

在大肠杆菌中分泌型表达人 α 心钠素衍生物

李 磊¹ 郭文彤² 李光地² 王健平³
张迺衡¹ 李载平² 曾桂超¹ 汤 健³

(1. 北京医科大学生化教研室 北京 100083
2. 上海生物化学研究所
3. 北京医科大学心肺内分泌研究室)

摘要 我们化学合成及克隆了 α -ANF基因并将其重组于大肠杆菌分泌型表达质粒pIN-III-OmpA进行表达;表达产物为N端多11肽的39肽 α -ANF类似物,完全分泌至培养外液中;生物学活性测定表明,表达产物具有与天然心钠素相同的免疫活性及降压、利尿和舒张血管的生物活性。

关键词: DNA合成; 基因克隆; 基因表达; 心钠素; OmpA 信号肽

人 α 型心钠素(α ANF)是由人心房肌细胞分泌的多肽激素,全长28个氨基酸,具有极强的利尿、利钠、降压及舒张血管的作用^[1],它在高血压、心肾功能不全的防治上具有潜在的应用价值。由于心钠素来源困难,且其在体内的半衰期较短,因此,利用基因工程技术大量生产并在基因水平上加以改造,以获得高效稳定的心钠素产品,将进一步开辟生物学研究以及为临床应用提供广泛的前景。

α ANF除了链内一对二硫键外,并无生物学活性必需的糖化、脂化位点,所以完全有可能在原核细胞表达体系中进行生物合成。本文报告了我们化学合成的编码天然 α ANF的cDNA,并克隆在大肠杆菌表达载体pIN-III-OmpA中,与细菌外膜蛋白A信号肽的部份基因构成融合基因,在Lpp-Lac杂合启动子及LacI基因作用下实施表达及调控,融合蛋白自动剪除信号肽部分并分泌至细胞膜间质^[2],活性检测表明分泌产物具有天然 α ANF的放免特性和降压、利尿和舒张血管的生物活性。

材 料 和 方 法

一、DNA化学合成 采用固相亚磷酸法于ABI 380 A型DNA自动合成仪上合成。合成粗产品的制备及纯化参照ABI公司提供的方法。

二、质粒DNA和受体细菌 PIN-III-OmpA₁, A₂, A₃及E. coli 宿主细菌JA221(Lpp⁻,

hd sM⁺, trpE₈, LeuB₈, LacY, recA₁/F₁LacI⁸, Lac⁺Pro⁺), W₈₂₀(F⁺LacI⁸)由美国新泽西州立大学医学院生化系 M. Inouye 教授赠给。E. coli JM109, pUC19, M13mp8 购自 Boehringer Mannheim 公司。细菌培养基为 YT 液体培养基 (16g 蛋白胨, 10g 酵母提取物, 5g NaCl 溶于 1000mL 去离子水中, 高压灭菌)。补充 M₉ 培养基 (M₉ 基本培养基补加葡萄糖至 4mg/mL, 色氨酸 20μg/mL, 亮氨酸 20μg/mL, 硫胺素 2μg/mL 和氨苄青霉素, 50μg/mL)。

三、DNA 重组反应 连接反应的条件: 50mmol/L Tris-Cl(pH7.6), 10mmol/L MgCl₂, 10mmol/L DTT, 1mmol/L ATP, 14°C 保温过夜。

四、受体细胞的制备、转化、质粒的抽提及菌落的原位杂交等, 按 Maniatis 等^[3]的方法。

五、DNA 序列分析 采用双脱氧末端终止法^[4], 反应试剂及 Klenow 酶为美国 Bio-Labs 公司产品。α-[³²P]-dATP(10mCi/mL) 及 α-[³⁵S]-dATP(600Ci/mmol) 为英国 Amersham 公司产品。

六、细菌膜间质蛋白抽提 参照文献 (5) 的方法。细菌培养物在 4°C, 5 000rpm 下离心 10 分钟。将菌体重新悬浮于 1/20 原体积的 20% 蔗糖, 25mmol/L EDTA 溶液中, 0°C 放置 30 分钟, 离心除去上清, 加入同样体积的无菌三蒸水, 0°C 持续振荡 30 分钟, 离心除去沉淀, 上清液即为膜间质蛋白抽提液。

