

# 牦牛 *KDM1A* 基因克隆及其在不同发育时期睾丸中的表达规律

韩 杰, 熊显荣, 王 艳, 杨显英, 阿果约达, 黄向月, 李 键\*

(西南民族大学 生命科学与技术学院, 成都 610041)

**摘 要:** 本研究旨在克隆牦牛组蛋白去甲基化酶 1A(lysine-specific histone demethylase 1A, *KDM1A*) 基因, 检测其在牦牛不同组织及睾丸发育过程中的表达水平。采集 4~5 岁健康牦牛心、脾、肝、卵巢、肺、大脑、肾、子宫、大肠、睾丸和胃, 提取各组织样的总 RNA, 另采集不同发育时期睾丸组织: 胎牛(5~6 月)、幼年时期(1~2 岁)、性成熟时期(4~5 岁)、老年时期(9~10 岁)。利用 RT-PCR 方法获取牦牛 *KDM1A* 的 CDS 区基因序列, 并使用生物信息软件分析其结构和功能。采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 检测 *KDM1A* 在不同组织中的表达水平, 并探究不同发育时期睾丸中 *KDM1A* 的表达规律。结果表明, 本研究克隆获得牦牛 *KDM1A* 基因 2 401 bp 的 cDNA 序列。牦牛 *KDM1A* 核苷酸序列与野牦牛、黄牛的同源性较高, 表明该基因在进化过程中较为保守。牦牛 *KDM1A* 基因 CDS 区为 2 331 bp, 编码 776 个氨基酸残基。*KDM1A* 在各组织中均有表达, 其中睾丸和肝中表达量最高。*KDM1A* mRNA 的表达水平呈先上升(从胎牛~性成熟时期)再下降(性成熟~老年时期)的趋势。综上所述, 本研究成功克隆了 *KDM1A* 基因, 其在不同发育时期睾丸中表达规律不同, *KDM1A* 基因可能参与牦牛睾丸的发育。

**关键词:** 牦牛; *KDM1A*; 表达; 睾丸

中图分类号: S823.8<sup>+</sup>5.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)12-2777-09

## Cloning of Yak *KDM1A* Gene and Its Expression Profile in Testis during Different Developmental Stages

HAN Jie, XIONG Xian-rong, WANG Yan, YANG Xian-ying,

A GUO Yue-da, HUANG Xiang-yue, LI Jian\*

(College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The aim of this study was to clone the lysine-specific histone demethylase 1A (*KDM1A*) gene, identify its expression in various tissues of yak, and to analyze the expression pattern in different growth periods of yak testis. The total RNA was extracted by collecting the heart, spleen, liver, ovary, lung, cerebrum, kidney, uterus, large intestine, testis and stomach from healthy yaks aged 4-5 years old. In addition, the testes at different developmental stages were collected including fetus (5-6-month-old), infancy (1-2-year-old), sexual maturity (4-5-year-old) and old age (9-10-year-old). RT-PCR was adopted for amplification of the complete CDS of *KDM1A* gene in yak. Meanwhile the structure and function of *KDM1A* gene in yak were analyzed by a series of bioinformatics softwares. Then the expression of *KDM1A* in different tissues and testes at different developmental stages were detected by RT-qPCR. The results showed that the

收稿日期: 2018-03-11

基金项目: 四川省科技支撑计划(2017NZ0076); 西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2018SZ35); 四川省肉牛现代繁殖技术研究与示范岗位资助

作者简介: 韩 杰(1994-), 男, 河南商丘人, 回族, 硕士生, 主要从事动物细胞和胚胎工程研究, E-mail: jie220622@163.com

\* 通信作者: 李 键, 教授, 博士生导师, 主要从事牦牛细胞生物学和发育生物学研究, E-mail: jianli\_1967@163.com

*KDM1A* was obtained by cDNA cloning, the length of which was 2 401 bp. And the length of the *KDM1A* gene was 2 331 bp in CDS, encoding 776 amino acids. It was high homology identity to that of corresponding cDNA from bovine, which showed that the *KDM1A* gene was conservative in the process of evolution. The expression profile of *KDM1A* was wide in yak tissues, but there are some differences in various tissues. For example, the expression level was the highest in liver and testis. The expression level of *KDM1A* mRNA during testis development presented the tendency of going up firstly and going down secondly. The complete CDS of *KDM1A* gene was successfully cloned and the *KDM1A* had a significant different expression among the 4 periods of yak testis, which indicted that the *KDM1A* gene might play an important role in testis development of yak.

**Key words:** yak; *KDM1A*; expression; testis

牦牛 (*Bos grunniens*) 生活在中国高原地区, 能够适应高寒、缺氧的生态环境, 能充分利用高原地区天然草地为人们提供优质健康的食品。此外, 牦牛在动物基因遗传资源研究中也是一个极其珍贵的基因库, 在自然繁殖的牦牛群中, 牦牛的繁殖力仅为 30%~40%。近些年, 虽然对牦牛育种的研究不断深入, 并取得了较大的进展<sup>[1]</sup>。牦牛繁殖力低的问题严重阻碍了牦牛业及高原地区的经济发展。因此, 牦牛繁殖性能的研究对提高牧区人们的生活水平和丰富中国遗传资源多样性具有重大意义<sup>[2]</sup>。

