

雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织 *Morf411* 基因 cDNA 克隆与表达分析

王强辉 翟健程 夏彦玲 李和平*

(东北林业大学 野生动物资源学院,哈尔滨 150040)

摘要 为探索驯鹿(*Rangifer tarandus*)*Morf411* 基因的生物学特性以及雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织表达差异,揭示 *Morf411* 对鹿茸生长的重要生物学意义,采用 RT-PCR 技术和分子克隆技术成功获得驯鹿 *Morf411* 基因 cDNA,以驯鹿 *Morf411* 基因 cDNA 为依据,展开生物信息分析和雌、雄驯鹿鹿茸表皮组织中表达差异的研究。结果表明:1)驯鹿 *Morf411* 基因 CDS 区全长为 972 bp,共编码 323 个氨基酸。2)驯鹿 *Morf411* 蛋白是一种相对分子量为 37.20 ku 的不具跨膜结构的亲水性蛋白质,其二级结构主要以 β 转角为主。3)驯鹿 *Morf411* 编码蛋白氨基酸序列与其他 18 个物种该蛋白氨基酸序列发现相似度介于 85%~100%,其中与白尾鹿相似度最高为 100%,与原鸡相似度最低为 85%,与其他亲缘关系较近物种(如牛、羊)的相似度能达到 99%;结合系统进化树发现驯鹿 *Morf411* 基因在进化中高度保守,各物种之间的遗传距离不超过 0.035。4)荧光定量结果显示雌性驯鹿鹿茸顶端表皮组织 *Morf411* 基因相对表达量是雄性的 2.127 ± 0.032 倍。本研究发现驯鹿 *Morf411* 基因在进化中高度保守,是鹿茸生长发育的关键基因,其在驯鹿鹿茸表皮组织中相对表达量受性别影响较为明显。

关键词 驯鹿; *Morf411* 基因; cDNA 克隆; 生物信息分析; 基因表达

中图分类号 TS201.4

文章编号 1007-4333(2018)06-0077-08

文献标志码 A

cDNA cloning and expression analysis of *Morf411* gene in the antler top of female and male reindeer

WANG Qianghui, ZHAI Jiancheng, XIA Yanling, LI Heping*

(College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract In order to explore the biological characteristics and expression of *Morf411* gene in reindeer. RT-PCR and molecular cloning were used to obtain the cDNA of *Morf411*. Based on the information of *Morf411* cDNA, a series of bioinformatics analysis was carried out. The results showed that: 1) The full length of reindeer *Morf411* CDS of was 972 bp, which encoded 323 amino acids. 2) *Morf411* protein was a hydrophilic protein of 37.20 ku without transmembrane structure, and its secondary structure was mainly β -sheet. 3) The amino acids sequence of *Morf411* protein was compared with that of 18 other species, the overall similarity was ranged 85% to 100%. The highest was white tail deer of 100% and the lowest was Raw chicken of 85%. Other species such as cattle, sheep with reindeer close relatives, their highest similarity reached 99%; Through the phylogenetic tree analysis, it was found that reindeer *Morf411* was highly conserved during the evolution, and the genetic distances among species were not more than 0.035. 4) The fluorescence quantitative analysis showed that expression of *Morf411* gene in the epidermis of female reindeer top antler was 2.127 ± 0.032 times more than in the male. In conclusion, reindeer *Morf411* gene was highly conserved during evolution and was an important for antler development. Its expression was affected by sex of reindeer.

Keywords reindeer; *Morf411* gene; cloning of cDNA; bioinformatics analysis; gene expression

收稿日期: 2017-10-13

基金项目: 国家林业局珍稀濒危物种野外救护与繁育项目(2012); 中央高校基本科研业务专项资金项目(2572016AA42)

第一作者: 王强辉, 硕士研究生, E-mail: wangqianghui@nefu.edu.cn

通讯作者: 李和平, 教授, 主要从事特种经济动物繁育研究, E-mail: lihepinghrb2002@nefu.edu.cn

染色体的结构变化影响基因的表达,甲基化和乙酰基化是染色体结构变化的两个重要因素^[1]。定位于人类4号染色体上的死亡因子基因 *MORF4* (Mortality factor on chromosome 4) 作为一个具有诱导细胞衰老的因子首次在人类永生细胞系中被发现^[2]。旁系同源的死亡因子 *Morf4l1* (Mortality factor 4-like protein 1) 基因在脊椎和无脊椎动物中先后被发现^[3]。*Morf4l1* 是组蛋白乙酰化酶的重要成员,属于 *MORF4* 蛋白家族^[4-5]。大多数组蛋白乙酰化酶均可以促进基因转录和细胞增殖,而 *MORF4* 基因在细胞中表达则促进大量细胞死亡和衰老^[5-6]。最早的 *Morf4l1* 基因是以 *MORF4* 的旁系同源基因发现于15号染色体上,故又称 *MGR15* (Mortality factor-related gene on chromosome 15)^[7]。*MORF4* 和 *Morf4l1* 基因编码蛋白的氨基酸序列相似度达94%,两者相比,*MORF4* 仅缺乏一个定位于NH₂端的染色质结构域^[8]。敲除 *Morf4l1* 基因导致小鼠胚胎发育延迟甚至死亡^[9-11]。Boije等^[12]研究发现 *Morf4l1* 是神经系统发育的重要因子,在细胞中表达能够促进细胞凋亡,同时 *Morf4l1* 也可能在细胞周期中参与细胞修复等过程。人类疾病相关研究表明 *Morf4l1* 基因在冠状动脉^[13]和胸腺癌^[14]中表达并发挥着重要作用。Larance等^[15]研究表明 *Morf4l1* 和 MRFAP1 相互作用,在 NEDD8 信号通路中扮演着重要角色。

