

利用 Affymetrix 芯片分析民猪冷应激后肌肉组织的基因表达谱

张冬杰, 刘 娣*, 别 墅, 孙洪涛, 汪 亮, 王文涛, 何鑫森

(黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086)

摘要: 冷应激可引起动物生产性能下降, 诱发多种疾病, 甚至造成死亡。民猪是我国北部地区特有的一个抗寒品种, 为了研究冷应激下基因的表达调控机制, 本研究利用 Affymetrix 猪基因芯片对民猪冷应激后肌肉组织内表达发生变化的基因进行了高通量的检测。结果, 共检测到差异基因 34 个, 其中下调表达的基因 27 个, 上调表达的基因 7 个。在下调表达的基因中有 7 个 (*OAS1*、*IRG6*、*ISG20*、*DDX58*、*IFIT1*、*ISG15*、*CXCL9*) 与干扰素诱导相关, 1 个 (*FST*) 与生长性状相关, 2 个 (*MX1*、*PG-2*) 与抗病毒有关, 2 个 (*S100A9*、*Numb*) 与细胞生长和凋亡有关; 上调表达的基因功能还不清楚, 推测它们可能与提高机体的抗寒性有关。对其中 5 个基因进行了 Real-time PCR 分析, 证实它们都受到了温度的调节, 与芯片检测结果吻合。结果提示, 重度冷应激会造成机体免疫力下降, 生长减缓。

关键词: 民猪; 冷应激; 基因芯片; Real-time PCR

中图分类号: S828; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)12-1661-05

Gene Expression Analysis upon Cold Induced by Affymetrix Pig Chip

ZHANG Dong-jie, LIU Di*, BIE Shu, SUN Hong-tao, WANG Liang, WANG Wen-tao, HE Xin-miao
(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Cold stress can cause animal performance descending, induce various diseases, even result in death. Min pig is a unique anti-cold breed in north region of China. In order to study regulation mechanisms of gene expression under cold stress, gene profiling was performed using Affymetrix pig chip on the basis of equally mixed RNA samples from 2 treatments. Thirty-four differentially expressed genes were detected, among them, twenty-seven genes were down-regulated and seven genes were up-regulated. Among down-regulated genes, seven genes (*OAS1*, *IRG6*, *ISG20*, *DDX58*, *IFIT1*, *ISG15*, *CXCL9*) were associated with interferon induction, one (*FST*) was associated with growth, two (*MX1*, *PG-2*) were associated with anti-virus, two (*S100A9*, *Numb*) were associated with cell growth and apoptosis. But the specific functions of the up-regulated genes were unknown, which may have relationship to animal cold resistant. Several genes were selected for Real-time PCR analysis, and the results showed that their expression patterns were consistent with the result of gene chip hybridization. The severe cold stress could cause immunity declining and growth slowing.

Key words: Min pig; cold stress; gene chip; Real-time PCR

东北民猪是我国华北型地方猪种的主要代表之一。全身被毛为黑色, 鬃毛较长密, 冬季大多密生棕

色绒毛, 体型中等大小, 颜面较长直, 有纵行皱纹, 耳较大下垂, 背腰有的微凹, 四肢较粗壮。民猪与我国

收稿日期: 2010-12-19

基金项目: 国家自然科学基金(31072020)

作者简介: 张冬杰(1980-), 女, 黑龙江桦南人, 副研究员, 博士, 主要从事猪的分子遗传育种研究, E-mail: djzhang8109@163.com

