

人胶源神经营养因子基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

张晓霆 马 磊 舒 宁 卫 敏 李昌本 陈素珍 赵寿元

(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

胶源神经营养因子(Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是从大鼠 B49 细胞系中分离纯化得到的一种蛋白质^[1],由于其对多巴胺神经元的专一性的神经营养作用而被发现。GDNF 成熟蛋白由 134 个氨基酸组成,具有两个 N-糖基化位点。它属于 TGF- β 基因家族但与该家族其它成员的氨基酸序列同源性仅为 20%,可能是一个新的亚家族。最近研究表明,它对发育中的运动神经元也有很强的神经营养作用^[2]。对啮齿类^[3,4],灵长类的猕猴^[5]的活体试验表明,胶源神经营养因子是一种治疗神经退化性疾病如帕金森氏症、肌萎缩性脊髓索硬化症等的非常有效的潜在药物。由于 GDNF 在体内含量极低而且仅在发育早期表达,因而只有通过基因工程方法才能获得大量的 GDNF。本文报道采用 PCR 方法从中国人基因组 DNA 中扩增出编码 GDNF 的基因,并实现在大肠杆菌中的高效表达。这为进一步研究 GDNF 的结构和生物学功能打下了坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

克隆表达载体 pET3a, 宿主菌大肠杆菌 BL21(DE3)均由本室提供。限制酶、连接酶购自 Biolabs 公司, Q-Sepharose 购自 Pharmacia 公司, 其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 人基因组 DNA 的抽提

采健康人血 5ml, 人基因组 DNA 的抽提按文献方法操作^[6]。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

为进行 PCR 扩增, 设计了两个引物, 由中科院细胞生物学研究所合成。引物 A: 5'CGCATAT-GTCTCCAGACAAACAAATGGCAGTGC 3' 引物 B: 5'GCGGATCCTCAGATACATCCACACC 3'

PCR 采用复华生物技术开发公司的 PCR 扩增试剂盒, 按所附说明书操作。

1.4 分子克隆与 DNA 序列分析

分子克隆按文献^[6]操作。DNA 序列分析采用 Pharmacia 公司的 T7 SequencingTMKit, 按说明书操作。

1.5 GDNF 的蛋白定量及氨基端序列测定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色, 凝胶扫描定量蛋白。N-端氨基酸序列由中国科学院植物生理研究所 BECKMAN 生物技术示范实验室测定。

2 结果和讨论

2.1 GDNF 编码序列的扩增

根据编码 GDNF 成熟蛋白的 DNA 序列, 我们设计了两个 PCR 引物, 引物 A 在编码 GDNF 成熟蛋白基因的第 1 个密码子之前加了一个起始密码子 ATG, 并设计了一个 NdeI 酶切位点, 引物 B 设计了一个 BamHI 酶切位点。此外, 我们还根据密码子的简并性将引物 A 中的两个非大肠杆菌偏好密码子改为

本项目得到国家自然科学基金资助。

本文于 1996 年 9 月 9 日收到。

大肠杆菌偏好型(图 1)。

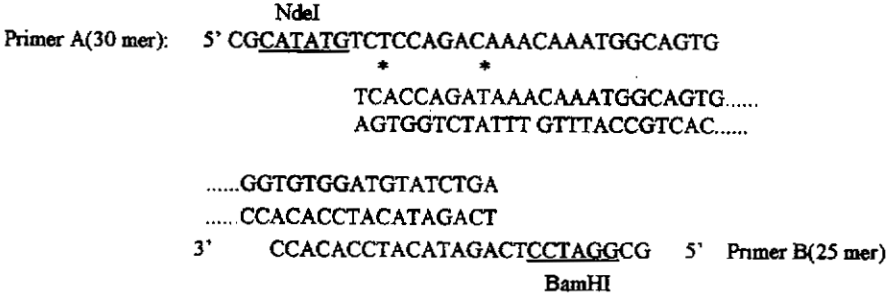


图 1 PCR 引物的设计

以中国人基因组 DNA 为模板,用引物 A 和引物 B 进行 PCR 扩增。扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果(图 2)表明,除了一条长约为 410bp 的 DNA 条带外,并无其它可见条带。这说明,虽然我们将引物 A 靠近 5' 端的两个密码子改为大肠杆菌偏好的密码子后造成了两个核苷酸的不配对,但 PCR 扩增的特异性仍然较高。由于翻译起始区的密码子对于翻译效率有很大的影响,所以我们利用 PCR 引物的少数几个核苷酸不配对对 PCR 扩增特异性影响不大的特点,将非大肠杆菌偏好的密码子改为大肠杆菌偏好的,以利于真核细胞来源的基因在大肠杆菌中的表达。

