

构建重组表达质粒 pBV220 / mhNT-4 及 mhNT-4 在大肠杆菌中的表达

张 华¹, 赵家良¹, 胡海涛²

(1. 中国医学科学院北京协和医院眼科, 北京 100730;
2. 西安交通大学医学院神经生物学中心, 西安 710061)

摘 要: 利用基因重组技术将 mhNT-4 亚克隆到表达载体 pBV220, 构建重组表达质粒 pBV220 / mhNT-4, 诱导表达 mhNT-4 成熟蛋白, 鉴定 mhNT-4 的生物活性。将经鉴定的 pGEM-T Easy / mhNT-4 克隆用限制性内切酶 EcoR I, BamH I 消化, 琼脂糖凝胶电泳回收片断。酶切原核高表达载体 pBV220, 用限制性内切酶 EcoR I, BamH I 消化, 琼脂糖凝胶电泳回收线性化载体。用 T4 DNA 连接酶连接两个回收片断, 构建重组质粒 pBV220 / mhNT-4。限制性内切酶消化, 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒。经鉴定的重组质粒 pBV220 / mhNT-4 转染大肠杆菌 DH5 α , 温度诱导表达 mhNT-4 蛋白。SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳技术分离表达的 mhNT-4 蛋白。制备 8~9d 鸡胚, 分离并培养背根神经节(DRG)细胞。分别加入回收的表达蛋白和牛血清白蛋白, 培养鸡胚背根神经节 DRG 细胞, 检测 mhNT-4 生物活性。重组表达质粒 pBV220 / mhNT-4 构建正确, 表达框架未发生改变。成功诱导表达、分离了 mhNT-4 成熟蛋白。表达蛋白组可见大量神经突起自神经节组织快周缘向四周呈放射状长出, 对照组未见神经突起长出。mhNT-4 成熟蛋白具有良好的生物活性。本研究为进一步开展 mhNT-4 基因治疗青光眼提供了资料。

关键词: 人神经营养-4 成熟蛋白基因 (mhNT-4); 基因重组; 表达载体; 生物活性
中图分类号: R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-7180(2006)04-0263-6

青光眼是一种严重的致盲性眼病, 是一组与视野缺损有关的具有特征性视神经病变的眼部疾病, 以高血压为危险因素之一。青光眼的视神经病变和视野缺损, 与视网膜神经节细胞及其轴突在视网膜和视神经缺损相关, 阐明视网膜神经节细胞死亡过程中的细胞分子变化是目前一个活跃的研究领域, 正被广泛应用于视网膜神经节细胞衰亡的机制研究中, 并将为青光眼治疗带来新方法。

神经营养家族 (neurotrophin family) 是神经营养因子中一组形态和结构密切相关的蛋白质^[1], 包括神经生长因子 (NGF), 脑源性神经营养因子 (BDNF), 神经营养因子-3 (NT-3), 神经营养因子-4/5 (NT-4/5) 和神经营养因子-6 (NT-6) ^[2-6]。对脊椎动物神经元的存活具有促进作用^[7]。目前, 神经营养家族已经成为神经系统研究的热点之一。

在以前的研究中, 我们课题组已成功地从中国人白细胞中克隆 NT-4 全长基因^[8]和成熟蛋白基因^[9]。本文从中国人白细胞中成功地克隆人神经营养-4 成熟蛋白基因 (the matured human neurotrophin-4, mhNT-4) 并成功构建重组了真核表达质粒 pBV220 / mhNT-4, 为今后研究在原核细胞中的表达, 进一步开展青光眼基因治疗创造有利条件^[7, 10-11]。

1 材料和方法

1.1 载体与菌株

噬菌体载体 pGEM-T Easy (50ng / μ l), 购自 Promega 公司。重组质粒 pGEM-T Easy / mhNT-4, 由作者构建成功^[9]。原核高表达质粒 pBV220, 见图 1; 宿主菌 E coli DH5 α 由西安华广生物工程公司馈赠。

