

## 人 $\alpha$ 降钙素基因相关肽基因在酵母细胞 中的分泌表达与产物的分离纯化

高长寿 毛申兰 陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

施溥涛

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

**摘 要** 化学合成的人  $\alpha$  降钙素基因相关肽 (CGRP) 基因用 PCR 法改造后使其能正确融合在酵母分泌型表达载体 pVT102U/ $\alpha$  中的  $\alpha$  交配因子前导肽序列之后, 然后进行克隆并转化酵母宿主菌 S-78 进行表达, 培养物的上清用酶标 (ELISA) 鉴定为阳性, 而对照 S-78、pVT102U/ $\alpha$  为阴性, 表达量用 ELISA 定量大于 2mg/L。表达产物经阳离子交换层析 (CM-Sephadex C<sub>25</sub>) 和 HPLC 纯化得到了 HPLC 纯产品。纯化后的 CGRP 能引起小鼠血压的降低, 说明表达的目的蛋白既有 CGRP 的免疫结合活性, 又有 CGRP 的生理活性。测定其 N-端 10 个氨基酸序列, 证明人工合成的 CGRP 基因在酵母细胞中已正确表达。

**关键词** 降钙素基因相关肽, 酵母细胞, 分泌

降钙素基因相关肽 (Calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是 1982 年 Amara 等人<sup>[1]</sup>从甲状腺髓样瘤细胞中克隆和发现的一种活性多肽, 是人类用分子生物学方法发现的第一个活性多肽。CGRP 由 37 个氨基酸残基组成, 广泛存在于中枢神经系统、周围神经系统和心血管系统中<sup>[2]</sup>, 具有强大的舒张血管、降低血压、抑制胃酸分泌等多种生理活性<sup>[3~5]</sup>, 参与多种功能的调节, 是迄今发现的人体内舒血管活性最强的一种活性多肽<sup>[6]</sup>。我们将在人工合成 CGRP 基因并将其融合在人  $\alpha$  肿瘤坏死因子 (TNF) 基因之后, 实现了 CGRP 基因在大肠杆菌中的高效融合表达 (另文发表) 的基础上, 又用 PCR 方法改造了 CGRP 基因, 将其克隆到分泌型的酵母高效表达载体 pVT102U/ $\alpha$  中, 使它能直接接在酵母  $\alpha$  交配因子的类胰蛋白酶加工位点 (Lys-Arg) 之后, 成功的实现了 CGRP 基因在酵母细胞中的分泌表达, 并对表达产物进行了分离纯化和鉴定。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒:** 宿主菌 JM83、JM103、质粒 pUC19 为本室保存; *Saccharomyces cerevisiae* S-78、质粒 pVT102U/ $\alpha$  为酵母分泌表达载体, 均由中国科学院上海生物化学研究所张友尚教授实验室馈赠, CGRP 基因供体-质粒 pCGRP 为本实验室构建。

**1.1.2 酶与试剂:** Tag DNA polymerase 购自复旦大学, 限制酶, T4DNA 连接酶等为 Boehringer mannheim 公司产品, HPLC 纯乙腈为 Merck 公司产品, [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP 为 DU pont 公司产品, CM-Sephadex C<sub>25</sub> 为 Pharmacia 公司产品, C<sub>18</sub> Sep--park 柱、C<sub>18</sub> HPLC

柱( $\mu$  bondapak,  $10\mu\text{m}$ ,  $3.9\text{mm}\times 30\text{cm}$ )为 Waters 公司产品。

1.1.3 合成的 CGRP 和兔抗 CGRP 抗血清由中国科学院上海生物化学研究所施溥涛教授实验室制备,羊抗兔 IgG-HRP(辣根过氧化物酶)购自华美生物工程公司。

