

haFGF 改构体的温控表达及其活性测定

庞实锋¹, 付宏岐², 郑克勤¹, 曹定国¹, 周汝滨^{1*}

(1. 广东医学院 生物学教研室, 广东 湛江 524023; 2. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118)

[摘要] 目的: 构建温控表达载体, 采用温控表达 haFGF, 为降低其生产成本打下基础。方法: 采用 PCR 法扩增截去其 N 端 19 个氨基酸的 haFGF DNA, 克隆到温控表达载体 PBV220 中, 然后转化进 BL21 (DE3) Star plysS 中进行温控表达。结果: 经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明, 温控表达载体表达的 haFGF 具有其原来的免疫原性, MTT 活性检测结果表明, haFGF 纯化产物与野生型 haFGF 活性相当, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论: 成功构建了 haFGF 的温控表达载体, 为提高目的蛋白的表达量和降低其生产成本打下基础。

[关键词] 酸性成纤维细胞生长因子; 基因克隆; 温控表达; 聚合酶链反应

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)04-0351-04

Temperature-regulated Expression of Human Acidic Fibroblast Growth Factor Remodeling Gene and Detection of Its Activity

PANG Shifeng¹, FU Hongqi², ZHENG Keqin¹, CAO Dingguo¹, ZHOU Rubin¹

(1. Department of Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, Guangdong, China;

2. Bioreactor and Pharmaceutical Development Engineering Research Center of Education Ministry, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To construct temperature-regulated expression vector, and to express human acidic fibroblast growth factor (haFGF) in a temperature-regulated manner, and so as to lay a foundation for cutting down cost of haFGF production. **Methods:** HaFGF truncated by 19 amino acids in N-terminal was amplified with polymerase chain reaction (PCR), cloned into temperature-regulated expression vector PBV220, and then transformed into E. coli BL21 (DE3) Star plysS to express under induction of temperature. **Results:** SDS-PAGE and Western blot analysis showed that haFGF-19 had its original immunogenicity. MTT results indicated that there was no significant difference of activities between haFGF-19 and wild-type aFGF. **Conclusions:** Temperature-regulated expression vector is successfully constructed. This study lays a foundation for enhancing expression level of haFGF and cutting down cost of production.

[Key words] human acidic fibroblast growth factor; gene cloning; temperature-dependent expression; polymerase chain reaction

人酸性成纤维细胞生长因子 (human acidic Fibroblast Growth Factor, haFGF) 是成纤维细胞生长因子家庭成员中的一员, 主要来源于神经外胚层和中胚层细胞, 它能促进神经再生, 对神经元具有营养支持作用, 在中枢神经系统创伤修复中起重要作用^[1]。此外, 在血管生成、创伤修复等方面亦具有重要的作用, 故此具有极其重要的医学价

值^[2~4]。研究表明, aFGF 的生物活性部位主要集中在 C 端, N 端增加或减少部分氨基酸对其生物活性影响不大, 为此, 利用 PCR 技术, 将其 N 端截去 19 个氨基酸构成只有 135 个氨基酸的 aFGF 改构体, 这就使得其分子量降低, 从而尽可能减少其潜在的免疫原性, 并保留其原有生物活性。有关 aFGF 的表达研究目前有不少报道, 这些表达研究都

