

人修饰型降钙素和鼠酰胺化酶基因在昆虫细胞中的偶联表达

杨冠珍 陈珍珍 崔大敷 李伯良 吴祥甫*

(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

摘 要 人降钙素(hCT)是 32 氨基酸的多肽激素,C-端为 α 脯氨酰胺结构,具有调节体内钙、磷代谢等许多重要生理功能。用重组昆虫杆状病毒表达系统,偶联表达合成的人修饰型降钙素(hmCT)基因与 GST 融合基因和大鼠酰胺化酶(PAM)基因,再用抗 hmCT 或抗 PAM 抗体,既检测到由昆虫细胞表达的 GSThmCT 产物也检测到 PAM 产物。经 GSH-琼脂糖凝胶亲和层析,分离纯化 GSThmCT 融合蛋白。这种蛋白修饰酶与底物在真核细胞偶联表达也将适用于其他生物活性肽的体外表达。

关键词 降钙素,酰胺化酶,偶联表达,杆状病毒

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0020-05

降钙素(Calcitonin CT)是由哺乳类动物甲状腺 C 细胞、鱼和鸟等非哺乳类脊椎动物后鳃体分泌的多肽激素,具有调节体内钙、磷代谢,降低血钙,促进骨对钙的吸收等功能。临床上,降钙素已广泛用于治疗帕金森氏症、高钙休克、骨质疏松、癌的骨转移、变形性骨炎、骨折等^[1]。降钙素由 32 个氨基酸组成。不同来源的降钙素氨基酸水平并不高度保守,但都具有几个共同特征,即第 1,7 位半胱氨酸形成二硫环;形成一个 α -螺旋;C 末端都为脯氨酰胺结构^[2]。各种来源降钙素生物活性不尽相同,其中鲑鱼降钙素(sCT)、鳗鱼降钙素(eCT)及鸡降钙素(cCT)活性最高,达 4000 ~ 6000 IU/mg,而人降钙素(hCT)活性最低,仅 100 ~ 200 IU/mg。若根据 CT 活性与结构的刚柔关系,设计并合成修饰型人降钙素类似物(hm-CT),发现该类似物 hmCT 降血钙活性可高达 2000 IU/mg^[3]。

降钙素的 C 末端脯氨酰胺结构对其完全生物活性是必需的。体内许多有重要生理功能的活性肽在生物合成过程中,都需要翻译后形成 C 末端 α -酰胺修饰。酰胺化结构对它们的生物活性和稳定性都极为重要。这种酰胺化修饰过程体内由甘氨酸 α -酰化单氧酶(Peptidylglycine α -amidating monooxygenase PAM)负责完成。PAM 为双功能酶,含两个催化结构域:氧化酶(PHM)和裂解酶(PAL)^[4]。迄今为止建立

的几乎所有基因工程表达系统都不具备翻译后 C 末端 α -酰胺化修饰能力^[5]。

重组昆虫病毒表达系统由于其高表达效率及表达后加工等能力而被广泛用于表达各种异源蛋白。尤其是用该系统进行多价外源基因共表达,表达产物被加工修饰或装配成生物活性蛋白^[6,7]。由于培养细胞不具备 C 端 α -酰胺化能力,及人修饰型降钙素为 32 个氨基酸的小肽,体外表达量低,mRNA 极不稳定^[8],因而至今尚无基因工程产品。我们利用重组昆虫病毒表达系统,设计将蛋白修饰酶-大鼠甘氨酸 α -酰化单氧酶(PAM)与高活性人修饰型降钙素类似物基因在昆虫细胞中共表达。同时获得人降钙素-GST 融合蛋白和大鼠甘氨酸 α -酰化单氧酶的表达。期望本研究结果为用基因工程手段产生各种生物活性肽提供新途径和新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 TG1; BL21 (DE3) 本实验室保存。质粒 pGEX2T, Pharmacia 公司。质粒 pFastBacDual 及菌株 DH10Bac 购自 GIBCO BRL 公司。昆虫秋粘虫细胞 (*Trichoplusia ni*) Tn5 本实验室培养。培养基 TNFH; 胎牛血清; 脂质体 (Lipofectin); 各种工具酶; 碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体及其底物 NBT/BCIP 均购自

