

人工合成的水蛭素基因在酵母中的表达

申同健 葛庆远 韩玉珉 王增丰

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

王启松

(复旦大学遗传研究所, 上海 200433)

摘 要

本文按水蛭素 HV2 的氨基酸序列, 设计并合成了水蛭素基因, 并在酵母 α 因子表达系统中表达. 通过诱变得到的稳定携带水蛭素表达质粒的酵母菌株, 在丰富培养基中培养 36—48 h 后, 可在培养液中测得 10—20 ATU/ml 的分泌的水蛭素表达产物. 经过较简单的纯化步骤, 得到 HPLC 纯的水蛭素, 其 N-端氨基酸序列与天然产物完全相同, 并有强烈的抗凝血和抑制凝血酶的活力. 从 500 ml 培养液中可得到约 3000 ATU 的纯水蛭素, 其比活力为 6600 ATU/mg.

关键词: 水蛭素, 基因合成, 酵母表达, 分泌

水蛭素是水蛭的唾液腺分泌的一种酸性多肽, 具有强烈的抗凝血作用. 1955 年 Markwardt 首先从欧洲医蛭中提纯了水蛭素^[1]. 天然水蛭素具有多种异构体, 均为 65 个或 66 个氨基酸组成, 彼此结构十分相似^[2]. 水蛭素能够与凝血酶形成摩尔比为 1:1 的稳定非共价结合物, 其抑制解离常数为 6.3×10^{-11} mol/L, 是已知最强有力的凝血酶天然抑制剂^[3].

水蛭素有多方面的医疗用途. 我国将水蛭入药已有悠久的历史. <本草纲目> 把它列为一种破血逐瘀药. 在欧洲, 水蛭亦被广泛地用于临床治疗. 近年来, 使用纯化的水蛭素进行了一系列的动物实验和若干临床实验, 结果表明水蛭素无毒性, 无明显抗原性, 在合理剂量范围内, 没有引起出血的危险; 作为抗凝剂, 它比肝素优越; 更重要的是, 它对于各种血栓疾病, 如冠状动脉血栓、静脉血栓以及弥散性血管内凝血等, 都有很好的治疗乃至预防效果. 因此, 它很有可能成为一个防治血栓疾病的新一类药物^[4].

由于水蛭素的天然来源有限, 用基因工程方法制造水蛭素得到普遍的重视. 1986 年, 国外几个实验室先后报道了在大肠杆菌及酵母胞内表达水蛭素的结果^[5-7]. Loison 等^[8] 用酵母 α

因子系统得到了分泌到胞外的水蛭素表达产物。本文叙述我们应用本实验室构建的 α 因子系统及诱变的酵母菌株表达人工合成的水蛭素基因,在丰富培养基中得到分泌到胞外的、具有强烈抗凝血活力的水蛭素表达产物。

一、材 料 与 方 法

1. 实验材料 各种工具酶及DNA序列分析引物均购自New England Biolabs公司。核苷酸亚磷酸胺底物购自Applied Biosystems公司。酵母培养基成分购自Difco公司。Chromozym TH和凝血酶购自Boehringer公司。天然水蛭素及亚硝基胍购自Sigma公司。同位素底物购自Amersham或New England Nuclear公司。其它试剂均为国产分析纯。

质粒pYA2及pYA2C为本实验室构建^[9]。面包酵母BJ-1995-SC株(α , Leu2, trp1, ura3, prb1, pep4, gal2, sec)系本实验室在原株基础上选得^[10]。其它质粒及菌株由本实验室提供。

2. 分子克隆方法 质粒提取、限制酶酶解、DNA聚合酶大片段、 T_4 多核苷酸激酶和 T_4 连接酶反应、DNA琼脂糖凝胶电泳、DNA片段纯化、大肠杆菌转化、菌落杂交和重组子筛选等均参照文献[11]方法。DNA序列分析基本上按照Sanger方法^[12]。

3. 寡核苷酸合成 组成水蛭素基因的寡核苷酸片段(链长35—40)系用固相亚磷酸胺法在381A型DNA合成仪(Applied Biosystem公司)上合成。产物用浓氨水于55°C保温处理过夜,待冷却后令氨挥发,冻干,溶于饱和尿素溶液,用16%聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。产物区带切下后,放入0.5 mol/L NaCl中在37°C浸泡过夜,加在Sep-Pak C-18柱上,用水洗去盐,用60%甲醇将寡核苷酸洗脱,冷冻离心干燥。用 T_4 多核苷酸激酶及 γ - $[^{32}P]$ -ATP标记5'端,电泳检查均为单一区带。

