

Galectin β 3 基因在仔猪断乳前、后 胃肠道组织表达差异性分析

孙娅莉¹, 韩立强¹, 李宏基¹, 郭豫杰¹, 鲁维飞¹, 常磊¹, 杨国宇²

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002 2 农业部动物生长发育调控重点开放实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 从仔猪的十二指肠组织中克隆 Galectin β 3 基因, 研究 Galectin β 3 在仔猪不同组织中的分布情况, 并采用实时荧光定量 PCR 检测 Galectin β 3 基因在断乳前、后仔猪胃肠道组织中的表达差异情况。结果表明: 成功克隆出了猪 Galectin β 3 基因序列, 并被 GenBank 收录 (Accession: NM_001142841)。与断乳前相比, 断乳后 Galectin β 3 基因的 mRNA 在十二指肠、回肠组织中的表达量显著上调 ($P < 0.05$), 而在胃、空肠、盲肠和结肠中的表达量与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

关键词: 猪; Galectin β 3 基因; 组织分布; 实时荧光定量 PCR 表达差异

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)02-0056-04

mRNA Expression of Galectin β 3 in Piglets Gastrointestinal Tract of Pre and Postweaning

SUN Ya-li, HAN Li-qiang, LI Hong-ji, GUO Yu-jie, LU Wei-fei, CHANG Lei, YANG Guo-yu

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Animal Growth and Development, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The coding sequence of galectin β 3 were cloned from tissue of piglet. The gene expression of galectin β 3 were amplified by RT-PCR in various piglet tissues. The fold change of galectin β 3 mRNA was determined by Real-time PCR compared between pre and postweaning piglet gastrointestinal tract. The result showed that the full length of galectin β 3 was 548 bp and accepted by GenBank (Accession: NM_001142841). Galectin β 3 mRNA expression was intensely expressed in most tissues and was significantly raised in duodenum and ileum after weaning ($P < 0.05$).

Key words: Piglet; Galectin β 3; Tissue distribution; Realtime PCR; Expression difference

在养猪生产中采用早期断乳技术, 可以提高母猪繁殖能力, 增加生产效益, 但同时也会带来仔猪腹泻等一系列问题。仔猪腹泻病因复杂, 通常是多种因素相互作用的结果, 可归结为非传染性消化不良性腹泻和传染性腹泻^[1]。动物凝集素作为一种糖类结合蛋白, 其在细胞与细胞、细胞与基质之间起着特异性黏附作用, 对细胞生长发育、炎症反应、免疫调节等具有一定的生理作用^[2], 但关于其在仔猪断乳应激过程中的生理作用还未见有报道。因此, 选择半乳糖凝集 (Galectins) 家族中的一员 Galectin β 3, 从仔猪组织中克隆 Galectin β 3 基因, 并研究断乳前、后其在胃肠道组织中的表达差异, 旨在为深入研究动物凝集素在仔猪断乳应激过程中的作用提供支持。

1 材料和方法

1.1 组织来源

试验样本来自郑州新大牧业有限公司提供的大白和长白杂交的二元健康仔猪。以 28 日龄为断乳时间^[3], 随机选取断乳前 7 d 仔猪 3 头, 颈部放血处死, 取胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和结肠; 断乳后 7 d 仔猪 3 头, 颈部放血处死, 取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑、小脑、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和肠淋巴结组织。所有组织经 PBS 液处理后, 立即放入液氮速冻, 置 -80°C 的超低温冰箱保存。

1.2 酶与试剂

反转录试剂盒 (PureYieldTM RNA Midiprep Sys-

收稿日期: 2009-12-22

基金项目: 河南省重大科技攻关项目 (0522010800)

作者简介: 孙娅莉 (1983-) 女, 河南新密人, 在读硕士, 主要从事基础生理生化研究。

通讯作者: 杨国宇 (1966-) 男, 河南南阳人, 教授, 博士, 主要从事功能性基因的克隆与表达研究。

tem)、M-MLV反转录酶、Rnase Inhibitor购于美国 Prime α 公司; oligo(dT) $_{18}$ 、Dn Φ m ix IMD19-T载体、Agarose Gel DNA Purification Kit购于宝生物(大连)有限公司; 2 \times Taq Plus PCR Master mix DNA Ma α ke购于天根生化科技(北京)有限公司; SYBR-Green 染料购于北京百泰克生物技术有限公司。

1.3 仪器

B α metra Tgradient型温度梯度 PCR仪由德国 B α metra公司生产, ThermoStat Plus恒温孵育器、Mastercycler ep Realplex型荧光定量 PCR仪由德国 eppendorf公司生产。

