

# 不同日龄大白猪视黄素 X 受体 $\alpha$ 基因的表达研究

杨国伟, 张冬杰, 刘 娣

(黑龙江省农业科学院畜牧研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

**摘要:** 采用 RT-PCR 方法对大白猪的 RXR $\alpha$  基因在 1 日龄、90 日龄、180 日龄、270 日龄和 360 日龄的心、肝、胃、脾、肾、肺、大肠、小肠、肌肉、子宫、卵巢共 11 个组织的表达情况进行了研究。结果表明, RXR $\alpha$  mRNA 在大白猪的肾脏、肺、小肠和肌肉组织中持续表达, 而在心脏和子宫表达水平较低, 1 日龄时表达 RXR $\alpha$  mRNA 的组织最多, 同时表达量也最高。

**关键词:** 大白猪; RXR $\alpha$ ; RT-PCR; 表达

中图分类号: S828 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)02-0009-03

## Research on Expression of Landrace RXR $\alpha$ Gene on Different Days

YANG Guo-wei, ZHANG Dong-jie, LIU Di

(Animal Husbandry Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** Expression level of RXR $\alpha$  gene in landrace heart, liver, stomach, spleen, kidney, lung, large intestine, small intestine, muscle, uterus and ovary on 1 d, 90 d, 180 d, 270 d and 360 d were studied by RT-PCR method. The result showed that RXR $\alpha$  mRNA was continuous expressed in kidney, lung, small intestine and muscle, but low level in heart and uterus. RXR $\alpha$  mRNA was broad expressed on 1 d and the level was also the highest.

**Key words:** landrace; RXR $\alpha$ ; RT-PCR; expression

视黄酸已被证明在脊椎动物的发育和调节体平衡方面有着重要作用。它的效应是通过专门的核受体蛋白介导的, 这些受体属于视黄酸/甲状腺激素受体超家族<sup>[1]</sup>。除了已被命名的 RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  外, Mangelsdorf 等<sup>[2]</sup>又发现了另外一种核受体称为视黄素 X 受体 (retinoid X receptor, RXR)。这个受体在配体结合区不同于其他三种 RARs, 而且它自身不具备与视黄酸的高亲和力。

RXR $\alpha$  既可以形成同型二聚体, 也可以形成 RXR $\alpha$ /RARs 异源二聚体行使功能, 而且这两种模式决定了视黄酸的两种不同反应途径。作为 RARs 的一个异二聚体, RXR $\alpha$  不是一个结合配体, 而是一个辅助因子。RXR $\alpha$  如果与另外一种核受体 LXR $\alpha$  形成一个有功能的异源二聚体, 则它是一个有活性的配体结合亚单位, 这种交互作用可能是视黄酸对靶基因起作用的另一个反应途径<sup>[3]</sup>。本研究以大白猪为实验材料, 对

RXR $\alpha$  基因的表达规律进行了研究, 以期对该基因在猪体内运载视黄酸过程中所起的作用及其他生理功能做进一步的探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

选取 2~3 胎龄的经产大白猪母猪 8 头, 同期进行纯繁, 其后代用于实验。分别在 1、90、180、270、360 日龄随机选取大白猪母猪各 4 头进行断颈宰杀, 随后迅速取下心、肝、胃、脾、肾、肺、大肠、小肠、肌肉、子宫、卵巢共 11 种组织, 置液氮中速冻,  $-70^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。大白猪由哈尔滨市三元种猪场提供。

#### 1.2 RNA 的提取及转录

严格按照 Invitrogen 公司的 TRIZOL 试剂说明书提取 RNA, 在紫外分光光度计上测定 RNA 的浓度和纯度。用 TaKaRa 的 BcaBEST<sup>TM</sup> RNA PCR Kit Ver1.1 试剂盒反转录成 cDNA。

#### 1.3 引物设计及 PCR 扩增

内标基因选择  $\beta$ -actin。各个组织的 RXR $\alpha$  的 PCR 扩增均在单管中进行, 以  $\beta$ -actin 为内标, 每样品作 2 次重复, 同时用 ddH<sub>2</sub>O 分别取代 RNA 样品和 RT 产物作为对照, 以检验是否有基因组和外源 DNA 污染, 并