组蛋白去甲基化酶 1A (lysine-specific histone demethylase 1A) 是一种黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 依赖性单胺氧化酶, 是胺氧化酶家族中的一员, 其主要包括 Tower、SWIRM 和胺氧化酶 3 个结构域<sup>[3-4]</sup>。同时, *KDM1A* 介导的是 H3K4me1/2 和 H3K9me1/2 去甲基化作用<sup>[5]</sup>。对该基因的研究发现, *KDM1A* 在哺乳动物组织中普遍表达, 并且可通过抑制或激活相关基因转录, 来调控 DNA 损伤、还原转录子的活性以及纺锤体和染色体的缺失, 进而在多种生物体的生殖细胞系中发挥重要作用<sup>[6-11]</sup>。此外, 该基因同样参与了细胞增殖、凋亡和转移、胚胎发育的调节、机体造血的调控以及性激素受体介导基因的转录调控等过程<sup>[6, 12-16]</sup>, 由此可知, *KDM1A* 基因在哺乳动物生殖发育调控、造血系统、多能干细胞的调控及内分泌等相关生物学活动的调节中均起重要作用。

关于 *KDM1A* 基因的研究主要集中在人和动物的生长发育及肿瘤等相关疾病上<sup>[17-19]</sup>, 而该基因在牦牛上的研究未见相关报道。为进一步研究 *KDM1A* 基因在牦牛睾丸中的表达情况, 本研究克隆牦牛 *KDM1A* 基因, 并对 *KDM1A* 序列的蛋白结

构和生物信息学功能进行分析和预测; 应用实时荧光定量 PCR 技术检测牦牛 *KDM1A* 基因在睾丸中的表达情况, 为进一步研究牦牛的 *KDM1A* 基因及其在牦牛生殖生理过程中所发挥的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

Trizol Reagent 购自 Invitrogen (美国) 公司, SYBR<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒、PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit 反转录试剂盒、Premix Taq<sup>TM</sup> DNA 聚合酶、pMDTM19-T 载体均购自 TaKaRa (大连) 公司, 感受态细胞 DH5 $\alpha$  购于天根生化科技有限公司, DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司, 其他无特殊说明均为国产分析纯; 荧光定量 PCR 仪、电泳仪、琼脂糖凝胶成像系统均购自美国 Biodine Rad 公司。

### 1.2 牦牛组织样本采集

样本均采自成都青白江屠宰场, 无菌采集健康牦牛 (4~5 岁) 的不同组织: 心、脾、肝、卵巢、肺、大脑、肾、子宫、睾丸、胃、大肠; 采集胎牛 (5~6 月)、幼年时期 (1~2 岁)、性成熟时期 (4~5 岁)、老年时期 (9~10 岁) 牦牛睾丸组织。所需样本均采集 3 头, 保存于液氮中。

### 1.3 牦牛组织总 RNA 的提取及其完整性检测

Trizol 法提取样本 RNA, 对所提取的 RNA 使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行完整性检测, 结果显示, 两条以上亮条带, 且无弥散和拖带的现象, 表明所得 RNA 完整性很好。应用核酸分析仪检测浓度和 OD 值, 选取 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 值为 1.8~2.0 的 RNA 作为模板, 按照 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit 反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 使用 GAP-

DH 基因的特异性引物检测 cDNA 的质量,对琼脂糖凝胶电泳结果显示单一清晰条带的 cDNA 进行编号,−20 °C 保存备用。

#### 1.4 引物设计及合成

根据 NCBI 已报道的野牦牛 (*Bos mutus*) *KDM1A* (GenBank 登录号: XM\_005905175.2) 和 *GAPDH* 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号: AC\_000162.1), 使用 Primer 5.0 分别设计引物 (表 1)。由上海生工生物工程有限公司合成。

#### 1.5 目的基因的扩增与克隆

PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 其中 Premix Taq™ DNA 聚合酶 12.5  $\mu\text{L}$ , cNDA 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O

9.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 1.0  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 1 min (3 段的退火温度分别为 62.2、56.4 和 53.0 °C), 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 7 min。10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 紫外光下切取目的条带并按照胶回收试剂盒说明书回收目的 DNA。然后将回收产物与 pMDTM19-T 载体在 16 °C 连接过夜, 转化到感受态细胞 DH5 $\alpha$  中。将菌液均匀涂于 LB 固体培养基 (AMP<sup>+</sup>) 平板上, 37 °C 培养过夜, 随机挑去单菌落, 在摇床震荡培养 8 h, 以菌液为模板进行 PCR 鉴定, 将呈阳性结果的菌液, 送上海生物工程有限公司测序。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence	退火温度/°C T <sub>m</sub>	产物长度/bp Product size	用途 Utilization
<i>KDM1A-1</i>	F1:GTCCTGGGTCTGCGACC	62.2	674	<i>KDM1A</i> cDNA 扩增 Amplification of cDNA of <i>KDM1A</i>
	R1:GCTGCTGCCAAGCCTGAG			
<i>KDM1A-2</i>	F2:TGGTCTTATCAACTTCGGCATC	56.4	1 167	<i>KDM1A</i> cDNA 扩增 Amplification of cDNA of <i>KDM1A</i>
	R2:GGAAGAGGCGGCACAAACT			
<i>KDM1A-3</i>	F3:TCAGGGTGCGAAGTGATAG	53.0	817	<i>KDM1A</i> cDNA 扩增 Amplification of cDNA of <i>KDM1A</i>
	R3:TATGCAGCCAAAGACACG			
<i>GAPDH</i>	F:TGCTGGTGCTGAGTATGTGGTG	60.0	293	内参基因扩增 Amplification reference genes
	R:TCTTCTGGGTGGCAGTGATGG			
<i>KDM1A</i>	F4:GATACTGTGCTTGTCACCGAG	60.0	245	实时荧光定量 PCR Real time quantitative PCR
	R4:GGATTCCCTCCAAGACCTGTTAC			

