

人生长激素释放因子基因的合成和克隆

熊克勇 金如忠 胡康洪 丁达明

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

本文报道人生长激素释放因子 (Leu²⁷, Met⁴⁴)hGRF(1-44)基因的合成和克隆。选用大肠杆菌高效表达所偏爱的简并密码子, 用计算机辅助设计合成基因的顺序, 用固相亚磷酸酰胺法合成了 hGRF 的 6 个寡聚核苷酸片段, 长度分别为 39 至 51 个核苷酸, 总共 141 个碱基对。通过酶促连接反应构建完整的 hGRF 基因, 并直接克隆到 pUC-19 质粒中, 克隆的宿主菌为 *E. coli* JM83。通过抗性筛选、阳性标记筛选、限制酶分析和分子杂交确定阳性克隆株。用 M13 双脱氧末端终止法对克隆基因序列分析, 证实合成和克隆的 hGRF 基因序列完全正确。

关键词 人生长激素释放因子; DNA 合成; 基因克隆

人生长激素释放因子(Human Growth Hormone Releasing Factor, 简称 hGRF)是人体下丘脑中的一种具有生物活性的多肽激素, 能特异性地诱导垂体前叶生长激素的合成和分泌。1982年, Guillemin等^[1]和Rivier等^[2]首次从肢端肥大症患者的胰异位肿瘤中分离到 hGRF, 以后又从人的下丘脑中分离到了这种物质^[3]。实验表明, 两种不同来源的 hGRF 都具有相同的理化性质和一级结构, 它们都由 44 个氨基酸组成。

hGRF 用于临床治疗侏儒症已取得了明显的效果^[4], 并有可能用于诊断和治疗其他一系列因生长激素缺陷而引起的病症。由于 hGRF 的应用无严格的种属特异性, 所以它在畜牧业生产中也有十分重要的应用价值^[5]。但是, 由于天然的 hGRF 含量甚微, 分离纯化十分困难。国外首先用肽合成法制备了具有天然 hGRF 顺序和各种氨基酸修饰的活性肽, 用于动物和临床试验证实安全有效^[4,6]。但该法工艺复杂, 不易扩大生产。近年来, 国外相继开展了用基因工程方法制备

hGRF 及其类似物的研究^[6,7], 国内也有制备其他小分子多肽的报道^[8,9]。本文报道用基因工程方法制备 hGRF 的研究, 包括 hGRF 基因寡聚核苷酸片段的化学合成、基因的酶促连接和基因的克隆等。

实验材料

(一)质粒和菌株

pUC-19、pAT-153 等质粒为华美生物工程公司产品; 菌株 *E. coli* JM83 由中国科学院上海细胞生物学研究所郭礼和先生惠赠; *E. coli* TG-1 由中国科学院上海药物研究所杨胜利先生惠赠。

(二)DNA 化学合成试剂

固相亚磷酸酰胺法合成, 试剂和材料均由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

本文于 1989 年 7 月 8 日收到。

本课题由中国科学院资助。本工作得到中国科学院上海药物研究所杨胜利先生热情指导和支持, 并得到中国科学院上海生物化学研究所李载平先生帮助, 本所邓裕俊同志参加部分工作, 在此一并致谢。

(三) DNA合成仪

ABI380A型, 美国 Applied Biosystems 公司产品。

(四) 酶和其他试剂

T4多核苷酸激酶、T4DNA连接酶、DNA聚合酶 I (Klenow fragment) 和各种限制酶均购自华美生物工程公司; γ - 32 P-ATP 和 α - 32 P-dGTP (10mCi/ml, 3000Ci/m mol) 均为英国 Amersham 公司产品; 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal)、单脱氧核苷三磷酸 (dNTP)、双脱氧核苷三磷酸 (ddNTP) 和 M13 17 聚寡聚核苷酸引物 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') 均为 Bio-Rad 公司产品; 限制酶反应缓冲液, LB 培养基及其他缓冲液按文献 [10] 方法配制。

