牦牛体外成熟卵母细胞差异转录组学研究

兰道亮¹, 熊显荣², 陈亚冰², 泽让东科¹, 艾鹭¹, 李健^{1*}

1. 西南民族大学青藏高原研究院, 成都 610041;

2. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041

* 联系人, E-mail: lijian@swun.cn

收稿日期: 2017-05-19; 接受日期: 2017-06-29; 网络版发表日期: 2017-09-08

西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 2015NZYTD01)资助

摘要 卵母细胞体外成熟环节是现代繁殖育种技术的基础环节, 体外成熟的MII期卵母细胞的质量直接影响了卵母细胞的后续受精及受精卵卵裂。由于卵母细胞的发育成熟是一个涉及大量基因转录调控的复杂过程。因此, 转录组学研究是了解卵母细胞发生发育的关键。本研究以高海拔地区的特有牛属动物牦牛(*Bos grunniens*)卵母细胞作为研究对象, 应用RNA-seq技术对牦牛GV期卵母细胞及体外成熟MII期卵母进行转录组学测序及比对分析。经深度测序后, 各获得一个包含51380686条过滤测序序列(clean reads), 4624261740碱基(bp)的GV期牦牛卵母细胞测序文库和一个包含50303412条过滤测序序列(clean reads), 4527307080碱基(bp)的MII期牦牛卵母细胞测序文库。基因覆盖率统计表明, GV期和MII期文库中分别有16719条和16339条牦牛基因得到转录。通过比较分析MII和GV期转录组数据, 共筛选出4767个差异表达基因, 其中1418个基因表达量上调和3349个基因表达量下调。GO功能分类注释显示, 差异基因与“代谢过程”等生物学过程存在密切关联, 同时结合分子功能相关类别等分子事件表现活跃。按表达量上调和下调分别对差异基因进行KEGG通路互作分析, 结果表明, 凋亡通路、内吞通路及代谢通路是上调的关键调控通路, 而代谢通路、丙酮酸代谢、黏着斑及氧化磷酸化是下调的关键调控通路, 其中代谢通路在上调及下调通路互作中均起关键调控作用。进一步对代谢通路进行分析, 结果表明, 组氨酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢及谷胱甘肽代谢是整个代谢通路的关键调控节点。此外, 本研究发现, 在牦牛卵母细胞体外成熟过程中, 与免疫相关的白细胞介素家族及干扰素家族基因发生了显著差异表达。该研究结果为进一步解析牦牛卵母细胞发育的分子机制及全面了解牦牛繁殖的特异性提供了基础。

关键词 牦牛, 卵母细胞, GV期, MII期, 体外成熟, RNA-Seq, 转录组, 分子机制

牦牛(*Bos grunniens*), 素有“高原之舟”的美誉, 是主要分布在中国青藏高原及其毗邻高山或亚高山地区的特有物种, 也是当今世界上已知唯一一种能够在高海拔地区(平均海拔高度3000 m)生存的牛属动物^[1]。

牦牛能够很好地适应高山草原环境, 并在恶劣的高原环境条件下(如空气稀薄、低温和强紫外线)自由生长和繁殖^[2]。同时牦牛可以为当地牧民提供奶、肉、毛等丰富的生产和生活资料, 是高原地区不可或缺的

引用格式: 兰道亮, 熊显荣, 陈亚冰, 等. 牦牛体外成熟卵母细胞差异转录组学研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1099–1112

Lan D L, Xiong X R, Cheng Y B, et al. Differential transcriptome analysis of yak oocytes *in vitro* maturation (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 1099–1112, doi: 10.1360/N052017-00017

重要畜种^[1,3,4]。然而,与生活在平原地区的普通牛类相比,牦牛的性成熟发育得更慢,其生殖能力也普遍更低。一头成年牦牛的平均繁殖率仅为48.61%,其中超过1/2的牦牛为每2年生1胎或每3年生2胎。此外,雌性牦牛发情率也很低,超过90%的产后雌性牦牛无法在同年的发情期发情^[5,6]。体外受精、胚胎移植等现代繁殖技术若能顺利地在牦牛中广泛应用及推广,将加速优良牦牛的繁殖及育种进程^[7,8]。

卵母细胞体外成熟环节是现代繁殖育种技术的基础环节,体外成熟的M II期卵母细胞的质量直接影响了卵母细胞的后续受精及受精卵卵裂^[9]。目前,与平原牛种相比,体外成熟方式获得的牦牛卵母细胞进行体外受精后,其卵母细胞卵裂率及囊胚率都较低,这一缺陷严重阻碍了胚胎移植技术在牦牛的推广及应用^[10-12]。同时目前对牦牛繁殖的特异性及其机制仍知之甚少。卵母细胞作为重要的雌性生殖细胞,发育过程中积累的母源mRNA及其编码蛋白质不仅可支持卵母细胞至受精卵发生的发育,同时他们也可参与合子基因组的激活,促进早期胚胎发育^[13]。卵母细胞良好的发育和成熟是决定雌性是否具有良好生产及繁殖能力的重要指征。因此阐明牦牛卵母细胞发育成熟的分子调控机制将为深入挖掘牦牛繁殖的特异性提供基础,同时在提高牦牛胚胎移植和妊娠维持的成功率等临床应用方面具有重要意义。

由于卵母细胞的发育成熟是一个涉及大量基因转录调控的复杂过程。因此,转录组学研究是了解卵母细胞发生发育的关键^[14]。近年来,基因芯片及高通量测序等转录组学研究技术先后被用于分析卵母细胞发育成熟的分子调控机制。基于GV期及M II期卵母细胞差异表达基因,可以推测与卵母细胞成熟相关的分子调控机制^[15]。尽管卵母细胞转录组学研究已在人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、猪(*Sus scrofa domestica*)、牛(*Bovine*)等多物种上已有报道^[16-22],但目前关于卵母细胞成熟的具体分子调控机制的研究还处于起始阶段,许多调控机制还没有被阐述,同时关于牦牛卵母细胞发育成熟的调控分子机制尚未见报道。随着牦牛基因组的测序完成,也为进一步牦牛转录组学的研究提供了“蓝图”^[1]。鉴于此,本研究应用RNA-seq技术对牦牛GV期卵母细胞及体外成熟M II期卵母细胞进行转录组学测序及比对分析,深入了解牦牛卵母细胞发育成熟中的差异表达基因及其调控