4. 水蛭素基因的合成 取除H1及h7以外的各寡聚核苷酸片段(图1)1 nmol,用 T_4 多核苷酸激酶将5'末端磷酸化,再与H1及h7片段各1 nmol混合,加入NaCl至0.5 mol/L,85°C保温15 min,然后缓缓冷却至室温。将此退火混合物用乙醇沉淀去盐,加入 T_4 DNA连接酶于12°C连接过夜。经5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化得到240 bp的连接产物,溶于TE缓冲液(10 mmol/L tris-HCl pH7.5, 1 mmol/L EDTA)备用。

5. 酵母菌的转化 基本按照Ito等的方法^[13]做以下改变:酵母菌体在YEPA培养基中培养至对数早期收集。处理至热休克一步后,将菌体在ura⁻-YNBG液体培养基中于30°C保温30 min,再涂布到同样成分的平皿上于30°C培养2—3天。

6. 酵母菌的诱变 (1)紫外线诱变:将对数期的酵母培养液2 ml铺在 $\Phi 9$ 平皿上,距25 W紫外灭菌灯管20 cm处照射4 min。(2)化学诱变:将对数后期的酵母菌液与亚硝基胍溶液混合至亚硝基胍浓度为0.5 mg/ml,于30°C保温20—30 min。离心洗涤菌体两次后,涂布在含有10 mmol/L 5FU的YEPA培养基平皿上^[14]。存活率约为 10^{-6} 。

7. 水蛭素的测定 水蛭素抑制凝血酶活力的测定按Chang等采用的以Chromozym TH为底物的比色方法^[3]。水蛭素抗凝血活力(生物活力)的测定参照Markwardt方法^[15],用大鼠血浆(心脏取血或断头取血)加入水蛭素表达产物后,用纯凝血酶滴定,以已知活力单位的天然水蛭素样品作为标准对照。每消耗1 NIH单位凝血酶定为1个抗凝血单位(1 ATU)。

8. 水蛭素的纯化 培养液中的水蛭素产物按以下方法纯化:500 ml培养液离心除去酵母细胞,向上清液中加入 $(NH_4)_2SO_4$ 至70%饱和度,离心收集沉淀,溶于1 ml 0.02 mol/L

tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液, 通过 Sephadex G50 柱 (1.5×60 cm), 取排出体积部分, 加至 DEAE-Sephadex A25 柱 (1.5×30 cm, 预用 0.02 mol/L tris-HCl pH7.5 缓冲液平衡), 并用 240 ml $0 - 1$ mol/L NaCl 直线梯度 (在 0.02 mol/L tris-HCl pH7.5 缓冲液中) 洗脱, 在约 0.6 mol/L NaCl 处将水蛭素活力峰收集, 冻干后, 溶于 $0.2 - 0.3$ ml 水, 分 $2 - 3$ 次用 ODS 柱纯化. Ultrashere-ODS 柱 (4.6×250 mm, Beckman 334 型 HPLC) 预用甲醇处理, 上样量为 0.1 ml, 用 20 ml $0 - 60\%$ 乙腈 (在 0.1% TFA 中) 直线梯度洗脱 (流速 0.5 ml/min), 收集水蛭素活力峰 (约 20 min 处), 反复冻干除去乙腈, 即为纯化的水蛭素.

```

<----- H1 ----->
A GCT TTA AAA CCA GGT CAA CCA ATG TAC AAG AGA
  AAT TTT GGT CCA GTT GGT TAC ATG TTC TCT
<----- h1 ----->
HindIII

><----- H2 ----->
ATC ACT TAT ACT GAC TGC ACT GAA TCT GGC CAA AAC TTG TGT TTG
TAG TGA ATA TGA CTG ACG TGA CTT AGA CCG GTT TTG AAC ACA AAC
><----- h2 ----->
Ball
ile thr tyr thr asp cys thr glu ser gly gln asn leu cys leu

----- H3 -----><----- H4 -----
TGT GAA GGT TCT AAC GTT TGT GGT AAG GGT AAC AAG TGT ATC TTG
ACA CIT CCA AGA TTG CAA ACA CCA TTC CCA TTG TTC ACA TAG AAC
----- h3 -----><----- h4 -----
cys glu gly ser asn val cys gly lys gly asn lys cys ile leu

><----- H5 ----->
GGT TCT AAC GGT AAG GGT AAC CAA TGT GTC ACT GGT GAA GGC ACT
CCA AGA TTG CCA TTC CCA TTG GTT ACA CAG TGA CCA CTT CCG TGA
><----- h5 ----->
gly ser asn gly lys gly asn gln cys val thr gly glu gly thr

----- H6 -----><-----
CCA AAC CCA GAG TCT CAC AAC AAC GGT GAC TTC GAA GAA ATT CCA
GGT TTG GGT CTC AGA GTG TTG TTG CCA CTG AAG CTT CTT TAA GGT
><----- h6 ----->
pro asn pro glu ser his asn asn gly asp phe glu glu ile pro

----- H7 ----->
GAA GAA TAC TTG CAA TAA GTC GAC GGT AC
CTT CTT ATG AAC GTT ATT CAG CTG C
----- h7 ----->
Sall KpnI
glu glu tyr leu gln stop

