

猪 *LXR α* 基因的克隆、序列分析及表达研究

于浩¹, 刘娣^{2,3}, 丁鏊⁴

(¹ 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; ² 黑龙江省农科院, 哈尔滨 150086;

³ 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030; ⁴ 黑龙江省血液中心, 哈尔滨 150056)

摘要: 采用 RT-PCR 结合克隆测序的方法, 从猪的肝脏组织中克隆出了猪基因的 *LXR α* (Liver X Receptors α) cDNA 序列, 编码区长度 1344 bp, 编码 447 个氨基酸, 基于 Pfam 数据库发现存在一个锌指蛋白和核受体的配体结合区; 系统发育分析发现猪的 *LXR α* 所在的哺乳动物类群非常保守, 与鸡和斑马鱼所构成的类群存在较大遗传距离; 在大白猪和杂种野猪的脂肪组织中检测表明 *LXR α* 基因的表达自 3 月龄至 12 月龄逐渐增加, 并在 9 月龄达到最高, 而杂种野猪在 9 月龄开始高表达, 12 月龄最高。研究结果表明 *LXR α* 基因可能是猪脂质代谢的重要分子标识之一。

关键词: 猪; *LXR α* ; RT-PCR; 系统发育分析

中图分类号: S828

文献标识码: A

论文编号: 2009-0887

Cloning, Sequence and Express Patterns Analysis of Porcine *LXR α* Gene

Yu Hao¹, Liu Di^{2,3}, Ding Juan⁴

(¹ College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062;

² Heilongjiang Agricultural Science Institute, Harbin 150086;

³ Northeast Agricultural University, Animal Science College, Harbin 150030;

⁴ Heilongjiang Blood Center, Harbin 150056)

Abstract: Cloning and sequencing the *LXR α* (Liver X Receptor α) cDNA from porcine liver tissues by RT-PCR, the coding region length was 1344 bp, coding 447 Amino Acids, Zinc finger and ligand-binding domain of nuclear hormone receptor are found based on the Pfam database, phylogenetic result showed that the *LXR α* genes in Mammalia clade were very conserved, the genetic distance between the Mammalia clade and non-Mammalia clade including chicken and zebrafish, *LXR α* mRNA level were detected in the adipose tissues showed that *LXR α* mRNA expression increased from 3-month to 12-month, the mRNA level was the most high in 9-month in large white pig, but the *LXR α* mRNA expression were detected in 9 month, and the expression in 12-month was high in crossed-bred wild pig. The results showed that *LXR α* gene maybe one of important molecular markers in lipid metabolism of pig.

Key words: porcine, *LXR α* , RT-PCR, phylogenetic analysis

0 引言

肝 X 受体 α (Liver X Receptors α , *LXR α*) 是核受体超家族的成员, 是重要的脂质传感器^[1]。 *LXR α* 亚家族有 2 个成员, *LXR α* (*NR1H3*) 和 *LXR β* (*NR1H2*)。 *LXR β* 广泛表达, 而 *LXR α* 仅表达于脂质代谢旺盛的组织, 如肝、肠、肾、脾; 二者均与 *RXR α* 形成异二聚体而发挥功能^[2]。大量研究证明 *LXR α* 是机体保持胆固醇相对稳

定的关键感受器, 可通过调控胆固醇代谢、储存、吸收和转运等多个环节来维持其自体平衡^[3], *LXR* 不仅在胆固醇逆向转运中发挥作用, 而且可以调节甘油三酯的合成^[4]。

LXR α 主要是通过对 *SREBP-1c* 的调节来实现胆固醇的转运和脂类的吸收和转化^[5], *SREBP-1c* 是甾醇调节元件结合蛋白家族中的一员。有研究表明肝细胞

第一作者简介: 于浩, 男, 1977 年出生, 黑龙江伊春人, 讲师, 主要从事分子遗传与动物育种研究。通信地址: 130062 长春市西安大路 5333 号, 吉林大学畜牧兽医学院, E-mail: savvy_yu@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2009-04-23, 修回日期: 2009-05-31。

