

# 猪基因组文库的构建及其生长激素基因的分离

寇 蔻 曹 颀 宋德秀

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

本工作以长白猪为材料, 分别用Charon28及EMBL 3 为载体, 构建了猪的基因组文库。用牛生长激素基因为探针对基因文库进行筛选, 由两个基因文库中各获得一个阳性克隆 $\lambda$ PGH1,  $\lambda$ PGH2。其后, 以质粒pUC19为载体对 $\lambda$ PGH1进行了亚克隆。通过对亚克隆pPGH的酶切图谱及其Southern杂交结果的分析表明, 在pPGH中含有完整的猪生长激素基因。

**关键词** 基因文库; 生长激素基因; 长白猪

生长激素是由脑下垂体前叶产生的单链多肽, 一般含有190个氨基酸残基。生长激素在促进个体生长, 治疗各种创伤疾病如骨折, 皮肤烧伤, 溃疡<sup>[1]</sup>等已证实是有效的。

1974年Jaenisch等<sup>[2]</sup>用显微注射技术把SV40注入小鼠胚胎囊胚腔, 获得第一只转基因鼠。1982年和1983年Palmiter等<sup>[3]</sup>分别把大鼠和人生长激素基因注入小鼠受精卵, 得到了体重比正常小鼠大的“超级鼠”。八十年代以来, 科学家先后分离了人<sup>[4]</sup>、牛<sup>[6]</sup>、大鼠<sup>[8]</sup>、羊<sup>[7]</sup>等的生长激素基因, 并进行了多方面的研究<sup>[8,9]</sup>。

为了能够用转移生长激素基因的方法得到生长快, 瘦肉率高的新品种, 加速我国大牲畜的品种改良, 我们以长白猪为材料构建了猪的基因组文库, 并分离出猪的生长激素基因。现正构建含有羊MT-I启动子的表达质粒, 准备将其转入到猪的受精卵中, 以期在猪体内表达, 从而培养出瘦肉型、生长快、饲料转化率高的猪的新品种。

## 材 料 和 方 法

### (一)材料

1. 长白猪猪肝: 由北京农业大学提供。

2. 菌株: *E. coli* DP50购自微生物所; *E. coli* K802由动物所提供;  $\lambda$ 噬菌体溶原菌BHB2688, BHB2690为西德Walter教授赠送; *E. coli* RR1为美国纽约大学生物化学实验室赠送。

3. 载体: 噬菌体EMBL3为西德Walter教授赠送; 噬菌体Charon28, 质粒pUC19为本室自备。

4. 酶: 除Mbo I为BRL公司产品外, 其它限制酶均为Boehringer Mannheim公司产品。碱性磷酸酶、RNA酶、T4DNA连接酶、DNA聚合酶部分为Boehringer Mannheim公司产品, 部分购自华美生物工程公司。

5. 膜及其他产品: 硝酸纤维素膜为Millipore公司产品; 混合纤维素膜购自上海新亚净化器件厂; 尼龙膜(Hybond-N)为Amersham公司产品。低融点琼脂糖为BRL产品;  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP为美国ICN公司产品。

### (二)方法

1. 15—23kb猪DNA的分离纯化:

本文于1989年6月21日收到。

本课题为国家高技术发展计划资助项目。

取猪肝脏按文献[10]的方法提取高分子量DNA。DNA经Mbo I 部分酶切后,在0.4%低熔点琼脂糖中电泳,30V过夜,将含所需大小的DNA片段的胶块切下,加等体积1mol/L NaCl,70℃ 5min,经酚、氯仿抽提后即得构建基因文库所需的15~20或19~23kb的DNA片段。

2. 载体DNA的制备:噬菌体 Charon28、EMBL3基本按文献[10]的方法,经氯化铯密度梯度超离心获得纯化的噬菌体,酚、氯仿抽提后即得纯化的载体DNA。

质粒pUC19 DNA的提取采用文献[10]的快速碱解法,用0.7%低熔点琼脂糖纯化。

3. 噬菌体体外包装及细菌转化:按文献[10]的方法提取包装蛋白。包装效率为 $2 \times 10^8$  pfu/ $\mu$ g  $\lambda$  DNA。感受态菌的制备及细菌转化按Boehringer Mannheim公司推荐的方法进行。

