

重组人骨形成蛋白-3 成熟肽的表达、纯化 及诱骨活性的研究*

朱帮福 蒲 勤 陈南春 陈苏民**

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 西安 710032)

摘 要 推测人骨形成蛋白-3 羧基端的 127 氨基酸的肽段为其成熟肽(hBMP-3m)。将编码此成熟肽的 cDNA 插入含 P_L 启动子的表达质粒 pDH 中,构建表达质粒 pDH-B3m,转化大肠杆菌 DH5 α 。42℃ 热诱导 6h 后表达量达到最高水平,约占菌体总蛋白 28%;表达产物以包涵体形式存在。包涵体经分离和洗涤后,溶解于尿素,在变性溶解状态下经阳离子交换层析,目的蛋白纯度至少在 95% 以上。再经稀释复性。然后将纯化、复性的重组人骨形成蛋白-3 成熟肽(rhBMP-3m)植入小鼠肌肉间隙,于不同时间取材观察,在局部可见典型的软骨形成、软骨内成骨以及骨组织形成的过程,证实所制备的 rhBMP-3m 具有明显的异位诱骨活性。

关键词 人骨形成蛋白-3, 表达, 蛋白质纯化, 诱骨活性

分类号 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0288-92

骨形成蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)最初是作为诱骨活性因子被发现的,可以诱导间充质细胞分化为软骨和骨,对骨骼的发育和再生修复起重要作用,临床已试用于骨缺损的治疗,效果理想^[1]。但提取天然的 BMP 存在步骤繁琐、重复性差及获得量少等缺点,因而应用受限。人 BMP1~13 cDNA 基因的克隆使得基因工程生产重组人 BMP(rhBMP)成为可能^[2,3];利用真核或原核系统都已表达出有生物活性的 hBMP-2, -4, -7 等。hBMP-3 与 BMP 家族其他成员差别最大,同源性最低,文献报道原核系统中表达的 hBMP-3 没有活性^[2]。而我室则首次在大肠杆菌中成功表达了具诱骨活性的人 BMP-3 羧基端肽^[4],并获得国家专利。在此基础上我们又克隆、构建了 hBMP-3 成熟肽的表达载体,在大肠杆菌中高效表达出 hBMP-3 完整成熟肽^[5]。为了进一步明确 hBMP-3 活性区域,为其作用机理研究和临床应用提供前提条件,本文对 rhBMP-3 成熟肽的表达、纯化、复性及诱骨活性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒与菌株: 表达 rhBMP-3 成熟肽的重组质粒 pDH-B3m 由本实验室构建^[5], hBMP-3 成熟肽 cDNA 基因(编码 127 肽)受 P_L 启动子调控;pDH-B3m 质粒以大肠杆菌 DH5 α 为宿主菌。

* 全军医药卫生科研基金重点课题(No. 96Z045);获国家专利,专利号:CN1165189A。

** 联系人及课题研究负责人。

收稿日期:1998-07-27,修回日期:1999-03-19。

1.1.2 生化试剂: SP-Sepharose FF 购自瑞典 Pharmacia 公司;除 Tryptone、Yeast extract 为进口试剂外,其余均为国产试剂。

1.1.3 实验动物: 昆明纯种小鼠,由第四军医大学实验动物研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 菌株的诱导表达: 将含重组质粒 pDH-B3m 的大肠杆菌 DH5 α 于 32 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日转接后 42 $^{\circ}$ C 水浴诱导,分别于 1~7h 取样,电泳观察最佳诱导时间。

1.2.2 裂菌: 收集 500mL 诱导表达菌液,用 50mL 裂菌液[0.5% DOC(脱氧胆酸钠)、30% 蔗糖、50mmol/L Tris.HCl(pH8.0)]溶解后,超声破碎。

1.2.3 包涵体的洗涤及变性溶解: 裂菌后的沉淀部分先用含 2% DOC 洗涤液[30% 蔗糖、100mmol/L NaCl、50mmol/L Tris.HCl (pH8.0)]洗涤 2 次,再以 2mol/L 脲缓冲液洗涤 2 次;然后溶于 7mol/L 脲变性溶解液,4 $^{\circ}$ C 放置 3h 以上,离心除去不溶物。

