

内蒙古绒山羊皮肤毛囊差异表达 序列标签的筛选及分析

苏立宁^{1,2,3}, 李 华^{1,2}, 刘东军¹, 旭日干^{1*}

(1. 内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021;
2. 佛山科学技术学院, 佛山 528231; 3. 河北北方学院, 张家口 075000)

摘 要: 旨在筛选和分析内蒙古绒山羊与毛和绒生长相关的差异基因, 本研究采用 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR)研究内蒙古绒山羊胎儿期不同日龄皮肤中控制初级毛囊和次级毛囊不同分化的差异表达序列标签。结果, 共筛选了 15 条差异表达序列标签(dbEST 登录号 JK711022-JK711036), 其中 3 条 ESTs 与毛囊发育有关, 5 条 ESTs 与次级毛囊和皮脂腺的发育有关。生物信息分析显示, JK711036 与甲状腺激素受体相互作用蛋白 12(TRIP12) 基因有关, 其他 ESTs 功能未知。结果表明, 胎儿期初级毛囊和次级毛囊在多种代谢途径上都存在差异表达的基因, 这将为进一步研究山羊毛和绒的形成分子机制奠定基础。

关键词: 绒山羊; 毛囊; DDRT-PCR; 表达序列标签

中图分类号: S827; Q523.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)09-1499-05

Screening and Analysis of Differential Expressed Sequence Tags in Skin Hair Follicles for Cashmere Goats

SU Li-ning^{1,2,3}, LI Hua^{1,2}, LIU Dong-jun¹, XU Ri-gan^{1*}

(1. *The Key Laboratory for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology of Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China*; 2. *College of Life Science, Foshan University, Foshan 528231, China*; 3. *Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China*)

Abstract: To screen and analyze the genes associated with growth of goats' wool and cashmere, differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) technology was used to study the differentially expressed sequence tags (ESTs) at different embryo ages in skin primary and secondary follicles of Inner Mongolia Cashmere goats. 15 ESTs were identified (Acc_N: JK711022-JK711036), of which 3 ESTs might play a role in the development of hair follicle, and 5 ESTs might be related to secondary follicles and sebaceous glands. The results of bioinformatics analysis showed that JK711036 shared homology with other species' TRIP12 gene, but the function of other ESTs were unknown. All these were showed that many differential expressed genes was associated with primary and secondary wool follicles on metabolism pathways, which would establish molecular foundation for the formation of wool and cashmere in goats.

Key words: cashmere goats; hair follicle; DDRT-PCR; ESTs

内蒙古绒山羊的羊绒纤维细而柔软, 具有“软黄金”之称。山羊绒的品质是育种核心的关键, 目前有

收稿日期: 2011-12-21

基金项目: 国家转基因项目(2008zx08008-002); 博士后基金资助

作者简介: 苏立宁(1983-), 女, 河北衡水人, 助教, 硕士, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: sulining123@163.com; 李 华(1969-), 女, 博士, 教授, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: okhua4@yahoo.cn。二者并列为一作者

* 通讯作者: 旭日干, E-mail: xurg@imu.edu.cn

关对山羊绒产绒特性分子选育的研究主要采用了候选基因法,分别对表皮生长因子、骨形态发生蛋白、 β 转化生长因子、胰岛素样生长因子家族、内皮肽-1等有报道^[1],但主效基因尚未完全确定,探寻与内蒙古绒山羊毛被生长发育的未知基因,阐释毛和绒形成的分子机制的报道较少^[2-3]。山羊毛和绒分别由初级毛囊和次级毛囊产生,2种毛囊之间最大的区别是初级毛囊有皮脂腺而次级毛囊没有皮脂腺。

本研究以内蒙古绒山羊为材料,采用 DDRT-PCR 技术^[4-7],筛选与初级毛囊和次级毛囊有关的差异表达基因,并通过生物信息学方法对其进行分析,为进一步研究山羊绒形成的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

自内蒙古白绒山羊种羊场,取内蒙古绒山羊 50、70、75、80、90、100、120 和 130 日龄 8 个日龄的胎儿体侧部皮肤,每个日龄取 3 只,分为 2 组,其中 50、70、75 和 80 日龄为 I 组;90、100、120 和 130 日龄为 II 组,用于分析初级和次级毛囊发育的相关基因,其中 II 组重点筛选与皮脂腺发育的相关基因^[8]。将采集的 3 cm×3 cm 的皮肤置于 DEPC 处理的水中洗去表面血液,放入 2 mL 冻存管,作好标记后立即投入液氮速冻。

