

绵羊角细胞关联蛋白2基因克隆与表达分析

张立春¹, 柳俭强¹, 李梦姝^{1,2}, 李欣¹, 曹阳¹, 金海国¹, 朴庆林^{1*}

(1. 吉林省农业科学院动物生物技术研究所, 吉林 公主岭 136100; 2. 黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161005)

摘要:为克隆绵羊角细胞关联蛋白2(Keratinocyte-associated protein 2, KRTCAP2)基因 mRNA 并分析该基因表达分布规律,本研究首先提取小尾寒羊与新吉细毛羊皮肤及不同组织总 RNA, RT-PCR 方法克隆 *KRTCAP2* 基因并进行两个品种间的比较分析,随后利用 HRM 方法对目的 SNP 位点进行基因多态性分析,最后用 qRT-PCR 方法分析两个品种不同组织间 *KRTCAP2* 基因的时空表达分布。RT-PCR 扩增显示绵羊皮肤组织出现略小于 500 bp 的特异性条带,测序证实该片段为 *KRTCAP2* 基因,长度为 466 bp,编码 149 个氨基酸。所克隆的 4 条片段中存在 4 个 SNP 位点,其中 2 个 SNP 位点引起氨基酸位点突变。针对 c.194 位 A>G 突变位点设计的 HRM 检测发现小尾寒羊、新吉细毛羊等群体中并不存在该多态位点。小尾寒羊与新吉细毛羊不同组织间的表达分布显示, *KRTCAP2* 基因存在多组织表达特性,在两品种羊组织表达模式既存在一致性也存在差异性。一致性主要表现为小尾寒羊与新吉细毛羊中肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肠道与皮肤组织中 *KRTCAP2* 表达量较心脏组织呈现上调表达的趋势。差异性表现为新吉细毛羊在肝脏、脾脏、肺脏、肠道、脑和皮肤的组织表达量均高于小尾寒羊,在肌肉和卵巢组织中的表达量低于小尾寒羊,在肾脏组织中的表达量基本持平。本研究成功克隆出绵羊 *KRTCAP2* 基因并进行了系统分析,为探讨绵羊角细胞功能奠定了基础。

关键词: *KRTCAP2*; 新吉细毛羊; 小尾寒羊; 基因克隆

中图分类号: S826

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2020)03-0050-05

The Cloning and Expression Analysis of Keratinocyte-associated Protein 2 Gene from Sheep

ZHANG Lichun¹, LIU Jianqiang¹, LI Mengshu^{1,2}, LI Xin¹, CAO Yang¹, JIN Haiguo¹, PIAO Qinglin^{1*}

(1. Animal Biotechnology Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 2. Branch of Animal husbandry and Veterinary, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihaer 161005, China)

Abstract: In order to clone the Keratinocyte-associated protein 2 (KRTCAP2) gene and identify the expression pattern in different organs of sheep, in this study, the total RNA was extracted from different organs coming from Small tail Han sheep (STH sheep) and Xinji Fine wool sheep (XJ sheep), and *KRTCAP2* was cloned by RT-PCR, the polymorphisms in different sheep populations were tested by HRM. In the end, the tissue expression pattern was measured by qRT-PCR. The RT-PCR amplification showed there was a specific band which was slightly smaller than 500 bp, and the sequencing data approved the amplicons were *KRTCAP2* gene with 466 bp in length encoding 149 amino acids peptides. In the same time, four SNP mutants were identified, and two of them caused mutation in protein. The polymorphism of A>G mutant in c.194 by HRM analysis showed there were no polymorphism in all populations including STH sheep and XJ sheep. The tissues expression distribution analysis by qRT-PCR approved that *KRTCAP2* gene was constructive expressed in all organs in sheep. However, the expression pattern has both similar and distinct point in organs from STH sheep and XJ sheep. The similar point is *KRTCAP2* has higher expression in liver, spleen, lung, kidney, gut and skin than heart in both STH sheep and XJ sheep, The expression levels in liver, spleen, lung, intestine, brain and skin were higher in XJ sheep than in STH sheep. The expression in muscle and ovary tissue of XJ sheep was lower than that of STH sheep, and the expression in kidney tissue was lower. In conclu-

收稿日期: 2018-12-12

基金项目: 国家“863”计划项目(2013AA102506)

作者简介: 张立春(1977-),男,副研究员,博士,研究方向: 动物生物技术。

通讯作者: 朴庆林,男,研究员, E-mail: pql@cjaas.com

sion, the sheep *KRTCAP2* gene was cloned in this study which provides an opportunity to explore the gene function in further.

Key words: *KRTCAP2*; Xinji fine wool sheep; Small tail Han Sheep; Gene cloning

角质形成细胞(Keratinocytes)又称角细胞,是皮肤上皮层含量最丰富的一类细胞,主要分布于上皮层中的基质层,占上皮细胞的95%以上^[1]。其在细胞增殖、分化与凋亡中发挥重要的作用,其中作为角细胞关联蛋白基因家族(Keratinocyte-associated protein, KRTCAP)中的一员, KRTCAP2在角质形成细胞中高表达,并调控毛发的生长发育^[2]。角细胞最主要的功能是保持皮肤组织的完整性,构筑机体与外界环境的第一道天然屏障^[3],使机体免受外界生物(细菌、病毒及寄生虫等)、物理与化学性损伤的同时减少机体水分损失^[4]。正常生理状态下,角细胞不断从皮肤深处基底层向体表移行,此过程同样伴随着角细胞分化与更新。研究表明角细胞从基底层移行至表皮角质层只需要28天时间,在移行过程中伴随着角质细胞的分化过程,典型的特征是角蛋白的不断累积^[5]。角细胞的更新源动力来自于皮肤表皮干细胞的增殖分化。表皮干细胞同样位于基底层,对基底层具有粘附的特性,具有细胞周期慢和超强自我更新能力^[5]。表皮干细胞还具有双向分化能力,向下迁移分化为表皮基底层,进而生成毛囊;向上迁移,并最终分化为各类表皮细胞,其主要为角细胞^[6]。课题组前期研究中发现小尾寒羊与新吉细毛羊皮肤组织结构存在较大差别,其中皮肤厚度差异最为明显^[7]。提示两者皮肤组织中角细胞的含量及功能可能存在一定差异,绵羊皮肤比较转录组学分析结果也证明毛囊干细胞分子表面标志基因存在表达差异。为进一步揭示不同绵羊品种角质形成细胞功能差异,本文以小尾寒羊与新吉细毛羊为研究对象,通过*KRTCAP2*基因克隆、多态性及时空表达比较分析,为阐释绵羊皮肤功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验动物为9~10月龄雌性新吉细毛羊和小尾寒羊,其中新吉细毛羊为吉林省农业科学院畜牧科学分院新近选育的超细型新品系,小尾寒羊为市售纯种小尾寒羊。

1.2 主要试剂

RNAlater购自QIAGEN公司、Trizol购自Invit-

rogen公司;pMD18-T载体、RNasefree DNase I、Agarose Gel DNA Purification Kit及ExTaq酶系统均购自大连宝生物公司;定量PCR试剂Light cycler 480 SYBR Green I master购自罗氏公司。

1.3 试验样品采集与保存

本试验所用样品主要包括肩胛后皮肤毛囊组织和其他实质组织器官。不同毛囊周期皮肤毛囊组织样品具体采集方法为:打毛剪对试验羊肩胛局部剪毛,70%酒精消毒,剪切0.5 mm的皮肤浸入RNAlater液中,其他实质组织器官样品主要包括心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、小肠、下丘脑、卵巢等,具体采集过程为:屠宰场标准流程屠宰试验羊,分别采集一定大小各组织器官样品,浸入RNAlater保存液中,送至-80℃冰箱保存。

