

小鼠 *RPL9* 基因克隆及组织表达差异性研究

李霞¹,景亚星¹,白鹭²,赵泉阳¹,高焕云²,郑振宇^{1,2*}

(1.河南农业大学 生命科学学院,河南 郑州 450002; 2.河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002)

摘要: 根据已报道的小鼠核糖体蛋白 L9 基因(*RPL9*)序列设计 PCR 引物,克隆 *RPL9* 基因,并以 β -*actin* 为内参基因,采用相对荧光定量 RT-PCR 方法,检测、分析 *RPL9* 基因 mRNA 在小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑及脂肪 7 个组织中表达量的差异。结果表明,成功克隆出 *RPL9* 基因序列全长,该基因在小鼠的 7 个组织中均有不同程度的转录表达,其中,在脂肪中的表达量最高,在肾、脾和脑中的表达量较高,在心、肝中的表达量较低,在肺中表达量最低。

关键词: *RPL9* 基因; 克隆; 荧光定量 PCR; β -*actin* 基因; 组织

中图分类号: S865.1⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)05-0142-04

Cloning and Expression Difference Analysis of
Mouse Ribosomal Protein L9 Gene (*RPL9*)

LI Xia¹, JING Yaxing¹, BAI Lu², ZHAO Xiaoyang¹, GAO Huanyun², ZHENG Zhenyu^{1,2*}

(1. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: We designed PCR primers which were based on ribosomal protein L9 gene (*RPL9*) sequence in mouse reported, and then cloned *RPL9* gene. Using β -*actin* as internal gene, the method of the relative fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect and analyze the expression differences of *RPL9* gene mRNA in seven kinds of tissues in mouse, such as heart, liver, spleen, lung, kidney, brain and fat. The results showed that we cloned *RPL9* gene successfully, the expression of *RPL9* gene had different levels of transcription in different tissues, the highest amount of expression in the fat, higher expression in kidney, spleen and brain, lower amount of expression in the heart and liver, the lowest amount of expression in the lung.

Key words: *RPL9* gene; cloning; fluorescence quantitative PCR; β -*actin* gene; tissues

近年来,各种与肉质品质相关的基因纷纷被发现,同时基因组学和蛋白质组学的发展也使人们开始从分子水平上进行品种优化、性状改良^[1-2]。基因的表达具有组织特异性和发育阶段特异性等特点,如发育和分化、对逆境的反应、细胞分裂、老化等^[3-4]。因此,研究不同类型细胞中基因表达的差异并克隆表达特异性的基因,对于深入研究基因表达的调控,了解生命过程的本质具有十分重要的意

义。核糖体蛋白一般被认为组成核糖体并参与蛋白质的合成,还参与基因的复制、转录、RNA 加工、DNA 修复等许多生命活动^[5]。除了参与蛋白质的合成之外,核糖体蛋白还有其他功能,如正常细胞恶性转化等^[6]。核糖体蛋白 L9(*RPL9*)是核糖体大亚基的组成部分^[7],其具有不寻常的结构,分子式为 C₁₇₀₉H₂₈₄₁N₅₇₉O₇₁₃S₁₂₂,总原子数为 5 964,编码的氨基酸数为 192,等电点为 9.96,其中,负电荷残基 20

收稿日期:2014-11-12
基金项目:河南省教育厅高校杰出科研人才创新工程项目(006KYCX015)
作者简介:李霞(1988-),女,河南新郑人,在读硕士研究生,研究方向:动物遗传工程。E-mail:924195654@qq.com
* 通讯作者:郑振宇(1962-),男,吉林龙井人,教授,博士,主要从事分子遗传学和动物遗传工程方面的研究。
E-mail:cbuniv@126.com

个、正电荷残基 33 个,相对分子质量为 21 863.4,包括 1 个由 α -螺旋连接的 2 个紧凑的球状结构域,该结构域能与 23S rRNA 相互作用^[8-9]。关于 *RPL9* 基因的具体作用以及作用模式目前尚不清楚,根据河南农业大学动物遗传工程实验室的前期研究成果,预测 *RPL9* 可能与肉质性状相关。为了进一步研究 *RPL9* 基因的相关功能,克隆了小鼠 *RPL9* 基因,检测并分析 *RPL9* 基因在小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、脂肪 7 个组织中 mRNA 表达量的差异,旨在为研究 *RPL9* 基因的表达规律奠定基础,同时为研究该基因与肉质性状的相关性提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试动物

