

简报

鼠心钠素基因的合成、克隆和表达

施文 王启松 奚国良* 郑兆鑫 杨胜利*
尤允* 贺沛富 杨迪 闵永洁 严维跃

(复旦大学遗传研究所, 上海)

(中国科学院药物研究所*, 上海)

心钠素 (Atrial natriuretic factor) 是最近几年发现的存在于哺乳动物心脏等器官中的一种多肽激素, 它有强的排钠利尿作用, 在临床上用于治疗高血压和肾脏疾病。它的发现已被评为当今世界上十大发现之一。由于它在医学上的应用价值, 美国、日本已相继合成了心钠素基因并在大肠杆菌中表达成功。然而在我国, 心钠素基因的合成、克隆和表达成功尚属首次。

人和鼠的心钠素均由 28 个氨基酸组成, 它们仅在 N 端第 12 号氨基酸不一样^[1,2], 但二者的生物活性几乎相同。

我们用化学方法合成鼠心钠素基因, 并对其进行克隆和表达。

整个基因除编码了心钠素结构基因外, 在基因的两端分别置有限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI 接头, 在结构基因的 N 端还编码了一个甲硫氨酸的密码子, 供以后用溴化氰裂解表达产物融合蛋白之用。整个心钠素基因由 96 个碱基对组成, 它被分成 7 个片段合成。化学合成 DNA 采用固相亚磷酸胺方法。合成的片段经分离纯化后用 DNA 连接酶一次连接成功。从凝胶电泳经放射自显影结果看, 基因合成产率可达 30—40%。合成的基因连接到

质粒 pBR322 上进行克隆, 原位杂交实验证明心钠素的基因已转化到大肠杆菌之中。在上述实验基础上再将心钠素基因连接到质粒 pWR590 上进行克隆, 原位杂交实验肯定了心钠素基因已插入到 pWR590 中。带有心钠素基因的 pWR590 的大肠杆菌经发酵后, 将离心沉淀的菌体悬浮在 8M 尿素溶液中, 经再次离心后表达产物已进入溶液中, 弃去沉淀, 用缓冲液稀释 5 倍, 这时表达产物以融合蛋白的形式沉淀下来, 离心后再用 8 M 尿素溶液溶解, 再用 5 倍缓冲液稀释、离心, 反复几次。最后大部分杂蛋白已被除去。用这种方法每克湿菌体可得约 83μg 融合蛋白。所得到的融合蛋白溶于 8 M 尿素缓冲液中, 用溴化氰处理 24h, 这时鼠心钠素被释放出来。经高压液相层析, 在标准心钠素出现的位置上出现一个吸收峰。用放射免疫方法鉴定, 肯定心钠素基因已表达成功。

参考文献

- [1] Flynn, T.G. et al.: *Biochem. Biophys. Res. commun.*, 117:859, 1983.
- [2] Kangawa, K. & Matsuo, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 118:113, 1984.