

# 重组人融合基因 Nm23-H1/HbFGF 的构建及其在大肠杆菌中表达的研究

孙艳梅 赵利淦 张美英

(暨南大学生物工程研究所 广州 510632)

**摘 要** 根据 Nm23-H1 与 HbFGF cDNA 序列,人工合成一段中间核酸序列,将它分别与 Nm23-H1 cDNA 的上游引物及 HbFGF cDNA 的下游引物组成两对引物,通过 PCR(聚合酶链式反应)构建出融合基因 Nm23-H1/HbFGF,将其定向克隆于质粒载体 pBV220 上,经诱导,SDS-PAGE 分析,表达产物分子量为 34kD,表达量占菌体总蛋白的 14%,表达产物以包涵体形式存在,ELISA 和 Western 印迹表明包涵体具有 Nm23-H1 和 HbFGF 抗原性,然后对包涵体进行变性、复性及纯化处理,取纯化产物进行定性和生物活性分析,结果证明纯化产物具有 Nm23-H1 和 HbFGF 的抗原性及生物活性。以上实验为今后进一步研究融合基因 Nm23-H1/HbFGF 在真核细胞中的抑癌、致癌性质打下了基础。

**关键词** 融合基因 Nm23-H1/HbFGF,定性分析,生物活性分析

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0551-06

抑癌基因 Nm23 是 Steeg 于 1988 年在 K-1735 鼠黑色素瘤细胞株中分离出的<sup>[1]</sup>。后来研究表明人类也有它的同源基因存在,目前共发现了人类 Nm23 家庭的 5 个成员,即 Nm23-H1<sup>[1,7]</sup>、Nm23-H2<sup>[2]</sup>、DR-nm23<sup>[3,4]</sup>、Nm23-H4<sup>[5]</sup>、Nm23-H5<sup>[6]</sup>。其中 Nm23-H1 与多类癌组织的转移呈负相关,可能是癌转移抑制基因,它编码二磷酸核苷激酶(Nucleoside diphosphate kinase)A 亚基,蛋白分子量为 17kD。FGF(Fibroblast growth factor)是 Gospodarowicz 于 1974 年从牛脑组织和垂体中分离出的能刺激 3T3 成纤维细胞分裂、生长的活性因子。它是个大家族,至少包括 7 个成员:酸性 FGF(aFGF)、碱性 FGF(bFGF)、hst/ks3、int-2、FGF-5、FGF-6 及角质细胞生长因子<sup>[8]</sup>。人 bFGF(Human bFGF,简称 HbFGF)与牛 bFGF 基因只有两个碱基之差,我们选用的 HbFGF 基因来源于牛的 bFGF 经体外点突变而来<sup>[9]</sup>。由于 HbFGF 具有广泛的生物学效应,特别是在组织再生、伤口愈合等方面的显著功效,目前它已被用于治疗烧伤、烫伤、眼角膜再生等许多领域,但诸多方面显示 HbFGF 具有致癌性,这影响了它的进一步开发。我们的工作是将抑癌基因 Nm23-H1 与有致癌性的 HbFGF 连接在一起,构建融合基因 Nm23-H1/HbFGF,使其在大肠杆菌中表达,纯化表达产物,对其进行定性及活性研究。所有这些为今后最终研究融合基因中 Nm23-H1 的抑

癌性与 HbFGF 致癌性之间的关系打下了基础。目前国际上还没有针对融合基因 Nm23-H1/HbFGF 的报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

重组质粒 pBV220 Nm23-H1 和 pBV220 HbFGF 由本所提供,宿主菌 BL21(DE3)和 DH5 $\alpha$  由本所保存,中间序列 87bp 核酸和引物 1、2、3、4 均由上海生物工程公司合成。

### 1.2 融合基因 Nm23-H1/HbFGF 的构建和重组质粒 pBV220 Nm23-H1/HbFGF 的获得

构建流程见图 1。

人工设计一段中间核酸序列(87bp 单链):

