

广东菲牛蛭水蛭素基因的克隆和序列测定

谭恩光, 刘秀平

(中山医科大学生物学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】研究地理因素对水蛭素基因结构变异的影响。【方法】抽提广东菲牛蛭基因组 DNA, 根据已发表的水蛭素基因设计一对引物, 从基因组 DNA 扩增出一特异性的大约 700 bp 片段, 再回收、克隆和测序。【结果】广东菲牛蛭水蛭素基因全长为 642 bp, 基因有 4 个外显子, 被三个内含子隔开。与马尼拉菲牛蛭水蛭素基因 Hm₁、Hm₂ 的同源性分别为 90% 与 88.6%。【结论】地理因素会影响菲牛蛭水蛭素基因结构的变异。

关键词: 水蛭素基因; 基因扩增; 序列分析; 菲牛蛭

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)02-0084-03

Cloning and Sequencing of Hirudin Gene of *Hirudinaria Manillensis* in Guangdong, China TAN En-guang, LIU Xiu-ping. (Department of Biology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract 【Objective】To study the effect of geological factors on hirudin gene variation in construction【Methods】The genomic DNA were isolated from *Hirudinaria manillensis* living in Guangdong. A pair of primers was designed from published hirudin genes. A specific DNA segment about 700 bp full-length was obtained from genomic DNA amplification by PCR. The segment was retrieved, purified, cloned and sequenced. 【Results】The hirudin gene from Guangdong *Hirudinaria manillensis* consisted of 640 bp. The gene contained four exons interrupted by three introns. The gene sequence had a homology with Hm₁ of 90%, Hm₂ of 88.6% from Manila *Hirudinaria manillensis*. 【Conclusion】The geological factors have an effect on hirudin gene variation of *Hirudinaria manillensis*.

Key words: hirudin gene; gene amplification; sequence analysis; *Hirudinaria manillensis*

关于水蛭素的研究, 早在 100 年前就发现水蛭抽提物有抗血液凝固作用。20 世纪 50 年代从欧洲医蛭 *Hirudo medicinalis* 分离纯化了水蛭素, 70 年代确定水蛭素为凝血酶特异性抑制剂。80 年代分子生物学的发展, 才确定水蛭素一级结构。水蛭素 hirudin 是从欧洲医蛭分离出来的, 医蛭食性较杂。随着研究的深入, 人们把注意力转向研究以哺乳动物为主要吸血对象的东南亚的菲牛蛭, 望获得更适合于人类的抗凝血物质。1992 年 Steiner^[1] 首次从菲牛蛭 *Hirudinaria manillensis* 提取 2 种水蛭素。1993 年 Scheri^[2] 研究了菲牛蛭二种水蛭素基因的结构。国内有关水蛭素基因研究起步较晚, 主要从人工合成国外发表的水蛭基因, 多数在原核生物大肠杆菌中表达^[3~4], 至此, 还未见采用我国牛蛭资源进行水蛭素基因的研究。我国牛蛭资源丰富, 已报告 6 个种。本研究以我国南方的广东菲牛蛭为材料, 研究地理因素对菲牛蛭水蛭素基因结构变异的影响, 为水蛭素基因工程及其产物在医学上的应用打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试水蛭为广东菲牛蛭 (*Hirudinaria manillensis*), 来自广州市郊区, 饥饿一段时间, 供 DNA 抽提用。生化试剂、限制性内切酶、*Taq* 多聚酶、T₄DNA 连接酶、X-gal、IPTG 等购自 Promega 公司, PCR 扩增试剂盒购自上海华美公司。菌种和质粒: PGEM-T Vector 购自 Promega 公司。DH₅α 由热带作物生物技术国家重点实验室提供。根据已发表的菲牛蛭水蛭素基因序列设计上、下游引物, 由中科院微生物研究所合成。

P₁: 5' AGTCGACAAATGTTCTCTCTCAAGT-TGTTTC3'; P₂: 5' ATCGGAATTCTTAATTCAAT-ATATCTTCAT3'

1.2 方 法

1.2.1 DNA 抽提 先取广东菲牛蛭 1 条, 沿腹中 线剪开, 取出生殖腺用吸水纸吸干血液, 用生理盐 水清洗蚂蟥及生殖腺。整体蚂蟥及生殖腺分别进 行碱裂解法、氯仿酚抽提。

收稿日期: 2001-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3880068, 39160017)

