

重组人神经生长因子 rh- β -NGF 真核表达载体的构建及其在 HEK293 细胞中的表达

李景传¹, 薛博夫², 袁媛¹, 马墨², 朱林², Rebecca Milburn², 李乐¹, 胡沛臻¹, 叶菁¹

1 第四军医大学基础部病理教研室, 陕西 西安 710032

2 深圳市港科深研生物科技有限公司, 广东 深圳 518067

李景传, 薛博夫, 袁媛, 等. 重组人神经生长因子 rh- β -NGF 真核表达载体的构建及其在 HEK293 细胞中的表达. 生物工程学报, 2015, 31(3): 411–420.

Li JC, Xue BF, Yuan Y, et al. Construction of recombinant human nerve growth factor (rh- β -NGF) eukaryotic vector and its expression in HEK293 cells. Chin J Biotech, 2015, 31(3): 411–420.

摘 要: 为大量制备 β -NGF, 构建了一种稳定、高效表达重组人神经生长因子 (Recombinant human nerve growth factor, rh- β -NGF) 的真核表达载体及含该重组载体的 HEK293 细胞株。首先, 构建重组质粒 pCMV- β -NGF-IRES-dhfr 并转染至 HEK293 细胞系, 用 MTX 加压筛选和有限稀释法进行选择, 获得高效表达 rh- β -NGF 的单克隆重组细胞株; 随后逐步降低血清培养, 最终使细胞株完全适应无血清培养基并稳定表达 rh- β -NGF; SDS-PAGE 分析该表达产物, 可见相对分子质量约 13 kDa 的条带, 纯度大于 50%, 经质谱法测定得到其肽图谱与理论序列完全匹配, 接着利用离子交换层析和分子筛层析纯化 rh- β -NGF; 最后进行重组细胞株表达效率和表达稳定性检测, 表明重组细胞株可稳定、高效表达 rh- β -NGF, 其分泌效率大于 20 pg/(cell·d), 并能诱导 PC12 细胞的分化, 具有良好的生物学活性。

关键词: 重组, 神经生长因子, 真核载体, HEK293 细胞, 活性鉴定

Received: May 13, 2014; **Accepted:** August 11, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81101711, 81101752), National Major Special Program of New Drug Research and Development (No. 2009ZX09102-226).

Corresponding author: Jing Ye. Tel: +86-29-84772257; E-mail: yejing1219@gmail.com

国家自然科学基金 (Nos. 81101711, 81101752), 重大新药创制科技重大专项 (No. 2009ZX09102-226) 资助。

Construction of recombinant human nerve growth factor (rh- β -NGF) eukaryotic vector and its expression in HEK293 cells

Jingchuan Li¹, Bofu Xue², Yuan Yuan¹, Mo Ma², Lin Zhu², Rebecca Milburn², Le Li¹, Peizhen Hu¹, and Jing Ye¹

¹ Department of Pathology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

² Eureka Biotechnology, LTD, Shenzhen 518067, Guangdong, China

Abstract: Human nerve growth factor (NGF) is a nerve cell growth regulation factor, which can provide nutrition for the neurons and promote the neurites outgrowth. In order to produce large-scale recombinant human nerve growth factor (rh-beta-NGF), we constructed a plasmid vector, which can stably express the rh-beta-NGF in the HEK293 cell lines. First, the plasmid of pCMV-beta-NGF-IRES-dhfr was constructed and transformed into HEK293 cells. Then MTX pressurized filter and limiting dilution methods were used to obtain monoclonal HEK293 cell lines. After stepwise reducing serum in culture media, the cells eventually adapted to serum-free medium and secreted rh-beta-NGF. SDS-PAGE analysis revealed that the expression product owned a molecular weight of about 13 kDa and a purity of more than 50%. The peptide mapping sequencing analysis demonstrated the sequences of rh-beta-NGF matched with the theoretical ones. Later we purified this protein by ion exchange and molecular sieve chromatograph. Finally, our experimental results exhibited that the recombinant cell lines can stably express rh-beta-NGF with a high efficiency of more than 20 pg/cell·day. In addition, this protein could successfully induce differentiation of PC12 cells. In summary, our recombinant HEK293 cells can express bio-active rh-beta-NGF with great efficiency and stability, which supply a valid basis to large-scale production of rh-beta-NGF.

