

文章编号: 1000- 0615(2002)03- 0201- 05

鲢生长激素 cDNA 表达载体构建 及在大肠杆菌中的表达

陈松林¹, Y. Hong², M. Scharl²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;
2. Biocenter of University Wuerzburg, Wuerzburg 97074)

摘要: 应用 RT-PCR 技术从白鲢垂体 mRNA 中扩增出 GH 全长 cDNA 片段, 长度 1.2kb。将 1.2kb 白鲢 GH cDNA 克隆到载体质粒 pBluescript KSII+ (pBSK SII+) 中, 构建了 pBS- scGHcDNA 克隆; 通过含有 *Nde*I 酶切位点的特异引物扩增出不含信号肽序列的 cDNA 片段, 将其重组到 pRSET5b 载体质粒中, 构建了白鲢 GH cDNA 表达质粒 pRSET- scGH。将此表达质粒转化 BL21(DE3) 大肠杆菌, 经 IPTG 诱导后, 在转化的大肠杆菌中检测到 GH 蛋白的存在。Western 印迹表明该蛋白带与草鱼 GH 单克隆抗体具有强烈的免疫反应。

关键词: 鲢; 生长激素 cDNA; 表达载体; 大肠杆菌

中图分类号: S917 文献标识码: A

Construction of expression vector of growth hormone cDNA from *Hypophthalmichthys molitrix* and its expression in *Escherichia coli*

CHEN Song-lin¹, Y. HONG², M. Scharl²

(1. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources Certificated by the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China; 2. Biocenter of University Wuerzburg, Wuerzburg 97074, Germany)

Abstract: Total RNA was isolated from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) pituitaries. The cDNA fragment of 1.2 kb encoding growth hormone (GH) was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using total RNA as template. The amplified cDNA was inserted at the *Eco*RI site in vector pBluescript KSII+ and resulted in plasmid pBS- scGHcDNA. GH cDNA fragment of 1 kb without signal peptide sequence was amplified using pBS- scGHcDNA as template and introduced to expression vector pRSET5b, generating scGH expression plasmid pRSET5b- scGH. The bacteria BL21(DE3) plys were transfected with pRSET5b- scGH. The expression of scGH peptide of 22kD in the transfected BL21(DE3) plys was detected by PAGE. Western blotting demonstrated that the recombinant scGH could specially react with monoclonal antibody to grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) GH.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; growth hormone cDNA; expression vector; *Escherichia coli*

收稿日期: 2001-08-02

资助项目: 农业部“九五”重点渔业科技项目(渔 95- B- 96- 07- 03)

作者简介: 陈松林(1960-), 男, 湖北黄陂人, 研究员, 博士生导师, 主要从事鱼类生物技术研究。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

生长激素(GH)是调节鱼类生长发育的重要内分泌激素。鱼类生长的快慢与其体内GH水平密切相关,通过增加体内GH的含量可以促进鱼的生长^[1, 2]。基因工程技术的发展为体外大量生产重组鱼类GH提供了可能。近几年来,应用重组DNA技术已经克隆了多种鱼类GH cDNA,并重组到大肠杆菌中,在色氨酸启动子的控制下,获得了效率不同的表达^[3-5]。研究表明,将基因重组GH注射或投喂到鱼体内后,可以明显刺激鱼苗的生长^[6, 7]。因此,开展鱼类GH基因克隆和重组GH生产的研究,不仅对于鱼类GH结构与功能的基础研究,而且对于开发鱼类促生长剂均有重要意义和应用价值。

本文报道了我国主要淡水养殖鱼类鲢GH cDNA克隆、表达载体构建及在大肠杆菌中表达的研究结果。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

pBluescript KSII+质粒购自Stratagene公司,pRSET5b质粒载体由德国Wuerzburg大学生物中心J. Altsdmied博士惠赠,宿主菌*E. coli* DH5 α 、BL21(DE3)plys由作者保存。

1.2 工具酶、试剂盒、抗体及主要生化试剂

Oligo(dt) 12-18引物、逆转录酶、dNTP混合物、Taq DNA聚合酶、RNA抽提试剂盒、DNA分子量标准购自Life Technologies (GibcoBRL)公司;草鱼生长激素单克隆抗体由Chen等^[8]自制;ECL Western blot检测试剂盒购自Amersham公司。

