

研究报告

凝乳酶原mRNA的分离及其cDNA克隆的鉴定

谭思元 刘年娟 杨开宇

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用异硫氰酸胍法从牛胃粘膜组织中分离到 poly (A) RNA。经电泳分析、体外翻译活性分析及Northern转移杂交分析, 结果表明, poly (A) RNA中含有完整的, 具有生物活性的凝乳酶原mRNA, 大小为16S。

从poly (A) RNA建立的cDNA库中, 以 C500-pepsinogen 为探针进行初级筛选, 集中阳性克隆成为凝乳酶原和相关胃蛋白酶原cDNA富集库。从富集库中选出插入片段带有凝乳酶原基因所特有的EcoRI切点的19个克隆。经限制性内切酶谱分析确定pCT 5 为凝乳酶原基因克隆, 其5'端缺少80bp。以 pCT 5 的插入片段为探针, 从cDNA 库中进一步筛选得到 pCT15。酶谱分析表明, pCT15的两端均足以覆盖编码区域, 而在917 位左右约有110bp 的缺失。从而不仅充分证明了分离的poly (A) RNA 中含有全链长的凝乳酶原 mRNA, 而且还可通过拼接pCT5及pCT15获得完整的凝乳酶原基因。

关键词 重组DNA; 分子克隆; 凝乳酶原; 缺失

凝乳酶 (Chymosin EC 3. 4. 23. 4) 是未断奶的小牛第四胃中主要的蛋白酶。其主要生物学功能是有限剪切κ-酪蛋白, 导致牛奶凝集。因此被用于干酪制造业, 成为重要的酶制剂品种, 其产值占全世界酶制剂总产值的15%, 居于第二位。由于干酪生产的需要, 全世界每年约屠宰5000万头小牛, 造成全球性小牛短缺。为了解决这一突出的矛盾, 八十年代以来, 日、英、美等国相继开展了牛凝乳酶基因工程的研究, 构建了各自的cDNA库^[1-5], 分别在大肠杆菌^[6-8], 酵母^[9-10]和霉菌^[11]中得到表达, 显示出应用前景。

我国是畜牧业不发达国家, 通过屠宰小牛生产凝乳酶行不通, 主要出路也在于基因工程, 为此, 我们开展了相应的研究。本文报道牛凝乳酶原 mRNA 的分离

及其cDNA克隆的鉴定。

材料与方 法

(一) 材料

限制性内切酶 Pst I, BamH I, EcoR I, Sma I, Kpn I, Taq I 买自 Boehringer 或 Promega 公司, 应用这些公司提供的反应条件。 α -³²P-dCTP, ³⁵S-Met 买自 Amersham, 硝酸纤维素滤膜 买自 Schleicher & Schuell。兔网织细胞裂解液由本实验室制备。

(二) 方法

1. Poly(A)RNA的制备: 用异硫氰酸胍方法^[12]制备总RNA, 再用oligo(dT)-

本文于1987年7月8日收到。

美国俄克拉荷马医学研究基金会的黄岳顺博士赠送C500-pepsinogen, 李凤如同志赠送鼠肝28S, 18S rRNA, 特此致谢。

纤维素柱层析分离poly (A) RNA^[13]。

2. RNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 用乙二醛变性RNA^[14], 经2.5%聚丙烯酰胺-0.5%琼脂糖凝胶^[15]电泳分离后, 硝酸银染色^[16]。

3. 体外翻译: 按略加修改的文献方法^[17]进行。

4. Northern转移, Southern转移, 菌落原位杂交, 小量制备质粒: 均按文献^[13]方法进行。

5. 大量制备质粒: 用SDS-碱法裂解细胞, 高浓度乙酸钾沉淀细胞碎片、蛋白及染色体DNA, 加核酸酶A至2 μg/ml, 核酸酶T1至20u/ml, 37℃保温20min, 酚/氯仿抽提去蛋白。加聚乙二醇至6.5g/ml, NaCl至0.4mol/L, 0℃静置1h, 离心。除去上清。将质粒DNA溶于水中。

