

重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) 融合蛋白的高效表达及鉴定

吴 炯¹ 费炎灵² 温晓燕^{2*}

(南京大学生物化学系 南京 210008)¹

(加拿大多伦多大学)²

摘 要 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)参与了许多细胞生长和分化的调控过程。本文采用重组 DNA 技术在大肠杆菌中高效表达了人 bFGF。首先将编码人 bFGF 基因克隆到 pXT 表达载体中与其上游的一短 S 导肽共一阅读框架, bFGF 基因的表达受强的 T7 启动子调控。采用 BL21(DE3)大肠杆菌作为宿主菌,用 IPTG 诱导 BL21(DE3)细菌合成的 T7RNA 聚合酶,后者可催化高水平的 bFGF 基因表达,其 bFGF 产量可占总菌体蛋白的 42.5%。采用肝素-Sephrose 一步亲和层析法直接从诱导后的细菌裂解产物中得到纯化的重组人 bFGF 蛋白。经 Western 印迹分析证明该蛋白可被人 bFGF 特异性单克隆抗体所识别。进一步研究证明该蛋白具有刺激 NR6R-3T3 成纤维细胞增殖的生物学活性,并且这一活性可被人 bFGF 特异性中和抗体所中和。

关键词 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), 融合蛋白, 基因表达, 生长因子

成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factors, FGFs)是一组具有调控细胞增殖、分化功能的蛋白分子,这些蛋白质在机体正常发育,组织更新以及创伤的愈合和修复过程中都有重要作用;它们还参与了诸如肿瘤的发生和转移等^[1]许多病理过程。FGF 家族目前已发现有九名成员,分别命名为 FGF1-9。依据其等电点的不同,FGF-1 和 FGF-2 也分别称为酸性 FGF(aFGF)和碱性 FGF(bFGF),二者是 FGF 家族的原型(Prototype)成员。

bFGF 是目前人们研究得较多的 FGF 之一,已发现 bFGF 可刺激血管内皮细胞和成纤维细胞的增殖^[2],对许多细胞起化学催化作用^[3~5],诱导内皮细胞合成胶原酶和纤溶酶原激活因子^[6],并在体内诱导血管形成^[7]。外源性供给 bFGF 可以促进创伤愈合^[8]、骨的修复^[9]、眼晶体再生及肢体再生等^[10,11],bFGF 是一具有广泛生物学活性的重要细胞因子。

天然 bFGF 可从许多组织中分离得到,其中包括神经组织,垂体腺,肾上腺皮质,黄体和胎盘组织等。由于分离和纯化天然 bFGF 来源有限,所以人们试图用基因工程方法生产大量 bFGF 用于基础研究和临床试用^[11]。然而由于人 bFGF 基因结构以及其密码子与大肠杆菌密码子使用频率的差异,bFGF 基因很难在大肠杆菌中进行高效表达^[12]。

* 通讯联系人。地址:25 Elm Street, Unit 907, Toronto, Ontario, Canada M5G 2G5. E-mail: cp177@freenet.toronto.on.ca

本文于 1996 年 6 月 4 日收到。

本研究中,我们设计了在大肠杆菌中高效表达人 bFGF 的系统。首先选用较强的 T7 启动子介导 bFGF 编码基因的转录;然后选用一在大肠杆菌中高效表达的上游引导肽(Leader peptide)加强 bFGF mRNA 的翻译,这样我们成功地在大肠杆菌中高效表达了人 bFGF 蛋白。进一步利用 bFGF 与肝素具有高亲和力结合这一特性,采用肝素-Sepharose 亲和层析方法分离纯化出高纯度的重组人 bFGF。并且证明该表达的人 bFGF 具有天然 bFGF 的免疫化学特性及其生物学活性。

1 材料与方法

1.1 菌种及工具酶

所有限制酶, T4 连接酶等均购自 Gibco BRL 公司(Grand Island, NY, USA)。JM109 和 BL21(DE3)大肠杆菌细胞株由 Dr. P. Firrorala 提供。LB 培养基和氨苄青霉素均购自 Sigma 公司(St. Louis, USA)。一切 DNA 操作方法均按 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 合著的 Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Lab Press, 1989 USA)一书进行。

