

重组人碱性成纤维细胞生长因子在大肠杆菌中的高效表达*

汪 炬 孙奋勇 陈小佳 张 玲 洪 岸**

(暨南大学生物工程研究所 广州 510632)

摘要: 利用基因改造的方法可以优化外源基因在大肠杆菌中的表达。利用逆转录 PCR 技术从原代培养的人成纤维细胞中克隆出人碱性成纤维细胞生长因子基因, 在不改变氨基酸序列的前提下对该基因的上游部分序列进行改造, 并将其插入表达载体 pET-3c, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达, 表达蛋白占菌体总蛋白的 30% 以上, 并具有良好的生物活性。

关键词: 人碱性成纤维细胞生长因子, 大肠杆菌, 表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0048-04

HIGH EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMAN BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN *ESCHERICHIA COLI*

WANG Ju SUN Fen-Yong CHEN Xiao-Jia ZHANG Lin HONG An

(Bio-engineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract: To improve the expression level of non-fusion hbFGF in *E. coli*, the coding sequence of human hbFGF gene, which had been cloned from primarily cultured human fibroblast, was mutated according to the principle of lowering the GC content and increasing the codon preference. After being ligated into pET-3c and transformed into BL21 (DE3), the recombinant induced by IPTG. Expression level was up to 30% of the total bacterial protein. The result indicated that optimizing of the TIR would promote the expression level of recombinant protein.

Key words: Human fibroblast growth factor, *Escherichia coli*, Expression

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. z18-03-29)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 218-03-29)

* * 联系人 Tel: 85220220, E-mail: ojs@jnu.edu.cn

收稿日期: 2002-05-01, 修回日期: 2002-09-08

成纤维细胞因子指的是一类与调控细胞增殖分化相关的细胞因子家族,目前发现的成员至少有23个。碱性成纤维细胞生长因子(Human Basic Fibroblast Factor, hbFGF)是成纤维细胞因子家族的一个重要成员,又叫做FGF-2,由155个氨基酸组成,分子量在18kD左右。bFGF具有重要的临床应用价值,可以促进创伤愈合,骨修复,治疗老年痴呆,心血管意外等。但由于其在各种组织中的含量极少,因此难以从纯天然的组织中获得,通过基因工程的手段在大肠杆菌中发酵不失为一种理想的方法。在国外,Squier^[1]等构建了pET-3b/hbFGF表达载体,在大肠杆菌BL21(DE3)中表达出具有生物活性的bFGF;在国内,王莉馨^[2]等构建了hbFGF的融合蛋白,表达率为9.9%,在不调整TIR序列的情况下,本所构建的bFGF表达量难以超过10%(资料未显示)。总的来说,依照常规方法构建胞内型表达非融合hbFGF,表达量均不高,未有超过15%的报道。本研究通过对hbFGF上游部分序列的调整,大大提高了hbFGF在大肠杆菌中的表达量。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和细胞株

大肠杆菌表达宿主BL21(DE3)与表达型质粒载体均购自Novagen公司,大肠杆菌DH5 α 和3T3细胞株为本所收藏。

1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶Nde I, BamH I, Bgl II, T₄连接酶, Taq酶均购自NEB, 逆转录酶购自Promega, 蛋白质分子量标准品购自Pharmacia。质粒纯化, PCR纯化, 切胶纯化试剂盒及RNA抽提试剂盒均购自QIAGEN。DMEM培养基与小牛血清购自Hyclone, 引物合成由上海生工完成。

1.3 寡核苷酸引物的设计合成

在设计上游引物时,综合考虑大肠杆菌编码蛋白质密码子的偏好性以及bFGF起始翻译区(Translation initiation region, TIR)的GC含量,在不改变氨基酸序列的前提下,利用DNASIS软件对该基因前20个氨基酸的部分编码子的第3位摇摆碱基进行改造,得到的新序列如下:

5' > gctatcg catatg gc (c→t) gc (c→t) gg (g→t) ag (c→t) at (c→t) acc ac (g→t) ct (g→t) cc (a→g) gc (c→a) ctg ccg ga (g→a) ga (c→t) gg (c→t) gg (c→t) agc gg (c→t) gc (t→g) ttc ccg ccg ggc cac ttc < 3'

