

北京鸭血管活性肠肽基因 cDNA 片断的克隆及序列分析

董虹¹ 穆祥² 刘凤华² 张永东¹ 许剑琴¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 北京农学院 动物科学系, 北京 102406)

摘要 为从北京鸭胃肠道中扩增血管活性肠肽(VIP)基因,根据鸡VIP基因(GenBank 登录号 X80906),设计了一对简并引物,从北京鸭腺胃、十二指肠和空肠提取总RNA,通过反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增,将从腺胃、十二指肠和空肠中扩增出的产物克隆到 pGEM-Teasy 载体上,导入大肠杆菌 JM109,阳性克隆经双酶切鉴定后测序,将测序结果与鸡和鹅(GenBank 登录号为 DQ023161)的VIP基因进行同源性比较。本试验扩增到的VIP基因与已知的鸡和鹅核苷酸序列比较,同源性分别为 94.61%和 94.42%,氨基酸序列同源性分别为 93.75%和 95.71%。本试验首次成功从北京鸭腺胃、十二指肠和空肠扩增到长度为 240 bp、编码VIP的基因片断(已提交 GenBank,登录号 DQ200173)。

关键词 北京鸭;血管活性肠肽;克隆;序列分析

中图分类号 Q 785;S 834.81

文章编号 1007-4333(2006)04-0029-04

文献标识码 A

Cloning and sequencing analysis of VIP gene from Beijing duck

Dong Hong¹, Mu Xiang², Liu Fenghua², Zhang Yongdong¹, Xu Jianqin¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Beijing University of Agriculture, Beijing 102406, China)

Abstract In order to clone the VIP gene in the gastrointestinal tract from Beijing duck, one pair of specific primers to VIP gene was designed and synthesized according to the chick sequence (X80906). Encoding VIP cDNA fragments were amplified by RT-PCR from the total RNA in the Proventriculus, the Duodenum and the Jejunum of Beijing duck. Their PCR products were ligated into pGEM-T easy vector, which was transformed into E. coli JM109. Positive bacteria clones were screened and identified by PCR method and digested with the double restriction enzyme EcoR. The sequence of VIP gene fragment was also determined and analyzed. Compared with the chick and the goose (DQ023161) VIP, the homology of the clone Beijing duck VIP was 94.61 and 94.42% and that of the deduced amino acid sequence was 93.75 and 95.71%, respectively. This is the first time the VIP gene fragment (DQ200173) is analysed in the three tissues from Beijing duck.

Key words Beijing duck; vasoactive intestinal peptide; clone; sequence analysis

血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)在动物体内具有多种功能,作为胃肠道激素,起扩张血管和松弛平滑肌、抑制胃蠕动和胆囊收缩、抑制胃酸和胃蛋白酶分泌的作用,属于抑制性递质。人消化道疾病研究显示,VIP含量变化与消化不良、肠易激综合征、胃腺和结肠腺癌多种消化道疾病密切联系,病变时机体内VIP含量明显升高^[1-3]。研

究表明VIP可显著降低胃肠黏膜组织中组胺含量,抑制胃黏膜损伤^[4]。

作为神经肽激素,VIP是催乳素(PRL)释放因子,起刺激和调节PRL释放的作用,已有研究显示,VIP可促进小鼠和猴催乳素(PRL)的释放^[5]。VIP在禽类体内是一个生理性的PRL释放因子^[6,7],它能刺激和调节PRL的释放,主动免疫VIP,可抑制

收稿日期:2005-12-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270977)

作者简介:董虹,硕士研究生;许剑琴,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事中西兽医结合,中兽药研发及其机理研究,E-mail:jianqinxu@126.com;刘凤华,教授,通讯作者,主要从事中兽药开发研究,E-mail:liufenghua1209@126.com

PRL 分泌,降低就巢率并大大提高禽类的产蛋量。目前关于火鸡和矮脚鸡 VIP 的研究较多,关于主要家禽鸡、鸭、鹅的研究甚少。我国一些地方鸡、鸭、鹅的就巢行为十分严重,对产蛋量影响很大,可通过调控 VIP 控制禽类抱窝行为,提高禽类产蛋量,增加经济效益^[5]。

