

庞坤,朱松波,何敏,等.小鼠乳腺泌乳过程中氨基酸转运载体 *Slc7a1*、*Slc7a5* 基因 mRNA 表达分析[J].江苏农业科学,2014,42(7):37-39.

小鼠乳腺泌乳过程中氨基酸转运载体 *Slc7a1*、*Slc7a5* 基因 mRNA 表达分析

庞坤¹,朱松波²,何敏¹,郭晓秋¹,汤丽¹,刘佳¹,韩立强³

(1. 信阳农林学院动物科学系,河南信阳 464000; 2. 郑州市农林科学研究所,河南郑州 450005;

3. 河南农业大学牧医工程学院,河南郑州 450002)

摘要:通过试验饲养泌乳小鼠,每天测量母鼠的体质量和采食量,在不同泌乳阶段采集乳腺组织,提取 RNA,反转录成 cDNA,荧光定量 PCR 分析氨基酸转运载体 *Slc7a1*、*Slc7a5* 基因 mRNA 的表达差异。结果表明,随着泌乳的开始,母鼠的采食量逐渐增加;*Slc7a1* 基因 mRNA 的表达量在泌乳中期达到最高,为妊娠期的 1.94 倍($P < 0.05$),而在其他时期差异不显著;*Slc7a5* 基因 mRNA 的表达量在整个泌乳阶段都显著增加,与妊娠期相比,在泌乳 12 d 时的表达量达到最高,为妊娠期的 15.93 倍($P < 0.01$)。说明 *Slc7a5* 载体可能在乳腺氨基酸转运中的作用更重要。

关键词:小鼠;乳腺;氨基酸转运载体;基因表达;妊娠阶段;泌乳期

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0037-02

氨基酸是构成动物机体蛋白质的主要成分,同时也参与细胞内很多重要的代谢反应。在泌乳过程中,哺乳动物乳腺需要从血液中摄取大量的氨基酸来满足乳蛋白的合成需要,1 头奶牛 1 d 大约需要 1 kg 的氨基酸来合成乳蛋白^[1-2]。氨基酸的转运主要是通过多种氨基酸转运载体从血液循环系统中获得的,不同的转运系统具有不同的离子和底物特异性。这些转运载体主要定位在乳腺上皮细胞的基底膜上^[3],根据转运氨基酸底物酸碱性的不同分为酸性、中性和碱性氨基酸转运载体^[4],其中,*Slc7a1* (solute carrier family 7 member 1)、*Slc7a5* (solute carrier family 7 member 5)均属于碱性氨基酸转运载体,通过细胞质膜的化学-电偶联、逆碱性氨基酸浓度梯度向细胞内聚集碱性氨基酸。在大鼠的乳腺中发现氨基酸转运载体 *LAT-1*、*CAT-1* 在泌乳阶段 mRNA 的表达分别升高了 20、12 倍^[5];但是,由于氨基酸转运载体多,一些转运载体是否在妊娠泌乳阶段表达依然还不清楚。因此,本试验采集小鼠的乳腺组织,研究在乳腺泌乳的不同时期乳腺组织氨基酸转运载体 *Slc7a1*、*Slc7a5* 的 mRNA 表达,为生产实践中针对泌乳营养供应的指导打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Trizol、cDNA 反转录试剂盒试剂盒等,购于宝生物工程(大连)有限公司;SYBR PCR Master mix,购于 TOYOBO 公司;其他试剂为分析纯。试验用昆明小白鼠,购于河南省实验动物中心;商品化颗粒饲料和全价营养粉料,购于河南省实验动

物中心,其基本成分为粗蛋白 21.86%、粗脂肪 4.11%、粗灰分 4.60%、水分 13.36%。仪器有 NanoDrop-1000 微量核酸蛋白检测仪(赛默飞世尔科技公司)和荧光定量 PCR 仪(ABI7300)。

