

生长抑制激素基因的化学合成与克隆

曾义祥 杜念兴

(南京农业大学兽医系, 南京)

汤锦炎

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

采用固相亚磷酸三酯法化学合成生长抑制激素基因的两个DNA片段A_{5,2}, A_{2,3}, 退火聚合合成平端双链后, 插入到经SmaI酶切的pUC12质粒DNA中。通过抗性筛选, 正性标记筛选以及酶切位点分析, 分子杂交, 序列分析, 证实化学合成的生长抑制激素基因已在大肠杆菌JM83中无性繁殖。

关键词 生长抑制激素; 基因合成; 基因克隆

生长抑制激素首先是在羊的下丘脑中发现的一种小分子多肽^[1], 其基因背景清楚, 生物功能繁多, 而且兼有神经性, 内分泌及旁分泌等作用方式^[2,3], 特别是它在激素生理变化中的调节作用, 使之愈来愈引起生物学工作者的高度重视。

70年代, Arimura^[4], Brazeau^[4]和 Terry^[5]等人利用预先制备好的抗生长抑制激素血清被动免疫动物后测定受体动物血清中生长激素与生长抑制激素的动态变化规律, 结果表明, 抗生长抑制激素的使用, 能提高受体动物生长激素的基础分泌。Maccacchini^[6]使用100—300g的大白鼠, 每天给予10—20μg的抗体量后可显著降低大白鼠体内生长抑制激素的含量, 与对照组相比可增重10—15%。上述事实说明生长抑制激素的合理使用将会给畜牧业的发展作出积极的贡献。

1973年, Guillemin从500000头绵羊下丘脑中提纯生长抑制激素总共才获得纯品8.5mg, 显然从动物组织中提纯生长抑制激素会有种种困难。1977年, Itakura^[7]用化学方法合成了生长抑制激素基因并在大肠杆菌中获得了表达。为此, 选择基因

工程途径生产生长抑制激素, 并以此制苗运用于畜牧业生产, 可能是一条十分经济而又有效的途径。

本文建立一种化学合成的生长抑制激素基因的无性繁殖系, 以期在今后进行基因表达时, 提供源源不断的外源基因。

材料与方 法

(一) 材料

1. 质粒pUC12: Pharmacia产品; 受体细菌*E. coli* JM83为中国科学院上海生物化学研究所202组提供。

2. 限制性内切酶, T4 DNA连接酶, DNA聚合酶I(Klenow)片段和双脱氧核苷三磷酸ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP; 为Boehringer Mannheim产品。

3. γ -³²P-ATP (3000Ci/mmol): Amersham产品。

4. T4多核苷酸激酶: 为中国科学

本文于1987年7月1日收到。

本工作得到中国科学院上海生物化学研究所202组的全体同志和上海生物工程基地干科达同志热情支持。徐为燕教授审阅此稿, 在此一并致谢。

院上海生物化学研究所202组制备。

5. 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG), 5-溴-4氯 3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (Xgal) 和单脱氧核苷三磷酸 dATP, dTTP, dCTP, dGTP: 均为 Sigma 公司产品。

6. M13 引物 (5'-GTAAAACGA-CGGCCAGT-3') 由中国科学院上海生物化学研究所202组合成。

(二) 方法

1. 寡聚 DNA 片段的化学合成: 利用应用生物系统公司380型DNA 自动合成

仪, 采用固相亚磷酸三酯法化学合成生长抑制激素的两个DNA片段A₅₂、A₂₃。55℃ 氨解合成片段, PAGE 进一步纯化, 在 Sephadex G-25柱上用重蒸去离子水洗脱去盐, 无水乙醇浓缩后分别溶于一定量 pH 8.0 TM 缓冲液 (0.5mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L MgCl₂) 中。DNA 片段5' 末端标记后, 作电泳鉴定。