DDRT-PCR 中所使用的引物参照 Von der Kammer 等^[9]得到的 3 个 3' 端锚定引物(HT11A/C/G)和 8 个随机引物(H-AP1-8)共 24 个组合,均由上海生工生物工程公司合成。

1.2 总 RNA 的提取、反转录及 DDRT-PCR

利用 RNAiso Plus 分别抽提各个日龄皮肤总 RNA,纯化并测定吸光度,分别将 8 个日龄的皮肤样品的总 RNA 按终浓度 $0.4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,混合为 8 个总 RNA 池,用于 RNA 的反转录。DDRT-PCR 参照 Von der Kammer 等^[9]的方法并进行优化。

1.3 差异片段的获取与克隆测序

PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,银染后将获得的目的胶条带放入加有双蒸水的 1.5 mL 管中洗涤,离心,去上清,加入 30 μL 双蒸水,用吸头尖端将凝胶碾碎,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜,离心,取上清用相应的引物组合再进行扩增,用 PCR 产物回收试剂盒纯化回收。纯化的差异片段,克隆到 PMD-18T 载体中,转化并挑选阳性克隆测序。

1.4 差异片段的鉴定及数据处理

根据测序结果设计引物,以 βactin 为内参,利用半定量 RT-PCR 验证差异片段的真实性,同时对获得的阳性片段再用实时荧光定量检测,采用 Ct 值比较法^[10],用目的基因的平均 Ct 值减去管家基因的平均 Ct 值,得到了 ΔCt 值后,再分别减去其中一个日龄的 ΔCt ,得到 $\Delta\Delta\text{Ct}$,再计算出 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值,利用 SPSS Statistics 17.0,通过单因素方差分析法比较 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值的大小,从而得出目的基因 mRNA 的相对表达量差异。验证为阳性的差异条带序列,提交到 dbEST 数据库,获登录号。通过 BLASTn、tBLASTx 等分析表达序列标签(ESTs)的信息。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取、检测及差异片段的获取

总 RNA 提取良好,28S 和 18S 电泳条带清晰(图略),总 RNA 在 260 和 280 nm 处吸收值的比值都在 1.8~2.0 之间。用 24 个引物组合对 2 组皮肤的 cDNA 进行扩增,得到 39 条差异显示的 cDNA 片段,大小在 70~1 100 bp 之间。

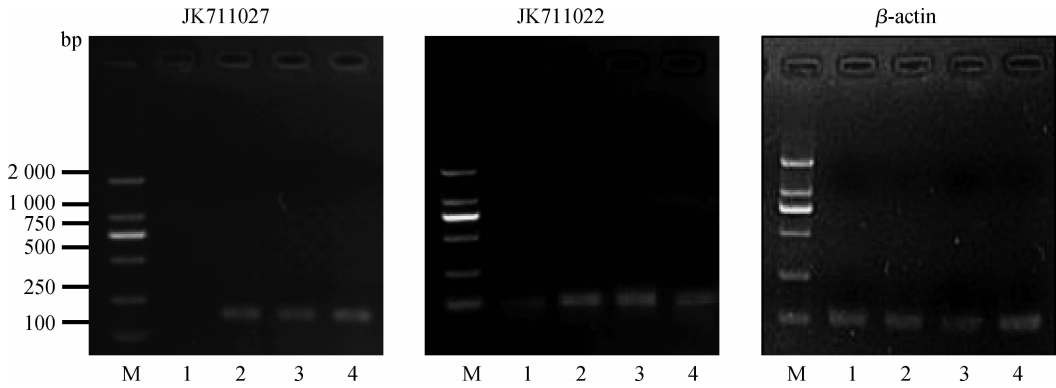
2.2 差异片段真实性验证

将 39 条序列测序后设计半定量引物,以 $\beta\text{-actin}$ 为内参,初次用 RT-PCR 验证其真实性。I 组有 7 条阳性差异表达的片段(图 1),序列登录号分别为 JK711022、JK711025、JK711027、JK711031、JK711032、JK711033、JK711034。II 组有 8 条阳性差异表达的片段(图 2),序列登录号分别为 JK711023、JK711024、JK711026、JK711028、JK711029、JK711030、JK711035、JK711036。