6. 探针制备: DNA酶切片段的回收用DE-81纸片法^[18], 用缺刻翻译(Nick translation)进行³²P标记。缺刻翻译试剂盒为BRL产品。

结 果

(一) 凝乳酶原mRNA的分离与鉴定

1. poly (A) RNA 的分离: 从5g牛胃粘膜组织中分离得到总RNA 72A_{2.00}单位, 约2.8mg。经oligo (dT)-纤维素(P-L Biochemicals)柱层析后, 获得poly(A)RNA 7.2A_{2.00}单位, 约280μg。

2. RNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析: 聚丙烯酰胺凝胶电泳是检查RNA分子完整性的有效方法之一。如图版I-A可见poly (A) RNA和总RNA均显出狭窄的不连续的核酸区带。由于rRNA中有富A区域存在, 故总RNA经oligo(dT)-纤维素柱层析后, 得到的poly (A) RNA中还含有一定量的rRNA。比较图版I-A中

3和4, 在18S rRNA量几乎相同的情况下, poly (A) RNA样品中所含有的9S-18S之间的核酸带含量明显多于总RNA。已知牛凝乳酶原mRNA为16S, 因此有理由认为, 经过亲和层析后, 牛凝乳酶原mRNA得到了富集。

3. mRNA体外翻译活性的分析: 体外翻译可检查mRNA指导合成蛋白质的能力。表1给出了在外源RNA指导的体外翻译体系中, ³⁵S-Met的掺入量。由表1可见, 与对照相比, 加入6μg总RNA, 掺入倍

表1 在外源RNA指导的体外翻译体系中³⁵S-Met的掺入量

Table 1 ³⁵S-Met incorporation in vitro translation system directed by exogenous RNA

| RNA | 掺入量 Incorporation (cpm/50μl) | 掺入倍数 Incorporation (-fold) |
|---|------------------------------------|----------------------------------|
| 无外源RNA No exogenous RNA (control) | 3.8×10^4 | 1 |
| 总RNA Total RNA (6μg) | 1.4×10^5 | 3.1 |
| Poly (A) RNA (1μg) | 2.3×10^5 | 5.9 |

数为3.1, 而1μg poly (A) RNA掺入倍数为5.9, 据此计算poly (A) RNA的翻译活性约为总RNA的12倍。

4. RNA转移杂交分析: 杂交是探测同源核苷酸的可靠方法。已知人胃蛋白酶原(Human pepsinogen)基因与凝乳酶原基因有较高的同源性, 因而以C500-pepsinogen(人胃蛋白酶原基因3'末端约500bp)为探针, 进行Northern转移杂交。降低杂交温度, 并增加杂交后洗涤液的盐浓度, 以维持探针与凝乳酶原mRNA杂交链的稳定性。结果在16S左右有一阳性带(图版I-B)。

在牛胃粘膜组织中, 与人胃蛋白酶原

基因有较高同源性的,有凝乳酶原mRNA,胃蛋白酶原mRNA,胃亚蛋白酶原mRNA,这三种mRNA编码的蛋白质分子量均为35000—45000,并且凝乳酶原mRNA含量最为丰富。故可以认为,poly(A)RNA中16S RNA组份分子完整,其中包括凝乳酶原RNA。

(二)牛凝乳酶原mRNA的cDNA克隆的鉴定

1. 以C500-pepsinogen为探针进行初级筛选:以C500-pepsinogen为探针,在45℃进行菌落原位杂交。将阳性克隆集中,得到凝乳酶原cDNA富集库。

2. 限制性内切酶谱分析鉴定凝乳酶原基因片段:用C500-pepsinogen探针杂交得到的阳性克隆,至少有凝乳酶原cDNA和胃蛋白酶原cDNA两种类型。由于凝乳酶原基因有一个EcoR I切点,而胃蛋白酶原基因无此切点,因而利用这一特点加以区别。从cDNA富集库中对具有插入片段的克隆进行小量质粒制备,经EcoR I酶解,发现在144个克隆中有19个克隆的插入片段含有EcoR I切点。