F. 正向引物; R. 反向引物

F. Forward primer; R. Reverse primer

#### 1.6 牦牛 *KDM1A* 基因生物信息学分析

NCBI 中 ORF Finder 分析 *KDM1A* 序列的开放阅读框, 并获得氨基酸序列, BLAST 在线工具进行同源性比对; 使用在线软件 ProtParam、ProtScale (理化性质、疏水性)、SignalP (信号肽)、TMHMM (跨膜区)、NetPhos (磷酸化位点)、SOPMA、SWISS-MODEL (二级结构、三级结构) 对 *KDM1A* 蛋白进行生物信息学分析; 在 NCBI 中找到需要建树的相关物种该基因序列, 并利用 MEGA 5.0 软件进行比对和系统进化树构建。

#### 1.7 牦牛 *KDM1A* 基因组织表达谱检测

采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 检测 *KDM1A* 基因在牦牛心、脾、肝、卵巢、肺、大肠、大脑、肾、子宫、睾丸、胃中的表达。RT-qPCR 反应体系为 15  $\mu\text{L}$ , 其中 SYBR® Premix Ex Taq™ II 7.5  $\mu\text{L}$ , cNDA 1.0  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 5.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环, 重复 3 次。

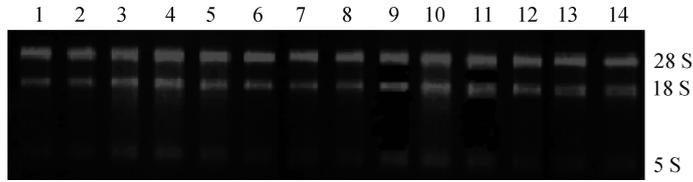
#### 1.8 牦牛睾丸组织中 *KDM1A* 基因表达分析

采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time

PCR, RT-qPCR) 检测不同时期牦牛睾丸中 *KDM1A* 基因的表达。RT-qPCR 反应体系同 1.7。每个样本进行 3 次重复,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对定量结果进行分析。

### 1.9 数据分析

荧光定量结果用“平均值±标准误 (Mean±SEM)”表示。采用 SPSS 软件进行显著性分析,  $P < 0.01$  差异极显著,  $P > 0.05$  差异不显著,  $P < 0.05$  差异显著。



1. 肝; 2. 睾丸; 3. 心; 4. 脾; 5. 肺; 6. 大肠; 7. 卵巢; 8. 肾; 9. 子宫; 10. 大脑; 11. 胃; 12. 胎牛睾丸; 13. 幼年期睾丸; 14. 老年期睾丸

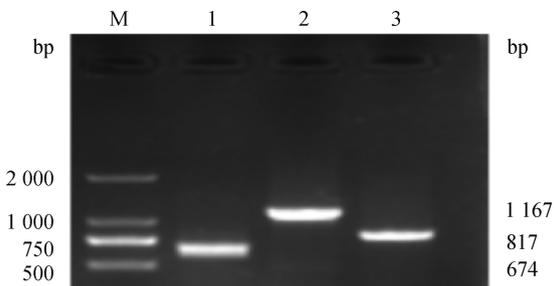
1. Liver; 2. Testis; 3. Heart; 4. Spleen; 5. Lung; 6. Large intestines; 7. Ovary; 8. Kidney; 9. Uterus; 10. Cerebrum; 11. Stomach; 12. Fetal bovine testis; 13. Juvenile testis; 14. Senile testis

图 1 各组织 RNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Result of agarose gel electrophoresis of different tissues RNA

### 2.2 牦牛 *KDM1A* 基因 CDS 扩增及克隆测序

以牦牛睾丸组织的总 RNA 为模板,利用 RT-PCR 对 *KDM1A* CDS 区进行扩增,得到单一清晰条带(图 2),并使用 DNAMAN 对所得序列进行拼接。获得核苷酸序列为 2 401 bp(图 3),开放阅读框为 2 331 bp,共编码 776 个氨基酸。



M. DL2000 DNA marker; 1~3. *KDM1A*-1、*KDM1A*-2、*KDM1A*-3 的 PCR 产物

M. DL2000 DNA marker; 1-3. The PCR products of yak *KDM1A*-1, *KDM1A*-2, *KDM1A*-3

图 2 牦牛 *KDM1A* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 Result for PCR amplification of yak *KDM1A*

### 2.3 物种间 *KDM1A* 基因同源性比较及进化树构建

将克隆测序的牦牛 *KDM1A* 基因与黄牛(XM\_005203319.1)、野牦牛(XM\_005905175.2)、绵羊

## 2 结果

### 2.1 样本 RNA 完整性检测

用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,结果显示,所提组织 RNA 均出现两条清晰明亮的条带(18S 和 28S),且无弥散和拖带的现象,无蛋白和 DNA 等杂质的污染,表明所得 RNA 完整性很好(图 1)。

(XM\_012152442.2)、山羊(XM\_995676880.3)、野猪(NM\_001112687.1)、骆驼(XM\_010979844.1)、人(KJ\_904681.1)、犬(XM\_022413506.1)、猫(XM\_019836867.1)、马(XM\_014737273.1)、家鼠(NM\_001356567.1)、兔(XM\_008265704.2)、原鸡(XM\_015297587.1)、非洲爪蟾(XM\_002936594.4)进行比对,同源性分别为 99.6%、99.7%、97.6%、97.6%、93.6%、93.8%、90.9%、93.0%、92.9%、93.0%、89.4%、89.5%、81.5%、77.9%。随后对 15 个物种 *KDM1A* 基因进行系统进化树构建,结果表明,该基因在物种进化过程中有很高的保守性,其中与牦牛 *KDM1A* 基因亲缘关系最近的是野牦牛,其次是黄牛、绵羊、山羊等(图 4)。

