

## 黄牛 *Ghrelin* 基因的克隆、表达及生物学活性检测

张爱玲<sup>1,2</sup>, 张丽<sup>1,3</sup>, 陈宏<sup>1,4</sup>, 张良志<sup>1</sup>, 蓝贤勇<sup>1</sup>, 张春雷<sup>1,4</sup>, 张存芳<sup>1</sup>, 朱泽轶<sup>1,5</sup>

1 西北农林科技大学动物科技学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

2 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

3 广东海洋大学农学院, 湛江 524000

4 徐州师范大学 细胞与分子生物学研究所, 徐州 221000

5 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850

**摘要:** 本研究通过 RT-PCR 方法从秦川牛皱胃底腺 mRNA 扩增获得 *Ghrelin* 基因的 cDNA 序列, 克隆至 pGM-T 载体获得重组质粒 pGh-T1, 并进行序列测定。将测序正确的 cDNA 序列定向克隆到 pET32a(+), 构建表达载体 pGh-32, 并转化 BL21(DE3)大肠杆菌。IPTG 诱导后 SDS-PAGE 分析表明秦川牛 *Ghrelin* 基因在大肠杆菌中获得高效表达, 可溶性分析表明 Ghrelin 融合蛋白以可溶性和包涵体 2 种形式表达。Western blotting 初步证实了所获的融合蛋白是特异的。镍柱亲和层析法分离纯化融合蛋白并皮下注射家兔后获得了融合蛋白的抗体血清, ELISA 检测血清的稀释效价在 1:12 800。将获得的血清与黄牛下丘脑弓状核进行免疫组化试验, 进一步印证了重组蛋白表达产物是有活性的, 为进一步研究黄牛 Ghrelin 的功能及其对黄牛生长发育和脂肪沉积奠定了基础。

**关键词:** 黄牛, RT-PCR, Ghrelin, 克隆, 基因表达

## Cloning, prokaryotic expression of cattle *Ghrelin* gene and biological activity detection of the expressed protein

Ailing Zhang<sup>1,2</sup>, Li Zhang<sup>1,3</sup>, Hong Chen<sup>1,4</sup>, Liangzhi Zhang<sup>1</sup>, Xianyong Lan<sup>1</sup>, Chunlei Zhang<sup>4</sup>, Cunfang Zhang<sup>1</sup>, and Zeyi Zhu<sup>1</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

2 College of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

3 Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524000, China

4 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221000, China

5 Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

**Abstract:** The cDNA of cattle *Ghrelin* gene was amplified from abomasum fundic gland mRNA of Qinchuan Cattle by RT-PCR. PCR product was cloned into the T vector pGM-T to construct pGh-T1 for sequencing. Then the cDNA was subcloned into the prokaryotic expressing plasmid vector pET32a(+) and transformed into host *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) for expression. The expression of pGh-32 mature Ghrelin protein was induced by IPTG and was identified by SDS-PAGE. The expression product was

**Received:** July 12, 2008; **Accepted:** October 20, 2008

**Supported by:** National 863 Program of China (No. 2006AA10Z197), National Natural Science Foundation of China (No. 30771544), National Key Technology R&D Program (No. 2006BAD01A10-5), Sustaining Program for Topnotch Persons of Northwest A&F University (No. 01140101), Natural Science Foundation of Xuzhou Normal University (No. 2003XY234).

**Corresponding author:** Hong Chen. Tel: +86-29-87092004; Fax: +86-29-87092164; E-mail: chenhong1212@263.net

国家“863 计划”(No. 2006AA10Z197), 国家自然科学基金(No. 30771544), 国家支撑计划(No. 2006BAD01A10-5), 西北农林科技大学拔尖人才支持计划(No. 01140101)和徐州师范大学专项基金(No. 2003XY234)资助。

observed with soluble protein and inclusion body. Western blotting showed that the recombinant protein was recognized by his-antibody specifically. The protein was purified by Ni-NTA column and was used to inject rabbits to obtain polyclonal antibody. ELISA result showed that the antibody titer was 1:12 800. The immunohistochemistry test between the hypothalamus arcuate nucleus and the antibody showed that fusion protein had biological activity. This will provide a basis for further study on the biological function of Ghrelin protein to growth and development and fat deposition of cattle.

