

鲤 (*Cyprinus carpio*) 生长激素 cDNA 的分子克隆及其 DNA 序列的比较*

赵晓祥 杨学成 李 晶 李 莹 张淑梅 杨志兴

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨 150010)

摘 要 从鲤鱼脑垂体中分离其总 RNA, 经反转录成第一条链 cDNA, 再经 PCR 扩增, 合成了鲤鱼生长激素 cDNA, 并把其克隆到大肠杆菌载体 (*pBluescript II* ks^+ / λ) 上。序列分析和限制性酶切图谱表明克隆的鲤鱼生长激素 cDNA 的开放读框含有 630bp, 编码 210 个氨基酸, 其中含有 22 个氨基酸的信号肽和 188 个氨基酸的成熟 GH 序列。我们克隆的鲤鱼 GH cDNA 与 Koren 发表的鲤鱼 GH cDNA 在编码区完全一致, 但与 Chao 发表的鲤鱼 GH cDNA 比较, 在编码区核酸序列和氨基酸序列的同源性分别为 95.6% 和 96.7%。

关键词 鲤鱼生长激素 cDNA, 扩增, 克隆, DNA 序列

鱼作为一种理想的生物学研究模型^[10]受到许多研究者的关注。鱼的生长激素 (GH) 是由脑下垂体前叶生成和分泌的单链多肽, 对鱼的生长发育起着重要的调节作用。由于鱼的生长激素在水产养殖业有巨大的应用价值和前景, 因此有必要对编码鱼的生长激素的基因进行研究。近年来国外已发表了几种鱼的生长激素 cDNA 及其序列^[1,2,8,11,15], 这不仅为探讨基因结构与功能的关系, 基因表达和调控以及基因的进化等课题提供了依据, 而且为培育速生的全元件转基因鱼的新品种提供了一条有效途径^[5]。我们根据已报导的鲤鱼 GH cDNA 序列^[8], 合成了两段含有 29 个寡聚核苷酸的引物, 用 PCR 方法扩增了鲤鱼 GH cDNA, 又对其进行了分子克隆和序列分析, 并与发表的鲤鱼 GH cDNA 序列^[2,8]做了比较, 为进一步研究鲤鱼 GH 基因的表达调控和基因转移奠定了基础。

材 料 和 方 法

(一)材料

1. 成熟的活鲤鱼来自黑龙江省肇州水产养殖场。
2. 限制性内切酶 EcoR I、Sal I、Sma I、Hind III、Rsa I、Nco I、T₄DNA 连接酶等均购自华美公司。

* 黑龙江省“八五”计划资助项目。

3. 反转录试剂盒和PCR试剂盒均购自Promega公司。
4. 大肠杆菌受体菌DH52和质粒(pBluescript II KS⁺/-)为本组保存。
5. 引物A: 5'CCGAATTCAGAGTTTGTCTACCCTGAGCG3'。引物B: GGGTCGACCTACAGGGTGCAGTTGGAATC3'。在引物A和引物B中,分别引入了EcoR I和Sal I酶切位点,酶切位点后的碱基顺序与Koren^[8]的鲤鱼GH cDNA的顺序(14-34和669-649)相对应。

(二) 方法

1. 鲤鱼总RNA的分离 取鲤鱼脑垂体0.5g,采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步分离总RNA的方法,详见参考文献^[4]。
2. 反转录 取总RNA 5μg, OhigoldT) 12-18引物 2.5μg, AMV反转录酶(75U),以上均按Promega公司反转录试剂盒说明操作。
3. PCR扩增 取反转录反应液11μl, 10UM引物A和引物B各2μl, 10×PCR缓冲液10μl, 2.5mMdNTPs 10μl, 总体积100μl, 97℃变性10min, 加入Taq DNA聚合酶2μl(6U), 石蜡油100μl, 进行PCR扩增(72℃ 50s, 94℃ 60s, 55℃ 30s), 35个循环后, 72℃延伸10min。
4. 生长激素cDNA的克隆 质粒(pBluescript II KS⁺/-)用Sma I酶切, 与PCR产物以1:2的比例连接, 用连接液转化大肠杆菌DH52感受态细胞, 筛选氨苄抗性菌落。具体方法见参考文献^[13]。
5. 核酸序列测定 依据Sanger双脱氧中止法^[14], 使用美国ABI公司370A自动序列分析仪, 以双链质粒DNA为模板, 用带荧光标记的T₇引物和PCR引物B做为序列分析的引物, 具体操作均按ABI公司说明书进行。结果借助DNA序列分析软件进行处理。
6. 限制性酶切图谱 用EcoR I和Sal I酶切pBluescript II KS⁺/--cGH重组质粒, 用1%低融点琼脂糖凝胶回收668bp的片段, 然后分别用Hind III、Rsa I和Nco I酶切回收的片段。见参考文献^[13]。

结 果

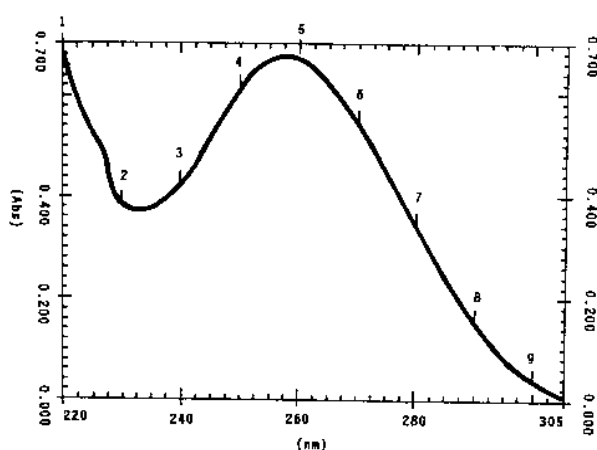
(一) 总RNA的分离及反转录

从0.5g鲤鱼脑垂体中共获得700μg的总RNA。OD260与OD280的比值为2.0。纯度如紫外扫描图(图1)所示。在反转录过程中, 以总RNA为模板, 省略了分离纯化poly(A)⁺RNA的过程。减少了样品在分离纯化过程中的损失。

(二) PCR扩增及其产物的克隆

在PCR扩增中, 把退火温度提高到55℃退火时间减到30s, 减少了PCR产物的非特异性多带。在94℃ 60s, 55℃ 30s, 72℃ 50s的条件下, 经过35个循环, 扩增出约668bp长的鲤鱼GH cDNA特异性一条带(图2)。以pBluescript II KS⁺/-质粒载体为对照, 筛选到一个较大重组子, 并用EcoR I和Sal I限制性内切酶鉴定, 此重组子中确有668bp的片段插入到质粒载体中, 并命名此重组子为pBluescript II KS⁺/-.cGH(图3)。

(三) 序列分析及酶切图谱



(POINT)	(ABS)	(POINT)	(ABS)
WAVELENGTH	VALUE	WAVELENGTH	VALUE
1: 220.0	0.680	2: 230.0	0.378
3: 240.0	0.419	4: 250.0	0.605
5: 260.0	0.671	6: 270.0	0.538
7: 280.0	0.335	8: 290.0	0.155
9: 300.0	0.036		

图 1 鲤鱼总 RNA 的紫外吸收图

Fig.1 Ultraviolet absorption pattern of total RNA for carp



图 2 鲤鱼 GH 基因的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of carp GH gene

1. λ DNA / Hind III 分子量标准
2. PCR 扩增 668bp 的 cGH 基因
1. λ DNA / Hind III marker
2. 668bp of cGH gene by PCR amplification



图 3 重组质粒的酶切电泳图

Fig.3 1.0% agarose gel electrophoresis of digestion patterns of recombinant plasmid

