

拉布拉多犬嗅觉受体 CfOLF4 基因的克隆及序列分析

缪勤 张汇东 朱骞 顾劲乔 温海

(公安部南京警犬研究所 南京 210012)

摘要:以常规 PCR 技术扩增警用拉布拉多犬(*Canis familiaris*)的嗅觉受体 CfOLF4 基因长 879 bp 的目的片段,构建 pMD-CfOLF4 载体进行 T-A 克隆。重组质粒测序后与 GenBank 公布的犬 CfOLF4 基因进行序列分析比较,旨在了解拉布拉多犬嗅觉受体 CfOLF4 基因遗传的同源性和变异特性。

关键词:嗅觉受体;CfOLF4 基因;克隆;序列分析;拉布拉多犬

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)03-136-04

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the Labrador Retriever CfOLF4 Gene

MIAO Qin ZHANG Hui-Dong ZHU Qian GU Jin-Qiao WEN Hai

(Nanjing Policedog Research Institute of Ministry of Public Security, Nanjing 210012, China)

Abstract In this study, pMD 18-T cloning vector was used and the 879 bp OR gene of Labrador Retriever (*Canis familiaris*) policedog was successfully cloned. Following T-A cloning, the recombinant plasmid pMD-CfOLF4 was sequenced and compared with the published sequence of dogs from GeneBank to analyze the variability of the Labrador Retriever OR gene.

Key words Olfactory receptor; CfOLF4 gene; Cloning; Sequence analysis; Labrador Retriever

嗅觉受体(olfactory receptors, ORs)是由嗅觉细胞表达的一种蛋白质,由哺乳动物体内最大的基因家族编码^[1]。哺乳动物基因组中有 1 000 多编码嗅觉受体的基因,占基因总量的 3% ~ 5%。每个嗅觉受体能识别数个相关的化学分子,而特异的气味可能与数个嗅觉受体相结合^[2]。据估计犬基因组中约有 1 300 个嗅觉受体基因,而目前已经测定的犬嗅觉受体基因约占其中的 80%^[3,4]。

在人和动物的生命过程中,嗅觉起着重要作用。嗅觉受体的主要作用是与气味分子结合,并将这种信号转换到下游信号转换途径的蛋白^[5]。嗅觉受体基因的缺失能引起特异性的嗅觉分辨力下降或缺失^[6]。犬的嗅觉是极其灵敏的,不仅对气味的感受性强,而且辨认气味的

机能也十分精确。拉布拉多犬目前已被世界各国警方用于毒品搜查、爆炸物搜查和机场检疫等领域。作为警犬,其作业能力是其嗅觉能力的外在表现。

本研究对拉布拉多犬(*Canis familiaris*)嗅觉受体 CfOLF4 基因进行克隆和序列分析比较,旨在了解警犬嗅觉受体 CfOLF4 基因的变异特性。

1 材料与方 法

1.1 犬和克隆菌株 拉布拉多犬由公安部南

基金项目 公安部 C 类项目(No. 20039729506);

第一作者介绍 缪勤,男,副研究员,研究方向:分子病毒学与免疫学;E-mail: miaoqindue@yahoo.com.cn.

收稿日期:2006-10-20;修回日期:2007-03-09

京警犬研究所培育。克隆专用宿主菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.2 试剂 常规的分子生物学试剂如 *Taq* DNA 聚合酶, 克隆载体 pMD-18T, 琼脂糖凝胶 DNA 回收纯化试剂盒等均购自大连宝生物公司。核酸提取试剂 Trizol 购于 Invitrogen 公司, 其余常规生化试剂为进口或国产分析纯。

1.3 采血 用 75% 乙醇消毒犬的前肢静脉皮肤, 用消毒过的 12 号针头刺入静脉采血 3 ~ 5 ml (ACD 抗凝), 用冰瓶带回实验室置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 模板 DNA 的提取 以 Trizol 法提取血液中的总 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 引物设计与合成 参照 Issel-Tarver 等^[7] 方法设计引物, 用以扩增 CfOLF4 基因, 并在 5' 端分别添加 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点和保护碱基。引物交由江苏百龙公司合成。

P1 5' ATCTT GAATTCCTGGAAGCTAGAGAAT-GATACACG 3'

EcoR I

P2 5' CTTGA GTCGACTCTGAGGCTGTAG-ATGAAG 3'

Sal I

1.6 PCR 扩增与 PCR 产物的回收 PCR 反应总体积 20 μ l : 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ l, 10 \times PCR Buffer 2.0 μ l, 2.5 mmol/L dNTP mixture 1.6 μ l, DEPC-H₂O 11.9 μ l, *Taq* 酶 (5 U/ μ l) 0.5 μ l, 样品 2.0 μ l, 10 nmol/L P1 和 P2 各 0.8 μ l。优化后的 PCR 循环参数为 : 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 51 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后, PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外灯下观察结果、照相。PCR 产物的回收过程参照 Agarose Gel DNA Extraction Kit 说明进行, 回收产物溶于洗脱液中。