Harris报道,在凝乳酶原基因的502,526,536,处分别为Sma I, EcoR I和BamH I切点,并认为可以利用这三个切点作为凝乳酶原基因的标志^[5]。由于130位有一个Pst I切点,经过Pst I-Sma I, Pst I-EcoR I, Pst I-BamH I双酶解反应后,会相应出现特征性的372,396和436bp的片段。根据这一设想,对上述19株克隆进行了多酶解分析。图版1-C给出了pCT5质粒DNA酶解片段的电泳分析结果。重组质粒的pBR322部分经Pst I, Pst I-Sma I, Pst I-Kpn I酶解后为4361bp的一个片段,经Pst I-EcoR I, Pst I-BamH I酶解后为两个片段,分别为3609,752bp和3237,1124bp。插入部

分经Pst I酶解后,为80和1130bp,表明5'端缺少部分编码区域。经过Pst I-Sma I, Pst I-EcoR I, Pst I-BamH I酶解后出现特征性的372,396,406bp的片段,说明525处左右有Sma I, EcoR I, BamH I切点,符合凝乳酶原基因所具有的特征性酶切位点。进一步用Pst I-Kpn I双酶解分析,也与凝乳酶原基因的Kpn I切点相符。

由于在克隆过程中,由mRNA合成的双链cDNA经过dC加尾,再与dG加尾的pBR322 pst I酶解的片段退火连接的,故插入部分的两端应有约25bp的dC:dG非编码区。这样推测pCT5的插入片段5'末端缺少约80bp的编码区域。

3. 筛选5'-末端序列:为了获得5'-末端完整的序列,以PS-pCT5(pCT5经Pst I酶解后插入部分的小片段)作为探针,在65℃进行菌落原位杂交,从cDNA库中得到10个阳性克隆。

4. pCT15内切酶谱分析:以PL-pCT5(pCT5经Pst I酶解后插入部分的大片段)为探针,将以上10个克隆的质粒经Pst I酶解后作Southern转移,于70℃杂交,确证有三类阳性克隆,即pCT5, pCT15, pCT11(图版1-D)。

对pCT15进行Pst I-Sma I, Pst I-EcoR I, Pst I-BamH I双酶解处理,出现特征性的372,396,406bp的片段,Pst I-Kpn I酶解结果表明Kpn I切点也与凝乳酶原基因相符(图版1-E)。此外,还发现,pCT15的插入部分经Pst I-BamH I酶解,用5%聚丙烯酰胺凝胶电泳后出现68,120,260,406bp 4条带(图版1-E),而经7%聚丙烯酰胺凝胶电泳后为5条带,即原来406bp的带又分为距离相近的两条带(没有给出图片)。根据凝乳酶原基因酶切图谱,经Pst I-

BamH I 酶解后应得到 68, 62, 220, 406 525bp 5 条带, 其中与 5' 和 3' 端相关的片段为 62 和 220bp。而 pCT15 的相应酶解片段为 120 和 260bp。从上述结果看 pCT15 的插入片段含有足以覆盖 5' 和 3' 端的编码区域, 但是没有出现预期的 525bp 的片段。据此推测在 BamH I 的 536 和 1061 两个切点之间有约 110bp 的缺失。对 pCT15 质粒 DNA 进行 Taq I 酶解分析表明, pCT15 中缺少第 917 位的 Taq I 酶切位点,

而这一位点在 pCT5 中存在 (没有给出图片)。从而证实了 pCT15 中, 相当于凝乳酶原基因的编码区域中部 917 位左右, 有约 110bp 的缺失。

至此, pCT5 及 pCT15 的插入部分均确认为凝乳酶原基因。前者 5' 端缺少约 80bp, 后者在编码区域中部 917 位左右缺少约 110bp, 而两端均有足够长度 (图 1), 因此有可能用这两个克隆拼接出完整的凝乳酶原基因。

