

研究报告

人肾液泡型 H^+ -ATPase 58kD
亚基基因的表达*

张 瑛

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

彭生斌 D. K. STONE 谢小松

(Department of Internal Medicine, Division of Molecular Transport,

the University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX 75235, U. S. A.)

摘要 在大肠杆菌中表达了人肾液泡型 H^+ -ATPase 58kD 亚基的基因. 利用聚合酶链式反应 (PCR) 得到了 58kD 亚基的编码片段. 直接将 PCR 产物连接到 PET 载体上表达. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹分析表明 58kD 亚基的基因得到高效表达. 表达产物可达细菌细胞质蛋白的 50%.

关键词 H^+ -ATPase, 58kD 亚基, 细菌表达

动物液泡型 H^+ -ATPase 主要分布于细胞内膜系统, 包括笼状囊泡颗粒、核内体、溶酶体、突触小泡、嗜铬颗粒、内质网、高尔基体膜、白细胞第三颗粒和激素处理区中. 这类 H^+ -ATPase 与细胞内吞作用、配体从受体上的解离、细胞器中的酸化及神经递质贮存的能量化等密切相关, 具有十分重要的生理意义. 类似于线粒体 F_1F_0 -型 H^+ -ATPase, 液泡型 H^+ -ATPase 也具有水解部分和跨膜部分. 动物液泡型 H^+ -ATPase 是由八或九种大小、数目不同的亚基组成的寡聚体. 生物化学分析表明, 58kD 和 70kD 亚基对于 ATP 水解起关键作用, 33kD, 40kD 亚基亦与活性相关, 四种亚基形成一个 ATP 水解的活性区^[1]. 由于生化的分离与重组是不完全的, 难以对每个亚基的作用进行深入研究. 为了准确认识各个亚基的结构与功能, 我们开始应用分子生物学方法表达和纯化单个亚基, 并首先报道了牛脑笼状囊泡颗粒 H^+ -ATPase 的 58kD, 70kD 亚基的部分氨基酸序列和人肾液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基的 cDNA 全序列^[2]. 为了进一步研究液泡型 H^+ -ATPase 的活性亚基的功能, 开展了人肾液

泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基基因的表达研究.

本文报道了用 PCR 技术合成人肾液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基的基因编码片段, 直接插入表达载体 PET-3a 中, 在大肠杆菌中得到了直接而高效表达的 58kD 亚基.

1 材料与方法

1.1 材料 限制性内切酶及 T4-DNA 连接酶购自 BRL 和 Boehringer Mannheim Biochemicals, 硝酸纤维素滤膜购自 Bio-Rad 公司, X 光片购自 Kodak 公司, 其他试剂为 Sigma 产品.

1.2 聚合酶链式反应 (PCR) PCR 使用 Perkin-Elmer Cetus 公司的 PCR 试剂盒和热循环仪. 以本实验室克隆并测序的人肾液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基的 cDNA 即 λ pp2a^[2] 为 PCR 的模板. 基于 58kD 亚基的 N 末端和 C 末端序列, 设计了两个 DNA 引物, 由 Hobbs 医

* 在美国德克萨斯大学西南医学中心分子运送室完成. 美国 NIH (DK RO1-33627) 基金资助.

收稿日期: 1993-05-25, 修回日期: 1993-11-24

学博士协助合成. 反应热参数一般按试剂盒中给的参数执行. 反应体积100 μ l, 循环数30个, 变性温度94 $^{\circ}$ C, 退火温度50 $^{\circ}$ C, 延伸温度72 $^{\circ}$ C, 引物浓度为100pmol 每反应, 模板浓度为100ng 每反应. PCR 产物用1%琼脂糖电泳鉴定并进一步纯化.

