

猪神经介素 B 和受体基因的克隆与组织分布

王 静, 李宏基, 王伟杰, 武宇晓, 李 平, 张志强, 台玉磊, 臧 猛, 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: 基于电子延伸序列, 克隆并分析了猪神经介素 B (NMB) 和受体 (NMBR) 基因。猪 NMB cDNA 克隆片段长度为 567 bp, 开放阅读框架长度为 366 bp, 编码 121 个氨基酸。NMBR cDNA 克隆片段长度为 1194 bp, 开放阅读框架长度为 1173 bp, 编码 390 个氨基酸。同源分析表明, 猪 NMB 的核酸序列与牛、人、小鼠和大鼠的同源性分别为 87.1%, 85.2%, 78.1% 和 76.6%, 氨基酸序列的同源性分别为 81%, 74.4%, 70.2% 和 70.1%; NMBR 的核酸序列与牛、人、小鼠和大鼠的同源性分别为 91%, 89%, 84.2% 和 83.6%, 氨基酸序列的同源性分别为 92.3%, 90.3%, 86.9% 和 86.4%。组织分布结果显示, 猪 NMB 在多种组织均有分布, NMBR 仅分布在大脑。克隆的猪 NMB 和受体基因分别注册 GenBank (EU375564 和 EU670045)。

关键词: 猪; NMB; 受体; 克隆; 序列分析; 组织分布

中图分类号: S828 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)11-0126-05

cDNA Cloning and Tissue Distribution of Porcine Neuromedin B and Its Receptor

WANG Jing, LI Hong-ji, WANG Wei-jie, WU Yu-xiao, LI Ping,

ZHANG Zhi-qiang, TAI Yu-lei, ZANG Meng, YANG Guo-yu*

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

Abstract: The coding sequence of porcine Neuromedin B and its receptor gene were amplified based on the *in silico* sequence information in the present study. DNA sequencing and bioinformatic analysis showed that the porcine Neuromedin B gene was 567 bp long, has one open reading frame of 366 bp and encodes 121 amino acids. The length of Neuromedin BR gene was 1194 bp, which containing one open reading frame of 1173 bp and encoding 390 amino acids. Compared to bovine, human, mouse and rat, the nucleotide homology of porcine Neuromedin B was 87.1%, 85.2%, 78.1% and 76.6%, respectively. The homology of amino acid sequence was 81%, 74.4%, 70.2% and 70.1%, respectively. As for the gene of porcine Neuromedin BR, the nucleotide homology was 91%, 89%, 84.2% and 83.6%, while the amino acid sequence homology was 92.3%, 90.3%, 86.9% and 86.4%, respectively. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the neuromedin B gene ubiquitously expressed in various tissues tested, while the gene of Neuromedin BR preferentially expressed in the brain. The sequences of porcine Neuromedin B and its receptor gene were submitted to the GenBank (EU375564 and EU670045).

Key words: Porcine; NMB; Receptor; Cloning; Sequence analysis; Tissue distribution

蛙皮素是下丘脑分泌的与厌食作用有关的一种物质。蛙皮素样多肽与调节各种行为有关, 比如自

发活动和觅食^[1]。神经介素 B (NMB) 是哺乳动物体内蛙样多肽的一种, 最初从猪脊髓中纯化出来, 目

收稿日期: 2008-07-30

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (0523010500)

作者简介: 王 静 (1981-), 女, 河南社旗人, 硕士, 主要从事动物生物化学研究工作。

通讯作者: 杨国宇 (1966-), 男, 河南新野人, 教授, 博士, 主要从事动物生物化学研究工作。

前已被证明在中枢神经系统和胃肠道中存在。蛙皮素及其相关多肽有不同的生理效应,这些效应包括调节外分泌和内分泌、平滑肌收缩、哺乳及细胞生长等^[2,3]。NMB通过结合细胞表面受体发挥作用。神经介素B受体(NMBR)已被证实是一种具有高亲和力的受体,NMBR带有7个跨膜区的G蛋白偶联受体,与主动肌结合;几个胞内信号级联包括磷脂酶的活化、钙动员和蛋白激酶C(PKC)活化,从而导致基因的表达、DNA合成或细胞效应等。NMBR已被证明在几个脑区,特别是在嗅觉区、丘脑区以及胃肠道中存在^[4,5]。