收稿日期:2001-07-16; 修回日期:2001-10-15。

基金项目:国家 863 高技术研究发展计划项目资助(No. 863-102-11-02-03)。

* 通讯作者: Tel:86-21-64374430 ext 5292; Fax:86-21-64338357; E-mail: xfwu@sunm.shcnc.ac.cn

GIBCO BRL公司。谷胱甘肽 Glutathione agarose 及还原型谷胱甘肽为 Sigma 公司。抗人降钙素类似物多克隆抗体及抗酰胺化酶多克隆抗体本所制备。寡核苷酸由本所合成。

1.2 方法

1.2.1 人降钙素基因化学合成及克隆:根据高活性人修饰型降钙素类似物序列^[9],设计并合成两个寡核苷酸,分别为 71bp 和 74bp,其中 71bp 3'端与 74bp 5'端互补重叠 15bp 序列。两个寡核苷酸退火后,经 DNA 聚合酶 I 大片段酶延伸,合成双链 DNA,共 130bp,克隆于 pUC19 载体,测序确定。

1.2.2 人修饰型降钙素基因在原核中表达:将人降钙素基因克隆于 pGEX-2T 载体的 *Bam*HI 位点,与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)融合,获得质粒 pGEX-CT。pGEX-CT 转化大肠杆菌 BL21(DE3),37℃ 培养 3h,1mmol/L IPTG 诱导 3h 后,收集细胞,作表达分析。重组 DNA 技术均按分子克隆手册进行^[10]。

1.2.3 人修饰型降钙素基因和大鼠酰胺化酶基因在昆虫细胞的共表达:基本按 GIBCO BRL 公司的 Bac-to-Bac 重组昆虫杆状病毒表达系统说明书进行。以上述质粒 pGEX-CT 为模板,用上游引物 5' GCTAGATCTATGTCCTATACTAGGT3'^[11]和下游引物 5' GGAAGATCTCAGTCAGTCACGATGAA3' 扩增出 GST-hmCT 融合基因,克隆于载体 pFastBacDual 的 *Bam*HI 和 *Xba*I 位点,使 GST-CT 融合基因在多角体(Ph)蛋白基因启动子控制之下。再将大鼠酰胺化酶基因克隆于该载体的 *Xho*I 和 *Sma*I 位点,使其在

P10 基因启动子控制下,获双基因双启动子转移载体 pFBD-GSTCT-PAM。转移载体转座 DH10Bac 菌株,抽提 Bacmid DNA 等均按说明书进行。Bacmid DNA 用脂质体方法转染昆虫细胞按文献^[12]进行。

1.2.4 表达产物的分离纯化:基本按 sigma 公司 GSH 琼脂糖凝胶说明书和文献^[11]进行。对被重组病毒感染 3d 的 Tn5 细胞,补加 1μmol/L CuSO₄、1mmol/L 抗坏血酸、0.5mmol/L NEMI、0.25mg/mL 过氧化氢酶(Catalase),27℃ 继续培养 6h,收集细胞。液氮-37℃ 反复冻融裂解细胞。12 000r/min 离心 15min,上清进行 GSH 琼脂糖凝胶柱亲和层析,10 倍柱体积的 PBS 洗,5mmol/L 还原型谷胱甘肽,50 mmol/L Tris-HCl pH8.0 洗脱。收集洗脱液,对水透析,冷冻干燥。

2 结果

2.1 人修饰型降钙素基因在大肠杆菌中表达

降钙素是 32 个氨基酸的小肽,单独体外表达很困难,mRNA 极不稳定,表达量低。为此我们设计与 GST 融合表达。合成并克隆的人修饰型降钙素基因 3'末端增加甘氨酸(hmCT-Gly)。将 hmCT-Gly 构建在 pGEX-2T 的 *Bam*HI 位点,获得 pGEX-CT 质粒。该质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中经 IPTG 诱导,获大量表达。表达产物与抗人修饰型降钙素多克隆抗体免疫杂交(图 1A)。通过 GSH-agarose 亲和层析,可一步纯化表达的 GST-CT 融合蛋白,分子量为 29.5kD,细菌中表达的融合蛋白以可溶形式存在(图 1B)。