* 通讯作者 E-mail: zrbgdmc@sina.com

需要添加昂贵的诱导剂 Isopropyl β -D-Thiogalactoside (IPTG),这就增加了其生产成本^[5~8]。但有关温控的报道少, PBV220 正是一种温控型表达载体,这种载体不需要添加诱导剂,可以通过控制温度在 42 °C 左右即可以达到诱导的目的^[9]。目前 aFGF 的表达量尚有待进一步提高,为了进一步提高其表达量,并降低其纯化难度等后处理问题,降低其生产成本,于 2007 年 6~12 月,开始了相关研究,将改构的 haFGF 基因克隆进温控表达载体 pBV220 中,然后转化进 BL21(DE3)Star plysS 中以使目的基因获得高效表达,而使外源蛋白表达量尽可能降低,构建了表达菌株 BL21(DE3)Star plysS/pBV220-haFGF 工程菌,由于 BL21(DE3)Star plysS 菌株是一种经改造的工程菌,具有在高效表达外源蛋白的同时能降低菌体自身蛋白的本底表达水平,故能相对提高目的蛋白占总蛋白的相对含量,对 haFGF 的开发及应用研究具有一定的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 BL21(DE3)Star、BL21(DE3)Star plysS、BL21(DE3)plysS、pBV220、pET3C-haFGF 质粒,均由暨南大学医药生物技术研究开发中心保存。

1.1.2 酶和试剂 Pfu、TaqDNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、各种限制性内切酶、PCR 纯化回收试剂盒均购自上海申能生物工程有限公司,引物由上海生工合成,质粒小量抽提试剂盒购自上海生工, DNA 胶回收试剂盒均购自大连宝生物公司。其余常用试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 引物合成 以 haFGF DNA 为蓝图,设计合成引物 P1、P2,在引物 P1、P2 分别引入 *EcoRI*、*Sall* 酶切位点,便于将目的基因克隆进表达载体中进行表达。引物序列如下:

P1:CGGAATTCATGGCTAATTACAAGAAGC

P2:GCCGCGACTTAATCAGAAGAGACTGGCA

其中,P1 中划线部分为 *EcoRI* 酶切位点及保护碱基,P2 划线部分是 *Sall* 酶切位点及保护碱基。

1.2.2 haFGF DNA 的合成 采用 PCR 技术以 pET3C-haFGF 质粒为模板,以 P1、P2 为引物,用高保真聚合酶 Pfu 按 94 °C、30 s、55 °C、35 s、72 °C、35 s 进行 25 个循环反应,进行至最后一步时,在

72 °C 延伸反应 5 min,扩增出 aFGF 改构体;经 PCR 纯化回收试剂盒回收 PCR 产物待用。

1.2.3 含 haFGF 基因的温控表达载体 pBV-aFGF 的构建 将经 PCR 纯化回收试剂盒回收的 haFGF 片段,用限制性内切酶 *EcoRI*、*Sall* 进行双酶切回收目的片段;将经同样双酶切的 pBV220 经凝胶电泳后用凝胶回收试剂盒回收大片段,取 4.5 μ l haFGF 回收片段与 0.5 μ l pBV220 大片段,在 T4 DNA 连接试剂盒中的 DI Solution 作用下,于 16 °C 进行连接反应 1 h。将连接反应产物转化感受态菌 BL21(DE3)Star,涂布于含 Amp 抗性平板中筛选抗性菌落;挑抗性单菌落培养,抽提质粒进行 PCR 及酶切鉴定。

1.2.4 haFGF 的表达及表达产物的检测 挑选抗性单菌落于含 Amp100 mg/L 的 LB 培养基中,30 °C,250 r/min 培养过夜,然后按 1% 接种量转接到新鲜的含 Amp100 mg/L 的 LB 培养基中,30 °C,250 r/min 培养至 OD600 = 0.4~0.5,收集部分菌液作诱导前比较,将余下菌液于 42 °C 诱导表达 3~4 h,将经诱导表达的菌液 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体,用双蒸水将菌液洗涤 1 次,将经洗涤后的诱导前后的菌体用 1 倍 SDS 样品缓冲液悬浮,100 °C 煮 5 min,离心取上清用 15% SDS-PAGE 电泳检测表达产物;进一步采用 Western blot 杂交分析:将表达产物上清液经 15% 的 SDS-PAGE 电泳后转移到硝酸纤维素膜上,然后将膜置于含 5% BSA 的 PBS-tween20 溶液中 4 °C 封闭过夜,漂洗后加入兔抗人 aFGF 多克隆抗体温育 1 h,漂洗后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 温育 1 h,漂洗后将 PVDF 膜浸泡于 Santa Cruz 公司的化学发光液中,在暗室中进行曝光,将 X-光片进行显影和定影后拍摄。

