

赖氨酸对绵羊 *GHR* 基因表达的影响

李建升¹, 程胜利², 韩向敏¹, 冯瑞林², 岳耀敬², 杨博辉², 刘建斌²

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃兰州 730070; 2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050)

摘要 [目的] 研究赖氨酸对绵羊生长的影响及其机理。[方法] 选用 1 岁左右的绵羊 15 只, 均分为 A、B、C 3 组, 分别在基础日粮中添加 0、4、10 g 赖氨酸。饲喂 28 d 后, 全部屠宰, 取样。提取组织总 RNA, 反转录后扩增 *GHR* 和 *GAPDH* 基因, 分析不同处理背最长肌中 *GHR* mRNA 的表达丰度。[结果] 绵羊 *GHR* 基因在 B 组背最长肌组织中的表达量显著高于对照 A 组 ($P < 0.01$), 极显著高于 C 组 ($P < 0.01$); C 组与 A 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。[结论] 在日粮中添加赖氨酸能够提高绵羊 *GHR* 基因在背最长肌中的表达量, 但不存在剂量依赖性。

关键词 赖氨酸; 绵羊; *GHR*; 基因表达

中图分类号 S826 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)14-06381-02

Effects of Lysine on the Expression of *GHR* mRNA in Sheep

LI Jian-sheng et al (College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] This study was to investigate the effects of lysine on the growth sheep and its mechanism. [Method] Fifteen one-year old sheep as experimental material were grouped into three groups (group A, group B and group C), into whose basal feed 0, 4 and 10 g lysine were respectively added. After 28 d of feeding, the experimental sheep were all slaughtered and sampled; then total RNAs were extracted from the samples and used to clone *GHR* and *GAPDH* genes via retrotranscription for analyzing the expression abundance of *GHR* mRNA in the longest muscle in the back from different treatments. [Result] The expression of *GHR* mRNA in treatment B was significantly higher than that in treatment A (CK) at 0.01 probability level, and significantly higher than that in treatment C at 0.05 probability level; while that in treatment C and treatment A was insignificant ($P > 0.05$). [Conclusion] Addition of lysine into basal feed of sheep could dose-independently improve the expression of *GHR* gene in the back.

Key words Lysine; Sheep; *GHR*; Gene expression

反刍动物蛋白质营养的实质和核心是氨基酸营养。国内外大量研究表明, 赖氨酸 (Lys) 和蛋氨酸 (Met) 是反刍动物的第一或第二限制性必需氨基酸^[1]。赖氨酸最重要的生理功能是参与体蛋白的合成, 与动物生长密切相关^[2]。研究表明, Lys 通过调控生长激素 (Growth Hormone Receptor, GH)、胰岛素 (Ins) 和类胰岛素生长因子 I (Insulin-like Growth Factor I, IGF-I) 影响蛋白质代谢。GH 促进氨基酸跨膜转运, 使 DNA、RNA 合成量增加, 蛋白质合成加快。但 GH 必须与靶器官上的 GHR 结合才能产生生物学效应, 因此动物生长很大程度上取决于靶器官上 GHR 以及与之相关基因的表达^[3]。动物生长的快慢或器官发育先后, 很大程度上取决于靶器官上 GHR 及与之相关的激素或受体基因表达的时空特异性^[4-5]。该研究在绵羊日粮中添加不同水平的赖氨酸, 研究其对绵羊背最长肌 *GHR* 基因表达的影响, 旨在阐明赖氨酸对动物生长发育的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物及分组。 试验选用年龄 1 岁左右, 体重 40 kg 左右, 身体健康的母羊 15 只。设 3 个处理组, 每组 5 个重复, 分别为 A 对照组 (基础日粮)、B 赖氨酸低剂量组 (基础日粮 + 4 g 赖氨酸盐) 和 C 赖氨酸高剂量组 (基础日粮 + 10 g 赖氨酸盐)。试验预试期 7 d, 正试期 28 d, 共计 35 d。