```

图 1 水蛭素基因的合成

二、结 果

1. 水蛭素基因的全合成 根据已知的水蛭素 HV2 氨基酸序列^[5] 以及酵母基因的常用编码设计了水蛭素基因的核苷酸顺序. 在其 5' 端 HindIII 位点后面增加了 30 bp 的与酵母 α 因子引导肽编码相衔接的顺序, 以利于在酵母 α 因子表达载体中表达加工. 在其 3' 端终止码后增加了 Sall 及 KpnI 位点, 以便于插入不同的表达载体^[9]. 全基因共 239 bp, 分为 7 段 14 个寡核苷酸合成 (图 1). 各片段混合退火拼接, 得的全长基因克隆入 pUC18 质粒, 测序鉴定. 全序列测定结果与设计完全符合.

2. 水蛭素基因的酵母表达载体的构建 质粒 pYA2C 系酵母 α 因子表达载体 pYA2

与细胞色素 C 编码及 3' 终止顺序构成. 通过 HindIII 及 KpnI 处理将细胞色素 C 编码部分除去, 换以上述合成的全长水蛭素基因, 即构成由 α 因子表达顺序(5' 调控区、启动子和引导肽编码) — 水蛭素基因 — 细胞色素 C 3' 端终止顺序串连而成的水蛭素表达单元. 将此表达单元(1.1 kb) 用 BamHI 切出, 放入大肠杆菌-酵母穿梭质粒 pJH158 中, 即构成水蛭素基因的表达载体 pJY-HI(图 2).

3. 表达水蛭素的酵母菌株的诱变 将上述水蛭素的表达质粒 pJY-HI 转化酵母 BJ-1995-SC 株, 得到的转化子在 ura^- -YNBG 培养基平皿上传代纯化后, 经紫外诱变及亚硝基胍诱变处理, 在 5FU-YEPD 培养基上初筛, 并逐一测定其水蛭素分泌活力. 选择 48 h 分泌水蛭素超过 5ATU/ml 的菌株, 重复诱变处理, 并在 YEPD 及 ura^- -YNBG 培养基上传代测定菌株内质粒稳定性, 选择质粒完全稳定的菌株再进行诱变处理, 最后选得一株能在丰富培养基上稳定地保存质粒、水蛭素的分泌产量达 20ATU/ml 的酵母菌株 BJ-1995-SC-HF.

4. 水蛭素表达产物的分泌情况及产量

上述突变株 BJ-1995-SC-HF 在 50 ml 及 250 ml 三角瓶(各含 YEPD 培养基 15 ml 及 50 ml) 于 30°C 在旋转摇床上培养 36—48 h (120—150 r/min), 培养液中可测得水蛭素活力为 10—20 ATU/ml. 与此同时, 离心得到的酵母菌体经机械或酶法破碎后, 却不能测出水蛭素活力, 可见绝大部分水蛭素表达产物已被分泌到培养液中.

5. 水蛭素表达产物的纯化和鉴定 在 250 ml 三角瓶规模增养的酵母培养液 500 ml, 经 Sephadex G50, DEAE-Sephadex A25 及 DOS 柱纯化后, 可得纯化水蛭素 300 ATU

左右(约 0.45 mg). 纯化水蛭素经 HPLC 分析为单一峰(图 3). 纯化水蛭素经氨基酸序列分析测定(470 A 型氨基酸序列仪, Applied Biosystems 公司产品)其 N 端 14 个氨基酸为 ile-thr-tyr-thr-asp-(cys)-thr-glu-ser-gly-gln-asn-leu-(cys), 与预期顺序完全符合(cys 在测定中被破坏). 纯化水蛭素显示强烈的抗凝血酶活力, 其抑制—剂量曲线见图 4, 与天然水蛭素相似^[7].

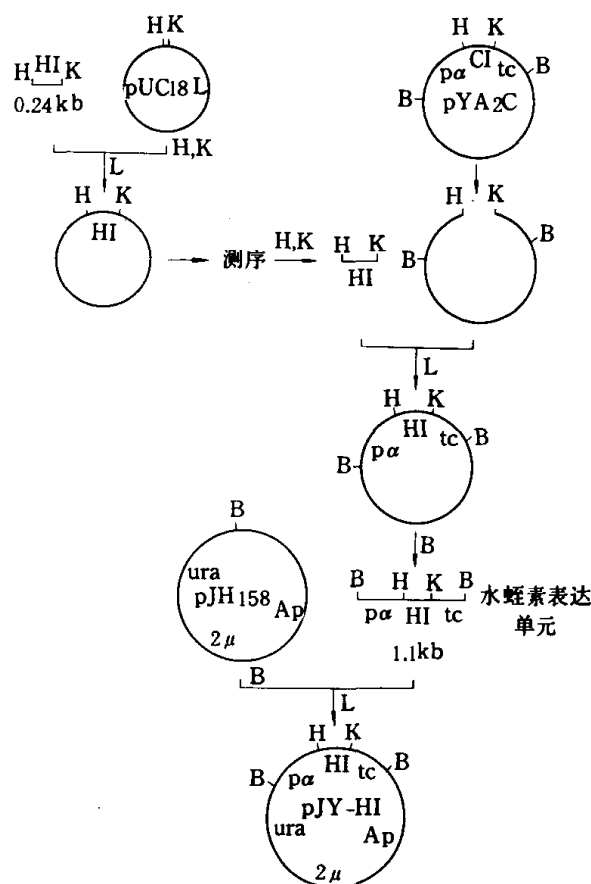


图2 水蛭素酵母表达载体的构建

(HI —— 合成水蛭素基因, cI —— 细胞色素 C 编码, $p\alpha$ 因子调控区、启动子及引导肽编码, tc —— 细胞色素 C 3' 终止顺序. H, K, B, L 分别代表 HindIII, KpnI, BamHI 及 T₄ DNA 连接酶)

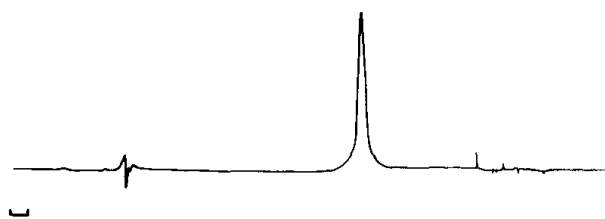


图3 纯化水蛭素表达产物的 HPLC 图谱
(层析条件见“材料和方法”, 描记为 230 nm 处光吸收.
线段相当 1 min (0.5 ml))

纯化水蛭素对血液有强烈的抗凝作用,根据滴定方法测得其抗凝血比活力为 6600 ATU/mg.

三、讨 论

我们按照水蛭素异构体 HV2 的氨基酸序列,参照酵母最适编码,设计了全部水蛭素基因的顺序,合成的基因在酵母中得到良好的表达.

为了得到高抗凝血活力的水蛭素表达产物,保持天然的 N 末端顺序是极其重要的^[8]. 为此我们在合成水蛭素基因的 5' 端设计了与天然酵母 α 因子肽 C 端编码相似的引导肽末端顺序以及酵母胞内蛋白酶 yscF 作用位点顺序的编码(图 5). 通过对表达产物 N 端氨基酸序列检测证实,它与天然水蛭素完全相同,达到了我们的预期目的. 这一结果说明了我们所设计的引导肽末端顺序及蛋白作用位点确实被酵母胞内蛋白酶正确地识别及有效地加工. 因此,这一顺序可以应用于利用 α 因子系统表达其它要求正确的天然 N 端结构蛋白质的场合.

酵母表达系统中的一个重要问题是质粒的稳定性问题. 营养缺陷型酵母菌株,常因发生回复突变而使体内具有氨基酸或核苷标记(如 leu, trp, his, ura 等)的质粒在传代途中丢失,导致在这些质粒上携带的外源基因表达产物产量急剧下降. 在这种情况下,即使使用昂贵的合成培养基也不能维持质粒的稳定. 我们通过反复常规诱变结合

5FU 压力下的选择,有效地封锁了酵母菌株 ura 途径相关的回复突变^[14],使得表达质粒 pJY-HI 在突变株 BJ-1995-SC-HF 中的稳定性大大提高,甚至在 YEPD 丰富培养基中传代亦不丢失,这一处理基本上解决了酵母质粒的稳定性问题,从而保证了水蛭素的较高的表达.