选取 8~10 周龄 DDK 品系小鼠(河南农业大学动物遗传工程实验室),小鼠体质量均为 25 g 左右。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、荧光定量试剂盒、异丙醇、75% 乙醇、DEPC、 β -*actin* 引物等均购自郑州久是生物技术有限公司。

1.3 主要仪器设备

Eco 实时定量 PCR 仪、低温离心机、PCR 仪、ND-1000 紫外分光光度计等均购自 Eppendorf 公司。

1.4 方法

1.4.1 总 RNA 提取 试验所用剪刀、器皿均用 0.1% DEPC 水处理,并高压灭菌(121 ℃、15 min)。将供试 DDK 品系小鼠解剖,分别取小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑及脂肪组织置于不同器皿中。分别取各个组织装于预冷的研钵中,迅速加入液氮研成粉末;加入含有 1 mL Trizol 的离心管,混匀后静置 15 min;加入 200 μ L 氯仿,混匀后静置 2 min;4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,小心取上清加入到新 1.5 mL 离心管中,加入 700 μ L 异丙醇,4 ℃ 静置 1 h;4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,加入 1 mL 75% 的乙醇洗涤沉淀;弃去乙醇,可用移液枪小心吸出,尽量不要弃去沉淀,干燥后加入 50 μ L DEPC 水,反复吹打混匀,离心管内即为 RNA 溶液。

用紫外分光光度计测定总 RNA 的纯度和浓度。

1.4.2 反转录反应 取 1 μ L 小鼠肝脏组织的总 RNA 提取液为模板,以 Oligo(dT)为反转录引物,在反转录酶作用下反转录合成 cDNA,反应体系参照反转录试剂盒说明书。

1.4.3 引物的设计与合成 参考小鼠 *RPL9* 基因序列(收录号 NM_011292.2),应用 Primer Premier 5.0 设计 PCR 引物。上游引物:5'-TCTGCGGAGG-GACTTCAATCACATC-3',下游引物:5'-GTTC-CTTTCTGTTACCCACCATTT-3',预期扩增片段长度为 579 bp,引物由 Invitrogen 公司合成。

1.4.4 PCR 反应 PCR 总反应体系为 50 μ L,其中 10 \times PCR Buffer 5 μ L, MgCl₂ 5 μ L, dNTP Mixture 5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,上、下游引物各 2.5 μ L,模板 DNA 为 5 μ L,加 ddH₂O 补充反应体系至 50 μ L。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,57.2 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 50 s,共 25 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。按 DNA 胶回收试剂盒说明回收目的片段。

1.4.5 测序鉴定 将回收产物与 pMD18-T 载体连接,待重组菌株鉴定正确,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。利用 DNAMAN 软件对所测目的基因核苷酸序列与 GenBank 注册的小鼠 *RPL9* 基因核苷酸序列(NM_011292.2)进行比对,将测序结果正确的重组菌株-70 ℃ 长期冷冻保存。

1.4.6 荧光定量 PCR 检测 以逆转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,以小鼠 β -*actin* 基因作为内参基因,采用相对定量进行分析。荧光定量 PCR 目的基因及内参基因的上、下游引物如表 1 所示。荧光定量 PCR 总反应体系为 20 μ L;PCR Mix 10 μ L,上、下游引物各 0.8 μ L,模板 DNA 2 μ L,无酶水 6.4 μ L。反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 30 s(45 个循环)。在小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、脂肪 7 个组织中,每个组织的荧光定量设置 3 个平行,每个平行均以 β -*actin* 作为对照,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据计算,采用 SAS 8.0 统计软件对各数值进行单因素方差分析^[10-13]。

表 1 荧光定量 PCR 上下游引物

基因名称	引物(5'—3')	片段长度/bp	退火温度/℃
<i>RPL9</i>	F:TCTGCGGAGGGACTTCAATCACATC	101	60
	R:GTTCCTTTCTGTTACCCACCATTT		
β - <i>actin</i>	F:GCGGCATCCACGAAACTAC	138	60
	R:TGATCTCCTTCTGCATCCTGTC		

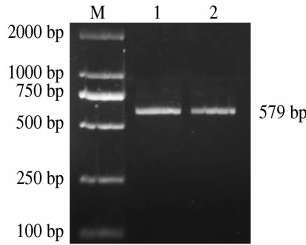
2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取与检测结果

提取小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、脂肪 7 个组织中的 RNA,紫外分光光度计测定结果显示,各个组织 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀值均在 1.7 ~ 2.0,说明 RNA 质量高,可以用于后续试验。