Keywords: recombinant, nerve growth factor (NGF), eukaryotic vectors, HEK293 cells, biological activities identification

神经生长因子 (NGF) 是神经营养因子中最早被发现、目前研究最为透彻的一种神经细胞生长调节因子, 具有神经元营养和促突起生长双重生物学功能, 它对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用^[1]。关于 NGF, 已有很多的基础研究和临床应用, 旨在应用 NGF 作为保护和治疗神经系统疾病的高效药物。而且近年研究认识到 NGF 并不仅仅局限于中枢以及周围神经系统甚至不仅局限在神经细胞水平, 还在褥疮^[2]、角膜溃疡^[3]、青光眼^[4]和免疫性疾病的治疗中发挥着积极的作用^[5]。目前生产 NGF 的

方法主要有两种^[6]: 一种是从小鼠颌下腺提取的分子量约为 13–14 kDa, 沉降系数为 2.5 S 的 β -NGF, 此种方式所获得的 β -NGF 具有如下缺点: 1) 鼠 NGF 与人 NGF 在蛋白序列上有 10% 的差异^[7], 使其具有免疫原性, 可能诱发抗体反应, 从而降低药效; 2) 具有鼠源病毒交叉感染的安全隐患; 3) 生产依赖活体动物。另一种是由原核表达系统 (*E. coli*) 重组表达制备, 此种方式的缺陷是蛋白不能进行翻译后修饰, 所得 β -NGF 活性明显低于天然 β -NGF^[6,8]。因此, 开发一种可稳定、高效表达天然活性 β -NGF 的表达系统具有重要的临床意义及商业价值。本实

验在人 HEK293 细胞中表达重组人 β-NGF (Recombinant human β-NGF, rh-β-NGF), 构建一种可稳定、高效表达天然活性 β-NGF 的重组表达载体, 和基于该重组表达载体的重组真核细胞株, 以及基于该重组真核细胞株的生产人 β-NGF 的方法, 为大量制备 β-NGF 提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂

人 HEK293 细胞、PC12 细胞购自 ATCC 细胞库; pCMV-MCS 载体、pIRES2-EGFP 质粒购自 Addgene 公司; Trizol 试剂盒、MTX、Superscript III 逆转录酶、*pfx* DNA 聚合酶、FreeStyle293 培养基购自 Invitrogen 公司; DNA marker、*Xho* I 和 *Bgl* II 剪切酶、*Bam*H I 酶和 *Hind* III 酶购自 TaKaRa 公司; DEME 完全培养基、胎牛血清、马血清购自 Gibco 公司; 蛋白 marker 购自 Thermo Fisher 公司; 注射用鼠神经生长因子购自舒泰神 (北京) 生物制药股份有限公司产品, 即苏肽生; 引物合成和基因测序由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

1.2 人 β-NGF 基因的克隆及 pCMV-β-NGF 重组载体的构建

使用 Trizol 试剂盒提取人胎盘细胞总 RNA, 所得总 RNA 为模板, 使用 Superscript III 逆转录酶逆转录合成 cDNA 库, 使用特异性扩增 β-NGF 基因全长的引物, 在 *pfx* DNA 聚合酶的催化下进行 PCR 扩增; PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1 min, 30 个循环。特异性扩增 β-NGF 基因全长的上、下游引物序列如表 1 所示, 引

物分别包括了 *Bam*H I 和 *Hind* III 的酶切位点, 上游引物上还设计了 *Kozak* 序列 (GCCACCATGG)^[9], 并且点突变了 β-NGF 基因 ATG 启动密码子后第一个碱基 (T 突变成 G); 下游引物上包含两个终止码 (TGATAA)。收集并纯化 PCR 扩增产物, 利用上、下游引物上的酶切位点: *Bam*H I 和 *Hind* III 将扩增片段构建到 pCMV-MCS 载体 (包含 CMV 启动子和 β 球蛋白基因内含子序列) 上, 得到重组质粒 pCMV-β-NGF, 进行酶切电泳及测序分析。

1.3 重组质粒 pCMV-β-NGF-IRES-dhfr 的构建

1.3.1 PCR 扩增 IRES

以 pIRES2-EGFP 质粒为模板, 以 *IRES* 正向引物 (包含 *Xho* I 酶切位点) 和 *IRES-dhfr* 反向融合引物 (表 1) 为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 45 s, 30 个循环, 得到长度为 612 bp 的扩增片段 IRES, 收集并纯化。

1.3.2 PCR 扩增 dhfr

以人 HEK293 细胞总 RNA 逆转录合成的

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>β-ngf</i> -F	GGGATCCGCCACCATGGCCATGTTGTTCTACACTCTG
<i>β-ngf</i> -R	CCC <u>AAGCTT</u> TTTATCAGGCTCTTCTCACAGCCTTCCTGC
<i>ires</i> -F	GCC <u>CTCGAG</u> GCCCCCTCTCCCTCCCCC
<i>ires-dhfr</i> -R	CAATGGTCGAACCATGGTTGTGGCCATTATCA
<i>ires-dhfr</i> -F	TGATAATATGGCCACAACCATGGTTTCGACCATG
<i>dhfr</i> -R	CCC <u>AGATCT</u> TTAGTCTTTCTTCTCGTAG

