

东北马鹿鹿茸软骨组织 cDNA 文库构建 及 IGF2 基因克隆与结构分析

刘学东, 张子栋, 郑冬, 马建章

(东北林业大学野生动物资源学院动物遗传学与分子生物学实验室, 哈尔滨 150040)

摘要: 【目的】从功能基因组学角度深入研究鹿茸软骨组织生长发育机理, 探讨胰岛素样生长因子-II (IGF2) 在鹿茸软骨组织生长发育过程中的作用。【方法】利用 SMART 技术构建了东北马鹿鹿茸软骨组织全长 cDNA 文库, 并设计 IGF2 基因保守引物对该文库进行筛选。【结果】构建的未扩增文库滴度为 1.8×10^6 pfu·ml⁻¹, 文库重组率大于 89.8%; 插入片段平均长度约为 1.2 kb; 扩增文库滴度为 1.4×10^{10} pfu·ml⁻¹; 克隆东北马鹿 IGF2 基因 (GenBank 登录号: EF177491) CDS 区为 540 bp, 编码 179 aa 长度的多肽, 与 GenBank 中检索得到的猪、马、牛、羊、人、小鼠和大鼠 IGF2 基因进行比对分析显示, 马鹿 IGF2 多肽无色氨酸 (Trp), 组氨酸 (His) 与苏氨酸 (Thr) 含量在 8 个物种中最高; 重建系统树结果显示, 东北马鹿 IGF2 与牛和羊 IGF2 基因具有最高的相似性。【结论】成功构建东北马鹿鹿茸软骨组织 cDNA 文库并克隆到 IGF2 基因。

关键词: 马鹿; 鹿茸软骨组织; SMART cDNA 文库; 胰岛素样生长因子-2

cDNA Library Construction from Antler Cartilage of the Red Deer (*Cervus elaphus*) and Cloning Insulin-like Growth Factor II Gene

LIU Xue-dong, ZHANG Zi-dong, ZHENG Dong, MA Jian-zhang

(Animal Genetics and Molecular Biology Laboratory, College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract: 【Objective】 To investigate molecular mechanisms of antler cartilage growth and development at the functional genomic level and further clarify function of the Insulin-like growth factor II (IGF2) gene. 【Method】 The SMART technique was used to construct a cDNA library from antler cartilage of the red deer (*Cervus elaphus*) and conserved primers were further designed to screen cDNA library and isolate IGF2 gene. 【Result】 The primary cDNA library contained 1.8×10^6 independent clones, 89.8% of which were recombinant; titer of the amplified library was 1.4×10^{10} pfu·ml⁻¹ and average length of exogenous inserts was 1.2 kb. Bioinformatic analysis based on IGF2 genes of pig, horse, cattle, sheep, human, mouse and rat showed CDS region of the red deer IGF2 gene (GenBank accession No: EF177491) was 540 bp, which encoded a 179-amino-acids-long peptide. Compared with other seven species, IGF2 of the red deer had no tryptophan, and contained the most histidine and threonine. Moreover, phylogenetic tree reconstructed disclosed the highest similarities among IGF2 of deer, cattle and sheep. 【Conclusion】 The results demonstrated that the reliability and representativeness of the cDNA library were constructed, which would provide a further platform for studying regeneration mechanisms of antler cartilage of the red deer.

Key words: Red deer; Antler cartilage; SAMRT cDNA library; Insulin-like growth factor II

0 引言

【研究意义】全世界共有鹿类 47 种, 中国有 16 种, 是鹿类资源最丰富的国家之一^[1]。中国养鹿并利

用鹿产品已有上千年的历史。东北马鹿 (*Cervus elaphus*) 作为马鹿的一个亚种, 因其鹿茸的品质优良和高产而蜚声国内外。再生指生物体以现存的细胞和组织重新生成或修复失去的组织或器官的过程^[2], 鹿

收稿日期: 2007-08-27; 接受日期: 2008-06-06

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目资助 (GC03B514); 黑龙江省留学回国基金资助 (LC06C36)

作者简介: 刘学东 (1970-), 女, 黑龙江大兴安岭人, 副教授, 研究方向为分子遗传学与分子生物学。E-mail: liuxuedong@nefu.edu.cn。通讯作者 马建章 (1937-), 男, 辽宁阜新, 中国工程院院士, 教授, 研究方向为野生动物保护与利用。Tel: 0451-82191025; E-mail: jianzhangma@163.com