1. λ DNA / Hind III 分子量标准
2. pBluescript II KS+ / -cGH / EcoRI+Sal I
3. pBluescript II KS+ / -cGH 重组质粒
4. pBluescript II KS+ / -cGH 质粒载体
1. λ DNA / Hind III marker
2. pBluescript II KS+ / -cGH / EcoRI+Sal I
3. recombinant plasmid pBluescript II KS+ / -cGH
4. plasmid vector pBluescript II KS+ / -

以 pBluescript II KS⁺ / -cGH 质粒 DNA 为模板, 用美国 ABI370A 全自动序列仪测出了 641bp 的核苷酸序列。由于使用了 PCR 引物 B 作为测序另一端的引物, 以致缺少了 PCR 引物的 27 个核苷酸, 这 27 个核苷酸与我们合成的 PCR 引物 B 的核苷酸顺序完全一致。因此, 可确定 668bp 的核苷酸序列。序列分析的结果表明我们所克隆的鲤鱼 GH cDNA 的开放读框含有 630bp 编码 210 个氨基酸, 其中含有 22 个氨基酸的信号肽和 188 个氨基酸的成熟 GH 序列 (图 4)。用 HindIII、Rsa I 和 Nco I 酶切 668bp 长的鲤鱼

GH cDNA, 参照序列分析的结果, 确定了鲤鱼 GH cDNA 的限制性酶切图谱 (图 5 和图 6)。

```

-22      *Ala
Met Ala Arg Val Leu Val Leu Leu Ser Val Val -12
GAATTCAGAGTTTGTCTACCCCTGAGCGAAATG GCT AGA GTA TTA GTG CTA TTG TCG GTG GTG
      *C      *G
Leu Val Ser Leu Leu Val Asn Gln Gly Arg Ala Ser Asp Asn Gln Arg Leu Phe 7
CTG GTT AGT TTG TTG GTA AAC CAG GGG AGA GCA TCA GAC AAC CAG CCG CTC TTC
      *G      *T
Asn Asn Ala Val Ile Arg Val Gln His Leu His Gln Leu Ala Ala Lys Met Ile 25
AAT AAT GCA GTC ATT CGT GTA CAA CAC CTG CAC CAG CTG GCT GCA AAA ATG ATT
      *C
Asn Asp Phe Glu Asp Ser Leu Leu Pro Glu Glu Arg Arg Gln Leu Ser Lys Ile 43
AAC GAC TTT GAG GAC AGC CTG TTG CCT GAG GAA CGC AGA CAG CTG AGT AAA ATC
      *T      *C      *G
Phe Pro Leu Ser Phe Cys Asn Ser Asp Tyr Ile Glu Ala Pro Ala Gly Lys Asp 61
TTC CCT CTG TCT TTC TGC AAT TCT GAC TAC ATT GAG GCG CCT GCT GGA AAA GAT
      *C *A      *Thr
Glu Thr Gln Lys Ser Ser Met Leu Lys Leu Leu Arg Ile Ser Phe His Leu Ile 79
GAA ACA CAG AAG AGC TCT ATG CTG AAG CTT CTT CGC ATC TCT TTT CAC CTC ATT
      *T      *C      *C *G      *Arg
Glu Ser Trp Glu Phe Pro Ser Gln Ser Leu Ser Gly Thr Val Ser Asn Ser Leu 97
GAG TCC TGG GAG TTC CCA AGC CAG TCC CTG AGC GGA ACC GTC TCA AAC AGC CTG
      *T      *C      *A      *Thr
Thr Val Gly Asn Pro Asn Gln Leu Thr Glu Lys Leu Ala Asp Leu Lys Met Gly 115
ACC GTA GGG AAC CCC AAC CAG CTC ACT GAG AAG CTG GCC GAC TTG AAA ATG GGC
      *C      *A      *Ile
      *Lys *Glu
Ile Ser Val Leu Ile Gln Ala Cys Leu Asp Gly Gln Pro Asn Met Asp Asp Asn 133
ATC AGT GTG CTC ATC CAG GCA TGT CTC GAT GGT CAA CCA AAC ATG GAT GAT AAC
      *A      *G
Asp Ser Leu Pro Leu Pro Phe Glu Asp Phe Tyr Leu Thr Met Gly Glu Asn Asn 151
GAC TCC TTG CCG CTG CCT TTT GAG GAC TTC TAC TTG ACC ATG GGG GAG AAC AAC
      *C      *A      *A
Leu Arg Glu Ser Phe Arg Leu Leu Ala Cys Phe Lys Lys Asp Met His Lys Val 169
CTC AGA GAG AGC TTT CGT CTG CTG GCT TGC TTC AAG AAG GAC ATG CAC AAA GTC
      *T      *G
Glu Thr Tyr Leu Arg Val Ala Asn Cys Arg Arg Ser Leu Asp Ser Asn Cys Thr 187
GAG ACC TAC TTG AGG GTT GCA AAT TGC AGG AGA TCC CTG GAT TCC AAC TGC ACC
      *A      *C
188
Leu End
CTG TAG GTCGAC