SREBP-1c 表达增加,导致脂肪酸合成酶蛋白增加,脂肪合成增加,*SREBP-1c* 表达越强,肝组织中的甘油三酯和胆固醇浓度也越高^[6],经研究发现*SREBP-1c* 的表达是由LXR α /RXR异二聚体可以结合到*SREBP-1c* 的启动子上游的LXRE顺式元件上,调控SREBP-1的转录,从而调控脂肪酸和胆固醇的生物合成^[7]。

猪的脂肪性状是育种工作的一个重要参考指标,了解猪的脂质代谢对培育瘦肉型猪种是十分必要的,通过野猪和家猪杂交得到的杂种野猪的脂肪含量很低,同时其低脂肪又没有影响到肉的口感和风味,因此笔者以大白猪和杂种野猪为研究对象,克隆猪的LXR α 基因,及其在大白猪和杂种野猪不同月龄的脂肪中的表达规律进行研究,以分析其在猪的脂质代谢上的潜在影响。

1 材料和方法

1.1 试验动物

3月龄、6月龄、9月龄、12月龄的纯种大白猪、杂种野猪各3头(克隆、半定量检测),样本于2008年采自黑龙江省农科院畜牧中心。

1.2 试验试剂

转化态受体菌株为DH5 α ,实验室保存,TRIZOL Reagent 购自 Invitrogen 公司; rTaqDNA 聚合酶、dNTPs、MLV 反转录酶、DL2000Marker、pMD-18T、胶回收试剂盒、质粒回收试剂盒购自 TaKaRa 公司,PCR 引物由北京华大基因研究中心合成。

1.3 总RNA的提取与反转录

取3月龄、6月龄、9月龄、12月龄的纯种大白猪、杂种野猪的各个组织,采用TRIZOL一步法提取总RNA,2%的琼脂糖电泳验证RNA完整性,用分光光度计检测浓度。以RNA为模板,用MLV酶反转录成20 μ l的cDNA,以1 μ l cDNA为模板用于PCR扩增。

1.4 引物设计与PCR

以牛的LXR α 基因的编码区序列对猪的EST数据酷筛选出与5'和3'高度同源的ESTs,设计克隆引物,上游: ATGTCCTTGTGGGTGGAGGC,下游: TCACTCGTGACATCCCAGAT,扩增片段1344 bp。PCR条件为94 $^{\circ}$ C预变性7 min,然后94 $^{\circ}$ C变性30 s,57 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1.5 min,35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物经纯化后回收、连接后,送北京华大基因研究中心进行测序。

RT-PCR的引物设计依据测序得到猪的LXR α 和已知的SREBP-1c、 β -actin(内参)序列进行设计,LXR α 上游: CAACGCTTTGCCCACTTCAC, LXR α 下游: CGGAGGCTCACCAGTTTCAT,扩增401bp; β -actin上

游: CGTGAGCACCTGTCTATT, β -actin 下游: ACCTGGATTCTTTTACGG,扩增221 bp。

PCR条件统一为94 $^{\circ}$ C预变性7 min,然后94 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,28个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

1.5 数据分析

猪LXR α 基因的引物设计采用Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>);结构域预测采用Pfam数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk>),系统发育分析使用Mega4 (<http://www.megasoftware.net>)。

2 结果与分析

2.1 猪LXR α 基因的PCR扩增

根据LXR α 基因的克隆引物,以大白猪肝组织cDNA为模板,参照设计好的PCR条件进行扩增,在1300 bp左右处扩增出符合需求的片断,见图1。

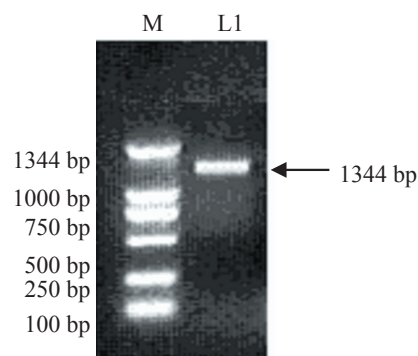


图1 LXR α 基因在大白猪的肝脏组织的RT-PCR扩增

2.2 猪LXR α 基因的结构鉴定及系统发育分析

测序结果表明扩增片段为一个完整的编码区,长度1344 bp,编码447个氨基酸。与牛的氨基酸同源率为97%,基于Pfam数据库对序列进行结构功能域分析,发现在其结构上存在核受体的配体结合区以及一个锌指蛋白C4亚型,上述结构符合LXR α 基因序列特征见图2,将测序结果提交给Genbank,ACCESSION为EF52855。

