

用加端 PCR 技术改造 hIGF-1 cDNA

罗进贤 吉坤美 张添元 王红革
(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 用 DNA 合成仪合成了分别带有 Pst I 位点和 Sal I 位点及终止密码子的 2 个用于扩增 hIGF-1 cDNA 的 PCR 引物. 利用合成的引物, 700 bp 长的 hIGF-1 cDNA 模板和 Taq 聚合酶进行 PCR 扩增. 扩增产物经电泳鉴定后克隆进 M13 mp18 载体, 进行核苷酸序列分析. 结果显示: PCR 产物含已发表的 hIGF-1 成熟蛋白的编码序列和 5' 端的 Pst I 位点及 3' 端的 Sal I 位点及终止密码 TAG. 用加端 PCR 技术成功地扩增和改造了 hIGF-1 的编码序列.

关键词 PCR 技术, hIGF cDNA, 改造

分类号 Q78

聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 是一种体外基因扩增方法, 是 80 年代中期建立起来的一种分子生物学新技术, 广泛应用于基因结构, 表达和调控研究, 基因工程以及临床医学等领域.

人胰岛素样生长因子 (Human Insulin-like Growth Factor, hIGF) 是从血清中分离的既具有促进细胞生长和分化又具有胰岛素样作用的多肽包括 hIGF-1 及 hIGF-2. 临床上, hIGF-1 可用于治疗侏儒症、糖尿病、肌肉萎缩性侧肢硬化、wasting 综合症和伤口愈合等^[1]. 另外, hIGF-1 与哺乳动物的 IGF-1 具有同源性, 可促进动物生长和提高瘦肉率, 在畜牧业上有应用前景. 考虑到 hIGF-1 的临床应用并测试本实验室构建的枯草杆菌表达和分泌系统^[2], 我们开展 hIGF-1 基因在枯草杆菌中的克隆和表达研究. 本文报道利用加端 PCR 技术扩增和改造 hIGF-1 cDNA 及 PCR 扩增产物的克隆和序列分析.

1 材料与方法

1.1 菌种与 DNA

大肠杆菌 C600 和 JM101 为本实验室保存的菌株. M13 mp18 DNA 为 GIBCO-BRL 公司产品, 含 hIGF-1 cDNA 的 700bp 片段为美国华盛顿大学惠赠.

1.2 培养基

大肠杆菌的培养和转化采用 LB 培养基, 固体选择培养基加 1.5% 琼脂和 100 mg/L

氨苄青霉素, 重组噬菌体的筛选另加适量 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (X-gal) 和异丙基硫代半乳糖 (IPTG)。

1.3 酶和主要试剂

限制性内切核酸酶, T4 DNA 连接酶, 4 种脱氧核苷酸 (dNTPs) 为 GIBCO-BRL 产品, X-gal, IPTG 及低熔点琼脂糖为 Sigma 公司产品, 高温 DNA 聚合酶为复旦大学产品, PCR 引物由中国科学院细胞生物学研究所合成。

1.4 DNA 的分离, 酶解及转化^[3]

1.5 PCR 扩增

按文献 [3] 的方法, 但略加修改, 反应体系为: 模板 DNA (0.1 g/L), 1 μ L; 5' 端引物 (20 m mol/L), 2 μ L; 3' 端引物 (20 m mol/L), 2 μ L; dNTPs (10 m mol/L), 5 μ L; 5 \times PCR 反应缓冲液 (50 m mol/L KCl; 50 m mol/L Tris-HCl, pH 8.3; 7.5 m mol/L MgCl₂; 0.1% 白明胶) 10 μ L; 重蒸水 29 μ L。

起始反应先在 95 $^{\circ}$ C 变性 7 min, 加 FD 耐热聚合酶 1 μ L (1g/L), 50 $^{\circ}$ C, 2 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 完成第一循环。以后每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 共 25 个循环, 最后一个循环延伸 10 min。

