

# 猪垂体中猪生长激素基因的克隆和部分序列分析

杨青 朱宝利 周顺伍 齐顺章

(北京农业大学动物生化教研室, 北京)

从猪垂体中提取出DNA, 以EMBL3噬菌体为载体, 构建了染色体基因文库。用全长的猪生长激素(pGH)cDNA作探针, 经原位杂交, 筛选出5个阳性克隆。提取其中一个阳性克隆的DNA, 通过斑点杂交, 酶解和Southern印迹, 表明它含有全长猪生长激素基因; 将Sma I 酶解后Southern印迹为阳性的两个片段进行了亚克隆, 对其中含有猪生长激素基因Sma I 位点上游序列的片段进行了部分序列分析, 并和已发表的相应序列进行了比较。

**关键词** 猪垂体; 猪生长激素基因; 序列分析

猪生长激素(pGH)是猪垂体分泌的一种蛋白类激素, 在代谢调控中起着重要作用。1983年Seeburg等首先克隆了pGH cDNA, 并进行了序列分析<sup>[1]</sup>。但对猪前生长激素来说, 他们的cDNA不够完整, 没有起始密码子。1989年我室克隆了两个比较完整的pGH cDNA, 也进行了全序列分析<sup>[2]</sup>, 将这些pGH cDNA进行比较的结果表明, 它们在编码区和非编码区的核苷酸序列上都存在差异, 表现出基因的多态性<sup>[3]</sup>。1987年Vize等发表了猪生长激素基因组基因的全序列<sup>[4]</sup>, 他们的序列表明pGH基因组基因由5个外显子和4个内含子所组成, 但他们没有说明这个基因是由猪的什么组织制备的。我们构建了猪垂体基因文库, 由其中筛选出pGH基因, 并做了部分序列分析, 试图观察pGH基因组基因的多态性。

## 材料和方法

### (一)材料

1. 实验用菌种、质粒和噬菌体:  
(见表1)
2. 酶及试剂: 各种限制酶和T4DNA连接酶购自友谊科技开发公司、华美生物

表1 实验用菌种、质粒和噬菌体

Table 1. Strain, plasmid and bacteriophage

Strain	Genotype
K802	SupE hsdR gal metB
JM107	F <sup>-</sup> (traD <sub>36</sub> proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZ ΔM15 SupE endA1 hsd R4
BHB2688	N205 recA(λimm434 cIts <sub>2</sub> redEam Sam/λ)
BHB2690	N205 recA(λimm434 cIts <sub>2</sub> redDam Sam/λ)
Plasmid	
pUC19	Amp <sup>r</sup>
Bacteriophage	
EMBL3	λ(Aam32 Bam1 sbhIΔ1 <sup>*</sup> b189 (polycloning site int29 nin44 trpE polycloning site)KH64 chiC srIΔ1 <sup>*</sup> nin5 srIΔ5 <sup>*</sup> )
M13mp18	
M13mp19	

工程公司和BRL公司。蛋白酶K和RNaseA为Merck公司产品; 胶原酶购自Sigma公司。序列分析用试剂盒为Promega公司产品。

3. 探针: 探针I: 猪生长激素(pGH)cDNA(本室)。探针II: 编码猪生长激素第1—5号氨基酸的序列: 5'TT-CCCAGCCATGCCCTT3'(由吴瑞先生

本文于1991年8月9日收到。

本课题为博士点基金支持项目

惠赠)。

4. 同位素: 序列分析用 $\alpha$ -( $^{32}\text{P}$ )dATP; 杜邦公司。探针标记用 $\alpha$ -( $^{32}\text{P}$ )dATP  $\gamma$ -( $^{32}\text{P}$ )ATP; 福瑞生物工程公司。

