

• 实验研究 •

人 α -心钠素基因的串联

石 松*

(中心实验室)

张晓东 张福徽 闵永洁 王启松

(复旦大学遗传所)

提 要 将 α -心钠素(α -hANF)基因克隆到PUC₁₈载体上,经菌落原位杂交筛选鉴定出有 α -hANF基因的克隆株。用Bam I和BamH I消化并分离纯化得到含5'端部分 α -hANF基因及PUC₁₈载体的F₁片段。用DNA合成仪合成3'端部分 α -hANF基因的F₂接头,在基因3'端加入谷氨酸的密码子GAA,作为表达产物用内肽酶Glu-C专一裂解的位置,并去掉基因3'端的终止信号TGA,将原BamH I接头改为EcoR I接头。最后,将F₁和F₂片段与 α -hANF基因酶促连接后进行转化,通过双酶切筛选出含有双拷贝 α -hANF基因的转化子,并用双脱氧链终止法进行序列分析,证明核苷酸顺序正确。

关键词 人 α -心钠素 基因 串联

人心钠素(human atrialnatriuretic factor)是由人心房肌细胞产生和分泌出的一类多肽激素,有 α 、 β 、 γ 3种,均具有明显的利尿、扩张血管和降低血压的作用^[1]。人 α -心钠素由28个氨基酸所组成,这些氨基酸序列也是其他两种心钠素的活性成分。自1984年以来,国外已有几个实验室相继完成了心钠素基因的克隆。^[2,3]1986年我国复旦大学遗传所和中科院上海药物研究所采用固相亚磷酸胺法合成了心钠素基因并在大肠杆菌中表达。

心钠素基因的分子量较小,在直接表达时产物很容易被体系中的蛋白酶水解。^[6]目前,解决这一问题的常用方法是将目的基因与细菌本身的某一蛋白融合后进行表达。^[6,7]但这一方法由于细胞代谢潜力没有得到充分发挥,所需要的蛋白仅占很小一部分。

最近,英国科学家将前胰岛素基因串联成多个拷贝较有效地解决了这一问题。为此,我们进行了 α -hANF基因的串联工作,以期获高效直接表达。

材 料 和 试 剂

细菌菌株和克隆载体 噬菌体M_{13mp18}, PUC₁₈, 大肠杆菌JM₁₀₃, 大肠杆菌MC₁₀₆₁为本实验室保存。

试剂和酶 合成DNA寡聚核苷酸片段所用的试剂和溶剂为美国Applied Biosystem公司产品, γ -³²P-ATP和 α -³²P-dATP为英国Amersham公司产品,T₄DNA连接酶和限制性内切酶Ban I、BamH I、EcoR I为美国Biolabs公司产品;Xgal和IPTG为美国Sigma公司产品。

方 法

 α -hANF基因在PUC₁₈上的克隆

1. PUC₁₈载体的制备 见文献^[8]。

2. α -hANF基因的准备 将含有 α -hANF基因的M₁₃菌株抽提RF DNA后,用EcoR I与BamH I双酶切低熔点琼脂糖电泳纯化得到 α -hANF基因^[8]。

3. 基因与载体的连接和转化 在已处理好的载体中加入 α -hANF基因,在T₄DNA连

● 硕士

接酶作用下12℃连接24小时用大肠菌 MC_{1081} 作受体菌转化,在加入 Xgal 的Ap LB 平板上(含 Ap100 μ g/ml)筛选,挑出白色菌落。

4. 原位杂交 挑出白色菌落,取合成时 A_0 片段作探针,按文献方法进行原位杂交^[8]。

F_1 片段的制备

1. 含 α -hANF 基因的 PUC_{18} 质粒的制备 将上面原位杂交筛选出的阳性菌落按文献抽提质粒^[8]。

2. 酶切及 F_1 片段的回收 取上述已纯化的 PUC_{18} 质粒用 Ban II 和 BamH I 双酶切,进行低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 F_1 片段。

F_2 接头的合成及组装

1. 化学合成、PAGE、柱层析、纯度鉴定 按文献进行^[4]。

2. F_2 接头的组装及磷酸化 将纯化鉴定后的三个寡聚核苷酸片段各约0.2OD₂₆₀按等摩尔数比混合,再加入20 μ l T_4 多核苷酸激酶缓冲液,80℃退火至室温。然后加入3 μ l 10mM-ATP, T_4 多核苷酸激酶2单位,37℃反应60分钟,4℃保存待用。

