

山羊子宫中 LHR 基因片段的克隆及半定量 RT-PCR 检测方法的建立

申 颖^{1,2}, 王 慧¹, 王树迎¹, 王立芹¹, 侯衍猛¹, 黄丽波¹

(1 山东农业大学 动物医学院, 山东 泰安 271018; 2 山东畜牧兽医职业学院 兽医系, 山东 潍坊 261061)

[摘 要] **【目的】**进一步研究处于发情周期不同阶段的济宁青山羊子宫中黄体生成素受体(LHR) mRNA 表达量的变化,为探讨其对山羊生殖内分泌机制的作用规律提供理论依据。**【方法】**以 GAPDH 为内参照基因,从济宁青山羊的子宫组织中提取总 RNA,用 RT-PCR 方法扩增目的基因,进行克隆测序,并对半定量 RT-PCR 反应体系进行了优化。**【结果】**获得了济宁青山羊 LHR mRNA 的部分序列,长度约为 286 bp,与已报道的 GenBank 中羊的 LHR mRNA(序列号为 AF379199)41~326 bp 序列同源性为 100%。以此基因片段的阳性克隆为基础优化的半定量 RT-PCR 体系为:LHR 基因的适宜循环数为 30 个,内参照 GAPDH 基因的循环数为 26 个,Mg²⁺浓度均为 1.5 mmol/L。**【结论】**克隆了山羊 LHR mRNA 的部分序列,并建立了优化的半定量 RT-PCR 体系。

[关键词] 半定量 RT-PCR; LHR mRNA; 基因克隆; 山羊

[中图分类号] S827.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)02-0006-05

Cloning and establishment of the semi-quantitative RT-PCR system of LHR partial gene of Goat's Uterus

SHEN Ying^{1,2}, WANG Hui¹, WANG Shu-ying¹, WANG Li-qin¹,
HOU Yan-meng¹, HUANG Li-bo¹

(1 College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China;

2 Veterinary Department, Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang, Shandong 261061, China)

Abstract: **【Objective】**Luteinizing hormone receptor (LHR) gene mRNA was amplified using RT-PCR to further study the different levels of LHR mRNA expression in the goat uterus during the various estrous cycle phases and research the possible role of the reproductive endocrine secretion of goat. **【Method】**Using GAPDH as inner control, total RNA was extracted from uterus of Jining gray goat. **【Result】**Sequenced analysis suggested that this fragment was partial sequence of LHR gene. The gene homology of fragment obtained in this study compared with that of reported LHR mRNA (AF379199) of *Capra hircus* was 100%. Cycle numbers of PCR system and the concentration of MgCl₂ was optimized and analyzed. **【Conclusion】**The goat's partial LHR mRNA gene was successfully cloned in present study and the optimized semi-quantitative RT-PCR system was established.

Key words: semi-quantitative RT-PCR; LHR mRNA; gene cloning; goat

黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)是由垂 体前叶的促性腺激素细胞分泌的一种糖蛋白类激

* [收稿日期] 2008-03-19

[基金项目] 山东省科技攻关项目(2006GG2209004)

[作者简介] 申 颖(1982—),女,山东蓬莱人,硕士,主要从事动物形态学和发育生物学研究。

[通信作者] 王树迎(1955—),男,山东潍坊人,教授,博士生导师,主要从事动物组织学与发育生物学研究。

E-mail: sywang@sdau.edu.cn

素,它主要通过与分布在组织上的特异性受体(Luteinizing hormone receptor,LHR)结合在动物的黄体溶解过程中发挥重要作用^[1]。LHR 属于 G 蛋白偶联受体超家族中的糖蛋白亚家族成员,其氨基酸序列和结构有高度同源性,具有 7 个跨膜区、4 个胞质区以及由 3 个环状区和 N 端组成的细胞外区,通过 G 蛋白和腺苷酸环化酶系统在信号传导中起重要作用^[2]。近年来研究发现,LH 及其受体不仅存在于下丘脑-垂体-性腺轴,在雌性哺乳动物的子宫中也有分布,并且黄体生成素受体基因敲除鼠子宫发育明显迟缓^[3-4]。某些恶性肿瘤性疾病,如子宫内膜癌上也发现了 LHR,推测其可能通过局部作用来调节子宫内膜癌细胞的功能^[5],这表明生殖道内的 LHR 在动物的生殖调控过程中也发挥着重要作用。目前,国内外学者已经在牛^[6]、猪^[7]、鼠^[8]等多种动物的子宫内发现 LHR,但对山羊子宫 LHR 的研究尚未见报道。为此,本研究以济宁青山羊为材料,对其子宫中 LHR mRNA 进行了测序,并构建了优化的半定量 RT-PCR 反应体系,为进一步研究发情周期不同阶段子宫中 LHR mRNA 表达量的变化奠定了基础,也为后续研究低繁和高繁山羊的生殖内分泌规律提供了一定的技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 山羊子宫 从山东莱芜黑山羊育种研究所,选取 2~3 岁健康未孕济宁青山羊 4 只,体质量 21~28 kg,于 2007 年 4 月中旬,逐一静脉放血后 5 min 内从腹腔中取出子宫,立即投于液氮中备用。

