

人生长激素释放因子基因的高效表达*

陈正兰 刘景晶** 胡卓逸 丁敏

(中国药科大学生生化教研室,生化研究室,南京 210009)

摘 要 将人生长激素释放因子(hGRF)基因和编码 *L*-天门冬酰胺酶(*L*-ansB) C末端 126个氨基酸残基的基因片断进行融合表达,融合蛋白在菌体总蛋白中的比率达到 30%左右,比和 *L*-ansB全基因融合表达时高得多,表达条件优化后,比率可增加到 43%。融合蛋白以不溶性的包含体形式存在。包含体的尿素抽提液经乙醇分级沉淀后得到较纯的融合蛋白,60 mmol/L的盐酸水解融合蛋白,通过 SDS-PAGE和电喷雾质谱分析,融合蛋白释放出一分子量为 5235.59 Da的物质,而 GRF的分子量是 5235.48 Da,也就是说融合蛋白酸水解释放出了 GRF

关键词 人生长激素释放因子; *L*-天门冬酰胺酶;融合表达

近年来,重组人生长激素(Recombinant Human Growth Hormone, rhGH)虽得到了广泛的应用,但由于 GH需反复静脉注射,这种非生理性脉冲方式增加 GH费用很高,人们纷纷寻找它的替代品^[1]。生长激素释放因子(Growth Hormone Releasing Factor, GRF)作为体内 GH合成和释放的调节物质,用量少,成本低,引起的 GH增加更符合生理性状况,同时口服、鼻内给药 GRF均有活性,长期使用不会引起脱敏作用^[2]。另外大多数 GH缺乏症并不是垂体水平的缺乏,因此 GRF作为 GH替代品具有极大的潜在价值。

天然存在的 GRF含量甚微,分离纯化十分困难。只有通过人工合成方法才能大量获得。化学合成法步骤多,操作繁琐,得率低,成本高。基因工程法可能更有效,但 GRF作为一含 44个氨基酸的小肽,直接表达易降解,效率低,必须通过融合方式表达。我室已将 hGRF基因和 *L*-天门冬酰胺酶(*L*-asparaginase B, *L*-ansB)完整基因进行了融合表达,但表达效率不高,融合蛋白仅占 10%左右(待发表)。为了进一步提高表达效率,本文中我们将 hGRF基因和编码 *L*-ansB C末端 126个氨基酸残基的基因片断进行融合表达,并通过酸水解释放 hGRF,取得了比较满意的结果

1 材 料

1.1 菌株

E. coli BL21(DE3)为本室保存。

1.2 质粒

pED 由本室构建,为含编码 *L*-ansB C末端 126个氨基酸残基序列的重组质粒,并且 *L*-ansB 基因中唯一的酸水解位点 Asp-Pro 的密码子已突变成 Asp-Ala 的密码子。pUGF 亦为本室构建,含 hGRF 基因。

1.3 酶

BamHI, HindIII, T4 DNA 连接酶均购自 Promega

1.4 其它试剂

IPTG, X-Gal, 硫酸卡那霉素(Kan), 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED, SDS, β -巯基乙醇, Tris, Tryptone, Yeast extract 等分别购自 Serva, Amresco 和 Oxoid。其余试剂均为分析纯。

2 方 法

2.1 基本方法

有关基因工程的常用方法均参照参考文献^[3]。

2.2 融合表达载体的构建

用 BamHI, HindIII 从 pUGF 上切出 GRF 基因,将它插入经相应酶切后的 pED 中(见图 1),经质粒大小、酶切分析和 PCR 分析正确的重组质粒命名为 pEDGF,委托上海基康公司在 ABI PRISM TM377 DNA Sequencer 上测定它的序列。

* 收稿日期 1999-08-23

国家自然科学基金和江苏省自然科学基金资助项目。项目号分别为 39870175 和 BK95092309

2.3 融合蛋白的诱导表达

从平板上挑取含 pEDGF 的 *E. coli* BL21 (DE3)单菌落种入液体 LB(kan 50 μ g/ml)中,其过夜培养物,按 2% 比例种入新鲜 LB培养液 (kan 50 μ g/ml)中, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导, 3~ 4 h 后采样,进行 SDS-PAGE 电泳。

2.4 表达条件的优化

2.4.1 培养基的优化 我们选择了 9 种培养基,其组成见表 1

Tab 1. The composition of the nine media									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tryptone(%)	1	2	3			0.5	1	1.5	2
Yeast extract(%)	0.5	1	1.5	0.5		1	2	3	2
NaCl(%)	1	2	3			1	2	3	2
Beef extract(%)					3.5				
Corn steep liquid(%)				7	7				
Monosodium glutamate				2	1				
(%)									

