

牛生长激素 cDNA 的分子克隆

宋德秀 倪彬晖 戴宗汉 史瀛仙

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

我们克隆了与牛生长激素 Poly(A)⁺ RNA 互补的 DNA (cDNA)。首先从小牛垂体中提纯总的 Poly(A)⁺ RNA, 用 AMV 逆转录酶合成单链 cDNA, 以单链 cDNA 为模板合成双链 cDNA, 用多聚 G 及多聚 C 谱尾法将双链 cDNA 克隆到 pBR322 质粒的 Pst I 位点上, 构建成牛垂体 Poly(A)⁺ RNA 的 cDNA 文库。以牛生长激素基因为探针, 筛选出 7 个阳性菌落, 经电泳鉴定有两个菌落 (1 号和 2 号) 含有大于 500bp 的插入片段。1 号克隆经酶切图谱、Southern blot 杂交及序列分析证实含有牛生长激素的编码序列。

关键词 牛生长激素; 克隆; 限制性酶图谱

在垂体中, 生长激素和另外一些蛋白质, 如绒毛膜促生长激素和催乳素形成了一组氨基酸序列相似及生物学功能相关的蛋白质^[1,2]。编码这些蛋白质的基因均属于一个“基因家族”, 因此, 它们可构成一个极好的模型来研究在这个大“基因家族”中各个亚基因在发育过程中的相互关系及调控表达。

国外已用基因工程方法生产生长激素及药物^[3]并应用于农牧业和医疗卫生领域^[4-12]。我国是一个人口众多的大国, 通过用细菌发酵方法生产生长激素, 促进动物的生长, 更快地繁殖家畜与家禽, 有着广阔的发展前景。

材料和方法

(一) 酶、菌种和重要试剂

限制性内切酶。如 Pst I、Hind III、Pvu II, Sma I 为 Boehringer Mannheim 产品。大片段 DNA Polymerase I (DNA Pol I)、T4 DNA ligase、RNase A、E. coli DNA Polymerase I、末端转移酶为 BRL 公司产品。E. coli RR1、E.

coli HB101 系美国纽约大学生化系赠送。³²P 标记的产品均来自 ICN Radiochemicals。

(二) 实验方法

1. Poly(A)⁺ RNA 的纯化及活性测定: 从刚屠宰的牛头中取出垂体, 迅速放入液氮中保存待用。用超速离心法制备多核糖体 (Polysome), 然后通过酚抽提、乙醇沉淀, 得到 Polysome RNA, 再通过寡聚 dT 纤维素 [Oligo(dT)-cellulose] 柱层析制备 Poly(A)⁺ RNA。Poly(A)⁺ RNA 的活性用麦胚无细胞体系鉴定^[13]。

2. cDNA 的合成: 我们采用了两种方法合成 cDNA。第一种按 Wickens 等人方法^[14]略加修改。条件如下: 在 50 μl 的反应体系中, dATP、dGTP、dTTP 分别为 0.8 mM, dCTP 0.4 mM, Tris-HCl (pH 8.3) 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 2 mM, KCl 70 mM (由原文献 140 mM 改为 70 mM), 200 μg/ml 的 Oligo(dT)₁₂₋₁₈, (α-³²P)

本文于 1986 年 12 月 24 日收到。

中国科学院细胞生物学研究所容红梅同志参加序列分析工作, 李建荣同志为本文制作照片, 在此一并致谢。

本课题为国家自然科学基金资助项目。

dCTP($\approx 3900\text{Ci}/\text{mmol}$), Poly(A)⁺ RNA 2 μg , AMV 逆转录酶50单位。42 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60min, 在冰浴上放置10min后用TGL-16B 高速台式离心机在15000rpm 离心 5min, 在沸水浴上煮沸3min, 立刻放入冰浴上, 离心后取上清液加入等体积的缓冲液 [Hepes(pH6.9)200mM, dNTP 0.5mM, BSA 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 及 9 个单位的 DNA Polymerase I (DNA Pol I)] 15 $^{\circ}\text{C}$ 保温90min, 加EDTA至浓度为 20mM 以终止反应。用酚抽提两次后上层液相通过Sephadex G-100柱 (1 \times 20cm), 收集第一个峰(cDNA 峰) (图 1), 在 2M NH₄Ac 浓度下用乙醇沉淀两次。

第二种cDNA合成方法按 Gubler 等方法^[15]略加改进。单链cDNA合成与 Wickens 方法相同, 双链 cDNA 的合成条件如下: 反应体系100 μl , 取约1 μg 杂交单链 cDNA, 20mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgCl₂, 10mM(NH₄)₂SO₄, 100mM KCl, 0.15mM β -NAD, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA, 40 μM dNTPs, 2u/ml RNaseA, 230u/ml *E. coli* DNA Polymerase I, 在 12 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10min后, 加入 1 个单位的 T4 DNA 连接酶, 反应混合物继续在12 $^{\circ}\text{C}$ 保温 90min, 然后在22 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60min, 终止反应及酚抽提过程与第一种方法相同, 最后在 2M 乙酸铵浓度下加二倍无水乙醇沉淀双链 cDNA 两次。所得到的双链 cDNA (ds cDNA) 可直接用来谱尾。

3. S₁-核酸酶消化: 取第一种方法合成的 ds cDNA, 按 Roger C. Wiegand 等^[16]方法进行S₁-核酸酶消化。

4. cDNA 克隆: (1) 双链 cDNA 的谱尾: 按文献[15]的方法进行。(2) 退化及转化: 将谱有 dC-ds cDNA 和 dG-pBR322 尾巴的 DNA 在下列条件下退化^[17]: 在 100 μl 的反应体系中加入

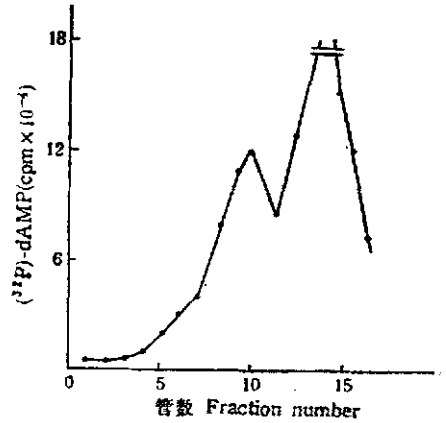


图 1 Sephadex G-100 层析分离双链牛垂体 cDNA

Fig. 1 Separating the double strands cDNA from unincorporated dNTPs by chromatography on sephadex G-100.

0.020 μg dG-pBR 322, 0.007 μg dC-ds cDNA, 0.15M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7.6), 1.0mM EDTA, 在 57 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30min后转移到冰上, 按 Susan L. Peacock 等人^[17]的方法进行转化。(3) 菌落杂交: 菌落原位杂交, 按 Grunstein 的方法进行^[18]。(4) Southern 分子杂交: 按 Southern E.M的方法^[19]进行。

结果和讨论

(一) 小牛垂体 Poly(A)⁺mRNA 的体外翻译

通过 Oligo(dT)-Cellulose (8 \times 1.5cm) 亲和层析得到牛垂体 Poly(A)⁺mRNA, 经麦胚无细胞体系测定, Poly(A)⁺mRNA 可促进 ¹⁴C-亮氨酸的参入, 合成蛋白质的效能随着加入到反应混合物中 mRNA 的量不同而变化。本实验在 50 μl 混合反应液中加入 2 μg Poly(A)⁺mRNA 为最适。

(二) cDNA 的合成及克隆

在合成单、双链cDNA 时我们摸索了

反转录酶与mRNA之间的比例及不同浓度的 DNA Pol I 和不同保温时间对合成 cDNA 的影响。发现过量的反转录酶和 DNA Pol I 会影响合成完整的cDNA,这可能是由于反转录酶中污染有 RNase 所致。在以单链cDNA末端“发夹”(hairpin)结构为引物,用*E. coli*-DNA Pol I 合成双链cDNA时,反应体系中加9个单位的*E. coli*-DNA Pol I 为最宜(图版 I -B)。不同保温时间对合成双链的长度也有明显影响,90min 为最适时间(图版 I -A)。