1.2 工具酶和实验试剂

限制性内切酶 EcoR I, BamH I, Sma I,

基金项目: 首都医学发展科研基金 (2002-1014), 美国中华医学基金 (No. 82413)

作者简介: 张华, 医学博士, 眼科博士后, 副主任医师, 副教授。

E-mail: eyezhanghua@yahoo.com.cn

TaqDNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, 考马斯亮兰 R-250 染色, 牛血清白蛋白和淋巴细胞分离液等均购自西安华美生物工程公司。其它试剂及全部实验设备均由西安华广生物工程公司提供。

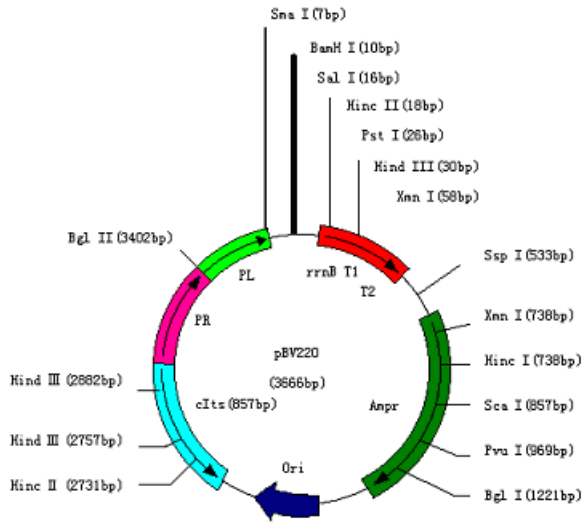


图1 pBV220 的限制性内切酶图谱

Fig.1 Restriction map of plasmid pBV220

1.3 感受态细胞制备 (CaCl₂)

接种 0.1ml E coli DH5 α 菌种入 10ml LB 培养液中。37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡 (摇床速度 3000r/min) 2~3 h (OD₆₀₀ 约为 0.4)。超净台取菌液 1.5ml 入无菌离心管, 8000r/min 离心 5min。(以下各步均在无菌条件下); 打开离心管, 弃上清, 加入 0.5ml 预冷的 CaCl₂ 重悬菌液。8000r/min 离心 5min 后, 弃上清, 再加入 0.1ml 预冷的 CaCl₂ 重悬菌液, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 琼脂平板的制备 LB

液体培养基的配制: 胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 琼脂 15g, 双蒸馏水定容至 1000ml, 5mol/L NaOH 调定 pH 至 7.0。分装至 10 个 100ml 烧瓶中, 1.034 \times 10⁵ Pa 高压灭菌 20min 后, 保存备用。在培养皿内加入氨苄青霉素 (50 μ g/ml), 再加入适量在微波炉内熔化的固体培养基, 混匀。在凝固好的琼脂平板的表面 40 μ l X-gal, 4 μ l IPTG, 用无菌玻璃涂布器涂匀, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱内 4h。

1.5 制备带有相同粘性末端的载体和目的基因

质粒 pGEM -T Easy/mhNT-4 经限制性内切酶 EcoR I 与 BamH I 联合消化后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳法回收 0.406Kb mhNT-4 的基因片段。同样方法回收经 EcoR I 与 BamH I 联合酶切的 pBV220 载体

(3.656Kb)。

1.6 带有相同粘性末端的载体和目的基因的连接反应

建立如下连接反应体系 pBV220/EcoR I BamH I (0.1 μ g/ μ l) 1 μ l, mhNT-4/EcoR I BamH I (0.1 μ g/ μ l) 1 μ l, T4 DNA 连接酶 (3U/ μ l) 1 μ l, 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μ l, H₂O 6 μ l, 65 $^{\circ}$ C 水浴 5min 后, 立即冰浴 2 min。4 $^{\circ}$ C 过夜。在一个 0.5ml 离心管内加入连接反应体系的目的基因、水和载体, 65 $^{\circ}$ C 5min 后, 立即冰浴 2 min。在连接反应体系加入 T4 DNA 连接酶及 2 \times T4 DNA 连接酶缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