通路,为进一步研究牦牛卵母细胞体外成熟分子机制及全面了解牦牛繁殖的特异性提供基础。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的收集及体外培养

卵巢组织采集自高原屠宰场10头体型相当的健康4岁雌性麦洼牦牛(龙日坝种畜场,四川红原,平均海拔3600 m)。牦牛卵母细胞的收集以及体外成熟培养参照Wang等人^[23]所述方法。通过抽吸法从牦牛卵巢上的早期卵泡中收集卵母细胞卵丘复合物(oocyte cumulus complex, OCC)。然后在倒置显微镜(CKX 41, Olympus, 日本)下以高密度、卵丘紧凑和胞浆均匀为标准选出优质OCCs,并用PBS缓冲液冲洗数次。从每头牦牛挑选出的OCCs一部分直接进行脱颗粒细胞处理,以获得纯净的GV期卵母细胞。另一部分OCCs培养在添加有10%胎牛血清(体积比),0.2 mmol/L丙酮酸,0.5 µg/mL促黄体生成素以及1 µm/L雌二醇-17β的199组织培养基中,于38.5℃,5% CO₂条件下连续培养18 h。体外成熟培养18 h以后,移除卵母细胞周边的卵丘细胞。选取可见第一极体排出的卵母细胞作为M II期卵母细胞,其中一部分用于后续测序实验。同时同批次另一部分M II期卵母细胞进行进一步体外受精实验,受精后将卵子移入发育用培养液继续培养。24 h后每隔6 h观察受精卵卵裂情况,以验证体外培养卵母细胞的成熟度。本研究不涉及动物伦理及福利问题,所有样本均采集自政府审查批准的高原屠宰场。

1.2 RNA提取及微量测序文库构建及测序

分别从每头牦牛卵巢中选取2枚优质的GV期卵母细胞及体外成熟的M II期卵母细胞,各共计20枚,采用RNeasy Micro Kit分别提取GV期卵母细胞及M II期卵母细胞总RNA。并用RNase-free的DNase I处理,以去除DNA污染。RNA的质量和含量通过使用Nanodrop ND-1000分析仪检测吸光度260 nm/280 nm (A_{260}/A_{280})比值进行测定,完整性通过Agilent 2100生物分析仪进行检测。然后利用SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech, 日本)试剂盒进行RNA富集,以期达到高通量测序建库的要求,具体操作流程参照试剂盒的说明书。随后使用TruSeq RNA Sample Prep Kit试剂盒(Illumina, 美国),对扩增富集得到的cDNA进行测序文库的构建,

与传统RNA测序文库构建所不同的是该文库是在富集生成的cDNA层面上进行片段化,再构建随机片段测序文库.即先用中断试剂在恒温混匀仪中对经SMART技术扩增富集的cDNA进行片段化(约200 bp),随后经纯化和配对末端修复后,将cDNA片段连接到测序接头并通过PCR对其进行扩增,以此获得最终的双末端(paired-end, PE)测序文库.使用Agilent2100生物分析仪和ABI StepOnePlus实时PCR系统执行文库质量控制(quality control, QC)测试后,在Illumina HiSeq 2500平台上对文库进行测序.

1.3 转录组数据分析

对高通量测序原始数据读数进行QC检测,以判断测序基本质量.原始测序读数经过滤去除接头序列、空读序列以及低质量序列后得到过滤后测序序列.使用TopHat2软件^[24]将过滤后序列比对到牦牛基因组^[1](版本1.0, <http://me.lzu.edu.cn/yak/>)和相关基因,通过比对结果统计测序序列在参考基因组及基因序列上的分布情况及覆盖度.应用Cufflinks软件^[25]对基因结构进行优化以及对新转录本进行预测,同时运用CPC(coding potential calculator)软件^[26]预测新转录本蛋白编码能力.使用RPKM法^[27]计算基因表达水平.采用“数字基因表达谱显著性”算法^[28]界定M II期和GV期文库之间的差异表达基因(differential expressed genes, DEGs),同时用 P 值检测对应达到统计学显著水平的差异基因表达.假阳性率(false discovery rate, FDR) ≤ 0.001 和 $\log_2$ Ratio的绝对值 ≥ 1 被用作确定基因表达差异显著性的阈值.同时按照表达量对差异基因进行聚类分析及热图的绘制.通过GO(Gene Ontology)和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析($P \leq 0.05$),对DEGs的功能进行注释.此外,利用Cytoscape软件^[29]对差异表达基因涉及的KEGG通路进行通路互作(pathway-act)分析,筛选关键调控通路.

1.4 Real-time PCR(qRT-PCR)验证

从关键调控通路的差异表达基因中选择10个基因(5个上调基因,5个为下调基因)进行qRT-PCR验证(基因信息见网络版附表1).采用RNeasy Micro Kit(Life Technologies, 美国)提取同期取样的GV期和M II期牦牛卵母细胞的总RNA.用SuperScript[®] III第一链合成系统(Life Technologies, 美国)在20 μ L的反应系统中对

提取的总RNA进行反转录.然后使用SYBRHPremix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa, 大连)和Bio-Rad CFX96 Touch[™]实时PCR系统(Bio-Rad, 美国)进行qRT-PCR操作.反应条件:95 $^{\circ}$ C 1 min,随后95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 40 s,总共40个循环.反应结束后进行最终熔解度曲线分析.采用H2AFZ基因作为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[21]计算各基因的相对表达量.

