

五指山小型猪生长激素释放激素受体基因的 cDNA 克隆及序列分析

张艳, 郑心力, 王峰, 孙瑞萍, 谭树义 (海南省农业科学院畜牧兽医研究所, 海南海口 571100)

摘要 [目的] 克隆五指山小型猪生长激素释放激素(GHRH)受体基因的 cDNA, 并对其序列分析。[方法] 以五指山小型猪耳组织提取的基因组 RNA 为模板, 根据已报道的猪 GHRHR cDNA 序列设计 3 对引物, 用 RT-PCR 方法进行 cDNA 扩增。PCR 产物经回收纯化后, 与 pMD18-T 连接并转化大肠杆菌 DH5 α , 转化产物经 PCR 和双酶切鉴定后筛选出阳性克隆, 阳性克隆经 LB 液体培养基培养鉴定后测序。[结果] 成功获得了五指山小型猪 GHRH 受体基因的 cDNA, 该片段长 1 577 bp, 编码 423 个氨基酸。BLAST 分析结果表明, 该片段与猪 GHRH 受体基因仅有 23 个碱基的差异, 同源率为 98%; 而两者 GHRH 受体基因均由 423 个氨基酸组成, 序列同源率为 96%。[结论] 该研究为进一步揭示五指山小型猪的矮小机理提供了理论依据。

关键词 五指山小型猪; 生长激素释放激素受体; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号 S828.8 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)27-12981-03

Clone and Sequence Analysis on cDNA Growth Hormone Releasing Hormone Receptor Gene from Wuzhishan Miniature Pig

ZHANG Yan et al (Institute of Animal science, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571100)

Abstract [Objective] The study aimed to clone cDNA of GHRH receptor gene from Wuzhishan miniature pig and analyze its sequence. [Method] Three pairs of primers were designed according to the sequence of announced GHRH receptor gene of pig. By taken the total RNA from ear tissue of Wuzhishan miniature pig as the template, the specific primers were used to amplify cDNA of GHRH receptor gene by RT-PCR method. The amplified products were connected with pMD18-T and transformed into *Escherichia* DH-5 α , after it was recovered and purified with gel, while the positive clones were taken to conduct sequence analysis after they were cultured by liquid medium of LB. [Result] The cDNA of GHRH receptor gene were successfully gained in the test and the length of cDNA fragment was 1 577 bp which coded 423 amino acid. The result of BLAST analysis showed that the fragment had 23 basyls which were different from that of pig, so their homology was 98%. The GHRH receptor gene of Wuzhishan miniature pig were all composed by 423 amino acid, and the sequence homology of their GHRH receptor genes was 96%. [Conclusion] The experiment provided theoretical basis for further studying on dwarfism mechanism of Wuzhishan miniature pig.

Key words Wuzhishan miniature pig; Growth hormone releasing hormone receptor; Clone; Analysis

五指山猪是我国著名珍稀地方猪种, 原产海南省五指山区, 除具有肉美、耐粗饲、抗逆抗病力强、早熟、耐近交、放牧性好等特点外, 还因它的解剖学、生理学特征及疾病发生机理等都与人类极为相似, 故适合做试验动物和医学动物模型, 具有重要的经济和社会价值。

但五指山猪生长缓慢, 成年猪体重仅 35 kg, 是正常猪体重的 15%~30%。而导致五指山猪矮小的机理至今不明。生长激素释放激素(Growth hormone releasing hormone, GHRH)属于血管活性肠肽家族成员, 是一种蛋白类激素, 由下丘脑合成并分泌, 对脊椎动物的生长、发育及代谢调控有极其重要的作用^[1]。GHRH 基因的作用是通过与受体 GHRHR 结合而实现的^[2]。猪 GHRHR 基因主要定位于 18 号染色体, 且与 S0062 和 S0120 存在连锁, 并将这一连锁定位于 SSC18q2.4^[3]。猪的 GHRHR RNA 序列已有报道(No. U49435), 编码区长 1 272 bp, 但未见其完整的基因序列报道。有报道指出, GHRHR 基因的变异可引起小鼠矮小和人遗传上的不足^[4-5]。因此, 该研究对五指山猪生长 GHRHR cDNA 序列进行克隆和分析, 以期从基因水平上探明五指山猪矮小的机理, 为五指山猪的品种资源保护和选育提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 随机采集五指山猪品种耳组织样共 30 份, 将其迅速放入液氮带回实验室, -70℃ 保存备用。