1.3 表达质粒的构建及筛选 用于构建人肾液泡型 H^+ -ATPase 的58kD 亚基的表达质粒的载体 PET-3a 由 Thomas 博士赠送. 构建质粒的转化菌株为 *E. coli* HB101. 重组质粒筛选按常规方法进行^[3], 限制性内切酶图谱分析表明确实含有正确插入.

1.4 58kD 亚基的表达 表达菌株为 *E. coli* BL21 (DE3). 将含有正确插入的重组质粒转化到 BL21 (DE3) 中, 挑选有氨苄青霉素抗性的转化体. 按 Studier^[4]方法鉴定其稳定性. 将一个单菌落接种至 2—3ml 含氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 的 M9-ZB 培养基中, 震荡 300r/min, 37 $^{\circ}$ C, 培养3—4h, 使培养液 A_{600} 达到 0.6—1. 添加诱导剂 IPTG, 使终浓度为 0.4mmol/L. 通常在诱导2—3h 后收集样品.

1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 按常规方法进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[5]. 牛脑笼状囊泡颗粒 H^+ -ATPase 作为对照与表达样品一起电泳^[6,7].

1.6 蛋白质印迹分析 蛋白质印迹分析基本上按 Burnette 方法^[8]进行. 抗牛脑笼状囊泡 H^+ -ATPase 58kD 亚基的血清按文献[1]制备. 含58kD 表达亚基的样品经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 用 Bio-Rad 转移装置将样品转移至硝酸纤维素滤膜上. 滤膜经印度墨水染色以观察转移效率并定出相应位置. 滤膜先用含 PET-3a 质粒的 BL21 (DE3) 菌体裂解液封闭 2h, 再用3%的牛血清白蛋白封闭2h. 以1:1000 稀释的抗血清与滤膜结合2h, 接着用¹²⁵I-IgG (10⁶cpm/ml) 室温保温滤膜1h. 每次封闭或抗体结合后, 均将滤膜反复漂洗. 漂洗液为 10mmol/L Tris-Cl pH7.5, 0.15mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 0.5% Tween 20. 滤膜最后用1mol/L NaCl 的漂洗液漂洗后, 晾干, 使用

Kodak X-光片置-70 $^{\circ}$ C 曝光.

2 结果与讨论

2.1 聚合酶链式反应及58kD 亚基基因表达质粒的组建

为了得到可以克隆的人肾液泡型 H^+ -ATPase 的58kD 亚基的全编码片段, 首先设计并合成了两个用于扩增人肾液泡型 H^+ -ATPase 的58kD 亚基的编码片段的 DNA 引物. 如图1所示, 引物 YZ5 相应于58kD 亚基的N末端的1—8氨基酸残基的编码序列,

引物名称	序列	编码链
YZ5	CTGCCATATGGCCATGGAGATAGACAGCAGG	+
	Nde I	
	起始密码	
YZ4	GCGTGATCATCTAGAGCGCAGTGTTCAGGCGCGAGG	-
	Bcl I Xba I	
	终止密码	

图1 聚合酶链反应中使用的两个 DNA 引物序列
DNA 引物序列是从5' 到3', YZ5相应于58kD 亚基 N 末端编码链, YZ4互补于58kD 亚基 C 末端编码链.

1 2

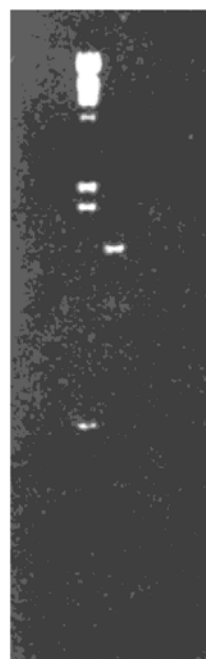


图2 58kD 亚基编码片段的 PCR 产物电泳图

— 1.5kb 1: λ DNA 被 Hind III 酶切; 2: 58kD 亚基编码片段的 PCR 产物.

