文章编号:1000-5404(2006)21-2167-04

论著

豚鼠MCHR2基因外显子1的克隆及序列分析

杨俊霞[1,2],易发平[1],宋方洲[1],周岐新[2] (重庆医科大学:[1]生物化学与分子生物学教研室,[2]药理学教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 探明豚鼠体内MCHR2基因的表达情况,为构建动物模型提供实验依据。**方法** 利用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)方法,从新鲜豚鼠大脑组织的总RNA中扩增MCHR2基因的全长cDNA编码区序列,从豚鼠脑组织中提取基因组DNA,PCR扩增MCHR2基因外显子1的序列,克隆入pUCm-T载体后进行序列分析。**结果** RT-PCR法未获得目的片段;由基因组DNA扩增出的MCHR2基因外显子1的序列片段长183 bp,与GenBank登录的人、猴、白鼬、犬的MCHR2序列比对,在第47位后面多了一个碱基——A,由于移码错译而导致提前出现终止密码,从而缩短了预测的开放阅读框架。**结论** 豚鼠体内的MCHR2基因是无功能的假基因。

关键词: MCHR2;基因克隆;序列分析;豚鼠;肥胖
中图法分类号: Q503; Q75; Q785 **文献标识码:** A

Cloning and sequence analysis of guinea pig MCHR2 gene exon 1

YANG Jun-xia[1,2], YI Fa-ping[1], SONG Fang-zhou[1], ZHOU Qi-xin[2] ([1] Department of Biochemistry and Molecular Biology, [2] Department of Pharmacology, The Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the expression of MCHR2 gene in guinea pig and to provide evidence for animal model construction. Methods The full-length MCHR2 cDNA fragment was amplified from the total RNA of fresh guinea pig brain tissue by RT-PCR. Then the MCHR2 gene exon 1 was amplified through PCR from the genomic DNA of guinea pig brain tissue and cloned into pUCm-T vector and sequenced. Results The full-length MCHR2 cDNA fragment was not obtained by RT-PCR. The DNA fragment of MCHR2 gene exon 1 was 183 bp in length. As compared with MCHR2 sequence of human, rhesus monkey, ferret and dog in GenBank, a frameshift in guinea pig was introduced (additional A after the 47th bp), which placed a premature termination codon shortly after the frameshift, shortening the predicted open reading frame. Conclusion Guinea pig contains nucleotide sequence alteration that renders MCHR2 non-functional.

Key words: melanin-concentrating hormone receptor; cloning; sequence analysis; guinea pig; obesity

肥胖是现代社会中最常见的营养障碍性疾病,是导致心脑血管疾病、糖尿病、高血压、高脂血症以及癌症等疾病的高危因素,并且还带来多个社会问题和心理问题[1]。近年来研究表明肥胖的发生与下丘脑对摄食的神经内分泌调控密切相关,继神经肽Y、刺鼠相关蛋白、增食欲素之后,又一个增强食欲的神经肽——黑色素浓集激素(melanin-concentrating hormone, MCH)进入人们的视野,随着研究的逐步深入相继发现了MCH的2个受体亚型——MCHR1和MCHR2,从而为肥胖发生机制及防治的研究提供了新的靶点。目前,通过构建转基因和基因敲除动物模型已对MCH及MCHR1与肥胖及能量代谢的关系进行了深入细致的研究,而对于MCHR-2功能的研究则进度缓慢,迄今为止尚少见其动物模型构建成功的报道,因而无法在整体水平探明该受体与肥胖的发生发展的确切关系。多数报道已证明大鼠、小鼠及仓鼠无MCHR2表达,而豚鼠是否表达MCHR2则不明确,为此本研究在用RT-PCR方法未能从豚鼠脑组织总RNA中扩增出MCHR2基因的全长cDNA编码区序列之后,从豚鼠的脑组织中提取基因组DNA,PCR扩增出MCHR2基因外显子1的序列,再连入T载体后进行序列分析,以探明豚鼠体内MCHR2基因的表达情况,为进一步构建动物模型提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

