

基于转录组数据的蒙古牛皮肤组织抗寒 相关信号通路及候选基因的筛选

齐 昱, 邢燕平, 潘 静, 凌 宇, 曹 宇, 周欢敏*

(内蒙古农业大学生命科学院, 呼和浩特 010019)

摘 要: 本研究旨在通过对冬夏两季蒙古牛皮肤组织进行转录组测序和生物信息学分析, 找到与蒙古牛抗寒性状相关的信号通路及候选基因。用 Ion Proton™ Sequencer 分别对冬季和夏季成年蒙古牛的皮肤组织进行转录组测序, 随后对转录组数据进行处理、与参考基因组比对、差异表达分析、GO 和 KEGG 富集分析以及候选基因筛选, 并用 Real-time PCR 方法对转录组数据进行可靠性检测。结果显示, 冬季组和夏季组分别得到 86 954 060 和 69 837 009 条 reads; 冬季组与参考基因组的唯一比率为 73.21%, 夏季组为 75.55%; 冬夏两组共有 182 个差异表达基因 (DEGs), 与夏季组相比, 其中 117 个在冬季组中上调, 65 个在冬季组中下调; Real-time PCR 分析显示, 转录组测序结果可靠; GO 分析结果显示, 细胞组分、分子功能、生物学过程分别富集到 21、39 和 224 个 term; KEGG 分析结果显示, 差异表达基因 (DEGs) 显著地富集在脂类代谢、凝血、酪氨酸代谢、类固醇合成和视黄醇代谢相关通路上; 共筛选出 8 个候选基因。综上表明, 脂类代谢、凝血、黑色素合成相关通路和基因, 以及与毛发发生相关的基因可能在蒙古牛抗寒过程中发挥重要作用。

关键词: 蒙古牛; 皮肤组织; 转录组; 信号通路; 差异表达基因

中图分类号: S823.8⁺1.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)12-2301-13

Screening of Cold Tolerance-Related Signaling Pathways and Candidate Genes in Mongolia Cattle Skin Tissues Based on Transcriptome Data

QI Yu, XING Yan-ping, PAN Jing, LING Yu, CAO Yu, ZHOU Huan-min*

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

Abstract: The aim of this study was to find out signaling pathways and candidate genes that related to cold tolerance of Mongolia cattle by RNA-sequencing and bioinformatics analysis of Mongolia cattle skin tissues in winter and summer. Transcriptome sequencing skin tissues of adult Mongolia cattle in winter and summer were carried out by Ion Proton™ Sequencer, respectively. And then data processing, reference genome alignment, gene differential expression analysis, GO and KEGG enrichment analysis and candidate gene screening were applied on the transcriptome data; Additionally, the reliability of the transcriptome data was detected by Real-time PCR. The results showed that 86 954 060 and 69 837 009 reads were obtained from winter and summer groups, respectively; The percentage of the uniquely mapped reads was 73.21% in winter group, and 75.55% in summer group. There were 182 DEGs between winter and summer groups, compared to summer group, 117 were up-regulated and 65 were down-regulated in winter group; Real-time PCR analysis showed that the transcriptome sequencing results were reliable; The results of GO analysis showed there were 21, 39 and 224 terms enriched in the cellular components,

收稿日期: 2017-05-09

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD18B00); 内蒙古自治区科技计划项目(20131403)

作者简介: 齐 昱(1987-), 女, 内蒙古通辽人, 博士生, 主要从事动物细胞发育与调控研究, E-mail: wsqiyu@aliyun.com

* 通信作者: 周欢敏, 教授, 主要从事发育生物学研究, E-mail: huanminzhou@263.net

molecular functions and biological processes, respectively; KEGG analysis showed that the DEGs were significantly enriched in lipid metabolism, blood coagulation, tyrosine metabolism, steroid hormone biosynthesis and retinol metabolism related pathways; 8 candidate genes were screened out. In summary, lipid metabolism, blood coagulation and melanin synthesis related pathways and genes as well as hair synthesis related genes may play an important role in cold resistance of Mongolian cattle.

Key words: Mongolia cattle; skin tissue; transcriptome; signal pathway; differentially expressed genes

蒙古牛属于哺乳纲(*Mammalia*),偶蹄目(*Artiodactyla*),牛科(*Bovidae*),牛属(*Bos taurus*),原产于蒙古高原地区,目前广泛分布于蒙古国、俄罗斯,中国内蒙古、东北、华北北部和西北地区。蒙古高原地处内陆,气候具有强烈的大陆性特征,局部地区冬季最低温度可达 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下甚至 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在蒙古高原极为寒冷的冬季,蒙古牛能够正常地生存、生产,表现出较高的生产性能和遗传稳定性。在长期自然选择和人工选择的条件下,蒙古牛逐渐形成了抗寒、抗旱、抗病、耐粗饲等特点,这些特点及优势使其成为蒙古高原的优势畜种之一。

目前对于哺乳动物抗寒机制的研究主要集中于小型哺乳动物和人类当中,他们的冷适应性产热主要依赖于褐色脂肪(BAT)、米色脂肪(Brite)这两种产热性脂肪^[1-4],BAT和Brite中表达解偶联蛋白1(UCP1),该蛋白位于细胞线粒体内膜上,可以将线粒体内膜上的呼吸链与氧化磷酸化解耦连,使呼吸链传递质子形成的膜内外质子动势不再用于ATP的产生,而被用于产生热量^[5]。但大型哺乳动物只在初生时存在产热性脂肪,随着年龄增长产热性脂肪逐渐退化,成体大型哺乳动物尚无存在BAT的报道^[6-7],对成体大型哺乳动物抗寒机制的研究尚存在较大空白。

皮肤是哺乳动物最大的器官也是与外界接触最直接的器官,它的主要功能是保护身体、排汗、感受冷热和压力。机体通过皮肤上的温度感受器来感知外周环境温度的改变,皮肤对温度的感知可以为机体维持体温提供调节性输入信号^[8-9]。而且哺乳动物皮肤上分布有大量的毛囊及汗腺^[10],它们在维持和调节哺乳动物体温方面发挥重要作用。转录组广义上指在特定状态下组织或细胞内转录出来的所有RNA的集合,包括mRNA和非编码RNA如rRNA、ncRNA、sRNA、tRNA等,狭义上的转录组专指所有mRNA的集合^[11]。目前针对动物皮肤组

