

转化生长因子 α -绿脓杆菌外毒素融合蛋白 TGF α -PE40 高效表达质粒的构建和表达

徐亚男 沈敏慧 赵庆顺* 张红宇 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 利用基因工程技术,将质粒 pYX382 用 XbaI 和 EcoRI 切下插入的 TGF α -PE40 融合基因片段, 连接到可表达载体 pCB604 的 XbaI/EcoRI 位点中, 构建成新的重组质粒 p2X-TP1。p2X-TP1 转化 *E. coli* BL21 感受态菌后, 在 IPTG 诱导下 Ipp 启动子转录表达 TGF α -PE40 融合蛋白。表达产物主要以包涵体形式沉积在细胞内。融合蛋白表达量的高低与诱导时的细胞密度, 诱导的温度以及培养基有关。在一定范围内与诱导剂的剂量以及诱导时间的长短无关。p2X-TP1 重组质粒在工程菌中的表达 TGF α -PE40 融合蛋白量约为 50mg/L。

关键词 TGF α -PE40 融合蛋白, 高效表达

目前很多工作证实^[1-3]TGF α -PE40 对多种体外培养过量表达 EGFR 的癌细胞的生长有强烈抑制作用, 其抑制程度与癌细胞表面 EGFR 分子数呈正相关, 而对细胞表面 EGFR 含量很低的正常细胞仅有较弱的作用。用此类型的肿瘤细胞接种于裸鼠腋下, 在不同时间内持续数天注射 TGF α -PE40, 则肿瘤的生长受到抑制, 并能延长其生存期, 因而 TGF α -PE40 对过量表达 EGFR 的肿瘤的治疗, 具有实际应用的前景。

为提高 TGF α -PE40 在大肠杆菌中的表达产量, 本文以质粒 pYX382 结构^[2]中 TGF α -PE40 cDNA 顺序为基础, 构建了一个新的高效表达重组质粒 p2X-TP1, 并对 TGF α -PE40 的表达、产物分布以及影响表达的一些因素作了比较研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种的质粒: 重组质粒 pYX382 见前文^[2], DH5 α , *E. coli* BL21 (λ DE3), 表达型重组质粒 pCB604 为本实验室改建的带有 Ipp 启动子的质粒载体。

1.1.2 限制酶和 T4 DNA 连结酶: 购自华美公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取、酶切条件、DNA 片段回收、连接及细菌转化: 按 Maniatis 实验手册进行^[5]略加改进。

1.2.2 重组质粒 p2X-TP1 构建: 质粒 pYX382 用限制酶 XbaI/EcoRI 双酶切, 电泳分离和纯化得到 TGF α -PE40 融合基因片段, 用 T4 DNA 连接酶将 TGF α -PE40 融合基因片段插入质粒载体 pCB604 的 XbaI/EcoRI 位点中构建成 p2X-TP1 重组质粒 (图 1)。

本工作得到国家高技术研究和发展计划生物技术领域的资助。

* 南京大学进修教师。

本文于 1993 年 8 月 24 日收到。

1.2.3 融合蛋白表达和产物分析:重组质粒 p2X-TP1 转化大肠杆菌 BL21 (λ DE3), 转化菌生长达到一定的密度时, 用 1mmol/L IPTG 诱导表达, 离心收集菌体, 用 Kondo 等报道方法^[6] (略加改进) 制备细菌总蛋白、周质和胞内样品或菌体经超声波破碎, 分离包涵体及可溶性部分的样品。

