

# 人转化生长因子 $\beta 1$ cDNA 的克隆及其原核表达

谢昌平 马 翥 李 平 赵寿元 李昌本

(复旦大学遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

**关键词** TGF- $\beta 1$ , pRSET-B, 原核表达

**分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0113-15

转化生长因子  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) 属于生物学功能很广泛的 TGF- $\beta$  超家族的一个成员, 对细胞增殖和分化、免疫系统、细胞粘连、肿瘤发生与恶变、神经系统的发育与建成等方面都有重要作用<sup>[1~3]</sup>。临床上, TGF- $\beta 1$  可用于创伤愈合以及软骨和骨组织损伤的修复, 特别是与 TGF- $\beta 3$  的联合应用, 可加速伤口愈合同时避免疤痕形成, 因此这方面有着广阔的应用前景。

天然的 TGF- $\beta 1$  成熟蛋白不存在糖基化位点, 能够在大肠杆菌中获得有活性的基因工程产物。我们根据已知的人 TGF- $\beta 1$  基因顺序, 设计了一对引物, 引入适当克隆位点, 采用 DNA 测序证实后, 采用了多种大肠杆菌表达载体系统并分析其表达状况, 最好得到稳定表达的基因工程菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种: DH5 $\alpha$ , *supE44* $\Delta$ *lacU169* (80*lacZM15*) *hsdR17**recA**gyrA96**thi-1**relA1*; JM109, *supE44* *thi* *recA1* *endA1* *hsdR17* *gyrA96* *relA1* (*lac-proAB*) F' [*traD36* *proAB* + *lac1q**lacZM15*];

DE3, *endA1* *recA1* *gyrA96* *thi* *hsdR17* (*rk*<sup>-</sup>, *mk*<sup>+</sup>) *relA1* *supE44* (*lac-proAB*) F' [*traD36* *proAB**lac1qZAM15*](DE3)。

载体: pUC119, pRSET-B, pET22b, pJLA503; 均为本实验室保存。兔抗人 TGF- $\beta 1$  多克隆抗体购于 Santa Biotechnology Inc. 酶标绵羊抗兔 IgG(HRP) 购于华美公司。

### 1.2 方法

1.2.1 人 TGF- $\beta 1$  cDNA 片段的克隆: 根据人的 TGF- $\beta 1$  基因序列, 设计 PCR 引物。5'引物: GGA AGC TTA GCA TAT GGC CCT GGA CAC CAA CTA CTG CTT CA, 3'引物: GCA AAG CTT TCA GCT GCA TTT GCA GGA GCG CA。从人的 cDNA 文库中 (Clontech Co.) 用 PCR 方法进行扩增。PCR 反应条件为: 93℃ 预变性 180s, 92℃ 30s, 56℃ 45s, 72℃ 45s 为一个循环, 进行 30 个循环的 PCR 扩增; 最后 72℃ 180s 延伸反应。反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。回收和纯化 PCR 产物, T4DNA 多聚酶切平末端, 连接在 pUC119 载体中, 命名为 pUF10。

1.2.2 双链测序: 大量抽提 pUF10 质粒, 测序, 方法按 USB Kit 所附说明操作。用 dGTP 验证测序结果的正确性。测序方法相同。

1.2.3 诱导表达: 转入表达载体 pRSET-B, 构建了两种重组子, 即融合与非融合两种形式, 其中 pRSETB-TGF(HindIII 插入) 重组子命名为 pTGF6, 其 5' 端有一段载体融合序列。按常规方法诱导表达<sup>[5~7]</sup>。噬菌体诱导表达如下: 接种新鲜菌落于 2 mL Super LB(200  $\mu$ g/mL Amp) 中, 37℃ 培养至 OD<sub>600</sub>

收稿日期: 1997-10-27, 修回日期: 1998-10-07。

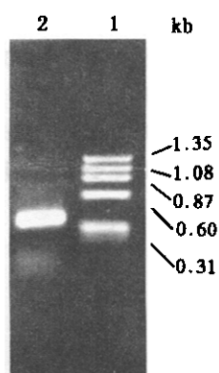


图1 PCR扩增  
TGF- $\beta$ 1 cDNA 片段

1. 分子量标记,  $\Phi$ X174/  
Hae III DNA  
2. TGF- $\beta$ 1 片段

=0.3, 5%接种于 2 mL Super LB 中, 振荡培养至  $OD_{600} = 0.5$ , 以  $MOI = 10$  加入 M13/T7 诱导 5~6 h。

1.2.4 Western blotting 免疫蛋白印迹分析: 发酵产物总蛋白 SDS-PAGE 电泳分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上进行免疫印迹分析。所有方法均按文献[8]操作。

## 2 结 果

### 2.1 PCR 扩增 TGF- $\beta$ 1 成熟蛋白编码区及序列验证

根据引物的核苷酸组成预测其  $T_m$  值, 做了一系列复性温度梯度试验, 以确定最佳温度。并通过加入 1% DMSO 以提高反应特异性, 从而确定了最佳反应条件。图 1 示 PCR 扩增出特异性片段为 363bp。DNA 序列分析证明与已报道的基因序列一致。

### 2.2 重组子的发酵及表达产物的 SDS-PAGE 分析

重组子 pRSETB-TGF- $\beta$ 1 的发酵产物用 SDS-PAGE 分析, 以检测表达状况及初步确定其表达量。从图 2 可以看到, 诱导后的产物在分子量约 17 kD 处有一明显染色带。SDS-PAGE 胶经薄层扫描和积分计算其表达量占细菌总蛋白量的 10.6%。