下游引物及逆转录引物: 5' > agcc agatct tca gct ctt agc aga cat < 3'

1.4 细胞培养

来自人的皮肤标本中分离成纤维细胞,以含10%小牛血清的DMEM培养基进行原代培养。

1.5 bFGF基因的克隆

用RNA抽提试剂盒分离成纤维细胞总RNA,运用bFGF下游引物进行逆转录,并以cDNA为模板,进行PCR扩增,条件为:94℃变性4 min, 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 33个循环, 72℃延伸10min。切胶回收PCR产物。Nde I与Bgl II双酶切PCR产物,与Nde I与BamH I双酶切pET-3C,按等摩尔比混合,在16℃连接30min,转化感受态细胞DH5 α ,酶切鉴定后,将重组子转化表达菌株BL21(DE3)。

1.6 重组子 PET-hbFGF 序列测定

由大连宝生物工程公司完成。

1.7 重组 hbFGF 的表达与鉴定

取重组子培养过夜,次日按1%转接至20mL LB培养基中,培养至 $OD_{600} = 0.2$,加IPTG至终浓度1mmol/L,继续培养4h。离心收集菌体,裂解液裂解,SDS-PAGE分析鉴定表达产物。

1.8 表达产物的纯化及活性鉴定

菌体悬于100mL破菌溶液中(20mmol/L Tris-HCl, 0.1mol/L NaCl, 2.5mmol/L EDTA, pH7.0),冰浴超声破碎24min, 10,000r/min离心15min,取上清。用Bio-Rex 70(Bio-Rad公司生产)填料装柱(30cm×3cm),用0.1mol/L NaCl + 20mmol/L PBS(pH7.0)平衡柱子,将离心后上清上样,上样量为80mL,上样完成后用平衡液冲洗至基线,再用0.6mol/L NaCl + 20mmol/L PBS(pH7.0)洗脱柱子,收集洗脱峰。用HEPARIN hyper D(Bio sepra公司生产)填料装柱(30cm×3cm),用0.6mol/L NaCl + 20mmol/L PBS(pH7.0)平衡柱子,将阳离子柱下直接上样,上样完成后用平衡液冲洗至基线,1.2mol/L NaCl + 20mmol/L PBS(pH7.0)冲洗,2.0mol/L NaCl + 20mmol/L PBS(pH7.0)洗脱,收集洗脱峰,SDS-PAGE分析鉴定。

使用MTT法来测定重组hbFGF对3T3细胞生长的促进作用。

2 结果

2.1 目的基因的扩增与克隆

以逆转录产物cDNA为模板,PCR扩增后,1.0%的琼脂糖凝胶电泳,在480bp处可见一明显条带,与预计产物大小相吻合。克隆入pET-3C载体后,酶切鉴定,插入片段大小正确(图1)。

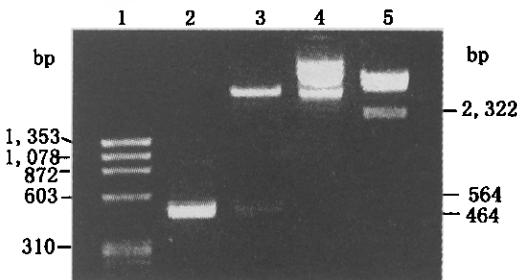


图1 rhbFGF突变基因构建

- 1 λ DNA/*Hind* III 分子量标准, 2 hbFGF突变体PCR产物,
- 3 *Bam*HI的消化产物, 4 pET-3c质粒,
- 5 *Pst*174/*Hae*III 分子量标准

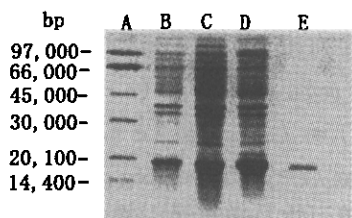


图2 rhbFGFr SDS-PAGE图

- A 相对分子质量标准蛋白, B 菌体破碎后上清, C 菌体破碎后沉淀,
- D 菌体总蛋白, E 经亲和层析纯化后的rhbFGF

2.2 重组子序列分析

编码序列前段被成功引入突变,但氨基酸序列没有变化,后续序列与GeneBank登录的序列相一致。

2.3 重组子在大肠杆菌中的表达和纯化

经 IPTG 诱导表达 4h 后, SDS-PAGE 电泳, 发现约 18kD 处有一明显条带, 与 bFGF 分子量大小吻合。薄层扫描结果表明, 表达量占菌体蛋白的 30% 以上 (图 2), 其中上清中可溶性表达约占一半。图 2 还表明经阳离子交换和亲和两步层析 (图 3, 4), 得到 SDS-PAGE 电泳为单一条带, 纯度达到 95% 以上的 rhbFGF 纯品。

