

小鼠催乳素释放肽的初步克隆

朱河水, 都军霞, 王新卫, 王月影, 王艳玲

(河南农业大学 动物生理生化实验室, 河南 郑州 450002)

摘要:为克隆并分析小鼠催乳素释放肽基因,从小鼠下丘脑提取总 RNA,进行 RT-PCR,PCR 产物与 pMD-19T 连接后转化 *E. coli* DH5 α ,检测阳性克隆并测序。测序结果表明,所得序列与大鼠催乳素释放肽编码区序列的相似指数为 86.3%。克隆所得序列为小鼠催乳素释放肽的基因片段。

关键词:小鼠;催乳素释放肽;克隆;序列

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2007)06-0199-02

Primary Cloning of Mouse Prolactin-releasing Peptide cDNA

ZHU He-shui, DU Jun-xia, WANG Xin-wei, WANG Yue-ying, WANG Yan-ling

(Lab of Animal Physiology & Biochemistry Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract:To clone and analyse mouse prolactin-releasing peptide. Total RNA was extracted from hypothalamus and amplified by RT-PCR. The PCR products were ligated into the pMD-19T vector, and then transformed into competent cells of *E. coli* DH5 α . The positive cloning was sequenced and analyzed. The cloned nucleotide sequence shared 86.3 % homology with the code zone sequence of rat prolactin-releasing peptide. The cloned nucleotide sequence was part of mouse prolactin-releasing peptide gene.

Key words: Mouse; PrRP; Cloning; Sequence

催乳素释放肽(Prolactin releasing peptide, PrRP)于 1998 年由日本学者 Hinuma S 首先从牛下丘脑提取物中分离出来,是 hGR3 受体的配体。早期研究发现 PrRP 能够有效地促进大鼠垂体前叶细胞释放催乳素,而对其他垂体激素的释放和分泌没有影响,于是被命名为催乳素释放肽^[1]。

随着研究的深入,人们发现 PrRP 在脑中分布广泛,与其他神经元存在着类似突触的联系^[2-4]。PrRP 的作用也不仅限于促进垂体催乳素的释放,对体内其他激素的释放也有一定的作用,同时影响着动物的摄食、能量平衡、应激、睡眠等相关生理活动^[5-7]。因为 PrRP 在体内的确切生理作用还不太明确,所以成为目前国内外信号肽研究方面的热点之一。

目前,国内外对人、牛、大鼠和绵羊催乳素释放肽的基因进行了探讨和研究,而对小鼠 PrRP 基因还没进行相关的研究,本试验以下丘脑为样本对小鼠催乳素释放肽基因进行了初步克隆和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 RNAout、DEPC、AMV 反转录酶、RNase-Inhibitor、5 \times buffer、OligdT、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、10 \times buffer(一)、MgCl₂、6 \times buffer、DNA Marker、琼脂糖、氯仿、异丙醇、乙醇均为分析纯试剂。

1.1.2 仪器 Sigma3k30 高速冷冻离心机、梯度 PCR 仪、DYY-II 型稳压稳流电泳仪、Tanon Gis-1000 凝胶成像分析系统、LRH-150B 生化培养箱等。

1.1.3 PrRP 引物 PCR 引物由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 样品总 RNA 的提取 按常规方法提取小鼠下丘脑组织中的 RNA。

1.2.2 RT-PCR 反应体积 20 μ L; 反应条件: 42 $^{\circ}$ C 60 min, 72 $^{\circ}$ C 15 min, 冰浴 2 min。

1.2.3 PCR 扩增 反应体系: 25 μ L; 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 62 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共

收稿日期: 2007-09-20

基金项目: 国家自然科学基金(30671531)

作者简介: 朱河水(1975-), 男, 河南确山人, 博士生, 研究方向为动物生理学。

通讯作者: 王艳玲(1962-), 女, 河南内黄人, 教授, 博士生导师, 主要从事泌乳生理学研究。

30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。反应完成后,分别取 5 μL PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶、100 V、30 min 电泳。凝胶成像系统照像。

1.3.4 DNA 克隆、测序与序列分析 将 PCR 扩增产物纯化后连接到 PMD19-T 载体上,通过 JM-109 感受态细胞进行转化培养。然后取培养液培养菌液。随后用通用引物 (BcaBesT Primer M13-47) 进行 PCR,再经过电泳结果判定含有插入片段的重组子。通过通用引物的鉴定,挑选出有扩增条带的且最亮的一管菌液进行测序。DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成,序列分析软件为 DNA Star。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