近年来,Bouchard等^[6,7]研究表明,NMB多态性可能与人体肥胖和糖尿病有关。Hoggard等^[8]证实NMB在脂肪组织中高效表达,并受机体能量水平的调节,提示NMB可能作为一种脂肪因子参与脂肪代谢的调节。试验利用RT-PCR技术克隆并测定了猪神经介素B和受体核酸序列,初步检测了其在组织中的分布,为进一步了解其生物学功能提供了依据。

1 材料和方法

1.1 酶与试剂

Oligod(T)、AMV反转录酶、RNA酶抑制剂、Takara EX Taq Polymerase HS、pMD-19T载体、dNTP-mix、Takara Agaose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、Takara Mini Best Plasmid Purification Kit Ver. 2.0等,均购于大连宝生物工程有限公司。动物RNAout购于绵阳高新区天泽基因工程有限公司。

1.2 NMB和受体基因的克隆

1.2.1 引物设计与合成 依据电子延伸序列设计了2对引物,进行猪的NMB和受体基因的扩增。NMB引物序列为:上游引物:5'-CATGACCCT-GCGGGCTAGG-3',下游引物:5'-GAAGCAAGACATACAGCAGGGACG-3';NMBR引物序列为:上游引物:5'-ATGCCCCCAAGTCTCTTTTC-3',下游引物:5'-TAGTGAGCTGAATGGCCAAATC-3'。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2.2 组织中总RNA的提取 提取猪心、肝、脾、肺、肾、膀胱、大脑、小脑、胃、空肠、回肠、结肠、甲状腺、肌肉、脂肪15个组织各0.1g,采用RNAout提取总RNA,溶解于DEPC水中备用。

1.2.3 RT-PCR扩增 反转录体系:DEPC水6.5μL、dNTP-mix 4μL,5×AMV Buffer 4μL,

Oligod(T)(50pmol/L) 1μL, Ribonuclease Inhibitor (40U/μL) 0.5μL, Total RNA 2μL, AMV Reverse Transcriptase XL (5U/μL)2μL。反应程序为:25℃ 10min, 42℃ 60min, 72℃ 15min,冰浴2min,得到cDNA,以此为模板进行PCR扩增目的基因。

NMB PCR反应程序为:95℃预变性5min;然后95℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸45s,30个循环,最后72℃延伸10min。

NMBR PCR反应程序为:95℃预变性5min;然后95℃变性30s,54℃退火30s,72℃延伸75s,30个循环;最后72℃延伸10min。PCR产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,用Takara Agaose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0进行纯化。

1.2.4 DNA序列测定 将PCR扩增产物纯化后连接到pMD-19T上,转化到CaCl₂法制备的*E.coli* JM109感受态细胞中。序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2.5 序列分析 在NCBI网站中运行BLAST、SignalP 3.0 Server及BioXM软件分析。

1.2.6 NMB和受体基因表达的组织特异性 提取猪上述15个组织的RNA作RT-PCR,扩增片段用琼脂糖电泳检测。

2 结果与分析

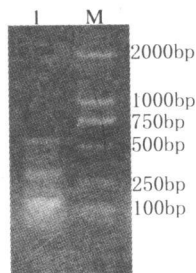
2.1 RT-PCR扩增及克隆

以猪组织中的总RNA为模板,分别利用NMB和NMBR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的结果表明,分别得到了长度为567bp和1194bp的目的片段,与预期结果相符(图1和图2)。分别将此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。

2.2 猪NMB和NMBR的cDNA序列测定

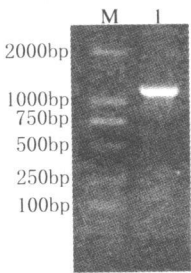
克隆的猪NMB基因全长为567bp,cDNA序列及其推测的氨基酸序列见图3,其中酸性氨基酸为12个,碱性氨基酸为24个,分子量为13.38kD,等电点为12.23。