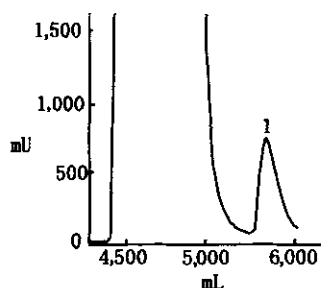


图3 rhbFGF 阳离子交换层析图

1 rhbFGF 活性峰

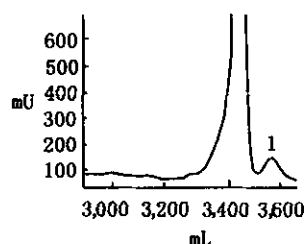


图4 rhbFGF 亲和层析图

1 rhbFGF 活性峰

2.4 活性测定

将纯化后的 rhbFGF 及 bFGF 参比品使用 MTT 法检测其生物学活性, 发现 3T3 细胞的生长曲线与参比品相似 (图 5)。

3 讨论

使用基因工程的方法生产蛋白质药物的一个关键是如何尽量降低成本, 而降低成本的一个主要方法就是增加基因的表达量。一般认为, 外源基因在大肠杆菌中的表达量很大程度上为翻译起始区 (Translation Initiation Region, TIR) 所决定, 较高的 GC 含量会形成较稳定的二级结构, 阻碍了转录和翻译的有效进行^[3,4]。此外, 大肠杆菌对编码氨基酸的不同密码子有一定的偏好性, TIR 中连续出现的稀有密码子会导致翻译的提前终止^[5,6], 降低 mRNA 的半衰期, 以及翻译的移框突变。但是, 关于 TIR 的范围尚无定论, Ganoza 等人认为开放性阅读框起始密码子上下游 70 个核苷酸的范围为 TIR 区域^[7]。我们统计了 bFGF 前 10 个和 20 个氨基酸编码序列中的 GC 含量分别高达 70% 和 78%, 并散在分布有 6 个稀有密码子, 这样的基因结构显然对表达不利, 必须进行适当调整。本研究考虑到重组质粒 bFGF 上游为表达载体 PET-3c 的固有序列, 已经过充分优化, 我们将序列调整的重点放在 bFGF 的 N 端前 20 个氨基酸的编码序列, 前提是不改变蛋白质的编码序列, 改造后的 GC 含量降低为 50%, 取得了较好的效果。

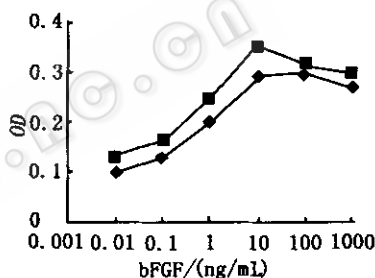


图5 rhbFGF 促 NIH3T3 细胞分裂活性图

◆ rhbFGF, ■ bFGF 参比品

参考文献

- [1] Squires C H, Childs J, Eisenberg S P, et al. J Biol Chem, 1988, 263: 16297 ~ 16302
- [2] 王莉馨, 刘亚娟, 林 剑, 等. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8 (2): 142 ~ 144.
- [3] Benedetti G, Santis P D, Morosetti S. Nucleic Acids Research, 1989, 17 (13): 5149 ~ 5161.
- [4] Sanli G, Blaber S I, Blaber M. J Mol Microbiol Biotechnol, 2001, 3 (1): 123 ~ 126.
- [5] Andersson S G E, Kurland C G. Mol Biol Evol, 1991, 8 (4): 530 ~ 544.
- [6] Blake R D, Hinds P W. J Biomol Struct Dyn, 1984, 2 (3): 593 ~ 606.
- [7] Ganoza M C, Louis B G. Biochimie, 1994, 76 (5): 428 ~ 439.