织的转录组学研究已广泛而深入地展开,研究对象遍及鱼类^[12]、两栖类^[13]、鸟类^[14]和哺乳类^[15-17]中的多个群体和物种。

虽然蒙古牛的性状如此独特和优良,但截止目前对其遗传学及抗寒机制的研究几乎为空白。本研究对冬夏两季蒙古牛皮肤组织进行高通量转录组测序和生物信息学分析,为进一步了解蒙古牛的抗寒机制和为分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 试验动物与组织样品采集 以冬夏两季蒙古牛为研究对象,分别选取冬季(12月份)10岁公牛、8岁母牛和3岁公牛各1头以及夏季(8月份)4岁公牛、6岁公牛和9岁母牛各1头,分别进行编号。以上试验动物均无血缘关系,由蒙古国农业部提供,冬季组采集温度为 $-35\sim-42\text{ }^{\circ}\text{C}$,夏季组采集温度为 $26\sim30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。分别将各试验动物的背部皮肤上的毛剃掉一部分,将动物宰杀后迅速切取各试验动物剃毛部位的皮肤,并用液氮速冻后, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.1.2 仪器与试剂 Ion ProtonTM Sequencer, Ion OneTouch 2 Instrument, Ion OneTouch ES, LightCycler480 实时定量PCR仪等仪器均由本实验室(内蒙古农业大学生物制造重点实验室)提供。动物组织RNA提取试剂盒 Rneasy MiNi Kit 购于QIAGEN公司;总RNA质控试剂盒及cDNA文库质控试剂盒 Agilent RNA nano Assay, Agilent RNA6000 Pico Assay 和 Agilent High Sensitivity DNA Kit 等均购自Agilent公司;mRNA纯化所需试剂盒 Dynabeads[®] mRNA DIRECTTM Micro Kit, cDNA文库构建所需试剂盒 Ion Total RNA-Seq Kit v2.0、Ion PITM Controls Kit V2、Dynabeads[®] MyOneTM Streptavidin C1 Magnetic,模板制备所需

试剂盒 Ion PI™ Template OT2 200 Kit V2 和测序所需试剂盒 Ion PI™ Sequencing 200 Kit V2、Ion PI Chip Kit v2、Ion Xpress RNA-Seq Barcode、ERCC ExFold RNA Spike-In Mixes 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司;实时定量 PCR 所需试剂 Prime-Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取、RNA 完整性检测与 mRNA 纯化 将各试验动物的皮肤组织在液氮中分别进行研磨后,按照 Rneasy Mini Kit 说明书所述的方法分别提取总 RNA。用 Agilent 2100 生物分析仪检测各组总 RNA 的浓度和完整性,总 RNA 含量 $>10 \mu\text{g}$,完整性(RIN 值) >7.0 为合格,用于下一步试验。用 Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit 对 mRNA 进行纯化,步骤详见说明书。

1.2.2 文库构建与模板制备 分别对 3 组冬季蒙古牛皮肤组织总 RNA 和 3 组夏季蒙古牛皮肤组织总 RNA 进行混合建库,冬季组编号 W-skin,夏季组编号 S-skin。文库构建步骤详见 Ion Total RNA-Seq Kit v2 说明书,模板制备步骤详见 Ion PI™ Template OT2 200 Kit v2 说明书。

1.2.3 测序与数据处理 对制备好的模板进行测序,步骤详见 Ion PI™ Sequencing 200 Kit v2 说明书。使用 Perl 脚本去掉原始数据的测序接头,短序列($<30 \text{ bp}$)和低质量 reads。

1.2.4 与参考基因组的比对 用 STAR^[18] (https://github.com/alexdobin/STAR/archive/STAR_2.5.2a.tar.gz) 和 Bowtie2^[19] (<https://sourceforge.net/projects/bowtie-bio/files/>) 将处理后的高质量 reads 与参考基因组进行比对,获得各样品 reads 的比对效率和 reads 在基因组上的位置信息。参考基因组来源于 Ensembl,序列为 *Bos taurus* 的 UMD 3.1 版本,基因组注释版本为 Version 81 (http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index/)。用 RseQC^[20] 软件包统计 reads 在基因组不同特征中的分布情况。

1.2.5 基因定量及差异表达分析 采用 edgeR^[21] 软件包对差异表达基因进行检测,并根据 $|\log_2(\text{FC})| \geq 2$, $\text{FDR} \leq 0.05$ 的过滤标准进行筛选。

1.2.6 差异表达基因的 GO 分类与富集分析

用 DAVID 在线软件对冬夏两季蒙古牛皮肤组织差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs) 进行 GO 注释,按照细胞组分 (Cellular component)、分子功能 (Molecular Function)、生物学过程 (Biological process) 对其进行分类。

1.2.7 差异表达基因的 KEGG 富集分析 用 DAVID 在线软件对冬夏两季蒙古牛皮肤组织 DEGs 作 KEGG 代谢通路分析。

1.2.8 测序结果可靠性分析 在冬夏两季蒙古牛皮肤组织 DEGs 中随机地选择 8 个,其中 4 个在 W-skin 中上调,4 个在 W-skin 中下调。以 βactin (*ACTB*) 为内参基因进行实时定量 PCR (Real-time PCR)。在罗氏网站 (<https://lifescience.roche.com>) 上设计上述 8 个 DEGs 和 βactin 的特异性引物并交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应体系见 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书,反应条件: 95°C 5 s; 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 40 个循环; 60°C 30 s, 95°C 15 s; 40°C 10 s。引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对表达量。

2 结果

2.1 冬夏两季蒙古牛皮肤组织总 RNA 质量检测

Agilent RNA nano Assay 和 Agilent 2100 生物分析仪的质控分析结果显示,冬夏两季蒙古牛共计 6 个皮肤组织样本的总 RNA 总量均 $\geq 10 \mu\text{g}$,完整性(RIN 值)均 ≥ 7 。