1.2 方法

1.2.1 试验动物与样品采集 试验采用 24 只雌性和 12 只雄性昆明小鼠进行同笼饲养;同笼后,检查雌性小鼠阴道栓,阴道栓明显的小鼠作为妊娠鼠单独饲养,直至分娩;分娩后,调整每只母鼠带 8 只幼鼠。在泌乳阶段,每天测量母鼠的采食量和体质量,分别在母鼠妊娠阶段的 18 d(P18)和泌乳的 6 d(L6)、12 d(L12)、18 d(L18)断头处死泌乳母鼠($n=6$),迅速剪取母鼠的乳腺组织,放入液氮速冻,保存于 -80°C 冰箱中。

1.2.2 设计引物 根据小鼠转运载体 *Slc7a1*、*Slc7a5* 的核苷酸序列设计引物跨越内含子,由宝生物工程(大连)有限公司合成(PAGE 级),同时,采用 3 个管家基因作为内参。引物及基因具体注释见表 1。

1.2.3 合成 cDNA 取 0.3~0.5 mg 乳腺组织,使用 Trizol 进行 RNA 提取,溶解于 30 μL DEPC 水中备用。反转录体系为 DEPC 水 6.5 μL 、dNTP 4 μL 、50 pmol/L 5 \times AMV Buffer 4 μL 、oligo d(T)₁₈ 1 μL 、40 U/mL Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL 、Total RNA 2 μL 、5 U/mL AMV Reverse Transcriptase XL2 μL 。反应程序为:25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 后冰浴 2 min 得到 cDNA,以此为模板进行荧光定量 PCR 扩增目的基因。

1.2.4 荧光定量 PCR 分别取妊娠期和泌乳期样本 cDNA 稀释 10 倍,进行定量 PCR,反应体系为:cDNA 2 μL ,上下游引物(20 pmol/L)各 0.25 μL ,2 \times SYBR PCR Master mix 10 μL ,nuclease-free water 7.5 μL ,总体积 20 μL ,在荧光定量 PCR 仪上进行反应。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,共 40 个循环。根据溶解曲线判断产物特异性,用软件计算标准曲线斜率(k)和相关系数,并计算扩增效率 $E=10^{-1/k}$ (表 1)。

收稿日期:2013-10-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201869);河南省重大科技攻关(编号:122101110100)。

作者简介:庞坤(1977—),女,河南永城人,硕士,讲师,主要从事动物生理生化研究。E-mail: xinyangpangkun@sina.com。

通信作者:韩立强(1979—),男,河南新乡人,博士,副教授,主要从事泌乳生物学研究。E-mail: qlhan2001@126.com。

表 1 荧光定量 PCR 引物信息

| 基因 | 引物(5'→3') | 扩增子长度 (bp) | 基因序号 | 相关 系数 | 扩增 效率 |
|---------------|---|---------------|--------------|----------|----------|
| <i>Rpl13A</i> | F:CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA;R:CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA | 168 | NM-009438 | 0.98 | 1.95 |
| <i>Gapdh</i> | F:TGTGTCCGTCGTGGATCTGA;R:TTGCTGTGAAGTCGCAGGAG | 150 | NM-001001303 | 0.99 | 1.97 |
| <i>Hprt</i> | F:CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA;R:CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA | 86 | NM-013556 | 0.99 | 2.01 |
| <i>Slc7a1</i> | F:AGCAGCCAAGGTTGGACA;R:TGCATGAGAGCATCAGGCAGTAG | 129 | NM_007513 | 0.99 | 2.13 |
| <i>Slc7a5</i> | F:CCAAGGCTGCTGTCAGTAGCA;R:TGTCGTCCATCTGTCAGTCCAAG | 127 | NM-011978 | 0.99 | 2.24 |

1.2.5 *Slc7a1*、*Slc7a5* 相对表达倍数的计算^[6] 以小鼠 3 个看家基因 *Gapdh*、*Rpl13A*、*Hprt* 为内参基因,计算泌乳期乳腺组织 L6、L12、L18 的氨基酸转运载体 *Slc7a1*、*Slc7a5* 基因 mRNA 表达差异,通过公式计算相对表达倍数: $Ratio = \frac{E_{target}^{\Delta Ct, target (control - sample)}}{GEOMEAN(E_{reference}^{\Delta Ct, ref (control - sample)})}$ 。其中, *Ratio* 为基因相对表达量; E_{target} 为目的基因扩增效率; $E_{reference}$ 为内参基因扩增效率, $Ct_{control}$ 为对照组的 *Ct* 值, Ct_{sample} 为样品组的 *Ct* 值。数据采用 SPSS 10.0 软件 ANOVA 中 Dunnet 程序进行两两比较,统计学性检。

2 结果与分析

2.1 母鼠在不同泌乳阶段体质量和采食量的变化

由图 1 可见,母鼠的体质量在开始阶段变化不大,泌乳后 1 d 母鼠平均体质量为 43.77 g;随着泌乳时间的延长,母鼠的体质量略有增长,在泌乳后的 6、12、18 d 母鼠体质量分别为 44.06、47.53、48.34 g;母鼠的采食量则随着泌乳时间的延长,一直呈现增加趋势,在泌乳后的 1 d,母鼠平均采食量为 10.23 g,到 6、12、18 d,平均采食量分别为 16.96、19.64、23.67 g。

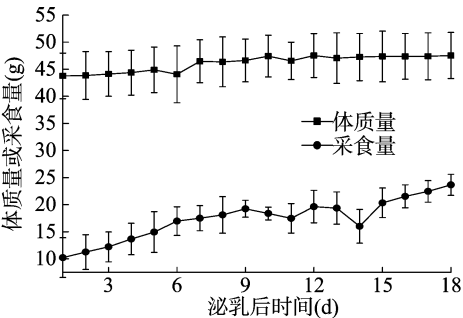


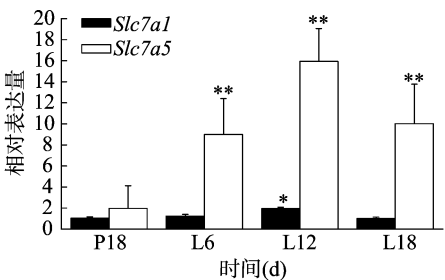
图 1 不同泌乳阶段母鼠体质量及采食量的变化

2.2 氨基酸转运载体 *Slc7a1*、*Slc7a5* 基因 mRNA 的表达变化

由图 2 可见,与对照组 (P18) 相比, *Slc7a1*、*Slc7a5* 基因的 mRNA 量表达随着泌乳期的延长,均呈先上升后下降的趋势; *Slc7a1* 基因的 mRNA 在泌乳前期 (L6) 表达量为对照组的 1.23 倍 ($P>0.05$),在泌乳中期 (L12) 和后期 (L18) 的表达量分别为妊娠期的 1.94 倍 ($P<0.05$) 和 1.04 倍 ($P>0.05$); *Slc7a5* 基因的 mRNA 表达量与妊娠期相比差异极显著,在泌乳前期 (L6) 表达量为妊娠期的 8.98 倍 ($P<0.01$),而在泌乳中期 (L12) 表达量为 15.93 倍 ($P<0.01$),泌乳晚期 (L18) 为 10.01 倍 ($P<0.01$)。

3 小结

哺乳动物在泌乳阶段为养育下一代,乳腺需要大量的氨基酸来合成乳蛋白。因此,随着泌乳的开始,乳腺需要从血液



*表示基因表达差异显著($P<0.05$); **表示基因表达差异极显著($P<0.01$)

