

胃泌素 RT-PCR 方法的建立及同源性分析^{*}

张源淑, 邹思湘

(南京农业大学 农业部重点开放动物生理生化研究室, 江苏 南京 210095)

[摘 要] 从猪胃窦和十二指肠提取总 RNA, 采用美国 Ambion RNA 公司生产的 Quantum RNA classic 18S 为内标, 建立了半定量 RT-PCR 方法, 并对胃窦和十二指肠胃泌素 mRNA 进行了定量检测、测序和比较分析。结果表明, 扩增的猪胃窦和十二指肠胃泌素核苷酸序列与猪前胃泌素 (proregastrin) 核苷酸的同源性达到 99%。将其与已发表的人、牛、大鼠和小鼠等物种相应序列的比较结果表明, 无论是核苷酸水平, 还是氨基酸水平, 都显示出了较高的同源性 (80%~99%)。另外, 建立的 RT-PCR 方法灵敏度高, 操作快捷方便, 可用于定量检测少量的组织样品中低丰度表达的胃泌素 mRNA。

[关键词] RT-PCR; 胃泌素; 同源性分析

[中图分类号] Q 503

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)09-0001-04

多聚酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction PCR) 技术自问世以来, 就以其高度的灵敏性和特异性倍受分子生物学家的关注。进入 20 世纪 90 年代以后, 人们已相继建立了许多定量 PCR (quantitative-PCR) 的方法^[1,2], 同时这些方法也在科研和生产实践中得以广泛应用。

消化道作为人体最大的内分泌器官, 其中遍布着分泌胃肠激素的内分泌细胞。胃肠激素调控着消化道的分泌、运动、吸收、血流和细胞营养等功能。如果消化道分泌异常必然会影响其功能, 从而引起各种临床症状和综合症。胃泌素 (Gastrin) 是最重要的胃肠激素之一, 由胃窦和十二指肠 G 细胞分泌, 具有促进胃酸、胃蛋白酶、胰液等的分泌, 加快胃肠道运动, 促进胃和十二指肠发育等功能^[3]。胃泌素作为胃肠发育的 1 个指标, 被广泛用于比较组织学、比较内分泌学和动物发育学等学科的研究。以往的研究^[4,5]多采用放射免疫法或免疫组化法测定血液和组织中的胃泌素水平, 因为胃泌素和胆囊收缩素 (Cholecystokinin, CCK) 属同一基因家族的产物, 所以上述方法所使用的胃泌素抗体可能与 CCK 有交叉反应, 这将直接影响研究结果的可靠性^[6]。本研究试图建立灵敏、特异的胃泌素半定量 RT-PCR 检测方法, 并用其对胃泌素的同源性进行分析, 以期为从细胞水平、分子水平上研究胃泌素及其受体后的信

号传递机制提供技术上的支持。

1 材料与方法

1.1 供试动物

三元杂交仔猪 (长白猪 × 大白猪 × 二花脸和大白猪 × 大白猪 × 二花脸各半) 由江苏南京雨润良种畜禽研究中心提供。

将 6 头 28 日龄断乳仔猪剖杀, 迅速取其胃窦部和十二指肠样品各 6 个, 放入 1.5 mL 离心管中, 于液氮中速冻, -70℃ 保存。

1.2 试剂

PCR 引物, 由上海 HaoJia 公司合成。反转录酶 (AMV)、Taq DNA 聚合酶由美国 Promega 公司生产; 18 S 内标试剂盒 (Quantum RNATM Internal Standards, 1716) 为美国 Ambion RNA 公司出品。其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取与电泳 分别取约 200 mg 的胃窦组织和十二指肠组织, 用电动匀浆机彻底匀浆后, 参照《分子克隆实验指南》^[7], 用硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取 RNA, 将所得总 RNA 溶解于经焦磷酸乙二酯 (Diethylpyrocatechol, DEPC) 处理的水中, 在紫外分光光度仪上测定 RNA 的浓度和纯度。并用质量分数 1.4% 变性琼脂糖凝胶电泳, 根据

^{*} [收稿日期] 2004-12-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30070565)

