

## 人促红细胞生成素基因的合成 及在大肠杆菌中的表达

毛积芳\* 戴金凤 冯春婴 毛成健 陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

人促红细胞生成素(简称 hEPO)是一种能够促进祖红细胞分化发育并进而促进红细胞生成的细胞生长因子,它在临床上可用于治疗某些贫血病人特别是由于慢性肾衰所引起的肾性贫血<sup>[1-3]</sup>。hEPO 是一种由 166 个氨基酸组成的糖基化蛋白质,它的前体还带有 27 个氨基酸的信号肽<sup>[4-6]</sup>。有两对由 Cys7-Cys161 和 Cys29-Cys33 组成的二硫键,其糖基化位点为 Asn-24, Asn-38, Asn-83 和 Ser-126<sup>[7,8]</sup>。由于天然来源 hEPO 的量较少,因此通过基因工程的手段是当前获得大量 hEPO 的较好的途径<sup>[9,10]</sup>。

我们在前文中曾经报道用单链方法合成天花粉胰蛋白酶抑制剂基因<sup>[11]</sup>以及用单链和 PCR 相结合来合成绿豆胰蛋白酶抑制剂基因的方法<sup>[12]</sup>,我们在合成 hEPO 基因(包括带有信号肽的 hEPO 基因)时也采用了这两种方法。合成的 hEPO 基因在大肠杆菌、CHO 细胞和昆虫细胞中均得到表达。本文报道 hEPO 基因的合成及在大肠杆菌中的表达结果。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂与材料

1.1.1 寡聚 DNA 片段:采用亚磷酰胺法在 ABI 公司 381 型 DNA 自动合成仪上合成,所用的亚磷酰胺单体亦为 ABI 公司产品。

1.1.2 酶类:限制酶 EcoRI、BamHI、Pst I、Hind III 及 T4 DNA 连接酶均购自 Boehringer Mannheim 公司,Bst DNA 聚合酶为中国科学院生物化学研究所叶盛钰副教授赠送,FD-Taq DNA 聚合酶为复旦大学遗传研究所产品,T4 多核苷酸激酶为本实验室自己制备。

1.1.3 试剂:Yeast extract 和 Trypton 为 Oxoid 产品;X-gal、DTT 和 IPTG 为 Sigma 产品; $\gamma$ -p-ATP 为 Amersham 产品。

1.1.4 质粒:pUC18、pUC19、M13mp18 及 M13mp19 均购自华美生物工程公司。表达载体 pSB92-1 为本室构建。

#### 1.2 方法

1.2.1 寡聚 DNA 片段的纯化:合成的片段用浓氨水 55℃ 保温 16 小时后,冻干。用聚丙烯酰胺变性凝胶电泳纯化。纯化后的片段经 5' 末端<sup>32</sup>P 标记后再进一步用聚丙烯酰胺变性凝胶电泳鉴定亦为单一条带。

1.2.2 DNA 序列测定:按美国 USB 公司测序试剂盒所提供的方法进行。

1.2.3 聚合酶延伸法合成双链片段:取 3' 末端的供体片段以  $\gamma^{32}$ -P-ATP 标记 5' 端(一般为 10pmol),再按一定的比例将各个需要连接的片段混合,连接。连接产物经聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离并去盐后,

\* 西安第四军医大学。

本文于 1993 年 7 月 12 日收到。



图 1 合成 hEPO 基因的顺序  
合成序列上的核苷酸为天然顺序

取带有<sup>32</sup>P标记3'末端彼此互补的上下链片段,按同位素计数等量混合退火后,加酶延伸。取样进行聚丙烯酰胺变性凝胶电泳以检查双链合成效果。反应液经酚、氯仿抽提使酶变性失活,经70%乙醇沉淀后的产品即可用于以后的酶切和克隆。

1.2.4 PCR法合成双链片段:按一定的比例将各个需要连接的片段混合,连接。将反应液稀释后取作模板进行PCR反应。产物经琼脂糖凝胶电泳回收后可用于酶切和克隆。

1.2.5 基因操作:酶切、连接及克隆等一般方法均参照《Molecular Cloning》<sup>[11]</sup>一书。

## 2 实验与结果

### 2.1 合成基因顺序的设计

合成基因的顺序系根据天然cDNA的顺序进行的局部的简并密码子变换(见图1)。其目的有三:(1)改变一些在大肠杆菌表达中使用频率很低的密码子。如第110位Arg由CGG变为CGT。(2)为设置合适的酶切位点如第70—80位GlnAlaLeu的密码子由CAGGCCCTG变为CAAGCTTTA。(3)为消除一些对基因合成有干扰的互补顺序,合成基因包括带有信号肽的和不带信号肽的两种基因。前者从5'上游端EcoRI酶切位点和起始密码子ATG开始到3'下游端两个连续的终止密码子TGATAG和BamHI酶切位点共600个碱基对,后者除去信号肽的26个氨基酸密码子全长共517个碱基对。合成基因中设计了5个常用的单酶切位点,把整个基因分成4段即EcoRI→KpnI(含信号肽和不含信号肽),KpnI→HindⅢ,HindⅢ→PstI,PstI→BamHI,这4段基因分别以4个亚克隆克隆S或克隆N,克隆1,克隆2和克隆3进行合成。

