

魏彦辉,周荣艳,张军杰,等. c-KIT 在不同毛色山羊皮肤中的表达[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):38-41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.009

c-KIT 在不同毛色山羊皮肤中的表达

魏彦辉¹, 周荣艳¹, 张军杰¹, 李祥龙^{1,2}, 锡建中¹, 李兰会¹, 陈 辉¹, 张振红¹

(1. 河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071000; 2. 河北科技师范学院动物科技学院, 河北昌黎 066004)

摘要:为了研究 c-KIT 在不同毛色山羊皮肤组织中的表达与定位并探索 c-KIT 在毛色形成中的作用机制,以黑山羊、白山羊为研究对象,利用实时定量 PCR 技术分析其相对表达量,并采用免疫组织化学技术进行 c-KIT 表达定位分析。结果表明,在山羊皮肤组织中,c-KIT 主要分布在皮肤上皮部、汗腺、皮脂腺、毛囊漏斗部以及内外根鞘。c-KIT 在黑山羊、白山羊毛色皮肤组织中表达部位、表达水平无显著差异,表明 c-KIT 的表达量、表达部位不是造成黑山羊、白山羊色差异的主要因素。

关键词:c-KIT;山羊;免疫组织化学;皮肤;毛色

中图分类号:S827.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0038-03

绒、毛及裘皮是山羊重要的经济性状,毛色表型特征的选育尤其受到各国育种人员的关注^[1]。探索山羊毛色形成的机制可以为培育天然的彩色山羊提供理论基础。哺乳动物的毛色表型特征主要是由毛发中黑色素的类型、数量决定的。c-KIT 编码的蛋白表达于黑素细胞前体物,肥大/干细胞生长因子的受体(mast/stem cell growth factor receptor,c-KIT)属于跨膜酪氨酸激酶受体,参与黑素细胞形成、成熟、增殖、分化及迁移等过程^[2-4]。经过伊马替尼处理的人表皮黑素细胞中,由于 c-KIT 不能被磷酸化,从而可以抑制黑素细胞的迁移^[5]。张巧灵等通过免疫组化分析得到 Kit 蛋白,在白色羊驼皮肤毛囊内根鞘、外根鞘及其结缔组织中有一定量的表达,但其在黄色羊驼表皮下层的结缔组织中只有很少量的表达^[6]。Kit 在白色羊驼中显著表达,其相对表达量是棕色羊驼的 4.602 9 倍^[7]。但是关于 c-KIT 在山羊皮肤组织内的表达及其是否与山羊毛色的形成有关未见报道。本试验以黑色山羊、白色山羊为研究对象,首次对 c-KIT 在不同毛色山羊皮肤组织中的表达定位进行了研究,在转录水平对其在不同毛色山羊皮肤组织中的表达情况进行了检测,探索该基因与山羊毛色形成的关系,旨在为研究 c-KIT 调控山羊毛色形成的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

在河北省定州市随机挑选成年白色山羊、黑色山羊各 3 只,选取体侧部位皮肤,用刮毛器刮净羊毛,用手术法取 1 cm² 左右皮肤组织 6 块。将用于总 RNA 提取的 3 块皮肤快

速投入液氮中保存,将用于免疫组织化学分析研究的 3 块皮肤投入 10% 甲醛溶液中固定,石蜡包埋后制成组织切片。

1.2 主要试剂和仪器

兔抗人 c-KIT 抗体(购自 Santa Cruz Biotechnology INC 公司);封闭用山羊血清工作液、生物素标记的羊抗兔 IgG、Streptavidin-HRP 工作液、DAB 显色试剂盒(均购自康为世纪公司);苏木素(Solarbio 公司);RNA 提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);荧光定量试剂盒(日本东洋纺公司);其他常规试剂均使用国产分析纯试剂。PCR 仪(德国 Biometra 公司);iQ5 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司);核酸蛋白测定仪 ND2000(Thermo 公司);高速冷冻离心机(Sigma 公司)。