VIP 是神经系统和免疫系统相互作用的一种信号分子,在机体免疫,尤其是局部黏膜免疫中起着调节作用^[8];VIP 作用于 APC、Th 等效应细胞,可以调节多种 Th 细胞特异性因子的水平,同时抑制 FasL 表达,阻止 Ag 诱导的 Th2 细胞克隆的清除,有助于记忆 CD4⁺ Th2 细胞的局部产生,并使存活的细胞抵抗凋亡,因此在体内外 VIP 可使 CD4⁺ T 细胞受抗原刺激后向 Th2 细胞分化,产生以 Th2 为主的免疫应答^[9]。这种特性使 VIP 具有相当广的临床应用前景,并有利于以 Th1 细胞为主的自身免疫疾病的治疗。鉴于 VIP 特殊的免疫特性,有人提出将 VIP 当作一种 Th2 型的细胞因子(IL-X)^[9]。本研究旨在从北京鸭胃肠道中扩增到 VIP 基因,为进一步研究 VIP 基因在北京鸭体内的分布及其在消化、生殖以及免疫系统中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 30 日龄北京鸭购于北京金星鸭业中心南口种鸭场;JM109、EcoR、X-gal、IPTG、T4-DNA 连接酶、pGEM-T Easy Vector 试剂盒及 M-MLV 反转录酶为 Promega 公司产品;DNA Marker、Taq DNA 聚合酶、琼脂糖(产地西班牙)为上海生工生物公司产品;质粒纯化试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品;总 RNA 小量提取试剂盒和胶回收试剂盒为博大泰克产品。

1.2 引物的设计与合成

参照 GenBank 中已登录的鸡 VIP 基因序列,设计了一对引物。上游引物 5'-ATTATTGATAGCTCCCA GGACA GT-3',下游引物:5'-GAGGTGGCTCA GCA GTTCA TC-3',由上海生工生物技术有限公司合成。

1.3 总 RNA 提取

30 日龄北京鸭,颈动脉放血,取腺胃、空肠和十二指肠,液氮速冻,采用博大泰克公司总 RNA 提取试剂盒,分别取组织约 50 mg,加入玻璃研磨器中,吸入预冷的变性剂,冰浴研磨至无明显组织块,醋酸

钠溶解分离,酚-氯仿-异戊醇抽提,异丙醇沉淀,适量双蒸水溶解总 RNA。

1.4 RT-PCR 扩增

用微量核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度,取 2 μg RNA,加入 1 μg oligo (dT)₁₆至无 RNA 酶的离心管中,用 DEPC 处理水补充至 13 μL,72 ℃ 水浴 5 min 后,立即置冰上冷却;然后依次加入 5 μL 5 × 反应缓冲液,5 μL 10 mol/L dNTP,1 μL 25 U Rnasin 抑制剂和 1 μL 200 U M-MLV 逆转录酶。42 ℃ 水浴 60 min,置 -20 ℃ 冰箱备用。PCR 反应体系中加入下列成分:cDNA 模板 1.0 μL,25 mol/L MgCl₂ 4.0 μL,5U Taq-DNA 0.125 μL,10 × buffer 5.0 μL,10 mol/L dNTPs 4.0 μL,12.8 pmol/μL 上下游引物各 2.5 μL,总体积 50 μL。反应液在 95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 50 s,52.8 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 31 个循环,最后 72 ℃ 保温 8 min。PCR 结束后取 20 μL 进行电泳鉴定。

1.5 基因克隆

扩增产物 2% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳,通过与 DNA 分子量标准对照检测,与预期目的片段大小吻合。将含有目的片段的琼脂块切下,采用玻璃奶回收法,将回收产物连接到 pGEM-T 载体,转化到 JM109 感受态细胞中,并涂布于含 IPTG、X-Gal 和氨苄青霉素(AMP)的 LB 培养基,37 ℃ 过夜培养,进行白斑筛选。挑取生长良好的白色菌落接种于含 AMP 的 SOC 液体培养基扩增培养。按照碱裂法提取质粒,进行酶切鉴定。

