

# 化学合成的人 $\alpha$ -心房肽基因在SUC2启动子-信号 顺序控制下的表达

秦 宁 李育阳 杨 迪 王启松

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

本文报道将化学合成的人 $\alpha$ -心房肽( $\alpha$ -hANP)基因与酵母分泌型表达载体YFD6 $\Delta$ 21重组,使 $\alpha$ -hANP基因在蔗糖酶基因(SUC2)启动子-信号顺序指导下,在酵母菌中合成和分泌有活性的 $\alpha$ -hANP。放射免疫分析表明: $\alpha$ -hANP基因只有在葡萄糖去阻遏条件下才能得到表达,而且其表达量与细胞浓度成正比。此外,95%以上表达产物被分泌到培养液中。

**关键词** 心房肽;基因表达;分泌;SUC2启动子;酵母

心房利钠多肽简称为心房肽(Atrial Natriuretic Peptide, ANP)是由哺乳动物心房组织的心肌细胞分泌的一种多肽类激素。它对哺乳动物及人的体液中电解质平衡、血容量、血管紧张度以及血压调节都起着极其重要的作用,很有希望成为治疗充血性心力衰竭,高血压等疾病的最佳药物之一<sup>[1]</sup>。

自1983年 deBold<sup>[2]</sup>首次从大鼠心房组织中分离得到心房肽以来,许多实验室都相继分离出各种类型的具有心房肽活性的多肽分子。大量实验证明:心房肽并非是一种均一的多肽分子,而是来自于同一个前体分子,经剪切、加工后产生的一系列大小不同功能相似的多肽化合物<sup>[3-5]</sup>。其中分子量较小,作用较强,且研究和应用比较广泛的是由28个氨基酸残基组成的 $\alpha$ -心房肽( $\alpha$ -hANP),分子量为3000道尔顿左右<sup>[6]</sup>。

由于心房肽有十分诱人的应用前景,世界上许多国家都在致力于ANP的多肽化学合成和基因工程方面的研究。我国在这方面起步较早,1986年施溥涛等<sup>[7]</sup>用固相化学合成法合成了ANP24肽(又称为心耳素II),1986年施文等<sup>[8]</sup>在国内首

次用化学合成的鼠ANP28肽基因成功地在大肠杆菌系统中以融合蛋白形式得到了表达。1986年 Vlasuk 等<sup>[9]</sup>用 $\alpha$ 因子启动子指导hANP 24肽在酵母中合成和分泌。前文<sup>[10]</sup>我们报道了可以使外源基因处于SUC2基因启动子-信号顺序控制下进行表达的载体,HBsAg基因在这个系统中表达水平很低,且未能检测到表达产物的分泌。本文报道的是利用这个系统表达化学合成人 $\alpha$ -心房肽基因的初步结果。

## 材料与 方法

### (一) 材料

1. 菌株与质粒:酵母菌受体菌为:DCO4 ( $\alpha$  ade1 leu2-04 GAL Cir<sup>+</sup>)为本室保存。BJ1991 ( $\alpha$  leu2 trp1 ura3-52 prb1-1122 pep4-3)、BJ2168 ( $\alpha$  leu2 trp1 ura3-52 prb1-1122 pep4-3 pre-407)和DBY746 ( $\alpha$  his3- $\Delta$ 1 leu2-3 leu2-112 ura3-52 trp289)均来自YGSC。大肠杆菌 *E. coli* Mc1061为组建和扩增质粒DNA的受体菌,*E. coli* JM103为测定DNA序列

本文于1987年8月21日收到。

时用于M13mp8扩增的受体菌。质粒 YFD6  $\Delta$ 21为酵母分泌型表达载体<sup>[10]</sup>。

2. 酶与试剂: 限制性内切酶、T4DNA连接酶、多聚核苷酸激酶和DNA多聚酶大片段为 Biolabs 或 Boehringer mannheim产品。

## (二) 方法

1.  $\alpha$ -hANP 基因片段的合成和组装:  $\alpha$ -hANP基因及其两端接头的DNA双链分8个片段以固相亚磷酸胺法在ABS 380A型DNA合成仪上合成。按文献[11]将合成片段5'端磷酸化后, 各取1 $\mu$ mol混合, 80℃退火3 min, 自然冷却至室温, 加入40 $\mu$ l连接缓冲液和10u T4 DNA连接酶, 12℃反应24h。

2. 连接反应: 反应体系中含有0.01 $\mu$ g末端经磷酸化后的 $\alpha$ -hANP基因, 0.3 $\mu$ g载体DNA, T4DNA连接酶2u, 反应总体积为20 $\mu$ l, 12℃连接过夜。缓冲液中有66mmol/L Tris-HCl (pH7.5)/5mmol/L MgCl<sub>2</sub>/5mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇/1mmol/L ATP。

3. 质粒DNA的转化: 大肠杆菌转化按略加修改的Mandel和Higa<sup>[12]</sup>方法进行; 酵母转化则按稍加修改的醋酸锂<sup>[13]</sup>方法进行。

4. 菌落原位杂交: 按文献[11]进行, 探针采用经<sup>32</sup>P末端标记的化学合成的 $\alpha$ -hANP基因单链片段A7(54—84)。

5. DNA片段的制备: 质粒YFD36 DNA经BamHI酶切后, 用5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后按文献[11]中醋酸铵方法进行洗脱、纯化。

6. DNA序列分析: 将制备的 $\alpha$ -hANP DNA片段重组到M13mp8的BamHI切点进行序列分析。M13序列分析试剂盒为BRL产品, 并按该公司推荐方法进行。

7.  $\alpha$ -hANP表达产物的放射免疫检

测: 酵母转化子的培养, 测定样品的制备见前文<sup>[10]</sup>。用放射免疫法分别测定细胞内、细胞周质空间以及培养液中 $\alpha$ -hANP活性。ANP放射免疫药盒为解放军总医院中心实验室产品, 按该室所提供的方法进行测定。

## 实验结果

### (一) 表达载体的构建与筛选

如图1所示, 载体YFD6 $\Delta$ 21经BamHI酶切后, 用碱性磷酸酯酶处理<sup>[11]</sup>, 以防载体在DNA连接酶作用时自身环化, 简化筛选过程。如材料与方法中所述装配 $\alpha$ -hANP基因, 将5'末端磷酸化后, 再以BamHI酶切后, 然后与上述载体连接, 转化大肠杆菌, 得到的转化子用菌落原位杂交方法钓出有插入片段的重组子。由于重组采用BamHI酶单切点,  $\alpha$ -hANP基因的插入方向就有二种可能性。利用 $\alpha$ -hANP基因靠近5'端8bp处有Hind III酶单切点作为参考位点, 同时载体BamHI位点下游约400bp处也有一个Hind III酶切位点。若 $\alpha$ -hANP基因正向插入, 用Hind III酶切后可得到约500bp左右的片段, 这是400bp加上 $\alpha$ -hANP基因90多bp所致, 而反向插入仅可得到410bp左右的片段。我们把正向插入的质粒称为YFD36。图版I是YFD36经Hind III酶切后在5%聚丙烯酰胺凝胶上电泳图谱。

$\alpha$ -hANP基因正向插入到SUC2启动子-信号顺序的下游处, 保持了转录方向的一致。在SUC2启动子-信号顺序下游还保留分泌性蔗糖酶前22个氨基酸残基的序列, 但序列分析证明, 它们与 $\alpha$ -hANP基因的阅读框保持一致(图2)。

### (二) $\alpha$ -hANP基因的序列分析

将在YFD36中带有 $\alpha$ -hANP基因的

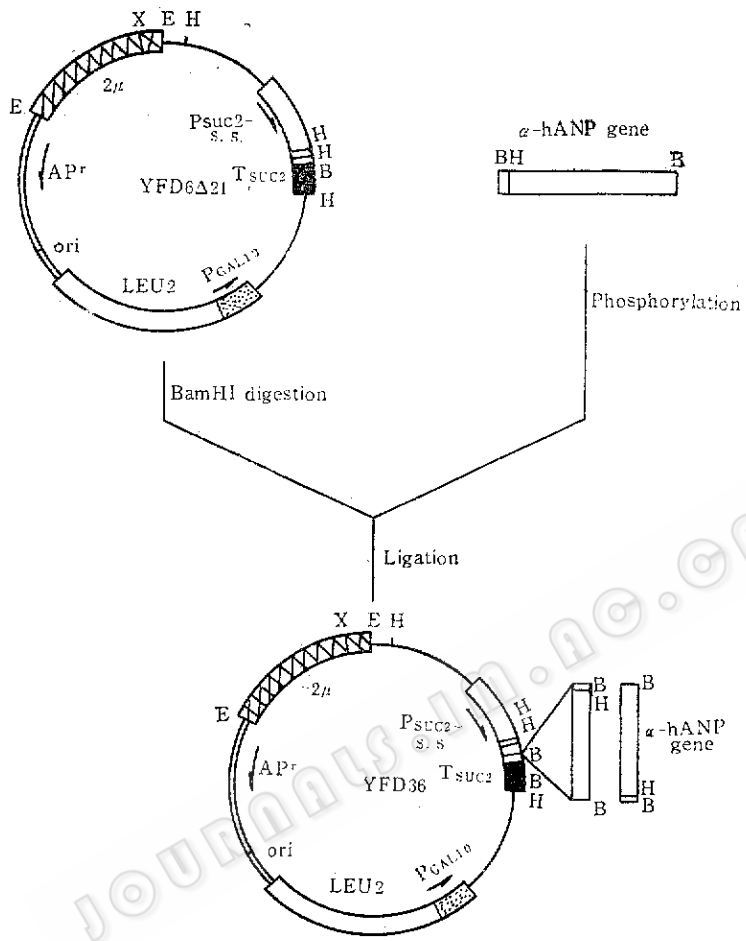


图 1 表达载体YFD36的构建  
Fig.1 Construction of expression vector YFD36

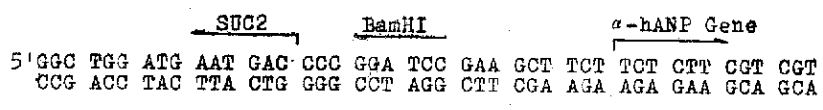


图 2 YFD36中SUC2和α-hANP基因接头顺序  
Fig.2 DNA sequence of the SUC2-α-hANP gene junction in YFD36

BamHI片段分离出来，重组到噬菌体M13 mp8中，然后测定α-hANP 基因的核苷酸序列，分析结果如图 3。这与我们先前设计的序列完全一致。

**(三) YFD36在酵母细胞中的稳定性**

用酵母DCO4(Cir<sup>+</sup>)作为受体菌，将YFD36转化，取得 LEU<sup>+</sup>的酵母转化子。转化子在非选择培养液YEPD中生长 18h，

培养物经适当稀释，涂布于YEPD 平板上，使每个平板上的菌落在 200 个左右。将长出的菌落影印到SD-leu选择性平板上。由于质粒的丢失，在 YEPD平板上的菌落有 33%左右不能在选择性平板上生长。

**(四) α-hANP在酵母中的合成与分泌**

将重组质粒YFD36转化到酵母受体菌所得的转化子经低糖 (0.05%葡萄糖) 条

BamHI HindIII Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly  
 5' GGATCGGAAGCTTCT TGT CTT CGT GGT TCT TCT TGC TTC GGT GGT  
 CCTAGGCTTCGAAGA AGA GAA GCA GCA AGA AGA ACG AAG CCA CCA

Arg Met Asp Arg Iiv Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn  
 CGT ATG GAC CGT ATC GGT GGT CAG TCT GGT GTT GGT TGC AAC  
 GCA TAC CTG GCA TAG CCA CGA GTC AGA CCA GAA CCA ACG TTG

Ser Phe Arg Tyr Stop BamHI  
 TCT TTC CGT TAC TGA GGATCC  
 AGA AAG GCA ATG ACT CCTAGG

图 3  $\alpha$ -hANP 基因的序列分析  
 Fig.3 DNA sequence of  $\alpha$ -hANP gene

件下培养使 SUC2 启动子去阻遏。制备培养液 (I)、细胞周质空间 (II) 以及细胞内 (III) 三种样品, 用放射免疫法分别测得各个样品的  $\alpha$ -hANP 的放免活性。总的表达量为每升 87.1  $\mu$ g, 其中培养基中占 95% 左右, 而细胞内和细胞周质空间中分别占 3% 和 2% 左右 (表 1)。说明用 SUC2 基因的启动子-信号顺序可有效地指导  $\alpha$ -hANP 基因的分泌性表达。表达产物的分泌效率已达到相当高的水平。

#### (五) 培养条件对 $\alpha$ -hANP 基因表达水平的影响

为了提高  $\alpha$ -hANP 基因的表达水平, 我们进行了不同培养条件下  $\alpha$ -hANP 基因表达水平的研究。

1. 去阻遏前培养条件对表达水平的影响: 如图 4, 在固定去阻遏时间为 3h 的前提下, 随着去阻遏前培养时间的延长,  $\alpha$ -hANP 基因表达水平在 24h 左右达到一个高峰, 随后表达量明显降低。

2. 去阻遏时间对  $\alpha$ -hANP 基因表达水平的影响: 在固定去阻遏前培养时间为 24h 的前提下, 改变去阻遏培养时间。如图 5 所示,  $\alpha$ -hANP 基因的表达水平随着去阻遏培养时间的延长有一定的提高, 但提高幅度不大, 当去阻遏培养时间延长 3 倍时, 表达量提高约为 2 倍左右。

3. 培养基成分中添加酪素水解物对  $\alpha$ -hANP 表达水平的影响: 在不添加酪素

表 1 放射免疫法测定  $\alpha$ -hANP 活性  
 Table 1 Detection of  $\alpha$ -hANP activity by radioimmunoassay

Samples	I $\times 10^{-1}$	II	III
cpm	1728	1435	1400
B/B <sub>0</sub> $\times 100\%$	35.2	22.0	20.1
ANP (ng/ml)	8.32	18.62	20.89
ANP ( $\mu$ g/L)	83.2	1.4	2.5

1. 表内 cpm 值为 3 次测定平均值
2. 阴性对照 = 3085; B<sub>0</sub> = 2852, 非特异性吸附 = 1032
3. 根据所做标准曲线, 查出总表达量为 87.1  $\mu$ g/L, 分泌产物占总表达量的 95% 左右
4. I、II 组分中  $\alpha$ -hANP 含量的计算公式:

$$\frac{\text{ANP (ng/ml)} \times 3 \times 1000 (\text{ml})}{40 (\text{ml})}$$

1. Each cpm value is the average of three assay
2. Negative control = 3085, B<sub>0</sub> = 2852, No antibody = 1032
3. According to the standard curve, the total expression level is 87.1  $\mu$ g/L, and secretion level is more than 95%
4.  $\alpha$ -hANP activity of component I and II in

$$1 \text{ liter culture} = \frac{\text{ANP (ng/ml)} \times 3 \times 1000 (\text{ml})}{40 (\text{ml})}$$

水解物时  $\alpha$ -hANP 基因的表达量每立升只有 10  $\mu$ g 左右。如加入 0.5% 酪素水解物, 在相同的培养时间内, 菌体量明显增加 (A<sub>600</sub> 约提高 3 倍左右),  $\alpha$ -hANP 的表达量也随之提高到 87.1  $\mu$ g/L, 提高近 8 倍。

#### (六) 不同宿主菌对 $\alpha$ -hANP 表达水平的影响

将 YFD36 DNA 分别转化到宿主菌 BJ 1991, BJ2168 和 DBY746 (其中 BJ1991,

BJ2168为蛋白酶缺陷的菌株)中。测定各转化子中 $\alpha$ -hANP 基因的表达水平及表达产物的分泌。结果表明:和宿主菌DCO4相比, BJ1991, BJ2168和DBY746三种转化子 $\alpha$ -hANP 的总表达量均略有下降, 而分泌到培养液的百分比则明显下降。分别为48%, 21%和34%。

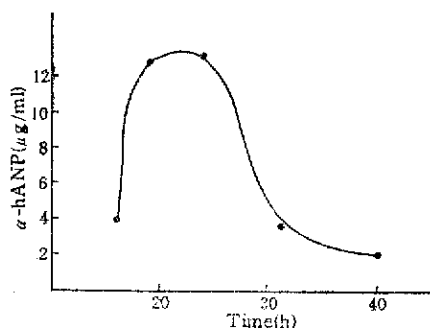


图4 去阻遏前培养时间对 $\alpha$ -hANP表达水平的影响

Fig.4 The effect of cultivation time before derepression on the expression level of  $\alpha$ -hANP gene

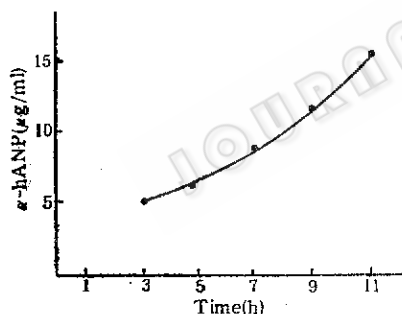


图5 去阻遏培养时间对 $\alpha$ -hANP基因表达水平的影响

Fig.5 The effect of derepression time on the expression level of  $\alpha$ -hANP gene

## 讨 论

本文报道了将SUC 2 基因启动子-信号顺序与 $\alpha$ -hANP基因融合在一起, 指导 $\alpha$ -hANP 基因的表达和产物的分泌。实验证明:  $\alpha$ -hANP 可以在酵母中合成并可有效地分泌到培养液中, 这与Chang等<sup>[14]</sup>的实验结果相似, 他将SUC 2 信号顺序与

人 $\alpha$ -干扰素基因融合在一起, 使干扰素在其指导下得到分泌性的表达, 并得到正确的加工。在我们构建的系统中大约95%左右在酵母中合成的 $\alpha$ -hANP 被分泌到培养液中, 只有极少数表达产物仍留在细胞内或细胞的周质空间, 这一结果再次说明SUC 2 的信号顺序包括了酵母分泌蛋白质所需的识别信息。而且说明由SUC 2 基因启动子-信号顺序构建的分泌型表达系统与由 $\alpha$ 因子基因启动子-信号顺序构建的表达系统一样可以用于外源基因的分泌性表达。而对于像 $\alpha$ -hANP 这样的小肽化合物更为有效。我们还未对表达产物的分子量和一级结构作进一步的鉴定, 因此还不能肯定翻译后的加工过程是否能正确进行。

化学合成的 $\alpha$ -hANP基因在SUC 2 基因启动子-信号顺序指导下的表达和产物的分泌是成功的, 特别是表达产物的分泌效率比较满意。但总的表达水平还不够理想。我们估计表达低的原因可能是酵母菌中存在的蛋白酶对新合成的异源多肽有一定的水解作用, 因此我们曾改用蛋白酶缺陷的菌株作为宿主, 但结果并不满意, 表达量有所下降, 分泌百分比下降更明显。或许这是因为蛋白酶的缺陷虽然可以减少对表达产物的破坏, 但同时可能也影响该系统中蛋白质分泌和翻译后的加工过程。其次, YFD36在酵母细胞中的稳定性也较差, 这对表达量也是有影响的。此外, 由于我们所用的合成基因在设计时选用的是大肠杆菌密码子系统。这对酵母系统中的表达可能会带来一定的影响。

我们虽然也从改变培养条件, 如: 前培养时间, 去阻遏培养时间以及改变培养基成份等来提高表达量作了一些探索。当我们在培养液中增加0.5%的酪素水解物后菌体增加三倍, 表达量也增加八倍, 有较好的效果。此外, 从我们的实验结果看

把去阻遏前培养时间控制在 24h 左右, 适当延长去阻遏培养时间也能提高表达水平, 但提高的幅度并不太大。如何进一步提高表达水平仍是今后必需进一步进行的工作。

### 参 考 文 献

- [1] deBold, A.J., *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 170:133, 1982.
- [2] deBold, A.J. & Flynn, T.G., *Life Sci.*, 33:297, 1983.
- [3] Yamanaka, M.et al., *Nature*, 309:719, 1984.
- [4] Maki, M.et al., *Nature*, 309:722, 1984.
- [5] Oikawa, S.et al., *Nature*, 309:724, 1984.
- [6] Kanagawa, K.et al., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 118:131, 1983.
- [7] 施涛涛等: 上海医科大学学报, 13:161, 1986.
- [8] 施文等: 生物工程学报, 3:152, 1987.
- [9] Vlasuk, G.P.et al., *J.Biol.Chem.*, 261:4789, 1986.
- [10] 赵家刚等: 生物工程学报, 4(4):, 1988.
- [11] Maniatis, T.et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, 1982.
- [12] Mandel, M. & Higa, A., *J.Mol.Biol.*, 53:139, 1970.
- [13] Ito, H.et al., *J.Bacteriol.*, 153:163, 1983.
- [14] Chang, C.N.et al., *Mol.Cellular.Biol.*, 6:1812, 1986.