* 通讯作者: 刘 娣, 教授, E-mail: liudi1963@163.com

其他地方猪种相比,一个显著特征就是抗寒性强。当外界温度下降到 -20°C 时,民猪的体温、心率、呼吸频率以及体表温度的下降都要显著低于长白猪。而且在 -28°C 的低温下,也不会出现寒颤和不安的现象^[1]。生理指标比长白和大白猪有更大的稳定性^[2]。因此,研究民猪抗寒特性的遗传机理对于充分合理的利用民猪资源,以及丰富我国在低温生物学研究领域的研究成果都具有重要意义。目前,已有多篇利用芯片技术研究猪的功能基因的报道^[3-4],但是利用该技术研究猪的抗寒性还未见报道。由于芯片技术具有高通量、并行检测的特点。因此,本研究拟采用 Affymetrix 的表达芯片对不同处理下的民猪肌肉组织内的差异表达基因进行筛选和分析,为后续的理论研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

75 日龄民猪 3 窝,每窝随机选取 4 头母猪,共计 12 头,均购自黑龙江省农业科学院畜牧研究所。将每窝个体随机分成 2 组即常温组和低温组,每组各 6 头。

1.2 民猪的低温冷诱导处理

2009 年 12 月 25 日到 2010 年 1 月 6 日期间,将常温组置于正常舍内饲养,温度控制在 $(10\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 左右,低温组在舍外半敞式大棚内饲养,平均温度为 $(-20\pm 2)^{\circ}\text{C}$,2 组均饲喂相同的饲料。处理结束后,屠宰,取腿部肌肉各 10 g 左右,液氮带回实验室, -80°C 冰箱冻存。

1.3 总 RNA 提取、基因芯片结果分析及基因功能预测和分析

使用 Trizol(Invitrogen 公司)分别提取每个样品的总 RNA,每个处理组内同窝的 2 个不同个体总 RNA 等量混合,作为 1 个样品,共计 6 个样品,编号为常温组的 C1、C2、C3 和低温组的 D1、D2、D3。每个样品的总 RNA 分别纯化后与猪基因表达谱芯片(Affymetrix,包含 24 123 个探针,其中有 22 458 个基因是已知基因,1 665 个其他的探针;有 2 000 个功能类,221 个蛋白类,135 个染色体类)进行杂交。芯片杂交试验由天津生物芯片技术有限责任公司完成。根据该公司提供的检测数据,将 C1 作为基线,进行芯片数据归一化,数据用 \log_2 进行转换,将常温组和低温组进行比较分析,选择大于 1 和小于 -1 的差异基因。根据差异表达基因探针代码,在 GenBank 数据库中获得基因注释,并进行 Pathway 的生物学注释(pathway 的数据库来自于公共数据库 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)),最后对差异基因进行层次聚类分析。

1.4 荧光定量 RT-PCR 验证

选取 5 个芯片检测存在明显表达变化的基因,采用 SYBR Green I 法进行荧光定量 RT-PCR 试验以验证芯片结果的可靠性。引物使用 Primer 5.0 软件设计(表 1),由上海生工生物工程有限公司合成,cDNA 制备使用 TaKaRa 公司生产的 RNA PCR Kit(AMV) Ver3.0 试剂盒,每个样本重复测定 3 次,实时定量 PCR 分析由 Mx3000p 定量 PCR 仪(Stratagene 公司)完成。目的基因相对表达量的计算按照如下公式计算:相对表达水平 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{试验组}} - (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$ 。其中的管家基因是 βactin 。

表 1 荧光定量 RT-PCR 验证的基因和引物相关信息

Table 1 Information on the primers used for quantitative Real-time PCR

基因 Gene symbol	引物序列(5'-3')Primer sequence	片段长度/bp Fragments length	GenBank 登录号 GenBank accession No.
CYP1A1	AAGAGGATGGACGAGAATGCC GGTGAAGGGAACGAAGGAGGT	282	NM_214412
FST	AAACCTACCGCAACGAATGTG TGCCAGCCTTGAAATCCATA	381	NM_001003662
DDX58	TTACCTTTGTCACCAGCACCA ACGAATCTGACCAGGAACCAT	335	AF319661.1
ZNF12	AAGGGAACCCTCACTGTCCATC GTCAGAGTAGACTTTCGCGAG	200	XM_003125424
PDZRN3	CGGGCCGTCTCAAAGAATCTGC CATCTGGCTCTGTGCGTACTCG	298	XM_003132326

