

垂体腺苷酸环化酶激活肽基因的合成 表达与活性研究*

陈哲宇^{1, 2)}** 柴延丰¹⁾ 何成¹⁾ 路长林¹⁾ 吴祥甫²⁾

(¹⁾第二军医大学神经生物学教研室, 上海 200433; ²⁾中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 根据文献报道垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP) 的氨基酸序列, 推导出其核苷酸序列并设计成部分互补的 6 条寡核苷酸片段, 利用 DNA 合成仪人工合成、纯化这 6 条寡核苷酸片段, 通过片段退火、连接、克隆及测序鉴定获得了 PACAP 基因。将 PACAP 基因克隆至 pGEX-4T-3 质粒中转化 BL21 进行表达分析, 融合蛋白约占细胞总蛋白的 30%, 其中部分为可溶性, 部分以包涵体形式存在。通过亲和层析纯化 GST-PACAP 融合蛋白, 该蛋白质能促进 PC12 细胞轴突生长及脊髓神经元存活。

关键词 垂体腺苷酸环化酶激活肽, 基因克隆, 基因表达, PC12 细胞, 脊髓神经元

学科分类号 O78

1989 年, 人们在研究下丘脑促垂体激素时, 从牛的下丘脑组织中提取到一种具有广泛生物活性的多肽, 因其能强烈激活垂体细胞腺苷酸环化酶, 升高细胞内 cAMP 含量, 故命名为垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP)^[1]。PACAP 由 38 个氨基酸残基组成, 其氨基端的 28 个氨基酸残基中有 68% 与血管活性肠肽 (VIP) 同源, 是促胰液素/高血糖素/血管活性肠肽家族的新成员^[2~4]。哺乳动物 PACAP38 结构有高度的保守性, 人、羊和大鼠 PACAP 结构完全相同。PACAP 在进化过程中也存在高度的保守性, 如蛙和鸡的 PACAP 结构与哺乳类仅有一个氨基酸残基的差别, 提示 PACAP 在体内起着重要的生理功能^[5]。近年来的研究表明, PACAP 不仅作为一种神经递质/调质起作用, 更重要的是作为一种神经营养因子在神经系统发育中起到重要作用。PACAP 能诱导 PC12 细胞突起生长^[6], 促进原代培养的小脑颗粒细胞存活和突起生长^[7]。PACAP 对交感、感觉神经元也起到营养和保护作用^[8, 9], 并能调节神经肌肉接头的电活动^[10]。进一步的实验结果提示, PACAP 的神经营养作用与激活细胞内 cAMP-依赖的蛋白激酶 (PKA) 和有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 系统有关^[8, 11]。目前国外多通过多肽合成方法获得 PACAP 多肽, 生产成本较高。因此利用基因工程方法生产 PACAP 多肽具有明显的潜在优势, 而

且还可以根据不同的目的对天然 PACAP 基因进行改造, 从而生产出药效更高、副作用更低的新 PACAP 多肽, 目前国内尚无 PACAP 基因工程的工作。本文报道了 PACAP 基因的合成、表达及其活性研究。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和细胞株

大肠杆菌 TG1、BL21 (DE3), 载体 pBluescriptSK (+), 表达质粒 pGEX-4T-3, PC12 细胞均由本实验室保存。

1.2 试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 激酶、胎牛血清、马血清及 DMEM 培养基为 Gibco BRL 公司产品; DNA 测序试剂盒及异丙基-β-D-硫代半乳糖苷酶 (IPTG) 为 Promega 公司产品; PACAP 多抗、poly-L-lysine 购自 Sigma 公司; Glutathione Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品; 碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 为华美生物工程公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 PACAP 基因合成

1.3.1 DNA 片段人工合成: DNA 片段由上海生

* 国家自然科学基金 (30000048) 和国家重点基础研究发展规划项目 (973 项目) (1999054005) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 021-25070294, E-mail: chengzyk@online.sh.cn

收稿日期: 2000-03-02, 接受日期: 2000-03-31

物工程中心合成并纯化。

1.3.2 DNA 片段的磷酸化、退火及连接: 按参考文献 [12] 介绍的方法进行。

1.3.3 DNA 序列测定: 按照 DNA 测序试剂盒推荐的方法操作。

1.4 基因操作

质粒抽提、酶切反应、DNA 片段回收、连接反应、细菌转化、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、蛋白质印迹、Bradford 蛋白质浓度测定等技术均参照文献 [12] 略加修改进行。

