

# 在大肠杆菌中温度诱导高效表达猪生长激素

余旭平 齐顺章

(北京农业大学动物生物化学教研室, 北京)

本实验构建了温度诱导的表达猪生长激素的表达载体, 转化大肠杆菌N4830后, 经温度诱导, 获得了高效表达。由SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及Western blot证实表达产物为猪生长激素, 经扫描估测猪生长激素的表达量占大肠杆菌细胞全蛋白的30%左右。

**关键词** 猪生长激素; 温度诱导; 高效表达

许多实验室已经证明, 给猪注射猪生长激素能显著提高猪的生长速度, 饲料转换率和瘦肉产率, 具有明显的经济效益和社会效益<sup>[1]</sup>。为了使猪生长激素在生产上的应用成为可能, 本室在获得全长猪生长激素cDNA基因后<sup>[2,3]</sup>, 于1988年与爱尔兰都柏林大学分子遗传室合作, 成功地在大肠杆菌中高效表达出猪生长激素<sup>[4]</sup>。但是该表达体系是用IPTG诱导的, IPTG的价格比较昂贵。为了降低生产成本, 我们在该表达体系的基础上, 进一步构建了温度诱导高效表达猪生长激素的大肠杆菌表达体系。

## 材料和方法

### (一) 材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3), N4830 和质粒 pET3a-pGH, pλ8 由本室提供。所有限制酶、T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司、友谊生物技术公司或中国生物技术联合发展公司。Klenow 大片段、天然猪生长激素和兔抗猪生长激素抗体由本室自制。羊抗兔抗体由北京农业大学实验动物研究所提供。分子量标准蛋白(磷酸化酶B:94kd, 牛血清白蛋白:67kd, 肌动蛋白:43kd,

碳酸酐酶:30kd, 烟草花叶病毒外壳蛋白:17.5kd)为中国科学院上海生化所产品。酵母提取物和蛋白胨为英国Oxoid公司产品。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和SDS为上海化学试剂公司进口分装。其他药品均为北京化工厂生产。

### (二) 方法

1. DNA重组操作: 参照 Maniatis 等<sup>[5]</sup>的方法。

2. 感受态细胞的制备及转化: 参照李谐勋等<sup>[6]</sup>的方法。

3. 诱导表达: 工程菌过夜培养物按1%接种于含氨苄青霉素(100μg/ml)的LB培养基中, 30℃, 200rpm 培养。待细菌生长至OD<sub>600nm</sub>值约为0.5到0.6时, 将温度提高至42℃, 200rpm继续培养诱导2h。

4. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 参照张龙翔的方法<sup>[7]</sup>。

5. Western blot: 参照 Towbin 等的方法<sup>[8]</sup>。

6. 表达效率的估测: 基因工程菌经诱导后, 取样进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶全细菌蛋白电泳, 考马斯亮蓝R250染色, 再用Shimadzu CS-910 薄层扫描仪扫描。

