

鲑鱼生长激素 cDNA 的改造和克隆

白俊杰 李新辉 罗建仁 马进

(农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室,
中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘要 采用聚合酶链反应(PCR)方法改造鲑鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)生长激素 cDNA。改造后的 cDNA 去除了编码生长激素成熟肽 cDNA 以外的信号肽序列及 5' 端和 3' 端的非翻译序列, 加入一起始密码, 并在改造后的基因两端引入 Bam H I 识别序列各 1 个。亚克隆后对改造过的基因进行了序列分析。

关键词 鲑鱼, 基因改造, 聚合酶链反应, 生长激素

鱼生长激素(f-GH)是由鱼脑垂体间叶细胞分泌的用于调节鱼体生长发育的一种多肽激素, 被认为是最具潜力的鱼类生长促进剂^[1]。现已证明, 基因重组的 f-GH 可通过口服被鱼体肠道吸收^[2,3], 具有很强的促生长作用^[4,5]。这些发现将为水产饲料业的发展开辟广阔的前景。在鱼类生长激素 cDNA 的表达和应用中, 酵母被认为是理想的表达宿主。这不仅因为酵母是真核细胞, 能更有效地表达真核基因^[6], 还由于酵母本身无毒, 营养价值高, 是很好的饲料源。然而, 作为低等真核生物的酵母往往不能识别高等动物基因的信号肽序列, 在构建表达质粒时常需把它们去除。

本文采用聚合酶链反应(PCR)方法, 对鲑鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)生长激素 cDNA 进行改造和修饰, 去除编码生长激素成熟肽序列以外的信号肽序列和非编码区序列, 在成熟肽序列之前加进一起始密码, 还在基因的两端各引入一 Bam H I 酶切位点, 便于下一步亚克隆。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种 鲑鱼生长激素 cDNA 质粒 popGH 来自中科院发育生物研究所。质粒 pUC18,

宿主菌 *E. coli* DH₅ α 购自华美生物工程公司。

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、PCR 扩增试剂盒 B 等购自华美生物工程公司。DNA 纯化试剂盒购自天象人公司, 低熔点琼脂糖为 Sigma 公司产品, 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)、异丙基- β -D 硫代乳糖苷(IPTG)等为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的制备 大肠杆菌转化、PCR 方法、低熔点琼脂糖回收 DNA 等方法参照 Sambrook 的方法^[7]。

1.2.2 PCR 扩增引物的合成及纯化 PCR 扩增引物委托上海 Sangon 生物工程公司合成, 合成产物经 PAGE 电泳纯化。

1.2.3 扩增模板的获得 Hind III 消化质粒 popGH, 低熔点琼脂糖法回收鲑鱼生长激素 cDNA 片段。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 反应在 Perkin Eetus 2400 型 DNA 扩增仪上进行, 模板浓度 6 ng, 引物浓度 25 pmol。解链反应 94 $^{\circ}$ C, 60 s; 退火反应 55 $^{\circ}$ C, 60 s; 延伸反应 72 $^{\circ}$ C, 120 s; 25 个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析后用 DNA 纯化试剂盒提供的方法纯化, 再溶于无菌水中。

1.2.5 扩增产物的克隆和筛选 纯化过的 PCR 扩增产物经 Bam H I 酶切与 Bam H I 酶切过的

收稿日期: 1997-05-26

pUC18 DNA 混合, T₄DNA 连接酶 14℃ 连接过夜。转化 *E. coli* DH₅ α , 蓝、白斑法结合电泳法筛选重组子。

1.2.6 重组子的序列分析 采用 373A 自动荧光测序仪自动测序。

2 结果

2.1 扩增引物的设计

采用 P1 和 P2 两引物扩增鲑鱼生长激素成熟肽编码序列。P1 是起始引物, 含 31 个碱基, 5'CGC GGATCCATGATAGAAAACCAACGGCTCT3'。该引物除了与编码成熟肽前 5 个氨基酸残基的正链序列一致的碱基外, 还加入了 1 个翻译的起始密码 ATG, 1 个 Bam H I 识别位点和用来保护该位点的 3 个附加碱基。P2 是终止引物, 有 29 个碱基, 5'CGCGGATCCCCGTCTACAGAGTGCAGTTG3'。该引物除了与编码成熟肽末端氨基酸残基负链的 13 个碱基和 1 个终止码 TAG 一致外, 还引入了 1 个 Bam H I 识别位点和 3 个附加的保护碱基。用 P1 和 P2 做引物, 经 PCR 扩增, 可等到一 592 bp 的