1.2 主要试剂 RT-PCR Kit, PCR 产物纯化回收试剂盒、重组质粒抽提试剂盒, 均购自天根生物工程有限公司; *Sal* I、

*Bam*H I、pMD18-T Vector 试剂盒、*E. coli* DH5 α 均购自 TaKaRa 公司。

1.3 引物设计与合成 利用引物设计软件 primer 5.0, 根据 GenBank 已登录的猪 GHRH 受体基因 mRNA 序列(SSU49435)设计合成引物 3 对, 扩增片段大小分别为 232、1 142 和 575 bp。P1: 上游引物 1: 5'-ACGCTGCGGG-GAAGTCT-3', 下游引物 1: 5'-TAGGACAGCCCCGAGGAGG-3'; P2: 上游引物 2: 5'-TCTACAAGCAGCAGACCG-3', 下游引物 2: 5'-CAGTTGTCAGCACCTTCG-3'; P3: 上游引物 3: 5'-ACGCTGCGGGGAAGTCT-3', 下游引物 3: 5'-TAGGACAGCCCCGAGGAGG-3'。

1.4 总 RNA 的提取与鉴定 五指山小型猪耳组织总 RNA 的提取方法按试剂盒说明书进行。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的质量。RNA 样品 100 倍稀释, 紫外分光光度计测定 OD_{260} 和 OD_{280} , 检测 RNA 的纯度及计算含量。

1.5 GHRH 受体基因 cDNA 序列的 RT-PCR 扩增 取高质量的总 RNA 2 μ g, Random(10 μ mol/L) 2.0 μ l, dNTPs Mix(2.5 μ mmol/L each) 2.0 μ l, Quant Reverse Transcriptase 1.0 μ l, 补加 DEPC-H₂O 至 20.0 μ l; 反应条件为 37℃ 60 min。

PCR 扩增体系为: DNA 模板(50 ng/ μ L) 2.0 μ l, 10 \times PCR Buffer(Mg²⁺ Free) 5.0 μ l, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 4.0 μ l, MgCl₂(25 mmol/L) 3.0 μ l, Ex *Taq* Polymerase(5 U/ μ l) 0.6 μ l, PF(10 pmol/L) 2.0 μ l, PR(10 pmol/L) 2.0 μ l, 无菌去离子 H₂O 31.4 μ l。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 50 s, 50℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR 产物回收与载体连接 PCR 产物电泳后按切胶

基金项目 海南省自然科学基金项目(30515)。

作者简介 张艳(1979-), 女, 山西阳城人, 博士, 助理研究员, 从事神经生殖免疫研究。

收稿日期 2009-05-25

回收试剂盒说明书进行回收提纯,将纯化后的目的片段与 pMD18-T Vector 载体连接。反应体系为:目的片段纯化产物 5.0 μ l、pMD18-T Vector 15.0 μ l、Ligation solution 4.0 μ l。连接反应液于 4 $^{\circ}$ C 反应 16 h。