收稿日期: 2008-11-25

第一作者简介: 杨国伟 (1976-), 男, 黑龙江省哈尔滨人, 硕士, 助理研究员, 从事动物营养与遗传研究。

通讯作者: 刘娣, 博士生导师, 教授, Tel: 13845091493, E-mail: liudi1963@163.com。

用混合样品(待测样品等比例混合)来建立最佳反应条件和校正不同批次间的差异。

$\beta$ -actin 基因(GenBank 登陆号 U07786)的引物序列: P1: 5'-CGGGACCTGACCGACATCCA-3', P2:

5'-GGGCCGTGATCTCCTTCTG-3'; RXR $\alpha$  基因(GenBank 登陆号 AF103947)的引物序列: P3: 5'-CGAGCCCAAGACCGAGAC-3'; P4: 5'-TGCCCTCAGCAGGATGA-3'。PCR 扩增反应条件如下: $\beta$ -actin 基因: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 24 个循环: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s; 72 $^{\circ}$ C 10 min; RXR $\alpha$  基因: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 34 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 电泳及灰度分析

取 10  $\mu$ L PCR 产物, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, EB

染色, 用 BioRad 的 QuantityOne 图像分析系统分析条带灰度。为减少批间误差, 所有样品均包括在同一次 PCR 中, 每一样品重复 2 次, 以平均值表示最终结果。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增循环参数的确定

PCR 扩增  $\beta$ -actin 基因时, 起始循环数从 21 开始, 模板为 1  $\mu$ L (50 ng), 每隔 1 个循环将反应管拿出 1 管, 直至 30 个循环。RXR $\alpha$  基因为 26 到 35 个循环。PCR 反应后进行电泳, 分析 IOD 值, 发现 PCR 扩增产量呈规律的直线性增加(见图 1)。

2.2 RT-PCR 扩增结果

RXR $\alpha$  基因在 1 日龄大白猪的 10 个所检组织中均

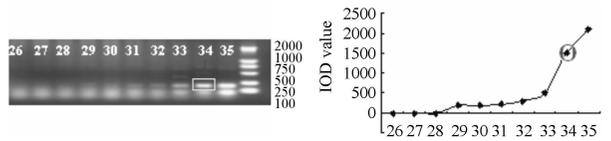
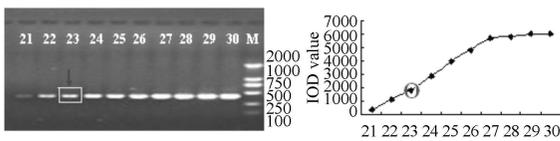
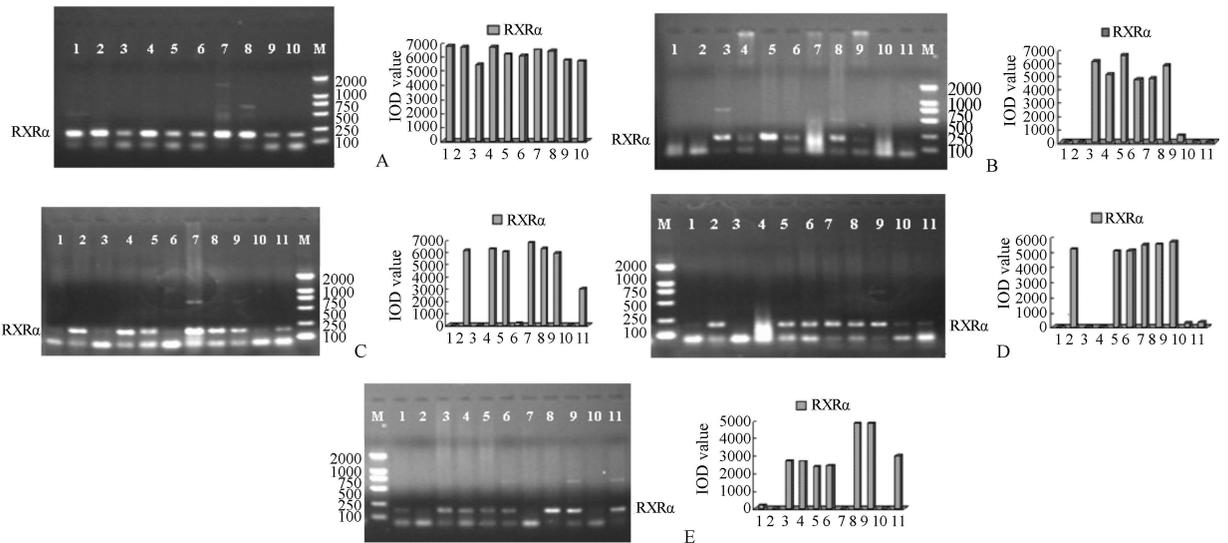


