

江浙蝮蛇神经生长因子在大肠杆菌中的表达及纯化*

郭丽英 钟晓燕 吴祥甫 周元聪**

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 将江浙蝮蛇(*Agkistrodon halys Pallas, A. h. P.*)神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)基因克隆于分泌型原核表达载体 pET-22b⁺,以 C 端融合了 6 个组氨酸的形式在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行了 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 分析确定有一比理论值略大的诱导表达条带,其表达量占全菌蛋白质的 20% 左右,且表达蛋白质主要是以包涵体的形式存在。用 6mol/L 的盐酸胍溶解包涵体后,利用固定化金属离子(Ni²⁺)配体亲和层析一步纯化目的蛋白质,纯度可达 80% 左右。对该重组肽进行变复性研究。利用 PC12 细胞进行生物活力测定,证明表达产物具有 NGF 生物活力。

关键词 江浙蝮蛇,神经生长因子,His6 融合表达,PC12 细胞

分类号 Q939 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0293-96

神经生长因子是第一个被发现,也是目前为止研究得最为清楚的一个神经营养因子^[1]。它能够促进发育中外周及中枢神经系统的感觉神经元及交感神经元的存活及分化,维持成熟神经元的正常功能,并在其受到损伤后促进其修复及再生。在临床应用上,它具有改善老年性痴呆症及帕金森症等潜力。因此,有生物活性的 NGF 的表达具有应用意义。我们曾报道了 *A. h. P.* NGF 前体 cDNA 的克隆及序列分析^[2]。本文报道将 *A. h. P.* NGF 成熟肽 cDNA 克隆于原核表达载体,在大肠杆菌中表达了有生物活性的 NGF。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: pET-22b⁺ 质粒和大肠杆菌 BL21(DE3)和大肠杆菌 JM109 由本实验室保存。*A. h. P.* NGF 前体 cDNA 由本实验室克隆。

1.1.2 其它: 寡核苷酸引物由中国科学院上海生物化学研究所合成。PC12 细胞由香港科技大学詹华强博士赠送。各种工具酶及 DMEM 培养基、胎牛血清、马血清均购自 Gibco-BRL 公司。IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)购自 Promega 公司。Poly-D-lysine、青霉素及链霉素均为 Sigma 公司产品。Ni²⁺-NTA 树脂购自 Novagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的克隆: 据 *A. h. P.* NGF 成熟肽两端序列,合成一对引物,序列如下:

引物 1, 5' CAGGATCCTGAAGATCATCCTGTGCATA 3';

* 中国科学院重大项目基金资助。

** 联系人, E-mail: zhoyuc@sunm.shnc.ac.cn

收稿日期:1998-09-27, 修回日期:1999-03-22。

引物 1, 5' ACCTCTAGATCCAAAGTTCTCATTTTTTCTAC 3'。

PCR 扩增、克隆皆按照常规方法进行。

1.2.2 基因表达: 重组表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑单克隆接种于 3mL LB 培养液, 30℃ 培养至 OD_{600nm} 为 0.6, 于 4℃ 静置过夜。取上述培养物 4% 接种于新鲜 LB 培养液中, 30℃ 振荡至 OD_{600nm} 为 0.6, 加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 30℃ 继续培养 3h, 离心收集菌体待测。

1.2.3 表达产物溶解性分析: 收集表达菌, 加磷酸盐缓冲液悬浮菌体, 冰浴超声破菌。离心(12 000r/min × 10min), 分别收取上清和沉淀, 加 SDS 上样缓冲液煮沸后上样, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 SDS-PAGE 分析: 按常规方法进行。胶浓度 13%, 考马斯亮蓝染色。

1.2.5 表达产物的亲和纯化: 超声破菌后的包涵体溶于缓冲液(6mol/L 盐酸胍、20mmol/L Tris-HCl pH 8.0、0.5mol/L NaCl、5mmol/L 咪唑)中并上 Ni^{2+} -NTA 柱, 按照产品说明书用 Ni^{2+} -NTA 亲和柱来纯化。具体作法如下: Ni^{2+} -NTA 柱用前用上述缓冲液平衡, 上样后用含 20mmol/L 咪唑的上述缓冲液洗至基线, 最后用含 300mol/L 咪唑的上述缓冲液洗脱。收集洗脱蛋白质 -20℃ 保存待测。

