

网络出版日期:2017-06-05
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20170605.1714.004.html

IMPDH 基因克隆、生物信息学分析及在牦牛卵巢不同时期中的差异表达

熊显荣¹, 兰道亮², 胡嘉嘉¹, 李 键¹, 字向东¹

(1. 西南民族大学 生命科学与技术学院, 成都 610041; 2. 西南民族大学 青藏高原研究院, 成都 610041)

摘 要 旨在获得牦牛 *IMPDH* 基因序列并进行生物信息学分析,同时分析其在卵巢组织中的时序表达谱,为进一步研究卵巢生长发育及排卵机制奠定基础。通过 RT-PCR 技术克隆牦牛的 *IMPDH* 基因,并运用生物信息学方法分析不同物种序列进化关系,利用荧光定量 qRT-PCR 技术检测 *IMPDH* 基因在不同发育时期牦牛卵巢组织中的表达情况。结果显示,克隆得到牦牛 1 623 bp 的 *IMPDH* 基因 cDNA 序列,内含 1 545 bp 开放阅读框序列,编码 514 个氨基酸残基。与野牦牛的相应序列具有很高的同源性(99.4%),表明 *IMPDH* 基因在进化过程中相对保守。实时定量 RT-PCR 检测结果显示 *IMPDH* 基因的表达随年龄的增加而呈现上升趋势。荧光定量 qRT-PCR 检测结果显示 *IMPDH* 基因在卵巢卵泡期表达最强,显著高于红体形成期。结果表明 *IMPDH* 参与牦牛卵巢组织的生长发育,并在卵巢活动中有明显的表达规律,表明 *IMPDH* 基因在牦牛繁殖周期具有重要作用,为进一步研究牦牛 *IMPDH* 基因功能奠定基础。

关键词 牦牛; 克隆; *IMPDH*; 序列分析; 差异表达

中图分类号 S829.9 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2017)06-0812-08

牦牛(*Bos grunniens*)是一个特有且珍贵的畜种,主要分布于青藏高原及其毗邻地区,中国约占世界牦牛总数的95%^[1]。在长期的人工选择和自然选择作用下,牦牛对高寒草地生态环境具有较强的适应能力,能在严寒、低氧、强紫外线辐射的恶劣环境条件下生存和繁衍后代,成为当地牧民赖以生存的生产和生活资料,也是主要经济来源之一^[2]。此外,牦牛是中国动物遗传资源中宝贵的基因库和珍稀的物种。但是牦牛存在生长速度慢、繁殖速率低、生产性能差,成为牦牛产业发展及生态保护的主要瓶颈之一^[3]。加快牦牛的选择育种进程,解析繁殖机制,提高牦牛生产性能,对牦牛养殖业具有重要意义。因此,随着牦牛基因组测序工作的完成,开展牦牛生长发育、繁殖性能等方面的研究,有助于挖掘牦牛优良特性和促进民族地区发展^[2]。

卵巢组织是决定哺乳动物繁殖效率的重要器官之一,主要生理功能包括合成相关的生殖激素与排出成熟的卵母细胞,而其功能的维持和发挥

主要依赖于多种信使的传递和调控^[4]。卵巢组织的生长发育和成熟是一个极其复杂的调控过程,除了需要具有较好发育能力的卵母细胞外,还需要许多信号分子的参与,如内分泌激素、免疫和代谢信号以及来自体细胞分泌的各种调控因子^[5]。哺乳动物卵巢组织的生长发育主要经历四个阶段:发生期——主要发生于胎儿期,由原始生殖细胞分化形成初级卵原细胞,停滞于减数分裂前期,出生后不再产生新的卵母细胞;发展期——随着中枢神经系统和垂体一下丘脑—卵巢轴的形成,第一波优势卵泡进入排卵程序,随后逐渐成熟;成熟期——进入成年后每个周期有一个(单胎动物)优势卵泡发育成熟并排卵,整个卵泡发育过程中伴随大量卵泡的凋亡闭锁;衰退老化期——由于卵巢储备的不可再生性,生育能力逐渐下降,直至完全丧失生育能力^[6]。卵巢的生长发育与排卵过程是受旁分泌、内分泌和自分泌等作用共同协调的。因此,利用现代分子生物学技术,从分子水平和基因水平等方面解析哺乳动物卵巢组织的生长

发育和排卵过程,旨在为进一步理解卵巢发育和排卵过程的分子调控机制提供重要的理论基础,为动物繁殖的调控、家畜繁殖力的提高、濒危珍贵动物的拯救和卵巢功能老龄化疾病的治疗等提供新思路。

前期研究表明,次黄嘌呤核苷酸脱氢酶(IMPDH)在哺乳动物卵巢生长发育和卵母细胞减数分裂成熟中起重要作用^[7]。IMPDH 是生物嘌呤从头合成途径的关键酶,在 NAD 的环境下将次黄嘌呤核苷酸(IMP)氧化合成黄嘌呤核苷酸(XMP)。在硫唑嘌呤代谢过程中,IMPDH 是催化生成鸟嘌呤核苷酸的限速酶,其活性与鸟嘌呤核苷酸浓度可能存在负相关^[8]。此外,IMPDH 是细胞内嘌呤代谢的活性物质,活性与细胞增殖、恶性转化相关,因此该酶可以作为治疗实体器官移植的潜在靶点^[9]。IMPDH 表型由 *IMPDH* 基因型决定。IMPDH 有两种亚型:IMPDH I 和 IMPDH II,分别由位于染色体 7 和染色体 3 的基因 *IMPDH1* 和 *IMPDH2* 编码,具有 84% 的同源性,大小相似且分子质量均为 56 ku,共由 514 个氨基酸残基组成^[9]。在免疫激活的情况下,*IMPDH* 基因表达明显上调^[10]。IMPDH I 结构性表达于所有细胞,而 IMPDH II 表达于部分细胞,与细胞的增殖和恶性转化有关^[9, 11]。

目前关于 *IMPDH* 基因的研究主要集中在小鼠、猪、斑马鱼等动物^[4, 6, 12],在牦牛上还未见报道。IMPDH 在物种进化中相对保守,但也存在种间差异性。因此,本研究以牦牛卵巢组织为研究对象,采用 RT-PCR 技术克隆得到 *IMPDH* 基因序列,运用生物信息学软件对牦牛 *IMPDH* 基因特征进行分析,利用实时定量 RT-PCR 检测 *IMPDH* 基因在不同发育阶段的牦牛卵巢组织中的表达差异,利用荧光定量 qRT-PCR 分析 *IMPDH* 基因在成年空怀牦牛卵巢组织不同活动期的表达。研究结果为探讨 *IMPDH* 基因在牦牛卵巢组织的生长发育和排卵机制中的生物学作用提供重要的理论依据,为建立有效可靠的分子遗传标记等奠定基础,对改善牦牛的遗传资源和繁殖技术具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自 Ferments 公司; *Taq* DNA 聚合酶购

自天根公司; pMD-20T 载体和 2×SYBR Green premix 购自 TAKARA 公司;感受态 DH5a 和 DNA 片段回收纯化试剂盒购自 AXYGEN 公司;荧光定量 PCR 仪、普通 PCR 仪、电泳仪、琼脂糖凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司;高速冷冻离心机购自 Eppendorf 公司;引物由生工生物工程上海(股份)有限公司合成。

1.2 试验动物

牦牛组织样品均采集于四川成都青白江区屠宰场,试验动物为健康的空怀期成年母牦牛,屠宰后以牙齿和年轮为依据,分别采集 2 岁、3 岁和 6 岁的卵巢组织。此外,以胎牛臂长为依据,分别采集 3 月龄、6 月龄和 9 月龄的胎牛卵巢组织。所有样品经过 PBS 清洗后迅速放入液氮罐中带回实验室,保存,备用。

1.3 总 RNA 的提取及反转录

利用 Trizol 试剂盒提取卵巢组织样本的总 RNA。并用 RNase-free 的 DNase I 处理,以去除 DNA 污染。RNA 的质量和含量通过 Nanodrop ND-1000 检测吸光度 A260 nm/A280 nm 进行判定,完整性通过 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。取 2 μL(1 g/L)RNA,0.5 μL M-MLV 反转录酶,0.5 μL oligo(dT)18,2 μL Buffer,及 ddH₂O 加至 10 μL,反转录成 cDNA。

1.4 牦牛 IMPDH 基因的克隆与测序

以牦牛卵巢组织 cDNA 为模板,引物为 IMPDH-p(表 1),扩增体系为 25 μL,预期扩增片段为 1 623 bp。反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,57 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 45 s,35 个循环,72 ℃延伸 7 min。所有 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果,用 Axygen 的凝胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物,取适量纯化的 PCR 产物与克隆载体 pMD-20T 进行连接,转化 DH5a 感受态细胞,至少挑取 3 个阳性克隆。经过 PCR 鉴定后,将阳性克隆送往生工生物工程上海(股份)有限公司进行测序。

1.5 牦牛 IMPDH 基因生物信息学分析

采用 ORF Finder 在线程序确定牦牛 *IMPDH* 基因开放阅读框;利用 MEGA 和 DNAMAN 6.0 软件进行序列同源性分析、构建系统进化树;NCBI 预测基因生物功能结构(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>);利用在线软件 ExPASy 分析根据基因序列推导的蛋白质序列的等电点和分子质量等理化性质;利用

