

# 蒙古绵羊 *Ghrelin* 基因的克隆和原核表达

梁建荣, 曹贵方\*, 赵鹏伟, 温世勇, 程兰玲, 涂 勇  
(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)

**摘要:** 为了克隆蒙古绵羊 *Ghrelin* 基因, 构建其原核表达载体, 并检测其在大肠杆菌中的表达情况。本研究用 RT-PCR 方法从蒙古绵羊胃组织 mRNA 扩增获得 *Ghrelin* 基因的 cDNA 序列, 克隆到 pMD-19T 载体后进行序列分析。将测序正确的 cDNA 序列与原核表达载体 pET-32a(+) 连接, 并转化 BL21(DE3) 大肠杆菌。经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。结果表明克隆的蒙古绵羊 *Ghrelin* 基因序列与已发表基因序列有 2 个碱基的差异, 该碱基的变化并不影响氨基酸序列, 目的蛋白主要以可溶性形式存在, Western-blot 初步证实了所获得的融合蛋白是特异的。本研究成功构建了蒙古绵羊 *Ghrelin* 基因的原核表达载体, 并在大肠杆菌中获得高效表达, 为进一步研究蒙古绵羊 *Ghrelin* 基因的功能提供参考。

**关键词:** Ghrelin; 基因克隆; 原核表达; 蒙古绵羊

中图分类号: S826.82; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)12-1782-05

## The cDNA Cloning and Prokaryotic Expression of Mongolia Sheep *Ghrelin* Gene

LIANG Jian-rong, CAO Gui-fang\*, ZHAO Peng-wei, WEN Shi-yong,  
CHENG Lan-ling, TU Yong

(Laboratory of Animal Embryo and Developmental Biology, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

**Abstract:** To construct Mongolia sheep Ghrelin prokaryotic expression vector, and observe its expression in host *Escherichia coli* strain BL21(DE3), the cDNA of *Ghrelin* gene was amplified from abomasum fundic gland mRNA of Mongolia sheep by RT-PCR. PCR product was cloned into the T vector pMD-19T to construct pMD-19T-Ghrelin for sequencing. Then the cDNA was subcloned into the prokaryotic expressing plasmid vector pET-32a(+) and transformed into host *Escherichia coli* strain BL21(DE3) for expression. The clone was induced by IPTG and was identified by SDS-PAGE and Western-blot. Comparing with the *Ghrelin* sequence of sheep reported in GenBank, there were two nucleotide differences, but it did not affect the amino acid sequence; the expression product was observed with soluble protein; The result of Western-blot showed that the recombinant protein was recognized by His-antibody specifically. The nucleotide sequence isolated from the recombinant plasmid pET-32a-Ghrelin was the same as expected; the Ghrelin protein was expressed successfully in *Escherichia coli*, which provided a basis for further investigation of Ghrelin function.

**Key words:** Ghrelin; gene cloning; prokaryotic expression; Mongolia sheep

Ghrelin 是 1999 年日本科学家 Kojima 等<sup>[1]</sup>发现的一个由 28 个氨基酸组成的脑肠肽, 在体内有 2

种存在形式, 即 N 端 3 位丝氨酸残基乙酰化和非乙酰化的 Ghrelin, 其中乙酰化是它的主要活性形式, 有

收稿日期: 2010-12-13

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(200711020506); 国家自然科学基金(30860201)

作者简介: 梁建荣(1984-), 女, 河北怀安人, 硕士生, 主要从事分子生物学、发育生物学的研究工作, E-mail: jianrong397@126.com

\* 通讯作者: 曹贵方, 教授, E-mail: guifangcao@126.com

助于 Ghrelin 通过血脑屏障,发挥内分泌功能<sup>[2]</sup>。最近报道非辛酰化的 Ghrelin 和辛酰化的 Ghrelin 均能够促进脊索神经上皮的增殖,非辛酰化的 Ghrelin 具有内分泌功能,能促进细胞增殖,具有抗凋亡作用<sup>[3]</sup>。*Ghrelin* 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成。*Ghrelin* 在胃中的含量较高,其次是肠<sup>[4]</sup>,以后人们陆续发现在多种动物的中枢神经系统和外周组织器官都有分布。

