

王志强,俞红贤,荆海霞,等.高原习服黄牛脑组织不同部位 *SLC25A6* mRNA 绝对定量分析[J].江苏农业科学,2014,42(8):39-42.

高原习服黄牛脑组织不同部位 *SLC25A6* mRNA 绝对定量分析

王志强,俞红贤,荆海霞,张勤文,魏青,梁林,牛亮

(青海大学,青海西宁 810016)

摘要:为研究 *SLC25A6* mRNA 在高原习服黄牛脑组织中的表达量对能量利用的影响,建立用于 *SLC25A6* 基因绝对定量的标准曲线;标准曲线扩增效率为 $E = 104.9\%$,回归系数 r 值为 -0.996 ,斜率为 -3.210 ,溶解曲线峰值单一;绝对定量检测值表明,高原习服黄牛脑组织各部位 *SLC25A6* mRNA 表达量总体差异有统计学意义,*SLC25A6* mRNA 检测值从高至低依次为小脑、海马、枕叶、额叶、颞叶、顶叶,小脑 *SLC25A6* 基因表达量显著高于其他各组织;顶叶表达量最低,小脑表达量为顶叶表达量的 2.79 倍;额叶、颞叶、顶叶之间差异,枕叶、海马之间差异均无统计学意义。结果表明,高原习服黄牛脑组织中大脑耗能强度可能最大,细胞活动旺盛;相反顶叶耗能强度最低。

关键词:高原习服黄牛;脑组织;线粒体;*SLC25A6* 基因;ANT3;绝对定量

中图分类号: S852.16⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0039-03

青藏高原平均海拔在 4 500 m 左右,大气压及氧分压较低,高寒干燥、紫外辐射强度大,特殊的地理及气候条件造就了特殊的生态环境;由于独特的高原环境长期影响,使得土著动物及人类在机体各个方面形成了对高原环境的低氧适应。机体获取的氧气最终通过线粒体被利用,糖类、脂肪、氨基酸在细胞质基质中完成糖酵解过程后,通过线粒体的三羧酸循环及氧化磷酸化途径,利用组织氧生成三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),从而为机体提供能量。

动物及人由低海拔地区进入高海拔地区后,机体会通过代偿等方式来适应低氧环境,从而减轻缺氧初期出现的症状,促使机体产生高原习服。研究表明,哺乳动物中枢神经系统对氧分压的改变极为敏感,脑组织不同区域会通过分子、细胞等各个水平的改变来适应低氧^[1]。但急性低氧暴露仍会损伤脑组织,造成神经细胞出现散在性坏死等现象^[2]。急性重复性低氧刺激可使脑组织线粒体功能受到抑制,同时提高脑组织 ATP 相对水平^[3]。低氧预适应能够减轻脑组织缺血后海马细胞凋亡数^[4],提高线粒体的膜电位、减少线粒体活性氧及一氧化氮的产生^[5],并通过降低线粒体通透性转变的概率来减少细胞凋亡数^[6]。

研究表明,线粒体内膜上的腺苷酸转运体(adenine nucleotide translocator, ANT)能够促进胞质和线粒体之间二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)与 ATP 的交换,使能量代谢顺利进行;而且 ANT 的 4 种异构体均与细胞凋亡途径有

关^[7],由 *SLC25A6* 基因编码的线粒体内膜蛋白 ANT3 表达量增高可引起线粒体膜通透性的改变,从而诱发细胞凋亡^[-8-9]。

应用绝对定量的方法,对高原习服黄牛 *SLC25A6* mRNA 在脑组织不同部位的表达情况进行研究,以期揭示低氧环境对高原习服黄牛脑组织不同部位能量代谢的影响,为哺乳动物低氧适应的分子机制及高原医学积累基础资料。

1 材料与与方法

1.1 动物来源及样品处理

于青海省海晏县(海拔 3 000 m 左右)选取临床健康成年高原习服黄牛,颈动脉放血致死,迅速取大脑额叶、颞叶、顶叶、枕叶、海马及小脑皮层样本,将其置于液氮中低温保存,用于提取总 RNA。

