中广泛表达, 暗示 *gFBXO38t1* 在功能上可能与 *KLF7* 具有一定的联系. 此外, 本研究发现, *gFBXO38t1* 在腹脂、回肠和胰腺中表达水平较高($P < 0.05$, 图 4b), 暗示 *gFBXO38t1* 可能在这 3 种组织中发挥重要作用. 而高、低脂系肉鸡的组织表达分析发现, *gFBXO38t1* 在两系鸡的胸肌、腿肌、肌胃、脾脏、睾丸、腺胃和肾脏这 7 种组织中存在显著表达差异, 则暗示 *gFBXO38t1* 的功能可能与肉鸡肥胖及其并发症有关.

β -*ACTIN* 是研究脂肪细胞分化常用的内参基因, 3T3-L1 细胞系中的实验结果表明 β -*ACTIN* 在脂肪细胞诱导分化过程中的表达量相对恒定^[19], 是研究脂肪细胞分化的一个相对理想的内参基因. *GAPDH* 基因表达水平在脂肪细胞分化过程中变化较大, 不适宜作为分析脂肪细胞分化的内参基因^[19]. 因此, 本研究选择 β -*ACTIN* 为内参基因来分析鸡腹部脂肪组织发育过程中 *gFBXO38t1* 的表达模式. 实验结果显示, *gFBXO38t1* 的表达量随着肉鸡周龄的变化而呈现出显著的变化($P < 0.05$), 暗示在脂肪组织发育过程中 *gFBXO38t1* 参与了鸡腹部脂肪组织的发育调控. 此外, 还发现在 3 和 4 周龄时高、低脂系腹部脂肪组织中 *gFBXO38t1* 表达量存在显著差异($P < 0.05$), 而其他周龄腹部脂肪组织 *gFBXO38t1* 表达量在两系间没有显著差异($P > 0.05$), 暗示了 3~4 周龄可能是 *gFBXO38t1* 调控鸡腹部脂肪组织发育的重要阶段. 而在 3 和 4 周龄时, 低脂

肉鸡腹部脂肪中 *gFBXO38t1* 表达水平显著高于高脂肉鸡 ($P > 0.05$), 则进一步暗示 *gFBXO38t1* 可能对肉鸡腹部脂肪组织发育具有负调控作用. 体外培养的鸡前脂肪细胞在分化过程中 *gFBXO38t1* 的表达量逐渐下降, 前脂肪细胞中 *gFBXO38t1* 的表达水平明显高于成熟脂肪细胞中的表达水平, 这和已经报道的众多脂肪细胞分化负调控因子(如 *KLF2*、*GATA2/3*、*ETO/MTG8*、*CHOP10* 和 *GILZ* 等)的表达模式完全一致^[20-22], 进一步暗示 *gFBXO38t1* 可能具有抑制在鸡脂肪细胞分化的作用.

脂肪组织发育是一个复杂的生物学过程, 它的调控过程涉及到众多的转录因子^[23], *C/EBP α* 是脂肪细胞分化的一个主要调控因子^[20, 23-24]. 此外, 脂肪组织是机体重要的能量储存库和内分泌器官, 它在能量平衡、糖脂代谢、免疫、生殖以及癌症发生等多方面发挥着重要的调控作用^[24], *LPL*、*FASN* 和 *FABP4* 是脂肪组织的重要功能性蛋白^[25-27]. 本研究发现, 过表达 *gFBXO38t1* 对鸡 *C/EBP α* 、*LPL*、*FABP4* 和 *FASN* 的启动子活性都具有调控作用, 表明 *gFBXO38t1* 对脂肪组织的发育和功能可能都具有重要的调控作用. 过表达 *gFBXO38t1* 抑制鸡 *C/EBP α* 、*LPL*、*FABP4* 和 *FASN* 的启动子活性, 从另一个角度提示了 *gFBXO38t1* 具有抑制鸡脂肪组织发育的功能.