2.2 小鼠 RPL9 基因的 PCR 扩增

小鼠 RPL9 基因的 PCR 扩增结果如图 1 所示,目的条带介于 500 ~ 750 bp,与预期结果相符。



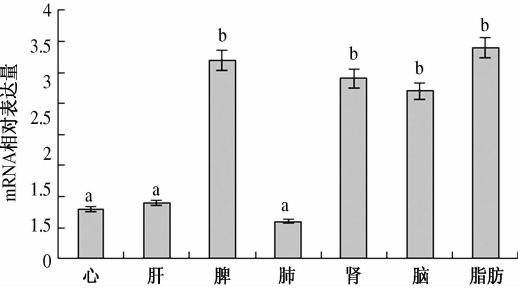
M. DNA Marker 2000; 1、2. 小鼠 RPL9 基因 PCR 扩增产物
图 1 小鼠 RPL9 基因 PCR 扩增结果

2.3 小鼠 RPL9 基因测序结果

将小鼠 RPL9 基因测序结果与 GenBank 注册的小鼠 RPL9 基因序列 (NM_011292. 2) 进行比对,结果表明,仅有极少量序列存在差异,两者的同源性为 98.45%。表明成功克隆出小鼠 RPL9 基因。

2.4 荧光定量 PCR 检测结果

由图 2 可以看出,在小鼠的 7 个组织中均可检测到 RPL9 的表达,其中脂肪的表达量最高,与脾、肾、脑差异不显著 ($P > 0.05$),与心、肝、肺的表达量差异显著 ($P < 0.05$);在内脏组织中,脾的表达量最高,与肾差异不显著 ($P > 0.05$),心与肝的表达量差异不显著 ($P > 0.05$),肺的表达量最低。



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)
图 2 RPL9 基因荧光定量 PCR 结果分析

3 结论与讨论

根据已报道的小鼠 RPL9 基因序列,设计特异性引物,并运用 PCR 技术扩增鼠 RPL9 基因,其长度

为 579 bp,测序结果表明,该序列与 NM_011292. 2 登录的序列同源性为 98.45%。成功克隆了小鼠 RPL9 基因全长编码序列,小鼠 RPL9 基因的克隆补充并完善了该基因的分子生物学信息。RPL9 基因被认为是影响肉质性状的重要候选基因,该基因可在动物不同生长发育阶段对脂肪的沉积起调节作用,从而影响肉质品质^[14]。张晶等^[15]研究表明,在我国地方猪种太湖猪与国外瘦肉型猪种长白猪脂肪组织的基因差异表达分析中,太湖猪 RPL9 基因的表达量相比于长白猪的表达量上调了 16.1 倍,这说明 RPL9 基因可能对细胞分化的调控和脂肪酸代谢的平衡产生影响,进而影响脂肪沉积。本研究结果表明,小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑、脂肪 7 个组织中均可检测到 RPL9 不同程度的表达,其中脂肪的表达量最高,脾、肾、脑各组织的表达均较高,心、肝、肺中的表达量较低,这与 Gudipati 等^[16]研究 RPL9B 基因在人的不同组织中的表达差异结果一致。结合前人研究结果及本研究结果表明,RPL9 基因在动物细胞内普遍表达,且在不同物种之间的组织表达具有相似性,该基因可能通过调节脂肪沉积而影响肉的嫩度、风味和多汁性等。

本次试验不仅成功克隆了小鼠 RPL9 基因,也证实该基因的组织表达有差异性,这可为进一步探讨影响肉质的遗传因素提供理论依据。随着对 RPL9 基因的不断深入研究,可通过基因调控技术提升或降低 RPL9 基因在各个组织的表达量,从而可以从分子水平控制肌肉及脂肪的性状,达到改善肉质的目的,这对提高畜禽肉的品质有重要意义。

参考文献:

[1] Li D, Chen N, McMichael A J, et al. Generation and characterisation of CD1d tetramer produced by a lentiviral expression system [J]. Journal of Immunological Methods, 2008, 330 (1): 57-63.

[2] Kroes R A, Jastrow A, McLone M G, et al. The identification of novel therapeutic targets for the treatment of malignant brain tumors [J]. Cancer Lett, 2000, 156 (2): 191-198.

[3] Sahin F, Qiu W, Wilentz R E, et al. RPL38, FOSL1, and UPPI are predominantly expressed in the pancreatic ductal epithelium [J]. Pancreas, 2005, 30 (2): 158-167.

[4] 王林云. 中国养猪业: 如何迎接 WTO 的挑战, 21 世纪养猪业与人类健康 [C] // 21 世纪养猪业与人类健康. 北京: 中国畜牧兽医学会猪学分会, 2001: 20-24.

[5] Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, et al. Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2001, 81 (2): 205-212.