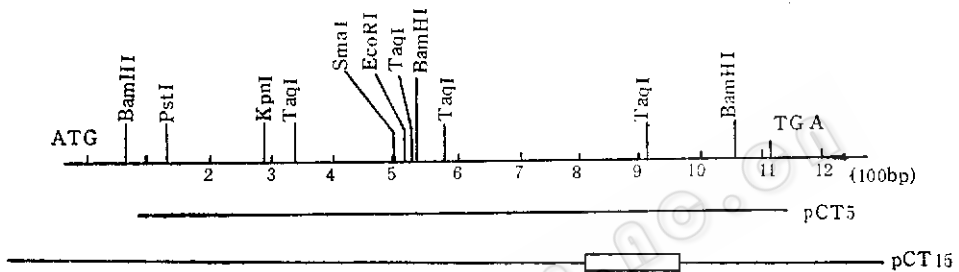


图 1 重组质粒 pCT5 和 pCT15 插入部分的限制性内切酶位点图

Fig. 1 A map of restriction endonuclease cleavage sites in inserts of recombinant plasmid pCT5 and pCT15

方向: 从左到右, 5' → 3'。方框表示 pCT15 基因片段缺失的部分序列, 而这部分序列在 pCT5 中存在 (见结果)
The direction is 5' to 3', left to right. The open box denotes the sequence missing from pCT15 but present in pCT5 (see RESULTS)

讨 论

1. 关于 mRNA 的分离: Uchiyama 报道, 用酚抽提法提取牛胃粘膜总 RNA 时, rRNA 完全降解。在皂土存在下进行酚抽提, 所得 RNA 经电泳分析出现较宽的区带^[1], 由此 RNA 建立的 cDNA 库中, 筛选到 10 个含有凝乳酶原基因片段的克隆, 均不够全长, 其中 9 个 5' 末端缺失^[2], 说明即使在皂土存在下进行酚抽提, 所得 RNA 也有部分降解。

我们在分离牛胃粘膜总 RNA 时, 曾采用过酚抽提法, 盐酸胍法^[19], 热酚法^[20], 在普通匀浆器 (ATO-MIX Blenders, MSE Scientific Instrument) 中

进行匀浆, 所得产物经电泳检查, 表明大部分被降解, 在兔网织细胞裂解液中翻译活性极低。其后, 改用异硫氰酸胍法, 获得了满意的结果。

在确认 pCT5 为凝乳酶原基因克隆后, 以 PL-pCT5 为探针, 进行 Northern 转移, 于 70°C 杂交, 在 16S 左右出现狭窄的阳性带, 证实 poly (A) RNA 中含有完整的凝乳酶原 mRNA。

由于牛胃粘膜组织内核酸酶含量丰富^[1], 因而在离体的胃粘膜组织中, 或由于反复冻融, 或由于匀浆不及时都可能造成细胞破裂, 导致 RNA 与核酸酶接触从而被降解。在组织匀浆时如核酸酶变性剂不够强, 或匀浆速度不够高都可能引起

RNA 的部分降解。上述实验结果说明 异硫氰酸胍法明显优于酚抽提法，采用强变性剂和高速匀浆是获得完整的，具有高生物活性RNA的关键。

2. 关于pCT15 基因片段的缺失：在分子克隆过程中，常造成基因片段的人为变异。已发现在凝乳酶分子克隆中存在基因片段的倒转重复和缺失现象^[4]。关于倒转重复序列的特点和形成机制，文献中已有报道^[21-23]，而关于基因编码区域中部片段的缺失，目前还没有很合理的解释。Moir报道^[4]在R207的凝乳酶原基因编码区域中部第644—757位有约100bp的缺失。其中644—650与758—764位有7个

碱基同源。这段同源序列无疑与缺失形成过程有关。但根据目前获得的数据还无法推知其缺失形成机制。

pCT15 的基因片段缺失部位在插入片段的917位左右，长度约110bp。为了探讨缺失部位及原因，通过计算机对凝乳酶原基因序列的分析，发现以下两个特点：第一，在896—911和1024—1029之间有6个碱基同源，这有可能造成896—1024之间的缺失；第二，在825—829和941—945之间有5个碱基的互补倒转重复序列，这段序列暗示着mRNA 可能在这一区域形成环状结构。

