

PTD-hEGF 融合蛋白在大肠杆菌中的表达及活性分析

PTD-hEGF Fusion Protein—Gene Expression and Function Analysis

智庆文^{1,2,3}, 王淑豪¹, 张凤英³, 李仕贵^{2*}, 孙曼霁^{1*}

ZHI Qing-Wen^{1,2,3}, WANG Shu-Hao¹, ZHANG Feng-Ying³, LI Shi-Gui^{2*} and SUN Man-Ji^{1*}

1 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

2 四川农业大学教育部作物遗传资源和发展重点实验室, 雅安 625014

3 中国人民解放军防化指挥工程学院, 北京 102205

1 Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2 Key Laboratory of Crop Genetic Resource and Improvement of Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China

3 Command and Engineering College of Chemical Defense of Chinese PLA, Beijing 102205, China

摘要 为获得 hEGF 在大肠杆菌中的高效表达, 构建了 pPTD-hEGF 原核表达载体。将其转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 0.3mmol/L IPTG 诱导, PTD-hEGF 融合蛋白进行了有效表达, 表达产物主要形成了包涵体。经 Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化, 融合蛋白的纯度达 99.5%。MALDI-TOF-MS 分析证明表达的融合蛋白氨基酸序列完全正确。PTD-hEGF 融合蛋白能明显促进 HEK-293 细胞的分裂和生长。

关键词 PTD-hEGF 融合蛋白, 原核表达, HEK-293 细胞

中图分类号 TQ93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0589-04

Abstract To produce membrane-permeable human epidermal growth factor (hEGF), a pPTD-hEGF prokaryocyte expression vector was constructed and transformed into *E. coli* BL 21 (DE3). The PTD-hEGF fusion protein was induced by 0.3mmol/L of IPTG expressed in the form of inclusion body with an yield of 40% of the total protein in the cells, and then purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography. The SDS-PAGE analysis showed a single fusion protein band with a molecular weight of 16kD. The amino acid sequence was checked by MALDI-TOF-MS analysis. The genetic engineering PTD-hEGF fusion protein obviously promoted the proliferation and growth of the HEK-293 cells *in vitro*.

Key words PTD-hEGF fusion protein, prokaryocyte expression, HEK-293 cell

人表皮生长因子(human epidermal growth factor, hEGF)是由 53 个氨基酸残基组成的多肽, 广泛分布于各种体液中。hEGF 强烈刺激多种细胞的增殖分化, 对维持人体正常的生理活动起着十分重要的作用。临床上可用于消化性溃疡、烧伤和创伤治疗^[1-3]。另外, hEGF 也可以用于化妆品领域, 起到

去皱、嫩肤、养颜之功效^[4,5]。人体中 hEGF 的含量极微, 提取纯化相当困难, 因此, hEGF 的获得主要通过微生物的分泌性表达来实现, 但这种表达量往往不高^[11-13]。高效表达 hEGF 的原核系统产物多为包涵体, 无活性, 复性过程繁琐, 限制了其广泛利用。PTD(Protein transduction domain, YGRKKRRQRRR)来

源于人类免疫缺陷病毒 HIV-1 Ta(Trans-activator) 蛋白的功能区^[6],能够有效引导肽段或者蛋白质进入细胞,具有蛋白传送的功能。PTD 与其他蛋白融合进入细胞具有快速、高效性,并且表现出原有蛋白的生物学功能^[7-10]。PTD 的发现无疑给 hEGF 的进一步开发利用提供了一条新的途径。本研究正是利用了 PTD 能穿透细胞膜,带动与其结合的蛋白进入细胞内部这一特性,构建了融合表达载体 pPTD-hEGF。成功实现了 PTD-hEGF 融合蛋白在大肠杆菌中的高效表达。所形成的包涵体产物无需经过专门的复性过程,经 Ni^{2+} -NTA 亲和层析纯化后,融合蛋白 PTD-hEGF 表现出了良好的促 HEK-293 细胞生长活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 :质粒 pPTD 由 pRSET 改造而成,在多克隆位点的上游含有编码 6 个组氨酸的标签序列及编码由 11 个氨基酸组成的 PTD 序列,此外还含有一些其他的辅助序列,该质粒由本实验室构建而成。pMD-18-hEGF,含有化学合成的人 EGF 基因序列,该基因序列与天然的人 EGF 基因序列不同,但所编码的氨基酸序列完全一样,为本实验室保存。pGEM-T Vector 和菌株 BL21(DE3) 购自天根生物技术有限公司。