1.3 总 RNA 的提取以及反转录合成

取冻存的山羊皮肤组织,按照 RNA 提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取,利用核酸蛋白测定仪进行浓度与纯度测定,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。使用 M-MLV 反转录酶进行 cDNA 第一链合成,配制模板 RNA 10 μL、oligo(dT)₁₈ 5 μL、RNase free ddH₂O 15 μL 的混合液;70 ℃ 保温 10 min,冰上急冷 2 min。短暂离心后分别加入 10 μL 5×M-MLV Buffer、2.5 μL 10 mmol/L dNTP Mixture、1.25 μL Recombinant Ribonuclease Inhibitor、1.25 μL Reverse Transcriptase M-MLV 和 5 μL RNase free ddH₂O。42 ℃ 保温 1 h,70 ℃ 保温 15 min 后冰上冷却。逆转录产物保存于 -20 ℃ 备用。

1.4 山羊皮肤组织中 c-KIT 的 qRT-PCR

1.4.1 反转录合成 c-KIT 的 cDNA 根据山羊 c-KIT 的基因序列以及 GADPH 的基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物,由华大六合基因公司合成。引物序列如下:c-KIT 基因正引物:5'-GGCCACCCCTGGTCATTACAGAATAT-3',反引物:5'-TGTCTGCCGCTTGGTTGGTAC-3',预期扩增片段大小为 225 bp;GADPH 基因正引物:5'-CACCCTCAAGAT-TGTCAGC-3',反引物:5'-CAGTGGTCATAAGTCCCTCC-3',预期扩增片段大小为 107 bp。PCR 反应体系总体积为 50 μL,包含 cDNA 2 μL,上下游引物各 2 μL,2x Taq MasterMix 25 μL,ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性

收稿日期:2015-03-24

基金项目:河北省自然科学基金(编号:C2012204009);河北省高等学校科学研究计划(编号:Q2012074);河北省首批青年拔尖人才支持计划。

作者简介:魏彦辉(1990—),男,河北易县人,硕士研究生,主要研究方向为动物遗传育种。E-mail:1196313575@qq.com。

通信作者:周荣艳,博士,副教授,主要研究方向为动物遗传育种。E-mail:rongyanzhou@126.com。

10 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 36 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增结束后用 1% 琼脂糖凝胶对产物进行电泳检测和回收纯化, 连接 pEASY - T3 载体并转化 *trans1-t1* 感受态细胞, 选取阳性重组子后送北京中科希林生物科技有限公司测序, 确定为阳性的克隆提取质粒。

1.4.2 测定 *c-KIT* 基因表达量 取反转录合成的 cDNA, 每个 cDNA 分别使用的引物对 *c-KIT* 与内参 *GAPDH* 进行实时定量 PCR 扩增。优化后的反应体系: THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 7 μ L, 总计 20 μ L。扩增程序: 95 °C 45 s; 95 °C 15 s, 62 °C 15 s, 72 °C 45 s, 共 40 个循环。每个样本设 3 次重复。反应结束后以溶解曲线来判定反应的特异性。

1.4.3 数据分析 利用 Microsoft Excel 软件进行数据分析, 结果均用平均值 \pm 标准误差表示, 其中基因的表达量结果经内参基因 *GAPDH* 表达量校正。分别扩增 *SCF*、*GAPDH* 基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 *SCF* 基因在不同毛色山羊皮肤组织中的相对表达水平, $\Delta C_{T\text{目的基因}} = C_{T\text{目的基因}} - C_{T\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{黑色山羊}} - \Delta C_{T\text{白色山羊}}$, *SCF* 基因 mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 表示。

1.5 山羊皮肤组织中 *c-KIT* 的免疫组化分析

将固定在 10% 甲醛溶液的皮肤组织取出, 经过脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、修块、切片, 获得厚度为 5 μ m 的石蜡切片。石蜡切片脱蜡至水, 用 3% 过氧化氢甲醇溶液处理 20 min, 灭活内源性过氧化物酶; 用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。0.1% 胰蛋白酶抗原修复; 室温下用山羊血清封闭 20 min, 去掉封闭液, 滴加一抗 (1: 80 稀释), 4 °C 孵育 16 h, 37 °C 复温 20 min, PBS 代替一抗作为阴性对照; PBS 清洗后滴加二抗 (生物素标记的羊抗兔 IgG), 室温孵育 30 min; PBS 清洗后加入 Streptavidin - HRP 工作液, 室温孵育 20 min; PBS 清洗后滴加 DAB 显色液显色, 显微镜下观察显色程度, 自来水冲洗终止反应, 苏木素复染。梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 显微镜下观察拍摄。

