

研究报告

应用聚合酶链反应改造鲑鱼生长激素 cDNA

宋诗铎 张同海 祁伟 赵为诚

王培福 胡文芝 李立津

(天津医学院第二附属医院, 300070)

为了在大肠杆菌中表达天然序列的鲑鱼生长激素基因, 本研究应用聚合酶链反应扩增方法改造鲑鱼生长激素 cDNA, 成功地扩增出编码鲑鱼生长激素成熟肽的序列, 并在该序列的 5 端和 3 端分别引入 *EcoRI* 和 *BamHI* 的识别序列, 使之便于进入载体, 获得亚克隆。结果表明: 应用聚合酶链反应扩增及分子克隆方法改造鲑鱼生长激素 cDNA 较传统的 DNA 重组方法简便, 效率高。文中对聚合酶链反应扩增中非预期突变进行了讨论。

关键词: 聚合酶链反应, 鲑鱼生长激素, cDNA, 分子克隆, 基因改造

聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, 简称 PCR) 是 Kang Millis 等近年提出的体外基因扩增技术^[6, 7], 通过使用一对寡聚核苷酸引物, 在耐热 *Taq* DNA 聚合酶作用下, 成百万倍地扩增靶序列的特异性片段。由于该技术操作简便, 快速, 已迅速成为分子生物学研究和临床诊断的重要手段^[8]。PCR 扩增方法最引人注目的特点是, 允许在引物的 5' 端引入一些与靶序列不完全互补的错配序列, 人们可利用这一特点定向地修饰和改造扩增产物。在对真核生物基因表达的研究中, 需要去除真核生物 cDNA 的信号肽序列, 用编码成熟肽的 DNA 与表达载体连接, 才能在原核生物系统表达。然而编码信号肽与成熟肽连接部位的序列往往缺乏合适的限制性内切酶识别序列, 使表达质粒构建十分困难。我们采用 PCR 方法, 从鲑鱼生长激素的 cDNA 克隆中, 成功地扩增出编码鲑鱼生长激素成熟肽的序列, 并在该序列的两端分别引入了不同的酶切点, 使之便于进入表达载体获得亚克隆, 为基因高效表达奠定基础。

材料和方法

(一) 材料

鲑鱼生长激素克隆质粒 psGH4 来自本实验室^[9]; 质粒 pUC18, 限制性内切酶和其它工具酶为 Boehringer Mannheim 公司及中国医学科学院基础医学研究所产品; *Taq* DNA 聚合酶购自华美生物公司; 同位素购自中国原子能研究院和 Amersham 公司。

(二) DNA 片段的合成及纯化

用固相磷酸二脂法, 经 Applied Biosystems Inc. 391 型 DNA 合成仪合成 DNA 片段, 经 20% 尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Sep-park C18 柱纯化。

(三) PCR 扩增 DNA

参照 Saiki 等^[10]的方法。具体方法如下: 100 μ l 反应体系中 (50m mol/L KCl, 10m mol/L Tris-HCl pH8.4, 1.5m mol/L MgCl₂, 100 μ l/ml 明胶和 4 μ l DMSO) 含 0.15 μ g 4Kb 的 ps GH 4/*EcoRI* 酶切片段, 起始引物 P1 和终末引物 P2 均为 50pM, dNTP (dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP) 分别为 250 μ mol/L。在 96 $^{\circ}$ C 下热变性 10 分钟, 于 42 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 加

Song Shiduo et al.: Rapid Modification of Salmon Growth Hormone cDNA by Using the Polymerase Chain Reaction (PCR)

本文于 1991 年 5 月 10 日收到。

入 2 μ l 耐热 *Taq* DNA 聚合酶, 在 65 $^{\circ}$ C 引物延伸 1.5 分钟, 然后按 93 $^{\circ}$ C 1 分钟, 47 $^{\circ}$ C 1 分钟和 65 $^{\circ}$ C 1.5 分钟进行 25 个循环, 其中前 3 个循环中, 退火温度逐渐从 47 $^{\circ}$ C 上升到 55 $^{\circ}$ C, 第 4 个循环及以后的退火温度均为 55 $^{\circ}$ C, 最后在 65 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟, 加 100 μ l 三氯甲烷抽提一次, 小心取出水相, 取 5 μ l 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。其余加入 4 μ l mol/L 乙酸钾和等体积的异丙醇使之沉淀, 沉淀物经 70% 冷乙醇洗涤, 冷冻干燥, 溶于 40 μ l 水中, 用于酶切和亚克隆。