正常豚鼠8只,体质量约200 g(重庆医科大学实验动物中心提供);总RNA抽提液TriPure购自Roche公司;RT-PCR试

作者简介:杨俊霞(1975-),女,江苏省扬州市人,硕士研究生,讲师,主要从事分子生物学和药理学方面的研究。电话:(023)68485070,E-mail:yangjunxia1234@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-11-28;修回日期:2006-01-24

剂盒购自 Promegag 公司;基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天为时代科技有限公司;质粒 DNA 抽提试剂盒、PCR 扩增试剂购自大连 TaKaRa 有限公司。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 登录的人、猴、犬、白鼬 MCHR2 基因的序列(序列号分别为:AY562946, AF513989, AY112659, AY112899),经 ClustalX 软件进行多序列比对后设计合成引物。引物由上海基康生物技术有限公司合成。扩增 MCHR2 基因的全长 cDNA 片段(1 023 bp)的上游引物:5′-ATGA ATCCATTTCACTCATCTTGTTGGAAC-3′;下游引物:5′- CTAAAAGTGTGATTTCA GAGTGTTTCC-3′。扩增 MCHR2 基因外显子 1 片段(182 bp)的上游引物:5′- ATGAATCCA TTTCACTCATCTTGTTGGAAC-3′;下游引物:5′-CTTAT TATAGTGAATACAATGAGGATGTTGCC-3′。

1.3 豚鼠脑组织总 RNA 的制备及 RT-PCR 反应

取正常豚鼠脑组织,立即置于 TriPure 裂解液中,用匀浆器研磨制成组织匀浆,按 TriPure 试剂说明书的操作步骤经氯仿分离,异丙醇沉淀,75% 乙醇洗涤后获得总 RNA 提取液,并通过电泳和测定 A 值判断总 RNA 的质和量。总 RNA 2 μl,随机引物 1 μl,5 × RT Buffer 4 μl、10 mmol/L dNTP Mix 1 μl,RNAase 抑制剂 0.5 μl,M-MLV 1 μl,无 RNA 酶水补足至 20 μl,42 ℃ 1 h进行逆转录反应,70 ℃ 10 min 使酶失活。以 GAPDH(450 bp)为内参照进行 PCR 反应,反应体系为:反转录产物 10 μl,10 × PCR Buffer 4 μl,10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μl,10 μmol/L 上下游引物各 5 μl,*Taq* 酶 1 μl,加水至 50 μl。反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 40 s,48 ~ 60 ℃ 40 s,72 ℃ 40 s,30 ~ 35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳检查。

1.4 豚鼠脑组织基因组 DNA 的提取及 PCR 反应

正常豚鼠脑组织用匀浆器研磨制成组织匀浆,按基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤依次加入细胞裂解液、蛋白酶 K 充分溶解组织,移入吸附柱,经乙醇、去蛋白液、漂洗液处理后即可获得基因组 DNA 片段。测定 A 值判断 DNA 的质和量。采用 50 μl 反应体系:模板 DNA 5 μl,10 × PCR Buffer 5 μl,$MgCl_2$ 3 μl,2.5 mmol/L dNTP Mix 4 μl,10 μmol/L 上下游引物各 2 μl,*Taq* 酶 0.5 μl,加水至 50 μl。反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 40 s,52 ℃ 40 s,72 ℃ 40 s,共 30 个循环;72℃ 延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳检查,取 200 bp 左右处的条带进行割胶回收纯化。

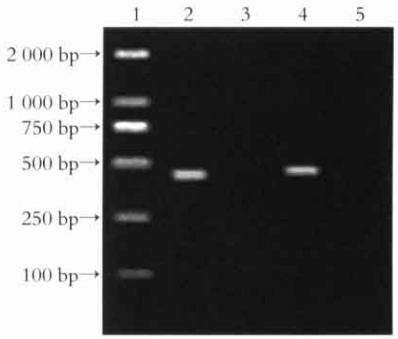
1.5 PCR 产物 T-A 克隆及测序[2]