1.2.5 温控高效表达菌株的建立 将重组质粒转化感受态菌 BL21(DE3)Star plysS(氯霉素抗性 Chl)及 BL21(DE3)plysS(Chl),在含 40 mg/L Chl 和 100 mg/L Amp 抗性平板中筛选抗性菌落,将阳性菌株 BL21(DE3)Star plysS/pBV-haFGF 及 BL21(DE3)plysS/pBV-haFGF 及 BL21(DE3)Star/pBV-haFGF 三者分别作热诱导表达,比较三者目的蛋白的表达量及背景外源蛋白的表达量,可选出重组质粒的最佳表达宿主菌。

1.2.6 表达产物包涵体的获得及纯化 将筛选出的工程菌 BL21(DE3)Star plysS/pBV-haFGF 于含 Chl 和 Amp 的 LB 培养基中,30 °C,200 r/min 振荡

培养过夜,次日按 10% 接种量转接于适当体积(1 L三角瓶中盛 200 ml LB)含 100 mg/L Amp 和 40 mg/L Chl 的新鲜 LB 培养基中,30 ℃,250 r/min 振荡培养 1.5~3 h,至 OD₆₀₀ = 0.4~0.6 时,转移到 45 ℃ 水浴中摇动 5 min,使培养基温度快速升温至 42 ℃,然后于 42 ℃ 进行热诱导表达 4 h,离心收集菌体。将离心所得每 3 g 菌体加 20 ml 缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L EDTA pH8.0, 100 mmol/L NaCl),于冰浴中超声破碎 15 min,于 4 ℃,13 000 r/min 离心 10 min,收集到的沉淀即为粗制包涵体;包涵体用洗涤液 I (50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 10 mmol/L EDTA pH8.0, 100 mmol/L NaCl, 1% Triton-X100)和洗涤液 II (50 mmol/L Tris-HCl pH8.5, 10 mmol/L EDTA pH8.5, 2 mmol/L 尿素)反复洗涤,洗涤液可洗涤去大部分杂蛋白以及部分细胞碎片。离心收集沉淀,沉淀用 6 mmol/L 盐酸胍,20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L EDTA pH8.0, 5 mmol/L DTT 溶液溶解,离心取上清用 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L EDTA pH8.0, 2 mmol/L GSH 透析复性。透析液经 Heparin SepharoseCl-6B 亲和层析,以 1.2 mmol/L NaCl (10 mmol/L PBS pH7.5)洗脱。

1.2.7 haFGF 的活性检测 采 Balb/c3T3,测定时选用本中心的野生型 haFGF 为标准品。将对数增殖期的 Balb/c3T3 加入 96 孔板中(每孔细胞 7 000/100 μl)。37 ℃,5% CO₂ 培养 24 h,再用含 0.4% 胎牛血清的 1640 培养液换液后使细胞饥饿培养 24 h。做 3 个实验组:实验组一为 haFGF 纯化样品,以初始浓度 100 μg/L 加入,而后以 2 倍稀释后加入,每 5 孔为一平行组,实验组二为 haFGF 标准品,也与纯化样品一样做 5 个同样的浓度梯度,实验组三为缓冲液组,如上方法加样,继续培养 24 h 后,加入 20 mL MTT(5 g/L),培养 4 h 后弃去培养液,每孔加入 150 μl 的 DMSO,室温放置 40 min 后,在 590 nm 波长下测其 OD 值,并绘制生长曲线。