图2 给出了由于存在互补倒转重复序

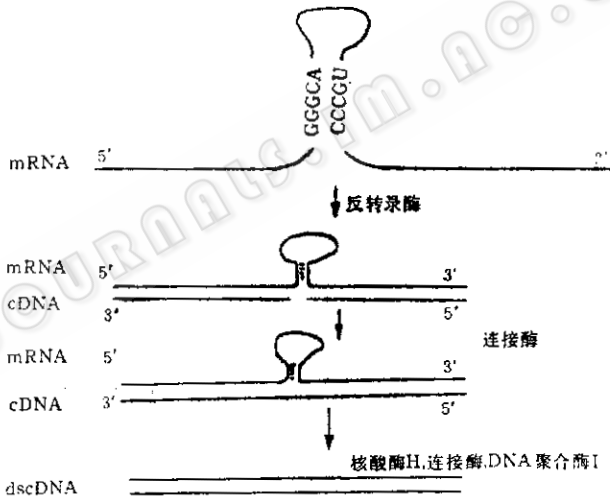


图2 pCT15中基因片段缺失的可能机制

Fig. 2 The possible mechanism of deletion of gene fragment in pCT15

列造成缺失的可能机制。克隆过程中，经反转录酶合成第一条cDNA链，在碰到环状结构时，造成暂停，但并未终止，而是越过环状结构继续合成。这时与环状部分对应的cDNA缺失。第二条cDNA合成时，连接酶修补第一条cDNA的缺刻，然后正常地合成双链cDNA。这样，mRNA的环

内部分不被反转录而造成了第825—940位之间的缺失。

以上两种可能性仅是根据凝乳酶原基因序列特点而作出的分析和推测。缺失的具体部位及长度需要进一步的序列分析才能说明。

参 考 文 献

- [1] Uchiyama, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44 (6): 1373—1383, 1980.
- [2] Nishimori, K. et al.: *J. Biochem.*, 90: 901—4, 1981.
- [3] Nishimori, K. et al.: *Gene*, 19: 337—334, 1982.
- [4] Moir, D. et al.: *Gene*, 19: 127, 1982.
- [5] Harris, T. J. R. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 10 (7): 2177—87, 1982.
- [6] Nishimori, K. et al.: *J. Biochem.*, 91: 1085—88, 1982.
- [7] Nishimori, K. et al.: *Gene*, 29: 41—49, 1984.
- [8] Emtage, J. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80: 3671—3675, 1983.
- [9] Goff, G. G. et al.: *Gene*, 27: 35—44, 1984.
- [10] Mellor, J. et al.: *Gene*, 24: 1—14, 1983.
- [11] Cullen, D. et al.: *Biotechnology*, 5 (4): 369—376, 1987.
- [12] Chirgwin, J. M. et al.: *Biochemistry*, 24: 5294—99, 1979.
- [13] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- [14] McMaster, G. K. & Carmichael, G. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74: 4835—38, 1977.
- [15] Peacock, A. G. & Dingman, C. W.: *Biochemistry*, 7: 668—674, 1968.
- [16] Merrill, C. R.: *Science*, 211: 1437—38, 1981.
- [17] Merrick, W. C.: *Meth. Enzymol.*, Vol. 101 (part C), New York, pp. 606—615, 1983.
- [18] Dretzen, G. et al.: *Anal. Biochem.*, 112 (2): 295—298, 1981.
- [19] Deeley, R. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 252: 8310—8319, 1977.
- [20] Feramisco, J. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257: 11024—11031, 1982.
- [21] Chan, S. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76: 5036—5040, 1979.
- [22] O'Hare, K. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 7: 321—334, 1979.
- [23] Weaver C. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78: 4073—4077, 1981.