1.1.2 动物细胞及培养基 :人胚肾 HEK-293 细胞由军事医学科学院毒物药物研究所张树卓博士惠赠。RPMI 1640 细胞培养基及胎牛血清(FBS)为 Gibco 产品。

1.1.3 酶和试剂 :限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco*R I 为 Promega 公司产品;质粒纯化与提取试剂盒,TA DNA 连接酶,PCR MasterMix 及 DNA 分子质量标准为天根生物技术有限公司产品;PCR 扩增引物在博亚生物公司合成。MTS 为 Promega 产品。标准 rhEGF 为 Peptrotech 产品。其他试剂均为分析纯或化学纯。

1.1.4 MALDI-TOF-MS 检测 :由军事医学科学院仪器测试分析中心进行测试。

1.2 方法

1.2.1 pPTD-hEGF 融合基因表达载体的构建 :依据 hEGF 基因编码序列及表达载体 pPTD 的多克隆酶切位点,设计一对引物。上游:5'-A GGTACC ATG AAT AGC GAT TCT GAA-3',下游:5'-A GAATTC TTA ACG AAG TTC CCA CCA-3'。划线处为酶切位点。按照以下反应程序从质粒 pMD-18-hEGF 上扩增出目的基因 hEGF:94℃ 变性 5min,94℃ 30s,65℃ 30s;

72℃ 60s;25 个循环结束后,72℃ 继续延伸 7min。纯化回收目的基因片段亚克隆到 pGEM-T 载体上。由 *Kpn* I + *Eco*R I 双酶切重组质粒和表达载体 pPTD,回收目的基因片段和载体片段,将它们连接成为重组的表达载体 pPTD-hEGF。

1.2.2 PTD-hEGF 融合蛋白的表达及表达形式的分析 :重组质粒 pPTD-hEGF 转化感受态的大肠杆菌 BL21(DE3),在 Amp^r 琼脂平板上挑选单菌落接种于 3mL LB/Amp 液体培养基中,33℃ 培养到 $OD_{600} = 0.5$ 左右时,加入 IPTG 至终浓度 0.3mmol/L,继续培养 2h。收集菌体,PBS 洗涤 2 次,按每 mL 细菌培养液加 50 μ L 细胞裂解液重悬菌体,超声裂解,离心后收集上清和菌体碎片。SDS-PAGE 电泳确定表达蛋白的存在形式。

1.2.3 PTD-hEGF 融合蛋白的纯化 :将表达菌体超声破碎离心后的沉淀溶解在 8mol/L 的尿素中, Ni^{2+} -NTA 亲和层析。用含咪唑 100mmol/L 的洗脱液冲洗结合了融合蛋白的介质,回收洗脱液,SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白。

1.2.4 MALDI-TOF-MS 分析 :切取胶内与预期结果一致的蛋白条带,脱色纯化后由 Trypsin 酶切,指纹图谱分析,然后对各片段进行拼接,确定所表达蛋白的氨基酸序列。

1.2.5 PTD-hEGF 融合蛋白对 HEK-293 细胞的促分裂和生长作用 :将标准 rhEGF 和纯化后的 PTD-hEGF 根据 hEGF 在融合蛋白中所占的比例换算成 hEGF 的实际含量,按 0.1,0.2,0.4,0.8,1.6 和 3.2ng/mL 稀释于含有 0.5% FBS 的 RPMI 1640 细胞培养基,将对数生长期细胞 HEK-293 按每孔 5000 个分别加入各浓度的培养液中,最终体积为 100 μ L,每一样品设 3 个平行组;37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 48h;每孔加入 20 μ L MTS 溶液后继续培养 1~4h,用酶联免疫检测仪测 OD 值, $\lambda = 492\text{nm}$ 。