1.2 主要仪器与试剂

低温高速离心机、普通 PCR 扩增仪、核酸电泳仪、紫外凝胶成像仪、核酸蛋白检测仪、real-time PCR 扩增仪;2 × *Taq* PCR MasterMix(含染料)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,均购自北京索莱宝科技有限公司;TaKaRa SYBR Premix Ex *Taq* II、PMD[®] 19-T Vector,均购自宝生物工程(大连)有限公司;RNAsimple Total RNA Kiti 试剂盒、FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒,均购自天根生化科技(北京)有限公司、质粒 DNA 小量抽提试剂盒、*EcoR* I,均购自上海生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 设计并合成引物 通过美国国家生物技术信息中心查询普通牛(*Bos taurus*) *SLC25A6* 基因的 mRNA 序列(NM_174660.2),根据其序列利用 DNAMAN、Primer5 设计特异性引物(表 1),预计扩增目的基因片段长度为 95 bp。引物设计后交由上海生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.2 总 RNA 的提取及 RT-PCR 反应 利用 RNAsimple Total RNA Kiti 试剂盒,按照说明书步骤,提取高原习服黄牛总 RNA。使用 BIO-RAD 核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度及纯

收稿日期:2014-04-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260588);青海省自然科学基金(编号:2011-Z-901)。

作者简介:王志强(1988—),男,河南焦作人,硕士研究生,主要从事高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系研究。E-mail: wzqhu@163.com。

通信作者:荆海霞,博士,副教授,主要从事高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系研究。E-mail: jinghaixial@163.com。

表1 引物相关信息

类型	引物	长度 (bp)	温度 (°C)
Forward	5' - ACGACGAGCTCAAGAAGGTC - 3'	20	59.60
Reverse	5' - ATTTCTCGAAGTCGGTGGTC - 3'	20	59.14

度,同时利用紫外凝胶成像仪对 RNA 凝胶电泳结果进行检测。利用 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒,按照说明书步骤进行反转录。反转录产物用于制备绝对定量标准品及定量 PCR 扩增反应。

1.3.3 绝对定量标准品的制备

1.3.3.1 *SLC25A6* 基因片段扩增 以反转录产物为模板进行 PCR 扩增反应,PCR 反应加样体系如下:模板 1 μL ,浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物各 0.5 μL , ddH₂O 10.5 μL , Solarbio 2 \times Taq PCR MasterMix (含染料) 12.5 μL 。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min 充分延伸。产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3.2 克隆 *SLC25A6* 基因片段并验证 利用 Solarbio 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行 PCR 产物纯化,纯化产物与 PMD[®] 19-T Vector 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接 1 h。后经 42 $^{\circ}\text{C}$ 热击及冰浴等反应与 *E. coli* DH5 α 感受态细胞进行连接,将菌液均匀涂布于含氨苄青霉素、半乳糖苷酶和异丙基硫代半乳糖苷的 LB 固体培养基平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 12 h。挑取白色阳性单菌落,接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,振荡培养 12 h。利用通用引物对菌液进行 PCR 初步鉴定后,对阳性转化子进行测序以进一步验证。

1.3.3.3 质粒 DNA 抽提、酶切及纯化 利用质粒 DNA 小量抽提试剂盒对鉴定正确的阳性菌液进行质粒提取。通过 *Eco*R I 对抽提的质粒进行酶切 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,65 $^{\circ}\text{C}$ 20 min 使酶失活。将酶切好的质粒 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,并利用 solarbio 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对目标 DNA 条带进行回收纯化,从而去除酶切不完全的环状质粒。

1.3.3.4 质粒 DNA 浓度测定及梯度稀释 利用核酸蛋白检测仪对纯化后的线性质粒进行浓度测定。根据公式:质粒拷贝数(拷贝数/ μL) = 6.02×10^{23} (拷贝数/mol) \times 质粒浓度(g/ μL)/质粒分子量(g/mol),得出质粒拷贝数,然后将质粒进行 10 倍梯度稀释,分别稀释成 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ 拷贝数/ μL

