

# 牛催乳素cDNA在大肠杆菌中的克隆与表达

舒幼敏 史瀛仙

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

从牛垂体中分离出总的mRNA, 经逆转录酶及大肠杆菌DNA聚合酶合成双链cDNA, 以pBR322作为克隆载体并用加G.C尾的方法进行重组, 把重组质粒导入大肠杆菌中, 建立了牛垂体mRNA的cDNA文库。用标记的人工合成的牛催乳素基因片段作为探针进行杂交, 并从库中筛选到几个阳性克隆, 经酶谱分析和DNA序列分析证明克隆中有一个含有全长的牛催乳素cDNA序列。将所获得的克隆进行“剪切”, 加上启动子, 然后导入大肠杆菌JM 103中并在IPTG诱导下表达。用SDS-PAGE检测, 证明有表达产物存在, 再通过酶标测定证明该表达产物具有与天然牛催乳素相似的免疫学活性。

**关键词** cDNA克隆; 牛催乳素; 基因表达

催乳素是由动物垂体前叶分泌的一种多肽类激素, 它与生长激素及其它一些激素组成了一个激素家族。对于动物的泌乳来说, 催乳素是必不可少的<sup>[1,2]</sup>。牛催乳素是一分子量为24000道尔顿的多肽。关于牛催乳素cDNA克隆和表达在国外已有报道<sup>[3]</sup>。

要研究牛催乳素在动物泌乳、医药研究及农业中的应用, 必须获得大量的催乳素, 这只有通过基因工程的方法来完成。牛催乳素在大肠杆菌中的表达, 对于研究其生物学功能、促进奶牛的产奶量, 以及由于牛催乳素能作用于其它动物从而对挽救由缺奶而濒临灭绝的珍稀动物具有重要意义。

## 材料和方法

### (一) 菌种、酶及重要试剂

*E. coli* PRL、*E. coli* JM 103 由上海生化所洪国蕃实验室提供; 限制酶、逆转录酶和末端转移酶均购自Boehringer Mannheim公司; 大肠杆菌聚合酶、连

接酶、RNase H及dG-pBR322 购自BRL公司; <sup>32</sup>P α-dATP购自ICN Radiochemicals。

### (二) mRNA的提取及cDNA文库的构建

垂体 mRNA 的提取采用氯化铯梯度离心的方法<sup>[4]</sup>。cDNA的合成及文库的构建完全按Gubler, V.等的方法进行<sup>[5]</sup>。

### (三) 菌落杂交、Southern杂交及酶谱分析

以人工合成的牛催乳素部分序列作为探针, 用大片段DNA聚合酶填平两端的方法, 使之标记上<sup>32</sup>P同位素。菌落杂交按Grunstein的方法进行<sup>[6]</sup>; Southern杂交参照Southern E.M的方法<sup>[7]</sup>; 质粒的酶解按产品说明书的条件进行。

### (四) 重组片段的序列分析

阳性克隆用Pst I酶切, 用低熔点琼脂糖电泳的方法分离出重组片段<sup>[8]</sup>。用

本文于1989年6月25日收到。

余慕贞教授对本工作给予很多帮助, 李建荣同志负责图片制作, 特此致谢。

Hae III 酶部分降解所得到的重组片段,再将其分别克隆到M13mp8、M13mp9载体中进行克隆。DNA序列分析参照 Sanger 的双脱氧末端终止法<sup>[9]</sup>。

### (五) 表达产物的电泳分析

把转化有牛催乳素表达质粒的JM103接种到含有氨苄青霉素(30 $\mu$ g/ml)和IPTG(0.2mol/L)的液体LB培养基中,37 $^{\circ}$ C培养过夜。通过离心收集菌体,再将菌体溶解于样品裂解液中(2% SDS、30%甘油、1mol/L巯基乙醇)。样品经100 $^{\circ}$ C加热5min后进行15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[10]</sup>,电泳后凝胶用考马氏亮蓝染色。

### (六) 表达产物的免疫学测定

100ml 过夜培养菌液经离心收集菌体,溶解于pH7.0的磷酸缓冲液中,用超声波法破碎细胞,12000r/min离心5min去沉

淀,上清用饱和硫酸铵沉淀,12000r/min离心30min,沉淀经透析、冷冻干燥即可用于酶标测定。

## 结果和讨论

### (一) 牛催乳素阳性克隆的获得与分析

通过菌落杂交从cDNA文库中获得一阳性克隆, Southern 杂交亦为阳性。用不同的限制酶作酶谱分析(图版 I -B),其整个插入片段的长度为1050个碱基对,经序列测定其碱基序列与国外所发表的序列相同(图版 I -1, 图 1)。