2 结果

2.1 卵母细胞体外培养

通过抽吸法在倒置显微镜下以高密度、卵丘紧凑和胞浆均匀为标准选出优质OCCs(图1A),一部分直接进行脱颗粒细胞处理,获得纯净的GV期卵母细胞(图1B).另一部分优质OCCs成功体外成熟培养为M II期OCCs(图1C)并脱颗粒获得纯净的M II期卵母细胞(图1D).同时同批次M II期卵母细胞进一步体外受精及胚胎发育培养观察实验表明,受精后均能有效发育到16细胞胚胎期,证明体外培养的M II期卵母细胞细胞核和细胞质均充分成熟,可用于后续测序实验.

2.2 转录组测序基本数据分析

转录组测序数据已递交于NCBI数据库(接受号:SRX1992472, SRX1992475).去除低质量序列(即仅包含接头、接头序列的读数和空读序列)后,在GV期转录组测序文库中共获得51380686条过滤测序序列(clean reads),包含4624261740碱基(bp).在M II期转录组测序文库中共获得50303412条过滤测序序列(clean reads),包含4527307080碱基(bp).碱基组成和质量分析结果显示,原始测序数据表现出均衡的碱基组成,且GV和M II期文库的低质量碱基($Q \leq 20$)的比例均低于5%,这一结果表明,文库构建成功且测序质量良好.进一步将过滤测序序列与牦牛基因组进行比对分析,结果显示,GV期文库中有41803326条(81.36%)测序序列、M II期文库中有40021395条测序序列(79.56%)可比对至牦牛基因组.基因覆盖率统计表明,GV期和M II期文库中分别有16719条和16339条牦牛基因得到转录.此外,新转录本预测和注释结果表明,GV期卵母细胞被预测有8494个新转录本,M II期卵母细胞被预测含有7570个新转录本.长度分布为145~14885 bp,外显子预测显示为1~65个.运用Coding Potential Calculator软件

图1 牦牛GV和MII期卵母细胞形态

A: GV期OCCs; B: GV期卵母细胞; C: MII期OCCs; D: MII期卵母细胞(A和C放大40×; B和D放大800×)

预测新转录本蛋白编码能力,结果显示共计2795个新转录本具备编码蛋白的能力.这为进一步挖掘牦牛繁殖相关新转录子或基因提供了数据基础.

2.3 差异表达基因筛选

通过比较分析MII和GV期转录组数据,共筛选出4767个差异表达基因,其中1418个基因表达量上调和3349个基因表达量下调.为验证这些基因表达数据,选择10个重点关键调控差异表达基因,应用qRT-PCR进一步验证这些差异基因在GV期、MII期卵母细胞中的表达情况.结果显示,qRT-PCR定量结果与RNA-seq表达趋势基本一致(网络版附表1),这表明转录组测序结果可靠.

2.4 差异基因功能分析

根据差异基因的表达量,首先对MII和GV期差异转录基因做了聚类分析,通过聚类热图(网络版附图1),发现了部分基因家族如白细胞介素家族(interleukin, IL)及干扰素家族(interferon, IFN)(网络版附表2)等基

因发生了显著的差异表达.为了深入了解差异表达基因的生物学意义,进一步对这些差异表达基因进行了GO和KEGG富集分析.GO富集分析表明,差异表达基因在生物学过程、细胞组分及分子功能三大类中的众多GO类别上均出现富集.在生物过程的分类下,共有47个GO类别出现富集,富集前10的类别(Top 10)已列于表1中.在富集前10的GO类别中,“代谢过程”相关类别(metabolic process)最为富集,其中前9个类别均为“代谢过程”相关类别,其次为“胞内生物合成过程”类别(cellular biosynthetic process).在分子功能的分类下,共有667个GO类别出现富集,位列前10的显著富集GO类别已列于表2中.在位列前10的GO类别中,结合分子功能相关类别(binding)最为富集,占据了绝大部分(8/10),具体涉及核苷酸结合(nucleotide binding)、小分子结合(small molecule binding)、蛋白质结合(protein binding)、ATP结合(ATP binding)、核糖核苷酸结合(ribonucleotide binding)等活性分子结合.其次为“催化活性”类别(catalytic activity)和“转移酶活性”类别(transferase activity).在细胞组分的分类下,共

表 1 生物学过程前10富集GO分类^{a)}

GO 分类(GO term)	集群频率(基因总数为3724)*	基因组频率(基因总数为15573)**	P值(corrected P-value)
Cellular metabolic process	1982/3724, 53.2%	7018/15573, 45.1%	8.13×10^{-27}
Metabolic process	2202/3724, 59.1%	8071/15573, 51.8%	3.80×10^{-21}
Primary metabolic process	1948/3724, 52.3%	7075/15573, 45.4%	1.61×10^{-18}
Cellular macromolecule metabolic process	1399/3724, 37.6%	4955/15573, 31.8%	3.81×10^{-14}
Small molecule metabolic process	694/3724, 18.6%	2258/15573, 14.5%	3.25×10^{-12}
Macromolecule metabolic process	1497/3724, 40.2%	5472/15573, 35.1%	5.39×10^{-10}
Single-organism metabolic process	1452/3724, 39.0%	5322/15573, 34.2%	5.33×10^{-9}
Cellular protein metabolic process	870/3724, 23.4%	3079/15573, 19.8%	1.55×10^{-6}
Coenzyme metabolic process	95/3724, 2.6%	230/15573, 1.5%	1.77×10^{-5}
Cellular biosynthetic process	672/3724, 18.0%	2340/15573, 15.0%	1.92×10^{-5}

a) *: 不同GO分类中的差异基因占有所有GO分类总差异基因(3724)的比例; **: 该GO分类包含的基因占基因组所有基因(15573)的比例

表 2 分子功能过程前10富集GO分类^{a)}

GO 分类(GO term)	集群频率(基因总数为3701)*	基因组频率(基因总数为15811)**	P值(corrected P-value)
Binding	3147/3701, 85.0%	12257/15811, 77.5%	3.03×10^{-35}
Catalytic activity	1660/3701, 44.9%	5960 out of 15811, 37.7%	1.80×10^{-21}
Protein binding	2104/3701, 56.8%	8056 out of 15811, 51.0%	1.80×10^{-13}
Transferase activity	613/3701, 16.6%	2020 out of 15811, 12.8%	1.28×10^{-11}
Small molecule binding	778/3701, 21.0%	2672 out of 15811, 16.9%	5.59×10^{-11}
Nucleoside phosphate binding	726/3701, 19.6%	2487 out of 15811, 15.7%	3.03×10^{-10}
Nucleotide binding	725/3701, 19.6%	2486 out of 15811, 15.7%	3.97×10^{-10}
Purine ribonucleoside triphosphate binding	566/3701, 15.3%	1873 out of 15811, 11.8%	4.17×10^{-10}
ATP binding	463/3701, 12.5%	1493 out of 15811, 9.4%	1.22×10^{-9}
Ribonucleotide binding	571/3701, 15.4%	1909 out of 15811, 12.1%	2.42×10^{-9}

a) *: 不同GO分类中的差异基因占有所有GO分类总差异基因(3701)的比例; **: 该GO分类包含的基因占基因组所有基因(15573)的比例

有427个GO类别出现富集。在位列前10的富集GO类别中(表3), 主要集中于细胞(intracellular)及细胞器组分(organelle)。

KEGG富集分析表明, DEGs中共有243个通路出现富集。为进一步探究这些通路的相互作用关系, 分别对表达量上调的差异基因以及表达量下调的差异基因进行了通路互作分析, 其中上调差异基因通路互作结果表明, 凋亡通路(apoptosis)、内吞通路(endocytosis)及代谢通路(metabolic pathways)是关键调控通路(图2)。下调差异基因通路互作结果表明, 代谢通路(metabolic pathways)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)、黏着斑(focal adhesion)及氧化磷酸化(oxidative

phosphorylation)是关键调控通路(图3)。由于代谢通路在上调及下调通路互作中均起关键调控作用, 同时由于代谢通路涉及众多基因和子代谢通路, 所以在上述基础上, 单独对代谢通路按上调及下调分别进行了相关通路互作分析, 其中上调通路互作结果表明, 组氨酸代谢(histidine metabolism)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(glycine, serine and threonine metabolism)、乙醛酸和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)及谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism)为关键调控代谢通路(图4)。下调通路互作结果表明, 氰基氨基酸代谢(cyanoamino acid metabolism)、组氨酸代谢(histidine metabolism)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(glycine,

表 3 细胞组分过程前10富集GO分类^{a)}

GO分类(GO term)	集群频率(基因总数为4010)*	基因组频率(基因总数为17161)**	P值(corrected P-value)
Intracellular	3462/4010, 86.3%	12790/17161, 74.5%	3.94×10^{-91}
Intracellular part	3366/4010, 83.9%	12422/17161, 72.4%	1.60×10^{-81}
Cytoplasm	2709/4010, 67.6%	9636/17161, 56.2%	1.27×10^{-60}
Intracellular organelle	2931/4010, 73.1%	10821/17161, 63.1%	4.19×10^{-50}
Organelle	2933/4010, 73.1%	10838/17161, 63.2%	1.15×10^{-49}
Membrane-bounded organelle	2686/4010, 67.0%	9723/17161, 56.7%	1.40×10^{-49}
Intracellular membrane-bounded organelle	2683/4010, 66.9%	9712/17161, 56.6%	1.90×10^{-49}
Cytoplasmic part	2140/4010, 53.4%	7373/17161, 43.0%	4.46×10^{-49}
Cell part	3684/4010, 91.9%	14656/17161, 85.4%	1.06×10^{-41}
Cell	3684/4010, 91.9%	14657/17161, 85.4%	1.24×10^{-41}

a) *: 不同GO分类中的差异基因占有所有GO分类总差异基因(4010)的比例; **: 该GO分类包含的基因占基因组所有基因(17161)的比例

图 2 上调差异基因KEGG通路互作网络图(网络版彩图)

serine and threonine metabolism)、乙醛酸和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)及谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism)为关键调控代谢通路(图5)。

3 讨论

卵母细胞作为雌性生殖配子,在动物生产繁殖方面具有重要功能。它不仅可将母源性遗传信息传递给后代,同时还在受精卵基因组重编程、启动和维持胚胎早期发育等诸多方面发挥重要作用^[13]。在哺乳动物

卵母细胞成熟期间,其经历了2个细胞停滞周期即胚胎(GV)阶段和有丝分裂中期II(MII)阶段。在MII阶段,卵母细胞经历核成熟以及胞质成熟,并为后期的受精及和胚胎发育作准备,是决定雌性是否具有良好生产及繁殖能力的重要阶段^[9]。尽管卵母细胞转录组学研究已在人类、小鼠、羊(*Caprinae*)和牛等多物种上已有报道^[16-22],但有关牦牛卵母细胞转录组学研究尚未见报道,并且卵母细胞在不同发育阶段的分子机制仍然还不十分清楚。鉴于此,本研究应用RNA-seq技术对牦牛GV期卵母细胞及体外成熟MII期卵母进行

图 3 下调差异基因KEGG通路互作网络图

转录组学测序及比对分析,挖掘牦牛卵母细胞发育成熟中的差异表达基因及其调控通路,为进一步了解牦牛卵母细胞体外成熟分子机制及其繁殖的特异性提供基础。

通过比较分析MII和GV期转录组数据,本研究共筛选出4767个差异表达基因。在GO富集分析生物学过程分类中,与牛类及其他种属卵母细胞成熟转录组所得结果不同,发现在牦牛卵母细胞成熟中,“代谢过程”相关类别富集最显著,这提示代谢过程的调节在卵母细胞成熟期间发挥了相关作用,值得进一步关注。在分子功能分类中,结合分子功能相关类别(binding)富集最显著,具体涉及核苷酸结合、小分子结合、蛋

白质结合、ATP结合等多种活性分子结合。先前,研究者采用基因芯片技术检测到牛类及其他种属卵母细胞中结合分子功能类别在卵母细胞中占有较高比例^[20,21,30],本研究结果再次证明了分子结合活动在卵母细胞发育过程中扮演着重要角色,提示卵母细胞的相关功能活动有可能是通过行使细胞内分子结合事件来实现的。在细胞组分分类中,细胞内相关组分类别(intracellular)占有最大比例。另外,细胞器相关组分(organelle)及细胞质组分(cytoplasm)占有较大比例,其中细胞器相关组分类别中,膜类细胞器占有较大比例,这提示膜类细胞器如线粒体也是卵母细胞发育成熟的重要场所。

图4 上调代谢KEGG通路互作网络图(网络版彩图)

对差异表达基因进一步进行KEGG分析, 这些差异表达基因共涉及254条通路. 为进一步探究这些通路的相关作用关系, 分别按表达量上调以及下调两部分对这些差异表达通路进行了通路互作分析. 牛属及其他物种卵母细胞发育转录组相关研究表明, MAPK, Wnt及PI3K/Akt 凋亡通路在卵母细胞成熟发育中起了关键调控作用^[31]. 但本研究发现牦牛卵母细胞成熟的关键调控通路与其他物种有所不同, 其中上调通路互作结果表明, 凋亡通路、内吞通路及代谢通路是关键调控通路. 细胞凋亡即细胞程序性死亡, 是指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序的死亡. 细胞

凋亡对多细胞生物个体的发育、正常细胞更新、各组织保持正常结构与功能有着积极而重要的意义^[32]. 在许多无脊椎动物和脊椎动物中, 大量的生殖细胞在发育的不同阶段丢失. 在哺乳动物中, 凋亡不仅直接与原始生殖细胞、卵原细胞、分化的卵母细胞有关, 而且还与卵泡闭锁有关^[32]. 本研究中凋亡通路中的Caspases, Bcl-2等主要凋亡诱导及效应因子家族成员的表达量均发生显著上升, 说明凋亡通路在牦牛卵母细胞成熟过程中被有效激活. 目前大部分研究报道在卵母细胞的成熟过程中, 会抑制凋亡的产生^[31-33], 但最近的研究证实, 凋亡尤其是早期凋亡有助于提高卵母

图 5 下调代谢KEGG通路互作网络图(网络版彩图)

细胞发育的全能性^[34],同时卵母细胞的有效发育和全能性的获得与凋亡的发生并无直接联系^[35].本研究中凋亡通路作为显著上调的关键通路,提示凋亡的调节在卵母细胞成熟发育过程中具有重要作用,但凋亡的激活是否是牦牛卵母细胞成熟的特殊机制有待进一步研究.除凋亡通路外,“内吞作用”通路也是上调通

路中的关键调控通路.内吞作用是细胞摄取胞外物质的一种普遍存在的机制.研究发现,内吞作用与非脊椎动物内卵黄形成相关^[36,37],然而,内吞作用在哺乳动物的生殖细胞中的确切功能尚不清楚.本研究中“内吞作用”通路中的多个基因表达量显著上调,其中微囊蛋白(caveolin, CAV)家族成员CAV1和CAV2的表达

量均上升。微囊蛋白是一种参与胆固醇体内平衡和运输的膜蛋白,在细胞内吞作用机制及细胞分化信号转导的调控方面发挥了重要作用。CAV1目前已证实在旋毛虫卵母细胞及胚胎发育过程中,尤其在性别分化中起关键调控作用^[38]。此外,CAV1在新秀丽杆状线虫的生殖细胞及胚胎发育过程中被证实其基因表达量会发生显著的变化,提示在生殖发育过程中可能起重要作用^[39]。本研究再次证实CAV蛋白家族在哺乳动物卵母细胞的发育成熟过程中表达量会发生明显变化,提示在卵母细胞的成熟机制中起重要调控作用。

下调通路互作结果表明,代谢通路、丙酮酸代谢、黏着斑及氧化磷酸化是关键调控通路。丙酮酸代谢是机体细胞内葡萄糖经过酶催化作用降解生成丙酮酸并伴随生成ATP的过程,丙酮酸代谢可以通过乙酰CoA中间物和柠檬酸循环实现机体内糖类物质、脂肪及蛋白质间互相转化^[40]。丙酮酸代谢一方面可提供卵母细胞内代谢反应所需的能量,另一方面提供代谢反应所需物质原料。但本研究丙酮酸代谢通路中的多个基因如乙酰-CoA羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACACB)、乙酰天冬氨酰谷氨酸合成酶A(*N*-acetylasparyl-glutamate synthetase A, RIMKLA)、羟酰谷胱甘肽水解酶(hydroxyacylglutathione hydrolase, HAGH)等基因的表达量均下降,即MII期牦牛卵母细胞与GV期细胞相比,下调了丙酮酸代谢通路。本课题组推测,GV期细胞为发育成熟需要丙酮酸代谢通路提供相关能量,一旦发育到MII期,细胞为维持该阶段的分裂阻滞状态,可能需要降低相关能量代谢,阻止进一步发育。黏着斑是介导细胞与细胞外基质的一种连接作用,其可通过整联蛋白锚定到细胞外基质上从而产生动态的细胞锚定型连接。本研究黏着斑通路中的众多基因均发生了表达量下调,其中包括通路中的关键基因黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)。FAK是一类非受体型酪氨酸蛋白激酶,广泛参与细胞与细胞外基质相互作用的信号反应通路。在小鼠生殖配子亚细胞定位研究中发现,FAK高表达于卵母细胞中,同时在卵母细胞受精及胚胎早期发育中发挥多种功能作用^[41]。此外,研究表明加入FAK抑制剂的体外培养成熟的小鼠卵母细胞,比正常培养的卵母细胞发育到囊胚阶段的数目和效率要高^[42]。本研究证实,在牦牛卵母体外成熟过程中,FAK的表达量显著下降,但其具体作用机制有待进一步研究。氧化磷酸化是主要发生