茸角是目前所知的惟一具有表形态再生(在失去后还能完全再生出来)能力的哺乳动物器官^[3]。因此,以鹿茸为模型开展研究,不仅可为哺乳动物再生生物学提供基础数据,而且可对中国茸鹿良种选育和鹿茸生产提供指导,具有重要的理论和实践意义。【前人研究进展】鹿茸角是鹿科动物雄性个体特有性征,马鹿鹿茸角每年再生和脱落一次,历时 90~120 d,经过新茸萌发到茸性皮肤脱落,茸性皮肤脱落到骨角形成至脱落两个阶段,前一阶段茸性皮肤的生长速度远远大于软骨骨化速度,后一阶段软骨骨化速度超过茸性皮肤生长速度,进而茸皮脱落形成骨质鹿角^[4]。鹿茸软骨骨化过程的组织学特性已经得到详细研究^[4],但关于鹿茸角再生分子机理,特别是胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGFs)、骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMPs)等局部生长因子调控鹿茸角骨组织生长发育的机制还缺乏基础数据^[5]。IGF2 也被称为生长调节素 A (somatomedin A),是胰岛素家族的成员之一,因与胰岛素在结构上具有约 47%的同源性而得名。早在 1986 年,Florini 等就发现 IGF2 以浓度依赖方式刺激肌纤维增殖与分化。截止目前已发现 IGF2 介导生长激素(growth hormone)作用,促细胞生长和胰岛素功能,并以自分泌形式参与生长发育^[6]。IGF2 是多种细胞的有丝分裂原,且以亲本特异性的方式进行印记(imprinting)表达^[7],作用于发育早期^[8]。有关 IGF2 如何调控软骨组织,特别是鹿茸软骨组织生长发育的研究并不多,近期 Sadighi 等发现向离体培养的鹿茸软骨区细胞中加入 IGF2,可促进细胞的分裂,但机理不清^[9]。【本研究切入点】关于 IGF2 在马鹿鹿茸角软骨组织生长发育过程中的作用以及鹿源 IGF2 基因结构特征,目前尚无文献报道。【拟解决的关键问题】通过构建马鹿鹿茸角软骨组织全长 cDNA 文库,并进而从文库中克隆分离 IGF2 基因进行生物信息学分析。构建目标材料高质量全长 cDNA 文库是本试验的关键。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜东北马鹿鹿茸于 2006 年 5 月上旬采自吉林省长春市红星养鹿场一头两岁左右的健康雄鹿,保存于干冰中立即带回实验室备用。

1.2 马鹿鹿茸软骨组织总 RNA 提取

使用一次性手术刀在离鹿茸顶支生长点 3 cm 处垂直鹿茸生长轴方向切断,自横断面中心软骨处取样

约 50 mg。利用 SV Total RNA Isolation System (Promega)从鹿茸软骨组织中提取总 RNA。使用 Cary 25 型分光光度计(Varian, 美国)测定 RNA 浓度和纯度。并将提取产物于含有甲醛的 1%琼脂糖变性胶,5 V·cm⁻¹ 30 min 进行电泳,确定总 RNA 质量。

1.3 马鹿鹿茸 cDNA 文库构建和检测

SMART cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech 公司,噬菌体包装蛋白 GigapackIII Gold Packing Extract 购自 Stratagene 公司。以总 RNA 为模板,利用 SMART 技术构建全长 cDNA 文库,试验流程按照试剂盒手册进行,对其中 cDNA 合成及 LD-PCR 等部分步骤稍作改进。按照手册中相关步骤分别测定未扩增和扩增文库滴度。并挑取噬菌斑,利用 PCR (LAMU: CCATTGTGTT GGTACCCGG; LAMD: ATACGACTC ACTATAGGGCGAATT)检测插入片断的大小,计算重组率。

1.4 IGF2 基因克隆及序列分析

参照 GenBank 中相关序列,设计 IGF2 基因保守引物(IGF2A: AATGGGGATCCCAGTGGG 和 IGF2B: GAATTACGACACTTTGGCTCACT),以 cDNA 文库总 DNA 为模板,从构建完毕的 cDNA 文库中筛选 IGF2 基因。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段,并克隆入 pGEM18-T 载体(TaKaRa)中,转化大肠杆菌 JM109,涂板,37℃过夜培养。挑取阳性克隆制备质粒,于测序仪(ABI3700 型,美国 ABI 公司)测序。

