

# 黄河裸裂尻生长激素(GH)基因的 PCR 扩增和克隆

谢保胜 李耀鹏 姚军卓 陈兴花  
(青海大学 生物科学系 西宁 810016)

中图分类号: S813.3

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2012)01-0038-03

关键词: 黄河裸裂尻; 生长激素(GH)基因; 克隆; 基因表达

摘要: 为了克隆黄河裸裂尻生长激素(GH)基因并获得表达产物, 试验采用异硫氰酸胍法提取黄河裸裂尻脑组织总 RNA, 以分离的 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 扩增获得 GH 基因 cDNA, 将 cDNA 插入质粒 pQE30 中, 并在大肠杆菌 RB791 中表达, 经异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导后, SDS-PAGE 电泳检测蛋白的表达情况。结果表明: 扩增后黄河裸裂尻 GH 基因长度为 508 bp, 黄河裸裂尻 GH 基因与青海湖裸鲤的同源性很高, 电泳显示出 1 条新的分子质量约为 14.4 ku 的特异性条带。

## PCR amplification and cloning of the growth hormone(GH) gene from *Schizopygopsis pylzovi*

XIE Bao-sheng, LI Yao-peng, YAO Jun-zhuo, CHEN Xing-hua  
(Department of Biological Science, Qinghai University, Xining 810016, China)

**Key words:** *Schizopygopsis pylzovi*; growth hormone gene; cloning; gene expression

**Abstract:** To clone the growth hormone gene from *Schizopygopsis pylzovi* and obtain the expression product of the gene, the total RNA was extracted from brain in the fish by the guanidine thiocyanate method. The growth hormone cDNA was amplified by RT-PCR method using the isolated total RNA as a template. The GH cDNA fragment was inserted into plasmid pQE30 and then expressed in *E. coli* RB791. The protein expression was analyzed by SDS-PAGE after IPTG induction. The results showed that the GH cDNA fragment from *Schizopygopsis pylzovi* was 508 bp in length. The GH gene from *Schizopygopsis pylzovi* was highly homologous with that of *Gymnocypris przewalskii* according to the sequence comparison. The results of electrophoresis showed that a new protein band was found with a molecular weight of about 14.4 ku.

生长激素(growth hormone, GH)是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种单一肽链的蛋白激素, 是一种具有广泛生理功能的生长调节素。鱼类生长激素(fish growth hormone, fGH)是由鱼类脑垂体合成和分泌的一种分子质量约为 22 ku 的蛋白多肽, 对鱼类的生长和发育具有重要作用。试验采用 RT-PCR 方法克隆黄河裸裂尻(*Schizopygopsis pylzovi*) GH 基因 cDNA, 以进一步获得黄河裸裂尻 GH 基因序列, 并将其连接到载体上, 构建黄河裸裂尻 GH 基因表达质粒并在大肠杆菌中表达, 获得融合蛋白, 现报道如下。

### 1 材料

#### 1.1 试验动物

收稿日期: 2011-05-13; 修回日期: 2011-06-14

基金项目: 2009 年国家大学生创新性实验计划项目(091074310)

作者简介: 谢保胜(1965-), 男, 教授, 硕士, xbsjhch@yahoo.com.cn.

黄河裸裂尻, 由青海省渔业环境监测站提供, 在青海大学分子生物学实验室水池短暂养殖。

#### 1.2 试剂

RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、pMD19-T 载体、pQE30、JM109 感受态细胞、*E. coli* RB791, 均由 TaKaRa 公司生产。利用 Primer Premier 5.0 软件根据同属鱼类同源性比对结果设计引物, 其他试剂购自索莱宝公司。

#### 2 方法

##### 2.1 黄河裸裂尻总 RNA 提取

按照谢保胜等<sup>[1]</sup>介绍的方法提取黄河裸裂尻总 RNA, 电泳分析 RNA 质量, 利用分光光度计测定其含量, 储存于液氮中。

##### 2.2 引物设计

利用鱼类 GH 基因序列保守的特点, 通过同源性比对设计引物: GH1 5'-TGAGGAAAGCCTGTTGC-3', GH2 5'-TGACTAGCAATACATTAGCG-3'。