## (二) 方法

1. 垂体DNA的提取: 参照文献[5, 6], 并做了部分修改。从 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出猪垂体, 用Waring blender加入液氮粉碎后, 在研钵中研磨成粉状。称取2g粉末置于50ml消化液(45ml 10.5mmol/L EDTA, 5ml 15% Sarcosyl, 500 $\mu\text{l}$  10mg/ml ProteinaseK)中,  $50^{\circ}\text{C}$ 水浴放置6h。酚抽提三次后, 在5L透析液(50mmol/L Tris-Cl, pH8.0, 20mmol/L EDTA, pH8.0)中,  $4^{\circ}\text{C}$ 条件下透析过夜。在透析后的样品中加入十二烷基肌氨酸钠(Sarcosyl)到0.5%, 同时加入蛋白酶K至200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $65^{\circ}\text{C}$ 水浴作用2h, 酚抽提, 透析, 共10L透析液, 中间更换2次。加入RNaseA,  $37^{\circ}\text{C}$ 反应3h, 酚/氯仿抽提2次, 在5L TE(pH7.5)中 $4^{\circ}\text{C}$ 透析8h。再加胶原酶至20mmol/L,  $37^{\circ}\text{C}$ 反应2.5h。酚/氯仿抽提2次, 取上层液体加3mol/L NaAc(pH5.2)至0.3mol/L, 滴加 $-20^{\circ}\text{C}$ 无水乙醇, 边加边用玻璃棒搅出DNA, 用70%乙醇洗, 溶于2.5ml—3.0ml TE中,  $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2. 质粒和噬菌体DNA的提取、DNA的酶切和回收, 包装蛋白的提取、噬菌斑的原位杂交筛选和Southern印迹以及斑点杂交方法: 均参照文献[5]。

3. DNA序列分析: 以M13为载体, 按Sanger末端终止法<sup>[7]</sup>进行。

## 结果与讨论

### (一) 猪垂体DNA的提取

我们先后用3种方法提取了猪垂体DNA。首先据文献[5]的方法, 提取出的DNA分子量为60kb左右, 在溶液中浓度较低(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 不利于部分酶解的进行。然后改用文献[6]的方法, 提取出的DNA分子量较大(70—100kb), 但易降解。第三种方法是采用蛋白酶K作用两次, 并充分透析的方式(见“方法1”), 进一步除去蛋白质。透析后的样品中又加入胶原酶作用, 再次纯化。通过这种方法获得的DNA分子量约80—100kb,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.9$  贮液浓度为0.35mg/ml, 在 $4^{\circ}\text{C}$ 条件下保存很稳定。

### (二) 基因文库的构建

为获得所需长度的DNA, 我们对部分酶解条件进行了摸索。用不同量的Sau3A对制得的DNA进行酶解, 当Sau3A的量为0.063u/ $\mu\text{g}$  DNA时,  $37^{\circ}\text{C}$ 反应1h, DNA片段大都集中在长度合乎要求的9—23 kb之间, 故为最适酶量。

根据做大量DNA部分酶解时, Sau3A的量为最适酶量的1/2的原则<sup>[6]</sup>, 实验中Sau3A酶量为0.03u/ $\mu\text{g}$  DNA, 然后回收9—23kb的DNA片段, 与用BamHI-EcoRI双酶解后的载体EMBL3 DNA按克分子数1:1混合, 加入T4 DNA连接酶, 在 $12-16^{\circ}\text{C}$ 下反应16h, 经体外包装(包装蛋白为自制, 效价 $5 \times 10^8$  pfu/ $\mu\text{g}$  DNA), 获得 $10^8$ 个重组体(背景 $2.5 \times 10^3$ 已减除)。经计算<sup>[8]</sup>在猪基因组基因文库中, 当重组体超过 $9.6 \times 10^5$ 时, 可能包含染色体上99%的特殊序列。我们得到了 $1.0 \times 10^8$ 重组噬菌体, 是符合基因文库的要求的。