**Keywords:** cattle, RT-PCR, Ghrelin, cloning, gene expression

众所周知,生长激素是由生长激素释放激素刺激垂体而分泌,不过内源性的生长激素促分泌素(GH secretagogues, GHSs)则是促进生长激素分泌的另一个途径。生长激素促分泌素的受体在垂体和下丘脑中发现<sup>[1]</sup>,而 Ghrelin 作为哺乳动物内源性的生长激素释放激素受体(GHSR)的内源性配体,则是在大鼠及人的胃中分离得到<sup>[2]</sup>。Ghrelin 在中文尚没有准确的译法,有人译为生长素。Arvat 等报道正常人注射 Ghrelin 后会引发饥饿反应,所以又有人称之为胃饥饿素<sup>[3]</sup>。Ghrelin 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成。Ghrelin 在胃中的含量较高,在中枢神经含量则比较低,免疫组化得知 Ghrelin-应答中枢神经细胞只局限于下丘脑弓状核一个非常有限的部位<sup>[2]</sup>。

当 Ghrelin 与其位于下丘脑的受体结合后,会产生一系列生物学效应如调节机体生长发育、调节能量平衡、促进胃酸分泌、提高食欲和增加脂肪积聚、增加体重等功能<sup>[4]</sup>,目前已成为人类和畜牧学科研究的热点之一。Tschop 等报道皮下或脑室注射 Ghrelin 增加小鼠与大鼠的采食、减少体脂利用并增加体重,提示对维持机体能量稳态有重要作用<sup>[5]</sup>。Ghrelin 不仅仅能够促进摄食,另外过多的 Ghrelin 还可减缓代谢率,其减少体脂利用可能是通过抑制脂肪氧化达到的<sup>[6]</sup>。长期注射 Ghrelin 可引起体重的增加,分析显示体重的增加主要在于脂肪的增加,而非肌肉或是骨骼的增加,故在 Ghrelin 引起的体重增加过程中,与脂肪的积聚是有关的, Ghrelin 前体基因的突变与肥胖有关系,也支持这一观点。

在家畜育种方面,人们更关注于其与家畜的能量平衡、肥胖及脂肪代谢的关系、与摄食的关系等方面的研究。动物机体处于精确的能量平衡中,胃肠道和下丘脑产生的 Ghrelin 影响中枢对能量平衡和摄食的调节,动物饥饿时血液中 Ghrelin 增加,在促进摄食的同时减少体内脂肪的消耗,引起动物体重增加。因此,了解 Ghrelin 调节脂肪、采食、能量代谢平衡的机制对研究新的养分分配、调控物质、

提高畜禽胴体品质、提高动物生产性能和维护动物机体健康等都具有很高的应用价值和现实意义。但由于 Ghrelin 被发现时间较短,在畜牧生产上的应用研究还非常少。不过在家畜上已有猪、绵羊等 Ghrelin 基因的研究报道<sup>[7-10]</sup>,但是目前对 Ghrelin 的研究还处于较初级的阶段,对 Ghrelin 在生理调节中的作用也了解不多。关于 Ghrelin 和其他激素对畜禽饥饿、摄食、脂肪蓄积和体重调节的研究,也还处在初始阶段,在这方面的深入研究将会给动物的能量调控带来令人惊喜的发现。本研究以中国著名的良种黄牛品种—秦川牛为研究对象,克隆表达了其 Ghrelin 基因,并进行了抗体血清制备和黄牛下丘脑弓状核免疫组织化学检测,期望对牛的 Ghrelin 基因结构功能研究积累基础的资料,为 Ghrelin 基因在黄牛的的生长发育、肌间脂肪积聚和肉质改良方面研究提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

大肠杆菌菌株 BL21(DE3)、DH5 $\alpha$ 由本实验室保存。

### 1.2 酶与试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶(*Bam*H、*Hind*), *Taq* DNA 聚合酶、Trizol 和溶菌酶均为 MBI 公司产品。DNA 聚合酶、1 kb Marker、Marker I、克隆载体 pGM-T 为北京天为时代公司产品,表达载体 pET32a(+)由本实验室保存,protein marker 为 TaKaRa 公司产品。DNA 凝胶回收试剂盒购于杭州博日科技公司, DNA 质粒提取试剂盒购于北京新长江公司。