在线粒体中的物质在氧化时释放的能量供给ADP与无机磷合成ATP的偶联反应,是机体重要的能量代谢途径。本研究氧化磷酸化通路中的多个基因的表达量均发生了下降,主要集中在细胞色素c氧化酶家族成员(cytochrome c oxidase, COX, 5A, 5B, 6A, 6B, 6C, 7A, 7B, 11, 17)和NADH脱氢酶(泛)亚基家族成员(NADH dehydrogenase (ubiquinone) subcomplex subunit, Nduf),包括NADH脱氢酶(泛)铁硫蛋白(Ndufs 2, 3, 5, 7, 8),NADH脱氢酶(泛) α 亚基(Ndufa 2, 5, 7, 8, 9)以及NADH脱氢酶(泛) β 亚基(Ndufb2, 3, 7, 9, 10, 11)。目前这些基因家族在卵母细胞发育成熟过程中的相关作用还未见单独报道,由于这些基因家族均为线粒体氧化磷酸化通路中的关键基因,本身发挥能量代谢的作用,这些基因及氧化磷酸化通路的下调,推测其功能可能与降低丙酮酸代谢通路类似,即降低相关能量代谢,阻止进一步发育,维持MII阶段的分裂阻滞状态。同时也可以减小氧化磷酸化供能反应给细胞带来的氧化损伤。

在牦牛卵母细胞上调和下调通路中发现,代谢通路均起了关键调控作用,这与GO分析结果一致。同时由于代谢通路涉及众多基因和子代谢通路,所以单独对代谢通路按上调及下调分别进行了相关通路互作分析,有趣的是,在上调和下调通路互作的结果中,有相当一部分关键调控通路是相同的,如组氨酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢及谷胱甘肽代谢,这说明上述4条代谢通路在整个代谢途径中发挥了关键调控作用。进一步分析发现这4条代谢通路中上调和下调的基因并不相同。如在上调的组氨酸代谢通路中包含两个上调基因:胺氧化酶A(amine oxidase A, MAOA)和吡哆醛依赖脱羧酶结构域蛋白1(pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1, PDXDC1),其中MAOA具有赖氨酸脱甲基酶活性,被证实同时具有组蛋白H3脱甲基酶功能,在卵母细胞基因甲基化印记方面发挥了重要作用^[43]。而在下调的组氨酸代谢通路中,包含5个下调基因:其中两个为同一基因即醛脱氢酶家族3B1(aldehyde dehydrogenase family 3 member B1, ALDH3B1),其余为细胞内非特异性二肽酶(cytosolic non-specific dipeptidase, CNDP2)、醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH2)及尿刊酸水合酶(urocanate hydratase, Y51H4A.7)。这些下调基因中醛脱氢酶类所占比例最多,醛脱氢酶是一类以多种醛类为底物的酶类,醛脱氢酶除了具有催化作用之外还

具有很多其他重要的生理功能,但在卵母细胞等生殖发育方面的作用研究还不多,目前只有在猪卵母细胞体外成熟过程的蛋白组学研究中发现醛脱氢酶家族成员D7A1的表达量有差异变化,提示是一个潜在的卵母细胞成熟标记物^[44].但在本研究中醛脱氢酶家族成员基因的表达量发生了显著下调,其具体作用还有待进一步研究.除组氨酸代谢外,另外3个甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢及谷胱甘肽代谢通路的情况与组氨酸代谢类似,通路中有部分基因上调,也有部分基因下调.此外,除上下调相同的关键代谢调控通路外,还有不同的关键调控通路,如下调中关键节点通路: 氨基氨基酸代谢通路,上调中并未出现.该通路包括了 γ -谷氨酰转移酶6(γ -glutamyltransferase 6, GGT6)、 γ -谷氨酰转移酶1(γ -glutamyltranspeptidase 1, GGT1)以及谷氨酰转移酶亚基A(glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A, QRSL1) 3个下调基因,全部与谷氨酰的代谢相关.目前有研究证实,肝功能紊乱的牛的卵泡液中的 γ -谷氨酰转移酶浓度过高,会导致卵母细胞成熟发育受阻^[45].本研究中谷氨酰转移酶相关基因的表达量也显著下降,推测有利于卵母细胞的成熟发育,但具体机制有待进一步研究.

此外,通过比较基因表达热图发现,在牦牛卵母细胞体外成熟过程中,白细胞介素家族(interleukin, IL)及干扰素家族(interferon, IFN)基因发生了显著差异表达.其中白细胞介素家族包括IL-33, 21, 34, 18, 23, 以及IL-11, 4, 13, 6受体亚基和IL-1受体相关激酶,目前越来越多的研究证实,白细胞介素及其受体在不同物种的卵泡及卵母细胞成熟发育过程的发挥了重要作用,但目前的研究多集中于少数几个白细胞介素

家族成员如IL-6, IL-7及IL-1等^[46-48],本研究结果表明,除已研究的相关IL成员外,IL家族其他成员在卵母细胞发育成熟过程中也发挥了相关作用,值得进一步研究.除IL家族基因外,干扰素家族基因也发生了显著差异表达,但有趣的是在该家族基因没有包含干扰素基因,均为干扰素诱导蛋白相关基因(*IFIT1*, *MX1*, *IFITM3*, *IFI27L1*, *ISG20*, *IFI6*)、干扰素调节子相关基因(*IFRD1*, *IRF7*, 1, 3, 4, *IRF2BP1*)及少数干扰素受体基因(*IFNGR1*, *IFNAR1*).早期研究者已发现,干扰素可在卵母细胞、胚胎等生殖细胞中表达,但具体作用及机制不清,随着研究的深入,近年来发现IFN-T, IFN- γ 等在胚胎、生殖配子发育过程中扮演了重要角色,不仅可以调控凋亡,而且可以联合白细胞介素促进胚胎及生殖配子的发育^[49,50].本研究发现,除干扰素外,干扰素家族的其他成员如干扰素诱导蛋白、干扰素调节子及干扰素受体等在卵母细胞成熟过程中也发生了差异表达,目前干扰素家族的其他相关成员在生殖发育中的研究很少,仅有少数研究表明干扰素调节子6在鱼类及蟾蜍胚胎上皮发育分化中发挥重要作用^[51],本研究结果提示干扰素家族的其他成员也积极参与了卵母细胞的成熟发育,值得进一步研究.