### 2.4 牦牛 *KDM1A* 蛋白结构和功能预测

采用 ExPASy 在线工具分析 *KDM1A* 蛋白的理化性质,该蛋白分子质量为 85.96 ku,分子式  $C_{3823}H_{6038}N_{1052}O_{1155}S_{23}$ ,等电点 5.82,脂肪系数 84.21,半衰期 30 h,不稳定指数为 41.46,带负电残基数(Asp + Glu) 97,带正电残基数(Arg + Lys) 85。推测该蛋白可能是不稳定的酸性蛋白。出现频率较高的氨基酸残基有 Glu(8.1%)、Val(7.1%)、Leu(9.9%)、Ala(8.4%),且不包括吡咯赖氨酸(Pyl)和硒半胱氨酸(Sec)。疏水性预测分析,*KDM1A*蛋白亲水性分值在第15位最小为-3.144,

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
GTCCTGGGCTGCGACCCCATGGAACCGGGAATCGCAGACGCGCGGAGGGCGACGGACCAGCGGGCGCAAGCGGGCGCGTGTAGATATAGAGAGATGGGTGAAAGTTGGCCAAAC
M E T G I A E T P E G R R T S R R K R A I V E Y R E M G E S L A N
130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
CTCTCAGAAGCAGTATTATTAGAGAGAGAGAAATGCTAAAGCGGAGAAAGAAAGCTTCTCCACCACCCCTCAAGCCCTCAGGAGAAATGAAAGTGGAGCCGAG
L S E D E Y Y S E E E R N A K A E K E K K L P P P P P Q A P P E E E N E S E P E
250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
GAACCATCTGGCGAAGCAGGACTTCAAGACGACAGTCTGGAGGTTGGAGCGGCAGCATCAGGTGTGGAGGGTGCAGCTTCCAGAGTAGACTTCCCTCATGACCCGGATGACT
E P S G Q A G G L Q D D S S G Y G D G Q A S G V E G G A A F Q S R L P H D R M T
370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
TCTCAAGAAGCAGCTGTTTTCGGATATCAICAGTGGACCACAGCAGACCCGAGAGTITTTCTGTTCATTAGAAATCGCACATTGCAGTGTGGTATGATAATCCAAAGATTCACTG
S Q E A A C F P D I I S G P Q Q T Q K V F L F I R N R T L Q L W L D N P K I Q L
550     560     570     580     590     600     610     620     630     640     650     660
CACCGATTACAGTATTAGAGCGTCTGGTCTTATCAACTTCGGCATCTATAAGAGATAAAGCCCTCCCAACTAAGAAGACGAAAGGTAATCATCATAGCTCTGGGGTCTCA
H R V H S Y L E R H G L I N F G I Y K R I K P L P T K K T G K V I I I G S G V S
670     680     690     700     710     720     730     740     750     760     770     780
GGCTTGGCAGCAGCAATTCACTTACAGAGTTTGGAAATGATGACACTTCTGGAAGCAGGAGTCTGTGGGTGGACGAGTGTCTACATTTCGCAAGGAAACTATGTAGTACCTT
G L A A A L Q L Q S F G M D V T L L E A R D R V G G R V A T F R K G N Y V A D L
790     800     810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
GGAGCCATGGTAGTACAGTCTTGGAGGGAATCCCATGGCTGTGGTTCAGCAACAAGTA AATATGGAATGGCCAAAGATCAAGCAAAATGCCACTTATTAAGCGAATGGACAGCT
G A M V V T G L G N N P M T V S K Q V V N M E L A K I K Q K C P L Y E A N G Q A
910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000    1010    1020
GTTCTAAAGAGAAAGTAAATGGTAGCAGAGTATTAACCGTGTCTAGAGACTACA TCTTACCTTAGTTCATCACTGACTGCAAGTCCCAAGTCCCAATTAAGCGCTGTCTCCCTGGC
V P K E K D E M V E Q E F N R L L E A T S Y L S H Q L D F N V L N N K P V S L G
1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120    1130    1140
CAGGCTTGGAAAGTGTCAATTCAGTTCAGAAAGACATGTCAAAGATGAACGATTGAA CATTGGAAGAAGTAGTGAAAACCTCAGGAGAACTGAAGGAACTTCTTAATAAGATGGTA
Q A L E V V I Q L Q E K H V K D E Q I E H W K K I V K T Q E E L K E L L N K M V
1150    1160    1170    1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
