

人甲状旁腺激素在大肠杆菌中的表达及鉴定

方宏清* 戴红梅 李彦英 赵洪亮 刘志敏 朱厚础 马清钧 陈惠鹏*

(北京生物工程研究所 北京 100071)

摘要 化学合成人甲状旁腺激素(hPTH)全长基因,克隆到大肠杆菌表达载体 pBV220 和 pET22b 中,获得了高表达。经破菌、阳离子交换层析、反相层析纯化获得了纯度大于 95% 的纯品。N 端测序、质谱分析结果表明重组 hPTH 结果完整,N 端无 Met 或 fMet。生物活性试验证明重组 hPTH 具有激活腺苷酸环化酶、增加骨质量和骨密度等作用。

关键词 人甲状旁腺激素,大肠杆菌,基因表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0102-05

人甲状旁腺激素(human parathyroid hormone, hPTH)是由 84 个氨基酸残基^[1]组成的低分子量蛋白质,是钙、磷体液平衡的主要调节因子。PTH 通过与受体结合后激活腺苷酸环化酶和蛋白激酶 C 的活性,改变骨吸收和骨合成的速率,影响骨代谢。研究发现间歇注射 PTH 可以促进骨合成速率,提高骨质密度和骨质量。动物试验或人体试验表明,PTH 可能具有以下用途^[2]:

1. 用于妇女绝经后骨质疏松症的治疗,目前正在进行 III 期临床试验。
2. 用于皮质类固醇诱发的药物性骨质疏松症的治疗,有少量临床研究报告。
3. 用于男性自发性骨质疏松症的治疗,有少量临床研究报告。
4. 促进或加快整形外科移植体(orthopaedic implants)的固定,动物试验报道。
5. 加快和改善老年性骨折愈合速率和质量,动物试验报道。
6. 局部注射用于直齿治疗(orthodontic therapy),动物试验报道。
7. 外用治疗牛皮癣(psoriasis),2000 年进入临床研究,无最新报道。

为了获得足够量的 hPTH 用于动物实验研究和临床研究,本研究利用重组 DNA 技术在大肠杆菌中

生产 hPTH。选择大肠杆菌偏爱密码子,人工合成全长 cDNA 序列,分别插入到 pBV220 和 pET22b 表达载体,转化到相应的宿主菌体内均获得了高表达。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli DH5 α , BL21(DE3)为本研究室保存;质粒 pBV220 由段海清博士惠赠,pET22b 由刘志刚博士惠赠。各种工具酶购自大连宝生物工程有限公司及华美生物工程公司。

1.2 全长 hPTH cDNA 的合成、克隆及表达载体的构建

选择大肠杆菌偏爱密码子,并考虑到在两种表达载体(pBV220 和 pET22b)中获得高表达的可能二级结构,设计了全长 hPTH cDNA 序列。分成 10 个片段分别合成,然后进行 5' 端磷酸化,变性、退火、连接。2% 琼脂糖电泳回收 270 bp 大小片段,与 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切的 pBV220 载体连接。转化 *E. coli* DH5 α 后,筛选重组子,经测序从 4 个重组子中获得一个序列完全正确的重组质粒,命名为 pBV-hPTH。

从质粒 pBV-hPTH 用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切切下小片段,与用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切的 pET22b 载体连接,获得表达质粒 pET-hPTH。

1.3 工程菌的构建及 hPTH 的表达

将质粒 pBV-hPTH 转化到 *E. coli* DH5 α 中构建了热诱导型表达工程菌 *E. coli* DH-BP。该工程菌接入含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中先在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养生长 4 h, 然后升温至 42 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 h 诱导表达 hPTH。

将质粒 pET-hPTH 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中构建了化学诱导型表达工程菌 *E. coli* BD-EP。该工程菌接入含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养生长 2.5 h 后, 加终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside), 继续于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h 诱导表达。

