中 国 科 学
1983 年 10 月　　B 辑　　第 10 期

化学合成的亮氨酸脑啡肽基因在大肠杆菌中的克隆和表达

敖世洲　梁镇和　汤锦炎　周晓雄
丁晓华　陈常庆　李载平
（中国科学院上海生物化学研究所）

摘　　要

化学合成的亮氨酸脑啡肽（LEK）基因与质粒 pBR322 重组，转化大肠杆菌，经过原位杂交筛选，限制性图谱分析和 Southern 杂交鉴定，获得一批 LEK 基因重组体．插入乳糖操纵子（lac）启动基因控制 LEK 基因的表达．一个 lac 转录方向和 LEK 基因转录方向相同的表达质粒，pLE103，能在大肠杆菌中产生 LEK．用放射免疫分析方法检测，LEK 的产量可达每毫克细菌蛋白 426 毫微克．

前文报道了亮氨酸脑啡肽（LEK）基因的化学合成[1]．本文报告 LEK 基因在大肠杆菌中的克隆和表达．苏联 Shemyakin 等人[2]曾报道类似工作，但是我们对重组体的组建采用了不同的途径．用乳糖操纵子（lac）的表达调控系统控制 LEK 基因的表达，使大肠杆菌能够产生较高水平的亮氨酸脑啡肽．

一、材料和方法

1. 质粒 DNA　载体 pBR322 由本所徐有成同志提供；其他重组质粒均按以前报道的方法[3]制备．

2. 酶制剂及其反应条件　限制性内切酶 EcoR1，Bam H1，HindIII 及 T4 DNA 连接酶由本所冯宗铭、朱绳祖、陆惠芬等同志提供；酶反应条件见以前工作[4]．多核苷酸激酶由中国科学院生物物理所生产；反应条件见前文[1]．碱性磷酸酯酶由中国科学院上海细胞生物学所提供；反应条件参见 Bano 和 Feix 方法[5]．

3. 细胞转化和平板筛选　用大肠杆菌 C600 或 MC106 作受体菌，按照 Cohen 等人方法[6]转化．根据不同情况在含氨基苄青霉素（Ap 50 微克/毫升），或加有 5-溴-4氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷（Xgal 40 微克/毫升）的营养琼脂平板上筛选．

4. 分子杂交实验　菌落的原位杂交按 Grunstein 和 Hogness 程序[7]处理，DNA 片段的墨迹转移杂交按 Southern 方法[8]进行．探针为用 [γ-^{32}P]ATP，末端标记合成 F2 片段（^{32}pTATGGTGGTTTCCTCTAG）[1]．用 Denhardt 溶液[9]杂交，37℃，20 小时．用含 0.5% SDS 的

本文 1982 年 8 月 25 日收到．

2XSSC 37℃ 洗 3 次，每次 1 小时．X 光片曝光 48 小时．

5. 凝胶电泳条件　0.7% 琼脂糖[4]和 20%聚丙烯酰胺[1]凝胶电泳按以前方法进行．

6. 脑啡肽的放射免疫分析方法　LEK 放射免疫测定的药箱由上海高血压病研究所供应．其中包括：^{125}I-LEK，非标记的 LEK 标准样品，兔抗 LEK 血清，正常兔血清，羊抗兔丙种球蛋白及 PELH 稀释液．参考陆以信等人方法[10]，并略加改进．

竞争性抑制标准曲线的实验在 Eppendorf 离心管中进行．各标准曲线管 (St) 中加入：(1) PELH 缓冲液；(2) 标准品 LEK6.25—400pg/管；(3) ^{125}I-LEK 约 6,000—8,000 cpm/管；(4) 兔抗 LEK 血清，使最终工作浓度 1:20,000；总反应体积为 350 微升．非特异性结合对照管 (c) 中不加抗血清和标准 LEK．另制备仅仅加入 ^{125}I-LEK 的总计数管 (T)．均做复管．St 及 C 在冰浴中反应 10 小时后加入 1:12 稀释的正常兔血清 15 微升及定量的羊抗兔丙种球蛋白 (20 微升)．继续反应 2.5 小时，8,000rpm 离心 5 分钟．尽可能移去上清液，沉淀用单道 γ 谱仪测定 cpm．计算每管的 ^{125}I-LEK 结合 (Bi/T)%，其中 Bi = Sti − C 以 (Bi/T/Bo/T) 对加入的 LEK 量或其对数作竞争抑制曲线图．