### 2.3 RT-PCR 扩增

将总 RNA 溶解于焦碳酸二乙酯( DEPC) 中, RNA 终浓度为  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。A 液: 取 RNA 样  $1 \mu\text{L}$ , 加  $3.75 \mu\text{L}$  RNA-free 水, Oligo dT-Adaptor Primer  $0.5 \mu\text{L}$ ,  $10 \times$  PCR Buffer  $1 \mu\text{L}$ , dNTP 混合物( Mixture)  $1 \mu\text{L}$ , RNase 抑制剂( Inhibitor)  $0.25 \mu\text{L}$ , AMV Reverse Transcriptase  $0.5 \mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $2 \mu\text{L}$ , 总体积为  $10 \mu\text{L}$ 。指弹混匀, 反应条件:  $30^\circ\text{C}$  预变性  $10 \text{ min}$ ;  $50^\circ\text{C}$  变性  $20 \text{ min}$ ,  $99^\circ\text{C}$  退火  $5 \text{ min}$ ,  $5^\circ\text{C}$  延伸  $5 \text{ min}$ 。B 液: 取灭菌水  $28.75 \mu\text{L}$ ,  $5 \times$  PCR Buffer  $10 \mu\text{L}$ , Ex Taq HS  $0.25 \mu\text{L}$ , 引物 GH1  $0.5 \mu\text{L}$ , GH2  $0.5 \mu\text{L}$ 。将 A 液与 B 液混合, 总体积为  $50 \mu\text{L}$ , 扩增条件:  $94^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ;  $94^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $50^\circ\text{C}$  退火  $30 \text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $40 \text{ s}$ , 共 35 个循环。取 PCR 产物  $5 \mu\text{L}$  进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 2.4 黄河裸裂尻 GH 基因的克隆<sup>[2-3]</sup>

取 PCR 产物  $0.5 \mu\text{L}$ , pMD19-T 载体  $1 \mu\text{L}$ , 连接液  $1 \mu\text{L}$ , 再加去离子水  $2.5 \mu\text{L}$ , 总反应液为  $5 \mu\text{L}$ 。加入 Solution I  $5 \mu\text{L}$ ,  $16^\circ\text{C}$  反应  $30 \text{ min}$ ; 向总反应液(  $10 \mu\text{L}$ ) 中加入 JM109 感受态细胞  $100 \mu\text{L}$ 。在冰内放置  $30 \text{ min}$ ,  $42^\circ\text{C}$  加热  $45 \text{ s}$  后再置冰内  $1 \text{ min}$ ; 加入  $890 \mu\text{L}$  SOC 培养基,  $37^\circ\text{C}$  振荡培养  $60 \text{ min}$ ; 在含有 X-Gal、异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷( IPTG)、氨苄西林( Amp) 的培养基上培养, 计数蓝白斑。用无菌牙签随机蘸取 15 个菌落制成细菌悬浮液, 扩增反应的总体积为  $50 \mu\text{L}$ : 分别取上述细菌悬浮液  $2 \mu\text{L}$ , 加入  $10 \times$  PCR Buffer  $5 \mu\text{L}$ , dNTP Mixture  $4 \mu\text{L}$ ,  $\text{M}_{13}$  Forward  $2 \mu\text{L}$ , AV-M  $2 \mu\text{L}$ , Ex Taq HS  $0.25 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $34.75 \mu\text{L}$ , 置于 15 个 Eppendorf 管中。扩增参数:  $94^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ;  $94^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{ min}$ ,  $55^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{ min}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{ min}$ , 共 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸  $5 \text{ min}$ 。扩增后分别取样  $5 \mu\text{L}$ , 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测后, 选取可行条带的原扩增液进行测序。

## 3 结果与分析

### 3.1 黄河裸裂尻总 RNA 电泳检测结果(见图 1)

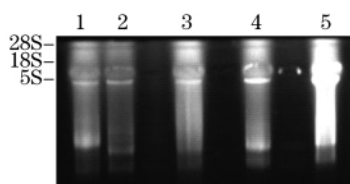


图 1 RNA 凝胶电泳检测结果

### 3.2 分光光度计测定 OD 值结果(见表 1)

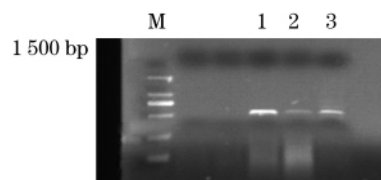
由表 1 可知: 经检测, 试验所提取的总 RNA 的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值在  $1.8 \sim 2.2$  范围内(通常纯 RNA 的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值为  $1.8 \sim 2.0$ )。