Interpro 在线预测网站预测蛋白质的结构域和功能位点;应用 Hopfield 和 SWISSMODEL 软件分别预测二级和三级结构。

1.6 实时定量 RT-PCR 检测 *IMPDH* 基因在不同发育阶段牦牛卵巢组织中的表达

采用实时定量 RT-PCR 检测 *IMPDH* 基因在不同发育阶段牦牛胎儿卵巢及成年卵巢组织中的表达情况。取不同时期胎儿卵巢(3 月龄、6 月龄和 9 月龄)和不同年龄的成年空怀卵泡期牦牛卵巢(2、3 和 6 周岁)组织。总 RNA 的提取及反转录同“1.3”,*IMPDH* 和 *GAPDH* 基因 PCR 扩增体系为 25 μ L,反应条件:2 $\times$ *Taq* Master Mix 12.5 μ L,*IMPDH*-q 和 *GAPDH*-q 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,cDNA 1 μ L,ddH₂O 加至 25 μ L。反应条件 94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s;55 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 30 s;35 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。

表 1 引物序列及 PCR 反应条件

Table 1 Primer sequences and PCR reaction conditions				
名称 Name	引物序列 Primer sequences	产物长度/bp Product size	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	登录号 Accession No.
IMPDH-p	F: 5'-CTCTGCGGTGCAGTCCTC-3' R: 5'-AAATCGACGGGATGTGCT-3'	1 623	57	NM_001034416
IMPDH-q	F: 5'-CTTTCCCTTCTTGCTACGCTG-3' R: 5'-CTGGTGGGCATCATCTCCTC-3'	165	55	NM_001034416
GAPDH-q	F: 5'-CCACGAGAAGTATAACAACA-3' R: 5'-GTCATAAGTCCCTCCACGAT-3'	120	55	EU195062.1

注:p 代表 RT-PCR,q 代表 qRT-PCR;F 为正义链引物,R 为反义链引物。

Note: p and q represent RT-PCR and qRT-PCR, respectively; F and R represent forward and reverse primer, respectively.

1.8 统计与分析

所有组别的试验都至少重复 3 次。采用 SPSS 19.0 软件分析试验数据。mRNA 相对表达丰度等采用 ANOVA 方差分析和 Tukey's LSD 检验,所有结果当 $P<0.05$ 时认为差异显著,当 $P<0.01$ 时认为差异极显著。数据均采用“平均值 $\pm$ 标准误”(mean $\pm$ SEM)表示。

2 结果与分析

2.1 牦牛 *IMPDH* 基因序列特征

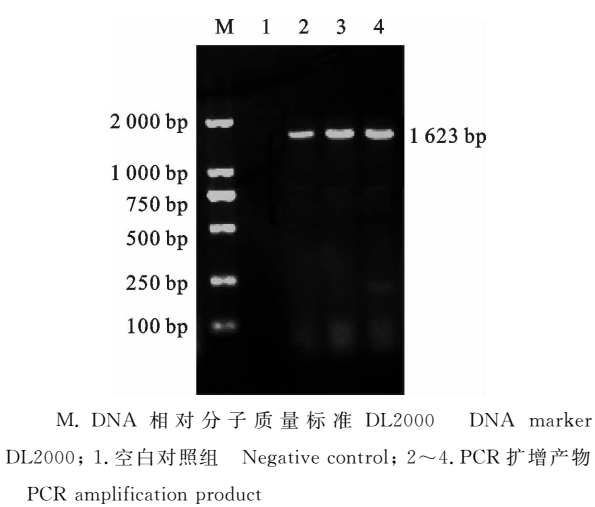
经琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 扩增得到与预期大小一致的片段(图 1)。进一步测序验证得到 1 623 bp 的牦牛 *IMPDH* 基因序列,其中 ORF 为 1 545 bp,编码 514 个氨基酸残基。通过软件比对分析发现,牦牛 *IMPDH* 基因与野牦牛(XM_005909361.2)有 7 个碱基的差异,依次为第 35 位 T $\rightarrow$ C、第 46 位 C $\rightarrow$ T、第 898 位 A $\rightarrow$ C、第 1064 位 G $\rightarrow$ T、第 1283 位 T $\rightarrow$ C、第 1532 位 G $\rightarrow$ A 和第

25 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.7 qRT-PCR 定量分析 *IMPDH* 基因在卵巢活动中的表达

以 *IMPDH* 为研究对象,以管家基因 *GAPDH* 为内参分析目的基因的相对表达水平。采用 SYBR Green II 荧光定量 qRT-PCR 分析成年空怀母牛卵巢活动中的 *IMPDH* 基因 mRNA 相对表达丰度。所有反应均重复 3 次,20 μ L 反应体系:10 μ L 2 $\times$ SYBR Green premix,上、下游引物各 0.8 μ L (10 pmol/mL),模板 2 μ L 以及 ddH₂O 6.4 μ L。反应条件为 95 μ C 30 s;95 μ L 10 s;55 $^{\circ}$ C 10 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,共 40 个循环。65~95 $^{\circ}$ C 每隔 0.5 $^{\circ}$ C 读板 1 次,绘制扩增和熔解曲线。分析各基因的熔解曲线并电泳鉴定 PCR 产物。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析目的基因 mRNA 表达水平。