Ghrelin 具有除了调节生长激素释放的基本作用以外<sup>[5]</sup>,还有更广泛的生物功能,如增强食欲<sup>[6-7]</sup>、调节能量代谢、促进胃酸分泌、调节免疫功能<sup>[8]</sup>、调节细胞增殖<sup>[9]</sup>等。新近研究表明<sup>[10]</sup>,将大鼠胰岛分离培养,在高糖刺激时加入一定浓度的 Ghrelin,胰岛素分泌量增加并且促进胰岛内前胰岛素原 mRNA 表达,从而促进胰岛素合成。Ghrelin 作为小分子活性肽,不会产生过度的免疫排斥,易于合成,其通过抑制促炎症细胞因子的分泌而起到抗炎效果,从而避免了抗生素带来的许许多多的问题。郭晓莉等<sup>[11]</sup>报道 Ghrelin 参与了肿瘤的发生和发展。总之,Ghrelin 具有很强的潜在应用前景。

目前人们已对人和鼠的 Ghrelin 进行了多方面的研究,在家畜上已有猪<sup>[12]</sup>、牛<sup>[13]</sup>等 *Ghrelin* 基因的研究报道,对于绵羊的 *Ghrelin* 研究甚少。本研究克隆蒙古绵羊 *Ghrelin* 基因,并使其在大肠杆菌中得到高效表达,旨在为羊 *Ghrelin* 基因的结构功能研究积累基础资料,为羊生长发育、提高胴体品质和增强免疫力方面的研究奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织样的采集

成年蒙古绵羊 3 只,由内蒙古农业大学实验动物室提供,屠宰后取其真胃组织马上冻入液氮中,−80 °C 冻存。

### 1.2 菌株与试剂

大肠杆菌菌株 BL21(DE3)和 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。DNA 凝胶回收试剂盒和 DNA 质粒提取试剂盒由北京天根生物技术有限公司生产。限制性内切酶(*EcoR* I、*Xho* I)、pMD19-T、pET32a 载体、RT-PCR 试剂盒及 *Ex Taq* 酶和 DNA marker(DL2000)均购自大连宝生物工程有限公司;Trizol 购自上海生工生物工程技术服务有限公司;预染蛋白质分子质量(7~175 ku)为纽英伦生物技术有限公司产品。抗体购自博士德微生物生物工程有限公司。

### 1.3 胃底组织总 RNA 的提取

采用 Trizol 法提取蒙古绵羊皱胃 mRNA,按照说明书进行。

### 1.4 引物的设计与合成

根据 GenBank 上公布的蒙古绵羊 *Ghrelin* 编码序列及引物设计原则,设计 *Ghrelin* 原核表达产物的引物。上游引物序列为 P1: CGGAATTCATGCCCCGCCCCGCGGACCATCTAC,带 *EcoR* I 酶切位点和保护碱基 CG,下游引物序列为 P2: ATCTCGAGTCACTCGTCAGCCAGGGTTTCTTC,*Xho* I 酶切位点和保护碱基 AT。引物由大连宝生物工程公司合成。

### 1.5 RT-PCR 反应

cDNA 第 1 链的合成参照 RT-PCR 试剂盒说明进行,并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L。模板 2  $\mu$ L,上下游引物各 0.75  $\mu$ L,*Ex Taq* 酶 12.5  $\mu$ L,无酶水 9  $\mu$ L。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,63 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 7 min。PCR 产物−20 °C 保存。

### 1.6 目的基因的克隆

在紫外灯下切取含目的 DNA 片段凝胶条,按 DNA 回收试剂盒说明书进行。用 TaKaRa 公司 pMD19-T Vector 试剂盒,将目的片段与 pMD19-T 载体连接。反应体系为纯化产物 5  $\mu$ L,pMD19-T Vector 1  $\mu$ L, Solution I 4  $\mu$ L。将总体积为 10  $\mu$ L 的连接反应液置 16 °C 水浴连接过夜并转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。菌液 PCR 初步鉴定正确后,提取质粒,分别进行酶切和 PCR 鉴定。将 PCR 和酶切鉴定正确的重组质粒送上海英骏公司进行序列测定,并命名为 pMD-19T-Ghrelin。