5'-CTGTGCTCAGAACTGGATCTATGAAATG  
GCCGCCGGGAGCATCACCACGCTGCCAGCCCTG  
CCGAGGACGCGCGCAGCGCGCTTT。单下划  
线序列与 Nm23-H1 下游序列同源,并且去掉了  
Nm23-H1 的终止密码子,双下划线序列与 HbFGF  
上游序列同源。同时设计引物 1 序列为 5'-CTGT-  
GCTCAGA,引物 2 序列为 5'-AAAGCGCCGCT,通  
过引物 1、2 对中间序列模板进行扩增,然后用  
Klenow 酶消化 PCR 产物。另设计引物 3 序列:5'-  
GGGAATTCATGGCCAACTGTGAGCGT,以引物 3  
和中间核酸序列的互补序列为一对引物,以从重组

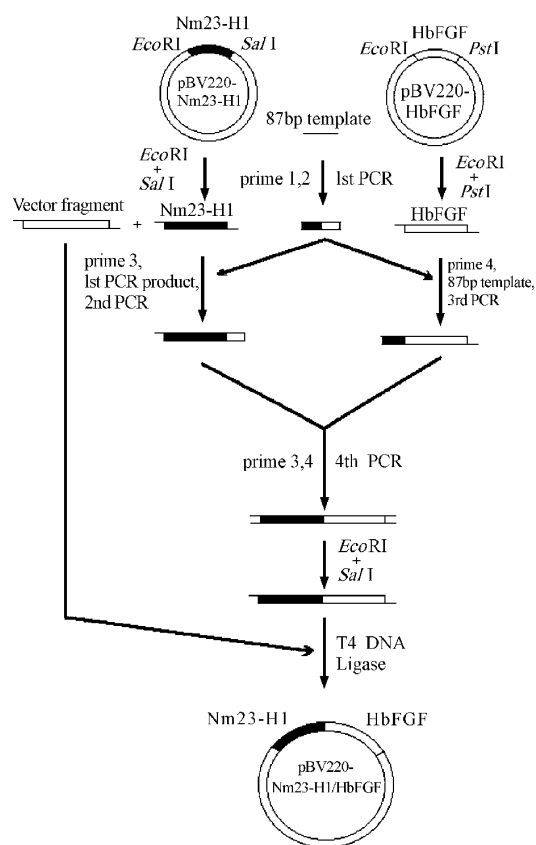


图1 重组质粒 pBV220-Nm23-H1/HbFGF 的构建流程图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pBV220-Nm23-H1/HbFGF

质粒上切割下来的 Nm23-H1 序列为模板,进行第二个 PCR 反应。反应体系参见文献[12],扩增条件为 94℃ 30s, 55℃ 1min, 72℃ 1min(最后一次循环 2min),循环总数 20 次。用 Klenow 酶消化 PCR 产物。另设计引物 4 序列: 5'-CCGTCGACTCAGCTCTTAGCAGACAT, 以引物 4 和中间核酸序列模板序列为一对引物,以从重组质粒上切割下来的 HbFGF 序列为模板,进行第三个 PCR 反应。反应体系参见文献[12],扩增条件为 94℃ 30s, 72℃ 2min(最后一次循环 3min),循环总数 15 次。用 Klenow 酶消化 PCR 产物。

最后将第二个、第三个 PCR 产物混合到一起,退火形成异源双链分子,以此为模板,应用引物 3、4 组成一对引物进行第四次 PCR 反应,反应体系参见文献[12],扩增条件为 94℃ 1min, 72℃ 2min(最后一次循环 3min),循环总数 10 次。用 *Eco*RI、*Sal*I 双酶切 PCR 产物,然后与经过相应双酶切的质粒载体 pBV220 以 T4DNA 连接酶 16℃ 进行连接,转化大肠杆菌 BL21(DE3),在 Amp 抗性平皿上挑选转化菌落,用 *Eco*RI、*Sal*I 双酶切鉴定。

### 1.3 融合基因 Nm23-H1/HbFGF 在大肠杆菌中的表达及产物纯化

**1.3.1 表达检测:**挑取重组子菌落接种于含 100μg/mL Amp 的 LB 培养液中, 30℃ 培养至  $OD_{600} \approx 0.4$ , 升温至 42℃, 诱导表达 4h。离心收集菌体, 15% SDS-PAGE 检测表达产物。