将获得的 IGF2 基因 DNA 序列递交 GenBank(登录号: EF177491)。利用 MegAlign (DNASTAR)将马鹿 IGF2 基因与猪(*Sus scrofa*, NM_213883)、牛(*Bos taurus*, NM_174087)、羊(*Ovis aries*, NM_001009311)、人(NM_001007139)、小鼠(NM_010514)、大鼠(NM_031511)、马(ECILGF22)等物种 IGF2 基因 CDS 区 DNA 及氨基酸序列分别进行比对分析。利用 MEGA 4^[10]软件进行序列核苷酸组成、转换和颠换等统计分析,并基于 DNA 和氨基酸序列利用 NJ 法重建进化树。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

总 RNA 经琼脂糖变性凝胶电泳后可清晰见到 28S 和 18S rRNA 各一条带(图 1-A),表明本试验所提取的鹿茸软骨组织总 RNA 是基本完整的,材料保存和提取过程未发生 RNA 降解。

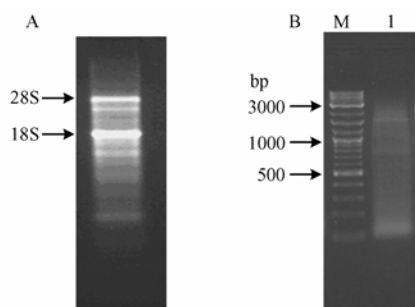


图 1 鹿茸软骨组织总 RNA 电泳图 (A) 及 cDNA 合成产物电泳图 (B)
B 中, M: DNA 分子量标准; 1: cDNA 反转录产物; 其中在 1 000 bp 左右的位置可隐约见 1 条 DNA 带
Within Panel B, M: DNA marker; 1: ds cDNA after second-strand synthesis, and one bands less than 1 000 bp could be seen

图 1 鹿茸软骨组织总 RNA 电泳图 (A) 及 cDNA 合成产物电泳图 (B)
Fig. 1 Electrophoresis of total RNA (A) and cDNA (B) from antler cartilage

2.2 双链 cDNA 合成及文库的滴定和检测

利用 LD-PCR 以 cDNA 第一链为模板合成 cDNA 第二条链, 其产物大小 0.1~5 kb, 隐约可见若干 DNA 带 (图 1-B), 这表明合成的 cDNA 符合建库要求。cDNA 未扩增文库滴度约为 1.8×10^6 pfu·ml⁻¹, 文库重组率达到 89.8% 以上, 插入片段大小平均为 1.2 kb (图 2)。扩增文库滴度为 1.4×10^{10} pfu·ml⁻¹。文库构建质量较高。

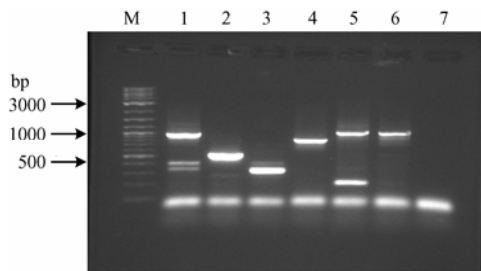


图 2 鹿茸软骨组织 cDNA 文库重组克隆检测
M: DNA 分子量标准; 1~6: 分别为文库中随机挑选出来的克隆; 7: 为 PCR 反应阴性对照, 可见引物多聚体副产物
M: DNA marker; 1-6: PCR products for clones selected randomly; 7: Negative control of PCR and primer by-products could be seen

