

黑线仓鼠及其白化突变系 TYR、TYRP1 的基因表达水平比较分析

赵彦斌¹, 孙兆增¹, 白杰英¹, 张小飞¹, 李爱学¹, 柳巨雄², 隋丽华¹,
胡仲明¹, 曾 林¹

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062)

【摘要】 目的 本研究旨在研究 TYR、TYRP1 基因在黑线仓鼠与白化突变系皮肤组织中的表达情况, 探索其与白化毛色性状的产生是否具有相关性。**方法** 以黑线仓鼠和白化突变系皮肤组织为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR 技术, 分别得到黑线仓鼠与白化突变系 TYR 和 TYRP1 基因的相对表达量。**结果** 黑线仓鼠皮肤中的 TYR 和 TYRP1 基因的 mRNA 相对表达量分别是白化突变系皮肤组织中的 2.5 倍和 5.3 倍。**结论** 表明黑线仓鼠皮肤中 TYR、TYRP1 的基因表达水平存在表达差异, 白化突变系 TYR、TYRP1 基因发生表达下调, 揭示出了 TYR、TYRP1 基因的表达量与白化突变系白化性状的产生有关。

【关键词】 白化突变系; TYR; TYRP1; 实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 Q95-331 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)07-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.007.001

Comparison of Gene Expression Levels of TYR、TYRP1 Gene in *Cricetulus barabensis* and the Albino mutant

ZHAO Yan-bin¹, SUN Zhao-zeng¹, BAI Jie-ying¹, ZHANG Xiao-fei¹, LI Ai-xue¹, LIU Ju-xiong²,
SUI Li-hua¹, HU Zhong-ming¹, ZENG Lin¹

(1. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

【Abstract】 Objective To explore the relationship between gene expression of *Cricetulus barabensis* TYR gene family and *Cricetulus barabensis* coat color. **Methods** The relative expression quantity of TYR, TYRP1 in *Cricetulus barabensis* of different colors was analyzed by using real time quantitative PCR in this research. **Results** The relative expression quantity of TYR, TYRP1 in *Cricetulus barabensis* respectively were 2.5, 5.3 times than that in the Albino mutant, all results were corrected by the household gene. **Conclusion** The findings indicated that gene expression level of TYR gene family in *Cricetulus barabensis* were higher than that in the Albino mutant, and the gene expression level of TYR gene family were related with phenotype of *Cricetulus barabensis* coat color.

【Key words】 Albino mutant; *Cricetulus barabensis*; TYR; TYRP1; Real time quantitative PCR

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30870347); 十二五重大专项“高致病病原动物模型研究(2012ZX10004502)。

[作者简介] 赵彦斌(1984-), 男, 博士生, 研究方向: 实验动物学。

[通讯作者] 曾林(1965-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 实验动物科学与管理, E-mail: zenglin1965@126.com。

毛发与皮肤中黑色素的数目、种类与分布的差异使哺乳动物产生不同的毛色^[1]。酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)、酪氨酸酶相关蛋白 1 (tyrosinase related protein, TYRP1)都属于黑色素细胞家族的成员,调控黑色素的合成过程。酪氨酸酶(TYR)对哺乳动物各种不同毛色的产生至关重要,因此 TYR 基因也往往成为研究动物不同毛色表型的热点基因^[2-3]。人、小鼠、大鼠等物种的酪氨酸酶基因位点结构和功能已得到深入的研究, TYR 是黑色素形成的关键酶也是限速酶之一,它的表达活性决定着黑色素合成的数目及速度,小鼠 TYR 基因被定位在白化位点上,它的突变往往会导致黑色素的合成受阻,因此该基因的克隆多被用于研究白化病等色素缺失性疾病^[4]。TYRP1 基因是首先被克隆得到的一种色素基因, TYRP1 基因编码二羟基吡哆羧酸氧化酶,在黑色素合成的下游途径发挥作用,它定位于小鼠的 brown 位点。了解这些调控黑色素生成相关基因的结构和表达规律,有助于阐明色素形成的机制。近些年已有研究者进行过 TYR、TYRP1 基因突变与不同毛色产生的关系的研究^[5-6],但是关于不同毛色表型的产生与 TYR、TYRP1 表达量变化是否具有相关性的研究报道较为匮乏。

黑线仓鼠白化突变系是培育形成的一种新实验动物品系,但目前对其白化性状产生的机制还缺乏深入的研究,鉴于 TYR、TYRP1 在黑色素合成中的重要作用,本研究将对 TYR、TYRP1 基因的研究作为明确黑线仓鼠产生白化性状原因的出发点,本实验采用实时荧光定量 PCR 技术(QRT-PCR)首次研究 TYR、TYRP1 在黑线仓鼠与其白化突变系皮肤组织中 mRNA 的表达量,比较其表达量的差异,以明确 TYR、TYRP1 的基因表达量与白化性状产生的相关性,为最终揭示黑线仓鼠白化突变系白化性状的产生机理奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

