

人表皮生长因子基因的化学合成和 克隆及其在酵母中的表达

袁汉英 闵永洁 石松 陶无凡 吴声积 李育阳 王启松

(复旦大学遗传所, 上海)

吕慧梅 张承圭 胡倩

(南京大学生化系, 南京)

用固相亚磷酸胺法合成了人表皮生长因子基因, 全长为173个核苷酸, 它被分成8个寡核苷酸, 分别在DNA合成仪上合成。经分离纯化后的寡聚核苷酸进行酶促连接, 然后被克隆到噬菌体M13mp18中, 克隆经分子杂交、限制酶酶切以及DNA序列分析检测, 证明合成的人表皮生长因子基因和设计的完全一致。将人表皮生长因子基因的DNA片段插入酵母分泌型表达载体YFD59 Hind III位点中, 建成表达人表皮生长因子基因的质粒YFD104, 再将此质粒转化酿酒酵母, 所得转化子经摇瓶发酵、发酵上清液用受体结合试验表明有人表皮生长因子表达。

关键词 基因的化学合成; 人表皮生长因子; 分泌型表达载体; 酵母

人表皮生长因子(Human Epidermal Growth Factor, 以下简称hEGF)是一种由53个氨基酸组成的多肽, 又称抑胃素^[1], 是一种有多种用途的多肽药物。EGF广泛存在于哺乳动物组织和体液中。EGF可以刺激外胚层与中胚层细胞, 如成纤维细胞, 神经胶质细胞, 角蛋白细胞, 上皮细胞, 内皮细胞, 软骨细胞等的增殖和分化作用。但对鳞状细胞及毛囊纤维细胞有抑制作用^[2-6]。EGF在医学上有广泛的应用前景, 过去人们从人尿中提取hEGF远不能满足日益发展的科研和临床应用的要求。基因工程技术为大量产生人表皮生长因子提供了条件。

目前美国, 日本都在积极研制基因工程人表皮生长因子, 预计不久就可以正式上市。几年来我们也进行了人表皮生长因子基因的化学合成和克隆并在酵母系统中取得了表达。

材料与方 法

(一) 菌种和质粒

1. 大肠杆菌JM109: 由本所保存。
2. 噬菌体M13mp18: 由本所保存。
3. 质粒YFD59为本所构建的酵母分泌型表达载体。
4. 大肠杆菌DH5: supE44, hsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1由本所保存。
5. 酿酒酵母BJ1991: α , leu2, trp1, ura3-52, prb1-112, pep4-3, 取自酵母遗传菌株保藏中心。

(二) 培养基

1. 大肠杆菌培养基: (1) LB 培养

本文于1990年11月18日收到。

本文中EGF活性的测定由中科院上海细胞生物学研究所徐永华研究组进行, 特此致谢。

基: 1% 蛋白胨, 1% 氯化钠, 0.5% 酵母提取粉。(2) LBA培养基: 每毫升LB培养基中加100 μ g氨基青霉素。

2. 酵母培养基: (1) YEPD 培养基: 1% 酵母提取粉, 1% 蛋白胨, 2% 葡萄糖。(2) 选择培养基: 0.67% YNB (Yeast Nitrogen Base), 2% 葡萄糖。每升培养基中加20mg色氨酸和20mg 亮氨酸。(3) 发酵培养基: 选择培养基加0.5% 酪蛋白水解物。

(三) 试剂和酶

1. 四种保护脱氧核苷酸、四唑及四种固相载体: 为美国Applied Biosystems公司产品, 乙腈为美国 Aldrich 公司产品。

2. 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal): 为美国BRL公司产品。

3. 异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPT-G): 为美国Sigma公司产品。

4. 10 \times 激酶缓冲液: 0.7mol/L Tris-HCl(pH7.6), 0.1mmol/L MgCl₂, 50mmol/L DTT。

5. 10 \times CIP 缓冲液: 0.5 mol/L Tris-HCl(pH9.0), 10mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L ZnCl₂, 10mmol/L 亚精胺。

6. 10 \times 中盐缓冲液: 50mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT。

7. 10 \times 连接酶缓冲液: 0.66mol/L Tris-HCl(pH7.6), 50mmol/L MgCl₂, 50mmol/L DTT, 10mmol/L ATP。

