

猪 Reg3 基因的克隆与序列分析

李文林, 陈福伟, 王伟杰, 韩立强, 王月影, 李宏基, 刘红亮, 杨国宇

(河南农业大学 动物生理生化实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 在猪的肠道组织中克隆 Reg3 基因, 提取总 RNA 利用设计的引物进行 RT-PCR PCR产物与 pMD-19T载体连接后转化 E. coli JM109 检测阳性克隆、测序并进行序列分析。结果表明: 克隆的猪 Reg3 基因与人、绵羊、马的同源性分别为 83.7%, 82.3%, 82.2%; 克隆了猪 Reg3 全长基因并注册 GenBank 注册号为 Accession FJ531494。

关键词: 猪; Reg3 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)02-0055-03

Molecular Cloning and Sequence Analysis of Porcine Gene Reg3

LI Wen-lin, CHEN Fu-wei, WANG Wei-jie, HAN Li-qiang, WANG Yue-ying

LI Hong-ji, LIU Hong-liang, YANG Guo-yu

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

Abstract: In order to clone and analyze the gene Reg3 in intestinal canal tissues of pig, the total RNA was extracted and mRNA sequence of Reg3 gene was amplified by RT-PCR method which used two designed primers. The PCR products were ligated into the pMD-19T vector, and then transformed into competent cells of E. coli JM109. The sequence was analyzed to identify the recombinant plasmid. The identification analysis showed that the Reg3 nucleotide sequence shared 83.7%, 82.3% and 82.2% homology with that of human, sheep and horse respectively, revealing porcine Reg3 gene had been successfully cloned in the present study. The sequence has been submitted to GenBank (Accession FJ531494).

Key words: Pig; Reg3 gene; Molecular cloning; Sequence analysis

再生基因家族 (Reg family) 于 1988 年首次由 Terazono 等^[1]从大鼠再生胰岛的 cDNA 文库分离得到, 属于钙依赖性凝集素超家族 (C-type lectin super family)^[2], 其编码的一种分泌蛋白可以刺激胰岛 β 细胞的生长。有研究发现, Reg 蛋白可能不仅对 β 细胞再生起关键作用, 而且还在哺乳动物其他生理和病理活动中起调节作用, 如对肝脏、胃肠道、胰腺细胞起促增殖, 抗凋亡作用^[3], 此外, 与糖尿病、炎症和创伤也有关^[4]。根据 Reg 基因编码蛋白的一级结构, Reg 家族可分为 4 个亚型: Reg1、Reg2、Reg3、Reg4, 所有 Reg 家族具有相似的基因结构, 均含有 5 个内含子和 6 个外显子, 编码 158~175 个氨基酸的分泌蛋白^[5]。

Reg3 基因 (Regenerating islet-derived family

REG 或 Reg) 是再生基因家族成员之一, 编码 19 kDa 的分泌和可溶性的蛋白, 特异性地表达于正常小肠、升结肠、胰腺, 在胰高血糖素导致的小肠胰管的内分泌细胞和肿瘤性的内分泌细胞中也均有表达^[6]。在健康动物肠道内, Reg3 被证明具有抗炎和抗菌性能, 可能协调肠道共生微生物的稳态或减轻炎症反应^[7-9]。鉴此, 本试验克隆了猪 Reg3 基因并进行了序列分析, 旨在为进一步研究猪 Reg3 的体外表达及其生物学功能等奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验于 2009 年在河南农业大学动物生理生化实验室内进行。试验所用 RNA 抽提试剂 Trizol

收稿日期: 2010-06-13

基金项目: 国家科技攻关计划子课题 (2006BAD04A03-10)

作者简介: 李文林 (1983-) 男, 山西朔州人, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

通讯作者: 杨国宇 (1966-) 男, 河南新野人, 教授, 博士, 主要从事动物生理生化研究。

oligo d(T)₁₉载体、dNTP mix TaKaRa Agase Gel DNA Purification Kit Ver 2.0等购于 TaKaRa公司。2×Taq PCR Master Mix(含染料)购于 TIANGEN公司。

1.2 Reg β 基因的克隆

1.2.1 引物设计与合成 依据电子延伸序列设计了一对引物,进行猪的 Reg β 基因扩增。引物由 TaKaRa公司合成。引物序列如下:上游引物:5'-CTCAGATCCCTGCAATACAG-3',下游引物:5'-TCG-CAGCAGAATCAGGAAGC-3'。

1.2.2 组织中总 RNA的提取 取猪的肠道组织0.1 g用 Trizol试剂按常规方法抽提总 RNA 溶解于 DEPC水中备用。

1.2.3 RT-PCR 扩增 反转录体系:DEPC水 6.5 μ L, dNTP mix 4 μ L, 5×AMV Buffer 4 μ L, oligo d(T)₁₈(50 pmol/L)1 μ L, Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, Total RNA 2 μ L, AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/ μ L) 2 μ L。反应程序为:25℃ 10 min 42℃ 60 min 72℃ 15 min 后冰浴 2 min 得到 cDNA,以此为模板进行 PCR 扩增目的基因。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 5 min 95℃ 变性 30 s 52℃ 退火 40 s 72℃ 延伸 45 s 30个循环;最后 72℃ 延伸 10 min PCR 产物用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,用 TaKaRa Agase Gel DNA Purification Kit Ver 2.0进行纯化。