1.7 阳性克隆筛选和鉴定

用连接反应产物转染 CaCl₂ 法制备的感受态 E coli DH5 α , 涂于 LB 琼脂平板上 (Ap⁺) 表面, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 12h。随机挑选单菌落, 种植于含有氨苄青霉素 (200mg/L) 的 LB 培养液内, 30 $^{\circ}$ C 增殖培养后, 碱裂解法小提质粒, 用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 联合酶切, 筛选出含有的 0.406Kb 重组质粒 pBV220/mhNT-4, 再用 Sma I 酶切鉴定 pBV220/mhNT-4。

1.8 克隆基因的诱导表达

将重组表达质粒 pBV220/mhNT-4 的 E. coli DH5 α 种植在含有氨苄青霉素 (200mg/L) 的 200ml LB 培养液内, 在 30 $^{\circ}$ C 振荡培养, 使培养液的 OD₆₀₀ 达 0.4-0.6, 迅速升温至 42 $^{\circ}$ C, 继续培养 5h。

1.9 表达蛋白的制备

1.9.1 细菌的裂解 (超声破碎法)

将经诱导表达的培养液, 在 4 $^{\circ}$ C 以 15000r/min 离心 15min 后, 弃上清。沉淀用裂解缓冲液 (50mmol/L NaAc, 150mmol/L NaCl; pH 5.0) 洗一次, 在 4 $^{\circ}$ C 以 15000r/min 离心 15min 后, 弃上清。用 30ml 裂解缓冲液重悬沉淀, 置 -20 $^{\circ}$ C, 6h。在冰浴条件下, 用超声波细胞粉碎机裂解细菌; 参数: 功率 120W, 每次超声粉碎持续 30s, 间隔 30s, 共 6 次; 再冰浴 5min; 4 $^{\circ}$ C 15000r/min, 离心 15min, 分别收集上清和沉淀。

1.9.2 包涵体的溶解和蛋白复性

用洗涤液 (100 裂解缓冲液; 现配) 重悬沉淀, 冰浴 30 后, 4 $^{\circ}$ C 15 000r/min, 离心 15min, 弃上清。沉淀溶于 8mol/L 尿素中, 室温 16h, 使其充分溶解, 4 $^{\circ}$ C 15 000r/min, 离心 15min, 收集上清。上清分别装于透析袋内, 4 $^{\circ}$ C 在洗涤液内透析 48h。收集透析袋内溶液, 4 $^{\circ}$ C 15 000r/min, 离心 15min, 收集上清。

1.10 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的考马斯亮蓝染色

从电泳装置上取下凝胶，浸于 5 倍体积考马斯亮蓝染色液（0.25g 考马斯亮蓝，90ml 甲醇:H₂O(1:1V/V)，10ml冰醋酸）内，室温 6h。回收染色液，凝胶用甲醇/醋酸溶液脱色 12h，其间更换脱色液数次。分析电泳结果，并用 20%甘油溶液保存凝胶，以备摄影。

1.11 鸡胚背根神经节组织培养

在超净台内，自气室打开 37℃ 孵育 10 天的鸡胚，用无菌镊挑出鸡胚，俯仰于灭菌敷料上。显微解剖镜下，用眼科剪刀剪去背侧软组织，暴露脊柱并煎去其背侧部分，暴露脊髓及两侧背根神经节。用 DMEM（含 5% 新生牛血清，100U/ml 青霉素、氨苄青霉素，2% NaHCO₃）冲洗涂布有鼠尾胶原的平皿一次。摘取背根神经节，分散种植于平皿内。片

刻后，加入培养基，至神经节刚好浸润。置平皿于 CO₂ 孵箱内，37℃ 封闭培养。培养 12h 后，分别加入回收的表达蛋白和牛血清白蛋白各 0.1μg，继续培养 24h。相差倒置显微镜下，观察神经节生长情况，并摄影。