8. 预杂交液: 10 \times Denhardt's, 6 \times SSC, 0.1mg/ml小牛胸腺DNA。

9. 限制酶Hind III、T4多核苷酸激酶、T4 DNA 连接酶: New England Biolabs公司产品。

10. 牛肠碱性磷酸酯酶、DNA聚合酶

I Klenow 片段: Boehringer Mannheim 产品。

11. 核苷酸序列分析所用试剂药盒: Pharmacia公司产品。

12. 标准分子量: Marker III 为华美生物工程公司产品。

(四) 方法

1. 寡聚核苷酸片段的化学合成: 人表皮生长因子基因的8个寡聚核苷酸片段用固相亚磷酸胺法, 在ABI 380A型DNA合成仪(Applied Biosystems公司)上合成。

2. 纯化: 合成的寡聚核苷酸片段上的保护基团经氨解除去, 经16%聚丙烯酰胺变性胶分离后, 将含有产物条带的胶用0.3mol/L NH₄Ac 浸泡24 h, 浸泡液上C18 Sep-pak反相柱(日本Waters公司), 用60%甲醇洗脱, 收集紫外吸收(A₂₆₀)峰区组份。

3. DNA片段的5'端羟基磷酸化与同位素标记: 纯化后的寡聚核苷酸片段的5'端用少量 γ -³²P-ATP标记^[7], 并追加非放射性ATP, 以使之完全磷酸化。

4. DNA片段等摩尔比混合(2个5'端的DNA片段不必磷酸化): 80 $^{\circ}$ C退火, 自然冷却至室温, 加入连接酶缓冲液和T4 DNA连接酶, 12 $^{\circ}$ C连接过夜。

5. 人表皮生长因子基因的克隆: 以噬菌体M13mp18 RF型DNA作为载体, 用限制酶Hind III酶切, 再用碱性磷酸酯酶处理, 用酚、氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀, 在已处理好的载体中加入5倍于载体的化学合成的人表皮生长因子基因, 混合物在T4 DNA连接酶作用下12 $^{\circ}$ C连接过夜, 连接液对大肠杆菌JM109转化。

6. 克隆子的分子杂交: 挑取白色噬菌斑, 提取噬菌体上清与用同位素 γ -³²P标记的合成寡聚核苷酸片段E2和E6探

针进行打点杂交 (Dot hybridization)^[8]。

7. 克隆子质粒DNA的限制酶酶切: 挑取杂交阳性的克隆子, 提取RF DNA, 用中盐酶切缓冲液和限制酶 Hind III, 37°C酶切1h后, 用5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

8. DNA 序列测定: 用双脱氧链终止法进行DNA序列分析。

9. 大肠杆菌质粒 DNA 提取: 大肠杆菌质粒 DNA 的抽提均用 Birnboim 法^[9]。

10. DNA 酶切片段的分离纯化: M 13mp18(EGF)DNA 经 Hind III 酶切, 再以 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测, 在胶上可见173bp的EGF 片段, 并按文献[10]方法分离片段。

11. 酿酒酵母的转化: 重组子 YFD 104 DNA 对酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BJ 1991的转化按Ito法^[11]进行。

12. 表达产物的制备和测定

(1) 表达产物的制备: 将各重组转化子分别接种于 2 ml酵母选择培养基中, 30°C振荡40h, 作为种子培养液, 以4%接种量转接于 20ml 发酵培养基中, 30°C振荡42h, 10k离心10min, 收集上清速冻于 -20°C备用。

(2) hEGF 的表达: 用受体结合竞争试验测定。

结 果 与 讨 论

(一) 人表皮生长因子基因组成

	Asn	Ser	Asp	Ser	Glu	Cys	Pro	Leu	Ser	His	Asp	Gly		
HindIII														
A	GCT	TGG	AAC	TCC	GAC	TCC	GAA	TGT	CCA	TTG	TCC	CAC	GAC	GGT
		ACC	TTG	AGG	CTG	AGG	CTT	ACA	GGT	AAC	AGG	GTG	CTG	CCA
Tyr	Cys	Leu	His	Asp	Gly	Val	Cys	MET	Tyr	Ile	Glu	Ala	Leu	Asp
TAC	TGT	TTG	CAC	GAC	GGT	GTT	TGT	ATG	TAC	ATC	GAA	GCC	TTG	GAC
ATG	ACA	AAC	GTG	CTG	CCA	CAA	ACA	TAC	ATG	TAG	CTT	CGG	AAC	CTG
Lys	Tyr	Ala	Cys	Asn	Cys	Val	Val	Gly	Tyr	Ile	Gly	Glu	Arg	Cys
AAG	TAC	GCT	TGT	AAC	TGT	GTT	GTT	GGT	TAC	ATC	GGT	GAA	AGA	TGT
TTC	ATG	CGA	ACA	TTG	ACA	CAA	CAA	CCA	ATG	TAG	CCA	CTT	TCT	ACA
Gln	Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys	Trp	Trp	Glu	Leu	Arg	stop			
CAA	TAC	AGA	GAC	TTG	AAG	TGG	TGG	GAA	TTG	AGA	TGA			
GTT	ATG	TCT	CTG	AAC	TTC	ACC	ACC	CTT	AAC	TCT	ACT	TCG	A	