1.1.4 PCR 突变引物片段由本室陈波等在 ABI 公司的 381A 型 DNA 合成仪上合成并经聚丙烯酰胺变性凝胶电泳纯化。

## 2.2 方法

2.2.1 基因克隆:质粒 DNA 制备, DNA 体外重组, 大肠杆菌感受态细胞制备及转化方法均按常规进行<sup>[7]</sup>。

2.2.2 CGRP 基因的改造及克隆:为了使 CGRP 基因正确融合在酵母 $\alpha$ 交配因子之后并能有效的分泌,我们设计了突变引物(5' TCT AGA TAA AAG AGC TTG CGA CAC TGC TAC C 3'),该引物设有 Xba I 识别顺序及类膜蛋白酶加工 Lys-Arg 的密码子并消除了原 CGRP 基因中的起始密码子 ATG。用突变引物及噬菌体 M13 通用引物,以 PCR 法对 pCGRP 质粒进行基因扩增改造了 CGRP 基因。PCR 产物经低熔点琼脂糖凝胶回收,利用 Xba I /Hind III 双酶切,克隆到 pUC19 的 Xba I /Hind III 位点后,转化大肠杆菌 JM103。用酶切鉴定筛选出一个含有 CGRP 基因片段(150bp、120bp 左右)的克隆按 USB Sequence Kit 所示方法进行序列测定,所用模板为含 CGRP 基因的双链 pUC19 质粒,测序正确的基因称为 XCGRP。将 XCGRP 克隆到 pVT102U/ $\alpha$  质粒中,含 XCGRP 基因的质粒称为 pVT-XCGRP。

2.2.3 酵母细胞的转化:参照 Ito 等用醋酸锂<sup>[8]</sup>方法进行。

2.2.4 CGRP 在酵母细胞中的分泌及酶免(ELISA)检测:在合成培养基中筛选 Ura<sup>-</sup>菌落,然后接种于 YPD 培养液中,30℃培养过夜,按 1:100 接种于 5ml 合成培养液中,30℃培养 40~48h,离心去菌体,取 50 $\mu\text{l}$  上清于 950 $\mu\text{l}$  包被液中,每孔 100 $\mu\text{l}$  包被于 96 孔板中,同时做阴性、阳性对照,方法参阅文献<sup>[9]</sup>。

2.2.5 表达产物的分离纯化:将含有质粒 pVT-XCGRP 的酵母菌在合成培养基(每升含 6.79YNB, 20g 葡萄糖, 100mg 亮氨酸, 100mg 组氨酸, 50mg 腺嘌呤, 200mg 肌醇, 4g 酪素水解物)中 30℃培养 48h,离心除去细胞,上清旋转蒸发到一定体积,倒入煮沸的乙酸中,使乙酸的终浓度为 3%,沸水浴 10min, 0.45 $\mu\text{m}$  醋酸纤维膜过滤后,过 Waters C<sub>18</sub> Sep-park 小柱除盐,用 80%甲醇(含 1%TFA)洗脱,洗脱液冻干过阳离子交换柱(CM-Sephadex C<sub>25</sub>),用 0.05mol/L NH<sub>4</sub>Ac 对 1mol/L NH<sub>4</sub>Ac 线性梯度洗脱,在 254nm 检测,用 ELISA 跟踪,收集阳性洗脱峰,冻干再过一次阳离子柱,用 Sep-park 柱脱盐后,用 C<sub>18</sub>HPLC 柱反复纯化至一个单峰。

2.2.6 多肽顺序分析:取经 HPLC 分离纯化后的 CGRP 样品约 10 $\mu\text{g}$ ,在 Applied Biosystem 477A 蛋白质顺序仪上分析 CGRP N 末端 10 个氨基酸。

2.2.7 CGRP 生理活性测定:a. 舒张血管功能(北京医科大学帮助完成):初步纯化的样品冻干后溶于 Kerb's 溶液,先用  $10^{-9}\text{mol/L}$  的去甲肾上腺素处理鼠主动脉肌条使之收缩,然后加入样品约 10 $\mu\text{g}$ ,观察主动脉肌条的舒张反应。同时作只含 pVT102U/ $\alpha$  质粒的酵母上清、肾上腺皮质激素做对照;b. 降血压作用:(由中国科学院上海药物所帮助完成):取鼠一只待血压平稳后注射 0.3ml 生理盐水 5min 血压无变化,然后注射约 5 $\mu\text{g}$

