



## 淡水瓦氏雅罗鱼基因文库的构建 和抗冻蛋白基因同源序列的筛选

费云标 于建康 陈良标 王亚平 严绍颐

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

靳光琴

(广西水产研究所, 南宁)

南、北极海域中的一些鱼类, 在秋冬季节, 它们的血液中含有一些能降低其冰点的蛋白质, 分别为抗冻糖蛋白(AFGP)和含糖的抗冻蛋白或抗冻多肽(AFP)。现在, 人们已经分离纯化了多种这样的抗冻糖蛋白、抗冻蛋白及多肽, 并克隆了编码它们的基因<sup>[1, 2]</sup>。Fletcher等将北美黄盖鲈抗冻蛋白(AFP)注入虹鳟鱼(*Salmotrout*)后改善了后者的抗冻性能<sup>[3]</sup>, 并将黄盖鲈AFP基因转入了大西洋鲑鱼 *Atlantic salmon* 中<sup>[4]</sup>。

我国北方水域中生活着一些极为耐寒的淡水鱼类, 为了解它们是否含有类似的抗冻蛋白基因, 并用于转基因鱼的育种研究, 我们构建了耐寒的瓦氏雅罗鱼 *Leuciscus waleckii* 的基因文库并检测其中是否含有AFP基因的同源序列。

### 材料与 方法

#### (一) 材料

瓦氏雅罗鱼 (*Leuciscus waleckii*) 属鲤形目 (Lycpriniformes), 鲤科 (Lyprinidae), 雅罗鱼亚科 (Leuciscinae)。本文所用瓦氏雅罗鱼取自我国内蒙古北部水域。

*E. coli* Q358、*E. coli* Q359和噬菌体EMBL3由中日友好医院周红奕女士赠送。

含北美黄盖鲈 (*Pseudopleuronectes americanus*) 抗冻蛋白 (AFP) 基因的 cDNA 的质粒 pKen-c17 由加拿大多伦多大学临床生物学系丘才良教授赠送。

含北美黄盖鲈 AFP 基因的质粒 pRSV-gpt-AFP 由美国 Johns Hopkins 大学生物系黄周汝祺 Ru Chih C. Huang 教授赠送。

限制酶 BamHI, EcoRI, Sau3A, Hind III, SstI 和 T4DNA 连接酶等试剂为德国 Boehringer 公司和华美生物工程公司 SABC 的产品。

#### (二) 基因文库的构建

基本按 Karn 等<sup>[5]</sup>和徐洪基等<sup>[6]</sup>的方法略加修改完成基因文库的构建 (如图 1 所示)。

首先用琼脂糖平板法, 以 *E. coli* Q358 作宿主菌制备噬菌体 EMBL 3, 经氯化铯密度梯度离心, 纯化 EMBL 3, 从中制备 EMBL 3 的 DNA, 经 BamHI 和 EcoRI 完全酶解, 获得 EMBL 3 的两臂作为载体备用。

提取高分子量瓦氏雅罗鱼 DNA, 经 BamHI 部分酶解, 通过琼脂糖凝胶电泳分离纯化, 获得约 20kb 大小的 DNA 片段。将 ± 20 kb 瓦氏雅罗鱼 DNA 片段与 EMBL 3 两臂用 T4DNA 连接酶在连

本文于 1990 年 12 月 6 日收到。

此项工作得到中国高科技主要项目和洛克菲勒基金 (88045) 的资助。

加拿大多伦多大学临床生物化学系丘才良教授和美国 Johns Hopkins 大学生物系黄周汝祺教授分别赠送质粒 pKen-c17 和 pRSV-gpt-AFP, 中日友好医院周红奕女士赠送 *E. coli* Q358、*E. coli* Q359 和噬菌体 EMBL 3; 中国科学院发育研究所李建荣先生在照片技术上给予协助; 林鸿参加本实验技术工作, 在此一并致谢。