经 PCR 扩增获得约 262 bp 的预期扩增产物 (图 1)。

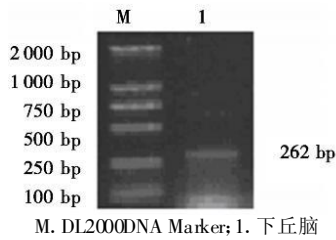


图 1 PCR 产物

Fig. 1 The PCR product

2.2 克隆片段的序列测定及分析

测序结果表明,获得了小鼠 PrRP 的部分片段。PCR 产物长 262 bp,与大鼠催乳素释放肽编码区序列的相似指数为 86.3% (图 2)。

碱基序列 : GACCTGGCTTCTGTGCTTGTGCTGCTAGGCTTAGTCCTCCAGGAGCTT 50
碱基序列 : CCAGCCGAGCCACCACTCCATGAGACCCGACCCCTGACATCAAT 100
碱基序列 : CCTGCCTGCTACACGGCTCTGGGATCAGGCCTGTGGCCGCTTCGGGAG 150
碱基序列 : GAGGAGGCCAGCCCTGAGGATCTCACCGACCTGGCCTGCCGTCCCGC 200
碱基序列 : TAAGCTGCTTCCCACTGGATGGAAGTCCCAAGTTCTCTCACAGCTCGAGA 250
碱基序列 : AGACAGTCTCTC 262

图 2 所得核苷酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequences

3 结论与讨论

牛、人、大鼠、绵羊 PrRP cDNA 编码区分别有 297, 264, 252, 297 个碱基,各自编码的催乳素释放肽原含有 98, 87, 83, 98 个氨基酸残基。虽然不同种属动物的催乳素释放肽原的氨基酸长度不完全一样,但经过剪切修饰都形成两种活性形式,分别具有 31 和 20 个氨基酸:PrRP-31 和 PrRP-20^[1, 8-10]。

河南农业大学动物生理生化实验室对小鼠的 PrRP 进行了前期的探讨工作,从小鼠下丘脑、延髓提取 RNA,并利用 RT-PCR 技术克隆出了小鼠 PrRP 的部分片段。对此片段进行了测序并与其他哺乳动

物 PrRP cDNA 的开放性阅读框 (ORF) 进行了比较。克隆出的小鼠 PrRP cDNA 片段为 262 bp,与大鼠 PrRP ORF (252 bp) 的相似指数为 86.3%,与人 PrRP ORF (264 bp) 的相似指数为 75.9%,与绵羊 PrRP ORF (297 bp) 的相似指数为 70.1%,与牛 PrRP ORF (297 bp) 的相似指数为 68.9%。小鼠 PrRP cDNA 片段的核心区域与大鼠 PrRP cDNA 核心区域相差 3 个碱基:

大鼠: CGCGGATCAGGCCTGTGGCCGCTTCGGCAGG
AGAAGGGCA

小鼠: CGTGGGATCAGGCCTGTGGCCGCTTCGGGAGG
AGGAGGGCA

但推导出的氨基酸序列和大鼠及人、牛、绵羊的氨基酸序列一样,为 RGIRPVGRFGRRA,此氨基酸序列为哺乳类 PrRP 的保守序列和特征序列,可进一步修饰为 RF 肽。进一步的 NCBI BLAST 比较显示此片段为小鼠催乳素释放肽 cDNA 序列片段。

参考文献:

- [1] Shuji Hinuma, Yugo Habata, Ryo Fujii, *et al.* A Prolactin-releasing peptide in the brain [J]. *Nature*, 1998, 393: 273—276.
- [2] Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, *et al.* Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(5): 2326—2333.
- [3] Fujiwara K, Matsumoto H, Yada T, *et al.* Identification of the prolactin-releasing peptide-producing cell in the rat adrenal gland [J]. *Regul Pept* 2005, 126(1—2): 97—102.
- [4] Fujii R, Fukusumi S, Hosoya M, *et al.* Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor [J]. *Regul Pept* 1999, 83(1): 1—10.
- [5] Vergoni A V, Watanabe H, Guidetti G, *et al.* Effect of repeated administration of prolactin releasing peptide on feeding behavior in rats [J]. *Brain Res* 2002, 955(1—2): 207—213.
- [6] Zhang SQ, Inoue S, Kimura M, *et al.* Prolactin-releasing peptide is a potent mediator of stress responses in the brain through the hypothalamic paraventricular nucleus [J]. *Neuroscience*, 2006, 141(2): 1069—1086.
- [7] Zhang SQ, Inoue S, Kimura M. Sleep-promoting activity of prolactin-releasing peptide (PrRP) in the rat [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(15): 3173—3176.
- [8] Masanobu Yamada, Atsushi Ozawa, Sumiyasu Ishii, *et al.* Isolation and Characterization of the Rat Prolactin-Releasing Peptide Gene: Multiple TATA Boxes in the Promoter Region [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 281(1): 53—56.
- [9] Curlewis J D, Kusters D H, Barclay J L, *et al.* Prolactin-releasing peptide in the ewe: cDNA cloning, mRNA distribution and effects on prolactin secretion in vitro and in vivo [J]. *J Endocrinol*, 2002, 174(1): 45—53.
- [10] Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP [J]. *Peptides*, 2006, 27(5): 1073—1086.