2. 寡聚 DNA 片段的装配与合成基因的克隆: 如图 1 所示, 约 80pmols 的寡聚 DNA 片段 A₅₂, A₂₃, 加入 2μl r-³²P-

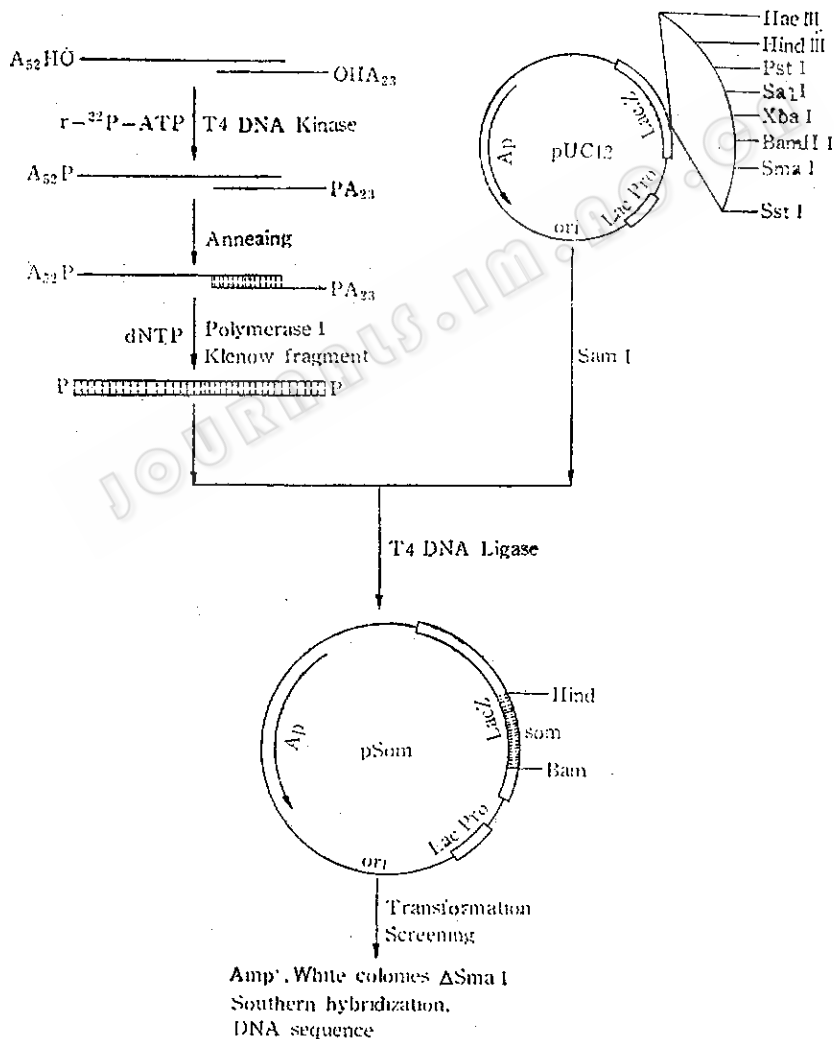


图 1 生长抑制激素基因克隆示意图
Fig. 1 Cloning strategy of somatostatin gene

ATP, 冷冻真空抽干, 然后分别加入 2 μ l pH7.5 TME 缓冲液 (500mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EDTA), 1 μ l 200mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 0.15mmol/L 非同位素 ATP, 4u 多核苷酸激酶, 补充重蒸水至总体积 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴中反应 40min。

混合 5' 端磷酸化的 A₅₂, A₂₃ 片段, 然后加入 5mmol/L NaCl 2 μ l, 加水至总体积 100 μ l, 90 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 缓慢冷却至室温。补加 4 μ l 5mol/L NaCl, 300 μ l 乙醇, 于干冰中沉淀, 离心抽干后悬浮到 9 μ l 水中。

在上述退火的 DNA 片段反应液中, 加入 pH7.5 TME 缓冲液 2 μ l, 5mmol/L dATP, dTTP, dCTP, dGTP 各 2 μ l, 200mmol/L DTT 0.5 μ l, 5u 的大肠杆菌 DNA 多聚酶 Klenow 片段, 加重蒸去离子水至总体积 20 μ l, 室温下反应 1h 补齐成平端 DNA 分子。加水 80 μ l, 5mol/L NaCl 6 μ l, 乙醇 300 μ l 于上述反应管中, 置干冰中沉淀, 离心抽干后悬浮到 3 μ l pH7.5 的 TME 缓冲液中。