1538 位 T $\rightarrow$ G,最终导致 7 个氨基酸发生突变。牦牛 *IMPDH* 的理论等电点分别为 5.69,分子质量约为 55.7 ku。



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000 DNA marker
DL2000; 1. 空白对照组 Negative control; 2~4. PCR 扩增产物
PCR amplification product

图 1 牦牛卵巢组织中 *IMPDH* 基因的 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR amplification of *IMPDH* gene from yak ovary

2.2 IMPDH 基因结构与功能分析

研究结果显示,牦牛 IMPDH 基因与野牦牛具有很高的同源性(99.4%),其次为黄牛(99.0%)(表 2)。进化树显示,牦牛 IMPDH 基因在进化过程中较为保守,DNAMAN 和 MEGA 软件分析结果显示,牦牛基因与野牦牛和黄牛的亲缘关系最为接近,位于同一进化分枝,与原鸡、斑马鱼等亲缘关系较远(图 2)。ExPASy 软件对牦牛 IMPDH 的亲疏水性预测结果显示最小亲水指数-2.833,最大亲水指数 2.722,该基因编码的蛋白质为亲水性蛋白质。膜结构域分析结果显示,IMPDH 编码的蛋白无跨膜结构。二级结构预测结果显示,牦牛 IMPDH 中存在 41.83% α -螺旋,12.45% β -折叠,28.99% 无规则卷曲等结构(图 3)。三级结构预测结果进一步验证二级结构的预测(图 4)。

表 2 牦牛和其他物种间 IMPDH 基因序列同源性分析
Table 2 Homologous of nucleotide of yak IMPDH gene with other species

物种 Species	登录号 GenBank No.	同源性/% Identity
野牦牛 <i>Bos mutus</i>	XM_005909361.2	99.4
黄牛 <i>Bos taurus</i>	NM_001034416.1	99.0
水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	XM_006053231.1	98.7
绵羊 <i>Ovis aries</i>	XM_004018474.3	97.3
骆驼 <i>Camelus ferus</i>	NM_006174141.2	93.6
猪 <i>Sus scrofa</i>	XM_003132201.4	93.0
猫 <i>Felis catus</i>	XM_003982210.3	93.1
马 <i>Equus caballus</i>	XM_001494550.4	92.9
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	XM_015130953.1	90.5
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_000884.2	90.5
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NM_011830.3	88.0
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NM_001030601.1	79.6
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NM_201464.1	74.4

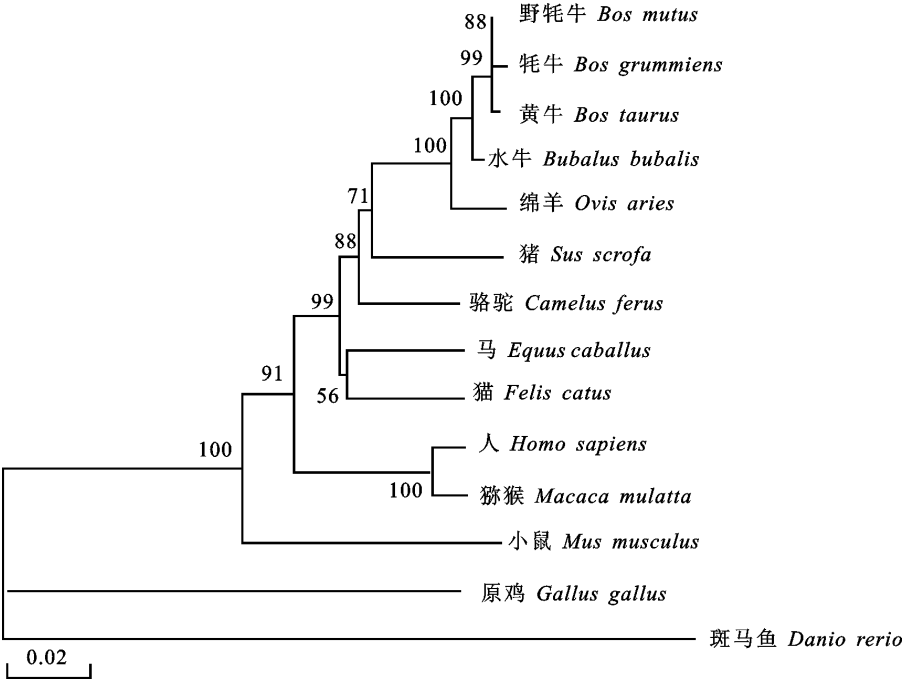
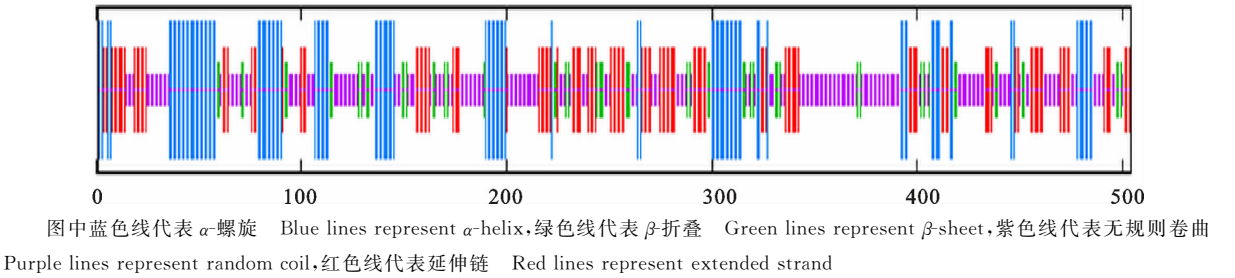


