

重组人心房利钠肽 (ANP) 的原核表达、纯化及鉴定

陈晨辉^{1,4*}, 赵自叶^{2,6*}, 徐进^{4,6}, 曹雪松^{2,6}, 郭尚敬^{3,6}, 李军^{3,6}, 王皓^{5,6}, 侯盛^{5,6}

1 同济大学 生命科学与技术学院, 上海 200092

2 聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252000

3 聊城大学 药学院, 山东 聊城 252000

4 上海张江生物技术有限公司, 上海 201203

5 第二军医大学肿瘤研究所, 上海 200433

6 抗体药物与靶向治疗国家重点实验室, 上海 201203

陈晨辉, 赵自叶, 徐进, 等. 重组人心房利钠肽 (ANP) 的原核表达、纯化及鉴定. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1273–1285.

Chen CH, Zhao ZY, Xu J, et al. Prokaryotic expression, purification and identification of recombinant human atrial natriuretic peptide. Chin J Biotech, 2016, 32(9): 1273–1285.

摘要: 为提高重组人心房利钠肽 (Atrial natriuretic peptide, ANP) 的表达量, 将 3 个 ANP 通过赖氨酸 (Lysine, K) 串联, 并构建相对应的重组表达载体 pET28a(+)/ANP₃。转染大肠杆菌进行诱导表达, 目的蛋白约占菌体总蛋白的 60%。经过包涵体变复性, 赖氨酸酶 (Lys-C) 和羧肽酶 (CPB) 水解, 以及一系列层析纯化, 每升培养液可获得约 16 mg 的 ANP 蛋白。最终, 纯化后的 ANP 经 UPLC 及 Tricine SDS-PAGE 鉴定, 纯度大于 90%, LC-MS 鉴定显示其分子量为 3 080 Da, 且为二硫键正确形成的 ANP 单体, 通过 ELISA 试剂盒检测, 其具有和参比品一致活性。本研究为 ANP 的大规模制备打下了基础。同时, 所采用的串联表达技术也为其他多肽类药物的重组表达提供了新的思路。

关键词: 心房利钠肽, 串联表达, 多肽纯化

Received: January 10, 2016; **Accepted:** March 24, 2016

Supported by: National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2014AA021004), State Key Project of drug for New Drug Development (Nos. 2013ZX09101021, 2013ZX09401303), Shanghai Commission of Science and Technology (Key laboratory and Projects) (Nos. 13DZ1930100, 14DZ2272300), Shanghai Excellent Technical Leader (No. 13XD1424000), Shanghai Key Technologies R&D Program of Biological Medicine (No. 15431906100), Shanghai Key Discipline Fund (No. B905).

Corresponding author: Sheng Hou. Tel: +86-21-60129276; Fax: +86-21-60129270; E-mail: sheng.hou@sinomabtech.com

*These authors contributed equally to this study.

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA021004), 国家新药创制重大专项 (Nos. 2013ZX09101021, 2013ZX09401303), 上海市重点实验室 (Nos. 13DZ1930100, 14DZ2272300), 上海市优秀学术带头人 (No. 13XD1424000), 上海市生物医药领域科技支撑项目 (No. 15431906100), 上海市重点学科基金 (No. B905) 资助。

Prokaryotic expression, purification and identification of recombinant human atrial natriuretic peptide

Chenhui Chen^{1,4*}, Ziye Zhao^{2,6*}, Jin Xu^{4,6}, Xuesong Cao^{2,6}, Shangjing Guo^{3,6}, Jun Li^{3,6}, Hao Wang^{5,6}, and Sheng Hou^{5,6}

1 School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China

2 School of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252000, Shandong, China

3 School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252000, Shandong, China

4 Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Shanghai 201203, China

5 Cancer Institute, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

6 State Key Laboratory of Antibody Medicine and Targeted Therapy, Shanghai 201203, China

Abstract: In order to improve the expression of recombinant human atrial natriuretic peptide (ANP), a new plasmid (pET28a(+)/ANP₃) containing 3 tandem ANP genes with lysine codon as the interval linker, was constructed. Target gene was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and induced by IPTG, about 60% of the total-cell-protein was the target protein, His₆-ANP₃. After denaturation and refolding, it was digested by Endoproteinase Lys-C and Carboxypeptidase B (CPB) and then purified by a series of purification processes, about 16 mg purified ANP monomer could be obtained from one liter bacteria broth of shaking culture. Ultimately, the purity of protein was above 90% determined by UPLC and Tricine SDS-PAGE, its molecular weight was 3 080 Da according to LC-MS identification and it was proved to be equivalent to the reference product by ELISA. The use of tandem gene expression can provide a new possible model for the expression of other peptide drugs.

Keywords: atrial natriuretic peptide, tandem expression, peptides purification

人心房利钠肽 (ANP) 是由人心房肌细胞分泌的一种小肽激素, 由 28 个氨基酸组成, 其中的 17 个氨基酸通过一对二硫键连接形成闭环, 而氨基端和羧基端分别有 6 个和 5 个氨基酸组成的短链 (图 1)。研究表明, ANP 具有舒张血管、降低血压、增加血管通透性以及利钠、利尿等作用^[1], 并能对抗肾素-血管紧张-醛固酮系统, 在调节心血管系统^[2-4]和盐水代谢平衡中也发挥着重要的作用^[5-6]。目前, 重组人心房利钠肽^[7], 主要用于心力衰竭的治疗^[8-10]。

作为多肽类药物, ANP 因分子量较小, 目前主要采用化学合成的方法和重组表达进行大规模制备。然而, 基因重组表达技术的发展, 尤

其是串联表达技术开发为多肽的制备提供了另一种选择方案^[5-8]。为提高 ANP 的表达量, 降低重组表达成本, 本研究采用 3 个 ANP 基因进行串联表达的模式, 首次在大肠杆菌中重组表达融合蛋白 His₆-K-ANP-K-ANP-K-ANP(His₆-ANP₃), 其中在 ANP 与融合标签以及 ANP 之间均加入赖氨酸 K。串联融合蛋白在经过变性, Lys-C (Endoproteinase Lys-C) 和 CPB (Carboxypeptidase B) 酶切后, 经过层析纯化, 可得到正确形成二硫键内肽环的单体 ANP。经 Tricine-SDS-PAGE^[15] 和 HPLC 鉴定, 蛋白纯度大于 90%, LC-MS 结果显示目的蛋白为单体 ANP 且无明显氧化及脱氨基修饰。

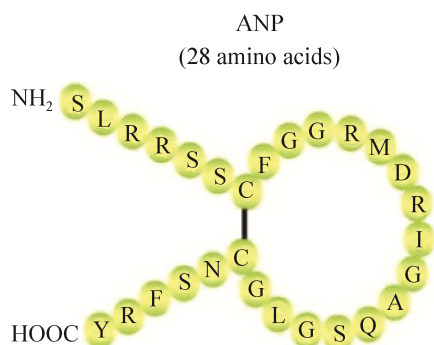


图 1 ANP 的氨基酸序列和结构图^[1]

Fig. 1 Amino acid sequence and structure of atrial natriuretic peptide (ANP)^[1].

