

## 人神经生长因子基因的克隆及其 在大肠杆菌中的表达

俞 萍 王会信 柳 川 刘 莉 丁红梅

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

神经生长因子(Nerve Growth Factor, NGF)是最早发现的生长因子之一,它对中枢和周围神经元具有存活分化效应<sup>[1]</sup>。NGF 有可能治疗 Alzheimer's 老年痴呆病、某些周围神经病变和脊髓损伤<sup>[2]</sup>。NGF 在人体组织中含量极微,已有报道从胎盘中纯化 hNGF,但其组织来源极其有限,成本高,产量低,不能满足对 hNGF 的需求,所以如果能利用基因工程方法获得大量有生物学活性的 hNGF 制品,对其基础理论研究和临床应用具有深远的意义。我们根据已知序列设计合成一对引物,以人基因组 DNA 为模板,用 PCR 获得 hNGF 基因,并构建重组表达质粒,使 rehNGF 在大肠杆菌中获得表达,表达产物具有免疫学和生物学活性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌株及载体: *E. coli* RRI、HMS174(DE3)、BL21(DE3)和 JM109(DE3)均为本室保存;克隆载体 pGEM-T 为 Promega 产品;表达载体 pET-3a 含 T7 噬菌体  $\Phi 10$  基因启动子(T7 启动子),为本室保存。

1.1.2 工具酶: 限制酶 EcoRI、BamHI 和 NdeI 以及 T4 DNA 连接酶均为 Promega 公司产品。

1.1.3 试剂: PCR 试剂盒为 Promega 公司产品;DNA 序列分析试剂盒为 Pharmacia 公司产品。

1.1.4 实验动物: 鸡胚由四季青孵化场提供。

#### 1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增及基因操作: 按分子克隆进行<sup>[3]</sup>。

1.2.2 细菌培养及 IPTG 诱导表达: 参见文献<sup>[4]</sup>。

1.2.3 SDS-PAGE 及薄层扫描: SDS-PAGE 方法见分子克隆;薄层扫描采用双波长扫描仪(Dual-Wavelength TLC scanner CS-910)扫描。

1.2.4 重组 hNGF 的免疫印迹(Western blotting): 将重组蛋白电转印至硝酸纤维素膜上。抗原-抗体反应中的第一抗体为兔抗鼠的多抗,酶联第二抗体为羊抗兔 IgG-HRP, DAB 显色。

1.2.5 重组 hNGF 生物学活性测定: 采用经典的鸡胚背根神经节(DRG)法测定,见文献<sup>[1]</sup>。

### 2 结果

#### 2.1 hNGF 基因的克隆

2.1.1 hNGF 基因的 PCR 扩增: 我们根据 Ulrich 等<sup>[5]</sup>报道的 hNGF 基因序列设计合成一对引物,为了便于克隆表达,在其 5'端分别外加 NdeI 和 BamHI 两个酶切位点以及终止密码子和一个保护碱基,引物如下:

P1 5' CCA TAT GTC ATC ATC CCA TCC CAT C 3'

P2 5' CGG ATC CTT AGG CTC TTC TCA CAG CCT 3'

基因扩增的条件为:94℃ 45sec, 55℃ 60sec, 72℃ 105sec。以正常人血白细胞基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增反应后, 产物在 1.5% Agarose 电泳胶上呈现单一特异性条带, 位置相当于 377bp 分子量, 与预计的完全吻合(见图版 I-A)。

### 2.1.2 重组质粒 pGEMNGF 的构建和序列分析

将 PCR 产物直接克隆进 pGEM-T 载体中, 用  $\text{CaCl}_2$  感受态法转化进入 *E. coli* RRI 中, 用含 IPTG 及 X-Gal 的 LB 平板筛选阳性克隆, 经酶切电泳鉴定后, 选出可能含插入片段的重组质粒 pGEMNGF, 然后经激光测序仪进行序列分析, 证实插入的 DNA 片段与报道的人 NGF 基因序列完全相同, 为其下一步的表达奠定基础。(重组质粒及表达质粒的构建见图 1)

### 2.1.3 重组表达质粒 pET-NGF 的构建:

将 pGEMNGF 和 pET-3a 分别经 NdeI 和 BamHI 双酶切后, 电泳回收插入片段和线性化载体, 在 T4DNA 连接酶的作用下产生重组表达质粒 pETNGF, 将其转化进 *E. coli* RRI 中进行酶切鉴定, 结果见图版 I-B。

## 2.2 rehNGF 在大肠杆菌中的表达

**2.2.1 pETNGF 在不同宿主菌中的表达:** 将 pETNGF 转化到不同遗传背景含 DE3 溶源菌的大肠杆菌中 (*E. coli* JM109, HMS174 和 BL21) 发酵培养, 分别取 1ml 发酵液的菌体进行 15% SDS-PAGE 检测, 表达量较高的为 pETNGF/HMS174 (DE3) 菌株。Laser 光密度扫描凝胶估算出 rehNGF 约占菌体总蛋白的 10% ~ 12%。图版 I-C 是发酵菌体的 SDS-PAGE

