

## 黄盖鲈抗冻蛋白的分离与 cDNA 克隆\*

蒋耀青 陈雄凤 刘澎湃 张乃昌

(中国科学院遗传研究所,北京)

五十年代末,六十年代初,国外学者从极地鱼类中发现并分离出能使血液冰点降低的抗冻物质。这种物质分为糖蛋白及抗冻肽两类。人们以美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*)等为材料,对抗冻肽的性质、一级结构、mRNA, 基因表达等都进行了研究。有关抗冻肽的作用机理以及基因的表达调节都是学者注意的中心。对抗冻蛋白基因的研究,在理论上可以使人们了解鱼类血清冰点降低的遗传基础,研究基因表达的调节等基础问题,另一方面也可用遗传工程手段改良经济鱼类品种,提高鱼类抗冻能力作一些贡献。但国内这方面的工作起步较晚,目前尚少有类似的工作报道。

我们以我国黄海沿岸黄盖鲈(*Pseudopleuronectes yokohamae*)为材料,根据血清的冰点、融点测定和热滞温度等数据,在国内首次证明黄盖鲈是含有抗冻蛋白的鱼类,克隆了抗冻蛋白基因 cDNA,并已在大肠杆菌中得到了表达。

经测定,黄盖鲈血清的冰点,冬季(-4.2°C)大大低于夏季(-1.3°C),而冬季的热滞温度(1.2°C)又明显高于夏季(0.5°C),说明黄盖鲈冬季血清中存在有抗冻蛋白。在冬季血清的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上,有一条夏季血清所没有的区带,分子量约为 4500 道尔顿。经 Sephadex G-25 柱层析法对冬季血清进行初步分离,将 B 峰提取物在离体情况下加入尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)及黄盖鲈的夏季血清中后,冰点分别从 -1.0°C 下降到 -2.8°C 及从 -1.3°C 下降为 -3.0°C; 热滞温度则分别自 0.2°C 上升为 1.0°C 及自 0.5°C 上升为 0.9°C,从而证明 B 峰物质为抗冻蛋白。

此种初提的抗冻蛋白,在高效液相色谱仪(HPLC)上进一步层析纯化,并进行氨基酸组成分析,结果表明它含有较多的疏水性氨基酸,丙氨酸的含量可高达 58.2%。

经 mRNA 电泳分析和 Northern 杂交,证实了黄盖鲈抗冻肽是一类在转录水平上受到调控的蛋白。

我们按照美洲拟鲈抗冻肽基因的核苷酸序列合成了一段寡聚核苷酸片段(d(ACCGCAGCC ACCGCC-

GCCGCA),以此为引物,与黄盖鲈的 mRNA 杂交,用反转录酶催化单股 cDNA 的合成,继之经 DNA 多聚酶,核酸酶 S<sub>1</sub>等的处理,催化双股 cDNA 的合成。琼脂糖电泳,放射自显影结果表明,合成的 cDNA 双链大小十分均一,特异性很强。

在获得均一的特异性 cDNA 片段后,用 EcoRI Linker 连接法,克隆了该片段,载体为 pUC19 质粒。重组质粒转化大肠杆菌 JM83,在含 x-gal 的 LB 培养基上,筛选白色重组克隆进行杂交分析。用 [<sup>32</sup>P]-dCTP 标记探针(特异性 cDNA 合成的第一链)筛选阳性克隆,结果证实了重组克隆(pYAF201)中插入了抗冻蛋白的 DNA 片段。我们还将美洲拟鲈抗冻蛋白基因 cDNA 作探针(黑龙江应用微生物所馈赠),与 pYAF201 质粒 DNA,黄盖鲈 DNA 做点渍杂交分析,结果为阳性。当我们用重组克隆 DNA 作探针,与冬季黄盖鲈 mRNA 进行 Northern 杂交时,10S 处为阳性结果,这些数据都有力地证明,插入片段为黄盖鲈抗冻肽基因 cDNA 片段。

对质粒 pYAF201 的酶切图谱分析表明,插入片段上有 HindIII, EcoRI, BamHI 及 pst 的酶切位点。

用 Sanger 末端终止法对插入片段进行了核酸序列测定,发现黄盖鲈抗冻肽 cDNA 基因中含有许多编码丙氨酸的密码子,与我们对黄盖鲈抗冻肽的氨基酸分析一致。

在以上工作的基础上,我们用质粒 pYAF201 转化大肠杆菌 JM83,对抗冻蛋白基因的表达产物进行了 Elisa 酶联吸附反应,检测结果为阳性。

为此,我们在国内首次发现了含有抗冻肽的鱼类,克隆了抗冻蛋白基因 cDNA,还初步在大肠杆菌中得到了表达。该工作对鱼类分子遗传学研究,以及遗传工程技术在生产实践中的应用,无疑提供了重要的数据和前景。

Jiang Yaoqing et al.: Isolation and cDNA Cloning of Antifreeze Protein in *Pseudopleuronectes yokohamae*

\* 农业部水产局支持项目。

本文于 1989 年 6 月 14 日收到。