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株

大肠杆菌 TG1、BL21 (DE3) 及质粒 pET28a(+) 为本实验室保存, pGEM-T vector 购自 Promega 公司。

1.1.2 基因合成及引物设计

由 Invitrogen 公司全基因合成含 3 个通过赖氨酸 K 连接的串联 ANP 基因序列 (每个片段 84 bp), 即 pMD18-T/ANP₃, 并设计引物: 正向引物(5'-3') CATATGGACGACGACGACAAGTCT (含 DDDDK, 以利于复性后蛋白标签的酶切去除), 限制性酶切位点是 *Nde* I; 反向引物为(5'-3') AAGCTTCTATCATTAGTAGCGAAAGGAGTTA CAGC, 限制性酶切位点是 *Hind* III。

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶、DNA Marker 2000、 λ -*Hind* III digest DNA Marker 购自 TaKaRa 公司。T4 DNA 连接酶、Go-*Taq* Green Master Mix 购自 Promega 公司。ANP 标准品购自 Chinese Peptide Company。蛋白 Marker 购自 Thermo Scientific

公司。琼脂糖购自 Amresco 公司。胰蛋白酶、酵母提取物购自 Oxoid 公司。色谱级乙腈、质谱级甲酸购自 Sigma 公司。色谱级三氟乙酸购自 TEDIA 公司。 Ni^{2+} 层析填料购自美国 GE Healthcare 公司。Nuvia S 层析填料购自美国 Bio-Rad 公司。ACQUITY UPLC BEH C18 Column (1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm)、ACQUITY UPLC BEH300 C4 (1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm) 均购自美国 Waters 公司。Human ANP (h-ANP) ELISA Kit (检测范围: 20–480 pg/mL) 购自上海酶研生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

超纯水, Milli-Q 系统: Millipore 公司产品; AKTA Purifier 纯化仪: GE 公司; 串联四级杆飞行时间质谱仪 Xevo G2-S QToF: Waters 公司; 超高效液相色谱层析系统, Acquity UPLC H-Class Bio 系统: Waters 公司; 多功能酶标仪 SpectraMax M5, Molecular Devices。

1.3 方法

1.3.1 pET28a(+)/ANP₃ 原核表达载体的构建和鉴定

以全基因合成的 pMD18-T/ANP₃ 克隆质粒为模板, PCR 扩增获得含有限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点的目的基因片段。2% 琼脂糖凝胶电泳后, 切胶纯化回收目的 DNA 片段, 并将回收片段与载体 pGEM-T-Vector 连接, 转化 TG1 感受态细胞, 利用质粒 DNA 抽提试剂盒提取质粒后酶切鉴定, 并测序鉴定; 再用 *Nde* I 和 *Hind* III 从测序正确的 T 载体上切下目的片段, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收目的片段, 与经过同样酶切的表达载体 pET28a(+) 连接, 转化 TG1, 然后挑克隆, 提取质粒, 再进行酶切鉴定, 选一个鉴定正确的

质粒,再转化表达菌株 BL21 (DE3),最后鉴定并保存正确的种子菌株。

1.3.2 ANP₃重组蛋白的诱导表达及条件优化

将菌液 pET28a(+)/ANP₃ BL21 (DE3) 接种于 5 mL LB 培养基中 37 °C 振荡过夜,按 1 : 50 体积比扩大培养,在 OD_{600} 值达到 0.6–1.0 后,分别加入不同浓度的 IPTG,在 25 °C、37 °C 进行诱导表达 4 h,取样处理,进行 15% SDS-PAGE 电泳分析,确定最佳诱导表达条件。

1.3.3 ANP₃重组蛋白包涵体变性、复性、纯化及鉴定

根据最佳优化条件培养菌体,离心收集菌体,并用 1×PBS 缓冲液充分悬浮,于冰上超声破碎菌体(超声 2 s,间隙 6 s,360 W 功率,30 min),离心(9 000 r/min,30 min)弃上清,获得包涵体。包涵体变性处理(变性液:8 mol/L 尿素+20 mmol/L Tris,pH 8.0):包涵体称重,溶解,离心,经 0.45 μm 滤膜过滤。初步纯化:首先用 Ni⁺亲和色谱柱纯化(平衡液:20 mmol/L PB +500 mmol/L 氯化钠+20 mmol/L 咪唑+8 mol/L 尿素,pH 7.4;洗脱液:20 mmol/L PB+500 mmol/L 氯化钠+500 mmol/L 咪唑+8 mol/L 尿素,pH 7.4),UV₂₈₀ 波长检测,收集洗脱峰;然后使用 Sephadex G25 脱盐柱将所得主峰置换至 Tris 尿素缓冲液中(20 mmol/L Tris+8 mol/L 尿素,pH 7.5),UV₂₈₀ 波长检测。复性处理(复性液:100 mmol/L 醋酸+0.2%聚山梨酯 80,pH 3.0,4 °C 提前预冷):按照一定的体积比例(1 : 25)进行稀释复性,4 °C 放置过夜。调节复性液 pH,利用蛋白酶 Lys-C 进行酶切,然后采用阳离子交换 Nuvia S 进行纯化,UV₂₁₅ 波长检测,获得 ANP 单体蛋白以及末端含 K 的 ANP 蛋白;再将末端含赖氨酸 K 的 ANP 洗脱峰调节 pH 至中性,利

用羧肽酶 CPB 进行酶切,再次采用阳离子交换柱 NuviaS 纯化,UV₂₁₅ 波长检测,获得单体蛋白 ANP。最后,利用 12% Tricine-SDS-PAGE、UPLC-C18 反相检测柱以及 LC-MS 分析和鉴定各纯化阶段的蛋白。

1.3.4 UPLC-C18 反相检测

以标准品作为参照,用 ACQUITY UPLC BEH C18 Column (1.7 μm, 2.1 mm×100 mm) 色谱柱以超纯水-0.1%甲酸为流动相 A,乙腈-0.1%甲酸为流动相 B,15%–90% B 液进行 15 min 梯度洗脱,流速 0.4 mL/min,上样量 10 μL,检测波长设置为 214 nm 及 280 nm。

