

亚基的相应肽序列几乎是100%的相同。因此完全可以使用抗牛脑笼状囊泡颗粒 H^+ -ATPase 的58kD 亚基的血清来测定人肾液泡型 H^+ -ATPase 的58kD 亚基在大肠杆菌中的表达。图6为蛋白质印迹分析的结果。由图6可见,在牛脑笼状囊泡颗粒 H^+ -ATPase 与诱导的含重组质粒的 BL21 (DE3) 菌液样品中均出现特异的分子量为58 000免疫带,而在不加 IPTG 诱导的含重组质粒的 BL21 (DE3) 菌液样品,以及 PET-3a 转化的 BL21 (DE3) 中添加 IPTG 后的菌液样品中均没有出现相应的免疫带。在最初的蛋白质印迹分析中,曾有一些非特异性的带出现,使得背景很深。我们用 PET-3a 转化的 BL21 (DE3) 菌体裂解液对结合样品的硝酸纤维素滤膜进行了预封闭。结果发现,非特异性带被封闭,而特异的免疫带更加明显了。这说明了表达产物确实是所预期的由大肠杆菌产生的58kD 亚基。

本工作最简便地完成了人肾液泡型 H^+ -ATPase 的58kD 亚基基因在大肠杆菌中的高效表达。表达产物主要以包涵体形式存在,经

尿素、 $(NH_4)_2SO_4$ 分部、甘油梯度离心分离纯化,可得高纯度的表达亚基,超过了生化提取的纯度。这对于进一步研究58kD 亚基以及液泡型 H^+ -ATPase 的结构与功能将是十分有意义的。有关研究正在进行中。

致谢 高波宁博士对本工作给予大力指导及协助,特在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 Xie X S, Stone D K. J Biol Chem, 1988; **263**: 9859
- 2 Sudhof T C, Fried V A, Stone D K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **86**: 6067
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.85
- 4 Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J *et al.* Methods in Enzymology, 1990; **185**: 60
- 5 Laemmli U K. Nature (London), 1970; **227**: 680
- 6 Xie X S, Stone D K, Racker E. Methods in Enzymology, 1988; **157**: 634
- 7 Xie X S, Stone D K. J Biol Chem, 1986; **261**: 2492
- 8 Burnette W N. Anal Biochem, 1981; **112**: 195

鲑鱼生长激素基因分泌型表达质粒的构建*

张同海 宋诗铎¹⁾ 赵为诚 陈昆明²⁾ 祁伟 胡文芝 王培福 方佩华²⁾

(天津医学院第二附属医院, 天津 300211)

摘要 生长激素 (GH) 是动物垂体前叶分泌的一种多肽类激素。应用分子重组及 PCR 等技术,构建了一种鲑鱼生长激素基因分泌型表达质粒 pOsGH153,使编码鲑鱼生长激素成熟肽的序列克隆在大肠杆菌分泌型表达载体 PIN-III-ompA 内,直接位于编码大肠杆菌外膜蛋白 A 信号肽序列的下游,在 Lpp-Lac 杂合启动子控制下,经 IPTG 诱导,分子量约23 000的鲑鱼生长激素在大肠杆菌中获得高效表达,该产物具有天然鲑鱼生长激素的免疫活性,直接分泌到细胞周质,而信号肽被自动剪除。

关键词 鲑鱼生长激素,分泌型表达质粒,大肠杆菌,基因表达

生长激素 (GH) 是动物垂体前叶分泌的一种多肽类激素,具有促进幼年动物生长及多方面的代谢调节作用,为了研究 GH 在医药及畜牧养殖业中的应用,必须获得大量的生长激素。

以前的研究中,我们采用重组 DNA 技术,获得

* 天津科委自然科学基金资助。

¹⁾ 通讯联系人, ²⁾ 天津内分泌研究所 (天津 300070)。

收稿日期: 1993-05-18, 修回日期: 1993-10-30

了鲑鱼生长激素 cDNA 的分子克隆^[1], 并经聚合酶链反应方法 (PCR) 改造了 cDNA, 使编码成熟肽的鲑鱼生长激素 (sGH) 基因片段在大肠杆菌获得表达^[2]. 由于表达产物定位在大肠杆菌的细胞浆内, 易形成不溶性包涵体, 溶解包涵体内的蛋白质需要使用变性剂或去垢剂, 结果可能使蛋白质结构改变, 活性及产量降低. 此外, 表达产物的氨基端往往附加甲硫氨酸或其它氨基酸残基, 导致蛋白质的氨基端与天然蛋白质不一致.