### 1.3 秦川牛血液 DNA 的提取

血液 DNA 按常规的酚抽提法进行<sup>[11]</sup>。

### 1.4 引物的设计与合成

根据 GenBank 公布的牛 Ghrelin 全基因序列和 preproghrelin mRNA 序列,设计秦川牛 Ghrelin 基因 cDNA 的 RT-PCR 引物。引物由 Sangon 合成(表 1)。

表 1 研究中所用引物

Table 1 Primers used in the study

Name	Sequence (5'-3')	Feature
G-1-H	ATggatccATGCCCGCCCCGTGGACC	<i>Italic</i> : protection base; lowercase: <i>Bam</i> H I site; underline: initiation codon
G-4	ATaagcttTCACTCGTTAGCCAGGGTTTCTTCAG	<i>Italic</i> : protection base; lowercase: <i>Hind</i> III site; underline: reverse complemented sequence of the 3' end of exon 3; the other base were the reverse complemented sequence of the exon 4

### 1.5 RT-PCR 克隆秦川牛 *Ghrelin* 基因的编码区

采用 Trizol 法提取秦川牛皱胃 mRNA, 并测定提取总 RNA 的  $OD_{260/280}$ , 其比值在 1.8~2.0 时进行 RT-PCR。将获得的 367 bp 的 *Ghrelin* 基因 cDNA 序列与 pGM-T 载体用 T4 DNA 连接酶 22 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆经 PCR 和酶切初步鉴定后测序, 阳性克隆命名为 pGh-T1。

### 1.6 秦川牛 *Ghrelin* 基因原核表达质粒的构建以及在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

将 pGh-T1 及表达载体 pET32a(+) 质粒经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 回收 351 bp 的片段以及载体大片段, 将目的片段和载体大片段连接过夜后转化 BL21(DE3)感受态细胞。菌液 PCR 初步鉴定正确后, 提取质粒, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 鉴定正确后测序, 命名为 pGh-32。挑取测序正确的单克隆于 5 mL 含 100 mg/L 氨苄的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养 12~14 h。次日, 按 1:100 扩大培养至  $OD$  值为 0.6 时, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续诱导培养 8 h, 同时将空载体 pET32a(+) 的诱导表达作阴性对照。在不同的时间点收集菌液, 以 10 000 r/min 速度离心 10 min 沉淀菌体, 加入 SDS 蛋白上样缓冲液混匀后, 煮沸 10 min, 离心取上清 10  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE。

### 1.7 大肠杆菌表达 *Ghrelin* 基因目的蛋白的可溶性分析

首先收集 IPTG 诱导的不同时间段的菌体(2 h、4 h 和 6 h), 煮沸后电泳, 发现 pGh-32 载体在 6~8 h 诱导量比较大, pGh-32 上 His 标签加上 351 bp 的目的蛋白(11 kD 左右)约 31 kD。同时把 pET32a(+) 空载体作为对照, 在诱导后 His 标签得到表达, 大小为 20 kD。

为了获知表达的融合蛋白 His-Ghrelin 是可溶性表达还是以包涵体形式表达, 将菌体悬浮于 PBS 液中, 反复冻融后, 加入溶菌酶和蛋白酶抑制剂 (PMSF) 混匀, 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后超声波破碎菌体, 然

后离心分别收集上清和沉淀(沉淀主要为包涵体)进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.8 大肠杆菌表达 *Ghrelin* 基因目的蛋白抗体制备与特异性鉴定

#### 1.8.1 *Ghrelin* 抗体制备与间接 ELISA 抗体效价检测

免疫前 2 周从耳缘静脉采集血清 1.5 mL, 作为对照血样。分 4 次免疫家兔, 第 1 次免疫注射后 2 周进行第 2 次免疫, 以后每隔一周免疫 1 次。注射剂量为 400  $\mu$ g/次 1 kg 体重。前 2 次免疫时目的蛋白用弗氏完全佐剂充分乳化蛋白, 使蛋白形成油包水的颗粒结构。后 2 次免疫时目的蛋白用弗氏不完全佐剂充分乳化蛋白。第 4 次免疫后 1 周, 从兔子心脏采血 20 mL, 低温析出血清。