4 结论

本研究应用RNA-seq技术首次对牦牛GV期卵母细胞及体外成熟MII期卵母进行了转录组学测序分析,挖掘了牦牛卵母细胞发育成熟中的差异表达基因及其特色调控通路,为进一步解析牦牛卵母细胞体外成熟分子机制及牦牛繁殖的特异性提供了丰富的数据基础.

参考文献

- 1 Qiu Q, Zhang G, Ma T, et al. The yak genome and adaptation to life at high altitude. *Nat Genet*, 2012, 44: 946-949
- 2 Miao F, Guo Z, Xue R, et al. Effects of grazing and precipitation on herbage biomass, herbage nutritive value, and yak performance in an alpine meadow on the Qinghai-Tibetan Plateau. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0127275
- 3 Fu M, Chen Y, Xiong X, et al. Establishment of mammary gland model *in vitro*: culture and evaluation of a yak mammary epithelial cell line. *PLoS ONE*, 2014, 9: e113669
- 4 Guo X, Long R, Kreuzer M, et al. Importance of functional ingredients in yak milk-derived food on health of Tibetan nomads living under high-altitude stress: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54: 292-302
- 5 Long R J, Zhang D G, Wang X, et al. Effect of strategic feed supplementation on productive and reproductive performance in yak cows. *Prev Vet Med*, 1999, 38: 195-206
- 6 Lan D L, Xiong X R, Wei Y L, et al. RNA-Seq analysis of yak ovary: improving yak gene structure information and mining reproduction-related

- genes. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 925–935
- 7 Fu M, Xiong X R, Lan D L, et al. Molecular characterization and tissue distribution of estrogen receptor genes in domestic yak. *Asian Australas J Anim Sci*, 2014, 27: 1684–1690
- 8 Xiao X, Zi X D, Niu H R, et al. Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to *in vitro* maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014, 12: 30
- 9 Ouandaogo Z G, Frydman N, Hesters L, et al. Differences in transcriptomic profiles of human cumulus cells isolated from oocytes at GV, MI and MII stages after *in vivo* and *in vitro* oocyte maturation. *Hum Reprod*, 2012, 27: 2438–2447
- 10 Zi X D, Lu H, Yin R H, et al. Development of embryos after *in vitro* fertilization of bovine oocytes with sperm from either yaks (*Bos grunniens*) or cattle (*Bos taurus*). *Anim Rep Sci*, 2008, 108: 208–215
- 11 Li Y, Dai Y, Du W, et al. *In vitro* development of yak (*Bos grunniens*) embryos generated by interspecies nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*, 2007, 101: 45–59
- 12 Xiong X R, Wang L J, Zi X D, et al. Epigenetic reprogramming of Yak iSCNT embryos after donor cell pre-treatment with oocyte extracts. *Anim Reprod Sci*, 2012, 133: 229–236
- 13 Zhang P, Ni X, Guo Y, et al. Proteomic-based identification of maternal proteins in mature mouse oocytes. *BMC Genomics*, 2009, 10: 348
- 14 Andreu-Vieyra C, Lin Y N, Matzuk M M. Mining the oocyte transcriptome. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17: 136–143
- 15 Labrecque R, Sirard M A. The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges. *Mol Hum Rep*, 2014, 20: 103–116
- 16 Kocabas A M, Crosby J, Ross P J, et al. The transcriptome of human oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 14027–14032
- 17 Grøndahl M L, Borup R, Vikeså J, et al. The dormant and the fully competent oocyte: comparing the transcriptome of human oocytes from primordial follicles and in metaphase II. *Mol Hum Reproduct*, 2013, 19: 600–617
- 18 Veselovska L, Smallwood S A, Saadeh H, et al. Deep sequencing and de novo assembly of the mouse oocyte transcriptome define the contribution of transcription to the DNA methylation landscape. *Genome Biol*, 2015, 16: 209
- 19 Misirlioglu M, Page G P, Sagirkaya H, et al. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18905–18910
- 20 Katz-Jaffe M G, McCallie B R, Preis K A, et al. Transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* matured bovine MII oocytes. *Theriogenology*, 2009, 71: 939–946
- 21 Mamo S, Carter F, Lonergan P, et al. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC Genomics*, 2011, 12: 151
- 22 Bonnet A, Cabau C, Bouchez O, et al. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. *BMC Genomics*, 2013, 14: 904
- 23 Wang K, Otu H H, Chen Y, et al. Reprogrammed transcriptome in rhesus-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos. *PLoS ONE*, 2011, 6: e22197
- 24 Kim D, Pertea G, Trapnell C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, 2013, 14: R36
- 25 Roberts A, Pimentel H, Trapnell C, et al. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinformatics*, 2011, 27: 2325–2329
- 26 Kong L, Zhang Y, Ye Z Q, et al. CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: W345–W349
- 27 Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Meth*, 2008, 5: 621–628
- 28 Su G, Morris J H, Demchak B, et al. Biological network exploration with Cytoscape 3. *Curr Protoc Bioinform*, 2014, 47: 1–24
- 29 Audic S, Claverie J M. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*, 1997, 7: 986–995
- 30 Markholt S, Grøndahl M L, Ernst E H, et al. Global gene analysis of oocytes from early stages in human folliculogenesis shows high expression of novel genes in reproduction. *MHR-Basic Sci Reproduct Med*, 2012, 18: 96–110
- 31 O'Shea L C, Mehta J, Lonergan P, et al. Developmental competence in oocytes and cumulus cells: candidate genes and networks. *Syst Biol Reprod Med*, 2012, 58: 88–101
- 32 Tiwari M, Prasad S, Tripathi A, et al. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis*, 2015, 20: 1019–1025
- 33 Wasielak M, Bogacki M. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *J Reprod Dev*, 2007, 53: 419–426
- 34 Li H J, Liu D J, Cang M, et al. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim Reprod Sci*, 2009,

- 114: 89–98
- 35 Anguita B, Vandaele L, Mateusen B, et al. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. [Theriogenology](#), 2007, 67: 537–549
- 36 Grant B, Hirsh D. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell*, 1999, 10: 4311–4326
- 37 Goldstein B. An MBoC favorite: receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell*, 2012, 23: 2235
- 38 Hernández-Bello R, Bermúdez-Cruz R M, Fonseca-Liñán R, et al. Identification, molecular characterisation and differential expression of caveolin-1 in *Trichinella spiralis* maturing oocytes and embryos. [Int J Parasitol](#), 2008, 38: 191–202
- 39 Sato K, Sato M, Audhya A, et al. Dynamic regulation of caveolin-1 trafficking in the germ line and embryo of *Caenorhabditis elegans*. [Mol Biol Cell](#), 2006, 17: 3085–3094
- 40 Songsasen N, Spindler R E, Wildt D E. Requirement for, and patterns of, pyruvate and glutamine metabolism in the domestic dog oocyte *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74: 870–877
- 41 Meng X Q, Dai Y Y, Jing L D, et al. Subcellular localization of proline-rich tyrosine kinase 2 during oocyte fertilization and early-embryo development in mice. [J Reproduct Dev](#), 2016, 62: 351–358
- 42 Ohtake J, Sakurai M, Hoshino Y, et al. Expression of focal adhesion kinase in mouse cumulus-oocyte complexes, and effect of phosphorylation at Tyr397 on cumulus expansion. [Mol Reprod Dev](#), 2015, 82: 218–231
- 43 Ciccone D N, Su H, Hevi S, et al. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. [Nature](#), 2009, 461: 415–418
- 44 Ellederova Z, Halada P, Man P, et al. Protein patterns of pig oocytes during *in vitro* maturation. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1533–1539
- 45 Sarentonglaga B, Ogata K, Taguchi Y, et al. The developmental potential of oocytes is impaired in cattle with liver abnormalities. [J Reprod Dev](#), 2013, 59: 168–173
- 46 Banerjee J, Sharma R, Agarwal A, et al. IL-6 and mouse oocyte spindle. [PLoS ONE](#), 2012, 7: e35535
- 47 Cheng Y, Yata A, Klein C, et al. Oocyte-expressed interleukin 7 suppresses granulosa cell apoptosis and promotes oocyte maturation in rats. [Biol Reproduct](#), 2011, 84: 707–714
- 48 Martoriati A, Caillaud M, Goudet G, et al. Inhibition of *in vitro* maturation of equine oocytes by interleukin 1 beta via specific IL-1 receptors. [Reproduction](#), 2003, 126: 509–515
- 49 Saugandhika S, Sharma V, Malik H, et al. Expression and purification of buffalo interferon-tau and efficacy of recombinant buffalo interferon-tau for *in vitro* embryo development. [Cytokine](#), 2015, 75: 186–196
- 50 Lee H J, Kim J Y, Park J E, et al. Induction of Fas-mediated apoptosis by interferon- γ is dependent on granulosa cell differentiation and follicular maturation in the rat ovary. *Dev Reprod*, 2016, 20: 315–329
- 51 Sabel J L, d’Alençon C, O’Brien E K, et al. Maternal interferon regulatory factor 6 is required for the differentiation of primary superficial epithelia in *Danio* and *Xenopus* embryos. [Dev Biol](#), 2009, 325: 249–262

Differential transcriptome analysis of yak oocytes *in vitro* maturation

LAN DaoLiang¹, XIONG XianRong², CHENG YaBing², MIPAM Tserang-donko¹, AI Yi¹ & LI Jian¹

¹ Institute of Tibetan Plateau Research, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

² College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Sound development and maturation of oocytes serve as important indicators in evaluating female fertility. Development and maturation of oocytes are complex processes involving transcriptional regulation of a large number of genes. Transcriptome studies are crucial in understanding such processes. In this study, oocytes obtained from yak—a unique bovine found in high-altitude areas—were used as research subject. RNA-seq was applied in comparative transcriptome analysis of yak oocytes, which were arrested at the germinal vesicle (GV) stage and metaphase II (MII) stage after *in vitro* maturation (IVM). After deep sequencing, 51380686 clean reads totaling 4624261740 bp were obtained from a GV yak oocyte library, whereas 50303412 clean reads with a total of 4527307080 bp were obtained from a MII yak oocyte library. Gene coverage statistics showed that 16719 and 16339 yak genes were mapped in GV and MII libraries, respectively. Comparative transcriptome analysis of oocytes at MII and GV stages revealed 4767 differentially expressed genes (DEGs), including 1418 upregulated and 3349 downregulated genes. Gene Ontology (GO) functional classification analysis showed that these DEGs are closely related to “metabolism” and other biological processes; moreover, molecular events related to molecular binding function are active. The interaction analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) pathways involved DEGs were conducted according to two parts of upregulation and downregulation respectively. Results of analysis of upregulated DEGs revealed that apoptosis, endocytosis, and metabolic pathways are key regulatory pathways. By contrast, downregulated genes are involved in metabolic pathways, pyruvate metabolism, focal adhesion, and oxidative phosphorylation. Therefore, metabolic pathways play critical regulatory roles in upregulation and downregulation of pathways. Further analysis showed that histidine, glycine, serine, and threonine metabolism; glyoxylic acid and dicarboxylic acid metabolism; and glutathione metabolism are key control nodes in entire metabolic pathways. Interestingly, immune-related interleukins and interferon family genes were also differentially expressed in IVM of yak oocytes. The present study provides basis for analyzing molecular mechanism of IVM of yak oocytes and for further understanding specificity of yak reproduction.

yak, oocyte, germinal vesicle, metaphasen II, *in vitro* maturation, RNA-Seq, transcriptome, molecular mechanism

doi: [10.1360/N052017-00017](https://doi.org/10.1360/N052017-00017)