Restriction site were underlined. F: forward primer; R: reverse primer.

cDNA 为模板,以 *IRES-dhfr* 正向融合引物和 *dhfr* 反向引物 (包含 *Bgl* II 酶切位点, 序列如表 1 所示) 为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 45 s, 30 个循环。得到长度为 592 bp 的扩增片段 *dhfr*, 收集并纯化。

1.3.3 PCR 融合扩增 *IRES-dhfr*

将以上 PCR 扩增片段 *IRES* 和 *dhfr* 为模板, 以 *IRES* 正向引物和 *dhfr* 反向引物进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 48 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 45 s, 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 80 s, 55 个循环, 得到 *IRES* 与 *dhfr* 的融合片段, 片段长度为 1 170 bp, 收集并纯化 *IRES-dhfr* 融合片段。

1.3.4 *IRES-dhfr* 构建至 pCMV- β -NGF

将上述 *IRES-dhfr* 融合片段用 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切, 所得酶切产物与经 *Xho* I 和 *Bgl* II 酶切处理的 pCMV- β -NGF 重组载体连接, 即得 pCMV- β -NGF-*IRES-dhfr* 重组质粒, 进行酶切电泳及测序分析。

1.4 β -NGF 重组细胞株的构建及鉴定

1.4.1 HEK293 细胞的转染与稳定筛选

使用氯化铯密度梯度离心法纯化 pCMV- β -NGF-*IRES-dhfr* 质粒, 备后续步骤使用。用 DEME 完全培养基 (含 10% 小牛血清), 在 37 °C、5% CO₂ 的环境下培养 HEK293 细胞至 60% 单层, 用磷酸钙共沉淀方法转染纯化后的 pCMV- β -NGF-*IRES-dhfr* 质粒至 HEK293 细胞中; 24 h 后更换培养基, 并加入 50 nmol/L 的 MTX 进行筛选。当细胞适应选择压力后, 逐次递增 MTX 浓度, 依次为 100、200、400、800 nmol/L。

当细胞适应 800 nmol/L 的 MTX 后, 进一步提升 MTX 浓度至 1 000 nmol/L, 并使用有限稀释法选择高效表达 β -NGF 的单克隆细胞株, 即为 β -NGF 重组细胞株。我们通过此方法筛选出 10 株可稳定表达 β -NGF 的重组细胞株。

1.4.2 重组细胞株无血清培养基适应及表达产物的电泳鉴定

重组细胞株通过逐步降低血清培养的方式, 使其先适应了含 1% FBS 的 DMEM 培养基, 接着在转瓶培养的方式下, 逐步用 FreeStyle293 无血清培养基替换 DMEM 培养基, 最终完全替换, 使其完全适应 FreeStyle293 无血清培养基。收集适量培养基, 取样进行 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色、脱色。

1.4.3 质谱鉴定表达产物 rh- β -NGF

实验采用毛细管液相色谱分离-电喷雾离子化-四级杆-飞行时间质谱法 (UPLC-ESI-Q-TOF-MS) 对 β -NGF 进行肽图谱测定: β -NGF 用胰蛋白酶水解后溶于 0.1% (V/V) 甲酸溶液, 用反相纳升级液相色谱-电喷雾串联质谱进行分析。采用 BEH130 毛细管液相色谱, 样品上样 10 μ L 至富集柱 (180 μ m \times 20 mm, Symmetry C18 trap column) 上, 用缓冲液 A (即 0.1% 甲酸水溶液) 以 10 μ L/min 流速脱盐 10 min, 在线切换至反相 C18 分离柱 (75 μ m \times 250 mm)。洗脱梯度为: 体积含量为 1%–5% 的缓冲液 B (即含 0.1% 甲酸的乙腈溶液) 5 min, 然后在 90 min 内升高至体积含量为 40% 的缓冲液 B, 之后以体积含量为 99% 的缓冲液 B 冲洗分离柱 15 min, 流速为 200 nL/min。根据由胰蛋白酶理论水解位点推断的 β -NGF 胰蛋白酶肽图谱的特征碎片离子数据, 对所得质谱肽图进行分析。

1.4.4 rh- β -NGF 的纯化及纯化产物的鉴定

收集含 rh- β -NGF 的培养上清 1 200 mL, 用 0.45 μ m 滤膜微滤, 随后用超滤膜超滤浓缩约 8 倍。超滤液上样于 SP Sepharose FF 强阳离子层析介质 (机型: GE Healthcare 的 AKTA Purifier 10), 平衡缓冲液是 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.0, 洗脱缓冲液是 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液、1 mol/L NaCl, pH 6.0, 流速 3 mL/min, 用 20 个柱体积进行 0–100% 线性洗脱, 收集目标峰, 无菌分装。另外, 为检测纯化后 rh- β -NGF 的纯度和浓度, 取以上小量目标蛋白洗脱峰, 上样于 Superdex 75 10/300 GL 预装柱 (机型: Agilent 公司的 1260 Infinity LC), 层析缓冲液是 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.0, 流速 1 mL/min, 收集目标峰。在液相色谱曲线中, 根据各组分的峰面积值计算出 rh- β -NGF 的纯度, 采用内标对比法测定蛋白的浓度。纯化后 rh- β -NGF 进行 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色、脱色。

