

不同发育阶段绒山羊皮肤中 *FGF5* 基因 mRNA 表达的 RT-PCR 检测

高爱琴¹, 李 宁², 李金泉¹, 张燕军¹

(1. 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要:为深入研究成纤维细胞生长因子 5 对毛囊生长发育的生物学功能提供理论依据。在 10 月左右和 1 月左右, 即皮肤毛囊处于生长旺期和退行期时采集了 12 只内蒙古阿尔巴斯白绒山羊皮样, 利用 TRIZOL 试剂盒提取皮肤总 RNA(一步法), 利用 RT-PCR 方法检测 *FGF5* 基因在绒山羊绒毛周期性生长不同阶段皮肤中的表达分布情况, 试验结果表明, *FGF5* 基因 mRNA 在绒山羊毛囊生长旺期和退行期均有表达, 却只得到了一种剪切形式的表达, 经测序是长片段, 而缺失外显子 2 的短片段形式没有检测到。

关键词: 绒山羊皮肤; 纤维细胞生长因子 5; mRNA 表达

中图分类号: S827.9⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)01-0036-02

The *FGF5* Gene mRNA Expression in Cashmere Goat Skin Tissue

GAO Ai-qin¹, LI Ning², LI Jin-quan¹, ZHANG Yan-jun¹

(1. College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. National Laboratory for Agribiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to study the biological function of Fibroblast growth factor-5 on the growth and development of follicles in cashmere goat, *FGF5* as the Candidate factor investigating its expression in the different stages of Cashmere growth in skin tissue were studied by RT-PCR method. The results showed that *FGF5* gene was expressed in different time of the tested skin tissues, including anage and recessing period. But it only found one kind of mRNA, that was long splice mRNA, but other kind of short splice mRNA(*FGF5*) was not investigated.

Key words: Cashmere goat skin; Fibroblast growth factor-5 gene; mRNA expression

目前, 在鼠中有关影响被毛生长的调控因子研究有很多, 在众多的调控因子中, 大多数因子影响被毛的形态, 而目前只发现成纤维细胞生长因子(*FGF5*)通过影响毛囊生长期的长短从而影响被毛的长度^[1]。有一种突变即 angora 鼠(最初命名为 go 基因突变)引起被毛变长, 突变鼠比野生型鼠被毛长约 50%^[2]。这一突变现象引起了众多学者的关注, 研究证明安哥拉鼠是由 *FGF5* 突变引起的, 以后的一系列试验表明成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor-5 *FGF5*)是影响毛囊周期性活动及被毛生长的很重要的生长因子^[3,4]。被毛的长度影响被毛的产量, 是生产中很重要的生产性状, 所以本试验以成纤维细胞生长因子 5 为候选因子, 研究其在绒山羊绒毛周期性生长不同阶段皮肤中的表达分布情况, 以期对深入研究其在毛囊生长发育中的生物学功能提供依据。

1 材料和方法

10 月左右和 1 月左右皮肤毛囊处于生长旺期和退行期时采了共 12 只内蒙古阿尔巴斯白绒山羊皮样, 皮肤组织样采自内蒙古农牧畜牧科学院, 利用 TRIZOL 试剂盒提取皮肤总 RNA(一步法), 利用 RT-PCR 方法检测表达。

引物序列为: F 5'-3': TGC TCT TCC TCA TCT TCT GC R 5'-3': AGC GAA ACT TCA GTC TGT AC

扩增条件: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 退火温度 61℃, 复性 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。采用 RT-PCR 方法检测。

2 结果与分析

2.1 皮肤 RNA 的分离

利用 TRIZOL 试剂盒提取皮肤总 RNA(一步

收稿日期: 2007-07-31

基金项目: 国家自然科学基金地区重点基金与中国农业大学农业生物技术国家重点实验室联合资助(39969002)

作者简介: 高爱琴(1969-), 女, 河北蔚县人, 副教授, 在读博士, 主要从事动物遗传育种研究工作。

法), 但由于皮肤组织特殊的构造, 含角质化成分较多的缘故, 在用研钵研磨的过程需要时间较长, 提取的 RNA 降解较严重(图 1), 所以进一步采取将液氮中取出的皮样稍融后用小剪刀剪碎再用匀浆机处理, 这种方法提取的 RNA 质量要比用研钵处理好。由于在皮样冻融过程中仍有一部分 RNA 降解, 所以最后将皮样放到 TRIZOL 中, 利用 TRIZOL 中含有的 RNA 酶抑制剂抑制 RNA 的降解, 提取的 RNA 质量较好, 可做进一步研究(图 2)。

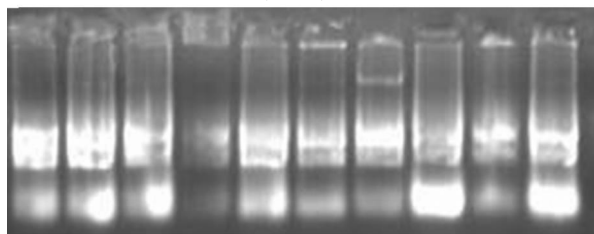


图 1 研钵法提取的 RNA
Fig. 1 RNA extracted in morta

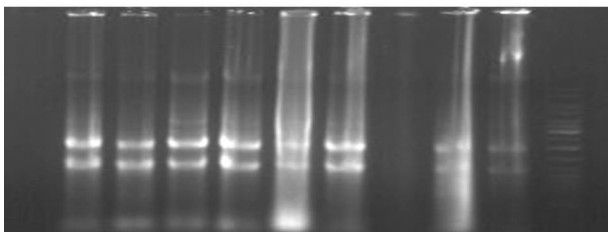
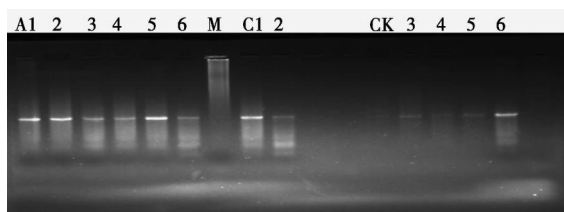


