

蒙古绵羊 ghrelin cDNA 的克隆及序列分析

吕东媛¹, 曹贵方^{1,2*}, 白春玲², 旭日干²

(1. 内蒙古农业大学动物胚胎与发育生物学研究室, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古大学实验动物中心, 呼和浩特 010021)

摘要: 根据 GenBank 中报道的绵羊 ghrelin 序列设计一对特异性引物, 以蒙古绵羊真胃组织中提取的总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 技术扩增出蒙古绵羊 ghrelin 的 cDNA, 并克隆到 pTZ19 载体中, 经限制性内切酶谱和 DNA 序列测定, 证实所克隆的蒙古绵羊 ghrelin 的 cDNA 为 ghrelin 的部分序列, 因为用 NCBI 网站上的 BLAST 功能将测序结果同已发表绵羊 ghrelin 序列进行对比, 205 个碱基中仅有 1 个碱基的差异, 该差异不影响翻译后多肽的序列。该段 cDNA 包含由 168 个碱基组成的开放读码框(ORF), 该 ORF 编码 56 个氨基酸残基的前原蒙古绵羊 ghrelin。对蒙古绵羊 ghrelin 的研究将有助于进一步揭示其生理和病理功能, 对反刍动物多种疾病过程的认识及防治策略具有深远意义。

关键词: 蒙古绵羊; ghrelin; cDNA; 克隆; 序列分析

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)08-0735-05

The cDNA Cloning and Sequencing Analysis of Mongolia Sheep Ghrelin

LÜ Dong-yuan¹, CAO Gui-fang^{1,2*}, BAI Chun-ling², XU Ri-gan²

(1. *Laboratory of Animal Embryo and Developmental Biology, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China*; 2. *Experimental Animal Center, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China*)

Abstract: In order to amplify cDNA of Mongolia sheep ghrelin, the differential primers were designed according to the GenBank sequence. Total RNA was extracted from the abomasums of Mongolia sheep and the cDNA encoding Mongolia sheep ghrelin was obtained by the reverse transcription PCR(RT-PCR). The purified RT-PCR product was cloned into pTZ19 vector. The results of restriction endonuclease pattern analysis of recombinant plasmid and DNA sequencing demonstrated that the Mongolia sheep ghrelin cDNA was part of ghrelin, because blasted sequencing result with published sheep ghrelin in NCBI web, only one base was different in 205 bases. The difference didn't influence polypeptide sequence after translation. The cDNA contained a ORF of 168 bases which encoded a 56 amino acid prepropeptide. The research to Mongolia sheep ghrelin will help us to open out its physiological and pathological function, and it will make far-reaching sense in preventing and curing some ruminant diseases.

Key words: Mongolia sheep; ghrelin; cDNA; clone; sequencing analysis

Ghrelin 是一种来自胃的辛酰基化的生长激素释放肽(GH-releasing peptide), 是日本科学家在 1999 年发现的由 28 个氨基酸构成的脑肠肽。最早从鼠胃及人胃的内分泌细胞中提取并分化出来。后

来在人、鼠的下丘脑弓状核中也被发现, 并被认为是生长激素释放激素受体(GHS-R)的内源性配体^[1]。在人鼠, ghrelin 的表达以胃组织中为最多, 另在下丘脑、小肠、大肠、胰腺和胎盘等也有表达^[2]。

收稿日期: 2005-07-27

作者简介: 吕东媛(1981-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 博士生, 主要从事分子生物学、发育生物学的研究工作; E-mail: lvdongy@sohu.com

* 通讯作者: 曹贵方, 教授、博士后, Tel: 0471-5833200。合作导师为旭日干院士

Ghrelin 主要是促进生长激素(GH)的分泌。在体外培养条件下,人和鼠 ghrelin 均可直接刺激 GH 在猪垂体前叶细胞的释放,在很多物种体内可引起垂体 GH 分泌^[1,3,4]。当 ghrelin 与其位于下丘脑的受体结合后,会产生一系列生物学效应,除了具有调节机体生长发育、调节能量平衡、促进胃酸分泌、提高食欲、增加脂肪积聚升高体重等功能外^[1,5],还可促进催乳素(PRL)和促肾上腺皮质激素(ACTH)的释放^[6],并具有抗肿瘤细胞增殖的作用^[5,7]。因此 ghrelin 的生理和病理生理意义是目前研究热点问题之一。各国学者对 ghrelin 的功能、意义开展了广泛的研究。国际上仅有少数科学家对牛、山羊等家畜的 ghrelin 在真胃上的分布及可能作用进行了初步分析研究,国内对 ghrelin 的试验性研究非常有限。本试验以内蒙古特有的蒙古绵羊为研究对象获得 ghrelin 基因片段以填充国内外反刍动物在该基因研究方面的资料。