1.5 PC12 诱导法检测重组细胞株所分泌 rh- β -NGF 的活性

在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 环境下用 DMEM 完全培养基 (含 5% 胎牛血清, 12% 马血清) 培养 PC12 细胞至 90% 单层, 胰酶消化细胞, 并将消化后的细胞按每孔 5×10^5 个细胞种植于六孔板中; 24 h 后, 清除所有培养基并于每孔内加入 2 mL 新鲜培养基和系列浓度的 rh- β -NGF, rh- β -NGF 终浓度为 0、10、25、50、100、150 ng/mL, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的饱和水汽二氧化碳培养箱中培养 24 h; 以空载体 pCMV-MCS 转染的 HEK293 细胞上清组作阴性对照组, 以加入相应等同终浓度的注射用鼠神经生长因子 (苏肽生) 作阳性对照组, 在相差显微镜下观察 PC12 细胞形态。

1.6 重组细胞株分泌 rh- β -NGF 的效率检测

选出 6 株稳定表达 β -NGF 的重组细胞株置于装有低血清培养基 (含 1% FBS) 的摇瓶中培养, 1–2 d 后, 离心收集细胞, 并用新鲜培养基悬浮, 调整细胞密度为 1×10^6 细胞/mL, 继续培养 24 h 后收集培养基, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 同时进行电泳的还有系列稀释的 BSA 标准品, 电泳结束后将凝胶进行考马斯亮蓝染色和脱色。

1.7 重组细胞的细胞系稳定性试验

重组细胞株在无 MTX 低血清的培养基 (含 1% FBS) 中传代 30、40、50 次和 60 次后, 各取 2×10^6 个细胞种植在 60 mm 培养皿里, 更换新鲜培养基培养 24 h 后, 收集培养基进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 每泳道上样 15 μ L, 电泳结束后用考马斯亮蓝染色和脱色。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒 pCMV- β -NGF 的鉴定

重组表达质粒 pCMV- β -NGF 经测序分析证实, β -NGF 基因片段已整合重组质粒中, 含有与 GenBank (Accession No. 4803) 公开的人 β -NGF 基因全长序列完全相同的序列。对 pCMV- β -NGF 进行酶切鉴定, 得到大小为 749 bp 和 4 270 bp 的两条带, 结果与预期一致 (图 1)。

2.2 重组表达质粒 pCMV- β -NGF-IRES-dhfr 的鉴定

DNA 测序结果显示该重组质粒包含 CMV 启动子、 β 球蛋白基因内含子、 β -NGF 基因全长、IRES 序列和 dhfr 基因。用 Xho I 和 Bgl II 双酶切对 pCMV- β -NGF-IRES-dhfr 进行酶切鉴定, 得到大小为 1 158 bp 和 4 942 bp 的两条带, 结果与预期一致 (图 2)。

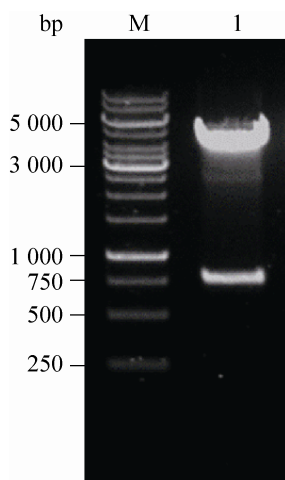


图1 重组质粒 pCMV-β-NGF 琼脂糖电泳分析
Fig. 1 Agarose electrophoresis analysis of pCMV-β-NGF.

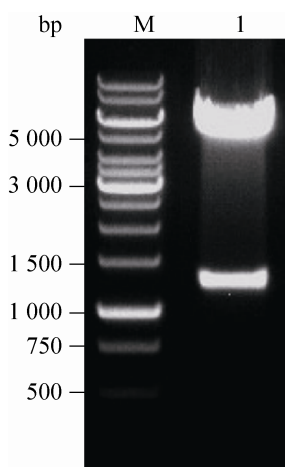


图2 重组质粒 pCMV-β-NGF-IRES-dhfr 琼脂糖电泳分析
Fig. 2 Agarose electrophoresis analysis of pCMV-β-NGF-IRES-dhfr.