1.3.5 质谱分析目的蛋白 ANP 以及含 K 的 ANP 片段

将末端含赖氨酸 K 的 ANP 洗脱峰(Nu-E4),即酶切前以及 CPB 酶切后的样品置换缓冲液至碳酸氢铵(50 mmol/L,pH 7.8)中,通过 UPLC-ESI-Q-TOF 技术对其进行质量分析。用 ACQUITY UPLC BEH300 C4 (1.7 μm, 2.1 mm×50 mm) 反相柱,以 10%乙腈-1% 甲酸为流动相 A,乙腈为流动相 C,10%–30% 流动相 C 进行 10 min 梯度洗脱,流速 0.3 mL/min,上样量为 2 μL。

1.3.6 ELISA 分析检测

首先将 ANP 参比品(960 pg/mL)以 2 倍比进行稀释,即:960、480、240、120、60、30 pg/mL。再将纯化获得的样品 ANP 利用样品稀释液稀释至 960 pg/mL,然后再以 2 倍比进行稀释样品。分别以 50 μL/孔体积加样,同时设置空白孔;37 °C 温育 30 min;用洗涤液重复洗板 5 次,拍干;加酶:每孔加入酶标试剂 50 μL,空白孔除外;37 °C 再温育 30 min;洗板;显色 10 min;终止反应;450 nm 波长测定。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET28a(+)/ANP₃ 构建

以 pMD18-T/ANP₃ 克隆质粒为模板, PCR 扩增含 ANP₃ 的目的片段, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在约 250 bp 处可见扩增产物, 大小与预期相符。然后与 pET28a(+) 载体连接, 用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 结果表明重组原核表达载体 pET28a(+)/ANP₃ 构建成功 (图 2)。

2.2 重组 ANP₃ 的诱导表达及纯化

pET28a(+)/ANP₃/BL21 菌液在扩大培养后 OD_{600} 为 0.6–1.0, 经 0.025 mmol/L IPTG 诱导培养, 15% SDS-PAGE 结果显示在分子量约 14 kDa 诱导出目的蛋白 (图 3, 箭头指示位置), 与理论值相符, 并确定最佳诱导条件为: 0.025 mmol/L 的 IPTG, 温度 37 °C, 时间 4 h。通过摇瓶培养, 将重组蛋白依次经过变复性酶切及进一步层析纯化, 可获得约 3 kDa 的目的蛋白, 其纯度可达到 90% 以上 (图 4), 最终每升摇瓶菌液可获得约 16 mg 目的蛋白。后期我们可尝试使用 10 μ m C18 制备填料进行纯化, 缓冲液及梯度条件同分析条件, 可以将蛋白纯度进一步提高。

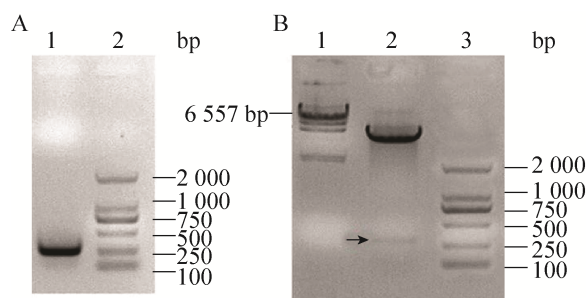


图 2 重组原核表达质粒 pET28a(+)/ANP₃ 的构建

Fig. 2 Construction of pET28a(+)/ANP₃ recombinant prokaryotic expression plasmid. (A) 1: PCR products of ANP₃; 2: DL2000 DNA marker. (B) 1: λ -*Hind* III digest DNA marker; 2: digestion identification of pET28a(+)/ANP₃ with *Nde* I 和 *Hind* III; 3: DL2000 DNA marker.

2.3 UPLC-C18 反相检测目的蛋白

包涵体复性液调节 pH 至 6.5, 以质量比 1 : 50 加入蛋白酶 Lys-C, 4 °C 酶切 2 h 后, 0.45 μ m 滤膜过滤, 即为组分[1]上样液 sample, 然后进行第一次阳离子交换柱 Nuvia S 纯化, 分别收集洗脱峰, 第一个峰为[2]杂质峰 (Nu-E1), 第二个峰为[3]杂质峰 (Nu-E2), 第三个为目的峰[4] ANP 单体 (Nu-E3), 第四个峰为目的峰[5]末端含 K 的 ANP 片段 (Nu-E4), 以浓度为 0.1 mg/mL 的 ANP 标准品[6]作为参照, 利用反相 UPLC-C18 进行检测 (图 4C; 图 5A、B)。

