

人甲状旁腺激素的基因克隆及在大肠杆菌中的表达

刘国安 唐建国*

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要 人甲状旁腺激素(Human parathyroid hormone, hPTH)是 84 个氨基酸组成的多肽激素。从人甲状旁腺肿瘤组织分离纯化总 RNA, 其 mRNA 逆转录得 cDNA, 以 cDNA 为模板, PCR 扩增得 hPTH 基因。将该基因克隆到表达载体 pBV220 上, 转化大肠杆菌 DH5 α 细胞, 获得了表达。细胞抽提液 1000 倍稀释后 hPTH 的放免活性 265.77ng/dl, 为对照的 480 倍。表达产物粗分离后经 Resource-S 阳离子柱进行了分离, 对活性峰进行了 MALDI 质谱分析及 HPLC C₁₈ 反相柱分析。

关键词 人甲状旁腺激素, 大肠杆菌, 基因克隆与表达, 分离纯化

甲状旁腺激素是人体内重要的钙磷调节因子, 最初合成产物是 115 个氨基酸残基的前甲状旁腺激素原(preprohPTH), 在分泌过程中切除 N 端 31 个氨基酸残基形成成熟的 84 个氨基酸的多肽激素^[1~3]。hPTH 的生理功能主要是刺激肾对钙的重吸收、磷的分泌和骨的重建, 导致合成和分解作用。临床上如果 hPTH 的分泌量过高, 血中 hPTH 浓度异常, 会导致甲旁亢, 从而引起骨的脱矿质化。如果 PTH 的活性片段在较低或中等剂量的浓度下长时间作用于骨, 则会刺激骨的形成, 并且通过诱导骨中的合成作用而有效地治疗骨质疏松症^[4]。hPTH 还可通过细胞膜钙通道对心血管产生作用^[5]。研究表明 hPTH 的活性中心位于 N 端 1~34 氨基酸肽段, 它通过与肾骨组织中专一性受体相结合而发挥作用^[6~8]。hPTH 分子不含半胱氨酸, 在体内很不稳定, 且含量很低给分离纯化带来困难, 因而使完整 hPTH 的研究受到影响。建立高效体外表达系统对 hPTH 及其作用机理的进一步研究都是十分有意义的。hPTH 体外表达国外已有报道^[9~13]。我们用 RT-PCR 的方法得到了 hPTH 的基因, 构建了 hPTH 的表达质粒, 进行了 hPTH 基因的表达、产物的分离纯化工作, 为 hPTH 的应用研究及结构与功能的研究打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织: 甲状旁腺肿瘤组织由协和医院内分泌科提供。

1.1.2 菌株和质粒: *E. coli* DH5 α 为本实验室保存菌株。质粒 pBV220 为温度诱导表达质粒, 有来自 λ 噬菌体的 P_RP_L 串联启动子。

1.1.3 酶和试剂: 限制酶, T4DNA 连接酶, AMV 逆转录酶及 TaqDNA 聚合酶购自华美生物工程公司, 序列分析试剂盒购自 Promega 公司, RNA 提取 TRIzol 试剂由天津

* 通信作者。

本文于 1996 年 8 月 5 日收到。

Biotechnology 公司提供,放免分析试剂盒购自天津德普生物技术和医学产品有限公司,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 合成: 切取甲状旁腺肿瘤组织 50~100mg,加 1mlTRIzol 试剂,冰浴中尽快磨碎组织,匀浆液置冰浴 5min,加 0.2ml 氯仿,迅速振荡 15s,冰浴 3min,12 000r/min,4℃ 离心 15min。取上层水相加 0.5ml 异丙醇,冰浴 10min,12 000r/min,4℃ 离心 10min,沉淀洗涤溶解备用。所用器具均经 0.1% DEPC 水处理。在 RNasin 存在条件下,Oligo(dT)作引物,mRNA 为模板,利用 AMV 逆转录酶合成 cDNA。

1.2.2 引物的设计与合成: 按 Vasicek 等的资料设计^[14],

引物 I 5'-GGAATTCATGTCTGTGAGTGAAATACAGCT-3'

引物 II 5'-GGGATCCTCACTGGGATTAGCTTTAG-3'