**1.3.2 目的蛋白在菌体中的存在形式:**用超声波破碎经温控诱导后的重组菌体,分离上清液与沉淀,用 15% SDS-PAGE 分析上清和沉淀中目的蛋白含量。

**1.3.3 表达产物的鉴定:**ELISA 实验:取菌体破碎液的沉淀做抗原,用包被液进行  $10^{-1}$  至  $10^{-4}$  稀释、包被过夜。使用两种多克隆一抗,一种为抗 NDPK-A 血清,另一种为抗 HbFGF 血清,其余操作参见文献[13]。

**Western blot 杂交检测:**取菌体破碎液的沉淀进行 15% SDS-PAGE 分析,同一样品点两孔,两孔中间做好标记。将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜上(4℃, 10mA, 过夜)。沿两孔中间标记处将膜剪开,分装两个平皿中。其余操作参见文献[11, 14]。

**1.3.4 表达产物的纯化及 ELISA 法鉴定纯化产物:**用超声波破碎经诱导后的重组菌体,离心取沉淀进行洗涤[0.5% Triton X-100 和 10mmol/L EDTA (pH8.0)],用 8mol/L 尿素溶解,并辅以还原剂 DTT 做保护,然后用复性液(50 mmol/L  $KH_2PO_4$  (pH 10.7), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽)对变性后的包涵体复性,通过离心,取上清液过 Heparin Sepharose CL-6B 柱进行亲和层析,用 0.6mol/L NaCl 平衡,收集 2mol/L NaCl 洗脱组分,做 15% SDS-PAGE 分析。同时,取纯化产物做抗原,用包被液进行  $10^{-1}$  至  $10^{-4}$  稀释、包被过夜,进行 ELISA 定性鉴定,操作同 1.3.3。

**1.3.5 纯化产物的生物活性分析**(1)融合蛋白中 NDPK-A 活性分析: Nm23-H1 编码的蛋白 NDPK-A 具有催化二磷酸核苷与三磷酸核苷之间相互转化的酶活性。酶促反应式( $UDP + ATP \rightleftharpoons UTP + ADP$ ),底物为 1 mmol/L UDP 和 1 mmol/L ATP,实验中设立对照组和实验组,对照组中不加纯化产物,实验组中加入纯化产物进行酶促反应,然后以反相 HPLC 检测酶活性,具体方法参见文献[10]。(2)融合蛋白中 HbFGF 活性分析: HbFGF 能促进鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)毛细血管增粗。实验中设立对照组和实验组,对照组中鸡胚 CAM 上滴加无菌水,实

验组中滴加适量纯化产物 37℃ 共同孵育一段时间，观察 CAM。

2 结果与讨论

2.1 融合基因 Nm23-H1/HbFGF 的构建及重组质粒 pBV220 Nm23-H1/HbFGF 的限制酶切鉴定

2.1.1 构建 Nm23-H1/HbFGF :通过第一个 PCR 得到的双链核酸序列是由 Nm23-H1 的 432 ~ 456 位和 HbFGF 的 1 ~ 62 位核苷酸组成 ,所以它同时具有两个基因的同源性 ,这样由它和引物 3 组合 ,以 Nm23-H1 为模板得到的第二个 PCR 产物具有了 HbFGF 的同源序列 ;而由它和引物 4 组合 ,以 HbFGF 为模板得到的第三个 PCR 产物具有了 Nm23-H1 的同源序列。从图 2A 可看出第二个

PCR 产物分子量大小为 526bp ,与预期大小相符。从图 2B 可看出第三个 PCR 产物分子量大小为 501bp ,与预期大小相符。然后将互相具有同源性的第二个和第三个 PCR 产物混合 ,退火并延伸就可形成异源双链分子 ,它既具有 Nm23-H1cDNA 的全部序列( 终止密码除外 ) ,又具有 HbFGFcDNA 的全部序列 ,它就是我们构建的目的融合基因 Nm23-H1/HbFGF ,图 2C 为引物 3、4 对其扩增得到的结果 ,可看出第四个 PCR 产物分子量大小为 940bp ,与预期大小相符。

2.1.2 pBV220 Nm23-H1/HbFGF 的限制酶切鉴定 重组质粒 pBV220 Nm23-H1/HbFGF 经 *Eco*RI、*Sal*I 双酶消化后电泳可见一条 940bp 的插入片段 ( 见图 3 ) ,与目的融合基因大小相符。