克隆的猪NMB受体基因全长为1194bp,cDNA序列及其推测的氨基酸序列见图4,其中酸性氨基酸为53个,碱性氨基酸为43个,分子量为43.33kD,等电点为8.95。



1. NMB 目的片段;M:DNA Marker(DL2000)

图 1 NMB RT-PCR 扩增片段



M. DNA Marker(DL2000);1. NMBR 目的片段

图 2 NMBR RT-PCR 扩增片段

```
1      catgacccctccgggctaggggcctcggctgctggggcctcctcttcttcaactctgct
      M T L R A R G A R L L G G L L F F T L L
61     cgcctccggcctccggcctccggcctcagctgggctctccgggacccctcgaagccgagccgaa
      A A G A A P L S W D L P E P R S R A G K
121    gctccggctgctccggcctcgggacacatctggggccacccgctcacttctgggacgagagag
      I R V H P R G N L W A T G H F M G K K S
181    ctggagccccccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      L E P P N P S L L G T T H H I S L R D Q
241    gagctcgcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
      R L Q L S H D L L R I L L Q K K A L G L
301    gagccctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctc
      S L S G P A S H T P Y R R L L V Q T L E
361    gagctgctgctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctcgcctc
      K *
421    agcctctgagctgggacccctggctggccacacacacacacacacacacacacacacacacac
      taactccattactgtgatttctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctgg
481    tgacgtccctctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct
541    tgacgtccctctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct
```

图 3 猪 NMB 的 cDNA 序列及其推测的氨基酸序列

```
1      atgccccccccagctctcttccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      M P P K S L S N L S Q T A G V N Q S G F
61     ttccccccccctccgggacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      F P G A S E R D F L P A T D R T T A E F
121    ctgctccctctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct
      V I R C V I P S L Y L L I I T V G L L G
181    aacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      N I V L V K I F L T N S A M R S V P N I
241    ttacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      F I S N L A A G D V L L L L T O V P V D
301    cccctccctccctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
      A S R Y F L D E W M F G K V G Q K L I P
361    ctgctccctctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct
      V I Q L T S V G V S V F T L T A L S A D
421    agctccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      R Y R A I V N P M D I Q T S G A V L W T
481    ctctctccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      C V K A G G I W V V S V L L A V P E A V
541    ttctccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      F S E V A R I D G L D N G S F T A C I P
601    taacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      Y P Q T D E L H P K I H S V L I F L V Y
661    ttccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      F L I P L G I I S V Y Y Y H I A K T L I
721    aacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      K S A H N L P G E Y N E H T K K Q M E T
781    cccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      R K R L A K I V L V F V G C F V F W F
841    cccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      P N H I L Y M Y R S F N Y N E I D P S L
901    gcccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      G H M I V T L V A R V L S F C N S C V N
961    ccatttctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
      P F A L Y L L S E S F R K H F N N Q L C
1021  tccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      C G R K S Y R E R S P S Y L L L S S A V
1081  cccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      R M T S L K S N A K N I V T N S V V P N
1141  gcccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      G H S V K Q E M A L *
```

图 4 猪 NMBR 的 cDNA 序列及其推测的氨基酸序列

2.3 猪 NMB 基因 cDNA 序列和氨基酸序列的种属差异

猪 NMB 基因 (GenBank No. EU375564) 的 ORF 与牛 (GenBank No. NM001075270)、人 (GenBank No. M21551)、小鼠 (GenBank No. NM026523) 和