- noma[J]. *Anticancer Res*,2000,20(4):2489-2494.
- [6] 许琰,丛喆,魏强,等. 实时定量 PCR 的研究进展及应用[J]. *中国试验动物学报*,2007,15(2):155-158.
- [7] 黄河,帅素容. 藏猪心脏脂肪酸结合蛋白基因(*H-FABP*)组织表达差异性研究[J]. *四川农业大学学报*,2007,25(4):480-484.
- [8] 齐小辉,马玺,李珊珊,等. 基于 PCR 的基因差异表达分析技术[J]. *生物技术通讯*,2004,15(4):389-391.
- [9] 史建伍,盛军庆,曾柳根,等. 萍乡红鲫卵母细胞透明带糖蛋白 ZP3 基因及其侧翼序列的克隆和分析[C]. 中国南方十六省(市、区)水产学会渔业学术论坛第二十六次学术交流大会论文集(下册),2010.
- [10] 杨华,刘守仁,钟发刚,等. *BMPR-IB* 基因在绵羊不同组织的表达差异性研究[J]. *中国畜牧杂志*,2009,45(11):6-10.
- [11] 陈修栋,桂宏翔,赵泉阳,等. DDK 综合症部分相关基因的实时定量 PCR 分析[J]. *河南农业科学*,2013,42(7):141-144,149.
- [12] 郑梦月,姜冬梅,康波,等. 四川白鹅 *ENO1* 基因特征及其在 HPG 轴组织中发育性表达的研究[J]. *华北农学报*,2014,29(1):93-97.
- [13] 秦彤,王皓宇,郝海生,等. 日粮精粗比对围产期奶牛乳腺内参基因表达的影响[J]. *华北农学报*,2013,28(4):75-78.
- [14] 张萍,周慧芳,孙正华,等. 恒河猴 *CD1d* 基因的克隆及其组织表达差异性分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*,2009,25(7):581-584.
- [15] 张晶,陈修栋,王善强,等. 淮南猪品种遗传特性的 AFLP 分析[J]. *中国畜牧杂志*,2011,38(5):130-133.
- [16] Gudipati R K, Neil H, Feuerbach F, *et al.* The yeast *RPL9B* gene is regulated by modulation between two modes of transcription termination[J]. *EMBO*,2012,31(10):2427-2437.

(上接第 110 页)

- [4] 胡帅珂,高岩,王莘. 水稻残茬自毒作用研究[J]. *现代农业科技*,2012(5):51-52.
- [5] 喻景权,松井久佳. 豌豆根系分泌物自毒作用的研究[J]. *园艺学报*,1999,26(3):175-179.
- [6] 杨广超,吕卫光,朱静,等. 西瓜根、茎、叶水浸提液对西瓜种子萌发及幼苗中酶活性的影响[J]. *西北农业学报*,2005,14(1):46-51.
- [7] 沈慧敏,郭鸿儒,黄高宝. 不同植物对小麦、黄瓜和萝卜幼苗化感作用潜力的初步评价[J]. *应用生态学报*,2005,16(4):740-743.
- [8] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2004:154-155.
- [9] 赵世杰,许长成,邹琦,等. 植物组织中丙二醛含量测定方法的改进[J]. *植物生理学通讯*,1991,30(3):207-210.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*,1976,72:248-254.
- [11] 白雪芳,张宝琛. 植物化学生态学中的克生作用在草业上的表现[J]. *草业科学*,1995(12):70-72.
- [12] 孙益群,柏明娥,徐高福,等. 高羊茅等 3 种植物对美丽胡枝子的化感作用[J]. *林业科技开发*,2010,24(5):67-70.
- [13] 郑丽,冯云龙. 入侵植物的生理生态特性对碳积累的影响[J]. *生态学报*,2005,25(10):2782-2787.
- [14] Turk M A, Tawaha A M. Inhibitory effects of aqueous extracts of black mustard on germination and growth of lentil[J]. *Pakistan Journal of Agronomy*,2002,1(1):28-30.
- [15] 王硕,慕小倩,杨超,等. 黄花蒿浸提液对小麦幼苗的化感作用及其机理研究[J]. *西北农林科技大学学报*,2006,34(6):106-110.
- [16] 刘建新,胡浩斌,王鑫. 多裂骆驼蓬水浸液对多年生黑麦草的化感作用与生理生化表现[J]. *草地学报*,2008,16(4):374-379.
- [17] 朱慧,马瑞君,陈树思,等. 高寒草场主要牧草对黄帚橐吾水浸液化感胁迫的生理响应[J]. *草业学报*,2007,16(5):102-106.