1.5 GST-PACAP 融合蛋白的表达

接种含表达质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 单菌落于 LB/Amp (Amp 100 mg/L) 培养液中, 于 37℃ 培养过夜。以 2% 的比例, 接种上述过夜菌于新鲜的 LB/Amp 培养液中, 于 37℃ 振荡 (300 r/min) 培养 2 h 至 A_{600} 为 0.6~0.8, 然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 再振荡培养 3~4 h, 最后取样测 A_{600} , 离心收集菌体。每毫升的菌体以重蒸水悬浮 (按每 0.1 的 A_{600} 值加 10 μ l 重蒸水的比例), 然后加入等体积的 2×SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液悬浮样品, 煮沸 5 min 取 20 μ l 上样, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析以鉴定表达结果。

1.6 表达产物溶解性分析

收集表达菌, 用 1×PBS 缓冲液 (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.3) 悬浮后, 超声波破菌, 12 000 g, 4℃ 离心 20 min, 分别取上清及沉淀进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳以分析表达产物的溶解性。

1.7 表达产物的活性研究

1.7.1 PC12 细胞培养: PC12 细胞在被 poly-L-lysine 包被过的培养皿中于 37℃ 培养, 培养基是含 6% 胎牛血清、6% 马血清的 DMEM。分别加入 10^{-8} mol/L GST-PACAP 融合蛋白、 10^{-8} mol/L GST 蛋白、 10^{-8} mol/L 神经生长因子 (NGF)、及同时加入 10^{-8} mol/L GST-PACAP 蛋白和 PACAP 抗体, 3 d 后观察 PC12 细胞的形态。

1.7.2 脊髓神经元培养: 脊髓神经元培养参照文献 [13] 的方法进行。取昆明种胎鼠 (E12-E15), 无菌解剖, 取出脊髓, 剥掉脊髓膜, 原代分离脊髓神经元, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 接种于预先用多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, Sigma 公司) 包被好的 96 孔培养板, 每孔的加入量为 100 μ l。培养板置 CO_2 培养箱 (含 5% CO_2), 37℃ 培养。培养至第 2

天, 更换为含 2% B27 的无血清培养基, 分别加入 10^{-8} mol/L GST-PACAP 融合蛋白、 10^{-8} mol/L GST 蛋白、 10^{-8} mol/L NGF、及同时加入 10^{-8} mol/L GST-PACAP 蛋白和 PACAP 抗体。以后每隔 3~4 天换液一次, 这样条件一直培养到第 14 天, 观察脊髓神经元的形态及数目。

1.7.3 硝基蓝四唑 (MTT) 检测: 将同一批标本参照文献 [14] 作 MTT 反应, 用 Bio-RAD 550 型 ELISA 读数仪检测 A 值, 检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm, 各组重复实验 10 次。

2 结 果

2.1 DNA 互补片段的设计及人工合成

根据文献报道的人 PACAP 的氨基酸序列, 推导出其可能的 DNA 序列, 并在 DNA 序列的 5' 端选用 *E. coli* 偏爱密码子。根据 PACAP 的 DNA 序列, 在 5' 端加上 *Bam*HI 识别位点, 3' 端加上 *Xho*I 识别位点, 合成 6 个人 PACAP cDNA 片段, 它们的序列是: F1: 5'-GATCCCACTCTGACGGCATCTTCACAGACT-CTTATTCGCGCTACCG-3'; F2: 5'-CGTGAGACTGCCGTAGAAGTGTCTGAG-3'; F3: 5'-AATAAGGGC-GATGGCTTTTGTTCACGACAGTTCTTTATGAAC-CGCCGGCA-3'; F4: 5'-AAAACAAATGGCTGTCAA-GAA-3'; F5: 5'-ATACTTGGCGGCCGTGCTAGGGA-AAAGGTATAAACAGAGGGTTAAAAACAAATG AG-3'; F6: 5'-CGATCCCTTTTCCATATTTGTCTCCCA-ATTTTGTCTTACTGAGCT-3'。设计好的 DNA 片段长度在 21~56 bp 之间, 它们之间的互补配对区的长度在 15~21 bp 之间。

2.2 DNA 片段的连接及序列分析

互补的 DNA 片段经磷酸化, 退火、连接后与经 *Bam*HI、*Xho*I 双酶切的 pBSK (+) 载体连接, 转化 TG1, 筛选阳性克隆后提取重组质粒 DNA 进行序列测定, 结果表明插入的 DNA 序列与设计的序列完全一致 (图 1)。

```
CAC TCT GAC GGC ATC TTC ACA GAC TCT TAT TCC CGC TAC
H   S   D   G   I   F   T   D   S   Y   S   R   Y
CGA AAA CAA ATG GCT GTC AAG AAA TAC TTG GCG GCC GTG
R   K   Q   M   A   V   K   K   Y   L   A   A   V
CTA GGG AAA AGG TAT AAA CAG AGG GTT AAA AAC AAA
L   G   K   R   Y   K   Q   R   V   K   N   K
```

Fig. 1 Nucleotide sequence of PACAP cDNA and deduced amino acid sequence

2.3 PACAP 蛋白在大肠杆菌中的高效表达

将克隆在 pBSK (+) 质粒中的人 PACAP 基因片段以 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切, 低熔点胶分离后与先经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切的表达载体 pGEX-4T-3 相连接, 构建了 *tac* 启动子控制下的含有人 PACAP cDNA 的表达质粒 pGEX-PACAP (图 2)。

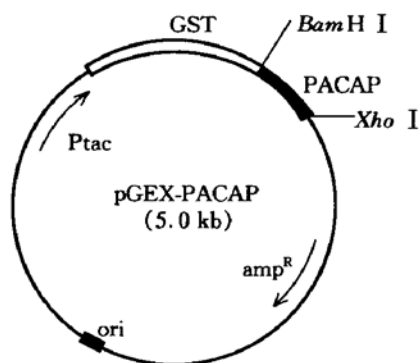


Fig. 2 Schematic representation of the pGEX-PACAP expression vector

The PACAP gene was ligated into pGEX-4T-3 expression vector utilizing *Bam*H I and *Xho* I sites.

将上述构建的表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 筛选表达菌株 BLPACAP, 进行 IPTG 诱导表达。在 37℃ 下诱导表达 3 h, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析观察到在 30 ku 处有一明显诱导表达条带, 与 GST-PACAP 融合蛋白的理论分子质量一致 (图 3)。凝胶自动扫描分析表明, 表达量占菌体总蛋白质的 30% 左右。进一步将表达菌破菌

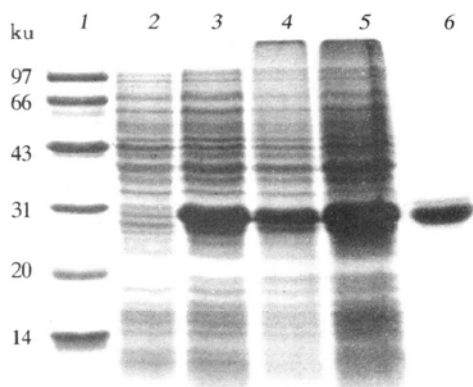


Fig. 3 Analysis of overexpression and purification of GST-PACAP in BL21 (DE3)

1: protein molecular mass marker; 2: bacterial total proteins before induction; 3: bacterial total proteins after induction; 4: the inclusion body of the sonicated cells; 5: the supernatant of the sonicated cells; 6: the purified GST-PACAP fusion proteins.

