

ProNGF 在大肠杆菌中的表达、纯化和复性

江汉民, 柴新君, 何冰, 赵娟, 俞新大

南开大学生命科学学院, 天津 300071

摘要: 将含有前导肽的人神经生长因子基因(proNGF)克隆在原核表达载体pET15b中, 转化大肠杆菌BL21(DE3)pLysS, 经IPTG诱导实现了目标融合蛋白的高效表达。SDS-PAGE分析表明表达蛋白占全菌总蛋白的20%左右, 表达蛋白主要以包涵体的形式存在。用6 mol/L的盐酸胍溶解包涵体后, 通过Ni²⁺-NTA柱纯化, 获得纯化的目标融合蛋白, 电泳谱带扫描分析表明蛋白纯度可达90%以上。Western blotting检测显示, 表达产物有较强的免疫学活性。经肠激酶作用后得到proNGF非融合蛋白, 分子量为27 kD, 100 mL表达菌液可获得13.1 mg proNGF蛋白。用透析复性的方法将目的蛋白重折叠, 复性率为18%, 在重折叠过程中前导肽发挥了一定的积极作用。用PC12细胞进行生物活性鉴定, 结果显示复性后的proNGF蛋白具有良好的生物活性。

关键词: 神经生长因子, 表达, 前导肽, 蛋白复性, 生物活性

Expression, Purification and Renaturation of ProNGF in *Escherichia coli*

Hanmin Jiang, Xinjun Chai, Bing He, Juan Zhao, and Xinda Yu

College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Nerve growth factor (NGF) promotes neuronal survival and differentiation and stimulates neurite outgrowth. NGF is synthesized as a precursor-proNGF *in vivo*. In this paper, a pET-proNGF prokaryocyte expression vector was constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS. The proNGF was expressed in the form of non-active aggregated monomer in *E. coli* after induction with IPTG. SDS-PAGE revealed the proNGF expression product had a Mr.30.2 kD. Western blotting analysis showed that the protein had good antigenicity. Fusion protein was successfully purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography and cleaved by Enterokinase and 13.1 mg proNGF was obtained from 100 mL cell culture in a typical experiment. The protein was dialyzed in a redox system containing reduced and oxidized glutathione. RP-HPLC was used to analysis the result of the refolding. The refolded proNGF protein can induce neurite outgrowth of PC12 cells, which indicated that pro-form of NGF we obtained had biological activity.

Keywords: nerve growth factor, expression, propeptide, protein refolding, biological activity

神经生长因子(Nerve Growth Factor, NGF)是机体重要的神经营养因子之一, 能促进中枢及外周神经系统的发育和分化, 维持神经系统的正常功能, 加快神经系统损伤后的修复, 临床上可用于治疗多

Received: July 23, 2007; Accepted: August 29, 2007

supported by: the Natural Science Foundation of Tianjin (No. 033605211).

Corresponding author: Xinda Yu. Tel: +86-22-23505275, E-mail: yuxd@nankai.edu.cn

天津市自然科学基金资助(No. 033605211)。

种神经系统疾患^[1-3]。已有报导从胎盘中纯化hNGF,但其组织来源极其有限,成本高产量低,不能满足对hNGF的需求,所以利用基因工程方法获得大量有活性的hNGF,对基础研究和临床应用均具有重要的意义。

用昆虫细胞、酵母细胞和大肠杆菌等表达系统表达NGF都有报道^[4-7],目前重要的问题仍然包括如何提高表达量、易于分离纯化和保持良好的生物活性。rhNGF在*E. coli*中主要以包涵体的形式表达,需要经过体外折叠复性形成正确的高级结构从而获得预期的生物活性。如何提高重组包涵体蛋白的复性率是多肽类药物表达研究的重要内容之一。近年来,pro肽在辅助蛋白质的折叠方面的作用引起了人们的关注^[8]。本文将带有前导肽的人神经生长因子(proNGF)在大肠杆菌中进行表达,并对影响蛋白复性的因素进行研究,探索较佳的复性条件,希望建立一种能够得到有活性的神经生长因子的有效方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及细胞

