

Slc24a5 在不同毛色绵羊皮肤中的表达和定位研究

田 雪¹, 孟晓林¹, 李学军¹, 孟立霞², 董常生³

(1. 河南师范大学 水产学院; 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007;

2. 凯里学院 环境与生命科学学院, 贵州 凯里 556011; 3. 山西农业大学 动物科技学院, 山西 太谷 030801)

摘 要:为研究阳离子交换体(solute carrier family 24 member 5, *Slc24a5*)在不同毛色绵羊皮肤中的表达情况,探究其与毛色形成之间的关系采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术分析黑色和白色绵羊皮肤中 *Slc24a5* 的相对表达量,并运用 Western blot 和免疫组织化学方法对不同毛色绵羊皮肤中 *Slc24a5* 蛋白的表达和定位情况进行分析.结果显示:*Slc24a5* 基因在黑色绵羊皮肤组织中的相对表达量是白色绵羊皮肤组织的 20.53 倍($P < 0.01$); Western blot 印迹结果证实绵羊皮肤组织总蛋白中存在分子量约为 51 kD 的蛋白质条带,且黑色绵羊皮肤平均蛋白表达量显著高于白色绵羊($P < 0.01$).免疫组织化学结果显示,*Slc24a5* 在绵羊皮肤毛囊外根鞘和毛基质处均呈阳性表达,且根据光密度值分析显示,*Slc24a5* 在黑色绵羊中的平均蛋白质表达量显著高于白色绵羊.以上研究结果显示 *Slc24a5* 可能与绵羊毛色形成具有一定的相关性.

关键词:阳离子交换体(*Slc24a5*);绵羊;表达;定位;

中图分类号:S813.3

文献标志码:A

阳离子交换体(solute carrier family 24 member 5, *Slc24a5*)是溶质载体家族成员之一,最初在研究斑马鱼时被发现,参与调控斑马鱼的金色表型^[1]. Lamason 等证实,斑马鱼的金色表型是由于 *Slc24a5* 变异,致使皮肤黑色素细胞和视网膜色素上皮细胞黑色素小体体积变小、数量减少、密度降低,黑色素沉积延迟和减少^[2].此外,对鸡视网膜色素上皮细胞 *Slc24a5* 基因进行 siRNA 干扰,发现色素细胞合成黑色素的能力受到抑制,影响黑色素的沉积^[3].近年来,国内外研究人员对 *Slc24a5* 在色素调控功能上开展了大量研究,但主要集中在人^[4]、小鼠^[5]、斑马鱼^[2]和禽类^[6],在毛用动物毛色形成方面尚未见相关报道.绵羊是重要的经济动物,具有多种天然色的表型^[7],本实验以白色和黑色绵羊为研究对象,通过 qRT-PCR 技术检测 *Slc24a5* mRNA 的表达差异,并利用 Western blot 和免疫组织化学方法检测其在不同被毛颜色绵羊皮肤组织中的蛋白表达和定位情况,探索 *Slc24a5* 与绵羊毛色形成之间的关系,为研究绵羊毛色形成机理提供理论依据.

1 材料与方 法

1.1 材 料

Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司,荧光定量试剂盒购自 TaKaRa 公司,兔抗 *Slc24a5* 多克隆抗体,辣根过氧化物酶标记(HRP)-山羊抗兔 IgG 均购自北京博奥森生物技术公司,总蛋白提取试剂盒购自普利莱基因技术有限公司,蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司.

随机选取白色和黑色绵羊各 3 只(山西农业大学绵羊基地).刮毛后用取皮器取绵羊皮肤组织 3 块只⁻¹,1 块置于 Bouins 液固定,制作组织切片,供免疫组织化学研究;另 2 块液氮保存,RNA 和蛋白质提取备用.

收稿日期:2015-03-13;修回日期:2015-06-10.

基金项目:国家自然科学基金(31402294);河南师范大学博士启动经费资助项目(qd13056);河南省水产学重点学科资助.

第 1 作者简介:田 雪(1981-),女,河北邢台人,河南师范大学副教授,博士,研究方向:动物体色调控研究,E-mail: tianxue_81@126.com.

通信作者:董常生(1952-),E-mail:changsheng_dong@126.com.

1.2 RNA提取及RT-PCR扩增

取液氮冻存的绵羊皮肤组织, Trizol 试剂盒提取其 RNA, 电泳检测其完整性, 并通过 ND-1000 核酸蛋白测定仪测定其浓度与 OD 值. 利用在线 Primer 3.0⁺ 软件设计绵羊 *Slc24a5* 引物, NCBI BLAST 初步检测引物的特异性. 引物由深圳华大公司合成, 序列为: 上游引物 5'-ACAGGAAATAGCACCCAG-3', 下游引物 5'-TACTCATCGCAGACAAAT-3'.

将各样本 RNA 归为同一浓度, 按照 TaKaRa 公司的反转录试剂盒方法进行 cDNA 合成. 以 cDNA 为模板, 进行产物的 PCR 扩增. 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶检测目的条带, 凝胶成像系统采集图像, 胶回收目的条带进行测序.

1.3 qRT-PCR 扩增

每个样本 cDNA 使用 *Slc24a5* 和 18S 的引物进行 qRT-PCR 扩增, 优化后的反应体系 (20 μ L): 12.5 μ L SYBR Premix Ex TaqTM II, 1.0 μ L 上下游引物, 0.5 μ L ROX reference dye, 1.0 μ L cDNA, 9 μ L 超纯水. 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环, 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 30 s. 每个样本 *Slc24a5* 基因、18s 基因重复 3 次. 反应结束, 由熔解曲线判定反应的特异性, 根据扩增曲线的 CT 计算定量结果. 通过 2^{-CT} 法计算 *Slc24a5* 在白色和黑色绵羊皮肤组织中的相对表达水平, $CT = CT_{Slc24a5} - CT_{18s}$, $CT = (CT_{Slc24a5} - CT_{18s})_{\text{绵羊实验组}} - (CT_{Slc24a5} - CT_{18s})_{\text{绵羊对照组}}$, *Slc24a5* mRNA 表达差别倍数以 2^{-CT} 表示.

1.4 Western 印迹

提取绵羊皮肤组织总蛋白. 每孔上样 30 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转印至 PVDF 膜. PVDF 膜 5% 脱脂奶粉摇床封闭 1 h. 将转印膜放入培养皿中, 加入兔抗 *Slc24a5* 多克隆抗体 (TBST 1:250 稀释) 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜. TBST 清洗 4 次, 每次 5 min. HRP-山羊抗兔 IgG (TBST 1:5000 稀释) 室温孵育 2 h. 取出转印膜, TBST 清洗 4 次, 每次 5 min. 获取图像, 储存分析.

1.5 免疫组织化学

Bouins 固定液中的绵羊皮肤组织, 石蜡包埋后切成 5 μ m 的切片. 将切好的石蜡切片常规脱水, 用超纯水新配制 3% H_2O_2 , 室温 10 min 灭活内源性过氧化物酶. PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 5% 非免疫牛血清, 封闭 20 min. 甩干后滴加兔抗 *Slc24a5* 多克隆抗体 (1:80), 室温放置 30 min, 4 $^{\circ}$ C 过夜. 室温放置 30 min, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 1:100 HRP-山羊抗兔 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min. 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 DAB 显色 5 min. PBS 缓冲液清洗, 苏木精轻度复染、脱水、透明, 中性树脂胶封片. 用 PBS 代替一抗作为阴性对照.

1.6 图像分析及统计学分析

应用 Image-pro Plus 6.0 软件 (美国 Media Cybernetics 公司) 分析不同毛色绵羊皮肤组织总蛋白的 *Slc24a5* 和 β -actin 免疫印迹结果, 测定目的条带面积和平均光密度, 蛋白质总量 = 条带面积 \times 平均光密度, *Slc24a5* 与内参蛋白 β -actin 对比, 进行半定量分析. 所得数据用 SPSS16.0 进行统计学分析, 分析结果用平均值 \pm 标准误 (Means \pm SE) 表示.

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

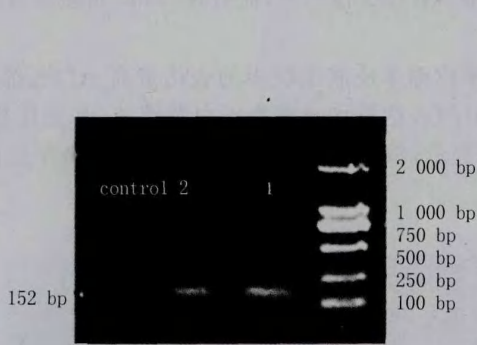
Slc24a5 经 PCR 扩增获得长度为 152 bp 的片段, 与预期片段大小一致. 由图 1 可知, 条带较清晰整齐, 扩增结果良好.

2.2 qRT-PCR 扩增

qRT-PCR 结果显示, *Slc24a5* 基因在黑色绵羊皮肤组织中 mRNA 相对表达水平为 18.1458 ± 3.1190 , 在白色绵羊皮肤组织中的相对表达水平为 0.8838 ± 0.0107 , 二者差异极显著 ($P < 0.01$) (图 2).

2.3 Western 印迹分析

Western blot 结果显示, 绵羊皮肤总蛋白中存在能与兔抗 *Slc24a5* 多克隆抗体发生免疫阳性反应的蛋



M: DL2000 DNA相对分子质量标准; 1、2: *Slc24a5* 基因RT-PCR产物; control为空白对照组

图1 RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果

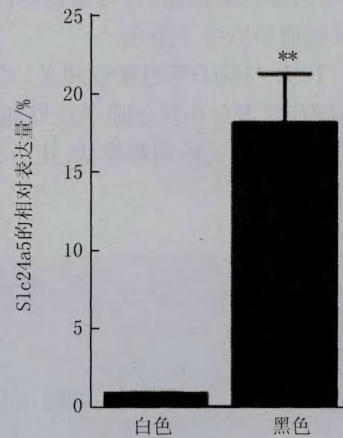


图2 *Slc24a5*基因在白色和黑色绵羊皮肤中的表达

白质条带,分子量大小约为 51 kD(图 3A).

对 *Slc24a5*、内参 β -actin 绵羊免疫印迹结果进行分析,结果显示 *Slc24a5* 蛋白在黑色绵羊皮肤组织中的平均蛋白含量为 0.6074 ± 0.0124 ,在白色绵羊皮肤组织中的平均蛋白含量为 0.3307 ± 0.0234 ,两种差异极显著($P < 0.01$)(图 3B).

2.4 免疫组织化学分析

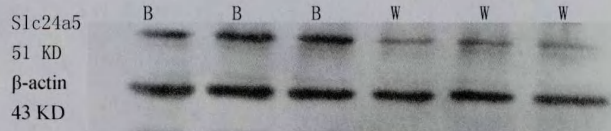
免疫组织化学结果显示, *Slc24a5* 在白色和黑色绵羊皮肤毛囊的外根鞘及毛基质中均呈阳性表达,且在黑色绵羊皮肤中的表达量高于白色绵羊;对照组中未见阳性反应(图 4).

3 讨论

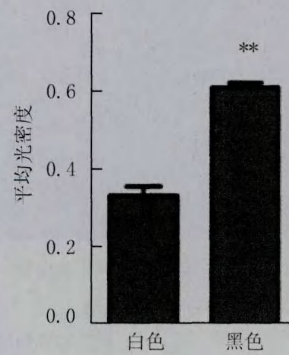
黑色素是哺乳动物毛色形成的主要物质基础,它的形成受到毛色相关基因及其所处环境因素的影响^[8]. 哺乳动物的毛色是由酪氨酸在酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)作用下产生的 2 种不同类型的色素(真黑素和褐黑素)比例决定的^[9-10], pH 作为决定 TYR 活性的关键因子之一,影响 TYR 活性,从而影响黑色素形成与黑色素体成熟^[11-12].

Lamason 等^[2]曾推测, *Slc24a5* 能改变黑色素体内的 pH 值,从而影响酪氨酸酶的活性. 亦有研究表明, *Slc24a5* 减少将导致黑色素体内 pH 值降低,变酸的黑色素体使酪氨酸酶活性降低,导致真黑素生成量减少^[13]. 后续研究表明, *Slc24a5* 蛋白是 1 种位于黑色素体膜上的钾离子依赖性阳离子交换蛋白,负责将钙离子摄入黑色素体,并将钠离子从该细胞器内泵出,而后者与质子泵的作用相耦联^[1,14-17]. 因此推测,当存在 *Slc24a5* 蛋白时,从黑色素体内被泵出的钠离子为了再次进入该细胞器,利用质子泵交换出氢离子,进而使得黑色素体内的 pH 值升高,使得酪氨酸酶活性增强,致使黑素生成增多、毛色加深.

本研究发现,在绵羊皮肤表皮及毛囊外根鞘部位均存在 *Slc24a5* 阳性免疫反应物,有文献证实,皮肤毛



(a)



(b)

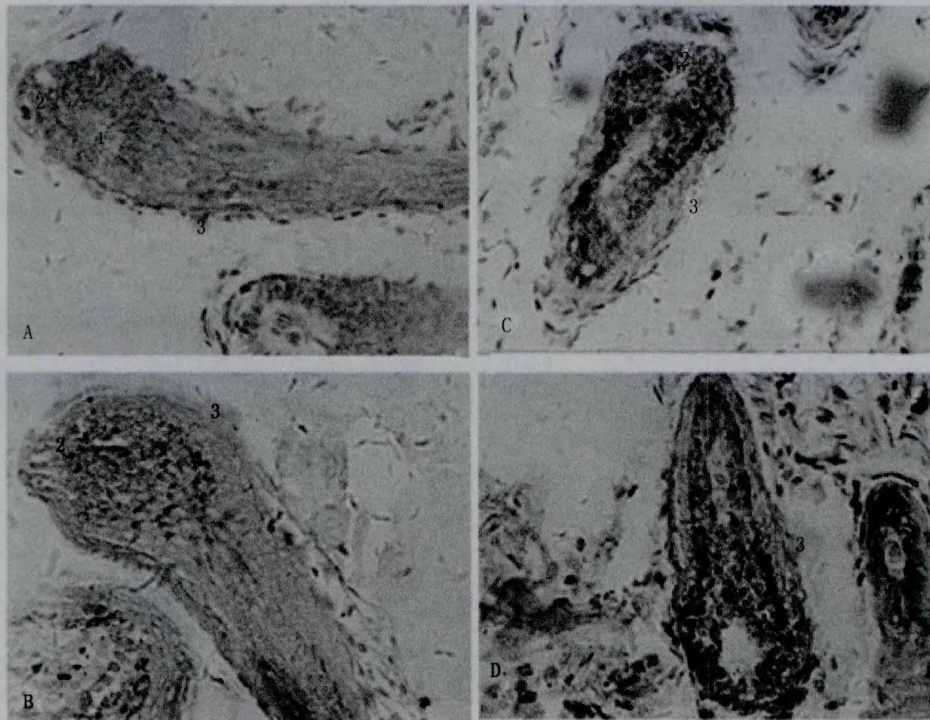
(a) *Slc24a5*和 β -actin在黑色和白色绵羊皮肤中总蛋白中的阳性印迹信号;

(b) 印迹条带的平均光密度分析, **, $P < 0.01$

图3 *Slc24a5*在白色和黑色绵羊皮肤中的表达

囊外根鞘内含有大量的黑色素细胞,且与动物毛色表型具有相关性^[18-19],提示 *Slc24a5* 可能参与黑色素细胞的某些生物学过程,进而影响绵羊毛色。

有研究已证实,*TYR* 与绵羊毛色形成相关,且在黑色绵羊皮肤组织中的表达量高于白色绵羊^[20]。本研究发现,*Slc24a5* 基因及其蛋白在黑色绵羊皮肤组织中的表达量均显著高于白色绵羊,其变化趋势与 *TYR* 相一致,符合 *Slc24a5* 先前研究的调控模式。这一结果提示,*Slc24a5* 极有可能通过调节 *TYR* 进而参与绵羊毛色形成的调控。



A和B. *Slc24a5*在白色绵羊皮肤中的定位; C和D. *Slc24a5*在黑色绵羊皮肤中的定位; A和C为阴性对照。

1. 毛基质; 2. 毛球; 3. 外根鞘

图4 *Slc24a5*蛋白在绵羊皮肤中的定位(40×)

因此,结合本试验中 *Slc24a5* 的定位及表达水平,推测 *Slc24a5* 与绵羊毛色的形成具有相关性,但其在调控过程中的作用机制还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Cook A L, Chen W, Thurber A E, et al. Analysis of cultured human melanocytes based on polymorphisms within the *SLC45A2/MATP*, *Slc24a5/NCKX5*, and *OCA2/P Loci*[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 129: 392-405.
- [2] Lanlan R, Mohideen M, Mest J, et al. *Slc24a5*, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans[J]. *Science*, 2005, 310(5755): 1782-1786.
- [3] Liu X F, Luo J, Hu X X, Yang H, et al. Repression of *Slc24a5* can reduce pigmentation in chicken[J]. *Front Biosci (Elite Edition)*, 2011, 3: 158-165.
- [4] Mallick C B, Iliescu F M, Möls M, et al. The light skin allele of *Slc24a5* in South Asians and Europeans shares identity by descent[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003912.
- [5] Voge P, Read R, Vance R, et al. Ocular Albinism and hypopigmentation defects in *Slc24a5*-I-mice[J]. *Vet Pathol*, 2008, 45: 264-279.
- [6] 滕召纯, 孙利民, 陆晓屏, 等. 他留乌骨鸡 *Slc24a5* 基因 Nhe I mismatch PCR-RFLP 标记与羽色及肤色相关性研究[J]. *中国家禽*, 2014, 36(15): 6-13.
- [7] 李洪涛, 何 新, 周志勇, 等. *Slc7a11* 基因在不同被毛颜色哈萨克羊皮肤组织中的表达分析[J]. *遗传*, 2012, 34(10): 1314-1319.
- [8] Barsh G, Cotsarelis G. How hair gets its pigment[J]. *Cell*, 2007, 130(5): 779-781.

- [9] Valencia J C, Costin G E, Wakamatsu K, et al. Mutations in dopachrome tautomerase (Dct) affect eumelanin/pheomelanin synthesis, but do not affect intracellular trafficking of the mutant protein[J]. *Biochem J*, 2005, 391: 249-259.
- [10] Vage D, Fuglei E, Snipstad K, et al. Two cysteine substitutions in the MC1R generate the blue variant of the arctic fox (*Alopex lagopus*) and prevent expression of the white winter coat[J]. *Peptides*, 2005, 26(10): 1814-1817.
- [11] Smith D R, Spaulding D T, Glenn H M, et al. The relationship between Na^+/H^+ exchanger expression and tyrosinase activity in human melanocytes[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 298(2): 521-534.
- [12] Sturm R A, Teasdale R D, Box N F. Human pigmentation genes Identification structure and consequences of polymorphic variation[J]. *Gene*, 2001, 277: 49-62.
- [13] Hidernori W, Julio C V, Kenichi Y, et al. Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity[J]. *J Bio Chem*, 2004, 279(9): 7971-7981.
- [14] Ginger R S, Askew S E, Ogborne R M, et al. *Slc24a5* encodes a trans-Golgi network protein with potassium-dependent sodium-calcium exchange activity that regulates human epidermal melanogenesis[J]. *J Bio Chem*, 2008, 283(9): 5486-5495.
- [15] Keith C, Victor A. The role of *Slc24a5* in skin color[J]. *Exper Dermatol*, 2006, 15(10): 836-838.
- [16] John R W, Anthony T. Genetic susceptibility to age related macular degeneration[J]. *Med Genet*, 2000, 37: 83-87.
- [17] Luo J, Zhang W, Yu B, et al. cDNA cloning, expression analysis of *Slc24a5* and its relationship with melanin deposition in chicken[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2008, 35(1): 69-76.
- [18] Jennifer Y, David E. Melanocyte biology and skin pigmentation[J]. *Nature*, 2007, 455(22): 843-850.
- [19] Slominski A, Wortsman J, Plonka P M, et al. Hair follicle pigmentation[J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(1): 13-21
- [20] 杨舒黎, 毛华明, 舒文, 等. 云南乌骨绵羊肉质性状与 *tyr* 基因多态性的相关分析[J]. *遗传*, 2006, 28(3): 292-298.

Expression and Tissue Distribution Analysis of *Slc24a5* Gene in Sheep Skins with Different Coat Colors

TIAN Xue¹, MENG Xiaolin¹, LI Xuejun¹, MENG Lixia², DONG Changsheng³

(1. Fisheries of College, Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. School of Environment and Life Science, Kaili university, Kaili 556011, China;

3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, taigu 030801, China)

Abstract: To study the relationship between solute carrier family24 member5 (*Slc24a5*) and alpaca coat color formation. We clone the partial length of coding sequence of sheep *Slc24a5* gene and analyzed the expression patterns using real time PCR, western blot and immunohistochemistry. The results showed the mRNA transcript level of *Slc24a5* in black sheep skin was 20.53 times than that in white sheep ($P < 0.01$). The *Slc24a5* protein was detected at 51 kD in the total protein and the expression level was significant higher in black sheep versus white sheep ($P < 0.01$). Additionally, immunohistochemical analysis further demonstrated that *Slc24a5* staining was robustly increased in the outer root sheath and hair matrix of black sheep skin compared with white, and the expression of *Slc24a5* were significantly different between the black and white sheep skin based on the average optical density in black sheep skin was significantly higher than that in white one. The above results exhibited that *Slc24a5* may involve in the coat color formation in sheep skin.

Keywords: *Slc24a5*; sheep; expression; distribution