2.2 冬夏两季蒙古牛皮肤组织 cDNA 文库质量检测

冬夏两季蒙古牛皮肤组织 cDNA 文库质控结果显示,W-skin cDNA 文库的片段大小为 $168\sim 310 \text{ bp}$,S-skin cDNA 文库的片段大小为 $168\sim 298 \text{ bp}$ 。两文库片段大小均为 $150\sim 450 \text{ bp}$,长度合格,文库构建成功。

2.3 冬夏两季蒙古牛皮肤组织 cDNA 测序质量评估

对冬夏两季蒙古牛的 cDNA 文库进行测序,共测得 2 张芯片,2 张芯片的 ISP loading 率均 $>75\%$,Key Signal 均 >50 ,测序平均长度均 $>80 \text{ bp}$,测序结果合格。

2.4 冬夏两季蒙古牛皮肤组织碱基数和基因组比对

2.4.1 碱基数数据统计 W-skin 测得 86 954 060 条 reads,总碱基数为 8 054 832 969 bp,平均读长为 91 bp,平均 GC 含量为 47.66%; S-skin 测得 69 837 009 条 reads,总碱基数为 6 513 545 916 bp,平均读长为 93 bp,平均 GC 含量为 46.91%(表 2)。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers of Real-time quantitative PCR

基因名称 Gene name	基因序列号 Gene ID	在 W-skin 中上下调类型 Up or down-regulation in W-skin	引物(5'-3') Primer
<i>ACTB</i>	ENSBTAG00000026199	—	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACGA R: GGAAGGAAGGCTGGAAGAGA
<i>FGA</i>	ENSBTAG00000001638	上调 Up-regulation	F: CCTATCCACGGCAGAGATGT R: ATTGCACCCACCAAACCTCAG
<i>FGB</i>	ENSBTAG000000022120	上调 Up-regulation	F: TGCTTTTCCAGATGTGAGGA R: TTCCACCTTTCAATATATAACTCTGC
<i>PTX3</i>	ENSBTAG00000009012	上调 Up-regulation	F: GCATCAGCGACCAGTCTGT R: CCAGCTGTACCTCAGCTATCG
<i>HP</i>	ENSBTAG00000006354	上调 Up-regulation	F: GGTCACCTTCACGTACACACC R: GGATCCTGAGCTTTGACAAGA
<i>TDO2</i>	ENSBTAG00000011062	下调 Down-regulation	F: AAGGCTGTCATGGTCTCCAG R: ACCGAGTGGTGGTGATCCT
<i>TYRP1</i>	ENSBTAG00000020985	下调 Down-regulation	F: GTTCTCAAACCTGCGGTGTGTT R: GCCACAAGGAGGTCAGAAGA
<i>OGN</i>	ENSBTAG00000011824	下调 Down-regulation	F: AGGAATCAAAGCAAATACATTCAA R: CCAAAGCATTGTGATCCAAGTA
<i>S100A9</i>	ENSBTAG00000006505	下调 Down-regulation	F: GTGTTGTGCATCTCCTCGTG R: CGAGGAGTTCATTATGCTGGT

表 2 样本数据产出统计

Table 2 The statistical of each sample output data

样本 Sample	读长/bp Reads	碱基/bp Bases	平均质量 Mean quality	平均长度/bp Mean length	GC 含量/% GC content
W-skin	86 954 060	8 054 832 969	22	91	47.66
S-skin	69 837 009	6 513 545 916	22	93	46.91

2.4.2 Reads 数据分析 将原始 reads 进行分类,分别统计 W-skin 和 S-skin 中短 reads、含接头序列 reads、含 poly(A)reads、含 poly(T)reads 以及高质量 reads 等的数目。经 Perl 脚本过滤处理后

W-skin 共得到高质量(HQ)reads 80 893 856 条,占总 reads 数的 93.03%;夏季蒙古牛皮肤组织 S-skin 共得到 HQ reads 64 728 203 条,占总 reads 数的 92.68%,各类别所占比例与具体 reads 数目详见表 3。

表 3 原始 reads 分类

Table 3 Classification of raw reads

统计项目 Items	冬季组(占总 reads 的比例/%)W-skin	夏季组(占总 reads 的比例/%)S-skin
总读长数目 No. of total reads	86 954 060 (100.00)	69 837 009 (100.00)
短读长数目 No. of short reads	5 533 159 (6.36)	4 623 049 (6.62)
含接头序列读长数目 No. of adapter reads	3 603 (0.00)	2 766 (0.00)
含 Poly(A)读长数目 No. of poly(A)	383 561 (0.44)	363 714 (0.52)
含 Poly(T)读长数目 No. of Poly(T)	139 881 (0.16)	119 277 (0.17)
高质量读长数目 No. of HQ reads	80 893 856 (93.03)	64 728 203 (92.68)

2.4.3 与基因组比对结果 比对结果显示,W-skin 与参考基因组的比对率为 97.96%,唯一比对率为 73.21%;S-skin 与参考基因组的比对率为

99.19%,唯一比对率为 75.55%。各类别所占比例与具体 reads 数目详见表 4。

表 4 基因组比对统计

Table 4 The statistical list of mapping to genome

统计项目 Items		冬季组 W-skin	夏季组 S-skin	
输入读长数 No. of input reads		80 893 856	64 728 203	
平均输入读长长度/bp Average input read length		97	97	
唯一比对读长数 Uniquely mapped reads number		59 223 107	48 908 075	
唯一比对读长比率/% Uniquely mapped reads		73.21	75.55	
平均比对长度/bp Average mapped length		89.26	90.81	
总剪接事件数 No. of splices: Total		18 249 983	14 863 361	
注释的剪接数 No. of splices: Annotated (sjdb)		18 057 174	14 732 177	
GT/AG 剪接数 No. of splices: GT/AG		18 064 983	14 714 595	
唯一比对读长 Uniquely mapped reads	GC/AG 剪接数 No. of splices: GC/AG	176 919	142 997	
	AT/AC 剪接数 No. of splices: AT/AC	8 081	5 769	
	非经典剪接数 No. of splices: Non-canonical	0	0	
	每碱基不匹配率/% Mismatch rate per base	0.74	0.71	
	每碱基删除率/% Deletion rate per base	0.32	0.29	
	平均删除长度/bp Deletion average length	1.14	1.14	
	每碱基插入率/% Insertion rate per base	0.29	0.31	
	平均插入长度/bp Insertion average length	1.13	1.14	
	多位点比对读长数 No. of reads mapped to multiple loci		11 019 529	8 189 958
	多重比对读长 Muti-mapping reads	多位点比对读长比率/% Percent of reads mapped to multiple loci	13.62	12.65
比对到太多位点的读长数 No. of reads mapped to too many loci		8 998 672	7 105 593	
比对到太多位点的读长比率/% Percent of reads mapped to too many loci		11.12	10.97	
未比对的读长 未比对读长数 No. of reads unmapped		1 652 548	524 577	
Unmapped reads	未比对读长比率/% Percent of reads unmapped	2.04	0.81	