1 材料与与方法

1.1 试验动物及其组织

3~4 岁成年蒙古绵羊 3 只(2♀1♂),由内蒙古农业大学提供。蒙古绵羊屠宰后立刻采取真胃组织,马上冻入液氮中,-70℃冻存备用。

1.2 质粒、感受态细胞

克隆载体为 pTZ19 Vector,上海生工馈赠;菌株为大肠杆菌 JM109,内蒙古农业大学动物科学与医学学院保存。

1.3 主要试剂

质粒提取试剂盒购自北京天为时代科技有限公司;DNA Marker 为 DL15 000、DL2 000,AMV 反转录酶,DNA 凝胶回收试剂盒,限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 均购自大连 Takara 公司;*Taq* DNA 聚合酶购自华美公司;总 RNA 提取试剂 Trizol 使用的是美国 Invitrogen 公司产品;琼脂糖为 Promega 公司产品。

1.4 PCR 引物设计与合成

根据 GenBank 中报道的绵羊 ghrelin 序列利用 DNASTar 软件设计一对特异性引物,其序列如下:上游引物(Primer1):5'-GAATTCGGAAGT-CAGGAGGAAGGTG-3'(含 *EcoR* I 酶切位点);下游引物(Primer2):5'-AAGCTTGGGAGAA-CAGACAGGTGGT-3'(含 *Hind* III 酶切位点)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.5 蒙古绵羊真胃组织总 RNA 的提取

将蒙古绵羊真胃组织按 100mg/mL Trizol 量加入 Trizol 匀浆,采用 Trizol 一步法提取(按试剂盒说明进行)。

1.6 RT-PCR

RT 反应体系为 25 μ L:总 RNA 5 μ L,5 \times RT 缓冲液 5 μ L,dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μ L,下游引物 2 μ L(10 μ mol/L),RNase 抑制剂 1 μ L,AMV 1 μ L,无 RNase 去离子水 6 μ L;反应条件为 42 $^{\circ}$ C,60 min。

PCR 反应体系为 50 μ L:Mg²⁺ 4 μ L,10 \times Buffer 5 μ L, dNTPs 8 μ L,模板 2 μ L,上下游引物各 2 μ L,*Taq* 酶 3 μ L,无菌水 24 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。进行 PCR 扩增时,同时以不加模板的体系和 RNA 为模板的体系作对照,以排除试剂污染和基因组 DNA 污染引起假阳性的可能。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.7 PCR 产物的克隆及重组质粒的筛选和鉴定

按 PCR 产物纯化试剂盒说明将 RT-PCR 扩增产物纯化。将 pTZ19 Vector 和纯化后的 PCR 扩增产物分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后,二者进行连接反应。连接反应产物转化宿主菌 JM109 感受态细胞,涂布含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的选择平板培养 12~16 h,挑取白色菌落于装有 4 mL LB 培养基的试管中培养 16 h 后分离菌体,用质粒提取试剂盒提取质粒。将提取的质粒用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。将少量提取的质粒取 2 μ L 作为模板进行 PCR 扩增。扩增条件和反应参数基本同胃组织 cDNA 的 PCR 一致。

1.8 测序

对经过酶切及 PCR 鉴定的阳性质粒寄上海生工进行序列测定。

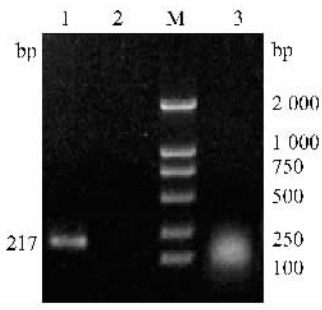
2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

以蒙古绵羊真胃组织中提取的总 RNA 为模板,根据 GenBank 中报道的 ghrelin 序列设计引物,进行 RT-PCR 扩增。将扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测为 217 bp 的条带(含 *EcoR* I 和 *Hind* III 序列),与预期的结果相符(见图 1)。

2.2 重组质粒的鉴定

经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切得到约 2.8 kb 和 217 bp 的两条带,再经 PCR 鉴定,进一步证实了阳