### (三) 含猪生长激素基因的阳性克隆的筛选和鉴定

1. 探针杂交筛选: 以pGH cDNA为探针, 经原位杂交, 筛选出5个阳性克

隆。

提取所得杂交阳性克隆的DNA, 进行斑点杂交, 再次表明 5 个克隆均为阳性(图 1)。

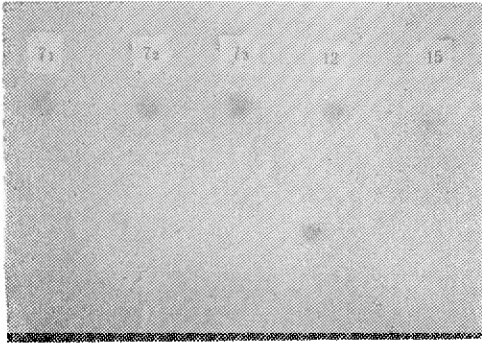


图 1 斑点杂交结果

Fig 1. Dot blot hybridization for positive clones

Upper line: five positive clones: EMBL3-pGH1, EMBL3-pGH2, EMBL3-pGH3, EMBL3-pGH12, EMBL3-pGH15; Lower line: left, EMBL3 DNA, right, pGH cDNA

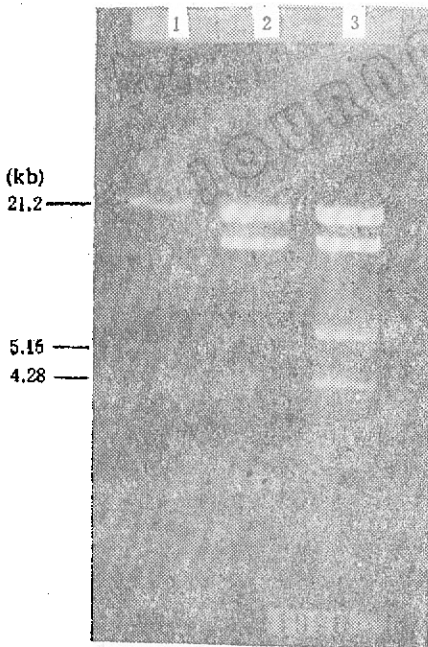


图 2 Sma I 酶切结果

Fig.2 Sma I digestion patterns of positive clones

1.1 lambda EcoRI-HindIII markers, 2. EMBL3-pGH15; 3. EMBL3-pGH3

2. 酶切和Southern印迹鉴定: 用 Sma I 对EMBL3-pGH3(图 2 中的“7<sub>3</sub>”) DNA进行酶切, 电泳后(图 2)以pGH cDNA为探针进行Southern印迹, 其中 有两条带杂交为阳性(图 3), 说明基因中 间有一个Sma I 位点。



图 3 Sma I 酶切后Southern印迹

Fig.3 Southern hybridization of Sma I digested EMBL3-pGH DNA

1.1 lambda EcoRI-HindIII markers; 2. EMBL3-pGH15; 3. EMBL3-pGH3 Two bands were observed in both lanes 2 and 3

将Vize的pGH基因全序列<sup>[4]</sup>输入计算机, 检索限制酶位点, 得知在整个基因中仅有一个Sma I 位点, 与我们的实验结果一致, 因而推测EMBL3-pGH3中含有 pGH基因。把Southern印迹条带与原电泳结果比较, 阳性片段为第二(长度约 14kb), 第四(长度约4kb)两条带。将两个片段分别克隆到质粒pUC19中, 转化大肠杆菌JM107, 快速抽提白色克隆的 DNA, 分别用探针 I 和探针 II 进行斑点杂交, 含4kb片段的DNA与探针 I 和探针 II 均呈阳性杂交, 说明它含有pGH

因的Sma I 位点上游的序列。而14kb片段则仅与探针 I 呈阳性杂交, 与探针 II 不杂交, 说明它所含的是pGH基因Sma I 位点下游的序列。从Vize的基因序列中可以看出, Sma I 位点上游的片段长度为1.64kb左右, 而我们所得的含Sma I 位点上游序列的片段约为4kb, 可见, EMBL3-pGH3可能含有pGH基因Sma I 位点上游的全部序列。而Vize基因Sma I 位点下游的片段长度为0.86kb左右, EMBL3-pGH3经Southern印迹显示的另一个阳性片段, 即含Sma I 位点下游序列的片段长度约为14kb, 可见Sma I 位点下游的基因序列也可能是完整的。由此推断, EMBL3-pGH3中可能含有全长pGH基因。

由于在Vize的基因序列中只有一个Pvu II 位点, 它与终止密码子相距12个碱基, 用Pvu II 酶解EMBL3-pGH3, 并做Southern印迹, 结果为两个阳性片段(图4)。可见, EMBL3-pGH3中所含的pGH基因内也只有一个Pvu II 位点, 并且Pvu-II 位点下游的片段相当长, 因而推测EMBL3-pGH含有pGH基因的3'-端的全部

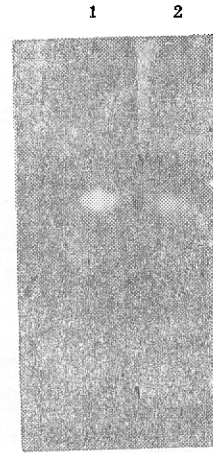


图4 Pvu II 酶切后Southern印迹

Fig.4 Southern hybridization of Pvu II digested EMBL3-pGH DNA  
1.  $\lambda$  EcoR I -Hind III markers;  
2. EMBL3-pGH2; 3. EMBL3-pGH3

序列, 并可能含有完整的pGH基因。

另外, 检索Vize的基因序列得知, pGH基因内部没有Sal I 位点。因此用Sal I 酶解EMBL3-pGH的DNA后进行Southern印迹, 可见一条5.1kb的阳性条带(图5)。表明我们克隆的pGH基因内部没有Sal I 位点, 也与Vize序列中的情况相符合。

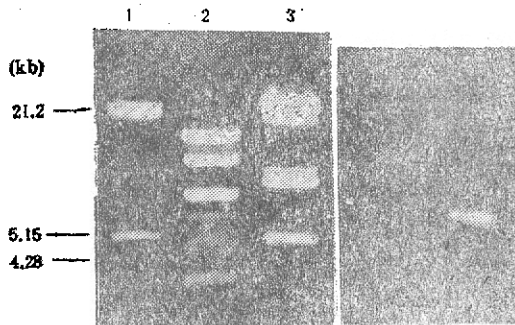


图5 EMBL3-pGH3用Sal I 酶切结果和Southern印迹。

Fig.5 Sal I digestion and Southern blotting patterns of EMBL3-pGH3  
1.  $\lambda$  EcoR I -Hind III markers; 2. digestion with Ava I; 3. digestion with Sal I; 4. Southern hybridization of Sal I digested EMBL3-pGH3 DNA

以上酶切分析结果初步证明, 从垂体基因文库中筛选出的EMBL3-pGH3可能含有全长的pGH基因。

#### (四) 部分序列分析

我们对含有pGH基因Sma I 位点上游序列的4kb片段做了部分序列分析, 结

Our nucleotides sequence determined upstream from SmaI site in pGH gene

```

↓
5'-----GGAACATGCCACCACCGGCTAAGACAGCGCACGTGAGCGCAG-GAC GTG GAG CTG CTG CGC
-----GGGGGACGCCACCACCGGAGGCAGCGCATCTGCCCGCAG-GAC GTG GAG CTG CTG CGC
↑ The pGH sequence reported by Vize
-----Intron 3----- -asp val glu leu leu arg

TTC TCG CTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTC GGG CCC GTG CAG TTC CTC AGC AGG
TTC TCG CTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTC GGG CCC GTG CAG TTC CTC AGC AGG
phe ser leu leu leu ile glu ser trp leu gly pro val gln phe leu ser arg

GTC TTC ACC AAC AGC CTG GTG TTT GGC ACC TCA GAC CGC GTC TAC GAG AAG CTG
GTC TTC ACC AAC AGC CTG GTG TTT GGC ACC TCA GAC CGC GTC TAC GAG AAG CTG
val phe thr asn ser leu val phe gly thr ser asp arg val tyr glu lys leu

AAG GAC CTG GAG GAG GGC ATC CAG GCC CTG ATG CCG-----
AAG GAC CTG GAG GAG GGC ATC CAG GCC CTG ATG CCG-GT-----intron 4-----CAG
lys asp leu glu glu gly ile gln ala leu met arg
<-----
-GAG CTG GAG GAT GGC AGC CCC CGG G-----3' TACCGAGCTCGAATTA-----
-GAG CTG GAG GAT GGC AGC CCC CGG G-----mp19-----
glu leu glu asp gly ser pro arg

