

王金玲, 王永, 刘鲁蜀, 等. 草地藏系绵羊生长激素释放激素基因部分 cDNA 的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 595-599.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.021

草地藏系绵羊生长激素释放激素基因部分 cDNA 的克隆及生物信息学分析

王金玲¹, 王永², 刘鲁蜀³, 陶永平⁴

(1. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000; 2. 西南民族大学青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室, 四川 成都 610041; 3. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610041; 4. 四川省若尔盖县畜牧局, 四川 若尔盖 624500)

摘要: 为了克隆草地藏系绵羊生长激素释放激素基因, 采用 Trizol 法从草地藏系绵羊下丘脑组织中提取总 RNA, 用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)进行 cDNA 扩增并克隆测序, 获得长度为 207 bp 的促生长激素释放激素基因(*GHRH*)的部分 cDNA 序列。结果表明获得的草地藏系绵羊 *GHRH* 部分 cDNA 序列与 GenBank 中注册的绵羊 *GHRH* 基因编码起始位置(86 位)到 292 位区域高度同源, 仅有 1 个碱基的差异, 该 cDNA 序列编码 69 个氨基酸残基, 其内含有信号肽序列, 该氨基酸序列的 31 ~ 57 位具有典型胰高血糖素类似激素特征的 GLUCA 结构域。

关键词: 藏系绵羊; *GHRH*; 基因克隆

中图分类号: Q959.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)03-0595-05

Cloning and bioinformatics analysis of a fragment cDNA encoding growth hormone-releasing hormone in Tibetan sheep

WANG Jin-ling¹, WANG Yong², LIU Lu-shu³, TAO Yong-ping⁴

(1. Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China; 2. Key Laboratory for The Qing-Tibet Plateau Animal Genetic Resource Conservation and Exploitation of Sichuan Province, South West University of Nationalities, Chengdu 610041, China; 3. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 4. Ruergai Bureau of Agriculture and Animal Husbandry, Ruergai 624500, China)

Abstract: Total RNA was extracted from the hypothalamus tissues of Tibetan sheep using Trizol method and cDNA was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The cDNA of Tibetan sheep *GHRH* gene was cloned from the amplified PCR product and sequenced. The cDNA was 207 bp in length and showed 99% homology with that of common sheep registered in GenBank from the starting position (86) to 292 bp. The cDNA sequence encodes 69 amino acid residues and contains a signal peptide sequence which has a GLUCA domain characterizing glucagon-like hormone at amino acid 31 to 57.

Key words: tibetan sheep; *GHRH*; gene clone

动物生长是一个复杂的生物代谢过程, 这个过

程受基因型、激素、营养和环境等因素的共同影响。激素作为生物体内的一种化学信息, 对机体的生长发育、代谢、繁殖和衰老等生命过程起着重要的调控作用。神经内分泌生长轴, 又称脑垂体生长轴, 在动物的生长发育过程中发挥重要的调节作用。下丘脑分泌的生长抑素(Somatostatin, SS)和生长激素释放激素(Growth hormone releasing hormone, *GHRH*)、垂

收稿日期: 2014-11-25

基金项目: 四川省学术和技术带头人培养资金重点项目; 四川省应用基础项目(2006J13-116); 四川省教育厅项目(10ZB142)

作者简介: 王金玲(1981-), 女, 内蒙古牙克石人, 硕士, 主要研究方向为动物遗传育种。(E-mail) 494878248@qq.com

通讯作者: 王永(1962-), (E-mail) wangyong010101@swun.cn

体分泌的生长激素 (Growth hormone, GH)、调节靶器官 (如肝脏) 分泌的生长激素受体 (Growth hormone receptor, GHR) 如胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor-I, IGF-I) 等构成了动物下丘脑-垂体-靶器官作用通路的基本内容^[1]。