含 pEDGF 的 *E. coli* BL21(DE3)在 9 种培养基中培养后,按“ 2.3 所述方法诱导表达,采样进行 SDS-PAGE 电泳。

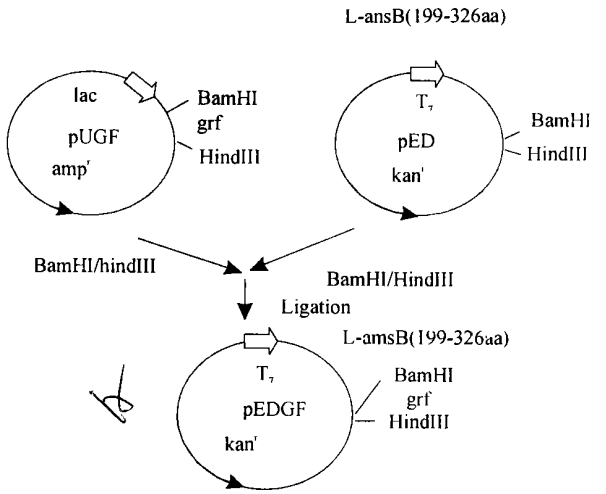


Fig 1. The construction of GRF fusion expressive plasmid pEDGF

2.4.2 诱导条件的优化

2.4.2.1 诱导剂加入时间 在培养时间为 2, 3, 4, 5, 6 h 时,分别加入 0.4 mmol/L IPTG 诱导,诱导 3~ 4 h 后取样进行 SDS-PAGE 电泳。

2.4.2.2 诱导剂浓度 培养 4 h 后,分别加入 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mmol/L IPTG 诱导,诱导 3~ 4 h 后取样进行 SDS-PAGE 电泳。

2.4 融合蛋白的纯化

含 pEDGF 的 *E. coli* BL21(DE3)诱导 4 h 后,

离心收集菌体,用细胞裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 溶菌酶 100 μ g/ml)裂解后离心,上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳。沉淀用裂解缓冲液洗涤一次后,为本文中的“包含体”。8 mmol/L 尿素溶解沉淀,离心取上清,上清用乙醇分级沉淀融合蛋白。

2.5 融合蛋白的酸水解

60 mmol/L 盐酸溶解乙醇沉淀的融合蛋白, 50 $^{\circ}$ C 作用 24 h 后进行 SDS-PAGE 电泳。

2.6 电喷雾质谱鉴定 GRF

酸水解产物直接进样至 HP1100ESI/MS 质谱仪,通过软件分析质荷比图,捕捉 GRF 的离子信号,精确测定 GRF 的分子量。

3 结果

3.1 融合表达载体 pEDGF

利用 T7 promoter primer 和 T7 terminator primer 对 pEDGF 进行双向测序,结果显示 GRF 基因已成功地插入,序列完全正确,与 L-ansB 基因 31 末端衔接后,读码框没有发生移位 (见图 2, 3)。

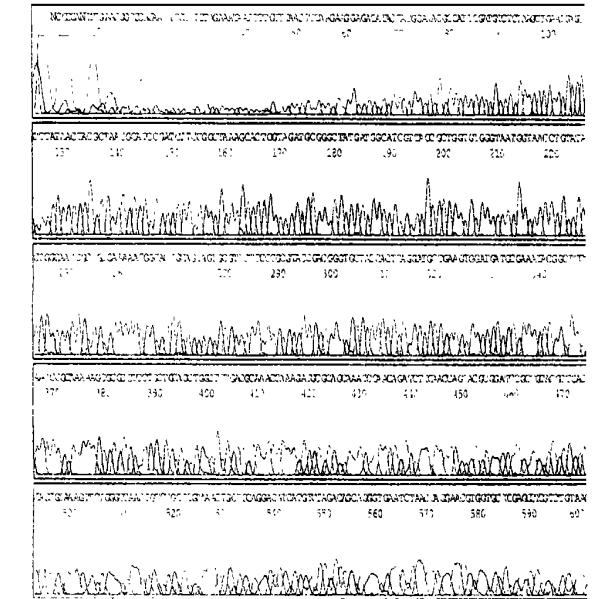


Fig 2 The forward sequencing result of pEDGF with T7 promoter primer

3.2 融合基因表达

蛋白电泳显示含 pEDGF 的 *E. coli* BL21 (DE3)出现新的蛋白带,分子量约 20KD,与预期

融合蛋白的分子量相近(见图 4), 密度扫描表明新的蛋白带占总蛋白的 30% , GRF在融合蛋白中占 1/4,也就是说 ,总蛋白中约 8% 为 GRE

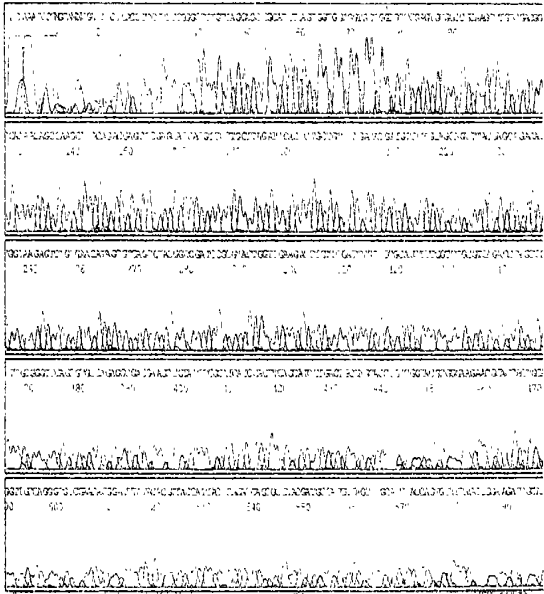


Fig 3. The backward sequencing result of pEDGF with T₇ terminator primer

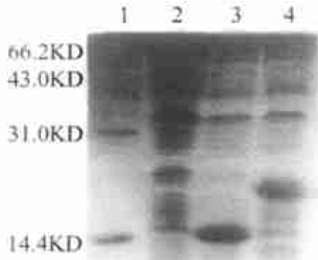


Fig 4. The analysis of fusion proteins in *E. coli* BL21(DE3) harboring pEDGF by SDS-PAGE
Lane1 Low molecular protein marker. Lane2 *E. coli* BL21(DE3). Lane3 *E. coli* BL21(DE3) harboring pED. Lane4 *E. coli* BL21(DE3) harboring pEDGF.

3. 3 表达条件

在培养 4-5 h后(见图 5),以 0. 3 mmol /LIPTG 诱导时,诱导效果最好,融合蛋白可占总蛋白的 35%(见图 6). 9种培养基中 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9对融合蛋白的表达较有利,其中尤以 4 5培养基较佳,融合蛋白可占总蛋白的 45%(见图 7),由于玉米浆较便宜,所以我们选择 4 5作为表达培养基

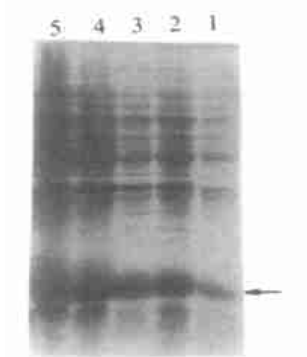


Fig 5. The effects of different IPTG adding time on the expression of fusion protein
The IPTG adding time of Lane1, 2, 3, 4, 5 was 2, 3, 4, 5, 6 h respectively.

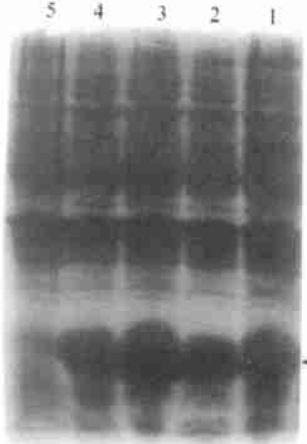


Fig 6. The effects of different IPTG concentration on the expression of fusion protein
The IPTG concentration of Lane 1, 2, 3, 4 was 0. 10, 2, 0. 3, 0. 4 mmol/L respectively. Lane 5 was a control whose IPTG concentration was zero.

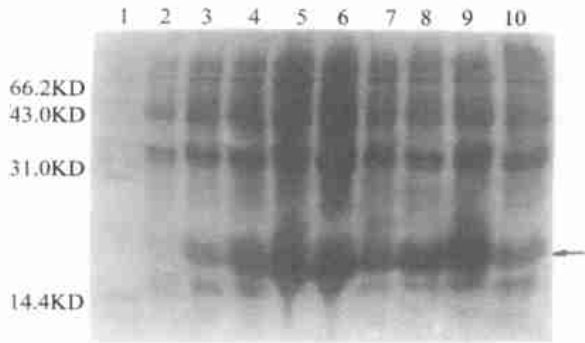


Fig 7. The effects of different media on fusion protein expression
Lane1. Molecular weight marker, Lane2 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 were referred to media 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 respectively.