SmaI 酶切的约 2 μ g 的 pUC12 质粒 DNA 与退火并补齐的合成片段混合到 20 μ l 水中, 然后加 200mmol/L DTT 1.5 μ l, 19mmol/L ATP 1.5 μ l, T4 DNA 连接酶 4 μ l, 反应总体积 30 μ l, 4 $^{\circ}$ C 反应 16h。

将重组质粒转入到受体细菌 JM83 在含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素和 80 μ g/ml Xgal 和 IPTG 的 LB 平板上培养。挑选白色菌落, 利用 SmaI 酶切位点的消失, Southern 转移杂交法筛选, 最后通过序列分析确证。

3. 质粒 DNA 的少量抽提: 参考 Ish-Horonicz^[8] 的方法, 大量抽提参考 Birnboim 和 Doly^[9] 的方法。

4. DNA 的限制性内切酶反应及

DNA 片段的连接反应: 参考 Maniatis^[10] 的方法

5. 质粒 DNA 的转化: 参考 Mandal 和 Higa^[11] 的方法。

6. DNA 膜转移杂交: 参考 Southern^[12] 的方法。

7. DNA 序列分析: 参考蒋志伟^[13] 等的方法。

结果与讨论

(一) 基因片段的合成与克隆

生长抑制激素为 14 个氨基酸的多肽分子, 不同动物的生长抑制激素氨基酸序列完全相同。人、猪和牛的生长抑制激素的 28 肽前体结构也完全一致。众多的试验表明, 通过双功能试剂, 将化学合成的与天然生长抑制激素序列完全相同的多肽, 连接到牛甲状腺球蛋白或牛血清白蛋白后, 免疫动物均可获得高效价的抗生长抑制激素血清^[1, 4, 5], 这在一定程度上可能是因为生长抑制激素分子太小, 半衰期极短, 在动物体内并不能为机体免疫系统所识别的缘故。为此, 根据 Shen^[14] 等人的工作, 我们选择了与天然生长抑制激素基因完全相同的序列作为合成的基因序列 (图 2)。

为了便于基因操作, 试验设计的生长抑制激素基因中还引入了另外一些结构特征。第一为了有利于插到表达质粒上, 5' 端供有 BamHI 和 HindIII 的酶切位点, 以使用此两种酶酶切后形成 5' 端的粘性末端。第二在生长抑制激素的第一个氨基酸之前设计了一个甲硫氨酸的密码子, 便于从表达的融合蛋白中, 用溴化氰裂解出所需要的生长抑制激素多肽分子。第三 C-末端氨基酸之后加入了两个终止密码子 (图 3)。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
 Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
 5'-GCT CGC TGC AAG AAC TTC TTC TGG AAG ACT TTC ACA TCC TGT-3'

图 2 设计的生长抑制激素的基因及其相对应的氨基酸
 Fig. 2 Designed sequence of the somatostatin gene and its corresponding amino acid

BamHI 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 stop stop
 5'-GGATCCGATGGCTGGCTGCAAGAAGACTTCTTCTGGAAGACTTTCACATCCTGTTAGTAAAGCTTT-3'
 CCTAGGCTACCGACCGACGTTCTTGAAGAAGACCTTCTGAAAGTGTAGGACAATCATTCGAAA
 HindIII

图 3 设计的全部生长抑制激素基因
 Fig. 3 Designed gene of somatostatin

A52:
 5'-GGATCCGATGGCTGGCTGCAAGAAGACTTCTTCTGGAAGACTTTCACATCCTGT-3'
 3'-AAGTGTAGGACAATCATTCGAAA-5'
 A23

图 4 合成的 A₅₂、A₂₃ DNA 片段的碱基序列
 Fig. 4 Sequences of two chemically synthesized DNA fragments of somatostatin gene A₅₂ and A₂₃