### (二) 中间质粒pUL-1的构建

构建过程参见图 2。首先用 DNA 合成仪合成一段牛催乳素 cDNA 的序列,它对应于牛催乳素的第一个氨基酸到第一个

```

TGCTTGGCTGAGGAGCCATAGGACGAGAGCTTCCTGGTGAAGTGTGTTTCITGAAATCATCACCACC
ATGGACAGCA  AAGETTCTGT  GCAGAAAGGG  TCCCGCTGC  TCTGTCTGT  GGTGGTGTGA
AATCTACTCT  TGTGCCAGGG  TGTTGTCTCC  ACCCCCGTCT  GTCCCAATGG  GCCTGGCAAC
TGCCAGGTAT  CCTTCGAGA  CCTGTTTGAC  CCGGCAGTCA  TGGTGTCCCA  CTACATCCAT
GACCTCTCCT  CGGAAATGTT  CAACGAATTT  GATAAACGGT  ATGCCACGG  CAAAGGGTTC
ATTACCATGG  CCTCAACAG  CTGCCATACC  TCCTCCCTTC  CTASCCCGGA  AGATAAAGAA
CAAGCCCAAC  AGACCCATCA  TGAAGTCCTT  ATGAGCTTGA  TTCTTGGGTT  GCTGCGCTCC
TGGAATGACC  CTCTGTATCA  CCTAGTCAAC  GASGTACGG  GTATGAAAG  AGCCCCAGAT
GCTATCTTAT  CGAGGGCCAT  AGAGATTGAG  GAAGAAAACA  ACGACTTCT  GGAAGGCAATG
GAGATGATA  TTGGCCARGT  TATTCCTGGA  GCCAAGAGA  CTGAGCCCTA  CCTGTGTGG
TCAGACTCC  CGTCCCTGCA  AACTAAGGAT  CAAGATGCAC  GTTATTCTGC  TTTTATAAC
CTGCTCCAST  GCCTGGCGAG  GGATTCAAGC  AAGATTGACA  CTTACCTTAA  GCTCCTGAAT
TGCAGAATCA  TCTACAACAA  CAACTGCTAA  GCCCACATTC  CATCCTATCC  ATTTCTGAGA
TGGTTCTTAA  TGATCCATTC  CCTGGCAAAC  TTCCTGAGC  TTTATAGCTT  TGTAATGCAT
GCTTGGCTCT  AATGGGTTTC  ATCTTAAATA  AAAACAGACT  CTGTAGCGAT  GTCAAAATCT

```

图 1 牛催乳素cDNA序列

Fig. 1 Bovine prolactin cDNA sequence



合成的片段连接,再将其克隆到pUC19的 BamHI与PstI位点,即得到pUL-1。

### (三) 牛催乳素表达质粒 pDprlex-1 的构建

构建步骤按图4,先用BamHI-Pst I双酶解质粒 pUL-1,分离出720bp的片段,再用 Sau 3A 酶切该片段并分离出约 600bp 的片段,然后将其克隆到 pDR540 的 BamHI位点。pDR540 是一种大肠杆菌的表达载体<sup>[11]</sup>,它含有一个 tac 启动子,重组的牛催乳素 cDNA 位于启动子的下游,从启动子的 SD 序列到催乳素 cDNA 的起始密码ATG之间有 8 个碱基对。

### (四) 细菌体系的表达及产物检测

含牛催乳素表达质粒的JM 103 在LB培养基中生长到停滞期后,收集菌体经裂解后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(图版 I -C)。从结果可看出,在分子量为 24000 道尔顿处有一浅带。从表达产物的量来看,其表达效率不高,这有可能与启动子到起始密码之间的碱基长度及组成有关,这有待进一步改进以提高其表达效率。表达产物经粗提后进行酶标测定显示具有免疫活性,用于酶标测定的抗体是兔抗羊催乳素,它与牛催乳素具有交叉反应<sup>[5]</sup>。该表达产物还有待于进一步纯化并分析其理化性质和生物活性。