驯鹿 (*Rangifer tarandus*) 是唯一雌雄都具角的鹿科动物,在我国仅分布在大兴安岭地区^[16]。目前关于驯鹿茸角分子机理方面研究相对较少,Zhai等^[17]筛选了雌、雄驯鹿鹿茸顶端间充质组织中差异表达的基因,并对表达差异做出推测和验证,为驯鹿茸角进一步研究奠定了生物学基础。鹿茸角的研究一直是鹿科动物研究热点,鹿茸角神奇的生长速度和再生机理尚不清楚,本研究拟选用驯鹿顶端表皮组织作为研究材料,对 *Morf4l1* 基因展开研究,从分子层面探求驯鹿茸角生长机理,从而丰富和发展鹿茸角生长相关的生物学信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以辽阳千山呈龙科技有限公司养鹿场(该鹿场驯鹿引自根河市敖鲁古雅乡)的成年健康雌、雄驯鹿各1头作为试验对象,于2016年鹿茸快速生长期切取雌、雄驯鹿鹿茸顶端组织大约5 cm,参考 Li等^[18]

对马鹿鹿茸顶端组织分层的方法,先将样品表面迅速消毒,纵向剖开,取其顶端组织表皮组织,采集完后迅速放入液氮中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 驯鹿茸顶端表皮组织总 RNA 的提取及 cDNA 合成

雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织总 RNA 提取和纯化:运用 Trizol 法^[19]提取总 RNA,根据试剂盒说明提取总 RNA 以及进行总 RNA 纯化,纯化后总 RNA 分别用1%的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定总 RNA 的完整性以及浓度和纯度。

建立 20.0 μL 体系合成 cDNA 模板:总 RNA 2.0 μL 、RT-buffer 4.0 μL 、dNTPs 2.0 μL 、RNase inhibitor 1.0 μL 、Oligo-dT 1.0 μL 、M-MLV3 逆转录酶 1.0 μL 、DEPC 处理水 9.0 μL ;42 $^{\circ}\text{C}$ 20 min、99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 条件下中进行合成反应,反应结束后放于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2 驯鹿 *Morf4l1* 基因的扩增及克隆

参考 GenBank 数据库中牛、羊等同源物种的 *Morf4l1* 基因序列,比对分析其保守区域,运用 Primer 5.0 软件设计1对同源性引物,设计引物涵盖该基因 CDS 区,预期扩增大小是 1 022 bp,上游引物:5'-GGTAGAGAGTAGGGGGC-3',下游引物是:5'-ACTAAGAAACAAAAGGTG-3',引物由哈尔滨博仕生物科技有限公司合成。

PCR 扩增,10.0 μL 体系:0.1 μL Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL),1.0 μL 10 \times Taq Buffer (Mg^{2+} Plus),0.8 μL dNTP Mix (2.5 mM each),1.0 μL DNA 模板,上、下游引物各 0.5 μL ,灭菌去离子水 6.1 μL 。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,36 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,如确认具有目的扩增条带,再用 50.0 μL 体系对 PCR 产物进行纯化回收,1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其质量。

将纯化回收的产物与 pMD 18-T 载体连接,连接体系 10.0 μL :5.0 μL Solution I,1.0 μL pMD 18-T 载体,3.5 μL PCR 产物,0.5 μL 灭菌去离子水,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 30 min。连接完成后将 10.0 μL 连接产物与 50.0 μL DH5 α 感受态细胞混合按照说明书完成转化,将成功转化的细胞在超净工作台用涂布棒均匀涂在 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 h

后,挑取白色单一菌落于 1.5 mL 含氨苄青霉素(按 1:1 000 加入 100 mg/mL 的氨苄青霉素溶液)的 LB 液体培养基中,置于 37 °C 恒温摇床(200 r/min)培养 8 h,再对克隆产物进行菌液 PCR 鉴定。