并没有带起始 ATG 密码的 Nde I 酶切位点; 引物 YZ4 互补于58kD 亚基的 C 末端506至

513. 氨基酸残基的编码序列, 同时设有带终止码的 Xba I 位点及 Bcl I 位点. 由于所扩增的 58kD 亚基的编码片段中含有 1 个 BamH I 位点, 因此在引物 YZ4 中添加 Bcl I 位点以与载体上 BamH I 位点相应. 为了便于 58kD 亚基的编码片段的再克隆, 在引物 YZ4 中巧妙地利用 58kD 亚基的 cDNA 上已有的 5 个碱基设置了 Xba I 位点. 使用 YZ5 与 YZ4 两个引物在 λ pp2a 模板上成功地扩增出了人肾液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基的编码片段. 图 2 表明, 用扩增反应液在 1% 琼脂糖电泳上可以看到明显的单一的产物带, 分子量为 1.5kb, 与编码人肾液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基的 cDNA 大小一致. PCR 产物经 Nde I 与 Bcl I 双酶酶切, 仍得单一的 1.5kb 带.

图 3 说明了人肾液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基基因的表达质粒的重组过程. PET-

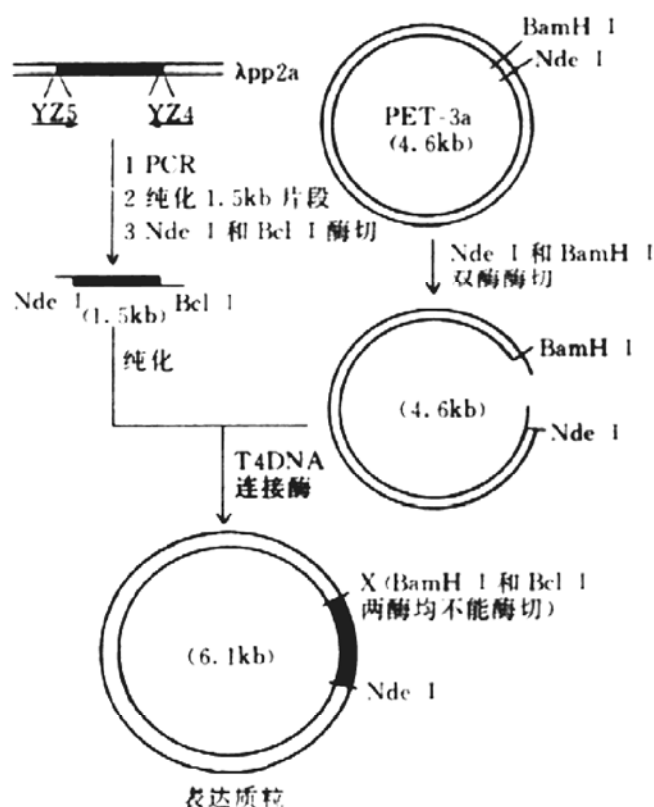


图3 人肾液泡型 H^+ -ATPase 58kD 亚基基因表达质粒构建

用引物 YZ5 和 YZ4 在 λ pp2a 模板上合成的 PCR 产物, 经 Nde I 和 Bcl I 酶切, 插入到 Nde I 和 BamH I 双酶酶切的 PET-3a 质粒中.

3a 是 pBR322 的衍生质粒, 它带 T7 噬菌体基因 10 的启动子、基因 10 的翻译起始区和 T7 噬菌体转录终止子. 在起始点上有一个 Nde I 位点 (CA' TATG), 用以表达完整天然蛋白; 在基因 10 第 11 密码子处带一个 BamH I 位点, 插入 DNA 可表达融合蛋白. 为了表达完整的 58kD 亚基, 在质粒重组中用 Nde I 和 BamH I 双酶酶切 PET-3a, 插入 Nde I 和 Bcl I 双酶酶

