

# 人前胰岛素原双链cDNA克隆的分离和鉴定

宋 后 燕

(上海第一医学院生物化学教研组, 上海)

Lydia Villa-komaroff

(美国马萨诸塞大学医学中心分子遗传学和微生物学教研组)

我们从人胰岛肿瘤组织 cDNA 基因库中分离到一个编码人前胰岛素原的双链 cDNA 克隆。限制性内切酶片段分析和DNA顺序分析均证明这是一个编码人前胰岛素原的 cDNA 克隆。该克隆中前胰岛素原编码顺序与 $\beta$ -内酰胺酶基因方向相同。

**关键词:** 人胰岛肿瘤组织cDNA基因库; 人前胰岛素原cDNA克隆

人前胰岛素原双链 cDNA 克隆用途甚广, 例如欲利用细菌或酵母等宿主细胞, 以基因工程方法生产人胰岛素首先必需具备这种克隆。人前胰岛素原 cDNA 克隆还可用于研究染色体胰岛素基因的结构和功能, 例如探索胰岛素基因及其邻近结构的变化与糖尿病、动脉粥样硬化症以及高脂血症的关系, 探索这些疾病的遗传规律<sup>[1-5]</sup>。我们利用这种克隆分离和研究与胰岛素基因类似的, 但又不完全相同的基因, 即所谓类胰岛素基因(Insulin-like genes)

我们取数个患者的胰岛肿瘤组织为材料, 制备了cDNA基因库, 并用人胰岛素B-肽链编码顺序和大鼠胰岛素IIA-肽链编码顺序作为两个探针, 筛选此基因库, 分离到一个人前胰岛素原双链cDNA克隆。该克隆的结构和顺序由限制性内切酶片段分析和DNA顺序分析证明。

Ullrich A.和Rutter W.J.<sup>[6,7]</sup>曾分离到人前胰岛素原cDNA克隆, 但均属专利所有, 他人无法享用。我们在基因库制备、克隆的分离和鉴定等方面均进行了改

进, 故在三个月内完成了从基因库制备到克隆的分离、鉴定全过程。

## 材料和方法

### (一) 材料

限制性内切酶等酶制剂买自Boehringer-Mannheim, New England Biolabs以及Bethesda Research Laboratories, Inc, 应用了这些公司提供的条件。反向转录酶买自Life Sciences, Inc.,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dNTP,  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP买自Amersham。硝酸纤维素滤膜买自Schleicher and Schuell或Millipore公司。

RNA的分离和双链cDNA的制备: 按照Chirgwin J.M.的方法<sup>[8]</sup>, 从人胰岛肿瘤组织中分离RNA。即冷冻组织在充满液氮的研钵中磨成粉状, 转入5M硫氰酸胍、5% $\beta$ -巯基乙醇和50mM Tris-HCl pH7.5溶液中制成匀浆, 经氯化铯梯度离

本文于1984年10月24日收到。

心分离RNA<sup>[9]</sup>,再用Oligo [dT]纤维素分离PolyA-RNA<sup>[10]</sup>。以此PolyA-RNA为模板,仿照 Wickens M.P.方法合成双链cDNA<sup>[11]</sup>,但作了以下修改:模板RNA溶液中加30mM 甲基氢氧化汞<sup>[12]</sup>,25℃保温5min后再加反向转录反应物,37℃作用4h,煮沸3min,离心以沉淀蛋白质,上清液用2倍浓度双链cDNA合成缓冲液等体积稀释,然后加大量DNA聚合酶I,15℃保温12h以促进双链cDNA的合成。合成各步产物的分子量均用碱性变性凝胶电泳进行鉴定。

## (二) 重组质粒的构建

pBR322经Pst I水解,在脱氧核苷酸末端转移酶(TdT)催化下,在3'-OH末端加上大约15个(dG)同聚物<sup>[13]</sup>;用TdT催化在双链cDNA的3'-OH末端加上大约15个(dc)同聚物,混合同聚物化的pBR322和双链cDNA,退火后,转化大肠杆菌HB101[*hsm*<sup>-</sup>,*hrs*<sup>-</sup>,*recA*<sup>-</sup>,*gal*<sup>-</sup>,*pro*<sup>-</sup>,*str*<sup>R</sup>]<sup>[14,15]</sup>。