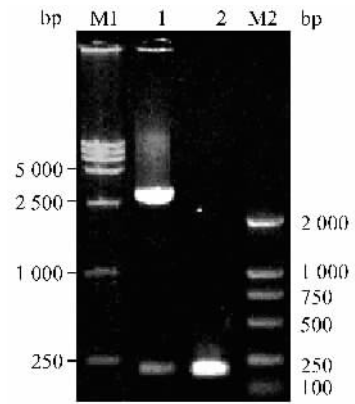


M. DL2 000 DNA marker; 1. RT-PCR 产物; 2. 不含模板的阴性对照; 3. 以 RNA 为模板的阴性对照

M. DL2 000 DNA marker; 1. Product of RT-PCR; 2. Negative control without template; 3. Negative control with RNA as template

图 1 蒙古绵羊 ghrelin cDNA RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis analysis of Mongolia Sheep ghrelin cDNA RT-PCR product



M1. DL15 000 DNA marker; 1. *EcoRI* 和 *Hind* III 双酶切结果; 2. PCR 鉴定结果; M2. DL2 000 DNA marker

M1. DL15 000 DNA marker; 1. pTZ19 digested with *EcoRI* and *Hind* III; 2. Product of PCR; M2. DL2 000 DNA marker

图 2 重组质粒 pTZ19 限制性酶切分析
Fig. 2 Restriction endonuclease pattern analysis of the recombinant plasmid pTZ19

性重组质粒(见图 2)。

2.3 测序结果及分析

RT-PCR 产物由上海生工生物工程公司进行 DNA 测序测出 217 个核苷酸(含 *EcoR* I 和 *Hind* III 序列),其测序结果通过 DNASTar(Lasergene 5.01)进行蛋白质氨基酸序列预测(见图 3)。其中 205 个碱基的蒙古绵羊 ghrelin cDNA 中包含由 168 个碱基组成的开放读码框(Open Reading Frame, ORF),该 cDNA ORF 编码 56 个氨基酸残基的前原蒙古绵羊 ghrelin(prepro-ghrelin)。用 NCBI 网站上的 BLAST 功能将测序结果同已发表绵羊 ghrelin 序列进行对比,205 个碱基中有 1 个碱基的差异,同源性达 99%,该差异不影响翻译后多肽的序列。

2.4 蒙古绵羊 ghrelin cDNA 与其它哺乳动物的 ghrelin cDNA 的同源性比较

通过 DNASTar 软件比较得出本试验克隆的蒙古绵羊 ghrelin 的 cDNA 与山羊、牛 ghrelin 的 cDNA 亲缘关系最近,分别为 97.1%和 92.2%;其次与人、恒河猴、猪、猫和狗 ghrelin 的 cDNA 亲缘关系较近,分别有 74.4%、78.5%、76.2%、75.6%和 75.4%的同源性;与小鼠、大鼠和沙鼠 ghrelin 的 cDNA 同源性较远,分别为 62.1%、64.3%和 60.4%。该段蒙古绵羊 ghrelin cDNA 与其它哺乳

| | | |
|--|--|-----|
| <u>GGA TTC GGA AGT CAG GAG GAA GGT</u> | <u>GCA GAG GAC GAG CTG GAA ATC CGG TTC</u> | 51 |
| G S Q E E G A E D E L E I R F | | 15 |
| AAT GCC CCC TTT AAC ATT GGG ATC AAG CTG TCA GGG GCT CAG TCC CTC CAG | | 102 |
| N A P F N I G I K L S G A Q S L Q | | 32 |
| CAC GGC CAG ACT CTG GGG AAG TTT CTT CAG GAC ATT CTT TGG GAA GAA | | 150 |
| H G Q T L G K F L Q D I L W E E | | 48 |
| GCC GAA GAA ACC CTG GCT GAC GAG TGA CCA GCC CTC GGA CCA <u>ACC ACC</u> | | 198 |
| A E E T L A D E * | | 56 |
| <u>TGT CTG TTC TCC CAA GCT T</u> | | 217 |

图 3 蒙古绵羊 ghrelin cDNA 的部分核苷酸序列及其对应的 56 个氨基酸组成的部分前原 ghrelin 下划线部分代表上游引物和下游引物互补序列; 双下划线部分代表酶切位点; 星号(*)代表终止密码子

Fig. 3 Nucleotide and predicted 56 amino acid sequences of Mongolia sheep ghrelin
Solid underline respectively indicate the sequence of primer 1 and the opposite sequence of primer 2; Double solid underline indicates *EcoR* I and *Hind* III; The asterisk(*) indicates stop codon

动物(如山羊、牛)的 ghrelin cDNA 一样含有由 168 个碱基组成的开放读码框(ORF),该 ORF 编码 56 个氨基酸的前原 ghrelin(preproghrelin)(见图 3)。

2.5 蒙古绵羊 ghrelin 与其它哺乳动物 ghrelin 氨基酸序列的同源性比较

根据蒙古绵羊 ghrelin 的 cDNA 序列推导其编

码的氨基酸序列并与其它哺乳动物 ghrelin 的氨基酸序列比较,可知哺乳动物 ghrelin 的氨基酸序列在特定区段具有严格地保守性(见图 4)。从遗传进化树上分析可见,蒙古绵羊 ghrelin 编码的氨基酸序列与山羊、牛的亲缘关系最近,其次为人、恒河猴、猪、猫、狗,与大鼠、小鼠和沙鼠的亲缘关系最远(见图 5)。

| | |
|---------------|---|
| | * * ** ***** **** * * ** ***** ** * * |
| Sheep | GSQEEGAEDELEIRFNAPFNIGIKLSGAQSLQHGGTGLGKFLQDILWEEAEETLADE |
| Goat | GSQEEGAEDELEIRFNAPFNIGIKLSGAQSLQHGGTGLGKFLQDILWEEAEETLADE |
| Bovine | GSQAEGAEDELEIRFNAPFNIGIKLAGAQSLQHGGTGLGKFLQDILWEEAEETLANE |
| Mouse | RGQAEEETEELEIRFNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRALGKFLQDILWEEVKEAPADK |
| Rat | RGQAEEAEELEIRFNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRALGKFLQDILWEEVKEAPANK |
| Gerbil | RGQAEGAEDELEIRFNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRALGKFLQDILWEEVKEEATDK |
| Homo sapiens | GGQAEGAEDELEVRFNAPFDVGIKLSGVQYQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK |
| Rhesus monkey | GDQAEGAEDELEIQFNAPFDVGIKLSGVQYQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK |
| Porcine | SGEVEGTEDKLEIRFNAPCDVGIKLSGAQSDQHGGPLGKFLQDILWEEVTEAPADK |
| Cat | TSQVEGAEDELEIRFNAPFDVGIKLSGAQYHQHGQALGKFLQDVLWEEAEVLADE |
| Dog | TSQVEEAEDELEIRFNAPFDVGIKLSGPQYHQHGQALGKFLQEVWEDTNEALADE |

“*”代表氨基酸高度保守的位置

“*”indicate highly conserved residues of these ferritins

图 4 蒙古绵羊 ghrelin 与其它哺乳动物 ghrelin 的氨基酸序列比较

Fig. 4 Alignment of Mongolia sheep and other mammalian ghrel in amino acid sequences

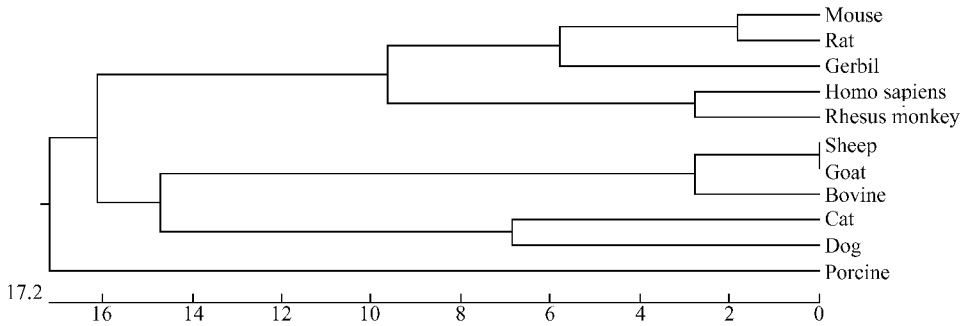


图 5 哺乳动物 ghrelin 氨基酸序列遗传进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of mammalian ghrelin amino acid sequences