2.4 质谱分析目的蛋白 ANP 以及含 K 的 ANP 片段

2.4.1 ANP 二硫键内肽环的鉴定

对于末端含赖氨酸 K 的 ANP 片段 (Nu-E4), 调节 pH 至中性 (pH 7.65), 按酶与蛋白 1 : 800 的

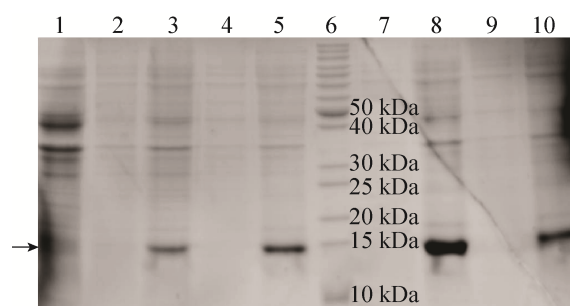
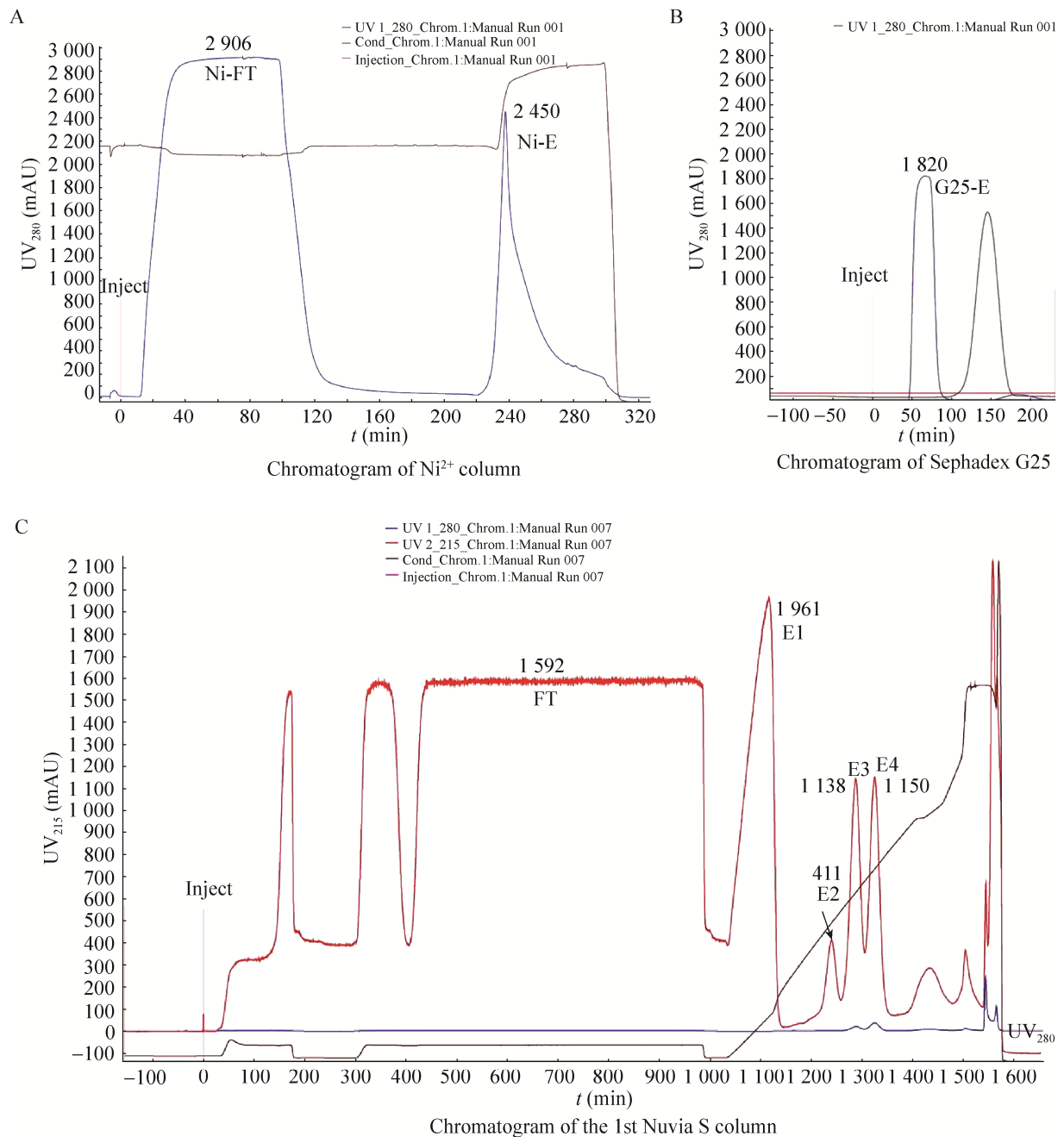


图 3 诱导温度及时间对重组蛋白 ANP₃ 表达量的影响

Fig. 3 Effect of inducing temperature and time on the expression of ANP₃; 1: pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3) noninduced; 2: supernatant of pET28a(+)/ANP₃/BL21 (DE3) induced by 25 °C, 2 h; 3: inclusion body of pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3) induced by 25 °C, 2 h; 4: supernatant of pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3) induced by 37 °C, 2 h; 5: inclusion body of pET28a(+)/ANP₃/BL21 (DE3) induced by 37 °C, 2 h; 6: unstained protein ladder; 7: supernatant of pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3) induced by 25 °C, 4 h; 8: inclusion body of pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3) induced by 25 °C, 4 h; 9: supernatant of pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3) induced by 37 °C, 4 h; 10: inclusion body of pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3) induced by 37 °C, 4 h.

质量比，室温酶切反应 2 h，样品处理后，利用 LC-ESI-TOF 质谱检测，结果如下：图 6A 显示酶切反应后可获得质荷比为 3 079.469 2 的 ANP 单体，与标准品 ANP 大小一致；图 6B 表明还

原后的目的蛋白分子量比未还原的目的蛋白大 2 Da，与理论分子量一致，说明目的蛋白 ANP 单体中存在完整的二硫键，即初步判断纯化获得的 ANP 单体具有较为完整的环状结构。



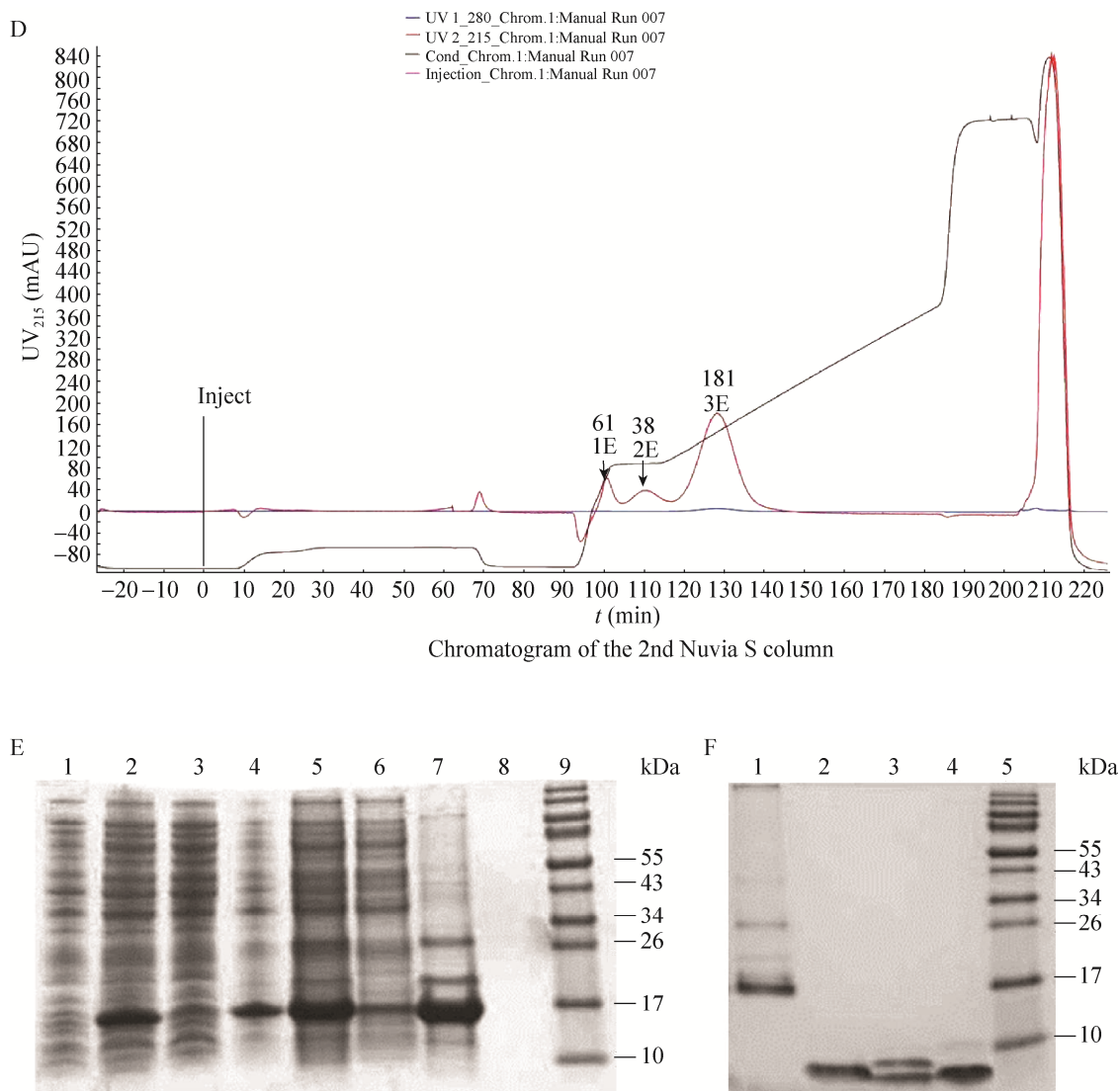


图 4 重组蛋白 ANP₃ 纯化图及 12% Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Purification chromatogram and 12% Tricine-SDS-PAGE analysis. (A-D) Chromatogram of Ni²⁺ column, Sephadex G25, the 1st Nuvia S column, the 2nd Nuvia S column respectively. (E) 1: pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3) noninduced; 2: bacterium of induced pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3); 3: supernatant of induced pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3); 4: inclusion body of induced pET28a(+)/ANP₃/BL21(DE3); 5: denatured solution of the inclusion body; 6–7: flowthrough of Ni²⁺ column (Ni-FT), elution of Ni²⁺ column (Ni-E); 8: loading buffer control; 9: unstained protein ladder. (F) 1: elution of Sephadex G25 (G25-E); 2–3: elution 4 and elution 3 of the 1st Nuvia S column (Nu-E4/E3) after Lys-C digestion; 4: elution from the 2nd Nuvia S column (Nu-3E) after CPB digestion; 5: pageRuler prestained protein ladder.

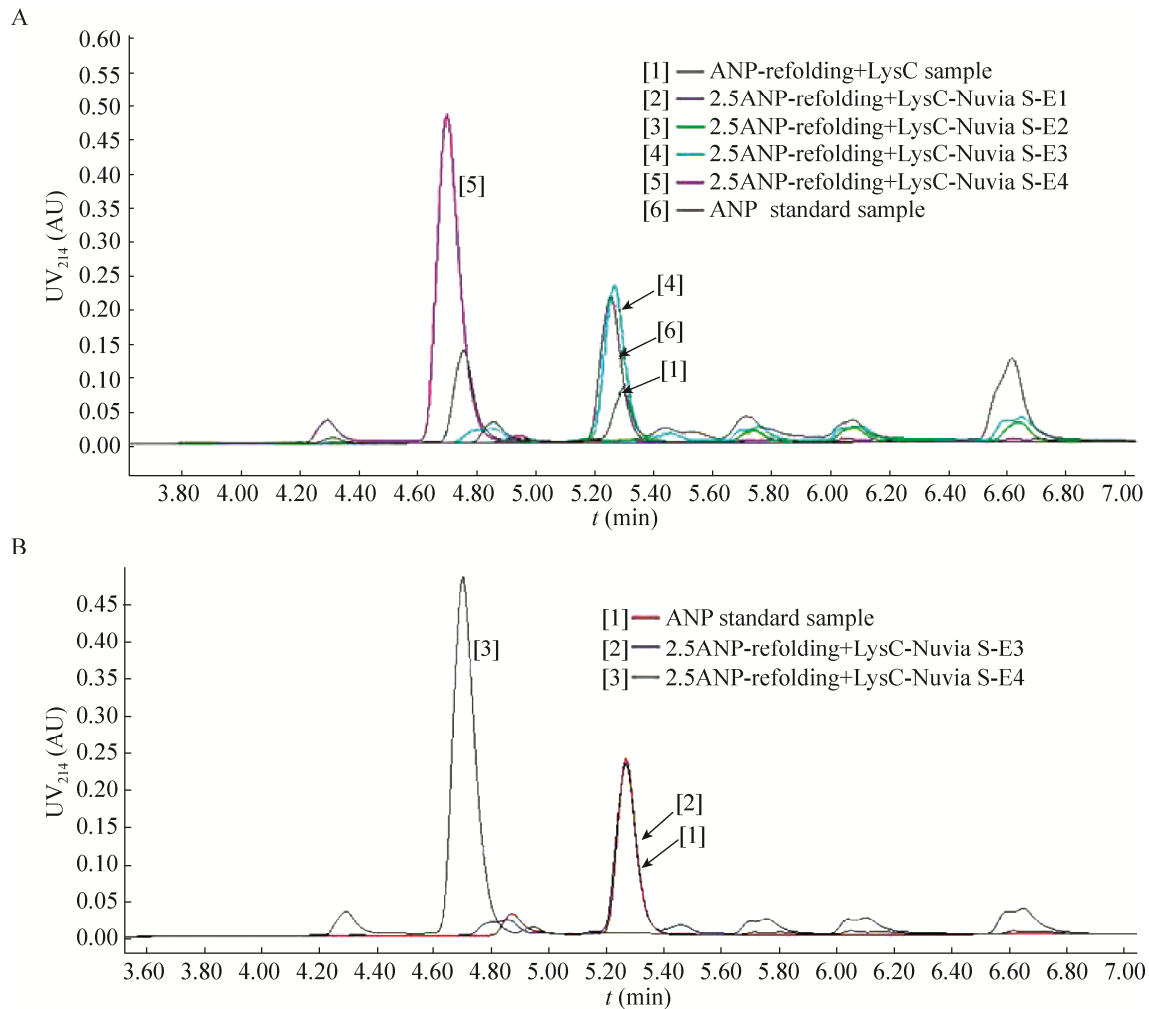


图5 UPLC-C18 检测蛋白酶 LysC 酶切重组蛋白 ANP₃ 色谱图

Fig. 5 UPLC-C18 chromatogram of recombinant protein ANP₃ after LysC digestion. (A-B): ANP standard sample eluted around 5.27 min, ANP fractions contained K(Nu-E4) eluted at around 4.72 min, ANP monomer(Nu-E3) eluted at around 5.27 min.