样品经调节为相当于同样体积的原始培养物, SDS-PAGE 后作考马斯亮蓝染色或抗 PE 抗体免疫印迹^[7]。

2 结 果

2.1 p2X-TP1 重组质粒和转化菌之诱导表达

p2X-TP1 质粒转化 DH5 α , 从含氨苄青霉素的 LB 板上, 选出转化菌克隆, 经扩增后抽提质粒 DNA, 进行 XbaI/EcoRI 双酶切和琼脂糖凝胶电泳检测。pCB604、pYX382 质粒用 XbaI/EcoRI 双酶切作对照。图 2 表明重组质粒 (第 4、5 列) 经 XbaI、EcoRI 双酶切, 产生一条与 pCB604 (第 2 列) 相同的载体 DNA 片段和一条与 pYX382 中相同的 TGF α -PE40 融合基因片段 (第 3 列)。

p2X-TP1 转化 *E. coli* BL21, 转化菌克隆在 37℃ 扩增, 到 OD₆₅₀ 为 0.4 左右时, 加 IPTG 诱导表达 90 分钟后, 制备细菌总蛋白样品。作 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色 (见图版 I-Aa)。结果表明 p2X-TP1 转化菌在 IPTG 诱导下高效表达 46kDa 的蛋白质产物。IPTG 浓度从 0.5—2mmol/L, 对高效表达效率并无重大影响。如果转化菌不被 IPTG 诱导, 则 46kDa 产物表达极少, 而宿主菌 BL21 的裂解液中不存在该蛋白质区带。同时 IPTG 诱导转化菌表达时间从 1.5 小时增加到 2.5 小时、3.5 小时并不能明显提高转化菌表达 TGF α -PE40 的总量 (见图版 I-Ab)。

2.2 不同培养基和诱导表达时菌体密度对表达的影响

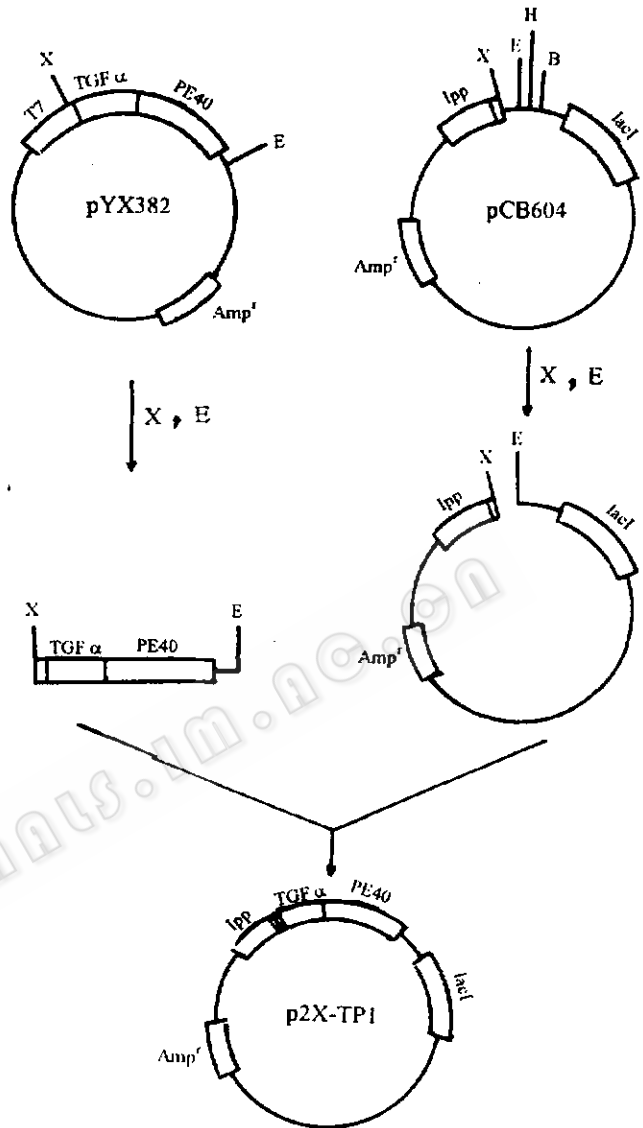


图 1 重组质粒 p2X-TP1 构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid p2X-TP1