HPLC 纯化后的 CGRP 样品, 观察鼠血压的变化情况。

## 2 结    果

### 2.1 CGRP 基因的改造及其克隆

为了使 CGRP 基因能正确融合于 pVT102U/ $\alpha$  的 Xba I /Hind III 位点, 置于酵母乙醇脱氢酶启动子之后, 并能被类胰蛋白酶加工, 我们设计的 PCR 引物 除 5' 端含有 Xba I 识别位点及类胰蛋白酶加工识别顺序 (Lys-Arg 密码子) 外, 还消除了 CGRP 基因中的 EcoR I 识别位点及起始密码, 以使表达的分泌蛋白 N 端为 CGRP 的天然 N 端氨基酸-Ala。利用突变引物及通用引物, 我们得到了含 Xba/Hind III 的 CGRP 的 PCR 产物。PCR 产物用低熔点胶回收, Xba I /Hind III 酶切后克隆进 pUC19 的 Xba I /Hind III 位点, 构建成 pUC-XCGRP 质粒, 转化 JM103, 用酶切筛选和 DNA 序列分析鉴定得到具有所需正确基因的 PUC-XCGRP (见图 1)。

### 2.2 CGRP 基因在酵母细胞中的分泌表达

用限制酶 Xba I /Hind III 从 pUC-XCGRP 中切出 XCGRP 基因, 同 pVT102U/ $\alpha$  质粒经 Xba I /Hind III 双酶切后得到的大片段进行连接, 转化 JM103, 酶切筛选阳性克隆, 得到重组质粒 pVT-XCGRP (图 2)。转化酵母细胞 S-78, 挑一转化后在合成培养基中长大的单菌落接种于 3ml YPD 培养液中, 30℃ 培养 40~48h, 离心去菌体, 取 50 $\mu$ l 的上清与 950 $\mu$ l 包被液混合, 加入酶标板中, 每孔 100 $\mu$ l 4℃ 包被过夜, 用酶免方法 (Elisa) 检测, 同时做阴性、阳性对照。含重组质粒 pVT-XCGRP 的酵母培养物的上清稀释 1000 倍包被 96 孔板 Elisa 检测为阳性, 而含载体 pVT102U/ $\alpha$  的酵母培养物上清 Elisa 检测为阴性, 用合成的 CGRP 为阳性对照作标准定量, 测出 CGRP 的表达量为 2mg/L 酵母培养液。酵母细胞内及周质空间用 Elisa 检测为阴性。

### 2.3 酵母分泌表达产物的分离纯化和鉴定

由于 CGRP 本身较稳定, 上清旋转蒸发至一定体积后, 加乙酸至终浓度约 3%, 于沸水中加热 5~10min, 过 0.45 $\mu$ m 醋酸纤维膜以除去一些大分子量的热变性蛋白质。经 Waters C<sub>18</sub> Sep-park 柱除盐; 走 CM-Sephadex C<sub>25</sub> 柱两次 (图 3), 再用 C<sub>18</sub> HPLC 柱 (Waters  $\mu$  bondapak 10 $\mu$ m 3.9mm $\times$ 30cm) 反复纯化至一单峰 (图 4)。以上步骤均用 ELISA 跟踪测定。

HPLC 柱纯化后的 CGRP 样品进行氨基酸顺序分析结果表明, 在酵母中合成的 CGRP N 端前 10 个氨基酸顺序为 Ala-Cys-Asp-Thr-Ala-Thr-Cys-Val-Thr-His, 与天然人的 CGRP 一致。