2 结果

2.1 pPTD-hEGF 融合基因表达载体的鉴定

2.1.1 PCR 鉴定 :任意挑选两个重组质粒进行 PCR 分析,结果表明这两个质粒都扩增出了与预期结果相符的目的基因片段(图 1)。

2.1.2 酶切鉴定 :*Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切重组质粒,电泳图谱中出现了与预期结果一致的目的基因片段(180bp)和载体片段(3000bp)(图 2)。测序证明重组质粒没有发生基因突变和移码现象(结果未显示)。

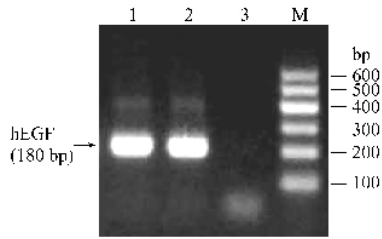


图 1 重组质粒的 PCR 分析

Fig.1 PCR analysis of the recombinant plasmids

M : DNA marker ; 1 2 : recombinant plasmids ; 3 : pPTD control.

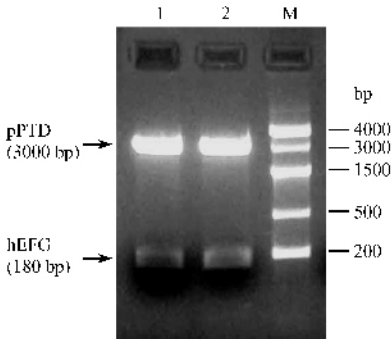


图 2 pPTD-hEGF 酶切分析

Fig.2 Analysis of the pPTD-hEGF recombinant plasmids

M : DNA marker ; 1 2 : pPTD-hEGF recombinant plasmids.

2.2 PTD-hEGF 融合蛋白的表达

挑取上述质粒之一转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经检验正确后进行诱导表达。以下是其中一个克隆的表达情况(图 3)。从图中可以看出, 该质粒进行了有效的表达。

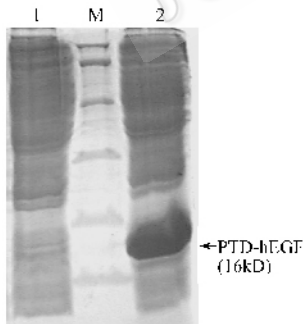


图 3 PTD-hEGF 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the PTD-hEGF expression

1 :supernatant of the cell lysate ; 2 :precipitate of the cell lysate ;M :protein marker (97 66 43 31 20 ,14.4kD).

2.4 PTD-hEGF 融合蛋白的纯化

将表达菌体超声破碎离心后的沉淀溶解在 8mol/L 的尿素中, Ni²⁺-NTA 亲和层析。用含咪唑 100mmol/L 的洗脱液冲洗结合了融合蛋白的介质, 回收洗脱液, SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白, 结果显示, 在大约 16kD 附近的位置出现了一条蛋白条带(图 4)。

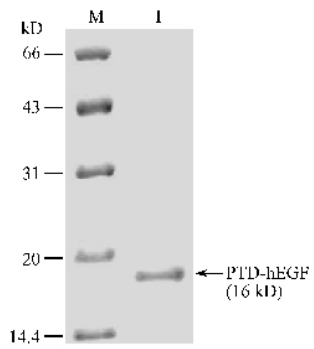


图 4 纯化的 PTD-hEGF 融合蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the purified PTD-hEGF fusion protein

M :protein marker ; 1 :purified PTD-hEGF fusion protein.