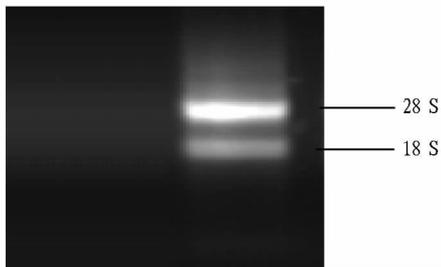


图1 总 RNA 琼脂糖电泳图谱

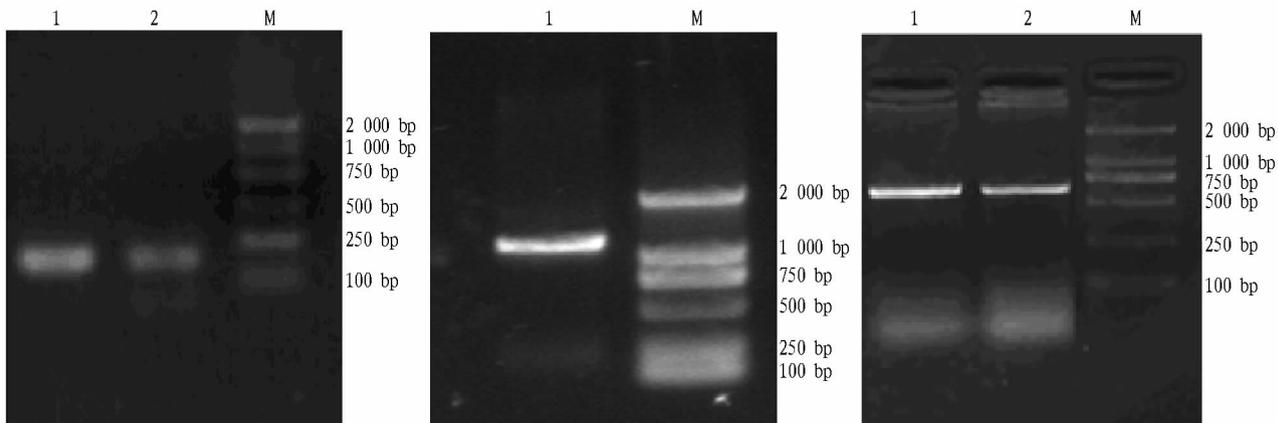
Fig 1 Electrophoretogram of total RNA

1.7 转化 将连接产物转化至 *Ecoli* DH5 α 感受态细胞中,取 150.0 μ l 转化产物涂在含氨苄青霉素的 LB 平板上进行培养。从转化产物中提取质粒,对纯化后的质粒进行 PCR 双酶切(*Sal* I 和 *Bam*H I 37 $^{\circ}$ C 放置 5 h)鉴定。以 2% 琼脂糖凝胶初步确定阳性克隆。

1.8 目的片段测序 将阳性克隆置于 5 \times 1 ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 16 ~ 18 h。菌液经 PCR 鉴定后,送上海生物工程公司测序。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 检测结果 图 1 显示,经 DEPC 处理后,总 RNA 琼脂糖凝胶出现了清晰、无拖尾的 2 条带,即 18S rRNA 和 28S rRNA,表明 RNA 完整性较好。所有样品紫外分光光度计定量,所得 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.8 ~ 2.0,表明样品纯度较好,无蛋白质和 DNA 污染。



注:M, maker; 1,2 为五指山猪 *GHRHR* cDNA RT-PCR 产物。

Note:M, Maker; 1,2, The RT-PCR product of Wuzhishan miniature pig *GHRHR* gene cDNA.