(四) 扩增产物的分子克隆和筛选

扩增产物 20 μ l 经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切, 在 T4 DNA 连接酶作用下, 与 pUC18 的 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切大片段连接, 转化进入大肠杆菌 JM 103。转化及转化子的筛选方法同以往报道^[2]。转化子经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切, 在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳中分离出插入子, 用 γ -³²PATP 标记的寡聚核苷酸探针 A 和探针 B 作 Southern 印迹杂交及放射自显影分析。

结 果

(一) 扩增片段引物及探针的设计

为了扩增蛙鱼生长激素成熟肽的编码序

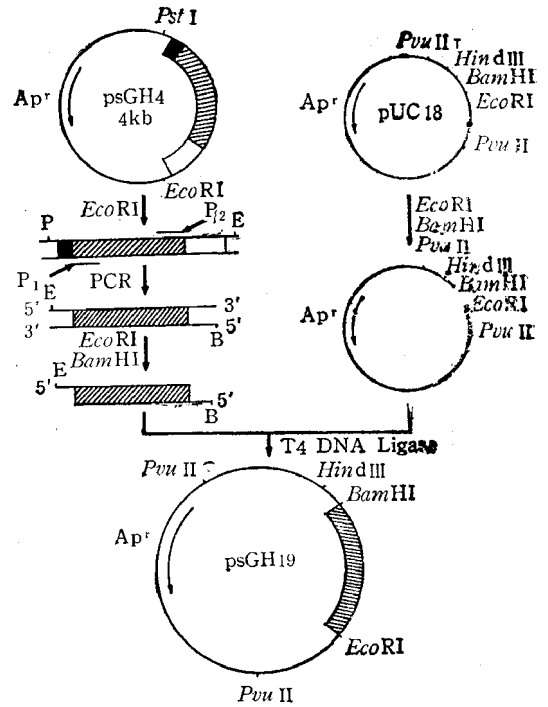


图 1 扩增蛙鱼生长激素成熟肽的编码序列及分子克隆的策略

列, 采用以下策略 (见图 1):

1. 蛙鱼生长激素克隆质粒 psGH4 用 *Eco*RI 酶切使其线性化。
2. 设计起始引物 P1 和终末引物 P2 (见图

		1	2	3	4	5	6	7
amino acid	NH ₂ --	Ile	Glu	Asn	Gln	Arg	Leu	Phe
mRNA	5' --	ATA	GAA	ACC	CAA	CGG	CTC	TTC--3'
• Probe A	3' --	TAT	CTT	TGG	GTT	GCC	GAG	AAG--5'
• Primer 1	5' --	CGCTGAATTCATA	GAA	ACC	CAA	CGG	--3'	
		<i>Eco</i> RI						
		166	167	168	169	170	171	172
amino acid	--	Met	His	Lys	Val	Glu	Thr	Thr--
mRNA	5' --	ATG	CAC	AAG	GTC	GAG	ACC	TAC--3'
• Probe B	3' --	TAC	GTG	TTC	CAG	CTC	TGG	ATG--5'
		184	185	186	187	188		
amino acid	--	Ala	Asn	Cys	Thr	Leu--	COOH	
mRNA	5' --	GCC	AAC	TGC	ACT	CTG	TAG--3'	
• Primer 2	3' --	CGG	TTG	ACG	TGA	GAC	ATCCTAGGCCCA--5'	
		<i>Bam</i> HI						

图 2 蛙鱼生长激素的部分氨基酸序列及合成的探针和引物 P₁ 和 P₂ 子别为起始引物和终末产物

2)。P1 含 25 个碱基，自 5' 端起有 10 个附加碱基序列，包括保护序列和 *EcoRI* 识别序列，其后与编码成熟肽前 5 个氨基酸残基的正链序列一致。P2 含 27 个碱基，自 5' 端起有 9 个附加碱基序列，包括保护序列和 *BamHI* 识别序列，其后与终止密码和编码成熟肽终末 5 个氨基酸残基的负链序列一致。使用 P1 和 P2 做引物，经 PCR 扩增，可获得 586bp 扩增片段，其包括编码完整成熟肽序列和终止密码，以及 5' 端的 *EcoRI* 和 3' 端的 *BamHI* 识别序列。