扩增片段, 其中包括编码完整的鲑鱼生长激素成熟肽序列, 1 个起始码, 1 个终止码, 以及 5'端和 3'端各 1 个 Bam H I 的识别位点。鲑鱼 GH(sGH) cDNA PCR 改造和克隆策略见图 1。

2.2 PCR 扩增

以 popGH/Hind III 为模板, P1、P2 作引物进行 PCR 反应。25 个循环后取 5 μ l 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳分析, 有 1 条清晰的扩增带约 590 bp。见图 2。

2.3 扩增产物的克隆

PCR 扩增产物经 Grass milk 纯化, Bam H I 酶切后与 pUC18 Bam H I 酶切片段连接, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH₅ α 。转化子经蓝、白斑筛选后, 再用电泳法分析, 获得 6 个有外源 DNA 片段插入的重组子。其中 3 号、5 号经进一步酶切分析证实为单片段 PCR 扩增产物插入的重组子, 命名为 pUCGH3 和 pUCGH5(图 2)。而 1、2、4、6 分别是双片段和 3 片段扩增产物插入的重组子。这是由于 PCR 扩增片段两端经 Bam H I 酶切后产生相同的粘性末端, 先自连后再克隆到 pUC18 载体上的缘故。

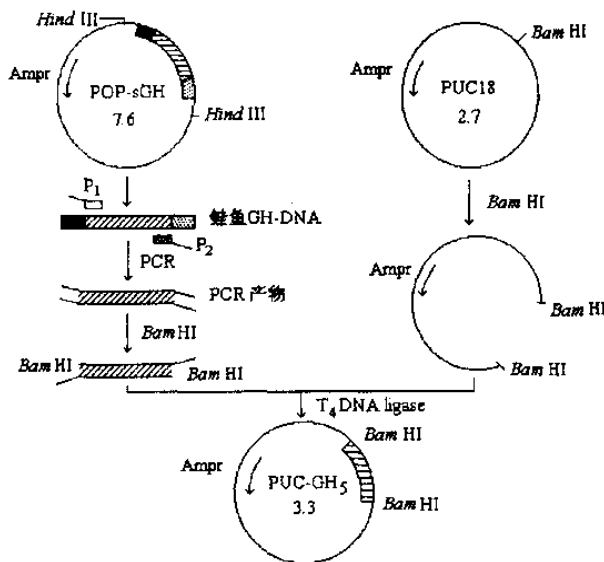


图 1 鲑鱼 GH cDNA PCR 改造和质粒 pUCGH5 构建示意图
Fig.1 Scheme for sGH cDNA PCR modification and construction of plasmid pUCGH5



图 2 PCR 产物和重组质粒 pUCGH5 的酶切电泳分析
Fig.2 Electrophoresis of PCR result and restriction pattern of plasmid pUCGH5
1. PCR result; 2. PCR result/Bam H I; 3. pUCGH5/Bam H I; 4. λ DNA/Hind III.

2.4 pUCGH5 外源插入片段的序列分析

质粒 pUCGH5 经 Bam H I 酶切后在约 590 bp 处有 1 条电泳带, 分子量与 PCR 产物几乎一样。为进一步证实该带就是经改造后的鲑鱼生长激素 cD-

```

      -20      -10      Bam HI 起始码 +1      10
5'...GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCATG ATA GAA AAC CAA CGG CTC
      20          30          40
TTC AAC ATC GTG GTC AGC CGG GTG CAA...3'
      520          530          540          550          560 终止码
5'...GTC GCC AAG TGC AGG AAG TCA CTG GAG GCC AAC TGC ACG CTG TAG
      Bam HI          580          590
ACGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAAT...3'
  
```

它包括两端的 Bam H I 识别序列, 1 个起始密码 ATG, 1 个终止密码 TAG, 在起始密码和终止密码间是鲑鱼生长激素成熟肽 cDNA 序列。这说明在 PCR 扩增中并没有发生错配或移码等非预期突变。

