

人胰岛素样生长因子-Ⅱ cDNA 的 PCR 扩增及序列分析

吴雅旭 石成华 张京生 陈国凤*

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

(解放军三〇二医院 北京 100039)*

人胰岛素样生长因子(Human insulin-like growth factor, 简称 h IGF)是一类既有细胞分化和增殖活性,又有胰岛素样作用的多肽,包括 IGF-Ⅰ 和 IGF-Ⅱ 两种。其中 IGF-Ⅰ 的功能比较清楚,而 IGF-Ⅱ 的作用正在研究中,可能在胎儿的生长发育及脑组织和神经系统中起重要作用。IGF-Ⅱ 能刺激一些细胞系的生长,对不同的肿瘤起自分泌和旁分泌生长因子的作用^[1-6]。最近又发现 IGF-Ⅱ 能刺激神经及肌肉的再生。由于天然 IGF-Ⅱ 的分离困难,我们利用基因工程方法克隆表达 IGF-Ⅱ cDNA,以获得大量重组蛋白,为研究和应用打下基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

E. coli JM103 和 pUC19 为本室保存的菌株和质粒。

1.2 酶与试剂

限制酶和 T4-DNA 连接酶购自 Gibco 公司;Taq DNA 聚合酶购自中国医学科学院基础医学研究所; α -³²P-dATP 购自北京福瑞生物工程公司;DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司;5-溴-4-氯-3-吡啶 β -D-半乳糖苷(X-gal)和异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG)为 Sigma 公司产品。

1.3 引物的合成

根据发表序列,应用 ABI-381-DNA 合成仪,合成成熟 IGF-Ⅱ cDNA 的 5'端及 3'端引物,并进行分离纯化。

1.4 PCR 扩增和基因克隆

以成人肝 cDNA 库为模板进行 PCR 扩增。条件是:94℃,60 秒,50℃,60 秒,72℃,90 秒,共循环 25 次,最后在 72℃ 延伸 7 分钟。按“Molecular Cloning”常规方法将 PCR 产物克隆到 pUC19 的 SmaI 位点。

1.5 重组子的筛选

将连接物转化到 *E. coli* JM103 中,涂到铺有 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基上(氨苄抗性),挑白色菌落进行质粒快抽,用 BamHI 酶切鉴定外源基因的插入方向。

1.6 质粒 DNA 的序列分析

按试剂盒说明书对快抽质粒进行序列分析。

2 结果与讨论

2.1 合成片段的设计与纯化

天然 IGF-Ⅱ 的主要形式为含 67 个氨基酸的多肽^[7]。为获得 IGF-Ⅱ 的结构基因,我们依据其两端的编码序列设计了一对引物,并在 3'端加上两个终止密码子 TGATAG 及 BamHI 酶切位点 GGATCC。5'端引物的序列为 5' GCTTACCGCCCCAGTGAG, 3'端引物的序列为 5'ATGGATCCTATCACTCGGACTTGGCGGG。为保证 PCR 产物的正确,我们对合成片段进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及 C18 反相柱纯化。

2.2 PCR 扩增及纯化

本文于 1993 年 10 月 4 日收到。

以合成的两个片段为引物,成人肝 cDNA 库为模板进行 PCR 扩增,得到约 230bp 片段(见图 1)。用冻融法从琼脂糖凝胶中回收该片段。

2.3 cDNA 的克隆及筛选

纯化回收的 PCR 产物,与 SmaI 酶切的 pUC19 按 3:1 的分子比进行连接。将连接物转化到 *E. coli* JM103 受体菌中,涂到铺有 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基上(氨苄抗性),挑取白色菌落进行质粒快抽。为便于以后的操作,拟挑取反向插入的重组质粒。用 BamHI 进行酶切,当片段正向插入时,能切出 230bp 片段,反之则不能。由此筛出反向重组质粒 pMBI8。