1.2 bFGF 高效表达质粒的构建

将含 bFGF 基因的 pBF 质粒(人 bFGF 基因从 ATCC 购得)用 NcoI 进行酶切,电泳分离出 0.55kb 的 bFGF 基因片段,然后将该 DNA 片段与 NcoI 酶切后的 pXT 质粒(加拿大新世纪生物公司提供)进行连接反应。将连接反应物转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞。筛选出含有 bFGF 基因正向插入子的重组质粒,命名为 pXBF(图 1)。

1.3 bFGF 在 BL21 (DE3)大肠杆菌细胞中的高效表达

将 pXBF 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,取一菌落种入含 40μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中,置 37℃ 振荡培养。待细菌生长至 A₆₀₀ = 0.5 时,加入 IPTG (Amersco, Ohio, USA)使其终浓度为 0.3mmol/L,继续培养 4h 后,收获菌体。冻存于 -20℃ 备用。

1.4 重组 bFGF 蛋白的纯化

将上述收获菌体悬浮于缓冲液 A (50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 4ml 缓冲液/g 湿重菌体),然后置于冰浴中用超声破碎细胞(450 Sonifier, Branson Ultrasonics, Danburg, CT)20s 一次,每次间隔 1min,共超声破碎 10 次。将菌体超声破碎物置 4℃ 10 000g 离心 30min。收集上清,加入 NaCl 至终浓度为 0.5mmol/L,直接加样到肝素-Sepharose (Sigma, St. Louis, USA)柱中(0.6ml 树脂/4ml 细胞裂解上清液)(柱子用前用含 0.5mol/L NaCl 的缓冲液 A 平衡)。继之用 12 倍柱体积的含 1mol/L NaCl 的缓冲液 A 洗柱。最后用含 2mol/L NaCl 的缓冲液 A 洗下 bFGF,收取洗脱液测定 A₂₈₀ 吸收值。将收集的 bFGF 的样品进行 15%

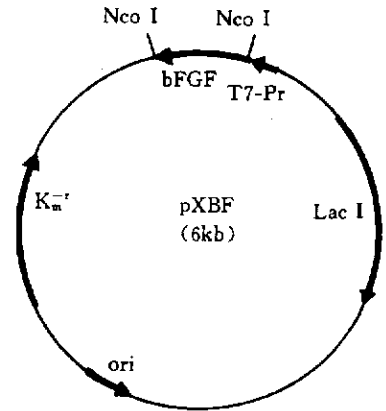


图 1 重组人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)表达载体 pXBF 结构图

Fig. 1 The structure of pXBF plasmid carrying human bFGF gene
0.55kb human bFGF cDNA was placed downstream of a short leader peptide, under the control of T7 promoter.

SDS-PAGE 电泳分析。

1.5 Western 印迹杂交分析

将 bFGF 样品在 15% 的 SDS-PAGE 胶上进行电泳, 然后转移到硝酸纤维素膜上(FMC Bio-Products, Rockland, ME)。继之将膜置含 1% 脱脂奶粉的 PBS-Tween-20 溶液中密封 1h, 再加入 1:2000 稀释的鼠抗人 bFGF 单克隆抗体(Signal transduction laboratory Ltd.) 进行反应。继之按常规方法加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗和底物 DAB 显色^[13]。最后将膜置于 dH₂O 中冲洗终止反应。

1.6 bFGF 生物活性测定

按 Rizzno 等人的方法根据其 bFGF 刺激静止 NR6R-3T3 成纤维细胞进行增殖的原理测定其活性^[14]。将细胞悬浮于含 10% 胎牛血清(FCS)(Sigma, St. Louis, USA)的 PR-MI1640 培养基中(Gibco BRL, Gland Island, NY, USA)调节细胞浓度为 5×10^4 /ml, 再加入到 96 孔培养板中(Corning)(200ml/孔)。将细胞置 37℃ 培养 4d 后吸去上清液, 再加入 0.4% FCS 的 PRMI1640 新鲜培养基, 同时加入 ³H 标记的脱氧胸苷(Du Pont, MA, USA)(0.5μ Ci/孔)和不同浓度的 bFGF 样品(25μl/孔)。将细胞继续在 37℃ 培养 24h, 吸去培养基, 用 PBS 洗 1 次, 再用甲醇洗 2 次, dH₂O 洗 2 次。再每孔加入冷 5% 的三氯醋酸 200μl, 置冰上 10min, 然后用 dH₂O 洗 3 次, 再每孔加入 200μl 0.3mol/L NaOH, 使细胞溶解。最后取 150μl 于 Beckman 液体闪烁计数器上测定同位素计数值。

