

牛碱性成纤维细胞生长因子在酵母系统中的表达

方向东* 陈 淳 谢志伟 耿解萍 王小宁* 戚正武

(中国科学院上海生物化学研究所国家分子生物学实验室 上海 200031)

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是 FGF 家族中具有代表性的成员。分子中无糖基化位点,为一单链阳离子多肽,与肝素有很强的亲和能力。它广泛存在于机体的各种组织中,是重要的神经营养因子和血管生成因子,在胚胎发生、生长、发育及血管形成等多种生理过程中起重要作用^[1]。

建立 bFGF 的真核表达体系,不仅可以进一步研究其蛋白质结构与功能间的关系,探讨其作用机制以及与其它细胞生长因子间的协同效应,同时为今后开发有临床应用前景的基因工程重组药物打下良好基础。

我们构建了牛 bFGF 的重组表达质粒 pVT102U/ α -bbFGF,并在酵母表达系统中得到表达,初步纯化后,通过细胞学检测表明,表达产物具有与天然 bFGF 相同的生物活性,为下步的工作创造了条件。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 含有 bbFGF 基因的 DNA 大片段(约 1.4kb)由南京大学生物化学朱德熙教授提供;bbFGF 标准蛋白及兔抗 bbFGF 多克隆抗体(美国 R&D 公司产品)由中科院上海生化所景乃禾研究员惠赠。

1.1.2 载体和细胞株:酵母菌种 *Saccharomyces cerevisiae* S-78(Leu2, ura3, rep4)及表达质粒 pVT102U/ α 为张友尚教授馈赠;克隆载体 M13mp18/19 购自华美生物工程公司;BALB/c 小鼠 3T3 细胞及 RPMI-1640 培养液购自中科院上海细胞所;大肠杆菌转化的受体菌 *E. coli* TGI(supEhds Δ 51hi Δ (lac⁻proAB)F'⁺[traD36proAB+lacIqlacZ Δ M15])为本室保存。

1.1.3 酶类:EcoRI、HindIII、Xba I 等限制酶、RNase A、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶 I Klenow 大片段购自美国 BRL 公司, Taq DNA 聚合酶为美国 Cetus 公司产品, DNA Sequenase 测序试剂盒为美国 USB 公司产品。

1.1.5 主要生化试剂及材料:蛋白胨、酵母抽提物为英国 Oxoid 公司产品, dNTP、Xgal、IPTG、琼脂糖购自 BRL 公司, MTT(噻唑蓝)、丙烯酰胺及 N,N'-二甲基双丙烯酰胺为美国 Sigma 公司产品, 蛋白低分子量标准为中科院上海生化所东风试剂厂产品 [α -³²P]dATP(3000Ci/mmol 为美国 Dupon 公司产品, Sephadex G-25, CM-52 纤维素、Heparin-Sepharose 4B 及 SephaglasTM DNA 片段回收试剂盒为瑞典 Pharmacia 公司产品, 其余均为进口分装或国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌质粒的提取,质粒的限制酶分析与片段的回收, DNA 片段连接与转化, 大肠杆菌感受细胞制备及转化, DNA 序列测定等方法参考文献[2]。

1.2.2 PCR 引物的合成及体外扩增:PCR 引物采用固相亚磷酸胺法在 Applied Biosystem 公司 380A

*工作单位:第一军医大学分子免疫学研究所,广州 510515。

本文于 1995 年 3 月 20 日收到。

DNA合成仪上接该公司提供的反应条件合成。100 μ l 体外扩增反应体系中含 10mmol/L Tris-HCl (pH8.3, 20 $^{\circ}$ C), 2.0mmol/L MgCl₂, 50mmol/L KCl, 200 μ mol/L dNTP, 0.5 μ g 正反引物, 2 μ g cDNA 模板, 2.5 单位 Taq DNA 聚合酶, 再覆盖 100 μ l 液体石蜡。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 40 $^{\circ}$ C 退火 3min, 55 $^{\circ}$ C 30s 及 72 $^{\circ}$ C 延伸 3min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10min。取 5 μ l 反应产物在 1.2% agarose 电泳上鉴定。