采用 ELISA 方法检测抗体效价。将已知抗原适当设置 3 个浓度稀释, 加入每孔后过夜, 然后加倍比稀释的待检血清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗涤, 加入新鲜稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5~1 h 后洗涤, 各反应孔中加入 TMB 底物溶液, 37 $^{\circ}$ C 0.5 h 后加硫酸终止反应。在酶标仪上于 450 nm 处, 以空白对照孔调零后测各孔  $OD$  值, 若大于规定的阴性对照  $OD$  值的 2.1 倍, 即为阳性。

#### 1.8.2 Western blotting 检测

将收集浓缩的表达产物经过 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素膜, 丽春红 S 染色后采用 8 mL BSA/TBS 溶液进行封闭, 将膜用 PBS 漂洗过后与 1:50 稀释的抗血清结合 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 然后与 HRP 标记羊抗鼠 IgG 反应 1 h, 加 DAB 底物液显色后双蒸水洗膜终止显色反应, 晾干照像。

#### 1.8.3 *Ghrelin* 抗体特异性鉴定

迅速取新鲜的秦川牛脑, 尽量将周围的肌肉组织和骨头剥离, 将其置入 4% 多聚甲醛溶液, 固定 3~4 d。小心把弓状核切下来, 进行脱水和石蜡包埋, 切片后备免疫组织化学实验用。His-商品抗体购于 Promega 公司, 免疫组织化学实验采用常规的 ABC 法。

## 2 结果

### 2.1 秦川牛 *Ghrelin* 基因编码区 DNA 的 RT-PCR 扩增结果和表达载体构建

秦川牛皱胃胃底腺提取 RNA 和 *Ghrelin* 基因编码区 cDNA 示意图见图 1。将预期目的条带定向克隆至 pET-32 载体上, 获得 pGh-32 表达载体。用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切得到了约 6000 bp 和 367 bp (包括酶切位点和保护碱基)的目的条带(图 2), 初步证明 pGh-32 是所需要的阳性克隆, 进一步测序结果表明表达质粒 pGh-32 构建正确, 带有秦川牛的 *Ghrelin* 基因全部编码区。

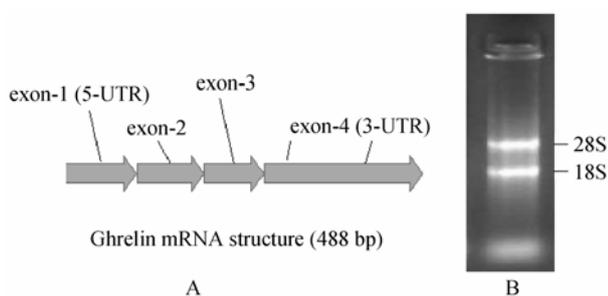


图 1 *Ghrelin* 基因 mRNA 示意图(A)和皱胃胃底腺组织 RNA(B)

Fig. 1 Construction of *Ghrelin* gene mRNA (A) and the agarose electrophoresis of RNA from the cattle abomasum fundic gland (B).

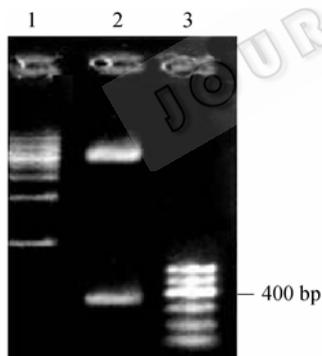


图 2 重组质粒 pGh-32 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切图谱  
Fig. 2 The *Bam*H I and *Hind* III pattern analysis of the recombinant plasmid of pGh-32. 1: 1kb marker, from upper to bottom: 10 kb, 8 kb, 7 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb; 2: the fragment of pGh-32 digested by *Bam*H I and *Hind* III; 3: marker I, from upper to bottom: 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp.