1.2.3 PCR 方法扩增 hPTH 基因: 反应以 cDNA 为模板,70~100pmol 引物,100mmol dNTPs,3 单位 Taq DNA 聚合酶,通用 PCR 反应缓冲液,总体积 50μl,在 PCR-90AD 扩增仪上先 94℃ 变性 10min,然后按 94℃ 45s,51℃ 50s,72℃ 90s,进行 35 次循环,最后在 72℃ 保温 10min。

1.2.4 hPTH 基因的克隆: 按图 1 所示进行。

1.2.5 DNA 序列分析: 采用 Sanger 双脱氧链终止法分别用 5'端引物和 3'端引物从基因 5'端和 3'端测序。

1.2.6 hPTH 的温度诱导表达: 接种转化 pGA555 的工程菌于 300μl LB 培养基(氨苄青霉素 50μg/ml),37℃,180r/min,振摇过夜,稀释至 3ml,30℃ 继续培养 2h 后升温至 42℃,温度诱导表达 5h。

1.2.7 hPTH 的放免活性分析: 按诊断试剂盒说明进行,所用抗体为针对 hPTH 分子中段 44~68 氨基酸肽段。样品 hPTH 浓度高,用起始缓冲液 B₀ 稀释。

1.2.8 SDS-PAGE: 在含 0.1% SDS 的 Laemmli 不连续缓冲系统中进行^[15]。

1.2.9 离子交换-HPLC: 在 Bio-Rad 2700 型 HPLC 仪上进行,表达菌体超声破碎后上清调 pH3.8 酸沉淀,离心去沉淀,上清用 Pharmacia 公司 Resource-S 柱进行分离,平衡液为 50mmol/L 甲酸溶液(pH3.8),洗脱液为 2mol/L NaCl(pH3.8),流速 1.0ml/min,盐洗脱梯度 0~2mol/L NaCl,收集具有放免活性的梯度洗脱峰。

1.2.10 反相柱-HPLC: 在 Varian 5060 型 HPLC 仪上进行,色谱柱为 Applied Biochem 公司 C₁₈反相柱,平衡液为 0.1% TFA,流速 0.6ml/min,洗脱液为 70% 乙腈,洗脱线性梯度 0~100%。

1.2.11 MALDI 质谱分析: 英国 VG 公司 Tofspec 质谱仪上进行,采用基质辅助激光解吸附飞行时间(Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight, MALDI-ToF)质谱分析,α-腈基-4-羟基肉桂酸为基质。N₂ 激光源,波长 337nm,加速电压 23 608V,浓缩样品及 10 倍稀释样品分别上样。