1.2.3 驯鹿 *Morf411* 基因序列测定

确认克隆成功的菌液送往吉林库美生物公司进行双向测序,测序结果经过 Chromas 软件对测序反馈峰图查验,DNASTAR 中 SeqMan 模块进行拼接分析,确认测序结果可靠后用 DNAMAN 对获得 cDNA 序列对应氨基酸序列推定。

1.2.4 驯鹿 *Morf411* 基因生物信息分析及系统进化树的构建

1) 驯鹿 *Morf411* 基因编码氨基酸序列同源性对比和进化树构建

将获得的驯鹿 *Morf411* 基因的 cDNA 序列经 NCBI 中 Blast 功能比对,确认正确后应用 DNASTAR 中 Editseq 模块将该基因 CDS 区翻译成氨基酸序列,然后应用 NCBI 数据库中 BlastP 功能对比,下载牛(*Bos taurus*)、羊(*Ovis aries*)、人(*Homo sapiens*)、金丝猴(*Rhinopithecus roxellana*)、白尾鹿(*Odocoileus virginianus texanus*)、单峰骆驼(*Camelus dromedarius*)、野猪(*Sus scrofa*)、原鸡(*Gallus gallus*)、白头鹰(*Haliaeetus leucocephalus*)、大棕蝠(*Eptesicus fuscus*)以及埃及果蝠(*Rousettus aegyptiacus*)等 17 个物种的 *Morf411* 蛋白氨基酸序列,通过 DNASTAR 中 Megalign 模块对比其相似度,最后运用 MEGA 5.0 构建 N-J 进化树。

2) 驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白质理化性质预测

根据驯鹿 *Morf411* 基因推定氨基酸序列,利用 ProParam 工具预测分析蛋白质序列的分子量、分子式、理论等电点(PI)、氨基酸组成、消光系数、稳定性等理化性质。

3) 驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白质疏水性和跨膜区预测

通过 ExPASy 服务器 ProtScale 模块对驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白疏水性进行预测,预测结果使用生物学分析软件 BioEdit 进行验证。蛋白跨膜区使用 TMHMM Serves v 2.0 进行预测分析。

4) 驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白质空间结构预测

分别使用 DNASTAR 中 Protean 模块和当前比较常用的 SWISS-MODEL 同源建模法对驯鹿

Morf411 基因编码蛋白的二级和三级结构进行预测分析。

1.2.5 *Morf411* 基因实时荧光定量分析

分别提取雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织总 RNA,然后反转录成 cDNA 备用。根据测序获得的驯鹿 *Morf411* 基因序列结合荧光定量 PCR 引物设计原则,运用 Primer 5.0 设计特异性引物,上游引物:5'-AAAATTGGGATGAATGGGTT-3';下游引物:5'-CATACTGCTCCTGATTGGCT-3';目的片段大小为 102 bp 符合荧光定量要求;另外在这次定量分析中选择 β actin 作为内参基因进行定量,参考 NCBI 数据库中牛、羊 β actin 基因设计特异性引物,其上游引物:5'-GCGTGACATCAAGGA-GAAGC-3';下游引物:5'-GGAAGGACGGCTGG-AAGA-3';目的片段大小为 173 bp,符合荧光定量引物要求。合成引物做好准备后对 *Morf411* 基因在雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织中的表达量进行定量分析。在 ABI 公司生产的 7500 Real-time system 上进行 Real-time RT-PCR,反应体系(20.0 μ L),包括:SYBR Green master mix 10.0 μ L、ROX II 0.4 μ L、灭菌的去离子水 6.0 μ L、上下游引物各 0.8 μ L、cDNA 模板 2.0 μ L。反应程序分为两部分:第一部分为扩增反应,95 °C 10 min,在 95 °C 15 s,60 °C 1 min,72 °C 30 s 下循环 40 次,设定在每个循环中 60 °C 1 min 时读取荧光值;第二部分为建立荧光 PCR 产物熔解曲线,扩增反应结束后继续从 72 °C 升温至 95 °C,持续 15 s,然后降至 60 °C,持续 1 min,之后缓慢升温至 95 °C,整体反应结束后,使用软件 ABI 7500 Software Version 2.3 分析 *Morf411* 基因相对 β actin 基因的差异表达 Ct 值,通过普遍使用的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[20]来计算分析基因在雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织中的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 雌、雄驯鹿总 RNA 提取及质量检测

1%的琼脂糖凝胶电泳检测雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织提取总 RNA,结果显示 5.8 S、18 S、28 S 条带清晰无拖带。紫外分光光度计检测结果显示:雌性总 RNA 浓度为 1 195.8 mg/L,OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.81;雄性总 RNA 浓度为 1 760.4 mg/L,OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 2.00。因此,获得雌、雄驯鹿总 RNA 浓度和纯度均满足试验要求。