## EXPRESSION OF CHEMICAL SYNTHESIZED $\alpha$ -hANP GENE DIRECTED BY SUC2 PROMOTER-SIGNAL SEQUENCE

Qin Ning Li Yuyang Yang Di Wang Qisong

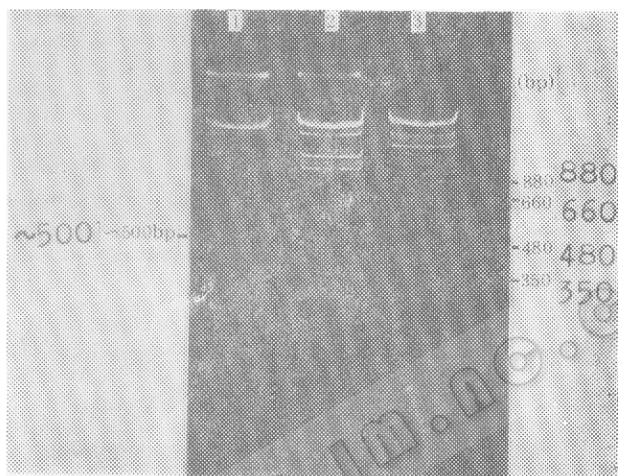
(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai)

The Chemical synthesized  $\alpha$ -hANP gene has been inserted into yeast expression vector YFD6 $\Delta$ 21. The expression of  $\alpha$ -hANP gene was directed by SUC2 promoter-signal sequence. The results of radioimmunoassay showed that the yeast cells containing chimeric vector can synthesize  $\alpha$ -hANP only at glucose derepression condition, and the expression level was related to the cell concentration. In addition, more than 95% of expressed  $\alpha$ -hANP was secreted into the medium.

### Key words

$\alpha$ -hANP; gene expression; secretion; SUC2 promoter; yeast

秦 宁等：化学合成的人 $\alpha$ -心房肽基因在SUC2启动子-信号顺序控制下的表达  
 Qin Ning et al.: Expression of chemical synthesized  $\alpha$ -hANP gene directed  
 by SUC2 promoter-signal sequence



YFD<sub>36</sub>中 $\alpha$ -hANP基因插入方向分析

Analysis of  $\alpha$ -hANP gene orientation in YFD<sub>36</sub>

YFD<sub>36</sub>经Hind III 酶切后在 5 % 聚丙烯酰胺上电泳分离

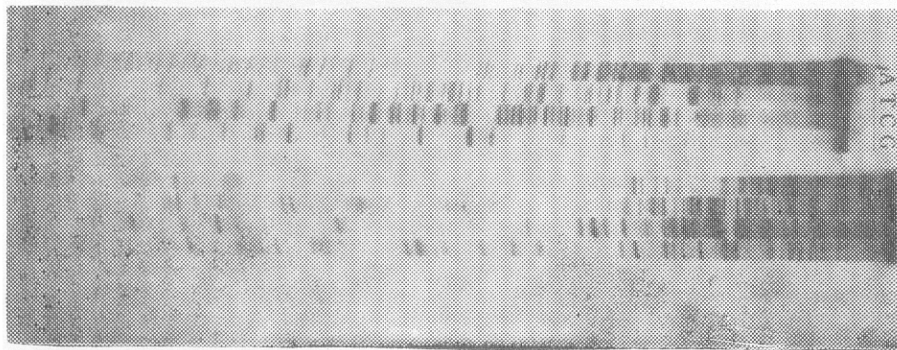
YFD<sub>36</sub> was cut with Hind III and subjected to electrophoresis in : 5 % polyacrylamide gel

1. YFD<sub>36</sub> 2. YFD<sub>36</sub> was cut with Hind III 3. Size standards, SpsI DNA digested with EcoRI

齐顺章等：猪生长激素cDNA的全序列分析

图版 I

Qi Shunzhang et al.: cDNA sequencing of the porcine growth hormone Plate I



猪生长激素cDNA放射自显影图

Autoradiogram of sequence analysis of pGH cDNA