2 结 果

2.1 差异表达分析

2 个处理组间差异倍数在 2 倍以上的基因共有 34 个(表 2),其中有些基因只是一段 EST 序列,经

NCBI 的 BLAST 在线软件比对后,也无法找出其源基因,只能以 Affymetrix 芯片公司上的编号命名,其中低温处理组与常温组相比,显著下降的基因共 27 个,其中 10 个是未知基因;显著上升的基因共 7 个,其中 2 个是未知基因。

表 2 2 个处理组间差异表达的基因(差异倍数>2 倍)

Table 2 List of differential expression genes between two groups (fold change>2)

序号 ID	基因 Gene name	基因符号 Gene symbol	GenBank 登录号 GenBank accession No.	染色体 位置 Location	平均差 Difference of means
与常温组相比表达下降的基因 Downregulated gene					
1	Ssc. 2641. 1	未知	AW313822	-	-1.05
2	Ssc. 29281. 1	未知	CO953055	-	-1.40
3	Ssc. 30216. 1	未知	CO988299	-	-1.10
4	Ssc. 30008. 1	未知	CO947798	-	-2.35
5	Ssc. 30027. 1	未知	CO948050	-	-1.12
6	Ssc. 10799. 1	未知	BQ598004	-	-1.02
7	Ssc. 10285. 1	未知	BI400467	-	-1.46
8	Ssc. 26005. 1	未知	BX926252	-	-1.55
9	Ssc. 17718. 1	未知	BQ604042	-	-1.12
10	Ssc. 26456. 1	MCA-32	CN069543	-	-1.03
11	myxo-virus resistance 1	MX1	NM_214061	13	-1.25
12	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46 ku	OAS1	NM_214303	14	-1.38
13	cytochrome P450 1A1	CYP1A1	NM_214412	7	-1.21
14	inflammatory response protein 6	IRG6	NM_213817. 1	3	-1.45
15	interferon stimulated exonuclease gene 20 ku	ISG20	NM_001005351	-	-1.29
16	IgG heavy chain	LOC396781	NM_213828	-	-1.35
17	follistatin	FST	NM_001003662	16	-1.04
18	leukocyte antimicrobial peptide precursor	PG-2	L24745	-	-1.97
19	Ig gamma 2b chain constant region/ IgG heavy chain	IGG2B/LOC396781	BX670708	-	-1.04
20	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	DDX58	AF319661. 1	-	-1.08
21	proline dehydrogenase (oxidase) 1	PRODH	AK231562	-	-1.33
22	brain expressed X-linked 1	BEX1	XM_003135280	X	-1.13
23	S100 calcium binding protein A9	S100A9	NM_001177906	4	-1.07
24	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT-1), transcript variant 2	IFIT1	XM_003133142	14	-1.22
25	ISG15 ubiquitin-like modifier	ISG15	NM_001128469	-	-1.26
26	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXCL9	NM_001114289	8	-1.07
27	numb homolog (Drosophila), transcript variant 1	NUMB	XM_003128649	7	-1.09
与常温组相比表达上升的基因 Upregulated gene					
28	Ssc. 7399. 1	未知	BF712467	-	1.01
29	Ssc. 22211. 2	未知	CF794439	-	1.76
30	zinc finger protein 12	ZNF12	XM_003125424	3	1.04
31	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	XM_003126160	5	1.91
32	haptocorrin	haptocorrin	X52566	-	1.47
33	PDZ domain containing ring finger 3	PDZRN3	XM_003132326	13	1.17
34	solute carrier family 23 member 3	SLC23A3	XM_001925526	15	1.57