2.5 基因定量及差异表达分析

W-skin 和 S-skin 之间的 DEGs 共有 182 个。与 S-skin 相比,在 W-skin 中上调的基因共有 117 个,下调的基因共有 65 个。W-skin 和 S-skin 基因差异性表达的火山图见图 1,图中 X 轴为 $\log_2(FC)$,FC 表示基因表达量差异倍数 (Fold change)。Y 轴为 $-\lg(FDR)$,即错误发现率 FDR (False discovery rate)的负对数值。对于 X 轴来说,偏离 0 越远说明表达量的倍数差越大;对于 Y 轴来说数值越大说明假阳性的概率越小,结果越可靠。火山图中红点为差异表达基因,黑点为表达量无差异的基因。

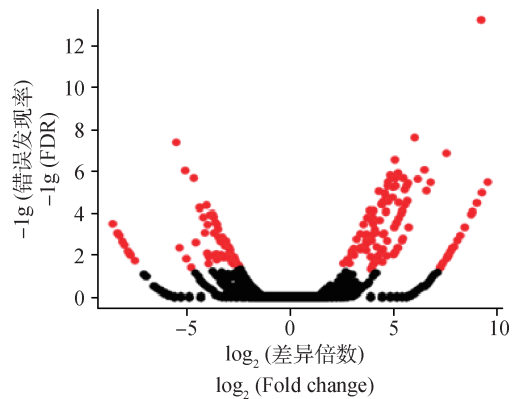


图 1 冬夏两季蒙古牛皮肤组织差异表达分析火山图

Fig. 1 Volcano plot of differential expression analysis between W-skin and S-skin

2.6 差异表达基因的 GO 分类与富集分析

GO 分类分析结果显示,“细胞组分”共注释到 75 个基因,“分子功能”共注释到 63 个基因而“生物学过程”共注释到 65 个基因。详见图 2。

通过超几何分析法分别计算上述 3 类 GO 分类中各功能类别的 P 值对差异表达基因进行 GO 富集分析(表 5),富集条件为 P 值 < 0.01 。 P 值越小说明差异表达基因在该条目中富集越显著。经过 GO 富集分析,细胞组分共富集到 21 个条目,分子功能共富集到 39 个条目,生物学过程共富集到 224 个条目。表 5 中列出各类别中富集最显著的 10 个条目,细胞组分中有 6 个与脂类及脂蛋白相关(GO: 0072562, GO: 0034364, GO: 0032994, GO: 0034358, GO:0034361, GO:0034385),分子功能中有 8 个与酶活性相关(GO:0004866, GO:0061135, GO: 0004857, GO: 0030414, GO: 0004867, GO: 0005102, GO:0061134, GO:0030234),与之相对应,生物学过程中有 6 个与酶反应相关(GO: 0051346, GO: 0010951, GO: 0043086, GO:

0045861, GO:0051336, GO:0010466)。

2.7 差异表达基因的 KEGG 富集分析

通过超几何分析法计算 KEGG 各功能类别的 P 值来对 DEGs 进行 KEGG 富集分析,富集条件为 P 值 < 0.05 。 P 值越小说明差异表达基因在该类别中富集越显著。经 KEGG 分析后共富集到 23 个信号通路,其中 2 个与凝血相关(bta04610, bta04611),2 个与脂类运输和代谢相关(bta00591, bta03320),2 个与细胞色素 P450 相关(bta00980 和 bta00982)。除此之外,视黄醇代谢(bta00830),类固醇激素合成(bta00140)和与黑色素合成相关的酪氨酸代谢(bta00350)等代谢通路也有明显富集(表 6)。

2.8 测序结果可靠性分析

对 8 个 DEGs 进行 Real-time PCR 验证,结果显示虽然个别基因的 Real-time PCR 结果与 RNA-Seq 结果相比差异倍数存在偏差,但两者之间的上下调表达趋势一致。因此,RNA-Seq 结果可靠,Real-time PCR 与 RNA-Seq 比较结果见图 3。