```

图4 鲤鱼生长激素基因的核苷酸序列及氨基酸序列

星号表示与 Chao 发表的鲤鱼 GH cDNA 不同的核苷酸和氨基酸

Fig.4 Nucleotide sequence and amino acid sequence of carp growth hormone gene

Asterisks indicate different nucleotide and amino acid with chao's carp GH cDNA



图 5 鲤鱼生长激素基因的限制性酶切图谱

Fig.5 Restriction map of the carp growth hormone gene

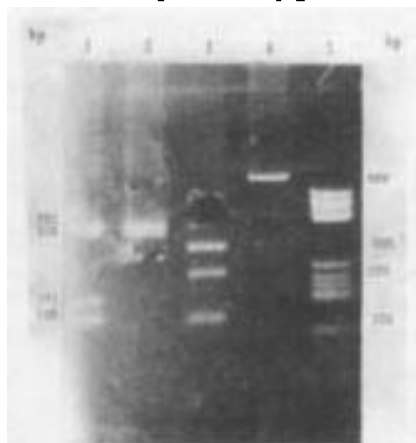


图 6 cGH DNA 的酶切电泳图

Fig.6 2.0% agarose gel electrophoresis of digestion patterns of carp GH DNA

1. cGH DNA / Rsa I + Hind III 2. cGH DNA / Hind III 3. cGH DNA / Nco I + Hind III
4. 668bp of cGH DNA 5. pBR³²² / Hae III 分子量标准
1. cGH DNA / Rsa I + Hind III 2. cGH DNA / Hind III 3. cGH DNA / Nco I + Hind III
4. 668bp of cGH DNA 5. pBR³²² / Hae III marker

讨 论

用 PCR 方法进行分子克隆比构建 cDNA 文库的方法简单, 而且能够按照预先设计的引物, 并在引物的 5' 端引入限制性内切酶的识别位点来扩增目的基因。但是在 PCR 扩增中, 需要非常重视非预期突变的问题。Tindall^[16] 指出了发生这种突变的主要原因。为了减少非预期突变, 许多学者做了研究^[6,7,9], 以改进 PCR 扩增的反应条件, 我们在设计鲤鱼 GH cDNA 的引物时, 为了增加与模板匹配的特异性适当增加了引物的长度, 使两段引物都含有 29 个寡聚核苷酸。在 PCR 扩增中, 通过增加退火温度, 减少退火时间, 限制循环次数等方法来增加 PCR 扩增中聚合反应的特异性, 减少非预期突变率。鲤鱼 GHcDNA 序列分析结果 (图 4) 证实了在 PCR 扩增中没有发生非预期的突变。我们克隆的鲤鱼 GHcDNA 的编码区的核苷酸序列和氨基酸序列与 Koren^[8] 发表的鲤鱼的 GHcDNA 的编码区序列完全相同。