4. 噬斑原位杂交及菌落原位杂交:基本上按文献[10]的方法进行。噬斑原位杂交温度为60℃;菌落杂交温度为42℃,加50%甲酰胺。

5. 探针制备和Southern杂交:采用牛生长激素基因(bGH)为探针,低熔点胶分离纯化。DNA片段的转移及分子杂交按Southern方法进行<sup>[11]</sup>。

## 结果和讨论

### (一)猪基因组文库的构建

在建库时我们选用了两种载体 Charon28和EMBL3。Charon28为BamHI位点特异的载体,可容纳15—20kb外源DNA片段<sup>[12]</sup>。EMBL3可容纳19—23kb外源DNA片段,具有多种特异性的限制酶位点<sup>[13]</sup>。在以Charon28和EMBL3为载体构建基因文库时,Mbo I 是一个理想

的限制酶。因为它识别四个碱基,切割DNA的随机性较大,另外它还可产生与限制酶BamHI互补的粘性末端。我们把猪的高分子量DNA用Mbo I 部分酶切后,用低熔点胶分离纯化15—20 kb和19—23kb DNA片段,此方法迅速、简便、经济,可用于构建真核基因文库。

构建基因文库的另一关键是如何获得高包装效率和重组率。高质量的包装蛋白是构建文库的前提,当包装效率达到 $10^8$  pfu/ $\mu$ g  $\lambda$  DNA以上时,方可认为其质量达到了要求。高质量的基因文库的建立不但要求载体及插入片段的质量好,还需要两者在一定的比例和浓度下连接。经过用不同的比例进行比较,发现用1.5—2.0 $\mu$ g载体加 $\approx 0.5\mu$ g插入片段在10 $\mu$ l反应体系中,12℃连接过夜可以得到最佳结果。我们用Charon28和EMBL3为载体分别构建的两个猪基因文库的包装效率均达到 $1 - 5 \times 10^5$  pfu/ $\mu$ g DNA。

在基因文库中筛选目的基因时,采用建库后直接筛选的方法。筛选工作在较高的密度下进行,每个直径150mm的培养皿中含约 $10^4$ 个重组噬斑,其中非重组体所占比例 $< 1\%$ 。以牛生长激素基因为探针,在两个文库中筛选,在分别筛选 $3 - 6 \times 10^5$ 个重组噬斑后,分别得到了阳性噬斑。通过再次纯化得到阳性单克隆,其中 $\lambda$ PGH1为本文所鉴定的单克隆(图版I-2)。

### (二) $\lambda$ PGH1的酶切分析

参考文献[14]中猪生长激素基因序列及噬菌体 Charon28的酶切图谱<sup>[12]</sup>,选用在基因中没有切点,而且距插入位点近的限制酶Hpa I,对快速提取的 $\lambda$ PGH1 DNA进行酶切反应,经电泳,Southern转移后用牛生长激素基因作探针杂交,结果在4.6kb处有一明显杂交带(图版I-1)。

### (三) 将 $\lambda$ PGH1 上的猪生长激素基因克隆到 pUC19 质粒上

在  $\lambda$ PGH1 上插入的外源 DNA 片段大约有 20kb, 其中大部分与本研究无关。因此我们选用 pUC19 质粒进行亚克隆。它与适当的宿主菌配合可以为重组子的鉴别提供方便, 它的分子量较小且在菌体中拷贝数高, 有利于酶切分析, 此外它能直接用于克隆片段的序列分析。

$\lambda$ PGH1 用 Hpa I 酶切后产生平末端, 与 pUC19 的 Sma I 末端在 T4DNA 连接酶作用下连接, 转化到宿主体内, 菌落原位杂交后获得含有猪生长激素基因的阳性克隆 pPGH。

### (四) pPGH 的酶切分析

为进一步分析 pPGH, 我们选用了 9 种限制酶对 pPGH 进行酶切、电泳并用完整牛生长激素基因为探针作 Southern 杂交 (图版 I-3)。由实验结果并参考文献 [14]。确定了 DNA 片段插入的方向和基因在片段中的位置及酶切位点 (图 1)。其中 Acc I、Pst I、Rsa I 和 Sma I 酶分别切出并杂交出 0.45, 1.75, 0.95 和 1.6kb 的片段 (与文献 [14] 相符), 另外对部分序列的测定结果也与文献 [14] 相符 (图版 I-4)。由此我们认为, 在 pPGH 中含有完整的猪生长激素基因。