AATTTAAAGAGAAATTAAGAAGTCCATCAGCAATACAAGAAGCAATCGAAGTCAA CCACCCAGAGATATCACTGTGAGTCTTATAGTAAAGCAACACAGGGATCTGACTGCC
N L K E K I K E L H Q Q Y K E A S E V K P P R D I T A E F L V K S K H R D L T A
1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380
CTGTGTAAAGAAATGATGAATTAGCTGAGACCAAGGAAACTAGAAGAAAACCTCAA GAGTGGGAAGCAATCCCCCAAGTGTATATATCTCTCATCAAGAGACAGACAGATACTT
L C K E Y D E L A E T Q G K L E E K L Q E L E A N P P S D V Y L S S R D R Q I L
1390    1400    1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
GATTGGCAATTTGCAAAATCGAGTGTGCTAATGCCAGCCTCTCTCCACTCTCCCTC AAGCACTGGGATCAGGATGATGACTTTGAGTTCCTGGCAGCCACTGACGGTGAAGAA
D W H F A N L E F A N A T P L S T L S L K H W D Q D D D F E F T G S H L T V R N
1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600    1610    1620
GGCTACTGTGTGCTGTGGCTTTGACGAGAGCCCTGGACATAAATCTGAATACGA GTTCGGCAGGTTGCTACACAGCTTCAGGCGCGAAGTGTAGCTGTGAATACCCGATCC
G Y S C V P V A L A E G L D I K L N T A V R Q V R Y T A S G C E V I A V N T R S
1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700    1710    1720    1730    1740
ACAAGCCAGACTTCATTATAAGTTCAGCGCGTCTCTGTACCTTCCCTTGGCGGCTTGAAGCAGCAGCCACAGCTGTTCAGTGTTCGGCCGCTCTTCTGAGTGGAAAAATCATC
T S Q T F I Y K C D A V L C T L P L G V L K Q Q P P A V Q F V P P L P E W K T S
1750    1760    1770    1780    1790    1800    1810    1820    1830    1840    1850    1860
GCAGTCCAAAGGATGGGGTTTGGCAACTCAACAAGGTCTGTGTGTTTGGCCGGTG TCTGGGACCCAAAGCGTCAATTTGTTTGGCCACTGTTGGCAGCACAACTGCAAGCAGAGT
A V Q R M G F G N L N K V V L C F D R V F W D P S V N L F G H V G S T T A S R G
1870    1880    1890    1900    1910    1920    1930    1940    1950    1960    1970    1980
GAACTCTCTCTTTCGGAACCTCTATAAAGCTCCAATACTGTGGCACTCTGGCCGGA GAAGCTGCTGGCATCATGGAAAACATAAGTATGATGTGATTGTTGGCCGATGCTGGCC
E L F L F W N L Y K A P I L L A L V A G E A A G I M E N I S D D V I V G R C L A
1990    2000    2010    2020    2030    2040    2050    2060    2070    2080    2090    2100
ATTCTCAAGGGGATTTTGGCAGCAGCGGTGCCCGCCCAAGGAACTGTGGTATCT CGCTGGCTGCTGATCCCTGGCCGAGGCTTCCTAATCTTACGTAGCCGAGGATCATCT
I L K G I F G S S A V P Q P K E T V V S R W R A D P W A R G S Y S Y V A A G S S
2110    2120    2130    2140    2150    2160    2170    2180    2190    2200    2210    2220
GGAAATGACTATGACTTAATGGCTCAGCCAACTCTGGCCCTCAATTCAGGTGCC CCACGCTAATTCAGGACTCTTCTTCTGGAGACACATAACTCGTAATACCAGCCG
G N D Y D L M A Q E I T P G P S I P A G A P Q P I P R L F A G E H T I R N Y P A
2230    2240    2250    2260    2270    2280    2290    2300    2310    2320    2330    2340
ACAGTCCATGGTCTCTGAGTGGGTGGGAGAGCAAGAAATTCAGACAGTATCTTGGGGCCATGTACACCTTCCTCGCCAGCCACACCCGGCTCCCTCCAGCAGCAGTCC
T V H G A L L S G L R E A G R I A D Q F L G A M Y T L P R Q A T P G V P A Q Q S
2350    2360    2370    2380    2390    2400
CCGAGCATGTGAGACAGACGCTGTTAAGGGAAGAACCCCTGCGCGTGTCTTTGGCTGCAIA
P S M *

```

上行表示牦牛 *KDM1A* 基因核苷酸序列;下行表示推测的氨基酸序列;下划线表示突变碱基;\* 表示终止密码子  