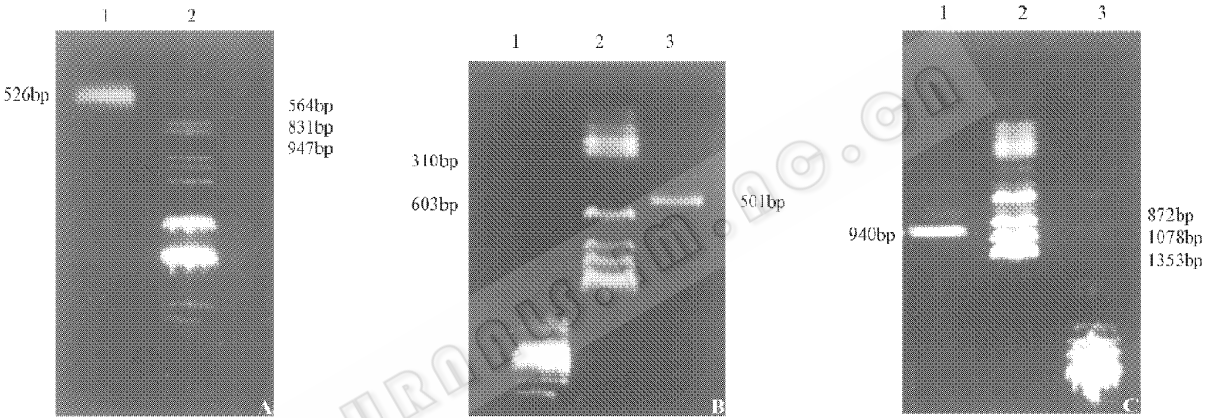


图 2 第二个(A)、第三个(B)、第四个(C)PCR 产物电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis analysis of the second (A) ,third ( B) and fourth (C) PCR product

- A. 1. The second PCR product

2.  $\lambda$ DNA/*Eco*RI + *Hind*III Marker
- B. 1.  $\lambda$ DNA/*Hind*III Marker

2.  $\phi$ X174DNA/*Hae*III Marker

3. The third PCR product
- C. 1. The fourth PCR product

2.  $\phi$ X174DNA/*Hae*III Marker

3.  $\lambda$ DNA/*Hind*III Marker

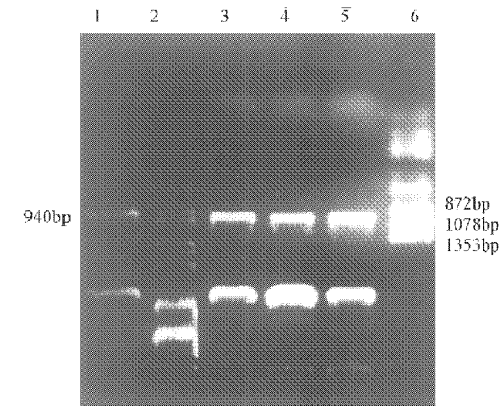


图 3 重组子 pBV220Nm23-H1/HbFGF 的限制性酶切鉴定

Fig.3 Electrophoresis pattern of restrictive fragments of pBV220Nm23-H1/HbFGF

- 1、3、4、5. pBV220Nm23-H1/HbFGF digested by *Eco*RI and *Sal*I
2.  $\lambda$ DNA/*Eco*RI + *Hind*III Marker
6.  $\phi$ X174DNA/*Hae*III Marker

2.2 融合基因的表达、鉴定、纯化以及 ELISA 法鉴定纯化产物

2.2.1 表达检测 :重组菌 BL21 ( DE3 ) pBV220 Nm23-H1/HbFGF 经 42℃ 温控 4h 后 ,用 SDS-PAGE 分析菌体裂解液成分 ,从图 4 可见 ,与空宿主 BL21 ( DE3 )相比 ,重组菌 BL21 ( DE3 )在 34kD 有一浓集的条带 ,与预期的表达产物分子量相符 ,表达产物约占菌体总蛋白的 14%。而已知 pBV220Nm23-H1 在 DH5 $\alpha$  中的表达产物高达 42%<sup>[10]</sup> ,pBV220HbFGF 的表达产物却很低 ,由此得出 ,Nm23-H1 能带动 HbFGF 在宿主菌中进行相对高水平的表达。从图还可见 ,宿主菌 DH5 $\alpha$  不适合该融合基因的表达 ,表达量不高。