1.2.6 产物的变复性^[3,4]: 上述洗脱蛋白质对缓冲液(0.1mol/L Tris-HCl pH 8.0、0.01mol/L EDTA、0.1mmol/L PMSF、10mmol/L DTT、6mol/L 盐酸胍)透析, 缓冲液中的盐酸胍与 DTT 浓度递减, 进而再用 10 倍体积的 0.1mol/L Tris-HCl pH 8.0、5μmol/L $CuSO_4$ 、20% 的甘油的缓冲液透析。复性产物 -20℃ 保存待测。

1.2.7 NGF 生物活性测定: 大鼠嗜铬神经瘤细胞株 PC12 细胞在 Poly-D-lysine 包被的培养皿中培养, 培养液为含有 6% 胎牛血清、6% 马血清、35μg/L 青霉素、50μg/L 链霉素的 DMEM/F12。NGF 生物活性测定参照文献[5]进行。用 0.05% 的胰蛋白酶溶液将细胞消化后, 离心收集细胞, 用无血清培养液吹打使细胞悬浮, 再离心。如此多次洗涤以彻底除去血清。最后细胞悬浮于无血清培养液中, 37℃ 静置 1h。将细胞以 2×10^5 的密度每孔 190μL 加入 PDL 包被过的 96 孔板里。待测样品用含 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液稀释成一系列的浓度, 加入孔中, 每孔 10μL。对照组加入不含样品的等量的上述磷酸缓冲液。37℃ 培养 24h 后用结晶紫染色法测定活细胞的数目。每孔加入 200μL 4% 的甲醛溶液固定 30min, 洗净后加入 150μL 含 0.05% 结晶紫的 pH 6.8 的 Tris-HCl 溶液染色 20min, 用水反复洗涤, 吹干后加入 100μL 0.1mol/L 的醋酸溶解。用酶标仪测定 590nm 光吸收。

2 结果与讨论

2.1 重组表达载体的构建

为了在大肠杆菌中进行表达, 我们设计了一对引物, 将编码 NGF 的成熟肽的基因通过 PCR 扩增出来, 克隆进入载体 pET-22b⁺。这个载体利用 T7 强启动子控制, 后接一段信号肽, 有利于将表达的肽运送到膜外, 这样将在一定程度上改善体外表达蛋白质的折叠及二硫键的错配情况。此外, 在表达蛋白的 C 端融合了 6 个连续的 His 残基, 也方便地利用固定化金属配体亲和层析将 His6 融合表达的外源产物纯化。克隆后的 DNA 经酶

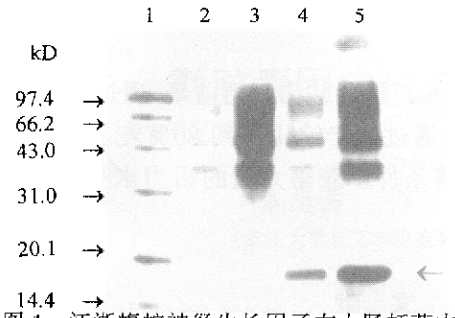


图 1 江浙蝮蛇神经生长因子在大肠杆菌中的表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of *A. h. P.* NGF expression product in *E. coli*

Lane 1. Molecular weight marker; Lane 2. BL21 (DE3) transformant containing pET-22b⁻; Lane 3 ~ 5. BL21 (DE3) transformant containing pET-22b-NGF after induction with IPTG for 0, 1.5 and 3h, respectively.

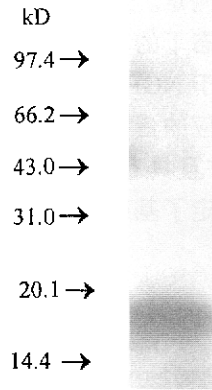


图 2 表达产物的纯化

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expressed *A. h. P.* NGF after affinity chromatography

切、测序鉴定正确。

2.2 NGF 的表达

将 pET-22b⁺-NGF 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 进行 IPTG 诱导的表达研究。经全菌蛋白质的 SDS-PAGE 分析, 与空载体及未诱导对照相比而言, 有一明显的诱导表达条带, 但该条带的分子量比理论估计值偏大(见图 1)。此外, 破菌后分取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析显示表达条带在沉淀中。这提示此蛋白质并未被分泌到胞外, 信号肽也未被切掉。表达条带是成熟的 NGF 肽段 N、C 端分别融合了信号肽和 6 个 His 的融合蛋白, 而且形成了包涵体的形式。这也说明了分泌型原核表达载体成功与否因后接的目的蛋白质而异。