离心后, 分别取上清液和沉淀进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 结果显示表达产物部分为可溶性, 部分以包涵体形式存在。降低 IPTG 浓度、降低诱导表达温度及缩短诱导表达时间可提高融合蛋白的溶解性 (结果未显示)。为进一步确认表达产物, 我们对表达产物进行了蛋白质印迹分析, 一抗采用兔抗人 PACAP IgG, 二抗采用碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG。蛋白质印迹结果在分子质量为 30 ku 处有一明显表达条带 (图 4), 证明我们所表达的产物具有 PACAP 多肽的抗原性。

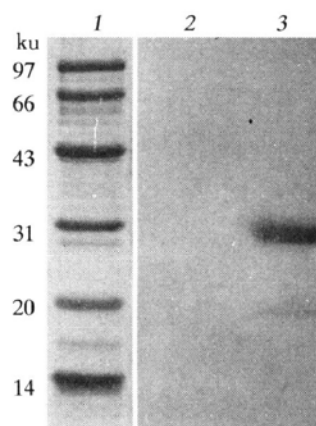


Fig. 4 Analysis of GST-PACAP protein expressed in BL21 (DE3) by Western blot

1: protein molecular mass marker; 2: bacterial total proteins before induction; 3: bacterial total proteins after induction.

2.4 PACAP 蛋白的纯化

按上述方法表达的 800 ml 发酵液, 4℃ 5 000 g 离心 5 min, 收集菌体, 40 ml 1×PBS 悬浮后, 超声破菌, 4℃ 12 000 g 离心 20 min, 分别取上清及沉淀进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 发现表达产物主要溶解在上清中。吸取上清, 用直径 0.44 μm 的滤膜过滤, 过已平衡的 Pharmacia 谷胱甘肽交联的 Sephrose 4B 柱, 20 ml PBS 洗后, 用 6 ml 新配的洗脱缓冲液 (10 mmol/L 还原性谷胱甘肽, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 洗脱, 按 1 ml/管收集, Bradford 法测定蛋白质浓度, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定蛋白质纯度达 90% 以上。

2.5 PACAP 蛋白对 PC12 细胞突起生长的影响

我们观察 PACAP 蛋白对 PC12 细胞突起生长的影响 (图 5)。加入 10^{-8} mol/L GST-PACAP 融合蛋白的 PC12 细胞形态上明显朝着神经元方向分化, 多数细胞长出长长的突起, 而加入 10^{-8} mol/L GST 蛋白的 PC12 细胞多数呈圆形, 基本没有突起, 加

入 10^{-8} mol/L NGF 作为阳性对照的 PC12 细胞也长出了长长的突起, 但同时加入 10^{-8} mol/L GST-PACAP 融合蛋白和 PACAP 抗体的 PC12 细胞基本

没有突起长出. 这说明我们所表达的 GST-PACAP 融合蛋白能促进 PC12 细胞突起生长, 并且这种作用与 GST 蛋白无关, 是由 PACAP 多肽介导的.