2.4.2 CPB 非特异性酶切鉴定

经常规 CPB 酶切条件酶切后，通过质谱计算，发现 CPB 也存在非特异性酶切，酶切位置分别位于 ANP 序列 C 端 CNSF|RY 与 CNS|FRY 处，对应质荷比分别为 2 760.306 2 和 2 613.229 2 (图 6B)。故为了提高目的蛋白的得率，需要对 CPB 酶切条件进行优化，从而减少

非特异性酶切。

2.4.3 CPB 酶切条件优化后的 UPLC-C18 检测

通过减少酶切时间或酶用量，CPB 与目的蛋白以 1 2 000 质量比，室温，酶切 2 h 反应后，非特异性酶切显著降低 (图 7A)，0.45 μm 滤膜进行过滤，即为组分[3]上样液 sample，其中[2]为 CPB 酶切前的样品，然后再利用第二次阳离

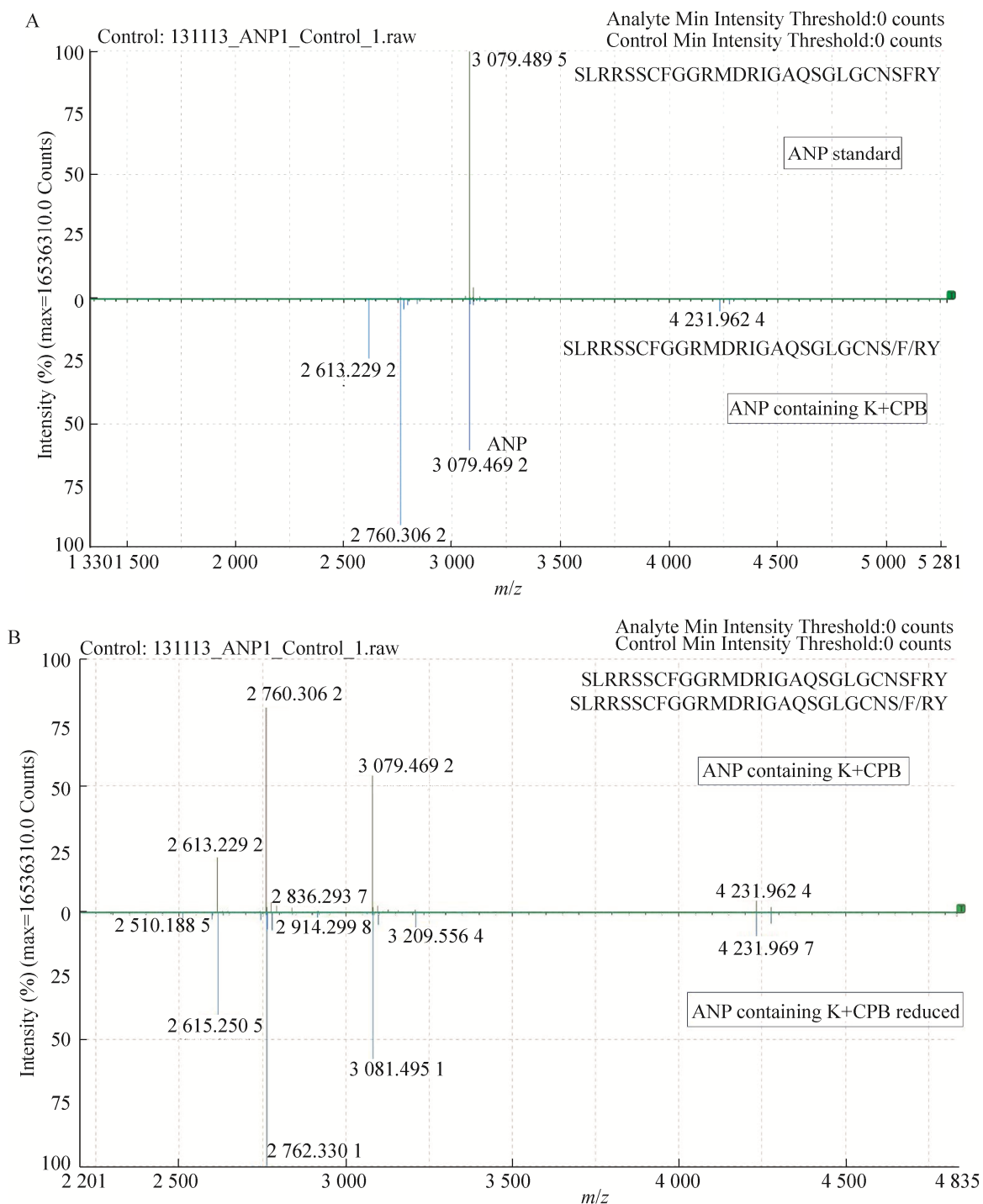


图 6 含 K 的 ANP(Nu-E4)及 CPB 酶切后的质谱鉴定图 (TIC)

Fig. 6 MS spectrum of ANP containing K (Nu-E4) and Nu-E4 digested by CPB. (A) Comparative spectrum of ANP standard substance and Nu-E4 digested by CPB. (B) Comparative spectrum of digested Nu-E4 nonreduced(up) and reduced by DTT(down).

