

## 技术与方法

牛促卵泡激素  $\alpha$  亚基 cDNA 的克隆与序列分析

昔奋攻 余 荭 陈新国 石玉瑚

(新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐 830000)

陈清轩 张志红

(中国科学院发育生物研究所, 北京 100080)

**摘要** 从牛脑垂体中提取总 RNA, 分离 mRNA, 反转录获得 cDNA, PCR 扩增获得长为 380 bp 的牛促卵泡激素  $\alpha$  亚基 cDNA 片段, 将它克隆于 pUC19 中, 进行序列分析, 结果表明: 所克隆的  $\alpha$  亚基基因编码区序列与 Erwin 所发表的序列基本相同, 仅编码第 24 位赖氨酸的密码有差异, 同时将所获基因的核苷酸序列及相应氨基酸序列与人、啮齿类的同类基因相比较, 具有很高的同源性。

**关键词** 牛促卵泡激素  $\alpha$  亚基, cDNA, 序列分析

**学科分类号** Q57

垂体分泌的促卵泡激素 (FSH)、促黄体激素 (LH)、促甲状腺素 (TSH) 及胎盘产生的绒毛膜促性腺素 (CG) 共同组成一个糖蛋白激素家族。它们功能虽然各异, 结构却极为相近, 都是由  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基组成, 在同一种内其  $\alpha$  亚基是确定的, 甚至在所有哺乳动物中的  $\alpha$  亚基的氨基酸序列都是保守的<sup>[1]</sup>。  $\beta$  亚基各不相同并决定着各激素的生物活性。它们是目前已知的最为复杂的蛋白质激素, 存在许多尚未认识的问题, 如: 人染色体中绒毛膜促性腺激素  $\beta$  亚基和促黄体激素  $\beta$  亚基基因以反向串连方式集为一簇, 这种反常组合方式的机制尚不清楚, 另  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基基因间的可能连接方式也有待确定。对多个不同种属中糖蛋白激素基因的组成分析会为其基因结构、功能及多基因调节关系的确立提供依据。目前已克隆分析了人<sup>[2]</sup>、大鼠<sup>[3]</sup>、小鼠<sup>[4]</sup>等  $\alpha$  亚基基因及一些糖蛋白激素  $\beta$  亚基的 cDNA 序列。我们已克隆了牛促卵泡激素  $\beta$  亚基的 cDNA, 并分别在大肠杆菌<sup>[5]</sup>和中国仓鼠卵巢细胞中表达了牛促卵泡激素  $\beta$  亚基。有报道表明<sup>[6]</sup>将  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基在同一真核细胞中表达时, 将有助于促卵泡激素向培养液中分泌。本文报道牛促卵泡激

素基因 cDNA 的扩增及序列分析, 并将它与人、大鼠、小鼠的同类基因进行比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1** PCR Kit、限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、末端转移酶、*E. coli* DNA 聚合酶 I 为 Boehringer 公司产品。异硫氰酸胍、二乙基焦碳酸盐、氯化铯为 Sigma 产品。

**1.1.2** pUC19、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本室提供。

**1.1.3** 牛脑垂体: 取于本地屠宰场刚屠宰的牛, 并迅速冻存于液氮中。

### 1.2 方法

**1.2.1** mRNA 的分离纯化: 用异硫氰酸胍-氯化铯法制备牛垂体总 RNA<sup>[7]</sup>, 再利用 oligo-dT 纤维素柱层析分离纯化 poly (A)<sup>+</sup> RNA<sup>[8]</sup>。

**1.2.2** cDNA 的合成: 以 oligo (dT)<sub>15</sub> 为引物, 以 poly (A)<sup>+</sup> RNA 为模板合成单链 cDNA, 加入 RNase H 去除 mRNA, 再于大肠杆菌 DNA 聚合酶作用下完成双链 cDNA 的合

\* 国家自然科学基金资助项目 (39360001)。

收稿日期: 1997-03-13, 修回日期: 1997-07-07

成<sup>[9]</sup>.