为了使用更为简便的方法而又获得全长 cDNA,我们用了两种不同方法来合成双链cDNA。第一种方法是采用 Wickens 等人方法^[14],以cDNA自身发夹结构为引物,在DNA Pol I 作用下合成第二条链。双链cDNA的发夹结构用 S_1 酶消化,除掉发夹结构,通过Hind III、Linker将cDNA片段插入到pBR322的Hind III位点,发现经 S_1 酶消化过的插入片段大部分在400—500bp之间(图版 II -A)。我们推测,在用 S_1 酶切除发夹结构的同时可能将mRNA 5'端的cDNA序列也切除,因此,大部分插入片段较短。从理论上讲, S_1 酶作用于单链DNA,但由于最适 S_1 酶浓度较难控制^[16,20,21],所以 S_1 酶浓度超过一定限度时就会将双链cDNA切成小片段。除此, S_1 酶还消化由于双链DNA错配引起的突环,或因条件不适引起缺刻而产生的相应单链DNA片段^[16,20,21]。

第二种方法采用了Gubler和Hoffman的方法,此方法首先合成第一条链,然后以杂交cDNA:mRNA为模板,在*E. coli*-DNA

Pol I、T4 DNA连接酶、RNase A、BSA作用下直接合成平端双链cDNA。我们用RNase A、T4DNA连接酶代替了Gubler体系中的RNase H和*E. coli*DNA连接酶。当用RNase A时所加单位要少,约 $1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ 。RNase A可将cDNA:mRNA杂交链中的mRNA链切成小缺刻,它们可以作为DNA Pol I的引物。要特别注意的是,必须先加*E. coli* DNA Pol I和RNase A,12°C反应10min后再加入T4 DNA连接酶,以免mRNA链上的缺刻又被连接上,失去了*E. coli* DNA Pol I的引物。这种方法合成的cDNA可直接用Poly G、Poly C谱尾法将cDNA克隆到pBR 322质粒的Pst I位点。得到插入的cDNA片段大部分为500—1000bp。

经抗菌素抗性法筛选的克隆,用 ^{32}P -dCTP标记的牛生长激素基因探针(1×10^8 cpm)杂交,筛选出7个阳性菌落(图2),其中两个重组克隆片段中有Pst I位点(图版 I -C)。1号和2号克隆用Pst I酶切后,经Southern blot杂交,以牛生长激素基因质粒(PbGH)为探针,插入片段有较强的杂交信号(图版 II -C)。1号克隆得到两个分别为-350bp和-200bp的Pst I酶切片段(图版 I -C)。将350bp片段克隆到M13中进行部分序列分析(图版 II -B),结果与已发表的牛生长激素cDNA的部分序列^[8]吻合。

根据上述实验结果,我们认为Gubler等人的方法在构建cDNA文库时较为简便,而且可得到全长cDNA,是目前建立cDNA文库较好的方法。



图2 用 ^{32}P 标记的牛生长激素基因为探针, 与生长在硝酸纤维素滤纸上含有外源DNA 克隆进行原位分子杂交, 有7个克隆为阳性

Fig. 2 Analysis by dot hybridization. Experimental condition were described in the materials and methods section. Seven cDNA clones were screened as: number 1(PbGH-1), 2(PbGH-2), 3(PbGH-3), 4(PbGH-4), 5(PbGH-5), 6(PbGH-6) and 7(PbGH-7)

参 考 文 献

- [1] Bewly T. A. et al.: *Int. J. Peptide Protein Res.*, 4(4):281-7, 1972.
- [2] Niall, H. D. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68(4):866-9, 1971.
- [3] Moore, D.D. et al.: *Cell*, 29(2):285-6, 1982.
- [4] Seeburg, P.H. et al.: *DNA*, 2(1):37-45, 1983.
- [5] Higgs, D.A. et al.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 27(2):240-53, 1975.
- [6] Higgs, D.A. et al.: *J. Fish. Res. Board Can.*, 33(7):1585-603, 1976.
- [7] Donaldson, E.M. et al.: *Fish Physiol.*, 8. 455-597, 1979.
- [8] Markert, J. R. et al.: *Can J. Zool.*, 55 (1):74-83, 1977.
- [9] Higgs, D. A. et al.: *Can J. Zool.*, 55(6):1048-56, 1977.
- [10] Wickens, M. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 253(7):2471-2482, 1978.
- [11] Machlin, L.J.: *J. Dairy Sci.*, 56(5):575-580, 1973.