图 2 鹿茸软骨组织 cDNA 文库重组克隆检测

Fig. 2 Recombinant clones screening within the cDNA library of antler cartilage

2.3 IGF2 基因克隆及序列分析

IGF2 基因 PCR 扩增产物经电泳得到 563 bp 左右

的一条特异条带 (图 3), 与预期结果相符。东北马鹿 IGF2 基因与其它 7 个物种的 DNA 和氨基酸序列比对结果分别见图 4 和图 5。东北马鹿 IGF2 基因 CDS 区全长 540 bp (图 4、表 1)。与其它物种比较, 东北马鹿 IGF2 基因 CDS 区在 3' 端存在 6 个碱基缺失 (图 4); 碱基代换在蛋白质水平上主要改变了 IGF2 基因肽链 N 端信号肽区和 C 端功能区的氨基酸组成 (图 5); 马鹿 IGF2 多肽产物中缺乏色氨酸 (Trp), 其组氨酸 (His) 与苏氨酸 (Thr) 含量在 8 个物种中是最高的; 并且在 pH 7.0 环境下其电荷量偏低 (表 1); 东北马鹿 IGF2 与牛和羊具有较高的相似性 (图 6), 其颠换差异仅各为 5 和 6 个核苷酸 (表 2), 且肽链长度均仅为 179 个氨基酸。

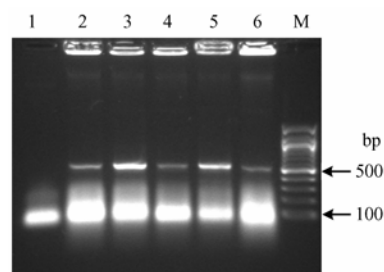


图 3 鹿茸软骨组织 cDNA 文库中分离 IGF2 基因
1: PCR 阴性对照, 清楚可见引物多聚体副产物; 2~6: 不同批次的 IGF2 基因 PCR 产物; M: DNA 分子量标准。图中加样孔处可见文库 DNA 模板
1: PCR negative control, the primers polymer could be seen; 2-6: All PCR products of IGF2 from different cDNA library aliquots, target DNA bands were about 563bps and PCR templates could be seen at the sample wells; M: 100 bp DNA marker

图 3 鹿茸软骨组织 cDNA 文库中分离 IGF2 基因

Fig. 3 Amplification of IGF2 gene from the cDNA library of antler cartilage

3 讨论

构建 cDNA 文库是目前进行功能基因组学研究的最基本最重要的手段之一。在特定的组织细胞中, 基因组中的基因只有一部分表达, 而且处在不同环境条件、不同分化时期的细胞其基因表达的种类和强度也不尽相同, 所以 cDNA 文库具有组织细胞特异性, 是研究和阐明特定组织生长发育机理的最佳起点。

目前构建全长 cDNA 文库的众多方法, 最困难也是最关键的问题仍然是如何最大程度地获得 5' 端序列。SMART 技术很巧妙地利用了反转录酶模板转换特性, 从而获得了更多的全长 cDNA。除了技术上的