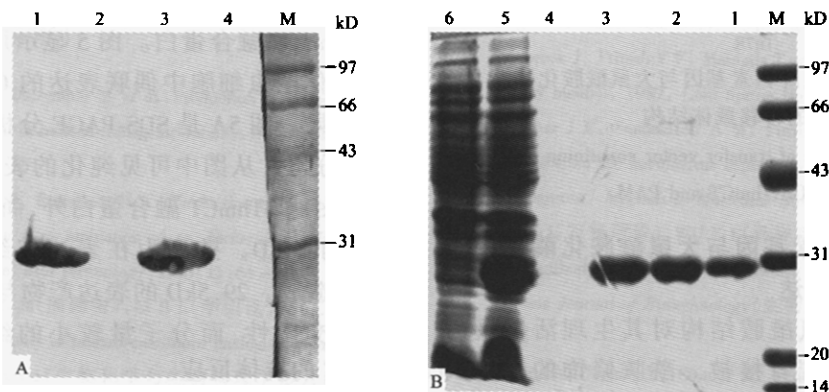


图 1 人修饰型降钙素-GST 融合蛋白在大肠杆菌中表达

Fig.1 The expression of GST-hmCT fusion protein in *E. coli*

A. Western blotting analysis of GST-hmCT produced in *E. coli*; M. Protein MW standard; 1, 3. Induced samples with IPTG; 2, 4. Uninduced samples. B. SDS-PAGE pattern of purified GST-hmCT produced by *E. coli*; 1~3. Elution fraction from GSH agarose column; 5, 6. Crude extract from *E. coli*, induced in lane 5 and uninduced in lane 6.

2.2 含人修饰型降钙素基因与大鼠酰胺化酶基因转移载体构建

为了实现人降钙素与大鼠酰胺化酶在昆虫细胞中的共表达,构建了含人降钙素 GST-hmCT 融合基因和大鼠酰胺化酶基因的双基因双启动子转移载体。在原核表达 GST-hmCT 融合蛋白的基础上,以 pGEX-CT 质粒 DNA 为模板,用引物 1 为上游引物,引物 2 为下游引物,扩增出 GST-hmCT 融合基因约 780bp, C 末端增加甘氨酸(Gly),为 C 端 α -酰胺化提供氨基。上游引物设计增加 *Bgl*II 酶切位点。利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统提供的 pFastBacDual 双基因双启动子载体,将 GST-hmCT-Gly 融合基因克隆于 *Bam*HI 和 *Xba*I 位点,使之在杆状病毒核多角体蛋白启动子控制下。另外,将大鼠酰胺化酶基因(PAM)^[4]克隆于该载体的 *Xho*I 和 *Sma*I 位点,使 PAM 基因受杆状病毒 P10 基因启动子调控,从而获得转移载体 pFBD-GSTCT-PAM。转移载体结构见图 2。

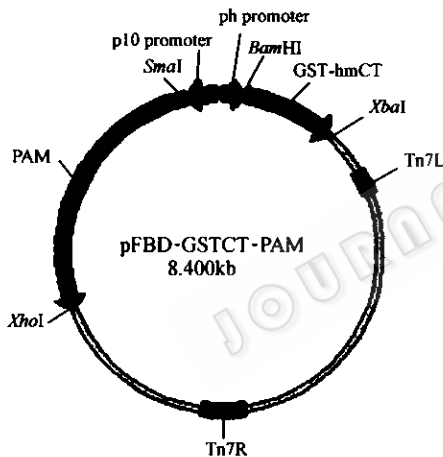


图 2 含人修饰型降钙素基因与大鼠酰胺化酶基因的转移载体结构

Fig.2 The structure of transfer vector containing dual gene of GST-hmCT and PAM

2.3 人修饰型降钙素基因与大鼠酰胺化酶基因在昆虫细胞中的偶联表达

降钙素 C-端脯氨酸结构对其生理活性极为重要。为了获得 C-端直接被 α -酰胺修饰的重组人降钙素,我们设计将蛋白修饰酶大鼠酰胺化酶基因与其底物人修饰型降钙素(hmCT-Gly)在重组昆虫病毒系统中偶联表达。重组病毒 GSTCT/PAM 感染昆虫细胞 Tn5 3d 后,收集细胞,用 Western blot 分别检测两个基因的表达产物。图 3A 显示用抗 PAM 多克隆抗体检测到的 PAM 在昆虫细胞的表达。产物分子量约为 97kD,符合理论值。从图 3A 可见除了