1.3 引物合成

根据白鲢GH基因的一级结构^[9],设计了RT-PCR引物。引物SC51位于翻译起始位点前17个核苷酸处,其序列为:5'-GAA ATT GAA TTC TGT CTA CCC TGA GCG AAA GTG-3';引物SC31位于3'端poly A位点下游,其序列为:5'-ATC GAA ATT GGA TGC AAT AAA TAA T-3'。引物中都包含1个EcoRI切点。引物SC52位于GH成熟肽的起始核苷酸处,其序列为:5'-ATT CAT ATG TCA GAG AAC CAG CGG CTT TTC-3',其中引入一个NdeI酶切位点。引物由Life Technologies (Gibco)公司合成。

1.4 垂体收集、RNA分离及RT-PCR

垂体采自1kg左右的白鲢,垂体摘下后置-80℃保存。垂体总RNA的制备按照试剂盒说明书进行。mRNA的转录和cDNA的合成用Gibco的逆转录试剂盒进行。cDNA的PCR扩增采用pfu/Taq双酶方法进行^[10]。简言之,在50μL反应体系中,包括5μL 10×PCR缓冲液,200μmol·L⁻¹4种dNTP,2.5单位pfu/Taq DNA聚合酶混合物,20pmol SC51和SC31引物,5μL cDNA合成产物。PCR参数为94℃变性2min,1个周期,94℃30s;54℃1min,72℃2min,循环30个周期,最后在72℃延伸10min。用凝胶电泳和回收试剂盒回收特异性扩增片段。电泳用DNA分子量标准为GibcoBRL公司的1kb DNA标准品。

1.5 鲢GH cDNA的克隆及表达载体构建

按分子克隆常规方法进行DNA的酶切、连接和转化。首先将PCR扩增出的1.2kb的鲢GH cDNA片段用EcoRI酶切,然后插入经EcoRI酶切的pBSKSI+载体中,构成pBS-scGHcDNA质粒。经过测序证明插入片段确为scGH cDNA序列,且无突变后,再进行表达载体构建。以pBS-scGHcDNA质粒为模板,用SC52引物和SC31引物扩增出一条1kb的DNA片段,用NdeI和EcoRI进行双酶切,将所产生的1kb片段插入到经NdeI和EcoRI酶切的pRSET5b载体上,使scGH的成熟肽编码序列正好位于pRSET5b上的起始密码子的下面。表达载体的构建步骤见图1。

1.6 基因的诱导表达

原核表达载体 pRSET5b 的 T7 启动子和 T7 RNA 聚合酶系统是在 IPTG 诱导下控制基因表达的。将测序正确的阳性克隆转化 BL21(DE3) plys 细菌, 接种单个阳性菌落到 3mL LB 培养基中, 过夜培养后, 扩大至 50 mL, 继续培养至对数生长期。向培养物中添加 $0.4\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG, 继续培养几小时后, 收集菌液待用。

1.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS- PAGE)

按常规方法进行。分离胶浓度为 16%, 浓缩胶浓度为 5%。取 200 μL 菌液离心后收集菌体, 加 50 μL 水和 50 μL $2\times$ 上样缓冲液, 重悬菌体后于 100°C 煮 5min, 取 20 μL 样品进行还原性 SDS - PAGE。电泳完毕后用考马斯亮蓝 R - 250 染色。用低分子量标准蛋白质 (Pharmacia 公司) 作为蛋白分子量标准。包括 6 种蛋白质, 即: (1) 乳清蛋白, 14 kD; (2) 胰蛋白酶抑制剂, 20 kD; (3) 碳酸酐酶, 30kD; (4) 卵白蛋白, 43 kD; (5) 白蛋白, 67 kD; (6) 磷酸化酶 b, 94 kD。

1.8 Western 印迹分析

诱导表达的产物经 SDS- PAGE 后, 将蛋白质转移到硝酸纤维素膜(NC 膜) 上。电转移完成后, 先将 NC 膜用封闭缓冲液 ($10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris - CL, pH 7.9, $150\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.5% Tween - 20, 3% BSA) 封闭 30min, 经过 3 次清洗后, 将膜与草鱼生长激素单克隆抗体 (第一抗体) 4°C 下反应过夜。经过 3 次清洗后, 将 NC 膜放在辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠 Ig G 溶液(第二抗体) 中室温反应 1h。第一抗体和第二抗体均用封闭缓冲液配制, 稀释度为万分之一。又经过 3 次清洗后, 将膜放在 ECL 显色溶液中反应 1min, 迅速将 NC 膜包裹在保鲜膜中, 放在 X 光片曝光盒中, 压上 X 光片, 室温下曝光 5~ 20 s, 然后用全自动显影机冲洗 X 光片。

2 结果

2.1 鲢 GH cDNA 的克隆

以鲢垂体 mRNA 反转录产物为模板, 用鲢 GH 基因特异引物 SC51 和 SC31 扩增出一条 1.2kb 左右的 DNA 片段(图 2)。这个片段相当于鲢 GH 基因的完整转录子(mRNA) 的大小, 包括 17bp 的 5' 不翻译序列, 633bp 的翻译序列和 510bp 的 3' 端不翻译区。将这个 cDNA 重组到 pBSKII+ 载体后构建了

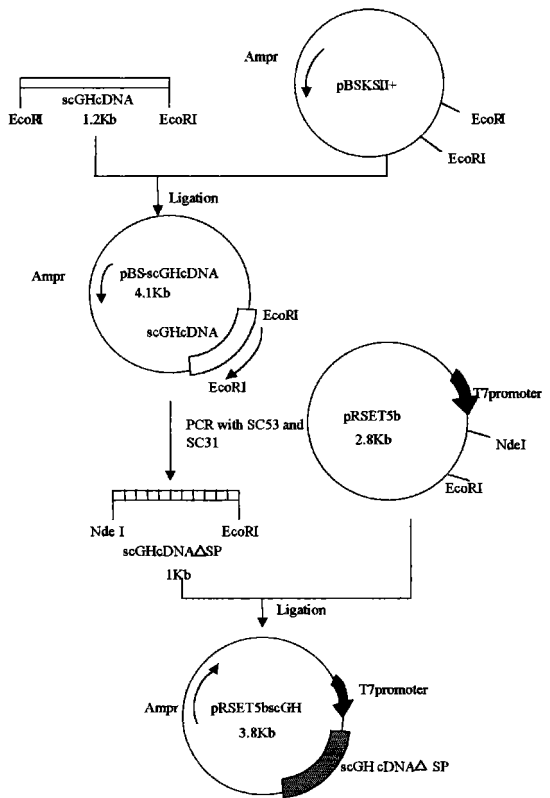


图 1 鲢 GH cDNA 表达载体构建图

Fig. 1 Construction of scGH cDNA expression vector scGHcDNA Δ SP: 去掉信号肽序列的 scGHcDNA 片段 (scGHcDNA fragment without signal peptide sequence)

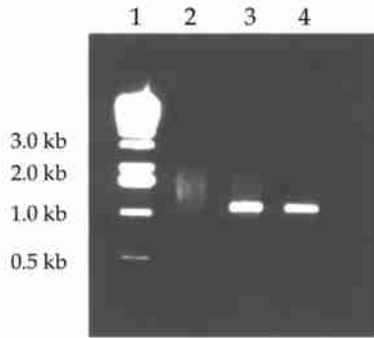


图 2 鲢 GH cDNA RT- PCR 扩增

Fig. 2 RT- PCR of GH cDNA from silver carp pituitaries 1. DNA marker; 2. negative control without total RNA; 3, 4: scGH cDNA

pBS-scGHcDNA 质粒。序列分析表明,该 cDNA 序列与以前报道的鲢 GH 基因中的编码序列完全相同^[9]。

2.2 鲢 GH cDNA 原核表达载体的构建

以 pBSscGHcDNA 质粒为模板,用引物 SC52 和 SC31 扩增出一条约 1.1 kb 的 DNA 带,经过 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切后,将这个 DNA 片段与同样经 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切的 pRSET5b 质粒载体连接,构建成鲢 GH cDNA 原核表达载体 pRSET5b-scGH(图 3)。该 GH 基因与 T7 终止密码子之间有 9 个碱基的距离。用连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,挑取若干转化子培养后,小量提取质粒 DNA 并进行酶切鉴定以筛选阳性重组子。对阳性重组子进行测序,证明了插入片段的可靠性(结果未显示)。