1.6 重组质粒的酶切鉴定

将筛选的阳性重组质粒用 EcoR 进行双酶切鉴定,2% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭),照相。酶切鉴定正确的质粒,原菌液过夜摇菌饱和后,送上海生工生物技术有限公司进行序列测定,并将测得的 VIP 基因序列与鸡和鹅的序列进行比较分析。

2 结果

2.1 RT-PCR

用微量核酸蛋白检测仪测定提取的 VIP 总 RNA 含量,其 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.7~2.0,证明提取的 RNA 较纯。RT-PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳鉴定。鸭腺胃、空肠和十二指肠均扩增出长度为 240 bp 左右,与设计完全相符的目的片段。

2.2 重组质粒的鉴定

将纯化的 PT-PCR 产物连接 pGEM-T 载体中, 转化 *E. coli* 感受态细胞 JM109 中, 培养后提取质粒用 *EcoR* 对质粒酶切鉴定, 结果得到了与预期大小一致的约 240 bp 的片断。

2.3 测序结果与对比分析

测序结果显示, VIP 基因长度为 240 bp, 核苷酸序列及推导的氨基酸序列与禽类中鸡 (GenBank 登录号为 X80906) 和鹅 (GenBank 登录号为 DQ023161) 同源性相比较, 核苷酸同源性分别为 94.61% 和 94.42%; 氨基酸同源性为 93.75% 和 95.71%。与鸡比较, 有 5 个氨基酸发生改变, 分别是 1 (Ile Phe)、50 (Ala Ser)、54 (Gly Asp)、78 (Arg His) 和 79 (Pro-Leu) 位; 与鹅比较, 氨基酸序列在 1、2、3 位 (Phe Lys, Ile Arg, Asp Val) 发生改变。序列比较见图 1、2。

| | | |
|-------|--|-----|
| duck | TTTATTGATAGCTCCCAGGACAGCTCTGTCAAACGCCACT | 40 |
| chick | a----- | 40 |
| goose | aaacga-t---t----- | 40 |
| duck | CTGATGCTGTTTTCACTGACAACACTACAGCCGCTTTCGGAA | 80 |
| chick | -----c-----a-- | 80 |
| goose | -----c---c----- | 80 |
| duck | GCAAATGGCTGTGAAGAAATACTTAAACTCAGTTTTAACC | 120 |
| chick | -----t----- | 120 |
| goose | -----t----- | 120 |
| duck | GGAAAAAGAAGCCAGGAAGAGCTAAACCCCTCTAAACTTC | 160 |
| chick | ----c-----t---t--ag-c----- | 160 |
| goose | ----- | 160 |
| duck | GTGATGAAGCAGAAATCTTGAACCTTCTTTTCAGAAAA | 200 |
| chick | -a-g----- | 200 |
| goose | ----- | 200 |
| duck | CTATGATGATGTTTCTGTAGTGAAGTCTGCTGAGCCACCTC | 240 |
| chick | -----ga-ct | 240 |
| goose | ----- | 215 |

图 1 鸭与鸡和鹅血管活性肠肽 cDNA 序列比较

Fig. 1 VIP in duck, chick and goose

| | | |
|-------|--|----|
| duck | FIDSSQSPVKRHSDAVFTDNYSRFRKQMAVKKYLNSVLT | 40 |
| chick | i----- | 40 |
| goose | krv----- | 40 |
| duck | GKRSQEELNPSKLRDEAEILEPSFSENYDDVSVDELLSHL | 80 |
| chick | -----a--g-----rp | 80 |
| goose | ----- | 71 |