生长对数期的菌液 5 毫升，离心收集菌体，悬于 1 毫升 70%甲酸含 CNBr 5 毫克，室温黑暗中反应 24 小时[11]．加 5 倍体积的水，冰冻抽干除去甲酸，pH 近中性，残留物溶于 2 毫升 PELH 缓冲液内．样品的测定同前述竞争抑制方法，以细菌裂解液代替标准品 LEK．算出 (Bi/T)% 值，在竞争抑制标准曲线上求得 LEK 的 pg 数．

7. 细菌蛋白的测定　用于 LEK 放射免疫分析的同样菌液，离心收集菌体，用生理盐水洗 3 次，悬于一定体积的生理盐水中，用 Folin 酚试剂按 Lowry 方法[12]测定总蛋白量，以牛血清白蛋白作标准曲线．

二、结果和讨论

图 1 总结了 LEK 基因片段的连接和重组质粒的构建．前文[1]已报道，合成的 LEK 基因在 5′端带有 EcoR1 粘性末端，在 3′端有 Bam H1 粘性末端．质粒 pBR322 经 EcoR1 和 Bam H1 双酶作用，用 Sepharose-2B 柱分离其中的大片段作为克隆载体．取 5 pmoles LEK 基因经多核苷酸激酶作用使 5′端磷酸化，与 0.5 pmoles 载体在 T4 DNA 连接酶作用下连接之，构成重组体 pEK，将此重组体引入大肠杆菌 C600 中，在含 Ap (50 毫微克/毫升)营养琼脂平板上获得一批转化体．按 Grunstein 和 Hogness 程序[7]作菌落原位杂交筛选，同时分离部分转化体的质粒 DNA，进行 Southern 转移[8]，对重组体作进一步鉴定．图 2 为几株 LEK 基因重组体和载体 pBR322 的琼脂糖凝胶电泳及 Southern 转移杂交图．可以看出除了 pBR322 以外，其他 LEK 基因重组体 pEK 5，6，7，9 和 10 都能与 5′-^{32}p 标记的 LEK 基因 18 核苷酸片段 (F2)[1] 杂交．pEK5与其他重组体比较，其电泳迁移速度较慢，相当于其他重组体的二聚体．

从所获得的 LEK 基因重组体中，我们对两个不同类型的重组体 pEK5 和 pEK10 作进一步鉴定．将 pEK5 和 pEK10 DNA 分别经 EcoR1 和 Bam H1 单酶或双酶作用，作琼脂糖凝胶电泳和 Southern 转移杂交．图 3 结果显示，pEK5 (A 和 B) 分别经 EcoR1 (b) 和 Bam H1 (d) 作用后形成线状单体，在凝胶电泳 (A) 上它们的迁移速度与二聚体的闭环 (CCC) 分子 (a) 相近．经 EcoR1 和 Bam H1 双酶作用 (c)，切去 26 bp LEK 基因，电泳迁移速度变