3.4 融合蛋白的纯化及酸水解

诱导含 pEDGF的 *E. coli* BL21(DE3)后,收集菌体,经细胞裂解液作用后产生的上清和沉淀分别电泳,结果显示上清中没有融合蛋白,融合蛋白以不溶性的“包含体”存在于沉淀中(见图 8)。包含体用 8 mol/L尿素水溶液溶解,电泳显示融合蛋白基本上进入溶液中(见图 8)。对尿素抽提液进行乙醇分级沉淀,最后产生的沉淀电泳后主要为融合蛋白(见图 8)。沉淀的融合蛋白溶解于 60 mmol/L盐酸中,50℃作用一定时间后电泳,除融合蛋白带外出现两条新的蛋白带,大小分别介于 14437Da和 6512Da及 6512Da和 3496Da之间,与计算的酸水解后的大片段分子量 13726. 8Da及小片段 GRF分子量 5235. 48Da相近,随着时间的推移融合蛋白越来越少(见图 9)。酸水解产物直接进行电喷雾

质谱分析,在产生的众多离子峰中,提取到一组离子峰,这些峰是由一分子量为 5235. 59Da的物质产生的,而 GRF的分子量是 5235. 48Da,可以推测融合蛋白酸水解后确实释放出了大小正确的 GRF

4 讨 论

象 GRF这样的小分子肽,用基因工程法表达时,由于常采用融合表达,其表达效率的高低直接关系到目标肽的产率,因为目标肽通常在融合蛋白中所占的比率较小,这同时也意味着在提高表达效率的同时,通过减小融合伙伴蛋白的大小,增加目标肽的比率,也能达到增加目标肽产率的目的。本文正是从这两方面开展工作的。

当融合伙伴蛋白从 326个氨基酸残基的 *L*-天门冬酰胺酶全分子缩短为其 C末端 126个氨基酸残基片段时,表达效率明显增加,融合蛋白在总细菌蛋白中的比率从 10%左右增加到 30%左右。表达条件优化后,表达效率可增加到 45%左右。而此时 GRF在融合蛋白中的比率也从 1/9上升到 1/4,即 GRF在总细菌蛋白中的比率增加到 10%左右。这样的表达效率是相当高的,因为 GRF在和 phoS^[4]、 γ -干扰素(1-99)^[5]、 β -半乳糖苷酶^[6]、蛋白 A抗体结合区^[7]、二氢叶酸还原酶(DHFR)^[8]和酵母 α -因子^[9]等进行融合表达时,融合蛋白在菌体总蛋白中的比率最多为 30%左右。表达效率的增加为后面的分离纯化工作创造了有利条件。

GRF以此种方式进行融合表达,GRF融合蛋白形成了包含体,包含体的形成至少有两个好处;一方面便于融合蛋白的分离纯化,另一方面可增加 GRF的稳定性免于被水解。由于酸水解可以在变性状态下进行,又可省去复性步骤。经过细胞裂解,包含体溶解,乙醇沉淀等简单步骤后,就得到了较高纯度的融合蛋白,融合蛋白经酸水解后释放出了大小正确的 GRF。这一切都说明该表达方案不仅可行,而且有效。

参 考 文 献

1 Schoen WR, Hsano JM, Prendong sat K, et al. A novel 3-substituted benzazepinone growth hormone secretagogue (L-692429). *J Med Chem*, 1994, 37: 897
2 Vance ML. Growth hormone-releasing hormone. *Clin Chem*, 1990, 36(3): 415

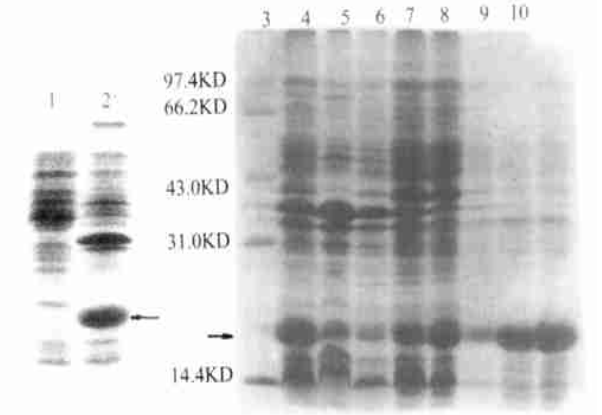


Fig 8. The separation and purification of GRF fusion protein. Lane 1 The soluble protein of *E. coli*. Lane 2 The pellet fraction of lysate. Lane 3 Molecular weight marker. Lane 4 Urea extract of the pellet fraction. Lane 5, 6, 7, 8, 9, 10 The precipitate of urea extract by ethanol different fractions. Arrow indicates GRF fusion protein.