**1.2.3 PCR 扩增目的基因 cDNA:** 根据 Erwin 所报序列, 由中国科学院微生物研究所技术室合成引物 1 和引物 2. 引物 1: 5' GAGCCATG-GATTACTACAGAAAA3'; 引物 2: 5' CTGC-TAGCTATTAGGATTTGAG3'.

以所获得的 cDNA 为模板, 扩增 FSH- $\alpha$  亚基 cDNA, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测.

**1.2.4 PCR 扩增产物的克隆及序列分析:** 利用 1.2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离回收特异的 cDNA 扩增片段, 纯化后经 T4 DNA 聚合酶修饰, 克隆于 pUC19 Sma I 位点, 用 DNA 序列分析仪 ABI 373A 测序.

## 2 结果与讨论

### 2.1 总 RNA 的提取和 mRNA 的分离

将所获得的总 RNA 进行羟甲基汞凝胶电泳, 结果表明: 从牛脑垂体中提取的总 RNA 有明显的 28 S、18 S rRNA 条带, 说明 RNA 在提取中未受降解, 同时 mRNA 长度范围约为 100~ 6 000 核苷酸, 而 bFSH- $\alpha$  cDNA 编码区为 380 bp, 说明所获总 RNA 及 mRNA 符合要求.

### 2.2 cDNA 长度测定

合成的 cDNA 经凝胶电泳, 放射自显影表

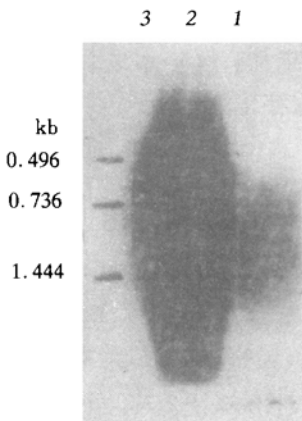


图 1 cDNA 长度测定

1: 单链 cDNA; 2: 双链 cDNA;  
3: pUC19+ TaqI.

明 (图 1) cDNA 第二条链的长度为 300~ 2 000 bp, 可用作 PCR 模板以扩增目的基因.

### 2.3 PCR 扩增牛促卵泡激素 $\alpha$ 亚基 cDNA

PCR 扩增产物的凝胶电泳结果显示 (图 2) 有一明显的 DNA 扩增带, 分子长度约为 380 bp 左右, 与 bFSH- $\alpha$  cDNA 分子大小一致.

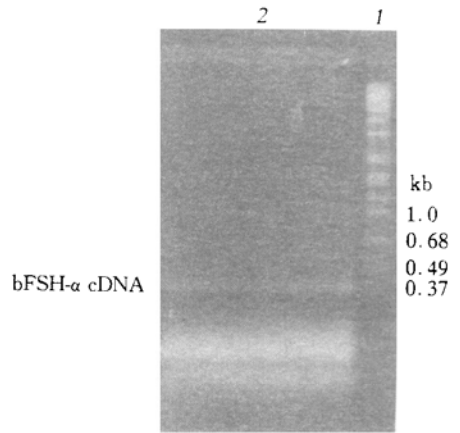


图 2 bFSH- $\alpha$  cDNA 的扩增

1: SppI DNA+ EcoRI; 2: bFSH- $\alpha$  cDNA 扩增片段.

### 2.4 PCR 产物的克隆与序列分析

将回收的 DNA 片段克隆于 pUC19 中, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取白色菌落, 提取质粒, 限制性酶切分析确定重组质粒. 用 DNA 序列分析仪对双链 DNA 进行序列分析 (图 3).

序列分析结果表明: 我们所克隆的 bFSH- $\alpha$  基因编码区序列与 Erwin<sup>[10]</sup> 所发表序列基本一致, 只是编码第 24 位赖氨酸的密码子是 AAA, 而 Erwin 报道的是 AAG, 这可能是因为: a. 动物个体基因有一定的突变. b. PCR 扩增时导致核苷酸错误掺入. 尽管如此, 该 cDNA 所编码的氨基酸序列与国外发表的序列完全一致.