1.2.3 PCR 产物的序列分析:上述 PCR 扩增片段直接经苯酚/氯仿抽提后酒精沉淀回收。然后用内切酶 EcoR I /Hind III 酶解, 与经同样酶解的 M13 RF DNA 载体于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化至 TG1 感受态细胞。阳性噬斑用 TG1 扩增后以碱变性法快速抽提菌体中的 RF DNA, 经 EcoR I /Hind III 双酶切及 1.2% agarose 电泳鉴定, 筛选出含 PCR 扩增片段的重组子。参照 USB 推荐的方法, 从相应重组子中抽提 ssDNA 作为模板用双脱氧末端终止法进行 DNA 序列测定。

1.2.4 酵母细胞转化及培养:制备酵母感受态细胞^[3]。转化时取约 1 μ g 重组的 pVT102U/ α -bbFGF DNA 加至 100 μ l 感受态细胞中, 并加入 5 μ g 辅助鱼精 DNA, 混合后于 30 $^{\circ}$ C 保温 30min, 再加入 500 μ l 40% PEG4000, 10mmol/L Tris 迅速混匀, 30 $^{\circ}$ C 继续孵育 1h 后, 42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 5min, 稍离心弃上清, 沉淀细胞用无菌水洗 2 遍, 再用 200 μ l 无菌水悬浮, 将细胞悬浮液涂布于选择性酵母培养基 (YSD), 含 0.67% 酵母氮碱 (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids)、2% 葡萄糖、0.02% L-白氨酸、0.02% 肌醇、0.005% 腺嘌呤, 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d。

1.2.5 免疫学检测:抗原包被液为 0.05mol/L pH9.6 NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液; 洗涤液为 PBT 缓冲液 (0.01mol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.05% Tween-20, pH7.4); 封闭液为 PBS-BSA 缓冲液 (0.01mol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.14mol/L NaCl, 1% BSA, pH7.4); 底物液为 0.1mol/L 柠檬酸/磷酸二氢钠缓冲液, 临用前新鲜配制并加入 0.5% H₂O₂ 及 0.4% 邻苯二胺盐酸盐底物; 酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG。

用包被缓冲液将 bbFGF 标准样品及表达产物按等比梯度稀释 (4.0mg/ml \rightarrow 0.25mg/ml), 于酶标板每孔加入 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 下放置 24h。吸去抗原包被液, 洗涤 3 次, 每次 2min。吸干后每孔加入 100 μ l 用封闭液稀释的兔抗 bbFGF 抗体 (0.1 μ g/ml), 置 37 $^{\circ}$ C 培养箱保温 2h。洗涤 3 次, 每孔加入 100 μ l 酶标抗体, 37 $^{\circ}$ C 下保温 1h。洗涤 4 次, 每孔加入 100 μ l 底物液, 37 $^{\circ}$ C 下放置 20min。最后每孔加入 50 μ l 2mol/L H₂SO₄ 终止反应, 在酶标比色仪上 (OD=492nm) 测定每孔吸光度值。

1.2.6 生物活性检测:用 PBS 缓冲液将 MTT [3-(4, 5-dimethyl-1-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide; Thiazolyl blue] 溶解成 5mg/ml, 4 $^{\circ}$ C 下放置备用。

将 BALB/c 鼠 3T3 细胞用培养液 (含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 液) 稀释成为 2 \times 10⁶/ml, 于无菌的 96 孔细胞培养板中每孔加入细胞液 0.1ml。实验组与标准样品对照组分别加入以培养液稀释的 bbFGF (亲和层析纯化产物) 及其标准品 (浓度 10 μ g \rightarrow 10ng, 10 倍稀释), 阴性对照组仅加培养液, 每组设两个复孔。加样完毕, 将培养板于 37 $^{\circ}$ C 培养 1.5h, 弃去上清。然后向各孔内加入 180 μ l 不含小牛血清的 RPMI-1640 液和 20 μ l MTT 溶液, 37 $^{\circ}$ C 再孵育 3h。吸净上清, 每孔加入 200 μ l 二甲基亚砜, 室温放置 20min。用酶联检测仪在 570nm 比色。以 bbFGF 量为横坐标, OD 值为纵坐标作图。

2 结果

2.1 PCR 产物的序列分析

参考已知的 bbFGF cDNA 序列^[4]设计正反两引物:

A: 5'-GCGAATTCATGGCCCGGGA-3'

EcoRI

B: 5'-CGAAGCTTAAAATCAGCTCTTAGCAG-3'