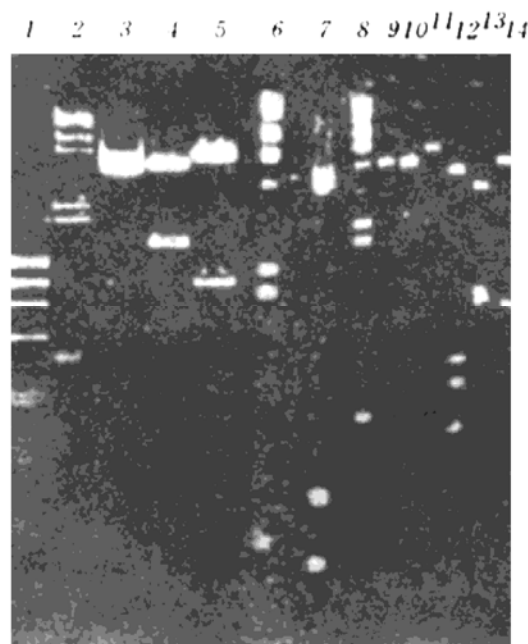


图4 58kD 亚基基因的表达质粒的酶切电泳图

1: Φ X 174 DNA/Hae III 片段; 2: λ DNA/Hind III 片段; 3: PET-3a 质粒被 Nde I 酶切; 4: 表达质粒被 Nde I 和 Xba I 酶切 (4.6kb, 1.5kb); 5: 表达质粒被 Nde I 和 BamH I 酶切 (5.0kb, 1.1kb); 6: λ DNA/Hind III 片段; 7: 表达质粒被 EcoR I 酶切 (4.8kb, 0.8kb, 0.5kb); 8: λ DNA/Hind III 片段; 9: 质粒 PET-3a 被 Nde I 酶切; 10: 质粒 PET-3a 被 Pst I 酶切; 11: 表达质粒被 Nde I 酶切 (6.1kb); 12: 表达质粒被 Nde I 和 EcoR I 双酶切 (4.0kb, 0.8kb, 0.7kb, 0.5kb); 13: 表达质粒被 Nde I 和 Pst I 酶切 (3.5kb, 1.2kb, 1.2kb, 0.2kb); 14: 表达质粒被 Pst I 酶切 (4.7kb, 1.2kb, 0.2kb).

解的 58kD 亚基编码片段, 经 *E. coli* HB101 转化, 挑选出含有正确插入的重组质粒阳性克隆.

重组质粒经 Nde I 酶切得 6.1kb 电泳带, 经 Nde I 与 Xba I 双酶消化得 4.6kb, 1.5kb 两条带, 表明符合原设计. PET-3a 的 BamH I 位点 (G' GATCC) 与插入片段的 Bcl I 位点 (T' GATCA) 相连形成了两酶均不能酶切的封闭位点. 进一步用 EcoR I, Pst I, Nde I 和 Pst I, Nde I 与 EcoR I, Nde I 和 BamH I 等单酶或双酶对重组质粒进行了酶切. 图4为重组质粒的酶切电泳图. 酶切结果证实, 插入片段的酶切图谱与发表的人肾液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基的 cDNA 的酶切图谱一致^[2]. 总之, 含有从起始密码到终止密码的 58kD 亚基编码片段的正确插入的重组质粒已构建成功.

2.2 58kD 亚基基因的表达

BL21 (DE3) 的 DE3 上携带有 T7 RNA 聚合酶基因, 使菌中 RNA 聚合酶本底活性较高, 因而使一些质粒难以在 BL21 (DE3) 中转化. 我们实验表明, 本文的重组质粒在 BL21 (DE3) 中较易转化. 进一步用 Studier^[4] 的方法对重组质粒的稳定性作了测定, 含有氨苄青霉素抗性的重组质粒的转化菌同时接种到添加氨苄青霉素的培养皿与空白培养皿中形成同样多的菌落; 接种到添加 IPTG 的培养皿中只形成不到百分之一的菌落; 接种到同时添加氨苄青霉素和 IPTG 的培养皿中只有不到万分之一的菌落形成. 这表明, 重组质粒在 BL21 (DE3) 中是稳定的, 为进一步的表达提供了前提条件.