2 结果与分析

2.1 山羊皮肤组织中总 RNA 的提取

将所提取的皮肤组织总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 电泳条带清晰, 28 S、18 S 清晰可见 (图 1)。用核酸测定仪进行 RNA 样品测定, $D_{260\text{ nm}}$ 与 $D_{280\text{ nm}}$ 比值为 1.8 ~ 2.0。

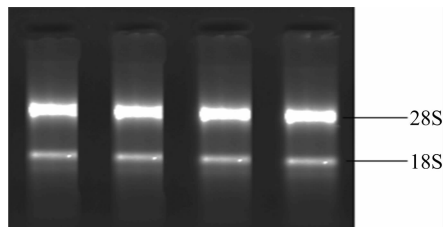
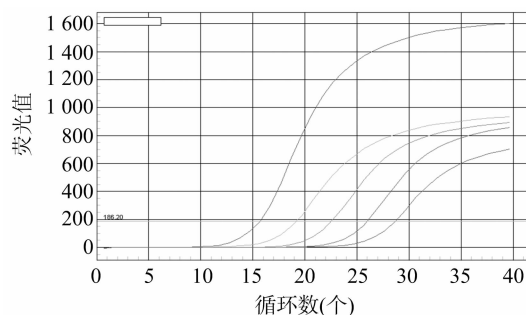


图1 山羊皮肤组织 RNA 电泳图

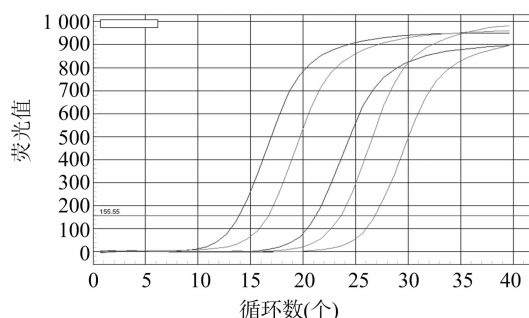
2.2 山羊皮肤组织中 *c-KIT* 的 qRT - PCR

2.2.1 实时荧光定量试验 经过 PCR 条件优化, 成功扩增了与预期大小一致的片段, 电泳检测显示条带清晰整齐, 扩增结果良好。对鉴定为阳性的重组质粒按 10 倍倍比稀释, 进行实时荧光定量 PCR 扩增, 由图 2、图 3 可以看出 *c-KIT*、*GAPDH* 基因的扩增产物 C_T 值均一, 溶解曲线只有 1 个明显的峰,

表明在实时荧光定量 PCR 过程中, 荧光信号均来自于特异性扩增产物, 且没有产生非特异性扩增及引物二聚体。根据荧光值的变化规律, 系统自动生成起始模板浓度与 C_T 值间的回归曲线, 该标准曲线检测灵敏度为 $10^9 \sim 10^5$ 个模板。*c-KIT* 基因的回归方程为 $y = 40.108 - 3.275x$, $r^2 = 0.992$; *GAPDH* 基因的回归方程为 $y = 45.351 - 3.276x$, $r^2 = 0.998$ 。由此可见, 所建立的回归方程可以用于实时荧光定量试验。