克隆质粒 pBS-T 购自天根生化科技有限公司;表达质粒 pET15b 及表达菌 BL21(DE3)pLysS 由本实验室保存;含有信号肽、前导肽和成熟肽 NGF 基因的质粒 pFastBac-preproNGF 为本实验室构建和保存;PC12 细胞由我院陈家童老师惠赠。

1.1.2 酶和主要试剂

PremixTaq DNA polymerase、*Bam*H I、*Nde* I、T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司;Ni²⁺-NTA 金属螯合蛋白质纯化系统购自 Novagen 公司;兔抗人β-NGF 抗体购自北京鼎国生物技术中心;Enterokinase 购自上海源智生化科技有限公司;rHuproNGF 标准品(分子量 49 kD)购自 PromoKine 公司;低分子量蛋白标准购自天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 ProNGF 基因的克隆

以本实验室构建的含有信号肽、前导肽和成熟肽 NGF 基因的质粒 pFastBac-preproNGF 为模板,参照 Ulrich 等^[9]报道的人 NGF 基因序列,通过分段合成引物,利用 2 步 PCR 的方法在 proNGF 的上游 5' 端引入编码肠激酶识别位点的序列和 *Nde* I 酶切位点,在

下游 5' 端引入终止密码子和 *Bam*H I 酶切位点。2 次 PCR 的引物序列如下:

1st PCR S1 Primer
5'-CGACGACAAGATGGAACCACACTCAGAGAG-3'

1st PCR A1 Primer
5'-CGGGATCCTTATCTCACAGCCTTCCTGCTG-3'

2nd PCR S2 Primer
5'-CGGCATATGGATGACGACGACAAGATGGAAC-3'

2nd PCR A2 Primer
5'-CGGGATCCTTATCTCACAGCCTTCCTGCTG-3'

第一次 PCR 反应结束后,取 1 μL 产物作为第二次 PCR 反应的模板。PCR 反应条件为:94 7min,94 45 s,62 30 s,72 1min,30 个循环。PCR 产物经凝胶回收后与 pBS-T 连接,连接产物转化 *E. coli* DH5α,经蓝白斑筛选及酶切分析得到阳性克隆,对阳性克隆进行序列测定,以确证目的基因序列正确。

1.2.2 表达质粒的构建

以 *Nde* I/*Bam*H I 双酶切阳性克隆质粒,回收编码 proNGF 的 DNA 片段,与经同样双酶切的 pET15b 进行连接。转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。筛选阳性克隆,进行 PCR 和酶切鉴定。

1.2.3 融合蛋白的表达、纯化和 Western blotting 鉴定

提取表达质粒,转化表达宿主菌 BL21(DE3)pLysS,在含有氨苄青霉素和氯霉素的培养基上筛选转化子,挑取单菌落过夜培养,按 1:100 的比例转接于 100 mL 含氨苄青霉素和氯霉素的 2×YT 培养基中,37 振荡培养至 A₆₀₀ 为 0.3~0.5,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,诱导培养 4 h。SDS-PAGE 电泳检测表达情况,并用超生波裂解细胞分析外源蛋白的表达形式。采用 Novagen 公司的 Ni²⁺-NTA 蛋白质纯化柱纯化目标融合蛋白,具体操作参照其说明书并参照文献^[10]。表达和纯化的 proNGF 经 SDS-PAGE 后,电转移至硝酸纤维素膜上,进行 Western blotting 分析,一抗为兔抗人β-NGF 的多克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG,显色试剂为 DAB。

1.2.4 融合蛋白的酶切

向 10 μg 融合蛋白质的浓缩液中加入肠激酶裂解液(50 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5, 1 mmol/L CaCl₂, 100

mol/L NaCl, 2 u肠激酶), 25 下反应过夜后, 通过 SDS-PAGE电泳检测切割效率。收集酶切后蛋白, 利用 Millipore公司的 Microcon YM-10 超滤柱进行超滤浓缩, Bradford法测定蛋白质浓度后, 分装成 10 μ g 的小包装冻存。

1.2.5 蛋白质的复性及复性结果的检测

采用优化后的谷胱甘肽氧化还原复性缓冲体系进行蛋白质复性。将酶切后纯化的 proNGF 样品于含 100 mmol/L DTT 的 6 mol/L 盐酸胍中透析 6 h, 以还原所有的二硫键, 然后于 6 mol/L 盐酸胍中透析 2 次, 除去 DTT。proNGF 在复性液中样品的浓度 50 μ g/mL。起始复性缓冲液为: Tris-Cl 100 mmol/L、EDTA 5 mmol/L、L-Arg 1 mol/L、GSH 5 mmol/L、GSSG 1 mmol/L、6 mol/L 盐酸胍、pH 9.0、10。通过更换溶液, 缓慢降低外周液中盐酸胍浓度, 直至降为 2 mol/L。

透析结束后直接取样, RP-HPLC 检测复性结果。色谱柱为: Alltima C4 色谱柱(5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm)、流动相 A 为乙腈:水(2:8)溶液, 内含 0.1%(V/V)TFA、流动相 B 为乙腈:水(6:4)溶液, 内含 0.1%(V/V)TFA, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 225 nm。色谱条件为: 0~10 min, 100%流动相 A, 10~40 min, 100%流动相 B。外标法计算复性后的蛋白浓度。

1.2.6 生物活性的鉴定

将 PC12 细胞按 2×10^4 细胞/mL 的密度接种于 RPMI 1640 培养液 I 中(含 10% 马血清和 5% 小牛血清, 100 u/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素), 37、5% CO₂ 培养箱中培养, 待其贴壁后, 调整培养液为含 100 ng/mL proNGF 的细胞培养液 II(含 2.5% 马血清和 1.25% 小牛血清), 37、5% CO₂ 的培养箱中培养 72 h。倒置显微镜下观察细胞形态。根据 PC12 细胞形态变化和突起生长程度确定 proNGF 的生物活性。

2 结果

2.1 ProNGF 基因的扩增和重组表达载体 pET15b-proNGF 的构建

PCR 扩增编码 proNGF 的 DNA 片段经克隆和测序正确后, 用 *Nde* I/*Bam*H I 双酶切, 与经同样双酶切的 pET15b 进行连接, 转化 *E.coli* DH5 α 。得到的重组表达载体命名为 pET15b-proNGF。PCR 和酶切鉴定结果显示(图 1), 该重组表达质粒包含一约

700 bp 的 *Nde* I/*Bam*H I 插入片段, 测序结果表明此片段包含 proNGF 基因完整的编码序列, 并且序列和可读框均完全正确, 进一步将该表达质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS, 用于蛋白的诱导表达。

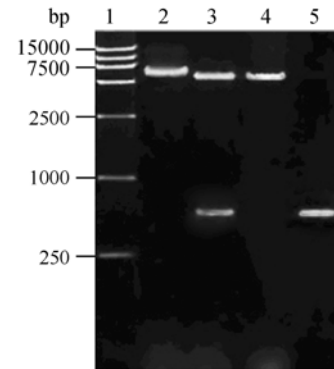


图 1 重组表达载体 pET15b-proNGF 的酶切分析
Fig. 1 Restriction analysis of recombinant expression plasmid pET15b-proNGF

1: DNA marker (DL-15000); 2: pET15b-proNGF/*Bam*H I; 3: pET15b-proNGF/*Bam*H I+*Nde* I; 4: pET15b/*Bam*H I; 5: PCR products

2.2 ProNGF 蛋白的诱导表达、纯化及 Western blotting 分析

经 IPTG 诱导后, 离心收集菌体。电泳检测结果(图 2)显示携带重组质粒 pET15b-proNGF 的表达菌株在分子量为 30.2 kD 的位置上产生有一条特异蛋白条带, 其表达量约占细菌总蛋白的 20%, 而对照菌株中均无此相应蛋白条带。裂解试验显示, proNGF 融合蛋白以包涵体形式存在于细胞质中。