2 结果

2.1 原核表达重组质粒 pBV220/mhNT-4 的构建

重组质粒 pGEM-T Easy/ mhNT-4 经限制性内切酶 EcoR I 与 BamH I 联合消化后，用 1% 琼脂糖凝胶电泳法回收 0.406Kb mhNT-4 的基因片段。同样方法回收经 EcoR I 与 BamH I 联合酶切的 pBV220 载体(3.656Kb)。所得重组质粒命名为 pBV220/mhNT-4，见图 2。

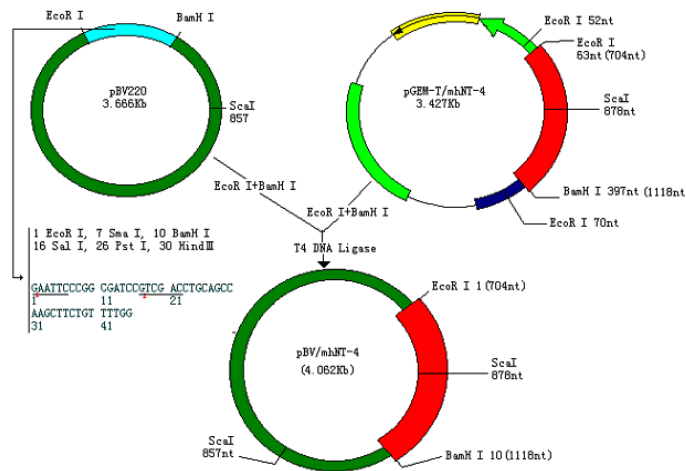


图 2 原核表达重组质粒 pBV220/mhNT-4 的构建

Fig.2 The strategy for constructing the recombinant pBV220/mhNT-4

2.2 阳性克隆的筛选鉴定

理论上，重组质粒 pBV220/mhNT-4，大小为 4.062Kb。经 EcoR I 和 BamH I 联合酶切后，产生 0.406Kb 和 3.656Kb 两个片段。实验所得重组质粒 pBV220/mhNT-4，分别经 EcoR I 和 BamH I 联合酶切后，1%琼脂糖凝胶电泳，结果显示，与理论值完全一致。见图 3。

2.3 克隆基因的热诱导表达

将含有重组质粒 pBV220/mhNT-4 的菌种，在 30℃ 摇床振荡扩增培养，使培养液的 OD600 达 0.4~0.6，迅速升温至 42℃，继续培养 5h。SDS -聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳结果（见图 4）显示。含 pBV220/mhNT-4 的 DH5α 菌种，在 42℃ 诱导表达出浓的蛋白条带，分子量约为 14KD。与 mhNT-4

蛋白分子量相符。

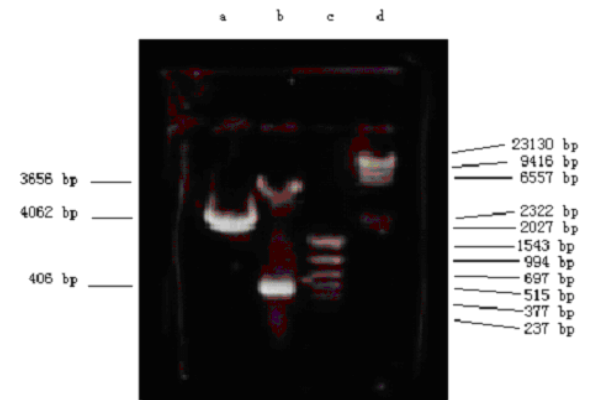


图 3 重组质粒 pBV220 / mhNT-4 的联合酶切鉴定图谱
Fig.3 Identification of the recombinant expression vector pBV220/mhNT-4: a.pBV220 / mhNT-4/Sma I(4.062Kb);

b.pBV220 / mhNT-4/ EcoR I +Bam I(0.406Kb, 3.656Kb); c. PCR Markers (0.237Kb,0.377Kb,0.515Kb,0.697Kb, 0.997Kb, 1.543Kb); d. λ DNA/Hind III Markers (0.125Kb, 0.564Kb, 2.207Kb,2.322Kb, 4.361Kb, 6.557Kb, 9.416Kb, 23.130Kb)