马鹿 Deer	ATGGGGATCCCAGTGGGAAAGTCGGTGCCTGGCGTTTCTCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTATGCTGCTTACCG	80
牛 CattleA...CA.....T.C...TG.....	80
羊 SheepA...CA.....A.....C...TG.....	80
马 HorseG...G...C...AT.C.GT...T...T...T...AT.....	80
人 HumanA...A...G...A...T.C.....AT.....	80
小鼠 MouseG...A...T...T.C...T...CT.....T...ATC.....G.	80
猪 PigGA..A.G...C...C...C.T.C.G...GT.....G.....	80
大鼠 RatG...A...T...T.C...T...CT.....T...ATC.....	80
马鹿 Deer	CCCCAGCGAGACCTTGTGCGCGGGGAGCTGGTGGACACCCTCCAGTTTGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCC	160
牛 CattleTC.....	160
羊 SheepTC.....	160
马 HorseT...TC...T.....T.....T.....A	160
人 HumanT...C.....C.....A	160
小鼠 MouseG.A...TC.....A.....T.T...G.T...TC.....A	160
猪 PigT...TC.....C.....A	160
大鼠 RatTC.....A.....T.T...G.T...TC.....A	160
马鹿 Deer	GACCATCCAGCCGCATAAACCGACGCAGCCGTGGCATCGTGGAAAGAGTGTGTCTCCGAAGCTGCGACCTGGCCCTCCTG	240
牛 CattleG...	240
羊 SheepG...	240
马 Horse	.G..CG.A.....C...C.....C.T...C.....	240
人 Human	.G..CG.A...TG.G.G...T.....T.G...C...T...C...T.....	240
小鼠 Mouse	.G..T.A...TGCC...T.....C...C.....	240
猪 Pig	.G..GG.A...G.G...C.....C...T.....G...	240
大鼠 Rat	.G..T.A...TGCC...T.....C...C...T.....	240
马鹿 Deer	GAGACTTACTGTGCCACCCCGCAAGTCCGAGAGGGATGTGTCTGCTCTACGACCGTCTCCGGACGACCTCACCGC	320
牛 CattleG.....	320
羊 SheepG.....T...A..	320
马 HorseC.....C...GA..C..C.....TC.C..AG	320
人 HumanG.....T.....C...GA..C..C.....A..T..C..AG	320
小鼠 MouseA.....C.....A...CA.G...A.....T..C..AG	320
猪 PigC.....C.....C...GA..C..C.....A..T..C..AG	320
大鼠 RatA.....C.....A...CA.G...A.....T..C..AG	320
马鹿 Deer	ATACCCCGTGGGCAAGCTCTTCCGACATGACACCCGGAAGCAGTCCACGCAGCGCTTGCAGGGGCTGCCCGCTTCC	400
牛 CattleT...A.T...T.T.....C...C.....	400
羊 SheepT...T...A.TC...T...C...C.....T...	400
马 HorseT...AGT.CA..G..T...A...C...C.....T..C...	400
人 HumanT...A.T...T...C...C.....T..C...	400
小鼠 MouseT...A.T...T...GA...G..GGA...C...A...T..C...	400
猪 PigT...CT...T...G.C..A..C.....G..C...	400
大鼠 RatT...AA.TTC...T...GA...G..GGA...C...A...T..C...	400
马鹿 Deer	TGCGAGCGCGCCGGGTGCGACGCTCGCCAGGAGCTGGAGGGCTCAGAGAGGCCAAGAGTCCCGTCCGCTGATCACT	480
牛 CattleA.....A.....G.C	480
羊 SheepA.....A.....G.C	480
马 Horse	...TA.C...T...T.A...C..A..T...G...C.AC.....C...G.C	480
人 Human	...T..C...A.GT...A...C...T...G...AC.....C...TG..	480
小鼠 Mouse	...T..C...T...T..A.A...CA.A.A.T...AC...T...C...GTG	480
猪 Pig	...C..C...A...G...C...C...A..C...C.G.C	480
大鼠 Rat	...T..C...T...A.A...C..A..T...C.C...C...GTG	480
马鹿 Deer	CTGCCATCCAGGACCTGCCACCCACGGGGCGCCTTCCGAGGCATCCAGCGAT-----TAG	546
牛 CattleC.....A.....-----	546
羊 SheepT.C.....-----	546
马 HorseC.G...CA.TC...C...T.GT...TG...CTGCAG.GA	546
人 Human	..A...C...A...C...-----C.CC.A...ATGG...A..CGGAAG.GA	546
小鼠 Mouse	T.A..ACC.A.A...C.---.A...G...ATG...A.CCATCAG.GA	546
猪 Pig	.GT...C..GA...C..G...C...G...G..C..CGGAAG.GA	546
大鼠 Rat	T.A..ACC.A.A...C.---.A...G...ATG...A.CCATCAG.GA	546

“.”代表与马鹿碱基相同，“-”代表碱基缺失；每行末尾数字代表碱基数
 “.” was for the same nucleotide as that of deer, while “-” was for nucleotide deletion. Number of nucleotide was listed at the end of each line

图 4 东北马鹿、牛、羊、马、猪、小鼠、大鼠及人 IGF2 基因 DNA 序列比对

Fig. 4 Alignment of IGF2 DNA sequence among red deer, cattle, sheep, horse, pig, mouse, rat and human