2.2 GDNF 基因的克隆

用低熔点胶法回收的 PCR 扩增片段,经 NdeI 和 BamHI 进行双酶切,然后与同样双酶切的表达载体 pET3a 连接,构建成表达质粒 pET3aTT(图 3)。转化大肠杆菌 BL21(DE3),重组转化子用 NdeI 和 BamHI 双酶切初步鉴定。取其中一个转化子,

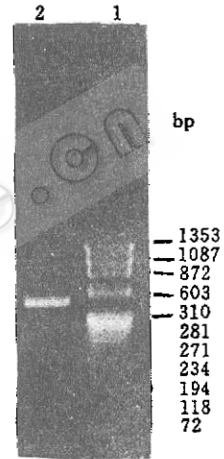


图 2 PCR 产物的 10% 琼脂糖电泳
 1. MW marker, $\phi \times 174$ /HaeIII
 2. PCR products

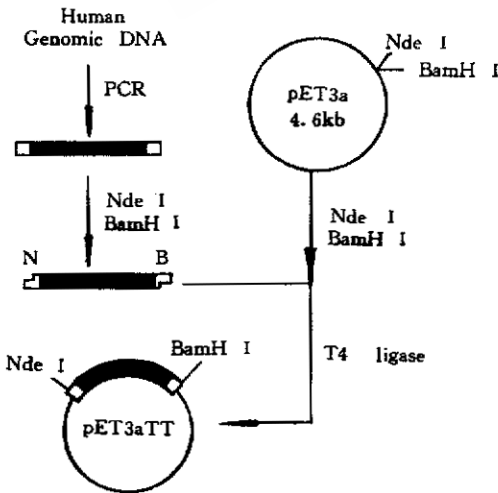


图 3 人胶源神经营因子表达载体 pET3aTT 的构建

用碱裂解法抽提质粒,经酶切、低熔点胶回收小片段后克隆到 M13 噬菌体上。转化大肠杆菌 TG1 菌株,制备单链,再进行 DNA 序列分析。序列分析结果与国外文献报道顺序完全一致(图 4)。从而确证了我们构建的表达质粒 pET3aTT 所克隆的片段是 hGDNF 基因。这也说明 hGDNF 基因是高度保守的,在东西方人群中并未发现核苷酸序列的多态性。

2.3 GDNF 在大肠杆菌中的表达

接种单菌落于 3ml LB 中,37°C 振荡培养过夜,按 1% 比例转接至 30ml LB 中,37°C 培养 3h,使 OD₆₀₀ 约等于 0.3~0.4,加入 IPTG 至终浓度为 0.4mmol/L,继续培养 3h,离心收集菌体,进行

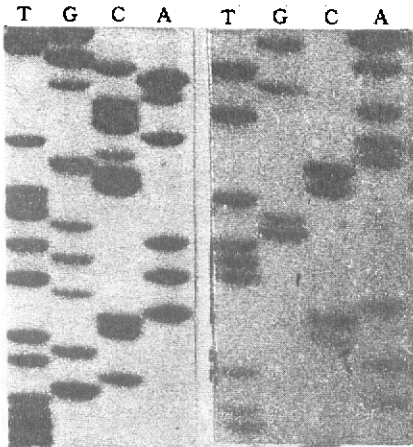


图4 部分人胶源神经营养因子基因测序放射自显影结果

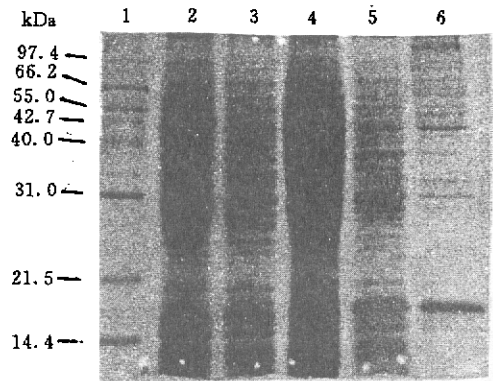


图5 大肠杆菌 SDS 电泳
1. 标准分子量对照, 2. pET3a/DE3 (未诱导), 3. pET3a/DE3 (诱导), 4. pET3a/TT/DE3 (未诱导), 5. pET3aTT/DE3 (诱导), 6. pET3aTT/DE3 (诱导)超声沉淀