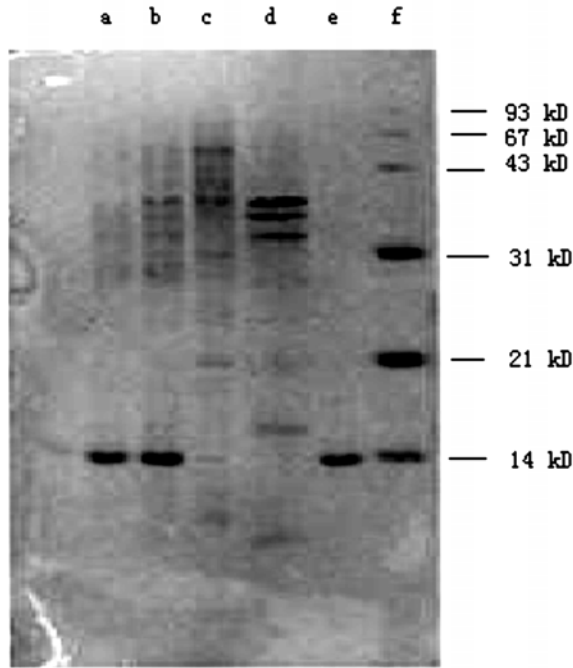


图4 含 pBV220/mhNT-4 的 DH5 α 菌种热诱导表达 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳图谱 (42 $^{\circ}$ C 诱导培养 5h) : a、pBV220 质粒转化菌对照上清; b、pBV220 质粒转化菌对照沉淀; c、pBV220/mhNT-4 表达上清; d、pBV220/mhNT-4 包涵体裂解后沉淀; e、pBV220/mhNT-4 表达产物复性后蛋白; f、蛋白质分子量参照物 (94, 67, 43, 30, 20,14) kD

Fig.4 SDS-PAGE analysis of DH5 α strain expression mhNT-4 fusion gene(expression was induced at 42 $^{\circ}$ C for 5 hours): a, Supernatant control of expressed pBV220. b, Pellet control of expressed pBV220. c, Supernatant of expressed pBV220/ mhNT-4. d, The inclusion bobies of protein of pBV220/ mhNT-4. e, Refolded protein of expressed pBV220/ mhNT-4. f, protein molecule weight marker (MW 94, 67, 43, 30, 20,14) kD

2.4 表达产物的活性检测

本文分别收集培养基中培养细胞上清, 加入鸡胚背根神经节组织培养皿中, 37 $^{\circ}$ C 培养 12h 后, 相差倒置显微镜下可见, 鸡胚背根神经节组织周缘有神经突起呈放射状长出 (见图 5)。对照组未见神经突起长出 (见图 6)。证实 mhNT-4 在原核细胞大肠杆菌中得到了正确表达和翻译后加工, 产生并分泌

了具有生物学活性的 mhNT-4 蛋白。

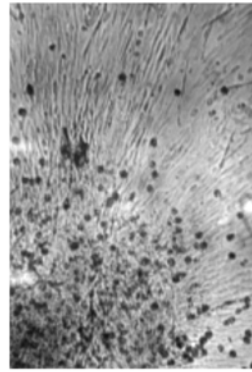


图 5



图 6

图5 鸡胚背根神经节组织培养法检测原核表达的 mhNT-4 生物学活性, 加入 mhNT-4 成熟区基因表达产物 24 小时, 鸡胚背根神经节组织周缘有神经突起呈放射状长出。

图6 鸡胚背根神经节组织培养法检测原核表达的 mhNT-4 生物学活性, 加入牛血清白蛋白 24 小时, 未见神经突起长出。

The expressed protein was introduced into the dorsal root ganglia(DRG) of embryonic day 8 chickens in order to test wether it was a biologically active protein. Bioactivily of the products was proved that it could support the cell survival and neurite growth in the primary cultures of DRG of embryonic day 8 chickens neurons(See Fig.5) as compared the contron(See Fig.6)