PCR 纯化产物 1 μl,pUCm-T 载体 20 ng,10 × 连接缓冲液 1 μl,T_4 DNA 连接酶 3 U,水补足至 10 μl,14 ℃ 温育 4 h 进行连接反应,再经 42 ℃ 热休克转化 *E. coli* JM109 感受态细菌,在含 Amp 的平板上培养,挑取白色菌落进行培养扩增,质粒抽提纯化,PCR 法确认为阳性克隆。将重组质粒 DNA 分别送上海鼎安生物科技公司和大连 TaKaRa 有限公司测序,并与 GenBank 登录的人、猴、犬、白鼬的 MCHR2 外显子 1 的序列进行比较。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 MCHR2 的全长 cDNA 及外显子 1 的结果

经多次 RT-PCR 反应,琼脂糖凝胶电泳检测,均只见到内参 GAPDH 的 450 bp 长的片段,未见到 1 023 bp 的 MCHR2 基因的全长 cDNA 的目的片段以及 182 bp 的 MCHR2 外显子 1 的目的片段(图 1)。



1:DNA 标准;2:GAPDH;3:MCHR2;4:GAPDH;5:MCHR2 外显子 1

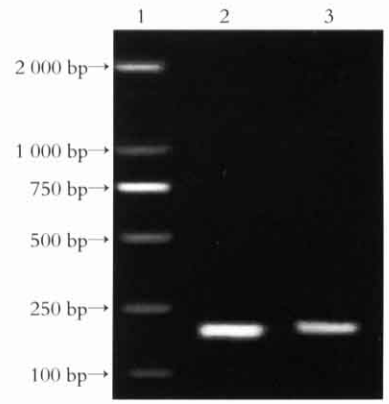
图 1 豚鼠脑组织 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.2 PCR 扩增 MCHR2 外显子 1 的结果

豚鼠基因组 DNA 经 PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳检测,可见约 200 bp 的 DNA 条带(图 2),与预计的 MCHR2 外显子 1 的片段(182 bp)相符。

2.3 重组质粒 DNA 的 PCR 鉴定结果

凝胶电泳结果表明近 200 bp 长的目的片段已成功克隆于质粒载体,并转入大肠杆菌内(图 2)。



1:DNA 标准;2:重组质粒 DNA 的 PCR 产物;3:豚鼠基因组 DNA 的 PCR 产物

图 2 豚鼠基因组 DNA 和重组质粒 DNA 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.4 测序结果

目的片段经克隆及测序获得了长 183 bp 的核苷酸序列,比预计的 182 bp 片段多一个碱基,为避免误差,分别两次进行基因组 DNA 的 PCR 扩增及克隆,并递交给两家测序公司进行测序,获得同样的结果,测序结果如下:

1- 40 ATGAATCCAT TTCATGCATC TTGTTGGAAC AACTGTGCTG
41- 80 AACTTTTAAA ACAAATTTTG GAATAAAGAG TTTGATTATC
81-120 AAACCTCCAG ATTTGTGAAT ACAGTCATTC TCC CTTCTGT
121-160 GATTGGGGCT ATCTGTTTAA TAGGACTGGT TGGCAACATC
161-183 CTCATTGTAT TCACTATAAT AAG

2.5 序列分析

豚鼠与人、猴、白鼬、犬的 MCHR2 外显子 1 的核苷酸序列

的比较如下（下划线表示不同碱基）：

豚鼠 ATG AAT CCA TTT CAT GCA TCT TGT TGG AAC 30
人　ATG AAT CCA TTT CAT GCA TCT TGT TGG AAC 30
猴　ATG AAT CCA TTT CAC TCA TCT TGT TGG AAC 30
白鼬 ATG AAT TCA CTT CAC TCA TCC TGT TGG AAC 30
犬　ATG TAT TCA CTT CAC TCA TCC TGT TGG AAC 30

豚鼠 AAC TGT GCT GAA CTT TTAA AAC AAA TTT TGG 61
人　ACC TCT GCC GAA CTT TTA　AAC AAA TCC TGG 60
猴　ACC TCT GCC GAA CTT TCA　AAC AAA TCC TGG 60
白鼬 ACC TCT GCT GAA CTT TTA　AAC AAA TCC TGC 60
犬　ACC TCT GCT GAA CCT TTG　AAC AAA TCC TGC 60