1.2.4 离子交换层析: SP-Sepharose FF 阳离子层析柱用 7mol/L 脲、50mmol/L PBS (pH7.8)溶液平衡,上样后用含 0~1mol/L NaCl 的缓冲液梯度洗脱,收集各组分。

1.2.5 目的蛋白的复性: 将收集的目的蛋白浓度调到 0.5mg/mL,按 1:10 加复性液稀释,复性液配方为: 50mmol/L Tris.HCl(pH8.0)、0.5mol/L 脲、0.5mol/L L-精氨酸盐酸盐、50 μ mol/L Cu $^{2+}$ 、140mmol/L NaCl。4 $^{\circ}$ C 放置 12h,然后对 5% 甘油透析 24h,将透析后的目的蛋白(rhBMP-3m)冷冻干燥。

1.2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE): 采用 Laemmli 不连续胶^[6],考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.7 蛋白含量测定: 用改良的 Bradford 试剂法^[7]。

1.2.8 表达产物的活性检测: 分离小鼠股部外侧肌肉间隙窝,植入经环氧乙烷熏蒸消毒的表达产物(rhBMP-3m)1mg;对照植入 1mg 粗制包涵体。植入后常规饲养,分别于第 7 天、14 天和 21 天取材,HE 染色,光镜观察结果。

2 结 果

2.1 菌株的诱导表达

pDH-B3m 重组质粒以 *E. coli* DH5 α 为宿主菌,按方法 1.4 进行温度诱导后作 SDS-PAGE,与对照菌株(未诱导的 pDH-B3m/DH5 α 及诱导的 pDH/DH5 α)比较,该菌在分子质量 14.5kD 处出现一条明显的新生蛋白带。表达量随诱导时间延长而增加,6h 达到最高,以后趋于稳定(Fig. 1)。诱导 6h 的样品电泳胶薄层扫描显示,新表达蛋白带对应最大主峰,约占菌体总蛋白的 28%。

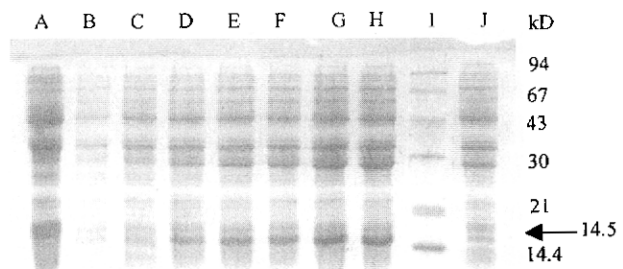


图 1 不同诱导时间 rhBMP-3m 表达的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of expressed rhBMP-3m induced for different times

A: Non-induced pDH-B3m/DH5 α

B~H: pDH-B3m/DH5 α induced at 42 $^{\circ}$ C for 1~7h

I: Protein molecular weight standards

J: pDH/DH5 α induced at 42 $^{\circ}$ C for 7h

2.2 包涵体的洗涤纯化

按方法 1.5 裂菌后的上清和沉淀分别作 SDS-PAGE,发现表达的 14.5kD 蛋白全部存在于沉淀中,说明诱导表达的蛋白是以包涵体的形式存在的。按方法 1.6 洗涤、溶解包涵体。对经各洗涤纯化包涵体蛋白作 SDS-PAGE,结果显示经过 4 次洗涤,目的蛋白即可达较高纯度(Fig. 2)。

2.3 SP-Sepharose FF 阳离子层析

变性蛋白经离子交换柱进一步纯化, rhBMP-3m 在 0.12mol/L NaCl 时被洗脱;收集洗脱峰作 SDS-PAGE,呈单一条带,纯度大于 95%(Fig. 3)。蛋白定量后算出产率约为 40mg/L 培养菌液。

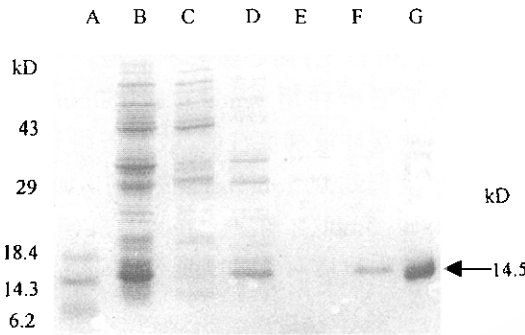


图 2 rhBMP-3m 洗涤纯化过程的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE for purifying rhBMP-3m