马鹿 Deer	MGIPVGVKSVLAF...LTF...LAFASCCY...AAYR...PSETL...CGGELV...DTLQ...FVCG...DRGFY...F...SRP...SSR...INRR...SRGIVE...ECCFR...SCDL...LALL	80
牛 Cattle	...TA...VL...A...	80
羊 Sheep	...TA...M...L...A...	80
马 Horse	...L...MLF...I...A...	80
人 Human	...M...M...VL...I...A...VS...	80
小鼠 Mouse	...M...VL...IS...L...I...G...G...S...A...	80
猪 Pig	...MR...PL...VL...V...L...A...V...	80
大鼠 Rat	...M...VL...IS...L...I...S...A...	80
马鹿 Deer	ETYC...ATPAK...SERDVS...ASTTVLP...D...LTAY...PVGK...LFRHD...TRKQ...STQ...RLRR...GLPA...FLRARR...GR...TLAQ...E...LEAL...REAK...SHR...PLIT	160
牛 Cattle	...V...F...QY...IW...K...A	160
羊 Sheep	...A...F...QS...W...K...A	160
马 Horse	...TPP...SPR...V...QYN...AW...L...T...M...VK...F...QR...A	160
人 Human	...TPP...NFPR...F...QY...W...L...HV...K...F...R...A	160
小鼠 Mouse	...T...QA...FPR...F...QY...WR...AG...L...M...K...KEF...R...V	160
猪 Pig	...TPP...NFPR...F...Y...W...A...L...K...V...R...TA	160
大鼠 Rat	...T...QA...FPR...F...KF...WR...AG...L...M...K...F...R...V	160
马鹿 Deer	LPIQDPATHGGASSEASSD--	181
牛 Cattle	..T...K...--	181
羊 Sheep	..T...--	181
马 Horse	..TE...TP...A...FV...V...LQ	181
人 Human	..T...-A...PP...MA...NRK	181
小鼠 Mouse	..PK...-A...M...NHQ	181
猪 Pig	R...TR...A...P...GHRK	181
大鼠 Rat	..PK...-A...M...NHQ	181

“.”代表与马鹿氨基酸相同，“-”代表氨基酸缺失；每行末尾数字代表氨基酸数
 “.” was for the same amino acid as that of deer, while “-” was for amino acid deletion. Number of amino acids was listed at the end of each line

图 5 东北马鹿、牛、羊、马、猪、小鼠、大鼠及人 IGF2 基因氨基酸序列比对

Fig. 5 Alignment of IGF2 amino acids sequence among red deer, cattle, sheep, horse, pig, mouse, rat and human

表 1 东北马鹿、牛、羊、马、猪、小鼠、大鼠及人 IGF2 基因 DNA 组成及肽链生化特性

Table 1 DNA composition and peptide biochemical characteristics of IGF2 from Red deer, cattle, sheep, horse, pig, mouse, rat and human

	DNA 组成 DNA composition					肽链特性 Biochemical characteristics of peptide				
	T(U) (%)	C (%)	A (%)	G (%)	(G+C) (%)	CDS 区全长 CDS length (bp)	电荷 Charge at pH 7.0	等电点 Isoelectric point	极性氨基酸个数 Number of polar amino acids(aa)	全长 Full length (aa)
马鹿 Deer	18.7	35.2	16.1	30	65.2	540	6.2	8.7	49	179
牛 Cattle	18.9	34.4	16.9	29.8	64.2	540	7.0	8.8	49	179
羊 Sheep	19.1	34.4	16.7	29.8	64.2	540	5.0	8.5	49	179
马 Horse	20	35.3	15.2	29.5	64.8	546	6.0	8.7	45	181
人 Human	18.8	35.2	16.2	29.8	65.0	543	10.2	9.3	42	180
小鼠 Mouse	21	32.6	17.7	28.7	61.3	543	9.2	9.2	42	180
猪 Pig	16.5	37.2	14.7	31.7	68.9	546	15.2	10.0	40	181
大鼠 Rat	20.8	33.3	17.1	28.7	62.0	543	10.2	9.4	41	180

精巧设计和简单便利的操作流程之外，在 RNA 起始量的需求上，SMART cDNA 文库构建技术仅需 50ng 总 RNA 就可以构建一个库容量大于 10⁶ pfu·ml⁻¹ 的未 sd 扩增文库，这对于取材困难的研究对象来讲是非常有应用价值的。虽然目前 SMART 技术流程已经基本被相关公司标准化，但是在下列相关环节上还需要在实际试验中予以细致地优化和改进。首先是 RNA 提取与 cDNA 合成，特别是 cDNA 合成质量是一个关

键因素。本试验 SMART 文库试剂盒中配备的 Advantage 2 DNA 聚合酶并不能很好地完成长距离聚合酶链反应 (LD-PCR) 扩增；另外在 LD-PCR 循环次数这个参数上对于不同物种也需要进行筛选和优化。另外一个关键环节在于连接 Sfi I 酶切后的 cDNA 与 λTriplEx2 载体臂及其蛋白包装。由于构建 cDNA 文库操作环节多，往往一个环节的不慎将导致无法达到成功文库标准值，从而使文库质量偏低。