黑线仓鼠及其白化突变系,体重 20~22 g,雌雄各 8 只,8 周龄。购自军事医学科学院实验动物中心[SCXK-(军)2007-004],实验动物使用合格证号:[SYXK-(军)2007-005]。

1.2 仪器和材料

Trizol (Invitrogen); DEPC (Promega); 反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit)、SYBR Premix Ex

TaqTM II、pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; DNA Marker2000 (康为世纪); 凝胶回收试剂盒 (BioFlux); Real Time PCR 扩增仪 (BIO-RAD iQTM 5)。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 提取及 RT-PCR:

使用 Trizol 一步法提取黑线仓鼠与白化突变系皮肤组织总 RNA,电泳检测其完整性,并使用 ND2100 微量核酸蛋白测定仪测定核酸浓度和纯度。

将各皮肤样本总 RNA 稀释为相同的浓度,反转录反应体系: 5 × PrimeScriptTM Buffer 4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix 1.0 μL, Oligo (dT) Primer 1.0 μL, 随机引物 1.0 μL, Total RNA 2 μL, DEPC 水加至 20 μL。反应条件: 37℃ 30 min, 85℃ 7 s; 4℃ 保存。以特异引物进行目的基因 PCR 扩增,克隆后测序鉴定。

1.3.2 合成引物:

根据前期实验已克隆测序得到的黑线仓鼠 TYR 与 TYRP1 序列设计引物,并且通过 Blast 初步检测引物的特异性。TYR 基因上下游引物序列分别为: 5'-GTAAGTTTGGATTGTTGGGGG-3' 和 5'-ATATGTGCCTGTGGGGATG-3', 扩增产物长度为 204 bp; TYRP1 基因上下游引物序列分别为: 5'-CAGGTTTGGGCTCAGTTTCC-3' 和 5'-CGGTCATCTTTACCATCGTG-3', 扩增产物长度为 190 bp; 内参基因 β-actin 上下游引物序列分别为: 5'-AGTGTCCCAACATCCCAGC-3' 和 5'-GTGACACCGTCCCCAGAAT-3', 扩增产物长度为 194 bp。

1.3.3 QRT-PCR:

标准曲线:以黑线仓鼠与白化突变系皮肤组织的 cDNA 为模板,按照 3 倍梯度稀释 5 个浓度标准,进行 QRT-PCR 扩增,扩增体系: SYBR Premix Ex TaqTM II 12.5 μL, 上、下游引物各 0.6 μL, cDNA 模板 2 μL, 灭菌蒸馏水加至 25 μL。扩增反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 变性 95℃ 5 s, 退火 55℃/61℃/60℃ (β-actin/TYR/TYRP1) 20s, 循环 40 次; 熔解曲线为 95℃ 1 min; 55℃ 1 min; 55℃ 循环 133 次 (每隔 0.3℃ 采集一次荧光信号), 直到 94.6℃。反应结果使用仪器自身携带的软件收集、分析。所有的样品都在同一块板中做 3 次重复,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.3.4 数据分析:

通过仪器自带的软件导出目的基因和内参基

因的标准曲线方程、扩增效率以及直线方程系数(斜率),并分析两者斜率之差。

2 结果与分析

2.1 RNA 的鉴定

皮肤总 RNA 用 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进行检测, 28S、18S 条带清晰可见(图略), 说明 RNA 无明显降解; RNA 样品的 OD260/OD280 均在 1.8~2.0 之间, 所提 RNA 符合要求。

2.2 扩增效率分析

内参基因、TYR、TYRP1 基因标准曲线建立后, 分别得到标准曲线方程, 其相关系数之差 < 0.1, 表明 β -actin 分别与 TYR、TRP1 基因扩增反应效率基本一致, 本实验可采用 $2^{-\Delta\Delta T}$ 相对定量方法。其中 ΔCT 目的基因 = CT 目的基因 - CT 内参基因, $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ 黑线仓鼠 - ΔCT 白化突变系, TYR、

TYRP1 mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta T}$ 表示。

2.3 QRT-PCR 结果

荧光定量的扩增曲线符合标准的 S 形扩增曲线(图 1), TYR、TYRP1 基因及内参基因的扩增曲线整体无明显上扬趋势现象、平行性较好, 曲线拐点清楚。

TYR、TYRP1 基因与内参基因的扩增产物的熔解曲线上只有 1 个明显的峰(图 2), 表明内参基因、TYR 及 TYRP1 基因没有非特异性扩增和引物二聚体的产生。