豚鼠 AAT AAA GAG TTT GAT TAT CAA ACC TCC AGA 91
人　AAT AAA GAG TTT GCT TAT CAA ACT GCC AGT 90
猴　AAT AAA GAG TTT GCT TAT CAA ACT GCC AGT 90
白鼬 AAT AAA GAA TCT GCT TAT CAA ACC CTC AGA 90
犬　AAT AAA GAG TTT GCT TAT CAC ACC CTC AGC 90

豚鼠 TTT GTG AAT ACA GTC ATT CTC CCT TCT GTG 121
人　GTG GTG GAT ACA GTC ATC CTC CCT TCC ATG 120
猴　GTT GTA GAT ACA GTC ATC CTC CCT TCC ATG 120
白鼬 ATT GTG GAT ACA ATC ATC CTC CCT TCT ATG 120
犬　ATT TTA GAT ACA GTC AGG CTT CCT TCT ATG 120

豚鼠 ATT GGG GCT ATC TGT TTA ATA GGA CTG GTT 151
人　ATT GGG ATT ATC TGT TCA ACA GGG CTG GTT 150
猴　ATT GGG ATT ATC TGT TCA ACA GGG CTG GTT 150
白鼬 ATT GGG ATT ATC TGT TCA ATG GGG CTG GTT 150
犬　ATT GGG ATT ATC TGT TCA ATG GGG CTA GTT 150

豚鼠 GGC AAC ATC CTC ATT GTA TTC ACT ATA ATA AG 183
人　GGC AAC ATC CTC ATT GTA TTC ACT ATA ATA AG 182
猴　GGC AAC ATC CTC ATT GTA TTC ACT ATA ATA AG 182
白鼬 GGC AAT GTC CTC ATT GTA TTC ACT ATA ATA AG 182
犬　GGC AAC ATC CTC ATT GTA TTC ACT ATA ATA AG 182

豚鼠与人、猴、白鼬、犬的 MCHR2 外显子 1 的氨基酸序列的比较如下：

豚鼠 1-21：MNPFHASCWNNCAELLKQILE
人　1-60：MNPFHASCWNTSAELLNKSWNKEFAYQTASVV
　　DTVILPSMIGIICSTGLVGNILIVFTII
猴　1-60：MNPFHSSCWNTSAELSNKSWNKEFAYQTASVV
　　DTVILPSMIGIICSTGLVGNILIVFTII
白鼬 1-60：MNSLHSSCWNTSAELLNKSCNKESAYQTLRIV
　　DTIILPSMIGIICSMGLVGNVLIVFTII
犬　1-60：MYSLHSSCWNTSAEPLNKSCNKEFAYHTLSIL
　　DTXRLPSMIGIICSMGLVGNILIVFTII

经基因比对分析，测序所得豚鼠脑组织 183 bp 的核苷酸片段与 GenBank 上登录的人、猴、白鼬、犬的 MCHR2 外显子 1 的核苷酸序列的同源性依次为 89.0%、87.9%、86.8%、84.1%。但是豚鼠的核苷酸片段在第 47 位后多了一个碱基——A，由此产生移码错译，并且在第 64 ~ 66 位提前出现终止密码——TAA，从而使预测的开放阅读框架缩短，仅翻译出 21 个氨基酸（人、猴、白鼬、犬的氨基酸数目均为 60 个）。