图 2 鸭与鸡和鹅血管活性肠肽氨基酸序列比较

Fig. 2 Deduced amino acid sequence of VIP in duck, chick and goose

3 讨论

VIP 是由 Said 等^[10]于 1970 年首次从猪小肠甲醇抽提液中分离纯化得到, 其后 Carlquist 等先后从其他动物分离得到^[8]。已知 VIP 是 28 个氨基酸组成的直链多肽, 由 170 个氨基酸的前激素原剪切而来。VIP 在中枢神经系统和胃肠道中的含量最多, 在脑内分布不匀, 下丘脑某些区域、皮层、杏仁、海马、纹状体等处含量较高; 下丘脑又以正中隆突含量最高, 肠道中以直肠、空肠和回肠最高。本次试验证明北京鸭腺胃、空肠和十二指肠都能扩增到 VIP 基因, 与上述报道一致。

1) VIP 是胃肠道黏膜及肠壁神经丛的重要递质, 对胃肠黏膜具有保护作用, 对胃肠运动起抑制性调节作用。陈尼维等^[11]证明消化性溃疡患者血浆中 VIP 含量显著高于健康人, 这与孙晓宁^[12]等对功能性消化不良患者血浆中 VIP 变化试验结果一致。谢健群等^[1]采用脾胃虚寒型肠易激综合征大鼠模型 (临床最常见的一种胃肠功能紊乱性疾病以腹泻、腹痛为特征), 观察中药肠祺方对模型大鼠 VIP 的影响, 结果显示模型组 VIP 显著高于正常组, 且中药能通过降低已经升高的 VIP 含量达到治疗疾病的作用。可见 VIP 含量的改变可导致消化道疾病的发生, 且可以通过调节 VIP 的含量纠正和改善该疾病; 因此对 VIP 的深入研究有利于消化道疾病的诊断和治疗。

2) VIP 是禽类分泌 PRL 的生理促进因子 (PRL 是引起家禽就巢最直接的激素, 体内 PRL 含量升高后家禽开始出现就巢表现, 产蛋率降低), VIP 能够降低 PRL 分泌, 从而抑制禽类就巢行为, 提高产蛋率。Sharp^[13]最早对就巢的矮脚鸡注射抗 VIP 抗体 (羊抗 VIP 抗体), 降低了 PRL 的分泌, 使矮脚鸡于 5 d 内终止就巢。最近对丝毛乌骨鸡进行了类似的研究, 对照组鸡就巢发生率高达 60%, 而免疫组低于 15%, 免疫组产蛋率比对照组高 60%^[6]。陈峰^[5]等用牛血清蛋白 (BSA) 为载体与 VIP 进行偶联后主动免疫 56 周龄的泰和鸡, 结果发现泰和鸡抱窝情况减少, 产蛋率提高, 并且对蛋的受精率和孵化率无影响。这些结果说明主动免疫 VIP 是目前抑制禽类就巢、提高繁殖性能的最佳方法; 但由于 VIP 在体内的半衰期短, 长期、多次注射 VIP 容易引起胃肠道功能紊乱和免疫抑制现象, 这极大限制了临床应用, 而基因治疗可以避免这些毒副作用^[14]。本试

验成功地从北京鸭体内扩增到VIP基因。从基因水平研究VIP对禽类就巢的影响,不仅能提高禽类繁殖性能,也能减少注射VIP对机体产生的副作用。

3)VIP也是一种能在外周淋巴微环境中产生的具有免疫学活性的神经肽^[15]。近年研究表明,VIP在调节自身免疫和炎症方面发挥着重要作用^[16]。VIP能抑制Th1免疫应答,促进Th2细胞的分化,调节免疫平衡,推测VIP在某些情况下能促进肿瘤的免疫逃避,从而抑制某些肿瘤如结肠癌的生长;VIP还能下调炎症前介质的释放,促进抗炎因子的产生,调节炎症反应,这在多种临床疾病如脓毒血症、类风湿性关节炎、Crohn's病等的动物试验中得到证实^[17-19]。由于VIP在免疫系统的作用才刚刚被发现,因此有必要进一步从分子水平研究VIP在免疫调节、黏膜免疫、自身免疫疾病、肿瘤疾病等方面的作用。