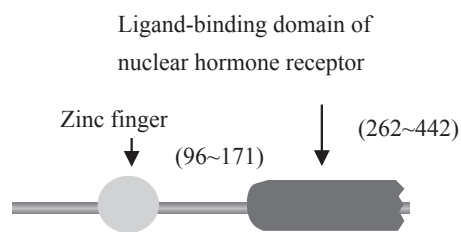


图2 基于Pfam数据库的LXR α 基序查找与分析

通过邻接法构建的分子进化树表明,猪LXR α 基因与牛的猪LXR α 基因亲缘性最高,整个哺乳动物类群的亲缘性均较高,而与鸡和斑马鱼之间的变异程度较大,产生较大的遗传距离,见图3。

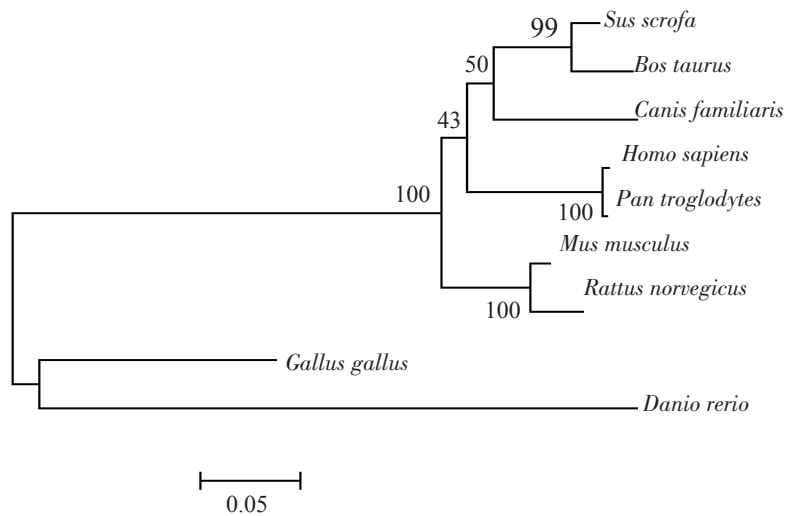


图3 基于Neighbor-Joining算法的LXRα基因的分子进化树

2.3 LXRα基因在大白猪和杂种野猪脂肪组织中的表达比较

LXRα基因在纯种大白和野家杂种猪的各个月龄

的脂肪组织中均表达,在大白猪以9月龄表达表达量最高,杂种野猪上的表达量均较弱,12月龄明显高于9月龄,见图4。

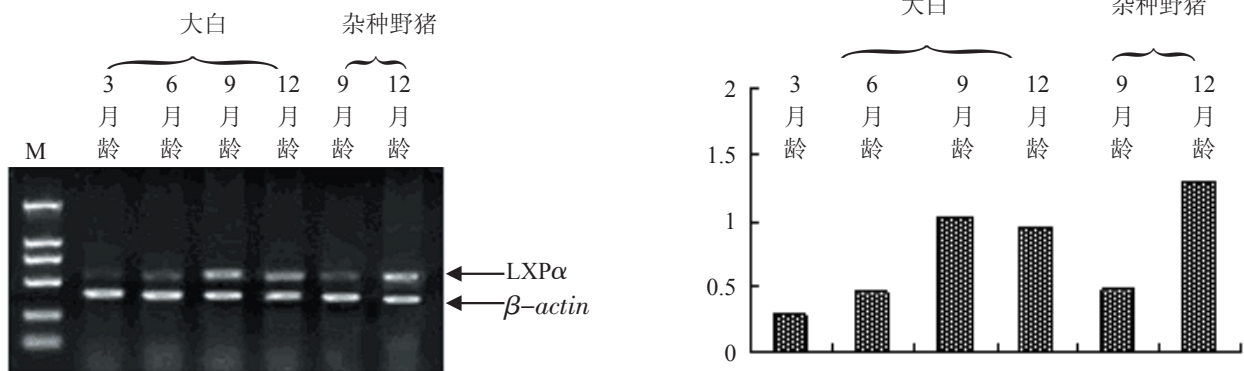


图4 猪LXRα基因在脂肪组织中的RT-PCR结果

3 讨论

猪的LXRα基因从后期的序列比对上看非常保守,因此可以通过牛的序列来进行同源种子的搜索,从而实现猪基因的扩增,而在对LXRα基因构建进化树时,从Swiss-Prot数据库检索到人、大鼠、小鼠、牛、鸡、斑马鱼、猩猩等八个LXRα基因与克隆所得猪的LXRα基因进行多重序列比对,比对结果表明LXRα进化非常保守,人、大鼠、小鼠、牛、猪、猩猩、犬划归为一个哺乳动物类群,而鸡和斑马鱼构成一个类群,两个类群差异较大的原因是鸡和斑马鱼在LXRα基因的锌指蛋白和配体结合区之间的序列存在缺失造成的,但锌指蛋白和配体结合区比较完整,这是两个类群间遗传距离大的根本原因。

在对LXRα基因在猪的脂肪组织中的表达检测时发现,LXRα基因随着饲养时间的延长,其表达量也在逐渐增加,在大白猪的上可以看出,LXRα基因在9月