对哺乳动物的研究表明, *FBXO38* 作为转录因子 *KLF7* 的辅助因子发挥生物学作用^[4], 本研究发现, 同时过表达鸡 *KLF7* 和 *gFBXO38t1* 对鸡 *LPL*、*FASN* 和 *FABP4* 基因启动子活性的影响介于单独过表达二者之间, 说明在过表达 *gFBXO38t1* 的同时, 过表达鸡 *KLF7* 并不能显著增强过表达 *gFBXO38t1* 对鸡 *LPL*、*FASN* 和 *FABP4* 基因启动子活性的调控作用, 表明在本研究所用的 DF1 细胞这一系统中, *gFBXO38t1* 的调控并不完全依赖于转录因子 *KLF7*, *gFBXO38t1* 可能通过其他途径来发挥调控作用. 此外, 本研究还发现, 同时过表达鸡 *KLF7* 可以抵消 *gFBXO38t1* 过表达对鸡 *FASN* 和 *FABP4* 启动子抑制作用, 并且能增强 *gFBXO38t1* 过表达对鸡 *C/EBP α* 启动子的抑制作用, 暗示鸡 *FBXO38t1* 和鸡 *KLF7* 可能存在蛋白质互作, 但这种互作可能是基因特异性的. 序列分析结果显示, *gFBXO38t1* 虽然具有与 *KLF7* 蛋白互作相关的 F-box 模序, 但是 *gFBXO38t1* 不存在核定位序列, 且缺乏完整的转录激活结构域, 暗示 *gFBXO38t1* 与鸡 *KLF7* 蛋白互作的方式很可能与小鼠 *FBXO38*

不完全相同.

综上所述, 本研究发现了一个新的 *FBXO38* 的转录剪接体——*gFBXO38t1*. *gFBXO38t1* 在多个组织广泛表达. 脂肪组织发育和细胞分化中的表达模式分析和报告基因分析都提示 *gFBXO38t1* 是鸡脂肪组织形成的抑制因子.

参 考 文 献

- [1] Kipreos E T, Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biol*, 2000, **1**(5): S3002
- [2] Bai C, Sen P, Hofmann K, *et al.* SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 1996, **86**(2): 263-274
- [3] Jin J, Cardozo T, Lovering R C, *et al.* Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev*, 2004, **18**(21): 2573-2580
- [4] Smaldone S, Laub F, Else C, *et al.* Identification of MoKA, a novel F-box protein that modulates Kruppel-like transcription factor 7 activity. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(3): 1058-1069
- [5] Hsu J Y, Reimann J D, Sorensen C S, *et al.* E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC (Cdh1). *Nat Cell Biol*, 2002, **4**(5): 358-366
- [6] Cardozo T, Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**(9): 739-751
- [7] Tsvetkov L M, Yeh K H, Lee S J, *et al.* p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol*, 1999, **9**(12): 661-664
- [8] Carrano A C, Eytan E, Hershko A, *et al.* SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, 1999, **1**(4): 193-199
- [9] Herbst A, Hemann M T, Tworowski K A, *et al.* A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep*, 2005, **6**(2): 177-183
- [10] Matsuzawa S I, Reed J C. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell*, 2001, **7**(5): 915-926
- [11] Kobe B, Kajava A V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, **11**(6): 725-732
- [12] Smith T F, Gaitatzes C, Saxena K, *et al.* The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 1999, **24**(5): 181-185
- [13] Smaldone S, Ramirez F. Multiple pathways regulate intracellular shuttling of MoKA, a co-activator of transcription factor KLF7. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(18): 5060-5068
- [14] Guo L, Sun B, Shang Z, *et al.* Comparison of adipose tissue cellularity in chicken lines divergently selected for fatness. *Poult Sci*, 2011, **90**(9): 2024-2034
- [15] Barber R D, Harmer D W, Coleman R A, *et al.* GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 2005, **21** (3): 389-395