本研究旨在构建一种鲑鱼生长激素基因分泌型表达质粒, 使编码鲑鱼生长激素成熟肽的序列克隆在大肠杆菌分泌型表达载体 PIN-III-ompA 内^[3], 直接位于编码大肠杆菌外膜蛋白 A 信号肽序列的下游, 在 Lpp-Lac 杂合启动子控制下, 经 IPTG 诱导, 鲑鱼生长激素在大肠杆菌中获得高效表达, 产物直接分泌到细胞周质, 而信号肽被自动剪除.

1 材料和方法

1.1 材料 宿主菌 *E. coli* JA221 (Lpp⁻, hdsM⁺, trpE5, LeuB6, LacY, recA1/F1LacI8, Lac⁺Pro⁺), 和 W620 (F' LacI8) 及质粒 pIN-III-ompA2 由美国新泽西大学 Inouye 教授赠给, *E. coli* JM 109, pUC18, 内切酶等分别购自 Boehringer Mannheim 公司, New England Biolabs 公司及中国医学科学院基础医学研究所. 含 Chinook 鲑鱼生长激素 cDNA 克隆的质粒 psGH4 自本实验室, 同位素自中国原子能研究院和 Amersham 公司. 细菌培养基为 2YT (16g 胰酶解脲, 10g 酵母浸膏, 10g NaCl 溶于 1L 水 pH7.0—7.2) 和 M9 补充培养基 (M9 基本培养基加葡萄糖至 4mg/ml, 色氨酸 20μg/ml, 亮氨酸 20μg/ml, 和硫胺素 2μg/ml). Chum 鲑鱼生长激素由日本 H. Kawauchi 教授赠送.

1.2 寡聚核苷酸的合成和标记 用固相亚磷酸法, 经 ABI 391 型 DNA 合成仪合成 DNA 片段. 探针标记同以往报导^[1].

1.3 PCR 扩增 DNA 参照宋诗铎等^[4]的方法.

1.4 DNA 重组反应 扩增产物经 EcoR I 和

BamH I 酶切, 在 T4 DNA 连接酶作用下, 与 PIN-III-ompA2 的 EcoR I 和 BamH I 酶切大片段连接, 依次转化进入大肠杆菌 W620, 大肠杆菌 JA221. 转化及转化子的筛选方法同以往报导^[4].

1.5 DNA 序列分析 采用双脱氧链末端法和荧光标记法, 经 ABI-370A 型 DNA 序列仪分析 DNA 片段, 反应试剂为美国 ABI 公司产品.

1.6 细菌膜周质蛋白提取 参照 Takahara 等方法^[5], 细菌 37℃ 振荡培养过夜, 至 A₆₆₀ 达 0.8—0.9, 加入终浓度为 0.01mmol/L 的 IPTG, 继续在 23℃ 振荡培养 4—6h, 离心收集菌体. 将菌体重新悬浮在含 10mmol/L Tris pH7.5, 20% 蔗糖溶液中, 0℃ 放置 5min, 再加入 0.5mol/L EDTA pH8.0, 置 0℃ 10min, 离心除去上清, 沉淀经蒸馏水洗涤后, 悬浮在 1mol/L Tris pH7.6 溶液中, 0℃ 下再放置 30min, 离心取上清液加入 1/10 体积的 100% 三氯醋酸, 置 0℃ 15min, 离心弃上清, 沉淀用 70% 冷乙醇洗涤两次, 冷冻干燥后备用. 该沉淀含有可溶性大肠杆菌细胞周质蛋白.

1.7 表达产物的 SDS-PAGE 分析 参照 Laemmli 等方法^[6], 表达产物经 SDS-聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 后, 采用银染法分析.