用实时荧光定量 PCR 量化差异片段的表达(表 1),I 组中差异表达片段 JK711022、JK711025、JK711027 和 JK711032 在各日龄差异表达均不显著($P>0.05$)。而 JK711031 在 75 和 80 日龄的表达量显著高于 50 和 70 日龄($P<0.05$);JK711033 在 70 日龄的表达量最低,75 日龄最高,显著高于其他日龄的表达量($P<0.05$);JK711034 在 80 日龄时表达量最高,明显高于其它日龄($P<0.05$),其它日龄间表达差异不显著($P>0.05$)。II 组中差异表达片段 JK711023、JK711035 和 JK711036 在各胎儿日龄差异表达均不显著($P>0.05$)。而 JK711024 在 100 日龄的表达量最低,120 日龄最高,与 90 和 130 日龄的表达量差异显著($P<$

0.05)。JK711026 和 JK711028 在 120 日龄的表达量最高,显著高于其它胎儿日龄($P < 0.05$),其它日龄间表达差异不显著($P > 0.05$)。JK711029 在 120 和 130 日龄的表达量较高,显著高于 90 和 100 日

龄的表达量($P < 0.05$)。JK711030 在 100 日龄的表达量最低,与 120 和 130 日龄的表达量相比,差异显著($P < 0.05$)。

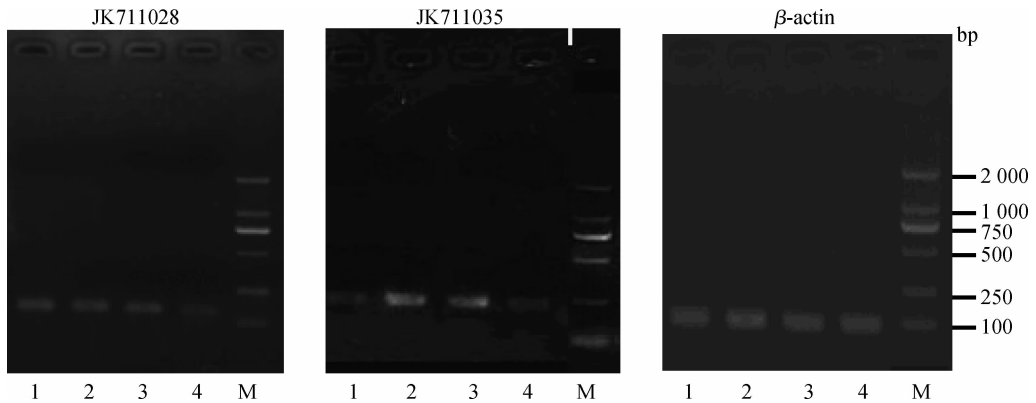


M. DNA 相对分子质量标准; 1. 50 d; 2. 70 d; 3. 75 d; 4. 80 d

M. DNA marker DL2000; 1. 50 d; 2. 70 d; 3. 75 d; 4. 80 d

图 1 I 组部分差异片段及 β -actin 的 RT-PCR 验证结果

Fig. 1 Identification of partial differential fragments and β -actin from group I using RT-PCR



M. DNA 相对分子质量标准; 1. 90 d; 2. 100 d; 3. 120 d; 4. 130 d

M. DNA marker DL2000; 1. 90 d; 2. 100 d; 3. 120 d; 4. 130 d

图 2 II 组部分差异片段及 β -actin 的 RT-PCR 验证结果

Fig. 2 Identification of partial differential fragments and β -actin from group II using RT-PCR

2.3 差异显示 cDNA 片段的生物信息学分析

将所获得的 15 条表达序列标签与山羊和其他物种核酸数据库、dbEST 数据库等进行序列比对,结果表明,JK711036 与山羊数据库中已知序列无显著相似性,与牛的甲状腺激素受体相互作用蛋白 12 (TRIP12) 基因的相似性为 98%,与其他物种的 TRIP12 基因的同源性也很高,推测该基因可能是绒山羊 TRIP12 基因的部分片段,其余 14 条 ESTs 未找到与之匹配的同源性高的序列,推断为新的 EST。