图 1 PCR 循环数与产量的关系

表达, 且不同组织间的表达量差异不明显。在 90 日龄大白猪的心脏、肝脏、子宫和卵巢中均不表达, 其余组织均表达, 但是在肌肉中的表达量非常低, 在肾脏中的表达量最高。在 180 日龄大白猪的心脏、胃和子宫中均不表达, 其余组织均表达, 但是在肺中的表达量非常低, 其次是卵巢, 其余组织的表达量差异不明显。在 270 日龄大白猪

的心脏、胃和脾脏中均不表达, 其余组织均表达, 但是在子宫和卵巢中的表达量非常微弱, 其余组织的表达量较高, 且差异不明显。在 360 日龄大白猪的肝脏、大肠和子宫中均不表达, 其余组织均表达, 但是在心脏中的表达量非常微弱, 在小肠和肌肉中高表达, 其次是卵巢, 其余组织的表达量差异不明显(见图 2)。



A: 1 日龄; B: 90 日龄; C: 180 日龄; D: 270 日龄; E: 360 日龄。

A ~ E 中 左侧为不同日龄大白猪的  $\beta$ -actin 和 RXR $\alpha$  基因在不同组织的 RT-PCR 产物琼脂糖电泳图。1~11 分别表示大白猪的心、肝、胃、脾、肾、肺、大肠、小肠、肌肉、子宫、卵巢, M: DL2000。右侧为大白猪的 RXR $\alpha$  基因 mRNA 表达量的模式图。

图 2 不同日龄大白猪 RXR $\alpha$  基因表达情况

3 讨论

Almasan 等<sup>[4]</sup> 将 RXR $\alpha$  基因定位在 9q34.3。Ton-tonoz 等<sup>[5]</sup> 发现了一个脂肪组织内的特异转录因子

ARF6 它是 RXR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  的一个异二聚体。核受体 PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  异源二聚体调节葡萄糖和脂质的体内平衡, 而且它也是抗糖尿病药品 G1262570 和噻唑烷

二酮类的作用目标。Gampe 等<sup>[9]</sup>报道了 RXR $\alpha$  与配体 9-cis-retinoic acid 配体结合区的晶体结构,这个结构在分子水平上说明了 RXRs 为什么能够与很多核受体形成异二聚体和可以通过 9-cis-retinoic acid 激活 PPAR $\gamma$ /RAR $\alpha$  异源二聚体的原因。

由于 RXRs 不能单独行使其生物功能,而必须与其他转录因子结合形成二聚体后,才能发挥作用,因此单独关于 RXRs 基因的研究报道较少。本研究结果表明 RXR $\alpha$  基因在刚出生的仔猪组织内广泛表达,并且表达水平较高。但是随着时间的增加, RXR $\alpha$  mRNA 的表达变化并没有表现出明显的规律。尽管如此,但仍可以看出, RXR $\alpha$  mRNA 的表达,存在着明显的时间和空间差异。推测产生这种结果的原因,一方面是因为该基因的表达受到机体自身生理状态的调节,即随着机体的增长,对视黄酸的需求也在不断变化,所以 RXR $\alpha$  的转录与表达也随之发生变化,另一方面也可能是因为体内的 RARs、激素以及其它转录因子也会对 RXR $\alpha$  的转录产生影响,因而造成了该基因的表达发生持续的变化。

(上接第 8 页)