2.4 序列分析

快抽重组质粒 pMBI8,用 pUC19 正向引物进行序列分析(如图 2)。除编码 Ser 29 的密码子 AGC 由 AGACTTCCAGGC 取代外,其余部分与 IGF-Ⅰ 结构基因序列完全相同。突变基因编码 70 个氨基酸的多肽,是天然 IGF-Ⅰ 的变种^[6],有些生物活性比天然 IGF-Ⅰ 还好,如与胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (IGFBP-3)和 2-型 IGF 受体的亲和力。因此我们决定进行重组表达研究,为进一步的基础和应用研究打下基础。现我们已将其重组到酵母-大肠杆菌分泌表达载体 pMB414 上,并转化到酵母菌 *S. cerevisiae* XV2181 中,正在进行活性检测。

A.

GCT TAC CGC CCC AGT GAG ACC CTG TGC GGC GGG

GAG CTG GTG GAC ACC CTC CAG TTC GTC TGT GGG

IGF-2 var.
GAC CGC GGC TTC TAC TTC AGA CTT CCA GGC AGG
A ----- GC

IGF-2

CCC GCA AGC CGT GTG AGC CGT CGC AGC CCT GGC

ATC GTT GAG GAG TGC TGT TTC CGC AGC TGT GAC

CTG GCC CTC CTG GAG ACG TAC TGT GCT ACC CCC

GCC AAG TCC GAG

A B

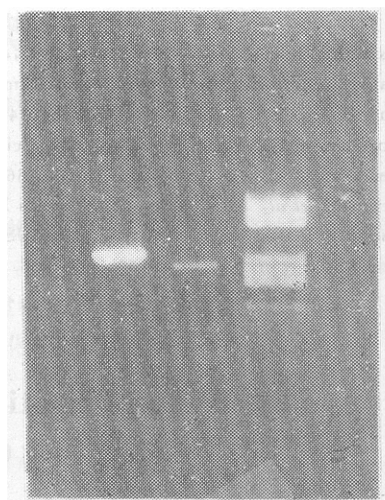


图 1 PCR 结果的琼脂糖凝胶电泳分析

A. 290bp DNA, B. PCR, C. pBR322+Hae I

B.

A G C T

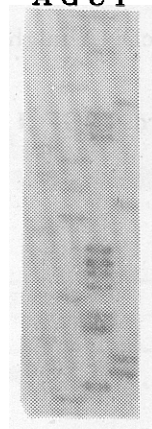


图 2 人类胰岛素生长因子-2 结构基因的序列分析

A. 人类胰岛素生长因子-2 及其变种的结构基因序列

B. 人类胰岛素样生长因子-2 变种结构基因的 5' 序列分析

参 考 文 献

- [1]Froesch E R *et al.* Ann Rev Physiol,1985,47:443—467.
[2]Tally M *et al.* Biochem Biophys Res Commun,1987,148:811—816.
[3]Lund P K *et al.* J Biol Chem,1986,261:14539—14544.
[4]Hoselbacher G K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA,1985, 82:2151—2157.
[5]Yee D *et al.* Cancer Research,1988, 48:6691—6696.
[6]Leroith D *et al.* In: Loughin SE *et al.* eds Neurotrophic Factors. Academic, San Diego, Calif, 1993.
[7]Zumstein P P *et al.* Proc Natl Acad Sci USA,1985,82:3169—3173.
[8]Czech M P *et al.* Cell,1989,59:235—238.

PCR Amplification and Sequence of Human Insulin-like Growth Factor-Ⅰ cDNA

Wu Yaxu Shi Chenghua Zhang Jingsheng Chen Guofeng*

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850*)

(*PLA 302 Hospital, Beijing 100039*) *

Abstract Human insulin-like growth factor-Ⅰ (hIGF-Ⅰ) cDNA has been cloned with PCR and other DNA recombinant techniques. The sequence of the cDNA cloned was analysed. Except AGC which coded Ser29 was replaced by AGACTTCCAGGC, others were the same as the sequence of IGF-Ⅰ cDNA published. The polypeptide coded by mutant cDNA might be a variant of natural IGF-Ⅰ

Key words IGF-Ⅰ, PCR, sequence