```

图 6 部分序列分析结果

Fig.6 The nucleotide sequence upstream the Sma I site of pGH gene  
The arrow indicates the sequencing direction

果见图 6。

从图 6 可以看出, 我们所分析的是 pGH 基因中由第 5 个外显子的 Sma I 位点到其 5'-端的 227 个碱基序列。把这段序列与 Vize 发表的相应序列进行比较时表明: (1) 第五个外显子中的一段序列是完全相同的; (2) 在 Vize 的序列中, 此外显子的上游为第四个内含子 (278bp)。而在我们的基因中无此内含子, 在第五个外显子的上游紧接着就是第四个外显子; (3) 我们第四个外显子的序列与 Vize 的完全相同; (4) 和 Vize 的序列一样, 在第四个外显子的上游为一内含子, 但这段序列虽与 Vize 的序列基本相同, 却有许多不同之处。

所分析的外显子部分与 Vize 报道的基因组基因的序列相同, 也与我室制备的

pGH cDNA 基因的相应序列相同, 因而表明我们所克隆的确实是 pGH 基因。内含子方面的差异则至少说明了基因的多态性, 这种情况已在我们分析 pGH cDNA 基因中得到了证明<sup>[8]</sup>。在比较我们的 2 个 pGH cDNA 基因以及他人报道的同一基因的序列时发现, 尽管编码成熟 pGH 的序列也有所不同, 但所代表的氨基酸序列则是完全相同的, 说明了在这方面的保守性。但在引导序列中所编码的氨基酸也有所不同, 说明这一序列的可变性比较大。我们所分析的 pGH 基因组基因的这一段序列与 Vize 的相应序列的异同似乎也说明了这一点, 即编码成熟 pGH 部分的序列是保守的, 而内含子部分的变异性则比较大。至于这种变异是否有生理意义需要进一步探讨的。

## 参 考 文 献

- [1] Seeburg, P.H., et al., *DNA*, 2:37—45, 1983.
- [2] 齐顺章, 生物工程学报5(1):35—37, 1989.
- [3] O'Mahony, D.V., et al., *Animal Genetics*, 20:313, 1989.
- [4] Peter, D.V., et al., *Gene*, 55:339—344, 1987.
- [5] Maniatis, T., et al., *Molecular Cloning, A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [6] Bernhar, G.H., et al., in *Methods in Enzymology*, Vol. 152, pp. 180—183, 1987.
- [7] Sanger, F., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:5463—5467, 1977.
- [8] Kaiser, K., et al., *DNA Cloning*, Vol. I, Glover, D.M. editor, IRL Press, pp. 1—47, 1985.

## Cloning and Partly Sequencing of the Porcine Growth Hormone(pGH) Gene from Pituitary Gland

Yang Qing    Zhu Baoli    Zhou Shunwu    Qi Shunzhang  
(Laboratory of Animal Biochemistry, Beijing Agricultural University, Beijing)

The high molecular weight DNA was isolated from porcine pituitary gland, and the genomic library was constructed using  $\lambda$  EMBL3 as the cloning vector. Five positive clones were identified by in situ hybridization with the full length pGH cDNA. Dot-blot hybridization, restriction analysis and Southern hybridization showed that one of the positive clones contains the whole sequence of pGH gene. Two positive Sma I fragments were subcloned, one of which contains the upstream sequence from the Sma I site of pGH gene and subsequently were partly sequenced. We also compared the sequence that we obtained with the reported corresponding sequence of pGH gene.

### Key words

Porcine pituitary gland, porcine growth hormone gene, DNA sequencing