2.2 驯鹿 *Morf411* 基因 cDNA 的扩增及克隆

驯鹿 *Morf411* 基因扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测获得约 1 000 bp 的特异性条带(图 1), 将该条带纯化回收克隆, 通过对 15 个克隆菌落的阳性检测, 确认克隆成功后进行双向测序, 测序结果经 DNASTAR 中 SeqMan 模块拼接获得大小为 1 097 bp 的基因序列, 与预期的片段大小基本一致。进一步 Blast 比对分析, 确认此序列是驯鹿 *Morf411* 基因的 cDNA 序列, 再通过相关分析证明获得驯鹿 *Morf411* 基因 cDNA 编码区全长, 图 2 为 *Morf411* 基因序列与推定氨基酸序列的对应图。

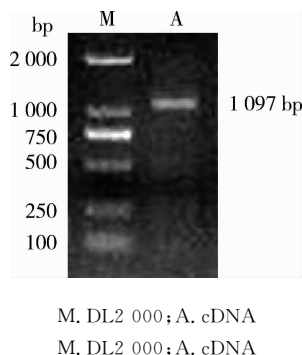


图 1 驯鹿 *Morf411* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of reindeer *Morf411* gene

```

1      CCTAGAGACTAGCGGCGGCTAGTCAGGGTGGTGGGAGAAGGAGGCGGCGCGGCTGA
61     ATCTTTTATAAATGGCGCGAAGCAGGACCGGAAGCCTAAATCCAGAGGGTGAGAGAG
           M A P K Q D P K P K F Q E G E R
121    TGCTGTGCTTTCATGGGCTCTTCTGTATGAAGCAAAGTGTGTAAGTTGCCATAAAGG
           V L C F H G P L L Y E A K C V K V A I K
181    ATAAACAGGTCAAATACTTACATCATTACAGTGGTTGGAATAAAAATGGGATGAATGGG
           D K Q V K Y F I H Y S G W N K N W D E
241    TTCCGAAAGCAGAGTACTCAAGTATGTGGATACCAATTTACAAAAACAGAGAACTTC
           V P E S R V L K Y V D T N L Q K Q R E L
301    AAAAAAGCAATCAGGAGCAGTATGCAGAGGGGAAGATGCGAGGGGCTGCCCTGGAAAGA
           Q K A N Q E Q Y A E G K M R G A A P G K
361    AGACTGCTGGGCTACAACAAAAAATATTGAAGTAAAAACGAAAAAGACAAACAAAAAGA
           K T A G L Q Q K N I E V K T K K N K Q K
421    CACCTGGAATGGAGATGGTGGCAGCACTAGTGAACACCTCAGCCTCCTCGAAGAAAA
           T P G N G D G G S T S E T P Q P P R K K
481    GGCTCGAGTAGACTCTACTGTTGAAAATGAGGAAACATTTATGAGCAGAGTGAAGTTA
           R A R V D P T V E N E E T F M S R V E V
541    AAGTCAAGATTCTCGAAGAACTGAAGCCATGGCTGTGTGATGACTGGGACTTAATACCC
           K V K I P E E L K P W L V D D W D L I T
601    GGCAAAACAGCTCTTCTATCTCCCGCAAGAAGAACCTGGATTCCATCTAGAGGATT
           R Q K Q L F Y L P A K K N V D S I L E D
661    ATCAAATTACAAGAAATCAGGAGAAACAGAGATAATAAGGAGTATGCACTAATGAGG
           Y A N Y K K S R G N T D N K E Y A V N
721    TTCTGGCTGGATAAAGGAATACTTCAATGTGATGTTGGGCACTCAACTGCTTACAAAT
           V V A C I K E Y F N V M L G T Q L L Y K
781    TTGAGAGCGGCAGTACGCTGAGATCCTTGCAGACCCTGATGCACCATGTCGCCAGG
           F E R P Q Y A E I L A D H P D A P M S Q
841    TGTACGGCGCCACATCTCCTGAGACTGTTGTACGAATGGAGCAATGTGGCCTATA
           V Y G A P H L L R L F V R I G A M L A Y
901    CACCTCTGGATGAGAAGAGCCTTGTATTACTGAATATCTTCCAGGATTTCTAAAAAT
           T P L D E K S L A L L L N Y L H D F L K
961    ACCTGGCAAAGAACTCTGCAACTTGTGTAGTGCCAGTATTGAAGTGCTCCCCCTG
           Y L A K N S A T L F S A S D Y E V A P P
1 021  AGTACCATCGGAAAGCCGTGTGAGGCACGTGCACCCACCATGTTGATCTCTGTAACA
           E Y H R K A V *
1 081  CCTTTTGTTCCTTAGT

```

下划线部分为引物序列。

Sequences underlined are primer sequences.