SDS-PAGE 电泳(图5)。结果表明, pET3aTT 转化菌经 IPTG 诱导后出现了分子量约为 16kDa 的蛋白条带, 而未经诱导的 pET3aTT 转化菌则此带不明显。pET3a 转化菌在 IPTG 诱导前后均无此条带。这表明, pET3aTT 转化菌经 IPTG 诱导后确实表达了一个分子量约为 16kDa 的外源蛋白。薄层扫描显示, hGDNF 表达量占菌体总蛋白的 16.5%。超声破碎后的 SDS-PAGE 电泳表明该外源蛋白主要位于沉淀中, 说明表达产物主要是以包涵体的形式存在。由于 hGDNF 成熟蛋白有 7 个半胱氨酸残基, 包涵体的形成可能与 hGDNF 分子的二硫键较多有关。实验过程中我们还采用了表达载体 pJLA503, 以它为基础构建的 hGDNF 表达质粒在热诱导前后均无明显的 16kDa 蛋白条带。由于 pJLA503 表达质粒是以 λ 噬菌体的启动子 P_L 、 P_R 串联使用为基础构建的, 而 pET3a 则是带 T7 启动子的表达质粒。因而我们认为 T7 启动子对 hGDNF 的表达更为有利。

2.4 表达产物的分离纯化及 N 端氨基酸序列分析

诱导表达的菌体经离心收集后, 超声波破碎, 离心, 弃上清, 沉淀用 2mol/L 尿素洗涤。8mol/L 尿素溶解沉淀后, 上 Q-Sepharose 柱进行离子交换层析, 以 0.1~0.5mol/L NaCl 进行梯度洗脱, 流速为 1.0ml/min。收集 hGDNF 富集组分走 SDS-PAGE。电泳结束后, 将聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上进行蛋白质的氨基端序列分析。所得的前 15 个氨基酸: MetSerProAspLys GlnMetAlaValLeuProArgArgGluArg。除了起始端多了一个 Met 外, 其余的序列与根据 cDNA 推测的成熟 hGDNF 序列完全一致, 说明 pET3aTT 转化菌表达的蛋白质确为人胶源神经营养因子。

参 考 文 献

- [1] Lin L *et al.* Science, 1993, 260:1130.
- [2] Henderson *et al.* Science, 1994, 266:1062.
- [3] Tomac A *et al.* Nature, 1995, 373:335.
- [4] Yan Q *et al.* Nature 1995, 373:341.
- [5] Gash D. M. *et al.* Nature 1996, 380:252.
- [6] Sambrook J *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual. 1989, 2nd ed. . Cold Spring Harbor Laboratory Press, N Y.

Cloning the Gene Coding for Human Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor and Its Expression in *Escherichia coli*

Zhang Xiaoting Ma Biao Shu Ning Wei Min
Li Changben Chen Suzhen Zhao Shouyuan

(*Institute of Genetics, Fudan University. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Shanghai 200433*)

Abstract By using PCR method, the hGDNF gene was cloned from Chinese genomic DNA. The hGDNF gene was subcloned into the expression vector pET3a which is under the control of T7 promoter and then transfected into *E. coli* BL21 (DE3). The constructed strain was designated as pET3aTT/BL21(DE3). The sequence data of cloned hGDNF gene showed that it was identical to that of natural one. Four hours after IPTG induction, a 16kDa extra protein which is about 16.5% out of total bacteria proteins in pET3aTT/DE3(BL21) was appeared in the gel of SDS-PAGE. The expression products existed in the form of inclusion body. The protein was purified via ion exchange chromatography. The results of amino acid sequencing proved that the sequence of 15 amino acids at the N-terminal of the expressed hGDNF was the same as that deduced from DNA sequence.

Key words Neurotrophic factor, human glial cell line-derived neurotrophic factor, gene cloning and expression