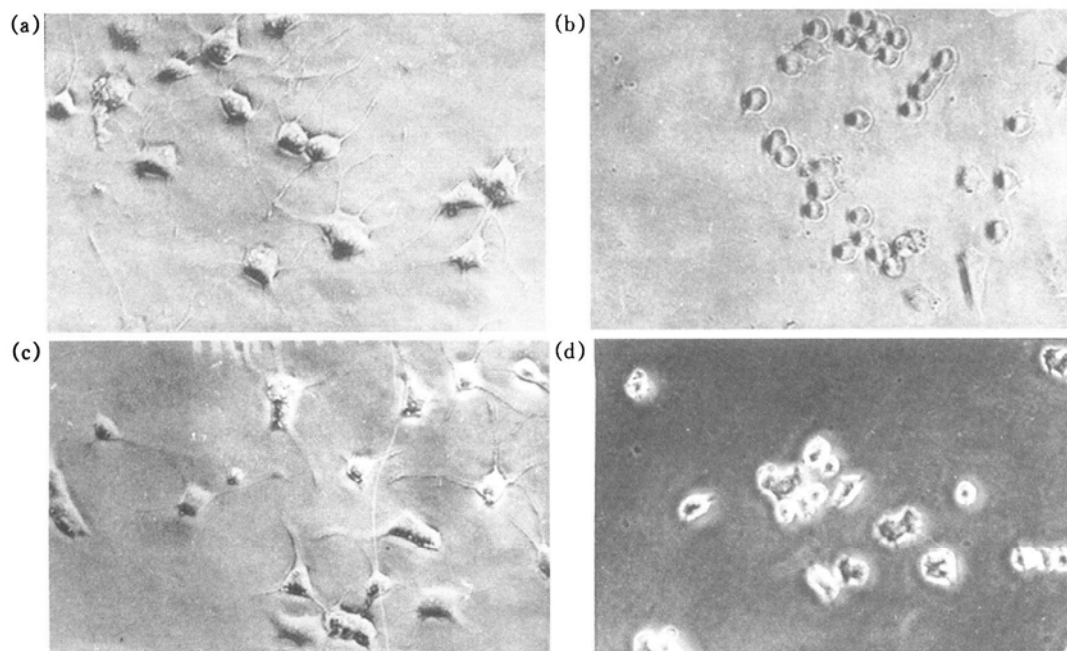


Fig. 5 Morphological differentiation of PC12 cells

(a) 10^{-8} mol/L GST-PACAP fusion protein; (b) 10^{-8} mol/L GST protein; (c) 10^{-8} mol/L NGF; (d) 10^{-8} mol/L GST-PACAP fusion protein + 2 mg/L PACAP polyclonal antibody.

2.6 PACAP 蛋白对脊髓神经元存活率的影响

我们取胎鼠脊髓神经元做原代培养, 在培养第 2 天换用含 2% B27 的无血清培养基以抑制神经胶质细胞的生长及排除血清成分对神经元生长的影响. 体外培养的脊髓神经元在培养的 7~10 d 要经历一个自然死亡的过程. 我们在培养的第 14 天用 MTT 法测定细胞存活率. 结果表明, GST-PACAP 融合蛋白组与阴性对照 GST 蛋白组及同时含有 GST-

PACAP 融合蛋白和 PACAP 抗体组相比能明显促进脊髓神经元存活 ($P < 0.05$), 而与 NGF 组相比没有显著性差异 (图 6).

3 讨 论

国外大多通过多肽合成获得 PACAP 多肽, Okazaki 等^[15] 1992 年在 CHO 细胞中表达了 PACAP 前体蛋白. 我们采用体外全基因合成的方法成功地合成了 PACAP 基因, 并且在大肠杆菌中得到了高效融合表达, 这在国内外文献均未见报道. 考虑到利用大肠杆菌表达系统进行表达, 根据大肠杆菌密码子的偏爱性, 在不改变氨基酸序列的前提下, 对少数密码子进行调整, cDNA 两端的附加序列是为了方便克隆. 实践证明, 采用这种方法合成一些多肽的基因是切实可行的, 但在设计 DNA 片段时, 需考虑每个片段不能形成发夹结构及退火特异性, 以免退火效率下降或错配. pGEX 系列载体是较常用的融合表达载体, 靶蛋白基因与谷胱甘肽转移酶基因融合, 有利于蛋白质的稳定和纯化. 我们采用 pGEX 系统在大肠杆菌中高效表达了 GST-PACAP 融合蛋白, 这不但为进一步进行

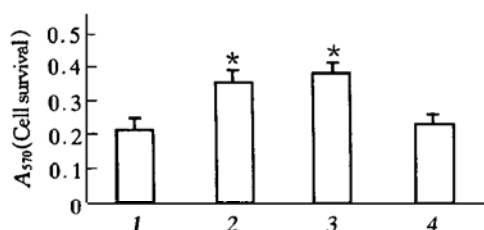


Fig. 6 Effect of GST-PACAP fusion protein on the survival of spinal cord neurons by MTT measure

1: 10^{-8} mol/L GST protein; 2: 10^{-8} mol/L GST-PACAP fusion protein; 3: 10^{-8} mol/L NGF; 4: 10^{-8} mol/L GST-PACAP fusion protein + 2 mg/L PACAP polyclonal antibody.

* $P < 0.05$ vs. GST protein group and GST-PACAP fusion protein + PACAP polyclonal antibody group.