图 2 驯鹿 *Morf411* 基因 cDNA 全序列与推定氨基酸对应图

Fig. 2 cDNA sequence and estimated amino acid of reindeer *Morf411* gene

2.3 驯鹿 *Morf411* 基因生物信息分析结果

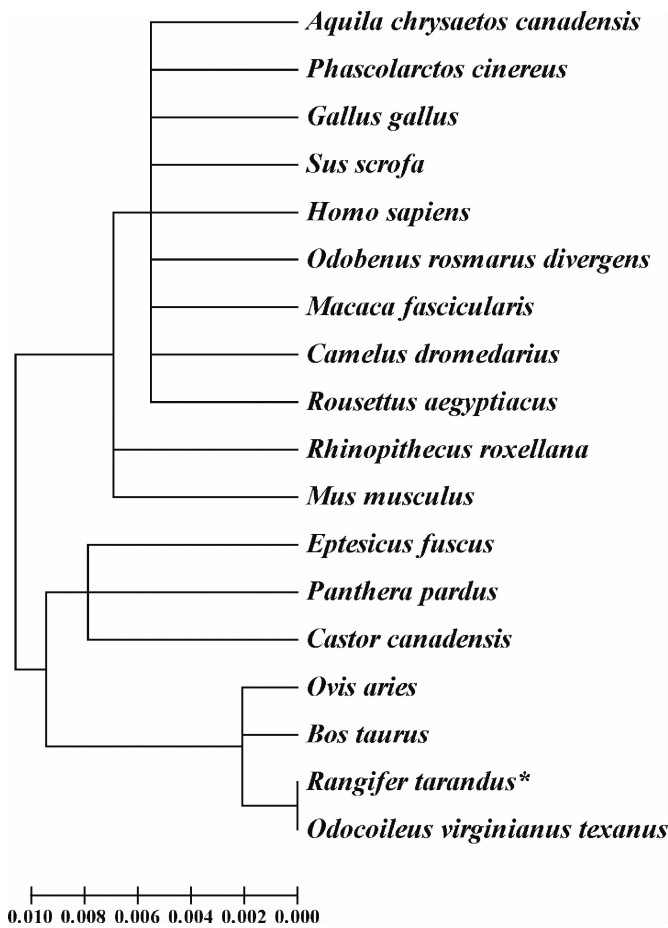
2.3.1 驯鹿 *Morf411* 基因编码氨基酸序列同源性对比和进化树构建

经过分析对比, 驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白氨基酸序列与其他物种相似性介于 85%~100%, 其中与白尾鹿相似性最高, 为 100%; 与原鸡相似性最低, 为 85%; 其他动物例如牛、羊等亲缘关系较近的物种相似性均达到 99%, 在对比中发现仅有个别物种 *Morf41* 氨基酸序列与驯鹿 *Morf411* 氨基酸序列相似性小于 90%。运用 MEGA 5.0 中邻接法构建

获得驯鹿 *Morf411* 系统进化树(图 3), 从图 3 结合 *Morf411* 氨基酸序列对比情况可以看到 *Morf411* 基因在进化上非常保守, 种间遗传距离很近, 驯鹿与其他物种遗传距离介于 0~0.035, 其中与原鸡遗传距离最远为 0.035。

2.3.2 驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白质理化性质预测

驯鹿 *Morf411* 基因 cDNA 编码区全长 972 bp, 共编码 323 个氨基酸, 相对分子量为 37.20 ku, 理论等电点 PI 为 9.21, 脂肪系数为 75.48, 不稳定系数为 41.54。



标尺表示遗传距离。

Scale represents genetic distance.

图 3 驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of protein encoded by reindeer *Morf411* gene

2.3.3 驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白质疏水性及跨膜区预测

通过 ExPASy 服务器 ProtScale 模块的 Kyte & Doolittle 算法和在线分析软件 TMHMM Servs v 2.0 分别对驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白疏水性和跨膜区进行预测分析,分析发现 *Morf411* 蛋白的氨基酸序列得分小于 -0.5 的部分比大于 0.5 的部分多,从而表明该蛋白亲水性强于疏水性,由此得出该蛋白是一种亲水性蛋白;TMHMM 预测得该蛋白氨基酸不易形成跨膜结构,由此说明驯鹿 *Morf41* 是一种亲水不具跨膜结构的蛋白分子。

2.3.4 驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白质空间结构预测

根据 Chou-Fasman 的经验参数方法对驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白质的二级结构预测,结果显示驯鹿 *Morf411* 含有 13 个 α 螺旋,6 个 β 折叠区,20 个 β 转角。运用同源结构建模预测得驯鹿

Morf411 基因编码蛋白的三级结构(图 4),三级结构预测共获得 3 个 *Morf411* 蛋白的空间模型,其中有两个相似度分别为 100%和 99.42%同源模型。

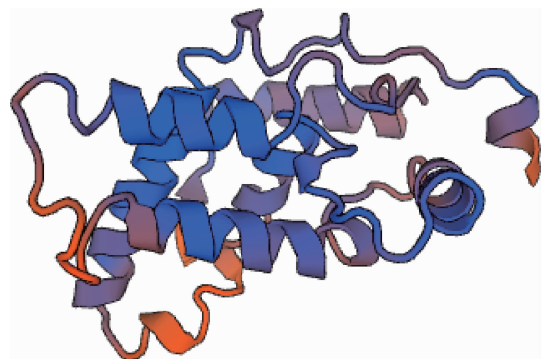


图 4 驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白三级结构预测图

Fig. 4 of Third-level structure prediction of the protein encoded by reindeer *Morf411* gene