1.7 T-A 克隆与序列分析 连接反应的具体操作在冰上进行。切胶纯化的 PCR 产物与 pMD-18T 载体的摩尔比为 1:(2 ~ 10), 16 $^{\circ}$ C 反应过夜。连接产物以热激法直接转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 。氨苄青霉素抗性平板筛选培

养 (37 $^{\circ}$ C, 16 ~ 24 h) 后挑取阳性克隆, 提取质粒进行鉴定。将鉴定后的阳性克隆送上海博亚生物技术有限公司进行序列测定。

1.8 重组质粒的鉴定

1.8.1 重组质粒的酶切鉴定 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切。取微量反应管, 依次加入 pMD-CfOLF4 8 μ l, *EcoR* I 1 μ l, *Sal* I 1 μ l, 10 \times Buffer H 2 μ l 和 ddH₂O 8 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 3 h。反应结束后, 酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.8.2 重组质粒的 PCR 鉴定 以重组质粒 pMD-CfOLF4 为模板, 以 P1、P2 为引物, 按上述 PCR 反应条件进行 PCR 鉴定。

1.8.3 重组质粒的序列测定及序列分析 各取 1.5 ml 经鉴定正确插入目的片段的阳性克隆 pMD-CfOLF4, 送上海博亚生物技术有限公司进行序列测定。结果与 GenBank 上公布的犬 CfOLF4 基因进行 BLAST 比较。

2 结果和讨论

2.1 CfOLF4 基因片段的 PCR 扩增 以 P1、P2 为引物, 扩增出大小约 879 bp 的 CfOLF4 基因目的片段, 与预期片段长度一致 (图 1)。

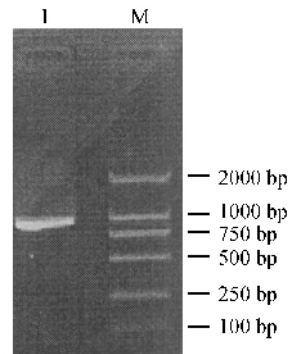


图 1 PCR 扩增产物的电泳分析

Fig.1 Electrophoresis of the products amplified by PCR

1. PCR 扩增产物; M. DNA 分子量标记 DL2000.

1. 879 bp fragments of Labrador OR gene;

M. DNA marker DL2000.

2.2 重组质粒的鉴定

2.2.1 重组质粒的酶切鉴定 重组质粒 pMD-

CfOLF4 经 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切后,酶切产物经电泳得到大小约 879 bp 的核酸电泳条带和约 2.6 kb 核酸电泳条带(图 2),初步证明所挑取阳性克隆为正确的重组转化子。

2.2.2 重组质粒的 PCR 鉴定 以重组质粒 pMD-CfOLF4 为模板,以 P1、P2 为引物,对初步

筛选的阳性克隆按上述 PCR 反应条件进行 PCR 鉴定,均扩增出大小约 879 bp 的目的片段,与预期片段长度一致(图 3)。

2.3 序列测定 将经鉴定的阳性克隆的菌液送上海博亚生物技术有限公司进行序列测定,结果见图 4。

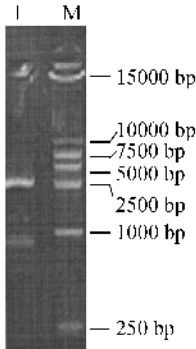


图 2 重组质粒双酶切鉴定结果

Fig.2 Analysis of recombinant plasmids by double digest

- 1. 重组质粒经 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切后的产物;
- M. DNA 分子量标记 DL15000。
- 1. pMD-CfOLF4 plasmids of Labrador digested with *EcoR* I + *Sal* I ; M. DNA marker DL15000.

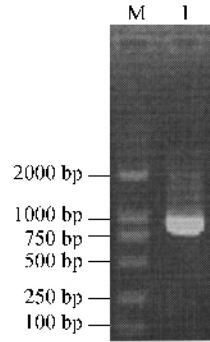


图 3 重组质粒的 PCR 鉴定结果

Fig.3 Analysis of recombinant plasmids by PCR

- 1. 拉布拉多犬 CfOLF4 基因重组质粒 PCR 扩增产物;
- M. DNA 分子量标记 DL2000。
- 1. The products amplified from pMD-CfOLF4 plasmids by PCR ;
- M. DNA marker DL2000.

```

TGGAAGTAGAGAATGATACACGAATTCAGAAATTTCTCCTTCTGGGATTTTCAGAGGAACCAAAATTGCAGCCCTTCCTC
TTTGGGCTGTTCTGTCATGTACCTGGTCACCATACTTGGGAACCTGCTCCTCATCTGGCTGTCAGCTCTGACTCTCAC
CTCCACACCCCATGTAATCTTCTTCCTTGCCTATCTGCTCTTGTAGACATCTGTTTCACCTGTACCACCATCCCAAAGATGC
TGGAATATAACAAACAAAGAAAAGTCATAACTTATGAGAGCTGCATCAGATGTAATTTTCGAGCTTTTTCGAG
GTATAGACAATTTCCCTCTGACTGTGATGGCCTATGATCGTACATGGCCATCTGTACCCCTGCACATACATGGTTCATCAT
GAACCCCTCAGCTCTGTTCACTACTACAACCTGGTATCCTGGATCATGAGTGCCTTGCATTCTTTGTTACAAACCTTAATGGT
GTTGCGACTGTCCTTCTGTACACATTTCCAAATCCCCACTTTTCTGTGAACCTCAATCAGATGATCAACTTGCCTGTTCT
GACACCTTTCTTAATAACATGATGTTGATTTTGCAGCTATATTGCTGGGGGTTGCTCCCCTGGTGGAGTCTCTTACTCTTA
TTTCAAGATAGTTTCCCTCTATACGTGGGATCTCATCAGCTCACAGCAAGTATAAAGCAITTTCCACCTGTGCTTCTCACCTC
TCGGTGTCTCCTTATTTTATTGTACAAGCCTAGGAGTGTACCTTAGCTCCGCTGCTCCCAGAGCACCACACAAGTTCA
GTGGCCTCAGTGATGTACAGTGGTCAACCCCATGCTGAACCCCTTTCATCTACAGCCTCAGAA