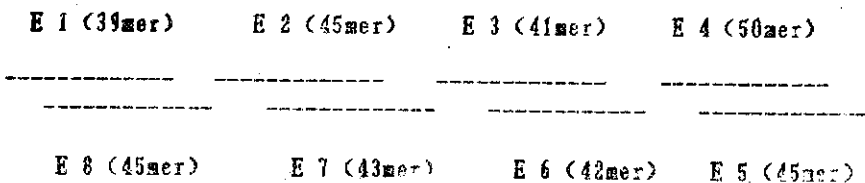


图 1 化学合成的人表皮生长因子基因
Fig.1 The chemically synthesized hEGF gene

图1表示人表皮生长因子基因的组成。合成基因选择原则根据Marugama等报道^[1,2],基因的设计在计算机的辅助下完成。为避免基因内部重复序列,迴文结构和非配对片段之间的互补顺序出现,人表皮生长因子全基因分为E1-E8 8个寡核苷酸片段分别合成,其长度分别为: E1 39mer; E2 45mer; E3 41mer; E4 50mer; E5 45mer; E6 42mer; E7 43mer; E8 45mer,合成基因总长度为173bp。两端加有供插入载体用的HindⅢ的接头。

(二) 化学合成寡聚核苷酸片段的³²P标记

DNA合成仪按图1所示方案分别合成了人表皮生长因子基因的8个片段,每次循环的合成效率平均为98%,经分离纯化和 γ -³²P-ATP标记后,用放射自显影技术鉴定证明8个片段是均一的。其纯度如图2所示。

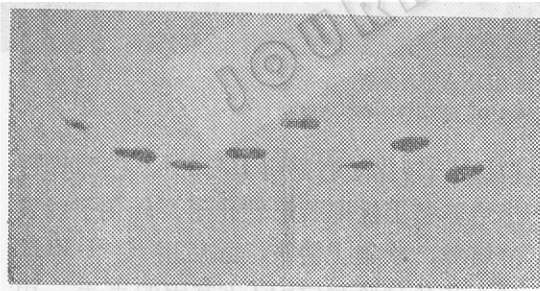


图2 hEGF的8个寡聚核苷酸片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.2 Polyacrylamide gel electrophoresis of 8 oligonucleotides which composed hEGF gene

(三) 化学合成寡聚核苷酸片段的连接产率

将纯化和同位素标记后的基因E1-E8片段80℃退火,在T4 DNA连接酶的作用下连接,基因连接产物经凝胶电泳和放射自显影技术鉴定,基因的连接产率为40

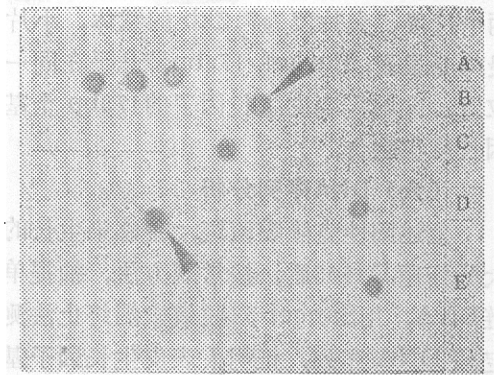


图3 克隆的打点杂交

Fig.3 Dot hybridization of clones

- A. No. 1 to No. 7
- B. No. 8 to No. 14
- C. No. 15 to No. 21
- D. No. 22 to No. 28
- E. No. 29 to No. 35