VIP是体内一种具有广泛生物活性的分子,在多个方面对机体起着非常重要的调节作用。本试验利用GenBank上鸡的VIP序列设计一对简并引物,首次成功运用RT-PCR法从北京鸭胃肠道扩增到240bp的VIP基因片断(序列已提交GenBank,登录号为DQ200173),为进一步从分子水平研究VIP在消化系统、内分泌系统和免疫系统等多方面对机体的调节作用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 谢建群, 陆雄, 龚丽萍, 等. 健脾温中法对脾胃虚寒型肠易激综合征模型大鼠血管活性肠肽影响的实验研究[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(4): 49-51
- [2] 李国华, 熊汉华, 侯晓华. 功能性消化不良患者胃窦黏膜血管活性肠肽 mRNA 的表达[J]. 胃肠病学, 2003, 8(5): 276-278
- [3] 李国华, 钱伟, 王静, 等. 胃腺癌细胞中血管活性肠肽自分泌调节作用及其机制[J]. 中华消化杂志, 2005, 25(1): 27-31
- [4] 黎永军, 马洪升. 血管活性肠肽与消化道疾病研究新进展[J]. 华西医学, 2005, 20(3): 616-617
- [5] 陈峰, 毕英佐, 曹永长, 等. 血管活性肠肽在禽类上的研究进展[J]. 中国家禽, 1997(1): 31-33
- [6] 陈峰, 施振旦, 毕英佐, 等. 血管活性肠肽对泰和鸡繁殖性能的影响[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(增刊): 45-50
- [7] 王光瑛, 王寿昆. 生殖激素对家禽就巢的控制[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2005, 34(1): 82-86
- [8] 王伟, 李伟毅. 血管活性肠肽的免疫调节作用[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27: 148-152
- [9] 张松照. VIP选择性分化Th细胞的研究进展[J]. 国外医学免疫学分册, 2005, 28(2): 65-68
- [10] Said S I, Mutt V. Polypeptide with broad biological Activity: isolation from small Intestine[J]. Science, 1970, 169: 12-17
- [11] 陈尼维, 陈维雄. 消化性溃疡患者血管活性肠肽与十二指肠胃反流和幽门螺杆菌感染关系的研究[J]. 胃肠病学, 2002, 7(4): 221-223
- [12] 孙晓宁, 刘均平. 功能性消化不良患者血浆胃肠激素水平研究[J]. 胃肠病学, 2001, 6(增刊): 40
- [13] Sharp P J, Sterling R J, Talbot R T, et al. The role of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide in the maintenance of prolactin secretin in incubating bantam hens: observation using pallive immunization, radio immunoassay and immunohistochemistry[J]. Endocrinology, 1989, 122: 5-13
- [14] 张松照, 沈建根, 廖志雄, 等. 血管活性肠肽真核表达质粒的构建及鉴定[J]. 浙江大学学报(医学版), 2005, 34(2): 148-151
- [15] Voice J K, Dorsam G, Chan R C, et al. Immunoeffector and immunoregulatory activities of vasoactive intestinal peptide[J]. Regul Pept, 2002, 109(1-3): 199-208
- [16] Dei Gado M, Ganea D. Cutting edge: is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine[J]. J Immunol, 2001, 166(5): 2907-2912
- [17] Delgado M, Abad C, Martinea C, et al. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by down-regulating both autoimmune and inflammatory components of the disease[J]. Nat Med, 2001, 7(5): 563-568
- [18] Tuncel N, Torel F, Sahinturk V V, et al. Vasoactive intestinal peptide inhibits degranulation and changes granular content of mast cells: a potential therapeutic strategy in controlling septic shock[J]. Peptides, 2000, 21(1): 81-89
- [19] Keino H, Kezuka T, Takeuchi M, et al. Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by vasoactive intestinal peptide[J]. Arch Ophthalmol, 2004, 122(8): 1779-1784