A: Protein molecular weight standards

B: Total protein of induced pDH-B3m/DH5α

C~D: Supernatant and precipitate washed with 2% DOC respectively

E~F: Supernatant and precipitate washed with 2mol/L urea respectively

G: Supernatant of F solubilized with 7 mol/L urea

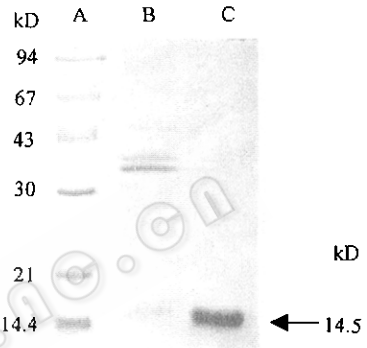


图 3 rhBMP-3m 离子交换层析后 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE for rhBMP-3m passed through ion-exchange chromatography

A: Protein molecular weight standards

B: Mixed protein

C: Purified rhBMP-3m

2.4 rhBMP-3m 的复性

按方法 1.8 稀释复性后,透析除去尿素、β-巯基乙醇和盐的过程中可见絮状沉淀出现。透析后浓缩至原复性体积的 1/4,蛋白定量测上清蛋白浓度为 0.08mg/mL;由此算得复性后可溶性蛋白回收率约为 40% [(0.08mg/mL × (1/4) V) ÷ (0.05mg/mL × V)]。冷冻干燥得到白色疏松锯末状蛋白,较易吸潮。

2.5 rhBMP-3m 的诱骨活性

将复性冻干的 14.5kD 蛋白 1mg 植入小鼠肌肉间隙,7d、14d、21d 后取样,作组织学切片观察,发现植入 7d 后肌肉组织中有大量的软骨细胞生成,软骨细胞大而圆(Fig. 4A);植入 14d 则见明显的软骨内成骨(Fig. 4B);21d 后新生骨组织呈编织状,有条索状骨小梁形成(Fig. 4C)。这结果表明纯化、复性的 rhBMP-3m 具有良好的诱导异位骨组织形成的活性;而对照组动物除有过炎症细胞浸润外,均未见有任何软骨或骨组织形成的迹象(组织学检查图未附),表明未经纯化复性的表达产物(包涵体)无诱骨活性。

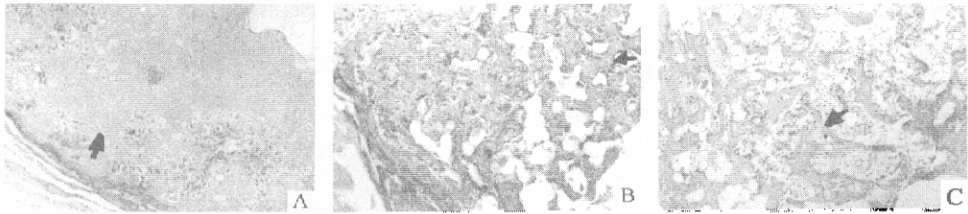


图 4 1mg rhBMP-3m 植入小鼠肌内的组织学检查

Fig. 4 Histological examination for mouse implanted with 1mg rhBMP-3m

A: 7days, formation of cartilage cells($\times 40$)

B: 14days, new bone formed from cartilage($\times 40$)

C: 21days, formation of bone and bone matrix($\times 40$)