3　讨论

MCH 是由下丘脑分泌的能够增强食欲的神经肽，在调节能量平衡和体重方面起重要的作用：在瘦素或瘦素受体缺陷的肥胖鼠模型中，下丘脑 MCH 水平升高[3]；在饮食诱导肥胖鼠模型中，下丘脑 MCH 及 MCH 受体水平也明显升高[4]；大鼠与小鼠短期或长期脑室内注射 MCH，无论是正常饮食还是高脂饮食均会引起进食增加和体脂增多进而导致肥胖；MCH 基因敲除小鼠出现进食减少、代谢增强、体型瘦小、体重减轻[5]；MCH 过表达的转基因小鼠则表现为进食增多、肥胖、并伴有高血糖、高胰岛素血症以及瘦素和胰岛素耐受[6]；尚有研究表明 MCH 还与认知、记忆、焦虑和抑郁等情绪反应有关[7]；提示 MCH 在肥胖症的发生发展中扮演着重要的角色。但是，应用基因敲除技术研究 MCHR1 的功能[8,9] 发现 MCHR1 敲除小鼠并不象 MCH 敲除小鼠一样表现为进食减少进而体重减轻，而是表现为进食增多，其体重则由于活动增多和代谢增强而维持正常或略低于正常，这种差异的存在推测可能是 MCH 的另一个受体存在的缘故。那么，MCHR2 对进食行为以及体重的调控作用是否起关键作用，它与肥胖发生发展的关系如何，它是否参与了认知、记忆、焦虑和抑郁等情绪反应的调控，诸如此类有关 MCHR2 基因的生理功能就成为人们日益关注的问题，构建动物模型则成为制约其功能研究进展的重要因素，然而迄今为止尚少见到其动物模型构建成功的相关报道。

本实验室拟构建 MCHR2 基因的动物模型，观察其进食行为和新陈代谢的变化，以探明其可能的生理功能，为肥胖症的防治研究提供新的靶点。但据文献报道目前 MCHR2 只在人、恒河猴、犬、白鼬有表达，在大鼠、小鼠和仓鼠无 MCHR2 表达。而豚鼠是否表达 MCHR2 则尚不明确，为此我们用基因克隆和序列分析的方法来研究豚鼠体内 MCHR2 表达情况，为进一步构建动物模型提供实验依据。人 MCHR2 基因全长 158 kb，含 5 个外显子[10]，cDNA 全长 1 023 bp，编码具有 340 个氨基酸的蛋白质，因此我们首先以人、猴、犬、白鼬的 MCHR2 基因的全长 cDNA 编码序列进行比对后设计引物，采用 RT-PCR 方法扩增豚鼠脑组织中的 MCHR2 的全长 cDNA 片段。然而，多次 RT-PCR 反应只见到内参 GAPDH 长 450 bp 的条带，始终未能获得长约 1 023 bp 的目的片段，随后又以 MCHR2 第一个外显子序列设计引物，用 RT-PCR 方法仍未能扩增出长约 182 bp 的目的片段，推测豚鼠体内可能无

MCHR2 mRNA 表达或者表达量极低而不易扩增。因此,我们改用豚鼠基因组 DNA 为模板来扩增 MCHR2 外显子1的片段,电泳可见约 200 bp 长的条带表明获得了该目的片段,提示豚鼠体内可能具有 MCHR2 基因。经 T-A 克隆获得的重组质粒 DNA 的测序结果表明,该目的片段全长 183 bp,比预计的 182 bp 片段多一个碱基,与 GenBank 上登录的人 MCHR2 外显子1的核苷酸序列的同源性最高(89.0%),其次为猴与白鼬(分别为 87.9% 和 86.8%),与犬的同源性最低(84.1%)。但是经基因比对分析显示,豚鼠的核苷酸片段在第47位后多了一个碱基——A,由此产生移码错译,并且在第 64 ~ 66 位提前出现终止密码——TAA,即翻译至第21个氨基酸后发生终止,从而使其预测的开放阅读框架缩短,而其他物种皆可翻译出60个氨基酸,由此看来豚鼠的基因组虽然具有 MCHR2 基因的序列,但却不能转录翻译出功能性蛋白,是无功能的假基因。为避免实验性误差,我们重复进行基因组 DNA 提取、PCR 扩增及克隆等操作,并递交给另一家测序公司进行测序,仍获得相同的结果,从而证明豚鼠体内的 MCHR2 基因是无功能的假基因。是否能通过基因定点突变来改造该基因使其能在豚鼠体内表达并产生功能,以期取得新的突破,则有待进一步研究。

参考文献:

[1] WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity[R]. Geneva: World Health Organization, 1998.