图 2 牦牛 IMPDH 进化树分析

Fig. 2 Yak IMPDH evolutionary tree analysis



图中蓝色线代表 α -螺旋 Blue lines represent α -helix,绿色线代表 β -折叠 Green lines represent β -sheet,紫色线代表无规则卷曲 Purple lines represent random coil,红色线代表延伸链 Red lines represent extended strand

图 3 牦牛 IMPDH 氨基酸序列二级结构预测

Fig. 3 Predicted secondary structure of amino acid sequence of yak IMPDH

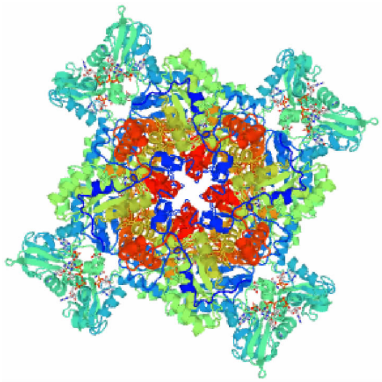


图 4 牦牛 IMPDH 氨基酸序列三级结构预测

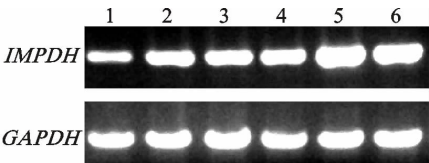
Fig. 4 Predicted tertiary structure of amino acid sequence of yak IMPDH

2.3 IMPDH 基因的时序表达谱

实时定量 RT-PCR 结果显示, *IMPDH* 基因在牦牛卵巢组织的表达丰度随牦牛胎龄和年龄的增长呈上升趋势, 成年后空怀的牦牛表达显著高于胎儿期(图 5), 但是 3 岁和 6 岁牦牛间差异不显著。

2.4 IMPDH 基因在牦牛卵巢活动中的表达

为进一步研究 *IMPDH* 基因在卵巢活动中

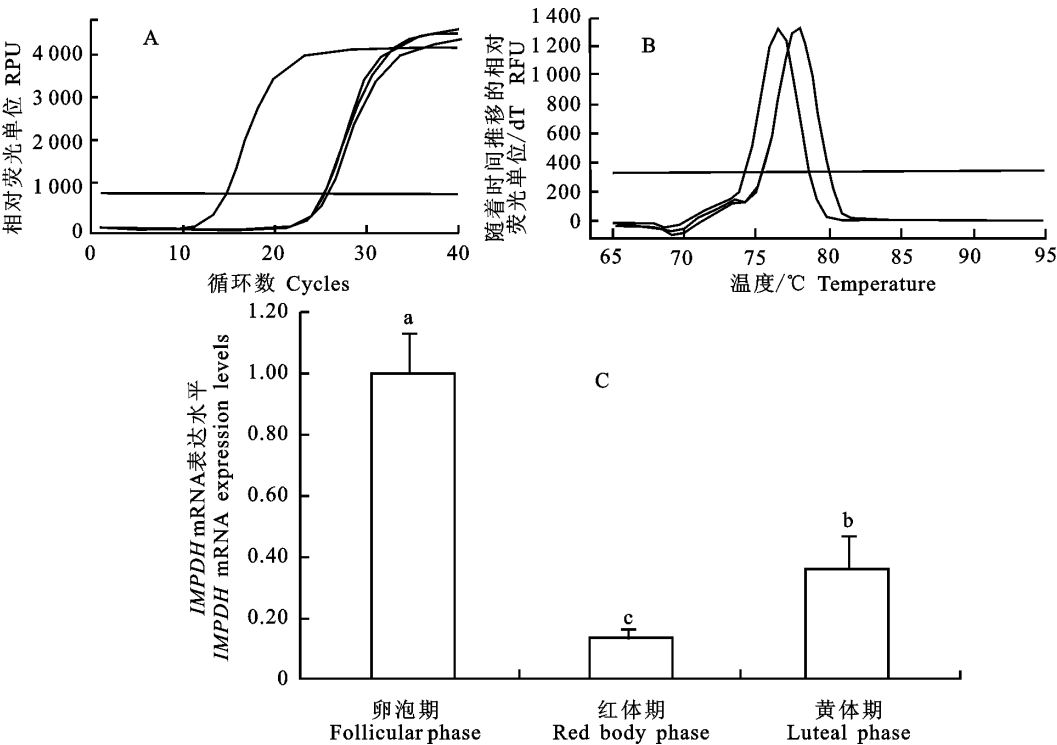


1~3 泳道依次为 3 月龄、6 月龄和 9 月龄胎牛, 4~6 泳道依次为 2 岁、3 岁和 6 岁成年牛卵巢组织 Line 1-3 represents ovaries of 3-month, 6-month and 9-month yak fetal, line 4-6 represents the ovaries of 2-year, 3-year and 6-year of adult yak, respectively