97kD PAM 外,在含血清培养基(TNFH)培养的细胞中,还检测到其他阳性杂带,也许血清中存在与抗 PAM 多抗杂交的蛋白。图 3B 表示用抗人修饰型降钙素多克隆抗体检测到的 GST-hmCT 融合蛋白在昆虫细胞中表达,产物分子量为 29.5kD。表明两个蛋白已同时获表达。

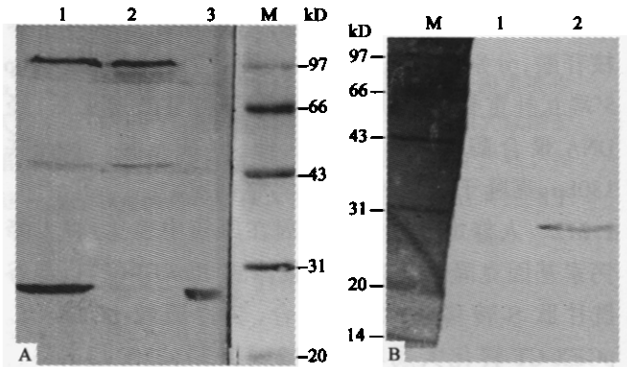


图 3 昆虫细胞偶联表达的人修饰型降钙素和 大鼠酰胺化酶蛋白印迹分析

Fig.3 Western blotting analysis for couple expression products of GST-hmCT and rat PAM from insect cells

A. Rat PAM produced by insect cells. The anti-PAM antibody was used. M. Protein MW marker; 1, 2. Infected cells with recombinant baculovirus GSTCT/PAM; 3. Mimic infected cells. SF900 serum free medium was used in lane 2.

B. GST-hmCT produced by insect cells. The anti-hmCT antibody was used. M. Protein MW marker; 1. Mimic infected cells; 2. Infected cells with recombinant baculovirus GSTCT/PAM.

2.4 人修饰型降钙素基因与大鼠酰胺化酶基因偶联表达产物的分离纯化

通过 GSH-Agarose 柱层析可容易地一步纯化 GST-hmCT 融合蛋白。图 5 显示用 GSH-Agarose 柱层析纯化昆虫细胞中偶联表达的 GST-hmCT 融合蛋白的结果。图 5A 是 SDS-PAGE 分析。图 5B 为 Western blot 分析。从图中可见纯化的表达产物除了分子量 29.5kD GSThmCT 融合蛋白外,尚有分子量较小的区带,约 24kD。推测为在表达或纯化过程中蛋白酶解^[2]造成。29.5kD 的表达产物与抗 hmCT 抗体呈免疫杂交阳性,而分子量较小的纯化蛋白则不与抗 hmCT 的抗体反应。

3 讨 论

至此,我们获得由重组昆虫病毒表达系统偶联表达的人修饰型降钙素和 大鼠酰胺化酶。通过 GSH 亲和层析,纯化 GSThmCT 融合蛋白。但精确测定纯化的 hmCT C-末端是否为脯氨酸结构还较困难。目前研究大都是通过表达降钙素前体肽,再进行体