结 果

一、αANF 基因设计、合成及序列分析

αANF 合成基因的 DNA 顺序主要参照 Kawa^[6] 等发表的 ANF 前体 cDNA 的序列, 由计算机辅助完成设计。整个基因分为 6 条寡聚核苷酸片段进行合成, 在保持氨基酸组成及顺序不变的前提下, 适当变换个别碱基, 在合成基因中引入了 Bgl II, Sac I 及 Taq I 三个限制性内切酶识别位点, 便于基因筛选和鉴定。为了表达完整的 28 肽 αANF, 在结构基因的两端分别加入起始密码 ATG 和终止密码 TAA, 并在 ATG 前加 Pst I 切点, 在 TAA 后面加 Hind III 切点。选择 TAA 作为终止密码不仅可以同 Hind III 切点共用 AA 两个碱基, 还可在 Hind III 酶解后用 S₁ 酶消化, 去掉 TAA 末尾的 A, 再与 C 或 T 起始的片段相连, 即可除去终止信号, 这一设计为今后组建融合蛋白基因提供了方便 (Fig. 1)。

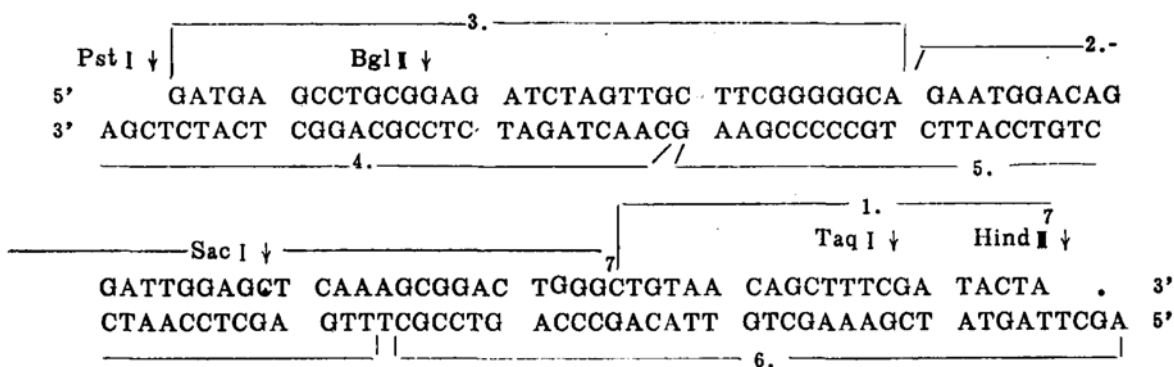


Fig. 1 Synthesis of α-ANF cDNA

设计的6条寡聚核苷酸片段通过固相亚磷酸三酯法在ABI 380A型DNA合成仪上合成。粗产物通过制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离纯化。产品以 γ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP标记末端,在10%聚丙烯酰胺凝胶电泳上鉴定其纯度,得到6条寡聚核苷酸片段的单一条带。纯化后的片段调至10pmol/ μL 浓度。6种纯化片段各取20pmol,用 T_4 多聚核苷酸激酶和 γ - $[^{25}\text{P}]$ -ATP标记5'末端。将上述混合物加热至65 $^{\circ}\text{C}$,10分钟后降至57 $^{\circ}\text{C}$ 放置2小时,再让其逐渐冷却至室温。调节反应体系至连接反应条件,加入5单位 T_4 DNA连接酶,14 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。电泳检测证明6条片段一次性粘合连接成完整的、100核苷酸长的双链 α ANF cDNA。

将上述连接混合物与经PstI-HindIII酶解的RFM13mp8连接过夜,转化E.coli JM103受体菌,通过IPTG-Xgal平板选出白色噬斑。抽提白色噬斑的RF DNA,分别进行EcoRI-HindIII; BamHI-HindIII, PstI-HindIII酶解,以pBR322-HinfI酶解片断为分子量标准进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,可见上述酶解产物中的100bp长的片段,与 α ANF的设计长度相符。