结果, pETNGF/HMS174(DE3) 菌体经 IPTG 诱导后, 在 14kDa 分子量处有一条十分明显的新增蛋白带, 而 pET-3a/HMS174(DE3) 由于无插入片段在该处并不出现此带。

**2.2.2 表达产物的免疫学活性鉴定:** 收集 pETNGF/HMS174(DE3) 发酵液的菌体进行 SDS-PAGE 电泳后, 与兔抗小鼠 NGF 多抗作 Western blot, 结果表明: 工程菌表达的 rehNGF 的分子量约为 14kDa, 且为单一条带, 说明其与小鼠 NGF 抗体有特异的交叉反应(见图版 I-D)。

**2.2.3 表达产物的初步纯化、复性及生物学活性测定:** 经 SDS-PAGE 电泳分析, rehNGF 主要存在于包含体中, 超声破碎离心后的沉淀依次用 0.5% Triton-X, 2mol/L 尿素和 4mol/L 尿素洗涤可使包含体纯度达 60% ~ 80%, 8mol/L 尿素溶解后的变性液经分子筛 SephadexG-150 后纯度可达 95% 以上。包含体经 8mol/L 尿素溶解后, 在氧化型-还原型谷胱甘肽下复性, 复性后的溶液超滤浓缩, 再经透析法逐步除去

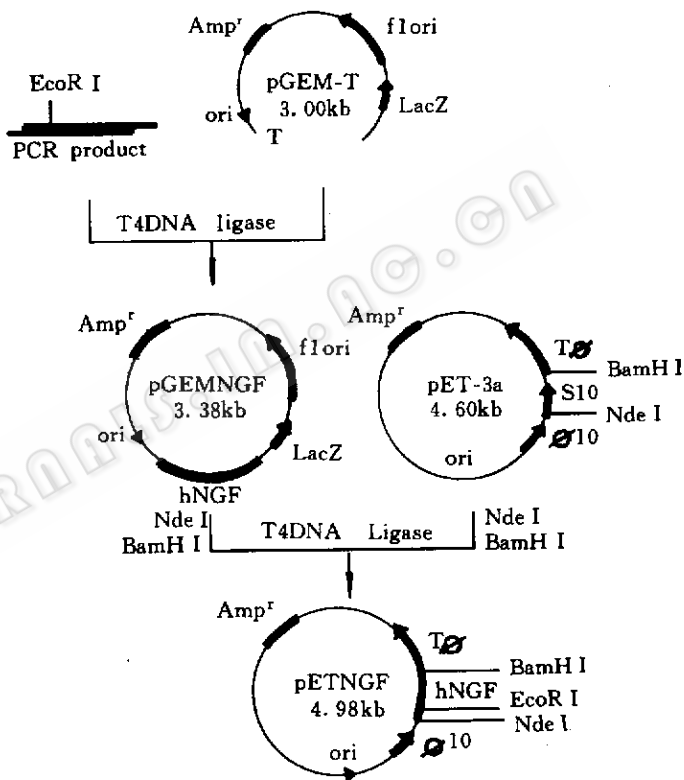


图 1 重组表达质粒的构建图

尿素,离心后取上清,用 8~9d 龄的鸡胚背根神经节测定其生物学活性,结果表明它具有明显的促进 DRG 突起生长的作用,活性可达 100ng/ml,见图 2。

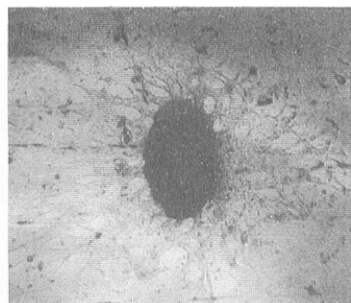


图 2 复性后的 rehNGF(100ng)的生物学活性

中央:8~9d 龄鸡胚背根神经节  
周围:神经纤维突起生长

### 3 讨论

在异源蛋白的表达中,大肠杆菌由于其背景清晰得到广泛的应用。现已用 *E. coli* 基因工程菌生产许多生物制品,例如  $\gamma$ -干扰素、白介素及 TNF 等。但是用该体系表达外源基因常碰到的问题之一便是异源蛋白的不可溶性,造成的原因是多方面的,包括蛋白质本身,大肠杆菌内环境以及生长温度和表达量等。如何使表达的非生物学活性的蛋白复性一直是棘手的问题,虽然许多科学家近年来致力于这方面的研究,但是蛋白质的变性复性问题仍然没有得到解决。

hNGF 是同源二聚体蛋白,其单体含 3 对分子内二硫键,单体间以非共价疏水键相连。它在 *E. coli* 中很难折叠成有活性的蛋白<sup>[6]</sup>,常以包含体的形式存在,即使在分泌载体的表达中也是如此。我们在实验中对 rehNGF 尝试了多种复性方法,如缓慢稀释法、胱氨酸-半胱氨酸法及氧化型-还原型谷胱甘肽法等,研究发现氧化型-还原型谷胱甘肽法最好。此外还发现在复性体系中加入 PEG400 有利于蛋白质的复性,变性蛋白的纯化可以大大提高复性率。进一步的纯化工作还在进行之中。