2 结果与讨论

为了得到 bFGF 的高水平表达, 我们选用 pXT 作为载体。该载体含有强的 T7 启动子序列、核糖体结合序列, 编码大肠杆菌 S 肽的引导序列和 T7 转录终止信号。T7 启动子序列与所有的有大肠杆菌 RNA 聚合酶识别的启动子序列无同源性, 并且在大肠杆菌基因组中无 T7 启动子序列。这样, T7 RNA 聚合酶可以高度选择性地作用于 pXT 载体上的 T7 启动子。并且, T7 RNA 聚合酶催化 RNA 合成启动和延长的效率是大肠杆菌 RNA 聚合酶的 5 倍。此外, S 肽编码序列极易在大肝杆菌中高效表达, 将 S 肽编码序列放在 bFGF 基因的上游可以克服 bFGF 基因上游结构及其密码选用频率不同于大肠杆菌而影响其基因表达的缺点。有人认为选用高效表达的基因序列作为上游导肽序列可以帮助提高一些因基因结构(如蛋白质 N 端编码序列, 稀有密码子等)而导致表达效率不高的基因在大肠杆菌中的表达^[13]。

在 pBF 质粒中, 首先已用体外诱变方法在 bFGF 基因的翻译启动密码处设计 NcoI 酶切位点。将 pBF 质粒用 NcoI 酶切下 bFGF 基因片段, 然后将后者连接插入到 pXT 载体的 NcoI 位点, 这样 bFGF 基因的编码序列刚好与上游的 S 肽编码序列共用同一翻译阅读框架(图 1)。序列分析和酶切图谱分析证明该 bFGF 基因的插入位点和方向与设计的完全相符(未列出)。

大肠杆菌 BL21(DE3)菌株细胞基因组中含有外源整合插入的 λ 噬菌体的 T7 基因 1 (编码 RNA 聚合酶), 并且该基因是受 lacUV5 启动子调控, 用 IPTG 可诱导其表达^[15]。将 bFGF 表达质粒转化 BL21(DE3)细胞, 用 IPTG 首先诱导合成 RNA 聚合酶, 继之, T7 RNA 聚合酶可识别 pXBF 质粒中 bFGF 基因上游的 T7 启动子序列, 从而催化合成大量

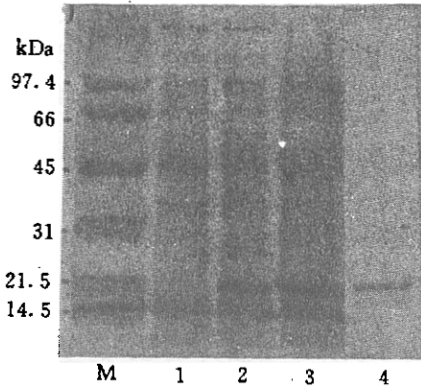


图2 bFGF 的高效表达和纯化

Fig.2 Overexpression and purification of recombinant human bFGF

Samples of *E. coli* cell lysates or purified bFGF protein were applied to a 15% SDS-polyacrylamide gel. The gel was stained with Commassie Blue. Results showed the total cell lysates obtained from *E. coli* BL21 (DE3) containing bFGF expression vectors without (lane 1) or after IPTG induction (lane 2), the expressed recombinant bFGF accumulated in the soluble cell lysate fraction (lane 3), and the recombinant bFGF after affinity chromatography of the soluble cell lysate fraction on heparin-Sepharose column (lane 4).

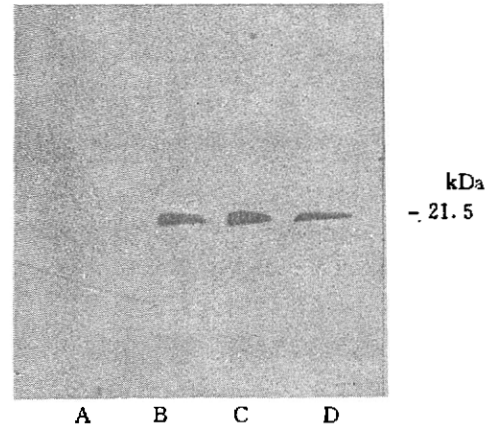


图3 重组 bFGF 的 Western 印迹分析

Fig.3 Western blot analysis of the expressed recombinant bFGF

The samples were applied to 15% SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membrane which was then probed by bFGF specific monoclonal antibodies. Lane A: IPTG-non-induced whole cell lysates; Lane B: IPTG-induced whole cell lysates; Lane C: IPTG-induced soluble cell lysate fraction; Lane D: purified bFGF.