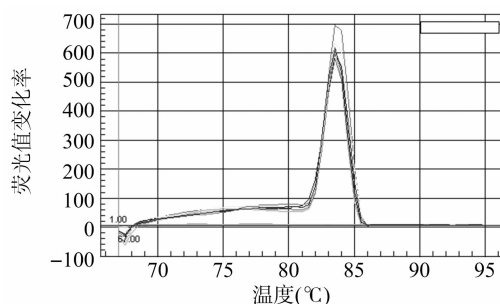


A. *c-KIT* 基因扩增曲线

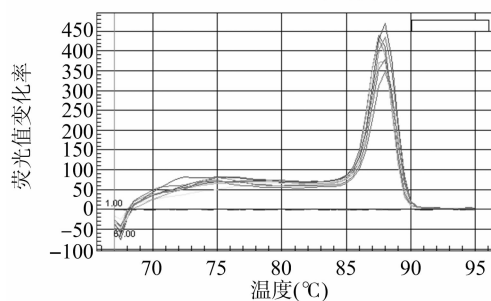


B. *GAPDH* 基因扩增曲线

图2 *c-KIT*、*GAPDH* 基因扩增曲线



A. *c-KIT* 基因溶解曲线



B. *GAPDH* 基因溶解曲线

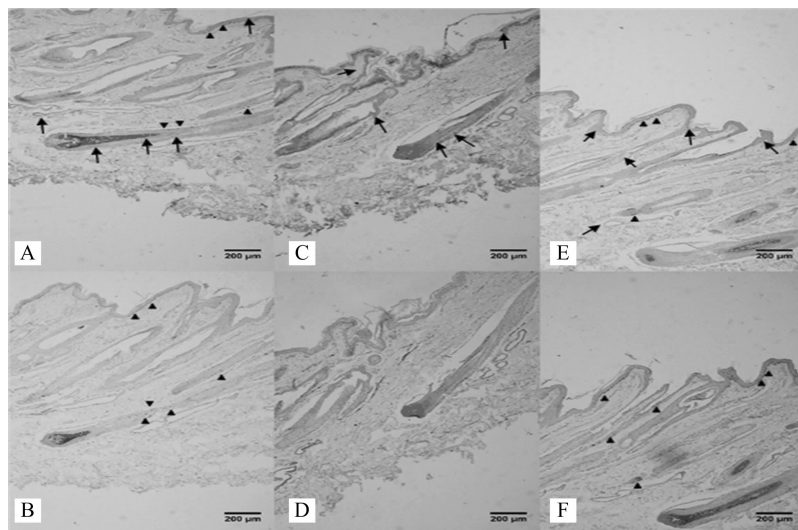
图3 *c-KIT*、*GAPDH* 基因扩增溶解曲线

2.2.2 实时荧光定量结果 根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 相对定量方法的结果, 表明 *c-KIT* 基因在黑色山羊皮肤中的 mRNA 表达水平是白色山羊的 1.28 倍, 且差异不显著。

2.3 山羊皮肤组织中 c-KIT 的免疫组化结果

山羊皮肤组织中 c-KIT 的免疫组织化学结果见图 4, 结果显示, 在白色山羊、黑色山羊皮肤组织中, c-KIT 主要定位在细胞膜上, 在皮肤上皮、毛囊漏斗部、外根鞘、内根鞘、皮脂

腺以及汗腺有阳性着色, 对照组无着色。对不同毛色山羊皮肤组织中的阳性细胞平均光密度进行测定比较, 结果表明, c-KIT 在白色山羊、黑色山羊皮肤组织中阳性细胞(毛囊漏斗部、外根鞘、内根鞘)的表达量不存在显著差异。



c-KIT在黑色山羊皮肤毛囊内、外根鞘、皮脂腺、汗腺中的分布(A)及对照(B);
c-KIT在白色山羊皮肤毛囊内、外根鞘、皮脂腺、汗腺中的分布(C)及对照(D);
c-KIT在黑色山羊皮肤表皮以及毛囊漏斗部中的分布(E)及对照(F);
→表示组织中c-KIT阳性部位; ▲代表组织中的黑色素

图4 免疫组织化学显示 c-KIT 在山羊皮肤组织中的分布(536 ×)

3 结论与讨论

本研究结果表明, c-KIT 在不同毛色山羊皮肤组织中主要分布于表皮、毛囊内外根鞘、毛囊漏斗部、皮脂腺、汗腺中, 并且黑色山羊、白色山羊皮肤组织中 c-KIT 的表达部位、表达量无显著差异。c-KIT 表达于黑素细胞前体物, 作为肥大/干细胞生长因子受体 (mast/stem cell growth factor receptor, c-KIT), 属于跨膜酪氨酸激酶受体, 参与黑素细胞的形成、成熟、增殖、分化及迁移等过程^[2-4], 在物种毛色形成中起重要作用。在正常人皮肤中, c-KIT 表达于表皮、毛囊漏斗部、外根鞘。在羊驼皮肤中, c-KIT 主要在毛囊永久部检测到信号^[8]。c-KIT 在山羊皮肤中主要表达于上皮、汗腺、皮脂腺、毛囊漏斗部、内外根鞘, 这与在其他物种中的报道相符, 这提示 c-KIT 在山羊毛色形成过程中可能与在其他物种中所起的功能相似或相同。c-KIT 在黑色山羊、白色山羊皮肤组织中的表达部位相同, 而且其 mRNA 表达量无显著差异, 说明 c-KIT 在皮肤组织中的表达并不是导致试验所选不同山羊毛色差异的主要因素。人角蛋白细胞和黑素细胞研究发现, 经过紫外线诱导后, 皮肤中 c-KIT 及其膜结合型的 SCF 配体的表达量显著升高^[9], 表明在 SCF/c-KIT 系统中, 表皮黑色素着色过程起到调节作用, c-KIT 在黑山羊、白山羊表皮中均有明显表达, 但观察到的黑色素数量却差异显著, 所以推测不同黑山羊、白山羊皮肤中还存在其他关键因素影响山羊表皮中黑色素的生成。在山羊皮肤组织中, c-KIT 主要分布于表皮、汗腺、皮脂腺、毛囊漏斗部、内外根鞘的上皮细胞、毛球部的黑素细胞以及肥大细胞中。皮肤上皮细胞具有较强的分裂潜力, 能够分化为具有间充质特性的细胞来修复组织