大鼠 (GenBank No. NM001109149) 的同源性分别为 87.1%、85.2%、78.1%和 76.6%。

猪 NMB 基因预测的氨基酸序列与牛、人、小鼠和大鼠的同源性分别为 81%、74.4%、70.2%和 70.1% (图 5)。

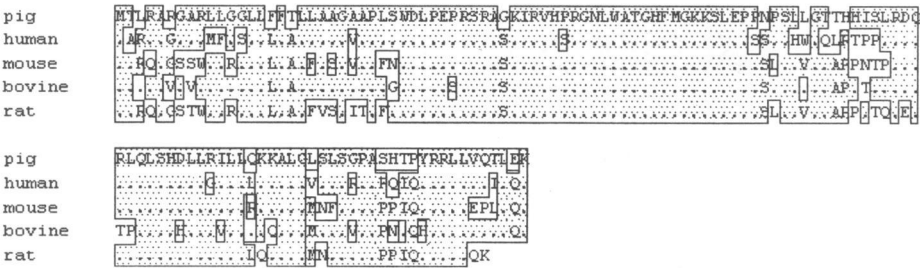


图 5 猪 NMB 氨基酸序列与人、小鼠、牛和大鼠的氨基酸序列的比较

2.4 猪 NMBR 基因 cDNA 序列和氨基酸序列的种属差异

猪 NMBR 基因 (GenBank No. EU670045) 的 ORF 与牛 (GenBank No. XM589356)、人 (GenBank No. NM002511)、小鼠 (GenBank No. NM008703) 和大鼠 (GenBank No. NM012799) 的同源性分别为 91%, 89%, 84.2% 和 83.6%。

猪 NMBR 基因预测的氨基酸序列与牛、人、小鼠和大鼠的同源性分别为 92.3%, 90.3%, 86.9% 和 86.4% (图 6)。

2.5 组织分布 RT-PCR 检测

NMB 在各组织都有分布, NMBR 仅分布在大脑 (图 7)。

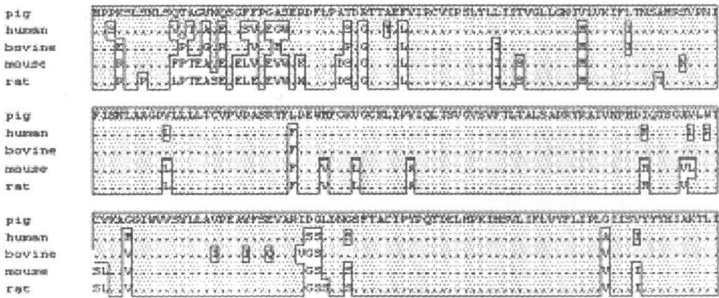
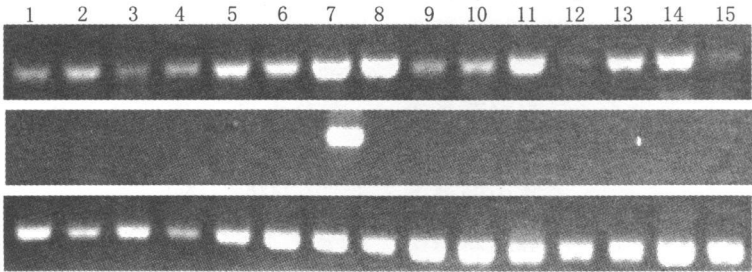


图 6 猪 NMBR 氨基酸序列与人、牛、小鼠和大鼠的氨基酸序列的比较



1. 心脏; 2. 肝脏; 3. 脾脏; 4. 肺脏; 5. 肾脏; 6. 膀胱; 7. 大脑; 8. 小肠; 9. 胃; 10. 空肠; 11. 回肠; 12. 结肠; 13. 甲状腺; 14. 肌肉; 15. 脂肪

图 7 猪 NMB 及其受体基因和 β -actin 在不同组织中的电泳图谱

3 讨论

NMB 是蛙皮素样肽家族的一个成员, 这些多肽有许多生物学效应可能与饮食行为和肥胖有关。Hoggard 等^[8] 试验证明, NMB 可能作为一种脂肪因子参与脂肪代谢的调节。NMB 作为一种神经内分泌因子, 在饮食行为和肥胖方面的研究只受到了