2.2.2 表达产物在菌体中的存在形式 :图 5 为取

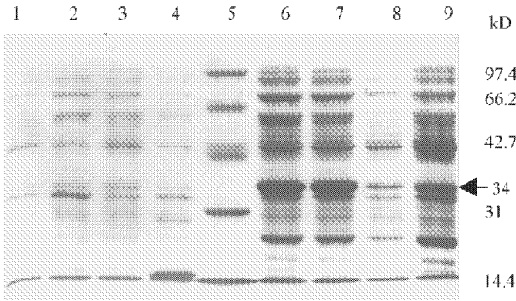


图 4 融合基因 Nm23-H1/HbFGF 在宿主菌中的表达情况

Fig.4 Analysis of the expression of gene in recombinants( 15% SDS-PAGE )

1. Cell lysate of DH5α with pBV220 Nm23-H1/HbFGF uninduced
2. Cell lysate of DH5α with pBV220 Nm23-H1/HbFGF induced
3. Cell lysate of DH5α
4. Cell lysate of DH5α with pBV220 Nm23-H1
5. Protein molecular weight standards
- 6, 7. Cell lysate of BL21 ( DE3 ) with pBV220 Nm23-H1/HbFGF induced
8. Cell lysate of BL21 ( DE3 ) with pBV220 Nm23-H1/HbFGF uninduced
9. Cell lysate of BL21 ( DE3 ) induced

菌体破碎液的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测的情况。结果表明融合蛋白多数存在于沉淀中 ,这说明融合蛋白主要是以包涵体形式表达于宿主菌中。

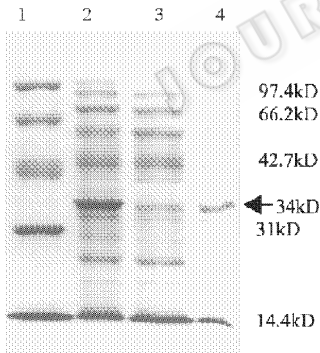


图 5 表达产物在菌体中的存在形式( 包涵体的检测 )

Fig.5 Detection of the inclusion body( 15% SDS-PAGE )

1. Protein molecular weight standards
2. Cell lysate of BL21( DE3 ) with pBV220 Nm23-H1/HbFGF induced
3. Supernatant of BL21 ( DE3 ) pBV220 Nm23-H1/HbFGF bacterial lysate
4. Pellet of BL21 ( DE3 ) pBV220 Nm23-H1/HbFGF bacterial lysate

**2.2.3 表达产物的鉴定 :**ELISA 实验是以菌体破碎液的沉淀( 包涵体 )作抗原 ,分别用两种一抗即抗 NDPK-A 血清( 滴度 1:200 )和抗 HbFGF 血清( 滴度 1:1000 )进行孵育。ELISA 检测见图 6。结果看出 ,

融合蛋白的 Nm23-H1 抗原性和 HbFGF 抗原性均很强。

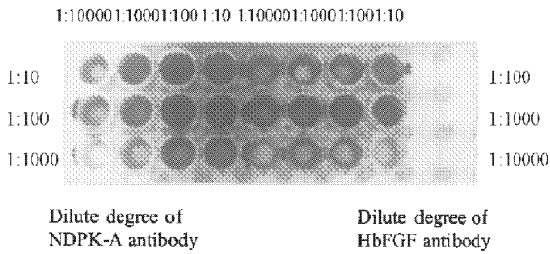


图 6 ELISA 定性鉴定

Fig.6 ELISA determination assay

**Western blot 杂交鉴定 :**取菌体破碎液的沉淀作待测样品进行分析。图 7 结果显示 ,用抗 NDPK-A 一抗孵育的 NC 膜 ,在 34kD 和 17kD 处各有一条清晰的谱带出现 ,用抗 HbFGF 抗体孵育的 NC 膜 ,同样在 34kD 和 17kD 处各有一条清晰的谱带出现。说明表达产物同时具有 Nm23-H1 和 HbFGF 双重抗原性。34kD 处谱带是融合蛋白带 ,而 17kD 处的谱带则分别是单个基因 Nm23-H1 或 HbFGF 的蛋白带。这种现象可能缘于 HbFGF 的氨基端性能不稳 ,以致表达产物中混有部分的两个单基因产物。