图 2 不同泌乳阶段母鼠乳腺组织 *Slc7a1*、*Slc7a5* 基因 mRNA 的表达差异

中摄取大量的氨基酸,泌乳母鼠的采食量就会逐渐增加,这也符合母鼠的泌乳需要。母鼠的体质量在泌乳期间增加并不是很明显,在泌乳后期基本上保持恒定(47~48 g)。相关研究发现,动物机体流经乳腺血液的动静脉氨基酸具有一定的浓度差^[7],在转运过程中,转运载体基因的表达对氨基酸的转运起到关键性作用。研究表明,在泌乳期,大鼠乳腺中 SLCA2 等载体的基因表达呈现有规律的变化^[8-9];一些氨基酸转运载体如谷氨酰胺转运载体在乳腺中的表达受到日粮的调控^[10]。本试验发现, *Slc7a1*、*Slc7a5* 作为 2 种氨基酸转运载体,在不同的泌乳阶段基因表达具有很大的差异,其中, *Slc7a1* 基因 mRNA 的表达量除了泌乳中期 (L12) 有显著增加,其他时期与妊娠期 (P18) 相比并没有显著差异, *Slc7a5* 基因 mRNA 的表达量在整个泌乳阶段都有显著增加,最高时达到妊娠期 (P18) 基因 mRNA 表达的 15 倍。这一结果说明在泌乳阶段,各种氨基酸转运载体的基因表达规律并不相同, *Slc7a5* 转运载体可能在乳腺转运氨基酸方面的作用更加重要。

参考文献:

[1]Shennan D B,Peaker M. Transport of milk constituents by the mammary gland[J]. Physiological Reviews,2000,80(3):925-951.
[2]Tovar A R,Becerril E,Hernández-Pando R,et al. Localization and expression of BCAT during pregnancy and lactation in the rat mammary gland[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,2001,280(3):E480-E488.
[3]Millar I D,Shennan D B. The regulation of Na⁺-dependent anionic amino acid transport by the rat mammary gland[J]. Biochimica et Biophysica Acta,1999,1421(2):340-346.
[4]魏宗友,徐柏林,郝志敏,等. 动物细胞碱性氨基酸转运载体的研究进展[J]. 饲料工业,2010,31(21):12-16.
[5]Alemán G,López A,Ordaz G,et al. Changes in messenger RNA abundance of amino acid transporters in rat mammary gland during pregnancy, lactation, and weaning[J]. Metabolism-Clinical and Experimental,2009,58(5):594-601.

任军方,姜殿强,云 勇. 海南省特有安诺兰 ISSR 体系的优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):39-41.

海南省特有安诺兰 ISSR 体系的优化

任军方,姜殿强,云 勇

(海南省农业科学院园林花卉研究所,海南海口 571100)

摘要:以海南省特有安诺兰为基因组材料,采用改进的 CTAB 法提取安诺兰叶片中的基因组 DNA,通过单因素试验,对 ISSR-PCR 反应体系中各影响因子进行优化和筛选,建立适合海南安诺兰的 ISSR-PCR 反应体系:15 μ L PCR 反应体积,10 \times PCR Buffer,200 μ mol/L dNTPs,0.5 μ mol/L 引物,1.5 mmol/L Mg^{2+} ,1.0 U *Taq* DNA 聚合酶,40 ng 模板 DNA。

关键词:安诺兰;ISSR-PCR;优化

中图分类号: Q949.718.43;S682.310.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0039-03

安诺兰 [*Anota hainanensis* (Rolfe) Schltr] 为兰科安诺兰属植物,海南省特有种,产于海南省中南部低海拔丘陵地区,热带附生兰,附生于低海拔丘陵地区的枫树上。安诺兰在春节前后开花,花朵清丽、密集而芳香,是极好的新春贺岁花卉。

ISSR (inter simple sequence repeat) 标记即简单重复序列区间 DNA 标记,是由 Zietkiewicz 等于 1994 年提出的一种新型分子标记技术^[1],它利用基于 SSR 而设计的寡核苷酸引物来检测 2 个 SSR 之间的一段短 DNA 序列差异。该技术的优点是所需 DNA 量少、多态性好、无须预知研究对象基因组序列等^[2],因此该技术已被广泛用于品种鉴定^[3]、基因定位及遗传多样性分析^[4-5]。由于 ISSR 技术也是基于 PCR 的一种分子标记技术,所以它同其他分子标记技术一样,结果容易受多种因素干扰,如模板 DNA 浓度、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、引物浓度等都能影响扩增结果,甚至其中一个因素改变都会影响扩增条带的位置或使其消失,从而影响整个试验结果,因此在研究时应先建立合适的反应体系并对其进行优化^[6-10]。本研究对海南省特有安诺兰 ISSR 反应体系进行探索,旨在建立适于安诺兰的 ISSR 反应体系。

1 材料与方

收稿日期:2013-10-17

基金项目:海南省自然科学基金(编号:310062)。

作者简介:任军方(1980—),女,河北石家庄人,助理研究员,研究方向为热带花卉种质资源学。E-mail:renjunfang808@163.com。

通信作者:云 勇,副研究员,研究方向为热带作物种质资源创新与利用。E-mail:yyong-3027@163.com。

1.1 材料

供试安诺兰来自于海南省农业科学院园林花卉研究所兰圃,试验地点在海南省农业科学院园林花卉研究所实验室。

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA marker 等试剂均购于上海生工生物工程有限公司。100 条 ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的序列,由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 试验方法

1.3.1 采用改良 CTAB 法提取 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,以 DL 2000 为标准,检查所得 DNA 的分子量、含量、纯度、完整性,并将 DNA 浓度稀释至 40 ng/ μ L。

1.3.2 ISSR-PCR 正交试验设计 采用正交试验建立 ISSR-PCR 反应体系并进行优化,参照陶兴林等人的方法^[11-15]设置各个因素,考察模板 DNA 浓度、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、引物浓度等 4 个因素对 ISSR 反应体系的影响,设定 5 个水平,建立 $U_{20}(5^4)$ 均匀设计表(表 1、表 2),确立海南安诺兰 ISSR-PCR 反应体系,每个处理重复 2 次。

表 1 安诺兰 ISSR 反应体系正交试验因素水平

| 水平 | A: <i>Taq</i> DNA 聚合酶 (U/ μ L) | B: dNTPs (μ mol/L) | C: 引物浓度 (μ mol/L) | D: 模板 DNA 浓度 (ng/ μ L) |
|----|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 1 | 0.008 | 50 | 0.1 | 0.8 |
| 2 | 0.020 | 100 | 0.3 | 1.2 |
| 3 | 0.030 | 150 | 0.5 | 1.6 |
| 4 | 0.040 | 200 | 0.8 | 2.0 |
| 5 | 0.060 | 300 | 1.0 | 2.4 |

[6] Han L Q, Yang G Y, Zhu H S, et al. Selection and use of reference genes in mouse mammary glands [J]. Genetics and Molecular Research, 2010, 9(1): 449-456.

[7] Guan X, Pettigrew J E, Ku P K, et al. Dietary protein concentration affects plasma arteriovenous difference of amino acids across the porcine mammary gland [J]. Journal of Animal Science, 2004, 82(10): 2953-2963.

[8] Tovar A R, Avila E, Desantiago S, et al. Characterization of methylaminoisobutyric acid transport by system A in rat mammary gland [J].

Metabolism, 2000, 49(7): 873-879.

[9] López A, Torres N, Ortiz V, et al. Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland [J]. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2006, 291(5): E1059-E1066.

[10] Martínez - López I, García C, Barber T, et al. The L - glutamate transporters GLAST (EAAT1) and GLT - 1 (EAAT2): expression and regulation in rat lactating mammary gland [J]. Molecular Membrane Biology, 1999, 15(4): 237-242.