- [12] Gill, J. A.: *Bio/Technology.*, 3:643—646, 1985.
- [13] Song Dexiu et al.: *The role of RNA in development and reproduction (I)*, Science press, pp. 714—729, 1981.
- [14] Wickens, M.P. et al.: *J. Bio. Chem.*, 253(7):2483—2495, 1978.
- [15] Gubler, U. and Hoffman, B.: *J. Gene.*, 25:263—269, 1983.
- [16] Wiegand, R.C. et al.: *J. Biological. Chemistry.*, 250(22):8848—8855, 1975.
- [17] Peacock, S.L.: *Biochemica et Biophysics. Acta.*, 655:243—250, 1981.
- [18] Grunstein, M. and Hogness, D. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72(10): 3961—3965, 1975.
- [19] Southern E.: *J. Mol. Biol.*, 98(3):503—17, 1975.
- [20] Vogt, V. M.: *Eur. J. Biochem.*, 33(1):192—200, 1973.
- [21] Hignchi Russ et al.: *Proc. Natl. Acade. Sci. U.S.A.*, 73(9): 3146—3150, 1976.

MOLECULAR CLONING OF BOVINE GROWTH HORMONE cDNA

Song Dexiu Ni Binhui Dai Zhonghan Shi Yingsien
(*Institute of Developmental Biology, Beijing*)

The cDNA which is complementary to bovine growth hormone Poly(A)⁺ RNA has been cloned. Total Poly(A)⁺ RNA were isolated from bovine pituitary gland and used as template to synthesize double-stranded cDNA with avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase, RNase A, DNA polymerase I. Double stranded cDNA had been inserted into pBR322 plasmid at Pst I site with oligo dG-tailed and oligo dC-tailed method and cDNA library had been constructed. Using ³²P-labeled BGH gene fragment as a probe, seven positive clones were isolated by dot hybridization techniques and two of them (Number 1 and Number 2) had been further characterized by Pst I and Pvu II digestion. One clone was shown to contain the entire bovine growth hormone coding regions.