## (三) 探针的制备

pH I-1质粒用Pst I水解,低熔点琼脂糖凝胶电泳分离各片段,并用N-[16-烷基-三甲基-溴]季铵盐从琼脂糖凝胶中提取克隆片段<sup>[16]</sup>,以 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dNTP通过切口翻译标记克隆片段<sup>[17]</sup>。pH I-1克隆片段编码人胰岛素引导肽和B-肽链的大部分。

pNR-1质粒的克隆片段用EcoR I和BamHI摘取,用同样方法分离、提取和标记克隆片段。该克隆片段编码大鼠胰岛素II的A-肽链。

各探针的比放射性强度约为10<sup>8</sup>cpm/ $\mu$ g。

## (四) 菌落原位杂交

菌落生长在硝酸纤维素滤膜上,各滤膜用复印法<sup>[18]</sup>制备三张复制品,这些复

制滤膜放在含四环素的LB平板上,25℃培养16h左右,其中两张滤膜按Grunstein M.方法<sup>[19]</sup>分别与上述两探针杂交,第三张滤膜保存于4℃冰箱,待日后选取阳性菌落,每张滤膜杂交液含0.25 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm探针DNA,5 $\times$ SET,10 $\times$ Denhardt's,0.6%焦磷酸钠,0.1%SDS以及载体DNA。65℃杂交过夜后,在同样温度用0.1—1 $\times$ SSC,0.1%SDS洗涤2h,然后暴露于X-光胶片1至3h。

## (五) 亚克隆的建造和DNA顺序分析

1. 人胰岛素原编码顺序的亚克隆的制备,——65 $\mu$ g pHS-1DNA(我们分离到的人前胰岛素原双链cDNA克隆命名为pHS-1)。用20单位Pvu I作用16h,经酚、氯仿抽提,乙醇沉淀,溶解于52 $\mu$ l TE(10mM Tris-HCl,1mM EDTA-Na<sub>2</sub> pH8.0),然后用10单位Bal31<sup>[20]</sup>,在20mM Tris-HCl,12mM CaCl<sub>2</sub>,1mM EDTA-Na<sub>2</sub>和600mM NaCl pH8.0,总体积为100 $\mu$ l的反应体系中保温于25℃水浴,每隔10min取出20 $\mu$ l反应物立即进行酚、氯仿抽提,乙醇沉淀,分别溶于20 $\mu$ l TE,从每份DNA溶液吸取5 $\mu$ l,用Pvu II水解,4%聚丙烯酰胺凝胶电泳测定DNA片段的大小。电泳结果看到,Bal31作用20min后,Pvu II切下的克隆片段约为250—300bp,与人胰岛素原编码顺序大小相仿。故把余下的Bal31作用20min的反应物用Pvu II水解,酚、氯仿抽提,乙醇沉淀,溶解于TE缓冲液,以鸟枪法与载体M13mp9克隆<sup>[21]</sup>,即250ng经Pvu I、Bal31和Pvu II作用的pHS-1 DNA片段加25ng的经Sma I线性化的M13 mp9以及2.5单位T<sub>4</sub>-DNA连接酶,总体积为10 $\mu$ l,在15℃进行连接反应24h,然后转化大肠杆菌JM101[ $\Delta$ lacpro, thi, strA, endA, sbcB15, hspR<sub>4</sub>, supE, F' tra D36, proAB, lac I, Z $\Delta$  M15]<sup>[21]</sup>。

## 2. 含有C-肽链编码顺序的亚克隆的制备

pHS-1 DNA 经 Pst I 水解, 2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离各片段, 用 N-[16-烷基-三甲基-溴]季铵盐从凝胶中抽提 48 bp 片段, 重组到 M13mp8 的 Pst I 位点, 然后转化大肠杆菌 JM101。

各噬斑用上述探针筛选<sup>[22]</sup>, 选取阳性噬斑作 DNA 顺序分析。各亚克隆 DNA 顺序分析采用 Dideoxy 末端终止法<sup>[23]</sup>。