2 结 果

2.1 PCR 扩增引物、探针的设计 起始引物 P1 和终末引物 P2 (见图 1), P1 含 25 个碱基, 自 5' 端起有 10 个附加碱基序列, 包括保护序列和 EcoR I 识别序列, 其后与编码成熟肽前 5 个氨基酸残基的正链序列一致. P2 含 26 个碱基, 自 5' 端起有 9 个附加碱基序列, 包括保护序列和 BamH I 识别序列, 其后与终止密码和编码成熟肽终末 5 个氨基酸残基的负链序列一致. 使用 P1 和 P2 做引物, 经 PCR 扩增, 可获得 580 bp 扩增片段, 包括编码完整成熟肽序列和终止密码, 以及 5' 端的 EcoR I 和 3' 端的 BamH I 识别序列. 寡聚核苷酸探针 A 和探针 B 分别与编码成熟肽的前 7 个氨基酸和末 7 个氨基酸序列互补.

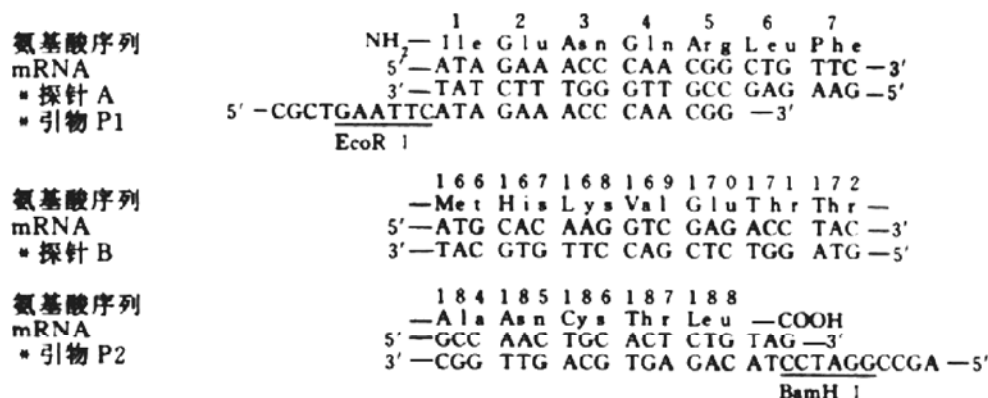


图1 鲑鱼生长激素部分氨基酸序列及合成的寡聚核苷酸探针和引物
起始引物 (P1) 和终末引物 (P2).

2.2 扩增产物的分子克隆及分泌型表达质粒的构建和筛选 策略见图2. 经 PCR 扩增得到的 580 bp 片段, 用内切酶 EcoR I 和 BamH I 酶解, 在 T4 DNA 连接酶作用下, 与分泌型表达载体 pIN- β -ompA2 的 EcoR I 和 BamH I 酶切大片段连接, 转化进入大肠杆菌 W620. 用 γ -³²P ATP 标记的寡聚核苷酸探针 A 作菌落原位杂交及放射自显影分析筛选出阳性转化子 (图3). 挑取阳性克隆, 提取质粒, 再经 EcoR I 和 BamH I 酶切, 电泳, 及 DNA 印迹杂交分