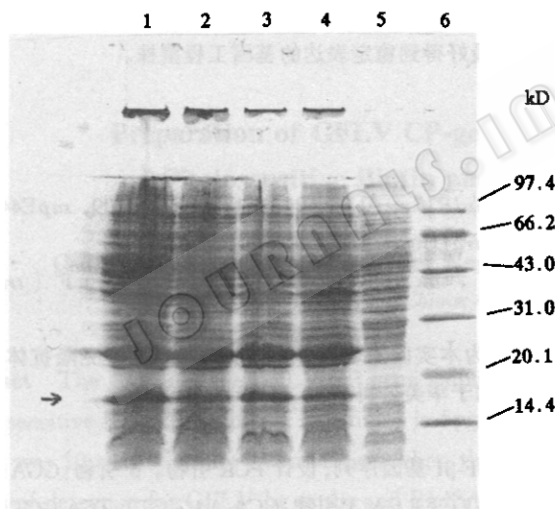


图2 表达产物 SDS-PAGE(15%凝胶)电泳

1, 2, 3, 4 分别为 pTGF6 用 1 mmol/L IPTG 诱导 4, 6, 8, 12 h 后电泳结果。5 为 pRSET-B 用 1 mmol/L IPTG 诱导后电泳结果。6 为蛋白分子量标记

### 2.3 Western blot 鉴定表达产物

以免抗人 TGF- $\beta$ 1 多抗为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔为二抗进行 Western blot 分析, 在 17 kD 处可见清晰条带, 如图 3。

## 3 讨 论

我们在 PCR 扩增获得 TGF- $\beta$ 1 编码区 cDNA 片段后, 把有效表达其它细胞因子的表达系统用于 TGF- $\beta$ 1 的表达都未得到满意的结果。通过毒性实验证实外源重组 TGF- $\beta$ 1 对宿主菌有很大的毒性。我

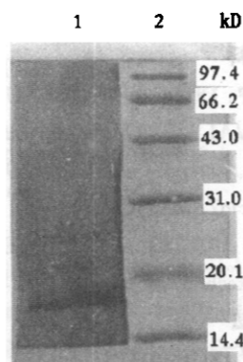


图3 重组子 pTGF6 发酵产  
物 Western blot 分析

1. 样品 2. 蛋白质分子量标记

们考虑到 TGF- $\beta 1$  的表达并不是唯一的例子,外源表达产物不利于宿主菌的生长从而影响表达产物本身的积累,可能是一个相当普遍的现象。研究解决这个问题将有利于原核基因工程的发展。为此,实验了以下方法以期获得稳定表达。

(1)按照本实验室已有的一些经验,如加大接种量,低温休克等。但运用到本研究中效果并不理想。

(2)pET22b 是一种分泌型载体,在其多克隆位点有一段 pr1B 信号肽序列。试用 pET22b 载体表达是希望外源蛋白表达后分泌到周质空间,避免在细胞质内大量积累而影响菌体活力。但结果并没有得到很大改善。

(3)我们对 pRSETB 载体构建了融合与非融合两种重组子,目的是为了克服 TGF- $\beta 1$  mRNA 5'端可能引入的不利于表达的因素。因为有报道认为,mRNA 5'端的二级结构会阻碍核糖体向下游翻译,从而严重影响表达效率。但在常规的诱导表达条件下,仍未得到稳定的表达。为了降低蛋白在诱导前渗漏表达而抑制菌体生长,我们采用了 M13/T7 这一表达体系。本体系是在加入 IPTG 后引入 T7RNA Polymerase,从而避免了诱导前渗漏表达,得到很好的效果。

### 参 考 文 献

- [1] J. Massague. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 1990, **6**:597~641.
- [2] F Zhang. *et al. Science*, 1997, **275**:1318~1320.
- [3] M. R. I. Young *et al. J. Immunol.*, 1996, **156**(5):1916~1922.
- [4] P. Martin. *Science*, 1997, **276**:75~81.
- [5] H. L. Chang *et al. Cancer Research*, 1993, **53**:4391~4398.
- [6] M. Yamazaki *et al. American Journal of Pathology*, 1994, **144**(2):221~226.
- [7] B. B. Samuel *et al. Biochemic et Biophysica Acta*, 1995, **1260**:27~34.
- [8] J. Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

## Cloning of hTGF- $\beta 1$ cDNA and Studying on Its Expression in *Escherichia coli*

Xie Changping Ma Biao Li Ping Zhao Shouyuan Li Changben

(State Key Lab of Genetics Engineering, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** A pair of primers was designed according to the sequence of human TGF- $\beta 1$  gene and a cDNA fragment encoding the mature TGF- $\beta 1$  was obtained from a human cDNA library by PCR amplification. After identified by DNA sequencing, the cDNA fragment was subcloned into a prokaryotic expression vector pRSET-B and then transformed into the host cells *E. coli* JM109. The transformants steadily produce the hTGF- $\beta 1$  after induced by 1mmol/L IPTG in the M13/T7 system. The immunogenicity of the engineered products was verified as same as the natural human TGF- $\beta 1$  by Western blot analysis. In present work, the result of several expression systems were compared and one of the protocols was demonstrated to be effective for the expression of TGF- $\beta 1$  which may be harmful to the host cells. We inferred that this protocol might be helpful to steadily express the foreign gene, the product of which was toxic to the host cell.

**Key words** TGF- $\beta 1$ , pRSET-B, prokaryotic expression