## 结果和讨论

### (一) cDNA 制备 和人前胰岛素原基因的筛选

用人胰岛肿瘤组织 Poly A-RNA 为模板合成双链 cDNA, 单链 cDNA 产率为模板 RNA 的 5%, 双链 cDNA 的产率为单链的 50%。用 0.1 μg (dc) 同聚物化的 ds-cDNA, 与 2 μg (dG) 同聚物化的 pBR322 退火, 转化大肠杆菌 HB101, 得到约 8000 个转化菌落。

转化菌落用菌落原位杂交法进行筛选。为了筛选一个既有羧基末端, 又有氨基末端的前胰岛素原编码基因, 即争取分离一个完整的前胰岛素原 cDNA 克隆, 我们用了两个探针。pHI-1 克隆片段用以筛选含有氨基末端的编码顺序; pHI-1 克隆是从另一个早先制备的人胰岛肿瘤 cDNA 基因库中分离到的, 其克隆片段编码人前胰岛素原的引导链到 B-肽链的第 17 个氨基酸 [A. Ganzalez 未发表资料]。pNR-1 克隆片段用以筛选含有羧基末端的编码顺序; pNR-1 克隆由我们自己制备, 从含有大白鼠染色体胰岛素 II 基因的重组噬菌体用 EcoR I 和 Bam H I 摘取 A-肽链编码顺序, 重组到 pBR322 的 EcoR I 和 Bam H I 位点之间<sup>[24]</sup>。大鼠染色体胰岛素 II A-肽链

编码顺序与人胰岛素 A-肽链编码顺序有 90% 以上的相似性。用这两个探针筛选我们的双链 cDNA 基因库, 得到大量阳性菌落, 有与两个探针杂交的, 也有只与其中一个探针杂交的。能与两个探针杂交的菌落, 很可能具有完整的前胰岛素原编码基因。图 1 显示了一个有代表性的杂交滤膜, 其中菌落 pHS-1 与两个探针均杂交。



图 1 一个有代表性的菌落原位杂交滤膜。可见 pHS-1 菌落与 pHI-1 克隆片段杂交后的感光斑点

Fig. 1 A representative filter from colony situ hybridization with radiolabeled pHI-1 insert. The colony pHS-1 is shown.

pHS-1 菌落经纯化分离, 用于制备大量 DNA, 供限制性内切酶片段分析和亚克隆制备。

pHS-1 DNA 经 Hinf I 水解, 琼脂糖凝胶电泳分离各片段, 最大片段约为 2100 bp, 由于 Pst I 位点在 pBR322 的 Hinf I 酶切的 最大片段 (1630bp) 之中, 在基因库制备时, cDNA 重组于载体 pBR322 的 Pst I 位点, 而且人前胰岛素原编码顺序中没有 Hinf I 切点, 所以 pHS-1 克隆片段约为 470bp。此凝胶各 DNA 片段用 Southern 墨

迹转移法转移到硝酸纤维素滤膜，再与上述探针杂交，只有 pHS-1/Hinf I 最大片段显示阳性杂交带〔图版 I-A-C〕。这个结果表明在 pHS-1 质粒中含有胰岛素编码顺序。

人前胰岛素原编码顺序只有一个 Pvu II 切点，位于终止密码前第 18 个核苷酸<sup>[6,7]</sup>，在 pBR322 中也只有一个 Pvu I 切点，位于 2067，我们利用这两个切点测定 pHS-1 克隆片段的重组方向。如果克隆片段的

重组方向与  $\beta$ -内酰胺酶编码基因的阅读方向相反，pHS-1/Pvu II 的小片段应含有克隆片段的大部分顺序，能与上述探针杂交，其长度应为 1940bp；大片段则只含克隆片段的小部分，不足以与探针杂交，其长度应为 2890bp。如果克隆片段的重组方向与  $\beta$ -内酰胺酶基因的阅读方向相同，pHS-1/Pvu II 的大片段应含有克隆片段的大部分顺序，能与探针杂交，其长度应为 3220bp 左右；小片段则只含克隆片段的小