### 2.5 哺乳类中各 $\alpha$ 亚基序列的比较

对人、牛、小鼠、大鼠糖蛋白激素  $\alpha$  亚基核苷酸及氨基酸序列的比较如表 1 所示, 这些序列在进化过程中具有很强的保守性.

```

- 24
5' AGA GCC ATG Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Val Ile Leu
   GAT GAT TAC TAC AGA AAA TAT GCA GCT GTC ATT CTG

- 10
Thr Ile Leu Ser Leu Phe Leu Gln Ile Leu His Ser Phe Pro
ACC ATT TTG TCT CTG TTT CTG CAA ATT CTC CAT TCC TTT CCT

Asp Gly Gln Phe Thr Met Gln Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu
GAT GGA GAG TTT ACA ATG CAG GGC TGT CCT GAA TGC AAG CTA

+ 20
Lys Glu Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp Ala Ala Ile Tyr
AAA GAA AAC AAA TAC TTC TCC AAA CCA GAT GCT GCA ATC TAT

+ 40
Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
CAG TGC ATG GGG TGC TGC TTC TCC AGG GCA TAC CCC ACT CCA

Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr
CCG AGG TCT AAG AAG ACA ATG TTG GTC CCC AAG AAC ATC ACC

+ 60
Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala
TCG GAA GCT ACA TGC TGT GTG GCC AAA GCA TTT ACC AAG GCC

+ 80
Thr Val Met Gly Asn Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys
ACA GTG ATG GGA AAT GTC AGA CTG GAG AAC CAC ACC GAG TGC

+ 96
His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser *** **
CAC TGC AGC ACT TGT TAT TAT CAC AAA TCC TAA TAG CTA GCAG 3'
    
```

图 3 牛促卵泡激素 α 亚基 cDNA 序列及相应的氨基酸序列

表 1 人、牛、啮齿类糖蛋白 α 亚基核苷酸与氨基酸序列比较

	牛/人	牛/小鼠	人/小鼠	小鼠/大鼠
氨基酸同源性	75%	90%	76%	97%
编码区核苷酸同源性	79%	85%	78%	94%

牛促卵泡激素 α 亚基 cDNA 的克隆将有利于其相应染色体 DNA 的克隆和筛选。从而确定除人以外的哺乳动物中编码糖蛋白激素 α 亚基的染色体 DNA 的组成结构及研究不同种中如人、鼠、牛等的同类激素 α 亚基基因 3'-非编码区及 3'-非转录区核苷酸序列的保守性, 以进一步确定此类激素家族基因的进化关系, 同时, α 亚基 cDNA 在真核细胞中与 β 亚基 cDNA 的同时表达将有利于促卵泡激素分泌到培养基中并增强其生物活性。

参 考 文 献

1 Pierce J G, Parsous T F. Glycoprotein hormones, structure and function. *Annu Rev Biochem*, 1981, **50** (2): 465~495

2 Fiddes J C, Goodman H W. Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the α subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature (Lond)*, 1979, **281** (4): 351~ 356

3 Chin W W, Kronenberg H M, Dee P C *et al*. Nucleotide sequence of the mRNA encoding the pre-α subunit of mouse thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (10): 5329~ 5333

4 Godine J E, Chin W W, Habener J F. α Subunit of rat pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem*, 1982, **257** (14): 8368~ 8371

5 艾秀莲, 陈新国, 季青等. 利用生物技术生产牛促卵泡激素 (bFSH). *中国科学 (B 辑)*, 1995, **25** (6): 604~ 609

6 孙国风译. 近期开始重组卵泡刺激素的治疗试验. *生物技术通报*, 1993, **3**: 15

7 Maurev R A, Anton Beck. Isolation and nucleotide sequence analysis of a cloned cDNA encoding the β subunit of bovine Follicle-stimulating Hormone. *DNA*, 1986, **5** (5): 363~ 369

8 Aviv H, Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69** (3): 1408 ~ 1412

9 Sambrook J F, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 396~ 405

10 Erwin C R, Croyle M L, Donelson J E *et al*. Nucleotide sequence of cloned complementary deoxyribonucleic acid for the α subunit of bovine pituitary glycoprotein hormones.