X: XbaI, E: EcoRI, H: HindIII, B: BamHI

图版 I-B, C 说明我们用 LB (图版 I-B) 或 Terrific Broth (图版 I-C) 两种培养基扩增 p2X-TP1 转化的 BL21 菌, 并在细菌生长达到不同密度时, 1mmol/L IPTG 诱导 1.5 小时表达 46kDa TGF α -PE40 产物的结果。电泳染色表明, 在 LB 培养基中, 细菌密度对产物表达有很大影响, OD₆₅₀ 为 0.14—1 的低密度工程菌, 在 IPTG 诱导下高效表达 46kDa TGF α -PE40, 产物表达量可能达到细菌总蛋白的 30% 左右, 而随着诱导表达时细菌密度的增高, 46kDa 蛋白区带表达量逐渐减少。用抗 PE 抗体所作免疫印迹 (图版 I-Bb) 也证明 46kDa TGF α -PE40 表达量随细菌密度的增高而降低。

在 Terrific Broth 培养基中 (图版 I-C), TGF α -PE40 产物区带在不同密度转化菌中的总表达量都维持在很高的水平 (见图版 I-Ca, Cb), 如果在较低细菌密度 (如 OD₆₅₀ 为 0.183) 下诱导表达, TGF α -PE40 产物可能占细菌总蛋白的 50% 左右, 随细菌密度增加, 细菌自身蛋白大量合成, TGF α -PE40 产物在细菌总蛋白中含量大大降低。

2.3 表达产物分布和温度对表达的影响

我们比较了 26℃、32℃、37℃、42℃ 四种温度对 p2X-TP1 转化菌表达产物影响。转化菌在 37℃ 生长到一定菌体密度, 然后在选定温度下用 1mmol/L IPTG 诱导 1.5 小时后收集菌体, 分析总蛋白 (图 3A)、胞内 (图 3B)、可溶性蛋白 (图 3C) 以及包涵体 (图 3D) 部

分中 TGF α -PE40 含量, 图 3 结果表明, 在 26℃、32℃ 温度下生长的转化菌, 其 TGF α -PE40 的表达量在各个样品中都很低, 在 37℃、42℃ 中 TGF α -PE40 融合蛋白在菌体总蛋白、胞内中都增加, 特别在 42℃ 表达时, 大量 TGF α -PE40 产物以包涵体形式存在 (图 3D4)。从电泳和免疫印迹结果估计, 表达 TGF α -PE40 产物可达到每升 50mg 以上。

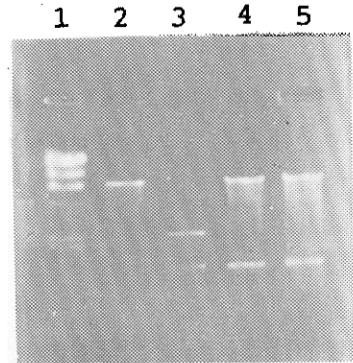


图 2 p2X-TP1 重组质粒 XbaI/EcoRI 双酶切图谱

Fig. 2 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid p2X-TP1 digested with XbaI/EcoRI.