2 结 果

2.1 用 PCR 方法扩增 hPTH 基因

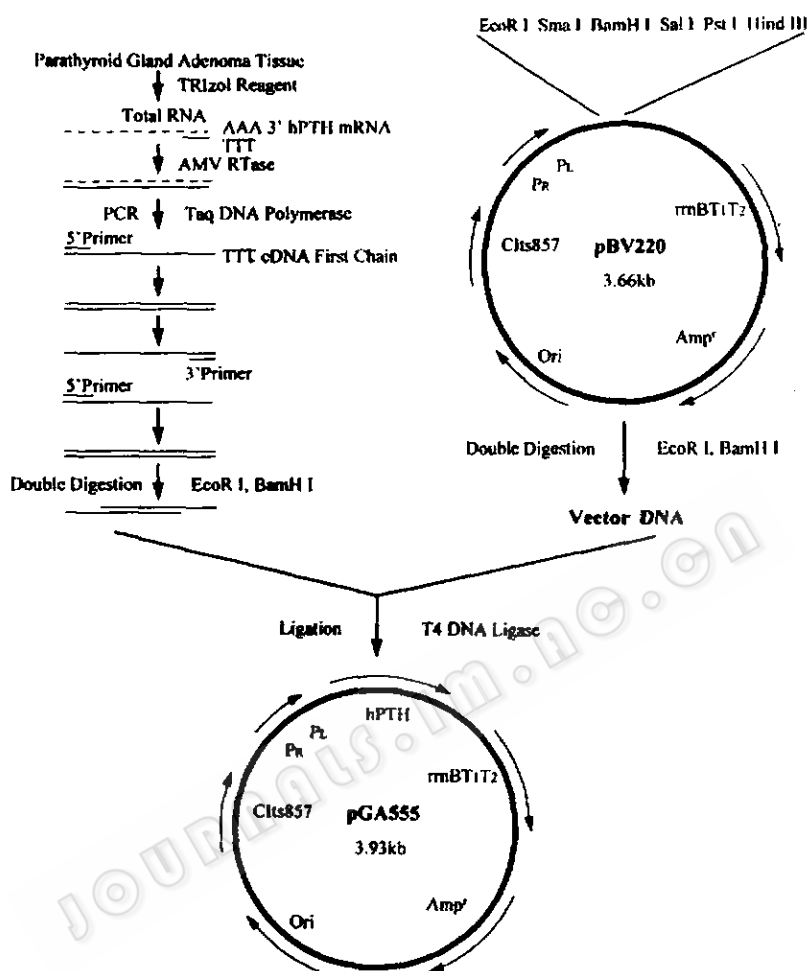


图 1 hPTH 基因 PCR 合成及克隆策略

Fig.1 Schematic representation of hPTH gene PCR synthesis and cloning

图版 I-A 为 PCR 扩增结果,由此可见扩增的片段大小约为 270 bp,与已报道的 hPTH 基因大小相同。

2.2 hPTH 基因的克隆

双酶切筛选的重组质粒 pGA555 进一步进行酶切鉴定分析。hPTH 基因内部距离 3' 端 171bp 处有一 PstI 位点, pBV220 多克隆位点在 BamH I 后有一 PstI 位点, pGA555PstI 单酶切有约 190bp 小片段,如图版 I-B 所示。

2.3 hPTH 的序列分析

双脱氧链终止法对重组质粒 pGA555 用引物 I、II 从两端进行了全序列测定,所得 hPTH 序列与文献报道一致,说明 hPTH 基因比较保守,在人种上没有差异,部分序列电泳分析结果见图版 I-C。

2.4 表达产物的放免活性分析

1.5ml 诱导表达的菌体用 7mol/L 盐酸胍于 4℃ 裂解 0.5h, 12 000r/min。4℃ 离心 10min 收集上清, 用 B₀ 缓冲液稀释 1 000 倍后测活, 含 pGA555 的细胞裂解液经稀释后, hPTH 含量为 265.77ng/dl, 是 pBV220 对照 0.55ng/dl 的 480 倍, 说明 hPTH 基因在细胞中获得了表达。

2.5 表达产物的电泳分析

表达菌体全蛋白及超声破碎细胞后的离心沉淀分别进行电泳分析。用转化有含胰岛素原基因的表达质粒 pJG103 的工程菌作对照^[16], 电泳结果如图版 I-D。质粒 pJG103 表达产物胰岛素原为 86 个氨基酸的多肽, 分子量大约 9 500Da。质粒 pGA555 表达产物 hPTH 由 84 个氨基酸组成, 大小约为 9 400Da, 与胰岛素原很相近, 电泳结果显示 pGA555 全蛋白样品在胰岛素原位置有表达条带。二者分别用超声波破碎细胞后离心, 沉淀经电泳分析, 可看出胰岛素原仍在沉淀中以包含体形式存在, 而 hPTH 则不出现条带, 说明它不在沉淀中, 而是以可溶的形式存在于细胞胞浆中。

2.6 表达产物的分离纯化

摇瓶大量培养后收集菌体, 3L 培养液可以得到湿菌体约 10g, 悬浮超声破碎, 离心收集上清, 调 pH3.8 酸沉淀可再去除大量的杂蛋白, 此后的上清再经 Resource-S 柱分离, 梯度洗脱, 层析图谱见图 2, 其中保留时间 13.56min 的峰为活性峰。收集活性峰, 浓缩后用 C₁₈ 反相柱分析, 结果如图 3 所示, 主峰只有一个。MALDI-ToF 质谱分析表明, 产物的分子量为 9 051Da, 接近 hPTH 的理论分子量 9 425Da。