作为垂体生长激素 (Growth hormone, GH) 的正向调控因子, GHRH 能促进垂体合成和分泌生长激素 GH^[2]。目前, 已有多例关于 *GHRH* 基因克隆的报道。Meng 等^[3] 构建了羊生长激素释放激素的肌肉注射表达质粒, 通过一次性简单肌肉注射这种质粒可以提高羊的生长速度, 促进体质量增加。汪以真等^[4] 用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 对猪下丘脑促生长激素释放激素 (GHRH) cDNA 扩增, 得到猪 *GHRH* 基因 cDNA 编码区序列。Kazmer 等^[5] 对普通牛 *GHRH* 全基因测序得到全长 9 356 bp 的片段。欧江涛等^[6] 对牦牛 *GHRH* 基因进行 PCR 产物 T-A 克隆测序。马志杰^[7] 等克隆了欧拉型藏羊 *GHRH* 基因内含子 2 的部分序列并进行了 HaeIII-RFLP 分析。另外, 人、金地鼠、猪、马、鸡、南方鲇鱼、斑马鱼等物种的 *GHRH* 基因也相继得到克隆^[8-9]。藏系绵羊是我国青藏高原特有的畜种之一, 也是中国粗毛羊中的一个地方原始品种, 具有耐高寒、耐粗饲料、适应性强等特点^[10]。国内一些学者对其已有较为系统的研究, 但多数集中于传统生物学及遗传多样性方面^[11-13]。草地藏系绵羊 *GHRH* 基因的 cDNA 克隆还未见报道。

本研究以草地藏系绵羊生长激素释放激素基因 (*GHRH*) 作为研究目标, 通过组织提取 RNA 反转录 cDNA 进行克隆、测序并对其核苷酸序列进行比较分析, 为进一步从分子水平上阐明草地藏系绵羊生长特性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样品采集

提取总 RNA 所用的成年藏系绵羊的下丘脑组织采自四川省阿坝藏族自治州若尔盖县, 屠宰后 30 min 内采集 3 头藏系绵羊的下丘脑组织, 迅速放入液氮中保存, 带回实验室, -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 主要试剂

Trizol, TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0, Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker, pMD18-T Vector, IPTG, X-gal, 胶回收 (小量) 试剂盒。

1.3 藏系绵羊下丘脑组织总 RNA 的提取和检测

采用 Trizol 试剂提取下丘脑组织总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测所获得的 RNA。用紫外分光光度计分析 RNA 浓度和质量。

1.4 引物设计

根据 NCBI 数据库中普通牛的基因 (NCBI Genbank 登陆号: NM178325), 应用 primer5.0 软件设计引物, 该引物为: 上游引物: 5'-GCTAAGTGTCTACAGCCTTGCAG-3', 下游引物: 5'-CAGCCCTTATCACTCTCTGGA-3', 预期扩增片段长度 340 bp。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.5 藏系绵羊 *GHRH* 基因的 RT-PCR

RT-PCR 反应体系: 反应总体积 10.00 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.00 μ l, 10 \times RT-Buffer 1 μ l, dNTP (10 mmol/L) 1 μ l, RNase free dH₂O 2.75 μ l, RNase Inhibitor (40 U/ μ l) 0.25 μ l, AMV (5 U/ μ l) 0.50 μ l, Oligo dT-Adaptor Primer (2.5 U/ μ l) 0.50 μ l, RNA 样品 2.00 μ l。RT-PCR 反应条件: 50 °C 30 min; 99 °C 5 min; 5 °C 5 min, 所获得的 cDNA 在 4 °C 下保存。

PCR 反应体系: 反应总体积为 40 μ l; 5 \times Buffer 10.00 μ l, 灭菌水 23.75 μ l, *Ex Taq* HS (5 U/ μ l) 0.25 μ l, 上游引物 (20 pmol/L) 0.50 μ l, 下游引物 (20 pmol/L) 0.50 μ l, cDNA 5.00 μ l。PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 10 s, 30 个循环; 72 °C 4 min, 4 °C 保存。产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 凝胶成像系统拍照检测。

1.6 藏系绵羊 *GHRH* 基因扩增片段的克隆测序

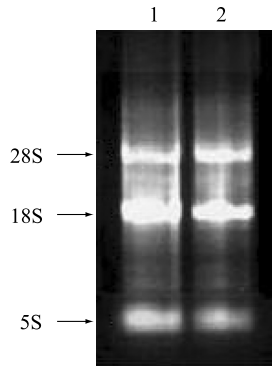
PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳, 电泳条带经割胶并回收纯化, 取 1.5 μ l 加入到 0.5 μ l 载体 PMD-18 Vector 中, 然后加入 Solution I 5.0 μ l, 灭菌水 3.0 μ l, 混匀, 反应总体积 10.00 μ l, 16 °C 水浴 3 h。将 10 μ l 连接产物转化到 200 μ l *E. coli* JM109 感受态宿主菌中。取 100 μ l 转化产物涂在含氨苄、IPTG 和 X-Gal LB 平板上, 挑取白色菌斑培养, 同时用未转化的菌液作阴性对照。用试剂盒抽提质粒, 送上海基康生物技术有限公司进行测序。