1.1.2 试验饲料。 试验饲料按照《中国美利奴羊营养需要量及饲料营养价值》(1992) 中育成母羊 (体重 40 kg, 日增重 100 g) 营养需要配制。基础饲料配方为玉米 33.0%、小麦麸

6.5%、棉籽粕 20%、豆粕 1.0%、苜蓿草粉 6.0%、玉米秸秆 50.0%、食盐 0.5%、添加剂 1.0%, 营养水平为 ME9.04 MJ、CP 8.27%、CF 19.2%、Ca 0.63%、P 0.29%、Ca:P 2.2:1。

1.1.3 饲养管理。 将试羊置于消化代谢笼中单笼饲养。整个试验期间, 分别在 9:00 和 17:00 各等量饲喂 1 次。同时在日粮中分别加入 0、4、10 g/d Lys · HCl。自由饮水。

1.1.4 样品采集。 正试期第 28 天, 屠宰试验羊, 取背最长肌样品, 装入灭菌冷冻管, 立即放入液氮中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 配制溶液。 DEPC 处理水 (无 RNA 酶的超纯水)、EDTA 溶液 (0.5 mol/L, pH 值 8.0)、TAE 电泳缓冲液 (50 × 贮存液)、溴化乙锭 (10 μg/ml)、75% 乙醇、3.0% 琼脂糖凝胶、1 mol/L Tris-HCl (pH 值 8.0)。

1.2.2 总 RNA 提取及检测。 按 Trizol Reagent 试剂盒说明书提取总 RNA, 溶于 DEPC 处理的超纯水中, -70 °C 保存备用。应用紫外分光光度计检测总 RNA 纯度, $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 为合格。所提取的总 RNA 经 DEPC 处理的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 证明其完整性。

1.2.3 RNA 的反转录。 按反转录试剂盒说明书 (大连 Takara 公司), 配制 10 μl 反转录反应体系, 含总 RNA 1 μg, 5 × PrimeScript Buffer 2 μl、PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μl、Oligo dT Prime (50 mmol/L) 0.5 μl、Random 6 mers (100 mmol/L) 0.5 μl、加 DEPC 水至 10 μl。反转录条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。

1.2.4 PCR 引物设计与合成。 根据 NCBI 登记的绵羊 *GHR* 和 *GAPDH* 基因序列, 委托大连宝生物公司设计和合成。*GHR* (M82912) P1: 5'-gcatagtcgctgtcttcc-3', P2: 5'-ggctg-gattttcgatggttcc-3'; 产物长度 96 bp; *GAPDH* (AF030943) P1: 5'-ttgtatggcgtgaacc-3', P2: 5'-ccctccacgatgcaaaa-3'; 产物长度 127 bp。

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (BRF070104)。

作者简介 李建升 (1981-), 男, 山东烟台人, 硕士研究生, 研究方向: 动物营养与饲料科学。* 通讯作者, E-mail: lzchshli@163.com。

收稿日期 2009-02-16

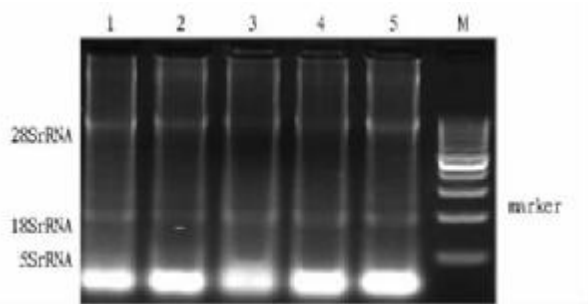
1.2.5 PCR 扩增。按 PCR 试剂盒说明书(大连 Takara 公司),配制 50 μl PCR 反应体系,含 RT 产物 1 μl , Takara *Taq* (5 U/ μl) 0.25 μl 、10 \times PCR Buffer (Mg^{2+} plus) 5 μl 、dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μl 、上下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 1 μl 、加灭菌水至 50 μl 。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、58.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (*GHR*)、55.5 $^{\circ}\text{C}$ (*GAPDH*) 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