用Sanger末端终止法测定M13mp8中插入片段的DNA顺序,从放射自显影图片上可读出完整的 α ANF DNA顺序,与设计顺序完全一致(Fig.2)。

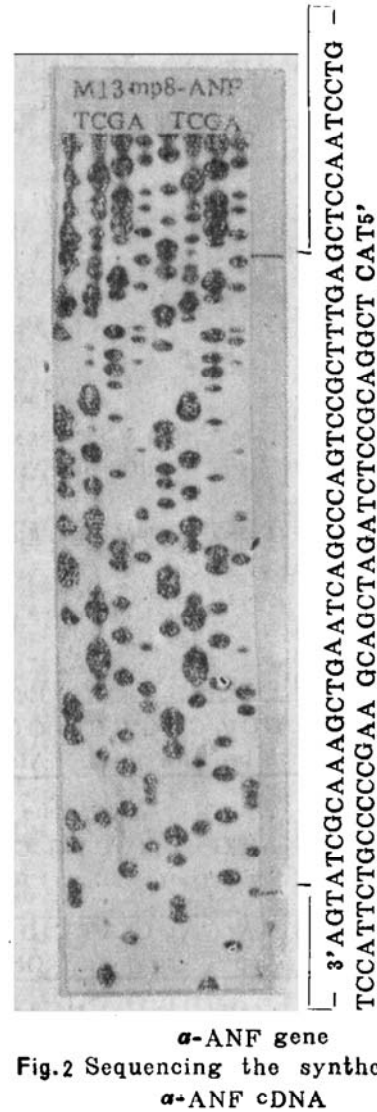
二、表达质粒的构建

表达载体pIN-III-OmpA₁提供的外源插入基因位点为E.coli, HindIII, BamHI。以EcoRI-HindIII双酶解质粒,然后从低熔点琼脂糖凝胶中回收载体片段。以EcoRI-HindIII的形式从RFM13mp8- α ANF中切出 α ANF cDNA片段,加入制备的pIN-III-OmpA₁片段,用 T_4 DNA连接酶连接后转化JA221受体细胞。随机选取100个抗氨基青霉素转化子,用合成基因的5号寡聚核苷酸片段为探针进行菌落原位杂交,共得到23个杂交阳性菌落。构建后的重组质粒如图3所示。

三、表达质粒的酶谱分析及接头区DNA序列测定

pIN-III-OmpA质粒不含BglII切点,而在合成基因中引入了BglII切点,为鉴定重组质粒提供了方便。我们选取4个杂交阳性克隆分别以BglII酶解,电泳结果表明这4株克隆质粒均引入了BglII切点。以PstI-HindIII对上述4个克隆进行双酶解,均获得一长约100bp的酶解片段,表明该克隆质粒插入了完整的 α ANF合成基因。我们将该克隆称为pO₁ α ANF。

以XbaI-HindIII双酶切下pO₁ α ANF质粒中信号肽基因与 α ANF基因接头区的片段,克隆于RFM13mp19中,构建成重组噬菌体M13mp19-OA₁,以双脱氧末端终止法测定重组噬菌体单链DNA序列。从读出的接头区顺序可以看出, α -ANF基因的氨基酸读码框架与OmpA



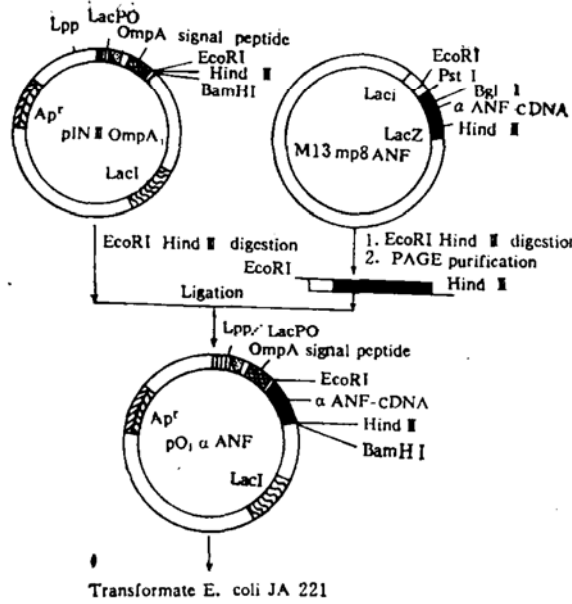


Fig.3 Strategy for the construction of the expression vector of the synthetic α -ANF cDNA