图2 五指山猪 *GHRHR* cDNA RT-PCR 扩增电泳图谱

Fig 2 RT-PCR amplification result of Wuzhishan miniature pig *GHRHR* gene cDNA

1	GGCCGAGCCA	CCACCATGGA	CAGCGGGGTG	TGGGCTGCCT	GCATCTTCTG	CCTGCTGAGC
61	TCCCTACCAG	TGCCTTGTG	CCACGTGCAC	CCGGAATGTG	ACTTCATCAC	CCAGCTGAGC
121	GAAGACGAGC	GAACCTGTCT	ACAAGCAGCA	GACCCGATGG	CCAACCTCTC	CTCGGGCTGT
181	CCTAGGACCT	GGGATGGGCT	GTTGTGCTGG	CCGACGGCAG	GCCCTGGGGA	GTGGGTGACC
241	CTCCCCCTGC	CGGCTTCTT	CTCTCACTTC	AGCTCTGAGC	CAGGCGCCCT	GAAGCGGGAC
301	TGCACCTCCA	CGGGCTGGTC	TGAGCCCTTC	CCGCCATATC	CCGAGGCTTG	CCCTGTGCCA
361	CTGGAGCTGC	TGACTGATGA	GAAATCCTAC	TTCTCCACTG	TGAGATTCTG	CTACACCACG
421	GGCCACAGCC	TCTCTGCCGT	GGCCCTCTTC	GTGGCCATCG	CCATCTCTGG	TGCTCTCAGG
481	AGGCTCCACT	GCCCCAGGAA	CTCCATCCAC	AGCCAGCTGT	AGCCACCTTC	TATCCTCAAG
541	GCGGGAGCTG	TGTTCTTCAA	AGACGCCGCC	CTCTTTCACA	GCGAGAACAC	GGACCACTGC
601	AGCTTCTCCA	CGGTTCTGTG	CAAGGTCTCT	GTGGCCACCT	CCCATTACGC	CACCATGACC
661	AACTTCAGTC	GGCTGCTGGC	AGAAGTGTCT	TACCTGACCT	GCCTTTGGCT	CCCTACGTC
721	CCCAGCACGA	GGAGGCCCTT	CTGGTGGCTG	GTTCTCGCTG	GCTGTGGGCT	GCCCATGCTC
781	TTCACTGGCA	CGTGGGTGGG	TTGCAAGTTG	GCCTTTGTGG	ATGTTGCGTG	CTGGGATCTG
841	GACGACAGCT	CCCCCTACTG	GTGGATCATC	AAAGGGCCCA	TCGTCTCTCT	CGTGGGGGTG
901	AACTTTGGGC	TTTTTCTCAA	TATTATCCGC	ZTCCTGCTGA	GGACACTGGA	GCCAGCTCAG
961	GGCAGCTCTC	ACACCCAGCC	TCAGTACTGG	CGTCTCTCCA	AGTCAACCTC	TCTCTCATC
1021	CCACTGTTTT	GAATCCACTA	CGTCATCTTC	AACTTCCTGC	AACTTCCTGC	TGGTCTGGGC
1081	ATCCGCCTCC	CCCTGGAGCT	GCGACTGGGC	TCCTTCCAGG	GCTACATTGT	TGCCATCTCT
1141	TACTGCTTCC	TCAACCAAGA	GGTGAGGACT	GAGATCTCAC	GGAGGTGGCA	TGGCCATGAC
1201	CCTGAACCTT	TGCCAGCCTG	GAGGACTCAT	GCCAAATGGG	CATAGCTTTC	CCGCTCAAGG
1261	GCGAAGGTGC	TGACAACCTGT	GTGCTAAGCT	GCCCTTGTCA	CACACCTGGA	ATCCACACCT
1321	GAACGTGGGC	AGCGGCTTGG	GTCCACCTCC	CTCCAGAGGA	GAGGGACCA	CCCCCTGCCC
1381	CCCAGGAACC	CTCCGTTCTG	GCCCTTGCCC	AGGCTGCAGT	CCAGCCCTTC	TTTCTGTCTC
1441	TGCCTCTGAC	TCTTTGGCCT	GAGTCCCTGT	GTGTCTACCT	CTGAAGTCTG	TGGTTCTCTC
1501	GTCTCTTTCC	TTCTCGCGTC	CCTCCTCTCT	GAGTCTGGGC	CGGAGCCGAA	AGCCAGTGG
1561	GCCAATAAAC	TTGTA AAA				

图3 五指山猪生长激素释放激素受体 cDNA 序列

Fig 3 The sequence of Wuzhishan miniature pig *GHRHR* gene cDNA

2.2 目的片段 RT-PCR 扩增结果 利用 3 对引物以五指山小型猪的基因组 cDNA 为模板进行扩增,经琼脂糖凝胶电泳后出现了明显的单一条带(图 2),且片段长度与预期长度