2 结果

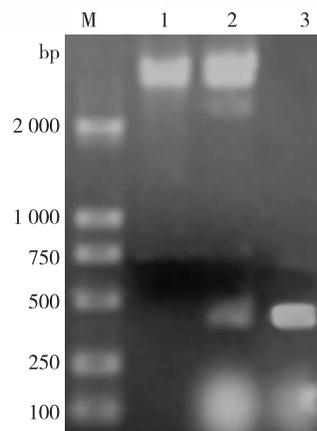
2.1 含 haFGF 基因的温控表达载体 pBV-haFGF 的构建及表达

采用温控表达载体 pBV220 为表达载体,将目的基因克隆于其 *EcoRI* 与 *Sall* 克隆位点之间,构建成含 haFGF 基因的热诱导重组表达载体 pBV-haF-

GF。重组质粒经 PCR 可扩增出一约 420 bp 的片段,与预期相符;重组质粒经 *EcoRI* 与 *Sall* 双酶切得到预期约 420 bp 的小片段(图 1)。DNA 测序结果正确。

2.2 haFGF 的表达及表达产物的检测

将含重组质粒的菌种接种于液体 LB 中,30 ℃,250 r/min 培养至 OD₆₀₀ = 0.4~0.6,然后将温度提高到 42 ℃ 热诱导表达 3~4 h,经 15% SDS-PAGE 电泳检测表达情况(图 2),重组菌有一条约 15 kD 的表达产物,与 haFGF 改构体标准品大小一致,而阴性对照空载体 pBV220 的表达产物及重组菌诱导前的表达产物中皆无此条带,与预期结果一致,由此可初步判断这就是目的蛋白。采用 Western blot 杂交分析进一步确认表达产物,杂交结果显示所得表达产物具有 aFGF 的抗原性(图 3),由此可知表达产物就是目的蛋白。



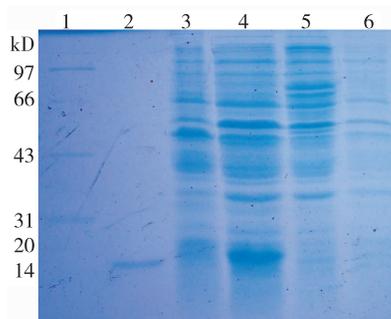
注:M:DNA marker2000;1:PBV220 *EcoRI*/*Sall*;2:重组质粒 PBV-haFGF *EcoRI*/*Sall*;3:重组质粒 PBV-haFGF PCR 产物

图 1 重组质粒酶切分析

Fig. 1 Recombinant plasmid restriction enzyme analysis

2.3 温控高效表达菌株的建立

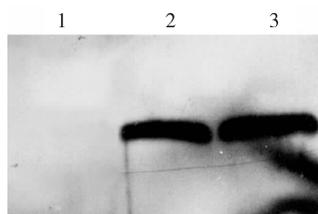
将构建好的如下 3 个重组菌 BL21 (DE3) Star/pBV-haFGF、BL21 (DE3) Star p_{lysS}/pBV-haFGF、BL21 (DE3) p_{lysS}/pBV-haFGF 同时进行热诱导表达,结果显示,含 p_{lysS} 基因的 BL21 (DE3) Star p_{lysS}/pBV-haFGF 和 BL21-(DE3) p_{lysS}/pBV-haFGF 两者的外源蛋白水平相当,目的蛋白的表达量在 BL21 (DE3) Star p_{lysS}/pBV-haFGF 中较高;BL21 (DE3) Star/pBV-haFGF 和 BL21 (DE3) Star p_{lysS}/pBV-haFGF 两者目的蛋白的表达量相当,而背景外源蛋白的表达量在 BL21 (DE3) Star p_{lysS}/pBV-haFGF 中要少得多,由此可选出重组质粒的最佳表



注:1:Protein Marker;2: haFGF 改构体标准品(15 kD);3:BL21(DE3) StarplysS / pBV-haFGF 热诱导前产物;4:BL21(DE3) Star plysS / pBV-haFGF 热诱导产物;5:BL21(DE3) Star plysS / pBV220 热诱导产物;6:BL21(DE3) Star plysS/pBV220 热诱导前产物