3 讨论

本研究成功的通过 RT-PCR 技术,从蒙古绵羊真胃组织中获得了长 205 个碱基的 ghrelin 基因的 cDNA 克隆,通过 PCR 鉴定和基因序列分析确认 PCR 产物为预期的 cDNA。该 205 个碱基的蒙古绵羊 ghrelin cDNA 中包含由 168 个碱基组成的开放读码框(ORF),该 cDNA ORF 编码 56 个氨基酸残基的前原蒙古绵羊 ghrelin。与其它哺乳动物的

ghrelin 比较,PCR 扩增得到的 cDNA 具有 ghrelin 保守序列,因此我们认为该 cDNA 为 ghrelin 前原肽的部分序列。用 NCBI 网站上的 BLAST 功能将测序结果同已发表绵羊 ghrelin 序列进行对比,205 个碱基中有一个碱基的差异。该差异不影响翻译后多肽的序列。与 GenBank 中已发表的哺乳动物 ghrelin 的 cDNA 及其编码的氨基酸序列进行同源性分析,结果表明蒙古绵羊 ghrelin 与已报道的其它哺乳动物 ghrelin 无论 cDNA 序列还是其编码的氨基

酸序列都具有较高的同源性,特别是与山羊和牛的同源性均在 90% 以上,说明哺乳动物在 ghrelin 的表达中不具有种属特异性。从遗传进化树可见蒙古绵羊 ghrelin 与人、恒河猴、猪、猫、狗 ghrelin 的亲缘关系较远,与大鼠、小鼠和沙鼠 ghrelin 的亲缘关系最远。

Ghrelin 是一种主要在胃部产生的胃肠胰腺激素,在能量代谢的整合中对胰岛素分泌和糖代谢的微调起重要作用^[8~10],是迄今发现的唯一生长激素释放激素受体(GHS-R)的天然配体^[7]。Ghrelin 一经发现立即引起人们极大的兴趣和关注。因此,目前在医学领域对于 ghrelin 的研究成为热点。开展对蒙古绵羊 ghrelin 的研究,为进一步研究家畜体内 ghrelin 的功能、作用奠定基础,控制反刍动物营养,填充反刍动物相关资料具有重要意义。

参考文献:

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. *Nature*, 1999,402(6 762):656~660.
- [2] Gualillo O, Caminos J E, Blanco M, *et al.* Ghrelin, a novel placental-derived hormone[J]. *Endocrinology*, 2001,142:788~794.
- [3] Wren A M, Small C J, Ward H L, *et al.* The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion [J]. *Endocrinology*, 2000,141:4 325~4 328.
- [4] Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, *et al.* Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85: 4 908 ~ 4 911.
- [5] Broglio F, Koetsveld P, Benso A, *et al.* Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(10):4 829~4 832.
- [6] Ghigo E, Arvat E, Giordano R, *et al.* Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans[J]. *Endocrine*, 2001, 14(1):87~93.
- [7] Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and function[J]. *Physiological Reviews*, 2005,85:495~522.
- [8] Broglio F, Arvat E, Benso A, *et al.* Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86:5 083 ~5 086.
- [9] Reimer M K, Pacini G, Ahren B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse [J]. *Endocrinology*, 2003, 144:916~921.
- [10] Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, *et al.* Ghrelin is present in pancreatic α cells of humans and rats and stimulates insulin secretion[J]. *Diabetes*, 2002, 51: 124~129.

动物疫情速递

泰国发生高致病性禽流感

2006 年 7 月 24 日泰国向 OIE 报告了禽流感疫情,Pichitr 省 BangMulnarg 地区暴发一起高致病性禽流感,病原是 H5 亚型高致病性禽流感病毒。此次疫情始于 2006 年 7 月 16 日,于 7 月 24 日首次确认。疫情涉及 31 只死亡鸡和 295 只易感动物。诊断由北部地区兽医研究所和发展中心(Pitsanuloke 省畜产发展厅)负责,所用方法为 RT-PCR。泰国采取的控制措施有扑杀、检疫、国内限制移动、区域化和疫区消毒。此次疫情系在自 2006 年 6 月 1 日开始的对高危区的第二次主动监测过程中发现的。Pichitr 省畜牧办公室宣布整个 BangMulnarg 地区为高致病性禽流感感染区,以便畜产发展厅采取全局的疾病控制措施。

日本发生山羊传染性胸膜肺炎

2006 年 7 月 24 日日本农林渔业部首席兽医官 Hirofumi Kugita 博士向 OIE 报告了山羊传染性胸膜肺炎疫情。冲绳 Nakagami 地区发生一起山羊传染性胸膜肺炎,这是日本首次报告此病。本次疫情始于 2006 年 5 月 21 日,于 2006 年 7 月 3 日确认,病原为丝状支原体丝状亚种 LC 型。经诊断发现一例病例,该山羊已被销毁(连同该场提供的另一只山羊)。诊断由日本国家传染病研究所用培养的方法完成。