的 7 个梯度,作为标准品。

1.3.4 real-time PCR 反应 real-time PCR 扩增反应的加样体系如下:模板 2 μL ,浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物各 1 μL , ddH₂O 8.5 μL , SYBR Premix Ex Taq II 12.5 μL 。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。首先将反转录产物 cDNA 上机后进行 1 个循环,使 cDNA 由单链变为双链,后与标准品一同进行 40 个循环。待测样品设置 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 检测结果

利用 BIO-RAD 核酸蛋白检测仪测定 RNA 纯度及浓度,测定结果见表 2,各项指标均符合要求。凝胶电泳检测结果见图 1,泳道自左至右以此为:额叶、颞叶、顶叶、枕叶、小脑及海马,18S 及 28S 条带清晰,并无降解现象出现。

表2 RNA 纯度及浓度

部位	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
额叶	2.040	1.224
颞叶	2.035	1.156
顶叶	2.036	1.588
枕叶	2.038	0.856
小脑	2.029	1.696
海马	2.000	0.632

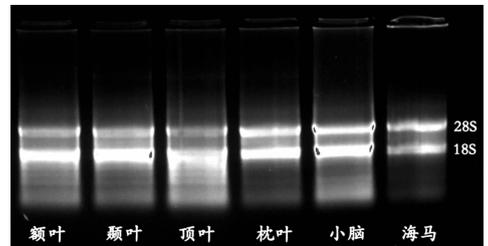


图1 RNA凝胶电泳检测结果

2.2 绝对定量标准品制备

SLC25A6 基因扩增片段在 100 bp 附近有条带,与预计长度相符(图 2-A);阳性菌液 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,在 200 bp 与 300 bp 之间有较亮的条带,片段大小与预期结果 240 bp 相符(图 2-B),对阳性转化子进行测序验证后进一步证实质粒构建成功;对质粒进行酶切后的凝胶电泳检测结果如图 2-C。

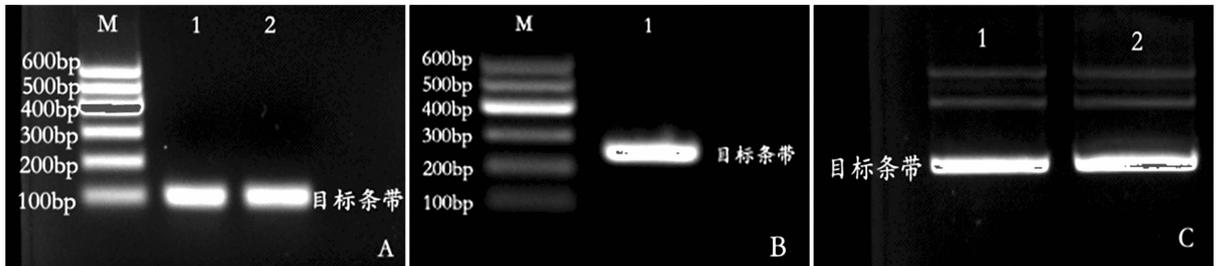
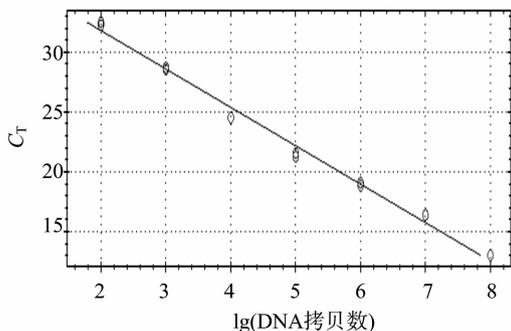
A—*SLC25A6*基因片段扩增; B—阳性菌液PCR验证; C—质粒酶切后凝胶电泳检测