Hind III

以含有 bbFGF 基因的 1.4kb 的 DNA 大片段作为模板,进行 PCR 体外扩增,获得全长的 bbFGF cDNA,5',3'端分别携带 EcoR I、Hind III 位点,克隆于 M13 RF DNA 载体中测序。与人 bFGF 的氨基酸及核苷酸序列比较,仅有两个氨基酸残基差异,bbFGF 中第 121 位的 Ser 及 137 位的 Pro 分别被 Thr 及 Ser 所取代,其它虽然还有 20 个不匹配的碱基,但都属于同义密码子,不影响氨基酸序列。

2.2 pVT102U/ α bbFGF 表达载体的构建

将测序正确的克隆扩增后,抽取克隆于 M13mp18 载体的 bbFGF 双链 DNA, EcoR I /Hind III 双酶切后从 1.2% agarose 电泳分离 bbFGF 基因片段。同时将 pVT102U/ α 用 Xba I /Hind III 酶切,通过人工合成的 Xba I 和 EcoR I 的寡核苷酸接头与 bbFGF 基因片段连接,转化 TG1 宿主细胞。以 Xba I /Hind III 酶切筛选含有 bbFGF 的 pVT102U/ α 阳性重组子,挑取阳性菌落扩增(图 1)。

2.3 bbFGF 在酵母细胞中的分泌表达以及纯化

重组 pVT102U/ α bbFGF 转化酵母 S-78,挑选培养基上的单菌落,接种于 2ml 选择培养基中,30℃ 下振荡培养过夜,然后取 500 μ l 过夜菌种接种于 200ml YCD(0.67% 酵母氮碱,2% 葡萄糖、0.5% 酪蛋白水解物、0.02% 肌醇、0.005% 腺嘌呤)或 YPD(1% 酵母抽提物、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖)培养基中,于 30℃ 培养 48h。培养物上清液经旋转蒸发浓缩至 30ml,以固体 Tris 调 pH 至 8.0,离心除去沉淀的杂蛋白后,经 Sephadex G-25(2 \times 50cm)层析分批脱盐,收集蛋白洗脱液(约 25ml),用 1mol/L NaAc(pH8.0)调节盐浓度 0.02mol/L 后,上样于 0.02mol/L NaAc/HAc(pH4.2)平衡的 CM-52 离子交换层析柱(2 \times 10cm),然后用平衡缓冲液对含有 1mol/L 的 NaCl 的同一缓冲液直线梯度洗脱(流速 1ml/min)收集各蛋白峰,电泳鉴定确定 bbFGF 洗脱峰的位置于 0.35mol/L 处(图 2)。

将 bbFGF 经 CM-52 离子交换层析纯化后的产物再用 Heparin-sepharose 4B 亲和层析(图 3),最后得到在 SDS-PAGE 中主要为一条带的 bbFGF 产物。

2.4 免疫原性的测定

利用 ELISA 方法分别检测标准 bbFGF 及其基因表达产物的抗原特性,可见两条反应曲线的特征一致,都是典型的 S 型曲线,见图 4。表明基因表达产物的抗原性与天然相同。

2.5 生物活性的初步测定

bbFGF 对 BALB/c 鼠 3T3 细胞有明显的促生长作用,随着细胞的增殖,与发色底物 MTT 作用后的显色反应也增强,从而可定量测定 bbFGF 的生物活性,见图 5。由于基因表达产物 bbFGF 的量较少,很难定量,取估计量后再成倍稀释,因而与 bbFGF 的标准样品不在同一曲线上,但两者都有明显的剂量依赖关系,趋势也相似,说明重组的 bbFGF 具有与天然相同的生物活性。

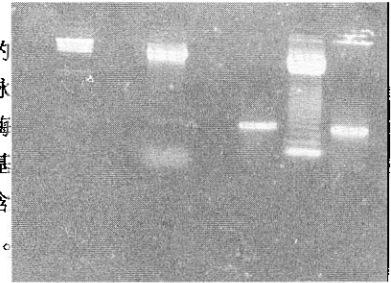


图 1 重组质粒 pVT102U- α bbFGF 经 Xba I 和 Hind III 酶切鉴定图
A: Lambda DNA-Hind III 核酸分子量标准;
(23.13kb, 9.42kb, 6.56kb, 4.36kb, 2.32kb, 2.03kb, 564bp)
B: pVT102U/ α bbFGF 经 Xba I 和 Hind III 酶切;
C, E: bbFGF 的 PCR 产物(480bp);
D: 123bp Ladder 核酸分子量标准。
(自下而上: 123bp, 246bp, 369bp, 492bp...)