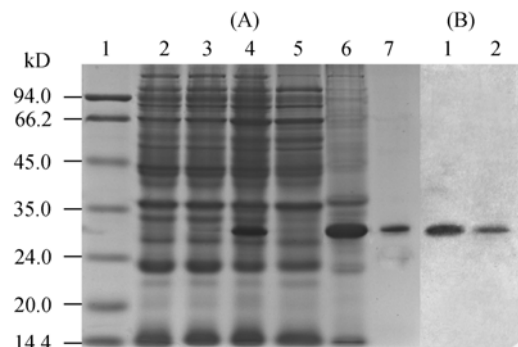


图 2 表达蛋白的 SDS-PAGE 与 Western blotting 分析
Fig. 2 SDS-PAGE(A) and Western blotting(B) of proNGF fusion protein expressed in *E. coli*

(A) 1: protein marker; 2: induced product of pET15b/BL21; 3: uninduced product of pET15b-proNGF/BL21; 4: induced product of pET15b-proNGF/BL21; 5: supernatant of ultrasonicated pET15b-proNGF/BL21; 6: deposit of ultrasonicated pET15b-proNGF/BL21; 7: purified target proNGF fusion protein (B) 1: total protein; 2: purified target protein

利用 8 mol/L 尿素溶解包涵体后通过 Ni²⁺-NTA

层析柱进行蛋白分离纯化。融合蛋白通过其N端6His-tag与 Ni^{2+} 离子之间的螯合作用,特异性吸附于层析柱上,经洗脱后,便可得到纯度高于90%的融合蛋白(图2A)。

Western blotting 检测显示, 分子量为30.2 kD处的目的蛋白能与兔抗人 β -NGF发生较强的免疫反应,说明我们所得到的表达产物有较强的免疫学活性(图2B)。

2.3 融合蛋白的酶切

纯化后的融合蛋白样品,经肠激酶酶切,SDS-PAGE 凝胶图像分析表明酶切后得到分子量约为27 kD的 proNGF 蛋白(图3),其大小与预期 proNGF 基因编码蛋白质大小相当。

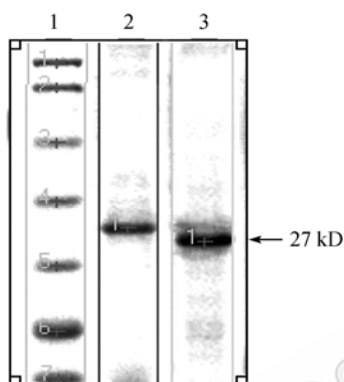


图3 SDS-PAGE 凝胶成像系统分析融合蛋白的酶切
Fig. 3 Cleavage of the fusion protein with Enterokinase analysed by gel imaging system

1: protein marker; 2: proNGF fusion protein(30.2 kD);
3: proNGF(27 kD)

2.4 ProNGF 复性结果的检测

RP-HPLC分析显示,氧化还原复性后的proNGF在 t_R 为22.046 min处有单一峰,与标准蛋白(rHuproNGF) t_R (22.286 min)基本一致,较复性前proNGF样品的 t_R 提前了4 min,完全变性的proNGF的 t_R 为26.057 min,表明proNGF蛋白经过氧化还原透析得到了复性(图4)。根据目标峰的峰面积和标准曲线应用外标法计算出蛋白浓度,进而计算出蛋白的复性率为18%。

2.5 生物活性测定

PC12 细胞培养法活性鉴定试验显示:在无proNGF的对照培养中,细胞体积小,呈圆形或椭圆形,没有出现形态上的明显分化特征(图5A)。在含100 ng/mL proNGF的培养中,PC12细胞分裂停止,细胞平展,细胞胞体分化为多边形或锥形,有多个