图2 PCR 扩增及质粒酶切结果

2.3 绝对定量标准曲线及溶解曲线

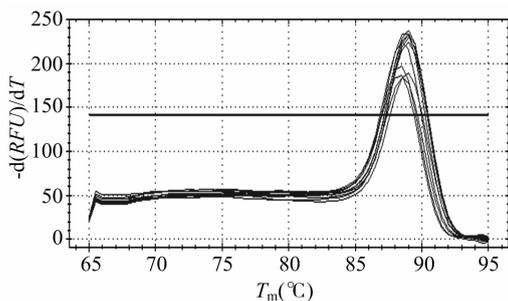
以横坐标表示 DNA 拷贝数的对数,纵坐标表示 C_T 值

(图 3)。标准曲线扩增效率 $E = 104.9\%$,回归系数 $r = -0.996$,斜率为 -3.210 ,结果表明,标准品浓度在 10 倍梯度

图3 *SLC25A6* 基因 real-time PCR 标准曲线

稀释后,起始模板浓度与 C_T 值之间具有良好线性关系。

溶解曲线(图4)峰值单一,PCR产物 T_m 值相对集中,说明引物具有较好的特异性,PCR过程中无非特异性扩增,扩增产物无二聚体出现。结果表明,本研究建立的标准曲线能够准确反映目的基因片段的扩增。

图4 *SLC25A6* 基因 real-time PCR 溶解曲线

2.4 高原习服黄牛脑组织内 *SLC25A6* 基因 mRNA 表达量

通过反转录试剂盒进行反转录时,20 μL 的反转录体系中共加入了 1 μg 的总 RNA,而进行 Real-time PCR 时,反应体系中加入 2 μL 反转录产物。根据标准曲线中 C_T 值与基因拷贝数的关系,换算出 *SLC25A6* 基因在总 RNA/ μg 中的绝对表达量。高原习服黄牛脑组织内 *SLC25A6* 基因 mRNA 表达量见表3、图5。高原习服黄牛脑组织中小脑 *SLC25A6* 基因表达量最高,拷贝数均值为 3.683×10^7 拷贝数/ μg ,显著高于其他各组织;顶叶表达量最低,小脑表达量为顶叶表达量的 2.79 倍;颞叶与枕叶、海马表达量均值之间有统计学意义;顶叶与枕叶、海马表达量均值之间有统计学意义;额叶、颞叶、顶叶均值之间差异,枕叶与海马之间差异均无统计学意义。

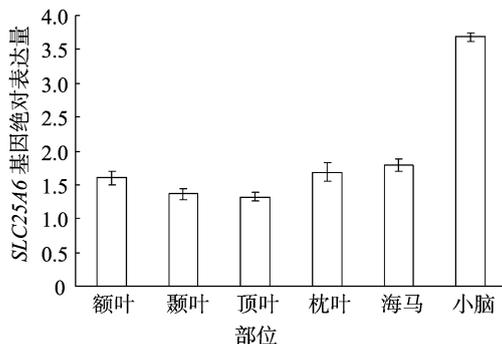
表3 高原习服黄牛脑组织 cDNA 样品中 *SLC25A6* 基因表达量

脑组织部位	<i>SLC25A6</i> 基因表达量 ($\times 10^7$ 拷贝数/ μg)
额叶	1.599 \pm 0.186bc
颞叶	1.362 \pm 0.128c
顶叶	1.320 \pm 0.107c
枕叶	1.687 \pm 0.232b
海马	1.789 \pm 0.160b
小脑	3.683 \pm 0.113a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

脑组织对氧需求量很大,低氧环境中,脑组织能够极大限

图5 高原习服黄牛脑组织不同部位 *SLC25A6* 基因表达量

度地利用氧,并产生尽可能多的能量;脑组织的缺氧适应能够使损坏脑细胞的不良因素得到抑制或调整,使脑组织在不良环境下度过危险期^[10]。ANT 在能量代谢中发挥着重要作用,本试验通过测定 *SLC25A6* 基因在高原习服黄牛脑组织中的表达情况,间接反映脑组织不同部位在高原低氧习服情况下对能量的利用情况。