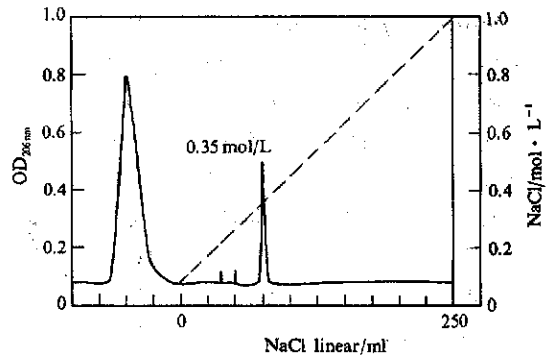


图 2 bbFGF 酵母表达产物的离子交换层析图
CM-52 层析柱经 NaCl 溶液线性洗脱(0~1.0mol/L)
Sample was added to the column(2 \times 10cm) equilibrated with 0.02mol/L NaAc/HAc(pH4.2), then eluted with the NaCl linear gradient solution.

3 讨论

成纤维细胞生长因子(FGF)家族是由多种不同结构的相关多肽组成,除了 bFGF 外,酸性 FGF(acidFGF, aFGF)也是其中具有代表性的成员。它们在胚胎形成;血管、神经、骨骼发育;损伤组织修复等生理或病理过程中也起重要作用^[6]。因而在临床上有望用于角膜的修复、创伤愈合以及皮肤的美容等^[7]。近年来发现的 int-2; hst/k-fgf; FGF-5; FGF6 等 4 种原癌基因也属于这个家族,它们与 aFGF、bFGF 有 40-50% 的同源性,在肝素亲和、促进内皮细胞生长等方面相似于前者,不同的是常见于胚胎形成、新生儿发育及许多肿瘤生长过程中,在成年人组织中极为少见。此外,在肿瘤细胞中也发现有 aFGF 和 bFGF 的存在,对促进肿瘤细胞分化及肿瘤组织的血管形成有明显作用^[8]。因此,对于这一家族蛋白的深入研究,具有重要的理论意义和实际应用价值。

bbFGF 在最初的报道中是由 146 个氨基酸残基组成,分子量约 16,500, PI 为 9.6^[9];但随后又发现由 154 个氨基酸残基组成的 bbFGF^[10],究竟 bbFGF 以何种形式存在,由这种多肽对于蛋白酶的敏感性不同而决定。bbFGF N 端的最初 23 个氨基酸残基并非生物活性必需,从肾上腺、肾及角膜等组织中提取分离的 bbFGF(1-46)都是经过剪切的形式^[2]。bbFGF 与 hbFGF 仅有两个氨基酸不同,即牛 Ser¹²¹(TCC)和 Pro¹³⁷(CCC)残基分别被人的 Thr(ACC)和 Ser(TCC)所取代,因此它们的生物学特性是极为接近的^[11]。

对 bbFGF 的生物活性检测,以往通常采用牛或人的毛细血管内皮细胞结合^[3H]同位素标记的方法,不仅操作复杂,而且存在放射损伤的危险,选择鼠 3T3 细胞作为检测细胞,虽然特异性有所下降,但灵敏、简便,不失为一种值得选用的快速初筛方法^[12]。MTT 可被活细胞还原成蓝紫色化合物(Formazan),此还原产物的量与细胞数在一定范围内成正比,利用比色法测定活细胞的相对数量,可以直观地

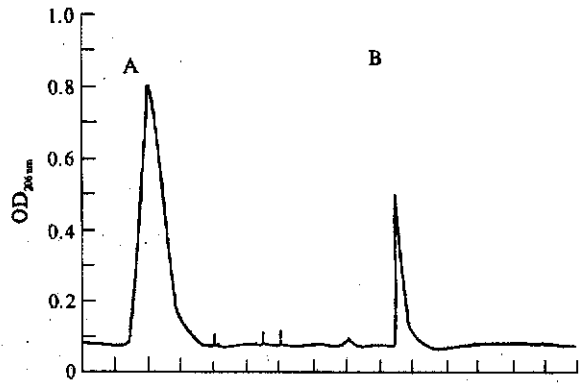


图 3 bbFGF 表达产物的亲和层析图
将 bbFGF 经离子交换层析后的产物再用 Heparin-Sepharose 4B 亲和层析纯化。上样缓冲液为 A)TE, pH7.0;洗脱液为 B)TE, pH7.0/1.0mol/L NaCl。