2.3 重组细胞株分泌 rh-β-NGF 的 SDS-PAGE 鉴定

重组细胞株可以分泌 rh-β-NGF 到液态培养基中。我们将一株已适应 FreeStyle293 无血清培养基的 β-NGF 重组细胞株按 1×10^6 /mL 的起始密度置于装有 FreeStyle293 无血清培养基的摇瓶中连续培养 6 d, 期间每天收集适量培养基, 并

更换新鲜培养基。对第 1-6 天的取样结果进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 (1、2、3、4、5、6 分别代表第 1、2、3、4、5、6 d 所收集的培养基, 每个泳道上样量为 15 μL 培养基), 以 FreeStyle293 无血清培养基作阴性对照。经考马斯亮蓝染色和脱色 (图 3), 在大约 13 kDa 的位置处有明显条带, 纯度在 50% 以上。

2.3.1 rh-β-NGF 的质谱鉴定结果

分泌所得 rh-β-NGF 经质谱鉴定, 有 13 段与理论序列相匹配的肽段, 其中有代表性的 6 段序列及所处位置如表 2 所示, 部分相应质谱图如图 4 所示。质谱所测得的 rh-β-NGF 肽段序列与理论 β-NGF 基因翻译蛋白序列相符。

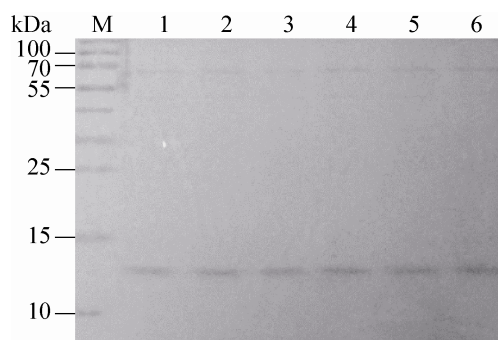


图3 重组细胞株表达 rh-β-NGF 的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE profile of rh-β-NGF. M: marker; 1-6: rh-β-NGF expression of recombinant cell lines in 1-6 days.

表2 与理论序列相匹配的肽段及位置

Table 2 Positions of peptides matching theoretical sequence

Peptides matching theoretical sequence (5'-3')	Positions
GEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIK	10-32
GKEVMVLGEVNINNSVFK	33-50
QYFFETK	51-57
GIDSKHWNSYCTTTHTFVK	70-88
FIRIDTACVCVLSR	101-114
IDTACVCVLSRK	104-115

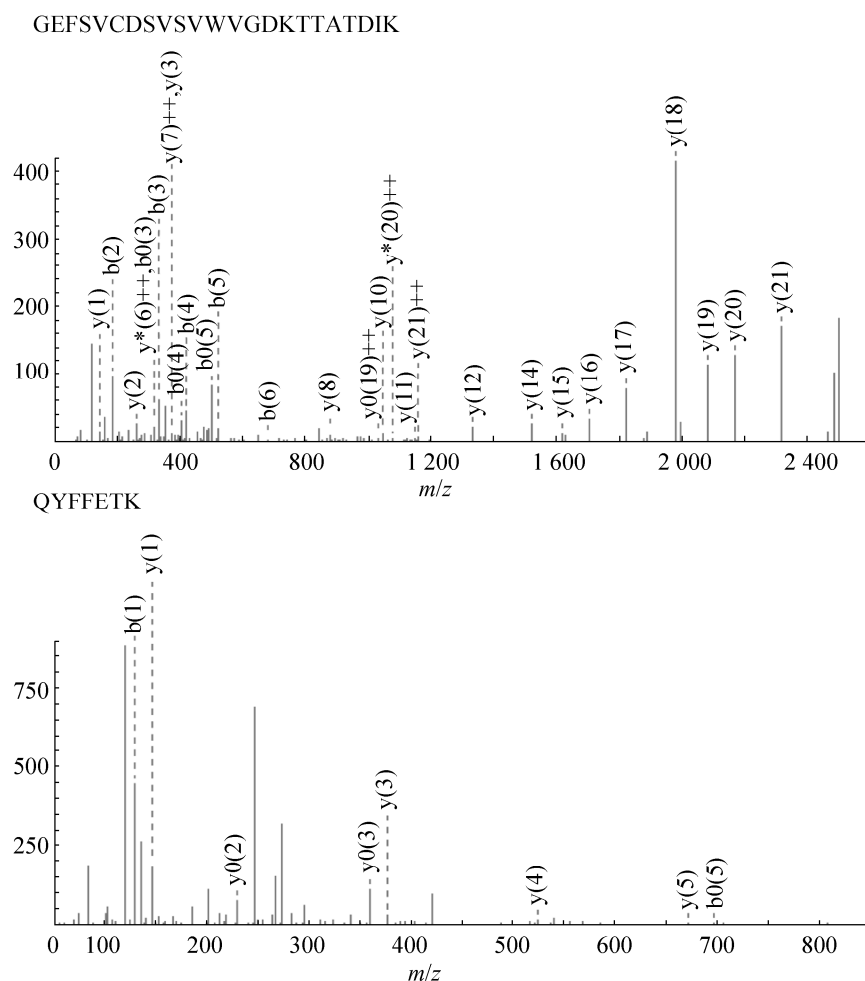


图 4 重组细胞株所分泌 rh- β -NGF 的部分质谱图

Fig. 4 Some mass spectrograms of rh- β -NGF.