The upper lines show the nucleotide sequences and the lower lines show the deduced amino acid sequences. Base mutations are underlined; \* shows termination codon

图 3 牦牛 *KDM1A* 基因核苷酸及其推测的氨基酸序列  
Fig. 3 Nucleotide sequences and the deduced amino acid sequences of yak *KDM1A*

第 628 位最大为 2.656,总平均亲水性 -0.378<0,且较大多数氨基酸残基具有亲水性,推测为亲水性蛋白,与所分析的蛋白理化性质结果一致。SignalP、TMHMM 分析表明,*KDM1A* 蛋白为不含跨膜结构和信号肽的蛋白。蛋白修饰磷酸化位点预测发现,该蛋白有 31 个 Ser 位点,28 个 Thr 位点和 14 个 Tyr 位点。*KDM1A* 蛋白二级结构预测知,295 个  $\alpha$ -螺旋占 38.02%,64 个  $\beta$ -转角占 8.25%,271 个无规卷曲占 34.92%,146 个延伸链占 18.81%(图 5),同时该蛋白的三级结构进一步验证了二级的预测。

### 2.5 牦牛 *KDM1A* 基因的组织表达谱

以内参基因 *GAPDH* 作为参照,利用 RT-qPCR 检测 *KDM1A* 基因在牦牛心、肝、脾、肺、肾、小肠、卵巢、子宫、胃、睾丸、大脑组织中表达,结果显示,其在牦牛各组织中普遍表达,但仍存在差异,其中该基因在睾丸和肝中的表达相对较高,心和卵巢中的表达次之,脾、肺、肾、子宫、大脑、大肠、胃中的表达相对较低(图 6)。

### 2.6 牦牛不同发育时期睾丸中 *KDM1A* 基因的表达

以内参基因 *GAPDH* 作为参照,利用 RT-qPCR

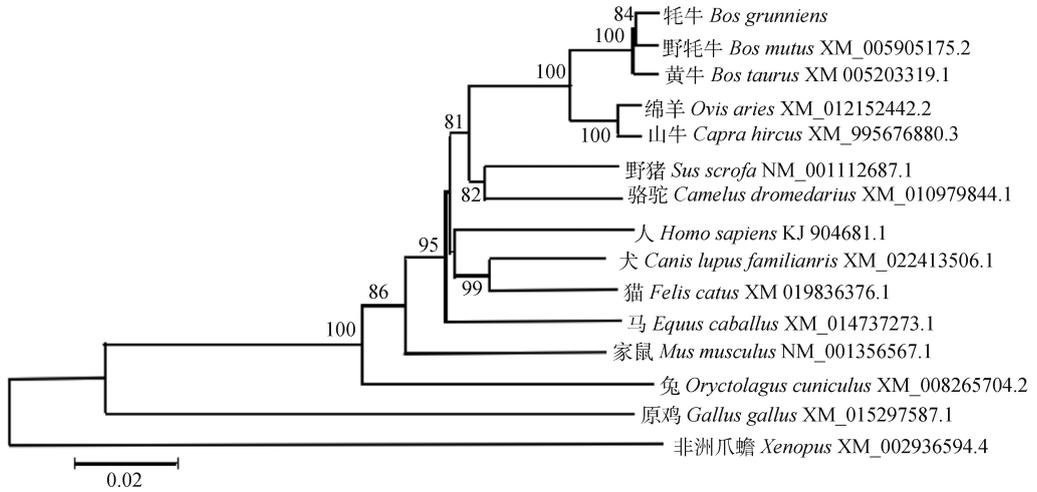


图 4 不同物种间的系统进化树  
 Fig. 4 Phylogenetic tree of KDM1A of various species

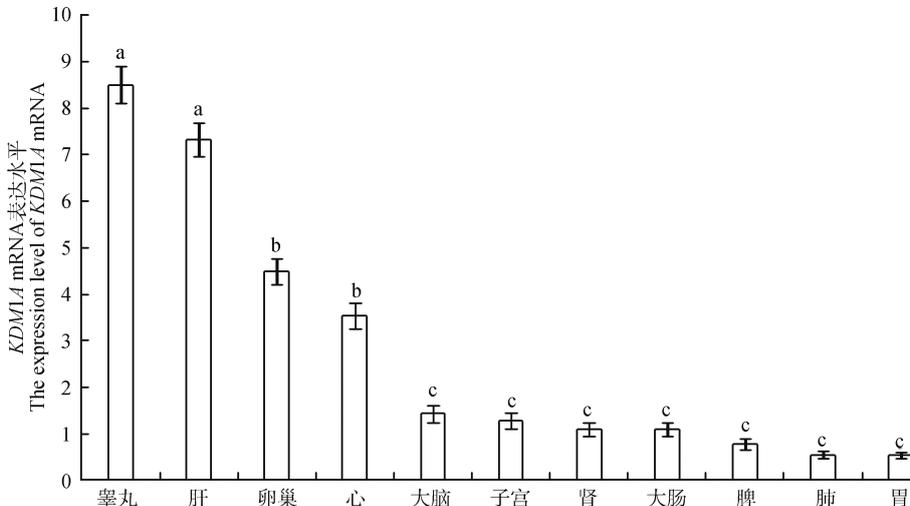


图 5 牦牛 KDM1A 蛋白三级结构预测  
 Fig. 5 Tertiary structure prediction of KDM1A protein of yak

检测 KDM1A 基因在牦牛不同时期睾丸中 mRNA 的表达情况(图 7)。结果显示, KDM1A 基因从胎牛~老年期睾丸中表达水平呈明显的先上升后下降趋势,以胎牛时期该基因的表达量作为参考,幼年期和老年期约为胎牛时期的 15 倍( $P < 0.01$ );以幼年期的作为参考,该基因在性成熟时期的表达量显著高于幼年期,约为其表达量的 1.6 倍( $P < 0.05$ ),与老年期睾丸中 KDM1A 的表达水平差异不显著( $P > 0.05$ )。

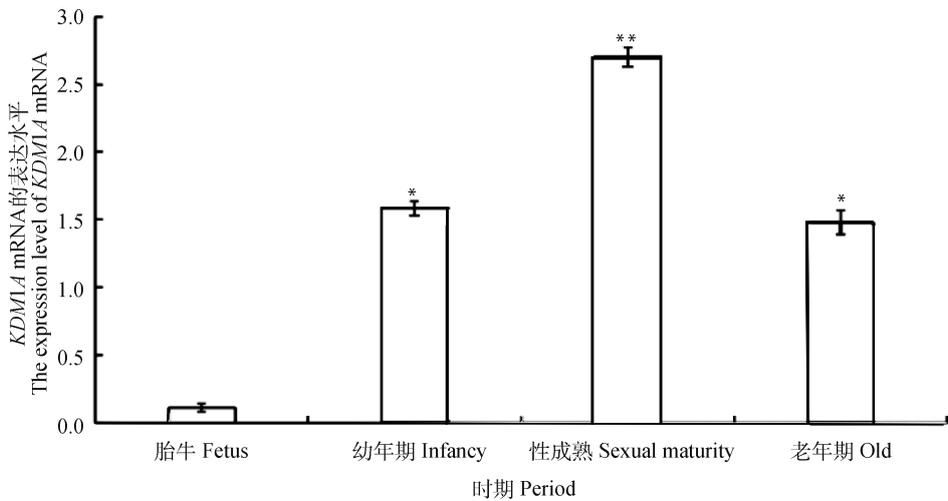
### 3 讨论

KDM1A 是位于细胞核上的一种黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)依赖性单胺氧化酶,是胺氧化酶家族



组织间比较:不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )  
 Comparison among tissues; Different letters show significant differences( $P < 0.05$ )

图 6 KDM1A 基因在牦牛不同组织中的表达  
 Fig. 6 The expression of KDM1A in yak different tissues



与胎牛比较: \*\* . 差异极显著( $P < 0.01$ ); \* . 差异显著( $P < 0.05$ )

Comparison with fetal bovine: \*\* show very significant difference( $P < 0.01$ ), \* show significant differences( $P < 0.05$ )

图 7 *KDM1A* 基因在牦牛不同发育时期睾丸中的表达水平

Fig. 7 The expression of *KDM1A* in different growth periods of yak testis

中的一员。*KDM1A* 主要催化 H3K4me1/2 和 H3K9me1/2 的去甲基化,并且可通过调控相关基因表达来介导精子的发生过程<sup>[20]</sup>。本研究克隆获得牦牛 *KDM1A* 基因核苷酸序列,与野牦牛对比,发现编码区除了存在 4 处碱基突变,使编码区第 28 位、35 位、223 位氨基酸,变化由 K→T, D→G, R→I,还发现从 250 bp 开始,比野牦牛多出了连续的 60 bp 碱基,导致多编码 20 个氨基酸,依次是 SGQAGGLQDDSSGGYGDGQA。但这种氨基酸的突变是否会导致蛋白功能改变,有待深入的研究。同源性分析发现,该基因与野牦牛、黄牛的同源性最高,暗示牦牛 *KDM1A* 基因在进化过程中具有较高的保守性。

组织表达谱分析结果发现,该基因 mRNA 在所选牦牛组织中均有表达,这与文献[8]的结果一致,且其表达量在睾丸、肝中较高,在睾丸中表达量高的原因可能和其在调控精子形成过程中起重要作用有关<sup>[20]</sup>。其在肝中表达量较高可能是和 Wnt 信号通路调节干细胞增殖、分化以及谷氨酰胺新陈代谢作用相关。已有研究证明,Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路在肝的发育、再生、新陈代谢以及氧化应激等方面发挥着重要作用,其中编码谷氨酰胺转移酶、鸟氨酸转氨酶和谷氨酰胺转运体(参与谷氨酰胺新陈代谢活动的酶)基因的表达受该通路的调控作用。敲减 *KDM1A* 可解除 Wnt 信号通路的抑制,进一步调控与该通路相关基因的表达<sup>[21-24]</sup>。

睾丸是产生雄激素、精子的重要场所,其包括不同发育阶段的生精细胞、支持细胞和分泌雄性激素以维持雄性功能和促进精子形成的间质细胞等多种功能各异的细胞。有研究发现,*KDM1A* 可通过调控相关基因的表达活性来介导精原干细胞的维持和分化过程,进而在精子发育和形成过程中发挥至关重要的作用<sup>[21]</sup>。