2 结果

2.1 藏系绵羊下丘脑总 RNA 的提取

对提取的藏系绵羊下丘脑总 RNA 样品进行测定, 其中 1 号样品 RNA $OD_{260} = 0.231$, $OD_{280} = 0.132$,

$OD_{260}/OD_{280} = 1.750$; 2 号样品 RNA $OD_{260} = 0.220$, $OD_{280} = 0.132$, $OD_{260}/OD_{280} = 1.667$ 。电泳分析显示,用 Trizol 试剂提取的藏系绵羊下丘脑总 RNA 的 28S 和 18S 条带清楚,可用于 RT-PCR(图 1)。



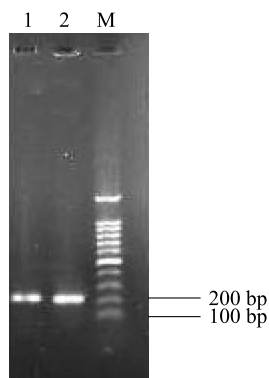
1:1 号样品;2:2 号样品。

图 1 草地藏系绵羊下丘脑组织总 RNA 琼脂糖电泳图

Fig. 1 Total RNA from Tibetan sheep hypothalamus revealed by agarose gel electrophoresis

2.2 藏系绵羊 *GHRH* 基因 RT-PCR

因未见报道绵羊 *GHRH* 基因 mRNA 的 CDS 全序列,故根据普通牛 *GHRH* 基因序列设计的引物期望能很好地扩增出藏系绵羊 *GHRH* 基因,获得的基因目的片段为 200 bp 左右,没有杂带(图 2)。



M:DNA marker;1,2:目的片段。

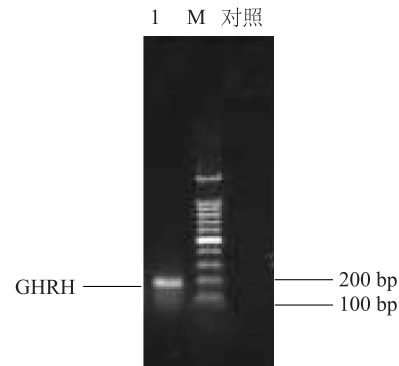
图 2 草地藏系绵羊下丘脑组织 *GHRH* 基因 RT-PCR 琼脂糖电泳结果

Fig. 2 *GHRH* cDNA from Tibetan sheep hypothalamus by RT-PCR

2.3 藏系绵羊下丘脑组织 *GHRH* 基因重组子 PCR 结果

用重组子 PMD18-T Vector-*GHRH* 转化后的重

组子进行 PCR 扩增,鉴定目的片段是否已经连接到载体上,并用未转化的重组子做阴性对照,结果如图 3。



M:DNA marker;1:重组子 PCR 扩增产物。对照:未转化的重组子 PCR 扩增。

图 3 草地藏系绵羊下丘脑组织 *GHRH* 基因重组子 PCR 扩增琼脂糖电泳鉴定结果

Fig. 3 Identification of *GHRH* cDNA from Tibetan sheep hypothalamus by PCR

2.4 藏系绵羊下丘脑组织 *GHRH* 基因测序结果及生物信息学分析

将连接到载体上的目的片段进行测序。结果显示,目的 cDNA 片段全长 207 bp,编码了 69 个氨基酸残基。cDNA 片段的序列为:5'-ATGCTGCTCTGGGTGTTCTTCCTCGTGACCCCTCACCCTCAGCAGCG-GCTCCCAAGGTTCCCTGCCCTCCCAGCCTCTCAGGA-TCCCAAGGTACGCAGATGCCATCTTCACTAACAGCT-ACCGGAAGATTCTGGGCCAGCTGTCTGCCCCGAAGC-TACTCCAGGATATCATGAACAGGCAGCAGGGAGAGA-GAAACCAGGAGCAAGGAA-3'。氨基酸残基序列分别为:MLLWVFFLVTLTLSSGSQGSPLPSQPLRIPRYADAI FTNSYRKILGQLSARKLLQDIMNRQQGERNQEQQ

2.4.1 草地藏系绵羊与绵羊生长激素释放激素基因(*GHRH*)部分序列比较 通过 NCBI 中的 Blast 程序分析,将草地藏系绵羊 *GHRH* 基因部分片段测序结果与 GenBank 中注册的绵羊 *GHRH* 基因(XM_004014558)相应序列进行比对分析。结果(图 4)表明,草地藏系绵羊编码起始位置(86 位)到 292 位区域与绵羊的该段序列间高度同源,共发现 1 处序列碱基差异,为 1 次碱基颠换(即 A—C 颠换)。