发酵培养在德国产的 5 L 罐中进行, 采用改良的液体 LB 培养基。

1.4 重组 hPTH 的纯化

按 1 g 湿菌加入 5 mL 破菌缓冲液的比例悬浮菌体进行破菌, 离心后上清先经过阳离子柱 SP Sepharose FF 初步纯化, 再经 C18 柱精细纯化获得重组 hPTH 纯品, 用 RP-HPLC 和 SDS-PAGE 进行纯度分析。

```

1           5           10
Met Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys
AAATTCAT ATG TCT GTA TCT GAG ATT CAG TA ATG CAT AAC CTT GGC AAA
GTA TAC AGA CAT AGA CTC TAA GTC AAT TAC GTA TTG GAA CCG TTT
15           20           25
His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu
CAT TTG AAC TCC AIG GAG CGI GFA GAA TGG CIG CGT AAG AAG CTG
GTA AAC TTG AGG TAC CIG GCA CAT CTT ACC GAC GCA TTC TTC GAG
30           35           40
Gln Asp Val His Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro
CAG GAC GTT CAC AAT TTC GTT GCG CTG GGC GCT CCG CTG GCA CCG
GTC CTG CAA GTG TTA AAG CAA CGC GAC CCG CGA GGC GAC CGT GGC
45           50           55
Arg Asp Ala Gly Ser Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val
CGT GAC GCT GGT TCT CAA CGC CCG CGI AAG AAA GAA GAT AAC GTT
GCA CTG CGA CCA AGA GTT GCG GGC GCA TTC TTT CTT CTA TTG CAA
60           65           70
Leu Val Glu Ser His Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala
GTG GTT GAA TCC CAT GAG AAA TCT CTG GGC GAA GCA GAC AAA GCG
GAC GAA CTT AGG GHA CTC TTT AGA GAC CGG CTT CGI CIG TTT CGG
75           80
Asp Val Asn Val Leu Thr Lys Ala Lys Ser Gln
GAT GTG AAC GTT CTG ACC AAA GCT AAA TCC CAG TAATGAG
GTA CAC TTG GAA GAC TGG TTT CGA TTT AGG GTC ATTACTCCTAG

```

图 1 优化设计的全长 hPTH cDNA 序列

Fig. 1 The synthetic hPTH gene with an initiating codon, two stop codons, *Eco*R I and *Bam*H I linkers

1.5 生物活性测定

鼠自发骨肉瘤细胞 ROS 17/2.8 来自北京大学医学部生化系。PTH 刺激腺苷酸环化酶活性实验参照文献 [3] 方法进行。全细胞 cAMP 浓度用酶免疫试剂盒测定 (cAMP Direct Biotrak EIA, 购自 Amersham Biosciences 公司)。

动物体内治疗骨质疏松症药效实验由北京放射医学研究所吕秋军博士课题组完成。采用去势 Wistar 大鼠模型, 以 Sigma 公司的 PTH(1-34) 作为阳性对照, 每周给药 5 次, 给药 39d。试验结束时称股骨干重, 并用双能 X 线吸收测量仪测定骨密度。

1.6 其他

N 端 15 个氨基酸残基序列分析由北京大学生命科学学院完成。质谱分子量测定由军事医学科学院仪器测试分析中心完成。胰蛋白酶降解片段的质谱分析由仪器测试中心的蔡耘副研究员完成。

2 结果

2.1 表达载体构建

选择两种常见的不同诱导方式的载体 pBV220 和 pET22b 用于表达 hPTH。为了获得高表达, 采用大肠杆菌偏爱密码子, 并根据密码子的简并性在不改变氨基酸残基的基础上优化核酸序列, 消除不利于高表达的 mRNA 二级结构, 尤其是在起始密码子附近的区域。设计了如图 1 所示的 cDNA 序列, 分成 10 个片段 (每个片段 ≤ 60 mer) 人工合成拼接 (图 2)。由于拼接后片段两头分别有 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切位点的粘性末端, 可直接与双酶切的 pBV220 载体直接连接构成表达载体 pBV-hPTH, 经测序分析目的基因序列与所设计的序列完全一致。

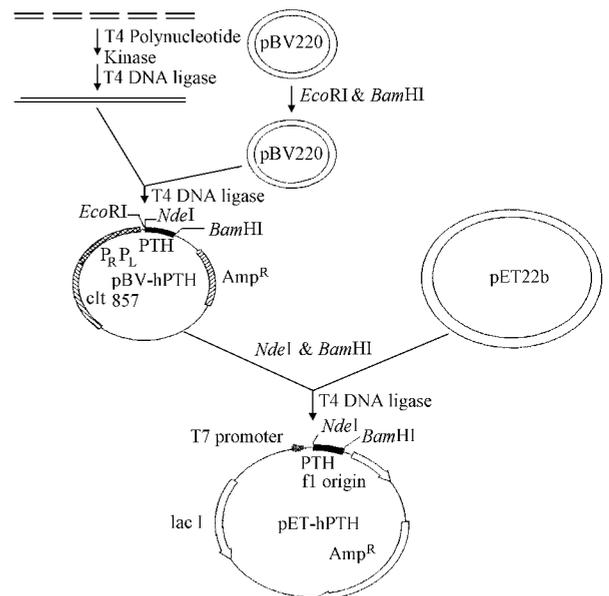


图 2 表达载体 pBV-hPTH 和 pET-hPTH 的构建

Fig. 2 Scheme for the construction of the expression vectors pBV-hPTH and pET-hPTH

在合成的 hPTH 基因序列中起始密码子前, 我们有意增加了一个 *Nde*I 酶切位点。这样可以通过

Nde I 和 *Eco*R I 双酶切将 hPTH 基因与质粒 pET22b 连接 构建第二个表达载体 pET-PTH。两种表达载体的酶切鉴定见图 3。

2.2 hPTH 的表达与纯化

重组 hPTH 在两种工程菌中均获得了高表达 (图略)。但 pET-PTH 载体的表达水平高于 pBV-PTH 载体。因此选择工程菌 *E. coli* BD-EP 用于发酵培养。在发酵罐中诱导 2~4 h hPTH 的表达水平可达到 30% 以上,见图 4。

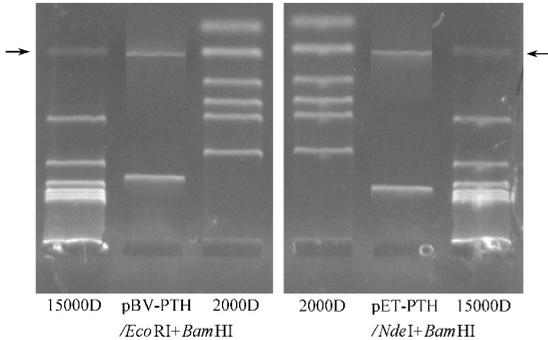


图 3 表达载体 pBV-PTH 及 pET-PTH 的限制酶分析

Fig.3 Restriction analysis of the expression vectors pBV-PTH and pET-PTH

DL 15 000. From top to bottom ,250 ,1000 ,2500 ,5000 ,7500 ,10 000 ,15 000bp ;DL 2000. From top to bottom ,100 ,250 ,500 ,750 ,1000 ,2000bp

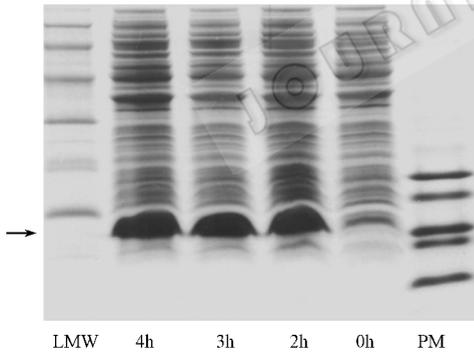


图 4 工程菌 *E. coli* BD-EP 表达 hPTH

Fig.4 SDS-PAGE analysis of recombinant hPTH expression LMW. From up to down ,97000 ,66000 ,45000 ,31000 ,20100 ,144 00dalton ;PM. From up to down ,16949 ,14404 ,10700 ,8159 ,6214dalton

菌体沉淀悬于破菌缓冲液中,破菌释放重组 hPTH,离心后目的产物位于上清中。上清用乙酸调 pH 值至 5,用纯水稀释 4 倍后,上 SP Sepharose FF 柱,进行盐浓度梯度洗脱,收集含重组 hPTH 的组份。合并后上 C18 柱,用含 0.1% TFA 的 25%~45% 乙腈进行梯度洗脱,合并含重组 hPTH 的组份,冷冻真空干燥,得到 hPTH 纯品。经 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 分析纯度大于 95%。图 5 为各纯化步骤

的 SDS-PAGE 分析。

2.3 重组 hPTH 的鉴定

N 端 15 个氨基酸残基测定结果依次为 :S、V、S、E、I、Q、L、M、H、N、L、G、K、H、L。表 1 为重组 hPTH 的质谱分析结果。表明该重组产物的 N 端无甲硫氨酸残基,也无乙酰化。