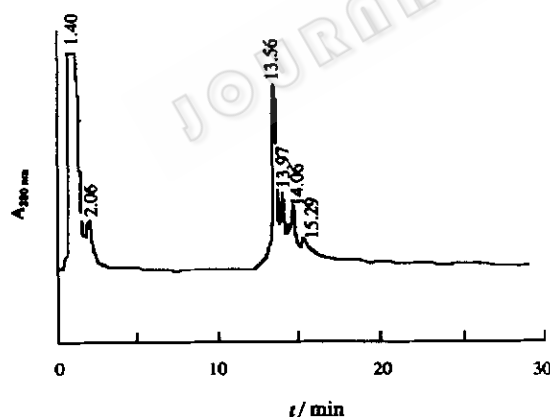


图2 hPTH 的 Resource-S 柱的分离纯化

Fig.2 Purification of hPTH by Resource-S column

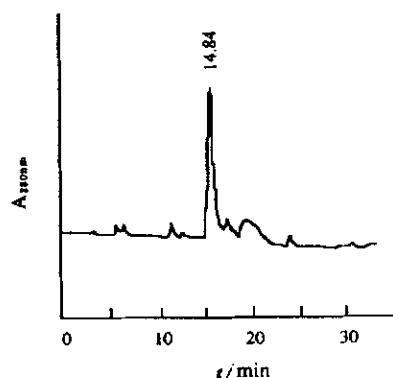


图3 HPLC C₁₈反相柱对活性峰进行分析

Fig.3 Analysis of radioimmuno active peak by C₁₈ reverse phase HPLC

3 讨论

甲状旁腺激素调节血中钙磷的浓度并可有效地治疗一些骨骼肌肉疾病。通过基因表达生产甲状旁腺激素的尝试国外已有报道, prepro-hPTH 序列在细菌及酵母体系中不能

完成完整 PTH 的加工和分泌^[9~10];用细菌信号肽代替 prepro-hPTH 序列表达分泌型 PTH,产物除了完整 PTH,还包括 PTH 片段^[11];人工合成的 hPTH 基因和 PTH cDNA 分别在大肠杆菌体内的直接表达,表达量也不十分理想^[12~13]。我们用 RT-PCR 方法成功地获得了 hPTH 基因,克隆入 pBV220 载体,在大肠杆菌细胞中完成了表达及分离纯化。hPTH 结构松散,在没有配体存在时,可不形成稳定构象,因此可以天然状态表达,以可溶形式存在于胞浆中。阳离子交换柱分离后的产物可再经反相柱的分离得到 HPLC 纯的样品。分析结果表明,我们得到了有活性的、分子量与其理论值接近的 hPTH。考虑到 hPTH 的不稳定性,我们在分离纯化过程中使用了蛋白酶抑制剂,以及不利于蛋白酶作用的缓冲体系,以保证 hPTH 的完整性,实验结果表明这是有效的。

参 考 文 献

- [1] Potts J T Jr, Kronenberg H M, Roseblatt M. *Adv Protein Chem*, 1982, **35**:323~396.
- [2] Habener J F, Potts J T Jr, Rich A. *J Biol Chem*, 1976, **251**:3893~3899.
- [3] Kronenberg H M, McDevitt B E, Majzoub J A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**:4981~4985.
- [4] Reeve J, Meunier P J, Parsons J A. *Br Med J*, 1980, **280**:1340~1344.
- [5] Huang M, Hanley D A, Rostad O P. *Life Science*, 1983, **32**:1009~1014.
- [6] Tregear G W, Van Rietschoten J, Greene E. *Endocrinology*, 1973, **93**:1349.
- [7] Potts J T Jr, Tregear G W, Keutmann H T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68**:63~67.
- [8] Martz A, Thomas M L. *Biochem Pharmacol*, 1983, **32**:3429~3433.
- [9] Born B, Freeman M, Hendy G N. *Mol Endocrinol*, 1987, **1**:5~14.
- [10] Born B, Freeman M, Bornstein W. *J Bone Miner Res*, 1987, **2**:353~360.
- [11] Hogset A, Blingsmo O R, Saether O. *J Biol Chem*, 1990, **265**:7338~7334.
- [12] Rabbani S A, Yasuda T, Bennett H P J. *J Biol Chem*, 1988, **263**:1307~1313.
- [13] Breyel B, Morelle G, Aufmkolk B. *3rd Congr Sur Biotech*, 1984, **111**:363~369.
- [14] Vasicek T J, McDevitt B E, Freeman M W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**:2127~2131.
- [15] Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**:680~685.
- [16] Tang J G, Hu M H. *Biotechnology Letters*, 1993, **15**:661~666.