2.4.2 草地藏系绵羊生长激素释放激素基因(*GH-*

RH) 部分序列编码的氨基酸序列分析 通过 Vectors NTI 软件分析发现,该 cDNA 片段编码的氨基酸残基序列与其比对基因序列所编码的部分氨基酸序列一致,这里体现了密码子的简并性。

对所得氨基酸残基序列进行信号肽预测,发现在此区域存在信号肽,可推测若获得完整的 CDS 框编

码的蛋白应属于分泌蛋白,且剪切位点位于第 20 个氨基酸残基位置(图 5)。利用 SMART 程序对推导的氨基酸序列进行功能结构域在线分析,表明在该序列的 31 ~ 57 位具有典型的 GLUCA 结构域(图 6),GLUCA 具有典型的胰高血糖素类似激素的特征。

Query	1	ATGCTGCTCTGGGTGTTCTTCCTCGTGACCCTCACCCTCAGCAGCGGCTCCCAAGGTTC	60
Sbjct	86	ATGCTGCTCTGGGTGTTCTTCCTCGTGACCCTCACCCTCAGCAGCGGCTCCCAAGGTTC	145
Query	61	CTGCCCTCCCAGCCTCTCAGGATCCCAAGGTACGCAGATGCCATCTTCACTAACAGCTAC	120
Sbjct	146	CTGCCCTCCCAGCCTCTCAGGATCCCAAGGTACGCAGATGCCATCTTCACTAACAGCTAC	205
Query	121	CGGAAGATTCTGGGCCAGCTGTCTGCCCGCAAGCTACTCCAGGATATCATGAACAGGCAG	180
Sbjct	206	CGGAAGATTCTGGGCCAGCTGTCTGCCCGCAAGCTACTCCAGGATATCATGAACAGGCAG	265
Query	181	CAGGGAGAGAGAAACCAGGAGCAAGGA	207
Sbjct	266	CAGGGAGAGAGAAACCAGGAGCAAGGA	292

图 4 利用 Blast 程序所预测的草地藏系绵羊 *GHRH* 基因核苷酸序列与绵羊 *GHRH* 基因(XM_004014558)的同源性比较

Fig. 4 The alignment of the nucleotide sequence of *GHRH* gene from Tibetan sheep and the putative *GHRH* gene from sheep (XM_004014558)

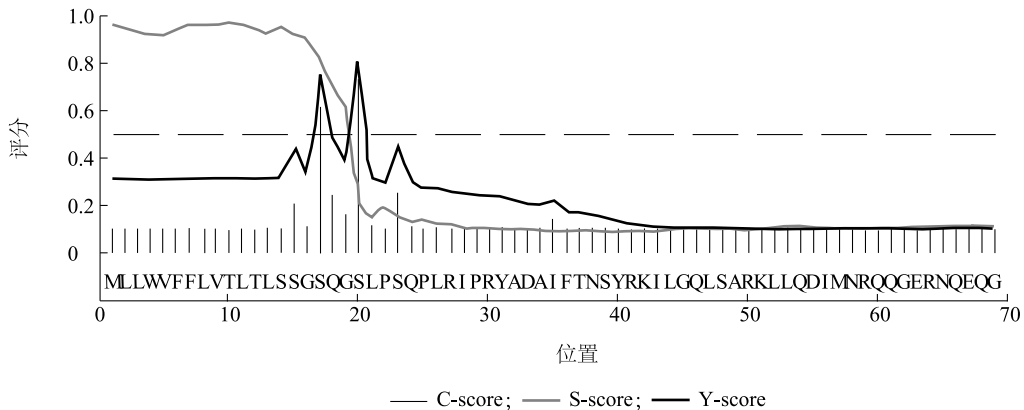


图 5 草地藏系绵羊 *GHRH* 基因编码的氨基酸残基序列中含有信号肽

Fig. 5 The signal peptide in the predicted amino acid residues

3 讨论

本试验应用 RT-PCR 技术,根据已报道的牛 *GHRH* 基因 cDNA 序列设计引物(在本试验设计之初还未见 GenBank 中注册绵羊 *GHRH* 基因 cDNA 全序列),首次从草地藏系绵羊下丘脑中克隆了 *GHRH* 基因部分 cDNA,长度为 207 bp。通过 Blast 比较分析发