[2] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂译. 北京:科学出版社, 1996: 627 - 628.

[3] QU D, LUDWIG D S, GAMMELTOFT S, *et al*. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour [J]. Nature, 1996, 380(6571): 243 - 247.

[4] ELLIOTT J C, HARROLD J A, BRODIN P, *et al*. Increases in melanin-concentrating hormone and MCH receptor levels in the hypothalamus of dietary-obese rats [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 128(2): 150 - 159.

[5] SHIMADA M, TRITOS N A, LOWELL B B, *et al*. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean [J]. Nature, 1998, 396(6712): 670 - 674.

[6] LUDWIG D S, TRITOS N A, MASTAITIS J W, *et al*. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance [J]. J Clin Invest, 2001, 107(3): 379 - 386.

[7] KATSUURA G, INUI A. Melanin-concentrating hormone as a metabolic and cognitive regulatory factor [J]. Curr Med Chem-Central Nervous System Agents, 2003, 3(3): 217 - 227.

[8] MARSH D J, WEINGARTH D T, NOVI D E, *et al*. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(5): 3240 - 3245.

[9] CHEN Y, HU C K, HSU C K, *et al*. Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity [J]. Endocrinology, 2002, 143(7): 2469 - 2477.

[10] SAILER A W, SANO H, ZENG Z, *et al*. Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(13): 7564 - 7569.

(编辑 陈聪连)

(上接2166页)

3 讨论

3.1 血液灌流在治疗 PQ 中毒中的作用

血液灌流可以有效清除体内的有毒物质。有人给猪灌服 PQ(70 mg/kg)后2 h 开始血液灌流,灌流2 h 停止,约排除毒物的51%,实验动物均死亡;如果将灌流时间延长至6 h,则3/4动物存活[2]。但 Hampson[3]发现,只有在患者体内的 PQ 浓度尚处于临界水平时及时进行血透及血流灌流才可能有效,如果患者血中 PQ 浓度超过3 mg/L,无论已服毒多长时间,何时进行血透及血液灌流,也无论是单次或重复血透及血液灌流,均不能改变患者的预后。本组病例 A 组与 B 组比较死亡率无明显差异,说明血液灌流虽然在清除患者体内的 PQ 肯定是有效的,但多不能降低患者的死亡率,主要原因是在实施血液灌流以前,患者体内达致死量的 PQ 已进入肺泡细胞及重要器官的血管组织,此时通过改变 PQ 的毒物动力学救治患者已不可能[3]。

3.2 激素的应用

糖皮质激素可以对抗非特异性炎症,抑制粒细胞和巨噬细胞释放氧自由基,从而抑制肺纤维化。本组病例 C 组与 A、B 组相比病死率明显降低($P<0.05$),提示在综合治疗加用血液灌流的基础上,大剂量糖皮质激素治疗有可能提高生存率,降低死亡率。但是由于我们所观察病例数不多,有待大宗病例进一步观察,以探讨急性百草枯中毒激素治疗的最佳剂量。

关键词:百草枯;中毒;激素

中图法分类号:R595.405 文献标识码:B

参考文献:

[1] 徐永建,牛汝桐,张珍祥. 百草枯中毒及其救治[J]. 内科急危重症杂志, 1997, 3(2): 84 - 85,93.

[2] YANG T S, CHANG Y L, YEN C K. Haemoperfusion treatment in pigs experimentally intoxicated by paraquat [J]. Hum Exp Toxicol, 1997, 16(12): 709 - 715.

[3] HAMPSON E C, POND S M. Failure of haemoperfusion and haemodialysis to prevent death in paraquat poisoning. A retrospective review of 42 patients[J]. Med Toxicol Adverse Drug Exp, 1988, 3(1): 64 - 71.

[4] 王永进,王洋惠. 百草枯中毒治疗的研究进展[J]. 中国急救医学, 2003, 23(6): 404 - 406.

(编辑 龙 亮)