

羊生长激素染色体基因的 分离及结构分析

任兆钧 冯淇辉
(兽医系)

刘新垣
(中国科学院上海生物化学研究所)

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE OVINE GROWTH HORMONE GENE

Ren Zhaojun Fung Kifai

(Department of Veterinary Medicine)

Liu Xinyuan

(Institute of Shanghai Biochemistry, Academia Sinica)

关键词 生长激素基因; 克隆; 噬斑形成单位; 重组子; 限制内切酶分析; DNA顺序

Key words: GH gene; clone; pfu; recombinants; restriction enzyme analysis
DNA sequence

鼠、人、牛、猪的生长激素 (GH) 染色体基因国外已先后有报道。羊的生长激素染色体基因, 文献尚未见报道。我们在国内条件下, 分离到羊生长激素 (GH) 编码的染色体基因, 经 DNA 全顺序测定, 结构完整, 可用于肉、毛、乳高产新品种动物的基因工程培育研究。

材料和方法

羊睾丸组织取自活体绵羊。建立基因文库载体用噬菌体 EMBL—3, 宿主菌 E.coli K 802, Q 359, 制备体外包装蛋白用菌种 HBH 2688 和 HBH 2690, 高效价包装蛋白按任兆钧等的方法制备, 建库过程参照 Maniatis 的方法。基因文库经鉴定、扩增。筛选基因文库用 2 个探针: 1. 含羊 GHmRNA 前体 3' 端顺序的质粒片段 (中国科学院细胞生物学研究所郭礼和教授提供), 2. 人工合成的寡核苷酸片段, 22 碱基: G AGGAGGTTCTAAATTATCCAT (中国科学院生物化学研究所刘新垣教授合成)。放射性同位素 [α - 32 P] dATP, [α - 32 P] dCTP, [γ - 32 P] dATP, (3000Ci/mmol,

Amersham 公司), 探针标记根据不同需要用缺口法, DNA 合成法, 末端标记法。限制性内切酶分析、膜转移杂交, 放射自显影、阳性重组子的筛选及次级克隆等按常规。硝酸纤维素膜国产(上海医药工业研究院产品)。重组噬菌体 DNA 的大量制备按任钧等的方法。DNA 顺序测定按 Sanger 等的 M13 双脱氧末端终止法及郭礼和等的质粒双向法, 载体分别用 M13mp18 及 pWR13。测定结果用核酸处理软件系统经 IBM 计算机处理。质粒双向测序在郭礼和教授指导及叶增灿助理研究员协助下进行。

试验结果

从羊睾丸组织抽提的染色体大分子 DNA 分子量大于 50kb, 符合 DNA 典型紫外吸收光谱。制备的包装蛋白体外包装效率达 3.5×10^5 pfu/ μ g 载体 DNA。收获重组子 9.7×10^5 pfu, 相当于按理论计算要求的 10 个库的数量, 经原位杂交和酶切电泳鉴定羊染色体基因组顺序已按预期长度插入。扩增其中 1.1×10^5 pfu 为永久基因文库。以探针 1 对 2.3×10^5 pfu 重组子进行筛选, 得到 6 个阳性噬菌体克隆, 经限制性内切酶 (BamHI、EcoRI、HindIII、BglII、SalI、XhoI) 分析表明是相同基因克隆。阳性克隆的酶切图谱与牛 GH 相似, 该基因定位于插入片段的 EcoRI—SalI 切段。探针 2 顺序的设计参照文献报道的鼠、人、牛 GH 基因 5' 端转录起始点上游 120 bp 进化保守顺序, 与 6 个阳性克隆杂交结果 3 个克隆再为阳性, 提示后者可能含有 GH 基因家族的 5' 端顺序。进一步分析的一个阳性克隆的染色体插入片段长 12.7 kb, 用 HindIII、EcoRI、SalI、BamHI 所作的酶切图谱结合 Southern 杂交分析, 表明该基因定位于插入片段中部, 利用该基因内、外的 BamHI 切点将阳性片段次级克隆至质粒 pWR13 的相应切点, 得到 2 个可能含羊 GH 基因的克隆, 命名为质粒 pSG1 和 pSG2。从以上 12.7kb 片段分离 8 kb EcoRI—SalI 切段, 散弹法克隆入 M13mp18 噬菌体, 得到 60 个重组白斑, 用探针 1 筛选, 继之用 T 带扫描除去相同克隆, 余 13 个克隆进行顺序测定, 结果找到 GH 67 个氨基酸编码, 证实从基因库筛选得到的阳性克隆是羊 GH 基因的克隆。用 pSG1 及 pSG2 双链测序, 填补、验证 M13 测序结果, 得出羊 GH 基因全部顺序。从测序结果, 羊 GH 染色体基因全长 1800 bp 左右, 有 4 个内含子。信号肽在内的全部氨基酸编码完整, 分为 5 个外显子区。3' 端终止密码子紧接第 191 氨基酸后, 与牛 GH 不同的一个氨基酸密码子在第 4 外显子区。另外, 还含有上游调控区, cap 位点及 5', 3' 非编码的端侧顺序 (flanking sequence)。与人、牛、猪、鼠及人胎盘促乳激毒基因比较, 发现很大同源相似性, 进化保守程度很高。这个基因将进一步用于动物细胞内表达。