有限的关注, 有关其生物学功能尚不十分清楚。据报道^[9, 10], NMB 基因影响饮食行为, 并随着时间推移, 进而影响体脂肪的增加; NMB 受体在内脏脂肪细胞中表达, 内脏脂肪库在调节摄食方面起了重要作用。所以, NMB 在连接饮食行为和肥胖的关系方面是一个极好的候补基因。本试验克隆和测定了猪神经介素 B 和受体核酸序列, 初步检测了其在

家兔魏氏梭菌病的诊治

郎利敏,王克领,游 一,张立宪,张清娴
(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所,河南 郑州 450002)

中图分类号: S858.291 文献标识码: B 文章编号: 1004-3268(2008)11-0130-02

家兔魏氏梭菌病又称魏氏梭菌性肠炎,是由 A 型或 E 型魏氏梭菌引起的,多发生于断乳后至成年的家兔。该病临床上以发病急、病程短、死亡率高,病兔排出灰褐色或黑色水样粪便,盲肠浆膜有出血斑和胃黏膜出血、溃疡为主要特征。近年来,该病的发生呈上升趋势。2007 年 10 月至 12 月,我处接诊了 40 余例以腹泻为主要症状的病例,确诊为魏氏梭菌病,采用中西医结合等综合性防治措施,取得了较好的疗效。现将其主要临床症状、病理变化、实验室诊断及防治措施介绍如下。

1 临床症状

家兔魏氏梭菌病呈零星散发,患病初期家兔精

神沉郁,趴伏不动,食欲不振或废绝,饮欲增加,少数病兔腹胀。病初粪便软,不成形,很快就排灰褐色或黑色水样稀便,伴有恶腥臭味。患兔被毛粗乱,肛门周围、后肢及尾部被毛潮湿、污秽。体温通常不高,发病 2~3d 后死亡,抗生素治疗效果差。

2 病理变化

剖检可见病尸脱水、消瘦,胃内有大量内容物,胃黏膜易脱落,胃底弥漫性出血,鲜红,呈“大红布”状,有的病例可见胃壁破裂。肠壁菲薄、松弛,浆膜面有鲜红色条状或块状出血斑,肠腔内有大量灰褐色水样内容物,大肠内容物混有较多气泡。黏膜面也可见到条状或块状出血斑,肠系膜淋巴结水肿,

收稿日期: 2008-07-16
作者简介: 郎利敏(1975-),女,河南偃师人,助理研究员,本科,主要从事动物疫病防治工作。

组织中的分布,为进一步了解其生物学功能提供了一些基础资料。

参考文献:

[1] Jensen R T, Battey J F, Spindel E R. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling and functions in normal and disease states[J]. *Pharmacol Rev*, 2008, 60(1): 1—42.

[2] Boelen A, Wiersinga W M, Fliers E. Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis[J]. *Thyroid*, 2008, 18(2): 123—129.

[3] Gonzalez N, Moody T W, Igarashi H, *et al.* Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2008, 15(1): 58—64.

[4] Oliveira K J, Cabanelas A, Veiga M A. Impaired serum thyrotropin response to hypothyroidism in mice with disruption of neuromedin B receptor[J]. *Regul Pept*, 2008, 146(1—3): 213—217.

[5] Ohki Hamazaki H, Wada K, Wada E. Disruption of neuromedin B receptor gene results in dysregulation of the pituitary-thyroid axis[J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 36(1): 73—80.

[6] Bouchard L, Drapeau V, Provencher V. Neuromedin β : a strong candidate gene linking eating behaviors and susceptibility to obesity[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80: 1478—1486.

[7] Bouchard L, Bouchard C, Chagnon Y C, *et al.* Evidence of linkage and association with body fatness and abdominal fat on chromosome 15q26[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2007, 15(8): 2061—2070.

[8] Hoggard N, Bashir S, Cruickshank M, *et al.* Expression of neuromedin B in adipose tissue and its regulation by changes in energy balance[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 39(3): 199—210.

[9] James P T, Leach R, Kalamara E, *et al.* The worldwide obesity epidemic[J]. *Obes Res*, 2001, 9: 2285—2335.

[10] Yang Y S, Song H D, Li R Y, *et al.* The gene expression profiling of human visceral adipose tissue and its secretory functions[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300: 839—846.