1.2.4 DNA序列测定 将 PCR 扩增产物纯化后在 16℃连接到 pMD-19T上,转化 CaCl₂法制备的 E. coli JM109感受态细胞,加入 SOC培养基,37℃振荡培养 1 h 取细胞悬液涂布于含 Amp的 LB琼脂平板培养基 37℃倒置培养过夜。进行蓝白斑筛选,挑选单一白色菌落于含 Amp的培养基中振荡培养,用 PCR 法确定阳性克隆,挑选 3管阳性菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.5 序列分析 在 National Center for Biotechnology Information (NCBI)数据库中运行 BLAST、Laser-gene及 BioXM软件分析。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增及克隆结果

以猪肠道组织中的总 RNA为模板,利用 Reg β 的上下游引物,采用 RT-PCR的方法,扩增得到相应的基因。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,得到了长度为 589 bp的目的片段(图 1)。将此 PCR 扩增产物进行回收纯化后,与 pMD-19T连接,构建克隆载体。转化到经 CaCl₂法制备的 E. coli JM109感受态

细胞后,进行蓝白斑的挑选,进行菌液 PCR 筛选阳性克隆(图 2)。

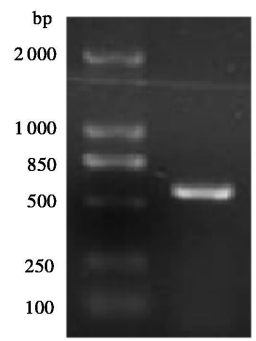


图 1 RT-PCR 扩增片段电泳图谱

Fig 1 Electrophoresis analysis of *Sus scrofa*

Reg β RT-PCR product

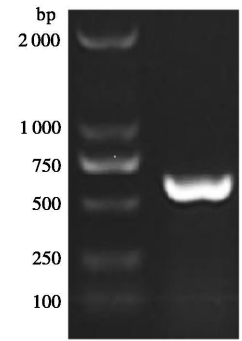


图 2 阳性菌落克隆的 PCR 鉴定结果

Fig 2 Electrophoresis analysis of

PCR products of positive clone

2.2 猪 Reg β 的 cDNA 序列

测序结果表明,克隆的猪 Reg β 基因包含一个完整的开放阅读框架(Open reading frame ORF),全长为 528 bp 其中酸性氨基酸为 27个,碱性氨基酸为 14个,分子量为 19.44 kDa 等电点为 5.11。

```
1      ctccagatccctgcaatacagacatgatgctgccttccatgagcctgccacgctgtcctg
      M M L P S M S L P S L S W
61     gatgctgctgtcctgctgctgatgctcctgtctcagggtccaaaggatgaagattccccagaga
      M L L S C L M L L S Q V Q G E D S P A D
121    cagccctctgcacggatcagctgtcccaaggctccatggcctatgcttctactgcta
      T P S A R I S C P K G S M A Y A S Y C Y
181    tgccttgtttataacacccaaaacctggatggatgcagacatggcctgccagaagcggcc
      A L F I T P K T W M D A D M A C Q K R P
241    ctccaggacacctgcgctgtgtgctcagtgaggctgagggatccttctgtcctcctgat
      S G H L A S V L S G A E A S F V S S L I
301    caagaacaattgaacgccctctcagacgtctggattgggctccacgacccaccgaggg
      K N N L N A L S D V W I G L H D P T E G
361    ctggagcccaatgctggtgagtgaggtagctctgatgtgctcaattacgttgc
      L E P N A G G W E W S S S D V L N Y V A
421    ctggagagagaacccctccaccagctcatacctggctactcgggagcctgtcaagaaa
      W E R N P S T S S Y P G Y C G S L S R N
481    cacaggatattctgaattggagagattataactgctatgtgaattaccctatgtctgaa
      T G Y L K W R D Y N C Y V N L P Y V C K
541    gtccaaggactagggtcagagaggatgtcagcttctctgattctgctgcga
      F K D *
```

图 3 猪 Reg β 基因的 cDNA 序列及其推测的氨基酸序列

Fig 3 Nucleotide sequence and extrapolated amino acid sequences of the porcine Reg β

2.3 猪 Reg3 基因 cDNA 序列的种属差异

Lasergene分析发现, 猪 Reg3 基因 (GenBank FJ531494) 的 ORF 与人 (GenBank NM_198448)、绵羊 (GenBank NM_001038014) 和马 (GenBank XM_001498136) 的同源性 (identities) 分别为 83.7%, 82.3%, 82.2%。