### 2.2 秦川牛 *Ghrelin* 基因的诱导表达与可溶性分析

将转化 pET32a(+)和 pGh-32 的 BL21(DE3)菌液诱导后, 收集菌体进行 SDS-PAGE, 得到了约 31 kD

的预期蛋白特异带, 与理论估计的相对分子质量相符(20 kD His 标签加约 11 kD 的目的蛋白, 图 3)。将菌体悬浮于 PBS 液中反复冻融 3 次后, 每克菌体加入 80  $\mu$ L 10 mg/L 的溶菌酶及 40  $\mu$ L 100 nml/L PMSF(蛋白酶抑制剂)混匀, 4 放置 30 min 后超声波破碎菌体, 然后 4 8000  $\times$  g 离心 15 min, 分别收集上清和沉淀(沉淀主要为包涵体)进行 SDS-PAGE, 结果表明目的蛋白大部分在上清表达, 一小部分以包涵体的形式存在。可以看到融合蛋白 His-Ghrelin 在上清中表达, 也以包涵体的形式表达, 不过上清中的表达量要大于包涵体, 即融合蛋白 His-Ghrelin 可溶性表达大于包涵体表达(图 4)。

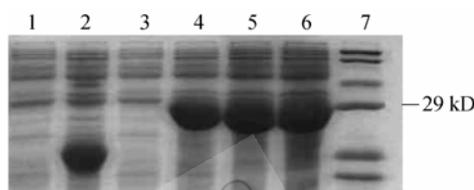


图 3 pGh-32 表达产物 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of His-Ghrelin fusion protein in pGh-32. 1: uninduced pET32a+; 2: induced pET32a+; 3: uninduced pGh-32; 4-6: induced pGh-32 for 2, 4 and 6 h; 7: protein marker, from upper to bottom: 99, 66, 44, 29, 20, and 14 kD.

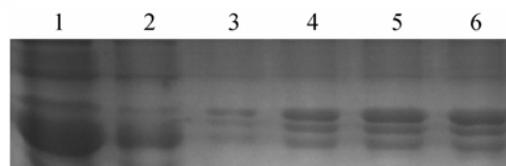


图 4 pGh-32 表达产物的可溶性表达分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the solubility of His-Ghrelin fusion protein in pGh-32. 1: anabacteria; 2: supernatant fluid; 3-6: urea inclusion body.

### 2.3 His-Ghrelin 融合蛋白抗体制备及 Western blotting

将本研究获得的蛋白免疫獭兔后采血获得血清通过 ELISA 间接检测血清抗体效价。酶标仪检测  $OD_{450}$  处吸光值表明血清在稀释到 1:12 800 倍时有明显的颜色梯度, 从曲线上(图 5)可以看到将血清稀释至 12 800 倍以上时吸光值急剧下降, 故把吸光值在阴性  $OD$  值 2.1 倍以上的判为阳性, 血清的稀释效价在 1:12 800。可以看到阴性对照(注射蛋白前采集的血清)基本没有吸光值。

由于本研究获得的目的蛋白是以细胞周质可溶性和包涵体形式表达的, 而且以可溶性表达为主,

所以从上清中来分离纯化目的蛋白。根据融合蛋白带有 His 标签, 故用带有硫酸镍的结合柱, 在蛋白分离纯化仪上分离纯化目的蛋白, 并将纯化后的目的蛋白进行浓缩。将目的蛋白与免疫兔后获得的血清抗体进行免疫印迹杂交, 在图 6 泳道可以清楚地看到有一条印迹条带, 而作为阴性对照(阴性血清)的泳道 2 则在相应的位置没有印迹条带, 这说明了表达的融合蛋白与免疫兔产生的抗体发生了特异性结合。

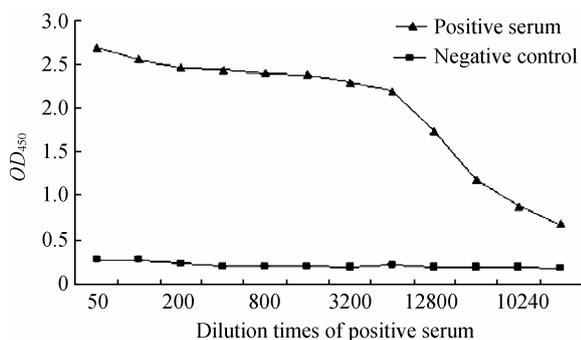


图 5 His-Ghrelin 融合蛋白免疫兔血清抗体效价测定  
Fig. 5 Titration of the immunized rabbit serum to His-Ghrelin fusion protein dilutions.