1.2.6 电泳及 mRNA 的丰度分析。将同一处理的绵羊背最长肌 *GHR*、*GAPDH* 基因扩增产物 6 μl 在同一块 3.0% 琼脂糖凝胶中电泳进行半定量分析。Gel-Pro 凝胶成像系统软件分析图像,对结果进行半定量分析,*GHR* 相对表达量为 *GHR* 电泳条带的 *IOD* (Integrated Optical Density) 值/*GAPDH* 电泳条带的 *IOD* 值。

1.2.7 试验数据分析。数据用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及检测 取 2 μl 总 RNA,经 3% 琼脂糖凝胶电泳后检测 mRNA 的完整性,部分总 RNA 电泳的结果如图 1 所示。所获电泳条带 (5SrRNA、18SrRNA 及 28 SrRNA) 清晰,无拖尾现象。紫外分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 的值介于 1.8~2.0 之间,表明 RNA 无降解,质量可靠,符合试验纯度和反转录要求,可以进行反转录试验。



注:1~5, RNA 样品; M:20 bp DNA Marker.
Note:1-5. RAN samples; M. 20 bp DNA Marker.

图 1 绵羊总 RNA 电泳结果

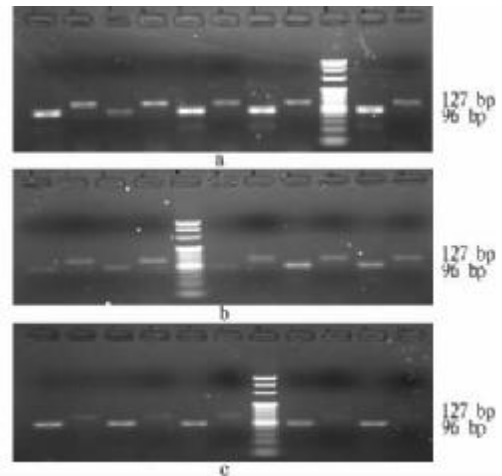
Fig.1 Agarose gel electrophoresis results of total RNA from sheep

2.2 绵羊背最长肌 GHR 基因半定量 RT-PCR 产物电泳结果 绵羊 *GHR* 基因在背最长肌组织表达结果见图 2、3。与内标 *GAPDH* 相比,绵羊 *GHR* 基因在 B 组背最长肌组织中的表达量极显著高于对照 A 组与处理组 C 组 ($P < 0.01$);绵羊 *GHR* 基因在 B 组背最长肌组织中的表达量略高于对照 A 组,但两者间差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

通过在日粮中添加不同水平的赖氨酸,对绵羊背最长肌 *GHR* mRNA 进行丰度分析发现,日粮中添加 4 g 赖氨酸盐,可以显著提高绵羊背最长肌 *GHR* mRNA 的水平;而添加 10 g 赖氨酸盐后,结果不明显。

影响赖氨酸需要量的因素有很多,包括日粮能量及蛋白质水平、日粮必需氨基酸的含量与比例、氨基酸的互作、饲



注:a 为对照组;b 为 B 组;c 为 C 组;M 为 20 bp DNA Maker,自下向上依次为 20、40、60、80、100、120、140、160、180、200、300、400、500 bp;第 1、3、5、7、9 泳道是 *GHR* PCR 产物,第 2、4、6、8、10 是 *GAPDH* PCR 产物。

Note:a is control group; b is B group; c is C group; M. 20 bp DNA Marker, the sizes are 20 bp,40 bp,60 bp,80 bp,100 bp,120 bp,140 bp,160 bp,180 bp,200 bp,300 bp,400 bp and 500 bp from upside to underside; the first, third, fifth, seventh and ninth lanes are *GHR*-PCR products; the second, fourth, sixth, eighth and tenth lanes are *GAPDH*-PCR products.