本文于1990年9月19日收到。

# 结 果

## (一) 表达载体的构建

温度诱导高效表达猪生长激素的表达

载体是在原有质粒 pET3a-pGH和pλ 8 的基础上构建的, 其过程如图 1 所示。

质粒pET3a-pGH先用 BamHI 部分酶解, 使载体上两个 BamHI 位点只切开一个。经电泳检查表明其主要成分为用单

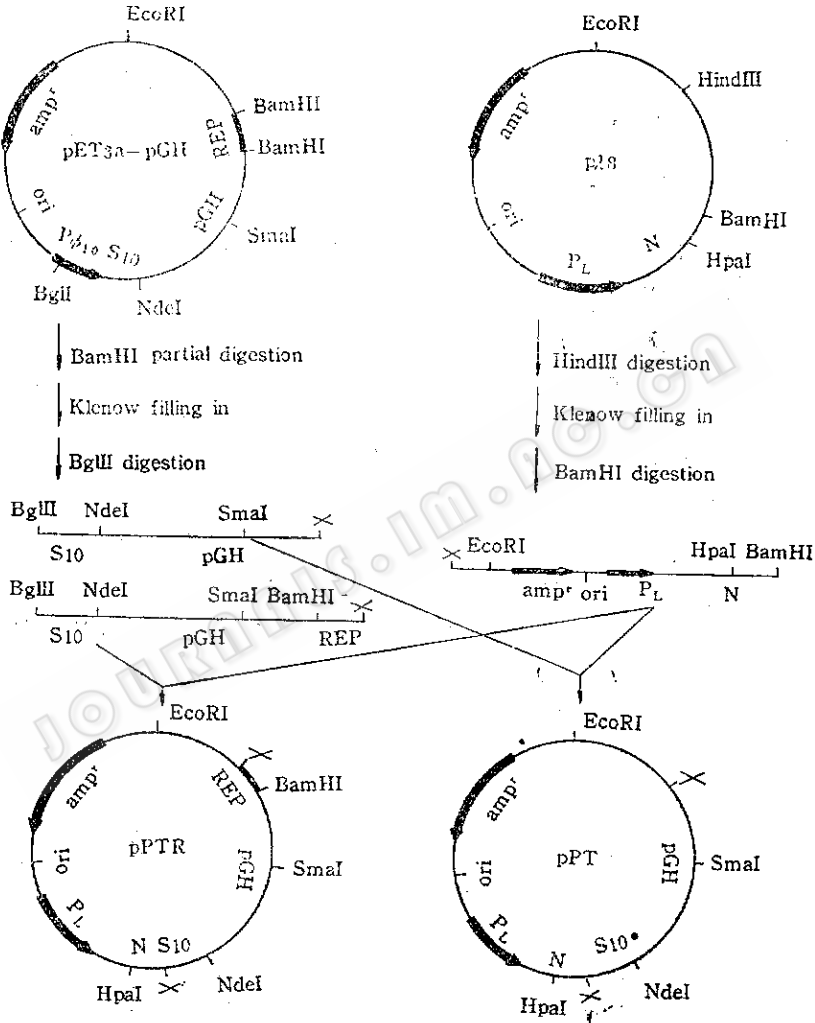


图 1 表达载体构建图解

Fig.1 Diagram of the construction of expression vectors

酶位点切开的质粒后, 用Klenow 大片段补平,再用BglII 酶切, 电泳检查出现两个较大的和两个较小的片段。同时回收两个较小的片段, 它们都带有改造过的猪生长激素 cDNA基因, 其中一个带“反相重复序列”(Repetitive extragenic palindro-

mic sequence, 简称为REP 序列), 另一个不带。这两个片段在基因上游都是 BglII 粘性末端, 下游为将 BamHI 切后补平的钝端。

质粒 pλ 8 用 HindIII 切成线型, 用 Klenow 大片段补平, 然后用 BamHI 切

成两个片段。电泳回收大片段, 此片段含有大肠杆菌 ColE1 复制原点、氨苄青霉素抗性基因和  $P_L$  启动子, 并且启动子下游一端为 BamHI 粘性末端, 另一端为 HindIII 切后补平的钝端。

将基因片段和  $P_L$  启动子片段按 2:1 (w/w) 左右的比例混合, 用 T4 DNA 连接酶连接。由于  $P_L$  启动子下游的 BamHI 粘性末端与基因片段上游的 BglII 粘性末端互补, 因此这两端以粘性末端连接, 另两端以钝端连接, 保证了将猪生长激素基因以正确的方向置于  $P_L$  启动子的控制之下。

用连接产物转化大肠杆菌 N4830, 以氨苄青霉素筛选转化子, 获得了大量克隆。由于设计的表达载体中只含一个 SmaI 位点(在基因中)和一个 HpaI 位点(在  $P_L$  启动子下游), 并且用这两个酶酶解时可得到一个约 5.7kb 的大片段和一个约 500bp 的小片段, 据此用酶解筛选所需要的重组子。在随机选取的 18 个克隆中获得了 10 个符合上述要求的克隆。