### 1.7 原核表达质粒的构建

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切克隆质粒 pMD-19T-Ghrelin 和 pET-32a 表达载体,分别回收目的片段和载体大片段,如上方法将目的片段和载体大片段连接过夜后转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。提取质粒后用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切和 PCR 鉴定重组质粒并测序,命名为 pET-32a-Ghrelin。

### 1.8 融合蛋白的诱导表达及可溶性分析

将测序正确的表达菌液按 1:100 量接种于含 100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> AMP 的 5 mL LB 培养基的试管中,37 °C 200 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 到 0.4~0.6,加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,37 °C 诱

导,分别在 2、4、6、8、10 和 12 h 收集菌液,对其进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.9 Western-blot 检测

将收集浓缩的表达产物经过 SDS-PAGE 后,进行 Western-blot 检测。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 提取结果

提取的总 RNA 电泳结果呈瀑布状,可见 28S、18S、5.8S 3 条带且未见 DNA 条带(图 1),表明提取的总 RNA 结构完整,无 DNA 的污染,可用于逆转录。

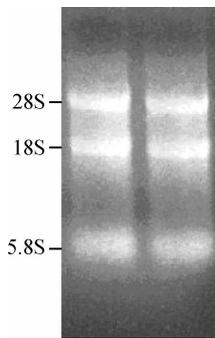
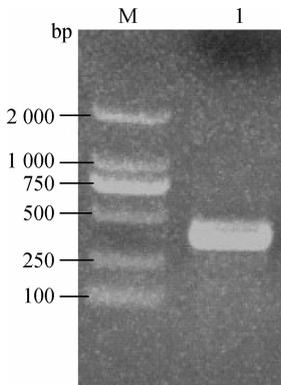


图 1 总 RNA 凝胶电泳分析

Fig. 1 Gel electrophoresis of total RNA

### 2.2 cDNA 片段的 RT-PCR 扩增结果

对蒙古绵羊 *Ghrelin* cDNA 片段进行 RT-PCR 扩增,PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,约 367 bp 处可见清晰的特异带(图 2),表明成功完成了 *Ghrelin* 基因的 RT-PCR 扩增。



M. DNA 相对分子质量标准; 1. PCR 产物

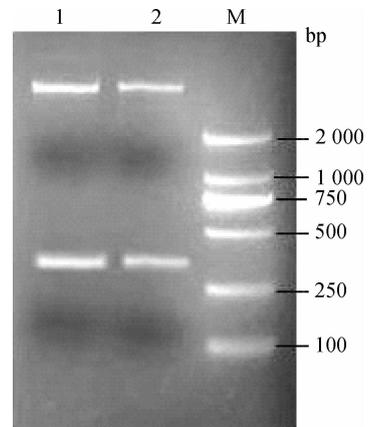
M. DNA marker DL-2000; 1. PCR product

图 2 RT-PCR 产物凝胶电泳分析

Fig. 2 Gel electrophoresis of RT-PCR product

### 2.3 克隆载体的构建

回收扩增片段,与 pMD19-T 载体连接,转化 DH5 $\alpha$  受体菌,涂布到含 Amp 的 LB 琼脂平板上。培养过夜后,平板上长出稀疏的蓝色和白色的克隆菌落。挑取白色菌落接种到含 100 mg  $\cdot$  L $^{-1}$  Amp 的 LB 培养基中,菌液 PCR 初步鉴定正确后,提取质粒,经 PCR 扩增,用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行酶切,均获得大约 367 bp 的特异性泳带,初步证明克隆成功(图 3)。重组质粒的测序结果经 Blast 分析,所得序列与 GenBank 中绵羊 *Ghrelin* 基因序列有 2 个碱基的差异,分别是 128 位 T 变为 C、第 242 位 G 变为 C,该碱基的变化不影响翻译后多肽的序列。



M. DNA 相对分子质量标准; 1, 2. pMD-19T-Ghrelin 质粒用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切

M. DNA marker DL-2000; 1, 2. pMD19-T-Ghrelin/*EcoR* I and *Xho* I

图 3 pMD-19T-Ghrelin 质粒酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pMD-18T-Ghrelin by endonuclease