龄最高,而后趋于稳定,而出栏时期的6月份,表达量相对较低,可以判断,此时,由LXRα基因调控的胆固醇积累在此时不是很高,而到了9月份则是达到了高峰,到12月份,有所降低,但趋于稳定。而3月龄、6月龄的杂种野猪的背部并未有出现脂肪,9月龄的杂种野猪上检测到脂肪,因此,杂种猪只能检测9月和12月龄的两个组织样,结果表明,从9月龄到12月龄,LXRα基因的表达是上升,但是在12月龄时,其LXRα基因的表达量较纯种大白猪的6月时为高,说明此时,杂种野猪脂肪内的胆固醇的含量可能要高于纯种大白猪。

综上所述,LXRα基因在进化非常保守,对猪的LXRα基因调控的胆固醇生成和脂质代谢的研究可以其他物种的研究进展作为参考;对杂种猪的脂肪组织检测发现,杂种猪的发育较慢,到10月龄才可出栏,而12月龄时,其LXRα基因表达量增高,其调控的胆固醇

的量是否增高,将是今后工作的一个研究重点,而LXR α 基因是否可以作为猪的胆固醇、脂肪积累的一个检测指标也将在后续的工作中得到深入研究。

参考文献

- [1] 吴静,张志文,管又飞.LXR α 在脂质代谢中的作用[J].生理科学进展,2004,35(01):69-72.
- [2] 党怀欣,朱毅.肝X受体 α 在脂代谢调节中的作用机制[J].中国动脉硬化杂志,2007,15(07):533.
- [3] 代小艳,唐朝克.肝X受体在体内胆固醇平衡中的作用[J].中国病理生理杂志,2006,22(09):1854-1857.
- [4] 刘阳,常永生,方福德.肝X受体:糖和脂代谢中的重要调节者[J].中国医学科学院学报,2007,29(03):430-435.
- [5] 王素玲,王切,姜玲玲.LXR调节肝胆固醇排出代谢的机制[J].河北医科大学学报,2007,28(03):221-223.
- [6] 艾正琳,陈东风.SREBP-1c在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义[J].第三军医大学学报,2006,28(10):1063-1065.
- [7] 李影.SREBPs调控体脂平衡分子机制研究进展[J].安徽农业科学,2007,35(20):6041-6046.