—50%。

(四) 克隆子的打点杂交结果

将化学合成连接好的人表皮生长因子基因与大肠杆菌噬菌体载体M13mp18 RF DNA重组,转化大肠杆菌JM109。重组克隆子一般为白色噬菌斑(在X-gal和IPTG LB平板上),挑取了白色噬菌斑30多个,将这些噬菌斑分别在3 ml LB液体培养基中培养,各取10μl上清(分泌到上清中的噬菌体为单链)与 γ -³²P-E2和E6探针进行打点杂交。从图3可见,其中7个样品为阳性,15号为M13mp18噬菌体上清对照,无杂交斑点,18号为hEGF片段DNA阳性对照,呈阳性杂交斑点,其余为克隆子的白色噬菌斑上清液,呈阳性杂交斑点的有1, 2, 3, 12, 23, 28, 35号样品。

(五) 限制酶酶切图

选择12号, 23号2个阳性克隆子抽提RF DNA,用限制酶HindⅢ对克隆子RF DNA分别酶解,在5%聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结果如图4所示, M13mp18

(EGF)RF DNA 用 Hind III 酶切有大小两个片段,大片段为7.2kb的载体,小片段与分子量 Marker 174bp带几乎在同一位置,这与人表皮生长因子的173bp 全基因长度相吻合。

(六) DNA序列分析

上述阳性克隆噬菌斑,在感染生长的大肠杆菌JM103后,按常规方法,抽提单链DNA,用Sanger 双脱氧末端终止法测定其 DNA 序列,证明人表皮生长因子基因核苷酸序列与设计的完全一致,如图 5 所示。

(七) hEGF 基因的表达载体的构建

如图 6 所示,我们采用酵母分泌型表达载体YFD59, YFD59上的Hind III位点是外源基因的插口,插入的外源基因的表达将接受酵母启动子PGK1- α 因子基因前导顺序的控制,构建过程如下:先用限制酶 Hind III 酶解, M13mp18 (EGF) RF

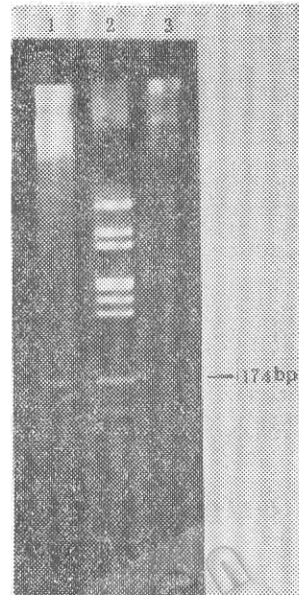


图 4 人表皮生长因子基因克隆的 Hind III 酶切
Fig.4 Hind III digestion of hEGF clone DNA
1, 3: 12号和23号克隆DNA Hind III 酶切
Hind III digests clone No.12 and
No.23
2. 分子量标准
Molecular weight marker; marker II



图 5 合成的hEGF基因的DNA序列分析
Fig.5 DNA sequence analysis of synthesized gene

DNA^[15],再用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化 hEGF Hind III 酶切片。分泌型表达酵母载体 YFD59 用 Hind III 酶解,并用碱性磷酸酯酶处理纯化后,将其与 hEGF 基因片段混合,用 T4 DNA 连接酶 12℃ 连接过夜。连接液转化大肠杆菌 DH 5^[13],用 Birnboim 法快速抽提转化子DNA,用 Hind III 酶切检查是否有 EGF 基因片段插入,共选得 5 个转化子证明有 hEGF 基因插入,命名为 YFD104-1、YFD104-2、YFD104-3、YFD104-4、YFD104-5。

(八) hEGF 基因的表达

将上述 YFD104 的 5 个克隆子抽提质

粒DNA转化酿酒酵母 BJ1991,在酵母选择培养基上挑取若干转化子,转化子经发酵培养,收集上清液,然后用 ¹²⁵I-EGF 结合竞争试验测定 hEGF 基因的表达。由于在 YFD104 中的 EGF 基因片段可能有两个插入方向,只有和启动子顺向插入的 EGF 基因才能表达。测定结果表明其中 BJ1991/YFD104-2 和 BJ1991/YFD104-5 的发酵上清液中有 EGF 活性。我们将酵母转化子 BJ1991/YFD104-5 作单菌落分离,取其中 10 个单菌落进行 EGF 基因表达测定,10 个单菌落的发酵上清液均有 EGF 活性,但是表达水平有一定的差异,范围在 0.4—1.0mg/L 之间。