本试验采用实时荧光定量 PCR 的方法检测了该基因在不同发育时期牦牛睾丸中的表达差异。结果表明,*KDM1A* mRNA 在不同时期睾丸中均有表达,但其表达量存在差异,表明 *KDM1A* 基因在睾丸发育过程中发挥一定作用。胎牛(5~6 月)时期的睾丸仅有少量支持细胞、未分化的精原干细胞,出生后,随着年龄增长,性成熟后(3~4 岁)的牦牛睾丸较幼年期(1~2 岁)的变化较大,主要包括间质细胞数量、生精上皮和生精细胞数量种类以及生精细胞层的明显增厚、增多<sup>[25]</sup>。有研究发现,雄激素受体多存在于间质细胞和支持细胞,同时,*KDM1A* 可与该受体结合,调控其依赖性基因的表达,进一步介导睾丸发育以及睾酮调控精子发生的过程。因此,随着幼年牦牛步入性成熟,其睾丸内的间质细胞增多,迫使了更多的雄激素受体激活以便于睾丸的正常发育以及保证精子的发生过程的顺利进行<sup>[26-27]</sup>。综上所述,*KDM1A* 在精子发生的分化过程发挥着重要功能。因此,从胎牛(出生前)~性成熟(3~4 岁)的不同时期,*KDM1A* 表达量呈显著上升趋势。

这一变化主要和睾丸发育过程中间质细胞以及生精细胞种类和数量增多有关,也是精子发生所必须的变化趋势。然而随着年龄增长,生精功能逐渐下降,生精细胞层数也明显减少,精原细胞、精母细胞和精子细胞均有不同程度的减少,精子细胞数明显减少,老年期较性成熟时期的 *KDM1A* 表达量又显著下降。由此推测,*KDM1A* 基因可能参与了牦牛睾丸发育过程。

#### 4 结 论

本研究成功克隆了牦牛 *KDM1A* 序列。生物信息学分析表明,*KDM1A* 基因 CDS 区的保守性较高。同时,*KDM1A* 基因在牦牛不同发育时期睾丸中的表达规律表明,该基因可能参与牦牛睾丸的发育。此结果为进一步研究 *KDM1A* 基因对牦牛生殖机能的调控提供基础资料。

#### 参考文献 (References):

[1] 兰道亮,熊显荣,位艳丽,等.基于 RNA-Seq 高通量测序技术的牦牛卵巢转录组研究;进一步完善牦牛基因结构及挖掘与繁殖相关新基因[J].中国科学:生命科学,2014,44(3):307-317.  
LAN D L, XIONG X R, WEI Y L, et al. RNA-Seq analysis of yak ovary: improving yak gene structure information and mining reproduction-related genes [J]. *Science China: Life Sciences*, 2014, 44(3):307-317. (in Chinese)

[2] QIU Q, ZHANG G J, MA T, et al. The yak genome and adaptation to life at high altitude[J]. *Nat Genet*, 2012,44(8):946-949.

[3] SHI Y J, LAN F, MATSON C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1[J]. *Cell*, 2004,119(7):941-953.

[4] STAVROPOULOS P, BLOBEL G, HOELZ A. Crystal structure and mechanism of human lysine-specific demethylase-1[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006,13(7):626-632.

[5] LAN F, NOTTKE A C, SHI Y. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008,20(3):316-325.

[6] 翟耀耀,刘晓霞,赵越.赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶 1 作用机制及其生物学功能的研究进展[J].生命科学,2012,24(1):7-12.  
ZHAI Y Y, LIU X X, ZHAO Y. Mechanism of LSD1 and its biological functions[J]. *Chinese Bulletin of*

*Life Sciences*, 2012,24(1):7-12. (in Chinese)

- [7] NOTTKE A, COLAIÁCOVO M P, SHI Y. Developmental roles of the histone lysine demethylases[J]. *Development*, 2009,136(6):879-889.
- [8] WANG J X, SCULLY K, ZHU X Y, et al. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes[J]. *Nature*, 2007,446(7138):882-887.
- [9] KIM J, SINGH A K, TAKATA Y, et al. LSD1 is essential for oocyte meiotic progression by regulating CDC25B expression in mice[J]. *Nat Commun*, 2015,6:10116.
- [10] WANG Y L, ZHU Y M, WANG Q, et al. The histone demethylase LSD1 is a novel oncogene and therapeutic target in oral cancer[J]. *Cancer Lett*, 2016,374(1):12-21.
- [11] LIM S, JANZER A, BECKER A, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology [J]. *Carcinogenesis*, 2010,31(3):512-520.
- [12] YEH S, SAMPSON E R, LEE D K, et al. Functional analysis of androgen receptor N-terminal and ligand binding domain interacting coregulators in prostate cancer[J]. *J Formos Med Assoc*, 2000,99(12):885-894.