图 2 绵羊背最长肌 GHR 半定量 RT-PCR 产物的电泳结果

Fig.2 Electrophoresis result of GHR semi quantitative RT-PCR products of sheep longissimus muscle

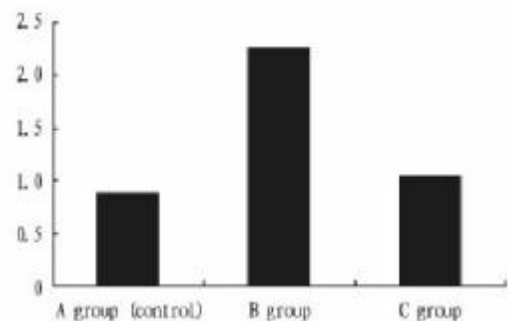


图 3 绵羊背最长肌 GHR mRNA 的相对丰度

Fig.3 The relative abundance of GHR mRNA of sheep longissimus muscle

料赖氨酸的利用率等^[6-8]。至于上述各因素在影响赖氨酸需要量中的作用大小,有待于进一步研究。

日粮氨基酸的供给会影响 *GHR* 基因表达。Brameld 等应用猪肝细胞培养技术研究发现,在培养基中去除赖氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、苏氨酸,会降低 *GHR* 基因表达,但不存在剂量依赖性^[9]。该试验证明了 Brameld 等的研究结果:*GHR* 基因的表达与赖氨酸的添加量不存在剂量依赖性。

参考文献

[1] 周俊,王代文. 赖氨酸营养研究进展 [J]. 饲料工业,2006,27 (8): 48-50.
[2] 罗钧秋,陈代文. 赖氨酸对蛋白质代谢的影响及其可能调控机制 [J]. 饲料工业,2006,27 (16): 40-41.
[3] 胥清富. 生长激素作用的靶基因在猪肝脏和肌肉上的表达及调控 [D]. 南京:南京农业大学,2002.

表2 L_93^4 正交试验结果Table 2 The results of L_93^4 orthogonal test

试验号 Test number	A	B	C	D	多糖含量 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Polysaccharide content	多糖得率//% Polysaccharide rate
1	1	1	1	1	45.49	18.92
2	1	2	2	2	49.58	11.50
3	1	3	3	3	54.65	44.16
4	2	1	2	3	56.68	49.42
5	2	2	3	1	45.12	33.20
6	2	3	1	2	48.18	29.88
7	3	1	3	2	48.71	40.14
8	3	2	1	3	52.51	41.16
9	3	3	2	1	68.80	41.28
K_1	74.58	108.48	89.96	93.40		
K_2	112.50	85.86	102.20	81.52		
K_3	122.58	115.32	117.50	134.74		
k_1	24.86	36.16	29.98	31.14		
k_2	37.50	28.62	34.06	27.18		
k_3	40.86	38.44	39.16	44.92		
R	16.00	9.82	9.18	17.74		

表3 多糖中蛋白质含量

Table 3 Protein content in polysaccharide

试验号 Test number	A	B	C	D	蛋白质含量//% Protein content
1	1	1	1	1	1.60
2	1	2	2	2	1.26
3	1	3	3	3	3.39
4	2	1	2	3	2.97
5	2	2	3	1	3.40
6	2	3	1	2	2.67
7	3	1	3	2	4.43
8	3	2	1	3	3.41
9	3	3	2	1	2.96
K_1	6.25	9.00	7.68	7.96	
K_2	9.04	8.07	7.19	8.36	
K_3	10.80	9.02	11.22	9.77	
k_1	2.08	3.00	2.56	2.65	
k_2	3.01	2.69	2.40	2.79	
k_3	3.60	3.01	3.74	3.26	
R	1.52	0.32	1.34	0.61	