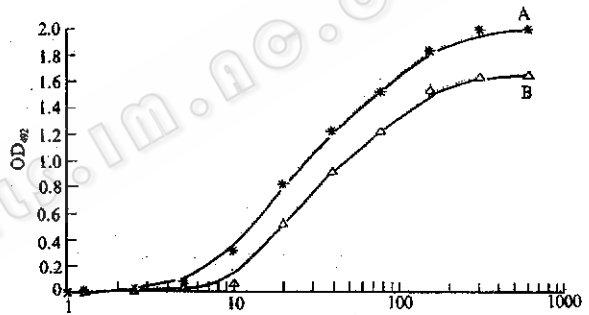


图 4 ELISA 方法检测 bbFGF 表达产物
A: 购自 R&D 公司的 bbFGF 标准样品 (*-*)
B: 在酵母系统表达的 bbFGF(△-△)

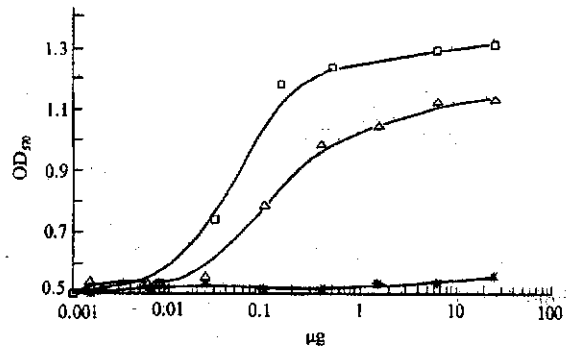


图 5 bbFGF 的生物活性测定
□-□: bbFGF 标准品(R&D 公司); △-△: bbFGF 的酵母表达产物; *-*: 阴性对照

反映细胞因子的生物活性^[13]。需要注意的是 RPMI-1640 液 pH 值对于比色本底的高低影响较大,如 pH 值偏高则本底较高,偏酸则影响细胞活性,一般以 pH7.4 为宜并需要加入 Hepes 缓冲剂。

参 考 文 献

- [1]Basilico C, Moscatelli D. *Adv. Cancer. Res.*, 1992, **59**:115~165.
- [2]Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning, a Laboratory Manual Methods*. 2nd edition, cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [3]Ito H Lane D. *J Bacteriology*, 1983, **153**:163~168.
- [4]Abraham J A, Mergia A, Whang J L *et al.* *Science*, 1986, **233**:545-548.
- [5]Harlow Ed Lane D *Antibodies, A Laboratory Manual*. 1nd edition, cold spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- [6]Sensenbrenner M, *Prog Neurobiol.*, 1993, **41**(6):683~704.
- [7]Slavin J Hunt J A Nasb, J R *et al.* *Br J Surg.*, 1992, **79**:918~921.
- [8]Gross J L Herblin, W F. Dusak, B A *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 1993, **85**:121~131.
- [9]Esch F Baird, A Ling N. *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**:6507~6511.
- [10]Ueno N Baird, A Esch F *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, **138**:580~588.
- [11]Kurokawa, T Sasada, R Iwane M *et al.* *FEBS. Lett*, 1987, **213**:189~194.
- [12]Davis T R. Tabatabai L Bruns K *et al.* *Biochim Biophys Acta*. 1991, **1095**(2):145~152
- [13]Bounous D I Campagnoli R P, Brown J *et al.* *Avian Dis*, 1992, **36**(4):1022~1027.

Expression of the Gene Coding for Bovine Basic Fibroblast Growth Factor in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Fang Xiangdong Chen Chun Xie Zhiwei
Geng Jieping Wang Xiaoning Qi Zhengwu

(National Molecular Biology Lab, Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract The fibroblast growth factor (FGF) constitute a family of at least seven structurally related polypeptides, among them basic FGF (bFGF) is the most characterized. They play an important role *in vivo* in embryonic development, angiogenesis, nervous cell system differentiation, and wound repair. According to the published cDNA sequences. The structural gene of bovine bFGF (bbFGF) was amplified by the PCR method, and constructed in the expression plasmid pVT102U/ α -bbFGF. The expressed product was purified by chromatography on CM-52 cellulose and affinity chromatography on heparin-Sepharose 4B. The immunogenic property of the expressed product was detected using the ELISA method, and its bioactivity of stimulating effect on 3T3 cells was also measured. They both showed the same activation with the natural one.

Key words Bovine basic fibroblast growth factors, bbFGF, yeast, gene expression