图 2 在 TRIZOL 中冻融后用匀浆机法提取的 RNA
Fig. 2 RNA extracted by homogenizer after
freez- thaw in TRIZOL

2.2 绒山羊 *FGF5* 基因皮肤组织特异性表达的 RT-PCR 检测

用设计的引物对绒山羊皮肤组织的总 RNA 进行 RT-PCR 检测, 结果见图 3。从图 3 可看出, 在绒山羊皮肤毛囊的生长期和退行期均检测到 *FGF5* 基因 mRNA 的表达。



A. 生长期; C. 退行期; CK. 阴性对照

A. Anage; C. Reassign period; CK. Negative control

图 3 绒山羊 *FGF5* 基因的的皮肤组织表达特异性检测

Fig. 3 RT-PCR analyze tissues expression pattern
of *FGF5* in cashmere goat

从 RT-PCR 试验结果得出, *FGF5* 基因 mRNA 在绒羊毛囊生长旺期和退行期均有表达, 与文献报道的 *FGF5* 基因在皮肤组织中的表达相似, 但文献报道用 RT-PCR 方法检测时出现了长短 2 条带, 即在鼠的皮肤组织中有剪切方式不同的两种 mRNA 存在, 短片段经测序是缺失了外显子 2 的结果。在试验中我们设计的引物是包括外显子 2 的序列, 却只

得到了一种剪切形式的表达, 经测序是长片段, 而缺失外显子 2 的短片段形式没有检测到, 这是 *FGF5* 基因在鼠和山羊的皮肤组织中不同的地方。

3 讨论

从 RT-PCR 试验结果可看出, *FGF5* 基因在绒羊毛囊生长旺期和退行期均有表达, 但由于只是定性检测, 无法确定 *FGF5* 基因 mRNA 表达水平在不同时期的准确差别, 虽然从扩增结果看其表达水平有差别, 但这有待于用半定量或定量检测进一步验证。与文献报道的 *FGF5* 基因在皮肤组织中的表达相似, 但文献报道用 RT-PCR 方法检测时出现了长短 2 条带, 即在鼠的皮肤组织中有剪切方式不同的两种 mRNA 存在, 短片段经测序是缺失了外显子 2 的结果。在试验中我们设计的引物是包括外显子 2 的序列, 却只得到了一种剪切形式的表达, 经测序是长片段, 而缺失外显子 2 的短片段形式没有检测到, 这是 *FGF5* 基因在鼠和山羊的皮肤组织中不同的地方^[5,6]。在绒山羊的皮肤组织中没有检测到小片段产物, 而在生长期和退行期均检测到长片段 mRNA 的转录, 那么在绒羊毛囊生长期对长片段产物发生拮抗作用的是什么因子? 这有待于进一步研究。可能有另外的因子代替 FGF5 短蛋白产物的功能^[7]。mRNA 原位杂交方法对基因的表达水平要求较高, 低水平的表达用该方法是很难检测的。而采用免疫组化方法需要有山羊的 FGF5 蛋白抗体, 目前该试剂的订购有较大困难, 另外检测 *FGF5* 基因在羊皮肤组织中的表达是为下一步的功能分析提供理论依据, 所以我们采用了操作简单、灵敏度较高的 RT-PCR 方法。

参考文献:

- [1] Pethö-Schramm A, Muller H J, Paus R. FGF5 and the murine hair cycle[J]. Arch Dermatol Res, 1996, 288(5/ 6): 264-266.
- [2] Pennycuik P R, Raphael K A. The anagen locus (go) in the mouse: Hair morphology, duration of growth cycle and site of action[J]. J Clin Invest, 1999, 104(7): 855- 864.
- [3] Hebert J M, Rosenquist T, Martin G R. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: Evidence from targeted and spontaneous mutations[J]. Cell, 1994, 78: 1017- 1025.
- [4] Suzuki S, Ota Y, Ozawa K. Dual-mode regulation of hair growth cycle by two Fgf-5 gene products[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(3): 456- 463.
- [5] Suzuki S, Kato T, Takimoto H. Localization of rat FGF-5 protein in skin macrophage-like cells and FGF-5S protein in hair follicle: Possible involvement of two Fgf-5 gene products in hair growth cycle regulation[J]. J Invest Dermatol, 1998, 111(6): 963- 972.
- [6] Ito C, Saitoh Y, Fujita Y. Decapeptide with fibroblast growth factor(FGF)-5 partial sequence inhibits hair growth suppressing activity of FGF-5[J]. J Cell Physiol, 2003, 197(2): 272-283.
- [7] Ota Y, Saitoh Y, Suzuki S, et al. Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(1): 169-176.