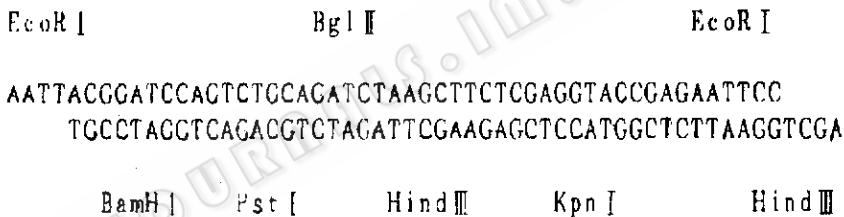


图2 克隆载体pUC-C<sub>0</sub>多克隆位点的顺序

### 2.2 基因合成的路线和方法

最近蔡英林等人报道了用传统的双链法合成hEPO基因的结果<sup>[12]</sup>。在我们的合成中,除亚克隆N是以合成53聚上链和45聚下链组合直接克隆入pUC-C<sub>123</sub>以得到pUC-EPO以外,其它4个亚克隆的双链基因片段都是以单链互补延伸和单链与PCR相结合的方法来合成的。为了使合成的各个亚克隆双链片段酶切后能在插入载体时同时实现基因拼接,我们按照hEPO基因中5个酶切位点的次序,设计了一个由两个51聚片段组成的多克隆位点双链(F5+F6),其顺序见图2。当它插入到pUC19的EcoRI-HindⅢ位点后,则消除了这两个位点而得到仅含有hEPO基因中5个对应酶切位点BamHI、PstI、HindⅢ、KpnI和EcoRI及一个筛选标记BglⅢ位点的克隆载体pUC-C<sub>0</sub>。

### 2.3 各个亚克隆双链片段的合成

2.3.1 片段的连接:各组连接反应所用片段的比例为:FC<sub>1</sub>上链,F<sub>16</sub>(52聚):F<sub>14</sub>(39聚):F<sub>17</sub>(14聚):F<sub>13</sub>(39聚):F<sub>15</sub>(14聚)=1:3:2:10:6;FC<sub>1</sub>下链,F<sub>18</sub>(48聚):F<sub>19</sub>(50聚):F<sub>20</sub>=1:3:2。FC<sub>2</sub>上链,F<sub>3</sub>(46聚):F<sub>4</sub>(42聚):F<sub>5</sub>(14聚)=1:3:2;FC<sub>2</sub>下链,F<sub>10</sub>(46聚):F<sub>11</sub>(47聚):F<sub>12</sub>(14聚)=1:3:2。FC<sub>3</sub>上链,F<sub>2</sub>(54聚):F<sub>1</sub>(53聚):F<sub>4</sub>(14聚)=1:3:2。FCS上链,F<sub>25</sub>(39聚):F<sub>24</sub>(39聚):F<sub>27</sub>(16聚):F<sub>21</sub>(27聚):F<sub>22</sub>(16聚)=1:3:2:10:6;FCS下链,F<sub>23</sub>(39聚):F<sub>26</sub>(24):F<sub>30</sub>(16聚)=1:3:2。

2.3.2 双链DNA片段的合成:用聚合酶延伸法合成了FC<sub>1</sub>、FC<sub>2</sub>和FC<sub>3</sub>,聚合产率约20%—30%。FC<sub>1</sub>、

FC<sub>2</sub>、FC<sub>3</sub> 和 FCS 均可由相应的片段通过 PCR 方法合成, 不过因连接片段的用量不同, 作为模板的量也随之不同; FC<sub>1</sub> 时为 0.15pmol, FC<sub>2</sub> 时为 0.81pmol, FC<sub>3</sub> 时为 1.5pmol, FCS 时为 0.13pmol。所有的 PCR 扩增产物走琼脂糖凝胶电泳均可见到清楚的条带 (图 3)。



图 3 PCR 产物的琼脂糖电泳

1. FC<sub>1</sub>, 2. FC<sub>2</sub>, 3. Marker  $\lambda$ , 4. FC<sub>3</sub>, 5. FCS

## 2.4 EPO 全基因的合成

**2.4.1 pUC-C<sub>123</sub>的构建:** 取等比例的 F<sub>5</sub> (51 聚) 和 F<sub>6</sub> (51 聚) 混合退火形成双链, 同经 EcoRI 和 Hind III 双酶切后的 pUC19 大片段用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 JM83, 经杂交及 DNA 序列分析获得阳性质粒 pUC-Co。将前述聚合酶延伸得到的 FC<sub>1</sub> 双链用 KpnI 和 Hind III 酶切后, 与经相同的酶切的 pUC-Co 大片段连接, 转化 JM83。挑选白色菌落筛选得到含有正确插入序列的质粒 pUC-C<sub>1</sub>, 将 FC<sub>2</sub> 和 FC<sub>3</sub> 依次以相应的酶酶切后插入 pUC-C<sub>1</sub>, pUC-C<sub>12</sub> 得到 pUC-C<sub>12</sub>, pUC-C<sub>123</sub>。以 PCR 方法得到的双链片段也可按上述方法得到 pUC-C<sub>123</sub>。