图 2 SDS-PAGE 电泳检测蛋白产物

Fig.2 SDS-PAGE analysis of protein expression products



注:1:BL21(DE3)Star plysS/ pBV220 热诱导产物;2:aFGF 标准品;3:BL21(DE3) Star plysS/ pBV-haFGF 热诱导产物

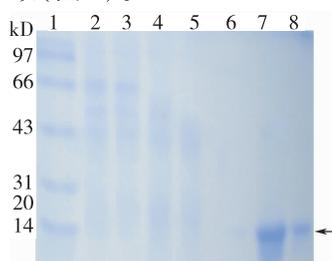
图 3 Western blot 杂交分析

Fig.3 Western blot analysis

达工程菌是 BL21(DE3) Star plysS/pBV-haFGF。

2.4 表达产物包涵体的获得及纯化

诱导表达的 haFGF 的菌体经超声破碎后,将经过反复洗涤的包涵体用盐酸胍缓冲液溶解变性,再经透析复性后经肝素亲和层析柱纯化,可在含 1.2 mmol/L NaCl 的 PBS 缓冲液洗脱下一活性峰,经 SDS-PAGE 分析,在 15 kD 处有一明显条带,与预期大小一致(图 4)。



注:1:Protein Marker;2~6: 杂蛋白峰;7:haFGF 改构体纯品;8:BL21(DE3) Star plysS/pBV-haFGF 纯化产物

图 4 SDS-PAGE 分析纯化产物

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified products

2.5 haFGF 的活性检测

用 MTT 法测定纯化的 haFGF 改构体和 aFGF 标准品的促细胞分裂活性,结果如图 5 所示,haFGF 改构体与野生型 aFGF 的促细胞分裂活性相当,两者无显著差异。

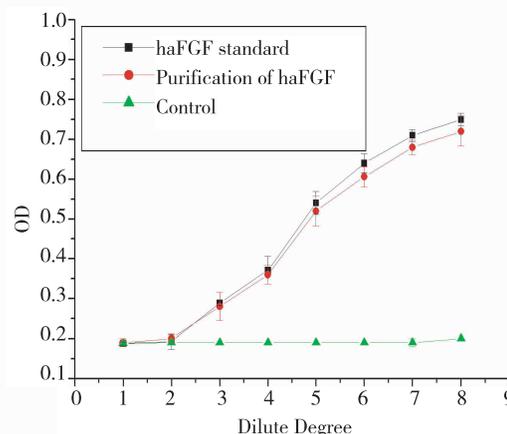


图 5 aFGF 促细胞分裂活性分析

Fig.5 Analysis of mitogenic activity of aFGF protein

3 讨论

haFGF 作为一种有丝分裂原,可以刺激表皮及成纤维细胞等生长,并能诱导血管的再生,因而可广泛应用于创伤和溃疡性疾病的治疗,目前 aFGF 一般是在原核表达系统下通过 IPTG 诱导表达,生产成本较高。为了进一步降低其生产成本,通过采用热诱导型载体进行目的基因的表达,这就可以消除 IPTG 的使用成本。此外,由于不同表达菌的背景表达量不一,本研究选用了 3 种不同的宿主菌对 aFGF 进行表达研究,结果表明,在 BL21(DE3) Star plysS 中,背景蛋白较少,表达量较大,是较好的宿主菌,可以应用于 aFGF 的温控表达。由于野生型 aFGF 分子量较大,应用时容易诱发机体的免疫效应,产生抗体;再者 aFGF 的活性部位主要集中在 C 端,所以本研究将其 N 端截少了 19 个氨基酸进行缺失表达,所得表达产物仍具有野生型的促细胞分裂活性,但降低了其免疫原性,这样就大大降低了产生抗体的应用风险,提高其应用价值。

4 参考文献

[1] 肖春苟,沈伟哉,郭国庆,等.侧脑室注射改构体酸性成纤维细胞生长因子对帕金森病大鼠旋转行为的影响[J].中国行为医学科学,2008(11):961-963.