由图 1 可以看出, 在质粒 pET3a-pGH 中基因的下游有两个 BamHI 酶切位点。在用 BamHI 部分酶解时, 如果切开的是靠近基因的那个 BamHI 位点, 则在构建好的载体上不带有 REP 序列。而且 BamHI 位点也因补平而消失, 不再有 BamHI 位点; 如果部分酶解时切开的是离基因较远的那个位点, 则在构建好的质粒中猪生长激素基因的下游具有 REP 序列, 而且靠近基因的那个 BamHI 酶切位点仍然保留。据此用 BamHI 酶解来鉴别带有和不带有 REP 序列的重组质粒。经鉴定, 从上述 10 个克隆中筛选出两个带 REP 序列的质粒, 命名为 pPT8 和 pPT15; 两个不带 REP 序列的质粒, 命名为 pPT9 和 pPT17。

## (二) 猪生长激素的温度诱导表达和

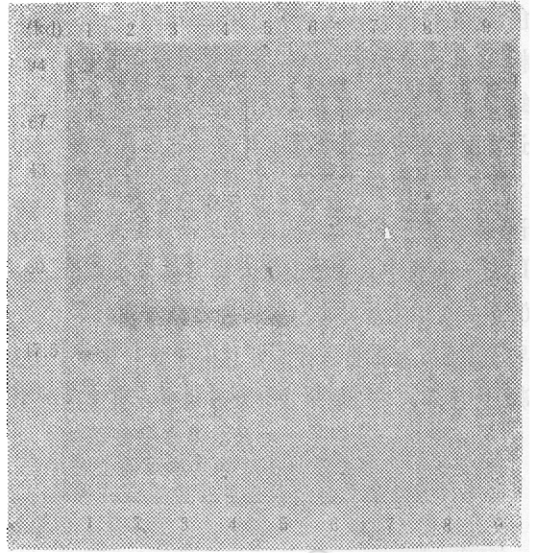


图 2 细菌全蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱  
Fig.2 SDS-PAGE of total bacterial proteins  
1. Proteins of standard molecular weight  
2-5. Induced genetically engineered bacteria  
6. Genetically engineered bacteria before induction  
7. Natural pGH  
8. *E. coli* N4830 before induction  
9. *E. coli* N4830 after induction

## 鉴定

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定: 用质粒 pPT8、pPT15、pPT9 和 pPT17 分别转化大肠杆菌 N4830。转化后的基因工程菌和未转化的大肠杆菌 N4830 同时培养诱导。诱导前后两种细菌的全蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果见图 2。

由图 2 可见, 和诱导前后的大肠杆菌 N4830 以及诱导前的基因工程菌相比, 诱导后的基因工程菌全蛋白电泳图谱中多出一条浓重的迁移率与天然猪生长激素相似的(分子量约为 22kd)蛋白带, 提示此带是猪生长激素 cDNA 基因经温度诱导的表达产物。

2. Western blot 的结果: 图 3 为 Western blot 的结果。由图 3 可见, 大肠杆菌 N4830 和未诱导的基因工程菌没有着色带, 而经诱导的基因工程菌则有一条着

色浓重的带，其迁移率与天然猪生长激素相似。由于所用抗体是特异与猪生长激素结合的兔抗猪生长激素抗体，因而表明表达产物为猪生长激素。

3. 扫描结果：此基因工程菌经多次诱导表达后发现，在摇瓶水平和在氨苄LB培养基中，以细菌长到  $OD_{600nm}$  值为 0.5—0.6 时开始诱导的表达效率较高。诱导 2 h 后，经细菌全蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，考马斯亮蓝 R250 染色，用



图 3 Western blot 结果

Fig.3 Results of Western blot

- 1. *E. coli* N4830; 2. Genetically engineered bacteria before induction;
- 3. Natural pGH; 4,5. Genetically engineered bacteria after induction

Shimadzu CS-910 扫描估测，结果表明，表达产生的猪生长激素量均占细菌总蛋白的 30% 左右。其中最高一次的表达效率为 33.2%，扫描结果见图 4。