1.4 总RNA提取与cDNA一键合成

新吉细毛羊与小尾寒羊皮肤毛囊组织与其他实质组织器官总RNA提取采用Trizol法,将150 mg组织块从RNAlater保存液中取出,转入含有1 mL的Trizol液与磁珠的1.5 mL螺口离心管中,将上述离心管固定于组织匀浆器中,4毫秒震荡研磨,提取各组织总RNA。提取的总RNA用DEPC水充分溶解,琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA完整性,紫外分光光度计检测其纯度与浓度,-70℃保存备用。要注意的是cDNA合成前总RNA用RNase-free DNase I处理确保不存在DNA污染。cDNA合成反应参照PrimeScript反转录试剂盒进行,具体步骤按说明书进行。

1.5 引物设计与合成

目前GenBank数据库中尚未有*KRTCAP2*基因mRNA序列信息,仅有预测序列。本文以预测序列(XM_004002576.3)为模板设计克隆引物,待基因mRNA克隆测序完成后,设计定量RT-PCR引物,同时以绵羊 β -actin基因为内参基因设计内参引物,具体引物序列信息见表1。

1.6 RT-PCR与基因克隆

基因扩增以皮肤毛囊组织cDNA为模板,具体反应体系为:14.3 μ L ddH₂O, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP Mix 2.5 μ L, 10 μ mol/L引物F 1 μ L, 10 μ mol/L引物R 1 μ L, 0.5U/ μ L Taq酶 0.2 μ L, 1 μ L cDNA模板。反应条件为94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 0.5 min, 35个循环。扩

表1 引物序列信息及扩增产物

引物	序列	产物(bp)	退火温度(℃)
sKCP2-C	F: CCTGGACAGAAGCACGGATT	463	60
	R: AGACATTGAGGGTCAATTTCTCT		
sKCP2-Q	F: CTGTCCCTTCTGCTCTTC	169	62
	R: ATCTTTGCTTGAATCCTTTAC		
sKCP2-c194	F: CTGCTCTTCGCTGGGATG	117	60
	R: AGAGGATACGGTGAGAGAG		
sβ-actin	F: CCGCAAATGCTTCTAGGCCG	98	62
	R: TCGCACGAGGCCAATCTCAT		

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测及胶回收,pMD18-T载体连接阳性克隆委托生物公司测序,测序结果进行生物信息学分析。

1.7 SNP位点检测

基因多态性检测采用HRM技术进行,小尾寒羊和新吉细毛羊群体分别为30头和48头,检测样本为血液基因组DNA。具体方法采用Light Cycle 480 II定量PCR仪。反应为20μL体系:ddH₂O为8.8μL,浓度为50 ng的DNA 1μL,High Resolution Melting Master 10μL,浓度为3μmol/L的正反引物各0.2μL。循环条件如下:95℃变性10 min,40个循环,条件为94℃ 15 s,68℃ 30 s,72℃ 15 s,扩增结束后进行HRM分型,分型条件为:95℃ 1 min,40℃ 1 min,65℃ 1 s;在65℃升温至95℃的过程中以25次/℃的速度收集荧光,最后降温至40℃ 40 s。检测结果以Gene Scanning软件进行分析。

1.8 组织表达分布检测

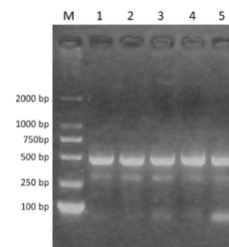
组织表达分布检测采用荧光定量RT-PCR进行,定量PCR采用Light Cycle 480 II定量PCR仪。反应为20μL体系:ddH₂O为8.6μL,cDNA模板稀释10倍后添加1μL,Light cyclor 480 SYBR Green I master 10μL,浓度为10μmol/L的正反引物各0.2μL。循环条件如下:95℃变性15 min,40个循环,条件为94℃ 15 s,62℃ 30 s,扩增结束后进行

产物溶解曲线分析。每个品种检测两个个体,每个样品重复进行3次。检测结果利用2^{-ΔΔCt}法进行数据分析并绘制柱形图。

2 试验结果

2.1 绵羊KRTCP2基因克隆与序列分析

以新吉细毛羊与小尾寒羊皮肤组织cDNA为模板,RT-PCR扩增电泳检测显示已成功扩增出明显目的条带,片段略小于500 bp(见图1)。



M: DL2000; 1-2: 小尾寒羊; 3-5: 新吉细毛羊

图1 绵羊KRTCP2基因RT-PCR扩增结果

扩增产物胶回收克隆测序结果显示该片段长度为466 bp,与参考序列比对显示该片段为绵羊KRTCP2基因。该序列与参考序列比较ORF区5'端缺少38 bp。序列比对发现新吉细毛羊与小尾寒羊中KRTCP2基因mRNA序列中发现3个多态位点,其中小尾寒羊2个多态位点位于ORF区,新吉细毛羊多态位点位于3'UTR区(图2)。ORF区c.194位A>G突