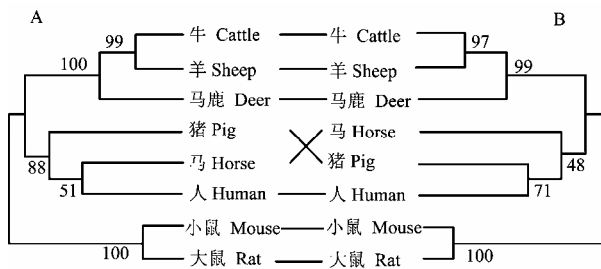
表 2 东北马鹿、牛、羊、马、猪、小鼠、大鼠及人 IGF2 基因 DNA 成对比较差异

Table 2 Pairwise differences of IGF2 DNA sequences among Red deer, cattle, sheep, horse, pig, mouse, rat and human

	马鹿 Deer	牛 Cattle	羊 Sheep	马 Horse	人 Human	小鼠 Mouse	猪 Pig	大鼠 Rat
马鹿 Deer		5	6	27	23	35	27	34
牛 Cattle	19		3	28	24	38	26	37
羊 Sheep	21	7		29	25	39	27	36
马 Horse	54	49	51		12	26	20	25
人 Human	53	50	51	44		22	20	21
小鼠 Mouse	60	54	54	57	46		38	5
猪 Pig	45	38	40	42	36	44		37
大鼠 Rat	59	53	54	57	48	7	44	

右上角矩阵为成对比较颠换差异个数; 左下角矩阵为成对比较转换差异个数

The up-right matrix was pairwise transversion difference; and the low-left was pairwise transition difference



基于 NJ 模型使用 MEGA 4 重建无根树。去除全部缺失。各结点的数值(百分数)为 1 000 次抽样检验的自引导置信水平(BCL)
Unrooted trees reconstructed with Neighbor-Joining (NJ) method. Complete deletion. Percentage under each branch was bootstrap confidence level after 1000 replicates

图 6 基于 8 物种 IGF2 基因 DNA (A) 和氨基酸 (B) 序列重建的系统树

Fig. 6 Phylogenetic trees reconstructed based on DNA (A) and amino acids (B) sequences of IGF2 genes of eight species

在相关模式生物研究的过程中已经发现 IGF2 是对成骨细胞增殖和骨基质形成起重要调节作用的生长因子, 而且 IGF2 可由成骨细胞产生并以自分泌方式刺激成骨细胞增殖^[6]。研究鹿茸软骨组织的生长发育不仅可以揭示茸质的老嫩和有效成分含量的变化, 直接决定鹿茸最佳采摘时间、等级与价值, 同时对建立以鹿茸为骨发育模型具有重大意义。胰岛素样生长因子对鹿茸角软骨组织生长发育起着重要调节作用, 目前已经得到普遍认同^[11], 但是却并没有进行深入研究, 而且 GenBank 中没有鹿类 IGF2 基因序列的任何记录。反映出世界范围内鹿茸生长发育机理研究滞后缓慢,

同时也表明器官再生机理研究的艰巨性和复杂性。本研究从所构建的鹿茸软骨组织 cDNA 文库中成功地克隆得到 IGF2 基因, 验证了本试验所构建的 cDNA 文库的代表性, 同时也为后期深入研究软骨组织发育机理和 IGF2 功能奠定了基础。鹿茸的软骨内骨化机理非常复杂, 深入研究其各种调控机制, 不仅可以提高鹿茸的产量和质量, 还有助于骨病的治疗, 而且也为新药开发提供理论基础。

4 结论

通过利用 SMART 技术构建东北马鹿鹿茸角软骨组织全长 cDNA 文库并克隆和分离获得 IGF2 基因序列, 利用生物信息学方法对鹿源 IGF2 基因和 GenBank 数据库中其它物种 IGF2 基因进行了比较分析, 获得可供利用的基础试验数据; 为进一步研究软骨组织发育机理和 IGF2 功能奠定, 以及指导鹿茸生产实践奠定了试验基础。