2.4 TYR、TYRP1 基因在黑线仓鼠与白化突变系的表达量比较分析

采用 $2^{-\Delta\Delta T}$ 相对定量方法分析表达量, TYR 基因在黑线仓鼠皮肤组织中的 mRNA 表达量是白化突变系的 2.5 倍; TYRP1 基因在黑线仓鼠皮肤组织中 mRNA 表达水平是白化突变系的 5.3 倍(图 3)。

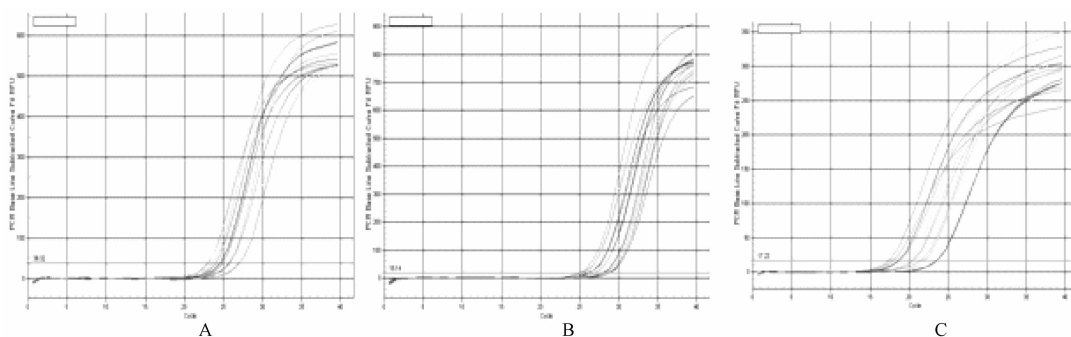


图 1 TYR、TYRP1、 β -actin 基因的扩增动力学曲线

Fig. 1 PCR amplification plots for TYR、TYRP1、 β -actin

注: A. TYR 基因的扩增动力学曲线; B. TYRP1 基因的扩增动力学曲线; C. β -actin 的扩增动力学曲线

Note: A. PCR amplification plots for TYR; B. PCR amplification plots for TYRP1; C. PCR amplification plots for β -actin

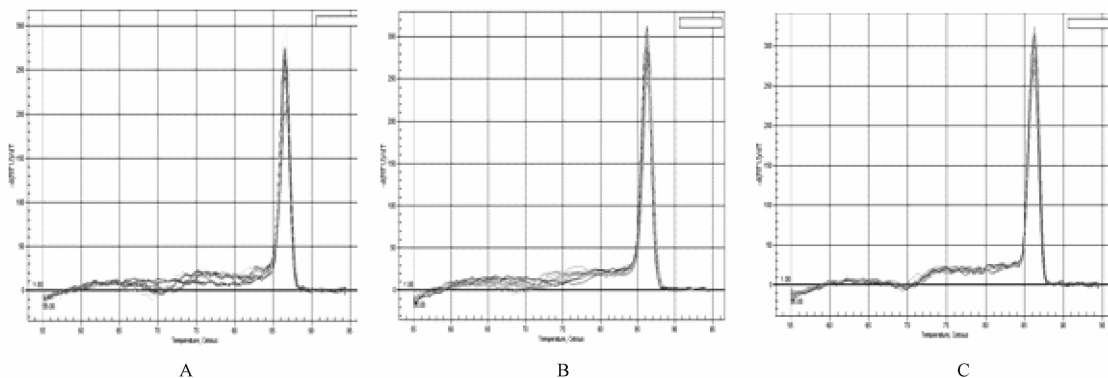


图 2 TYR、TYRP1 与 β -actin 基因的溶解曲线

Fig. 2 Dissociation curve for TYR、TYRP1、 β -actin gene

注: A. TYR 基因的溶解曲线; B. TYRP1 基因的溶解曲线; C. β -actin 的溶解曲线

Note: A. Dissociation curve for TYR gene; B. Dissociation curve for TYRP1 gene; C. Dissociation curve for β -actin gene