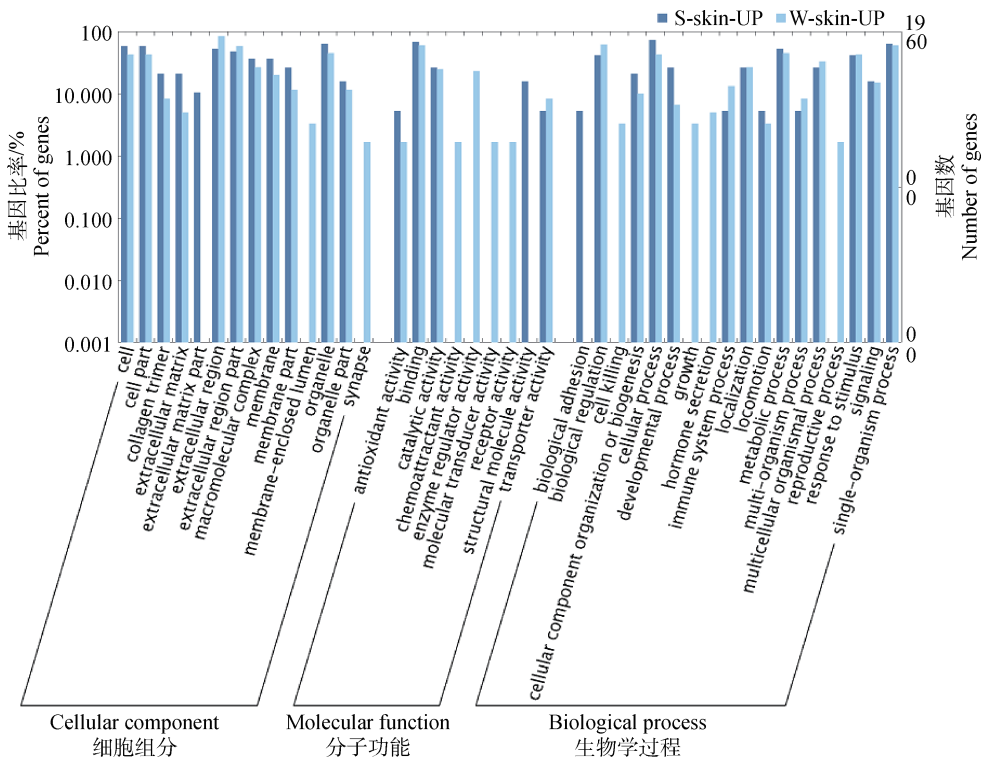


图 2 冬季蒙古牛与夏季蒙古牛皮肤组织的 DEGs 的 GO 分类

Fig. 2 GO classification of DEGs between W-skin and S-skin

表 5 冬夏两季蒙古牛皮肤组织差异表达基因 GO 富集分析最显著的前 10 条目

Table 5 The top10 GO enrichment terms of DEGs between W-skin and S-skin

项目 Item	GO 编号 GO ID	基因本体术语 GO term	P 值 P value	DEGs 数目 No. of DEGs
细胞组分 Cellular component	GO:0005576	胞外区	1.81E-25	61
	GO:0005615	胞外空间	3.08E-22	35
	GO:0044421	胞外区部分	5.84E-14	44
	GO:0005581	胶原三聚体	1.32E-10	9
	GO:0072562	血液微粒	1.82E-10	9
	GO:0034364	高密度脂蛋白颗粒	1.28E-08	6
	GO:0032994	脂蛋白复合物	7.59E-08	6
	GO:0034358	血浆脂蛋白颗粒	7.59E-08	6
	GO:0034361	极低密度脂蛋白颗粒	8.90E-08	5
GO:0034385	富含甘油三酯脂蛋白颗粒	8.90E-08	5	
分子功能 Molecular function	GO:0004866	内肽酶抑制剂活性	1.67E-09	10
	GO:0061135	内肽酶调节剂活性	1.95E-09	10
	GO:0004857	酶抑制剂活性	2.25E-09	12
	GO:0030414	肽酶抑制剂活性	2.65E-09	10
	GO:0004867	丝氨酸内肽酶抑制剂的活性	3.77E-09	8
	GO:0005102	受体结合	4.60E-09	19
	GO:0061134	酶调节活性	7.10E-09	10
	GO:0030234	酶调节活性	1.42E-07	14
GO:0005179	激素活性	1.09E-06	8	
GO:0098772	分子功能调节因子	2.55E-06	14	
生物学过程 Biological process	GO:0051346	水解酶活性负调控	2.41E-10	13
	GO:0016485	蛋白质加工	8.89E-10	14
	GO:0006952	防御反应	1.22E-09	19
	GO:0010955	蛋白质加工负调控	2.38E-09	12
	GO:0070613	蛋白质加工过程调控	4.47E-09	12
	GO:0010951	内肽酶活性的负调控	2.09E-08	10
	GO:0043086	催化活性负调控	2.15E-08	14
	GO:0045861	蛋白水解的负调节	2.23E-08	11
	GO:0051336	水解酶活性的调节	2.51E-08	16
GO:0010466	肽酶活性的负调控	2.99E-08	10	

2.9 候选基因筛选

根据基因的差异表达分析结果、GO 和 KEGG 富集分析结果,共筛选出 8 个与蒙古牛抗寒相关的候选基因。与脂质转运和代谢相关的基因: *FABP1* 和 *ADIPOQ*; 与凝血相关的基因 *FGA*、*FGB* 和

FGG; 与黑色素合成限速酶基因 *TYRP1* 和 *DCT*; 与毛发生长相关基因 *LOC101906373* (Keratin-associated protein 8-1)。以上基因的差异表达情况见表 7。

表 6 冬夏两季蒙古牛皮肤组织差异表达基因 KEGG 富集分析结果

Table 6 KEGG enrichment analysis results of DEG between W-skin and S-skin

通路编号 Pathway ID	通路描述 Description	P 值 P value	DEGs 数目 No. of DEGs	DEGs 名称 Names of DEGs
bta04610	补体和凝血级联 Complement and coagulation cascades	2.53E-13	13	<i>FGA, PLG, FGB, F9, SERPIND1, MBL2, KNG1, C8A, C9, FGG, F2, F13B, C5</i>
bta05204	化学致癌 Chemical carcinogenesis	6.11E-11	11	<i>LOC540707, GSTA3, LOC511498, CYP2E1, CYP3A5, ADH4, LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, LOC615303</i>
bta00983	药物代谢-其他酶 Drug metabolism-other enzymes	1.60E-09	8	<i>CES1, DPYS, UPP2, LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, LOC615303</i>
bta00980	细胞色素 P450 的异物代谢 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	4.97E-09	9	<i>LOC540707, GSTA3, CYP2E1, ADH4, LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, LOC615303</i>
bta00830	视黄醇代谢 Retinol metabolism	7.37E-08	8	<i>LOC511498, CYP3A5, ADH4, LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, LOC615303</i>
bta00982	药物代谢-细胞色素 P450 P450 Drug metabolism-cytochrome P450	8.48E-08	8	<i>GSTA3, CYP2E1, ADH4, LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, LOC615303</i>
bta00140	类固醇激素的合成 Steroid hormone biosynthesis	9.74E-08	8	<i>LOC511498, CYP2E1, CYP3A5, LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, LOC615303</i>
bta00500	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	3.33E-07	7	<i>LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, G6PC, GYS2, LOC615303</i>
bta00053	抗坏血酸和醛酸代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	1.53E-06	5	<i>LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, LOC615303</i>
bta03320	PPAR 信号通路 PPAR signaling pathway	5.29E-06	7	<i>ADIPOQ, APOA2, APOC3, FABP1, APOA5, PCK1, MMP1</i>
bta00040	戊糖和葡萄糖醛酸相互作用 Pentose and glucuronate interconversions	8.40E-06	5	<i>LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, LOC615303</i>
bta01100	代谢通路 Metabolic pathways	1.50E-05	28	<i>TYRP1, TDO2, ALOX15, AOC1, ATP6V0D2, DCT, FOLH1B, PON1, CES1, LOC511498, CPS1, CYP2E1, OTC, DPYS, PAH, ACSM2B, UPP2, CYP3A5, HGD, ADH4, LOC100138004, BHMT, PCK1, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, G6PC, LOC615303</i>