2.2 芯片结果中差异表达基因的功能预测和分析

干扰素系统属于脊椎动物抵抗病毒攻击的先天免疫系统,病毒感染后细胞产生并分泌干扰素(IFN),IFN反过来诱导一系列抗病毒蛋白的表达,使机体进入抗病毒状态。本研究中所筛出的17个基因表达显著下降,且功能已知的基因中有7个是在干扰素诱导下产生的,如:*OAS1*^[5],*IRG6*^[6],*ISG20*^[7],*DDX58*^[8-9],*IFIT1*^[10-11],*ISG15*^[12-13],*CXCL9*^[14],可见,冷应激使机体的抗病毒能力下降。其他10个显著下调的功能基因中,有1个与抗病毒直接相关的*MX1*基因^[15],2个与体温调节有关的*CYP1A1*^[16-18]和*P450*^[19]基因;1个与生长性状显著相关的*FST*基因^[20-21];1个抗菌肽PG-2^[22-23];1个线粒体酶*PRODH*^[24];1个与精子发生及生精小管发育相关的基因*BEX1*^[25];以及2个与细胞生长分化和凋亡有关的*S100A9*^[26]和*Numb*^[27]。

本研究所筛选出的5个表达显著上调的基因中,除了*PDZRN3*基因功能未知外,其余4个基因分属于不同的超家族。如*ZNF12*在MAPK(Mitogen-activated protein kinase)信号通路中起着转录阻抑的作用^[28]; *CXCL2*属于ELR趋化因子,对嗜中性粒细胞有强烈的趋化活性,但不能趋化单核细胞^[29]; *haptocorrin*是一个与维生素B₁₂运载相关的蛋白^[30]; *SLC*是细胞内最大的一类转运蛋白^[31]。

2.3 差异基因的通路聚类分析

Pathway分析采用公共Pathway数据库KEGG,*P*值设为0.001时,没有发现与差异基因可能相关的通路。推测这可能是由于目前猪的基因组注释信息还很有限,GO和Pathway的注释信息也有限,故导致GO和Pathway等功能富集分析难以获得有生物学意义的结果。层次聚类分析结果显示,有4个基因(*OAS1*,*CXCL2*,*DDX58*,*CXCL9*)聚为免疫反应类(Immune response),3个基因(*MX1*,*IRG6*,*DDX58*)聚为病毒反应类(Response to virus),3个基因(*OAS1*,*ISG20*,*DDX58*)聚为RNA结合类(RNA binding)。

2.4 实时定量PCR结果

为验证芯片结果的可靠性,从芯片杂交结果中选择3个表达下调的基因(*CYP1A1*、*FST*、*DDX58*)和表达上调的基因(*ZNF12*和*PDZRN3*),进行Real-time PCR验证。结果表明,实时定量PCR检测结果与基因芯片检测结果趋势基本一致(图1),说明本试验芯片数据是可靠的。

3 讨论

一般来说,急性和重度冷应激常使机体呈现免

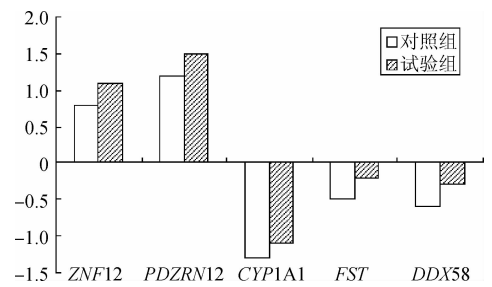


图1 应用Real-time PCR方法验证猪表达芯片
Fig. 1 Application of Real-time PCR method for demonstrating pig expression chip

疫抑制^[32],而慢性和温和冷应激常引起免疫增强^[33]。本研究中低温处理组的平均温度为-20℃,属于重度冷应激,因此发现有7个与免疫力有关的基因表达出现了显著下降。推测是由于应激引起脾脏和淋巴结对刀豆素(ConA)及植物血凝素A(PHA)的反应性减弱,自然杀伤细胞(NK)杀伤活性下降,对靶细胞的攻击力下降;抑制淋巴细胞特别是T淋巴细胞的有丝分裂和DNA合成;损伤浆细胞,阻碍免疫球蛋白的合成和分泌;抑制巨噬细胞对抗原的吞噬和处理,进而对机体的免疫功能带来一定的影响^[34]。