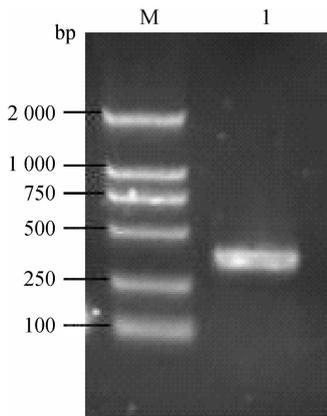
### 2.4 原核表达质粒的构建及鉴定

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pMD-19T-Ghrelin 克隆质粒和 pET-32a 原核表达载体,分别回收目的片段和载体大片段,进行连接反应后转化大肠杆菌,利用 Kan 抗性筛选。将提取的质粒采用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切及 PCR 鉴定,在 367 bp 处出现特异片段(图 4),证明已将蒙古绵羊 *Ghrelin* cDNA 片段连入载体。

### 2.5 重组蛋白的诱导表达及 Western-blot 结果

重组表达质粒 pET-32a-Ghrelin 在 BL21 (DE3) 宿主菌中的诱导表达结果表明目的蛋白大部分在上清表达,一小部分以包涵体的形式存在。即融合蛋白 His-Ghrelin 可溶性表达大于包涵体表达(图 5)。IPTG 诱导 pET-32a-Ghrelin 6 h 时表达量

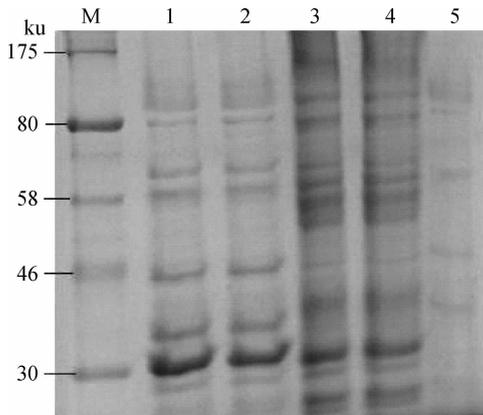
最大(图6), 相对分子质量约为 33 ku, 与理论估计的相对分子质量相符。



M. DNA 相对分子质量标准; 1. PCR 产物  
M. DNA marker DL-2000; 1. PCR product

图4 PCR产物凝胶电泳分析

Fig. 4 Gel electrophoresis of PCR product



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1~2. 上清; 3~4. 沉淀;  
5. pET-32a 空载体诱导

M. Protein molecular weight marker; 1-2. Supernatant fluid; 3-4. Inclusion body; 5. pET-32a vector plasmid after being induced

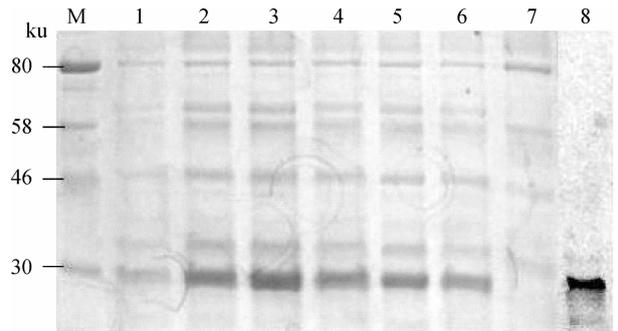
图5 pET-32a-Ghrelin 表达产物的可溶性表达分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the solubility of His-Ghrelin fusion protein in pET-32a-Ghrelin

### 3 讨论

选择合适的载体和正确的构建方法, 是目的基因在原核细胞中正确表达的关键。本研究选用的 pET-32a 表达载体含有 T7 启动子, 可被 T7 RNA 聚合酶识别, T7 RNA 聚合酶的转录效率比大肠杆菌 RNA 聚合酶高 5 倍, 能够高效转录 mRNA, 并大量表达目的蛋白; 二是载体使目标序列与硫氧还蛋白 (Trx. Tag) 融合, 增加可溶性目标蛋白的比例,