2.3 表达产物的纯化

收集包涵体, 用盐酸胍溶解后直接利用固定化金属离子(Ni²⁺)配体进行亲和层析。接着我们对洗脱的目的蛋白质进行了变复性研究。可能由于二硫键的错配, 另外还有 NGF 分子本身的结构特性造成分子具有粘性, 这些都导致大量的融合蛋白在复性过程中聚合沉淀。天然的 NGF 分离纯化中即发现 NGF 很易发生聚合, Hu 等在小鼠 NGF 表达中也发现了这一现象^[6]。我们在复性液中加入了一定量的甘油, 这在一定程度上增加了表达蛋白的溶解性。复性产物经 SDS-PAGE 分析表明, 表达蛋白已获 80% 纯化(图 2)。

2.4 产物的活性分析

利用 PC12 细胞在无血清条件下的存活依赖于 NGF 的特性进行 NGF 生

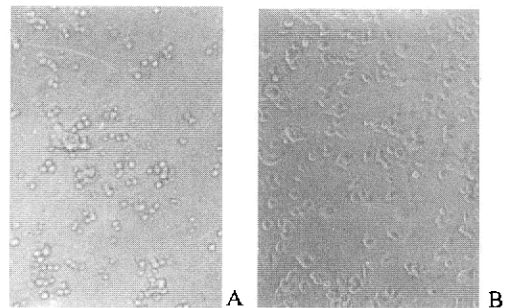


图 3 表达的神经生长因子能够维持 PC12 细胞在无血清条件下的存活

Fig. 3 The expressed *A. h. P.* NGF could rescue PC12 cells form apoptosis in serum-free medium
A. Without recombinant NGF; B. With recombinant NGF

物活力测定。结果显示经纯化的融合蛋白具有 NGF 生物活力,能够维持 PC12 细胞在无血清状态下的存活(图 3)。

由于 NGF 在神经系统中的生理功能及其可能的临床运用前景,通过基因工程的手段获得相应的蛋白质具有相当的意义,本工作通过一步纯化得到 80% 左右纯的 NGF 融合蛋白,并且具有生物活力,这就为进一步改善条件以获得大量的活力水平高的 NGF 表达产物奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] R. Levi-Montalcini, S. D. Skaper, R. D. Toso *et al.* *Trends Neurosci*, 1996, 19: 514.
- [2] L. Y. Guo, J. F. Zhu, X. F. Wu *et al.* *Toxicon*, 1999, 37: 465.
- [3] E D R Clark. *Curr Opin Biotech*, 1998, 9: 157.
- [4] R. Rudolph, H Lilie. *FASEB J*, 1996, 10: 49.
- [5] C. J. Robison, R. Stammers. *Growth Factors*, 1994, 10: 193.
- [6] G. Hu, K. E. Neet. *Gene*, 1998, 70: 57.

Expression of Nerve Growth Factor from *Agkistrodon halys Pallas* in *Escherichia coli* and its Purification *

Guo Liying Zhong Xiaoyan Wu Xiangfu Zhou Yuancong

(Shanghai Institute of Biochemistry, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract *Agkistrodon halys Pallas* nerve growth factor gene was cloned into a secretive prokaryotic expression vector pET-22b⁺, which carries a C-terminal His Tag sequence. After transforming into *E. coli* BL21(DE3), NGF was induced to express at 30°C by IPTG. SDS-PAGE analysis showed an induced expression product band which constituted about 20% of the total bacterial proteins. However, its molecular weight was larger than what was expected. Moreover, the analysis of product solubility revealed that NGF was in the form of inclusion bodies. Inclusion bodies was solubilized in 6 μmol/L guanidine HCl and purified directly by immobilized metal (Ni²⁺) chelation affinity chromatography. The product was renatured by dilution and air oxidation in the presence of 5 μmol/L CuSO₄. The product was proved active by examining the survival rate of PC12 cells in serum-free medium.

Key words *Agkistrodon halys Pallas*, nerve growth factor, His 6 fusion expression, PC12 cells

• Supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences.