



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103031374 A

(43) 申请公布日 2013.04.10

(21) 申请号 201210439191.2

(22) 申请日 2012.11.06

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 许剑琴 刘凤华 万长荣 尹朋

麻武仁 徐霄龙

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

公司 11002

代理人 王朋飞 张庆敏

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C40B 40/06 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 19 页

序列表 3 页 附图 7 页

(54) 发明名称

一种用于评价运输应激模型的基因芯片及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于评价运输应激模型的基因芯片及其应用。所述基因芯片包括针对下述基因产生的 RNA、cRNA 或 cDNA 进行检测的探针中的一种或多种:Gdnf、Lifr、Ppp3r1、Sphk1、B4galt1、Phlda1、Il24、Adm、Gsdma1、Acvr1、Naip2、Aqp2、Ptpnc、Bcl2l1、Rela、Ctnnb1、Pdcd6ip、Tgfbr1、Hmox1、Sort1、Tpt1、Aldh1a1、Actc1、Rhot2、Bax。本发明芯片通过一次实时、同步、高通量检测神经-免疫-内分泌指标的变化多层次、多靶点全面评价畜禽在运输应激后上述指标的典型变化,对于评价运输过程中畜禽的机体状况及生产性能具有指导意义。本发明芯片不仅将在新药研究中体现节省样品、节省时间,同时节省资金,具有重大实际意义。

1. 一种用于评价运输应激模型的基因芯片,其具有针对下述基因产生的 RNA、cRNA 或 cDNA 进行检测的探针中的一种或多种 :Gdnf、Lifr、Ppp3r1、Sphk1、B4galt1、Phlda1、Il24、Adm、Gsdma1、Acvr1、Naip2、Aqp2、Ptprc、Bcl2l1、Rela、Ctnnb1、Pdc6ip、Tgfbr1、Hmox1、Sort1、Tpt1、Aldh1a1、Actc1、Rhot2、Bax。

2. 根据权利要求 1 所述的基因芯片,其特征在于,还包括针对下述基因产生的 RNA、cRNA 或 cDNA 进行检测的探针中的一种或多种 :RT1-CE5、RT1-CE16、Tlr9、RT1-CE3、Ptms、Apob、S100a9、Itga6、Scd1、Gpx2、Akr1c21、Ndufc2、Nox1、Cox7c、Cyp1a1、Fmo1、Cyp2j10、Fgb、Nrep、Fga、Tnrc6a、Ppp1r15b、Casc3、Hspa8、Tfrc。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的基因芯片,其特征在于,所述探针为来自下述基因的核酸序列或其互补序列 :Gdnf、Lifr、Ppp3r1、Sphk1、B4galt1、Phlda1、Il24、Adm、Gsdma1、Acvr1、Naip2、Aqp2、Ptprc、Bcl2l1、Rela、Ctnnb1、Pdc6ip、Tgfbr1、Hmox1、Sort1、Tpt1、Aldh1a1、Actc1、Rhot2、Bax、RT1-CE5、RT1-CE16、Tlr9、RT1-CE3、Ptms、Apob、S 100a9、Itga6、Scd1、Gpx2、Akr1c21、Ndufc2、Nox1、Cox7c、Cyp1a1、Fmo1、Cyp2j10、Fgb、Nrep、Fga、Tnrc6a、Ppp1r15b、Casc3、Hspa8、Tfrc。

4. 一种用于评价运输应激模型的试剂盒,其包括针对下述基因产生的 RNA、cRNA、cDNA 或其表达产物进行测定的试剂 :Gdnf、Lifr、Ppp3r1、Sphk1、B4galt1、Phlda1、Il24、Adm、Gsdma1、Acvr1、Naip2、Aqp2、Ptprc、Bcl2l1、Rela、Ctnnb1、Pdc6ip、Tgfbr1、Hmox1、Sort1、Tpt1、Aldh1a1、Actc1、Rhot2、Bax。

5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其还包括针对下述基因产生的 RNA、cRNA、cDNA 或其表达产物进行测定的试剂 :RT1-CE5、RT1-CE16、Tlr9、RT1-CE3、Ptms、Apob、S100a9、Itga6、Scd1、Gpx2、Akr1c21、Ndufc2、Nox1、Cox7c、Cyp1a1、Fmo1、Cyp2j10、Fgb、Nrep、Fga、Tnrc6a、Ppp 1r15b、Casc3、Hspa8、Tfrc。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为 :a) 检测 RNA、cRNA、cDNA 的试剂盒 :荧光定量 PCR 检测试剂盒,原位杂交及原位 RT-PCR, Nouthern 检测试剂盒中的一种或几种 ;

或 b) 检测表达产物的试剂盒 :ELISA 试剂盒或抗体芯片试剂盒中的一种或几种。

7. 权利要求 1-3 任一项所述基因芯片、权利要求 4-6 任一项所述试剂盒在用于评价运输应激模型中的应用。

8. 一种用于评价运输应激模型的方法,其特征在于,利用权利要求 1-3 任一项所述基因芯片或权利要求 4-6 任一项所述试剂盒对所述运输应激模型基因进行检测,通过基因的差异性表达进行聚类分析,从而评价运输应激模型。

一种用于评价运输应激模型的基因芯片及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域，具体地，涉及一种用于评价运输应激模型的基因芯片及其应用。

背景技术

[0002] 运输应激 (transport stress) 是指在运输途中的禁食 / 限饲、环境变化 (混群、密度、温度、湿度)、颠簸、心理压力等应激原的综合作用下，动物机体产生本能的适应性和防御性反映，是影响动物生产的重要因素之一。运输应激条件下，动物往往表现为呼吸、心跳加速，恐惧不安、性情急躁，体内的营养、水分大量消耗，并最终影响动物的生产性能、免疫水平及畜产品品质。

[0003] 运输应激的机理为动物受到应激原的作用后，下丘脑兴奋，分泌促肾上腺皮质释放激素，通过垂体门脉系统进入垂体前叶，使垂体前叶分泌肾上腺皮质激素 (ACTH) 增多，ACTH 通过血液循环到达肾上腺，促使糖皮质激素的释放。应激初期分泌的肾上腺，也可刺激垂体前叶释放 ACTH，ACTH 分泌的增多，阻碍某些营养物质的吸收，加强分解代谢，抑制炎症和免疫反应，致使机体抵抗力下降。应激原的强度大，作用持久时，肾上腺皮质分泌功能衰竭，可造成动物发病和死亡。

[0004] 目前对于运输应激模型的评价并没有一个确定的标准，大多时候用皮质醇、儿茶酚胺等激素水平的变化来衡量应激的发生，但导致激素变化的影响因素太多，且其自身的代谢速度快，不能稳定和确切的指示机体实际的应激状态，所以我们引入基因芯片这一新技术。基因芯片技术作为基因诊断、相关基因确定、疾病分子机理分析、药物筛选等重要工具，具有高通量、并行性及样品消耗量少的优势，在中药研究尤其是新药的设计筛选开发独具魅力，能够进行大规模筛选，在药物与基因间架起一座桥梁，通过基因表达谱芯片实验可以同时观察成千上万个基因在不同个体、不同组织、不同发育阶段的表达状况，从疾病及药物两个角度对生物体的多个参数同时进行研究，发掘药物靶点并同时获取作用机制的相关信息，改变了传统的一次实验仅对单个或几个基因表达差异进行观察，为多环节药物作用机制的研究提供了有力工具。

[0005] 因此，我们希望通过基因表达谱分析找到能够评价动物运输应激模型的基因芯片。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种用于评价运输应激模型的基因芯片。

[0007] 本发明另一目的是提供一种包括上述基因芯片的试剂盒。

[0008] 本发明又一目的是提供一种利用上述基因芯片或试剂盒评价运输应激模型的方法。

[0009] 本发明提供的评价运输应激模型的基因芯片，其主要针对以下基因产生的 RNA、CRNA 或 CDNA 进行检测：

[0010] 1、细胞死亡相关基因 :Gdnf、Lifr、Ppp3r1、Sphk1、B4galt1、Phlda1、Il24、Adm、Gsdma1、Acvr1、Naip2、Aqp2、Ptprc、Bcl2l1、Rela、Ctnnb1、Pcd6ip、Tgfbr1、Hmox1、Sort1、Tpt1、Aldh1a1、Actc1、Rhot2、Bax。

[0011] 2、免疫相关基因 :RT1-CE5、RT1-CE16、Tlr9、RT1-CE3、Ptms、B4galt1、Gpx2、Ptprc、Ctnnb1、Apob、S100a9、Itga6、Tgfbr1、Hmox1。

[0012] 3、氧化应激相关基因 :Scd1、Gpx2、Akr1c21、Hmox1、Ndufc2、Nox1、Cox7c、Cyp1a1、Aldh1a1、Fmo1、Cyp2j10。

[0013] 4、应激应答相关基因 :Fgb、B4galt1、Sphk1、Il24、Nrep、Adm、Fga、Acvr1、Aqp2、Ptprc、Gpx2、Bcl2l1、Rela、Tnrc6a、Pcd6ip、Ppp1r15b、Tgfbr1、Hmox1、Gdnf、Casc3、Nox1、Cyp1a1、Aldh1a1、Hspa8、Tfrc、Tlr9、Bax。

[0014] 一种优选的组合应当具有针对下述基因产生的 RNA、cRNA 或 cDNA 进行检测的探针 :Gdnf、Lifr、Ppp3r1、Sphk1、B4galt1、Phlda1、Il24、Adm、Gsdma1、Acvr1、Naip2、Aqp2、Ptprc、Bcl2l1、Rela、Ctnnb1、Pcd6ip、Tgfbr1、Hmox1、Sort1、Tpt1、Aldh1a1、Actc1、Rhot2、Bax、RT1-CE5、RT1-CE16、Tlr9、RT1-CE3、Ptms、Apob、S100a9、Itga6、Scd1、Gpx2、Akr1c21、Ndufc2、Nox1、Cox7c、Cyp1a1、Fmo1、Cyp2j10、Fgb、Nrep、Fga、Tnrc6a、Ppp1r15b、Casc3、Hspa8、Tfrc。

[0015] 利用上述基因芯片对目的基因进行检测后,通过以下运输应激综合症评价标准进行检验 :

[0016] 1、细胞死亡相关基因 :上调 Ppp3r1、Sphk1、B4galt1、Phlda1、Il24、Adm、Gsdma1、Acvr1、Naip2、Aqp2、Ptprc、Bcl2l1、Rela、Ctnnb1、Pcd6ip、Tgfbr1、Hmox1、Sort1、Gdnf、Lifr ;下调 Tpt1、Aldh1a1、Actc1、Rhot2、Bax。T 检验 $P < 0.01$ 。

[0017] 2、免疫相关基因 :上调 Ptms、B4galt1、Gpx2、Ptprc、Ctnnb1、Apob、S100a9、Itga6、Tgfbr1、Hmox1 ;下调 RT1-CE5、RT1-CE16、Tlr9、RT1-CE3。T 检验 $P < 0.01$ 。

[0018] 3、氧化应激相关基因 :上调 Scd1、Gpx2、Akr1c21、Hmox1 ;下调 Ndufc2、Nox1、Cox7c、Cyp1a1、Aldh1a1、Fmo1、Cyp2j10。T 检验 $P < 0.01$ 。

[0019] 4、应激应答相关基因 :上调 Fgb、B4galt1、Sphk1、Il24、Nrep、Adm、Fga、Acvr1、Aqp2、Ptprc、Gpx2、Bcl2l1、Rela、Tnrc6a、Pcd6ip、Ppp1r15b、Tgfbr1、Hmox1、Gdnf、Casc3 ;下调 Nox1、Cyp1a1、Aldh1a1、Hspa8、Tfrc、Tlr9、Bax。T 检验 $P < 0.01$ 。

[0020] 本发明中所述的探针可以是上述相应基因的核酸序列、其互补序列,或者它们的片段,它们被固定在适于检测反应的固相载体上,制成基因芯片。本发明中所述固相载体可选用本领域中众所周知的载体,只要所述载体与所述反应物相容,不会影响检测结果。优选的,本发明所述固相载体为玻璃片、硝酸纤维素膜或硅片等。

[0021] 本发明所述基因芯片可包含在一个试剂盒中,其中还可以包括用于评价反应的相应试剂、缓冲液以及说明书等。其包括对上述基因产生的 RNA 或表达产物测定的全部或部分试剂,典型地,测定 RNA 的试剂包括荧光定量 PCR 检测试剂盒,原位杂交及其原位 RT-PCR, Northern 检测试剂盒等,测定蛋白表达产物的试剂盒,包括 ELISA 试剂盒、抗体芯片等。

[0022] 在本发明的实施方案中,所述固相载体为玻璃片,玻璃片用多聚赖氨酸进行处理,向其上固定具有本发明所选的基因特征性片段,利用机械手点印芯片,并将芯片重新水合化及快速干燥、UV- 交联、封闭及变性,得到评价用基因芯片。同时以荧光素标记待测样品,

和芯片进行杂交。

[0023] 在本发明中,待测样品核酸的抽提可采用异硫氰酸胍稳定法,用分光光度计对 RNA 定量。

[0024] 本发明所述评价用基因芯片采用了下述严格交反应条件。依据本发明所选择的条件,可实现使大量杂交反应中的大多数反应物处于最佳状况中,从而使尽可能多的配对物都不遗漏,即减少假阳性的可能,将错配降到最低。

[0025] (1) 预杂交芯片:

[0026] I. 取出芯片,平衡至室温;

[0027] II. 加入 1× 杂交 Buffer;

[0028] III. 45°C, 60rpm, 预杂交 10min。

[0029] (2) 杂交液的配制:

[0030] 表 1 杂交液的配制

[0031]

	配方	300 μ l	终浓度
1	片段化 cRNA (0.5mg/ml)	30 μ l	0.05 μ g/ μ l
2	Oligo B2 对照 (3nM)	5 μ l	50pM
3	20×Hybridization control	15 μ l	1×
4	鱼精 DNA (9.3mg/ml)	3.3 μ l	0.1mg/ml
5	乙酰化 BSA (20mg/ml)	7.5 μ l	0.5mg/ml
6	2× 杂交 Buffer	150 μ l	1×
7	DMSO	30 μ l	
8	RNase-Free Water	59.2 μ l	

[0032]

[0033] I. 杂交液混匀,离心片刻;

[0034] II. 99°C, 温浴 5min;

[0035] III. 将杂交液转至 45°C, 温浴 5min;

[0036] IV. 离心机最大转速离心 5min。

[0037] (3) 杂交芯片

[0038] I. 吸出芯片中的 1× 杂交 Buffer;

[0039] II. 将杂交液加入到芯片中;

[0040] III. 45°C, 60rpm, 杂交 16h。

[0041] 本发明中所用试剂均为常规试剂,包括用于标记的试剂:MessageAmp™ II-Biotin (Ambion 公司, # 1791)、1 Poly-A RNAControl Kit (Affymetrix 公司, P/

N 900433)、1 Hybridization Control Kit(Affymetrix 公司, P/N 900454) ;用于清洗和染色的试剂:分子生物学级用水(BioWhittaker Molecular Applications/Cambrex, P/N51200)、蒸馏水(Invitrogen Life Technologies, P/N 15230-147)、牛血清白蛋白(BSA, 50mg/mL) (Invitrogen Life Technologies, P/N15561-020)、R-Phycoerythrin Streptavidin(分子探针, P/N S-866)、5M NaCl(无 RNA 酶、无 DNA 酶)(Ambion, P/N 9760G)、20×SSPE(3M NaCl, 0. 2M NaH₂PO₄, 0. 02M EDTA) (BioWhittaker Molecular Applications/Cambrex, P/N 51214)、羊 IgG(Sigma-Aldrich, P/N I5256)、Anti-streptavidin 抗体(羊)(生物素化 Vector Laboratories, P/NBA-0500)、10%Surfact-Amps 20(Tween-20) (Pierce Chemical, P/N28320) 等。

[0042] 基于以上技术方案,本发明具有以下优点和效果:

[0043] (1) 本发明首次将上述差异表达明显的基因聚类后采用生物芯片技术应用于对运输应激模型的评价,并通过一次实时、同步、高通量检测神经-免疫-内分泌指标的变化多层次、多靶点全面评价畜禽在运输应激后上述指标的典型变化。

[0044] (2) 本发明首次将细胞凋亡、氧化应激和免疫相关基因结合起来作为运输应激综合症的评价指标,上述指标对于评价运输过程中畜禽的机体状况及生产性能具有指导意义。

[0045] (3) 本发明芯片不仅将在新药研究中体现节省样品、节省时间,同时节省资金,具有重大实际意义。

附图说明

[0046] 图 1 为应激前后大鼠体重、体温变化。

[0047] 图 2 为应激前后大鼠血清生化指标变化,应激前为对照组。

[0048] 图 3 为应激前后大鼠空肠组织解剖学观察,应激前为对照组。

[0049] 图 4 为应激前后大鼠空肠组织光镜下观察,应激前为对照组。

[0050] 图 5 为应激前后大鼠空肠组织电镜下观察,应激前为对照组。

[0051] 图 6 为应激前后大鼠空肠 TUNEL 染色,应激前为对照组。

[0052] 图 7 为变化 5 倍以上基因聚类分析, a 为 cell death 相关基因聚类分析; b 为氧化还原相关基因聚类分析; c 为应激应答相关基因聚类分析。

[0053] 图 8 为应激前后大鼠部分变化基因 PCR 验证,应激前为对照组。

具体实施方式

[0054] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0055] 若为特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0056] 实施例 1 基因芯片的制备

[0057] 关于本发明所述基因芯片的制备,可采用如下详述的通用策略。

[0058] 1、载玻片处理

[0059] 首先充分清洗载玻片,用 25×NaOH 溶液 200mL 加 300mL 95%乙醇配成 500mL 碱性清洗液,将载玻片彻底浸泡在清洗液中 2h,再用清水冲洗 5 遍并将载玻片泡在水中。接下

来就是用多聚-L-赖氨酸溶液浸泡,从而使多聚赖氨酸均匀涂包在玻璃表面,形成一种多聚-L-赖氨酸涂面。具体做法是配成 350mL 多聚-L-赖氨酸浸泡液,将洗净的载玻片直接浸泡,浸泡期间保持慢速摇晃,1h 后取出并在水中浸泡清洗,最后干燥。一般将涂好的载玻片用锡箔纸包好,室温放置 1 个月,进行熟化,以使表面保持充分的疏水性。这对于以后点 DNA 样品是十分重要的。

[0060] 2、基因芯片的点印

[0061] 点印 DNA 用机械手。将一组处理好的载玻片固定在一个平台上,将 DNA 样品(溶在 50%DMSO 中,0.25-0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)装在 96 孔或 384 孔的平板中,并将平板放在支架上。机械手将一组特制的点样吸头插入对应的 DNA 平板孔中,让每个吸头充上约 1 μl 的 DNA 溶液。然后机械手轻轻地将吸头移向载玻片,将 DNA 样品完全一致地点到多聚-L-赖氨酸包被的载玻片面上。每个载玻片上大约点 0.5 μl 的 DNA 溶液。点样的质量要表现在点与点的距离,这取决于点样吸头的尖锐度与多聚-L-赖氨酸表面的疏水性,矩阵 24 \times 24,每个样品重复 4 次,每张芯片上下两个矩阵。

[0062] 3、基因芯片的后加工处理

[0063] 当基因芯片点成之后,需要对其进行进一步的加工处理,以便能够用于以后的杂交实验。通常进行四步处理,即重新水合化及快速干燥、UV-交联、封闭及变性后备用。

[0064] 3.1 重新水合化:通常点样过程并不能保证 DNA 在点中均匀一致。为使 DNA 在所有点中都分布均匀。需要对之进行重新水和化并进行快速干燥。这一过程要求技术条件很高。当重新水合化不充分时,大小不规则的点会影响以后的杂交与分析结果。但当过度水合化时,点与点之间可能会产生融合。因此,要确定一个十分准确的水合条件,本芯片采用的是相对湿度 70% 环境水合 2h,室温干燥 0.5h。

[0065] 3.2 UV 交联:当重新水合化后立即干燥后,将载玻片放在 UV 射线下照射,这样可以使 DNA 交联在载玻片上。这一过程对于 DNA 浓度低时尤为重要,可以增加可杂交 DNA 吸附到每一个点上的量。在 UV 交联时,将载玻片有 DNA 点的面朝上,照射总能量强度为 65MJ/cm。

[0066] 3.3 封闭:封闭主要目的是将游离赖氨酸基团加以修饰,以避免这些基团与以后被标记的 DNA 结合。如果不对载玻片封闭,那么,将来杂交后就会产生无法分清的非特异杂交斑。而且还会产生过多的背景。一般的封闭办法是用琥珀酸酐进行酰基化,将赖氨酸的氨基转化成酰氨基,使之形成负电荷表面,从而减小与 DNA 的非特异结合。这一过程一般在 15min 内结束。

[0067] 3.4 变性处理:当封闭过程完成后,要立即进行变性处理,即将整个载玻片立即浸入沸腾但不冒泡的水中,上下翻 3~5 次,停留 2min,然后立即转到 95% 的乙醇中,浸泡一会儿后离心干燥,这样便完成了对芯片上 DNA 的变性处理。此时,整个基因芯片块也就做好了。

[0068] 实施例 2 本发明所述基因芯片检测待测样品的通用策略

[0069] 1、待测样品的标记

[0070] 依照所检测对象的不同,选择具体的待测样本,依照如下方法提取核酸样品,并对所得待测样品核酸进行生物素标记。

[0071] RNA 的提取方法:(参见分子克隆:实验指南中文第三版 2002 年 J. 萨姆布鲁克等

著黄培堂等译 518-522 页) ;对待测样品的核酸进行提取。

[0072] 生物素标记 :以提取的核酸作模板,采用 RT-PCR 方法进行扩增, RNA/T7-Oligo (dT) 作为引物合成双联 cDNA,再以 cDNA 为模板合成 cRNA,并用生物素 -NTP 进行标记。

[0073] 2、基因芯片与待测样品的杂交

[0074] 取出芯片平衡芯片至室温,参见下表配制杂交液

[0075] 表 2 杂交液的配制

[0076]

	配方	300 μ l	终浓度
1	片段化 cRNA (0.5mg/ml)	30 μ l	0.05 μ g/ μ l
2	Oligo B2 对照 (3nM)	5 μ l	50pM
3	20 \times Hybridization control	15 μ l	1 \times
4	鱼精 DNA (9.3mg/ml)	3.3 μ l	0.1mg/ml
5	乙酰化 BSA (20mg/ml)	7.5 μ l	0.5mg/ml
6	2 \times 杂交 Buffer	150 μ l	1 \times
7	DMSO	30 μ l	
8	RNase-Free Water	59.2 μ l	

[0077] 根据芯片类型确定需要配制的体积,这已将杂交过程中会损失部分(10-20 μ L)杂交液考虑在内。将杂交液置于加热块上,99 $^{\circ}$ C温育 5min。其间,用一次性吸头通过一个 septa (芯片上 septa 位置)注入相应体积 1 \times 杂交缓冲液将芯片置于杂交炉中,45 $^{\circ}$ C温育 10min,60rpm 旋转。将 99 $^{\circ}$ C 已温育 5min 的杂交液转移到另一加热块上,45 $^{\circ}$ C温育 5min。从加热块上取出杂交液,微型离心机最大转速离心 5min,以除去杂交混合液中的不溶性物质。从杂交炉中取出芯片,吸出 1 \times 杂交缓冲液,将杂交液加入到芯片中,将芯片平衡放置于杂交炉中,45 $^{\circ}$ C,60rpm 旋转杂交 16h。

[0078] 3. 杂交结果的检测

[0079] 将杂交完毕的芯片用 GeneChip[®] Scanner 3000 (Affymetrix, USA) 激光共聚焦扫描仪在适当条件下扫描检测其杂交信号。

[0080] 实施例 3 运输应激模型评价芯片实例

[0081] 本例用 35 $^{\circ}$ C、60n/min 的条件模拟运输应激 2 小时,连续 3 天,研究应激后大鼠临床症状、肠道组织形态学变化,细胞凋亡及基因变化,并通过本发明芯片来进行检测和验证。

[0082] 一、材料和方法

[0083] 1.1 动物分组和饲养

[0084] 20 只体重为 250 \pm 20g 雄性 SD (sprague-Dawley)大鼠(购自北京维通利华试验动

物技术有限公司)。供试大鼠在温度 25℃,湿度 45% 环境下适应性饲养 3 天(每天上午定时给料,自由饮水)。随机分为对照组和应激组,每组 10 只。饲喂商品鼠粮(每天定量 200g)。

[0085] 1.2 试验处理

[0086] 应激组大鼠于摇床中 35℃、60n/min,每天上午 9:00-11:00 处理连续 3 天,对照组于室温下正常饲养。

[0087] 1.3 样品和指标数据采集

[0088] 在第 3 天处理完大鼠后立即眼球采血用于血清生化检测,短颈处死取空场(距离幽门口 20cm)组织用灭菌生理盐水冲洗干净分为 4 部分① 10% 甲醛固定②基因芯片检测③④液氮冻透后 -80℃保存。

[0089] 1.4 动物临床表现

[0090] 每天在应激前即 9:00 记录大鼠体重、体温,11:00 即应激后记录大鼠体重、体温。观察应激前后大鼠的精神状态,生理行为变化,并拍照片。

[0091] 1.5 血清皮质醇及血糖检测

[0092] 血样,37℃放置 60min,4℃下 3000r/min 离心 10min,取上清 200ul 分装,冷藏送于中国农业大学动物医院检测皮质醇和血糖的含量。

[0093] 1.6 空肠组织形态学检测

[0094] 1.6.1 空肠组织眼观及光镜下形态学变化

[0095] 大鼠处死后,打开腹腔,拍照记录腹腔脏器眼观变化。

[0096] 用中性甲醛固定空场组织 24h,然后经脱水、透明、浸蜡、包埋处理制成石蜡切片,石蜡切片再经二甲苯:无水酒精(1:1)、无水酒精及 95%酒精-80%酒精-70%酒精-50%酒精等梯度酒精脱蜡脱水(各 2min),用 Ehrlich 苏木精溶液染色约 10-15min,用蒸馏水洗去多余染料后,入 0.5% 盐酸酒精溶液分色(10~15s 钟),以镜检为准,用自来水蓝化 15~30min,经蒸馏水洗后,梯度酒精上行至 95%酒精(各 1~2min),入 0.5% 伊红酒精液染 30s 至 1min,再依次入 95%酒精和无水酒精脱水(各 1~3min),经二甲苯:无水酒精(1:1),二甲苯透明,中性树胶封片。日本 Olympus BH2 生物显微镜下(10*20/10*40)观察组织变化。

[0097] 1.6.2 空肠组织电镜变化

[0098] 用锋利刀片取 1mm³ 的空肠组织,入戊二醛固定液中,固定 24h(4℃),0.1M 磷酸缓冲液清洗 3 次(每次 3~5min),用 1% 锇酸固定标本 2h(4℃),再经 30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇(可过夜保存)、90% 乙醇、90% 乙醇丙酮、90% 丙酮梯度脱水(10min);100% 丙酮(用干燥剂处理过)脱水 2 次,每次 10min,然后将标本移入环氧树脂与丙酮 1:1 的混合液中,浸润标本,放于抽湿机上 2h,再将标本放入点有环氧树脂的标本盒内,置于 35℃烘箱内 2h;后将标本滤纸上吸干,再放入点有环氧树脂的标本盒内,70℃温箱过夜聚合。制作超薄切片(60~80nm),柠檬酸铅染色 10min。双蒸水清洗数分钟,滤纸吸干,JEM-1230 透射电镜(日本 JEOL 公司)观察空肠黏膜上皮细胞结构。

[0099] 1.7 基因芯片扫描

[0100] 取对照组和应激组空肠组织每组 6 个样匀浆,提取 RNA,用大鼠全基因寡聚 DNA 芯片进行分析,方法同实施例 2。该芯片选自 Agilent 大鼠寡聚 DNA 芯片(4×44K),Agilent G4131F(上海生物芯片有限公司),该芯片含有针对上述基因的寡核苷酸探针,所述探针的探针号、基因名、基因号如表 3 所示。

[0101] 表 3 检测探针

[0102]

探针号	基因名	基因号
A_44_P524566	Actc1	NM_019183
A_44_P454202	Acvr1	NM_024486
A_43_P11527	Adm	NM_012715
A_44_P323773	Akr1c21	NM_001013057
A_44_P365286	Aldh1a1	NM_022407
A_44_P402346	Apob	NM_019287
A_42_P763077	Aqp2	NM_012909
A_44_P879764	B4gal t1	NM_053287
A_43_P11800	Bax	NM_017059
A_44_P548065	Bcl211	NM_031535
A_44_P489244	Casc3	NM_147144
A_44_P540570	Cox7c	NM_001134705
A_44_P409339	Ctnnb1	NM_053357
A_44_P321009	Cyp1a1	NM_012540
A_44_P448154	Cyp2j10	NM_001134980
A_44_P332328	Fga	NM_001008724
A_43_P10037	Fgb	NM_020071
A_44_P283508	Fmo1	NM_012792
A_44_P365470	Gdnf	NM_019139
A_44_P500056	Gpx2	BQ196649
A_44_P298331	Gsdma1	NM_001108297
A_43_P11472	Hmox1	NM_012580

A_44_P396546	Hspa8	NM_024351
A_43_P15489	I124	NM_133311
A_44_P187056	Itga6	XM_002729169
A_44_P263355	Lifr	NM_031048
A_44_P330692	Naip2	AJ271303
A_44_P356344	Ndufc2	NM_001009290
A_44_P421322	Nox1	NM_053683
A_44_P635239	Nrep	AY724475
A_44_P520840	Pdcd6ip	NM_001029910
A_44_P351211	Ph1da1	NM_017180
A_44_P1035051	Ppp1r15b	NM_001107175

[0103]

A_43_P10391	Ppp3r1	NM_017309
A_43_P12707	Ptms	NM_031975
A_44_P135213	Ptprc	NM_001109890
A_44_P184726	Rela	NM_199267
A_44_P1052504	Rhot2	NM_181823
A_44_P86724	RT1-CE16	NM_001008839
A_44_P274061	RT1-CE3	NM_001008841
A_44_P172850	RT1-CE5	NM_001008843
A_44_P353618	S100a9	NM_053587
A_44_P550145	Scd1	NM_139192
A_44_P445572	Sort1	NM_031767
A_44_P381917	Sphk1	NM_133386

A_43_P15662	Tfrc	NM_022712
A_44_P703479	Tgfbr1	NM_012775
A_44_P294706	Tlr9	NM_198131
A_44_P161343	Tnrc6a	NM_001107549
A_44_P39879	Tpt1	NM_053867

[0104] 1.8 荧光定量 PCR 验证芯片数据。

[0105] 1.8.1 RNA 提取

[0106] 称取 90 ~ 100mg 空肠组织于盛有液氮的研钵中, 研磨成粉状后加入 1mL TRIzol 试剂, 继续充分研磨, 转入 1.5mL 的 Eppendorf 管中, 室温放置 5min。加入 200 μ L 氯仿, 振荡混匀, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 12000rpm, 离心 15min, 移上清(水相)于一新 Eppendorf 管中, 加入 500 μ L 异丙醇混匀, 室温放置 15min, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C, 12000rpm 离心 10min, 弃上清。加 1mL 75% 乙醇, 洗涤 1 次(适度震荡混匀), 4 $^{\circ}$ C 小于 7500rpm 离心 5min, 弃乙醇。(不要回流液体, 应缓慢倾斜移除废液), 室温稍微晾干, RNA 略显透明, 加入 0.1%DEPC 水 20 ~ 40 μ L, 缓慢用枪头吹吸 5 ~ 8 次, 溶解混匀并置于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0107] 用紫外分光光度计检测 RNA 的产量, 在 260nm 处的吸光度, 1OD=40 μ g/mL。根据在 260nm 和 280nm 处的吸光值, 检测 RNA 的纯度, 纯 RNA 的 OD260/OD280 比值应接近 2.0 (比值最好在 1.9 ~ 2.1 之间)。

[0108] 1.8.2 RI-PCR

[0109] 依次取 2.0 μ L oligo-dT18 (10mmol/L) 与 2.0 μ L dNTPs (10mmol/L 加入到有 2.0 μ L RNA(1 μ g/ μ L)的 1.5mL Eppendorf 管中, 75 $^{\circ}$ C 变性 5min, 立即置冰上冷却。然后每管中加入 2.0 μ L M-MLV 反转录酶(200U/ μ L). 8.0 μ L 5 \times 反转录酶反应缓冲液(10mmol/L), 0.8 μ L RNA 酶抑制剂(50U/ μ L), 用灭菌的 0.1%DEPC 处理水补足总体积至 40 μ L 37 $^{\circ}$ C 反应 2h, 95 $^{\circ}$ C 灭活反转录酶 5min, 立即使用或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0110] 1.8.3 荧光 PCR 的引物、反应体系和程序

[0111] 根据 GenBank 发表的大鼠的 Bax、Bcl-212、GPX2 等基因序列, 使用 Primer premier 5.0 和 DNAMAN 生物软件分别在相对保守的区域设计 PCR 特异引物, 由上海生物工程公司合成。引物序列见表 1。将冻干粉状态的引物用灭菌超纯水, 配制成 20 μ mol/L 溶液, -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0112] 表 4 PCR 引物

基因	基因号	引物序列 5'~3'	产物大小
β -actin	NM_031144	正向引物: TTGTCCTGTATGCCTCTGG 反向引物: ATGTCACGCACGATTTCCC	218
Bax	NM_017059.2	正向引物: CAGGACGCATCCACCAAGAA 反向引物: GGGTCCCGAAGTAGGAAAGG	114
Bcl-2l2	NM_001191.2	正向引物: CTGGGAGGAGAAGATGC 反向引物: ACCTTTGTTCCACGACCCATAG	126
GPX2	NM_183403.2	正向引物: ACCAGTTCGGACATCAGGAG 反向引物: GGGTCGTCATAAGGGTAGGG	101
NOX1	NM_053683.1	正向引物: ATCCCTTTACTCTGACCTCTGC 反向引物: GTTTGCCTAATTCGTCCATCT	231
Ndufc2	NM_001009290.1	正向引物: CTACATCGGCTTCCTGGGCTA 反向引物: CATAAGTTTTCTTCTCTTTCTC	299
Ppp3r1	NM_017309.2	正向引物: GTTGAGGTTTCGTTTCCGTAT 反向引物: ACTGCGTATCTTTCAGGTTGTT	196

[0114] PCR 反应体系: 1.0 μ L cDNA, 1.0 μ L 引物, 10 μ L Brilliant SYBR Green QPCR master Mix, 0.3 μ L ROX, 补水至 20 μ L。

[0115] 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min。94 $^{\circ}$ C 变性 30s; 56 $^{\circ}$ C 退火 30s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 40 个循环。溶解曲线条件为: 95 $^{\circ}$ C 1min; 55 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 30s。

[0116] 二、结果

[0117] 2.1 动物临床表现

[0118] 与对照组相比, 用摇床 35 $^{\circ}$ C、60n/min、2h/d, 连续 3 天处理后大鼠被毛湿透、精神萎靡, 排泄增加, 并有洗脸行为。

[0119] 2.2 大鼠体重体温变化

[0120] 如图 1 所示, 与对照组相比, 应激后大鼠体重显著下降 ($p < 0.05$), 体温均显著升高 ($p < 0.05$), 平均达到 39.5 $^{\circ}$ C。

[0121] 2.3 大鼠血清生化指标变化

[0122] 如图 2 所示, 与对照组相比, 应激组大鼠皮质醇及血糖均显著升高 ($p < 0.05$)。应激后, 动物机体通过升高血糖来应对外界环境变化带来的刺激; 同时机体快速启动下丘脑-肾上腺-皮质轴, 使血清中皮质醇水平迅速升高。

[0123] 2.4 空肠组织形态学变化

[0124] 2.4.1 大鼠空肠组织解剖学变化

[0125] 如图 3 所示, 与对照组相比, 应激组大鼠肠道充血、出血, 肠道鼓气严重。

[0126] 2.4.2 大鼠空肠组织光镜观察

[0127] 如图 4 所示, 对照组大鼠空肠绒毛结构比较完整, 应激组的肠道绒毛损伤, 顶端脱落至肠腔, 固有层裸露, 肠道结构完整性破坏。

[0128] 2.4.3 大鼠空肠组织电镜观察

[0129] 如图 5 所示, 对照组空肠上皮细胞微绒毛排列整齐, 细胞器如线粒体结构相对清

晰,运输应激大鼠小肠黏膜上皮微绒毛变短、排列稀疏不整;线粒体、转运小泡及次级溶酶体数量增加。细胞间连

[0130] 2.4.4 大鼠空肠组织凋亡检测

[0131] 如图6所示,应激组空肠凋亡细胞明显多于对照组。

[0132] 2.5 芯片差异数据

[0133] 2.5.1 上调5倍以上基因数据

[0134] 表5 上调5倍以上基因数据

[0135]

	探针号	P 值	差异倍数	基因名	基因号
细胞死亡相关	A_43_P10391	0.0011	11.60	Ppp3r1	NM_017309
	A_44_P381917	0.0030	10.04	Sphk1	NM_133386
	A_44_P879764	0.0053	10.61	B4galt1	NM_053287
	A_44_P351211	0.0	9.71	Phlda1	NM_017180
	A_43_P15489	3.0E-4	7.99	Il24	NM_133311
	A_43_P11527	0.0025	7.09	Adm	NM_012715
	A_44_P298331	0.0010	7.02	Gsdma1	NM_001108297
	A_44_P454202	0.0	6.99	Acvr1	NM_024486
	A_44_P330692	0.0225	6.94	Naip2	AJ271303
	A_42_P763077	7.0E-4	6.88	Aqp2	NM_012909
	A_44_P135213	0.0	6.77	Ptpre	NM_001109890
	A_44_P548065	0.0	6.64	Bcl2l1	NM_031535
	A_44_P184726	9.0E-4	6.57	Rela	NM_199267
	A_44_P409339	0.0	6.57	Ctnnb1	NM_053357
	A_44_P520840	0.0	5.81	Pdcd6ip	NM_001029910
	A_44_P703479	4.0E-4	5.51	Tgfbr1	NM_012775
	A_43_P11472	0.0024	5.46	Hmox1	NM_012580
	A_44_P445572	1.0E-4	5.41	Sort1	NM_031767
A_44_P365470	0.0013	5.33	Gdnf	NM_019139	
A_44_P263355	0.0	5.27	Lifr	NM_031048	
免疫相关	A_43_P12707	1.0E-4	10.73	Ptms	NM_031975
	A_42_P773945	0.0052	10.61	B4galt1	NM_053287
	A_44_P500056	0.0287	6.68	Gpx2	BQ196649
	A_44_P135213	0.0	6.77	Ptpre	NM_001109890
	A_44_P409339	0.0	6.57	Ctnnb1	NM_053357
	A_44_P402346	0.0	6.36	Apob	NM_019287
	A_44_P353618	0.0133	5.62	S100a9	NM_053587
	A_44_P187056	0.0	5.55	Itga6	XM_002729169
	A_44_P703479	4.0E-4	5.51	Tgfbr1	NM_012775
A_43_P11472	0.0024	5.46	Hmox1	NM_012580	

氧化应激相关	A_44_P550145	0.0095	18.76	Scd1	NM_139192
	A_44_P500056	0.0287	6.68	Gpx2	BQ196649
	A_44_P323773	0.0027	5.52	Akr1c2l	NM_001013057
	A_43_P11472	0.0024	5.46	Hmox1	NM_012580
应激应答相关	A_43_P10037	0.0080	17.5452	Fgb	NM_020071
	A_44_P879764	0.0053	10.6117	B4galt1	NM_053287
	A_44_P381917	0.0030	10.0423	Sphk1	NM_133386
	A_43_P15489	3.0E-4	7.9938	Il24	NM_133311
	A_44_P635239	0.0	7.8769	Nrep	AY724475
	A_43_P11527	0.0025	7.0854	Adm	NM_012715
	A_44_P332328	0.0153	7.0651	Fga	NM_001008724
	A_44_P454202	0.0	6.9911	Acvr1	NM_024486
	A_42_P763077	7.0E-4	6.8758	Aqp2	NM_012909
	A_44_P135213	0.0	6.774	Ptprc	NM_001109890
	A_44_P500056	0.0287	6.6813	Gpx2	BQ196649
	A_44_P548065	0.0	6.6351	Bcl2l1	NM_031535
	A_44_P184726	9.0E-4	6.5664	Rela	NM_199267
	A_44_P161343	1.0E-4	6.1647	Tnrc6a	NM_001107549
	A_44_P520840	0.0	5.8087	Pcdcd6ip	NM_001029910
	A_44_P103505 l	0.0	5.7831	Ppp1r15b	NM_001107175
	A_44_P703479	4.0E-4	5.5107	Tgfbr1	NM_012775
	A_43_P11472	0.0024	5.4572	Hmox1	NM_012580
	A_44_P365470	0.0013	5.3321	Gdnf	NM_019139
	A_44_P489244	2.0E-4	5.3143	Casc3	NM_147144

[0136]

[0137] 2.5.2 下调 5 倍以上基因数据

[0138] 表 6 下调 5 倍以上基因数据

[0139]

分类	探针号	P 值	差异倍数	基因名	基因号
细胞死亡相关	A_44_P39879	5.0E-4	-8.80	Tpt1	NM_053867
	A_44_P365286	0.0013	-8.54	Aldh1a1	NM_022407
	A_44_P524566	0.0011	-8.22	Actc1	NM_019183
	A_44_P1052504	0.0032	-7.17	Rhot2	NM_181823
	A_43_P11800	0.018	-5.02	Bax	NM_017059
免疫相关	A_44_P172850	0.0119	-7.44	RT1-CE5	NM_001008843
	A_44_P86724	0.0	-5.71	RT1-CE1	NM_001008839

[0140]	氧化应激 相关	A_44_P294706	0.0127	-5.26	Tlr9	NM_198131
		A_44_P274061	0.0	-5.16	RT1-CE3	NM_001008841
	A_44_P356344	9.0E-4	-15.11	Ndufc2	NM_001009290	
	A_44_P421322	0.0099	-10.94	Nox1	NM_053683	
	A_44_P540570	0.0000361	-10.09	Cox7c	NM_001134705	
	A_44_P321009	0.0093	-9.75	Cyp11a1	NM_012540	
	A_44_P365286	0.0013	-8.54	Aldh1a1	NM_022407	
	A_44_P283508	4.0E-4	-7.25	Fmol	NM_012792	
	A_44_P448154	9.0E-4	-5.49	Cyp2j10	NM_001134980	
	应激应答 相关	A_44_P421322	0.0099	-10.94	Nox1	NM_053683
		A_44_P321009	0.0093	-9.75	Cyp11a1	NM_012540
		A_44_P365286	0.0013	-8.54	Aldh1a1	NM_022407
		A_44_P396546	7.0E-4	-7.79	Hspa8	NM_024351
		A_43_P15662	4.0E-4	-5.85	Tfrc	NM_022712
A_44_P294706		0.0127	-5.1	Tlr9	NM_198131	
A_43_P11800		0.018	-5.02	Bax	NM_017059	

[0141] 2.5.3 变化 5 倍以上基因聚类分析

[0142] 如图 7 所示,3 列 control_1、control_2、control_3 为对照组,3 列 stress_1、stress_2、stress_3 为应激组,最右边为基因名缩写。红色表示基因表达上调,黑色表示基因表达没变化,绿色表示基因表达下调。7a 为 cell death 相关基因聚类分析;7b 为氧化还原相关基因聚类分析;7c 为应激应答相关基因聚类分析。

[0143] 2.5.4 部分变化基因 PCR 验证

[0144] 如图 8 所示,挑选部分基因进行 RT-PCR 对基因芯片进行验证,其与基因芯片中数据变化趋势一致。

[0145] 2.6 差异基因 GO (Gene Ontology) 分析

[0146] 表 7 中所列数据表明显著变化基因的功能分类,即这些基因的变化影响了机体哪一方面功能反应。如显著变化的基因中有 21 个与机体的外源性刺激应答有关,这 21 个基因占了该功能相关基因总数 867 中的 2.42%, $p < 0.01$ (GO:0009605)。

[0147] 表 7 变化 5 倍以上差异基因 GO 分析

[0148]

GOId	名称	Hits	总数	百分比	p值
GO:0009605	response to external stimulus (外源性刺激应答)	21	867	2.42%	0.0474
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis (参与形态发生的解剖结构的形成)	14	344	4.07%	0.0019
GO:0009719	response to endogenous stimulus (内源性刺激应答)	20	575	3.48%	0.0015
GO:0045768	positive regulation of anti-apoptosis(抗凋亡的正调节)	4	28	14.29%	0.0016
GO:0019987	negative regulation of anti-apoptosis (抗凋亡的负调节)	1	4	25.0%	0.0774
GO:0045767	regulation of anti-apoptosis (抗凋亡的调节)	5	37	13.51%	5.0E-4
GO:0000267	cell fraction (细胞碎片)	27	957	2.82%	0.0044
GO:0010926	anatomical structure formation (解剖结构形成)	29	1049	2.76%	0.0042
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis(解剖结构形态)	32	1225	2.61%	0.0060
GO:0019207	kinase regulator activity (酶转录活性)	5	77	6.49%	0.0101
GO:0032993	protein-DNA complex (DNA 复合蛋白)	5	80	6.25%	0.0117
GO:0016265	Death (死亡)	25	937	2.67%	0.0116
GO:0008219	cell death (细胞死亡)	25	932	2.68%	0.0109
GO:0048523	negative regulation of cellular process(细胞进程的负调控)	35	1407	2.49%	0.0085
GO:0008283	cell proliferation (细胞增殖)	23	846	2.72%	0.0124
GO:0051179	Localization (识别)	62	2929	2.12%	0.0161
GO:0003712	transcription cofactor activity (转录辅因子的活性)	7	162	4.32%	0.019
GO:0009566	Fertilization (受精)	4	61	6.56%	0.0202
GO:0007565	female pregnancy (妊娠)	5	96	5.21%	0.023
GO:0048519	negative regulation of biological process (生物进程负调控)	36	1557	2.31%	0.0213
GO:0009986	cell surface (细胞表面)	11	337	3.26%	0.0246
GO:0006810	Transport (转运)	51	2386	2.14%	0.0249
GO:0051234	establishment of localization (识别)	51	2403	2.12%	0.0279

	GO:0051094	positive regulation of developmental process (发育过程的正调控)	17	628	2.71%	0.0304
	GO:0005215	transporter activity (转运蛋白的活性)	25	1042	2.4%	0.0355
	GO:0016564	transcription repressor activity (转录抑制物的活性)	8	227	3.52%	0.0355
	GO:0048522	positive regulation of cellular process (细胞进程正调控)	36	1625	2.22%	0.0367
	GO:0048871	multicellular organismal homeostasis (多细胞生物内环境稳态)	4	73	5.48%	0.0348
	GO:0051707	response to other organism (异常组织应答)	9	270	3.33%	0.0358
[0149]	GO:0048522	positive regulation of cellular process (细胞进程正调控)	36	1625	2.22%	0.0367
	GO:0016563	transcription activator activity (转录激活子活性)	9	281	3.2%	0.0439
	GO:0005577	fibrinogen complex(纤维蛋白原复合物)	1	2	50.0%	0.0472
	GO:0002339	B cell selection (B细胞选择)	1	2	50.0%	0.0472
	GO:0016043	cellular component organization (组织细胞成分)	44	2091	2.1%	0.0453
	GO:0051093	negative regulation of developmental process (发育进程负调控)	15	570	2.63%	0.0493
	GO:0009607	response to biotic stimulus (生物刺激应答)	10	334	2.99%	0.0503

[0150] 2.7 差异基因 Pathway 分析

[0151] 表 8 所列数据展示了基因芯片检测到的显著变化基因参与机体活动所涉及的信号通路,如检测到 8 个显著变化基因是与凋亡通路相关,其占凋亡通路总基因(99)数的 8.08%, $p < 0.01$ 。

[0152] 表 8 变化 5 倍以上差异基因 Pathway 分析

	PathwayDB	名称	Hits	总数	百分比	p值
	Kegg	Apoptosis (凋亡通路)	8	99	8.08%	0.0
[0153]	Kegg	MAPK signaling pathway (MAPK 应激信号通路)	9	275	3.27%	3.0E-4
	Kegg	Oxidative phosphorylation (氧化磷酸化)	5	174	2.87%	0.0116
	Kegg	Natural killer cell mediated cytotoxicity	5	149	3.36%	0.0063

[0154]

	(自然杀伤细胞介导的细胞毒作用)				
Kegg	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (肌萎缩侧索硬化)	4	71	5.63%	0.0025
Kegg	Antigen processing and presentation (抗原加工与递呈)	5	107	4.67%	0.0016
Kegg	Adherens junction (黏附连接)	4	74	5.41%	0.0029
Kegg	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) (致心律失常性右心室心肌病)	3	76	3.95%	0.0218
Kegg	Autoimmune thyroid disease (自身免疫性甲状腺病)	4	73	5.48%	0.0027
Kegg	Biosynthesis of unsaturated fatty acids (不饱和脂肪酸的生物合成)	2	28	7.14%	0.0213
Kegg	Cardiac muscle contraction (心肌收缩)	4	92	4.35%	0.0060
Kegg	Cell adhesion molecules (CAMs) (细胞黏附分子)	8	158	5.06%	0.0
Kegg	Chronic myeloid leukemia (慢性髓细胞样白血病)	3	82	3.66%	0.0263
Kegg	Colorectal cancer (结肠直肠癌)	4	73	5.48%	0.0027
Kegg	Dilated cardiomyopathy (扩张性心肌病)	5	91	5.49%	8.0E-4
Kegg	Drug metabolism - cytochrome P450 (药物代谢作用-细胞色素P450)	4	83	4.82%	0.0042
Kegg	Drug metabolism - other enzymes - (药物代谢作用-其他酶类)	3	54	5.56%	0.0091
Kegg	Endocytosis (内吞作用)	13	240	5.42%	0.0
Kegg	Fc gamma R-mediated phagocytosis (Fc γ 介导的吞噬作用)	4	98	4.08%	0.0074
Kegg	Gap junction (间隙连接)	3	87	3.45%	0.0305
Kegg	Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate (糖胺聚糖生物合成-硫酸角质素)	2	16	12.5%	0.0079
Kegg	Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series (糖胺聚糖生物合成-乳糖和新乳糖系列)	3	25	12.0%	0.0012
Kegg	Graft-versus-host disease (移植物抗宿)	4	60	6.67%	0.0014

[0155]

	主病)				
Kegg	Hedgehog signaling pathway (刺猬信号通路)	3	52	5.77%	0.0082
Kegg	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) (肥厚性心肌病)	3	89	3.37%	0.0322
Kegg	Insulin signaling pathway (胰岛素信号通路)	5	140	3.57%	0.0049
Kegg	Jak-STAT signaling pathway (JAK-STAT信号通路)	4	149	2.68%	0.0286
Kegg	Long-term potentiation (长时程增强效应)	3	72	4.17%	0.019
Kegg	Allograft rejection (同种异体移植排斥)	4	62	6.45%	0.0016
Kegg	Melanogenesis (黑素生成)	4	97	4.12%	0.0072
Kegg	Metabolic pathways (代谢途径)	17	1206	1.41%	0.0115
Kegg	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (外源性化学物质代谢-细胞色素P450介导)	4	71	5.63%	0.0025
Kegg	NOD-like receptor signaling pathway (NOD样受体信号通路)	4	65	6.15%	0.0018
Kegg	p53 signaling pathway (P53信号通路)	3	76	3.95%	0.0218
Kegg	Pancreatic cancer (胰腺癌)	3	72	4.17%	0.019
Kegg	Parkinson's disease (帕金森氏病)	5	191	2.62%	0.0165
Kegg	Pathways in cancer (肿瘤通路)	9	334	2.69%	0.0012
Kegg	Pentose and glucuronate interconversions (戊糖与葡萄糖醛酸转化)	3	23	13.04%	0.0010
Kegg	PPAR signaling pathway (过氧化物酶体信号通路)	3	75	4.0%	0.0211
Kegg	Prion diseases (朊病毒病)	3	37	8.11%	0.0034
Kegg	Retinol metabolism (视黄醇代谢)	5	69	7.25%	2.0E-4
Kegg	Small cell lung cancer (小细胞肺癌)	4	95	4.21%	0.0067
Kegg	Starch and sucrose metabolism (淀粉及蔗糖代谢)	3	46	6.52%	0.0060
Kegg	Steroid hormone biosynthesis(类固醇激素的生物合成)	4	52	7.69%	8.0E-4

[0156]	Kegg	Type I diabetes mellitus (I型糖尿病)	4	69	5.8%	0.0023
	Kegg	Ubiquitin mediated proteolysis (泛素介导的蛋白水解作用)	4	132	3.03%	0.0196
	Kegg	Vasopressin-regulated water reabsorption (加压素调节水重吸收作用)	5	43	11.63%	0.0
	Kegg	Viral myocarditis (病毒性心肌炎)	6	104	5.77%	2.0E-4
	Kegg	Wnt signaling pathway (Wnt信号通路)	7	147	4.76%	2.0E-4

[0157] 结论:通过对大鼠临床表现、血清生化指标、组织形态学检测、凋亡检测以及部分基因的 RT-PCR 验证试验,结果表明本基因芯片评价体系的准确率可达 80% 以上。

[0158] 运输应激对于动物而言是一种强烈应激,是造成动物应激反应的重要原因之一。动物运输过程中的驱赶、装卸、震动、摩擦、碰撞、高温、饥渴等因素将会引起应激综合征,导致动物发生行为、生理变化并最终导致组织损伤。随着大鼠、小鼠、兔、狗、猪等动物基因组测序的完成,研制实用的基因组芯片,利用基因芯片技术从整体、器官、细胞等水平筛选有关基因的差异表达,获取并归纳与应激综合症相关的关键特征信息,以确定运输应激综合症的基因表达谱情况,进而利于选择功效相关稳定的中药方剂,从而建立相应的运输应激模型评价体系,其对中兽药的新药研发具有重要意义为后续研究某个具体基因的功能指明方向,提高研究的目的性和有效性;同时可以在充分分析基因芯片数据的生物学意义的基础上,利用基因敲除和基因高表达等分子生物学实验手段,对某些重要功能基因在细胞活动中的生物学功能改变提供了基础。

[0159] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

	<110> 中国农业大学	
	<120> 一种用于评价运输应激模型的基因芯片及其应用	
	<130> KHP12116369.9	
	<160> 14	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 1	
	ttgtccctgt atgcctctgg	20
	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 2	
	atgtcaegca cgatttccc	19
[0001]	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 3	
	caggacgcat ccaccaagaa	20
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 4	
	gggtcccgaa gtaggaaagg	20
	<210> 5	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 5	
	ctgggaggag aagatgc	17
	<210> 6	
	<211> 22	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
acctttgttc cacgacccat ag	22
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
accagttcgg acatcaggag	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
gggtcgtcat aagggtaggg	20
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
atccctttac tetgacctet gc	22
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
gtttgcctaa ttctccate t	21
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
ctacatoggc ttctggget a	21
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<400> 12	
cataagtttt cttctctttc tc	22
<210> 13	
<211> 2F	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
gttgaggttc gctttccgta t	21
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
actgegtate tttcaggttg tt	22

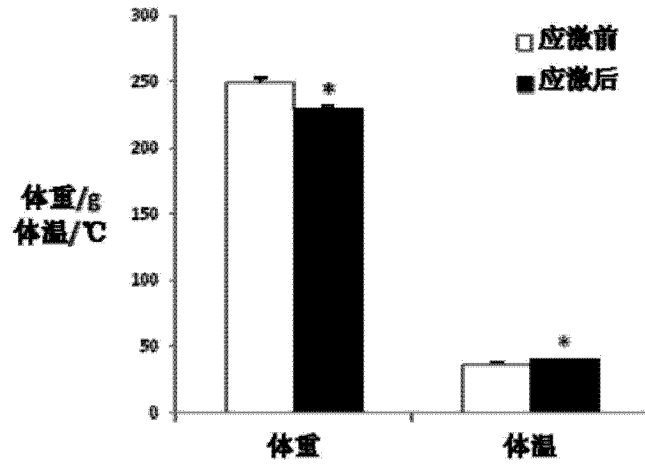


图 1

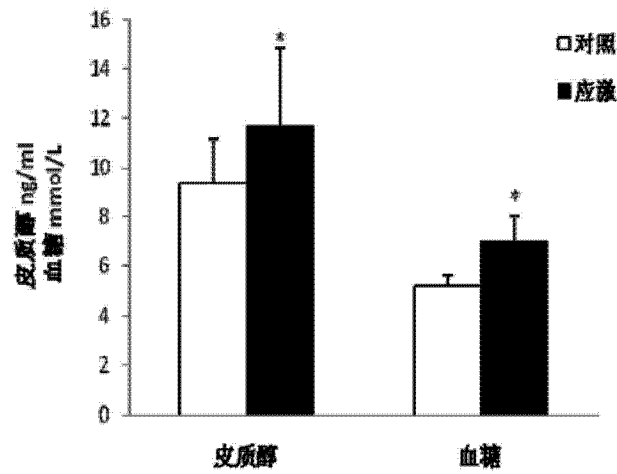
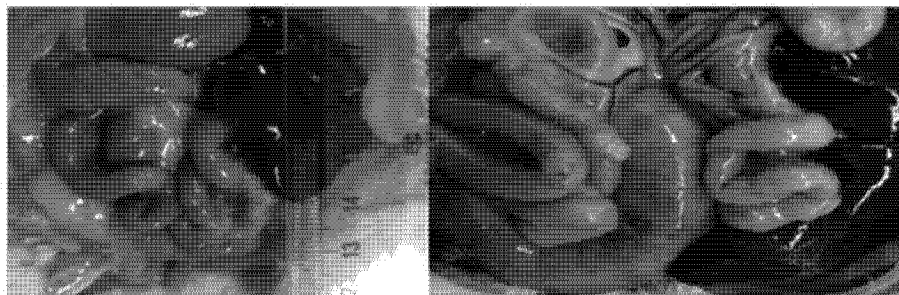


图 2



对照组

应激组

图 3

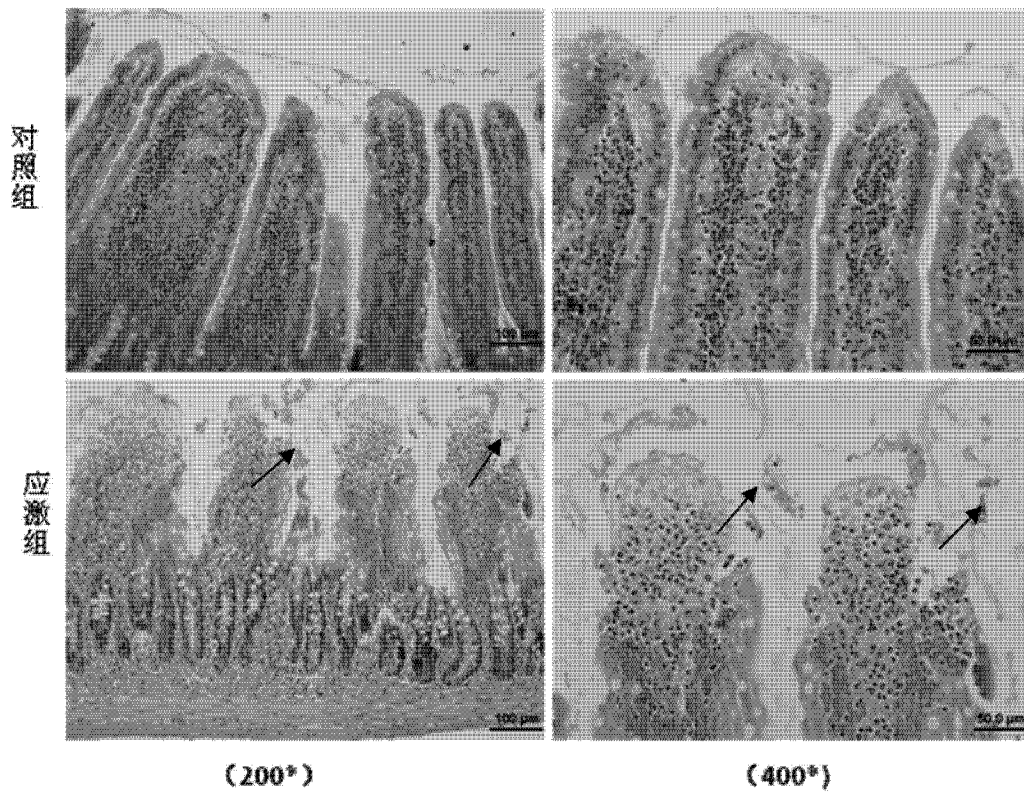


图 4

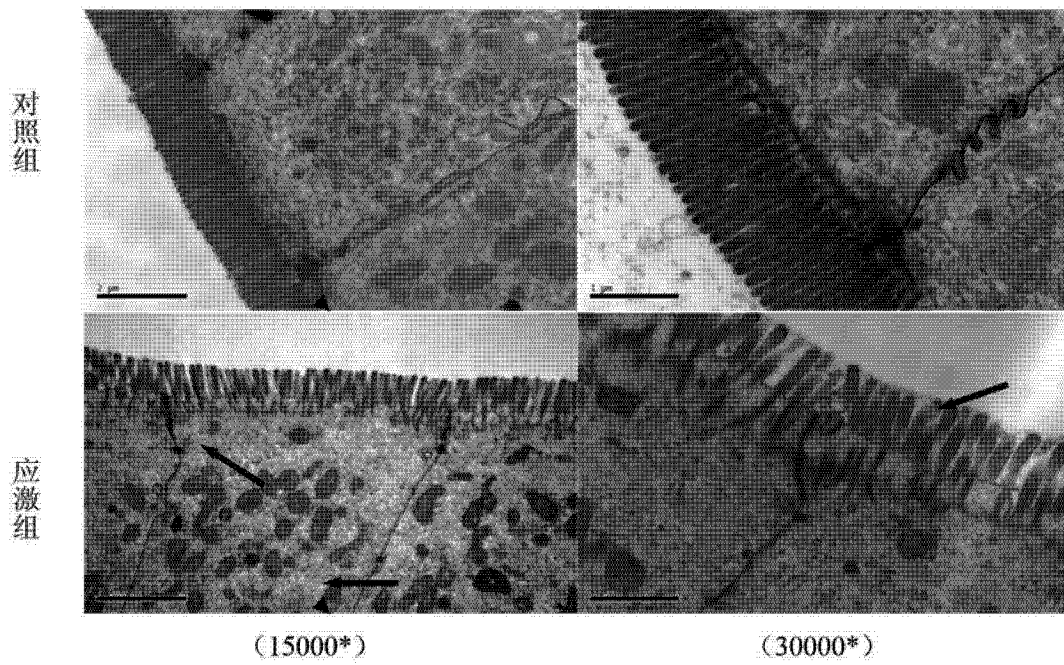


图 5

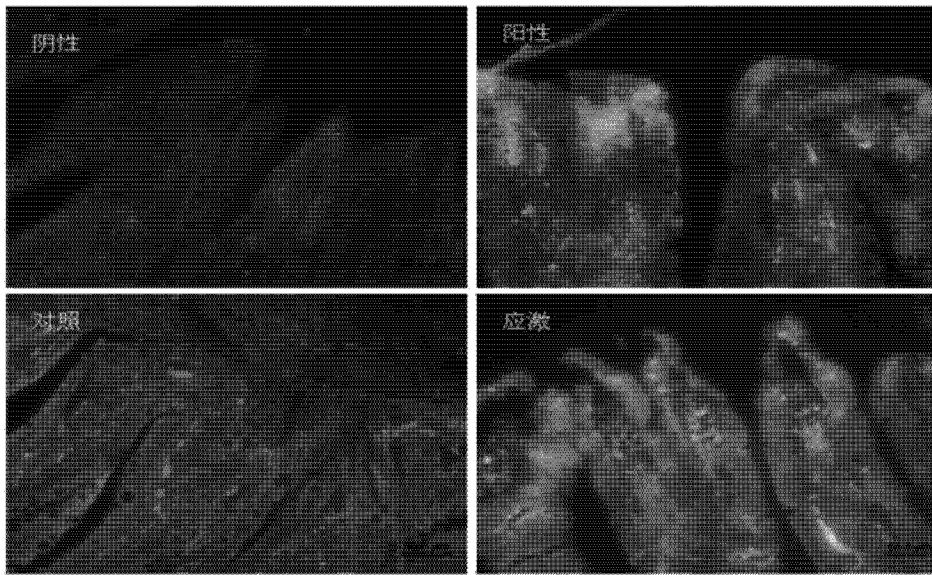