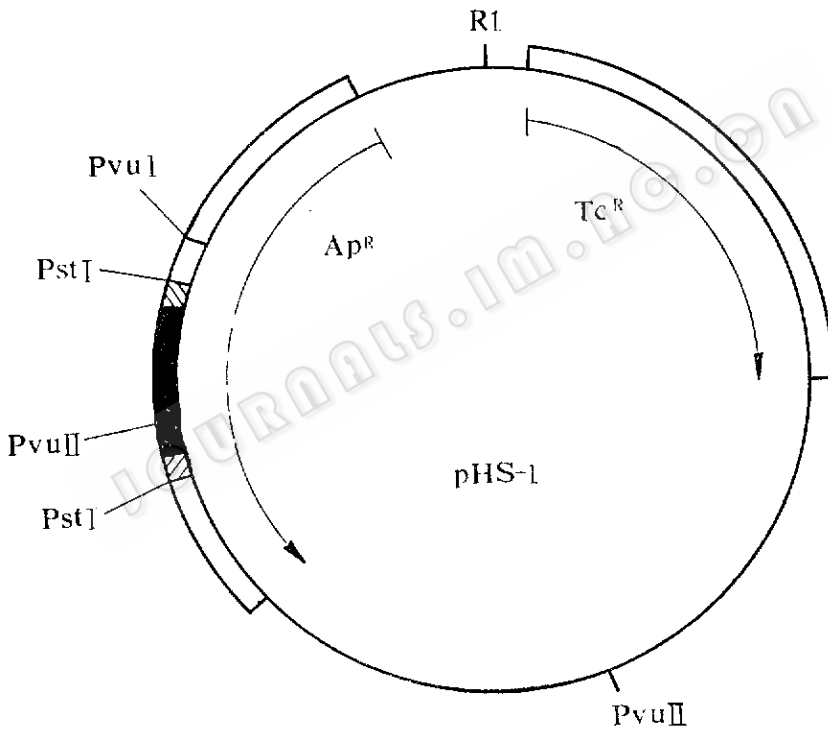


图 2 pHS-1 的结构

Fig. 2 Structure of pHS-1

图中也显示了一些在 pBR322 中只有一个切点的限制性内切酶切点，以表明亚克隆制备的方案  
Some of the unique restriction endonuclease sites in pBR322 are shown

□ 四环素抗性基因编码区和氨苄青霉素抗性基因编码区

■ 前胰岛素原编码区

▨ (dc):(dG)同聚物区

→ 转录方向

The open areas indicate the regions encoding tetracycline resistance ( $Tc^R$ ) and ampicillin resistance ( $Ap^R$ ). The arrows indicate the directions of transcription. The Solid region indicates the insulin coding region. The hatched lines indicate the d(G)-d(C) tails.

部分顺序，不能与探针杂交，其长度约为1610bp。我们用Pvu II水解pHS-1 DNA，得到3220bp和1610bp两个片段，只有3220片段与上述两探针杂交。这个结果表明，在pHS-1质粒中含有胰岛素基因的编码顺序，其重组方向与 $\beta$ -内酰胺酶的编码基因方向相同，因此，pHS-1质粒有可能表达出一个融合蛋白。这个结构有利于用pHS-1克隆，进行基因工程生产人胰岛素。

为了进一步证明pHS-1克隆含有完整的前胰岛素原编码基因，我们利用Pst I水解pHS-1 DNA，用 $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP和多聚核苷酸激酶在5'-末端标记水解产物，再用15%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离各片段，经放射自显影，如期见到28, 48, 85bp等人胰岛素cDNA的Pst I酶切片段，其中182bp在凝胶顶端，电泳时没有移动(图版I-D)。

限制性内切酶对pHS-1克隆的分析结果使我们相信这个克隆含有相当完整的人前胰岛素原双链cDNA基因。图2表示pHS-1的结构。

## (二) 亚克隆及其顺序分析

由于(dc):(dG)同聚物干扰Didexoxy DNA顺序分析，也干扰分子杂交，我们重组一个无(dc):(dG)同聚物接头，无引导肽编码顺序的亚克隆。我们采用了M13 mp8, mp9作载体，以便直接用末端终止法测定克隆片段的顺序；同时又可摘出克隆片段，重组到与M13mp8, mp9有相同限制性内切酶位点的质粒载体PUC8, PUC9, 大量制备重组质粒和克隆片段，用作探索类胰岛素基因的探针。

pHS-1用Pvu I水解，达线性化后；我们先滴定Ba131对线性化的pHS-1的水解活性，然后在控制条件下(见方法部分)使Ba131从pHS-1分子的3'和5'端同时各切除150bp，从而删去(dc):(dG)同聚物接头