2.4 猪 Reg3 基因的种属差异

猪 Reg3 与人、绵羊和马的基因进化方面的关系可见图 4。由图 4 可知, 猪 Reg3 的序列与人、绵羊和马在基因进化方面, 人和马的同源性最高, 两者与猪的同源性次之, 和绵羊的同源性最低。猪 Reg3 基因预测的氨基酸序列与人、绵羊和马的同源性分别为 71.4%, 68.8%, 73.9%。由此可见, 牛的 Reg3 基因与人和马的 Reg3 的分子进化距离最近, 亲缘关系最密切。

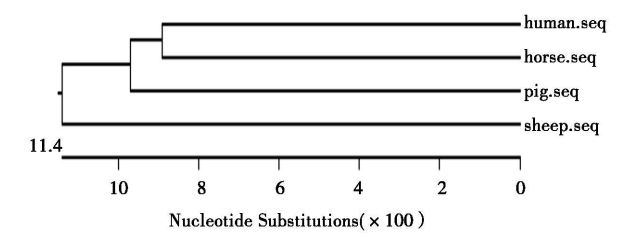


图 4 猪 Reg3 基因和其他动物的 Reg3 基因的进化树
Fig 4 Phylogenetic tree of porcine Reg3 and other mammalian Reg3

3 讨论

本试验以猪的肠道组织总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 的方法克隆得到猪的 Reg3 基因, 长度为 589 bp 具有编码 176 个氨基酸的完整的 ORF。对猪推导的 Reg3 氨基酸序列分析发现, Reg3 的氨基末端有一个由 27 个氨基酸残基构成类似信号肽的结构, 含有跨膜螺旋。在系统进化树上, 猪的 Reg3 与人和马的同源性最高, 和绵羊的同源性较低。

根据蛋白质的序列特征, 哺乳动物的 Reg 家族蛋白应属于 C 型凝集素超家族。C 型凝集素超家族是一类表达于细胞表面的受体, 都具有胞外的识别碳水化合物的结构域 (Carbohydrate recognition domain CRD), 其配体识别的过程往往是 Ca 依赖性的。C 型凝集素在细胞外基质和胞膜上与细胞吞噬、补体活化、病原体识别有关。Reg 家族蛋白是可溶性蛋白, 并不结合碳水化合物, 可能具有独特的功能。Reg 基因家族 4 个亚型从碱基与氨基酸序列具有高度同源性, 并且都具有单个 C2 型凝集素糖基识别区, 但各自又具有不同的结构特点, 从而表现不同的功能^[10]。相关文献报道^[8], Reg3 可以附着在

细菌细胞表面, 且具有结合甘露聚糖的能力, 表明它们结合细菌活性类似甘露糖结合凝集素, 可以推测 Reg3 具有抗肠道微生物活性, 但需进一步研究。

本试验利用 RT-PCR 方法首次扩增出猪 Reg3 基因序列, 通过同源性比较可知猪 Reg3 基因编码的氨基酸序列与人、马、绵羊的序列同源性比较高, 且蛋白质结构特征与人、马、绵羊的相一致, 为进一步研究猪 Reg3 的体外表达及其生物学功能等奠定了基础。

参考文献:

- [1] Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, et al. A novel gene activated in regenerating islets[J]. Biol Chem 1988 263(5): 2111—2114
- [2] Kanarainen M, Heiskala K, Knuutila S, et al. RELP, a novel human reg-like protein with up-regulated expression in inflammatory and metaplastic gastrointestinal mucosa [J]. Am J Pathol 2003 163(1): 11—20
- [3] Iovanna J L, Dagm J C. Themultifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to a shortN-terminalpeptide[J]. Biochim Biophys Acta 2005 1723(1—3): 8—18
- [4] Zhang Y W, Ding L S, Lai M D. Reg gene family and human diseases[J]. World J Gastroenterol 2003 9 (12): 2635—2641.
- [5] 郑声琴, 何杰. 再生基因家族与消化系统肿瘤 [J]. 世界华人消化杂志, 2008 16(23): 2644—2648
- [6] Hervieu V, Christa L, Gouysse G, et al. HIP/PAP, a member of the reg family, is expressed in glucagon-producing enteropancreatic endocrine cells and tumors[J]. Hum Pathol 2006 37: 1066—1075
- [7] Bernard-Perrone F R, Renaud W P, Guy-Crotte O M, et al. Expression of REG protein during cell growth and differentiation of two human colon carcinoma cell lines[J]. Histochem Cytochem 1999 47(7): 863—870
- [8] Cash H L, Whitham C V, Hooper L V. Refolding, purification and characterization of human and murine RegIII proteins expressed in Escherichia coli[J]. Protein expression and purification 2006 48(1): 151—159
- [9] Ogawa H, Fukushima K, Naito H, et al. Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model[J]. Inflammatory Bowel Diseases 2003 9 (3): 162—170
- [10] 崔巍, 刘均利, 施秉银. Reg 基因家族蛋白对胰岛 β 细胞生长的影响 [J]. 生理科学进展, 2009 40(1): 55—58