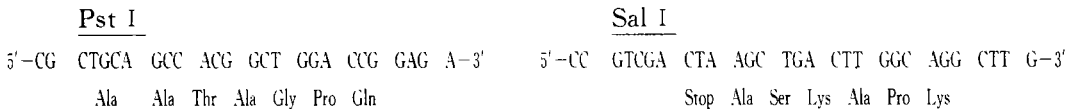
1.6 扩增产物的克隆和序列分析

按 GIBCO-BRL 公司的《M13 克隆和双脱氧序列分析实验手册》进行。

2 实验结果

2.1 PCR 引物的设计与 hIGF-1 cDNA 的 PCR 扩增

hIGF-1 cDNA 是一个长开放读码区, 除 5' 端和 3' 端的非编码区外, 还编码 hIGF-1 前体包括成熟 hIGF-1 的 70 个氨基酸, N 端的信号肽和 C 端的氨基酸序列, 而且在编码 hIGF-1 成熟蛋白的 210 bp 序列的两端无起始密码和终止密码, 也没有合适的限制酶切位点^[4,5]。为了在枯草杆菌中表达 hIGF-1, 应用加端 PCR (add-on PCR) 方法对 hIGF-1 cDNA 进行改造, 以期获得含 hIGF-1 成熟蛋白 70 个氨基酸的编码序列。3' 端带终止密码, 5' 端及 3' 端分别带 Pst I 及 Sal I 酶切位点的 DNA 片段, 为此设计合成如下引物:



其中 5' 端引物的 5' 端带 Pst I 位点, 3' 端引物的 3' 端加上终止密码 TAG 及 Sal I 位点, 在两个引物的 5' 端分别加入 CG 和 CC 作为“夹子” (clamp) 以利于 PCR 产物的内切酶酶解。

以含 hIGF-1 cDNA 的 700 bp DNA 片段作模板, 按材料与方法中介绍的方法进行 PCR 扩增, 共 25 个循环, 扩增产物的电泳结果如图 1, 从图中可见, 除了一条约 230 bp 的主带 (PCR 产物) 外, 还有两条 (微量) 大于 230 bp 的副带, 这是由于引物的 GC 含量过高引起的。



图 1 PCR 产物的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products

- (1) $\phi \times 174$ RF DNA 的 Hae III 酶切片段
- (2) PCR 产物



图 2 重组 M13mp18-IGF 的酶切电泳图

Fig. 1 Eleatropheresis of M13mp18 - IGF re-
striction fragments

- (1) $\phi \times 174$ RF DNA 的 Hae III 酶切片段
- (2) M13mp18-IGF 的 Pst I 和 Sal I 的酶切片段

2.2 PCR 产物的克隆和酶切分析

用低熔点琼脂糖分离回收 230 bp 左右的主带，用 Pst I，Sal I 双酶切后克隆至 M13mp18 载体上获得重组载体 M13mp18-IGF。M13mp18-IGF 经 Pst I，Sal I 双酶切后走 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳，结果如图 2。电泳结果显示，M13mp18-IGF 经 Pst I，Sal I 双酶切后获得一带约 230bp 的带，表明已将 PCR 扩增的产物克隆至 M13mp18 载体上。

2.3 PCR 产物的核苷酸序列分析

采用 Sanger 的双脱氧末端终止法，选用 GIBCO-BRL 公司的测序试剂盒（DNA 复制的酶是 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段）进行测序，发现由于待测片段 5' 端的 GC 含量特别高，易形成链内二级结构，造成电泳过程中条带的不规律迁移和压缩现象，为此，改用 UB 公司试剂盒的测序酶（sequenase）代替 Klenow 片段，并用 dITP 代替 dGTP，共测定了 4 个克隆，其中 1 号及 2 号克隆含错配碱基即第 83 位的 T 变为 A，使原编码第 28 位的酪氨酸密码 TAT 变为门冬氨酸的密码 AAT（图 3）。3 号及 4 号克隆的序列分析结果如图 3，从图中可读出编码 hIGF-1 成熟蛋白的核苷酸序列及 5' 端的 Pst I 位点和 3' 端的 Sal I 位点和终止密码。