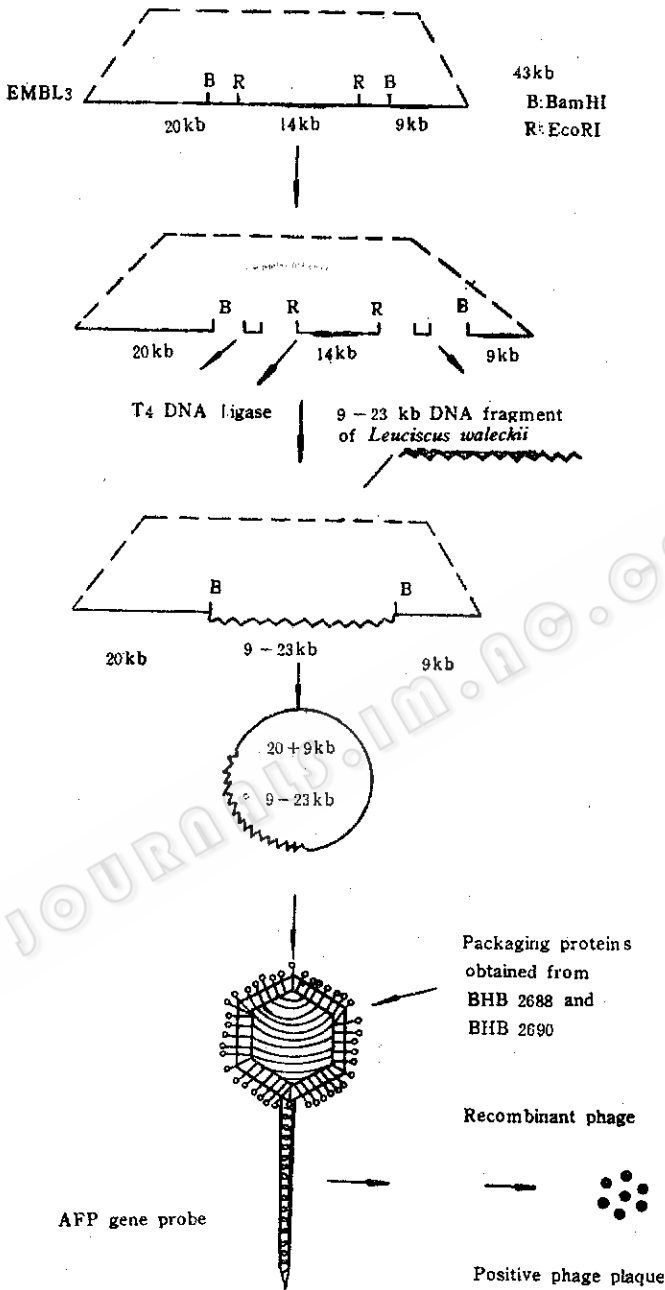


图 1 淡水雅罗鱼DNA基因文库的构建过程

接缓冲液 0.5mol/L Tris-HCl, pH7.4, 0.01 mol/L DTT, 1 mmol/L 亚精胺、1 mmol/L ATP, 0.1μg/ml BSA 中, 于 5—10℃ 反应过夜, 获得等于或略大于完整噬菌体EMBL3 DNA 分子量的重组噬菌体DNA。

基本按 Manitis 等<sup>[1]</sup>的方法 I 制备包装蛋白, 将上述重组DNA进行包装, 但对 *E. coli* BHB 2688和BHB 2690的培养改用LB培养液, 并在包装反应进行30min时添加 1份 BHB 2690 超声波制备物后继续培养30min, 将重组噬菌体于 20k

rpm(SwTi 41) 离心, 收集噬菌体沉淀物, 重新悬浮于SM液, 用*E. coli* Q359作宿主菌检测重组噬菌体。经检测, 其成斑率大于  $1 \times 10^5$  pfu/ $\mu$ g DNA, 考虑到已知的抗冻蛋白 (AFP) 基因常多至40个拷贝, 故文库总量约  $1 \times 10^5$  pfu 已是足量。