和引导肽编码顺序。由此所得产物再用Pvu II水解，得到胰岛素原编码顺序，再用鸟枪法重组到M13 mp9的Sma I位点，然后转化大肠杆菌HB101。各噬斑用上述探针筛选，用EcoR I和BamHI水解阳性噬斑的复制型DNA<sup>[26]</sup>，选择克隆片段为250—270bp的噬斑作为DNA顺序分析的对象。其中IN-12mp9的克隆片段起始于人前胰岛素原基因5'-端第50个核苷酸，可以读出整个B-肽链编码顺序和C-肽链编码顺序的一小部分(图版I-E-F)难以读到A-肽链编码区。为此，我们用EcoRI和BamHI摘出IN-12mp9中的克隆片段，重组到M13mp8的EcoRI和BamHI之间，再进行顺序分析。IN-12mp8克隆片段的顺序起始于人前胰岛素原A-肽链Pvu II切点，读得Pvu II切点上游的全部A-肽链编码顺序，以及部分C-肽链编码顺序(图版I-E-F)。为了确切分析C-肽链编码区的顺序，我们又制备了pHS-1/Pst I 48bp的亚克隆，INC-mp8的顺序分析结果清楚地显示了人胰岛素C-肽链编码区中Pst I-Pst I的顺序。各亚克隆顺序分析结果列于图3。这些顺序分析结果进一步证明了pHS-1是一个相当完整的人前胰岛素原双链cDNA克隆。

我们正在利用pHS-1和由此构造的各亚克隆探索与胰岛素基因类似的，但又不完全相同的基因，我们已经从人和动物的各种组织中检测到多种这样的顺序<sup>[26]</sup>。pHS-1顺序又正好在 $\beta$ -内酰胺酶编码基因的框架之中[pHS-1克隆的全结构顺序将另文发表]，如若与高效启动子等顺序重组可用于基因工程生产人胰岛素<sup>[27]</sup>。如果将pHS-1的克隆片段重组到合适的载体上，移入动物细胞，也可研究胰岛素基因表达的调控。探索糖尿病发病机理和治疗方法。



图 3 人前胰岛素原cDNA的顺序

Fig. 3 The sequence of human insulin cDNA

IN-12顺序用大写字母表示,人前胰岛素原mRNA的其余部分顺序由文献[1, 2, 7, 27]查得,箭头表示顺序分析方向。

The sequence present in IN-12 are shown in large letters.

The rest of the sequence of the insulin mRNA is from the literature [1, 2, 7, 27]

▣ 引导链编码区

▤ B-肽链编码区

▥ C-肽链编码区

▦ A-肽链编码区

The arrows under the sequence indicate the sequencing strategy. The boxes above the sequence show the regions coding for the A, B and C peptides of insulin.

## 参 考 文 献

- [1] Ullrich, A. et al. : *Science*, 209 : 612—615, 1980.
- [2] Bell, G.I., et al. : *Nature*, 284 : 26—32, 1980.
- [3] Botstein, D. et al. : *Am. J. Hum. Genet.* 32 : 314—331, 1980.
- [4] Rotwein, P., et al. : *Science* 213 : 1117—1120, 1981.
- [5] Owerback, D. et al. : *Diabetes*, 31 : 275—277, 1982.
- [6] Ullrich, A. et al. : *Science*, 208 : 57—59, 1980.
- [7] Rutter, W. J. : *Nature*, 282 : 525—527, 1979.