(续表 6 Continued)

通路编号 Pathway ID	通路描述 Description	P 值 P value	DEGs 数目 No. of DEGs	DEGs 名称 Names of DEGs
bta00860	卟啉与叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	2.52E-05	5	LOC100138004, UGT2A3, LOC530553, LOC100140261, LOC615303
bta05150	金黄色葡萄球菌感染 Staphylococcus aureus infection	3.13E-05	6	BOLA-DQA5, BOLA-DQB, PLG, MBL2, FGG, C5
bta00591	亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	0.000 465	4	ALOX15, LOC511498, CYP2E1, CYP3A5
bta00350	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	0.000 629	4	TYRP1, DCT, HGD, ADH4
bta04974	蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption	0.001 504	5	COL3A1, COL1A1, COL6A6, COL1A2, PRSS2
bta04611	血小板活化 Platelet activation	0.001 582	6	COL3A1, COL1A1, COL1A2, FGA, FGB, FGG
bta04512	ECM 受体相互作用 ECM-receptor interaction	0.001 668	5	COL3A1, COL1A1, COL6A6, COL1A2, VTN
bta04151	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway	0.002 351	10	COL3A1, COL1A1, COL6A6, COL1A2, GH1, VTN, PRL, PCK1, G6PC, GYS2
bta04922	胰高血糖素信号通路 Glucagon signaling pathway	0.002 575	5	GCG, SLC2A2, PCK1, G6PC, GYS2
bta05020	朊病毒病 Prion diseases	0.003 807	3	C8A, C9, C5
bta05146	阿米巴病 Amoebiasis	0.006 911	5	COL3A1, COL1A1, COL1A2, C8A, C9

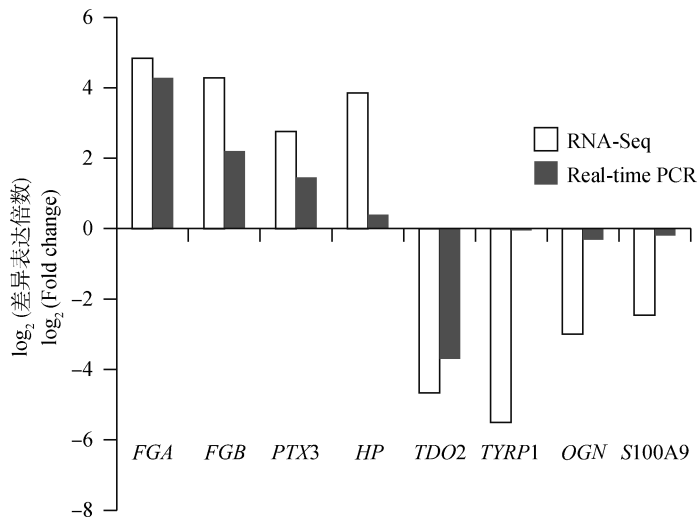


图 3 RNA-Seq 与 Real-time PCR 结果比较

Fig. 3 Comparison of the RNA-Seq and real-time PCR results

表 7 候选基因的差异表达

Table 7 Differential expression of candidate genes

基因名称 Gene name	在 W-skin 中上下调类型 Up or down-regulation in W-skin	\log_2 (差异倍数) \log_2 (FC)
<i>FABP1</i>	上调 Up-regulation	8.75
<i>ADIPOQ</i>	下调 Down-regulation	-3.28
<i>FGA</i>	上调 Up-regulation	4.84
<i>FGB</i>	上调 Up-regulation	4.29
<i>FGG</i>	上调 Up-regulation	3.72
<i>TYRP1</i>	下调 Down-regulation	-5.51
<i>DCT</i>	下调 Down-regulation	-3.49
LOC101906373	上调 Up-regulation	2.57

3 讨论

3.1 研究对象及组织的选择

皮肤是人和哺乳动物最大的器官,同时它也是重要的感觉器官,感知外界的温度、湿度和机械损伤等,所以皮肤与动物对环境和温度的适应能力息息相关。本研究以冬夏两季蒙古牛的皮肤组织为对象,研究皮肤组织在蒙古牛适应寒冷过程中发挥的作用及其分子机制。本研究中选取的冬夏蒙古牛两季共计 6 头,他们相互之间没有亲缘关系,以求屏蔽亲缘关系引起的基因差异表达;冬季组以及夏季组对青年期、壮年期和老年期的蒙古牛都有选取,以求屏蔽由年龄引起的基因差异表达;冬季组以及夏季组对公牛和母牛都有选取,以求屏蔽由性别引起的基因差异表达。

3.2 与参考基因组比对

冬季组和夏季组样本与参考基因组的总比对率高(分别为 97.96%和 99.19%),唯一比对率不高,但也在正常值内(分别为 73.21%和 75.55%),而多位点比对率略高(分别为 13.62%和 12.65%)。造成这种结果的原因可能有 3 种:(1)参考基因组完整度低。蒙古牛为非模式生物,其基因组完整度比模式生物的完整度要低;(2)文库中短序列略多。某些短序列由于读长较短的关系可能与多个位点都存在映射关系(3)种:文库中长序列略多。由于真核生物基因中存在内含子,mRNA 在基因组上的分布是不连续的,且常存在可变剪接等情况,使得某些 reads 与参考基因组上的多个位点都存在映射关系。由于

后续试验中只使用唯一比对的 reads,为了避免唯一比对率略低造成的对参考基因组覆盖不全的问题,本研究采取扩大测序量的方法,提高了长度适中的、唯一比对的 reads 总量来扩大数据对参考基因组的覆盖,该问题得以解决,不影响后续分析。