```

图 4 CfOLF4 基因的序列

Fig.4 The nucleotide sequence of Labrador CfOLF4 gene

2.4 嗅觉受体基因片段的序列同源性分析

测序结果表明,已测序的 879 bp 碱基中未发现碱基缺失或其他使阅读框(ORF)发生移位的突变。本研究扩增的拉布拉多犬序列片段与 GenBank 上犬 CfOLF4 序列 U53682 比较,基因同源性为 99.8%(图 5),且并无插入或缺失位点,只是在第 434 和 879 位碱基上发生碱基替换(表 1)。种系关系的分析也表明二者之间遗传关系很近(图 6)。

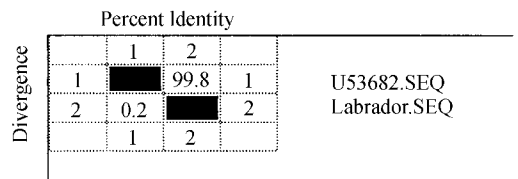


图 5 CfOLF4 基因核苷酸序列同源性分析

Fig.5 Homologous analysis of CfOLF4 base sequences

表 1 碱基替换情况

Table 1 Nucleotide and amino acids alterations

碱基位置(bp) Loci	CfOLF4	434	879
碱基替换 Base substitution	U53682 拉布拉多犬	T A	G A

2.5 讨 论 嗅觉受体基因属于 G 蛋白偶联

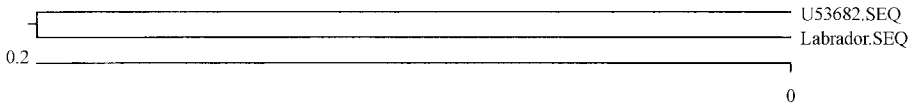


图 6 种系关系图

Fig.6 Phylogenetic relationship

本研究中,应用 PCR 技术从拉布拉多犬血液 DNA 中成功扩增出一个 879 bp 的 CfOLF4 基因,与 GenBank 中已发表的犬 CfOLF4 基因序列(U53682)进行比较,发现二者有 99.8% 同源性。进一步研究发现有两个核苷酸发生了突变(第 434 位的 T 变为 A,第 879 位的 G 变为 A)。而 Krautwurst 等研究表明,氨基酸序列的改变能够使动物嗅觉特异性发生变化^[9]。此核苷酸的突变对犬嗅觉功能的影响状况还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sharon D, Glusman G, Pilpel Y, *et al.* Genome dynamics, evolution, and protein modeling in the olfactory receptor gene superfamily. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, **855**: 182 ~ 193.
- [2] Malnic B, Hirono J, Sato T, *et al.* Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 1999, **96**: 713 ~ 723.

受体超家族^[1]。1991 年 Buck 等首次在褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 克隆并发现嗅觉受体基因^[8]。随后的研究发现嗅觉受体基因构成了基因组中已知的最大的超家族之一,也称为嗅亚基因组或 OR 基因超家族^[1]。每一嗅觉受体由大约 1 kb 单一编码的外显子组成。

- [3] Olender T, Fuchs T, Linhart C, *et al.* The canine olfactory subgenome. *Genomics* 2004, **83**(3): 361 ~ 72.
- [4] Quignon P, Kirkness E, Cadieu E, *et al.* Comparison of the canine and human olfactory receptor gene repertoires. *Genome Biol* 2003, **4**: R80.1 ~ R80.9.
- [5] Zhao H, Firestein S. Vertebrate odorant receptors. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **56**: 647 ~ 659.
- [6] Lancet D, Gross-Isseroff R T, Seidmann E, *et al.* Olfactory: from signal transduction and termination to human genome mapping. *Chem Senses*, 1993, **18**: 217 ~ 225.
- [7] Issel-Tarver L, Rine J. Organization and expression of canine olfactory receptor genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(20): 897 ~ 10 902.
- [8] Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 1991, **65**(1): 175 ~ 187.
- [9] Krautwurst D, Yau K W, Reed R R. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell*, 1998, **95**(7): 917 ~ 926.