1.1.2 试剂 TRNzol 购自北京天根生物技术有限公司;焦磷酸二乙酯(diethylpyrocarbonate,DEPC)购自美国 Sigma 公司;pMD18-T Vector、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;割胶回收试剂盒(QIA quick Gel Extraction Kit)购自 GIBCO 公司;其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 山羊总 RNA 的提取 取 50~100 mg 冻存的山羊子宫组织,经液氮速冻研磨后,收集于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,加入 1 mL 的 TRNzol,充分混匀,室温放置 5 min;4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液至另一管中,加入 0.2 mL 的氯仿,震荡混匀 15 s,室温静置 3 min;4 ℃、10 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液同时加入等体积的异丙醇,混匀,室温放置 30 min;4 ℃、10 000 r/min 离心

10 min,去上清液。再向管中加入 1 mL 体积分数 75%乙醇(DEPC 处理过的水配置)清洗沉淀;4 ℃、5 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,管底的 RNA 用 30 μL 无 RNA 酶的超纯水溶解,存于-70 ℃备用。对提取的山羊总 RNA 分别用紫外分光光度计和 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及完整性。

1.2.2 山羊 cDNA 第一链的合成 取 2 μg 山羊总 RNA,2.5 pmol/μL Oligo dT 2 μL,补充 DEPC 水至 10 μL,70 ℃水浴 5 min,冰上骤冷 30 s,冰浴上加入 M-MLV 反转录酶 1 μL,5×RT Buffer 5 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL,2.5 mmol/L dNTPs 5 μL,补充 DEPC 水至 25 μL,混匀。42 ℃ 1 h,85 ℃ 15 min 终止反应。

1.2.3 山羊子宫 LHR mRNA 片段的 PCR 扩增 根据已报道的羊的 LHR 和 GAPDH 基因序列(序列号分别为 AF379199,AJ431207)设计 2 对引物(表 1),引物均由博尚生物技术有限公司合成。通过对引物核苷酸序列的分析,及不同退火温度下 PCR 产物的电泳结果分析,LHR 和 GAPDH 基因片段扩增的最佳退火温度分别为 47 和 55 ℃。

表 1 LHR 和 GAPDH 基因的引物序列

Table 1 Primers sequences of LHR and GAPDH gene		
基因 Gene	引物 Primer	产物大小/bp Length of amplified fragments
LHR	F:5'-AATATCGAGCTGAAC TTT-3' R:5'-TTGCCTGATGTGCCTAAC-3'	286
GAPDH	F:5'-GGGTGATGCTGGTGTGCTGAGT-3' R:5'-TCCCTCCACGATGCCAAA-3'	259

PCR 反应总体积 25 μL:RT 产物 1 μL,2.5 mmol/L dNTP Mixture 2.0 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,Taq DNA 聚合酶 0.2 μL,10×PCR Buffer 2.5 μL,上、下游引物各 1 μL 混匀后,分别进行 LHR 和 GAPDH 的 PCR 扩增。LHR 的 PCR 扩增条件为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 1 min,47 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环;72 ℃延伸 10 min。GAPDH 的 PCR 扩增条件为:95 ℃预变性 150 s;95 ℃变性 25 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 26 个循环;72 ℃延伸 5 min。反应结束后,取 PCR 产物进行 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,凝胶成像仪下观察结果、照相。

1.2.4 PCR 扩增循环数的确定 采用 1.2.3 PCR 体系,分别设定循环数 24,26,28,30,32,34 和 36 次,根据扩增产物的效果,在 PCR 扩增平台期之前的指数增长期选择适宜的循环数。

1.2.5 Mg^{2+} 浓度的确定 在保持 1.2.3 PCR 体系不变的基础上,分别加入 $MgCl_2$ 使 Mg^{2+} 终浓度为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 和 3.0 mmol/L,进行扩增。产物进行凝胶电泳,鉴定其扩增效果,确定最适宜的 Mg^{2+} 浓度。