方法和结果**(一) 基因设计**

1. 以天然 hGRF 的氨基酸顺序为基础 [1], 对个别氨基酸作如下修饰: 在编码框架的 5' 端增设一个 Met, 用 Leu 取代 Met²⁷, 用 Met 取代 Leu⁴⁴。

2. 选用大肠杆菌高效表达所偏爱的简并密码子 [11], 在编码框架的 5' 端和 3' 端分别设置 BamH I 和 EcoR I 限制酶位点的粘性末端, 便于合成基因直接定向地克隆到载体质粒中, 也便于加入适当的接头片段后将结构基因组成多个串联式或融合蛋白的形式, 使该基因得到高效表达。

3. 用计算机检索初步确定的基因顺序, 找出基因中存在的限制酶位点和正、反向重复顺序, 在不违背前面要求的前提下, 改变基因中的个别密码, 消除不利于克隆的限制酶位点, 设置用于检测的限制酶位点。在最后确定的结构基因中设置了 Xho I 限制酶位点并排除了 6 个以上核苷酸组成的重复顺序。

4. 整个基因顺序确定以后, 根据化学合成的条件, 在产量和纯度达到要求的前提下, 尽量延长每个寡核苷酸片段, 并保证正负链每个酶促连接片段之间的互补区在 15 个核苷酸以上。最后, 我们将 hGRF 基因分成大小为 39 至 51 个核苷酸组成的 6 个片段, 分别进行化学合成。hGRF 设计基因的顺序和分段情况见图 1。

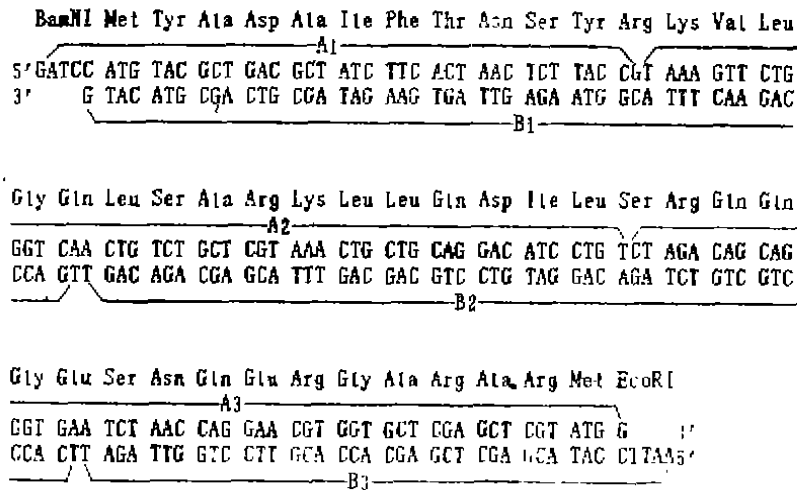


图 1 人生长激素释放因子设计基因及其对应的氨基酸顺序
Fig. 1 Designed sequence of the hGRF gene and its corresponding amino acids

(二)寡聚核苷酸片段的化学合成

6个寡聚核苷酸片段均采用固相亚磷酸酰胺法在ABI380A型DNA合成仪上合成。按设计的基因顺序,在含有3'端第一核苷酸的微孔玻璃(CPG)载体上逐个连接核苷酸至所需长度,产物用浓氨水从载体上切下,除去保护基,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后切下产物凝胶带,洗脱得到合成产物,经去盐、真空干燥,分别得到6个纯化的产物片段。纯化的每种寡聚核苷酸片段各取100pmol,分别进行5'端³²P标记,在含8mol/L尿素的10%聚丙烯酰胺凝胶上电泳,放射自显影,结果见图版I-A。根据合成片段自显影带以及自显影带与电泳指示剂(溴酚蓝BPB和二甲苯蓝Xc)之间的相对位置,鉴定合成片段的纯度和相对大小均符合要求。