2.3 最佳工艺的确定 综上所述,川牛膝多糖的最佳提取工艺为 $A_3B_3C_3D_3$,即温度 $100\text{ }^\circ\text{C}$,提取时间 8 h ,料液比 $1:20$,乙醇浓度 95% 。

3 讨论

为了提高以多糖为有效成分的药材的利用率,探索“道地药材”的内在质量、多糖的提取及含量测定方法具有极其重要的意义。该试验采用传统水提醇沉的方法提取川牛膝多糖中的可溶性多糖,硫酸-苯酚比色法测定多糖含量,DNS法测定提取物中单糖含量,此方法简单,显色稳定,灵敏度高,重现性好。

该试验结果表明,川牛膝中多糖含量较丰富。而多糖可参与生物体细胞的各种活动,具有抗肿瘤和提高免疫力、抗炎、抗病毒、抗凝血、降血糖、降血脂、抗疲劳、抗衰老等^[8-11]作用,其来源广泛且细胞毒性较低,应用于生物体毒副作用小,因此对植物多糖的研究已成为医药界的热门领域^[12]。可见,以川牛膝为原料开发以多糖为主要成分的药品、保健品等具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 广州: 广东科学技术出版社, 1995: 27.
- [2] LI Z L, SHI S H, CHEN H, et al. The improving red cell immunity function of *Cyathula officinalis* Kuan polysaccharide [J]. Chin Trad Med Pharmacol & Clin, 1999, 15 (4): 26-27.
- [3] CHEN H, LIU Y P. The elementary anti-tumour research of *Cyathula officinalis* Kuan polysaccharide [J]. J Chengdu Univ TCM, 2001, 24 (1): 49-50.
- [4] 向道斌, 李晓玉. 牛膝多糖的抗肿瘤活性及其免疫增强作用[J]. 中国药理学报, 1993, 14 (6): 556-561.
- [5] 张惟杰. 糖类化合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994: 13-16.
- [6] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 78-79.
- [7] 姜红. 黑木耳多糖的提取及分离纯化[M]. 大连: 大连轻工业学院, 2005.
- [8] 崔亦华, 崔英德, 易国斌. 应用广泛的天然多糖及其提取方法[J]. 广州化工, 2002, 30 (3): 7-9.
- [9] 宋军, 杨金蓉, 李祖伦. 川牛膝多糖对小鼠肝癌细胞抑制作用研究[J]. 四川生理科学杂志, 2002, 24 (3): 118-119.
- [10] 曹颖莉, 崔荣军, 赵漩. 螺旋藻多糖对老龄小鼠脑和肝中 SOD, MDA 的影响[J]. 中国初级卫生保健, 2003, 17 (4): 68-69.
- [11] 苗明三. 五味子多糖对衰老模型小鼠的影响[J]. 中国医药学报, 2002, 17 (3): 187-188.
- [12] 陈晓青, 蒋新宇, 刘佳佳. 中草药成分分离分析技术与方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 206-210.

(上接第 6382 页)

- [4] 孙逊, 朱尚权. 生长激素受体的结构、功能及其信号转导[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 1999, 19 (1): 9-14.
- [5] 邓利, 张为民, 林浩然. 生长激素受体的研究进展[J]. 动物学研究, 2001, 22 (3): 226-230.
- [6] 王和民. 赖氨酸和精氨酸的营养需要特点[J]. 广东饲料, 1998 (4): 12-14.
- [7] HAN Y, BAKER D H. Effects of sex, heat stress, body weight, and genetic

strain on the dietary lysine requirement of broiler chicks [J]. Poultry Science, 1993, 72: 701-708.

- [8] 吴维辉, 蒋宗勇, 林映才, 等. 肉仔鸡可消化色氨酸需求参数研究[J]. 动物营养学报, 1999 (2): 45-48, 53.
- [9] BRAMELD J M, GILMOUR R S, BUTTERY P J. Glucose and amino acids interact with hormones to control expression of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA in cultured pig hepatocytes [J]. J Nutr, 1999, 130: 1298-1306.