Biochemistry, 1983, 22 (10): 4856~ 4860

**Nucleotide Sequence of Cloned cDNA for  $\alpha$  Subunit of Bovine Follicle Stimulating Hormone.**

XI Feng-gong, YU Hong, CHEN Xin-guo, SHI Yu-hu (*Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Ürmqi 830000, China*); CHEN Qing-xuan, ZHANG Zhi-hong (*Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

**Abstract** Total RNA was prepared from pituitary of bovine. mRNA was isolated from the total RNA. cDNA was synthesized as template

used in PCR for amplification of cDNA for  $\alpha$  subunit of bovine follicle stimulating hormone. Sequence analysis showed that the obtained cDNA fragment is 380 bp and all these nucleotides except one coding for Lys of No. 24 are as same as that Erwin reported. Comparison of bovine, human and rodent indicated that the amino acid and nucleotide sequences of the  $\alpha$  subunit in these mammalian species are highly conservative.

**Key words**  $\alpha$  subunit of bovine follicle stimulating hormone, cDNA, nucleotide sequence analysis

# 环糊精交联固定酶的生物传感器及临床应用\*

李海虹

(浙江维美纺织公司医务科, 杭州 310015)

严少华 漆德瑶 刘海鹰

(上海大学化学化工系, 上海 200072)

**摘要** 通过交联方式将辣根过氧化物酶固定在 Eastman-AQ-N-甲基吩嗪修饰电极上, 制备成过氧化氢生物传感器. 通过循环伏安法和计时电流法证明固定在 Eastman-AQ 阳离子交换树脂中的 N-甲基吩嗪有效地在辣根过氧化物酶和玻碳电极之间传递电子. 由于该生物传感器对过氧化氢具有良好的生物电催化还原的功能, 所以将它与葡萄糖氧化酶和半乳糖苷酶结合, 制备成双酶和三酶体系的生物传感器, 用于葡萄糖和乳糖的测定. 该生物传感器具有灵敏度高、响应快、响应范围宽及选择性好等优点. 对糖尿病患者的血糖测定结果与采用葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶的分光光度法的结果一致.

**关键词** 生物传感器, Eastman-AQ 聚合物, N-甲基吩嗪, 辣根过氧化物酶, 葡萄糖, 乳糖,  $\beta$  环糊精  
**学科分类号** O657.1

酶与电极之间的有效电子传递在电流型生物传感器中起决定性的作用<sup>[1,2]</sup>. 虽然辣根过氧化物酶能够在热解石墨电极上发生直接电子传递, 但是由于空间障碍, 这种直接电子传递过程比较缓慢, 因此利用这种方式制备的生物传感器对过氧化氢响应不灵敏<sup>[3]</sup>. 采用一些氧化还原物质作为辣根过氧化物酶与电极之间的电子传递体是克服上述电子传递缓慢的一种有效途径. 常使用的电子传递体有二茂铁及其衍生物<sup>[4]</sup>、二茂镍<sup>[5]</sup>、铁氰化钾<sup>[6]</sup>和钌联吡啶化合物<sup>[7]</sup>. 但这些电子传递体对抗坏血酸

具有催化作用, 使得采用这类电子传递体的生物传感器受生物样品中抗坏血酸的干扰. 本文采用 N-甲基吩嗪为辣根过氧化物酶的电子传递体<sup>[2]</sup>, 将其固定在 Eastman-AQ 聚合物膜中, 制成 Eastman-AQ-N-甲基吩嗪修饰电极. 将辣根过氧化物酶交联在聚  $\beta$  环糊精上, 然后将其固定在修饰电极的表面, 制成过氧化氢生物传感器. 该生物传感器具有对过氧化氢响应

\* 国家自然科学基金 (29675012) 和上海市教委资助项目.  
收稿日期: 1996-12-23, 修回日期: 1997-06-09