### (三) 抗冻蛋白基因同源序列的筛选

用限制酶Sst I 酶解质粒 pRSV-gpt-AFP获内含北美黄盖鲈抗冻蛋白 (AFP) 基因的DNA片段及用 BamHI 酶解质粒pKen-c17获得北美黄盖鲈 AFP 基因的 0.4kb cDNA 作探针, 与重组体噬菌斑作原位杂交并对杂交阳性噬菌体的 DNA 用Hind III、BamHI、SacI等酶解后进行Southern blot分析<sup>[8]</sup>。

## 结 果 与 讨 论

通过原位杂交获得三个AFP基因杂交阳性克隆, 将其中一个阳性克隆的DNA, 经过Southern blot分析(见图2), 获得了Hind III, 20kb左右、BamHI, 8.0 kb左右、SacI, 2.7kb左右的阳性杂交片段(见图3和图4)。

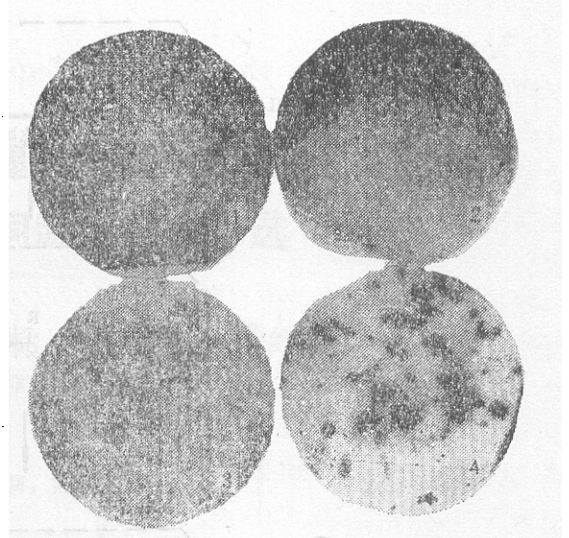


图2 原位分子杂交筛选淡水瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)基因文库中抗冻蛋白(AFP)基因的同源序列

AFP基因探针为 pRSV-gpt-AFP插入物; 1和2中的箭头示生长着重组噬菌体的同一平板上经双份膜在同一位点初筛出杂交阳性的重组噬菌斑; 3和4中的箭头示经初筛所获阳性重组体在同一平板用双份膜于各自对应位点上筛选出扩增后的阳性克隆

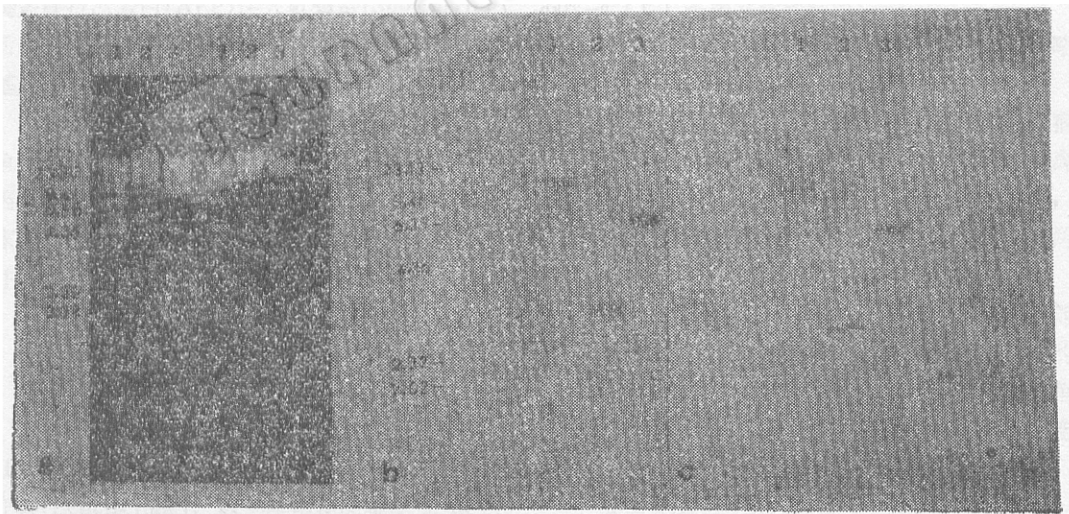


图3 阳性重组噬菌体DNA的Southern分析

- 噬菌体DNA经多种限制酶酶切(1, Hind III, 2, SacI和3, BamHI)和琼脂糖凝胶电泳
- 噬菌体DNA经酶切后与获自pKen-c17/BamHI的AFP基因的0.4kb cDNA的分子杂交图谱
- 同b, 但以获自pRSV-gpt-AFP/SstI的AFP基因为杂交探针, 示与b相应的杂交序列