(三)基因的构建

除基因两侧5'端的A1和B3片段以外,其余4个片段各取400pmol,分别加入1μl 10mmol/L ATP、4单位T4多核苷酸激酶、缓冲液和重蒸水至总体积20μl,在终浓度为50mmol/L Tris-HCl pH7.6, 10mmol/L MgCl₂, 10mmol/L 二巯基苏糖醇(DTT), 10mmol/L 亚精胺的缓冲体系中,37℃温育1h,使这些片段的5'端磷酸化。将4个5'端磷酸化的片段混合,加入未经磷酸化的A1和B3片段各400pmol,100℃5min灭活激酶,缓慢冷却至室温,再加入1μl 10mmol/L ATP, 10单位T4 DNA连接酶和连接酶缓冲液,在终浓度为50mmol/L Tris-HCl pH7.6, 10mmol/L MgCl₂, 10mmol/L DTT的缓冲体系中,4℃连接反应过夜。反应产物经8%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离,溴化乙锭(EB)染色,切下141bp处的产物凝胶带,洗脱hGRF基因,按文献[12]的方法纯化

hGRF合成基因。图版I-B为合成的hGRF基因的8%PAGE分离图。

(四)基因的克隆

pUC-19质粒经BamH I和EcoR I双酶消化,按文献[10, 13]的方法制备其BamH I-EcoR I大片段,与酶促连接的hGRF基因混合,在T4DNA连接酶反应体系(同前)中,4℃反应过夜,组建成含hGRF基因的重组质粒(图2),然后转化到*E. coli* JM83感受态细胞(按文献[10]方法制备)中,在含100μg/ml氨苄青霉素、40μg/ml X-gal和IPTG的LB平板上37℃培养过夜。挑取白色菌落培养在5ml LB培养液(含100μg/ml Amp)中,碱法快速抽提质粒,用BamH I和EcoR I双酶消化,8%PAGE,EB染色,紫外灯下可见重组质粒存在141bp带(图版I-C),用相同方法制备的pUC-19质粒不见此带。

(五)重组质粒分析

1. 限制酶分析:如前所述,在hGRF基因中设置有Xho I单限制酶位点,这是载体质粒pUC-19中所没有的。同时,由图2可知,载体pUC-19质粒中含Kpn I单限制酶位点,而在阳性重组质粒中这个位点应该消失。用Xho I和Kpn I分别酶解重组质粒和pUC-19,经0.8%琼脂糖凝胶电泳,EB染色后紫外下观察,结果证实重组质粒中存在hGRF基因中的Xho I单酶切位点(图版I-D)。