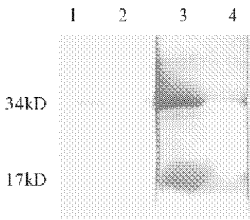


图 7 表达产物的 Western 印迹分析

Fig.7 Western blot analysis of expressing product

- 1 2. Treated by HbFGF antibody
- 3 4. Treated by NDPK-A antibody
- 1 3. Pellet of bacterial lysate
- 2 4. Supernatant of bacterial lysate

**2.2.4 表达产物的纯化及 ELISA 法鉴定纯化产物** 图 8 为包涵体经过变性溶解、复性及亲和层析后所得纯化产物的 SDS-PAGE 检测情况 ,结果可看出 34kD 处有一条蛋白带 ,与 Western blot 的杂交结果相符 ,证明纯化方案可行。同时 ,取纯化产物进行 ELISA 鉴定 ,结果表明纯化产物具有 Nm23-H1 和 HbFGF 抗原性。

**2.3 纯化产物的生物活性分析**

图 9 为对照组和实验组 NDPK-A 酶活性检测情况 ,结果表明对照组中的产物峰( UTP 和 ADP )测不出来 ,而实验组中的产物峰很明显 ,证明纯化产物

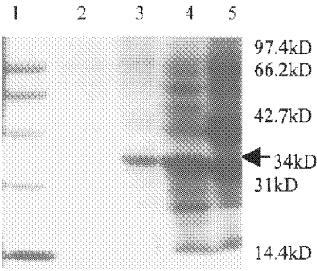


图 8 表达产物的纯化

Fig.8 SDS-PAGE of purification products

- 1. Protein molecular weight standards
- 2. Fraction eluted by 0.6 mol/L NaCl + 10 mmol/L Tris.HCl (pH7.0)
- 3. Fraction eluted by 2 mol/L NaCl + 10 mmol/L Tris.Cl (pH7.0)
- 4, 5. BL21 (DE3) pBV220Nm23-H1/HbFGF bacterial lysate

具有 NDPK-A 酶活性。另外 ,对照组和实验组 HbFGF 生物活性分析的结果表明 ,实验组鸡胚 CAM 上有毛细血管局部增粗的现象 ,对照组鸡胚 CAM 上无此现象发生 ,表明纯化产物同时具有 HbFGF 生物活性。

以上各项实验 ,证明构建的融合基因 Nm23-H1/HbFGF 保留了 Nm23-H1 和 HbFGF 两种基因的活性 ,这为今后在真核水平上探讨融合基因 Nm23-H1/HbFGF 的性质打下了基础 ,其中主要包括 Nm23-H1 的抑癌功能是否会降低 HbFGF 的致癌性的研究。若融合基因 Nm23-H1/HbFGF 在保证具有 HbFGF 活性的前提下 ,降低了它的致癌性 ,则有望将其开发成一类新的基因工程药物。

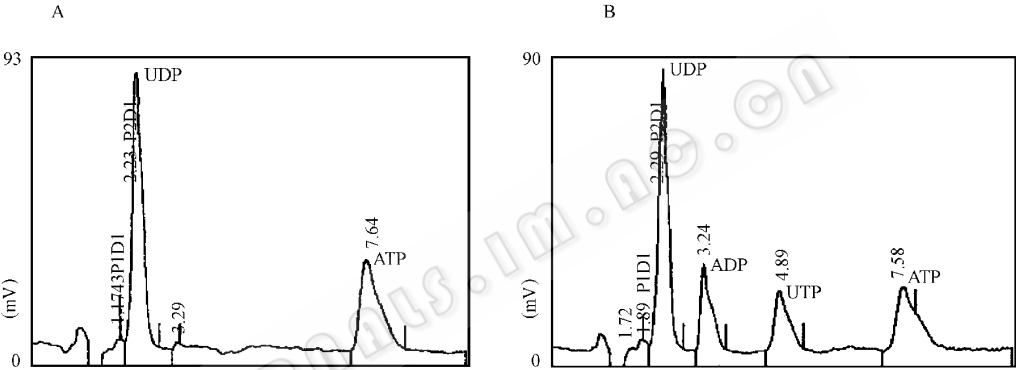


图 9 对照组、实验组的反相 HPLC 成分分析(Nm23-H1 酶活性分析)