[作者简介] 张源淑 (1962-), 女, 甘肃兰州人, 副教授, 博士, 主要从事动物泌乳和营养生理生化研究。

[通讯作者] 邹思湘 (1946-), 男, 江苏苏州人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物泌乳和营养生理生化研究。

28 S rRNA 和 18 S rRNA 的灰度比评价 RNA 质量。

1.3.2 PCR 引物设计和反转录(RT) 猪胃泌素 cDNA 序列来源于 GenBank, 具体为:

1 gat gga gaa c tga ggc acc a ggc caa cag c
agc aca cct g cct ccc agc t ctg cag tca a
61 gat gca gcg a ctc tgc gcc t atg tcc tga t cca
tgt gct g gct ctg gcc g cct gct ctg a
121 agc ttc ttg g aag cct ggc t tcc agc tgc a
aga tgc gtc c tca gga cca g gag cca aca g
181 ggg caa aga g cca cat gag c tgg atc ggc t

tgg ccc agc c tct cac cac c gaa ggc agc t
241 ggg gct cca g ggg ccc cct c acc tgg tgg c
aga cct ggc c aag aag cag g ggc cat gga t
301 gga gga gga a gaa gaa gca t atg gat gga t
gga ctt cgg c cgc cgc agt g ctg agg aag g
361 aga cca gcg t ccc tag aac c gag ctc cag a
gcc cag cca c ctc cta ggc c atc cca gtc c
421 agc cac atg a aag cca agt c cca ata aac t
agc ttc caa c gg

根据猪胃泌素 GenBank cDNA 序列设计的 Gastrin 引物见表 1。

表 1 Gastrin 目的基因引物参数
Table 1 Parameters of oliga-nucleotide primer pairs for the target genes

cDNA 序列分析 cDNA sequence reference	目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequence	产物 Product
GenBank	Sense	5 'TCT GCG CCT ATG TCC TGA T-3 '	300 bp
	Antisense	5 'GAC GCT GGT CTC CTT CCT C-3 '	

每一样品各取 5 μg 总 RNA 进行反转录(RT), 反应总体积为 50 μL, 其中, 10 ng/μL 随机引物 pd (T) 10 (Boehringer Mannheim GmbH, Germany), 0.5 mmol/L dNTP, 1×RT Buffer, 3 U RNase Inhibitor, 25 U 反转录酶(AMV)。样品总 RNA 在 RT 反应前, 80℃ 变性 5 min, 4℃ 5 min, 冰上放置 5 min, 加好各反应成分于 42℃ 反应 60 min; 95℃ 灭活 5 min; 4℃ 5 min, RT 产物在-20℃ 保存备用。

1.3.3 RT-PCR 扩增 PCR 反应总体积为 50 μL, 其中 10×PCR buffer 5.0 μL; 25 mmol/L MgCl₂ 4.0 μL; 10 mmol/L dNTP 1.0 μL; 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL; RT 产物 2.0 μL; Gastrin 引物 2.0 μL; ddH₂O 35.8 μL。扩增反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

RT-PCR 扩增后, 取 20 μL PCR 产物在质量分数 2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳。图像处理及灰度分析在 Kodak ID 分析系统上进行。所用 PCR 仪为 Gene Amp PCR System 9600 (由 PE 公司生产)。

1.3.4 PCR 条件的建立 随机抽取 4 个反转录产物管(胃窦 2 个, 十二指肠 2 个), 各做 2 个平行管, 按上述条件加入各成分。另取 1 管将 RT 产物换成 2.0 μL 水(H₂O)作为阴性对照; 再取 2 管将 Gastrin primer 换成 18 S rRNA 作为阳性对照(18 S 对照)。扩增反应条件同上。

1.3.5 序列分析 随机抽取 2 个反转录产物做胃泌素 PCR, 对 PCR 成功的扩增产物进行测序, 并鉴定其同源性。测序由上海 TaKaRa 宝生物有限公司完成, 测序号为 NSJ1200。将所得到的 DNA 序列与 GenBank 数据库中已知的胃泌素相应序列进行序列同源性比较和分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取分离结果