2.4 MALDI-TOF-MS 分析 PTD-hEGF 融合蛋白

从 SDS-PAGE 胶上切取 PTD-hEGF 融合蛋白片段, 脱色纯化后用 Trypsin 酶切, 指纹图谱分析(图 5)。胰酶消化后的各肽段的序列列于表 1。肽段重叠分析结果表明所表达的 PTD-hEGF 融合蛋白的氨基酸序列完全正确。

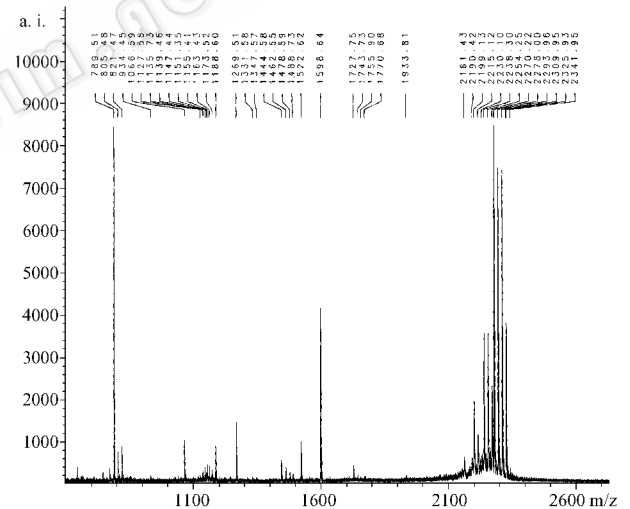


图 5 融合蛋白 PTD-hEGF 的 MALDI-TOF-MS 图谱

Fig.5 MALDI-TOF-MS analysis of the fusion PTD-hEGF protein

将上述各肽段重叠后可以看出, 片段 I - V 显示了 N 端 3-44 位的氨基酸序列, 片段 VI - X 显示了 C 端 103-127 位的氨基酸序列。在片段 45-50 位的序列是 RRQRRR, 被胰酶消化后为单一的氨基酸, 在 51-102 位没有胰酶的酶切位点, 在图上都没有显示出来。综上所述, 在 SDS-PAGE 胶上 16kD 的蛋白条带即为融合蛋白 PTD-hEGF。

2.5 PTD-hEGF 融合蛋白促细胞生长活性的测定

纯化后的 PTD-hEGF 融合蛋白稀释成相应浓度添加到 HEK-293 细胞的培养液中, 用 MTS 法对其促细胞的生长活性进行了检测(图 6)。PTD-hEGF 在

0.1 ~ 0.4ng/mL 范围内随浓度的升高而增强,表现出明显的量效关系。PTD-hEGF 与标准 rhEGF 对 HEK-293 细胞的促生长活性相似,但在较低浓度下又表现出比标准 rhEGF 有更高的活性。

表 1

Table 1 Mass and amino acid sequences of the peptides measured by MALDI-TOF-MS

Fragment No.	Molecular ion peak measured	Peptide sequences	Fragment locations
I	2278.00	GSHHHHHHGMASMTGGQQMGR	3 - 23
II	1269.51	DLYDDDDKDR	24 - 33
III	1727.75	DLYDDDDKDRWGSK	24 - 37
IV	1151.35	WGSKLGYGRK	34 - 43
V	821.47	LGYGRKK	38 - 44
VI	1444.58	YACNCVVG YIGER	103 - 115
VII	2341.95	YACNCVVG YIGERCQYRDLK	103 - 122
VIII	934.45	CQYRDLK	116 - 122
IX	1147.44	DLKWWE LR	120 - 127
X	789.51	WWE LR	123 - 127

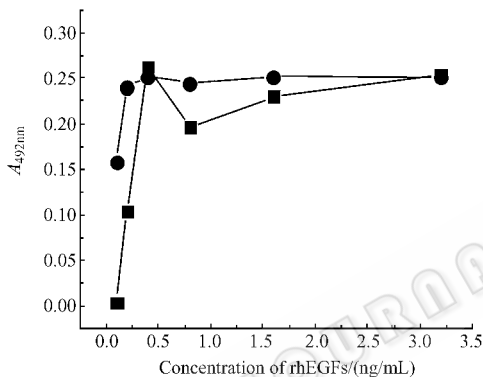


图 6

Fig. 6 Biological activity analysis of fusion PTD-hEGF by MTS

■ standard rhEGF ● PTD-hEGF.