本研究根据二级结构预测结果选择相似度为 99.42% 的模型,该模型符合二级结构特征,能够较为真实的反映驯鹿 *Morf411* 基因编码蛋白的空间结构。

2.4 *Morf411* 基因在雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织中的表达

雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织中 *Morf411* 基因

Real-time RT-PCR 结果显示 *Morf411* 基因在雌性驯鹿茸顶端表皮组织相对表达量高于雄性,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算得到雌性相对表达量为雄性的 2.127 ± 0.032 倍(表 1)。荧光定量 PCR 获得各样品的扩增曲线均为一条完整的 S 曲线、溶解曲线的峰图单一,不具有杂峰,从扩增曲线和溶解曲线判断此次荧光定量不受其他非特异扩增的影响。

表 1 雌、雄驯鹿鹿茸顶端表皮组织 *Morf411* 基因的表达差异

Table 1 Differential expression of *Morf411* gene epidermis of top antler of female and male reindeer

性别 Sex	平均值 Average				
	<i>Morf411</i> Ct	$\beta actin$ Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
雄性	21.379±0.405	19.224±0.299	2.155±0.106	0	1
雌性	25.764±0.457	24.698±0.329	1.066±0.128	-(1.089±0.022)	2.127±0.032

注: $\Delta Ct = Ct(\text{目标基因}) - Ct(\text{内参基因})$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{目标组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$; 以雄性为对照组。

Note: $\Delta Ct = Ct(\text{Target gene}) - Ct(\text{Reference gene})$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Target group}) - \Delta Ct(\text{Control group})$; Male reindeer is used as control.

3 讨论

驯鹿是唯一雌雄都长角的鹿科动物,和其他雄性鹿科动物一样,雌、雄驯鹿鹿茸角均可以周期性再生,其在快速生长期细胞增殖速是癌细胞增殖速度的 30 多倍, Goss 等^[21] 研究发现快速生长期马鹿鹿茸生长速度可达 2.75 cm/d, 达到这一增殖速度必须有許多细胞生长因子的参与, 并受多个细胞因子及细胞环境的调控, 而 *Morf411* 作为细胞增殖、分化的重要调节因子之一^[12], 在细胞增殖分化中扮演着重要角色, 因此研究驯鹿 *Morf411* 基因对于探索鹿茸生长的奥秘和丰富鹿茸的生物学信息有重要意义。

本研究成功获得驯鹿 *Morf411* 基因 cDNA 序列, 经分析发现驯鹿该基因 CDS 区全长 972 bp, 编码 323 个氨基酸, 编码蛋白分子量为 37.20 ku。已有研究通过凝胶过滤法和粒度筛析色谱法研究发现 *Morf411* 在细胞中主要存在两种复合体, 其中长链复合体(L-*Morf411*) 分子量一般小于 670 ku, 短链复合体(S-*Morf411*) 分子量一般小于 70 ku^[22-23]。Boije 等^[12] 在研究中发现 S-*Morf411* 基因的过表达能够导致初生神经元的增加, 而鹿茸再生过程中伴随着神经元的再生和发育。从现有研究结果和驯鹿鹿茸本身的特征来看, *Morf411* 基因的表达与功能均对鹿茸发育有着至关重要的作用。进行驯鹿

Morf411 基因编码蛋白氨基酸序列对比发现, 驯鹿 *Morf411* 与其他物种的相似度均高于 85%, 说明该基因非常保守, 与已有研究发现 *Morf411* 基因在单细胞原核生物到真核生物再到哺乳动物中高度保守相一致^[3-4]; 从图 3 可以看到驯鹿 *Morf411* 在进化上和白尾鹿遗传距离最近, 其次为牛、羊等 17 个物种, 各物种之间的遗传距离完全符合经典分类学特点, 进一步佐证了本研究的可靠性。Morf411 蛋白是一种不具有跨膜结构的亲水蛋白, 该理化性质与蛋白的功能相关。

鹿茸角周期再生开始于初茸的骨化和脱落, 受驯鹿生殖周期的系统性调节和其他局部因子调节。鹿茸生长与繁殖周期和性激素浓度的变化有关, 并受内源性节律影响^[24]; 性激素是调控鹿茸生长的最主要的调节因子, 雄性鹿茸角在春季睾酮含量最低时茸角正常脱落, 若在冬末春初时去势将导致雄鹿茸角提前脱落^[24]; 已有研究证实在此时注射性激素会阻止鹿茸的脱落与再生^[26]。这些研究结果均表明激素的系统调节对于鹿茸生长的重要作用, 但是, 驯鹿作为唯一雌雄都具角的鹿科动物, 其激素的系统调节和其他局部因子调节的互作显得更为重要, *Morf411* 基因在雌性驯鹿茸顶端表皮组织中相对表达量为雄性的 2.127 ± 0.032 倍, 造成雌性 *Morf411* 基因高表达的原因可能就是这一协同作用导致的结果。