图 6 为体外腺苷酸环化酶刺激实验结果,说明所制备的重组 hPTH 的细胞活性与 Sigma 公司标准品相当。

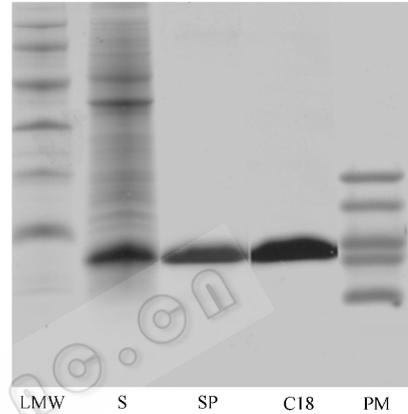


图 5 重组 hPTH 的纯化

Fig.5 SDS-PAGE analysis of recombinant hPTH purification LMW&PM. See fig.4 ;S, Supernatant after sonification ;SP, SP Sepharose FF

表 1 重组 hPTH 的质谱分析

Table 1 MALDI-TOF-MS analysis of recombinant hPTH

Residues	Molecular weight	
	<i>m/z</i>	
	observed	calculated
1-84	9422	9424.75
Trypsin digestion		
1-13	1454.73	1454.76
14-20	885.44	885.41
21-26	Not detected	
27-44	1945.14	1945.09
28-44	1817.02	1817.00
45-54	Not detected	
55-65	1297.64	1297.62
66-80	1558.82	1558.82
73-80	858.52	858.48
81-84	Not detected	

表 2 为动物实验结果,表明重组 hPTH 和 hPTH (1-34)(Sigma 公司产品)一样能增加去势大鼠的骨密度和骨质量。

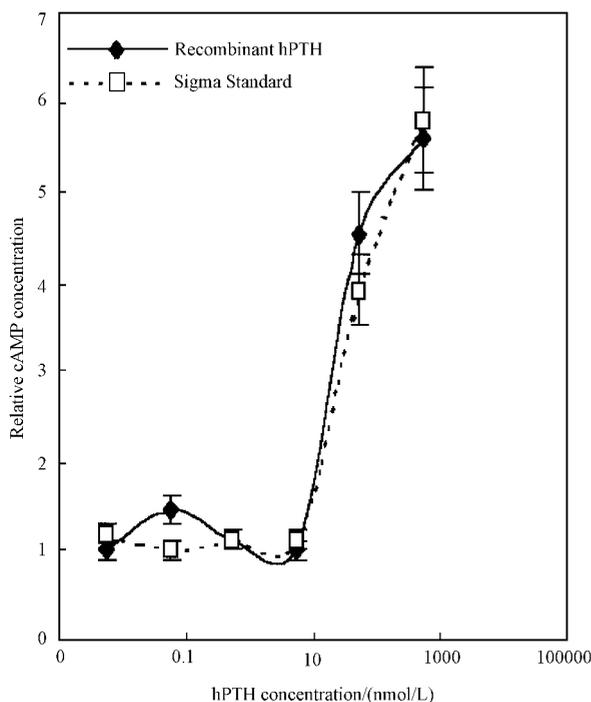


图 6 重组 hPTH 腺苷酸环化酶刺激实验

Fig. 6 Adenylate cyclase assay of recombinant hPTH (n = 3)

表 2 重组 hPTH 对去势大鼠股骨重量和骨密度的影响

Table 2 Effect of recombinant hPTH on femoral dry weight and bone mineral density in ovariectomized Wistar rats

Groups	Number of rats	Femoral dry weight ¹ /g	Bone mineral density ¹ (g/cm ²)
Normal control	10	0.830 ± 0.030	0.236 ± 0.02
Negative control	10	0.792 ± 0.047	0.201 ± 0.04
Recombinant hPTH			
10 μg/kg/d	10	0.869 ± 0.062**	0.213 ± 0.05*
30 μg/kg/d	10	0.883 ± 0.029***	0.219 ± 0.03***
90 μg/kg/d	10	0.959 ± 0.060***	0.234 ± 0.06***
Positive control			
hPTH(1-34) 30 μg/kg/d	8	0.901 ± 0.042***	0.228 ± 0.03**