**2.4.2 pUC-EPO 的构建:** 取 F<sub>21</sub> (53 聚) 和 F<sub>22</sub> (45 聚) 退火后, 插入 pUC-C<sub>123</sub>, 经酶切及序列分析得到含正确 EPO 基因的质粒 pUC-EPO。

**2.4.3 带信号肽 hEPO 全基因 (pUC-EPO<sub>S</sub>) 的构建:** 将前述 PCR 扩增得到的 FCS 双链片段经

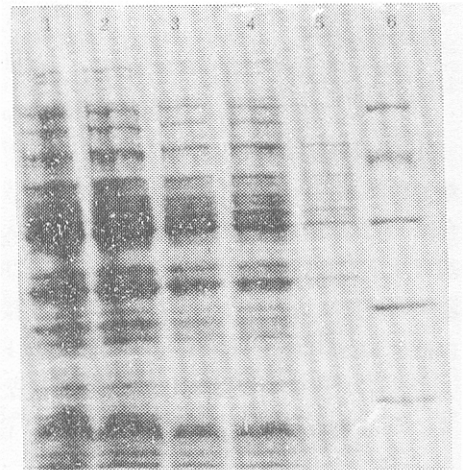


图 4 表达的 hEPO 蛋白的 SDS 电泳

1、2. pSB-EPO/DH5 $\alpha$  42 C 诱导 4 小时  
3、4. pSB-EPO/DH5 $\alpha$  42 C 诱导 2 小时  
5. pSB92-/DH5 $\alpha$  42 C 诱导 4 小时  
6. 低分子量标准蛋白

klcnw 酶补齐, 再用 EcoRI 酶切后, 插入经 SmaI 和 EcoRI 酶切的 pUC19 构建成 pUC-CS. 从 pUC-CS 中用 EcoRI 和 KpnI 切出 FCS, 插入 pUC-C<sub>1113</sub>, 经酶切鉴定筛选, 得到含有预期插入片段大小的阳性克隆株 pUC-EPOs, 经 DNA 序列测定证明序列正确。

2.4.4 hEPO 基因在大肠杆菌中的表达: 从 pUC-EPO 中用 EcoRI 和 BanHI 将 EPO 基因切出, 同 pSB92-1 经 EcoRI 和 BamHI 双酶切制备的大片段经 T4DNA 连接酶连接后, 转化 DH5 $\alpha$ . 抽提 DNA 再用 EcoRI+BamHI 双酶切鉴定插入基因片段的方法筛选克隆转化子, 得到重组体阳性克隆 pSB-EPO/DH5 $\alpha$ . 将 pSB-EPO/DH5 $\alpha$  接种于 3ml LB 培养液中 (含氨苄青霉素 100mg/L), 30 $^{\circ}$ C 过夜。次日以 1:100 接种于 5ml LB 中, 30 $^{\circ}$ C 培养至对数期, 升温至 42 $^{\circ}$ C 诱导 6 小时, 取样进行 SDS 电泳。可以在分子量大约为 18kDa 处清晰地看到 EPO 的表达条带 (图 4)。

### 参 考 文 献

- (1) Eehbach J W *et al.* Engl Med, 1987, 316, 73.
- (2) Winearls C G *et al.* J Biol Chem, 1986, 2: 1175.
- (3) Vapnick D *et al.* J Cell Biochemistry, suppl, 1989, 13 D: 18
- (4) Lai P H *et al.* J Biol Chem, 1986, 26: 3116.
- (5) Jacobs K *et al.* Nature, 1985, 313: 806.
- (6) Lin F K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 7580.
- (7) Imai N *et al.* J Biochemistry, 1990, 107: 352.
- (8) Lai P H *et al.* J Biol Chem, 1986, 26: 3116.
- (9) Takeuchi M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 7819.
- (10) Davis F M *et al.* Biochemistry, 1987, 26: 2633.
- (11) 干科达等. 生物工程杂志, 1991, 7: 41.
- (12) 陈常庆等. 生物工程学报, 1993, 9: 54.
- (13) Sambrook J *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Press New York, 1989.
- (14) 蔡英林等. 中国医学科学院学报, 1992, (3): 173.

## Synthesis of Human Erythropoietin Gene and Its Expression in *Escherichia coli*

Mao Jifang Dai Jinfeng Feng Chunyin Mao Chenjian Chen Changqing

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

**Abstract** This paper described the synthesis of human erythropoietin (hEPO) gene and its expression in *E. coli*. The hEPO gene was divided into four segments with the designed restriction sites. For the synthesis of each segment, two mutually primed single strands were extended by DNA polymerase or extended and amplified by PCR to form a double stranded DNA. After digestion of the double stranded DNA with restriction enzyme, each segment was sequentially cloned into pUC-C<sub>n</sub> plasmid to construct the whole gene. By this procedure, the hEPO gene with and without signal peptide (pUC-EPOs and pUC-EPO) were synthesized. The synthetic hEPO gene was expressed in *E. coli* under the control of P<sub>L</sub> promoter.