2. 分子杂交:用³²P-ATP末端标记的B1、B2和B3片段作探针,分别与不同阳性克隆株的粗纯质粒点杂交,杂交结果(图版I-E)证实先前的阳性选择是正确的。

3. DNA序列分析:碱法抽提阳性克隆株的质粒DNA, BamH I和EcoR I双酶消化,将其中的重组片段亚克隆到复

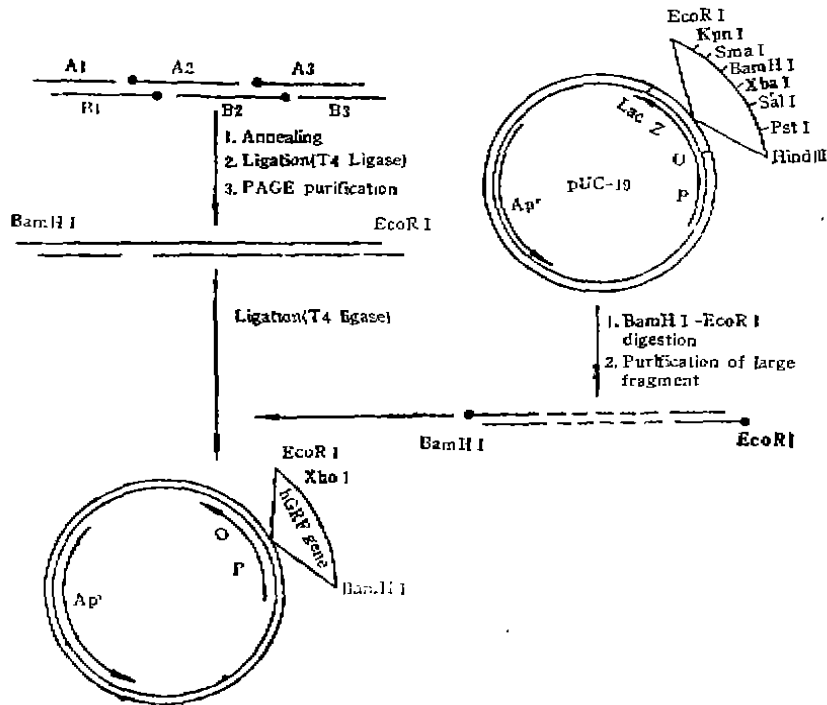


图 2 hGRF合成基因的构建和克隆示意图

Fig.2 Construction and cloning strategy of synthetic hGRF gene (—, 5'-phosphate)

制型M13mp 19 RF DNA中，转化到*E. coli* TG-1菌中，以重组的M13 mp 19单链DNA为模板，M13 17聚核苷酸片段为引物， α -³²P-dGTP为放射源，采用双脱氧末端终止法^[14]测定重组片段的序列。结果表明，克隆基因的核苷酸序列与设计的hGRF基因序列完全相符(图版I-F, G)，证明hGRF基因的合成和克隆是正确的。

讨 论

在hGRF基因的设计过程中，用计算机检索经初步确定的基因顺序，找出其中存在的限制酶位点，通过改变个别密码，排除了与克隆载体相同的酶切位点以及结构基因中6个以上核苷酸组成的正、反向

重复顺序，有利于合成基因的构建和克隆。在合成基因中还设置了原本不存在的Xho I酶切位点，有利于重组质粒的检测。除此之外，在基因分段时，尽量延长每个合成片段的长度，并使正负链相邻片段之间重叠互补区域在15个核苷酸以上，以保证酶促连接反应的正确性。基因设计时，将天然hGRF氨基酸顺序中的Met用Leu取代，Leu⁴⁴用Met取代，这样修饰是为了以后产物的分离，修饰后的表达产物活性不受影响^[15,16]。

合成基因的连接和克隆过去多采用分段连接和分段克隆的方法，虽然可靠性较高，但是实验步骤繁琐、费时。在hGRF基因的构建过程中，我们将6个合成的寡聚核苷酸片段同时混合，一次性酶促连接成完整的基因。同时，合成基因两侧5'端

羟基游离的片段未经磷酸化,避免了基因自身连接而形成多聚体。

在筛选、检测阳性重组质粒时,我们采用碱法快速抽提质粒DNA,经BamH I - EcoR I 双酶切后聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,观察克隆基因的存在。用这种方法一

次可同时检测10—20个克隆菌株,不仅能检测到克隆的目的基因的存在,还能鉴定目的基因的大小,是一种比较直观,简便而又准确的方法。用这种方法,使我们在一天之内便得到了满意的检测结果。在转化的克隆菌中,检测到80%为阳性克隆。