2.3.2 纯化产物的鉴定结果

纯化的 rh- β -NGF 经 SDS-PAGE 分析, 大约 13 kDa 的位置处有明显条带, 经 Quantity One 软件分析, 纯度在 95% 以上, 与 HPLC 测纯度结果 >91.7% 相符 (图 5)。另外, HPLC 测蛋白浓度结果为 0.163 mg/mL, 与 Bradford 法测蛋白浓度结果 0.159 mg/mL 相符。

2.4 PC12 细胞经 rh- β -NGF 诱导得到分化

PC12 细胞经诱导后成簇生长, 细胞有纤维状突起的细胞簇为阳性细胞簇, 所诱导阳性细

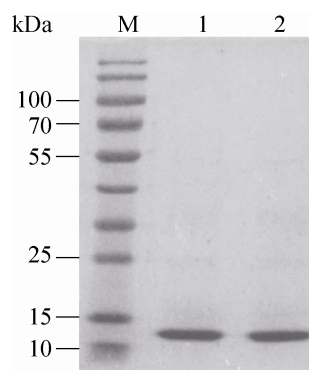


图 5 纯化 rh- β -NGF 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE profile of purified rh- β -NGF. M: marker; 1-2: purified rh- β -NGF.

胞簇的比例反映了 β -NGF 的活性。与注射用鼠神经生长因子 (苏肽生) 组相似, 重组细胞株分泌的 rh- β -NGF 组可见阳性细胞簇, 而阴性对照组则无阳性细胞簇 (图 6); 说明重组细胞株所分泌的 β -NGF 具有诱导 PC12 细胞分化的活性。

统计不同浓度 rh- β -NGF 组以及注射用鼠神

经生长因子 (苏肽生) 组所诱导的 PC12 阳性细胞簇数占总细胞簇数的百分比, 以阳性细胞簇百分比为纵坐标, 以 β -NGF 浓度为横坐标绘制剂量-反应曲线。相同浓度下, 重组细胞株所分泌的 rh- β -NGF 活性与现有注射用鼠神经生长因子 (苏肽生) 的活性相当或更强 (图 7)。

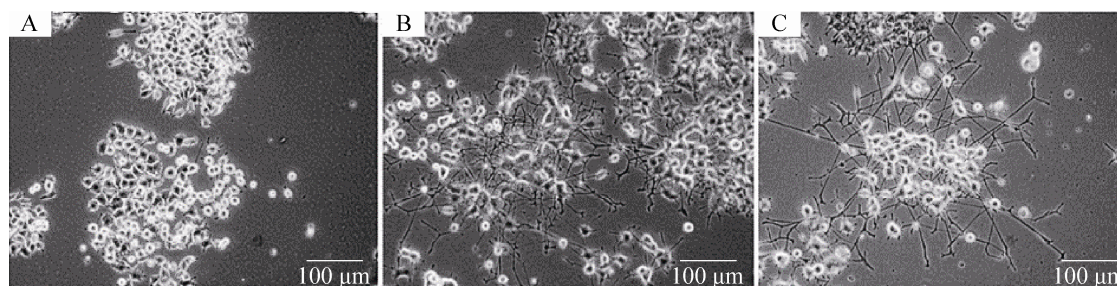


图 6 NGF 诱导 PC12 细胞分化

Fig. 6 PC12 cells differentiation induced by NGF (50 µg/mL). (A) Negative control. (B) Mouse NGF for injection. (C) rh- β -NGF.