在低温处理期间,我们还发现,低温组的个体体质量增加要显著低于常温组,在差异表达基因中也筛出了*FST*这样一个与生长性状显著相关的功能基因,推测*FST*的表达及功能行使易受到外界环境的影响。此外,还有与抗病毒有关的*MX1*和*PG-2*,以及与细胞生长和凋亡有关的*S100A9*和*Numb*,表达水平都出现了显著下降,可见,低温环境对动物机体的生长和抗病都会造成不利的影。而表达上调的基因,推测应该是与机体抗冷性有关的基因,机体通过启动或提高它们的表达,给出逆境保护措施,从而协助动物度过难关或逆境。但由于目前对这些基因的研究还不够清楚,所以无法确定机体是通过何种方式、何种途径来抵御寒冷应激的,这些仍需进一步的研究分析。

4 结论

本研究采用Affymetrix芯片筛选了民猪冷应激后肌肉组织内的差异表达基因,发现冷应激后,与机体免疫力相关的7个基因表达水平发生显著下降,与生长性状显著相关的*FST*基因表达水平也出现了显著下降,这与我们日常观测到的冷应激下机体易生病、生长变缓的现象非常吻合。但对于冷应激下,表达上调,能够帮助机体抵御寒冷气候的相关基因研究还不够深入,需要进一步研究分析。

参考文献:

- [1] 赵刚. 东北民猪研究[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1988.
- [2] 周传臣,张玉芝,高健. 东北民猪 de 优良特性[J]. 养殖技术顾问,2005,(2):10.
- [3] 李明洲,李学伟,朱砺,等. 利用功能分类基因芯片研究不同品种猪脂肪中特定基因的发育性变化[J]. 生物工程学报,2008,24(4):665-672.
- [4] 李明洲,朱砺,李学伟,等. 长白猪和太湖猪不同生长阶段脂肪中肉质和胴体性状相关基因的表达谱分析[J]. 中国科学 C 辑:生命科学,2008,38(8):729-741.
- [5] TORRALBA S,SOJAT J,HARTMANN R. 2'-5' oligoadenylate synthetase shares active site architecture with the archaeal CCA-adding enzyme[J]. *Cell Mol Life Sci*,2008,65(16):2613-2620.
- [6] GWONHWA S,FULLER W B, THOMAS E S. Pregnancy and interferon tau regulate RSAD2 and IFIH1 expression in the ovine uterus[J]. *Reproduction*, 2007,133: 285-295.
- [7] 蔡应木,焦晓阳,叶向群. 干扰素抗病毒应答途径新基因—干扰素激活基因 20 结构和功能研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(1):41-42.
- [8] ALINA B,RAVI S, ADOLFO G S. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing[J]. *PNAS*, 2010,107(37): 16303-16308.
- [9] 孙岳平,张丽君,张梅,等. RIG-I 基因剔除小鼠表型的初步分析[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2008,(7): 836-840.
- [10] 郭晓妹,方海立. 系统性红斑狼疮的发生与干扰素诱导表达基因 IFIT1 的研究进展[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(增刊):52-53.
- [11] 李淑蓉,粟永萍,刘晓宏,等. 干扰素诱导蛋白 P56 与糖皮质激素受体的相互作用及其转录活性的影响[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31(9):791-795.
- [12] 石贺欣,陈巍,王琛. ISG15 类泛素化修饰:宿主细胞固有的抗病毒的新机制[J]. 中国细胞生物学学报,2010,32(3):343-349.
- [13] 万新星,陈汉春. 类泛素修饰蛋白质 ISG15 及其修饰酶系的功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2010,26(4): 295-300.
- [14] 路慧丽,俞眉,韩伟. 趋化因子 CXCL9/Mig 的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(10): 57-61.
- [15] 吴圣龙,包文斌,鞠慧萍,等. 猪 Mx1 基因第 14 外显子多态性分析及新突变位点的发现[J]. 遗传,2007,29(6): 693-698.
- [16] 王丽平,陆承平. 人工感染猪链球菌对小鼠肝脏药物代谢酶的抑制作用[J]. 中国农业科学,2009,42(3): 1078-1083.
- [17] 吕慧,宋述强. 细胞因子与细胞色素 P450[J]. 海峡药学,2001,13(3):1-3.
- [18] 狄军艳,冯甲棣. 细胞色素 P450 与体温调节[J]. 锦州医学院学报,2002,23(4):74-77.
- [19] 狄军艳,冯甲棣,张玉霞,等. 大鼠肝微粒体细胞色素 P450 在体温调节中作用的探讨[J]. 中国医科大学学报,2003,32(3):201-202.
- [20] 姜丹丹,牟彦双,李慧,等. 猪卵泡抑素 (follistatin) 基因真核表达载体的构建及体外表达[C]//中国畜牧兽医学动物解剖学及组织胚胎学分会第十六次学术研讨会论文集,2010.
- [21] 张宁,张雪梅,刘明军,等. 绵羊 Follistatin 基因表达及其结构域的功能分析[J]. 生物工程学报,2010,26(8):1050-1056.
- [22] KOKRYAKOV V N, HARWIG S S, PANYUTICH E A, et al. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins[J]. *FEBS Lett*,1993,327(2):231-236.
- [23] 李云松. 猪血液中抗菌肽成熟肽 pMAP-23 与 pG-2 基因的克隆及原核表达[D]. 长春:吉林农业大学,2008.
- [24] 姜万奎,许青松. 延边地区朝鲜族、汉族人群脯氨酸脱氢酶和 5-羟色胺 2A 受体基因基因座遗传多态性[J]. 吉林医学,2007,28(11):1320-1321.
- [25] 杨泉胜,夏放,吴海,等. 脑表达的 X 连锁基因的克隆、染色体定位和初步功能研究[J]. 复旦学报(自然科学版),2000,39(6):613-617.
- [26] 郭佳,王要军,刘海军. S100A9 在肿瘤方面的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2009,9(22):4379-4380.
- [27] 钱文雨,李华顺. Numb 与神经发育[J]. 中国细胞生物学学报,2010,32(1): 1-16.
- [28] ZHAO Y,ZHOU L, LIU B, et al. ZNF325, a novel human zinc finger protein with a RBaK-like RB-binding domain, inhibits AP-1- and SRE-mediated transcriptional activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2006,346(4):1191-1199.
- [29] 熊玉宝. MIP-2 在大鼠急性胰腺炎肺损伤发病机制中的作用[D]. 苏州:苏州大学,2004.
- [30] HEWITT J E, SEETHARAM B, LEYKAM J, et al. Isolation and characterization of a cDNA encoding porcine gastric haptocorrin [J]. *Eur J Biochem*, 1990,189(1):125-130.
- [31] 王继红,李西川,蒋伶活. 第 10 个溶质转运蛋白家族 (SLC10) 的细胞功能[J]. 中国细胞生物学学报,2009,31(6):754-760.
- [32] 李荣侠,孙国志,赵伟. 冷应激对海兰雏鸡某些血相变化的影响[J]. 黑龙江动物科学和兽医,2005,8:40-41.
- [33] 计红,杨焕民,李士泽,等. 冷应激对仔猪血浆相关细胞因子和 IgG 水平的影响[J]. 应用与环境生物学报,2010,16(5): 632-636.
- [34] 李丽娟,王安,芦燕. 冷应激对肉仔鸡生长性能、免疫及抗氧化功能的影响[J]. 中国饲料,2009,(17):42-43.