3 讨 论

对 hBMP 基因表达的研究,国外多用 CHO、COS 等真核细胞,其活性虽好,但成本高、产量低^[2,8];国内则利用廉价的大肠杆菌表达了具诱骨活性的 hBMP-2 肽段^[9~11]。但是目前国内外关于 hBMP-3 表达的研究并不多。hBMP-3 全长 cDNA 编码区为 1416bp,编码 472 个氨基酸组成的多肽,与 hBMP 家族其他成员差别最大,和 hBMP-2 及 -4 的同源性仅为 35%;依据 BMP 前体蛋白和成熟蛋白之间有一共同的内切蛋白酶切位点 RXXR, Celeste 等^[12]推测 hBMP-3 成熟蛋白是羧基端 127 氨基酸组成的肽段,分子量为 14.5kD。我室曾在大肠杆菌中表达了有诱骨活性的 hBMP-3 羧基端 215 个氨基酸肽段,在 P_{lac} 启动子调控下,目的蛋白表达量占细菌总蛋白量的 18.5%^[4]。此次我们利用重新构建的 hBMP-3 成熟肽表达质粒 pDH-B3m^[5],不仅提高了表达量,而且表达载体为温控型,操作简单,适于生产。其表达产物大小与预期相符(14.5kD),也是目前所表达 hBMP-3 最小肽段。

BMP 属于细胞分化因子,至今尚无定量的活性测定方法,因而无法用比活性(u/mg)监测其纯化过程中活性的提高。BMP 诱骨活性一般以其体内异位诱导骨和软骨生成来定性判断。我们的实验结果表明纯化、复性后的 rhBMP-3m 诱骨过程与其他 BMP 诱导成骨过程基本相似;证实 hBMP-3 成熟肽(127 个氨基酸)包含生物活性区域。从组织学观察其诱骨的速度及骨组织的形成质量也优于以往表达的 hBMP-3 羧基端 215 肽^[4]。但 hBMP-3 成熟肽是否为最小或最佳活性肽段尚待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] M. R. Urist, S. Kovacs, K. A. Yates *et al.* J. Hand. Surg. Am., 1986, 11(3):417~421.
- [2] J. M. Wozney, V. Rosen, J. Celeste *et al.* Science, 1988, 242:1528~1534.
- [3] M. Inada, T. Katagiri, S. Akiyama *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1996, 222(2):317~322.
- [4] 崔有宏,陈苏民,刘新平等. 生物化学杂志, 1997, 13(5):513~519.
- [5] 朱帮福,蒲勤,陈苏民等. 第四军医大学学报, 1998, 19(3):249~251.
- [6] U. K. Laemmli. Nature, 1970, 227:680~685.

- [7] S. M. Read, D. H. Northcote. *Analy. Biochem.*, 1981, **116**:53~58.
- [8] E. A. Wang, V. Rosen, J. S. D Alessandro *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**(7):2220~2224.
- [9] 赵 明, 王会信, 周廷冲. *生物化学杂志*, 1994, **10**(3):318~324.
- [10] 林 松, 徐印敏, 李伯良. *生物化学与生物物理学报*, 1996, **28**(1):8~13.
- [11] 刘新平, 陈苏民, 陈南春等. *生物化学与生物物理进展*, 1996, **23**(2):156~159.
- [12] A. J. Celeste, J. A. Iannazzi, R. C. Taylor *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, **87**(23):9843~9847.

Expression, Purification and Bone-inducing Activity of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-3 Mature Peptide*

Zhu Bangfu Pu Qin Chen Nanchun Chen Sumin

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract It was inferred that the mature peptide of human bone morphogenetic protein-3 (hBMP-3m) consisted of the carboxyl terminal 127 amino acid residues of hBMP-3. A plasmid, pDH-B3m, which can express hBMP-3m, was constructed by inserting the cDNA sequences encoding hBMP-3m into pDH, a P_L containing expression vector. *Escherichia coli* DH5 α was transformed with pDH-B3m. The highest expression level of recombinant hBMP-3m (rhBMP-3m) could be reached after 6h induction at 42°C, it amounted 28% of the total bacterial proteins. rhBMP-3m was in the inclusion body. After washing and partially purification of the inclusion body, it was solubilized in urea and purified efficiently through ion-exchange chromatography. The purity of rhBMP-3m was at least 95%. rhBMP-3m was renatured by dilution method and then was implanted 1mg into mouse thigh muscles to assay its activity. A typical process of the formation of cartilage and bone tissues was observed from histological sections. The results showed that the purified and renatured rhBMP-3m had a good activity on inducing ectopic bone formation.

Key words Human bone morphogenetic protein-3(hBMP-3), expression, purification of protein, bone-inducing activity

* Key Project of PLA's Medical Research Foundation(No. 96Z045).