3.3 GO 富集

GO 数据库^[22]适用于各个物种,能对基因、蛋白质进行限定和描述。本研究 DEGs GO 富集分析中,细胞组分、分子功能和生物学过程类别中富集了大量的与脂类及脂蛋白相关,与酶活性和酶反应相关的类别,说明冬夏两季蒙古牛皮肤组织在脂类合成和运输以及在酶活性调节方面可能存在明显差异。

3.4 KEGG 富集

KEGG Pathway 分析^[23]可以用于获得 DEGs 所涉及到的信号通路,通过基因代谢通路的分析可以进一步了解这些基因的生物学功能。本研究的 DEGs KEGG 富集分析中,凝血相关通路、脂类运输和代谢相关通路、视黄醇代谢通路和与黑色素合成相关的酪氨酸代谢通路等被显著富集。

3.4.1 凝血相关通路 哺乳动物抗寒的主要策略除了增加产热外还有一种是减少体温损耗,而减少体温损耗通常是以减少外周组织血液循环量实现的^[24-26]。对北极熊和雅库特马的基因组学研究发现,血液凝集相关基因在它们对所处地区寒冷环境适应性进化的过程中被正向选择^[27-28]。因此冬季蒙古牛皮肤组织中的血液凝集相关基因上调表达可能在减少皮下血管血液循环,减少体温散失方面发挥重要作用。

3.4.2 脂类运输和代谢相关通路 哺乳动物皮肤具有皮脂腺,皮脂腺可进行脂肪酸从头合成,其分泌的脂质具有保护表皮、毛发,抗微生物和抗氧化的作用^[29]。因此,本研究与夏季组相比冬季组蒙古牛皮肤组织中与脂类代谢相关的通路及基因明显上调表达,脂类代谢活跃,可能有利于对皮肤组织的保护。

3.4.3 黑色素合成相关的酪氨酸代谢通路 以减少外周组织血液流量来对抗寒冷的代价之一是增强了体内氧化应激,使 ROS(活性氧簇)水平升高^[30],高浓度的 ROS 对组织和细胞具有破坏作用。 H_2O_2 是 ROS 组成成分之一,除了超氧自由基的歧化外, H_2O_2 还可以通过黑色素合成过程中的中间体聚合反应作为副产物被产出^[31]。因此,冬季蒙古牛皮肤组织中黑色素合成相关的酪氨酸代谢通路以及该通路中的关键限速酶 *TYRP1* 和 *DCT* 的下调表达,可能有助于减少皮肤组织中 H_2O_2 的水平,减少氧化应激对机体的损伤。

3.5 候选基因

FABP1 和 *ADIPOQ* 在调节脂质代谢方面发挥重要作用。*FABP1* 属于脂肪酸结合蛋白(*FABPs*)家族成员,其 mRNA 在哺乳动物的肝、小肠、肾和肺等组织广泛分布^[32-34]。*FABP1* 作用是结合脂肪酸及其衍生物,调节机体脂质平衡^[35-36]。脂联素(*Adiponectin*)又称 *ADIPOQ*,它是一种激素蛋白,可以增强脂肪酸氧化和葡萄糖的摄取^[37]。

纤维蛋白原(*Fibrinogen*),有称凝血因子 I,为对称的二聚体糖蛋白,每个蛋白单体由 α_A 、 β 、 γ 3 条多肽链构成,这 3 条多肽链分别由 *FGA*、*FGB*、*FGG* 3 个基因编码^[38]。纤维蛋白原可以促进血小板的聚集,增加血液黏滞性和外周阻力,使血流速度减慢。本研究与 S-skin 相比 W-skin 中的 *FGA*、*FGB*、*FGG* 都上调表达,说明冬季蒙古牛皮肤组织中的纤维蛋白酶原表达量比夏季组高,蒙古牛可能通过减少皮下血管血液流速的方式降低体温消散。

LOC101906373(*Keratin-associated protein 8-1*)是角蛋白相关蛋白的一种。角蛋白(*KRT*)和角蛋白相关蛋白(*KAP*)是毛发合成所需的主要蛋白,*KRT* 有酸型和基础型两类^[39-40],*KAP* 根据其氨基酸成分可分为 3 类,分别为高硫型(HS)、超高硫型(UHS)和高甘氨酸型(HGT)^[41],LOC101906373 属于 HGT。在毛发生成过程中 HGT *KAP* 的表达晚于 *KRT*^[42-44],以决定毛发的弯曲程度以及机械强

度^[45-46]。与 S-skin 相比,W-skin 中 LOC101906373 上调表达,说明蒙古牛毛发合成在冬季明显增加以助其越冬,并且 LOC101906373 可能在该过程中发挥重要作用。

4 结 论

本研究利用 Ion Proton™ Sequencer 对冬季蒙古牛和夏季蒙古牛的皮肤组织进行转录组测序,经过分析后得出初步结论:凝血相关通路、脂类运输和代谢相关通路及与黑色素合成相关的酪氨酸可能与蒙古牛抗寒能力有关;候选基因 *FABP1*、*ADIPOQ*、*FGA*、*FGB*、*FGG*、*TYRP1*、*DCT*、LOC101906373 可能在蒙古牛抗寒过程中发挥重要作用。

参考文献(References):

- [1] CANNON B, NEDERGAARD J. Brown adipose tissue: function and physiological significance [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(1): 277-359.
- [2] HIMMS-HAGEN J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity [J]. *Prog Lipid Res*, 1989, 28(2): 67-115.
- [3] HARMS M, SEALE P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1252-1263.
- [4] WU J, COHEN P, SPIEGELMAN B M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(3): 234-250.
- [5] SIDOSSIS L, KAJIMURA S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(2): 478-486.
- [6] ZURLO F, LARSON K, BOGARDUS C, et al. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure [J]. *J Clin Invest*, 1990, 86(5): 1423-1427.
- [7] ZURLO F, NEMETH P M, CHOKSI R M, et al. Whole-body energy metabolism and skeletal muscle biochemical characteristics [J]. *Metabolism*, 1994, 43(4): 481-486.
- [8] LUMPKIN E A, CATERINA M J. Mechanisms of sensory transduction in the skin [J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 858-865.
- [9] SCHEPERS R J, RINGKAMP M. Thermoreceptors and thermosensitive afferents [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009, 33(3): 205-212.