Key words

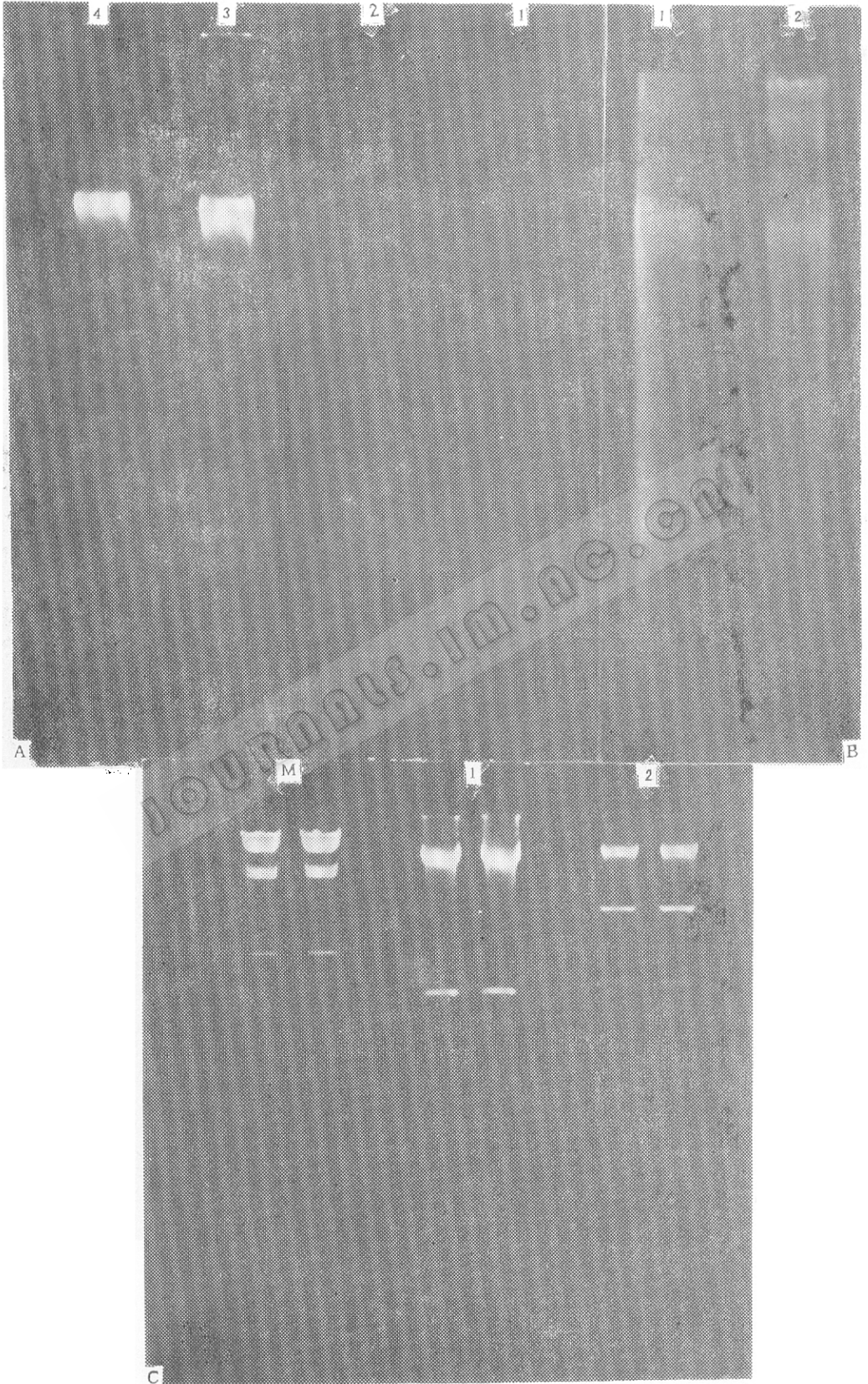
Bovine growth hormone; cloning; restriction endonuclease map

图版 I 说明

- A. 不同保温时间下合成双链 cDNA 的放射自显影
 Autoradiogram of double-strands cDNA synthesised in different incorporation time
- | | |
|-----------|------------|
| 1. 0 min | 2. 30 min |
| 3. 90 min | 4. 120 min |
- B. 双链 cDNA 的放射自显影
 Autoradiogram of double-strands cDNA synthesised by different units of *E. coli* DNA polymerase I
- | |
|---------------------------------|
| 1. 18 units of DNA polymerase I |
| 2. 9 units of DNA polymerase I |
- C. 1,2 克隆 Pst I 酶切图谱
 Determination of cDNA of bovine growth hormone by restriction endonuclease map. Recombinant plasmids were digested by Pst I
- M. Marker, DNA/Hind III
 Number 1 PbGH-1+ Pst I
 Number 2 PbGH-2+ Pst I

图版 I 说明

- A. 用 S_1 酶消化双链 cDNA 后, 得到的克隆 (1-3), 用 Hind III 消化重组质粒得到插入片段均小于 500bp
 Sizing of cDNA inserts
 Line 1-3. Three recombinants were analyzed by digestion with Hind III
 M. DNA molecular marker
 P. pBR322 plasmid DNA
- B. PbGH-1 克隆的部分序列分析 (-350bp 的 Pst I 片段)
 Sequence of Pst I fragment (350 bp) of PbGH-1 箭头表示 Pst I 切点位置 The arrow indicate the Position of the Pst I site
- C. PbGH-1, PbGH-2 的 Southern blot 分析图。
 用含有 bGH 基因的质粒为探针, 与 PbGH-1 和 PbGH-2 杂交的结果
 Southern blot analysis of PbGH-1 and PbGH-2
 Line 1-2. PbGH-1/Pst I
 Line 3-4. PbGH-2/Pst I
- M. 标明与图版 I-A 同样的 λ DNA/Hind III 标准样品 The arrows indicated the position of the same Hind III markers as Plate I-A



Song Dexiu et al.: Molecular cloning of bovine growth hormone cDNA