### 参 考 文 献

- 1 Bradshaw R A. Ann Rev Biochem, 1978, 47: 191~216
- 2 Lindsay R M, Wiegand S J, Altar C A *et al.* TINS, 1994, 17: 182~190
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, 2nd ed, New York: CSH.
- 4 Studier F W. Methods in Enzymology, 1990, 185: 69~89
- 5 Ullrich A, Gray A, Berman C *et al.* Nature, 1983, 303: 821~825
- 6 Negro A, Martini I, Bigon E *et al.* Gene, 1992, 110: 251~256

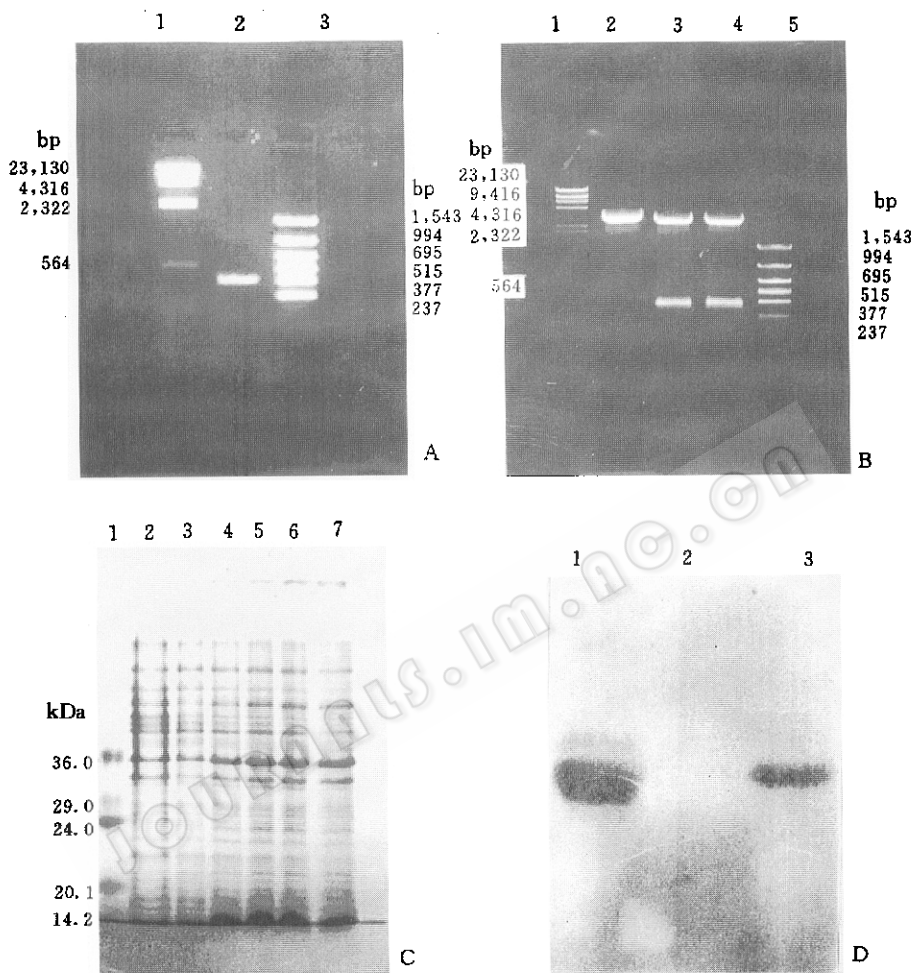
## Molecular Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Human Nerve Growth Factor Gene

Yu Ping Wang Huixin Liu Chuan Liu li Ding Hongmei

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

**Abstract** We cloned the hNGF gene which can be obtained with human genomic DNA as template by PCR into pGEM-T vector and confirmed it by sequencing. Then we constructed successfully expression plasmid pETNGF with pET-3a. The yield of rehNGF in *E. coli* is about 10%~12% of total cellular proteins. The expressed product exists in the form of inclusion largely. The inclusion was denatured with 8mol/L urea and renatured with GSSG-GSH. We examined its activities by Western-blot and DRG method. The result showed that rehNGF has obviously immunological and biological activities.

**Key words** Human nerve growth factor, gene expression, renaturation



A. Analysis of PCR product by 1.5% agarose gel electrophoresis

1. λDNA/Hind III marker; 2. PCR product; 3. PCR marker

B. Analysis of pETNGF after restrictive enzyme digestion

1. λDNA/Hind III marker; 2. pETNGF/EcoRI; 3. pETNGF/EcoRI + BamHI

4. pETNGF/NdeI + BamHI; 5. PCR marker

C. SDS-PAGE analysis of the expression product

1. Protein molecular weight markers

2. Total protein of pET-3a/HMS174(DE3)

3. Total protein of pETNGF/HMS174(DE3)

After the induction time is 0, 1, 2, 4, 8 hour(s) respectively

D. Western Blot analysis of the expression product

1. Mouse 2.5S NGF; 2. Total protein of pET-3a/HMS174 (DE3)

3. Total protein of pETNGF/HMS174(DE3) after the induction