而且还含有用于构建融合蛋白的 His 标签, 利于融合重组蛋白的鉴定和分离纯化。此外, 宿主细胞 *E. coli* BL21 具有生长快、培养经济、表达水平高等特点, 也是本试验成功的重要原因。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1~6. 重组质粒诱导 2、4、6、8、10、12 h; 7. pET-32a 空载体诱导; 8. Western-blot 结果

M. Protein molecular weight marker; 1-6. The expressed products from the recombinant plasmids after being induced for 2, 4, 6, 8, 10, 12 h; 7. pET-32a vector plasmid after being induced; 8. Western-blot

图6 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

Fig. 6 SDS-PAGE and Western-blot analysis of the expressed product

试验中对克隆的蒙古绵羊 *Ghrelin* cDNA 片段进行检测时发现与 GenBank 中公布的绵羊 *Ghrelin* 序列有 2 个碱基差异, 分别是 128 位 T 变为 C 和第 242 位 G 变为 C, 该碱基的转换可能是由于绵羊的品种不同而使得该基因序列中的某些碱基个别改变, 系多态性所致。但该变化并不影响氨基酸的组成, 而该基因的功能不会受到影响。

Ghrelin 是一种主要在胃部产生的胃肠胰腺激素, 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<sup>[14]</sup>, 成为了近年来研究的热点。本试验中仅仅克隆并表达了 Ghrelin 蛋白, 对其进行了初步检测, 后续的工作拟将其应用于实验动物, 观察动物的生长轴相关激素分泌、健康、生产性能等指标, 从而为此基因药物在畜牧实践中的应用的效果及可行性提供参考, 对于研究提高饲料报酬和促生长微生态制剂的开发应用具有一定的意义。

### 4 结论

本研究以蒙古绵羊为研究对象, 采用 RT-PCR 技术克隆了其 *Ghrelin* 基因, 经双酶切鉴定后将目的基因定向插入原核表达质粒 pET-32a 载体中, 构

建出重组原核表达质粒并实现在 *E. coli* BL21 的高效表达,可溶性分析获知蛋白大部分以可溶性形式表达,并进一步作了目的蛋白的 Western-blot 检测,得到了可靠的结果,为进一步研究 Ghrelin 的生物学活性奠定基础。

#### 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(6762): 656-660.
- [2] KORBONITS M, GOLDSTONE A P, GUEORGUIEV M, et al. Ghrelin-a hormone with multiple functions[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2004, 25: 27-68.
- [3] SATO M, NAKAHARA K, GOTO S, et al. Effects of ghrelin and desacyl ghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350: 598-603.
- [4] 王越晖,祝世功. Ghrelin 的发现及研究进展[J]. 中国病理生理杂志,2001, 17(12):1256-1259.
- [5] DATE Y, MURAKAMI N, KOJIMA M, et al. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin growth hormone release in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275:477-480.
- [6] 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, 141:4325-4328.
- [7] NAKAZATO M, MURAKAMI N, DATE Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding [J]. *Nature*, 2001, 409(6817):194-198.
- [8] HATTORI N, SAITO T, YAGYU T, et al. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86 (9): 4284-4291.
- [9] VOLANTE M, ALLIA E, FULCHERI E, et al. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(2):645-654.
- [10] 毛微波,郭晓蕙,高妍,等. Ghrelin 促进大鼠胰岛素合成及高葡萄糖诱导的胰岛素分泌[J]. 基础医学与临床,2004, 24(4):432-435.
- [11] 郭晓莉,王平芳. Ghrelin 的最新进展[J]. 医学综述, 2007, 13(24):1948-1950.
- [12] 杨连玉,杨文艳,赵颖彩,等. 猪 Ghrelin 基因的克隆及原核表达[J]. 中国兽医学报,2005, 25(6):614-616.
- [13] 张爱玲,张丽,陈宏,等. 黄牛 Ghrelin 基因的克隆、表达及生物学活性检测[J]. 生物工程学报,2009, 25(1):23-28.
- [14] KOJIMA M, KANGAWA K. Ghrelin: Structure and function [J]. *Physiol Rev*,2005, 85:495-522.

(编辑 郭云雁)