

猪 NPY 受体 Y1 cDNA 的克隆及分析

周春宝^{1,2}, 倪黎纳², 丁家桐¹, 包文斌¹

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏泰州 225300; 2. 江苏姜曲海种猪场, 江苏泰州 225300; 3. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要 [目的] 研究猪 NPY-Y1 受体在猪激素分泌及发育生理功能中的调节作用。[方法] 从初情期的苏姜猪母猪中提取下丘脑组织总 RNA, RT-PCR 扩增出 NPY-Y1 cDNA, 扩增产物克隆入 pGEMT easy 载体中进行序列测定。[结果] 试验扩增产物与 GeneBank 公布的猪 NPY-Y1 序列比较, 其同源性达到 100%。[结论] 为下一步研究猪 NPY-Y1 基因的生理功能和作用机理奠定了基础。

关键词 苏姜猪; NPY-Y1 基因; RT-PCR 扩增; 序列分析

中图分类号 S828 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)36-15797-02

Cloning and Sequencing of the cDNA of Neuropeptide Y Receptor Y1 from Pig

ZHOU Chun hao et al (Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou, Jiangsu 225300)

Abstract [Objective] The research aimed to study the regulating function of neuropeptide Y receptor Y1 on the hormone secretion and development physiology in pig. [Method] Pig NPY-Y1 gene was obtained using reverse transcription polymerase chain reaction amplification (RT-PCR) of total RNA extracted from hypothalamus tissue of pituitary in Sujiang pig. The RT-PCR products was subcloned into pGEMT easy vector and the correctness of the sequences was confirmed by sequence analysis. [Result] The result of sequence analysis showed that its homology with NPY-Y1 cDNA from GenBank was up to 100%. [Conclusion] These data indicated that the NPY-Y1 cDNA was cloned correctly, which would play a great role in the research of its physiological functions and mechanism.

Key words Sujiang pig; NPY-Y1 gene; RT-PCR amplification; Sequencing

神经肽 Y (NPY) 是一种 36 氨基酸残基的神经递质, 属含 YY 肽和胰多肽结构的多肽家族^[1]。NPY 广泛分布于中枢及外周神经组织的神经元中^[2], 参与血管收缩、摄食、激素分泌以及情绪等生理功能的调节^[3-4]。NPY 的生理调节功能主要通过与其受体相互作用实现^[5], 到目前为止, 已发现了 NPY 的 6 种受体亚型: Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6, 它们都是 7 次跨膜, 与 G 蛋白相偶联的速激肽受体家族成员^[6]。该研究采用 RT-PCR 法克隆猪 NPY-Y1 基因序列, 以便研究猪 NPY-Y1 受体在猪激素分泌以及发育生理功能调节中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

1.1.1 试验动物。160 日龄初情期的苏姜猪(暂定名)母猪 1 头, 体重为 80 kg, 由江苏姜曲海种猪场(江苏泰州)提供。

1.1.2 菌种、试剂。DH5 大肠杆菌为扬州大学动物科学与技术学院繁殖组保存。反转录试剂盒、高保真 Pfu DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、EcoR 限制性内切酶、胶回收试剂盒等购于大连宝生物生物工程有限公司; pGEMT easy 载体购自北京博大泰克生物工程有限公司; RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent、氨苄青霉素(Ampicillin) 为上海生工生物工程有限公司产品; 其余试剂均为上海生工生物工程技术服务有限公司的分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的采集。于江苏姜曲海种猪场选取初情期、体重大约为 80 kg 的苏姜猪运至实验室, 颈动脉放血致死, 迅速取出下丘脑放入液氮中保存、待用。

1.2.2 RNA 的提取。按 Trizol Reagent 说明书进行猪下丘脑组织总 RNA 的提取, 用紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和含量。

1.2.3 RT-PCR 扩增。根据反转录试剂盒说明书进行反转

录, 合成 cDNA 第一链。根据 GeneBank 数据库中公布的已知基因猪 NPY-Y1 受体基因(AF106081), 采用 Primer 5.0 引物设计软件进行引物设计, 序列如下:

上游引物 F: 5'-CTGGAGGCCGAGTAATAGA-3 (606 bp)

下游引物 R: 5'-TTCCTGGACCTGTATTAT-3 (-975 bp)