突起长出,其外形似交感神经元细胞(图5B)。表明在大肠杆菌中表达的 proNGF 复性后具有神经生长因子的生物活性。

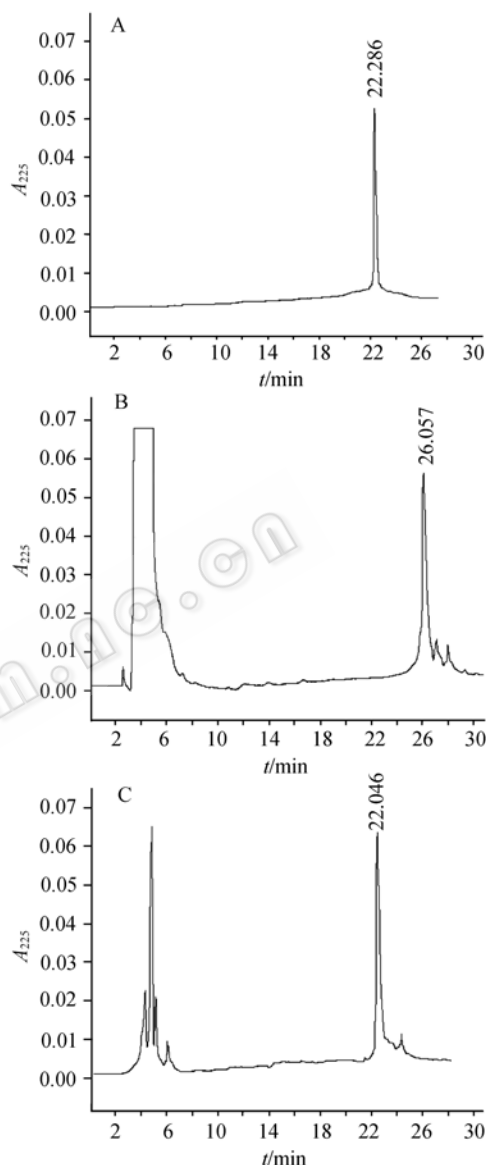


图4 ProNGF 复性的 RP-HPLC 分析
Fig. 4 Analysis of proNGF refolding by RP-HPLC
A: rHuproNGF; B: unfolded proNGF; C: refolded proNGF

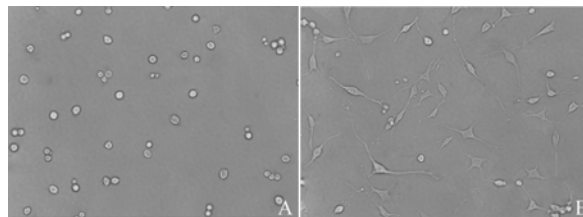


图5 ProNGF 生物活性测定($\times 200$)
Fig. 5 The effect of proNGF on the growth of PC12 cells ($\times 200$)

A: control: absence of proNGF; B: presence of 100 ng/mL proNGF

3 讨论

自Scott^[11]首次克隆出NGF基因以来,研究者不断尝试用不同的NGF基因片段在不同的表达系统中进行重组表达。NGF在体内是以前体的形式合成的,包括信号肽、前导肽和成熟肽三部分。信号肽有助于蛋白质的分泌。目前发现,绝大多数的以含有前导肽的前体形式合成的蛋白质,其前导肽都有帮助其正确折叠的作用,人们对蛋白质折叠有帮助的前导肽称为分子内分子伴侣(Intramolecular Chaperone, IMC)^[8,12]。因此认为, pro肽有可能在NGF的折叠过程中扮演了分子内分子伴侣的角色。所以本试验选用含前导肽的人NGF基因片段(proNGF),在大肠杆菌中进行重组诱导表达。