1 Mean ± SE. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 versus negative control.

3 讨论

1981 年, Hendy 等^[1]首次报道了 hPTH 的基因序列, 推导出 PTH 的氨基酸序列, 纠正了以前报道中的个别错误, 从此推动了 PTH 的基因工程研究。由于其结构松散, 易被蛋白酶降解等, PTH 难以获得高表达。已有人证明直接将 hPTH 基因克隆在 pBV220

载体中, 在大肠杆菌内表达水平极低。现已知, 外源蛋白在大肠杆菌中的表达水平与多种因素有关, 如启动子和终止子的强弱、SD 序列、密码子的偏爱性、基因二级结构、宿主菌的遗传背景、培养条件等等。尤其是翻译起始区二级结构的稳定性直接影响提高翻译起始效率, 从而影响外源基因表达水平^[4]。为了获得 hPTH 在大肠杆菌中的高表达, 我们选择大肠杆菌偏爱密码子, 分段合成了全长 cDNA 序列, 并将其克隆到 pBV220 和 pET22b 载体上。在不改变氨基酸残基的条件下, 根据密码子的简并性, 调整翻译起始区的核苷酸序列, 优化其二级结构, 结果使 hPTH 在这两种表达载体中都获得了高表达。

在大肠杆菌细胞内表达的蛋白质其 N 端通常会有甲硫氨酸残基或其甲酰化形式 (fMet) 存在。但 N 端氨基酸测序及质谱分析均证明, 重组 hPTH 的 N 端第一个残基为 Ser。因为 Ser 的旋转半径小, 新生多肽链的第一个残基 fMet 能被有效切除^[5]。PTH 的 N 端完整性很重要, 无论多或少一个/几个残基都显著降低其生物活性^[6]。体外刺激腺苷酸环化酶活性试验和动物体内试验证明, 我们在大肠杆菌内表达的 hPTH 具有生物活性, 能够增加去势大鼠的骨质量和骨密度, 为大规模制备 hPTH 用于临床前和临床研究打下了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hendy G N, Kronenberg H M, Potts J T *et al*. Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(12): 7365 - 7369
- [2] Morley P, Whitfield J F, Willick G E. Parathyroid Hormone: An anabolic treatment for osteoporosis. *Current Pharmaceutical Design*, 2001, **7**(8): 671 - 687
- [3] Shigeno C, Yamamoto I, Kitamura N *et al*. Interaction of human parathyroid hormone-related peptide with parathyroid hormone receptors in clonal rat osteosarcoma cells. *J Biol Chem*, 1988, **263**(34): 18369 - 18377
- [4] de Smith M H, van Duin J. Translational initiation on structured messengers: another role for the Shine-Dalgarno interaction. *J Mol Biol*, 1994, **235**(1): 173 - 184
- [5] Hirel P H, Schmitter M J, Dessen P *et al*. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(21): 8247 - 8251
- [6] Rabbani S A, Yasuda T, Bennett H P J *et al*. Recombinant human parathyroid hormone synthesized in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1988, **263**(3): 1307 - 1313

High Expression and Characterization of Human Parathyroid Hormone in *Escherichia coli*

FANG Hong-Qing* DAI Hong-Mei LI Yan-Ying ZHAO Hong-Liang DENG Bing-Bing
XUE Chong LIU Zhi-Min ZHU Hou-Chu MA Qing-Jun CHEN Hui-Peng*
(*Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100071 ,China*)

Abstract Human parathyroid hormone(hPTH) was highly expressed in *Escherichia coli* by inserted the synthesized whole hPTH cDNA into the vectors pBV220 and pET22b. After expression and disruption ,the purified product was acquired through cation exchange chromatography and reverse phase chromatography . From the results of N-terminal sequencing and MALDI-TOF-MS analysis the recombinant prtein was indentified as intact hPTH. In *in vitro* Bioassays the recombinant hPTH stimulated adenylate cyclase as the standard did. In ovariectomized rats the recombinant hPTH markedly increased the femoral bone mass and bone mineral density.

Key words human parathyroid hormone , *Escherichia coli* , gene expression

Received : 07-19-2002

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China(863)(No. 2001AA215451-3).

* Corresponding author. Tel 86-10-66948801 ; Fax 86-10-63833521 ; E-mail : fanghongqing@hotmail.com