已有实验表明, 动物液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基在分离过程中是稳定的^[6,7]. BL21 (DE3) 作为 B 型菌, 缺乏 lon (依赖 ATP 的蛋白酶基因) 和 ompT (外膜蛋白酶) 蛋白酶, 在这菌株中产生的许多蛋白质是稳定的. 因此, 我们预期人肾液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基基因可以在 BL21 (DE3) 中得到高效表达. 图 5 表明, 用 10 μ l 菌液进行 SDS 聚丙烯酰胺电泳, 即可见明显的分子量为 58 000 的蛋白条带, 与对照的牛脑笼状囊泡颗粒 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基大小一致. 随着诱导时间延长, 表达的 58kD 亚基条带逐渐加深, 到 3h 达到最深. 用 Bio-Rad 的 GS-670 光密度扫描仪对凝胶染色

条带进行反射扫描测定表明, 表达的 58kD 亚基占整个细菌细胞质蛋白的 50%.

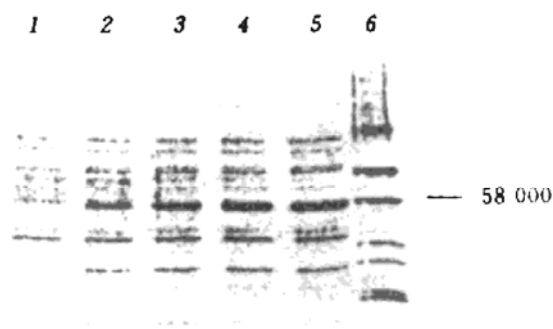


图5 表达的58kD亚基的SDS聚丙烯酰胺电泳

1—5: 在 IPTG 诱导前及诱导 0.5, 1, 2 和 3h 后, 表达 58kD 亚基基因的菌液样品. 6: 纯化的牛脑笼状囊泡颗粒 H^+ -ATPase.

已有报道^[2]液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基在各种生物中具有高度的保守性, 已测的牛脑笼状囊泡颗粒 H^+ -ATPase 的 58kD 亚基

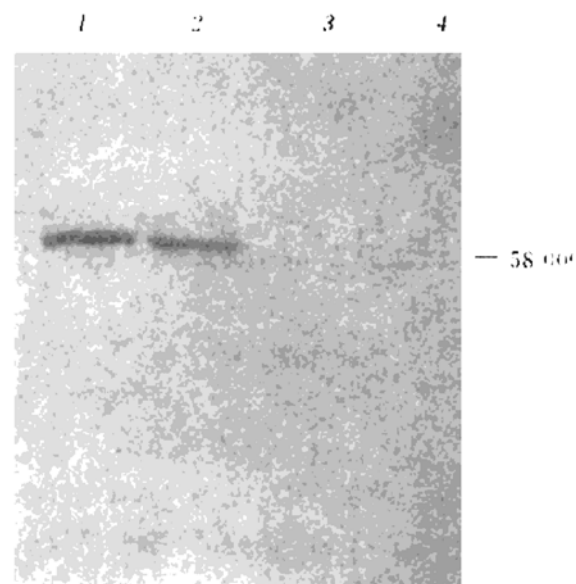


图6 表达的58kD亚基的蛋白质印迹分析

1: 纯化的牛脑笼状囊泡颗粒 H^+ -ATPase; 2: 诱导的含表达质粒的 BL21 (DE3) 菌液样品; 3: 没有诱导的含表达质粒的 BL (DE3) 菌液样品; 4: 添加诱导剂的含对照质粒 PET-3a 的 BL21 (DE3) 菌液样品.

的肽序列与人肾液泡型 H^+ -ATPase 的 58kD

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

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