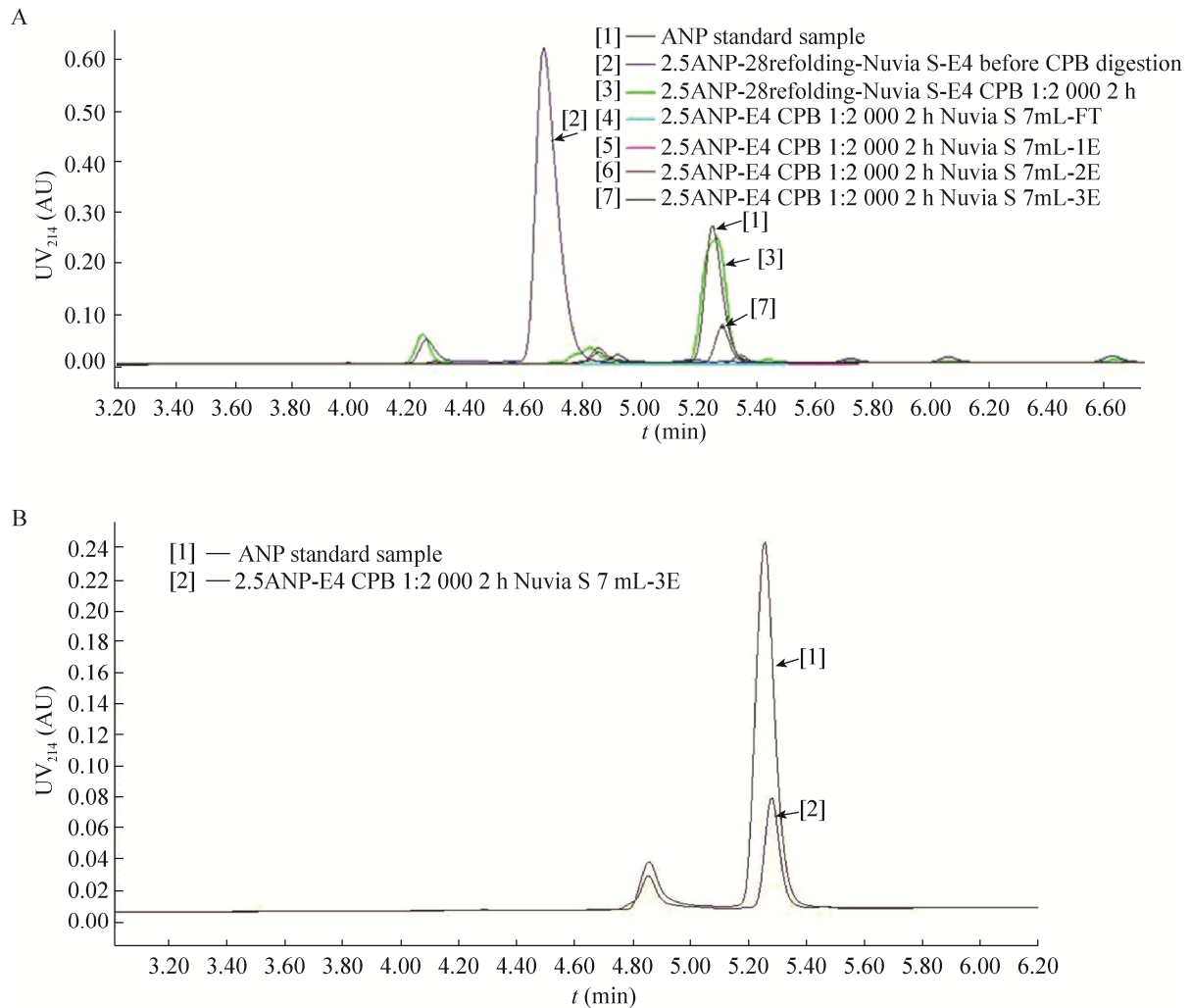


图7 UPLC-C18 检测蛋白酶 CPB 酶切含 K 的 ANP 色谱图

Fig. 7 UPLC-C18 chromatogram of ANP fractions contained K after CPB digestion. (A) ANP fractions contained K after CPB digestion. (B) ANP standard sample and ANP monomer (Nu-3E) eluted at around 5.30 min.

子交换柱 Nuvia S 纯化, 首先组份[4]为过柱流出液 FT (Flow through), 再分别收集洗脱峰, 第一个峰为[5]杂质峰 (Nu-1E), 第二个峰为[6]杂质峰 (Nu-2E), 第三个为目的峰[7] ANP 单体 (Nu-3E), 以[1]标准品 ANP (0.1 mg/mL) 作为参照, 利用反相 UPLC-C18 进行检测 (图 4D, 图 7A、B)。结果显示: 以 CPB 与 Nu-E4 按 1:2 000 质量比进行酶切反应的条件适中, 收集到的目的峰

为 Nu-3E。

3 ELISA 检测

通过 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值), 4 参数回归拟合作图 (图 8)。结果显示本研究表达纯化的 ANP 单体蛋白与 ANP 参比品具有相似的活性。从另一方面证明了所表达的 ANP 与参比品具有一致的抗原识别表位。

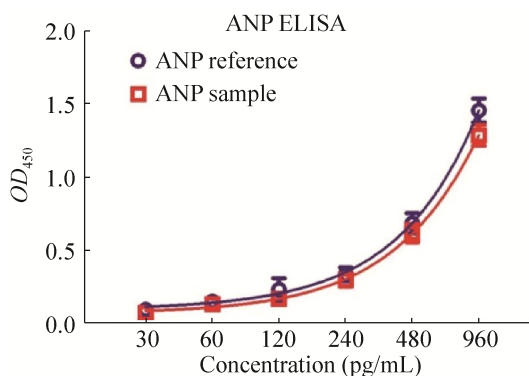


图 8 ELISA 检测目的蛋白 ANP

Fig. 8 ELISA assay of ANP. Cycle: ANP reference product; square: ANP sample.

4 讨论

心房利钠肽 (ANP) 是目前用于心力衰竭治疗的一种多肽类药物, 其对于防止高血压、心肾等相关疾病的治疗方面^[16-21]以及抗肿瘤的作用^[14, 22]方面具备良好的应用前景。由于直接重组表达小肽药物的表达量低、稳定性差及容易降解等性质, ANP 及其他多肽的制备目前仍以体外多肽合成为主。本研究采用多拷贝基因串联表达的方式进行 ANP 制备。在目的基因与融合标签 (His₆-tag) 间以及各拷贝基因之间均有赖氨酸 (K) 作为 linker, 即可以被限制性 Lys-C 酶切。而 CPB 的使用, 则可以进一步水解去除 ANP 羧基端残留的 K。新构建的表达载体 His₆-ANP₃ 在大肠杆菌中可实现高效表达, 并产生大量包涵体。同时, 可以使用 His 标签进行初步的纯化, 在包涵体的变性及复性条件优化后, ANP 的得率明显提升, 但对于表达量占菌体约 60% 的包涵体进行复性纯化, 后续仍有较大的提升空间。我们在前期的探索性研究阶段也尝试过串联 1 个、2 个及 3 个 ANP 在 pET22b(+) 中进行表达, 但是经过诱导后, 包