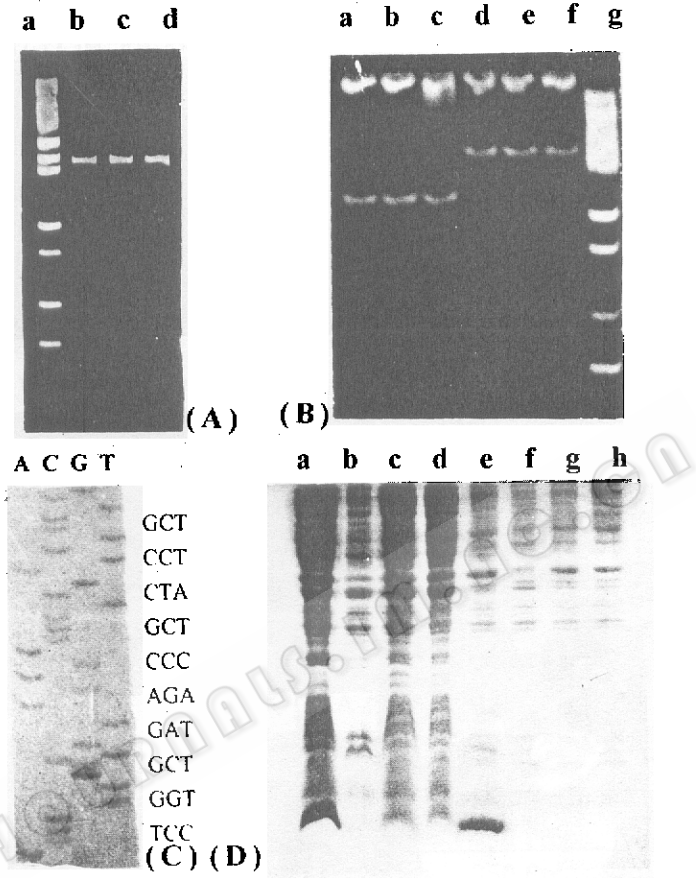
Expression of Human Parathyroid Hormone cDNA in *Escherichia coli*

Liu Guoan Tang Jianguo

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Human parathyroid hormone(hPTH) is a peptide hormone consisting of 84 amino acids. Total RNAs were isolated from parathyroid adenoma tissue and mRNAs were reverse transcribed to obtain cDNAs. The hPTH gene was then amplified from cDNAs by PCR, inserted into expression vector pBV220 which contains a temperature inducible promoter and confirmed by DNA sequencing. The recombinant plasmid was used to transform *E. coli* DH5 α . The radiommo activity of hPTH in the crude extract of DH5 α containing recombinant plasmid pGA555 was 265.77ng/dl, which is 480 times as that of control. After partial purification of the expression product, the supernatant was applied to Resource-S column chromatography. The radiommo active peak was collected and characterized by HPLC C₁₈ reverse phase column and MALDI mass spectrometric analysis.

Key words Human parathyroid hormone, *E. coli*, gene cloning and expression, isolation and purification



(A) 7.0% PAGE analysis of hPTH cDNA PCR product. (a) pGEM-7ZI(+) /Hae III DNA molecular weight marker, from top to bottom is 657, 458, 434, 328, 289, 267, 174, 142, 102, 80bp, respectively. (b), (c), (d) hPTH cDNA PCR products.

(B) 7.0% PAGE analysis of pGA555 with Pst I digestion and EcoR I, BamH I double digestion. (a), (b), (c) pGA555, digested with Pst I. (d), (e), (f) pGA555, digested with EcoR I and BamH I. (g) pGEM-7ZI(+) /Hae III DNA molecular marker, from top to bottom is 657, 458, 434, 328, 289, 267, 174, 142, 102, 80bp, respectively.

(C) 6% urea-PAGE analysis of hPTH gene partial sequence.

(D) 15% SDS-PAGE analysis of expressed products. (a) Total proteins of cells containing pJG103, (b) Total proteins of cells containing pBV220. (c), (d) Total proteins of cells containing pGA555, (e) pellet of (a) after sonication and centrifugation. (f) Pellet of (b) after sonication and centrifugation. (g), (h) Pellet of (c), (d) After sonication and centrifugation.