- [13] HUANG J, SENGUPTA R, ESPEJO A B, et al. P53 is regulated by the lysine demethylase LSD1[J]. *Nature*, 2007,449(7158):105-108.
- [14] TSAI W W, NGUYEN T T, SHI Y, et al. p53-targeted LSD1 functions in repression of chromatin structure and transcription *in vivo* [J]. *Mol Cell Biol*, 2008,28(17):5139-5146.
- [15] SHAO G B, DING H M, GONG A H, et al. Inheritance of histone H3 methylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer[J]. *J Reprod Dev*, 2008,54(3):233-238.
- [16] HU X, LI X G, VALVERDE K, et al. LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009,106(25):10141-10146.
- [17] WILLMANN D, LIM S, WETZEL S, et al. Impairment of prostate cancer cell growth by a selective and reversible Lysine-specific demethylase 1 inhibitor[J]. *Int J Cancer*, 2012,131(11):2704-2709.
- [18] KASHYAP V, AHMAD S, NILSSON E M, et al. The lysine specific demethylase-1 (LSD1/KDM1A) regu-

- lates VEGF-A expression in prostate cancer[J]. *Mol Oncol*, 2013, 7(3):555-566.
- [19] OMBRA M N, DI SANTI A, ABBONDANZA C, et al. Retinoic acid impairs estrogen signaling in breast cancer cells by interfering with activation of LSD1 via PKA[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1829(5): 480-486.
- [20] LAMBROT R, LAFLEUR C, KIMMINS S. The histone demethylase KDM1A is essential for the maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells and progenitors [J]. *FASEB J*, 2015, 29(11): 4402-4416.
- [21] CHEN Y, KIM J, ZHANG R P, et al. Histone demethylase LSD1 promotes adipocyte differentiation through repressing wnt signaling[J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(10):1228-1240.
- [22] SEKINE S, LAN B Y, BEDOLLI M, et al. Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice[J]. *Hepatology*, 2006, 43(4):817-825.
- [23] TAN X P, BEHARI J, CIEPLY B, et al. Conditional deletion of  $\beta$ -catenin reveals its role in liver growth and regeneration[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(5): 1561-1572.
- [24] CADORET A, OVEJERO C, TERRIS B, et al. New targets of  $\beta$ -catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism[J]. *Oncogene*, 2002, 21(54):8293-8301.
- [25] 李德宏. 高原牦牛睾丸的形态学研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- LI D H. A morphological study on testis in male yak [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2007. (in Chinese)
- [26] WISSMANN M, YIN N, MÜLLER J M, et al. Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(3):347-353.
- [27] 朱俊峰, 谷来凤, 闫振龙, 等. 不同发育阶段牦牛睾丸生精小管和间质细胞的形态学变化[J]. 甘肃农业大学学报, 2014, 49(4):18-22.
- ZHU J F, GU L F, YAN Z L, et al. Morphological changes of testicular seminiferous tubules and leydig cells of yak in different ages[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2014, 49(4):18-22. (in Chinese)

(编辑 程金华)