综上所述, *Morf4l1* 作为生命活动中重要的细胞因子, 目前对于其生物学信息和功能研究尚少, 本研究在已有研究基础上进行扩充、丰富, 为驯鹿 *Morf4l1* 研究提供了生物学依据。

参考文献 References

- [1] 康静婷, 梁前进, 梁辰, 王鹏程. 表观遗传学研究进展[J]. 科技导报, 2013, 31(19): 66-74
Kang J T, Liang Q J, Liang C, Wang P C. Overview on epigenetics and its progress [J]. *Science & Technology Review*, 2013, 31(19): 66-74 (in Chinese)
- [2] Allard S, Utley R T, Savard J, Clarke A, Grant P, Brandl C J, Pillus L, Workman J L, and Côté J. NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p [J]. *EMBO Journal*, 1999, 18(18): 5108-5119
- [3] Bertram M J, Pereira-Smith O M. Conservation of the *MORF4* related, gene family; Identification of a new chromo domain subfamily and novel protein motif [J]. *Gene*, 2001, 266(1-2): 111
- [4] Chen Y, Li J, Dunn S, Xiong S, Chen W, Zhao Y, Chen B B, Mallampalli R K, and Zou C. Histone deacetylase 2 (HDAC2) protein-dependent deacetylation of mortality factor 4-like 1 (*MORF4L1*) protein enhances its homodimerization [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(10): 7092-7098
- [5] Yochum G S, Ayer D E. Role for the mortality factors *MORF4*, *MRGX*, and *MRG15* in transcriptional repression via associations with Pfl, mSin3A, and Transducin-Like Enhancer of Split [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2002, 22(22): 7868-7876
- [6] Bryce S D, Forsyth N R, Fitzsimmons S A, Clark L J, Bertram M J, Cuthbert A P, Newbold R F, Pereira-Smith O M, Parkinson E K. Genetic and functional analyses exclude mortality factor 4 (*MORF4*) as a keratinocyte senescence gene [J]. *Cancer Research*, 1999, 59(9): 2038-2040
- [7] Matsuoka Y, Matsuoka Y, Shibata S, Ban T, Toratani N, Shigekawa M, Ishida H, Yoneda Y. A chromodomain-containing nuclear protein, *MRG15* is expressed as a novel type of dendritic mRNA in neurons [J]. *Neuroscience Research*, 2002, 42(4): 299-308
- [8] Tominaga K, Pereira-Smith O M. The genomic organization, promoter position and expression profile of the mouse *MRG15* gene [J]. *Gene*, 2002, 294(1-2): 215
- [9] Chen M, Takano-Maruyama M, Pereira-Smith O M, Gaufo G O, Tominaga K. *MRG15*, a component of HAT and HDAC complexes, is essential for proliferation and differentiation of neural precursor cells [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2009, 87(7): 1522-1531
- [10] Zhang H, Li Y, Yang J, Tominaga K, Pereira-Smith O M, Towerl J. Conditional inactivation of *MRG15* gene function limits survival during larval and adult stages of *Drosophila melanogaster* [J]. *Experimental Gerontology*, 2010, 45(11): 825-833
- [11] Tominaga K, Kirtane B, Jackson J G., Ikeno Y, Ikeda T, Hawks C, Smith J R., Matzuk M M, Pereira-Smith O M. *MRG15* regulates embryonic development and cell proliferation [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2005, 25(8): 2924-2937
- [12] Boije H, Ring H, Shirazi F S, Grundberg I, Nilsson M, Hallböök F. Alternative splicing of the chromodomain protein *Morf4l1* pre-mRNA has implications on cell differentiation in the developing chicken retina [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2013, 51(2): 615-628
- [13] Peden J F, Hopewell J C, Saleheen D, Chambers J C, Hager J, Soranzo N, Collins R, Danesh J, Elliott P, Farrall M, Stirrups K, Zhang W, Hamsten A, Parish S, Lathrop M, Watkins H, Clarke R, Deloukas P, Kooner J S, Goel A, Ongen H, Strawbridge R J, Heath S, Mälarstig A, Helgadottir A, Öhrvik J, Murtaza M, Potter S, Hunt S E, Delepine M, Jalilzadeh S, Axelsson T, Syvanen A C, Gwilliam R, Bumpstead S, Gray E, Edkins S, Folkersen L, Kyriakou T, Franco-Cereceda A, Gabrielsen A, Seedorf U. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for Coronary artery disease [J]. *Nature Genetics*, 2011, 43(4): 339-344
- [14] Martrat G, Maxwell C M, Tominaga E, Porta-de-la-Riva M, Bonifaci N, Gómez-Baldó L, Bogliolo M, Lázaro C, Blanco I, Brunet J, Aguilar H, Fernández-Rodríguez J, Seal S, Renwick A, Rahman N, Kühl J, Neveling K, Schindler D, Ramírez M J, Castellá M, Hernández G, Embrace, Easton D F, Peock S, Cook M, Oliver C T, Frost D, Platte R, Evans D G, Lalloo F, Eeles R, Izatt L, Chu C, Davidson R, Ong K R, Cook J, Douglas F, Hodgson S, Brewer C, Morrison P J, Porteous M, Peterlongo P, Manoukian S, Peissel B, Zaffaroni D, Roversi G, Barile M, Viel A, Pasini B, Ottini L, Putignano A L, Savarese A, Bernard L, Radice P, Healey S, Spurdle A, Chen X, Beesley J, ConFab, Rookus M A, Verhoef S, Tilanus-Linthorst M A, Vreeswijk M P, Asperen C J, Bodmer D, Ausems M G, van Os T A, Blok M J, Meijers-Heijboer H E, Hogervorst F B, Hebon Goldgar D E, Buys S, John E M, Miron A, Southey M, Daly M B, Bcfr; Swerbra, Harbst K, Borg A, Rantala J, Barbany-Bustinza G, Ehrencrona H, Stenmark-Askmal M, Kaufman B, Laitman Y, Milgrom R, Friedman E, Domchek S M, Nathanson K L, Rebbeck T R, Johannsson O T, Couch F J, Wang X,