### 讨 论

前面已经提到，在筛选出的 4 个质粒

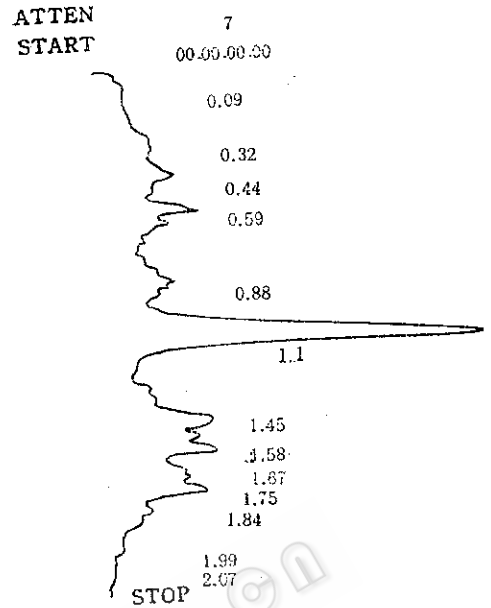


图 4 扫描结果

Fig.4 Results of Shimadzu CS-910 scanning of the SDS-PAGE gel of total bacterial proteins stained by Coomassie brilliant blue R250

中，pPT8 和 pPT15 在猪生长激素基因的下流含有 REP 序列，而 pPT9 和 pPT17 不含 REP 序列。REP 序列是从大肠杆菌染色体中克隆出来的一个 DNA 片段，据报道<sup>[8-11]</sup>，在基因的下流含有此序列时，转录出来的 mRNA 有抵制 3'→5' 核酸外切酶降解 mRNA 的作用，从而延长 mRNA 的寿命，提高表达效率。我们用 4 个质粒分别转化大肠杆菌 N4830，在相同条件下培养并诱导，经扫描估测，结果表明 4 个菌种的表达效率无明显差异 (pPT8/N4830、pPT15/N4830、pPT9/N4830、pPT17/N4830 的表达效率分别为 27.12%、28.88%、26.43% 和 28.32%)。说明在我们构建的表达系统中诱导表达条件下，REP 序列没有提高表达效率的作用，其原因尚需进一步探讨。

本教研室其他同志已用此工程菌进行发酵, 并从其中提取出高纯度的猪生长激素。用去垂体大鼠进行的实验证明其具有生物学活性后, 已在猪上做了实验, 其结果

与孟山度公司的产品所做的实验结果<sup>[1]</sup>以及其实验室报告的效果相似, 这进一步证明我们已构建成温度诱导的在大肠杆菌中高效表达猪生长激素的体系。

### 参 考 文 献

- [1] Carol L. M., et al., *J. Anim. Sci.*, 67:116—127, 1989.
- [2] 贾 峰等: 生物化学杂志, 5(2):136—142, 1989.
- [3] 齐顺章等: 生物工程学报, 5(1):35—39, 1989.
- [4] O'Mahony, D. J. et al., *Gene*, 91:275—279, 1990.
- [5] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [6] 李谱勋等: 遗传, 6(4): 1—2, 1984.
- [7] 张龙翔等: “生化实验方法和技术”, 人民教育出版社, 北京, 1982.
- [8] Towbin, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:4350, 1979.
- [9] Higgins, C. F. et al., *Nature*, 298:760—762, 1982.
- [10] Gilson, E. et al., *EMBO J.*, 3:1417—1422, 1984.
- [11] Sarah F. N. et al.: *Cell*, 48:297—310, 1987.

## Temperature-inducing High level Expression of Porcine Growth Hormone in *Escherichia coli*

Yu Xuping Qi Shunzhang

(Laboratory of Animal Biochemistry, Beijing Agricultural University, Beijing)

Temperature inducible *E. coli* expression vectors of pGH gene were constructed. After the transformation of *E. coli* N4830 with them and induction by temperature shift, high level expression was achieved. The expressed pGH, as verified by migration rate in SDS-PAGE and Western blot, accumulated up to about 30% of the total bacterial cellular proteins as estimated by Shimadzu CS-910 scanning of the SDS-PAGE gel stained by Coomassie brilliant blue R250.

### Key words

pGH; temperature-inducible; high-level expression