由于反转录产物 cDNA 为单链,而标准品质粒为双链,所以进行 Real-time PCR 时,先将 cDNA 进行 1 个循环的扩增,使其变为双链,后与标准品一同进行 40 个循环,以避免单链与双链之间的差异^[11]。试验结果表明,标准曲线的扩增效率为 $E = 104.9\%$,回归系数 $r = -0.996$,斜率为 -3.210 ,溶解曲线峰值单一。从这些参数可以看出标准曲线线性关系良好,引物特异性较强。结果能够真实反映出 *SLC25A6* 基因在高原习服黄牛脑组织中的实际拷贝数。

本研究结果表明,在高原习服黄牛脑组织中 *SLC25A6* 基因的表达量从高到低依次为小脑、海马、枕叶、额叶、颞叶、顶叶,小脑表达量显著高于其组织,小脑 *SLC25A6* 基因表达量为额叶表达量的 2.79 倍。顶叶消耗能量强度较低,细胞能量代谢较弱,小脑消耗能量强度较大,细胞能量代谢较强。可以推断顶叶为低氧环境敏感区域,小脑抗低氧能力较强。

参考文献:

- [1] Peña F, Ramirez J M. Hypoxia-induced changes in neuronal network properties[J]. *Molecular Neurobiology*, 2005, 32(3): 251-283.
- [2] 胡定煜,李 淳,戴荣继,等. 常压低氧下 Wistar 大鼠脑组织中 *HIF-1 α* 表达与脑损伤[J]. *化学通报*, 2010, 73(11): 1030-1034.
- [3] 谢胜男,李 昕,李尧华,等. 急性重复低氧对小鼠脑组织血氧饱和度和线粒体功能以及 ATP 水平的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(4): 755-758.
- [4] 齐 晶,闵连秋. 低氧预处理对缺血脑组织 *p53* 表达的影响[J]. *牡丹江医学院学报*, 2008, 29(1): 34-36.
- [5] Plotnikov E Y, Kazachenko A V, Vyssokikh M Y, et al. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney[J]. *Kidney International*, 2007, 72(12): 1493-1502.
- [6] Hausenloy D J, Yellon D M, Mani-Babu S, et al. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition[J]. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2004, 287(2): 841-849.

宋波,陈龙正,徐海,等. 有棱丝瓜与普通丝瓜种间杂种后代的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):42-44.

有棱丝瓜与普通丝瓜种间杂种后代的 ISSR 分析

宋波¹, 陈龙正¹, 徐海¹, 郑涛², 袁希汉¹

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏南京 210014; 2. 四川省成都市新津县农村发展局, 四川成都 611400)

摘要:应用 ISSR 技术对有棱丝瓜 [*Luffa acutangula* (L.) Roxb.] 与普通丝瓜 [*Luffa cylindrica* (L.) Roem.] 及其种间杂种 F₁、F₂ 代的遗传差异性进行了研究。结果表明: 供试材料基因组 DNA 间具有很高的多态性, 双亲的遗传相似系数仅为 0.395, F₁ 的条带主要表现为双亲互补带型, F₁、F₂ 并没有明显向双亲任何一方遗传的倾向, F₂ 的遗传变异较大。