### 3.3 黄河裸裂尻 GH 基因 cDNA 的 RT-PCR 扩增

结果(见图 2、图 3)

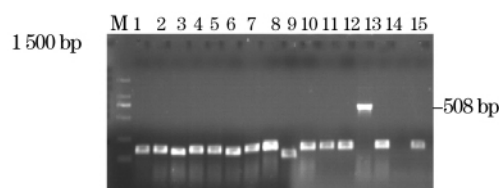
表 1 分光光度计测定 OD 值结果

| 项目   | RNA 浓度/<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | $\text{OD}_{230}$ | $\text{OD}_{260}$ | $\text{OD}_{280}$ | $\text{OD}_{320}$ | $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ |
|------|---------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|
| 样品 1 | 72.3                                              | 1.898             | 1.808             | 0.848             | 0.045             | 2.13                              |
| 样品 2 | 83.2                                              | 2.236             | 2.080             | 0.957             | 0.023             | 2.17                              |
| 样品 3 | 58.0                                              | 1.802             | 1.450             | 0.695             | 0.186             | 2.09                              |
| 样品 4 | 74.9                                              | 2.001             | 1.872             | 0.955             | 0.207             | 1.96                              |

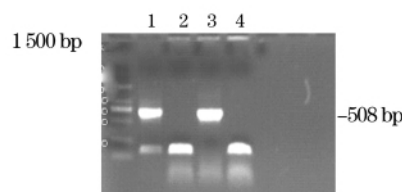


M. DL-1 500 Marker; 1. 腮组织; 2. 脑组织。

图 2 RT-PCR 扩增产物电泳结果



A. M.DL-1 500 Marker; 1~15. 菌落样品; 13. 与预期目的片段大小一致。



B. M.DL-1 500 Marker; 1~4. 菌落样品; 1, 3. 与预期目的片段大小一致。

图 3 黄河裸裂尻 GH 基因转化后 PCR 结果

### 3.4 序列分析

测序结果显示: 黄河裸裂尻 GH 基因 cDNA 长度为 508 bp, 黄河裸裂尻 GH 基因编码的核苷酸序列与鲤鱼、鲫鱼、斑马鱼、鳊鱼、虹鳟鱼等相应的核苷酸序列同源性较高, 见图 4。

### 3.5 氨基酸序列比对(结果见图 5)

### 3.6 同源性比较和系统分析

利用 Mega4.1 构件邻接(N-J)系统进化树<sup>[4-5]</sup>, 选择 5 种在进化上具有代表性的进行比较, 采用默认参数进行构建, 同时应用自举检验估计系统发育树各节点的自引导值(重复次数为 1 000 次)。黄河裸裂尻与鲤鱼、鲫鱼、虹鳟鱼、斑马鱼等淡水鲤科鱼类的同源性较高, 见图 6。

### 3.7 黄河裸裂尻 GH 基因在大肠杆菌中的表达

采用 BamH I 和 Hind III 对黄河裸裂尻 GH 基因

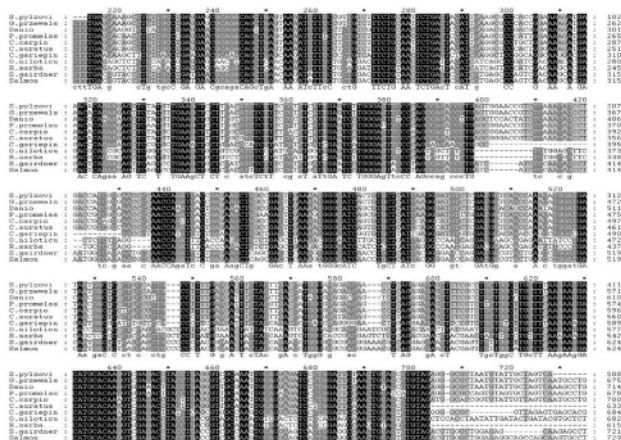


图4 黄河裸裂尻与其他鱼类的GH基因核苷酸序列同源性比较



图5 黄河裸裂尻分别与青海湖裸鲤、鲤鱼和斑马鱼的氨基酸序列比对结果

cDNA 与 pQE30 载体进行双酶切,用 T4 DNA 连接酶连接后,获得重组质粒。再将重组质粒转入 *E. coli* RB791 中,在 LB 培养基中于 37 °C 培养 12 ~ 15 h。蘸取上述大肠杆菌菌落,置于含 2 mL 的 2 × LB / Amp 培养基的试管中,在 37 °C 条件下振荡 4 ~ 5 h,加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L。诱导 2 h 后收集菌液进行 SDS - PAGE 蛋白质电泳检测,见图 7。

由图 7 可知: 4 号菌株经 IPTG 诱导后,出现特异蛋白表达条带,蛋白分子质量约为 14.4 ku。

#### 4 讨论

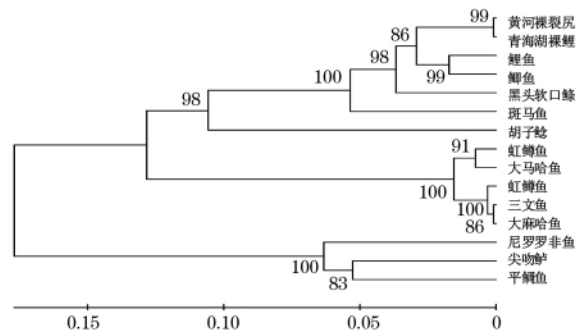


图6 黄河裸裂尻与其他鱼类的GH系统进化树

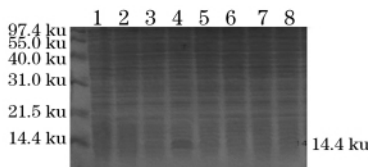


图7 黄河裸裂尻GH基因SDS - PAGE电泳结果

采用 RT - PCR 法和基因克隆研究黄河裸裂尻 GH 基因的 cDNA 序列,其长度为 508 bp。与其他鱼类进行核苷酸序列和氨基酸序列比对发现: 黄河裸裂尻与青海湖裸鲤、鲤鱼、斑马鱼的亲缘关系较近,氨基酸序列相似性分别为 100%、98%、94%,尽管黄河裸裂尻与青海湖裸鲤所编码的氨基酸相似性为 100%,但所测序列中编码氨基酸的基因序列有 1 个核苷酸位点不同,可能是不同种群间歧异性的具体表现。研究仅扩增出黄河裸裂尻 GH 基因的 1 个长度为 508 bp 的片段,并没有得到其全长序列,导致黄河裸裂尻与其他鱼种的同源性比对产生了一定差异。

研究采用生物信息学方法对黄河裸裂尻 GH 基因序列、编码蛋白的理化性质等进行分析,为今后研究 GH 蛋白的分离、纯化及对该蛋白生物活性分析提供可靠的技术保障,也对青海省开展的高原特有鱼种的人工驯化和养殖计划提供有力的技术保障。

#### 参考文献:

- [1] 谢保胜, 藤原滋树. 斑马鱼总 RNA 提取和纯化 [J]. 生物学杂志 2007 24(6): 67 - 69.
- [2] 谢保胜, 段瑞君, 藤原滋树. 斑马鱼促性腺激素释放激素基因的克隆与表达 [J]. 青海医学院学报 2009 30(1): 9 - 13.
- [3] 谢保胜, 段瑞君. 斑马鱼促性腺激素释放激素及相关肽基因的克隆与序列分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(3): 263 - 267.
- [4] 刘滨, 臧晓南, 刘顺梅, 等. 大菱鲆生长激素基因 cDNA 的克隆、序列分析及分子系统研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(5): 726 - 732.
- [5] 江世贵, 张殿昌. 鲢生长激素基因 cDNA 的分子克隆和序列分析 [J]. 中国水产科学 2003 10(2): 10 - 14.

(015)