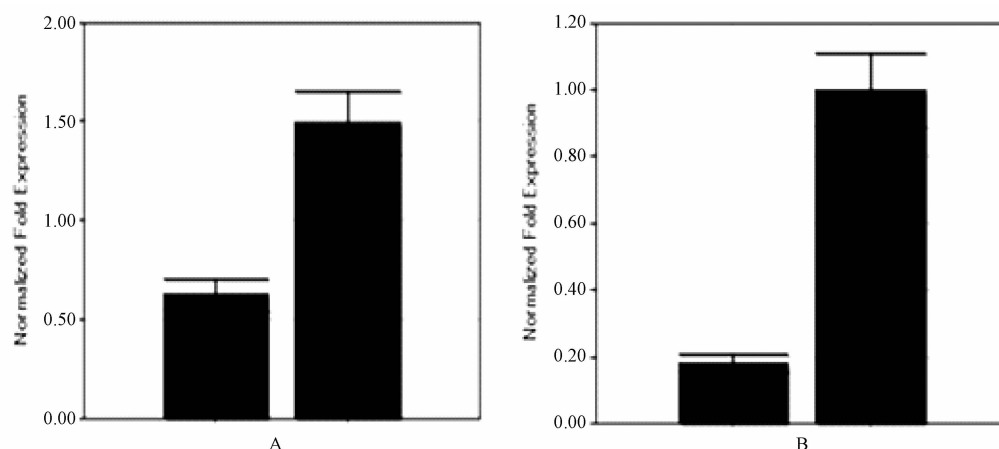


图 3 TYR、TYRP1 基因的相对定量结果

Fig. 3 Relative quantification results of TYR、TYRP1 gene

注:A. TYR 基因的相对定量结果;B. TYRP1 基因的溶解曲线相对定量结果

Note: A. Relative quantification results of TYR gene; B. Relative quantification results of TYRP1 gene

3 讨论

酪氨酸酶(TYR)对黑色素合成过程至关重要, TYR 是黑色素形成的关键酶也是限速酶之一, 酪氨酸经该酶催化氧化为各种衍生物, 而黑色素正是这些衍生物的聚合物。目前资料中已报道的小鼠白化性状产生的原因大多与 TYR 基因的突变有关, 因此编码酪氨酸酶的 TYR 基因也就成了研究动物白化性状和人的白化病的热点候选基因。研究发现 TYR 的基因表达量在非色素沉着性毛发中明显低于色素沉着性毛发^[7]。而本研究结果显示 TYR 基因在黑线仓鼠中的 mRNA 表达量是白化突变系的 2.5 倍, 结果揭示白化突变系 TYR 基因表达量的降低, 促使黑色素细胞合成与沉积的黑色素减少, 进而导致产生了白化毛色表型。

酪氨酸酶相关蛋白 1(TYRP1)在黑色素合成的下游调控过程中起重要作用。TYRP1 是黑色素细胞特异性家族成员, 由 brown 位点基因编码, TYRP1 基因的表达情况使毛发与皮肤产生不同颜色^[8]。本研究结果表明 TYRP1 mRNA 表达量在黑线仓鼠皮肤组织中是白化突变系的 5.3 倍, TYRP1 基因在黑线仓鼠皮肤组织中的表达水平要明显高于白化突变系, 结论提示黑线仓鼠 TYRP1 的基因表达量与白化毛色表型的出现具有一定的相关性, 认为这可能与 TYRP1 的表达调控序列有关, 其可以调控该基因的表达量。

本研究发现了黑线仓鼠白化表型与 TYR、TYRP1 的基因表达量有一定的相关性。TYR、

TYRP1 在黑线仓鼠中的表达量要高于白化突变系, 提示 TYR、TYRP1 都在色素沉着过程中起到了调控作用。本研究为阐明 TYR、TYRP1 基因对黑色素性状的调控机制, 以及黑线仓鼠白化突变系白化性状产生机理奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 潘兴华. 黑色素细胞及黑素的生成与调节 [J]. 生理科学进展, 1998, 29(2):179-181.
- [2] Spritz RA., Chiang PW, Naoki Oiso N, et al. Human and mouse disorders of pigmentation [J]. Curr Opin Genetics Dev, 2003, 13:284-289.
- [3] Carden SM, Boissy RE, Schoettker PJ, et al. Albinism: modern molecular diagnosis [J]. Brit J Ophthalmol, 1998, 82:189-195.
- [4] Shiahara S, Okinaga S, Tomita Y, et al. A point mutation in the tyrosinase gene of BALB/c albino mouse causing the cysteine-serine substitution at position 85 [J]. Eur J Biochem, 1990, 189:455-461.
- [5] Lefur N, Kelsall SR, Mintz B. Base substitution at different alternative splice donor sites of the tyrosinase gene in albinism [J]. Genomics, 1996, 37:245-248.
- [6] Schmidt A, Beermann F. Molecular basis of darkened albinism in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91:4756-4760.
- [7] Commos, Gaillard, Thibauts, et al. Absence of TRP2 in melanogenic melanocytes of human hair [J]. Pigment Cell Res, 2004, 17(6):488-497.
- [8] Schmut ZSM, BERRYERE T G, GOLDFINCHA D. TYRP1 and MC1R geno types and their effects on coat color in dog s [J]. Mamm Genome, 2002, 13(7):380-387.