所分离胃窦组织总 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8~1.9, 琼脂糖凝胶电泳后, 可见 2 条清晰的 18 S 和 28 S RNA 条带(图 1), 说明本试验所提取的胃窦组织总 RNA 是完整的, 在材料保存和提取过程中, RNA 均无降解发生。

2.2 RT-PCR 扩增产物分析

由图 2 可知, 对随机抽取的 4 个反转录产物做 RT-PCR, 扩增后都只出现 1 条带, 且无非特异性条带, PCR 产物大小与预期结果一致, 条带长度为 300 bp 左右。加 18 S 引物而未加 Gastrin 引物的管只有 18 S rRNA 条带, 未出现非特异性条带, 条带长度在 500 bp 左右, 与设计扩增的片段长度相符。阴性对照管无目的片段及非特异性条带。这一结果说明, 其反转录效果较好, 所提取的 RNA 中无基因组 DNA 存在。

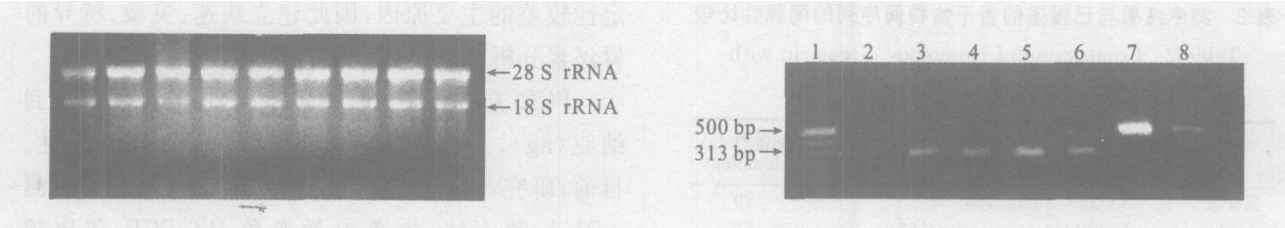


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果
Fig 1 A garose gel electrophoresis
analysis of total RNA

图 2 RT-PCR 产物电泳结果
1 DNA 分子量标记 Marker PUC19; 2 水对照管; 3, 4 胃窦
胃泌素 mRNA; 5, 6 十二指肠胃泌素 mRNA; 7, 8 18 S 对照管
Fig 2 Result of RT-PCR
1 DNA marker; 2 H₂O control; 3, 4 Gastrin mRNA in stomach;
5, 6 Gastrin mRNA in duodenum; 7, 8 18 S control

2 3 扩增产物的测序结果
对扩增成功的 RT-PCR 产物进行测序, 结果表

明扩增的猪胃窦和十二指肠胃泌素核苷酸序列大小
均为 276 bp, 其碱基编码序列如下。

AGN TNA ACT ATG ACC ATC C ATC CAT ATG C TTC TTC TTC C TCC TCC ATC C ATG GCC CCT G CTT CTT GGC C
AGG TCT GCC A CCA GGT GAG G GGG CCC CTG G AGC CCC AGC T GCC TTC GGT G GTG AGA GGC T GGN CCA AGC
C GAT CCA GCT C TGT GGC TCT TTG CCC CTG T TGG CTC CTG G TCC TGA GGA C GCA TCT TGC A GCT GGA AGC
C AGG CTT CCA A GAA GCT TCA G AGC AGG CGG C CAG AGC CAG C ACC AGG ATC A GGA CAT AGG C GCA GAA

将本研究的测序结果 (pig Gas) 通过 Blast 软件
与 GenBank 中的现有序列进行同源性比较分析, 结
果在 GenBank 中找到与其同源性达到 99% 的猪前

胃泌素基因 (图 3)。这说明本试验采用的 RT-PCR
的特异性良好。

Query: 15 ccatccatccatgatgcttcttcttctcctccatccatggcccctgcttcttggccaggt 74
|||||
Sbjct: 332 ccatccatccatgatgcttcttcttctcctccatccatggcccctgcttcttggccaggt 273