利用 380 型 DNA 自动合成仪, 合成生长抑制激素的两个 DNA 片段, 分别称之为 A₅₂、A₂₃ (图 4)。

化学合成的生长抑制激素基因片段 A₅₂ 和 A₂₃ 分别用 r-³²P-ATP 进行 5' 末端标记, 在 12% 聚丙烯酰胺-7mol/L 尿素凝胶中用变性电泳指示剂进行 PAGE, 放射自显影后其结果见图版 I-1。从自显影条带与溴酚蓝 (BPB) 及二甲苯腈蓝 (Xc) 指示剂的相对位置可知, A₅₂ 和 A₂₃ 碱基数与试验设计的大致相符合。

经 5' 端磷酸化的 A₅₂ 和 A₂₃ 片段退火, 然后在大肠杆菌 DNA 聚合酶催化下补齐成平端 DNA 分子。退火的 DNA 溶液由于分子间配对的碱基少, 经电泳后仍有多条带出现, 而聚合后的基因片段不仅分子变大, 同时条带也趋向单一。图版 I-2 补齐的反应物经苯酚抽提, 乙醇沉淀后与 SmaI 酶切的 pUC12 质粒 DNA 连接, 并转化细菌 JM83。

(二) 筛选克隆株

pUC12 质粒含有氨苄青霉素的抗性基因, 同时还有半乳糖苷酶基因的启动子及 β-半乳糖苷酶的结构基因。含有 pUC12 质粒的细菌在 Xgal 与 IPTG 存在的情况下, 由于 β-半乳糖苷酶的诱导表达而生长为蓝色菌落。该质粒还有一位于 β-半乳糖苷酶基因前部的多酶接头, 如外源的生长抑制激素基因插入到 SmaI 酶切部位, 那么 β-半乳糖苷酶结构基因将会由于移码突变而失活, 继而在 Xgal 与 IPTG 培养基中形成白色菌落。未插入外源基因而自身环化的质粒 DNA 转化细菌后仍恢复 β-半乳糖苷酶结构基因的活性。分别将 50, 100 和 200 μl 的转化细菌涂布到含有 Amp., Xgal 及 IPTG 的 LB 选择培养基中培养 12h, 共挑选 74 个有氨苄青霉素抗性的白色菌落作为可能的克隆株, 供进一步的鉴定。

(三) 酶切鉴定

pUC12 质粒 DNA 在其多酶接头处有

唯一的 SmaI 切点, 外源基因插入此处, 则由于连接部位碱基组成的变化, 使 SmaI 酶切位点消失, 自身环化的质粒 DNA 仍可恢复 SmaI 酶切识别序列。在上述 74 个供试菌中任意挑选 40 个菌株, 按碱法快速抽提质粒 DNA, 利用 SmaI 酶切分析, 共确定缺失 SmaI 酶切位点的细菌菌株 10 个, 分别编号为 pSom. 1、2、5、7、8、13、23、24、31 和 34。图版 I-3 为 pSom. 5 质粒 DNA 经 BamHI, HindIII 和 SmaI 酶切的电泳图。

(四) 分子杂交鉴定

以 $r^{-32}\text{P}$ -ATP 标记合成的基因片段 A₂₃, 并以此作为杂交探针, 按 Southern 的方法进行转移杂交, 证实 pSom.

2、5、7、8、13、23、24、31 和 34 为带有目的基因的杂交阳性菌株, 进一步证实了酶切分析的结果 (见图版 I-4)。

(五) 基因的序列分析

按蒋志伟等的双脱氧终止法进行 pSom. 5 质粒 DNA 的序列分析。由于 pUC12 质粒 DNA 与 M13 噬菌体在 DNA 多酶接头处有一致的序列, 因此序列分析的引物采用 M13 17 聚寡核苷酸片段, 并以 $r^{-32}\text{P}$ -ATP 作为同位素源。序列分析的结果表明 (图版 I-5), 克隆基因的碱基序列与设计的生长抑制激素基因完全符合。证实目的基因已在大肠杆菌 JM83 中克隆成功。