双拷贝 α -hANF 基因的克隆

1. F_1 、 F_2 与基因的连接与转化 将 F_1 、 F_2

与单拷贝基因按摩尔比1:5:5进行连接与转化,方法同前。

2. 转化子的筛选 采用快速抽提方法^[8]抽提多个转化子的质粒,分别进行 EcoR I 与 BamH I 双酶切,以 PBR 322/Hae III 作分子量标准,5%PAGE 鉴定。

3. 序列分析 将上面双酶切筛选出的转化因子抽提质粒,按文献进行序列分析^[9]。

结果与讨论

hANF 双拷贝基因组建的设计 由于在 hANF 基因的3'端有终止信号 TGA,不能直接进行串联,所以我们在基因的3'端找到一个酶切位点 Ban II,用此酶消化后,保留5'端部分,重新合成基因的3'端部分,并去掉终止信号 TGA,将原 BamH I 接头改为 EcoR I 接头,加上了谷氨酸的密码子 GAA,作为内肽酶 Glu-C 专一裂解的位点。然后 F_1 、 F_2 与原单拷贝基因连接,得到双拷贝 hANF基因,见图1。

α -hANF 基因在 PUC_{18} 上的克隆

1. 转化结果 A板(100ng DNA)20个菌落;B板(500ng DNA)52个菌落;C板

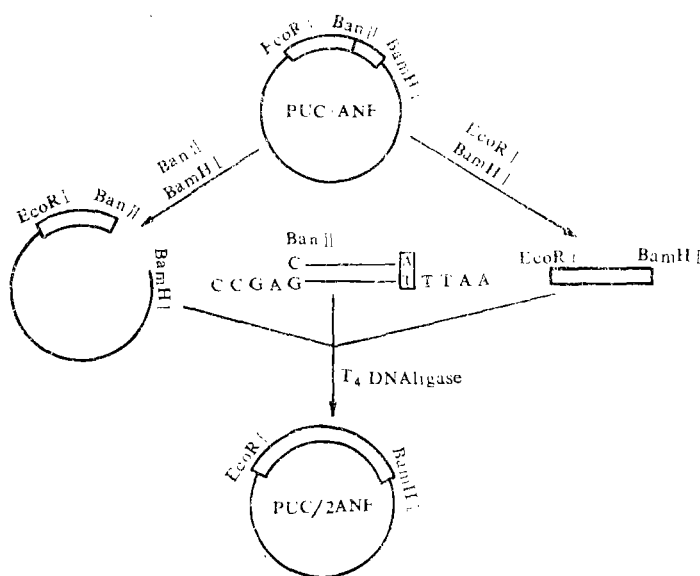


图1 α -hANF双拷贝基因的组建

(阳性对照) 300个菌落。

2. 转化子的筛选鉴定 A板和B板中72个菌落, 白色菌落21个, 蓝色菌落51个。将21个白色菌落作原位杂交后, 结果11个为阳性。

F₂接头的合成与组装

F₂接头分为3个寡聚核苷酸合成, 其序列见图2。F₂接头包括编码基因(Ban I位点) 3'端一段序列, 去掉了原来3'端的终止信号TGA, 但加上Glu的密码子GAG以及EcoRI的粘性末端, 但由于图2框中碱基对为A-