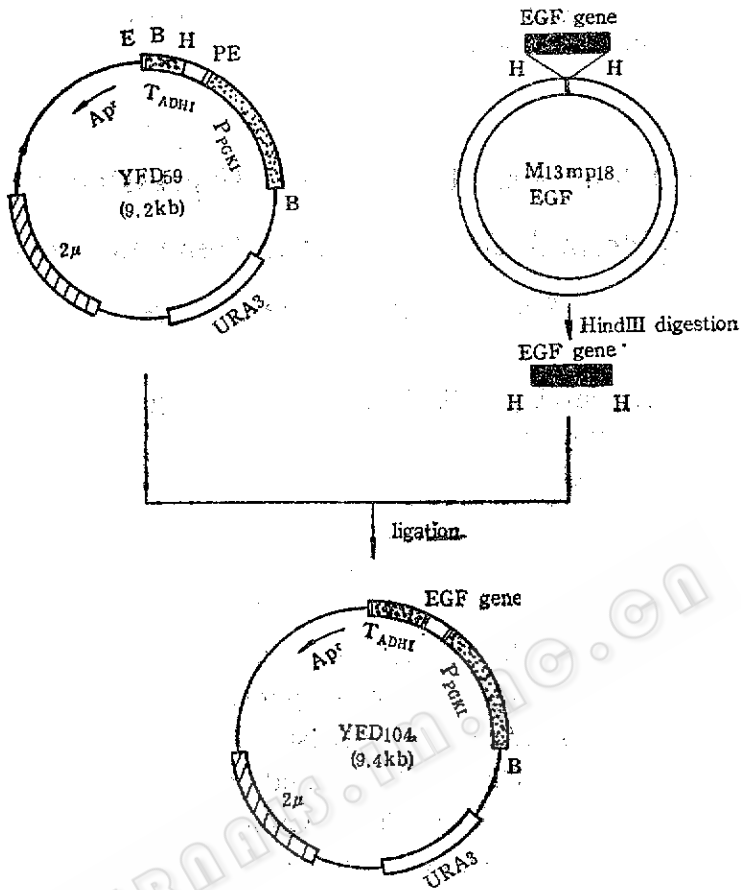


图 6 质粒YFD104的构建

Fig. 6 Construction of plasmid YFD104

PPGK1: 酵母PGK1基因的启动子

Promoter of yeast PGK1 gene

TADHI: 酵母ADHI基因的终止子

Terminator of yeast ADHI gene

E, EcoR I; B, BamH I; H, Hind III; P, Pst I

参 考 文 献

- [1] Gregory, W, *Nature*, 257:325,1975.
- [2] Carpenter, G. and Zandegui, J., *Anal. Biochem.*, 153:279,1985.
- [3] Carpenter, G., In: *Tissue Growth Factors* (Baserga, R, ed) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 89-132,1981.
- [4] Rheinwald, J. G. et al., *Nature*, 265:421,1977.
- [5] Sun, T. T. et al., *Nature*, 269:489,1977.
- [6] Coustin, A. S. et al., *Cancer Res.*, 46:1015,1986.
- [7] Messing, J. et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 101, New York, Academic Press p.20,1983.
- [8] Kafatos, F. C. et al., *Nucl. Acids Res.*, 7:1541,1979.
- [9] Birnboim, H. C. et al., *Nucl. Acids Res.*, 7:1512-1523,1979.
- [10] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [11] Hisao, Ito, et al., *J. Bacteriology*, 53:159-163,1983.

[12] Marugama, J. et al.; *Nucl. Acids Res.*, 14 Supplement, p.151,1986.

[13] Mandel, M. et al.; *J. Mol. Biol.*, 53:159,1970.

Chemical Synthesis, Cloning and Expression of Human Epidermal Growth Factor Gene in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Yuan Hanying Min Yongjie Shi Song Tao Wufan
Wu Shengji Li Yuyang Wang Qisong
(*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai*)

Lu Huimei Zhang Chenggui Hu Qian
(*Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing*)

A gene coding for human epidermal growth factor (hEGF) has been chemically synthesized by solid-phase phosphoramidite method. The 173 base-pair synthetic DNA duplex consists of structural gene encoding hEGF, a stop codon TGA at 3' end and some convenient restriction sites at both ends of the gene. The synthesis of the gene involved enzymatic joining of 8 oligonucleotides to form DNA duplex which was cloned into vector M13mp18. The recombinant colonies were identified by dot hybridization and restriction enzyme digestion. Its accuracy was confirmed by DNA sequence analysis. The hEGF DNA was inserted in yeast secretion vector YFD59. The resulted expression plasmid YFD104 was introduced into yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The binding assay showed that the yeast transformants could express and secrete hEGF.

Key words

Chemical synthesis of the gene; human epidermal growth factor; secretory expression vector; yeast