图 5 RT-PCR 检测不同发育阶段牦牛卵巢 *IMPDH* mRNA 表达量

Fig. 5 RT-PCR analysis of yak *IMPDH* mRNA expression in yak fetal and adults ovaries of different developmental stages

的表达情况, 以 *GAPDH* 为参照进行实时荧光定量分析。荧光定量的扩增曲线和熔解曲线见图 6。结果表明, *IMPDH* 在牦牛卵泡期卵巢中表达量显著高于排卵后的红体形成期及黄体形成期 ($P<0.05$), 其中在牦牛红体形成期的卵巢组织中表达量最低, 与卵泡期卵巢组织中 *IMPDH* 的表达差异极显著 ($P<0.01$)。



A. 扩增曲线, B. 熔解曲线, C. 表达水平柱状图, 不同字母(a-c)表示差异显著 ($P<0.05$) A, B and C represent amplification curve, melting curve and histogram of expression, respectively; different letters show significant difference ($P<0.05$)

图 6 牦牛 *IMPDH* 基因的 qRT-PCR 结果

Fig. 6 qRT-PCR results of *IMPDH* gene from yak ovary

3 讨论

IMPDH 是生物体内嘌呤核苷酸的从头生物合成途径的关键酶,被认为是癌症抑制剂的靶点^[13],其在进化进程中相对保守。目前已报道的 IMPDH 有两种亚型,其中 II 型最先是来自肿瘤细胞中诱导出来的,通过对其晶体结构的分析,其后又分别在大鼠、三毛滴虫、肺炎链球菌和疏螺旋体中分离出来^[9,14]。IMPDH 通常以四聚体形式存在,是 GTP 经典合成途径的限速酶;这一反应依赖于 NAD^+ 的参加,对细胞增殖分化的影响十分重要^[15]。IMPDH 限制鸟嘌呤核苷酸的生物合成,且可阻断细胞功能,如 DNA 复制、RNA 合成、和信号转导。这些效应伴有细胞周期中断、细胞分化和凋亡的诱导等^[16]。IMPDH 蛋白氨基酸序列存在较大的差异,但在哺乳动物中保守性较高^[17],如人和鼠的同源性可达 89%,但在细菌之间却存在较小的同源性仅为 23%,本试验亦证实这种差异性。

IMPDH 参与繁殖调控、卵泡发育及胚胎着床等生物学过程。IMPDH 的研究主要集中在植物^[18]、细菌^[19]和癌症细胞上^[20],关于 IMPDH 在哺乳动物卵巢组织中的资料报道较少。本研究以牦牛为研究对象,结果显示 IMPDH 在哺乳动物卵巢组织中表达,且在卵泡期表达量最高,表明 IMPDH 对卵泡生长发育有一定影响,可能与卵母细胞发育和排卵有关。雌性动物的繁殖能力主要取决于卵巢组织及其卵泡的协同发育。卵巢组织的生长发育与成熟是一个动态过程。成年雌性动物的每一个发情周期都需经历卵泡发育、红体及黄体的形成与退化的过程。这个过程由垂体、下丘脑、卵巢以及体细胞共同产生的许多生长因子和激素共同参与,形成复杂的调控网络。IMPDH 通过从头合成途径对卵细胞的生长发育和成熟起重要作用,并可通过调节卵巢功能参与排卵、早期胚胎发育和胚泡着床等过程^[21]。因此研究牦牛繁殖活动中 *IMPDH* 基因的表达,对其在卵泡生长发育过程中的作用具有重要意义。

IMPDH 对卵巢的排卵及卵母细胞减数分裂阻滞具有重要作用。哺乳动物卵巢组织上存在数百万个各级卵泡,但在卵泡生长发育过程中,只有少量卵泡可以发育成熟并排卵,其余大部分卵泡都将闭锁退化。多数动物胎儿的原始卵泡、初级卵泡闭锁主要是由卵母细胞内 cGMP 水平引起