本试验选用的表达载体为pET15b,由于其本身含有6个组氨酸组成的组氨酸“标签”,所以表达的目的蛋白可以通过Ni²⁺-NTA亲和层析而纯化,大大简化了纯化过程和难度。另外,在PCR扩增proNGF基因片段时,我们在proNGF基因的上游引入了编码肠激酶识别序列的碱基,这样表达出的蛋白由于含有(Asp)₄-Lys序列,能够被肠激酶专一性识别,并在赖氨酸残基后切割。方便纯化后除去目的蛋白N端多余的氨基酸,既避免了复性时对蛋白质折叠的影响,又排除了将来对蛋白质性质进行分析时的干扰。

蛋白质复性即如何高效地将无活性的包涵体转变成成为有活性的蛋白质已成为基因工程研究的重要内容,而利用分子伴侣的协助折叠特性进行的蛋白质复性技术正成为这一领域的研究热点^[13],本研究中,我们将带前导肽(propeptide)的人NGF基因(proNGF)在大肠杆菌中进行表达,表达的产物以包涵体的形式存在,在经过变性剂(6 mol/L的盐酸胍)和还原剂(DTT)处理后,通过透析的方式在氧化还原体系中进行了复性的研究,在总结前人研究结果的基础上,将RP-HPLC技术引入到神经生长因子复性结果的定性及定量分析中。RP-HPLC可以分出聚合体、异构体等,可用来分析正确折叠产物的含量,是分析正确折叠率的简便易行的方法。proNGF有3对二硫键,复性过程中易形成二硫键错配,这些错配的proNGF以及复性不完全proNGF的疏水性比天然结构的proNGF疏水性大,比具有生物活性的蛋白

更迟洗脱出来。这都可以通过RP-HPLC检测到。复性结果表明proNGF的复性率要远远高于相同复性条件下成熟肽在大肠杆菌中表达产物的复性率(0.8%左右),这说明在变性蛋白的重折叠过程中前导肽(propeptide)发挥了一定的积极作用。

复性后的产物采用PC12细胞培养法进行生物活性的鉴定,与经典的神经生长因子活性测定方法—鸡胚背根神经节培养法相比,该法具有操作简单,干扰因素少,活性判断标准客观等优点。

在采用常规的10%的马血清+5%的小牛血清+85%的RPMI 1640作为PC12细胞培养液时,发现PC12细胞极易团聚,在国外文献报道的基础上,我们对PC12细胞培养法进行了部分改进,降低了马血清的浓度,并比较研究了不同的血清比例,经过摸索优化了测定proNGF活性的方法。为使神经样突起有足够生长空间,要使细胞贴壁,减少聚团,同时降低牛血清自身所致细胞分化,选择了2.5%马血清和1.25%小牛血清的浓度,取得了良好效果。细胞培养12h就完全贴壁且牢固,不易聚团,可生存,但生长状态不佳,细胞呈圆球形。而加入神经生长因子后,PC12细胞可以正常生长并分化出神经元样的突触。

我们的工作为进一步研究pro肽在NGF的折叠中的作用及作用机制打下了基础。

REFERENCES

- [1] Hu L, Cote SL, Cuello AC. Differential modulation of the cholinergic phenotype of the nucleus basalis magnocellularis neurons by applying NGF at the cell body of cortical terminal fields. *Exp Neurol*, 1997, **143**(1):162-171.
- [2] Schifitto G, Yinnoutsos C, Simpson DM, et al. Long term treatment with recombinant nerve growth factor for HIV-associated sensory neuropathy. *Neurology*, 2001, **57**(7): 1313-1316.
- [3] Goins WF, Yoshimura N, Phelan MW, et al. Herpes simplexvirus mediated nerve growth factor expression in bladder and afferent neurons: potential treatment for diabetic bladder dysfunction. *J Urol*, 2001, **165**(5): 1748-1754.
- [4] Allen SJ, Robertson AG, Tyler SJ, et al. Recombinant human nerve growth factor for clinical trials: protein expression, purification, stability and characterisation of binding to infusion pumps. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, **47**: 239-255.
- [5] Fan Q, Liu HD, Sun T, et al. Expression of Human β -nerve growth factor in *P. pastoris* and *E. coli*. *Chinese Science*