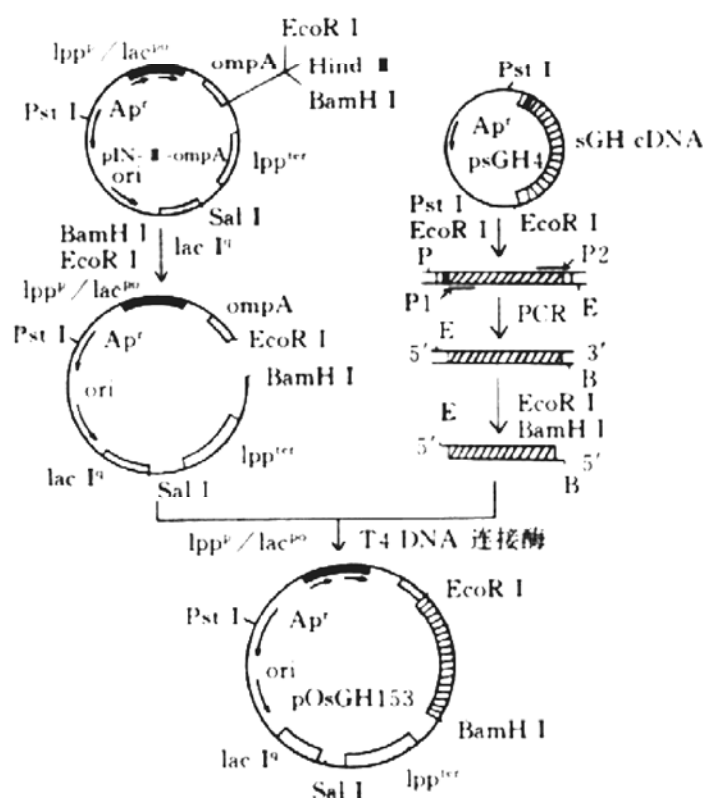


图2 分泌型表达质粒 pOsGH153 构建示意图

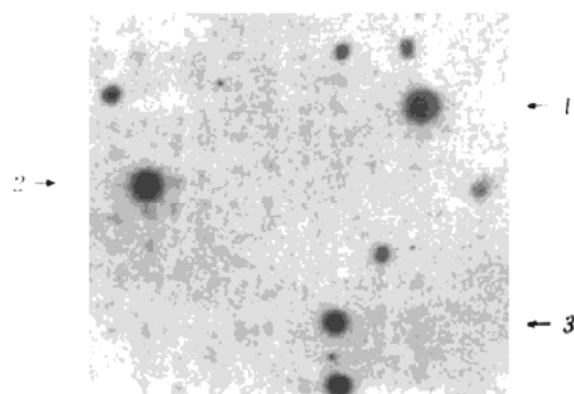


图3 转化子的菌落杂交分析
转化子在 90mm 培养皿中生长, 复制膜用 ³²P 标记的探针 A 进行菌落杂交, 1, 2, 3 分别为筛选的阳性克隆 pOsGH153, pOsGH128 和 pOsGH83.

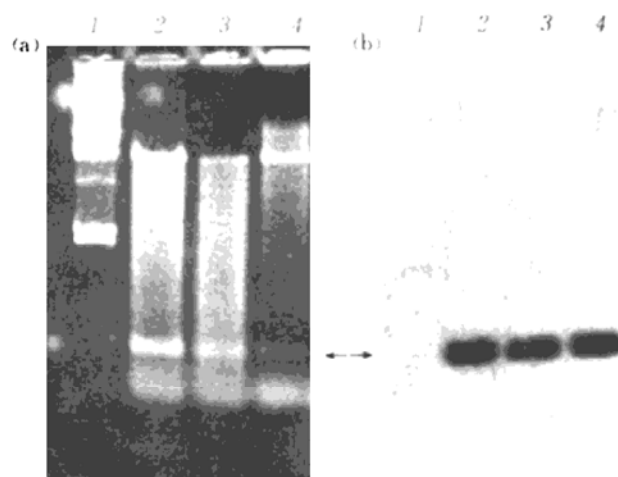


图4 阳性克隆经 EcoR I 和 BamH I 酶切后的电泳分析 (a) 和 DNA 印迹杂交分析 (b)
1: λDNA/Hind III, 2: pOsGH153, 3: pOsGH128, 4: pOsGH83.

析, 可见 pOsGH153 等三个克隆含有编码鲑鱼

生长激素成熟肽的基因片段, 约576 bp 长 (图4), 与氨基端探针 A 和羧基端探针 B 序列互补, 核酸序列分析证实编码生长激素成熟肽序列位于 ompA 信号肽序列下游阅读框架结构内, 其第一个密码子与 EcoR I 序列紧紧连接, 与实验设计完全一致。

2.3 鲑鱼生长激素在大肠杆菌中的表达 含有表达质粒 pOsGH153 的 JA221 菌株经隔夜培养, 用 IPTG 诱导 4h, 提取周质蛋白和胞浆蛋白。表达产物经 SDS-PAGE, 银染色分析及电泳凝胶扫描, 结果表明在分子量约 23 000 处多一条与大肠杆菌 ompA 信号肽阅读框架内融合的 sGH 基因表达产物带 (图5), 表达率占

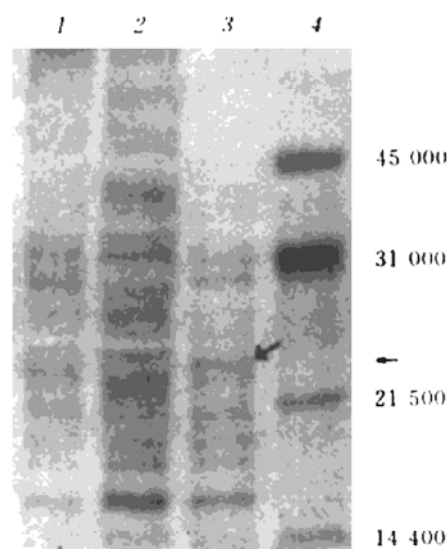


图5 含 pOsGH153 的 JA221 株表达后

细胞组分 SDS-PAGE 及银染色分析

1: 含空载体 PIN-III-ompA 的细菌周质蛋白; 2: 含重组质粒 pOsGH153 的细菌胞浆蛋白; 3: 含重组质粒 pOsGH153 的细菌周质蛋白, 箭头示 sGH, 约 23 000; 4: 蛋白质分子量标准。