(232 bp、142 bp 和 575 bp)相符。可初步确定已成功获得五指山小型猪 *GHRH* 受体基因的序列。

2.3 PCR 扩增的 *GHRHR* cDNA 序列测定及分析 将上述

PCR 产物克隆入 pMD18-T Vector 载体,挑取单个菌落进行液体培养和质粒制备。根据酶切及 PCR 鉴定结果,选择含正确插入片段的重组质粒进行序列测定,结果见图 3。片段大小为 1 577 bp。

应用 DNASTAR 软件对五指山猪与 GenBank 上已公布的猪 GHRHR 核苷酸序列(SSU49435)进行比较,共有 23 处碱基发生转换,其同源性为 98%。应用 DNAMAN 等生物软件翻译出 GHRH 氨基酸序列并进行序列间比对,分析五指山猪与 GenBank 上已公布的猪 GHRHR 氨基酸序列(NP_999200)发现,共有 17 处氨基酸发生突变,其同源性为 96%。

3 讨论

GHRH 对脊椎动物的生长、发育及代谢调控起极其重要的作用。GHRH 发挥其生物学功能是通过与 GHRH 受体结合实现。因此,GHRHR 也被作为控制家畜生长和胴体性状变化的一个候选基因^[2]。

分离和克隆基因是研究基因结构、功能及表达的基础。人们最早是从人和鼠的垂体中克隆得到编码 44 个氨基酸的 GHRH-RP cDNA。接着,猪、牛、羊的 GHRH-RP 也先后被获得。猪的 GHRHR RNA 序列已有报道(No. U49435),但未见其完整的基因序列报道。人的 GHRHR 基因包含 13 个外显子和 12 个内含子(No. AC005155);奶牛的 GHRHR 基因部分外显子和内含子以及 5' 端非编码区和启动子序列也有报道(No. AF267729,AF257661-257672)。该研究利用 RT-PCR 方法首次扩增了五指山小型猪 GHRHR 基因的 cDNA 序列,得到该基因的 cDNA 序列长为 1 577 bp,编码 423 个氨基酸。通过同源性比较可知,五指山猪与普通猪 GHRHR 核苷酸序列同源性为 98%,2 种猪基因编码的氨基酸序列的同源性为

(上接第 12956 页)

可有效地避免同一种抗原既作免疫原又作检测抗原所带来的干扰,减少筛选工作量。在该研究中,为了尽量避免由于纯化不完全导致筛选的阳性克隆是针对菌体蛋白,用 BL21 (PET-32a)经 IPTG 诱导后裂解产物作为阴性对照,用该方法制备单克隆抗体,简化了试验工作,具有很好的应用价值。

(2)该试验采用 Western blot 分析法,鉴定所制备 mAb 的特异性,B3 株 mAb 不仅能与免疫抗原 His-PoIFN- γ 反应,也能与纯化的 GST-PoIFN- γ 反应,说明该株 mAb 分泌的抗体是针对 His-PoIFN- γ 和 GST-PoIFN- γ 的共同部分 PoIFN- γ 的。PoIFN- γ 与 ChIFN- γ 核苷酸同源性为 32.7%,具有一定的同源性,该 mAb 与 His-ChIFN- γ 、GST-ChIFN- γ 以及其他几种融合蛋白均不反应,充分证明该株 mAb 是针对 PoIFN- γ 的特异性 mAb。该研究筛选出的 mAb 通过 ELISA 和 Western blot 验证了其特异性。经反复冻存、复苏后检测,mAb 具有较好的稳定性,这为建立针对 PoIFN- γ 的特异性检测方法提供了技术平台。

参考文献

[1] BACH E A, AGUET M, SCHREIBER R D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling [J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15:563 - 591.