1.2.6 PCR 扩增产物的克隆及序列分析 用琼脂糖凝胶回收 PCR 扩增的目的片段,将其与 pMD18-T Vector 连接,构建重组质粒 pMD18-T-LHR,然后转化大肠杆菌 DH5a,铺板,过夜培养后挑取白色单菌落进行重组质粒快速鉴定,对初步鉴定为含有重组质粒的菌落摇菌、提质粒,用 *EcoR* I 和 *Sal* I 2 种酶进行双酶切鉴定。选取 2 个含有目的片段重组子的菌落,送北京华大基因研究中心进行 DNA 测序,将测序结果与 GenBank 上公布的 LHR 进行比较。

2 结果与分析

2.1 山羊总 RNA 的提取

提取的山羊总 RNA 的光密度比值 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,可见有

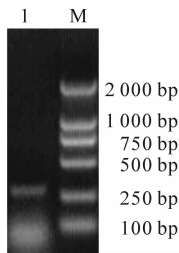


图 2 山羊子宫 LHR mRNA 片段的 PCR 产物凝胶电泳结果

1. PCR 产物;M. DNA Marker

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR product of LHR mRNA fragment

1. PCR product;M. DNA Marker

2.3 山羊子宫 LHR mRNA 片段的测序及分析

阳性克隆子经过正反向 2 个测序反应,得到 286 bp 的核苷酸序列(图 4)。对扩增的 PCR 产物进行基因序列分析,与 GenBank 上登陆的羊 LHR

```
AATATCGAGCTGAACTTTATAGGAGGAAGGATTTTTCAGCTTATATCTCCAAC TGCAAA
AATGGCTTCACTGGATCAAATAAGCCCTCCCGGTCCACCTTCAAGTTGACTACATTACA
ATGTCAATATTCAGCTGTCTGGACAAGACTTGCTGTAATTAGTGTTAACTGTGGTATC
AGTAAGCACATTACTGAATTATACTTAAATATGTAAAAAAATTCTCTCTACCAGTAATA
TTAACAAAGAGTTGGTTTCAGGAAATTATGTGTTAGGCACATCAGGCAA
```

图 4 山羊子宫 LHR mRNA 片段的核苷酸序列

Fig. 4 The sequenced result of LHR mRNA fragment

Z28S、18S 和 5S 3 条明显的条带(图 1),且 5S 带较 28S 和 18S 2 条带弱,表明提取的山羊总 RNA 完整,符合 RT-PCR 的试验要求。

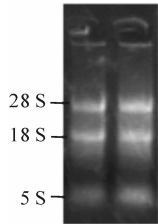


图 1 山羊总 RNA 的电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total

2.2 山羊子宫 LHR mRNA 片段的扩增及重组质粒 DNA 的 PCR 检验

图 2 结果显示,山羊子宫扩增出长度约为 286 bp 的 LHR mRNA 片段,与预期片段长度一致。扩增片段经连接、转化、培养后,挑取重组子,对初步筛选的阳性克隆进行 PCR 鉴定,结果扩增到 1 条明亮的与设计片段长度一致的条带(图 3),表明目的基因已成功转入大肠杆菌中。

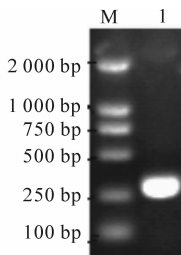


图 3 重组质粒 pMD18-T-LHR 的 PCR 鉴定结果

M. DNA Marker;1. 重组质粒 pMD18-T-LHR 的 PCR 产物

Fig. 3 Gel electrophoresis of PCR product

M. DNA Marker;1. PCR product of recombinant DNA

mRNA(登陆号为 AF379199)41~326 bp 的核苷酸序列同源性达到了 100%,证明此 PCR 产物即为山羊 LHR mRNA 基因的部分序列,二者高度同源。

2.4 半定量 RT-PCR 体系的优化

2.4.1 循环数的筛选 由图 5 可见, 济宁青山羊 LHR 基因在 32 个循环之前, PCR 产物电泳条带亮度随着循环数的增加而增强, 故本试验选择电泳条带清晰而又未达到平台期的 30 个循环, 为 LHR 基

因半定量 RT-PCR 反应的适宜循环数。而内参照 济宁青山羊 GAPDH 基因在 28 个循环数之前, 基因产量呈线性增长, 故选择条带清晰又未达到平台期的 26 个循环, 为 GAPDH 基因的 PCR 反应循环数。