Query: 75 ctgccaccaggtgagggggcccctggagcccagctgccttcggtggtgagaggctggnc 134
|||||
Sbjct: 272 ctgccaccaggtgagggggcccctggagcccagctgccttcggtggtgagaggctgggc 213

Query: 135 caagccgatccagctcatgtggctctttggcccctgttggctcctggtcctgaggacgcat 194
|||||
Sbjct: 212 caagccgatccagctcatgtggctctttggcccctgttggctcctggtcctgaggacgcat 153

Query: 195 cttgcagctggaagccaggtcttccaagaagcttcagagcaggcggccagagccagca 251
|||||
Sbjct: 152 cttgcagctggaagccaggtcttccaagaagcttcagagcaggcggccagagccagca 96

图 3 测序结果的在线 Blast 软件分析结果
Query: 测序结果; Sbjct Blast 给出的结果
Fig 3 Analysis of the sequencing results by Blast on line
Query. The result of sequencing; Sbjct The result of Blast

2 4 同源性比较分析结果
由表 2 可见, 无论在核苷酸水平还是在氨基酸
水平, 猪与人、牛、绵羊、猫、大鼠和小鼠的胃泌素核
苷酸序列都存在着较高的同源性 (80% ~ 99%), 并
可以清楚地看出猪胃泌素基因序列与人相应序列的
同源性达 83%。

表 2 测序结果与已报道的若干物种间序列的同源性比较

Table 2 Comparison of Homology of gastrin with reported different species		
物种 Species	GenBank 登陆号 GenBank accession number	同源性/% Homology
猪 Pig	VO 1303 preprogastrin	99
人 Human	V 00511 1 pregastrin (G17)	83
牛 Bovine	X16581 1 Bovine mRNA for preprogastrin	85
马 Horse	U 92801 1 Ovis aries preprogastrin (GAS) gene	90
人 Human	X00183 1 gastrin gene	81
牛 Bovine	M 31657 1 Bovine gastrin gene	92
小鼠 Rat	M 38653 1 Rat gastrin mRNA, complete cds	80

3 讨 论

众所周知,胃泌素是动物胃肠道的一种古老而重要的激素,是胃酸分泌的主要调节激素,可促进消化道黏膜生长,对胃肠黏膜有营养作用,但其同时也能促进消化系统肿瘤和癌细胞的增殖。国内一般将胃泌素及其受体与脾虚症结合起来研究^[8],认为脾虚与胃泌素关系非常密切。1996 年前的研究^[9,10],主要集中在外周血中胃泌素水平的检测方面,因为在血浆中的胃泌素含量极微(100~150 pg/mL),其血浆浓度极易受各种生理因素的影响,标本中胃泌素易在蛋白酶作用下降解,这是血清胃泌素检测稳

定性较差的主要原因,因此建立快速、灵敏、特异的胃泌素分析方法十分必要。

PCR 方法具有极高的灵敏度,检测极限可达到纳克(ng),但有时会出现假阳性而影响其特异性。目前,研究者已发展了几种采用 RT-PCR 定量检测 mRNA 的方法,主要包括竞争 RT-PCR 和比较 RT-PCR。其中竞争 RT-PCR 是国际上公认的较好的定量检测方法,但测试的每个样品必须进行 6 次以上的 PCR 反应,并做出标准曲线才能定量测定,花费成本较高,且误差来源也较难控制。Northern Blot 方法需要相当量的核酸,才能产生可信的定量结果,并且技术程序也相当繁琐^[11]。因此,根据国内的研究条件,本研究应用美国 Ambion RNA 公司生产的 18 S 内标试剂盒(Quantum RNA™ Internal Standards, 1716),建立了猪胃窦和十二指肠胃泌素 mRNA 相对定量的 RT-PCR 检测方法,对扩增产物核苷酸序列进行分析,并与 GenBank 提供的猪前胃泌素原核苷酸序列进行了同源性比较,其同源性达到 99%。且与人、牛、绵羊、猫、大鼠和小鼠的胃泌素核苷酸系列均存在较高的同源性(80% 以上)。