我们克隆的鲤鱼生长激素 cDNA 与 Chao^[2] 发表的鲤鱼 GHcDNA 比较, 在相同位点上都含有 4 个半胱氨酸, 可形成两个二硫键, 这对稳定蛋白质的构象是必不可少的。在两个相同位点 Asn-133 和 Asn-185 有两个潜在的 N-糖基化位点, 可能是水生生物 GH 渗透调节所必需的结构。在编码区, 有 28 个核苷酸和 7 个氨基酸与 Chao 的 cDNA 编码

区的序列不同(图4),其核苷酸和氨基酸的同源率分别为95.6%和96.7%。在鲑鱼和鳟鱼中已得到了两种类型的GHcDNA^[1,12,15],这两种类型的cDNA是由分开的两种基因编码的,并证实这两种类型的GH分子量相同,氨基酸组成和等电点不同。据Koren^[8]和Chiou^[3]推测,在鲤鱼中可能也存在至少两种类型的GH基因。Chao所克隆的cDNA可能代表了鲤鱼GH的另一类型。在本实验中还没有发现Chao所克隆的鲤鱼GHcDNA的另一类型,有待于进一步研究。对这一问题的深入研究,有可能为鲤鱼的进化提供证据。

致谢: DNA序列测定得到了中国科学院微生物所王永力、沈天翔同志的帮助,PCR引物的合成得到了东北林业大学石绍业教授的帮助,表示谢意。

参 考 文 献

- [1] Agellon L B et al, 1986. DNA, 5: 463-471.
- [2] Chao S C et al, 1989. Biochim. Biophys. Acta, 1007: 233-236.
- [3] Chiou C S et al, 1990. Biochim. Biophys. Acta, 1087: 91-94.
- [4] Chomczynski P et al, 1987. Analytical Biochemistry, 162: 156-159.
- [5] Dus S J et al, 1992. Biotechnology, 10: 176-181.
- [6] Ho S N et al, 1989. Gene, 77:51.
- [7] Horton R M et al, 1989. Gene, 77:61.
- [8] Koren Y et al, 1989. Gene, 77: 309-315.
- [9] Nishikawa B K et al, 1989. Biotechniques, 7: 730-735.
- [10] Powers D A, 1989. Science, 246: 352-3587.
- [11] Rentier-Delrue E et al, 1989. DNA, 8: 271-278.
- [12] Rentier-Delrue F et al, 1989. DNA, 8: 109-117.
- [13] Sambrook J et al, 1989. In: Molecular Cloning, A laboratory Manual, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- [14] Sanger F et al, 1977. Proc. Natl. Acad. Sci-USA, 74: 546.
- [15] Sekine S et al, 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4306-4310.
- [16] Tindall K R et al, 1989. Biochemistry, 27: 6008.

MOLECULAR CLONING AND DNA SEQUENCE COMPARISON OF GROWTH HORMONE cDNA FOR CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

Zhao Xiaoxiang Yang Xuecheng Li Jing Li Ying Zhang Shumei Yang Zhixing
(Institute of Applied Microbiology Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010)

ABSTRACT Total RNA was isolated from carp pituitary gland. Then the first strand cDNA was synthesized using oligo(dT) 12-18 as primer, total RNA as template and AMV reverse transcriptase. Next the polymerase chain reaction (PCR) was performed using the first strand cDNA as template, synthetic 29 oligonucleotides as primer and Taq

DNA polymerase (94℃ 60S, 55℃ 30S, 72℃ 50S, 35 cycles). After PCR amplification, PCR products were cloned into an E. coli expression vector (pBluescript II KS⁺ / -). The result of sequence analysis and restriction map shows an open reading frame of carp growth hormone gene contains 630 base pairs which code for a polypeptide of 210 amino acids including 22 amino acids of the signal peptide and 188 amino acids of the mature growth hormone. Nucleotide sequence and amino acid sequence of carp growth hormone gene are as same as Koren's carp GH cDNA in code region. Compared with Chao's carp GH cDNA, homology of nucleotide sequence and amino acid sequence for carp growth hormone gene is 95.6% and 96.7% respectively in code region.

KEY WORDS Carp growth hormone cDNA, Amplification, Cloning, DNA sequence