50 μ l 的 PCR 反应体系包括 5 μ l 10 \times 缓冲液、浓度 0.2 mmol/L dNTP 1 μ l 模板(反转录产物)、4U Taq DNA 聚合酶、1U Pfu DNA 聚合酶、15 pmol 正向和反向引物。反应条件如下: 首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 56 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 反应 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物进行常规的琼脂糖凝胶电泳分析后, 用胶回收试剂盒回收目的片段。

1.2.4 RT-PCR 产物的克隆及序列分析。RT-PCR 扩增产物的克隆按 pGEMT easy 载体说明书进行。将上述回收产物与 pGEMT easy 载体连接, 反应条件为 16 $^{\circ}$ C, 30 min。取 10 μ l 连接产物加入 200 μ l 感受态大肠杆菌(氯化钙法制备感受态细胞), 混合悬液冰上放置 30 min 后, 42 $^{\circ}$ C 水浴中热激 45 s, 迅速置于冰上冷却 2 min。然后向管中加入 1 ml LB 液体培养基(不含氨苄青霉素, Amp^r), 混匀后 37 $^{\circ}$ C 微振荡培养 1 h, 将 200 μ l 转化菌涂布于预先涂布了 40 μ l X-gal (20 ng/ml) 和 4 μ l IPTG (200 ng/ml) 的 Amp^r 平板, 经 37 $^{\circ}$ C 培养 14~16 h 后, 挑取单个白色菌落接种 1 ml 含 Amp^r 的 LB 液体培养液, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 碱裂解法抽提质粒 DNA。

经 EcoR 限制性内切酶单酶切及 PCR 鉴定后, 将含正确插入片段的重组质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定, 所获序列用 Blast 程序与 GeneBank 数据库中公布的已知基因进行序列同源性比较。

2 结果与分析

2.1 猪下丘脑组织总 RNA 的提取 将提取的猪下丘脑组织总 RNA 进行电泳检测(如图 1 所示), 电泳显示 28 S、18 S、5 S RNA 条带清晰, 28 S、18 S 的浓度比约为 2:1, 用分光光度计检测 RNA 的纯度和含量, 得到 $A_{260}/A_{280} = 1.92$, 说明提取总

RNA 的完整性良好。

2.2 NPY-Y1 基因的扩增 PCR 扩增经 30 个循环后, 取 10 μ l 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 在溴化乙锭染色后的凝胶上分别出现大小约为 370 bp 左右的单一条带(图2), 与预计结果相符。

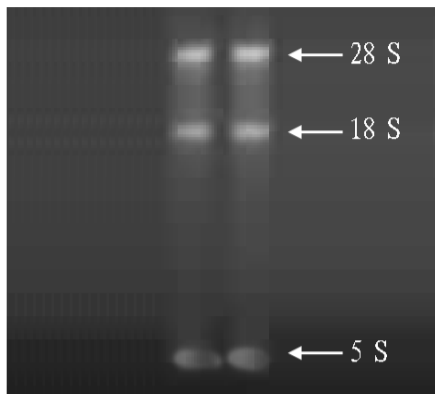
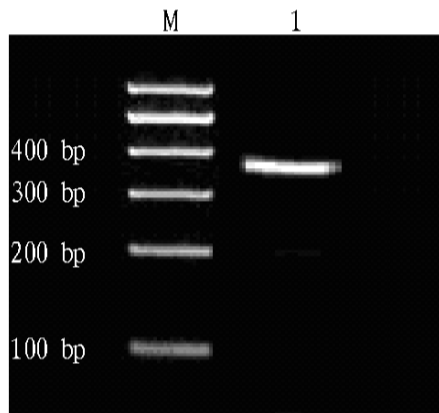


图1 猪下丘脑组织总RNA的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.1 Agarose gel electrophoresis analysis of total RNA from porcine hypothalamus



注:1, NPY-Y1 的 RT-PCR 产物; M, 100 bp DNA Marker。

Note: 1, RT-PCR products of NPY-Y1; M, 100 bp DNA Marker.

