

鲤鱼生长激素基因的 PCR 扩增、克隆及其序列比较

赵晓祥 李 晶 李荣萍 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 (*Cyprinus carpio*) 脑垂体中分离其总 RNA, 经反转录成为第一条链 cDNA。以第一条链 cDNA 为模板, 以合成的两段 29 个寡聚核苷酸为引物, 再经过 PCR 扩增, 合成了鲤鱼的生长激素基因, 并将其克隆到大肠杆菌表达载体 (p^{Blue-script} KS⁺/-) 上。序列分析和限制酶切图谱表明所克隆的鲤鱼生长激素基因的开放读框含有 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。我们所克隆的鲤鱼 GH 基因与 Koren 发表的鲤鱼 GHcDNA 的序列在编码区完全一致, 但是与 Chao 发表的鲤鱼 GHcDNA 比较, 在编码区核苷酸序列和氨基酸序列的同源性分别为 95.6% 和 96.7%。

关键词 鲤鱼生长激素基因, PCR 扩增, 克隆, DNA 序列分析

鱼作为一种理想的生物学研究模型^[1]受到许多学者的关注。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基因进行研究。近年来国外已发表了几种鱼的生长激素 cDNA 的克隆及其序列^[2~6], 并与一些哺乳类的生长激素基因进行了比较, 发现它们在氨基酸组成和生物活性方面具有高度的保守性^[2]。这些研究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进化等课题提供了依据, 而且为培养速生的全鱼元件转基因鱼的新品种提供了一条有效途径^[7]。我们根据已报道的鲤鱼生长激素 cDNA 序列^[4], 合成了两段含有 29 个寡聚核苷酸的引物, 用 PCR 方法扩增了鲤鱼的生长激素基因, 又对其进行了克隆和序列分析, 并与发表的鲤鱼生长激素 cDNA 序列^[4,5]做了比较, 为进一步研究鲤鱼生长激素基因的表达调控和基因转移奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 成熟的活鲤鱼来自黑龙江肇州水产养殖场。

1.1.2 限制酶 EcoR I、Sal I、Sma I、Hind III、Rsa I、Nco I, T4DNA 连接酶等均购自华美公司。

1.1.3 反转录试剂盒和 PCR 试剂盒均购自 Promega 公司。

1.1.4 大肠杆菌受体菌 DH5 α 和质粒 (p^{Blue-script} KS⁺/-) 为本组保存。

1.1.5 根据 Koren 发表的鲤鱼 GHcDNA 的序列, 设计合成了 PCR 扩增所需的引物 A

和引物 B。引物 A: 5' CCGAATTCAGAGTTTGTCTACCCTGAGCG3'。引物 B: 5' GGGTCGACCTACAGGGTGCAGTTGGAATC3'。在引物 A 中引入了 EcoR I 酶切位点, 酶切位点后的碱基顺序与 Koren 的鲤鱼 GHcDNA 的顺序 (从 14~34) 一致。在引物 B 中引入了 Sal I 酶切位点, 酶切位点后的碱基顺序与 Koren 的鲤鱼 GHcDNA 的顺序 (从 669~649) 互补。

1.1.6 实验所用其它一些试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 鲤鱼总 RNA 的分离: 取鲤鱼脑垂体 0.5g, 采用 Chomczynski 的异硫氰酸胍-酚-氯仿一步分离总 RNA 的方法, 详见参考文献[8]。

1.2.2 反转录: 取总 RNA 5 μ g, oligo (dT) 12~18 引物 2.5 μ g, AMV 反转录酶 (75u), 42 $^{\circ}$ C 保温 60min。以上均按 Promega 公司反转录试剂盒说明操作。

1.2.3 PCR 扩增: 取反转录反应液 11 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 (mmol/L) (500 KCl、100 Tris-HCl、pH9.0、15 MgCl₂, 0.1% gelatin, 1% Triton X100) 10 μ l, 2.5mmol/L dNTPs 10 μ l, 10 μ mol/L 引物 A 和 B 各 2 μ l, 双蒸水 64 μ l, 97 $^{\circ}$ C 变性 10min, 加入 TaqDNA 聚合酶 2 μ l (6u), 石蜡油 100 μ l, 进行 PCR 扩增 (72 $^{\circ}$ C 50s, 94 $^{\circ}$ C 60s, 55 $^{\circ}$ C 30s) 经过 35 个循环后, 在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.2.4 生长激素基因的克隆: 质粒 (p^{Bluescript} KS⁺/-) 用 Sma I 酶切, 并与 PCR 产物以 1:2 的比例连接, 12 $^{\circ}$ C 连接过夜。用连接液转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选氨苄抗性菌落。详见参考文献[9]。