关键词:有棱丝瓜; 普通丝瓜; 种间杂种; ISSR

中图分类号: S642.403.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0042-03

有棱丝瓜 [*Luffa acutangula* (L.) Roxb.] 与普通丝瓜 [*Luffa cylindrical* (L.) Roem.] 是我国普遍种植的 2 个丝瓜栽培种。有棱丝瓜与普通丝瓜在花色、花期以及果实性状等农艺性状方面存在较大差异, 同时二者具有许多互补的优良性状, 如普通丝瓜的果皮碰擦后或果肉烹饪后均易变褐, 而有棱丝瓜的果肉在烹饪后不变色, 保持翠绿, 口感清香。有棱丝瓜开花对日照长度要求严格, 早熟性较差, 产量不高, 普通丝瓜一般早熟性好, 产量高, 可通过种间杂交, 利用彼此的优良性状对二者进行有目的的改良^[1-2]。目前国内外关于丝瓜种间杂交研究集中在杂交技术、农艺性状等方面^[1-4], 关于分子层面的研究未见报道。本研究对有棱丝瓜与普通丝瓜及其种间杂种 F₁、F₂ 进行 ISSR 分析, 从 DNA 分子水平分析亲本及杂交后代间的遗传差异性及其相似性, 旨在为揭示丝瓜种间杂交后代的遗传特性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为有棱丝瓜(P₁)、有棱丝瓜×普通丝瓜(F₁)、普通丝瓜(P₂)、20 个 F₂ 单株, 共 23 份材料。3 叶期取幼苗嫩叶, 用 CTAB 法提取基因组 DNA。

收稿日期: 2013-10-23

基金项目: 江苏省科技支撑计划(编号: BE2012323); 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(11)1002]。

作者简介: 宋波(1981—), 男, 四川乐山人, 硕士, 助理研究员, 从事十字花科和瓜类蔬菜研究。E-mail: anybody119@sina.com。

通信作者: 袁希汉, 研究员, 从事十字花科和瓜类蔬菜研究。E-mail: xhyuan258@163.com。

1.2 ISSR 分析

ISSR 反应体系共 20 μL。在灭菌的 0.2 mL PCR 薄壁管中依次加入下列组分: 双蒸水 11.8 μL, 10 × Buffer 溶液 2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 溶液 2 μL, 2 mmol/L dNTPs 2.5 μL, 10 mmol/L 20 碱基随机引物 0.5 μL, TaqDNA 聚合酶 1 U, 20~40 ng 模板 DNA 1 μL(以上各反应组分均购于上海生工生物工程技术服务有限公司)。稍加离心混匀后, 在 PTC-100 PCR 仪中扩增。反应程序: 预变性 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s, 55.8 °C, 45 s, 72 °C, 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分离 1.5 h, 电压为 5 V/cm, 0.5 μg/L 溴化乙锭染色, 用上海培青凝胶成像系统进行拍照分析。扩增片段的分子大小标记是 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus。从 70 个引物中筛选出重复性好、适宜于各供试材料的 6 个引物 (ISSR17、ISSR22、ISSR23、ISSR26、ISSR33、ISSR59) 进行 ISSR 分析。

1.3 数据处理

每个样品的扩增条带按有或无记录, 有带赋值为 1, 无带赋值为 0, 按 Nei 的方法^[5] 计算材料间的相似系数 (genetic similarity):

$$GS(i, j) = 2N(i, j) / [N(i) + N(j)]。$$

式中: GS(i, j) 是遗传相似系数, N(i, j) 是材料 i, j 共同具有的带数; N(i) 是材料 i 的带数, N(j) 是材料 j 的带数。

2 结果与分析

2.1 供试材料的 ISSR 分析

筛选出的 6 个 ISSR 引物能够获得清晰条带, 反应稳定, 能够用于扩增试验。23 份供试材料扩增的带数总计 652 条, ISSR 片段长度为 500~2 900 bp, 共产生 38 条扩增带, 其中 34

[7] Galleme C, Touat Z, Chen Z X, et al. The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010, 42(5): 623-629.

[8] 兰春慧, 房殿春, 樊丽琳, 等. 线粒体内膜蛋白 ANT 在幽门螺杆菌致胃癌细胞凋亡中的表达[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2009, 18(2): 100-102.

[9] Zamora M, Granell M, Mampel T, et al. Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells [J]. FEBS Letters, 2004, 563(1/2/3): 155-160.

[10] 崔秀玉, 吕国蔚. 脑缺氧和脑缺氧适应时能量代谢的变化[J]. 首都医科大学学报, 1996, 17(2): 153-155.

[11] 李丽, 赵成萍, 李宏, 等. 质粒制备绝对定量 PCR 标准曲线方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(6): 1157-1162.