图2 RT-PCR 扩增猪 NPY-Y1 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 Agarose gel electrophoresis analysis on RT-PCR amplification products of porcine NPY-Y1 cDNA

2.3 PCR 扩增 NPY-Y1 cDNA 序列分析 将上述 PCR 产物克隆入 pGEMT easy 载体, 挑取单个菌落进行液体培养和质粒 DNA 制备。根据限制酶单酶切及 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, 将所获序列用 Blast 程序与已发表的猪 NPY-Y1 序列(AF106081) 的序列相比较, 结果显示 PCR 扩增 NPY-Y1 cDNA 与 GeneBank 已发表的猪 NPY-Y1 cDNA 序列的同源性为 100%。

3 结论与讨论

研究中采用高保真 RT-PCR 方法扩增出猪 NPY-Y1 cDNA 序列。所用的高保真 Pfu 聚合酶具有 3' 5' 外切酶活性, 可提高 PCR 反应的真实性和特异性, 而 Taq DNA 聚合酶可在 PCR 产物两端加上 1 个 A, 便于用 T 载体进行高效率的 T-A 克隆。将获得的猪 NPY-Y1 cDNA 进行序列测定, 序列分析结果与 GeneBank 已发表的猪 NPY-Y1 序列(AF106081) 同源性为

100%, 说明使用高保真 Pfu 聚合酶保证了克隆的正确性和真实性, 所获得的序列可以用于实验室后续表达丰度的研究。

神经肽 Y 是 1982 年由 Tatemoto^[7] 首次从猪脑中分离得到的, 是由 36 个氨基酸组成的活性多肽, 由于结构中富含酪氨酸故称为神经肽酪氨酸(NPY)。它的结构与同是 3 个氨基酸的胰多肽(pp) 和肽 YY(PYY) 极其相似, 故被认为同属胰多肽家族。NPY 的作用通过其分布广泛的特异受体介导, 目前已被克隆的 NPY 受体有 Y1、Y2、Y3、Y4 和 Y5 受体亚型, 均属 G 蛋白相关联受体超家族^[6]。目前研究表明猪 NPY-Y1 基因起调控作用是通过与 NPY 的 N 端氨基酸结合, Berglund 等在 1999 年研究发现当去除 NPY 的 N 端氨基酸时, 其与 NPY-Y1 的亲合力明显下降^[8]。Berglund 等在 1999 年还报道豚鼠 NPY-Y1 基因与其他公布的哺乳动物 NPY-Y1 基因的同源性可达到 92%~93%^[8], 说明哺乳动物 NPY-Y1 基因的进化较慢, 其基本功能还保持基本相同。该研究结果多方面证实试验所克隆的序列是正确的, 这为后续研究工作做了可靠的准备。

参考文献

- [1] TATEMOTO K, NEUROPEPTIDE Y. Complete amino acid sequence of the brain peptide[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79(18): 5485-5489.
- [2] CHRONWALL B M, DIMAGGIO DA, MASSARI V J, et al. The anatomy of neuropeptide-Y containing neurons in rat brain[J]. Neuroscience, 1985, 15(4): 1159-1181.
- [3] COLMERS W F, BLEAKMAN D. Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons[J]. Trends Neurosci, 1994, 17(9): 373-379.
- [4] GRUNDEMAR L, HAKANSON R. Neuropeptide Y effector system: perspectives for drug development[J]. Trends Pharmacol Sci, 1994, 15(5): 153-159.
- [5] GEHLERT D R. Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity[J]. Neuropeptides, 1999, 33(5): 329-338.
- [6] LARHAMMAR D. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide[J]. Regulatory Peptides, 1996, 65(3): 165-174.
- [7] TATEMOTO K, CARLQUIST M, MUTT W. Neuropeptide Y: a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide[J]. Nature, 1982, 296(10): 659-660.
- [8] BERGLUND M M, HOLMBERG S K, ERIKSSON H, et al. The cloned guinea pig neuropeptide Y receptor Y1 conforms to other mammalian Y1 receptors[J]. Peptides, 1999, 20(9): 1043-1053.
- [9] WANG Y H, LI B, WANG D, et al. Construction of midgut tissue-specific cDNA library of Bombyx mandarina. Molecular cloning and sequence analysis of serine protease gene fragment[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3): 35-38.
- [10] 杨洁, 张丽梅, 刘殿武. 猪囊尾蚴一种蛋白抗原的 cDNA 分子克隆[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2004, 16(4): 285-288.
- [11] WANG D Z, LI Q, LI R P, et al. Cloning and analysis of 5' flanking region of sporamin A gene from sweet potato[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 54-57.
- [12] 沈斌, 高荣, 孟民杰, 等. 猪带绦虫抗原基因 TS76 的克隆及原核表达[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(2): 61-65.
- [13] JIN C M, ZHANG S F, YUL Z. Cloning and bioinformatics analysis of P23 gene from Theileria sergenti[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3): 56-58, 84.