(下转第 358 页)

- 理运用[J]. 中国行为医学科学, 2005(1):69.
- [5] 许凯, 吕明方. 抗衰老药理学[M]. 中国医药科技出版, 1994:56.
- [6] 裘维焰. 补肾健脾活血法抗衰老作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 1998(8):294-296.
- [7] 刘岳松. 抗衰老防老话中药(六)·五味子[J]. 中国老年, 1998(5):43.
- [8] 黄兆胜, 刘明平. 养寿丹对阿尔茨海默病肾虚小鼠脑神经递质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002(1):26.
- (2011-03-08 收稿, 2011-06-21 修回)

(上接第 354 页)

- [2] 余琰, 蔡绍哲, 夏玉先. 酸性成纤维细胞生长因子研究进展[J]. 中国药理学通报, 2002(2):125-128.
- [3] 吕文天, 龚守良, 李校堃. 酸性成纤维细胞生长因子的生物学特性[J]. 中国生化药物杂志, 2005(1):49-51.
- [4] 李校堃, 许华, 付小兵, 等. 重组人酸性成纤维细胞生长因子促进创伤愈合的研究[J]. 中国药科大学学报, 2003(4):312-315.
- [5] 王树民, 解佳森, 刘丹, 等. 重组人 aFGF 工程菌发酵条件的优化[J]. 中国生物制品学杂志, 2009(9):898-900.
- [6] Shiloach J, Fass R, Growing E. Coli to high cell density - ahistorical perspective on method development [J]. Biotech Adv, 2005(5):345-357.
- [7] 刘社际, 杨立明. 重组人生长激素在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中高效表达研究[J]. 生物技术通讯, 2004(4):462-467.
- [8] 袁辉, 刘笑迪, 谭毅, 等. 重组人酸性成纤维细胞生长因子改构体在大肠杆菌中的表达[J]. 温州医学院学报, 2007(4):303-308.
- [9] 朱大兴, 王艳萍, 杨学勤, 等. 高效原核表达载体 pBV220 的改造与应用[J]. 生物工程学报, 2008(7):1312-1316.
- (2011-03-11 收稿, 2011-06-20 修回)

· 文摘 ·

突变型 APP 基因转染对神经细胞尼古丁受体的影响

安宇, 唐智, 齐晓岚, 肖雁, 单可人, 官志忠

目的: 探讨阿尔茨海默病(AD)发病机制中的重要物质淀粉样蛋白前体蛋白(APP)高表达对神经型尼古丁受体(nAChR)的影响。**方法:** 将含有瑞典家庭性AD双突变的APP670/671基因(APP_{SWE})转入神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞和原代培养的大鼠神经细胞,得到体外构建的高表达APP_{SWE}细胞模型;用即时荧光定量PCR和Western blot方法分别测定APP mRNA、可溶性APP和总APP蛋白表达水平以及nAChR mRNA和蛋白表达水平;用放射性配体 [³H]epibatidine 进行nAChR配体结合试验。**结果:** 转染APP_{SWE}质粒的SH-SY5Y细胞和原代培养的神经细胞中APP mRNA和总APP蛋白表达水平显著升高,在SH-SY5Y细胞的培养液中检测到αAPP分泌量下降;SH-SY5Y细胞转染组α7 nAChR蛋白和mRNA表达水平显著升高,而α3 nAChR蛋白和mRNA表达水平明显下降,并且 [³H]epibatidine 配体结合位点明显减少;原代培养的神经细胞转染组α4 nAChR蛋白水平明显下降,但其mRNA水平无明显变化。**结论:** APP蛋白高表达使体外培养神经细胞中nAChR发生改变,其中α7 nAChR表达水平升高,而含α3和α4亚单位的nAChR表达水平降低,表明APP代谢紊乱可对nAChR产生一定的影响,在AD的发病机制中有重要作用。

全文刊登于《中华病理学杂志》,2010(1):48.