以上结果表明我们已成功地应用加端 PCR 技术对 hIGF-1 cDNA 进行了扩增和改造，扩增产物除含有编码 hIGF-1 成熟蛋白 210 bp 序列外，在其 5' 端和 3' 端分别加上 Pst I，Sal I 位点及终止密码 TAG，有利于下一步的克隆和表达，由于该 cDNA 将被引入枯草杆菌的分泌载体，该载体有芽孢杆菌的信号肽序列，故在改造的 cDNA 中不再加起始密码。

Pst I

5'-CT GCA GCC ACG GCT GGA CCG GAG ACG CTC TGC GGG GCT
 GAG CTG GTG GAT GTC CTT CAG TTC GTG TGT GGA GAC
 AGG GGC TTT TAT TTC AAC AAG CCC ACA GGG TAT GGC
 TCC AGC AGT CGG AGG GCG CCT CAG ACA GGC ATC GTG
 GAT GAG TGC TGC TTC CGG AGC TGT GAT CTA AGG AGG
 CTG GAG ATG TAT TGC GCA CCC CTC AAG CCT GCC AAG
 TCA GCT TAG TCGAC-3'

Sal I

图 3 PCR 扩增产物的全序列

Fig. 3 The complete nucleotide sequence of PCR amplified product

3 讨 论

本研究采用加端 PCR 技术改造 hIGF-1 cDNA 片段, 获得适于进行克隆和表达的 hIGF1 基因的编码区。

本实验中 PCR 扩增产物的特异性较差, 除了约 230bp 的主带外还有两条副带, 这与合成引物的碱基组成有关。由于编码 hIGF-1 成熟蛋白的 210bp 序列中 GC 含量达到 70%, 其 5' 端甚至达到 77% 而 Pst I, Sal I 识别位点的 GC 比例也很高, 因而合成的两个引物的 GC 含量都在 65% 以上, 在 PCR 扩增过程中容易出现非特异性的带^[6]。

模板的 GC 含量也影响 PCR 产物的序列分析工作。hIGF-1 成熟蛋白的编码序列不仅 GC 含量高而且含聚 G 多, 容易形成局部链内二级结构, 影响聚合酶在这些区域的复制能力和模板的充分变性, 导致电泳过程中的不规则迁移使邻近的 DNA 带压缩。在我们的实验中曾出现 1~40 位碱基电泳带的不规则迁移, 在 33~36 位之间连续 4 个碱基压缩, 102~104 三个 G 只显示二条带等。我们改用 dITP 代替 dGTP, 利用其与一般碱基配对能力差的性质, 防止链内二级结构的产生, 收到较好的效果。

参 考 文 献

- 1 张树庸. 国内外医药生物技术研究的一些概况. 生物工程进展增刊—基因工程产品开发前景研讨会综述报告专集, 1992, 104~117
- 2 李文清. 分泌载体 pUS186 的构建及地衣杆菌 α -淀粉酶基因在枯草杆菌中的表达. 遗传学报, 1994, 21: 330
- 3 Sambrook J. Molecular Cloning. 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 4 Jansen M. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. Nature, 1989, 306: 609
- 5 Rotwin P. Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. PNAS, USA, 1986, 83: 77
- 6 陈诗书. 有关聚合酶链反应的若干问题. 生物工程进展, 1991, 11: 32

Amplification of hIGF-1 Coding Sequence by PCR Technique

Luo Jinxian Ji Kunmei Zhang Tianyuan Wong Hongge*

Abstract Two primers containing the Pst I site and Sal I site and stop codon respectively were synthesized and used to amplify a 232 bp DNA sequence coding for mature hIGF-1 protein with the 700 bp hIGF-1 cDNA fragment as template by Taq polymerase. The amplified DNA fragment was cloned into M13mp18 vector and sequenced by Sanger's dideoxy chain termination method. The sequencing data show that the nucleotide sequence of the cloned fragment is the same as hIGF-1 coding sequence published and that we have successfully remoulded the hIGF-1 protein coding region with Pst I site at 5' end and Sal I site and stop codon at 3' end using the add-on PCR technique.

Keywords PCR technique, hIGF cDNA, amplification

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275