图2 绵羊KRTCP2基因核苷酸比对

```
Ref: MRTANRPWFGSPXLDRTDWTQGGMMVVGTTSLALSSLLSLLFAGMQMYSRQLASTEWLTIQGGLLGSGLFVFSLTAENNENLVFGKGFQAKIFPEILLCLLLALFASGLIHRVCV 120
7-3: LDRSTDWTQGGMMVVGTTSLALSSLLSLLFAGMQMYSRQLASTEWLTIQGGLLGSGLFVFSLTAENNENLVFGKGFQAKIFPEILLCLLLALFASGLIHRVCV 107
7-8: LDRSTDWTQGGMMVVGTTSLALSSLLSLLFAGMQMYSRQLASTEWLTIQGGLLGSGLFVFSLTAENNENLVFGKGFQAKIFPEILLCLLLALFASGLIHRVCV 107
Ref: TTCFIFSMVGLYYINKISSTLYQATAPVLTAKVTGKGGKRN. 162
7-3: TTCFIFSMVGLYYINKISSTLYQATAPVLTAKVTGKGGKRN. 149
7-8: TTCFIFSMVGLYYINKISSTLYQATAPVLTAKVTGKGGKRN. 149
```

7-3 和 7-8 为小尾寒羊,灰色标注为多态位点,Ref:参考序列 XM_004002576.3

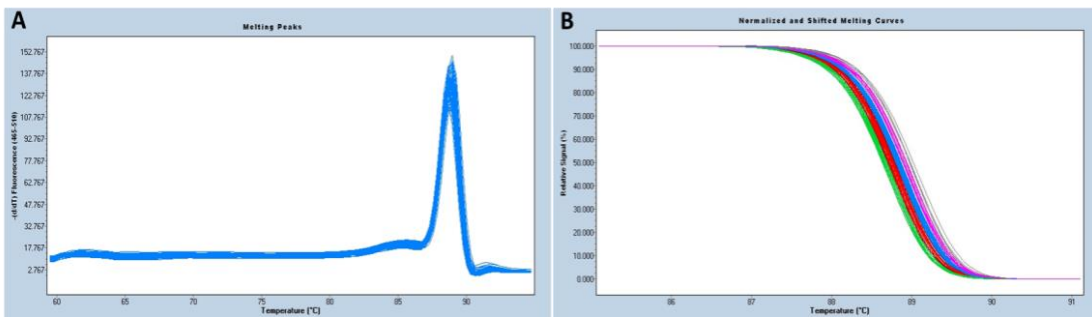
图3 绵羊 *KRTCP2* 基因氨基酸序列比对

变导致 a.65 位氨基酸 Gln>Arg 突变,c.241 位 T<C 突变导致 a.81 位氨基酸 Phe>Leu 突变(图3)。

2.2 绵羊 *KRTCP2* 基因多态性分析

针对基因克隆测序检测到的 c.194 多态位点设计 HRM 检测引物,以新吉细毛羊(48 头)、小尾寒羊(30 头)、陶赛特与小尾寒羊杂交 F₁ 代羊(25 头)血液基因组为模板,进行不同群体多态性检

测分析,经过条件摸索证实 HRM 扩增反应特异性较好(图 4A),但对上述群体扩增产物进行 GeneScanning 分析结果发现扩增产物溶解曲线一致,不存在多态位点(图 4B)。该结果与克隆测序结果存在差异,可能的原因是克隆测序过程引入的人为突变。