α 因子

TGG CAT TGG TTG CAA CTA AAA CCT GGC CAA CCA ATG TAC AAG AGA
trp his trp leu gln leu lys pro gly gln pro met tyr lys arg
* **

合成水蛭素基因

A GCT TTA AAA CCA GGT CAA CCA ATG TAC AAG AGA
ala leu lys pro gly gln pro met tyr lys arg
* **

图 5 合成水蛭素基因 5' 端的引导肽末端顺序与酵母 α 因子肽顺序比较

(上排: 酵母 α 因子肽编码及氨基酸顺序, 下排: 合成水蛭素基因 5' 端核苷酸及对应氨基酸顺序.

* —— 酵母羧肽酶作用位点, ** —— 酵母 yscF 蛋白酶作用位点)

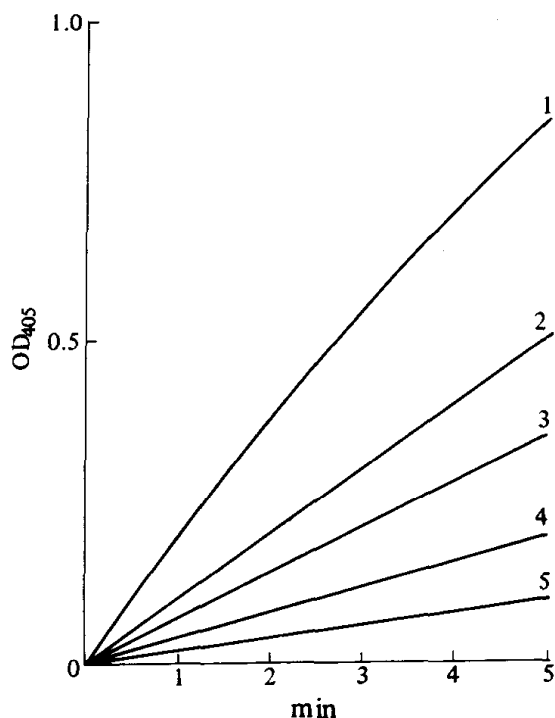


图 4 水蛭素表达产物对凝血酶的抑制
(按 Chang 氏方法^[3], 水蛭素加量为 1 —— 0 μ g, 2 —— 0.02 μ g, 3 —— 0.05 μ g, 4 —— 0.5 μ g, 5 —— 1 μ g)

酵母表达系统中另一个常见的问题是菌体的不易破碎,因此某些胞内表达系统中虽然产量很高,但很难用于制备。 α 因子表达系统能将多种表达产物分泌到酵母胞外^[10],对水蛭素的分泌效率虽无精确测定但估计超过 90%,这一高效率的分泌使我们可以比较简单的纯化步骤得到高纯度的水蛭素产物。

我们目前提纯的水蛭素,表现明显的抑制凝血酶的活力和抗血液凝固的活力,惟其比活力为 6600ATU/mg,比天然水蛭素 13000—14000ATU/mg 为低。一个可能的原因是我们得到的水蛭素表达产物没有任何修饰,其 63 位 tyr 残基处于游离状态,而天然水蛭素的 63 位 tyr 是高度硫酸酯化的,因此二者对凝血酶的抑制强度有所不同^[12]。另一个可能的原因是我们的水蛭素制品在纯化过程中有部分失活,有待于进一步研究。

由于培养条件的限制,本文的表达实验均为小规模摇瓶培养,酵母生长远远未达到最佳水平。按活力测定估计,目前培养液中水蛭素的产量约为 3 mg/L。预计在改善培养条件后,其产量将进一步提高。

参 考 文 献

- [1] Markwardt, F., *Naturwiss.*, **41**(1955), 537—538.
- [2] Dodt, J. et al., *FEBS Lett.*, **165**(1984), 180—184.
- [3] Chang, J.-Y., *ibid.*, **164**(1983), 307—313.
- [4] Kaiser, B. et al., *Folia Haematol.*, **155**(1988), 41—118.
- [5] Harvey, K. P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**(1986), 1084—1288.
- [6] Bergmann, C. et al., *J. Biol. Chem.*, **369**(1986), 731—740.
- [7] Fortkamp, E. et al., *DNA*, **5**(1986), 511—517.
- [8] Loison, G. et al., *Biotechnol.*, **6**(1988), 72—77.
- [9] 申同健等, 生物化学杂志, **3**(1987), 55—58.
- [10] 申同健、剧冬红, 科学通报, **35**(1990), 296—299.
- [11] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
- [12] Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**(1977), 5463—5467.
- [13] Ito, H. et al., *J. Bacteriol.*, **153**(1983), 163—168.
- [14] Loison G. et al., *Biotechnol.*, **4**(1986), 433—437.
- [15] Markwardt, F., *Methods in Enzymology*, **19**(1970), 924—932.