Fig.9 Components analysis of control and experimental group

A. Control group B. Experimental group

参 考 文 献

[ 1 ] Steeg P S ,Bevilacqua G ,Kopper L *et al.* *J Natl Cancer Inst* ,1988 **80** :200~204

[ 2 ] Stahl J A ,Leone A ,Rosengard A M *et al.* *Cancer Res* ,1991 **52** :445~449

[ 3 ] Amendola R ,Negroni A. *J Natl Cancer Inst* ,1997 **89** ( 17 ) :1300~1310

[ 4 ] Martinez R ,Venturalli D ,Perrotti D. *Cancer Res* ,1997 **57** ( 6 ) :1180~1187

[ 5 ] Milon L ,Rousseau M M F ,Munier A. *Hum Genet* ,1997 **99** ( 4 ) :550~557

[ 6 ] Munier A ,Feral C ,Milon L. *FEBS Lett* ,1998 **434** ( 3 ) :289~294

[ 7 ] Hartsough M T ,Steeg P S. *Am J Hum Genet* ,1998 **63** ( 1 ) :6~10

[ 8 ] 崔亚东.生命的化学 ,1997 ,**17** ( 5 ) :32~33

[ 9 ] ZHAO L G. Rapid and Efficient Detecting and Mutating Bovine Basic Fibroblast Growth Factor( bFGF ) Gene to Human bFGF Gene. Symposium Program ,Australia Biotechnology Association ,1996 ,p. 191

[ 10 ] 侯 宇 ,赵利淦 ,张美英.中国生物化学与分子生物学报. *Chin J Biochem Mol Biol* ,1998 ,**14** ( 6 ) :655~660

[ 11 ] 萨姆布鲁克 J ,弗里奇 E F ,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南( 第二版 ). 北京 :科学出版社 ,1996

[ 12 ] Mepherston M J ,Quirke P ,Taylor G R. PCR ( A Practical Approach ). Oxford University Press ,1991

[ 13 ] 李成文.现代免疫化学技术 . 上海 :上海科学技术出版社 ,1992

[ 14 ] Dunbar B S. Protein Blotting ( A Practical Approach ). Oxford University Press ,1994

[ 15 ] Doonan S. Protein Purification Protocols( Methods in Molecular Biology Volume 59 ). Humana Press ,1996

## Studies on the Construction and Expression of Recombinant Human Fusion Gene Nm23-H1/HbFGF in *Escherichia coli*

SUN Yan-Mei ZHAO Li-Gan ZHANG Mei-Ying

(*Bioengineering Institute of Jinan University ,Guangzhou 510632*)

**Abstract** First a piece of intermediate nucleic acid chain was designed according to the nucleic acid sequences of Nm23-H1 and HbFGF cDNA ,then it was combined with the upstream primer of Nm23-H1 or the downstream primer of HbFGF to perform Polymerase Chain Reaction( PCR ) respectively. The fusion gene Nm23-H1/HbFGF was constructed by four steps of PCR and it was cloned into the plasmid vector pBV220. The recombinant was induced at 42℃ and analyzed by SDS-PAGE. Results show that the fusion gene Nm23-H1/HbFGF highly expresses its product in inclusion body in *E. coli* BL21( DE3 ). The expressing product is 14% of the total bacterial protein and it is 34kD. ELISA assay and Western blot indicate that the inclusion body contains antigens of Nm23-H1 and HbFGF. By denaturation ,renaturation and purification ,the inclusion body was purified. Determination and biological activity assay show that the purified product contains two kinds of antigens which have biological activities of Nm23-H1 and HbFGF. All these data establish good base to study the tumor suppressor activity and oncogenicity of the fusion gene Nm23-H1/HbFGF in eukaryocyte.

**Key words** Fusion gene Nm23-H1/HbFGF ,qualitative determination ,biological activity assay