3 讨论

神经营养因子-4 (NT-4) 和成熟的神经营养因子-4 编码基因已从蟾蜍中克隆出来^[1]。人的神经营养因子-4 基因定位于染色体 19q13.3, 全基因 633bp, 其单一外显子编码的前提由 210 氨基酸组成。NT-4 成熟蛋白由 130 个氨基酸组成, 基因 390bp, 人的神经营养因子-4 基因对鸡胚背根神经节的感觉神经元的存活和生长有促进作用^[1]。

hNT-4 成熟蛋白基因与其它神经营养素的同源氨基酸序列为 50%~55%。NT-4 的成熟段序列有 6 个高度保守的半胱氨酸残基通过二硫键连接形成的半胱氨酸节 (cysteine knot)。

真核基因在大肠杆菌中表达已经有十余年历史, 它能够快速提供大量蛋白质, 有利于蛋白质工程和蛋白质功能的研究^[12]。目前, 克隆化的基因在大肠杆菌内表达主要以产生融合蛋白和天然蛋白 2 种形式存在。由于天然蛋白表达量过高的情况下以形成大量包涵体, 为纯化蛋白质带来许多困难, 而不像融合蛋白那样表达比较稳定, 并且表达出的蛋白质量较多。融合蛋白表达体系主要优点在于表达

量较高,容易纯化,并且多数表达载体中存在蛋白酶水解位点,可将克隆蛋白水解下来。

人神经营养素-4的基因(hNT-4)具有多方面的神经生物学作用,但因其在组织内的含量很低,因此难以用传统方法直接从组织内提取足够的天然蛋白,所以必须采用基因工程生产重组hNT-4。基因工程的表达系统分为原核和真核两种,其中原核表达因其产量高、操作简单、费用少,因而迄今依然是基因工程中应用最为广泛的表达系统。人神经营养素-4的成熟蛋白基因(mhNT-4)的成功克隆^[9],为其在大肠杆菌内进行高效表达提供了关键的物质基础。

表达效率一直是基因工程研究中关注的焦点。而选择合适的载体宿主系统是外源基因在原核体系内高效表达的关键之一。在大肠杆菌中高效表达真核蛋白,必须选择合适的表达载体。本课题选用的原核高效表达真核质粒pBV220,质粒pBV220具有以下优点: cIts857 抑制子基因与P_L启动子同在一个载体上,可以转化任何菌株,以便选用蛋白酶活性较低的宿主菌,使表达产物不易降解;SD序列后面紧跟多克隆酶切位点,便于插入带起始ATG的外源基因,可表达非融合蛋白,其产品可供人体使用;强的转录终止信号可防止出现“通读”现象,有利于质粒-宿主系统的稳定;整个质粒仅为3.666Kb,有利于增加其拷贝数及容量,可以插入较大片段的外源基因。因其含有P_L启动子和编码对该启动子具有抑制作用而又对温度敏感的cI蛋白基因cIts857 调控基因cI,因此可用温度对插入其中的外源基因的转录进行调控。而在SD序列下游的多克隆位点,使得设计引物时,即在成熟蛋白序列前引入了起始密码子ATG,因此在插入pBV220转化大肠杆菌后,经温度诱导,可以高效表达非融合性的hNT-4成熟蛋白。

实验结果表明,hNT-4成熟蛋白在大肠杆菌内大量表达,形成胞浆内不溶性的包涵体。包涵体(inclusion body,IB)是外源基因在原核细胞中表达时,尤其在大肠杆菌细胞中高效表达时,形成的有膜包裹的高密度、不溶性蛋白质颗粒,在显微镜下观察时为高折射区,与细胞质中的其它成分有明显的区别。细胞中的生物活性蛋白质常以可溶性或分子复合物的形式存在,功能性的蛋白质总是折叠成特定的三维构型。包涵体内的蛋白质是非折叠状态的聚集体,不具有生物学活性,因此,要获得具有生物