3 讨论

绒山羊产绒是一种多基因遗传性状,受多因素的影响,如次级毛囊数量、次级毛囊与初级毛囊的比值及毛囊周期调控因子等^[11]。本研究获得的 15 条差异表达序列标签,其中 JK711036 推测为山羊 TRIP12 的片段,目前关于绒山羊 TRIP12 基因的结构及其功能尚未见报道。通过代谢途径分析数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析得知,TRIP12 参与哺乳动物蛋白质泛素降解过程 (Ubiquitin fusion degradation, UFD)。

TRIP12 作为 UFD 途径中的 E3 连接酶^[12], 调控细胞周期和信号转导过程。甲状腺激素与甲状腺激素受体在脂类、糖类和蛋白代谢等生理学方面起作用, TRIP12 作为一种甲状腺激素受体相互作用蛋白, 具有转录调节功能, 与多重代谢综合征发生有关^[13-14]。Notch 信号途径在毛囊的发育中发挥重要

的作用, 该途径在很大程度上受蛋白泛素化过程的调控, TRIP12 作为 E3 的一种, 调控 Notch 信号途径的作用, 影响毛囊的发育^[15]。但 JK711036 片段量化表达在几个日龄的胎儿皮肤中不显著, 推测该基因可能不是毛和绒、皮脂腺发育的主效基因。

表 1 差异片段在不同日龄胎儿皮肤中的相对表达量

Table 1 Relative mRNA levels of differential fragments at different embryo ages in skin

差异片段 (登录号)	I 组				II 组			
	50 d	70 d	75 d	80 d	90 d	100 d	120 d	130 d
JK711022	1.29±0.42	4.40±0.84	3.64±0.96	3.60±2.56	—	—	—	—
JK711025	1.20±0.27	1.24±0.20	1.41±0.37	1.90±1.2	—	—	—	—
JK711027	1.15±0.16	1.58±0.35	1.67±0.56	2.02±0.80	—	—	—	—
JK711031	1.58±0.50 ^a	1.43±0.30 ^a	3.07±0.72 ^b	2.23±0.87 ^b	—	—	—	—
JK711032	1.65±0.57	1.36±0.20	2.67±0.47	1.82±0.85	—	—	—	—
JK711033	1.29±0.30 ^a	0.44±0.37 ^a	11.21±1.5 ^b	0.77±0.40 ^a	—	—	—	—
JK711034	1.88±0.82 ^a	1.13±0.53 ^a	2.25±0.70 ^a	4.60±1.12 ^b	—	—	—	—
JK711023	—	—	—	—	1.65±0.67	0.58±0.17	1.30±0.90	1.25±0.66
JK711024	—	—	—	—	1.34±0.29 ^b	0.04±0.01 ^a	5.75±0.58 ^c	1.64±0.81 ^b
JK711026	—	—	—	—	1.61±0.53 ^a	1.25±0.13 ^a	12.45±1.73 ^b	1.96±0.23 ^a
JK711028	—	—	—	—	1.58±0.50 ^a	1.99±0.14 ^a	2.99±0.84 ^b	1.43±0.32 ^a
JK711029	—	—	—	—	1.48±0.97 ^a	1.20±0.30 ^a	5.68±1.15 ^b	5.67±1.64 ^b
JK711030	—	—	—	—	1.48±0.43 ^{ab}	0.49±0.19 ^a	2.03±0.98 ^b	2.01±0.08 ^b
JK711035	—	—	—	—	1.88±0.78	3.20±0.06	3.82±0.57	2.16±0.36
JK711036	—	—	—	—	1.22±0.31	0.66±0.17	1.33±0.62	1.27±0.30

同一行中上标不同表示差异显著($P < 0.05$)

Values with different superscripts in the same row are significantly different($P < 0.05$)

其他的 14 条差异表达序列标签在数据库中未发现高度同源序列, 暂无对应的基因。JK711031、JK711033 和 JK711034 3 条片段在 50~80 日龄胎儿皮肤毛囊中的表达差异显著, 50 日龄绒山羊胎儿皮肤各部位初级毛囊还未形成, 70 日龄各部位已出现初级毛囊, 75 日龄开始出现次级毛囊, 80 日龄各部位出现次级毛囊^[8], 因此推测这 3 个片段对应的基因可能在毛囊发育中发挥了一定的作用。与其它片段相比较, JK711033 对应的基因可能在次级毛囊起始时发挥较大的作用, JK711031 和 JK711034 对应的基因在次级毛囊出现后发挥了主要作用。90