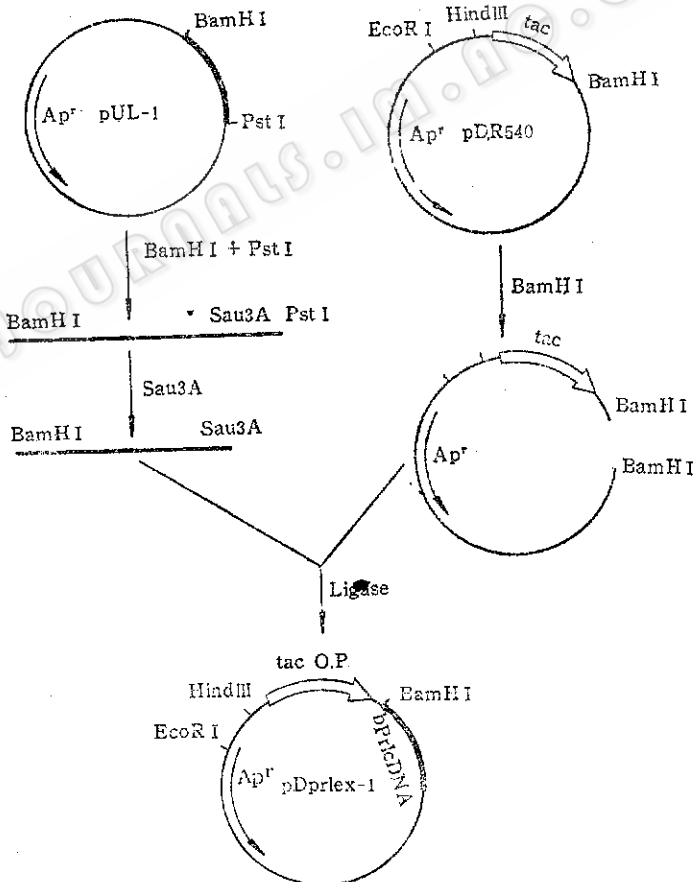


图 4 表达质粒 pDprlex-1 的构建路线

Fig.4 Construction of a plasmid (pDprlex-1) for the bacterial expression of bovine prolactin

## 参 考 文 献

- [1] Niall, H.D. et al.: *Recent Prog. Horm. Res.*, 29:387—416, 1973.  
 [2] Emmerman, J.T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:4466—4470, 1977.  
 [3] Dennis N.L. et al.: *DNA*, 20(1):21—28, 1986.  
 [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory, pp. 188—195, 1982.  
 [5] Gubler, V. et al.: *Gene*, 25:263—269, 1983.  
 [6] Grunstein, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72(10):3961—3965, 1975.  
 [7] Southern, E.: *J. Mol. Biol.*, 98(3):503—517, 1975.  
 [8] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory, p.170, 1982.  
 [9] Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463, 1977.  
 [10] Anderson, L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5421, 1977.  
 [11] Russel, D.R. et al.: *Gene*, 20:231, 1982.

## CLONING AND EXPRESSION OF cDNA FOR BOVINE PROLACTIN IN *ESCHERICHIA COLI*

Shu Youmin Shi Yingxian

(*Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing*)

The cDNA library prepared from bovine pituitary was constructed. One of the several clones encoding full length bovine prolactin (bPrl) was selected. Synthetic oligodeoxynucleotide was used as hybridization probe to select the positive clone. The insertion of the positive clone has been sequenced. Its sequence was the same as the published sequence of bovine prolactin. Bovine prolactin cDNA was modified and linked to the tac promotor and expressed in *E. coli* JM103. The method of SDS-PAGE was used to detect the expression product and the result of ELISA showed the product has the immune activity of prolactin.

### Key words

cDNA cloning; bovine prolactin; gene expression

### 图版说明 Explanation of plate I

A. The autoradiography of the Prl-1 cDNA sequences, B. Prl-1 DNA digested with restriction enzymes 1. Prl-1, 2, 3. Prl-1/PvuII, 4,5. Prl-1/PvuII + Pst I, 6,7. Prl-1/PstI, 8.  $\lambda$ DNA/EcoRI + HindIII, C. SDS-PAGE for expression of pDprl-1 in *E. coli* 1. JM103/PDR540, 2. JM103/pDR540 with 20mmol/L IPTG, 3. JM103/pDprl-1, 4. JM103/pDprl-1 with 20mmol/L IPTG, 5. JM103/pDprl-1 with 20mmol/L IPTG, 6. JM103/pDprl-1 with 60mmol/L IPTG, 7. protein marker