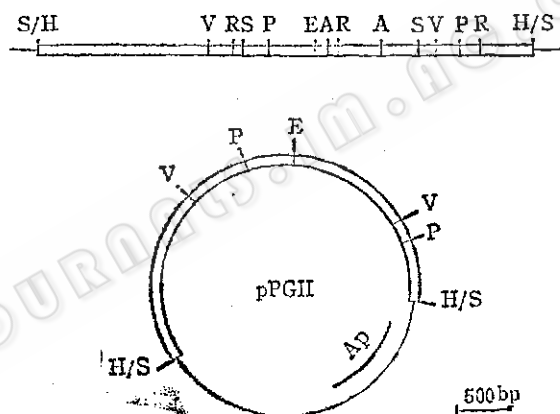


图 1 pPGH 的限制酶酶切图谱

Fig. 1 Restriction endonuclease map of pPGH

Double line: Inserted  $\lambda$ PGH1-Hpa I fragment

Single line: pUC19

A: Acc I, E: Eco R I, H: Hpa I, P: Pst I, R: Rsa I, S: Sma I, V: Pvu II

### 参 考 文 献

- [1] Goeddel, D. V., et al., *Nature*, 281:544-548, 1979.
- [2] Jaenisch, R. and Mintz, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:1250-1254, 1974.
- [3] Palmiter, R. D. et al., *Nature*, 300:611, 1982.
- [4] Fiddes, J. C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4294, 1978.
- [5] Woychik, R. P. et al., *Nucleic Acids Research*, 10: 7197-7210, 1982.
- [6] Page, G. S. et al., *Nucleic Acids Research*, 9:2087-2104, 1981.
- [7] Byrne, C. R., et al., *Aust. J. Biol. Sci.*, 40:459-468, 1987.
- [8] Hammer, R. E. et al., *Nature*, 315: 680-683, 1985.
- [9] Seamark, R. F. et al., *J. Cell. Sci.*, 90:295-300, 1988.
- [10] Maniatis, T. et al., *In Molecular Cloning, A laboratory Manual*, SCH. USA, 1982.
- [11] Southern, E. M. et al., *J. Mol. Biol.*, 98:503, 1975.

- [12] Rimm, D. et al., *Gene*, 12:301, 1980.  
[13] Frischauf A-M. et al., *J. Mol. Biol.*, 170: 827—842, 1983.  
[14] Vize, P. D. et al., *Gene*, 55:339—344, 1987.  
[15] Yanisch-Perron, G. et al., *Gene*, 33:103—119, 1985.

## Construction of Porcine Genomic Library and Isolation of Porcine Growth Hormone Gene

Kou Kou Cao Jie Song Dexiu

(*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing*)

Two porcine genomic libraries have been constructed using both phage Charon 28 and EMBL3 as the vectors and two positive plaques ( $\lambda$ PGH1,  $\lambda$ PGH2) have been isolated using bovine growth hormone gene (bGH) as the hybridization probe. The gene within the  $\lambda$ PGH1 was subcloned into plasmid pUC19. By digestion with 9 different restriction enzymes and Southern hybridization, it showed that the plasmid pPGH contains full length porcine growth hormone gene.

### Key words

Genomic library; growth hormone gene; porcine

### 图 版 说 明

#### Explanation of Plate I

1. DNA from  $\lambda$ PGH1 were digested with restriction enzyme Hpa I and electrophoresed on a 0.8% agarose gel  
a:  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III; b: Charon28 DNA/Hpa I; c, d:  $\lambda$ PGH1 DNA/Hpa I  
Right: The Southern hybridization result of the same gel
2. Plaque *in situ* hybridization: Recombinant phage DNA was transferred to microcellulose filter and hybridized with  $^{32}$ P-labelled bGH probe and autoradiographed
3. Analysis of pPGH DNA digested with different restriction enzymes  
Left: Ethidium bromide stained gel  
a.  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III; b. Positive control: bGH gene digested with Pst I; c—k. pPGH digested with Acc I, Alu I, EcoR I, Hind II, Kpn I, Pst I, Pvu II, Rsa I, Sma I; respectively  
Right: Southern hibridization result of the same gel
4. Part sequence from pPGH