3 讨论

本研究成功构建了能在原核生物中高效融合表达的载体 pPTD-hEGF,将该载体导入到工程菌株 BL21(DE3)中,在 IPTG 的诱导下得到了高效表达的融合蛋白 PTD-hEGF。表达量占细菌总蛋白的 40%,表达形式主要是包涵体。 Ni^{2+} -NTA 亲和层析纯化得到的融合蛋白纯度达 99.5% 以上。包涵体是变性蛋白质的聚集体,没有生物活性,而培养细胞中添加后表现出了明显的促细胞生长活性,这一现象说明包涵体进行了活性恢复。其机制之一应该是 PTD-hEGF 进入了细胞内部,在细胞内发生了重新折叠,由无活性的形式变为有生理活性的形式。当细胞培养中 hEGF 的浓度在 0.1 ~ 0.4ng/mL 时,其促细胞生长作用有明显的量效关系,PTD-hEGF 在较低浓度下有明显的促细胞生长活性,其原因可能是除了

与膜受体结合外,hEGF 在 PTD 的牵引下进入了细胞核内,由于 PTD 序列中带有核定位信号肽 (GRKKR)^[14],其跨膜转运后主要积聚于细胞,尤其是核内,hEGF 在核内聚集,直接调控了 DNA,RNA 和蛋白质的合成。

致谢 MALDI-TOF-MS 分析结果是在军事医学科学院仪器测试分析中心王杰老师的帮助和指导下完成的,在此表示感谢。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Wang SL(王世岭),Guo ZR(郭振荣),Zhou L(周亮),et al. Effects of recombinant human epidermal growth factor on the healing of burn wounds. *Chin J Clin Pharmacol*(中国临床药理学杂志),1998,14(3):150-154.
- [2] Yu ZL(于正龙),Shen BD(沈炳棣). The study of human epidermal growth factor in treating peptic ulcer. *Chin J Dig*(中消化杂志),1994,14(2):119-120.
- [3] Zhou L(周亮),Wang SL(王世岭),Ma JL(马建丽),et al. Recombinant human epidermal growth factor in treatment of 100 cases of burn wounds. *Chin New Dru J*(中国新药杂志),2000,9(6):399-401.
- [4] Tang YH(唐艳红),Wang QX(王泉祥),Tang ZM(唐在明). Human epidermal growth factor and its protection in skin. *Chin J Med Aesth & Cosmet*(中华医学美容学杂志),2004,10(1):53-55.
- [5] Chen QD(陈秋东),Xu YX(许永兴),Xu ZN(徐志南). Human epidermal growth factor and its application in cosmetics. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*(日用化学工业),2002,32(5):38-40.
- [6] Vives E,Brodin P,Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*,1997,272(25):16010-16017.
- [7] Morris MC,Depollier J,Mery J,et al. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature Biotechnol*,2001,19(12):1173-1176.
- [8] Klein D,Mendoza V,Pileggi A,et al. Delivery of TAT/PTD-fused proteins/peptides to islets via pancreatic duct. *Cell Transplant*,2005,14(5):241-248.
- [9] Becker HM,McAllister SS,Dowdy SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods*,2001,24(3):247-256.
- [10] Schwarze SR,Ho A,Vocero-Akbani A,et al. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*,1999,285(5433):1569-1572.
- [11] Xu ZN(徐志南),Cen PL(岑沛霖),Wong WKR. The effects of different glucose feeding modes on hEGF production in an excretory recombinant *Escherichia coli* K12 system. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报),2001,17(5):594-597.
- [12] Wang GL(王关林),Yi Q(易庆),Fang HJ(方宏筠). Transforming and secreting expression of human egf in mutant strain WYBS2001 of *Bacillus* and its functions. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报),2003,30(2):97-102.
- [13] Lam KH,Chow KC,Wong WK. Construction of an efficient *Bacillus subtilis* system for extracellular production of heterologous proteins. *J Biotechnol*,1998,63(3):167-177.
- [14] Vives E,Brodin P,Lebler B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*,1997,272(25):16010-16017.