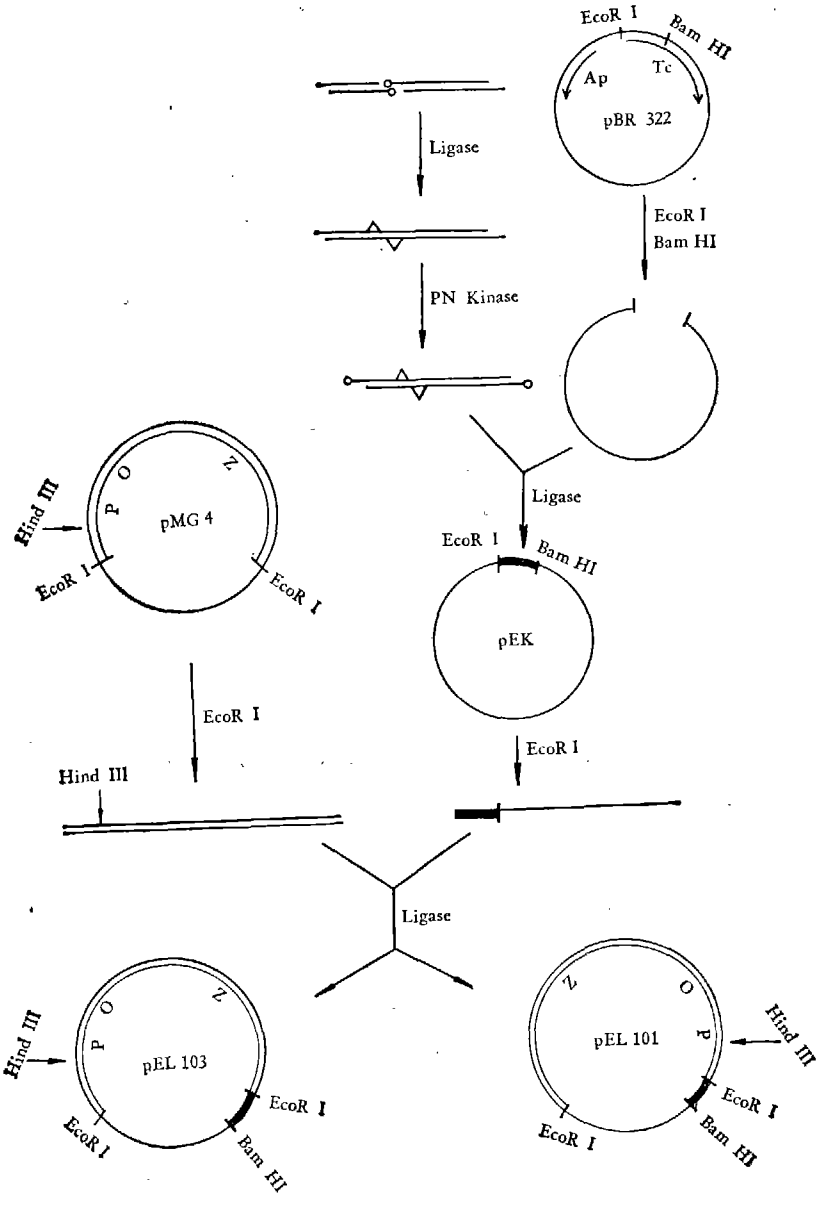


图 1 LEK 基因片段的连接和重组质粒的构建

化不大. 但 Southern 杂交图 (B) 显示, 经 EcoR1 和 Bam H1 双酶作用切去 LEK 基因, 就不再与 $5'^{-32}$ p-F2 探针杂交. pEK10 (C 和 D) 经 EcoR1 和 Bam H1 作用也给出同样的结果,只是被酶作用形成的线形分子较 CCC 分子的电泳迁移速度为慢.

在上述琼脂糖凝胶电泳中,由于 LEK 基因只有 26 bp, 无法观察. 我们又作了 20% 聚丙烯酰胺凝胶 (7*M* 尿素)电泳. pEK5 和 pEK10 经 EcoR1 和 Bam H1 作用后,先用磷酸酯酶处理,再用 [γ-^{32}P]ATP 标记5′端. 图 4 为 20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳放射自显影图. 结果显示, pEK5 (II) 和 pEK10 (III) 在 EcoR1 和 Bam H1 作用下, 都能切出 26 核苷酸的片段,