分子水平上阐明组培苗遗传稳定性的分子机理。目前,用于检测组培苗遗传稳定性的分子标记技术已在水稻、春兰、果桑等植物上广泛应用<sup>[4-6]</sup>。周克夫等利用 SSR 标记技术,根据康耐尔大学的资料设计了 311 对 SSR 引物对早籼稻品种佳禾早占种植材料和组培材料进行分析,对两种材料进行 PCR 多态性扩增,结果发现两者间存在多态性的引物有 88 对,多态性比例达到 30.3%。并证明,佳禾早占水稻组培苗后代所表现出的矮秆性状与亲本在遗传物质上确有明显差别<sup>[4]</sup>。除用来鉴定组培苗的遗传稳定性分子标记技术的方法以外,还有细胞学方法、同工酶法、形态学鉴定法等均有报道<sup>[7-9]</sup>。

本研究应用 RAPD 分子标记技术对四倍体刺槐组培苗基因组 DNA 进行分析,应用 NAA 的组培苗之间出现了一定程度的变异,这也进一步证明了经某些激素(浓度)处理的组培苗在 DNA 水平上已经发生变异,其遗传物质不稳定,不能有效保证母株的遗传特性,这与前人关于芥蓝<sup>[10]</sup>、苹果<sup>[11]</sup>等组培苗遗传稳定性的研究报道不一致。由此可见,以组培快繁技术快速扩大饲料型四倍体刺槐的生产量,还应该从分子水平进行进一步的鉴定,从而有效保证组培苗的纯度。

## 参考文献:

- [1] Burrage P S, Huntington J T, Spom M B et al. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression by a retinoid X receptor-specific ligand[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(3): 892-904.
- [2] Mangelsdorf D J, Umesono K, Kliewer S A et al. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR[J]. *Cell*, 1991, 66: 555-561.
- [3] Willy P J, Umesono K, Ong E S et al. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway[J]. *Genes*, 1995, 9: 1033-1045.
- [4] Almasan A, Mangelsdorf D J, Ong E S et al. Chromosomal localization of the human retinoid X receptors[J]. *Genomics*, 1994, 20(3): 397-403.
- [5] Tontonoz P, Graves R A, Budavari A I et al. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha[J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(25): 5628-5634.
- [6] Gampe R T, Jr, Montana V G, Lambert M H et al. Asymmetry in the PPAR-gamma/RXR-alpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors[J]. *Molec. Cell*, 2000, 5: 545-555.

## 参考文献:

- [1] 任满田. 四倍体刺槐生物学特性及经济价值[J]. *山西林业*, 2003(5): 29.
- [2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 345-346.
- [3] 王侠礼, 钟士传, 曹帮华. 饲料型刺槐微体快繁技术的研究[J]. *中国农学通报*, 2003, 19(3): 51-53.
- [4] 周克夫, 张凯, 戎文婷. 应用 SSR 分子标记比较佳禾早占水稻组培苗与种植苗的性状差异[J]. *植物研究*, 2006, 26(6): 703-707.
- [5] 高丽, 杨波, 李洪林. 叶艺春兰组培苗遗传稳定性的 ISSR 研究[J]. *亚热带植物科学*, 2007, 36(2): 13-14.
- [6] 刘健, 于元杰. 果桑组培继代过程中的 RAPD 分析[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(5): 1310-1311.
- [7] 李卫东, 王冬梅, 黎小瑛. 用细胞学方法研究番木瓜组培苗的遗传稳定性[J]. *云南植物研究*, 2006, 28(6): 645-648.
- [8] Kongkiatnam P, Waterway M J, Fortin M G. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.); comparisons of morphological isozyme and RAPD markers[J]. *Euphytica*, 1995, 84: 237-246.
- [9] 詹亚光, 杨传平, 王玉成. 白桦组培离体再生的解剖学研究[J]. *林业科学*, 2002, 38(6): 143-147.
- [10] 庄东红, 黄文华, 郑汉藩. 芥蓝 (*Brassica alboglabra* Bailey) 组培苗遗传稳定性的研究[J]. *汕头大学学报(自然科学版)*, 1999, 14(1): 54-58.
- [11] 杜国强, 师校欣, 张庆良. 苹果不同继代次数的茎尖组培苗同工酶酶谱及 RAPD 分析[J]. *园艺学报*, 2006, 33(1): 33-37.