涵体含量为 3 个串联的最多, 1 个及 2 个串联表达量比较低; 随后换成 pET28a(+) 后, 3 个串联的表达量得到了进一步提高, 考虑到这种情况, 我们在最终表达质粒的选择上使用了 3 个串联表达。因此, 在表达量方面也许存在更进一步的优化空间。

在本研究中, 还发现 CPB 在酶切末端含赖氨酸 K 的 ANP 片段时存在非特异酶切, 且这一现象可在优化酶切条件后得以改善, 同时非特异性酶切的片段可以经过优化后续纯化予以去除。同时, 在使用 CPB 时需要严格控制酶切比例及时间, 减少由于非特异酶切带来的蛋白损失。

此外, UPLC 及质谱技术的应用, 可实现对小分子药物序列及结构进行快速准确的初步鉴定。ANP 中由两个半胱氨酸所形成的环状结构以及羧基端的氨基酸残基对于维持其生物活性起到至关重要的作用^[23], 因此十分有必要采用质谱技术进行精确的分子量鉴定, 以此来确定 ANP 结构及序列的正确性, 同时也可以对蛋白的降解、氧化及脱氨基予以鉴定。在后续的研究中, 我们将对得到的 ANP 单体进行大鼠体内降压、利尿、体外舒张血管等相关的实验^[13, 24-26], 并在纯化工艺及鉴定方法上进一步优化, 以用于大规模生产。

REFERENCES

- [1] Gardner DG, Chen S, Glenn DJ, et al. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension*, 2007, 49(3): 419-426.
- [2] Hisatomi K, Eishi K. Multicenter trial of carperitide in patients with renal dysfunction undergoing cardiovascular surgery. *Gen Thorac Card Surg*, 2012, 60(1): 21-30.

- [3] Morita Y, Kohsaka S, Oshima K, et al. Use of carperitide infusion for acutely decompensated heart failure. *Criti Care*, 2012, 16(1): 406.
- [4] McKie PM, Burnett JC. Rationale and therapeutic opportunities for natriuretic peptide system augmentation in heart failure. *Curr Heart Fail Rep*, 2014, 12(1): 7–14.
- [5] Frossard PM, Coleman RT. Human atrial natriuretic peptides (ANP) gene locus: Bgl I RFLP. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14(22): 9223.
- [6] Lema G. Human atrial natriuretic peptide, renal function, and cardiac surgery: do we all read the same? *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 15(2): 138–139.
- [7] Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of α -human natriuretic polypeptide (α -hANP). *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 118(1): 131–139.
- [8] Richards A M. The natriuretic peptides in heart failure. *Basic Res Cardiol*, 2004, 99(2): 94–100.
- [9] Ezekowitz J A. Novel pharmacologic therapies in development for acute decompensated heart failure. *Curr Cardiol Rep*, 2013, 15(2): 329.
- [10] George M, Rajaram M, Shanmugam E, et al. Novel drug targets in clinical development for heart failure. *Eur J Clin Pharmacol*, 2014, 70(7): 765–774.
- [11] Zhao M, Ma KT, Zhang NH. Expression of multi-copied atrial natriuretic peptide in soluble form in *E. coli*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, 15(3): 383–386 (in Chinese).
赵明, 马康涛, 张迺衢. 在大肠杆菌中表达可溶的多串心钠素. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(3): 383–386.
- [12] Chen WJ, Wang J, Lu JZ, et al. High level expression of human atrial natriuretic peptide in fusion form in *E. coli* system. *Acta Acad Med Sin*, 2001, 23(6): 573–579 (in Chinese).
陈伟京, 王俊, 路金芝, 等. 在大肠杆菌中以融合蛋白高效表达基因工程产品人心钠素. *中国医学科学院学报*, 2001, 23(6): 573–579.
- [13] Chen WJ. The genetic engineering study on atrial natriuretic peptide and an exploration on the technologic strategy of small peptide genetic engineering. Beijing: Peking Union Medical College, 2013 (in Chinese).
陈伟京. 心钠素基因工程研究及小肽基因工程技术路线探索. 北京: 中国协和医科大学, 2003.
- [14] Gao B, Wu XY, Lu Y. Anticancer effects of atrial natriuretic peptide and recombinant expression of the peptide. *Chin J Clin Med*, 2012, 19(4): 437–439 (in Chinese).
高波, 吴晓琰, 陆怡. 心房利钠肽的抗肿瘤作用及其基因工程表达. *中国临床医学*, 2012, 19(4): 437–439.
- [15] Haider SR, Reid HJ, Sharp BL. Tricine-SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*, 2012, 869: 81–91.
- [16] Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, et al. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 2012, 5: 91–96.
- [17] Sowers JR. Diabetes mellitus and vascular disease. *Hypertension*, 2013, 61(5): 943–947.
- [18] Lee CYW, Burnett Jr JC. Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart Fail Rev*, 2007, 12(2): 131–142.
- [19] Moro C, Klimcakova E, Lolmède K, et al. Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia*, 2007, 50(5): 1038–1047.
- [20] Shinagawa K. Clinical development and regulatory approval of acute heart failure drugs in Japan. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2015, 29(2): 107–109.
- [21] Nakamura Y, Hagino I, Aoki M, et al. Changes in plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in children undergoing surgical isolated atrial septal defect closure. *Ped Cardiol*, 2015, 36(6):

- 1219–1224.
- [22] Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, et al. The world's first clinical randomized trial of atrial natriuretic peptide for preventing cancer recurrence following lung cancer surgery. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2015, 16(Suppl 1): A72.
- [23] Qin N, Wei N, Yao XH, et al. The synthesis and secretion of human atrial natriuretic peptide in yeast cells. *Chin Sci*, 1991, 21(1): 62–66 (in Chinese).
秦宁, 魏楠, 姚锡惠, 等. 人心钠素在酵母细胞中的合成与分泌. *中国科学*, 1991, 21(1): 62–66.
- [24] Zhao M, Ma KT, Zhang NH. Purification of multi-copied atrial natriuretic peptide and the identification of its activity. *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, 15(5): 836–838 (in Chinese).
赵明, 马康涛, 张迺衡. 多串心钠素的纯化与活性测定. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(5): 836–838.
- [25] Daniel D Correa de sa MD, Chen HH. The role of natriuretic peptides in heart failure. *Curr Heart Fail Rep*, 2008, 10: 182–189.
- [26] Guido Boerrigter MD, Burnett Jr MD. Cardiorenal syndrome in decompensated heart failure: prognostic and therapeutic implications. *Curr Heart Fail Rep*, 2004, 1: 113–120.

(本文责编 郝丽芳)