的^[4]。cGMP 是由卵丘细胞以及卵泡壁颗粒细胞两者共同产生^[22]。主要是通过卵泡壁颗粒细胞的利钠尿酸受体 2(NPR2)将 GTP 转化为 cGMP,从而抑制 PDE3A 的活性,导致卵母细胞减数分裂阻滞^[4,22]。而 GTP 又是由从肌苷一磷酸(IMP)在 IMPDH 酶作用下,经一系列的生物合成反应产生的。IMP 是从嘌呤代谢途径和 HPRT 补救途径,最终将次黄嘌呤转化而来。研究发现,在小鼠卵母细胞复合体中的 IMP 的主要来源是从头合成途径^[21]。IMPDH 在卵母细胞减数分裂阻滞中起相当重要作用,前期研究发现使用 IMPDH 抑制剂咪唑立宾和霉酚酸能诱导小鼠性早熟以及恢复卵母细胞减数分裂^[23-24]。可能是由于这些抑制剂扰乱减数分裂进展和排卵的协调作用,从而影响卵母细胞的质量和生殖力^[24]。这些结果表明,IMPDH 具有维持卵母细胞减数分裂阻滞的功能,推测是通过调控鸟苷酸环化酶的活性影响 cGMP 的产生。因此,有关 IMPDH 调控卵巢及其卵母细胞维持减数分裂阻滞作用机制有待进一步深入研究。

本研究中,通过初步分析 *IMPDH* 基因在牦牛卵巢生长发育过程及繁殖周期中的表达情况,为研究 IMPDH 在卵泡发育和排卵机制奠定基础。前期大量研究表明 IMPDH 是一种与雌性哺乳动物生殖过程密切相关的生物酶^[7]。本研究结果表明,IMPDH 参与牦牛卵巢的发育,并在卵巢活动过程中有明显的表达规律,初步推测 IMPDH 在牦牛排卵、胚胎发育、胚胎着床及着床后的发育过程中起重要的调节作用。此外,可能与牦牛的低繁殖率与自然流产之间存在密切的关系^[25]。然而,其作用机理目前尚不完全清楚,有必要进行深入的研究。是否由于 *IMPDH* 基因调控卵巢的发育和卵泡的形成,而间接性的调控牦牛繁殖性能还有待进一步挖掘。

4 结论

本研究利用 RT-PCR 成功克隆牦牛 *IMPDH* 基因 CDS 序列,并发现该基因在卵巢组织中呈规律性表达。由此表明,IMPDH 基因参与牦牛卵巢组织的生长发育及发情周期中卵巢的活动,为解析牦牛卵巢组织的生长发育及性激素分泌等重要生殖活动的分子机理提供新的依据,为研究 IMPDH 在卵泡发育与排卵中的作用机制奠定基础。

参考文献 Reference:

- [1] WIENER G, HAN J L, LONG R J. The Yak [M]. 2nd edition. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, 2003.
- [2] QIU Q, ZHANG G J, MA T, *et al.* The yak genome and adaptation to life at high altitude [J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(8): 946-949.
- [3] XIONG X R, LI J, FU M, *et al.* Oocyte extract improves epigenetic reprogramming of yak fibroblast cells and cloned embryo development [J]. *Theriogenology*, 2013, 79(3): 462-469.
- [4] ZHANG M J, SU Y Q, SUGIURA K, *et al.* Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes [J]. *Science*, 2010, 330(6002): 366-369.
- [5] BURKS D J, DE MORA, J F, SCHUBERT M, *et al.* IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis [J]. *Nature*, 2000, 407(6802): 377-482.
- [6] DAS D, NATH P, PAL S, *et al.* Expression of two insulin receptor subtypes, insra and insrb, in zebrafish (*Danio rerio*) ovary and involvement of insulin action in ovarian function [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 239(27): 21-31.
- [7] WIGGLESWORTH K, LEE K B, O'BRIEN M J, *et al.* Bi-directional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(39): E3723-E3729.
- [8] ASADA A, NISHIDA A, SHIOYA M, *et al.* NUDT15 R139C-related thiopurine leukocytopenia is mediated by 6-thioguanine nucleotide-independent mechanism in Japanese patients with inflammatory bowel disease [J]. *Journal of Gastroenterology*, 2016, 51(1): 22-29.
- [9] SARA B, HELGE R, STEIN B. Real-time PCR determination of *IMPDH1* and *IMPDH2* expression in blood cells [J]. *Clinical Chemistry*, 2007, 53(6): 1023-1029.
- [10] JAIN J, ALMQUIST S J, FORD P J, *et al.* Regulation of inosine monophosphate type I and type II isoforms in human lymphocytes [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 67(4): 767-776.
- [11] LOONEY R J, ANOLIK J, SANZ I. B cells as therapeutic targets for rheumatic diseases [J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2004, 16(3): 180-185.
- [12] ZHOU J M, ZHANG X H, HE K W, *et al.* Characterization and proteome analysis of Inosine 5-monophosphate dehydrogenase in epidemic streptococcus suis serotype 2 [J]. *Current Microbiology*, 2014, 68(5): 663-669.
- [13] BAIRAGYA H R, MUKHOPADHYAY B P, SEKAR K. An insight to the dynamics of conserved water molecular triad in IMPDH II (human): recognition of cofactor and substrate to catalytic Arg 322 [J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2009, 27(2): 149-158.
- [14] GOLDSTEIN B M, COLBY T D. IMP dehydrogenase: structural aspects of inhibitor binding [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 1999, 6(6): 519-536.
- [15] COLBY T D, VANDERVEEN K, STRICKLER M D, *et al.* Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: implication of ligand binding and drug design [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(7): 3531-3536.
- [16] PITALUGA A N, MOREIRA M E C, TRAUB-CSEK Y M. A putative role for inosine 5' monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in *Leishmania amazonensis* programmed cell death [J]. *Experimental Parasitology*, 2015, 149: 32-38.
- [17] COLLART F R, HUBERMAN E. Cloning and sequence analysis of the human and Chinese hamster inosine-5-monophosphate dehydrogenase cDNAs [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(30): 15769-15772.
- [18] 周晨阳. 肌苷-5'-单磷酸脱氢酶基因的克隆及与茶叶中咖啡因含量的关联分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
ZHOU C Y. Molecular cloning of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase gene and association analysis of the gene with caffeine content in tea plant [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [19] 张雪寒, 何孔旺, 周俊明, 等. 猪链球菌 2 型次黄嘌呤核苷酸脱氢酶缺失株的构建[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1789-1796.
ZHANG X H, HE K W, ZHOU J M, *et al.* Construction and identification of *Streptococcus suis* type 2 deficient in IMPDH expression [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(5): 1789-1796 (in Chinese with English abstract).
- [20] KIM H R, ROE J S, LEE J E, *et al.* A p53-inducible microRNA-34a downregulates Ras signaling by targeting IMPDH [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2012, 418(4): 682-688.
- [21] DOWNS S M. High performance liquid chromatography analysis of hypoxanthine metabolism in mouse oocyte-cumulus cell complexes: Effects of purine metabolic perturbants [J]. *Biology of Reproduction*, 1994, 50(6): 1403-1412.
- [22] ROBINSON J W, ZHANG M J, SHUHAIBAR L C, *et al.* Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes [J]. *Developmental Biology*, 2012, 366(2): 308-316.
- [23] Pedro M, Mattia G, Tomas T, *et al.* Recent advances on the enantioselective synthesis of C-nucleosides inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, 14(10):