本研究成功地建立了猪胃窦胃泌素半定量 RT-PCR 分析方法,其灵敏度高、特异性强,可用于人和动物胃泌素在体内或体外的功能和机理研究。

[参考文献]

- [1] Zamorano P L, Mahesh V B, Brann D W. Quantitation RT-PCR for neuroendocrine studies[J]. Neuroendocrine, 1996, 63: 397-407.
- [2] K hler T H, Labner D, Rost A K, et al Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction[M]. Germany Berlin Heidelberg: springer-Verlag, 1995.
- [3] 陈元方. 胃肠激素概述[J]. 中华消化杂志, 1996, 16(1): 45.
- [4] Gradwell P D, Hansky. Serum gastrin in newborn, sucking and weaned pigs[J]. Res Vet Sci, 1980, 29: 85-88.
- [5] Xu R T, Gradwell P D. Gastrin in fetal and neonatal pigs[J]. Comp Biochem Physiol B, 1991, 98: 615-621.
- [6] Thomas P, Careyal N, Peter A, et al A gastrin gene is expressed in both porcine pituitary and antral mucosal tissues[J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13(20): 7299-7305.
- [7] 萨母布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995.
- [8] 梁文妹, 石爱荣. 胚胎及新生大鼠胃肠道 5-羟色胺及胃泌素免疫反应细胞的形态学研究[J]. 解剖科学进展, 1998, 4(2): 165-168.
- [9] Kikuya K, Seichi H, Yosuke T. Molecular cloning of human gastrin precursor cDNA [J]. Gene, 1983, 26: 53-57.
- [10] 孙风蓬. 胃泌素及其相关胃肠激素的研究进展[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 2000, 20(3): 229-231.
- [11] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

(下转第 10 页)

ments[J]. FEBS Lett, 1993, 319: 189- 194

- [11] Vos P, Simons G, Siezen R J, et al Primary structure and organization of the gene for a procaryotic, cell envelope-located serine protease[J]. J Biol Chem, 1989, 264: 13579- 13585
- [12] Mulders JW, Boerrigter IJ, Rollemans H S, et al Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant[J]. Eur J Biochem, 1991, 201: 581- 584

Inhibition of nisin Z mutants with charge in hinge region

YUAN Jing, LI Yuan-rui, DU Shuang-kui, LIU Bian-fang

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To study the effect of charge in hinge region on the relation between structure and function, we changed certain amino acid of hinge region by performing site-directed mutagenesis with *nis* Z gene. The results showed that the antimicrobial activities of nine mutants decreased, while N20E nisin Z, M21E nisin Z and K22E nisin Z, introducing negative charge residue into hinge region, nearly lost the activity. Compared with wild-type nisin Z, mutant N20K nisin Z and M21K nisin Z displayed antimicrobial activity against gram-negative *Shigella*, *Pseudomonas* and *Salmonella*. Meanwhile, the data of N20K nisin Z and M21K nisin Z CD spectrum showed similarities to that of wild-type nisin Z in secondary structures. The small difference in intensity in the 210- 220 nm region between the CD spectra of the wild-type and those of the mutants showed subtle changes in the structural composition of nisin Z.

Key words: *nis* Z; the mutants with charge in hinge region; site-directed mutagenesis; spectra of antibacterial activity

(上接第 4 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)09-0005-EA

Establishment of gastrin relative quantification RT-PCR and analysis of its homology

ZHANG Yuan-shu, ZOU Si-xiang

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: RNA was extracted from stomach and duodenum in pigs. Relative RT-PCR using Quantum RNA™ 18 S internal Standards for the quantitation of Gastrin mRNA was established for examining in present study. The 99% of nuclei length of the product from RT-PCR was identical with porcine messenger RNA for preprogastrin. Comparison of this sequence with the sequences of human, bovine, mouse and rat, both nucleotide composition and codon usage amino acid comparison were more homological (80% - 99%). The result indicated that RT-PCR was much more sensitive and reliable in detecting lowly expressed mRNAs in small tissues.

Key words: RT-PCR; gastrin; homological analysis