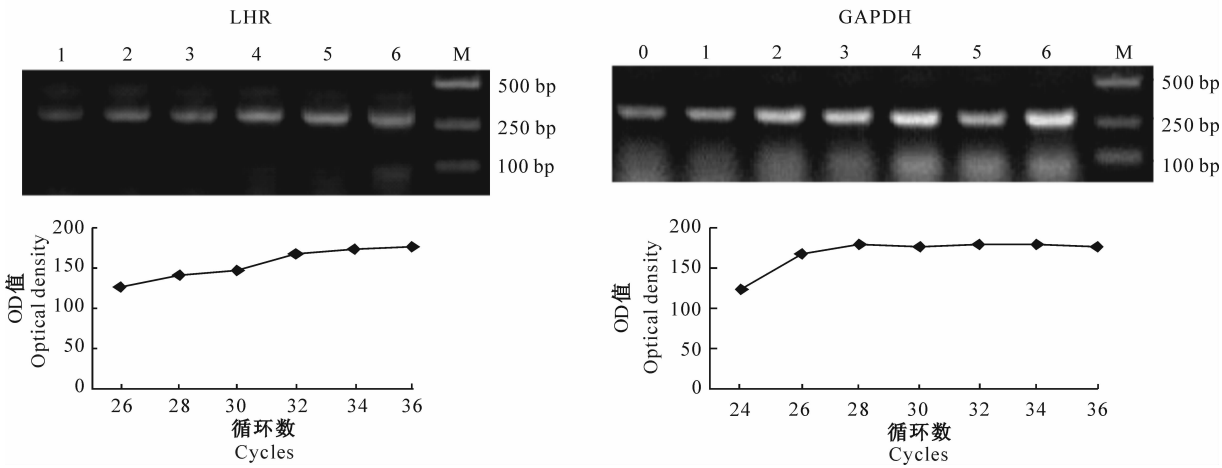


图 5 山羊子宫 LHR 和 GAPDH 基因在不同循环的 PCR 产物电泳分析和完整光密度值(OD)

0~6. 分别代表循环数为 24,26,28,30,32,34 和 36 时的扩增产物;M: DNA Marker

Fig. 5 Electrophoretic results of LHR and GAPDH PCR products and integrated OD analysis in different cycles

0—6. Cycles: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36; M: DNA Marker

2.4.2 最佳 Mg^{2+} 浓度的确定 如图 6 所示, 山羊子宫 LHR 特异性引物在 6 个 Mg^{2+} 浓度的扩增特异性和效率均有差别。在 1.5 mmol/L 时扩增效率及特异性较好, 而当浓度过高时, 有杂带、特异性差,

浓度低时扩增效率低。而不同 Mg^{2+} 浓度对 GAPDH 的影响较小, 故本试验均采用 1.5 mmol/L 作为 LHR 和 GAPDH 基因 PCR 扩增的 Mg^{2+} 浓度。

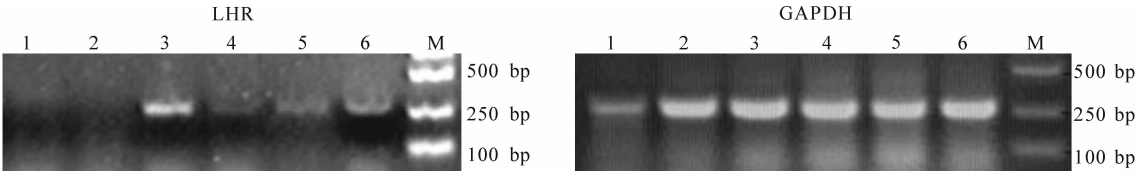


图 6 不同 $MgCl_2$ 浓度下山羊子宫 LHR 和 GAPDH 基因扩增产物的电泳结果

1~6. Mg^{2+} 浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L 时的扩增产物; M: DNA Marker

Fig. 6 Gel electrophoresis of LHR and GAPDH gene PCR product at different Mg^{2+} concentrations

1—6. Product of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol/L; M: DNA Marker

3 讨论

传统观点认为, LH 具有促进卵泡发育和排卵, 以及黄体形成和维持黄体分泌孕酮的两大生理作用。而前人研究发现, LH 除影响传统的性腺靶位点外, 对多种动物的生殖道、乳腺、肾上腺等器官也有影响。LHR 在非性腺器官的广泛存在表明, 其在生殖和医学上可能具有很多重要的功能^[9-10]。Shemesh 等^[11]用放射性受体检测发情周期的牛子