损伤^[10-11]。因此有学者认为, 与 KIT 有关系的肥大细胞, 部分种类的造血干细胞、生殖细胞、黑素细胞以及胃肠道的卡哈尔氏间质细胞在特定条件下都具有较强的分裂能力^[12-13]。因此 c-KIT 主要表达于具有较强分裂增殖潜力的细胞中, c-KIT 还可能与皮肤细胞的更新有关。

参考文献:

- [1] 常洪. 山羊的毛色遗传[J]. 国外畜牧科技, 1995, 22(5): 23-26.
- [2] Botchkareva N V, Khlgatian M, Longley B J, et al. SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation[J]. FASEB Journal, 2001, 15(3): 645-658.
- [3] Parichy D M, Rawls J F, Pratt S J, et al. Zebrafish sparse corresponds to an orthologue of c-kit and is required for the morphogenesis of a subpopulation of melanocytes, but is not essential for hematopoiesis or primordial germ cell development[J]. Development, 1999, 126(15): 3425-3436.
- [4] Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K, et al. In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development[J]. EMBO Journal, 1991, 10(8): 2111-2118.
- [5] Xia J X, Li F Q, Urabe K, et al. Imatinib inhibits migration of normal human epidermal melanocytes and suppress the phosphorylation of C-kit[J]. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2012, 7(2): 100-103.
- [6] 张巧灵, 姜俊兵, 张维军, 等. 显性白毛调控基因在不同毛色羊驼皮肤中表达差异的研究[J]. 激光生物学报, 2008, 17(4): 491-495.
- [7] 张丹丽, 田雪, 宋云飞, 等. miR-193b 及其靶基因 Kit 在不同毛色羊驼皮肤中的表达[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(5): 44-49.

漫晓丹,孟春花,王慧利,等. 猪 *SLA-DRB1* 基因外显子 3 单核苷酸多态性及其与 PRRSV 易感性的关联[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):41-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.010

猪 *SLA-DRB1* 基因外显子 3 单核苷酸多态性及其与 PRRSV 易感性的关联

漫晓丹^{1,2}, 孟春花², 王慧利², 李隐侠², 李齐发¹, 曹少先²

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏南京 210014)

摘要: *SLA-DRB1* 是影响猪体免疫反应、疾病感染和疫苗应答的重要因子。本研究对猪 *SLA-DRB1* 基因外显子 3 序列进行扩增和测序, 筛选多态性位点, 分析其与 PRRSV (猪繁殖与呼吸综合征病毒) 易感性的相关性。测序发现 *SLA-DRB1* 基因外显子 3 存在 4 个单碱基突变 (g. 17G/A, g. 95C/T, g. 137G/C 和 g. 232G/C)。针对 g. 232G/C 建立 PCR-RFLP 方法, 检测 6 个猪种群共 227 个样本, 发现在大白姜曲海杂交猪、姜曲海猪、长白猪、定远猪和杜洛克猪中有 GG(0.43, 0.80, 0.59, 0.54, 0.83) 和 GC(0.57, 0.20, 0.41, 0.46, 0.17) 2 种基因型, 其他群体均为 GG 型。不同基因型猪肺泡巨噬细胞中 PRRSV 拷贝数在接毒后 6、12、18、24、36 h 差异均不显著 ($P > 0.05$), 不同基因型猪血液中病毒载量在接毒后 4、7、11、14、21、28、35、42 d 差异均不显著 ($P > 0.05$), 不同基因型对猪体质量和日增质量的影响不显著 ($P > 0.05$)。提示 *SLA-DRB1* 的 g. 232G/C 突变与 PRRSV 抗性无显著关联。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; *SLA-DRB1* 基因; 外显子; PCR-RFLP; 易感性; 碱基突变