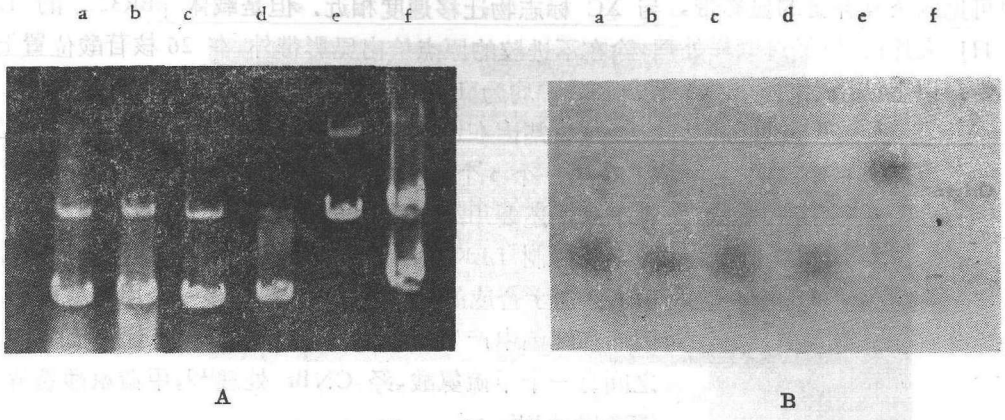


图 2　重组质粒的鉴定

A. 重组质粒 pEK 5, 6, 7, 9 和 10 的琼脂糖凝胶电泳
B. Southern 杂交图. 用 5′ $^{32}p - F_2(^{32}pTATGGTGGTTTCCTCTAG)$[11] 作探针.
a. pEk10, b. pEK 9, c. pEK7, d. pEK6 e. pEK 5, f. pBR 322

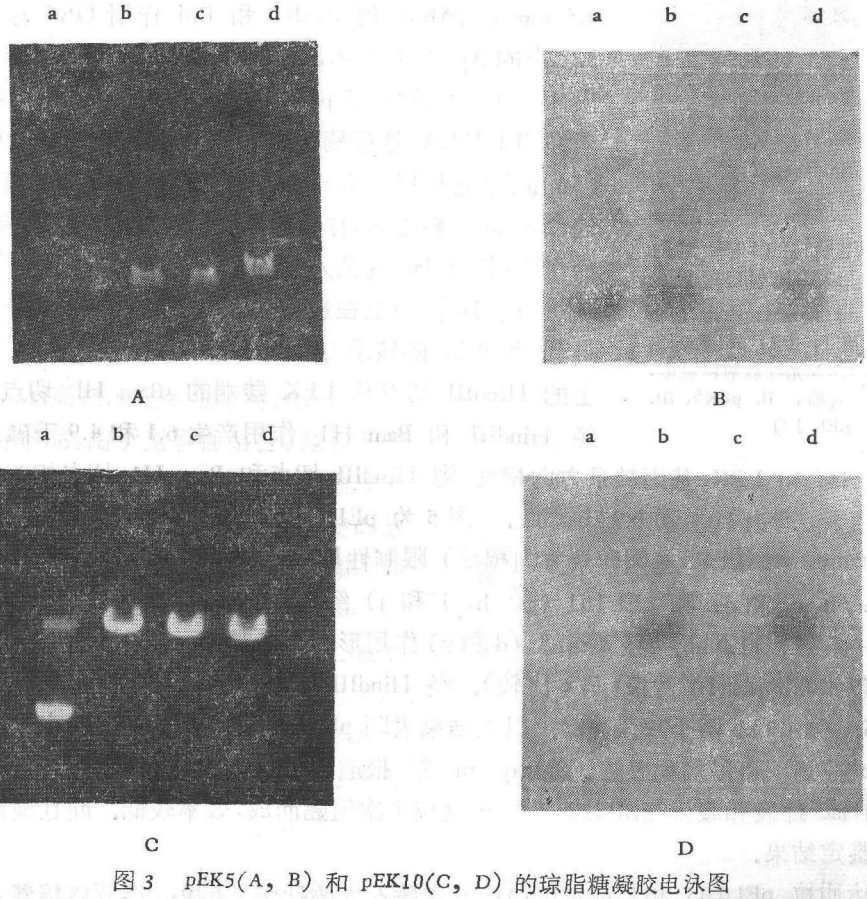


图 3　pEK5(A, B) 和 pEK10(C, D) 的琼脂糖凝胶电泳图
(A, C) 和 Sonthern 杂交图 (B, D)
(a.……, b. EcoR1, c. EcoR1 + Bam H1, d. Bam H1)

图中可见两条互补链的显影带，与 XC 标志物迁移速度相近．但是载体 pBR322 的 EcoR1-Bam H1 大片段(I)经过同样处理，除在不进胶的原点给出显影带外，在 26 核苷酸位置上没有显影带．以上结果表明，pEK5 和 pEK10 均为 LEK 基因的重组体．

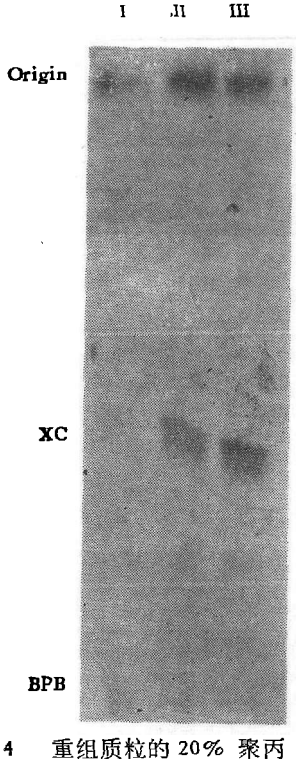


图 4 重组质粒的 20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳放射自显影图
(经 EcoR1 和 BamH1 作用，磷酸酯酶处理，用 [γ-^{32}P] ATP 标记 5′端，电泳后作X光片放射自显影．I. pBR 322 对照，II. pEK5，III. pEK 10)

真核基因在原核细胞中表达，都需要原核启动基因控制．LEK 是一个 5 个氨基酸的小肽，要能在细菌中表达后稳定保存下来，还要用细菌的肽段进行保护[13]．我们用 lac 表达调控系统控制 LEK 基因的表达，以 β-半乳糖苷酶的肽段保护 LEK．由于合成的 LEK 基因氨基端多一个甲硫氨酸的密码，因而在细菌中产生的杂合多肽，β-半乳糖苷酶肽段和 LEK 之间有一个甲硫氨酸，经 CNBr 处理[11]，甲硫氨酸裂解，即可游离出 LEK．

pMG4 为 lac 片段和 pBR322 的重组体[4]，用 EcoR1 可以将 lac 片段切出，然后通过 pEK10 的 EcoR1 切点，可将 lac 片段插入 pEK10．如图 1 所示，lac 插入 pEK10 时可能有 lac 转录方向与 LEK 基因相同和相反的两种方向．取 0.5 pmoles pMG4 用 EcoR1 和 Pstl 作用 (Pstl 作用使 pBR-322 上的 Ap^r 基因破坏，可减少 pBR322 给出的转化体)，切出 lac 片段；另取 0.5 pmoles pEK10，用 EcoR1 切开，将两者经 T4 DNA 连接酶作用后转化大肠杆菌 C600，在含 Ap (50 微克/毫升)和 Xgal (40 微克/毫升) 营养琼脂平板上筛选 Ap^r lac^+ 转化体，作重组质粒 DNA 分离，经限制性内切酶作用，鉴定 lac 的插入方向．

由于 lac 片段上在启动基因 (P) 的外侧有一个 HindIII 切点[14]，如果 lac 的转录方向与 LEK 基因转录方向一致，则 lac 上的 HindIII 切点与 LEK 羧端的 Bam Hl 切点相距较远，经 HindIII 和 Bam H1 作用产生 6.1 和 4.9 千碱基对 (Kb) 的片段；如 lac 和 LEK 基因转录方向相反，则 HindIII 切点和 Bam H1 切点相距较近，在这两种酶作用下，产生 10.1 和 0.9 kb 片段．图 5 为 pEL103 (lac 和 LEK 基因转录方向相同) 和 pEL101 (lac 和 LEK 基因转录方向相反) 限制性片段的琼脂糖凝胶电泳图．可以看出，pEL103 (a, b, c, 和 d) 和 pEL101 (g, h, i 和 j) 经 HindIII (a 和 j) Bam Hl (b 和 i) 作用形成一条带，11.0 kb．经 EcoR1 (d 和 g) 作用形成两条带：一条 7.0 kb lac 片段 (与 f 比较)，一条 4.0kb pEk10 片段(与 e 比较)．经 HindIII 和 Bam H1 同时作用(c 和 h)，pEL-103 形成 6.1 和 4.9 kb 两个片段 (h)．以上结果表明 pEL103 为 LEK 基因的表达质粒．LEK 基因在 lac 控制下可以实现表达．Shemyakin 等[2]报道的表达质粒，用合成的 LEK 基因，Charon 4A 的 lac 片段和载体 pBR322 三分子反应 1 次组建而成，效率较低．而且他们也没有给出质粒的鉴定结果．

将表达质粒 pEL103 和其他重组质粒分别转入大肠杆菌 C600，作液体培养，离心收集对数生长期的菌体，经 CNBr 处理，作 LEK 放射免疫分析，测定不同菌体内的 LEK 含量(见

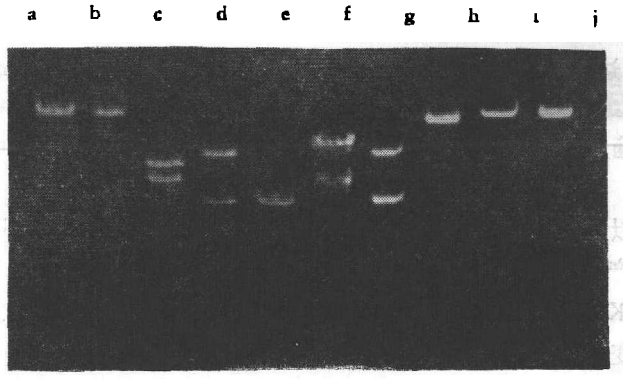


图 5　pEL101 和 pEL103 DNA 限制性片段琼脂糖凝胶电泳图

(a. pEL103 + HindIII, b. pEL103 + BamH1, c.pEL 103+HindIII + BamHl, d. pEL103 + EcoR1, e. pEK10 + EcoR1, f.p MG4 + EcoR1, g. pEL101 + EcoR1, h. pEL101 + HindIII + BamH1, i. pEL 101 + BamH1, j. pEL101 + HindIII)

表 1　亮氨酸脑啡肽的放射免疫分析

竞争物 (微微克)	cpm	细菌样品 (蛋白,微克)	cpm
.....	3363		
LEK(6.25)	3026	C600(10)	3343
LEK(12.5)	2717	pEK10(18)	3300
LEK(25.0)	2234	pMG4(20)	3122
LEK(50.0)	1864	pEL 101(12)	3208
LEK(100)	1649	pEL103(1.5)	1212
LEK(200)	1270	pEL103(3.0)	824
LEK(400)	988	pEL103(7.5)	740

LEK: 亮氨酸-脑·啡肽

材料和方法)。 表 1 结果表明，在测定系统中加入 ^{125}I-LEK 6350 cpm，能被双抗免疫沉淀 3363cpm。 如果在测定系统中另加入非标记的 LEK 标准品,由于竞争性结合,能被双抗免疫沉淀的放射性 (cpm) 减少。 随着非标记竞争性底物的增加，被双抗免疫沉淀的放射性 (cpm) 递减 (表 1 左行)。 根据加入非标记的 LEK 量和被沉淀的放射性 (cpm) 的改变可以作竞争性抑制标准曲线，以定量未知样品中的 LEK 含量。表 1 右行列出了在测定系统中加入含不同重组质粒菌体样品时的被双抗免疫沉淀的放射性 (cpm)。对于大肠杆菌 C600 以及含有 pEK10, pMG4 和 pEL101 的菌体，在反应系统中加入 10—20 微克的细菌蛋白样品，被双抗免疫沉淀的放射性 (cpm) 都没有明显的改变,接近于 3363

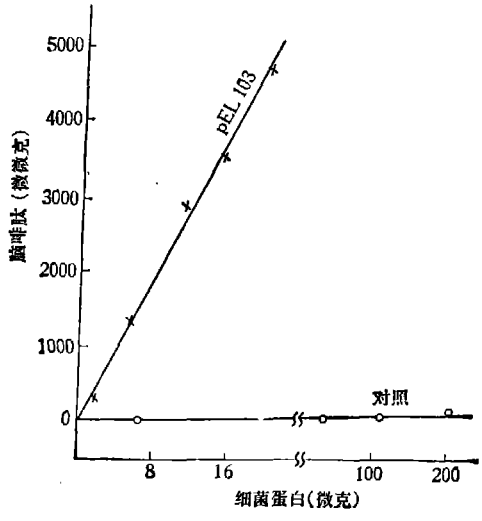


图 6　大肠杆菌 C600 产生的亮氨酸脑啡肽

cpm. 但对含 pEL103 表达质粒的菌体，加入细菌蛋白 1.5 微克后，被双抗免疫沉淀的放射性 (cpm) 就明显减少，达到 1212cpm. 随着细菌蛋白的增加，放射性 (cpm) 下降愈明显. 加入 3.0 微克细菌蛋白时，下降到 824cpm，加入 7.5 微克细菌蛋白时，降为 740cpm，此时 LEK 含量已超过竞争抑制标准曲线的范围. 结果表明含 pEL103 的菌体与其他对照菌比较，其所产生的 LEK 是明显的.

cpm 的改变可以从竞争性抑制标准曲线上换算成 LEK 的量. 从图 6 的结果可以看出，含 pEL103 菌体所产生的 LEK，随细菌蛋白的增加而升高，成一直线关系. 在细菌蛋白为 20 微克时，产生 LEK 4,700 微微克. 但 C600 对照菌则不存在这个关系，细菌蛋白达到 200 微克时，cpm 的改变只有相当于 18 微微克 LEK 的改变. 这可能是在大量蛋白存在下，对测定系统的干扰，并不反映 LEK 的产生.

表 2 亮氨酸脑啡肽基因在不同细菌中的表达

细 菌 寄 主	$\frac{\text{ng LEK}}{\text{蛋白，微克}}$	β-gal-LEK 杂合多肽/总蛋白
C600($i^+z^+y^-$)	195	3.9%
MC106(△lac)	426	8.5%

β-gal: β-半乳糖苷酸， LEK: 亮氨酸-脑啡肽

大肠杆菌 C600 lac 的表型为 $i^+z^+y^-$，细胞内有 i 基因所产生的阻遏蛋白，lac 的表达受到一定的阻遏，利用诱导剂可以提高 lac 的表达水平[15]. 我们改变寄主细胞，将 pEL103 转入 lac 缺失的大肠杆菌 MC 106 (△lac)，同样可以使 lac 表达水平提高. 表 2 比较了 pEL103 在 C600 和 MC 106 中的表达水平. 在 C600 中每毫克细菌蛋白产生 LEK 195 ng，MC 106 则产生 426 ng，LEK 的产量增加了一倍以上. 如果换算成 β-半乳糖苷酶-LEK 杂合蛋白的产生，在 C600 中约占细菌总蛋白的 3.9%，在 MC106 中可达 8.5%，与经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导后的表达水平相近[2].

本工作承本所冯宗铭、朱绳祖、陆惠芬等同志提供限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶；上海高血压病研究所邱嘉盛同志对 LEK 放射免疫分析测定提供宝贵意见，谨此致谢.

参 考 文 献

[1] 汤锦炎等，中国科学，亮-脑啡肽基因的合成(待发表).
[2] Shemyakin, M. F., et al., *Nucleic Acids Res.*, 8(1980), 6163.
[3] 敖世洲等，遗传学报，10(1983),85.
[4] 敖世洲、高美华，生物化学与生物物理学报，14(1982),121.
[5] Sano, H. & Feix, G., *Biochemistry*, 13 (1974), 5110.
[6] Cohen, S. N., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69(1972), 2110.
[7] Grunstein, M. & Hogness, D. S., *ibid.*, 73 (1975), 961.
[8] Southern, E. M., *J. Mol. Biol.*, 98 (1975), 503.
[9] Denhardt, D. T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23 (1966), 641.
[10] 陆以信等，生物化学与生物物理学报，12(1980),641.
[11] Gross, E., *Methods Enzymol.*, 11(1967), 238.
[12] Lowry, O. H., et al., *J. Biol. Chem.*, 193 (1951), 265.
[13] Itakura, K., et al., *Science*, 198 (1977), 1056.
[14] Allent, B. & Bukhar, A. I., *J. Mol. Biol.*, 92 (1975), 529.
[15] Miller, J. H., *Experiments in Molecular Genetics*, 1972, 47, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.