参 考 文 献

- [1] Guillemin, R. et al., *Science*, 218, 585—587, 1982.
- [2] Rivier, J. et al., *Nature*, 300, 276—278, 1982.
- [3] Bohlen, P. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114, 930—936, 1983.
- [4] Thorner, M. et al., *Hormone Res.*, 24, 91—98, 1986.
- [5] Felix, A. et al., *US Patent*, Vol. 4, pp. 649, 131, 1987.
- [6] Coude, F. et al., *Trends in Biotech.*, 4(2), 83—87, 1984.
- [7] Engels, J. et al., *Protein Engineering*, 3(1), 195—199, 1987.
- [8] 曾义祥等: *生物工程学报*, 4(4), 292—297, 1988.
- [9] 钱苏雯等: *中国科学 B 辑*, 4, 387—394, 1988.
- [10] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- [11] Grosjean, H. and Fier, W., *Gene*, 18, 199—209, 1982.
- [12] Smith, H. et al., *Method in Enzymol.*, Academic Press, Vol. 65, pp. 373—374, 1980.
- [13] Wieslander, L., *Anal. Biochem.*, 98, 305—309, 1979.
- [14] Hindley, J. and Staden, R., *DNA Sequencing, Laboratory Techniques in Biochem. and Molecular Biology*, Vol. 10, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 121—221, 1983.
- [15] Clove, G. et al., *J. Mol. Biol.*, 191, 553—561, 1986.
- [16] Kempe, T. et al., *Bio/Technology*, 4, 565—568, 1986.

SYNTHESIS AND CLONING OF THE HUMAN GROWTH HORMONE RELEASING FACTOR GENE

Xiong Keyong Jin Ruzhong Hu Kanghong Ding Daming
(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

The human growth hormone releasing factor(hGRF) gene has been synthesized and cloned. Computer programming was applied to the design of optimized segments for the synthesis of the hGRF gene using preferred codons for expression in *E. coli*. Six segments with length ranging from 39 to 51 nucleotides were synthesized by solid-phase phosphoramidite method. The entire gene consisting of 141 base pairs was constructed by enzymatic ligation of all synthetic segments and then cloned into plasmid vector pUC-19. The positive colonies were confirmed by screening of ampicillin resistance, inactive β -galactosidase, analysis by restriction enzymes and dot-blot hybridization. The DNA sequence of the cloned synthetic hGRF gene was proved correct by M13

dideoxynucleotide chain termination method.

Key words

hGRF; DNA synthesis; gene cloning

图版说明

Explanation of plate I

A. 8mol/L尿素-10%PAGE分析纯化的寡聚核苷酸片段

Analysis of the purified DNA fragments (5'- γ ³²P labeled) by 8mol/L urea-10% PAGE. 1. A2 (50-mer) 2. B2(51-mer) 3. B1(51-mer) 4. B3(39-mer) 5. A1(40-mer) 6. A3(51-mer)

B. hGRF合成基因的PAGE纯化

Purification of constructed hGRF gene by 8% PAGE. 1. Molecular weight standard; pAT-153 EcoRI-HinfI fragments 2. Constructed hGRF gene band

C. BamHI和EcoRI酶切鉴定重组质粒

Examination of recombinant plasmids digested by BamHI and EcoRI.

1. Control plasmid pUC-19 2-4,6-8. Recombinant plasmids No. 10, 9, 8, 7, 6, 3 respectively

5. MW standard; pAT-153 EcoRI-HinfI fragments

D. 重组质粒的酶切电泳分析

0.8% agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid digested by restriction enzymes.

1,3. pUC-19 digested by KpnI and XhoI respectively. 2,4. Recombinant plasmid No. 6 digested by KpnI and XhoI respectively

E. 重组质粒与 γ -³²P-ATP标记探针点杂交的放射自显影图

Autoradiography of dot-blot hybridization of the recombinant plasmids with the probes labeled by γ -³²P-ATP. 1,2,3,5. recombinant plasmids No. 6,7,9,10 respectively. 4. Control plasmid pUC-19 I, II, III. probes. ³²P-B1, ³²P-B2, ³²P-B3 respectively

F,G. 克隆的hGRF基因序列分析的放射自显影图

Autoradiography of DNA sequencing of the cloned hGRF gene, using the fragment 5'-GTAAAA-CGACGGCCAGT-3' as primer.

Electrophoresis for 2 h(F) and 3.5 h(G)