bFGF mRNA。最后核糖体通过与其中的核糖体结构序列(rbs)作用,介导翻译合成 bFGF 蛋白。结果如图 2 所示,未受 IPTG 诱导的 BL21 (DE3) 细胞中无 bFGF 的表达(图 2, Lane 1)。受 IPTG 诱导后的细胞可合成大量分子量约为 21.5kDa 的 bFGF 和 S 肽融合蛋白,这与预测的融合蛋白分子量一致(图 2, Lane 2)。并且,所合成的 bFGF 蛋白都是以可溶性形式存在于细胞裂解的上清液中(图 2, Lane 3),用光密度扫描分析 SDS-PAGE 结果,计算 IPTG 诱导后细菌中所表达的 bFGF 蛋白量约占总细菌蛋白的 42.5%。如果将 bFGF 基因插入到 pXT- II 表达载体中,在 bFGF 基因的上游无一短的 S 肽引导序列;结果 IPTG 诱导合成的 bFGF 蛋白量仅占细菌总蛋白的 10.4% (数据未列出)。这说明在 bFGF 基因的上游位置高效表达的 S 肽引导序列对 bFGF 基因的高效表达是至关重要的。

利用 bFGF 可与肝素特异性结合这一特点,我们用肝素-Sepharose 亲和层析一步法纯化从细菌裂解上清液中分离纯化的重组人 bFGF 融合蛋白。结果如图 2 所示,从肝素-Sepharose 柱上洗脱下来的重组 bFGF 蛋白在 SDS-PAGE 胶中只有一条带(图 2, Lane 4),未见其它杂蛋白带。

为了证实所表达的重组蛋白具有 bFGF 的免疫化学特异,我们用 Western 印迹检测了其重组人 bFGF 与抗人 bFGF 单克隆抗体的特导反应。结果如图 3 所示,在未受 IPTG

诱导的 BL21(DE3)大肠杆菌细胞中无任何蛋白可与该特异性单克隆抗体反应(图 3, Lane A)而在 IPTG 诱导的 BL21(DE3)细胞及其裂解上清液中分别有一分子量为 21.5kDa 大小的蛋白质带可被 bFGF 特异性单克隆抗体所识别(图 3, Lane B 和 C), 并且与纯化的 bFGF 蛋白质反应带处相同的位置(图 3, Lane D)。Western 印迹分析结果与前面的 SDS-PAGE 结果相一致。

进一步我们利用刺激 NR6R-3T3 成纤维细胞增殖的试验检测纯化的重组的 bFGF 融合蛋白是否具有天然 bFGF 生物学活性, 结果如图 4 所示。NR6R-3T3 成纤维细胞对重组 bFGF 蛋白表现出剂量依赖型应答。在 bFGF 蛋白 N 端的 S 肽序列并不影响融合蛋白中 bFGF 的生物学活性。用凝血酶切除前端的 S 肽并不增强其 bFGF 的生物活性(数据未列出)。

最后我们检测了 bFGF 特异性中和抗体对表达的重组 bFGF 蛋白生物活性的中和作用。结果如图 5 所示, 纯化的 bFGF 蛋白刺激 NR6R-3T3 细胞增殖的活性能明显地被 bFGF 特异性中和抗体中和, 进一步证实了表达的重组 bFGF 蛋白具有天然 bFGF 蛋白一样的免疫化学特性和生物学活性。

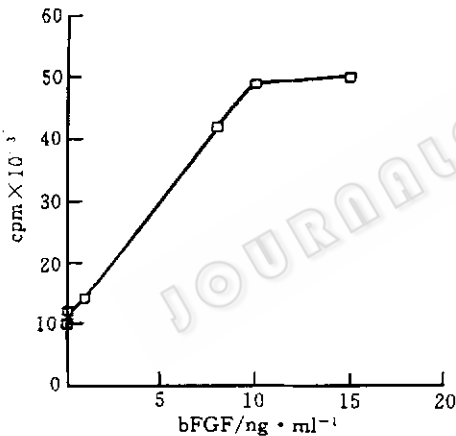


图 4 重组 bFGF 对 NR6R-3T3 成纤维细胞的增殖刺激实验

Fig. 4 Induction of proliferation of NR6R-3T3 fibroblast by the expressed bFGF

Quiescent NR6R-3T3 fibroblasts were exposed to increasing amount of recombinant bFGF in culturing medium containing (³H)-thymidine. The cells were then harvested and the radioactivity was measured on a liquid scintillation counter. The results are expressed as means of three independent assay.