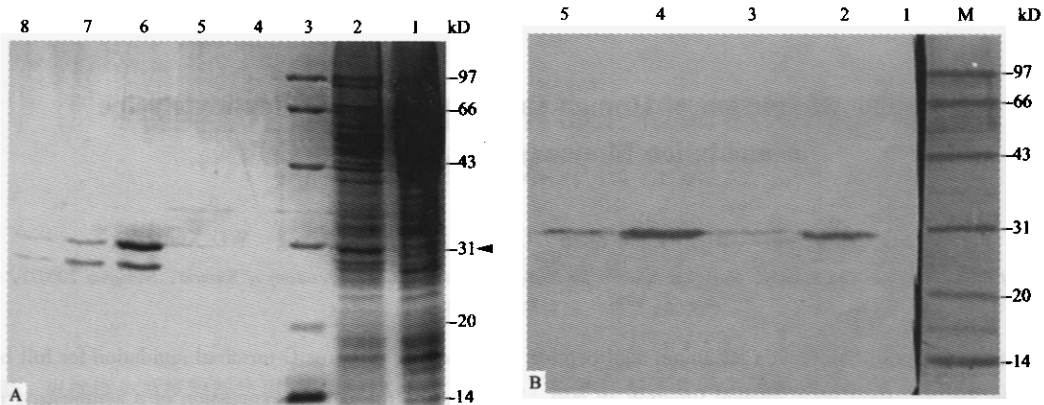


图4 昆虫细胞产生的人修饰型降钙素-GST融合蛋白的分离纯化

Fig.4 The purification of GSThmCT fusion protein produced in insect cells

A. The SDS-PAGE pattern of purified GSThmCT. 1, 2. Crude extract from insect cells, mimic infection in lane 1 and infection with recombinant baculovirus GSTCT/PAM in lane 2; 3. Protein MW marker; 4~8. Elution fraction. The arrow shows expression product.

B. Western blotting analysis for purified GSThmCT. The anti-hmCT antibody was used. M, Protein MW marker; 1, 2. Crude extract from insect cells infected by recombinant baculovirus GSTCT/PAM in lane 2 and mimic infection in lane 1; 3~5. Elution fraction.

外酰胺化修饰加工成成熟肽^[2,13,14]。Mckee用转基因兔获得C-端酰胺化修饰的鲑鱼降钙素(sCT)^[1]。而我们设计将蛋白修饰酶与底物蛋白偶联表达,以期获得体内加工修饰的成熟蛋白也不失为一条新途径。

降钙素广泛用于治疗各种骨代谢疾病。化学合成的各种CT,如鲑鱼CT、牛CT、电鳗CT等都对人潜在的免疫原性,长期使用活力下降^[13]。我们进行人修饰型降钙素类似物基因工程研究有一定应用价值。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Mckee C, Gibison A, Dalrymple M *et al.* Production of biologically active salmon calcitonin in milk of transgenic rabbits. *Nature Biotechnology*, 1998, 16:647~651
- [2] Ray V L M, Duyne V P, Bertelsent H A. Production of recombinant salmon calcitonin by *in vitro* amidation of an *Escherichia coli* produced precursor peptide. *Bio/Technology*, 1993, 11:64~70
- [3] YU C(俞超), ZHOU G M(周国明), LI B L(李伯良) *et al.* Synthesis and biological activity of human calcitonin analogue. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 1999, 31(5):553~557
- [4] JIANG Z H(江智红), YANG Y H(杨宇红), XU L G(徐来根) *et al.* Functional expression of rat peptidylglycine α -amidation monooxygenase in CHO cells and its use in *in vivo* amidation. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, 14(2):125~132
- [5] Maeda S. Expression of foreign gene in insect cells using baculovirus vectors. *Insect Cell Biotechnology*, CRC Press, 1994, chapter 1:1~31
- [6] Hasemann C A, Capra J D. High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *Proc Natl acad Sci U S A*, 1990, 87:3942~3946
- [7] YU Y J(余拥军), JANG Y L(姜育蕾), YANG G Z(杨冠珍) *et al.* High expression in insect cells of a functional chimeric antibody with specificity for HBsAg. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 1997, 29(6):561~566
- [8] Gigova L, Wishart P, Uscheva A *et al.* Expression of repetitive human calcitonin genes in *Escherichia coli*. *Biotechnology and applied Biochemistry*, 1989, 11:401~412
- [9] CUI D F(崔大敷), YU C(俞超), WU X F(吴祥甫) *et al.* The analogues of human calcitonin. Patent application No.98110839.3.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular cloning, A laboratory manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [11] Sorscher J E, Sommerfelt A M. Purification of recombinant protein derived from the baculovirus expression system using glutathione affinity agarose. *Methods in Molecular Biology*, 1995, 39:337~348
- [12] YANG G Z(杨冠珍), WU X F(吴祥甫), LIU J(刘健) *et al.* Chimeric antibody production in silkworm cells and silkworm larvae. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, 15(1):41~45
- [13] Yabuda M, Suzuki Y, Ohsuye K. High expression of a recombinant human calcitonin precursor peptide in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 42:703~708
- [14] YANG Y H(杨宇红), CHEN H(陈虎), YU C(俞超) *et al.* *In vitro* amidating processing of products by gene engineering. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 2000, 32(3):312~315