96%。结果表明,五指山猪的 GHRHR 序列与普通猪的同源性很高。但与普通猪相比,五指山猪的 GHRHR 序列中有部分碱基发生变异,而且在蛋白质的氨基酸组成上也发生了一些实质性变化。众所周知,结构决定功能,因而推测,GHRHR 基因序列的差异可能会影响 GHRH 功能的发挥。而五指山猪较普通猪生长缓慢,矮小。故笔者推测五指山猪的 GHRHR 序列与普通猪的核苷酸序列和氨基酸序列中存在的这些差异,可能是诱发五指山猪矮小的主要原因之一。为进一步研究五指山小型猪 GHRHR 基因的分子进化、多态性及阐明五指山猪矮小的机理提供了依据和线索。

参考文献

[1] 唐胜球,晓铤挺,董小英. 畜禽生长激素释放因子(GRF)的研究进展[J]. *中国兽医学报*,2004,24(3):310.
 [2] 刘德武,杨关福,张细权. 猪神经内分泌生长轴各因子及相关基因的研究进展[J]. *农业生物技术学报*,2004,12(1):109 - 115.
 [3] SUN H S, TARLOR C, ROBIC A, et al. Mapping of growth hormone releasing hormone receptor to swine chromosome 18[J]. *Anim Genet*,1997, 28:351 - 353.
 [4] OBAL F, JR FANG J,TAISHI P, et al. Deficiency of growth hormone-releasing hormone signaling is associated with sleep alterations in the dwarf rat[J]. *J Neurosci*,2001,21:2912.
 [5] CARAKUSHANSKY M, WHATMORE A J, CLAYTON P E, et al. A new missense mutation in the growth hormone - releasing hormone receptor gene in familial isolated GH deficiency[J]. *Eur J Endocrinol*,2003,148: 25 - 30.
 [6] HUANG Z G, XIE Z. Developmental changes of GHR mRNA expression level in sheep liver[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*,2009,1(2): 8 - 12.
 [7] 江涌,李文笙,谢骏,等. 石斑鱼垂体腺苷酸环化酶激活多肽和生长激素释放激素基因的 cDNA 克隆及表达分析[J]. *生物化学与生物物理学报*,2003,35(9):864 - 872.

[2] SCHRODER K,HERTZOG P J,RAVASI T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals,mechanisms and functions [J]. *J Leukoc Biol*,2004,75: 163 - 189.
 [3] ROSA F M, COCHET M M, FELLOUS M. Interferon and major histocompatibility complex genes: a model to analyse eukaryotic gene regulation [J]. *Interferon*,1986,7:48 - 8.
 [4] BILLIAU A. Interferon: the path ways of discovery. I. Molecular and cellular aspects [J]. *Cytokine and Growth Factor Reviews*,2006,17:381 - 409.
 [5] HUGHES H P. Cytokine adjuvants: lessons from the past-guidelines of the future? [J]. *Vet Immunol Immunopathol*,1998,63:131 - 138.
 [6] MATEADE ANTONIO E,HUSMANN R J,HANSEN R, et al. Quantitative detection of porcine interferon gamma in response to mitogen,superantigen and recall viral antigen [J]. *Vet Immunol Immunopathol*,1998,61:265 - 277.
 [7] 鲍鸣,仲大莲,许发芝,等. 鸡 γ -干扰素基因的克隆与原核表达[J]. *安徽农业大学学报*,2004,31(1):92 - 95.
 [8] 程宝艳,余为一,彭明义,等. 鸡新城疫病毒 F 基因部分片段克隆表达及其抗体制备[J]. *安徽农业科学*,2008,36(29):12616 - 12618.
 [9] 杨文超,谢金文,余为一. 猪瘟病毒 E2 基因的克隆及其初步鉴定[J]. *安徽农业科学*,2007,35(25):7841.
 [10] J·萨姆布鲁克,D·W·拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社,2002.
 [11] LI N, QIN A J, SHAO H X, et al. Development and characterization of monoclonal antibody specific to nuclear protein of avian influenza virus type A[J]. *Agricultural Science & Technology*,2008,9(1):60 - 63.
 [12] 余斌,张强,闫丽萍,等. 抗猪 γ -干扰素单克隆抗体的制备和鉴定[J]. *中国预防兽医学报*,2007,29(2):146 - 149.