A: 扩增片段溶解曲线分析;B: GeneScanning 分析结果

图4 不同绵羊品种 *KRTCP2* 基因 c.194 多态性分析

2.3 *KRTCP2* 基因组织表达分布分析

为探寻 *KRTCP2* 基因组织表达规律,提取小尾寒羊与新吉细毛羊各 2 头个体心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、小肠、卵巢、脑、肌肉与皮肤组织 RNA,通过 RT-PCR 方法检测 *KRTCP2* 在不同组织器官中的表达情况,以心脏组织表达水平为内对照,绘制相对表达变化柱形图(图 5)。结果显示两个品种羊不同组织器官 *KRTCP2* 基因表达模式既存在一致性也存在差异性。一致性主要表现为小尾寒羊与新吉细毛羊中肝脏、脾脏、肺脏、肾

脏、肠道与皮肤组织中 *KRTCP2* 表达较心脏组织呈现上调表达的趋势。差异性表现为新吉细毛羊在肝脏、脾脏、肺脏、肠道、脑和皮肤的组织表达量均高于小尾寒羊,在肌肉和卵巢组织中的表达量低于小尾寒羊,在肾脏组织中的表达量基本持平。另外小尾寒羊脑组织、新吉细毛羊肌肉组织 *KRTCP2* 基因表达较心脏组织明显降低,对应品种则呈现表达升高的趋势。

3 讨论

皮肤组织是隔绝机体与外界环境的第一道防线,在保护机体免受外界物理、化学、生物等损伤发挥重要的作用^[8]。皮肤组织含量最为丰富的是角细胞,皮肤附属物是由皮肤角细胞定向分化所形成^[9]。毛发发生与生长源于毛囊组织,而毛囊组织是胚胎期皮肤上皮组织中角细胞内陷分化而来,毛囊组织更新同样与皮肤干细胞密切相关,因此绵羊毛品质遗传机制离不开对皮肤角细胞功能的研究。本文通过对小尾寒羊与新吉细毛羊 *KRTCAP2* 基因克隆及系统鉴定,为阐释两品种绵羊皮肤角细胞功能差异,进而为毛用性状遗传奠定基础。

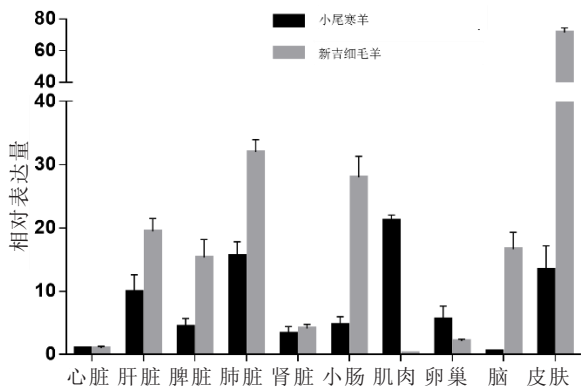


图5 小尾寒羊及新吉细毛羊不同组织器官 *KRTCAP2* 基因表达分析

RT-PCR 克隆显示小尾寒羊与新吉细毛羊皮肤组织中 *KRTCAP2* 基因特异性表达, *KRTCAP2* 基因不同物种间高度保守, 但克隆发现 *KRTCAP2* 基因 mRNA 存在 3 处多态位点, 尤其是第 1, 2 多态位点引起编码氨基酸突变, 因此本试验进一步设计群体间多态性检测试验进行验证, 但遗憾的是在小尾寒羊、新吉细毛羊及陶赛特与小尾寒羊杂交 F₁ 代羊群体中均未检测到该多态位点, 一方面直接证实 *KRTCAP2* 基因的高度保守性^[10]。定量 RT-PCR 结果显示小尾寒羊与新吉细毛羊 *KRTCAP2* 基因在不同组织表达分布模式上既存在一致性也存在差异性。绵羊组织多器官表达情况与人组织器官表达结果相一致, 提示 *KRTCAP2* 基因物种间的保守性^[11]。但小尾寒羊与新吉细毛羊品种间差异却较大, 由于本试验中仅仅检测了小尾寒羊与新吉细毛羊各 2 个个体, 不能排除个体差异, 也不具有品种代表性。