作者简介: 谭恩光(1936-)男, 广东阳江人, 教授, 刘秀平, 广东药学院。

1.2.2 PCR 扩增水蛭素基因 以广东菲牛蛭基因组 DNA 为模板,反应体系如下:基因组 DNA 1 μ L (0.1 μ g), P₁ 2 μ L, P₂ 2 μ L, dNTP 5 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, Taq 酶 1 μ L, 补充 ddH₂O 至总体积 50 μ L。反应程序如下:97 $^{\circ}$ C 变性 7 min 后,降温至 72 $^{\circ}$ C,加 Taq 酶,72 $^{\circ}$ C 维持 2 min,然后进入前 5 个循环,94 $^{\circ}$ C、50 s; 45 $^{\circ}$ C、45 s; 72 $^{\circ}$ C、80 s。5~10 循环,94 $^{\circ}$ C、50 s; 50 $^{\circ}$ C、50 s; 72 $^{\circ}$ C、80 s。11~35 循环,94 $^{\circ}$ C、60 s; 55 $^{\circ}$ C、60 s; 72 $^{\circ}$ C、90 s; 最后 72 $^{\circ}$ C, 10 min。PCR 扩增结束,用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.2.3 PCR 产物纯化 按参考文献[5]进行。

1.2.4 质粒 DNA 的制备及转化 重组质粒的筛选、鉴定,均按参考文献[5]进行。重组质粒插入片段的序列测定,测定反应体系按试剂盒要求加样,PE 公司 377 型全自动测定仪进行序列测定。

2 结果

2.1 水蛭素基因组 DNA 的抽提

从整体蚂蟥提取广东菲牛蛭基因组 DNA,约为 22 kb,完整性较好(图 1)。

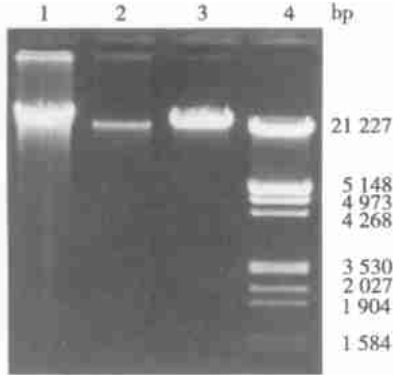


图 1 广东菲牛蛭 DNA 抽提

Fig 1 Genomic DNA extracted from *Hirudinaria manillensis* in Guangdong

Lane 1: Gonad tissue genomic DNA; Lane 2: Whole body tissue genomic DNA; Lane 3: molecular marker; Lane 4: λ DNA Eco I + Hind III markers

2.2 PCR 扩增水蛭素基因

采用所设计引物,以广东菲牛蛭基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增反应,产物经 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,得到一条近似 700 bp 的 DNA 片段,与预期的扩增产物相符(图 2),说明预期的 Hmg(广东菲牛蛭水蛭素基因)已得到扩增。

2.3 PCR 产物纯化和克隆

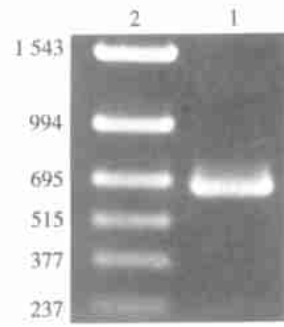


图 2 广东菲牛蛭基因组 DNA 中 PCR 扩增水蛭素基因
Fig. 2 PCR amplification of hirudin gene in genomic DNA of Guangdong *H. Manillensis*

Lane 1: markers; Lane 2: about 700 bp amplification production

利用低熔点琼脂糖凝胶,在 4 $^{\circ}$ C 低电压情况下进行电泳,纯化后得到一条 642 bp 左右的 DNA 片段,纯化后产物浓度约 60 mg/L。

纯化后的 PCR 产物与克隆载体 3:1 的比例混合,连接得到重组质粒,以连接产物转化感受态 *E. coli* DH α ,通过 IPTG-X-gal 蓝白菌落筛选,得到较好的转化结果。选择其中 5 个白色菌落和 1 个蓝色菌落,根据电泳滞后现象,双酶切鉴定以及 PCR 反应,判断所选 5 个白色菌落都是重组子。

2.4 水蛭素基因的序列测定结果

大量抽提并纯化重组质粒,吸光度在 260/280,达到测定要求,测定结果表明,广东菲牛蛭水蛭素基因,其全长为 642 bp,同国外已发表的马尼拉菲牛蛭水蛭素基因 Hm₁ 同源性为 90%,Hm₂ 同源性 88.6%。广东菲牛蛭水蛭素基因与 Hm₁、Hm₂ 的比较见图 3。它们分别编码的氨基酸序列见图 4。

根据测得的核苷酸序列及外显子拼接的 GT-AG 法则,推测此基因有 4 个外显子,被 3 个内含子隔开,及与 Hm₁ 和 Hm₂ 基本相同。第一个外显子编码 20 个氨基酸构成信号肽。

3 讨论

3.1 关于 PCR 引物和循环参数的选择

PCR 扩增基因是否成功,关键之一是引物的设计和适宜的循环参数。我们比较了 Dodt 等发表医蛭的水蛭素基因的氨基酸序列,发现在水蛭素分子中,大部分氨基酸较保守。比较 Scacheri 等测得菲牛蛭水蛭素基因 Hm₁、Hm₂,二者的信号肽无论是氨基酸序列还是核苷酸序列都完全相同,因此认为以菲牛蛭水蛭素基因信号肽 1~7 相应的核苷酸序