Couple Production of Human Calcitonin and Rat Peptidylglycine α -amidation Monooxygenase in Insect Cells

YANG Guan-Zhen CHEN Zhen-Zhen CUI Da-Fu LI Bo-Liang WU Xiang-Fu*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Human calcitonin (hCT) is a 32 amino acid peptide hormone that requires C-terminal amidation for full biological activity. Calcitonin has important physiological function *in vivo*. We describe the couple expression of a synthesized modified human calcitonin(hmCT) gene fused with glutathione-S-transferase and rat peptidylglycine α -amidation monooxygenase (PAM) in insect cells infected by recombinant baculovirus GSTCT/PAM. Using Western blotting against hmCT or rat PAM, the GSThmCT fusion protein had been identified as well as the PAM. Following affinity chromatography with glutathione agarose column, the GSThmCT fusion protein produced by insect cells was purified. The purified fusion protein was also interacted with antibody against hmCT. The couple expression of a modification enzyme and its substrate in eucaryotic expression system may be used for producing other biological activity peptides.

Key words calcitonin, peptidylglycine α -amidation monooxygenase, couple-expression, baculovirus

Received: 07-16-2001

This work was supported by a grant from the State 863 High Technology R&D Project of China(No.863-102-11-02-03).

* Corresponding author. Tel:86-21-64374430 ext 5292; Fax:86-21-64338357; E-mail:xfwu@sunm.shnc.ac.cn

科学出版社生物类图书精品推荐

书名	作(译)者	定价	出版时间	备注
微生物生物学(第8版)	Madigan, Marinko, Parker 著, 杨文博等译	160	2001年8月	Brock Biology of Microorganisms 是国外经典微生物学教材, 本书为其第8版。
细胞实验指南(上、下)	D. L. Spector, R. D. Goldman, L. A. Leinwand 著, 黄培堂译	220	2001年2月	本书为论述细胞学实验集大成者, 与《分子克隆实验指南》齐名。
体外培养的原理与技术	薛庆善	148	2001年1月	本书重点论述动物四大基本组织的各种细胞以及特殊类型组织细胞的体外培养原理和技术。
膜片钳实验技术	陈军、李继硕	20	2001年10月	本书系统而全面地介绍了该技术的基本原理、实验步骤、实际应用等。
心脏生理学:从细胞到循环(第3版)	Lionel H. Opie 著, 高天祥等译	65	2001年10月	本书第1版曾被誉为心脏生理学的里程碑, 此第3版增加了新篇章, 介绍了新进展。
神经元:细胞与分子生物学	I. B. Levitan, L. K. Kaczmarek 著, 舒斯云等译	56	2001年10月	本书是一本有着广泛影响的神经生物学名著。
图解植物学词典	J. G. Harris, M. W. Harris 著, 王宇飞等译	55	2001年10月	本书是一本图文并茂的植物学工具书, 涵盖了绝大部分在植物鉴定和描述中设计的词汇, 共2400余条, 另有1900余幅精美插图。

即日起, 欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书并免费索取书目。凡购书者免邮费, 且可享受各种折扣优惠。请按以下方式联系我们:

电话: 010-64011127, 64002234 传真: 010-64034622

电子邮件: directselling@sina.com

通讯地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 邮政编码: 100717

联系人: 卢秀明

同时欢迎访问生物编辑部主页: <http://spbio.yeah.net> 和网上售书合作伙伴: <http://www.biogene.com.cn>。