信号肽相符，且插入片段的接头与实验设计完全一致 (Fig.4)。

Signal peptide cleavage site

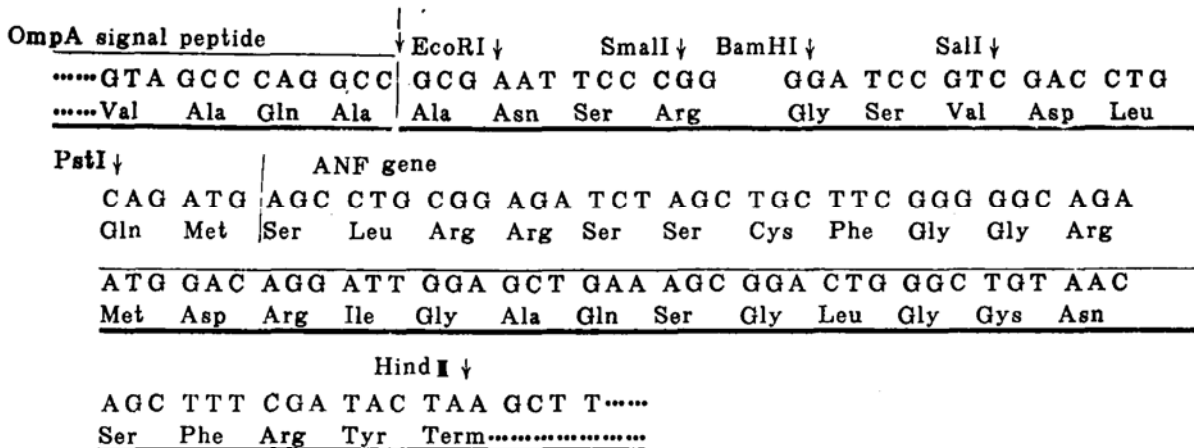


Fig.4 Sequencing the DNA fragment containing OmpA signal peptide coding region and α -ANF cDNA

四、pO₁ α ANF在E. coli 宿主菌内的表达

含有表达质粒 pO₁ α ANF 的 JA221 菌株，在 IPTG 诱导条件下进行产物表达。为了便于分析产物在膜间质和培养外液间的分配，我们选择了补充的 M₉ 液体培养基进行培养，以空载 pIN-III-OmpA₁ 质粒为对照，在 37°C 下培养至 O.D.600 为 1.0，按新述方法提取细菌膜间质蛋白，同时将培养液冷冻干燥后透析除盐。

以标准心钠素样品为阳性对照，以空载质粒样品为阴性对照，应用特异性心钠素抗体对表达产物的上述两种样品进行竞争性放射免疫活性测定。结果表明在培养外液中有高浓度的 α ANF 免疫活性，含量约 80ng/mL；而在膜间质产物中则没有探测到 α ANF 的放免活性。结果

说明表达产物全分泌至培养外液中。用离体大鼠尾动脉灌流系统测定样品对去甲肾上腺素的拮抗的生理作用。结果表明,表达产物的舒张血管作用远大于对照组。另外,整体大鼠的测定结果还表明表达产物与对照相比,具有明显的利尿及降血压作用(数据未示)。

讨 论

用放射免疫法测定培养基和细菌膜间质抽提物的结果表明,产物并非定位于膜间质,而是全部进入培养基。主要原因是由于分子量过小而引起的渗漏。类似的情况也发生在利用 pIN-III-OmpA 系统表达 TGF- α 的过程^[7]。其次,为降低放免测定时的本底而选用了渗透压较低的 M₉ 培养基,也是造成产物外泄的原因之一。同时,低养分的 M₉ 培养基也是产量不高的原因。因而,换用养分丰富的培养基并进行高密度发酵,可望使表达产量有较大的提高。

pIN-III-OmpA₁ 表达产物的信号肽剪切位点是在外源基因插入位点之前。因此, α ANF 产物的 N 端带有由 M13mp8 多接头区所编码的 11 个氨基酸,利用定向点突变技术删除这段 DNA 顺序后,即可得到天然 α ANF 的表达株。另外,随着对 α ANF 分子结构及生物学功能的深入研究,利用基因定向突变技术改换 α ANF 中适当的氨基酸,可望得到高效、长半衰期的心钠素衍生物。

参 考 文 献

- [1] Tanaka J, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 124:633
- [2] Hiroshi T, et al. *Biotechnology*, 1988, 6:948
- [3] Maniatis T, et al. *Molecular Cloning*, CSH 1982
- [4] Sanger F, et al. *PNAS*, 1977, 74:5463
- [5] Hansen M H, et al. *Biotechnology*, 1986, 4:991
- [6] Kawa S, et al. *Nature*, 1984, 309:724
- [7] Makari Y, *Personal communication*, 1987

Chemical Synthesis and Secretive expression of Human α -ANF Gene in E.coli

Li, Lei Guo, Wen-Tong Li, Guang-di Wang, Jian-ping Zhang, Nai-heng Li, Zai-ping Zeng, Gui-chao Tang, Jian

(Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083)

Abstract We have chemically synthesized and cloned the cDNA encoding human α -atrial natriuretic factor (α -ANF). The cDNA was inserted into an E.coli expression vector pIN-III-OmpA. The recombinant plasmid produced an ANF like peptide which exhibited immunological and physiological properties identical to natural human α -ANF.

Key word: DNA synthesis; Gene cloning; Gene expression; Atrial natriuretic factor; Omp signal peptide