3. 寡聚核苷酸探针的设计 探针 A 和探针 B (见图 2) 分别与编码鲑鱼生长激素成熟肽的氨基端和羧基端序列互补。

(二) 扩增 586 bp 片段

0.15 μ g 的 *psGH4/EcoRI* 片段经 25 个循环的 PCR 扩增后，取 5 μ l 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析，可见清晰均一的 586bp 的片段 (见图 3)，扩增产物大约 1.5 μ g，实际扩增倍数 P 约

1 000，理论扩增循环数 n，可根据公式 $n = \lg P / \lg 2$ 计算，得 $n = 10$ 。

(三) 扩增产物的分子克隆

586bp 的扩增产物经 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶

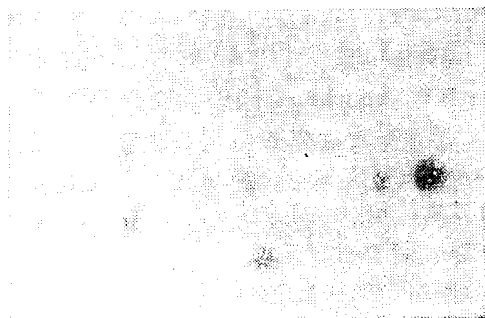


图 4 转化子的菌落杂交分析

共选取 150 个转化子，与探针 A 杂交，获得 7 个阳性克隆。箭头指示 *psGH19*，末行中间阳性信号为含 *psGH4* 的菌株。

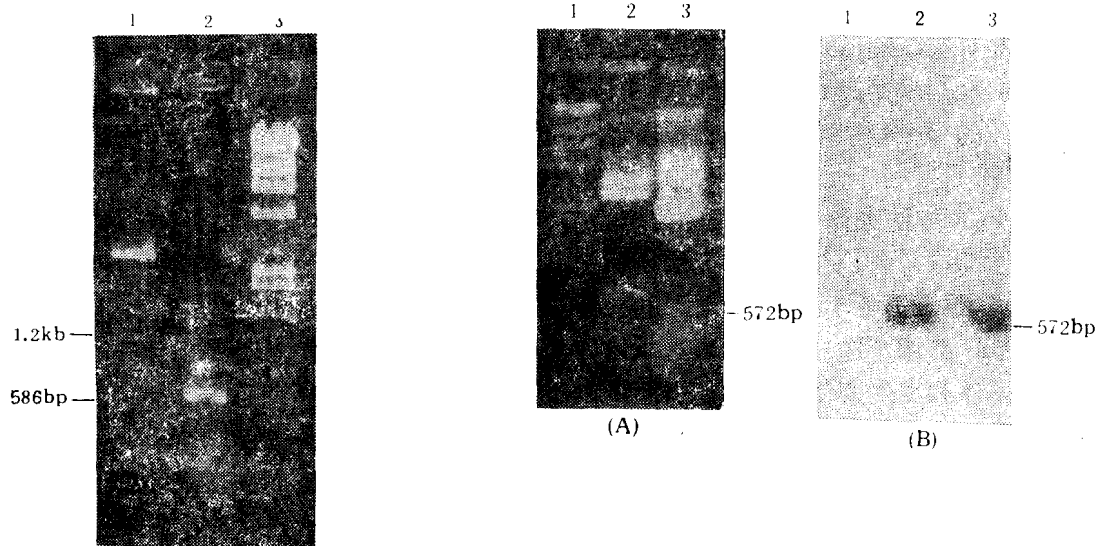


图 5 重组质粒的酶切电泳 (A) 和 Southern 印迹杂交分析 (B)