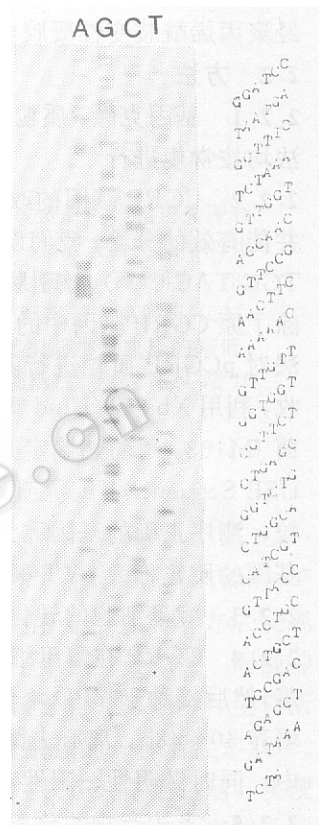


图 1 PCR 改造后的 CGRP 序列  
Fig. 1 The mutation sequence of CGRP by PCR

## 2.4 CGRP 生理活性测定

酵母细胞分泌表达的 CGRP 经阳离子柱初步纯化后和肾上腺皮质激素一样可以明显舒张去甲肾上腺素引起的鼠主动脉肌条收缩 (图 5), HPLC 纯化后的 CGRP 约  $5\mu\text{g}$  注射小鼠后不到一分钟血压降低  $8\text{kPa}$  (约  $60\text{mmHg}$ ) (图 6)。

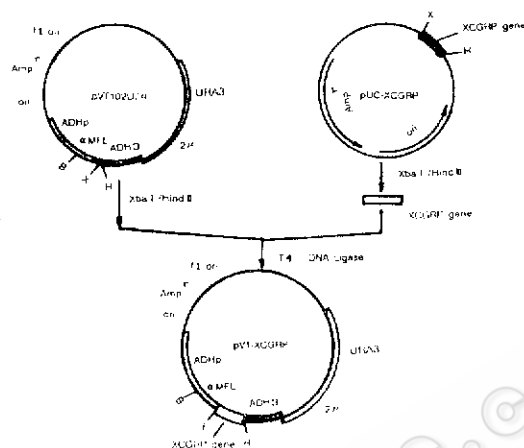


图 2 CGRP 表达载体 pVT-XCGRP 的构建

Fig. 2 Construction of expression plasmid pTV-XCGRP  
ADHp. The ADH1 gene promoter; ADH3. the 3' regene of ADH1 gene;  $\alpha$  MFL. The  $\alpha$ -mate factor leader gene,  $2\mu$ . The yeast origin, URA3. The URA3 gene

B. BamH I, H. Hind III, X. Xba I

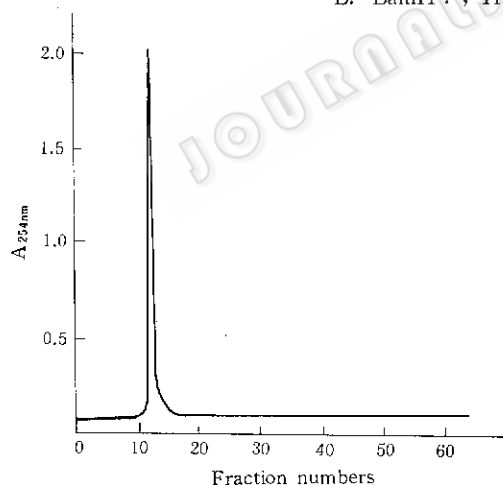


图 3 阳离子柱 (CM-sephadex  $C_{25}$ ) 再次纯化酵母分泌表达 CGRP 的洗脱曲线

Fig. 3 Cation exchange chromatography of CGRP expressed in *S. cerevisiae*

Condition.  $0.05\text{mol/L}$   $\text{NH}_4\text{Ac}$  pH5.0  $\sim 1\text{mol/L}$   $\text{NH}_4\text{Ac}$  pH8.0 linear gradient elution; Flow rate.  $0.5\text{ml/min}$ ,  $5\text{ml/tube}$

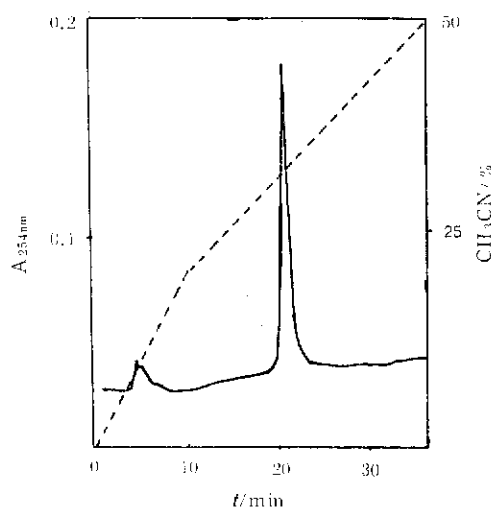


图 4 HPLC 反相柱第三次纯化 CGRP 的洗脱曲线

Fig. 4 Purification of CGRP expressed in *S. cerevisiae* by 3rd reverse-phase HPLC  
The eluent was; Buffer A.  $0.05\%$  TFA in water; Buffer B.  $0.05\%$  TFA in water; acetonitrile ( $50:50$ ). The gradient applied was;  $0\sim 40\%$  B for 10 min,  $40\%\sim 100\%$  B for 30min, Flow rate;  $1\text{ml/min}$

### 3 讨 论

CGRP 为小分子多肽，如直接在细胞内单独表达很容易被宿主细胞降解。CGRP 基因在酵母中的分泌表达，不但可以避免表达产物被菌体蛋白酶降解，而且酵母细胞内质网上有硫硫键异构酶<sup>[10]</sup>，能催化分泌产物中二硫键的正确形成，得到活性多肽。我们将 CGRP 基因置于酵母乙醇脱氢酶（ADH）启动子控制之下，融合在酵母  $\alpha$  交配因子之后，成功的实现了 CGRP 在酵母中的分泌表达，用 Elisa 法在细胞内和细胞周质空间基本上测不到 CGRP 的存在，充分证明 ADH 启动子- $\alpha$  交配因子信号顺利构建的酵母分泌型表达系统可有效地应用于外源基因的分泌性表达，而对于像 CGRP 分子量较小的多肽分子特别有效。

已经知道，生物体内很多活性多肽，其羧端都是以酰胺化的形式存在，并且为活性所必需。天然的人 CGRP 的羧末端也是酰胺，但用化学合成的方法证明，去羧端酰胺的 CGRP 具有相同的生物活性。本文用基因工程方法经酵母分泌表达的 CGRP 产物，其羧端为自由羧基，也证实了这个结果。基因工程表达的产物和天然的 CGRP 比较在生物活性、体内半衰期等都没有明显的差异，这就为进一步通过基因定位突变和蛋白质工程手段对 CGRP 进行结构和功能研究打下了基础，而且人们也可通过对 CGRP 羧末端酰胺化为模型，进一步研究基因工程表达产物的羧末端酰胺化反应和条件。

应该指出，本文所实现的 CGRP 基因在酵母中的分泌表达，其表达量已经达到 2mg/L，并已分离纯化得到 CGRP 纯品。但从生产的角度来看，仍然存在着距离，因而

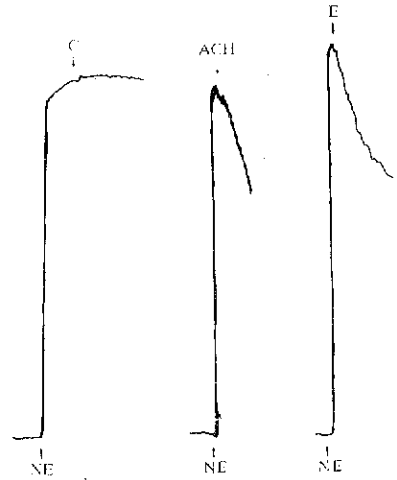


图 5 酵母细胞分泌的 CGRP 舒张去甲肾上腺素引起的鼠主动脉肌条收缩的功能

Fig. 5 The CGRP expressed in *S. cerevisiae* can relax the contraction of rat aorta strip caused by norepinephrine at the final concentration of  $10^{-9}$  mol/L

NE, Norepinephrine  $10^{-4}$  mol/L, ACH, Adrenal cortical hormone, C, Control, E, Sample

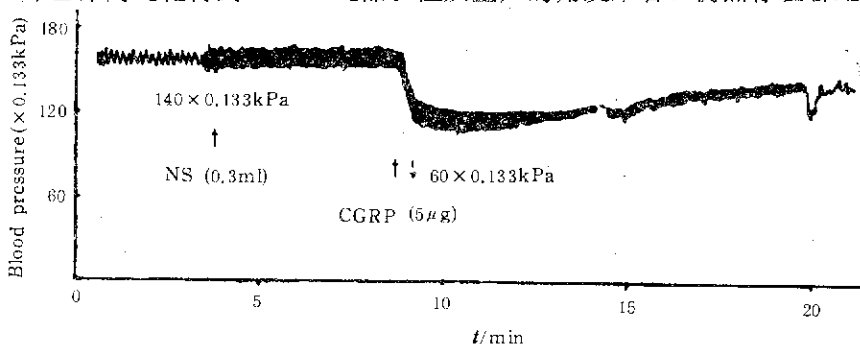


图 6 酵母分泌表达的 CGRP 降低鼠血压的作用

Fig. 6 The hypotensive effect of CGRP expressed in *S. cerevisiae* against rat

NS, Normal saline

提高发酵的 CGRP 表达量和改进产品的纯化工艺, 仍值得继续努力, 有关这方面的工作还在进行之中。

## 参 考 文 献

- [1] Amara S G, Jonas V, Rosenfeld M G *et al.* Nature. 1982, **298**: 240~244.
- [2] Rosenfeld M G, Mermond J, Amara S G *et al.* Nature. 1983, **304**: 129~135.
- [3] Brain S D, Williams T J, Tippins J R *et al.* Nature. 1985, **313**: 54~56.
- [4] Lundberg J A, Franco-cereceda A, Hua X Y *et al.* Eur J pharmacol. 1985, **108**: 315~319.
- [5] Papps T T, Debas H T, Walsh J H *et al.* Am J physiol. 1986, **250**: 127~133.
- [6] Ezra D, Laurindo F R M, Goldstein D S *et al.* Eur J pharmacol. 1987, **137**: 101~106.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular Clone (2nd Edition): A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York: 1989.
- [8] Ito H, Fukuda Y, Murata K *et al.* J Bacteriology, 1983, **153**: 163~168.
- [9] Hudson L, Hay F C *et al.* Practical Immunology, 1980, (2).
- [10] Freedman R B. Trends Biochem Sci, 1984, **106**: 438~443.

# Secretory Expression and Purification of Human $\alpha$ Calcitonin Gene-related Peptide in *Saccharomyces cerevisiae*

Gao Changshou Mao Shenlan Chen Changqing

(Shanghai Research Centre of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

Shi Putao

(Shanghai Institute of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

**Abstract** A hybrid gene was constructed via polymerase chain reaction containing a fusion between the DNA sequences encoding the yeast mating pheromone  $\alpha$ -factor leader region and a synthetic sequence encoding human  $\alpha$  calcitonin gene-related peptide (h $\alpha$ CGRP). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with the hybrid gene resulted in the yeast cells secreting biologically active h $\alpha$ CGRP into the extracellular medium. The expression level of h $\alpha$ CGRP is more than 2mg/L. The secreted h $\alpha$ CGRP was purified and found to be accurately processed at the junction in the chimeric  $\alpha$  factor leader region/h $\alpha$ CGRP protein, producing the desired mature h $\alpha$ CGRP amino terminus.

**Key words** Human  $\alpha$  calcitonin gene-related peptide, *Saccharomyces cerevisiae*, secretory