1212-1224.

[24] DOWNS S M. Induction of meiotic maturation in vivo in the mouse by IMP dehydrogenase inhibitors; effects on the developmental capacity of ova [J]. *Molecular Reproduction & Development*, 1994, 38(3):293-302.

[25] FULWILER A L, BOITZ J M, GILROY C, *et al.* IMP dehydrogenase deficiency in *Leishmania donovani* causes a restrictive growth phenotype in promastigotes but is not essential for infection in mice [J]. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2011, 180(2):123-126.

Cloning, Bioinformatics Analysis and Differential Expression of IMPDH Gene in Yak Ovary at Different Stages

XIONG Xianrong¹, LAN Daoliang², HU Jiajia¹, LI Jian¹ and ZI Xiangdong¹

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;
2. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau Research, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract The aim of this study is to obtain the information about sequence structure and bioinformatics analysis of yak *IMPDH* gene, analysis of sequential expression in ovarian tissue. It could provide information for further study of mechanism of ovarian development and ovulation. Yak *IMPDH* cDNA was cloned using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the sequences characteristics were analyzed, and *IMPDH* gene expression in ovary were examined by real time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) at different stages of development and reproductive cycle. The study obtained a complete cDNA sequences of 1 623 bp of *IMPDH* gene of yak with a deduced protein, which were consisted of 514 amino acids that are highly homologous with other species. The sequence similarity of *IMPDH* between yak and wild yak was 99.4%, this indicated that *IMPDH* gene was conservative during evolution. The result of RT-PCR indicated that the expression of yak *IMPDH* increased with the increase of age. The *IMPDH* gene in ovarian follicular phase was the strongest expression at other stages, and significantly higher than that of the red body phase. These results suggested that *IMPDH* gene was probably related to the ovarian development, and there was a significantly expressed pattern during ovarian activity. These indicated that *IMPDH* played an important role during the reproductive cycle, and made a foundation for the further study of the function of *IMPDH* gene in yak.

Key words Yak; Cloning; *IMPDH*; Sequence analysis; Differential expression

Received 2016-07-28 **Returned** 2016-09-26

Foundation item The Sichuan Provincial Science and Technology Program (No. 2014NZ0114); the Fundamental Research Funds for the Central Universities of Southwest Minzu University (No. 2016NZYQN38).

First author XIONG Xianrong, male, master student. Research area: breeding and embryo engineering of yak. E-mail: xianrongxiong@163.com

Corresponding author LI Jian, male, professor. Research area: animal reproductive endocrine and embryo engineering. E-mail: jianli_1967@163.com