

杨莉,欧都,齐亚银,等. 寒冷应激对新疆阿勒泰羊脂肪酸合成酶 mRNA 表达的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):28-30.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.007

寒冷应激对新疆阿勒泰羊脂肪酸合成酶 mRNA 表达的影响

杨莉,欧都,齐亚银,张莉
(石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832000)

摘要:为了研究寒冷应激对阿勒泰羊脂肪酸合成酶 mRNA 表达的影响,在寒冷应激前后分别采集湖羊及阿勒泰羊各个部位的组织,采用 RT-PCR 方法检测各组织中脂肪酸合成酶(Fas) mRNA 表达水平,分析在不同品种、不同部位寒冷应激后其表达的变化。结果显示,阿勒泰羊及湖羊 Fas mRNA 表达量在应激后均有下降,阿勒泰羊尤为显著,且应激后尾部和颈部冷表达量最低。研究表明,在寒冷应激下脂肪酸合成减少,脂肪作为能源物质被分解供能并维持体温的恒定,以适应冷刺激。

关键词:寒冷应激;脂肪酸合成酶;阿勒泰羊;湖羊;mRNA 表达水平

中图分类号: S826.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0028-03

应激于 1936 年由加拿大病理生理学家 Selye 首次提出,并定义为机体对外界或内部的各种异常刺激所产生的非特异性应答反应的总和。对动物而言,环境的冷热、创伤、惊吓都属于应激刺激。不同的应激源产生的神经内分泌系统的调节机制和机体所产生的生物学效应不同。而冷应激是高寒地区最普遍的应激源之一,新疆阿勒泰地区位于中国西北边陲,冬季长达半年,温度最低可达 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$,四季不分明,只有冷暖差别。许多优良绵羊品种无法适应阿勒泰地区异常寒冷的气候条件,而阿勒泰羊以其抗寒性强、耐粗饲等特点,成为当地的优良类群^[1]。

脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, Fas)是脂肪合成的关键酶之一,它参与长链脂肪酸合成的一系列反应,最后生成棕榈酸。动物机体中脂肪合成和沉积所需的脂肪酸大部分都来源于脂肪酸的从头合成,即乙酰辅酶 A(CoA)和丙二酸单酯 CoA 在 Fas 的催化下合成脂肪酸的过程,进而脂肪酸与甘油合成甘油三酯,Fas 在机体组织中的表达量和酶的活性对脂肪酸的合成和脂肪的沉积具有决定性作用^[2-3]。

新疆阿勒泰羊全身肌肉丰满肥硕,尾根附近沉积大量脂肪,能够适应阿勒泰地区异常寒冷的气候条件。笔者所在实验室前期的研究证实,阿勒泰羊的脂肪酸代谢对体温降低的适应很敏感,为了研究其脂肪组织在抗寒中的重要性,确定其在寒冷的环境下是否作为主要的能源物质参与产热以维持温度的恒定,本试验采用实时荧光定量方法检测寒冷应激前后阿勒泰羊和湖羊各部位脂肪组织 Fas mRNA 的表达量,旨在

从低温对不同品种绵羊脂肪组织的合成方面分析阿勒泰羊耐寒的可能适应机制,为新疆绵羊抗寒育种工作提供理论依据,减少寒冷应激对养羊业带来的损失。

1 材料与与方法

1.1 材料和试剂

选择新疆福海县健康成年的阿勒泰羊和湖羊各 5 只,在寒冷应激前(10 月)和寒冷应激后(1 月)分别采集湖羊及阿勒泰羊颈部肌间脂肪、胸部肌间脂肪、腹部肌间脂肪、腿部肌间脂肪、尾部脂肪以及肝脏等 6 个部位的组织,立即放入液氮罐速冻,转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中进行保存。

Trizol、DEPC、DNA Marker、mix、质粒提取试剂盒(批号:DP103-02)购自天根生物科技服务有限公司;PrimeScript[®] RT reagent kit 反转试剂盒(批号:RR047A)、pMD[®] 18-2 Simple Vector、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司(批号:DRR420A);DNA 凝胶回收试剂盒(批号:DP209-02);胰蛋白胍、酵母提取物、琼脂粉、琼脂糖、三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇购自北京华美生物工程公司;感受态细胞大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为笔者所在实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中已发布的绵羊 Fas 基因为模版(登录号:AF479289.1)用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,由北京六合华大基因有限公司合成。上游引物:5'-CCTCGGTGCCCGTTGTCTAC-3';下游引物:5'-TGCTGCTCAAAGGATGTGTC-3',目的片段长度为 256 bp。