1.2.5 核酸序列测定: DNA 序列测定依据 Sanger 双脱氧中止法^[10], 使用双美国 ABI 公司 370A 自动序列分析仪, 测定反应试剂盒购于 ABI 公司, 其中包括单、双脱氧单核苷酸底物, TaqDNA 聚合酶, 带荧光标记物的 T7 引物 (5' AATACGACTCACTATAG3') 和 PCR 引物 B。序列反应用双链质粒 DNA 为模板, 双链模板的提取见参考文献[9]。测序全过程, 包括聚合酶链延伸反应, 聚丙烯酰胺凝胶的制备, 电泳及数据收集分析均按 ABI 公司说明书操作。结果借助 DNA 序列分析软件进行处理。

1.2.6 限制酶切图谱: 用 EcoR I 和 Sal I 酶切 p^{Bluescript} KS⁺/-c GH 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。详见参考文献[9]。

2 结果

2.1 总 RNA 的分离及反转录

从 0.5g 鲤鱼脑垂体中共获得 700 μ g 的总 RNA。OD₂₆₀与 OD₂₈₀的比值为 2.0。纯度如紫外扫描图 (图 1) 所示。采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步提取 RNA 的方法, 分离的总 RNA 纯度高, 时间短, 是提取 RNA 比较好的方法。在反转录过程中, 我们以总 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, 结果表明以总 RNA 为模板的反转录同样是成功的。

2.2 PCR 扩增及其产物的克隆

在 PCR 扩增中, 有诸多因素影响 PCR 的产物, 其中退火温度和退火时间是影响 PCR

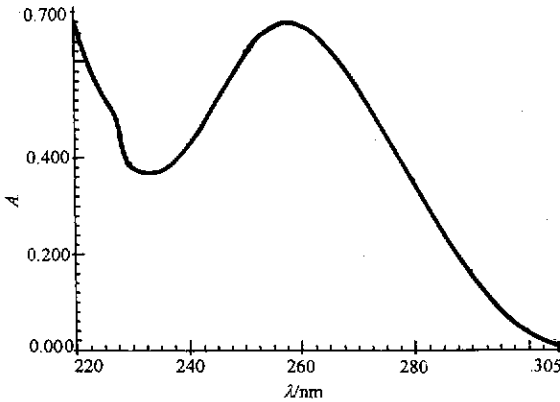


图1 鲤鱼总 RNA 的紫外吸收图

Fig. 1 Ultraviolet absorption pattern of total RNA for carp

668bp 的片段插入到 p^{Bluescript I} KS⁺/— 质粒载体中, 并命名此重组子为 p^{Bluescript I} KS⁺/—-cGH (图版 I-B)。

2.3 序列分析及酶切图谱

以 p^{Bluescript I} 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 B 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, 我们可确定 668bp 的核苷酸序列。序列分析的结果表明我们所克隆的鲤鱼生长激素基因的开放读框含有 630bp, 编码 210 个氨基酸, 其中含有 22 个氨基酸的信号肽序列和 188 个氨基酸的成熟 GH 序列。图 2 显示了鲤鱼生长激素基因的核苷酸顺序和氨基酸顺序。用 Hind III、Rsa I 和 Nco I 酶切 668bp 长的鲤鱼生长激素基因, 参照序列分析的结果, 确定了鲤鱼生长激素基因的限制性酶切图谱 (图 3 和图版 I-C)。

3 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^[11]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^[12~14], 以改进 PCR 扩增的反应条件。我们在设计鲤鱼生长激素基因的引物时, 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, 我们把退火温度提高到 55℃, 退火时间减少到 30s, 循环次数限制在 35 次以下。通过以上这些方法来增加 PCR 扩增中的聚合反应的特异性, 减少非预期的突变率。鲤鱼生长激素基因的序列分析结果 (图 2) 证实了在 PCR 扩增中没有发生非预期的突变。我们克隆的鲤鱼生长激素基因的编码区的核苷酸序列及氨基酸序列与 Koren^[4]发表的鲤鱼生长激素 cDNA 的编码区序列完全相同。