细胞总蛋白的 10% 以上。以 sGH 纯品作标准物, 空载质粒 PIN-III-ompA 为阴性对照, 应用特异性 sGH 抗体对上述细胞位点表达产物进行放免活性测定。结果表明在周质产物中有高浓度的 sGH 免疫活性, 含量约 84 ng/ml, 胞浆和培养液中没有测到 sGH 放免活性。

3 讨 论

在既往的研究中, 我们已成功地应用 PCR 方法改造 cDNA 分子克隆, 在两个引物的 5' 端设计不同的酶切点, 使扩增的编码成熟肽序列易于进入表达载体的正确阅读框架内。此外通过改进的操作技术, 避免了 PCR 过程中可能发生的非预期突变。本研究中我们以 PIN-III-ompA 为基础构建了 sGH 分泌型表达载体 pOsGH153, 可溶性鲑鱼生长激素在大肠杆菌的周质中存在, 胞浆中含量很少, 这样可通过简单的渗透破膜法提纯表达产物。此结果与 Takahara 等诸多学者报导一致^[3,6]。但国内也曾有报导用 PIN-III-ompA 系统表达心钠素等小肽 (28aa) 时, 产物由于分子量较小, 可通过大肠杆菌外膜泄漏到胞外培养基中, 周质含量甚少^[7]。本研究中 sGH (188aa) 分子较大, 在胞外培养基中未测到 sGH 活性。

在分泌型表达质粒 pOsGH153 中, 通过杂合启动子 Lpp-Lac 的控制, 表达的融合蛋白直接分泌到细胞周质, 大肠杆菌外膜信号肽序列在指导重组的外源蛋白质分泌到大肠杆菌周质腔过程中, 自身自动被剪切。因此表达产物不含有大肠杆菌外膜蛋白。由于信号肽剪切点位于外源性基因插入位点之前, sGH 产物的 N 端存在有酶切点编码的 3 个氨基酸残基, 我们将通过定点基因突变方法, 去除这 9 个核苷酸, 可望突变表达质粒能分泌表达出与天然氨基端完全一致的鲑鱼生长激素。

参 考 文 献

- 1 宋诗铎, Trinh K Y, 丘才良. 遗传学报, 1992; 19(4): 308
- 2 Song S, Zhang T, Zhao W *et al.* Aquaculture, 1993; 111: 199
- 3 Ghayeb J, Kimura H, Takahara M *et al.* EMBO J, 1984; 3 (10): 2437
- 4 宋诗铎, 张同海, 祁伟等. 遗传, 1992; 14 (5): 1
- 5 Takahara M, Hibler D W, Barr P J *et al.* J Biochem, 1985; 260 (5): 2670
- 6 Laemli U K. Nature, 1970; 227: 680-685
- 7 李磊, 郭文彤, 李光地等. 生物化学杂志, 1991; 7 (4): 187

rized.

Key words electroporation, electrofusion, biotechnology

Structure and Function of Recombinant Human Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor. Ling Mingsheng, Xu Mingbo, Ma Xiankai. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 326—330

Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) has been expressed in prokaryotic and eukaryotic cells. Purified to homogeneity, which facilitates to study the structure and function of this factor. Recently, the study of structure and function of rhGM-CSF has been mainly focused on crystal structure, including chemical modification, conformation and stability in solution, mutation and molecular design. The progress in study the structure-function relationship and the mechanism of interaction of GM-CSF with its receptor is discussed.