参 考 文 献

- [1] Brazeau, P. et al.: *Science*, 179:77, 1973.
- [2] Patel, Y.C. et al.: *Methods of hormone radioimmunoassay*, Second Edition, Academic Press Inc., Somatostatin 77-97, 1979.
- [3] Arimura, A. et al.: *Science*, 189:1007-1009, 1975.
- [4] Arimura, A. et al.: *Endocrinology*, 98:1069, 1976.
- [5] Terry, L.C.: *Science*, 192:565, 1976.
- [6] Macccechini Maria Luisa, Promoting animal growth using antibody against somatostatin. (International Minerals and Chemical Corp.) U.S. US 4,599, 299 (Cl. 424-485, A61 K39/395) 08 July, Appl., 773, 814, 1986.
- [7] Itakura, K. et al.: *Science*, 198:1056, 1977.
- [8] Ish-Horowitz, D. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 9:2989, 1981.
- [9] Birnboim, H.C.: *Nucleic Acids Res.*, 7:1513, 1979.
- [10] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- [11] Mandal, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 53:154, 1970.
- [12] Southern, E.: *J. Mol. Biol.*, 98:503, 1975.
- [13] 蒋志伟等: 生物化学与生物物理学报, 待发表。
- [14] Shen, L.P. et al.: *PNAS. USA.*, 79:4575-4579, 1982.

CHEMICAL SYNTHESIS AND CLONING OF SOMATOSTATIN GENE

Zeng Yixiang Du Nianxing

(Veterinary Medicine Department, Nanjing Agricultural University, Nanjing)

Tang Jinyan

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

Two DNA fragments of somatostatin gene $A_{5,2}$ and $A_{2,3}$ were chemically synthesized by the solid-phase phosphotriester method. These two DNA fragments were annealed, then extended into blunt-end by polymerase and ligated with the plasmid pUC12 DNA which was cleaved with restriction endonuclease *Sma*I. By the screening of ampicillin resistance, inactive β -galactosidase, restriction enzyme characterization, Southern hybridization and DNA sequencing for the transformants, it is certain that the somatostatin gene has been successfully cloned into the *E. coli*, JM83.

Key words

Somatostatin; gene synthesis; gene cloning

图版说明

1. 纯化的 $A_{5,2}$ - $A_{2,3}$ DNA 片段的电泳图
Analysis by 7mol/L Urea-12% PAGE of the purified DNA fragments $A_{5,2}$ and $A_{2,3}$.
Left: $A_{5,2}$, Right: $A_{2,3}$. BpB: Bromophenol blue, Xc: Xylene cyanol
2. 退火与补齐的生长抑制激素基因在12%聚丙烯酰胺凝胶中的电泳。左边: 退火的片段, 右边: 退火之后再补齐的片段
Acrylamide gel analysis of the annealing and polymerase extension somatostatin DNA
Left, the annealing fragment of $A_{5,2}$ and $A_{2,3}$, Right, the polymerase extension fragment
3. 质粒DNA的酶切分析。pSom5 质粒 DNA 经 *Sma*I, *Bam*HI, *Hind*III 酶切后, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳
Analysis by 0.7% agarose gel electrophoresis of the pSom5 plasmid DNA cleaved with the restriction endonuclease *Sma*I, *Bam*HI and *Hind*III
A. DNA + *Hind*III, B. DNA + *Sma*I, C. DNA + *Bam*HI, D. DNA
4. pSomI, 2, 5, 7, 8, 13, 23, 24, 31和34的Southern 杂交图, 使用 $r\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 末端标记的 $A_{2,3}$ 作为杂交探针
Southern hybridization of the plasmid DNA pSom. 1, 2, 5, 7, 8, 13, 23, 24, 31 and 34, using $A_{2,3}$ labelled with $r\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ as probe
5. 克隆基因的序列分析 Sequence analysis of the cloning gene, using the fragment
 $5'\text{-GTAAAACGACGGCCAGT-}3'$ as primer