- Fredericksen Z, Cuadras D, Moreno V, Pientka F K, Depping R, Caldés T, Osorio A, Benítez J, Bueren J, Heikkinen T, Nevanlinna H, Hamann U, Torres D, Caligo M A, Godwin A K, Imyanitov EN, Janavicius R; GEMO Study Collaborators, Sinilnikova O M, Stoppa-Lyonnet D, Mazoyer S, Verny-Pierre C, Castera L, Pauw A, Bignon Y J, Uhrhammer N, Peyrat J P, Vennin P, Ferrer S F, Collonge-Rame M A, Mortemousque I, McGuffog L, Chenevix-Trench G, Pereira-Smith O M, Antoniou A C, Cerón J, Tominaga K, Surrallés J, Pujana M A. Exploring the link between MORF4L1 and risk of breast cancer[J]. *Breast Cancer Research*, 2011, 13(2):R40
- [15] Larance M, Kirkwood K J, Xirodimas D P, Lundberg E, Uhlen M, Lamond A I. Characterization of MRFAP1 turnover and interactions downstream of the NEDD8 pathway[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(3):M111. 014407
- [16] 卡丽娜. 论驯鹿鄂温克人的驯鹿文化[J]. 黑龙江民族丛刊, 2007(2):174-178
Kalila. Culture of Ewenki people about reindeer[J]. *Journal of Heilongjiang nationalities*, 2007(2):174-178 (in Chinese)
- [17] Zhai J, Gao L, Xia Y, Li H. A study on differentially expressed genes in reserve mesenchyme of male and female reindeer antler tip[J]. *Pakistan Journal Journal of Zoology*, 2017, 49(3):889-895
- [18] Li C, Clark D E, Lord E A, Stanton J A, Suttie J M. Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery[J]. *Anatomical Record*, 2002, 268(2):125-130
- [19] Simms D, Chomczynski P. TRIzol™: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA[J]. *Focus*, 1993, 15(4):532-535
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408
- [21] Goss R J. Problems of antlerogenesis[J]. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 1970(69):227-238
- [22] Tomohiro H, Yasuko O, Noriyo H, Kaori S, Motoki S, Fuyuki I and Jun-ichi N. RBP2 is an MRG15 complex component and down-regulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation[J]. *Genes to Cells Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 2007, 12(6):811
- [23] Kirkwood K J, Ahmad Y, Larance M. Characterization of native protein complexes and protein isoform variation using size-fractionation-based quantitative proteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics MCP*, 2013, 12(12):3851
- [24] West N O, Nordan H C. Hormonal regulation of reproduction and the antler cycle in the male Columbian black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). Part II. The effects of methallibure and hormone treatment[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1976, 54(10):1637
- [25] Jaczewski Z, Doboszyńska T, Krzywiński A. The induction of antler growth by amputation of the pedicle in red deer (*Cervus elaphus* L.) males castrated before puberty [J]. *Folia Biologica*, 1976, 24(3):299-307
- [26] Fletcher T J. The induction of male sexual behavior in red deer (*Cervus elaphus*) by the administration of testosterone to hinds and estradiol-17 beta to stags [J]. *Hormones & Behavior*, 1978, 11(1):74-88

责任编辑: 杨爱东