2.3 鲢 GH cDNA 在大肠杆菌中的表达

将构建好的表达质粒 pRSET5b-scGH 转化大肠杆菌 BL21(DE3)plys;经 IPTG 诱导后,scGH 在 T7 启动子的作用下得到表达。SDS-PAGE 分析结果见图 4。与空载体质粒 pRSET5b 相比,重组的表达质粒 pRSET5b-scGH 在分子量大约 22 kD 处有明显的表达条带。用草鱼生长激素单克隆抗体进行的 Western 印迹结果进一步表明,在 22kD 处的蛋白条带与草鱼 GH 单克隆抗体发生特异结合反应(图 5),充分证明该蛋白带是表达的鲢 GH,而对照组则不与 GH 单抗发生反应。

3 讨论

PCR 技术是进行基因克隆的有效手段。这种方法具有快速、省时和省力的特点。不过,传统 PCR 中所用的 Taq DNA 聚合酶由于没有校正功能,所扩增出来的 DNA 片段难免有一定的碱基错配率,有些地方会发生突变,这对于克隆要表达的基因尤其重要。因为任何一个碱基的突变,特别是阅读框的移动,将会引起蛋白质合成的改变,导致蛋白活性的丧失。本文采用具有校正功能的 pfu DNA 聚合酶与 Taq DNA 聚合酶一起使用,有效地克服了碱基错配的问题。保证了所克隆出的基因的忠实性。序列分析表明克隆出的鲢 GH cDNA 无碱基突变现象,与已报道的鲢 GH 基因的编码序列完全相同。从而证明这种 pfu 酶加 Taq 酶的 PCR 方法的可靠性。这种方法在其它功能基因克隆中也具有重要应用价值。

对于大多数基因表达研究来说,大肠杆菌表达系统应该满足如下几点条件:(1) 在抑制状态下,基础表达量很低;(2) 诱导方法快速、简单;且可以达到高的水平;(3) 克隆位点多,DNA 操作简单。T7

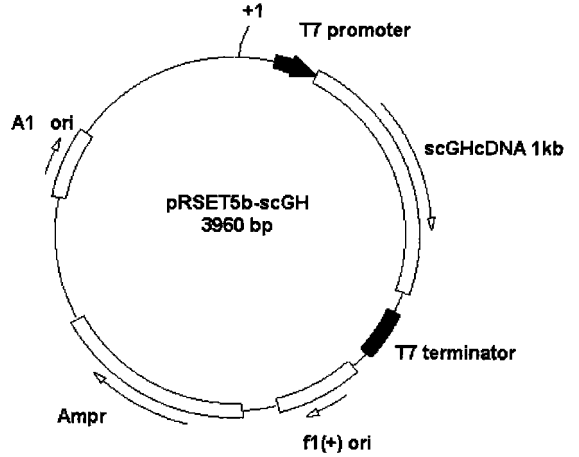


图 3 鲢 GH cDNA 表达载体质粒
Fig. 3 Expression plasmid of silver carp GH cDNA

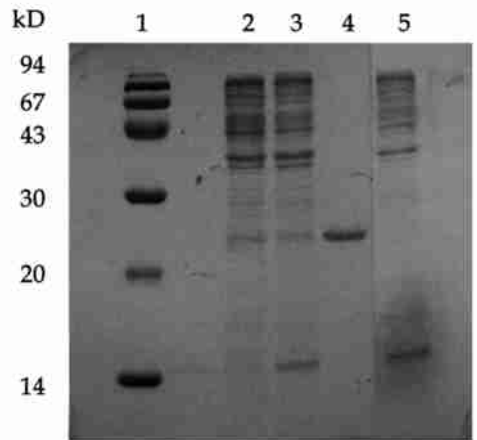


图 4 鲢 GH cDNA 在 BL21(DE3) plys 大肠杆菌中表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 4 PAGE of recombinant scGH in BL21(DE3) plys
1. 分子量标准; 2. IPTG 诱导后 3h; 3 IPTG 诱导后 12h;
4. 重组鲤 GH 作为阳性对照; 5. 未转化 BL21 细菌作为阴性对照
1. MW marker; 2 3h after IPTG induction; 3 2 h after IPTG induction;
4. recombinant cap GH as positive control;
5. nontransfected BL21 plys as negative control