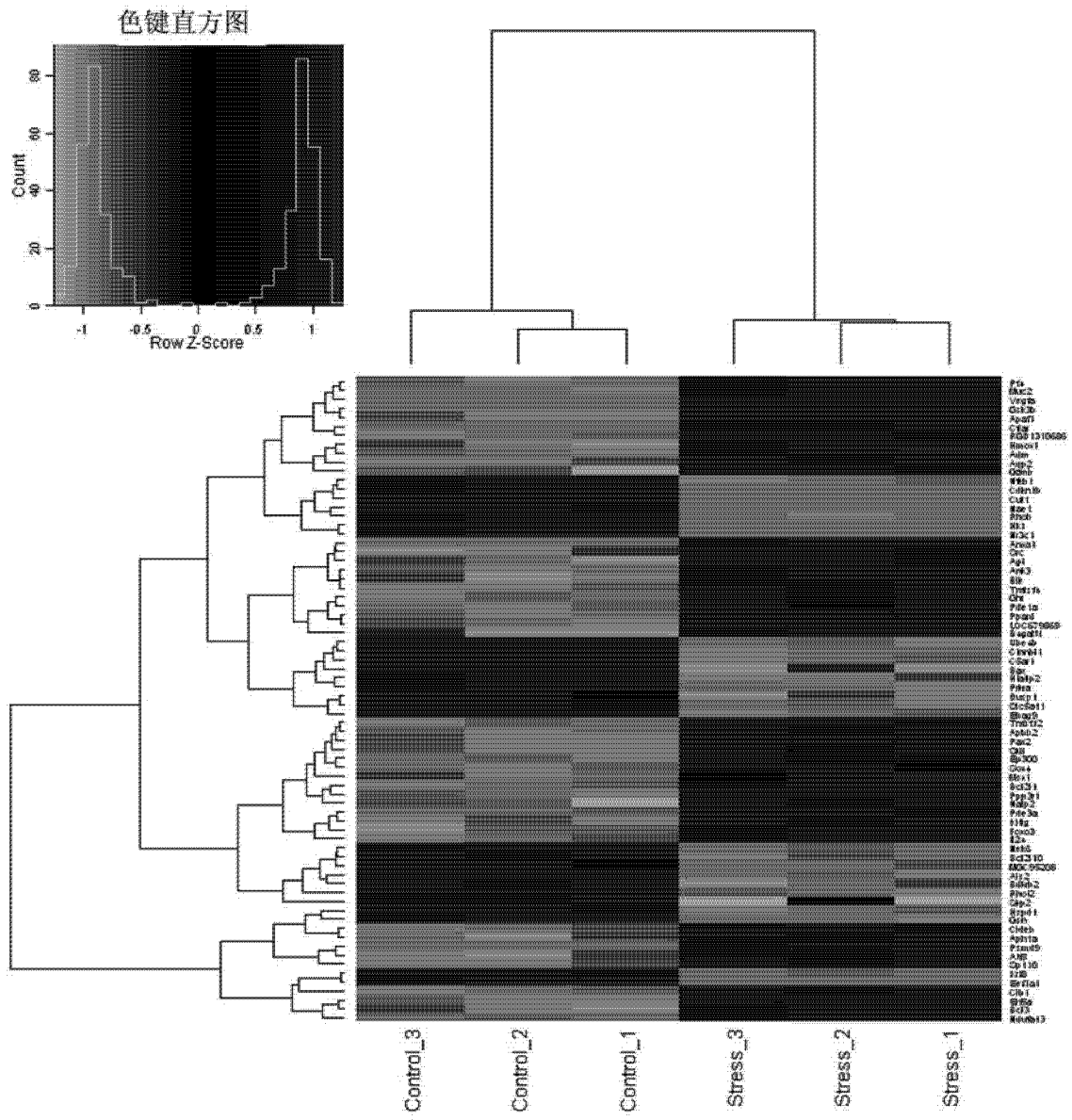
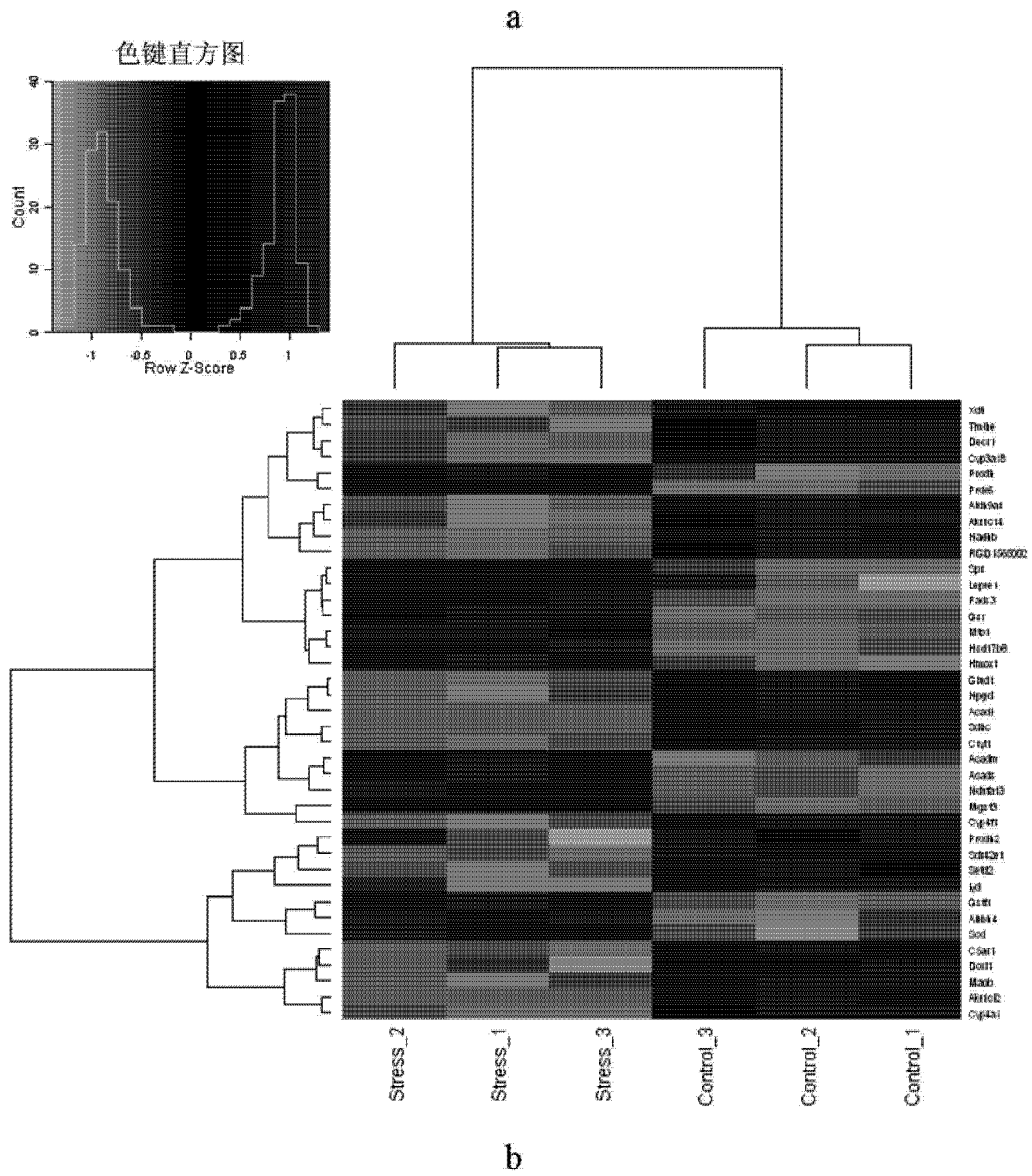
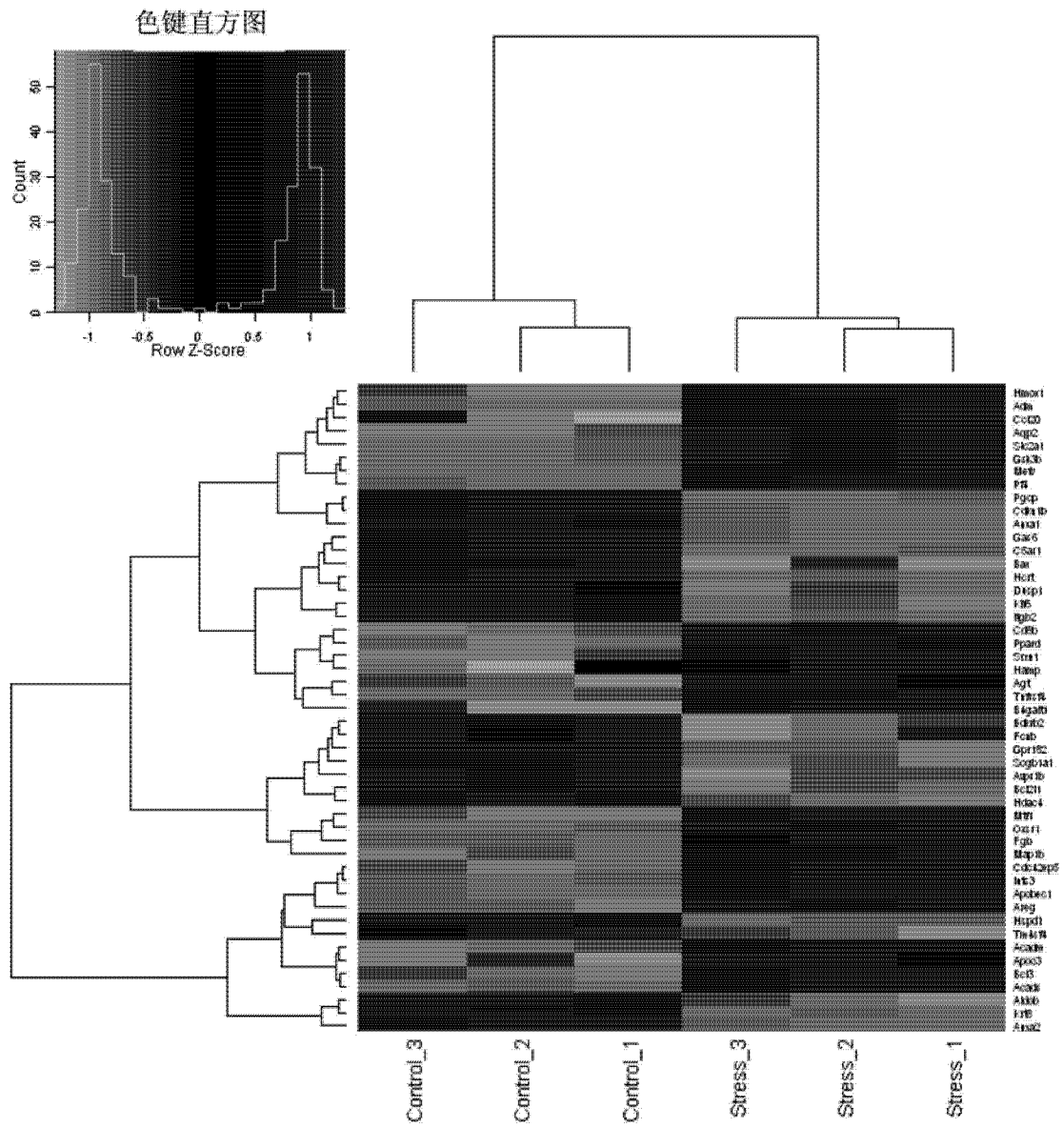


图 6







c

图 7

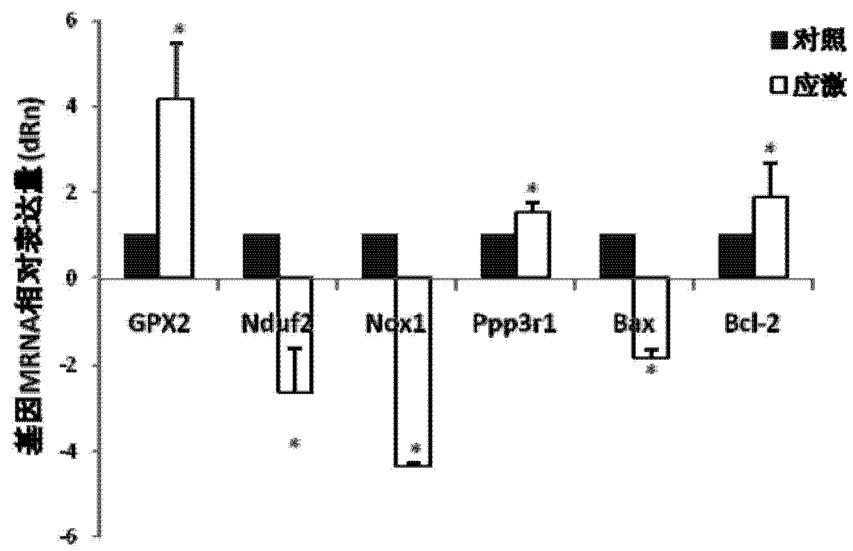


图 8