图 6 His-Ghrelin 融合蛋白的免疫印迹 Western blotting 鉴定(原核表达)

Fig. 6 Identification of His-Ghrelin fusion protein by Western blotting (prokaryotic expression). 1: protein marker, the same to the Fig 3; 2: the immunoblot of positive serum and protein; 3: the immunoblot of negative serum and protein.

### 2.4 免疫组织化学结果

图 7 为秦川牛弓状核石蜡组织切片与血清抗体免疫组织化学反应结果。胞质呈现棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞, 经过苏木精复染后可以清楚地看到细胞核的存在 (图 7A)。同时将采集的阴性血清与弓状核组织进行免疫组织化学反应, 做阴性对照 (图 7B), 经苏木精复染后并没有观察到棕黄色出现。Ghrelin 基因在神经细胞的胞质表达, 本实验结果再一次印证了所得到的抗体的特异性, 间接说明了所

获得的目的蛋白是有活性的。

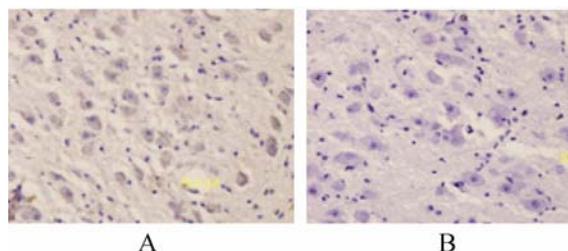


图 7 秦川牛弓状核与血清抗体免疫组织化学反应结果 (苏木精复染, 放大倍数×400)

Fig. 7 The immunohistochemistry of arcuate nuclei and polyclonal antibody (stained with haematoxylin repeatedly, the enlargement factor of ×400). A: positive result; B: negative control.

## 3 讨论

Ghrelin 作为 GHSs 受体的配体, 具有多种功能。如 Ghrelin 刺激垂体细胞释放生长激素 (GH), 而且呈现剂量依赖型。体内 Ghrelin 刺激 GH 分泌的途径有 2 条, 一是直接作用于垂体促 GH 分泌, 再者为通过生长激素释放激素 (GHRH) 及一些未知的下丘脑因子间接作用于垂体生长激素细胞, 促进 GH 分泌<sup>[2]</sup>。因此 Ghrelin 对于家畜的生长发育具有重要的作用。下丘脑弓状核是食欲调节的重要部位, Ghrelin-应答中枢神经细胞只局限于下丘脑弓状核。不过下丘脑的 Ghrelin 最得注意的一个功能是食欲调节功能, 是第一个被发现的来自胃的食物摄入刺激调节信号以及第一个被证明具有促进人类食欲的消化道-脑肽。当给予大鼠脑室注射 Ghrelin 时, 其采食量大大增加<sup>[12,13]</sup>。采食量是衡量家畜生长速度快慢的一个直观的指标, 而往往食欲旺盛的个体采食量也大, 这样的个体生长速度快, 能较快达到成年体重, 节约培育成本。Ghrelin 能增进食欲, 提高采食量, 对于临床上治疗动物的食欲不佳、厌食具有重要的意义。但是目前只在人、小鼠上研究较多, 而在大家畜上研究则较少, 国内在猪上有研究, 黄牛则还没有相关研究。

近年来如何保持能量平衡、减少饲料报酬和提高牛肉的肌间脂肪一直是肉牛育种的目标之一。肌间脂肪是表明肌肉品质的重要指标之一, 与肌肉多汁性、柔嫩度、风味和适口性密切相关。肌间脂肪能明显改善肌肉坚实性, 使柔嫩度增加, 口感更舒适。因此, 在肉牛传统选育的基础上, 如果能够深入