1. Marker; λ DNA/Hind III; 2. pCB604, XbaI/EcoRI; 3. pYX382, XbaI/EcoRI; 4, 5 p2X-TP1, XbaI/EcoRI

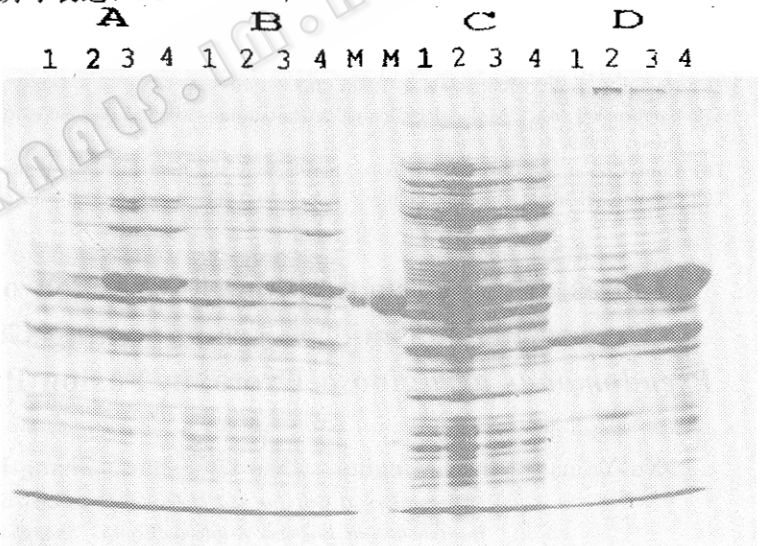


图 3 温度对 *E. coli* BL21 工程菌表达 TGF α -PE40 产物的影响

Fig. 3 The effect of growth temperature on expression of TGF α -PE40 fusion protein in *E. coli* BL21 cells.

Culture temperature; 26°C (1), 32°C (2), 37°C (3), 42°C (4). A. total proteins, B. Cytoplasm, C. Soluble proteins, D. Inclusion bodies

3 讨 论

pCB604 载体有一个高效 Ipp 启动子, 是 *E. coli* 中最强启动子之一, 这种启动子在转录途中受插入在其下游的 lac UV5 启动子操纵基因所控制, 因而克隆基因在没有 lac 诱导物情况下, 表达受 lac 遏制物 (lacI 基因产物) 所抑制。把 lacI 基因插入质粒之中, 这样克隆基因的表达可由载体本身产生的 lac 阻遏物来调节^[8]。我们把 TGF α -PE40 融合基因片段插入在高效 Ipp 启动子的 pCB604 载体中, 得到满意效果, 获得高产 TGF α -PE40 融合蛋白, 因为在 p2X-TP1 中不含 OmpA 信号肽顺序, 表达产物 TGF α -PE40 不被分泌, 而以包涵体形式沉积在细菌中。包涵体的形成, 可能与宿主菌生长条件、外源基因表达产物、蛋白分子中脯氨酸的含量等多种因素有关^[9]。

我们对 p2X-TP1 在工程菌中表达产物 TGF α -PE40 融合蛋白进行分离、纯化, 并用纯化的样品进行细胞活性实验及动物实验治疗, 结果表明其对过量表达 EGFR 的癌细胞的生长有强烈抑制作用。而对接种在裸鼠中的 BEL-7404 细胞的生长有明显影响。

参 考 文 献

- [1] Chaudhary V K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 3438-4542.
- [2] 徐永华等, 实验生物学报, 1993, 26: 289-295.
- [3] Pai L H *et al.* Cancer Res, 1991, 51: 2808-2812.
- [4] Siegall C B *et al.* FASEB J, 1989, 3: 2647-2652.
- [5] Maniatis T *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- [6] Kondo T *et al.* J Biol Chem., 1988, 263: 9470-9475.
- [7] Sambrook J *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Lunn C A *et al.* Current Topics in Microbiology and Immunology, 1986, 125: 39-74.
- [9] Schein C H *et al.* Bio/Technology, 1989, 7: 1141-1149.

Studies on Construction and Expression of High Efficiency Expressing Plasmid of Transforming Growth Factor α -*Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Fusion Protein TGF α -PE40