2.5 重组细胞株高效分泌 rh- β -NGF

用 Quantity One 软件进行密度扫描检测 13 kDa 位置处的条带光密度, 参照 BSA 标准品的光密度, 计算出 β -NGF 的含量 (图 8)。经检测, 6 株重组细

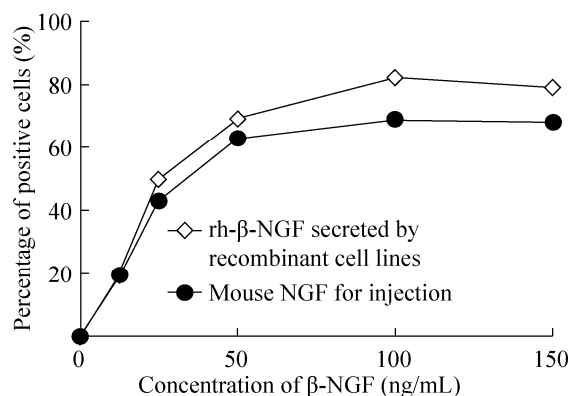


图 7 不同浓度 rh- β -NGF 组和注射用鼠神经生长因子 (苏肽生) 组诱导 PC12 阳性细胞簇数的百分比

Fig. 7 Percentage of PC12 positive cells induced by rh- β -NGF and mouse NGF for injection in different concentrations.

胞株培养基中的 rh- β -NGF 含量为 50–100 mg/L 培养基, 计算其表达效率约为 20–50 pg/(cell·d)。

2.6 重组细胞系经多次传代仍稳定表达 rh- β -NGF

细胞系经历 30、40、50 和 60 次传代后仍能表达 rh- β -NGF (图 9), 且表达效率稳定, 培养基中 β -NGF 含量约 100 mg/L。

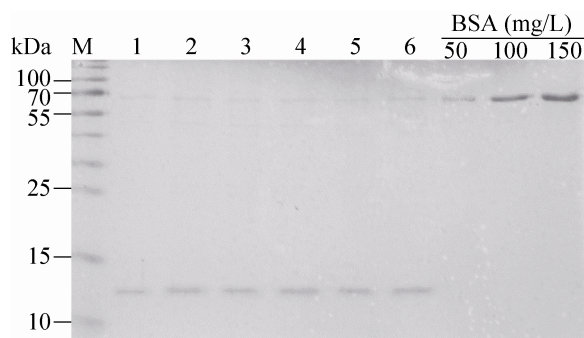


图 8 重组细胞株分泌 rh- β -NGF 的效率检测

Fig. 8 Test of secretion efficiency by recombinant cell lines. M: marker; 1–6: rh- β -NGF expression of recombinant cell lines in 1–6 days.

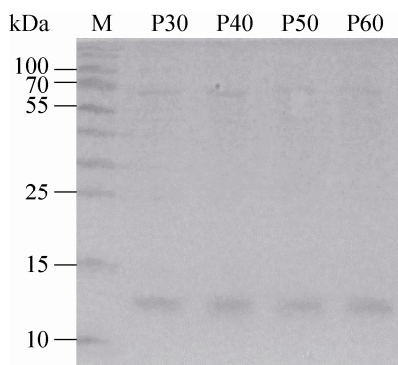


图9 重组细胞株分泌 rh- β -NGF 的稳定性检测

Fig. 9 Test of secretion stability of recombinant cell lines. M: marker; P30-P60: rh- β -NGF expression of 30th, 40th, 50th and 60th generation recombinant cell lines.

3 讨论

NGF 包含 α 、 β 、 γ 3 个亚基, 活性区是 β 亚基, 它具有完整的 NGF 生物学活性, 是与 BDNF、NT-3 和 NT-4 结构相关的神经营养因子, 为含有半胱氨酸结 (Cysteine knot) 的稳定二聚体结构家族, 由两个 118 个氨基酸组成的单链通过非共价键结合而成^[10]。 β -NGF 初始翻译产物由信号肽、前导肽及成熟肽 3 部分组成, 即 pre-pro-NGF^[11], 其中, 信号肽负责新生肽链的细胞内转运, 前导肽能帮助成熟肽形成具有生物学活性的正确构象, 而成熟肽才是具有生物学活性的肽段^[8,12-13]。目前, 已经有多种采用基因工程方法制备人的 NGF, 选择的表达系统主要有大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞及腺病毒等, 其中大肠杆菌不具备蛋白质翻译后加工修饰系统^[14], 酵母细胞的蛋白质翻译后加工修饰方式与高等真核生物差别较大, 很难获得具有较高生物活性的产物^[15-16], 而其他表达系统也都有多种明显的缺陷。

本实验选择哺乳动物细胞表达系统, 利用基因重组技术可将表达人 NGF 的基因片段插入

动物细胞系的基因组里, 使这些细胞持续稳定高表达人 NGF 蛋白。真核细胞系统具有高等真核生物完整的蛋白质翻译后加工修饰系统, 具备有利于外源基因表达产物二硫键形成的细胞环境, 拥有完备的转录后加工过程, 包括糖基化、羧基化, 使表达的外源真核基因产物能够保持其天然结构及活性^[17], 使得基因重组人 NGF 和人体自身 NGF 蛋白序列完全一致。此外, 本实验构建的重组细胞株是分泌型细胞株, 可以高效表达并分泌 NGF 蛋白到培养基中, 此特点将大大降低下游蛋白纯化的工艺难度和成本, 避免了如细胞破碎等会增加大量宿主细胞杂质蛋白和宿主杂质 DNA 等工艺。在无血清培养条件下可以进一步减少外源杂质和潜在污染源, 简化纯化工艺, 提高回收率, 并且大大降低纯化成本。