KRTCAP2 主要位于细胞内质网, 属于多跨膜蛋白。主要参与寡糖基转移酶复合体构成, 催化甘露糖寡糖基与蛋白肽链中 Asn-X-Ser/Thr 保守基序的天冬酰胺酸残基偶连, 进而完成蛋白糖基化修饰^[12], 从而间接调节机体生理生化功能。报道显示在高度恶性卵巢癌组织中存在 MUC1-TRIM46-KRTCAP2 融合基因并可导致 MUC1 融合突变蛋白表达及糖基化、细胞内分布等异常, 提示 *KRTCAP2* 功能异常对组织器官功能可能同样是致命的。目前 dbSNP 和 ClinVar 数据库中已积累大量 *KRTCAP2* 突变的数据, 但并未有与具体疾病相关的报道, 一方面说明 *KRTCAP2* 基因变异较为常见, 同时也提示 *KRTCAP2* 功能的复杂性, 在绵羊等其他物种中同样值得关注。

4 结 论

小尾寒羊与新吉细毛羊比较分析显示绵羊皮肤组织出现略小于 500 bp 的特异性条带, 测序证实该片段为 *KRTCAP2* 基因, 长度为 466 bp, 编码 149 个氨基酸; 经过基因多态性分析显示, 所克隆的 4 条片段中存在 4 个 SNP 位点, 其中 2 个 SNP 位点引起氨基酸位点突变, 小尾寒羊、新吉细毛羊等群体中并不存在该多态位点; *KRTCAP2* 基因在小尾寒羊与新吉细毛羊中存在多组织表达特性, 既存在一致性也存在差异性, 其中小尾寒羊与新

吉细毛羊中肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肠道与皮肤组织中 *KRTCAP2* 表达量较心脏组织呈现上调表达的趋势, 大部分新吉细毛羊组织表达量高于小尾寒羊。

参考文献:

- [1] Wang J X, Fukunaga-kalabis M, Herlyn M. Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma[J]. Journal of Cell Communication and Signaling, 2016, 10(3): 191-196.
- [2] Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, et al. Steroidogenesis in the skin: implications for local immune functions[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 137: 107-123.
- [3] Abadie S, Jarret C, Colombelli J, et al. 3D imaging of cleared human skin biopsies using light-sheet microscopy: A new way to visualize in-depth skin structure[J]. Skin research and technology, 2018, 24(2): 294-303.
- [4] Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing[J]. The Journal of Investigative Dermatology, 2007, 127(5): 998-1008.
- [5] Zarei F, Abbaszadeh A. Stem cell and skin rejuvenation[J]. Journal of Cosmetic and Laser Therapy: Official Publication of the European Society for Laser Dermatology, 2018, 20(3): 193-197.
- [6] Zhang L, Sun F, Jin H, et al. A comparison of transcriptomic patterns measured in the skin of Chinese fine and coarse wool sheep breeds[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 14301.
- [7] Niehues H, Bouwstra J A, El Ghalbzouri A, et al. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function[J]. Experimental Dermatology, 2018, 27(5): 501-511.
- [8] Dahl M V. Stem cells and the skin[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2012, 11(4): 297-306.
- [9] Roboti P, High S. Keratinocyte-associated protein 2 is a bona fide subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase[J]. Journal of Cell Science, 2012, 125(Pt 1): 220-232.
- [10] Bonkobara M, Das A, Takao J, et al. Identification of novel genes for secreted and membrane-anchored proteins in human keratinocytes[J]. The British Journal of Dermatology, 2003, 148(4): 654-664.
- [11] Wilson C M, Magnaudeix A, Yardin C, et al. DC2 and keratinocyte-associated protein 2 (KCP2), subunits of the oligosaccharyltransferase complex, are regulators of the gamma-secretase-directed processing of amyloid precursor protein (APP)[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(36): 31080-31091.
- [12] Kannan K, Kordestani G K, Galagoda A, et al. Aberrant MUC1-TRIM46-KRTCAP2 Chimeric RNAs in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma[J]. Cancers, 2015, 7(4): 2083-2093.

(责任编辑:刘洪霞)