ISOLATION OF mRNA CODING FOR PROCHYMO SIN AND IDENTIFICATION OF ITS cDNA CLONES IN *E. COLI*

Tan Siyuan Liu Nianjuan Yang Kaiyu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Poly (A) RNA was isolated from the gastric mucosa of the calf fourth stomach by guanidine isothiocyanate procedure. Analysis of poly (A) RNA by means of translation in vitro, polyacrylamide gel electrophoresis and Northern hybridization indicated that the intact active mRNA coding for prochymosin was present in 16S fraction of poly (A) RNA.

The secondary library enriched for chymosin and related gastric proteases cDNAs was constructed by collecting the positive clones selected with labeled C500-pepsinogen probe from the first cDNA library. 19 recombinants containing insert fragment with EcoRI site unique only to prochymosin but not to pepsinogen were selected from the secondary library. One of them, pCT5, was identified as a clone bearing the prochymosin cDNA lacking the 5'-end region of about 80bp by the restriction pattern. The cDNA insert in pCT15 was found to cover nearly all of the prochymosin coding sequence with a

deletion of about 110bp around nucleotide 917 through further screening with pCT5 fragment as probe and restriction mapping. It is evident that the isolated RNA contains the intact prochymosin mRNA and the entire coding sequence for prochymosin can be obtained by proper ligation of the relevant sequence from pCT5 and pCT15.

Key words

Recombinant DNA; molecular cloning; prochymosin; deletion

图版说明

A. RNA电泳分析

1. 鼠肝28S, 18S rRNA
2. 标准珠蛋白mRNA (BRL)
3. poly (A)-RNA (2.5 μ g)
4. 总RNA (1 μ g)

B. RNA转移杂交分析

poly (A) RNA经乙二醛变性, 1%琼脂糖电泳分离后, 转移到硝酸纤维素膜上, 以C500-pepsinogen为探针, 于45 $^{\circ}$ C杂交。

C. pCT5质粒DNA的限制性内切酶解片段的电泳分析用5%聚丙烯酰胺凝胶

D. DNA转移杂交分析

质粒DNA经Pst I消化, 2%琼脂糖电泳分离, 转移到硝酸纤维素膜上, 以PL-pCT5为探针, 于70 $^{\circ}$ C杂交。

E. pCT15质粒DNA的限制性内切酶解片段的电泳分析用5%聚丙烯酰胺凝胶

A. Electrophoresis analysis of RNA

1. rat liver 28S, 18S rRNA
2. standard globin mRNA (BRL)
3. poly (A) RNA (2.5 μ g)
4. total RNA (1 μ g)

B. RNA transfer and hybridization

After electrophoresis on 1% agarose gel, RNA was transferred to nitrocellulose paper, followed by hybridization with C500-pepsinogen at 45 $^{\circ}$ C

1. poly(A)RNA (6 μ g)
2. poly (A) RNA (24 μ g)
3. poly (A) RNA (3 μ g)

C. Electrophoresis of restriction endonuclease cleaved pCT5 plasmid DNA

5% polyacrylamide gel was used.

1. ϕ X174 RF DNA-Hae III digest marker
2. Pst I and Kpn I digest
3. Pst I and Sma I digest
4. Pst I and Bam HI digest
5. Pst I and Eco RI digest
6. Pst I digest

D. DNA transfer and hybridization

Plasmid DNA was digested by Pst I, separated by electrophoresis on 2% agarose gel followed by transfer to nitrocellulose membrane and hybridization with PL-pCT5 at 70 $^{\circ}$ C.

1. pCT6
2. pCT9
3. pCT15
4. pCT11

E. Electrophoresis of restriction endonuclease cleaved pCT15 plasmid DNA

5% polyacrylamide gel was used

1. ϕ X174 RF DNA-Hae III digest marker
2. Pst I and Bam HI digest
3. Pst I and Kpn I digest
4. Pst I and Sma I digest
5. Pst I and Eco RI digest
6. Pst I digest

谭思元等：凝乳酶原mRNA的分离及其cDNA克隆的鉴定

Tan Siyuan et al.: Isolation of mRNA coding for prochymosin and identification of its cDNA clones in *E. coli*