PACAP 结构与功能的研究打下了良好的基础, 也为今后进行类似神经肽的表达进行了有益的尝试。

我们采用 10^{-8} mol/L 作为 GST-PACAP 融合蛋白活性研究的剂量是根据文献报道的 PACAP 的 EC_{50} 选定的^[6]。目前关于 PACAP 神经营养活性的研究越来越引起人们的关注, 我们的研究表明 GST-PACAP 融合蛋白能促进 PC12 细胞轴突生长, 促进脊髓神经元存活, 效果同 NGF 相当, 提示 PACAP 有可能用于脊髓及外周神经损伤的治疗。PACAP 由于其分子质量小, 能够完整地透过血脑屏障, 用于中枢神经损伤的治疗具有给药途径方便的潜在优势^[16]。目前我们正在进行蛋白酶解 GST-PACAP 融合蛋白, 并通过 HPLC 纯化获得 PACAP 多肽的工作。

参 考 文 献

- 1 Miyata A, Arimura A, Dahl R R. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **164** (3): 567~ 574
- 2 Miyata A, Jiang L, Dahl R R. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **170** (4): 643~ 648
- 3 Kimura C, Ohkubo S, Ogi K. A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the bovine and human cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **166** (1): 81~ 89
- 4 Ogi K, Kimura C, Onda H. Molecular cloning and characterization of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **173** (6): 1271~ 1279
- 5 Chartel N, Tonon M C, Vaudry H. Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology*, 1991, **129** (3): 3367~ 3371
- 6 Deutch P J, Sun Y. The 38-amino acid from pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates dual signaling cascades in PC12 cells and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 1992, **267** (4): 5108~ 5113
- 7 Vaudry D, Gonzalez B J, Basille M, *et al.* Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience*, 1998, **84** (3): 801~ 812
- 8 May V, Beaudet M M, Parsons R L, *et al.* Mechanisms of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-induced depolarization of sympathetic superior cervical ganglion (SCG) neurons. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, **865** (1): 164~ 175
- 9 Liondyno M, Skoglosa Y, Takei N, *et al.* Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) protects dorsal root ganglion neurons from death and induces calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity *in vitro*. *J Neurosci Res*, 1998, **51** (2): 243~ 256
- 10 Zhong Y, Pena L A. A novel synaptic transmission mediated by a PACAP-like neuropeptide in *Drosophila*. *Neuron*, 1995, **14** (3): 527~ 536
- 11 Campard P K, Crodhmore C, Rene F, *et al.* PACAP type 1 receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol*, 1997, **16** (3): 323~ 333
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 19~ 57
- 13 Wang F Z, Nelson P G, Fitzgerald S C, *et al.* Cholinergic function in cultures of mouse spinal cord neurons. *J Neurosci Res*, 1990, **25** (2): 312~ 323
- 14 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Methods*, 1983, **65** (1): 55~ 63
- 15 Okazaki K, Kimura C, Kosaka T, *et al.* Expression of human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) cDNA in CHO cells and characterization of the products. *FEBS Letter*, 1992, **298** (1): 49~ 56
- 16 Banks W A, Uchida D, Arimura A, *et al.* Transport of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier and the prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, **805** (2): 270~ 277

Gene Cloning and Expression of PACAP and Study of Its Biological Activity*

CHEN Zhe-Yu^{1, 2)**}, CHAI Yan-Feng¹⁾, HE Cheng¹⁾, LU Chang-Lin¹⁾, WU Xiang-Fu²⁾

⁽¹⁾ Department of Neurobiology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

⁽²⁾ Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract In order to study the expression and the feasibility of scaled production of neuropeptide in the routine expression system such as *E. coli* with the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as an example, the following experiments were carried out. First, on the basis of the reported amino acid sequence of PACAP, DNA sequence of PACAP was deduced and six partially complementary oligonucleotide fragments were

designed. The coding region of PACAP was obtained by renaturing the DNA fragments and ligation and identified by DNA sequencing. The coding region of PACAP was cloned into plasmid pGEX-4T-3 and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). An expression strain BLPACAP was selected. SDS-PAGE analysis revealed that the GST-PACAP fusion protein was highly expressed and accumulated to about 30% of the total bacterial proteins. By affinity chromatography, up to 90% GST-PACAP was purified by one step from bacterial lysate. The purified protein could promote neurite outgrowth of PC12 cells and the survival of spinal cord neurons.

Key words pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, gene cloning, gene expression, PC12 cells, spinal cord neurons

* This work was supported by National Nature Science Foundation of China (30000048) and Chinese National Fundamental Basic Research Project (1999054005).

** Corresponding author. Tel: 86-21-25070294, E-mail: chengzyk@online.sh.cn

Received: March 2, 2000 Accepted: March 31, 2000