现,草地藏系绵羊与已报道普通绵羊 *GHRH* cDNA 序列间仅有 1 个碱基的差异,与普通牛序列也只有 5 个碱基的差异;将草地藏系绵羊 *GHRH* 基因部分片段与 GenBank 中登陆的人、鼠、马、猪、黑猩猩等物种 *GHRH* 基因 cDNA 成熟肽编码区序列进行比较。人与黑猩猩间 *GHRH* 基因的同源性为 99.56%;黑猩猩和金地鼠间 *GHRH* 基因同源性为 78.26%;草地藏系绵羊

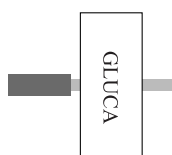


图6 利用 SMART 程序推导出草地藏系绵羊 *GHRH* 基因编码的氨基酸序列含有 GLUCA 结构域

Fig. 6 The deduced GLUCA domain in amino acid sequence using SMART program

GHRH 基因部分 cDNA 与人和黑猩猩的同源性为 96.62%,与猪和金地鼠的同源性 97.1%,与马的同源性为 98.1%。可见,*GHRH* 基因在物种内品种间和近缘种间有较高的同源性,而在关系较远的物种间也存在变异。关于 *GHRH* 氨基酸序列比对的结果发现,其无论是在种内还是种间都是高度保守的。一系列的 Blast 比较分析结果表明,*GHRH* 基因在物种间和物种内既存在保守性也存在变异性,反映了其在起源进化过程中的一些特点。

对草地藏系绵羊经济性状功能基因的研究,目前还处于刚起步阶段。同时,鉴于 *GHRH* 基因在影响动物生长发育速度、瘦肉率等方面具有重要作用,本研究认为,还应对草地藏系绵羊 *GHRH* 基因的结构、表达调控和定位等方面做大量的分析研究。草地藏系绵羊 *GHRH* 基因的部分 cDNA 序列的获得,为我们进一步对该基因 cDNA 全长的克隆奠定了基础,今后计划通过 3'-RACE 和 5'-RACE 技术获得草地藏系绵羊 *GHRH* 基因 cDNA 全长序列,进而研究其功能。

参考文献:

- [1] 刘建文,施用晖,乐国伟. 动物生长轴的激素调控[J]. 中国饲料, 2003(14):7-9.
- [2] SHALLY A V. Struture of the porcine LH and FSH-releasing hormone confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses [J]. Biochem BioPhy Res Commun, 1971, 44 (1): 459-463.
- [3] MENG Q Y, CHEN Z Q, YU Z Q, et al. Increased body weight vi-amyogenic expression of injectable growth hormone-releasing hormone (GHRH) plasmid with bupivacaine as adjuvant in sheep[J]. Animal Biotechnology, 2004, 15(2): 175-192.
- [4] 汪以真,颜新春,余东游. 猪下丘脑促生长激素释放激素 (GHRH) 基因克隆及序列分析[J]. 浙江大学学报, 2000, 26(3): 277-279.
- [5] KAZMER G W, ZINN S A, STRAUSBAUGH L D. Short communication: growth hormone response to somatostatin-28 and growth hormone-releasing factor in dairy heifers[J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83(10): 2282-2288.
- [6] 欧江涛,钟金城,赵益新. 牦牛生长激素释放激素基因的克隆及序列分析[J]. 四川畜牧兽医, 2003, 29(2): 9-12.
- [7] 马志杰,魏雅萍,钟金城,等. 藏绵羊 *GHRH* 基因部分片段的克隆及 HaeIII-RFLP 分析[J]. 河南农业科学, 2008(2): 95-98.
- [8] 魏 玲,程道军,王志坚. 南方鲇促生长激素释放激素基因部分 cDNA 克隆及序列分析[J]. 西南师范大学学报, 2008, 33(3): 57-62.
- [9] FRADINGER E A, SHERWOOD N M. Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the zebra fish[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2000, 165: 211-219.
- [10] 王 杰,王 永. 草地养羊学[M]. 成都:四川教育出版社, 1993.
- [11] 赵亚力. 藏系绵羊染色体的显带研究[J]. 畜牧兽医学报, 1989, 20(4): 315-316.
- [12] 卫学承,徐振帮. 藏系绵羊染色体的研究[J]. 青海畜牧兽医杂志, 1991, 20(4): 4-6.
- [13] 冯 政. 藏羚、藏绵羊、藏山羊 mtDNA D-Loop 区序列变异与系统发生关系的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2004.

(责任编辑:陈海霞)