1.4 试验方法

1.4.1 目的基因的克隆 以报道的哺乳动物 Galectin β 基因序列对猪 ESTs库和 UnGene进行搜索, 利用搜索的 EST拼接序列设计一对特异性克隆引物, 上游: 5'-TCTGGCAGGAGGTGAGACG-3'; 下游: 5'-CCATCCC GTTGTGAAGCTCAG-3', 由大连宝生物工程有限公司合成。

取断乳前仔猪胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和结肠组织, 断乳后心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑、小脑、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和肠淋巴结组织各约 300 mg, 按反转录试剂盒说明书提取所取各种组织总 RNA, 溶于 500 μ L Nuclease Free Water中, 使用 M-MLV反转录酶反转录得到 cDNA。以十二指肠 cDNA为模板进行 PCR扩增。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C变性 30 s; 58 $^{\circ}$ C退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C延伸 40 s; 30次循环; 最后 72 $^{\circ}$ C延伸 10 min。扩增产物用 Takara Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0进行纯化后连接到 IMD19-T载体上, 转化至 DH5 α 感受态细胞, 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.4.2 Galectin β 基因的组织分布分析 取断乳仔猪心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑、小脑、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和肠淋巴结等 15个组织的 cDNA, 依据上一步克隆出的 Galectin β 基因序列设计定量引物, 上游为 5'-AGCAAGAACCCAGAAATGCAGGTG-3'; 下游为 5'-AGCACCAAGATGTGAGCTCAAAG-3', 同时选取 RPL4作为内参基因, 根据 GenBank中猪的 RPL4基因序列设计一对特异性引物, 上游为 5'-CAAGAGTAAGTACAACCTTC-3'; 下游为 5'-GAAGTCTACGATGAATCTTC-3', 引物由大连宝生物工程有限公司合成, 采用 RT-PCR方法, 分析 Galectin β 在各组织中的分布情况。

1.4.3 实时荧光定量 PCR

1.4.3.1 荧光定量扩增模板选取 取断乳前、后仔猪的胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和结肠组织 cDNA作为荧光定量 PCR反应模板。

1.4.3.2 绘制标准曲线 将上述定量反应 cDNA样品混合后进行 10倍梯度稀释, 使用含有 10 $^{-5}$ ~ 10 $^{-1}$ 倍 DNA原液的稀释液作为反应模板进行荧光定量 PCR, 以判断扩增效率, 同时包括 1个阴性对照, 阴性对照以 RNA作为反应模板, 以验证有无基因组 DNA。数据收集和标准曲线的生成由仪器自带软件完成, 阈值线采用自动设定, 从而确保样品分析的一致性。

1.4.3.3 胃肠道中目的基因表达差异性分析 将断乳前和断乳后仔猪的胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和结肠组织的 cDNA作为实时荧光定量 PCR的反应模板, 每个样品均作 2管重复以减少操作误差, 每个样品均有内参基因 RPL4作为对照。反应体系: SYBR Green mix 10 μ L, 上下游引物各 0.25 μ L (10 pmol/ μ L), cDNA 2 μ L, Nuclease Free Water 7.5 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 1 min(预变性)后进入循环, 95 $^{\circ}$ C 20 s(变性), 60 $^{\circ}$ C 20 s(退火), 72 $^{\circ}$ C 20 s(延伸), 重复 40个循环, 设置在延伸阶段收集荧光信号。扩增完毕后, 进行熔解曲线分析以确定扩增产物的特异性, 温度从 60 $^{\circ}$ C缓慢递增至 95 $^{\circ}$ C, 连续测定样品的荧光强度以获取熔解曲线。

1.4.3.4 定量 PCR数据分析^[4-5] 以 RPL4基因为内参, 断乳前仔猪组织的 mRNA表达量作为对照组, 通过公式对断乳后仔猪样品组织中 Galectin β 相对表达量进行计算: $Rat\beta = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_{\text{target control sample}}}}{E_{\text{reference}}^{\Delta C_{\text{ref control sample}}}}$, 其中 Rat β 为 mRNA相对表达量; E_{target} 为目的基因扩增效率; $E_{\text{reference}}$ 为内参基因扩增效率; C_{control} 为对照组的 C α 值, C_{sample} 为样品组的 C α 值。对 mRNA相对表达量采用 SPSS1.5统计软件分析处理, 组间差异比较用 t检验。

2 结果与分析

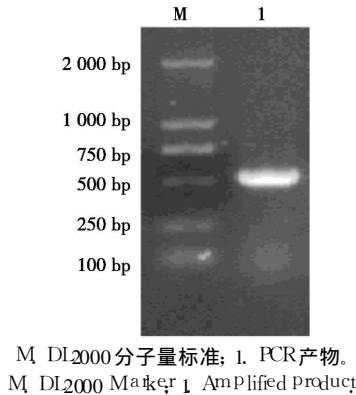
2.1 Galectin β 基因克隆及序列分析

Galectin β 的 PCR产物经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳, 显示扩增到一个片段约 548 bp的条带(图1), 与预计相符。切胶回收后, 连接、转化, 蓝白斑筛选, 送样测序确定即目的片段。序列被 NCB收录, 注册号: Accession NM_001142841。

2.2 仔猪 Galectin β 基因的组织分布

取断乳仔猪 15种组织: 心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑、小脑、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和肠淋巴结组织, 同时扩增 RPL4和 Galectin β

tin γ 3, 结果见图 2。由图 2 可知, Galectin γ 3 在断乳仔猪大部分组织中均有分布。



M DL2000 分子量标准; 1. PCR 产物。
M DL2000 Marker 1 Amplified Product

图 1 Galectin γ 3 基因电泳结果

Fig 1 Electrophoresis of amplified product of Galectin γ 3 gene

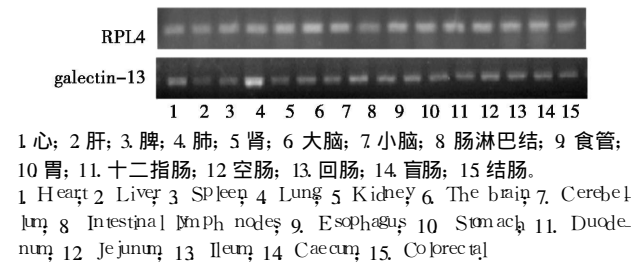


图 2 Galectin γ 3 在不同组织中的表达

Fig 2 Galectin γ 3 expression in different tissues

2.3 荧光定量 PCR 标准曲线和熔解曲线

内参基因 RPL4 和目的基因 Galectin γ 3 的扩增效率分别为 $E_{\text{reference}} = 1.96$ $E_{\text{target}} = 2.05$ 目的基因 Galectin γ 3 的直线方程为 $y = -3.8199x + 36.017$, 其中 x 代表 C 值, y 代表模板的拷贝数对数值, 线性回归方程的相关性系数 R^2 为 0.998 1 反应良好。所用引物可特异性扩增 DNA 序列, 经过 40 个循环后, 扩增产物的熔解温度均高于 80°C (图 3.4), 熔解曲线只有单一的尖锐陡峰, 表明各个产物特异性很高, 经电泳检测, 大小与产物长度符合, 说明扩增反应符合定量要求。

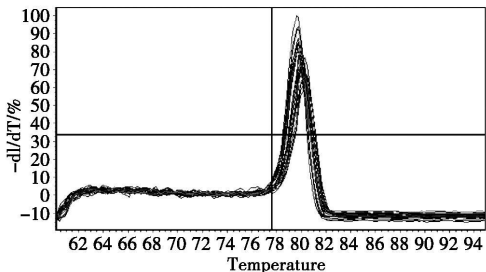


图 3 RPL4 熔解曲线图

Fig 3 RPL4 melting curve

2.4 断奶前、后 Galectin γ 3 在胃肠道组织中的表达差异

Galectin γ 3 基因在断乳前和断乳后仔猪胃肠道

组织中的表达差异见图 5。与断乳前相比, 断乳后 Galectin γ 3 基因表达在十二指肠和回肠组织中发生了显著变化。十二指肠组织中该基因表达上调了 3.17 倍 ($P=0.086$), 回肠组织中上调了 15.73 倍 ($P=0.001$), 而在胃、空肠、盲肠和结肠组织中的表达与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)。

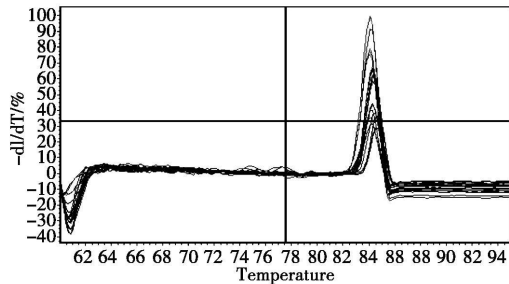


图 4 Galectin γ 3 熔解曲线

Fig 4 Galectin γ 3 melting curve

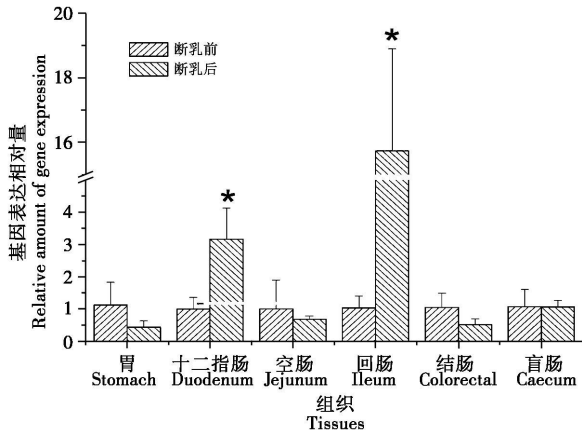


图 5 Galectin γ 3 在断乳前后仔猪胃肠道的表达差异

Fig 5 The fold change of Galectin γ 3 mRNA between pre and post weaning piglet gastrointestinal tract