我们所克隆的鲤鱼生长激素基因与 Chao^[5]发表的鲤鱼生长激素 cDNA 比较, 在相同位点上都含有 4 个半胱氨酸 (Cys-49, Cys-161, Cys-178, Cys-186), 可形成两个二硫键,

产物特异性的主要因素, 我们适当地提高退火温度, 由 50℃ 升到 55℃, 减少了退火时间, 由 60s 减到 30s, 减少 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 长的鲤鱼生长激素基因的特异性一条带 (图版 I-A)。以 p^{Bluescript I} KS⁺/— 质粒载体为对照, 筛选到一个较大的重组子, 并用 EcoR I 和 Sal I 限制酶鉴定, 在此重组子中确有约

```

-22      *Ala
Met Ala Arg Val Leu Val Leu Leu Ser Val Val -12
GAATTCAGAGTTTGTCTACCCGTGAGCGAAATG GCT AGA GTA TTA GTG CTA TTG TCG GTG GTG
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
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
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
Phe Pro Leu Ser Phe Cys Asn Ser Asp Tyr Ile Gln Ala Pro Ala Gly Lys Asp 61
TTC CCT CTG TCT TTC TGC AAT TCT GAC TAC ATT GAG GCG CCT GCT CAC AAA GAT
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
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
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
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
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
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 TGG TTC AAG AAG GAC ATG CAC AAA GTC
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 TTC AAC TGC ACC
188
Leu End
CTG TAG GTCGAC

```

图 2 鲤鱼生长激素基因的核苷酸序列及氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and amino acid sequence of carp growth hormone gene

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

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 (Asn-Xaa-Ser 和 Asn-Xaa-Thr)，可能是水生生物生长激素的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 2)，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生长激素 cDNA^[2,3,15]，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生长激素分子量相同，氨基酸组成和等电点不同。据 Koren^[4]和 Chiou^[16]推测，在鲤鱼中可能也存在至少两种类型的生长激素基因。Chao 所克隆的 cDNA 可能代表了鲤鱼生长激素 cDNA 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研究所王永力、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，表示感谢。

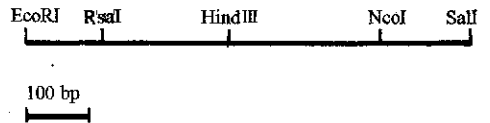


图 3 鲤鱼生长激素基因的限制性酶切图谱
Fig. 3 Restriction map of the carp growth hormone gene

参 考 文 献

- [1] Powers D A. *Science*, 1989, **246**: 352~358.
- [2] Sekine S, Mizukami T, Nishi T *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1985, **82**: 4306~4310.
- [3] Agellon L B, Chen T T. *DNA*, 1986, **5**: 463~471.
- [4] Koren Y, Sarid S, Ber R *et al.* *Gene*, 1989, **77**: 309~315.
- [5] Chao S C, Pan F M, Chang W C. *Biochem Biophys Acta*, 1989, **1007**: 233~236.
- [6] Rentier-Delrue E, Swennen D, Philippart J C *et al.* *DNA*, 1989, **8**: 271~278.
- [7] Du S J, Gong Z, Fletscher G L *et al.* *Biotechnology*, 1992, **10**: 176~181.
- [8] Chomczynki P, Sacchi N. *Analytical Biochemistry*, 1987, **162**: 156~159.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [10] Sanger F, Nicklen S, Coulson A P. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977, **74**: 546.
- [11] Tindall K R, Kunkel T A, *Biochemistry*, 1989, **27**: 6008~6013.
- [12] Ho S N, Hunt H D, Horton R M *et al.* *Gene*, 1989, **77**: 51~59.
- [13] Horton R M, Hunt H D, Ho S N, *et al.* *Gene*, 1989, **77**: 61~68.
- [14] Nishikawa B K. *Biotechniques*, 1989, **7**: 730~735.
- [15] Rentier-Delrue F, Swennen D, Mercier L *et al.* *DNA*, 1989, **8**: 109~117.
- [16] Chiou C S, Chen H T, Chang W C. *Biochim Biophys Acta.* 1990, **1087**: 91~94.