References

- [1] 盛和林. 中国鹿类动物. 上海: 华东师范大学出版社, 1992: 1-18.
Sheng H L. *Deers in China*. Shanghai: East China Normal University Press, 1992: 1-18. (in Chinese)
- [2] Yannas I V. *Tissue and Organ Regeneration in Adults*. New York: Springer-Verlag New York, Inc, 2001: 68-78.
- [3] Price J S, Allen S, Fauchoux C, Althnaian T, Mount J G. Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals? *Journal of Anatomy*, 2005, 207: 603-618.
- [4] Li C Y, Suttie J M, Clark D E. Histological examination of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*). *The Anatomical Record*

- Part A*, 2005, 282: 163-174.
- [5] Price J S, Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 2004, 359: 809-822.
- [6] 肖 骏, 王 岩. 骨缺损区不同时相 IGF-II 的表达与凋亡的相关性. *中国骨与关节损伤杂志*, 2005, 20(2): 107-109.
Xiao J, Wang Y. Correlation between IGF-II mRNA expression and apoptosis during healing of the radius. *Chinese Journal of Bone and Joint Injury*, 2005, 20(2): 107-109. (in Chinese)
- [7] 彭凤兰. 胰岛素样生长因子 2(Igf2)研究进展. *实用预防医学*, 2007, 14: 1963-1966.
Peng F L. Current advances on insulin-like growth factor 2. *Practical Preventive Medicine*, 2007, 14: 1963-1966. (in Chinese)
- [8] 蒋思文, 彭 健, 熊远著. 胰岛素样生长因子 2 研究进展. *遗传*, 2004, 26: 271-273.
Jiang S W, Peng J, Xiong Y Z. Advance on insulin-like growth factor 2. *Hereditas* (Beijing), 2004, 26: 271-273. (in Chinese)
- [9] Sadighi M, Li C, Littlejohn R P, Suttie J M. Effects of testosterone either alone or with IGF-I on growth of cells derived from the proliferation zone of regenerating antlers *in vitro*. *Growth Hormone & IGF Research*, 2001, 11: 240-246.
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [11] 冯海华, 闭兴明, 赵丽红, 宋 宇, 岳占斌, 张学明, 李春义, 邓旭明. 胰岛素样生长因子 1 对不同生长期鹿茸生长中心细胞体外增殖的影响. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11: 7373-7376.
Feng H H, Bi X M, Zhao L H, Song Y, Yue Z P, Zhang X M, Li C Y, Deng X M. Effects of insulin-like growth factor 1 on the *in vitro* proliferation of antler organic center cells at different growing periods. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2007, 11: 7373-7376. (in Chinese)

(责任编辑 高 雨, 林鉴非)

欢迎订阅 2009 年《麦类作物学报》

《麦类作物学报》是由教育部主管、西北农林科技大学和国家小麦工程技术研究中心联合主办的专业性学术期刊,也是全国唯一的麦类作物专刊。主要刊载麦类作物(小麦、大麦、燕麦、黑麦等)遗传育种、生理生化、栽培管理、食品加工、产品贸易等方面有创新性的学术论文、领先水平的科研成果、学术报告、有新意的文献综述以及学术动态等。读者对象为国内外农业科技人员、农业院校师生及高级农业技术推广和管理人员。

本刊为“农业科学中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、“中国科技精品期刊”,现已被英国《国际农业与生物技术文摘》数据库(CABI)、美国《化学文摘》数据库(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)数据库、日本《科学技术》数据库(JST)、波兰《哥白尼索引》数据库(IC)、《中国科学引文数据库》(核心库)等国内外多家权威性检索系统收录。影响因子排名已连续 3 年居全国农业期刊前 10 位。

本刊为双月刊,单月中旬出版,A4 开本,180 页码。每册定价 20.00 元,全年 120.00 元,国内刊号:CN61-1359/S,国际刊号:1009-1041。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:52-66。漏订者可直接汇款至编辑部补订。国外总发行:北京中国国际图书贸易总公司,代号:1479B。

热忱欢迎国内外专家随时指导和赐稿,亦欢迎各有关课题组、单位和个人出版专辑、刊登广告。

联系人:华千勇;电话:029-87082642(兼传真)

通讯地址:陕西杨凌 渭惠路 3 号《麦类作物学报》编辑部(邮政编码:712100)

E-mail: mlzw@chinajournal.net.cn; 网址: <http://mlzw.chinajournal.net.cn>; <http://mlzwx.periodicals.net.cn>