1. λ /*HindIII*; 2. *psGH19/EcoRI + BamHI*;
3. *psGH18/EcoRI + BamHI*

该电泳转移到尼龙膜，用探针 B 做 Southern 印迹杂交

图 3 PCR 产物的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析

1. 扩增模板: *psGH4*; 2. PCR 扩增产物约 586bp;
3. λ /*HindIII*。

切消化后,与 pUC18 的 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切大片段连接、转化后用 γ - ^{32}P ATP 标记的寡聚核苷酸探针 A 筛选转化子,获得 7 个阳性克隆(见图 4)。取其中 2 个克隆提取质粒,用 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切消化,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见 psGH19 含有 572bp 的插入子(见图 5),用 γ - ^{32}P ATP 标记的寡聚核苷酸探针 B 作 Southern 印迹杂交分析,进一步证实该克隆含有编码鲑鱼生长激素成熟肽的基因片段,约 572bp 长,与氨基端探针 A 和羧基端探针 B 序列互补,结果与以往报道一致^[1]。

讨 论

PCR 扩增方法允许在引物的 5' 端引入与靶序列不同的一段 DNA 序列,虽然该序列与模板 DNA 不配对,但对扩增的影响很小,能人为地改造扩增产物,效果几乎达到 100%^[9]。该特点可用于引入限制性内切酶识别序列便于分子克隆,也可引入定点突变,包括插入、缺失等,而有利于基因的改造,目前已有这类报道^[11,14],不配对的序列可加到 45 个碱基长^[12]。

为充分保证在 PCR 扩增中含有不配对序列的引物与靶序列退火成功,掌握退火的条件很重要。我们采用起始温度为 42°C 1 分钟,然后在以后的 3—4 个循环中逐步提高退火温度到 55°C。

用 PCR 方法进行分子克隆比传统的 DNA 重组方法简单得多,且不受有无酶切识别序列的限制。但是需要十分重视非预期突变问题,因为 PCR 扩增产物克隆进入表达载体,如果一个碱基序列发生变化,将可能引起蛋白质合成的改变。Tindall 等^[13]指出,在 PCR 扩增中

使用 *Taq* DNA 聚合酶,合成每 9 000 个核苷酸会出现 1 个碱基错误,合成 41 000 个核苷酸,出现 1 次框架移动。按照标准化 PCR 方法,在 20 个循环后错误率为 1/900。其主要原因是 *Taq* DNA 聚合酶不具有 3'→5' 外切酶活性,不能自行清除聚合反应中错配的碱基。为了减少非预期突变,许多学者做了大量的研究^[3,4,8],改进 PCR 扩增反应条件,使非预期突变率减少到 1/3900。其中包括增加模板的浓度及尽量减少循环次数,尽可能缩短 PCR 反应中高温维持时间,以避免模板损坏,以及尽可能提高退火温度,以便阻止错误链的延伸。为此我们在实验中适当增加了模板的浓度,实际的循环次数 $n = 10$,PCR 扩增产物的序列分析(另文报道)证实没有发生非预期突变。

参 考 文 献

- [1] 宋诗铎等: 1992. 遗传学报,19(4): 308—315.
- [2] 宋诗铎等: 1988. 遗传学报,16(5): 374—380.
- [3] Ho, S. N. et al.: 1989. *Gene*, 77: 51.
- [4] Horton, R. M. et al.: 1989. *Gene*, 77: 61.
- [5] Marx, J. J.: 1988. *Science*, 240: 1408—1410.
- [6] Millis, K. B. and F. Faloona 1987. *Meth. Enzymol.*, 155: 335.
- [7] Millis, K. B. et al.: 1986. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263—273.
- [8] Nishikawa, B. K. et al.: 1989. *Biotechniques*, 7: 730—735.
- [9] Russell, H.: 1989. *PCR Technology*, M Stockton press, New York.
- [10] Saiki, R. K. et al.: 1985. *Science*, 37: 170—172.
- [11] Sarkar, G. and S. Sommer: 1990. *Biotechniques*, 8(4): 404—407.
- [12] Scheffield, V. C. et al.: 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 232.
- [13] Tindall, K. R. and T. A. Kunkel: 1989. *Biochemistry*, 27: 6008.
- [14] Vallette, F. et al.: 1989. *Nucl. Acids Res.*, 17: 723.