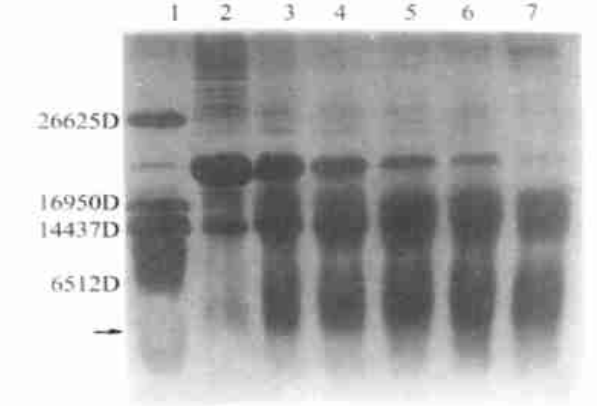


Fig 9. The acid-hydrolysis of GRF fusion protein. Lane 1 Molecular weight marker. Lane 2 The purified fusion protein from urea extract by ethanol. Lane 3, 4, 5, 6, 7 The acid hydrolysis products of fusion protein at 12h intervals. Arrow indicates GRF

- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989
- 4 Anba J, Baty D, Lloubes R, *et al.* Expression vector promoting the synthesis and export of the human growth-hormone-releasing factor in *Escherichia coli*. *Gene*, 1987, **53** 219
- 5 Basu M, Dharm E, Levine JF, Expression of growth hormone releasing factor analog Leu GRF (1-44) OH in *Escherichia coli*: purification and characterization of the expressed protein. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **286**(2): 638
- 6 Kempe T. Production and characterization of growth hormone releasing factor analogs through recombinant DNA and chemical techniques. *Biotechnology*, 1986, **4** 565
- 7 李伯良,胡明,杨新颖等,牛生长激素释放因子的融合表达及其产物的化学加工. *生物化学与生物物理学报*, 1994, **26**(6): 577
- 8 Iwakura M, Obara K, Kokubu T, *et al.* Expression and purification of growth hormone-releasing factor with the aid of dihydrofolate reductase handle. *J Biochem*, 1992, **112** 57
- 9 Barn PJ. EP0129073 A1, 1984

The High Expression of hGRF Gene

Chen Zhenglan, Liu Jingjing, Hu Zhuoyi, Ding Min

Biochemistry Department, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract The hGRF was fused with C-terminal 126 amino acids fragment of *L*-ansB and the expression level of the fusion protein increased to 30% comparing with its fusion expression to the whole *L*-ansB molecule. After improving the expressive condition such as media and inductive condition, the expression level can reach to 45%. The fusion protein was insoluble in *E. coli* cytoplasm. After dissolving the inclusion body in 8 mmol/L urea and precipitating by ethanol, the partially purified fusion protein was obtained. 60 mmol/L hydrogen chloride hydrolyzed the fusion protein. Through the analysis of SDS-PAGE and the electrospray mass spectrum, a material with MW 5235.59 Da was released from the fusion protein. It is GRF whose MW is 5235.48 Da.

Key words GRF; *L*-ansB; Fusion Expression

【摘要】 阿昔洛韦复乳的研究: 大鼠吸收动力学、生物利用度和趋肝性 丁立,张钧寿,马丽,赵骏,龚明涛. *药理学学报*, 1999, 34(10): 790

目的: 研究阿昔洛韦(ACV)复乳的口服生物利用度和肝靶向性. 方法: 采用高效液相色谱法测定大鼠口服ACV复乳和普通片剂后的血药浓度和肝组织分布,对试验数据进行药动力学分析. 药物浓度对时间数据作房室模型和统计

矩解析,并求出相应的药动力学参数. 结果: 大鼠口服ACV复乳对片剂的相对生物利用度为149.8%,达峰时间和血浓维持时间明显延迟. 血浓经时过程符合二室开放线性药动学模型. 血浓峰值附近的肝组织药物分布是片剂的1.62倍($P < 0.01$),谷值附近是片剂的5.16倍($P < 0.05$). 结论: 大鼠口服ACV复乳可提高生物利用度,并有一定的肝靶向性.