学活性的蛋白质必须将包涵体溶解,释放出其中的蛋白质,并进行蛋白质复性。包涵体是不溶于水的,为了获得可溶性的蛋白质,首先将其溶解,本实验采用强的蛋白质变性剂8mol/L尿素溶解包涵体,使共价聚集的蛋白质分子间分离。经过包涵体蛋白质的复性,是包涵体内的变性蛋白质恢复其天然三维空间结构从而具有生物学活性。收集包涵体内表达蛋白,经体外复性后,可促进培养的鸡胚背根神经节神经元突起生长,表明其具有较好的生物活性。

[参考文献]

- [1] Nancy Y P, Carlos F I, Steven HN, *et al.* Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 3060~3064
- [2] Maisonpierre P C, Belluscio L, Squinto S, *et al.* Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF[J]. *Science*, 1990, 247: 1146~1151
- [3] Maisonpierre P C, Michelle M, Nancy Y P, *et al.* Human and rat brain-derived neurotrophin factor and neurotrophin-3: gene structure, distributions, chromosomal localizations[J]. *Distribution. Genomics*, 1991, 10: 558~568
- [4] Götz R, Köster R, Winkler C, *et al.* Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family[J]. *Nature*, 1994, 372: 266~269
- [5] Lewin G R, Bard Y A. Physiology of neurotrophins[J]. *Annu Rev Neurosci*, 1996, 19: 289~317
- [6] McDonald N Q, Hendrickson. A structural superfamily of growth factors containing a cysteine knot motif[J]. *Cell*, 1993, 73: 421~424
- [7] Arenas E, Persson H. Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo[J]. *Nature*, 1994, 367(6461): 368~371
- [8] Zhang Hua, Hu Haitao, Ren Huimin, *et al.* Molecular cloning of human neurotrophin-4 gene[J]. *J Xi'an Med Univ(Engl. Ed.)*, 2001, 13(2): 172~176
- [9] Zhang Hua, Hu Haitao, Ren Huimin, *et al.* The cloning of the matured human neurotrophin-4 gene[J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2004, 20(5): 439~443
- [10] Boissiere F, Fauchoux B, Agid Y, *et al.* Expression of catalytic trkB gene in the striatum and the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease: an in situ hybridization study. *Neurosci Lett*, 1997, 221(2-3): 141~144
- [11] 张殿增主译, 张华副主译. 《基础和临床药理学(第七版)》, 第1版, 第1次印刷. 世界图书出版公司出版, 2000: 1087~1097 { [美] Bertram G. Kutzung(卡卓恩)著, Basic & Clinical Pharmacology(7E), 由 Appleton & Lange 公司授权 }
- [12] Harris T J R. In genetic engineering[J]. *Academic press, London*, 1993; 1: 57-92

The strategy for constructing the recombinant pBV220/ the matured human neurotrophin-4 gene molecular cloning and its expression in escherichia coli

Zhang Hua¹, Zhao Jialiang¹, Hu Haitao²

(1. Department of Ophthalmology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730;

2. Research Center of Neurobiology, Medical College of Xi-an Jiaotong University, Xi-an 710061, China)

Abstract: Through genetic recombination technique, the matured human neurotrophin-4 gene (mhNT-4) is inserted into polylinker site of expression vector pBV220, to generate a recombination plasmid pBV220/ mhNT-4 as expression vector. Construction, recombinant plasmid pBV220 / mhNT-4 and evaluation the bioactivity of mhNT-4. The splice donor sequence BamH I and protect base pair is obtained and cloned into fusion vector pBV220, after restrict enzymes digesting. (The results showed that mhNT-4 is cloned correctly into expression vector pBV220, recombinant expression vector pBV220/ mhNT-4 is constructed.). Recombinant plasmid pBV220 / mhNT-4 is correctly constructed and open reading frame is not exchange. This study successfully detachment, purified and indicated the gene of mhNT-4. The bioactivity of the secreted proteins is detected. The mhNT-4 protein is a satisfactory bioactivity. In conclusion, the results of this study suggest that genomic productions of the mature hNT-4 genes can be used for the neuroprotective therapy. It is concluded that the prokaryocyte cell expression vector is constructed successfully for gene therapy of glaucoma and other central nervous system diseases.

Key words: the matured human neurotrophin-4 gene(mhNT-4); DNA recombination; expression vector; organism activity