中图分类号: S858.285.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0041-04

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 是一种高度传染性疾病, 以母猪繁殖障碍和仔猪的呼吸道疾病为特征, 造成怀孕母猪流产、产死胎和仔猪的高死亡率等^[1]。其病原猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 具有高度变异性、抗体依赖性复制增强、巨噬细胞嗜性和持续性感染等特征^[2], 导致现有的疫苗不能很好地控制 PRRS 的流行, PRRS 的防治仍然是养猪业头等难题之一^[3-4]。因此, 猪对 PRRSV 的抗性也日益受到关注。国外已有多个课题组分别在体内外研究了 PRRSV 在不同猪种肺泡巨噬细胞 (PAM) 中复制和生长的特征, 发现猪对 PRRSV 抗性或易感性存在品种 (系) 间的遗传差异^[5]。Murtaugh 等研究了猪对 PRRSV 的免疫应答, 指出疾病的严重

性在猪品种间和群体间存在变异^[6]。Ait-Ali 等的研究表明 PRRSV 在来源于长白猪的 PAM 中的复制相对于其他商业遗传品系包括大白猪、皮特兰和另外 2 个合成系显著延迟、缓慢, 然而, 关于猪 PRRSV 抗性的遗传机制尚不清楚^[7]。

猪的主要组织相容性复合物 (MHC) 即猪白细胞抗原 (SLA), 它是由紧密连锁、高度多态的基因位点所组成的染色体上的一个遗传区域, 其基因产物为 MHC 抗原, 主要功能是抗原递呈, 与动物的抗病性有着密切的关系^[8]。SLA 按其抗原结构和功能主要分为 3 大类, 即 I、II、III 类, *SLA-DRB1* 属于 II 类分子。目前, 国内外对 *SLA-DRB1* 基因的研究主要集中在第二外显子多态性的研究上。张冬杰等通过对 *SLA-DRB1* 基因整个编码区进行分析, 发现突变大多集中在第二外显子处, 其他 3 个外显子突变较少^[9]。徐如海等研究表明, *SLA-DRB1* 近端调控区存在 24 个多态位点, 其中 G-146T 位点与仔猪大肠杆菌 K88ab 黏附表型存在显著的关联^[10]。

Arceo 等对 200 头杂交猪进行 PRRSV 攻毒时发现, 高病毒载量低体质量增加组相对于低病毒载量低体质量增加组 *SLA-DRB1* 基因表达量降低, 提示 *SLA-DRB1* 可能在猪抗

收稿日期: 2015-04-08

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30972075); 江苏省农业科技自主创新资金 [编号: CX(12)2034]。

作者简介: 漫晓丹 (1989—), 女, 河南汝州, 硕士研究生, 主要从事动物分子生物学研究。E-mail: 2013105022@njau.edu.cn。

通信作者: 李齐发, 博士, 教授, 主要从事动物分子遗传与育种研究, E-mail: liqifa@njau.edu.cn; 曹少先, 博士, 研究员, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: caoshaoxian@163.com。

[8] 姜俊兵, 于秀菊, 田雪, 等. 干细胞因子及其受体 c-KIT 对羊驼毛囊黑色素细胞增殖与分化的影响及其机制[J]. 解剖学报, 2011, 42(1): 99-103.

[9] Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, et al. The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2001, 116(4): 578-586.

[10] Snippet H J, Haegebarth A, Kasper M, et al. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin[J].

Science, 2010, 327: 1385-1389.

[11] Thierry J P, Acloque H, Huang R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.

[12] Zhu Y I, Fitzpatrick J E. Expression of c-kit (CD117) in Spitz nevus and malignant melanoma[J]. J Cutan Pathol, 2006, 33: 33-37.

[13] Tryggvason G, Hilmarsdottir B, Gunnarsson G H, et al. Tyrosine kinase mutations in gastrointestinal stromal tumors in a nation-wide study in Iceland[J]. APMIS, 2010, 118(9): 648-656.