启动子/T7 RNA 聚合酶系统表达载体能很好地满足上述 3 个要求, 在活性蛋白表达上具有重要应用价值^[11]。本研究应用这个表达系统成功地表达了鲢 GH。因为这个表达载体具有多个克隆位点, 可供外源基因片段插入, 其中还包含 1 个翻译起始密码子 ATG, 只需将外源基因编码序列紧接在这个 ATG 后面即可, 从而大大方便了基因克隆操作步骤。这个表达系统在其它激素表达上也可推广应用。

本文在 pRSET5b 载体上表达出的鲢 GH 蛋白分子量与我们以前分离纯化出的草鱼 GH^[12] 及其它学者获得的重组鲤 GH 分子量相同, 均为 22kD 左右; Western 印迹分析表明重组鲢 GH 与草鱼生长激素单克隆抗体具有强烈的免疫交叉反应, 充分证明了本文获得的重组鲢 GH 是具有活性的。鲢 GH 表达载体的构建及在微生物中的成功表达, 为研究鱼类 GH 的结构与功能及大量生产鱼类重组 GH 奠定了基础。

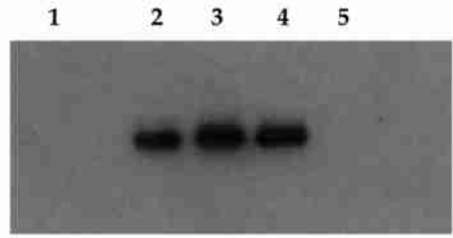


图 5 鲢 GH 表达产物的 Western 印迹

Fig. 5 Western blot of scGH expression in BL21(DE3) plys
1. 分子量标准; 2. IPTG 诱导后 3h; 3. IPTG 诱导后 12h;
4. 重组鲤 GH 作为阳性对照; 5. 未转化 BL21 细菌作为阴性对照
1. MW marker; 2. 3h after IPTG induction; 3. 12 h after IPTG induction;
4. recombinant cap GH as positive control;
5. nontransfected BL21 plys as negative control

参考文献:

- [1] Marchant T A, Peter R E. Seasonal variations in body growth rates and circulation levels of growth hormones in the goldfish, *Carassius auratus* [J]. J Exp Zool, 1986, 237- 239.
- [2] Chen S L. Progress and prospect of gene engineering of fish peptide hormone[J]. J Fish China, 1993, 17: 264- 270. [陈松林. 鱼类多肽激素基因工程研究进展及展望[J]. 水产学报, 1993, 17(3): 264- 270.]
- [3] Sekine S, Muzukami T, Nishi T, et al. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *E. Coli* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 4306- 4310.
- [4] Hew C L, Trinh K Y, Du S J, et al. Molecular cloning and expression of salmon pituitary hormones [J]. Fish Physiol Biochem, 1989, 7: 375- 380.
- [5] Fine M, Sakal E, Vashdi D, et al. Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: expression, purification and determination of biological activity *in vitro* and *in vivo* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1993, 89: 51- 61.
- [6] Agellon L B, Emery C J, Jones J M. Promotion of rapid growth of rainbow trout by a recombinant fish growth hormone [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1988, 45: 146- 151.
- [7] Mclean E, Donaldson H M, Souza L M. Growth acceleration of coho salmon following oral administration of recombinant bovine somatotropin [J]. A quac, 1990, 91: 197- 203.
- [8] Chen S L, Yang F, He L, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth hormone [J]. Asian Fisheries Science, 1996, 9: 183- 189.
- [9] Hong Y, Scharl M. Sequence of the growth hormone gene from the silver carp and evolution of GH genes in vertebrates [J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1174: 285- 288.
- [10] Chen S L, Hong Y H, Scharl M. Lack of ultraviolet-light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53 [J]. Gene, 2001, 264: 197- 203.
- [11] Schoepfer R. The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli* [J]. Gene, 1993, 124: 83- 85.
- [12] Chen S L, Deng W T, Liu X T, et al. Isolation and purification of growth hormone from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and preparation of antibody against the gcGH [J]. Acta Zoologica Sinica, 1995, 41: 282- 290. [陈松林, 邓文涛, 刘宪亭, 等. 草鱼垂体生长激素分离纯化及其抗体制备的研究[J]. 动物学报, 1995, 41(3): 282- 290.]