本实验中, 我们优选地构建出的重组表达载体主要由 5 部分组成: 启动子 (CMV)、 β 球蛋白基因内含子^[18-19] (简称 BGI, 可增强人 β -NGF 基因的转录效率, 还可促进 mRNA 从细胞核转移到内质网)、人 β -NGF 基因、内部核糖体进入位点序列^[20-21] (简称 IRES, 可招募核糖体对 mRNA 进行翻译, 以此可调控其下游筛选标记基因的表达) 和筛选标记基因 (*dhfr*)。重组表达载体采用一个启动子同时诱导 β -NGF 基因和筛选标记基因转录、并使用 IRES 启动后者翻译的方式, 使得细胞耐药性和表达量高度统一^[22]。因此, 当使用该重组表达载体转染宿主细胞时, 筛选出阳性表达细胞株的概率较大, 所得重组表达细胞株在筛选条件下可持续、稳定表达 β -NGF 蛋白, 细胞系经多次传代后, 仍能高效表达 β -NGF 蛋白, 其分泌效率大于 20 pg/(cell·d), 为大量制备 β -NGF 提供了实验基础, 并为进一步可能的临床应用作出了贡献。

REFERENCES

- [1] Deppmann CD, Mihalas S, Sharma N, et al. A model for neuronal competition during development. *Science*, 2008, 320(5874): 369–373.
- [2] Bernabei R, Landi F, Bonini S, et al. Effect of topical application of nerve-growth factor on pressure ulcers. *Lancet*, 1999, 354(9175): 307.
- [3] Lambiase A, Sacchetti M, Bonini S, et al. Nerve growth factor therapy for corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol*, 2012, 23(4): 296–302.
- [4] Lambiase A, Mantelli F, Bonini S, et al. Nerve growth factor eye drops to treat glaucoma. *Drug News Perspect*, 2010, 23(6): 361–367.
- [5] Manni L, Rocco ML, Bianchi P, et al. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. *Growth Factors*, 2013, 31(4): 115–122.
- [6] Colangelo AM, Finotti N, Ceriani M, et al. Recombinant human nerve growth factor with a marked activity *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(51): 18658–18663.
- [7] Bradshaw RA. Nerve growth factor. *Annu Rev Biochem*, 1978, 47(1): 191–216.
- [8] Rattenholl A, Lilie H, Grossmann A, et al. The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur J Biochem*, 2001, 268(11): 3296–3303.
- [9] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(20): 8125–8148.
- [10] Barde YA. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res*, 1994, 390: 45–56.
- [11] Shinde U, Inouye M. Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin Cell Dev Biol*, 2000, 11(1): 35–44.
- [12] Fahnstock M, Yu G, Michalski B, et al. The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem*, 2004, 89(3): 581–592.
- [13] Teng KK, Felice S, Kim T, et al. Understanding proneurotrophin actions: recent advances and challenges. *Dev Neurobiol*, 2010, 70(5): 350–359.
- [14] Jiang HM, Chai XJ, He B, et al. Expression, purification and renaturation of proNGF in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(3): 509–514 (in Chinese).
江汉民, 柴新君, 何冰, 等. ProNGF 在大肠杆菌中的表达、纯化和复性. *生物工程学报*, 2008, 24(3): 509–514.
- [15] Soderstrom S, Hallbook F, Ibanez CF, et al. Recombinant human beta-nerve growth factor (NGF): biological activity and properties in an enzyme immunoassay. *J Neurosci Res*, 1990, 27(4): 665–677.
- [16] Vigentini I, Merico A, Tutino ML, et al. Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J Biotechnol*, 2006, 127(1): 141–150.
- [17] Holzman TF, Chung CC, Edalji R, et al. Recombinant human prorenin from CHO cells: expression and purification. *J Protein Chem*, 1990, 9(6): 663–672.
- [18] Hausladen A, Privalle CT, Keng T, et al. Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell*, 1996, 86(5): 719–729.
- [19] Haridas V, Kim SO, Nishimura G, et al. Avicinylation (thioesterification): a protein modification that can regulate the response to oxidative and nitrosative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(29): 10088–10093.
- [20] Sachs AB, Sarnow P, Hentze MW, et al. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*, 1997, 89(6): 831–838.
- [21] Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK, et al. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(4): 182–188.
- [22] Lucas BK, Giere LM, DeMarco RA, et al. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(9): 1774–1779.

(本文责编 陈宏宇)