1.2.2 RNA 的提取 利用 TRIZOL 一步法提取试验样品的总 RNA,琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。然后依次加入以下试剂:RNA 1 μg , $10\times$ Reaction buffer 2 μL , MgCl_2 1 μL , DNase I - RNase-free 1 μL , DEPC 处理水补足 10 μL , 除去存在的少量基因组 DNA。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,然后加入 1 μL 50 mol/L EDTA, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 10 min,即可用此 RNA 作为反转录的模板。以 RNase-free 水为对照,

收稿日期:2014-09-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260610);新疆生产建设兵团重大科技项目(编号:2013AA033-3);石河子大学优秀青年基金(编号:2012ZRKXYQ02)。

作者简介:杨莉(1990—),女,硕士研究生,主要从事动物生理学研究。E-mail:563289492@qq.com。

通信作者:张莉,博士研究生,副教授,主要从事动物生理学研究。E-mail:zhangli@shzu.edu.cn。

用紫外分光光度计测定 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的值和总 RNA 浓度。

1.2.3 反转录 向提取纯化好的各组织总 RNA 中加入以下试剂: $5 \times \text{gDNA Eraser buffer I}$ $2 \mu\text{L}$, $5 \times \text{gDNA Eraser I}$ $1 \mu\text{L}$, 总 RNA $1 \mu\text{L}$, 无核酸酶水补足至 $10 \mu\text{L}$ 。 42°C 孵育混合物 3 min , 冷却后, 向下旋转混匀, 将管子放回冰上。再向以上反应液中按指定顺序加入如下试剂: 无核酸酶水 I $4 \mu\text{L}$, $5 \times \text{prime script buffer 2}$ $4 \mu\text{L}$, RT Prime Mix I $1 \mu\text{L}$, prime Script RT Enzyme Mix I $1 \mu\text{L}$, 终体积为 $20 \mu\text{L}$ 。加完样后轻柔混合, 短暂离心后 37°C 孵育混合物 30 min , 最后 85°C 加热 5 s 终止反应。反转录产物可直接用于 PCR 扩增, 或于 -20°C 下保存 (<3 个月), 长期保存建议放于 -70°C 下。

1.2.4 目的基因 PCR 反应及克隆测序 利用常规 PCR 反应对组织样品中 *Fas* 基因进行扩增, PCR 反应体系为: *Taq* DNA 聚合酶 $1.5 \mu\text{L}$, 10 pmol/L 上下游引物各 $1 \mu\text{L}$, $10 \times$ 缓冲液 (含 Mg^{2+}) $2 \mu\text{L}$, $2.5 \mu\text{mol/L}$ dNTP $2 \mu\text{L}$, cDNA $2 \mu\text{L}$, 超纯水补足到 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min ; 95°C 变性 30 s , 56°C 退火 30 s , 72°C 延伸 30 s , 30 个循环; 72°C 延伸 5 min , 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。利用常规 PCR 反应对组织样品中 *Fas* 基因进行扩增, 将目标片段分别从琼脂糖凝胶中切下, 按照 DNA 回收试剂盒说明回收目标片段, 在 T4 DNA 连接酶作用下, 经 16°C 过夜连接 pMD18-T 载体, 用 CaCl_2 法将连接产物转入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 经蓝白斑筛选阳性菌落后, 挑取单菌落进行培养, 然后从菌液中提取质粒, 菌液送往上海华大基因公司测序。

1.2.5 实时定量 PCR 反应 提取重组质粒 pMD18-T-*Fas*, 将线性化纯化后质粒用紫外分光光度计测定 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$, 按下式计算拷贝数:

$$\text{拷贝数 (拷贝/mL)} = (\text{质粒浓度} \times 6.02 \times 10^{23}) / (649 \times \text{重组质粒长度})$$