- [8] Chirgwin, J. M. et al. : *Biochemistry*, 18 : 5294—5298, 1979.
- [9] Glisin, V., et al. : *Biochemistry*, 13 : 2633—2637, 1974.
- [10] Aviv, H. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69 : 1408—1412, 1972.
- [11] Wickens, M.P et al. : *J. Biol. Chem.*, 253 : 2483—2495, 1978.
- [12] Payver, F. et al. : *J. Biol. Chem.*, 254 : 7636—7642, 1979.
- [13] Villa-Komaroff, L., et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75 : 3727—3731, 1978.
- [14] Boyer, H.W. et al. : *J. Molec. Biol.*, 41 : 457—472, 1969.
- [15] Kurnit, D.M. et al. : *Cytogenet. Cell Genet.*, 34 : 193—203, 1982.
- [16] Langridge, J. et al. : *Analytical Biochem*, 103 : 264—271, 1980.
- [17] Rigby, P.W.J. : *J. Mol. Biol.* 113 : 237—254, 1977.
- [18] Messelson M. et al. : *Gene*, 10 : 63—67, 1980.
- [19] Grunstein, M. et al : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72 : 3961—3965, 1975.
- [20] Gray, H.B. et al. : *Nucleic Acids Res.*, 2 : 1459—1492, 1975.
- [21] Messing, J. : in *Methods in Enzymology* 101, ed. Wu, R. et al. NY 1983, pp 20—78.
- [22] Benton, W.D. et al. : *Science*, 196 : 180—182, 1977.
- [23] Sanger, F. et al. : *J. Mol. Biol.*, 143 : 161—178, 1980.
- [24] Lomedico, P. et al. : *Cell*, 18 : 545—558, 1979.
- [25] Bimboim, H.C. et al. : *Nucleic Acids Research* 7 : 1531—1523, 1979.
- [26] Gonzalez, A., submitted for publication.
- [27] Villa-Komaroff, L. et al : *Gene*, 21 : 95—104, 1983.
- [28] Southern, E.M. et al. : *J.Mol.Biol.*, 98 : 503—818, 1975.

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DOUBLE-STRANDED cDNA CLONE ENCO- DING HUMAN PREPROINSULIN

Song Houyan

(Department of Biochemistry Shanghai First Medical School, Shanghai)

Lydia Villa-Komaroff

(Department of Molecular Genetics and Microbiology University of  
Massachusetts Medical School, U.S.A.)

We have isolated a ds-cDNA clone encoding human preproinsulin from a human insulinoma cDNA library and verified the identity of the clone by restriction fragment analysis. The preproinsulin sequence is in the same orientation as the  $\beta$ -lactamase gene. To facilitate future studies, we constructed subclones in which most of the sequences encoding the leader sequence and the oligo d(G):d(C) tails used for the initial cloning are deleted. The sequence of the subclones was determined by the enzymatic sequencing procedure.

### Key words

Human insulinoma ds-cDNA library; Human preproinsulin ds-cDNA clone

## 图 版 说 明

A-C: pHS-1 DNA的限制性内切酶分析

A: 溴化乙锭染色的凝胶所显示的区带

- |                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| 1. pHS-1/EcoR I         | 2. pHS-1/Hinf I  |
| 3. pHS-1/Pvu I          | 4. pBR322/EcoR I |
| 5. pBR322/Pvu I         | 6. pBR322/Pvu I  |
| 7. $\lambda$ DNA/Hind I |                  |

B: Southern墨迹法转移DNA片段并与PNR-1克隆片段杂交后放射自显影

- |                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| 1. $\lambda$ DNA/Hind I | 2. pHS-1/EcoR I  |
| 3. pHS-1/Hinf I         | 4. pHS-1/Pvu I   |
| 5. pBR322/EcoR I        | 6. pBR322/Hinf I |
| 7. pBR322/Pvu I         |                  |

C: Southern墨迹法转移DNA片段并与pII<sup>-</sup>1克隆片段杂交后放射自显影图

- |                  |                  |
|------------------|------------------|
| 1. pHS-1/EcoR I  | 2. pHS-1/Hinf I  |
| 3. pHS-1/Pvu I   | 4. pBR322/EcoR I |
| 5. pBR322/Hinf I | 6. pBR322/Pvu I  |

D: pHS-1的Pst I 酶解片段聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

- |                 |                 |                |
|-----------------|-----------------|----------------|
| 1. pBR322/Hpa I | 2. pBR322/Rsa I | 3. pHS-1/Pst I |
|-----------------|-----------------|----------------|

E-F: 亚克隆DNA顺序分析凝胶的放射自显影图

E: IN-12mp8顺序分析

F: IN-12 mp9顺序分析