日龄初级毛囊和次级毛囊已经分开, 100 日龄初级毛囊生长最快, 且初级毛囊可见皮脂腺, 120 日龄次级毛囊生长最快, 130 日龄次级毛囊皮脂腺消失^[8], 在 90~130 日龄的胎儿皮肤毛囊发育中, 本研究发

发现 JK711024、JK711026、JK711028、JK711029 和 JK711030 几个片段表达差异显著, 其余不显著, 这几个片段对应的基因在次级毛囊和皮脂腺的发育中发挥作用。与其它片段比较, JK711026 对应的基因可能在次级毛囊生长最快时发挥主导作用, JK711029 对应的基因在次级毛囊皮脂腺的消失中表达量最高, 发挥较大的作用。

4 结 论

在不同日龄的胎儿皮肤毛囊中发现了 15 条表达量差异的片段,其中 8 条 ESTs 表达量差异显著。一条片段与牛的 *TRIP12* 基因同源率为 98%,推测 *TRIP12* 基因可能通过蛋白泛素降解过程调控毛囊的发育,但表达量的多少与毛囊的不同发育阶段无显著相关性。另外 14 条片段未发现同源序列,它们的结构、功能以及与毛囊不同发育阶段的关系有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 苏立宁,李 华,旭日干,等. 毛囊分子调控机制 [J]. 生命的化学,2011, 31(3): 455-460.
- [2] 席海燕,周欢敏,郑 琰. 绒山羊生长期次级毛囊 cDNA 消减文库的构建及其序列分析 [J]. 中国农业科学,2009, 42(10): 3749-3754.
- [3] 尹 俊,扈庭茂,李金泉,等. 内蒙古绒山羊毛囊兴盛期皮肤 cDNA 文库的构建及 KAP6-2 cDNA 的克隆 [J]. 动物学研究,2004, 25(2): 166-171.
- [4] 李拥军,敖 红,孙桂金,等. 羊体内发育与体外培养特定阶段胚胎基因差异表达的研究 [J]. 畜牧兽医学报,2005, 36(12): 1281-1285.
- [5] LATHE R, HARRIS A. Differential display detects host nucleic acid motifs altered in scrapie-infected brain [J]. *J Mol Biol*, 2009, 392(3): 813-822.
- [6] 锡建中,赵振华,李少华,等. 山羊植入前胚胎发育相关基因的差异表达分析 [J]. 江苏农业科学,2009, (2): 37-39.
- [7] 钱丽丽,贾 青,李雪梅,等. 山羊高繁殖力相关基因的筛选与分析 [J]. 畜牧兽医学报,2011, 42(4): 578-584.
- [8] 张燕军,尹 俊,李金泉,等. 内蒙古阿尔巴斯绒山羊毛囊结构及形态发生过程研究 [J]. 中国农业科学,2007, 40(5): 1017-1023.
- [9] VON DER KAMMER H, ALBRECHT C, MAY-HAUS M, et al. Identification of genes regulated by muscarinic acetylcholine receptors: application of an improved and statistically comprehensive mRNA differential display technique [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(10): 2211-2218.
- [10] 周汝真,李若瑜,余 进. 白念珠菌抗氧化基因体外表达研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2009, 4(6): 325-329.
- [11] 王宏博,高雅琴. 绒山羊皮肤毛囊结构及其与产绒量关系的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(29): 12701-12703.
- [12] PARK Y, YOON S K, YOON J B. The HECT domain of TRIP12 ubiquitinates substrates of the ubiquitin fusion degradation pathway [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(3): 1540-1549.
- [13] TANG W, MILLER M B, RICH S S, et al. Linkage analysis of a composite factor for the multiple metabolic syndrome [J]. *Diabetes*, 2003, 52(11): 2840-2847.
- [14] DOCO-FENZY M, LANDAIS E, ANDRIEUX J, et al. Deletion 2q36, 2q36. 3 with multiple renal cysts and severe mental retardation [J]. *Eur J Med Genet*, 2008, 51(6): 598-607.
- [15] RUBIO-ALIAGA I, PRZEMECK G K H, FUCHS H, et al. Dll1 haploinsufficiency in adult mice leads to a complex phenotype affecting metabolic and immunological processes [J]. *PloS One*, 2009, 4(6): 506-512.

(编辑 郭云雁)