- [16] Ikeobi C O, Woolliams J A, Morrice D R, *et al.* Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. *Anim Genet*, 2002, **33** (6): 428-435
- [17] Atzmon G, Blum S, Feldman M, *et al.* QTLs detected in a multigenerational resource chicken population. *J Hered*, 2008, **99**(5): 528-538
- [18] Matsumoto N, Laub F, Aldabe R, *et al.* Cloning the cDNA for a new human zinc finger protein defines a group of closely related Kruppel-like transcription factors. *J Biol Chem*, 1998, **273** (43): 28229-28237
- [19] Arsenijevic T, Gregoire F, Delforge V, *et al.* Murine 3T3-L1 adipocyte cell differentiation model: validated reference genes for qPCR gene expression analysis. *PLoS One*, 2012, **7**(5): e37517
- [20] Farmer S R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 2006, **4**(4): 263-273
- [21] 张志威, 李 辉, 王 宁. KLF 转录因子家族与脂肪细胞分化. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, **25**(11): 983-999
Zhang Z W, Li H, Wang N. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2009, **25**(11): 983-990
- [22] 张志威, 陈月婵, 裴文宇, 等. 过表达鸡 *Gata2* 或 *Gata3* 基因抑制 *Ppar γ* 基因的转录. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, **28**(9): 835-842
Zhang Z W, Chen Y C, Pei W Y, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2012, **28**(9): 835-842
- [23] Lefterova M I, Lazar M A. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, **20**(3): 107-114
- [24] Rosen E D, Macdougald O A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7**(12): 885-896
- [25] Shi H, Wang Q, Wang Y, *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein: an important gene related to lipid metabolism in chicken adipocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2010, **157**(4): 357-363
- [26] Mead J R, Irvine S A, Ramji D P. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)*, 2002, **80**(12): 753-769
- [27] Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, *et al.* Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2007, **50**(7): 1472-1480

Cloning, Expression and Function Analysis of Chicken *FBXO38t1**

ZHANG Zhi-Wei^{1, 2, 3}, SUN Ying-Ning^{1, 2, 3, 4}, RONG En-Guang^{1, 2, 3}, LI Hui^{1, 2, 3}, WANG Ning^{1, 2, 3}**

⁽¹⁾ Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China;

⁽²⁾ Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China;

⁽³⁾ College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

⁽⁴⁾ Biology and Forestry College, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract F-box proteins are widely present in eukaryotes, and their biological functions are diverse in animals. In this study, the full-length coding sequence of an unnamed gene LOC416151 (GenBank accession XM_414482) was cloned from the chicken abdominal adipose tissue by reverse transcriptase (RT)-PCR, and the sequence analysis showed that the acquired sequence (GenBank accession. JX290204) is one of the transcript variants of chicken *FBXO38*, which was designated as *gFBXO38t1*. Real-time RT-PCR analysis showed that *gFBXO38t1* was widely expressed in various chicken tissues, with a relatively higher expression level in the pancreas, ileum and abdominal fat tissue. In addition, *gFBXO38t1* was expressed in all the chicken abdominal fat tissues used in the present study, and at 3 and 4 weeks of age, the *gFBXO38t1* expression in lean males was significantly greater than that in fat males ($P < 0.05$) and no significant difference was observed at the other ages ($P > 0.05$). The *gFBXO38t1* expression decreased followed by the differentiation of chicken preadipocytes induced by oleate, and *gFBXO38t1* expressed more highly in chicken preadipocytes than in mature adipocytes ($P < 0.05$), suggesting that *gFBXO38t1* might play a negative role in the chicken adipogenesis. Additionally, The luciferase reporter assay showed that *gFBXO38t1* overexpression inhibited the promoter activities of chicken CCAAT/enhancer-binding protein α (*C/EBP α*), lipoprotein lipase (*LPL*), fatty acid synthase (*FASN*) and fatty acid-binding protein 4 (*FABP4*). The combined overexpression of *gKLF7* and *gFBXO38t1* did not lead to an enhanced ability for *gFBXO38t1* to regulate the promoter activities of chicken *LPL*, *FABP4* and *FASN*, indicating that *gFBXO38t1* may regulate promoter activities of these genes through a KLF7-independent manner. The current study provides evidence that the *gFBXO38t1* is involved in chicken adipogenesis.

Key words F-box proteins, KLF7, chicken, adipogenesis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00402

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2009CB941604), China Agriculture Research System (CARS-42) and Program for Innovation Research Team in University of Heilongjiang Province (2010td02).

**Corresponding author.

Tel: 86-451-55191770, E-mail: ningwang2001@yahoo.com

Received: January 9, 2013 Accepted: March 28, 2013