宫内膜细胞碎片发现 LHR 的存在; 在猪的子宫肌层上也存在特异性、高亲和力、低容载量的 LH 结合位点^[12-13]。通过对 LHR 基因敲除小鼠的研究证明, 小鼠子宫内膜、子宫肌层 COX-2 基因的表达受 LH 信号通路的调控, 从而影响早期胚胎的附植^[14]。

同时有研究表明, 子宫中 LHR mRNA 表达量的变化与 COX-2 和前列腺素产物的诱导作用之间存在一定程度的相关性^[6, 15]。LH 能引起黄体期子宫内膜 LHR 表达量达到最高值, 这将促进子宫内

膜中 COX-2 和 PGF2 α 的分泌,伴随其分泌量的增加,将诱导黄体溶解,继而诱发排卵并起始一个新的发情周期^[16],说明子宫中的 LHR 在发情周期的调节过程中也发挥着重要作用。

本试验建立了济宁青山羊 LHR 基因的半定量 RT-PCR 检测体系,为下一步研究发情周期子宫中 LHR mRNA 的存在以及变化规律提供了技术支持。有关发情周期不同阶段的济宁青山羊子宫中 LHR mRNA 表达量的变化规律,还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Csapo A I, Pulkkinen M O, Ruttner B. The significance of the human corpus luteum in pregnancy maintenance [J]. I Preliminary Studies, 1972, 112: 1061-1067.
- [2] Catt K, Dufau M L. Gonadotropic hormones: biosynthesis secretion, receptors and actions [C]//Yen S S C, Jaffe R B. Reproductive Endocrinology. Philadelphia: W. B. Saunders, 1991: 105-155.
- [3] Lei Z M, Mishra S, Zou W, et al. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-receptor gene [J]. Mol Endo, 2001, 15: 184-200.
- [4] Rao C V, Lei Z M. Consequences of targeted inactivation of LH receptors [J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 187: 57-67.
- [5] 陈蕾, 白宏伟, 尹善德, 等. 子宫内膜癌组织中黄体生成素及其受体的表达意义 [J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(4): 310-312.
Chen L, Bai H W, Yin S D, et al. Expressions and significances of luteinizing hormone and its receptor in human endometrial cancer [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2007, 28(4): 310-312. (in Chinese)
- [6] Friedman S, Gurevich M, Shemesh M. Bovine cyclic endometrium contains high-affinity luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors [J]. Biology of Reproduction, 1995, 52: 1020-1026.
- [7] Stepień A, Derecka K, Gawronska B, et al. LH/hCG receptors in the porcine uterus-a new evidence of their Presence in the Cervix [J]. Journal of Physiology and Pharmacology, 2000, 51(4): 917-931.
- [8] Zheng M L, Shi H, Deborah L, et al. Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract [J]. Biology of Reproduction, 2001, 64: 179-187.
- [9] Rao C V, Lei Z M. The present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine [J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 269: 2-8.
- [10] Ziecik A J, Kaczmarek M M, Blitek A. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor [J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 269: 51-60.
- [11] Shemesh M, Mizrahi D, Fields M J, et al. Expression of functional luteinizing hormone (LH) receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine endometrium: LH augmentation of cAMP and inositol phosphate *in vitro* and human chorionic gonadotropin (hCG) augmentation of peripheral prostaglandin *in vivo* [J]. Reprod Biol, 2001, 1: 13-19.
- [12] Ziecik A J, Jedlinska M, Rzucidlo S J. Effect of estradiol and progesterone on myometrial LH/hCG receptors in pigs [J]. Acta Endocrinol, 1992, 127: 185-188.
- [13] Rzucidlo S J, Weigl R M, Tilton J E. Myometrial LH/hCG receptors during the estrous cycle and pregnancy in pigs [J]. Anim Reprod, 1998, 51: 249-257.
- [14] Lin D X, Lei Z M. Dependence of uterine cyclooxygenase-2 expression on luteinizing hormone signaling [J]. Biology of Reproduction, 2005, 73: 256-260.
- [15] Stepień A, Shemesh M, Ziecik A J. Luteinizing hormone-receptor kinetic and LH-induced prostaglandin production throughout the estrous cycle in porcine endometrium [J]. J Reprod Nutr Dev, 1999, 39: 663-674.
- [16] Weems Y S, Kim L, Humphreys Y S, et al. Effect of luteinizing hormone (LH), pregnancy specific protein B, or arachidonic acid on ovine endometrium of the estrous cycle or placental secretion of prostaglandins E₂ and F_{2 α} and progesterone *in vitro* [J]. Prostaglandins, 2003, 71: 55-73.