Amplification, Cloning and Sequence Comparison of Growth Hormone Gene for Carp by Polymerase Chain Reaction

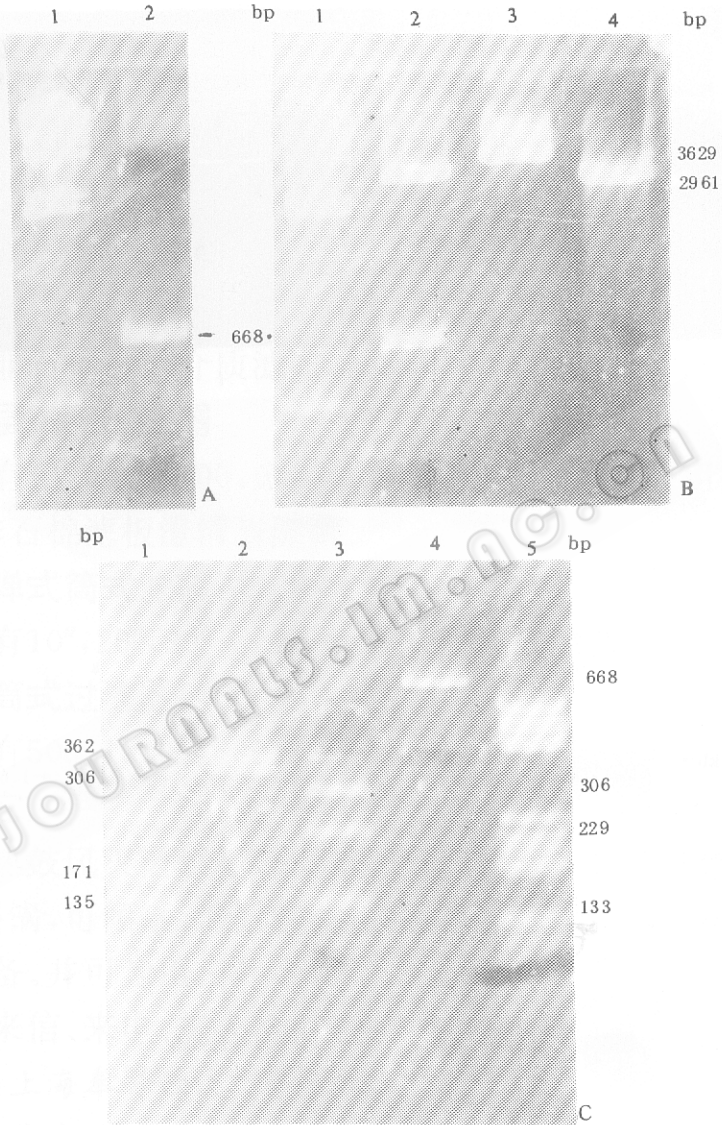
Zhao Xiaoxiang Li Jing Li Rongping Zhang Shumei Yang Zhixing

(Institute of Applied Microbiology Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010)

Abstract Total RNA was isolated from carp (*Cyprinus carpio*) 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°C 60s, 55°C 30s, 72°C 50s, 35 cycles). After PCR amplification, the products were cloned into an *E. coli* expression vector (p^{Bluescript} KS+/-). The result of sequence analysis and restriction map shows that 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 of carp growth hormone gene is 95.6% and 96.7% respectively in code region.

Key words Carp growth hormone gene, PCR amplification, cloning, DNA sequence

Zhao Xiaoxiang *et al.* : Amplification, cloning and sequence comparison of growth hormone gene for carp by polymerase chain reaction



A. PCR amplification of carp GH gene

1. λ DNA/Hind III marker, 2. 668bp of cGH gene by PCR amplification

B. 0% agarose gel electrophoresis of digestion patterns of recombinant plasmid

1. λ DNA/Hind III marker, 2. pBluescript II KS+/- cGH/EcoR I + Sal I

3. Recombinant plasmid pBluescript II KS+/- cGH, 4. Plasmid vector pBluescript II KS+/-/-

C. 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. pBR²²²/Hae III marker