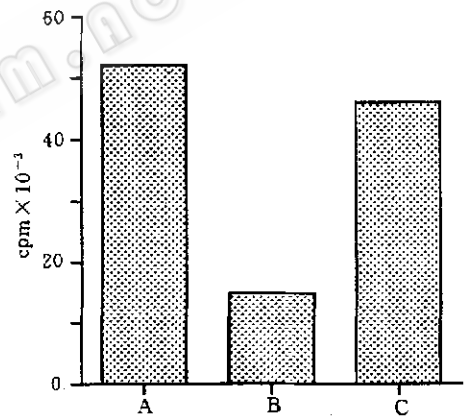


图 5 bFGF 特异性抗体对 bFGF 的中和作用

Fig. 5 Neutralization of bFGF activity by bFGF specific antibodies

The purified bFGF protein (200ng/ml) was mixed with equal volume of bFGF specific neutralizing antibodies (5 μ g/ml) (B) non-immunized goat gamma-globulins (5 μ g/ml) (C) or PBS buffer (A) at 37 $^{\circ}$ C for 30 minutes. The bFGF activity was then measured by NR6R-3T3 fibroblast proliferation assay. The results are expressed as means of three independent experiments.

参 考 文 献

- [1] Baid A, Bohlen P, "Fibroblast Growth Factors" in Peptide Growth Factors and Their Receptors by Sporn, M. B. and Roberts, A. B., Springer-Verlag, New York, 1990, p369~458.
- [2] Godpodarowicz D, Curr Topics Dev Biol, 1990, 24: 57~93.
- [3] Moscatelli D, Presta M, Rifkin D B *et al.* Proc Natl Acad Sci. USA, 1986, 83: 2091~2095.
- [4] Senior R M, Huang S S, Griffin G L *et al.* 1986, 141: 67~72.
- [5] Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J *et al.* Mol Cell Biol, 1986, 6: 4060~4066.
- [6] Folkman J, Klagsburn M. Science, 1987, 235: 442~447.
- [7] Lobb R R, Alderman E M, Fert J W. Biochemistry, 1985, 24: 4969~4973
- [8] Davidson J M, Klagsbrun M, Hill K E *et al.* J Cell Biol, 1985, 100: 1219~1227.
- [9] Canolis E, Lorenzo J, Burgess W H *et al.* J Clin Invest, 1987, 79: 52~58.
- [10] Cuny R, Jeanny J C, Courtois Y. Differentiation, 1986, 32: 221~229.
- [11] Burgess, W H, Maciag T. Ann Rev Biochem, 1989, 58: 575~592.
- [12] Lemaître G, Laarroubi K, Soulet L *et al.* Biochimie, 1995, 77: 162~166.
- [13] Wu J, Cho M I, Kuramitsu H K *et al.* Infect Immun, 1995, 63(7): 2516~2521.
- [14] Rizzino A, Kazakoff P, Ruff E *et al.* Cancer Res., 1988, 48: 4266~4273.
- [15] Studier F W, Moffatt B A. J Mol Biol, 1986, 189: 113~130.

Overexpression and Characterization of Human Basic Fibroblast Growth Factor from *Escherichia coli* Cells

Wu Jiong¹ Fei Yanling² Wen Xiaoyan²

(Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210008)¹

(University of Toronto, Canada)²

Abstract The cDNA sequence coding human basic fibroblast growth factor (bFGF) was cloned downstream of the bacteriophage T7 promoter. A upstream short S peptide was used to increase the translation efficiency of bFGF. With induction of IPTG, the recombinant S gene-bFGF protein was overexpressed as 42.5% of total bacterial proteins. Heparin-sepharose affinity chromatography was used to purify the bFGF fusion protein. Western blot analysis showed that human bFGF-specific monoclonal antibody could detect the recombinant bFGF protein. Further experiments demonstrated that the recombinant fusion protein could stimulate the proliferation of the quiescent NR6R-3T3 fibroblasts and the bFGF biological activity could be neutralized by human bFGF-specific neutralizing antibodies.

Key words bFGF, fusion protein, gene expression, growth factor