Key words rhGM-CSF, structure and function, crystal structure, chemical modification, conformation and stability in solution

Advances in Biological High Resolution Electron Microscopy. Xu Wei, Pan Dongri, Xing Li, Tang Jinghua. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 330—333, 371

Biological high resolution electron microscopy, a method developed recently, is comparable to X-ray crystallography for determination of high resolution structure of biological macromolecules. It overcomes some difficulties confronted by X-ray crystallography and can apply

directly to the non-crystal biological macromolecules or to those proteins which can only form two-dimensional crystals. This method contains mainly experimental recording of real structure information and image analysis of the electron micrographs. Several problems which will be encountered in the application of these techniques, e. g. natural structure preservation, radiation damage, poor contrast, and low signal-noise ratio are discussed.

Key words biological macromolecule, high resolution, electron microscopy

Expression of the Gene of the 58kD Subunit of the Vacuolar H⁺-ATPase From Human Kidney in *E. coli*. Zhang Ying, Peng Shengbin, Stone D. K., Xie Xiaosong. (*Department of Internal Medicine, Division of Molecular Transport, the University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX 75235, U. S. A.*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 334—338

The 58kD subunit gene of the human kidney vacuolar H⁺-ATPase has been successfully expressed in *E. coli*. The fragment of 58kD subunit gene was obtained by polymerase chain reaction (PCR). A clone encoding 58kD subunit was obtained by directly joining PCR product into the plasmid for expression by T7 RNA polymerase (PET). Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis of cultured transformants demonstrated high expression of 58kD subunit gene. The product of 58kD subunit accounted for 50% of cytoplasmic proteins.

Key words H⁺-ATPase, 58kD subunit, bacteria expression

Expression and Secretion of Salmon Growth Hormone From an *Escherichia coli* Secretion

Vector. Zhang Tonghai, Song Shiduo, Zhao Weicheng, Chen Kunming, Qi Wei, Hu Wenzhi, Wang Peifu, Fang Peihua. (*Department of Internal Medicine, The Second Teaching Hospital Tianjin Medical College, Tianjin 300211*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 338—341

A cDNA fragment encoding mature salmon growth hormone (sGH) was successfully amplified by polymerase chain reaction and the restriction recognition sequences were respectively introduced into the 5' end and 3' end of the amplified fragment. The recombinant secretion vector pOsGH153 containing genes coding for the *E. coli* ompA signal peptide and mature sGH was constructed and confirmed by restriction enzyme analysis and Southern blot hybridization with the oligonucleotide probe. Upon induction of IPTG, the sGH was expressed in *E. coli* cells and was secreted into the *E. coli* periplasma.

Key words salmon growth hormone, secretion vector, periplasma expression, *E. coli*

Expression of the Genes of the 70kD and 33kD Subunits of the Bovine Brain Vacuolar Proton Pump in *E. coli*. Zhang Ying, Peng Shengbin, Stone D. K., Xie Xiaosong. (*Department of Internal Medicine, Division of Molecular Transport, the University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX 75235, U. S. A.*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 342—347

The genes of the 70kD and 33kD subunits of the bovine brain vacuolar proton pump have been successfully expressed in *E. Coli*. The fragment of the gene of 70kD subunit was obtained by polymerase chain reaction (PCR) from an isolated cDNA encoding the 70kD subunit of the bovine brain vacuolar proton pump.

The fragment of the gene of 33kD subunit was also obtained by PCR from the bovine brain cDNA library. Two clones encoding 70kD and 33kD subunits were individually obtained by directly joining the PCR products into PET vector. Sodium dodecyl sulfate (SDS) -polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western blot analysis of cultured transformants demonstrated high expression.

Key words vacuolar proton pump, 70kD and 33kD subunits, expression of genes

Myocardial Membrane Injury of Myocardial Ischemia/Reperfusion and Lipidaemia in Rat. Dong Chuanren, Yu Xuegang, Wang Xuejun. (*Department of Pathophysiology, Hubei Medical University, Wuhan 430071*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 347—350

Through the experiment model of the myocardial ischemia/reperfusion and lipidaemia in rat, both of them obviously induce membrane injury: a drop of membrane phospholipids, an increase in content of free fatty acids, cholesterol and cholesterol/phospholipid ratio, a decrease in membrane lipids fluidity and activity of membrane enzymes (Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase). These alterations perhaps related to the increase of lipids hyperoxidation induced by free radical and exchange of lipids.

Key words phospholipids/PD, liposomes/PD, myocardium, hemoperfusion, cell membrane

Effects and Interaction of Angiotensin II and Opioids on Fos Protein Expression. Chen Suzhen, Han Jisheng. (*Neuroscience Research Center, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 350—352