3 讨论

(1) PCR 是近年发展起来的 DNA 体外扩增新技术, 因其简便、实用, 当今凡涉及分子克隆的各类生物学、医学和农业科学研究都因得到 PCA 技术支持而效率大增。尤其是在 PCR 扩增时允许在引物的 5' 端引入一些与靶序列不完全互补的错配序列, 对于定向改造扩增产物极有帮助。鱼生长激素基因的信号肽序列不一定能被低等真核生物酵母识别, 预计需要除去 cDNA 的信号肽序列, 加上 1 个起始密码与表达载体连接, 以构建成高效表达系统。由于编码信号肽与成熟肽连接部位的序列缺乏合适的限制性内切酶识别序列, 使表达质粒的构建十分困难。采用 PCR 方法, 在设计引物时让序列两端引入合适的酶切位点, 便于表达载体的亚克隆。

(2) 用 PCR 技术进行基因改造无疑带来许多便利, 然而美中不足的是 PCR 反应中常用的 Taq 聚合酶缺乏 3'→5' 外切活性。因此, 在 PCR 反应中如果发现某些核苷酸的错配, 这种酶是没有校正功能的。使用 Taq DNA 聚合酶的 PCR 反应出现碱基错配的机率为 2.1×10^{-4} [8]。这对于基因表达将带来非常严重的后果, 因为 1 个碱基序列的改变, 特别是 1 次框架的移动将会引起蛋白质合成的改变。为此我们采取了以下 3 点措施, 以尽可能减少这种非预期突变的产生: ① 选择优质的 Taq DNA 聚合酶; ② 反应中适当增加模板的浓度; ③ 适当减少循环次数。序列分析结果证实, 我们的实验并没有发生非

预期的突变。我们对该插入片段的全序列进行了测定并证实该序列就是预期改造后的鲑鱼生长激素 cDNA。序列测定的部分结果:

预期的突变。

(3) 将 PCR 产物克隆到载体中往往要比其它来源的 DNA 片段克隆难些, 这可能是由于扩增产物两端的限制性内切酶识别序列没有足够多的保护碱基, 也可能是由于 Taq DNA 聚合酶与 PCR 产物末端结合而封闭酶切位点所致, 影响了酶切效率。解决的方法除了在设计引物时多加些保护碱基(这不仅增加合成引物的费用, 而且引物中也不允许过多的与模板不配对序列), 由于不同的内切酶要求保护碱基数也不同, 在设计引物时要充分考虑该加的保护碱基数。除此, 扩增产物经纯化去除残留的 Taq DNA 聚合酶也有助于酶切处理。

致谢: 本实验得到中山大学生物工程中心罗进贤教授实验室的帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Donaldson, et al. Hormonal enhancement of growth. In: Fish Physiology Academic Press, New York, 1979, 8:455~597
- 2 Georgopoulou, et al. Absorption of intact proteins by the intestinal epithelium of trout *Salmo gairdneri*: Aluminence enzyme immunoassay and cytochemical study. Cell Tiss Res, 1988, 251:145~151
- 3 LeBail P Y, et al. Intestinal transfer for growth hormone into the circulatory system of the rainbow trout *Salmo gairdneri*: interference by granule cells. Aquaculture, 1989, 91:197~203
- 4 张庆. 基因重组金枪鱼生长激素对草鱼鱼种生长的作用. 水产学报, 1993, 17(3): 230~233
- 5 Mclean E, et al. Growth acceleration of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) following oral administration of recombinant bovine somatotropin. Aquaculture, 1990, 91:197~203
- 6 Schober, et al. Yeast vector for production of interferon. In: Methods in Enzymology. New York: Academic press, 1986, 119:416~423

- 7 Sambrook J, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 8 卢圣栋, 等. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 413-415

Reform and clone of growth hormone cDNA for *Oncorhynchus tshawytscha*

Bai Junjie Li Xinhui Luo Jianren Ma Jin

(Key Lab. of Tropical and Subtropical Fish Breeding and Cultivation, Ministry of Agriculture,
Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

Abstract A polymerase chain reaction (PCR) method was used to modify the growth hormone cDNA of *Oncorhynchus tshawytscha*. The modified cDNA sequence contains an initiator codon and a completely coded mature peptide sequence of sGH for chinook trout, and deletes putative signal sequence and 5' & 3' untranslated regions. For easy to subclone, one Bam H I site was added to each side of reformed gene. After cDNA subcloned, the modified gene sequence was analyzed.

Key words *Oncorhynchus tshawytscha*, gene modification, PCR, salmon growth hormone