这是首次发现在我国的一种耐寒淡水鱼基因组中可能存在着与海洋鱼类抗冻蛋白基因同源的DNA序列。我们已克隆了这 2.7 kb 片段的序

列, 以便对其结构和功能作进一步的分析, 并试图用于转基因鱼的研究。

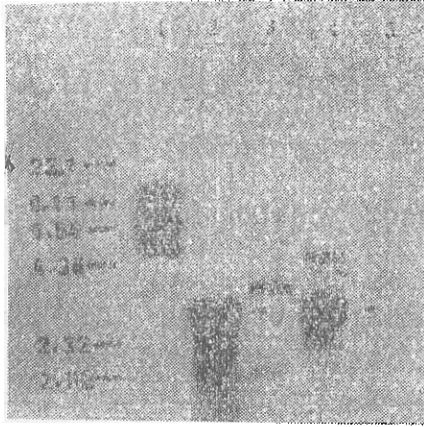


图 4 阳性重组噬菌体DNA的亚克隆和Southern分析  
杂交探针为PRSV-gpt-AFP/SstI的AFP基因

1, 2; 3\* 阳性重组噬菌体DNA的阳性重组质粒: (1) 无酶切, (2) SacI 酶切, 箭头示 2.7kb DNA 片段中 AFP 基因的同源序列

3, 4; 4\* 阳性重组噬菌体DNA的阳性重组质粒: (3) 无酶切, (4) SacI 酶切, 箭头示 2.7kb DNA 片段中 AFP 基因的同源序列

5: 对照pBR322质粒经SacI酶切, 无杂交序列

### 参 考 文 献

- [1] Devries, A.L., *Ann.Rev.Physiol.*, 45:245—260,1983.
- [2] Davies, P.L. et al., *J.Biol.Chem.*, 259:9241—9247,1984.
- [3] Fletcher, G.L. et al., *Can.J.Zool.*, 64:1897—1901,1986.
- [4] Fletcher, G.L. et al., *Can.J.Fish.Aquat.Sci.*, 45:352—357,1988.
- [5] Karn, J. et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 101, New York, Academic Press, pp.3—19, 1983.
- [6] 徐洪基等: 科学通报, (16):1267—1270,1986.
- [7] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp.256—268,1982.
- [8] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp.332—338,1982.

# Construction of Genomic Library of A Fresh Water Teleost (*Leuciscus waleckii*) and Detection of Its Homologous Sequences of Antifreeze Protein Gene

Fei Yunbiao Yu Jiankang Chen Liangbiao

Wang Yaping Yan Shaoyi

(*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing*)

Jin Guanquin

(*Guangxi Fisheries Research Institute, Nanning*)

The genomic library of one kind of cold-temperature resistant fresh water teleost, *Leuciscus waleckii*, was constructed by using phage EMBL3 as vector. Three positive hybridized recombinant phage plaques were screened out by AFP gene probe of a marine teleost, North American winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Three positive hybridized bands of 2.7 kb/SacI, 8 kb/BamHI and 20 kb/HindIII DNA segments obtained from these positive hybridization recombinant phage DNA were identified when a AFP gene and a 0.4 kb cDNA of AFP gene of a marine teleost, the winter flounder, were used respectively as the probes for Southern analysis. These preliminary results show that a homologous sequence of AFP gene of winter flounder seems to be present in the genome of *Leuciscus waleckii*.

## Key words

*Leuciscus waleckii*; fresh water teleost; genomic library; antifreeze protein gene