地研究 Ghrelin 的功能, 研究其对牛生长发育过程中的脂肪积聚作用, 将会加快肉牛肉品质选育的进度, 早期实现育种目标。Ghrelin 有“肥胖信号”的作用, 对脂肪的积聚和贮存有作用, 被认为是能量代谢的长期作用。长期注射 Ghrelin 可引起体重的增加, 通过分析体重的增加主要为脂肪的增加, 而非肌肉或是骨骼的增加, 故在 Ghrelin 引起的体重增加过程是与脂肪合成代谢和分解代谢, 脂肪的积聚是有关的, Ghrelin 基因的突变与肥胖有关系, 也支持这一观点。Ghrelin 可能在营养物质的摄入, 胃动力功能和中枢神经系统存在反馈信号, 其作为促食欲多肽, 可通过刺激食欲, 增加营养物质摄入, 对脂肪的积聚和储备有正相关作用, 造成脂肪增加。秦川牛是我国的优良肉用品种, 本工作以秦川牛为研究对象, 克隆了其 Ghrelin 基因并实现该基因在原核的高效表达, 并进一步作了目的蛋白的 Western blotting 和免疫组织化学检测, 均得到了可靠的结果, 这些将有望为黄牛增食欲微生态制剂的开发应用打下基础, 同时也对黄牛能量平衡和牛肉品质方面积累更多的研究资料, 对于研究提高饲料报酬和牛肉品质具有一定的意义。另外, 通过基因克隆和原核表达获取牛 Ghrelin 的目的肽将进一步作为抗原免疫动物, 为其功能的深入研究打下了基础, 后续工作正在进行。

## REFERENCES

- [1] Guan XM, Yu H, Palyha OC, *et al.* Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997, **48**(1): 23–29.
- [2] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al.* Ghrelin is a growth-hormone—releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999, **402**: 656–660.
- [3] Arvat E, Di Vito L, Broglio F, *et al.* Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest*, 2000, **23**: 493–495.
- [4] Broglio F, Koetsveld P, Benso A, *et al.* Ghrelin is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**(10): 4829–4832.
- [5] Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 2000, **407**: 908–913.
- [6] Asakawa A, Inui A, Kaga T, *et al.* Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*, 2001, **120**: 337–345.
- [7] Yang LY, Yang WY, Zhao YC, *et al.* Cloning and expression of Ghrelin gene in pig. *Chin J Vet Sci*, 2005, **25**(6): 614–616.  
杨连玉, 杨文艳, 赵颖彩, 等. 猪 Ghrelin 基因的克隆及原核表达. *中国兽医学报*, 2005, **25**(6): 614–616.
- [8] Yang LY, Yang WY, Ji FJ, *et al.* Cloning of Ghrelin gene and its mRNA distribution in pig. *J Jilin Agri Univ*, 2004, **26**(1): 86–88.  
杨连玉, 杨文艳, 冀凤杰, 等. 猪 Ghrelin 的基因克隆及其组织中 mRNA 分布的研究. *吉林农业大学学报*, 2004, **26**(1): 86–88.
- [9] Wu ZF, Xiang YW, Shi ZD, *et al.* Construction of the plasmid of Ghrelin gene and the function on pig growth. *J Huazhong Agri Univ*, 2006, **25**(3): 259–263.  
吴珍芳, 向有为, 施振旦, 等. 猪 Ghrelin 基因表达质粒构建及其促生长作用. *华中农业大学学报*, 2006, **25**(3): 259–263.
- [10] Lv DY, Cao GF, Bai CL, *et al.* Cloning and analysis of the cDNA of Ghrelin gene in sheep. *Acta Vet Zootech Sin*, 2006, **37**(8): 735–739.  
吕东媛, 曹贵方, 白春玲, 等. 蒙古绵羊 ghrelin cDNA 的克隆及序列分析. *畜牧兽医学报*, 2006, **37**(8): 735–739.
- [11] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.  
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. *分子克隆实验指南*. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Nakazato M, Murakami N, Date Y, *et al.* A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 2001, **409**(6817): 194–198.
- [13] Wren AM, Small CJ, Ward HL, *et al.* The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 2000, **141**(11): 4325–4328.