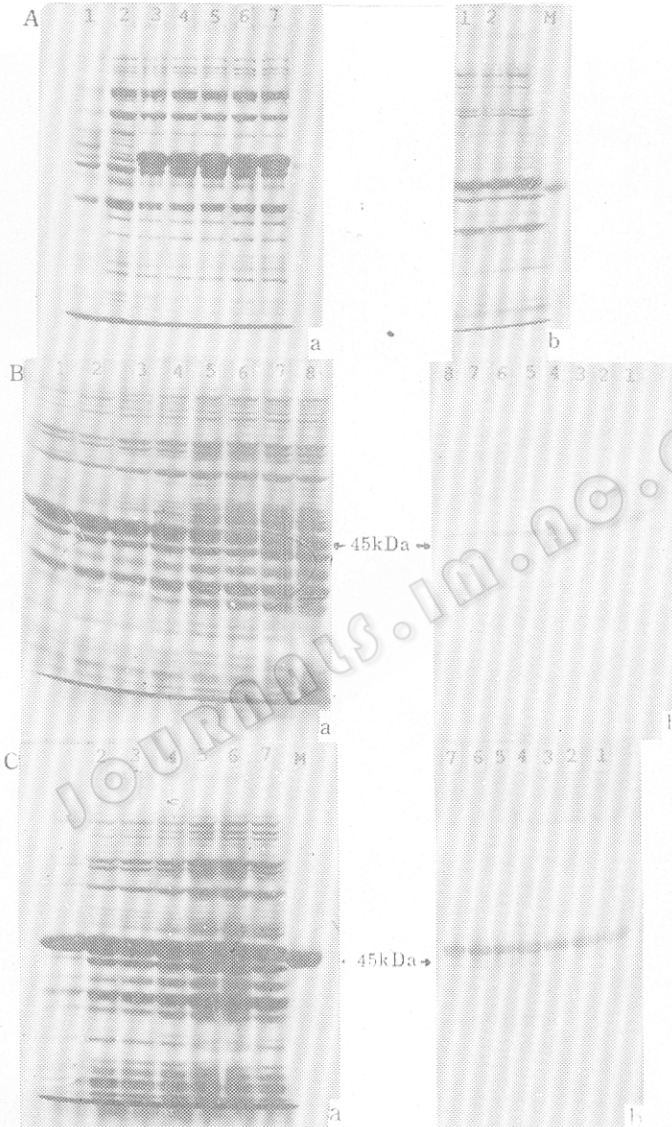
Xu Ya'nan Shen Minghui Zhao Qingshun Zhang Hongyu Xu Yonghua

(Laboratory of Cellular and Molecular Oncology, Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract The XbaI/EcoRI cleaved TGF α -PE40 gene from plasmid pXY382 was inserted into the same cloning site of the expression vector pCB604 resulting in the plasmid p2X-TP1. *E. coli* BL21 (λ DE3) cells were transformed with p2X-TP1 and then induced with IPTG. The product expressed was accumulated mainly in form of inclusion bodies. The expression level was closely related with the cell density, induction temperature and medium but not with the inducer dosage and the induction period within certain range. The expressed amount of the fusion protein TGF α -PE40 was about 50mg/L.

Key words TGF α -PE40, fusion protein, high level expression

Xu Ya'nian *et al.* Studies on construction and expression of high efficiency expressing plasmid of transforming growth factor α -*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin fusion protein TGF α -PE40



A. The effect of IPTG concentration and induction time on expression of TGF α -PE40 fusion protein in *E. coli* BL21 cells.

a. IPTG concentration, 0 (2), 0.5mmol/L (3), 0.75mmol/L (4), 1.0mmol/L (5), 1.5mmol/L (6), 2.0mmol/L (7), Control; BL21 (1), Marker; 45kDa. b. Induction time, 1.5h (1), 2.5h (2), 3.5h (3), Marker; 45kDa

B. The effect of cell densities during induction on expression of TPG α -PE40 in *E. coli* BL21 cells grown in LB. Cell densities during induction, OD₆₅₀: 0.142 (1), 0.310 (2), 0.533 (3), 1.08 (4), 1.50 (5), 1.77 (6), 1.96 (7), 1.92 (8), Marker 45 kDa (M). a. Coomassie brilliant blue-stained pattern. b. Immunoblot pattern probed with the antibody against PE.

C. The effect of cell densities during induction on expression of TGF α -PE40 fusion protein in *E. coli* BL21 cells grown in Terrific Broth. Cell densities during induction, OD₆₅₀: 0.183 (1), 0.383 (2), 0.76 (3), 1.11 (4), 1.47 (5), 1.76 (6), 1.89 (7), Marker 45kDa (M). a. Coomassie brilliant blue-stained pattern. b. Immunoblot pattern probed with the antibody against PE.