式中: 6.02×10^{23} 为阿氏常数; 649 为质粒分子质量为 1 个碱基的平均分子质量。

将重组质粒浓度稀释为 10^{10} 拷贝数后, 在依次稀释为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 , 以不同浓度的质粒为模板, 进行荧光定量 PCR 反应, 反应体系: SYBR $10 \mu\text{L}$, ddH₂O $7.2 \mu\text{L}$, 10 pmol/L 上下游引物各 $0.4 \mu\text{L}$, 模板 $2 \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 5 min ; 94°C 30 s , 52°C 30 s , 72°C 30 s , 50 个循环。

反应结束后, 计算机自身会根据质粒浓度与 cDNA 模板的浓度制作标准曲线。通过此标准曲线来计算质粒浓度。应用 MX3000P 荧光定量 PCR 仪进行表达分析。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测阿勒泰羊和湖羊的 *Fas* mRNA 表达量 对寒冷应激前后阿勒泰羊及湖羊的颈部肌间脂肪、胸部肌间脂肪、腹部肌间脂肪、腿部肌间脂肪、尾部脂肪和肝脏组织进行实时荧光定量 PCR, 每个组织进行 3 次重复。

1.2.7 数据分析 所测不同样本的质粒浓度换算成拷贝数, 用 SPSS 11.0 软件进行分析, 用 *t* 检验确定 *Fas* 基因的表达量, 根据单因素方差分析寒冷应激前后与物种间的相关性。

2 结果与分析

2.1 提取总 RNA

总 RNA 的质量是获得完整 cDNA 序列的关键因素。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA, 28S 和 18S RNA 带型清晰

可见, 表明总 RNA 无降解, 完整性较好 (图 1)。提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定后 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 $1.8 \sim 2.0$ 之间, 表明提取的总 RNA 无蛋白质和苯酚污染, 纯度较高, 可用于后续的试验。

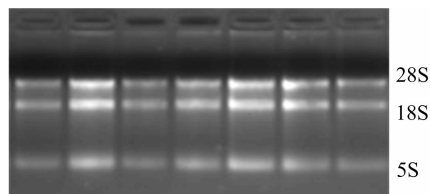


图1 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

2.2 *Fas* 基因的 RT-PCR 扩增

提取湖羊和阿勒泰羊各组织的 RNA, 采用分光光度计对其进行定量并调整至相同剂量。以 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 以 *Fas* 的上、下游引物扩增, 得到 256 bp 的条带 (图 2)。可以看出, 各组织的 PCR 扩增条带亮度基本一致, 说明各个组织的 cDNA 模板扩增稳定。

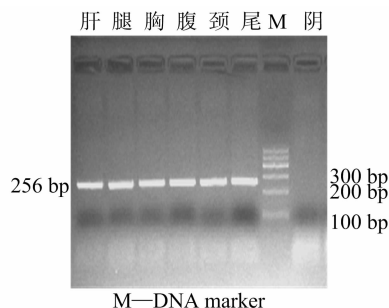


图2 *Fas* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

2.3 *Fas* 基因的 mRNA 组织表达水平的绝对定量分析

2.3.1 标准曲线的生成 LightCycle 根据所测的质粒浓度自动绘制出标准曲线 (图 3 至图 5), 测得 *Fas* 基因的值几乎在一条直线上, 相关系数是 0.998 6, 曲线的斜率为 -3.274 , *Fas* 基因的扩增效率为 $E = 10^{-1/(-3.27)} - 1 = 1.02$, 而扩增产物的熔解曲线出现了 1 个主峰, T_m 值为 $(92 \pm 0.2)^\circ\text{C}$; 说明所建立的绵羊 *Fas* mRNA 定量检测方法是有效的。

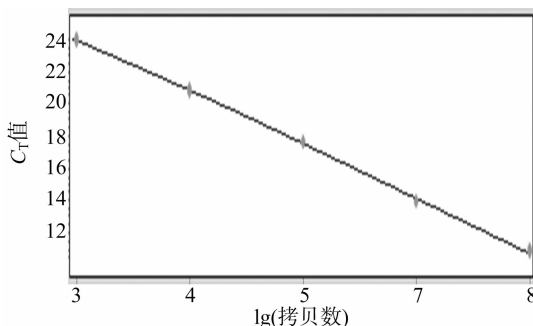


图3 *Fas* 基因的标准曲线

2.4 阿勒泰羊与湖羊在应激前与应激后 *Fas* mRNA 在不同组织中的表达量分析

阿勒泰羊在应激后各个部位组织的 *Fas* mRNA 表达量均有下降, 其中阿勒泰羊的颈部、胸部、腹部、腿部肌间脂肪及尾部脂肪的表达量与应激前差异极显著 ($P < 0.01$) (图 6)。

湖羊在应激后各个组织的 *Fas* mRNA 表达量均有下降, 其中颈部肌间脂肪、胸部肌间脂肪、腿部肌间脂肪 *Fas* mRNA

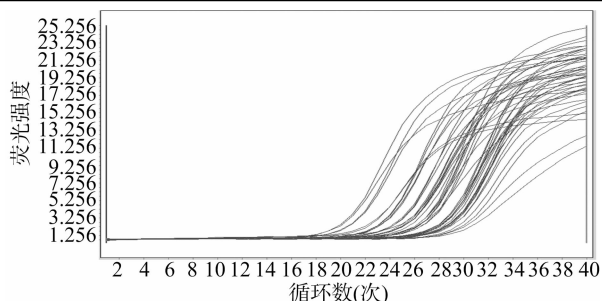


图4 Fas基因的扩增曲线

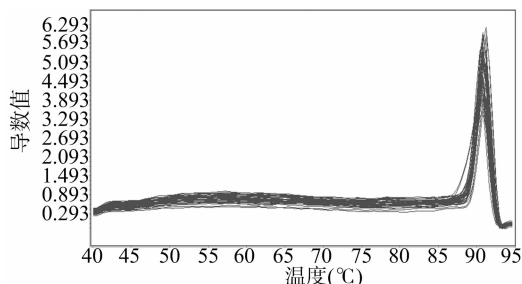
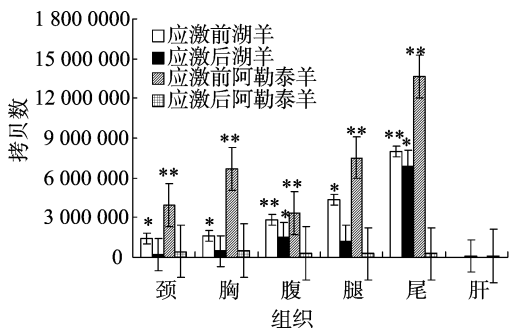


图5 Fas扩增产物的溶解曲线

表达量与应激前相比差异显著 ($P < 0.05$), 而尾部脂肪、腹部肌间脂肪 *Fas* mRNA 表达量与应激前相比则差异不显著 ($P > 0.05$) (图 6)。

阿勒泰羊各组织在应激前的 *Fas* mRNA 表达量均高于湖羊, 而两者在应激后颈部、胸部、腿部肌间脂肪的表达量差异不显著, 腹部肌间脂肪和尾部脂肪相比差异显著 ($P < 0.05$)。阿勒泰羊与湖羊应激后肝脏 *Fas* mRNA 表达量相对脂肪组织的表达量较低。



*、**分别表示差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$)

图6 阿勒泰羊与湖羊 *Fas* mRNA 基因在不同组织中的表达量

3 结论与讨论

机体通过协调控制有关脂肪合成和分解的酶的活性和基因表达来调节体脂的沉积, 使动物体脂的沉积始终处于一个动态平衡, *Fas* 是体组织脂肪酸再生能力的主要限速酶, 在动物体脂沉积中发挥重要作用, 其表达水平的升高能够显著增加甘油三酯在体内的沉积^[4]。脂蛋白酯酶 (lipoprotein lipase, Lpl) 是脂质代谢中的关键酶^[5], 对脂肪沉积具有反作用, 主要功能是水解极低密度脂蛋白 (VLDL) 和乳糜微粒 (CM) 中的甘油三酯 (TG), 使之转变为小分子量的脂肪酸, 以供各种组织贮存和利用。

本试验通过对寒冷应激前后阿勒泰羊和湖羊不同组织 *Fas* mRNA 的检测发现, 各组织的 *Fas* 的表达量均呈现下降

的趋势; 同时, 本试验前期研究得出寒冷应激后 *Lpl* 在阿勒泰羊和湖羊各组织的表达量均显著升高, 其结果可在一定程度上反映机体脂质代谢的规律, 在寒冷应激前 *Fas* 表达量较高, 促进脂肪沉积; *Lpl* 的表达量较低, 阻止了脂肪酸进入脂肪组织沉积, 脂肪组织把多余的能量转变成脂肪储存起来。而寒冷应激后 *Fas* 和 *Lpl* 表达量与寒冷应激前相反, 机体分解脂肪用以供能并维持体温的恒定。

多数研究表明, 热应激可以增加脂肪沉积的趋势^[6-7], 动物的体脂沉积所需要的脂肪酸大多来自脂肪酸的全程合成^[3]。刘梅等研究了急性热应激对肉仔鸡 *Fas* mRNA 表达的影响, 发现急性热应激显著增加了肝脏 *Fas* mRNA 相对表达水平, 从而促进了肝脏的脂肪酸合成, 同时急性热应激对腹脂 *Fas* 表达量影响并不显著^[8]。其结果与本试验结果相反, 应激源的相对性和不同物种之间脂肪代谢的调节机理也不一致。对于寒冷应激对脂肪代谢的研究较少, 由本试验结果可推断, 在寒冷应激下脂肪酸合成减少, 脂肪作为能源物质被分解供能, 来适应冷刺激。同时, 仔鸡的肝脏是胴体脂肪酸合成的主要场所, 90% 胴体脂肪在肝脏中合成^[9-11], 而绵羊的脂肪组织是胴体脂肪合成的唯一场所, 因此阿勒泰羊与湖羊肝脏 *Fas* mRNA 表达量比脂肪组织低。

本试验选用新疆耐寒品种阿勒泰羊和不耐寒品种湖羊作为试验对象, 全面系统地研究了低温条件下 2 种绵羊机体内脂肪组织参与能量代谢的变化过程, 比较其脂肪酸合成酶和脂蛋白酯酶在不同品种之间的表达差异, 揭示了阿勒泰羊耐寒的可能适应机制, 为新疆绵羊抗寒育种工作提供理论依据。

参考文献:

- [1] 李金保, 别克·木哈买提, 库拉西, 等. 地方良种阿勒泰羊 [J]. 新疆畜牧业, 2008 (1): 31-33.
- [2] Semenkovich C F. Regulation of fatty acid synthase (FAS) [J]. Progress in Lipid Research, 1997, 36(1): 43-53.
- [3] Smith S, Witkowski A, Joshi A K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase [J]. Progress in Lipid Research, 2003, 42(4): 289-317.
- [4] 张力莉, 徐晓锋. 动物脂肪酸合成酶基因表达调控的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(4): 101-103.
- [5] Goldberg I J, Soprano D R, Wyatt M L, et al. Localization of lipoprotein lipase mRNA in selected rat tissues [J]. Journal of Lipid Research, 1989, 30(10): 1569-1577.
- [6] 王启军, 卢庆萍, 张宏福. 高温环境对北京油鸡生产性能及脂肪沉积的影响 [J]. 广东饲料, 2006, 15(6): 38-40.
- [7] 贺喜, 戴求仲, 张石蕊, 等. 日粮共轭亚油酸对两个品种肉仔鸡生长性能及脂类代谢的影响 [J]. 动物营养学报, 2007, 19(5): 581-587.
- [8] 刘梅. 急性热应激对肉仔鸡生长性能及脂肪代谢的影响 [J]. 动物营养学报, 2011, 23(5): 862-868.
- [9] 姚国佳, 单体中, 汪以真, 等. 脂肪酸合成酶基因在皮下脂肪中表达及其与血清 Leptin 的关系 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(5): 818-819.
- [10] 乔永. 湖羊羔羊不同部位肌肉肌内脂肪沉积相关基因表达的发育性变化研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [11] Qiao Y, Huang Z G, Li Q F, et al. Developmental changes of the *FAS* and *HSL* mRNA expression and their effects on the content of intramuscular fat in Kazak and Xinjiang sheep [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(10): 909-917.