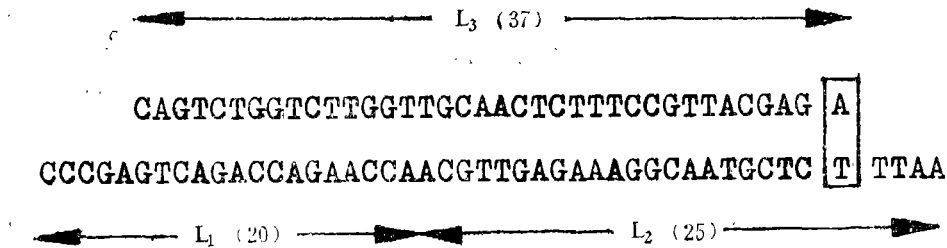


图2 F₂接头的核苷酸顺序

划为3个寡聚核苷酸片段合成, 括号内数字代表各片段长度

	Glu	Ser	Leu	Arg	Arg	Ser	Ser	Cys	Phe
5' AATTC	GAA	TCT	CTT	CGT	CGT	TCT	TCT	TGC	TTC
G	CTT	AGA	GAA	GCA	GCA	AGA	AGA	ACG	AAG
Gly	Gly	Arg	Met	Asp	Arg	Ile	Gly	Ala	Gln
GGT	GGT	CGT	ATG	GAC	CGT	ATC	GGG	GCT	CAG
CCA	CCA	GCA	TAC	CTG	GCA	TAG	CCC	CGA	GTC
Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Asn	Ser	Phe	Arg	Tyr
TCT	GGT	CTT	GGT	TGC	AAC	TCT	TTC	CGT	TAC
AGA	CCA	GAA	CCA	ACG	TTG	AGA	AAG	GCA	ATG
Glu	Lys	Phe	Glu	Ser	Leu	Arg	Arg	Ser	Ser
GAG	AAA	TTC	GAA	TCT	CTT	CGT	CGT	TCT	TCT
CTC	TTT	AAG	CTT	AGA	GAA	GCA	GCA	AGA	AGA
Cys	Phe	Gly	Gly	Arg	Met	Asp	Arg	Ile	Gly
TGC	TTC	GGT	GGT	CGT	ATG	GAC	CGT	ATC	GGG
ACG	AAG	CCA	CCA	GCA	TAC	CTG	GCA	TAG	CCC
Ala	Gln	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Asn	Ser	Phe
GCT	CAG	TCT	GGT	CTT	GGT	TGC	AAC	TCT	TTC
CGA	GTC	AGA	CCA	GAA	CCA	ACG	TTG	AGA	AAG
Arg	Tyr	Stop							
CGT	TAC	TGA	G						
GCA	ATG	ACT	CCTAG						

图3 α -hANF 双拷贝基因的核苷酸和氨基酸顺序

T 使该 EcoR I 位点在连接后被封闭。

双拷贝 α -hANF 基因的克隆

1. 酶切筛选 从转化因子中选出7个菌落, 抽提质粒后用 EcoR I 与 BamH I 双酶切后5%PAGE 鉴定, 得到阳性菌落1个。

2. 序列分析 将上面筛选出的含双拷贝 α -hANF 基因的质粒进行序列分析, 核苷酸顺序与原设计完全相同(图3)。由于在每个 α -hANF 基因两端加上了 Glu 的密码子, 在基因表达时, 可用内肽酶 Glu-C 将产物裂解, 由于内肽酶 Glu-C 的专一性强且价格较便宜, 对于基因工程产品的应用是有价值的。另外, F₁F₂ 与双拷贝基因可继续连接下去, 得到多拷贝基因。

参 考 文 献

- [1] Flynn T G, et al. The biochemistry and molecular biology of atrial natrial factor. *Biochem J* 1985;232(2):313.
- [2] Lewicki J A, et al. Cloning, sequence analysis, and processing of the rat and human atrial natriuretic peptide precursors. *Federation Proceedings* 1986;45(7):2086.

- [3] Viasuk G P, et al. Expression and secretion of biologically active human atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem* 1986; 261(11):2733.
- [4] 杨迪, 等. 人 α -心钠素全基因的化学合成. *生物化学杂志* 1989;5(4):289.
- [5] Davis A R, et al. Immune response to human influenza virus hemagglutinin expressed in *E. coli*. *Gene* 1983;21(1):273.
- [6] Goeddel D V, et al. Expressed in *E. coli* of Chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(1):106.
- [7] Reed S I, et al. Preparation of product-specific antisera by gene fusion. *Gene* 1982;20(1):255.
- [8] 彭秀玲, 等. 基因工程实验技术. 第1版. 长沙: 湖南科技出版社. 1987:5~98.
- [9] Ellson Y C, et al. Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 1985;4(2):165.

CLONING MULTIPLE COPIES OF A GENE FOR HUMAN ATRIAL NATRIURETIC FACTOR

Shi Song

(Central Laboratory)

Zhang Xiaodong Zhang Fuhui Min Yongjie Wang Qisong

(Genetics Institute FuDan University, Shanghai)

A method is described which allows α -human atrial natriuretic factor to be synthesized in stable form and with high yield in *Escherichia coli*. Two copies of the synthetic α -hANF gene were linked in tandem, separated by conons specifying a 4-amino-acid linker with glutamic residues flanking the authentic N and C termini of the 28-aa hormone. This linker is for enzymatic cleavage of expressed product by endoproteinase Glu-C. Two copies gene sequence was verified by dideoxynucleotide chain termination method.

Key words α -Human atrial natriuretic factor Gene Multiple copies gene