3 讨论

凝集素是自然界广泛存在的一大类非免疫来源的、无酶活性的多价糖类结合蛋白, 能够参与细胞的识别和黏着, 将不同的细胞联系起来, 具有多种生物学功能。作为凝集素的一种, Galectins 具有特殊的氨基酸序列, 与含 β 半乳糖苷残基的糖结合物具有很高的结合力, 与肿瘤的转移、浸润、生长和黏附有关, 参与细胞的增值、分化和局部免疫调节和凋亡^[6]。Galectins 亦可以与胃、肠黏膜上的黏蛋白和上皮表面的多糖蛋白复合物结合, 形成的复合物可使上皮表面耐受腔内物质, 如胃酸、消化酶和外源微生物的破坏^[7]。因而, Galectins 与各种疾病相关的报道也在日益增多^[8,9]。

Galectin γ 3 发现于 1983 年, 含有单一的糖识别结构域, Northern Blot 杂交发现, Galectin γ 3 在人胎盘中特异性表达^[10], 此前的研究也主要集中于 Ga

lectin I3 基因与生殖系统的关系方面, 而关于 Galectin I3 对仔猪胃肠道的生理作用及 Galectin I3 在仔猪断乳前、后在胃肠道中的表达和活性差异则至今尚未见有报道。作为 Galectins 中的一员, Galectin I3 基因的结构与分布决定着它应该与仔猪胃肠道生理机能存在着某种联系。本试验研究发现, Galectin I3 基因在仔猪断乳前、后胃肠道各段均有表达, 但表达量却发生了变化, 与断乳前相比, 断乳后 Galectin I3 基因在十二指肠和回肠组织中的表达量显著上调, Thomson 等^[11] 应用荧光标记也证明猪半乳糖凝集素主要分布在小肠刷状缘^[11], 因此, 推测 Galectin I3 可能在胃肠道上皮细胞的组成、生长发育及稳定等方面起着特殊的作用, 保护肠道刷状缘不受胆汁、胰脏酶类和病原微生物的侵害, 从而对断乳后肠道的免疫起到重要的调节作用。

参考文献:

[1] 刘虎守, 李存德. 早期断奶仔猪腹泻原因及综合防控措施[J]. 现代农业科技, 2008(5): 201.
[2] Rabinovich G A. Galectin I as a potential cancer target[J]. British Journal of Cancer, 2005 92(7): 1188—1192
[3] 张永勇, 罗运全, 谈命安, 等. 断乳仔猪腹泻的预防和治疗[J]. 中国猪业, 2008(7): 36—37.
[4] Michael W P. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR[J]. Nucleic Acids

Research 2001 29 2002—2007.
[5] Vandesompele J, Katleen D P, Filip P. Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome biology 2002 3(7): 0034 1—0034 11.
[6] David C Kilpatrick. Animal lectins: a historical introduction and overview[J]. Biochim Biophys Acta 2002 1572(3): 187—197.
[7] Wasano K, Hirakawa Y. Recombinant galectin I recognizes mucin and epithelial cell surface glycoconjugates of gastrointestinal tract[J]. JHistochem Cytochem 1997 45: 275—283
[8] Saussez S, Cuu D R, Decaestecker C, et al. Galectin I (P53-induced gene 1): a new prognostic predictor of recurrence and survival in stage IV hypopharyngeal cancer[J]. Ann Surg Oncol 2006 13(7): 999—1009
[9] Nagy N, Legendre H, Engels Q, et al. Refined prognostic evaluation in colon carcinoma using immunohistochemical galectin fingerprinting[J]. Cancer 2003 97(8): 1849—1858
[10] Quan sheng Y, Kang Y, Hong ling Y, et al. Cloning and expression of a novel human galectin cDNA. Predominantly expressed in placenta[J]. Biochim Biophys Acta 2002 1574(3): 407—411
[11] Thomson M K, Hansen G H, Danielsen E M. Galectin I at the enterocyte brush border of the small intestine[J]. MolMembrBiol 2009(5): 1—9