- [10] 李克平, 陈俊菲, 王石平, 等. 水牛皮皮肤结构的研究[J]. 华中农学院学报, 1983, 2(2): 35-43.
LI K P, CHEN J F, WANG S P, et al. A skin structural study in water buffalo[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1983, 2(2): 35-43. (in Chinese)
- [11] COSTA V, ANGELINI C, DE FEIS I, et al. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-seq[J]. *J Biomed College*, 2010, 2010: 853916.
- [12] JIANG Y L, ZHANG S H, XU J, et al. Comparative transcriptome analysis reveals the genetic basis of skin color variation in common carp[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108200.
- [13] CHEN T B, FARRAGHER S, BJORSON A J, et al. Granular gland transcriptomes in stimulated amphibian skin secretions[J]. *Biochem J*, 2003, 371(Pt 1): 125-130.
- [14] ZHANG J Q, LIU F Z, CAO J T, et al. Skin transcriptome profiles associated with skin color in chickens[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0127301.
- [15] PABUWAL V, BOSWELL M, PASQUALI A, et al. Transcriptomic analysis of cultured whale skin cells exposed to hexavalent chromium[Cr(VI)][J]. *Aquat Toxicol*, 2013, 134-135: 74-81.
- [16] RIZZO J M, ROMANO R A, BARD J, et al. RNA-seq studies reveal new insights into p63 and the transcriptomic landscape of the mouse skin[J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(2): 629-632.
- [17] WANG L L, ZHANG Y J, ZHAO M, et al. SNP discovery from transcriptome of Cashmere goat skin[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2015, 28(9): 1235-1243.
- [18] DOBIN A, DAVIS C A, SCHLESINGER F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(1): 15-21.
- [19] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nat Methods*, 2012, 9(4): 357-359.
- [20] WANG L G, WANG S Q, LI W. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(16): 2184-2185.
- [21] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [22] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25-29.
- [23] OGATA H, GOTO S, SATO K, et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 29-34.
- [24] VANHOUTTE P M. Physical factors of regulation [M]. New York: Wiley, 2011.
- [25] FLAVAHAN N A. The role of vascular alpha-2-adrenoceptors as cutaneous thermosensors[J]. *Physiology*, 1991, 6(6): 251-255.
- [26] THOMPSON G E. Physiological effects of cold exposure[J]. *Int Rev Physiol*, 1997, 15: 29-69.
- [27] LIU S P, LORENZEN E D, FUMAGALLI M, et al. Population genomics reveal recent speciation and rapid evolutionary adaptation in polar bears[J]. *Cell*, 2014, 157(4): 785-794.
- [28] LIBRADO P, DER SARKISSIAN C, ERMINI L, et al. Tracking the origins of Yakutian horses and the genetic basis for their fast adaptation to subarctic environments[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(50): E6889-E6897.
- [29] UCHIYAMA N, YAMAMOTO A, KAMEDA K, et al. The activity of fatty acid synthase of epidermal keratinocytes is regulated in the lower stratum spinosum and the stratum basale by local inflammation rather than by circulating hormones[J]. *J Dermatol Sci*, 2000, 24(2): 134-141.
- [30] STOREY J M, STOREY K B. Cold hardiness and freeze tolerance[M]. New York: Wiley, 2005.
- [31] JIMÉNEZ-CERVANTES C, MARTÍNEZ-ESPARZA M, PÉREZ C, et al. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 12): 2335-2344.
- [32] GORDON J I, ELSHOURBAGY N, LOWE J B, et al. Tissue specific expression and developmental regulation of two genes coding for rat fatty acid binding proteins [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(4): 1995-1998.
- [33] MAATMAN R G H J, VAN DE WESTERLO E M A, VAN KUPPEVELT T H M S M, et al. Molecular identification of the liver- and the heart-type fatty acid-binding proteins in human and rat kidney. Use of the reverse transcriptase polymerase chain reaction [J]. *Biochem J*, 1992, 288(Pt 1): 285-290.
- [34] GUTHMANN F, HOHOFF C, FECHNER H, et

- al. Expression of fatty-acid-binding proteins in cells involved in lung-specific lipid metabolism[J]. *Eur J Biochem*, 1998, 253(2): 430-436.
- [35] DEMPSEY M E, MCCOY K E, BAKER H N, et al. Large scale purification and structural characterization of squalene and sterol carrier protein[J]. *J Biol Chem*, 1981, 256(4): 1867-1873.
- [36] LEVI A J, GATMAITAN Z, ARIAS I M. Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions[J]. *J Clin Invest*, 1969, 48(11): 2156-2167.
- [37] YAMAUCHI T, KAMON J, ITO Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects [J]. *Nature*, 2003, 423 (6941): 762-769.
- [38] HENSCHEN A, LOTTSPREICH F, KEHL M, et al. Covalent structure of fibrinogen[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1983, 408: 28-43.
- [39] SCHWEIZER J, BOWDEN P E, COULOMBE P A, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins[J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(2): 169-174.
- [40] LANGBEIN L, ROGERS M A, PRAETZEL-WUNDER S, et al. Novel type I hair keratins K39 and K40 are the last to be expressed in differentiation of the hair: completion of the human hair keratin catalog [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127 (6): 1532-1535.
- [41] GONG H, ZHOU H T, MCKENZIE G W, et al. An updated nomenclature for keratin - associated proteins (KAPs)[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2): 258-264.
- [42] ROGERS M A, LANGBEIN L, WINTER H, et al. Characterization of a first domain of human high glycine-tyrosine and high sulfur keratin-associated protein (KAP) genes on chromosome 21q22.1[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48993-49002.
- [43] ROGERS G E. Hair follicle differentiation and regulation[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(2-3): 163-170.
- [44] LANGBEIN L, ROGERS M A, WINTER H, et al. The catalog of human hair keratins I. Expression of the nine type I members in the hair follicle[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(28): 19874-19884.
- [45] ROGERS M A, LANGBEIN L, PRAETZEL-WUNDER S, et al. Human hair keratin-associated proteins (KAPs) [J]. *Int Rev Cytol*, 2006, 251: 209-263.
- [46] LI S W, OUYANG H S, ROGERS G E, et al. Characterization of the structural and molecular defects in fibres and follicles of the Merino felting lustre mutant [J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18(2): 134-142.

(编辑 程金华)