

人表皮生长因子的基因克隆与原核表达*

王保莉^{1,2}, 吴方丽¹, 张涌², 郭蔼光¹

(1 西北农林科技大学 生命科学学院; 2 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用RT-PCR方法从人胎盘组织中扩增出hEGF基因, 将其分别连入表达载体pGEX-4t-1(+)和pGEX-6p-1(+)质粒中, 并转化入BL₂₁-Codon plusTM中, 解决了大肠杆菌密码子偏爱性问题, 不需附加程序就可以编码稀有密码子的重组基因。SDS-PAGE结果证明, pGEX-4t-1(+)-hEGF和pGEX-6p-1(+)-hEGF分别在大肠杆菌BL₂₁(DE3)-Codon plusTM-RP和BL₂₁(DE3)-Codon plusTM-R_L中获得高效表达, 目的蛋白占总菌体蛋白的30%左右。

[关键词] 人表皮生长因子; 基因克隆; 偏爱密码子; 基因表达

[中图分类号] Q 785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)02-0083-04

1962年, 美国Cohen教授在新生小鼠颌下腺的萃取液中分离出一种活性成分, 将其加入培养液中培养表皮细胞时, 发现其可直接促进表皮细胞的生长与分化, 因此将其命名为表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)^[1]。人类的EGF(hEGF)由53个氨基酸组成, 其生理活性很强, 经过纯化的EGF可以刺激细胞的生长, 促进细胞分化。临床上EGF可促使外胚层细胞和毛细血管生长, 促进烧伤、创伤及外科伤口的愈合, 加速移植表皮或角膜的生长, 修复胃肠道、肝脏、眼角膜的损伤, 促进神经元的再生及制造人体器官等^[2,3]; 多种肿瘤的发生、发育与hEGF存在剂量关系, 尤其是某些癌性病变更与hEGF密不可分^[4,5]。由于hEGF具有多种生理作用, 决定了其在临床上有广阔的应用前景。

本试验采用RT-PCR方法从人胎盘组织中扩增出hEGF基因, 并从高效表达和分离纯化两方面考虑, 采用了BL₂₁-Codon plusTM宿主菌和谷胱甘肽硫转移酶(GST)作为纯化标签, 对hEGF进行原核细胞融合表达, 为进一步采用层析技术分离和纯化原核细胞生产的hEGF奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用胎盘购自陕西省杨凌示范区人民医

院。

1.2 质粒和菌种

克隆载体pUCm-T购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 表达载体pGEX-4t-1(+), pGEX-6p-1(+), 受体菌JM109及BL₂₁(DE3)-Codon plusTM-RP, BL₂₁(DE3)-Codon plusTM-R_L, 由陕西省农业分子生物学重点实验室保存。

1.3 工具酶和试剂

限制性内切酶EcoR I, Sal I购自陕西宝泰克生物科技有限责任公司; Trizol试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司; 质粒提取试剂盒购自北京鼎国生物科技有限责任公司; 其余试剂均由宝泰克生物科技有限责任公司提供。

1.4 PCR引物

参考Genbank登录的hEGF(NM-001963)序列自行设计。引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。其序列如下:

上游引物 5' GAA TTC ATG AAT AGT
GAC TCT GAA TGT 3'

下游引物 5' TTA TCA GCG CAG TTC
CCA CCA CCT 3'

在上游引物序列中加有一EcoR I酶切位点(方框内); 下游引物加有2个终止密码子(下划线处)。

* [收稿日期] 2003-07-25

[基金项目] 国家“863”基金项目(2001AA 213081); 西北农林科技大学重点专题基金项目

[作者简介] 王保莉(1960-), 女, 陕西西安市人, 教授, 博士, 主要从事分子生物学研究。

1.5 RNA 提取及逆转录反应

按照 Trizol 说明书进行总 RNA 的提取。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 RNA 无明显降解后, 进行以下逆转录反应: 1 μL Oligo-d(T)₁₈ (500 mg/L), 5 μg 总 RNA 加水至 12 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min, 冰浴冷却 5 min, 然后加入 5 $\times$ 第一链缓冲液 4 μL , 10 mmol/L dNTPs 2 μL , RNasin 1 μL (30 U/ μL) M-MLV 逆转录酶 1 μL (200 U), 轻轻混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min; 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min 终止反应。

取上述逆转录产物 1 μL , 加入上下游引物进行 PCR 反应, 于 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min, 用于扩增 hEGF 的 cDNA。

1.6 克隆与测序

纯化 PCR 产物, 连接到克隆载体 pUCm-T 上, 转化至感受态宿主菌 JM 109 中, 经蓝/白斑筛选, 挑取白色菌落, 抽提质粒酶切及 PCR 初鉴。序列测定由上海生工生物工程有限公司完成。

1.7 表达载体的构建

将连有 hEGF 的质粒 pUCm-T-hEGF 和载体 pGEX-4t-1(+), pGEX-6p-1(+) 分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切回收目的片段, 然后加入 T₄ DNA 连接酶进行连接, 转化感受态大肠杆菌 JM 109, 在含有氨苄的平板上培养过夜, 挑取阳性克隆进行 PCR 及 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切初步鉴定。

1.8 外源基因的诱导表达

重组质粒 pGEX-4t-1(+)-hEGF, pGEX-6p-1(+)-hEGF 分别转化 BL₂₁ (DE3)-Codon plusTM-RP, BL₂₁ (DE3)-Codon plusTM-R_L 受体菌, 接种单菌落于 LB/AP (50 mg/L)/Cm (25 mg/L) 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。取上述过夜菌接种于新鲜的 LB/AP/Cm 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 600 nm, 吸光度为 0.6, 加 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 5 h 后, 离心收集菌体, SDS-PAGE 鉴定诱导表达结果。

2 结果

2.1 hEGF 基因的 PCR 扩增

提取人胎盘组织的总 RNA, 逆转录得到 cDNA 第一链, 以此为模板, 利用特异性引物进行 PCR 扩增, 获得约 171 bp 的片段, 见图 1。

2.2 测序结果

测序结果表明, 所克隆的序列与 Genbank 中登录的碱基序列完全相同, 可以认为是获得了人的 EGF 基因, 见图 2。

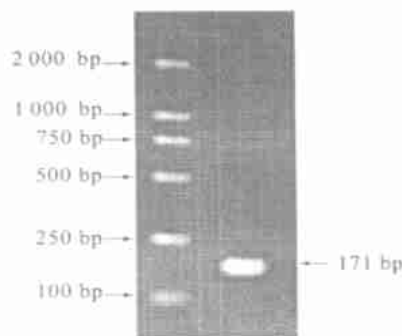


图 1 hEGF 全长 cDNA PCR 产物的电泳分析
1 DL 2000 标准分子量; 2 PCR 产物

Fig 1 Electrophoretogram of PCR product of full length of hEGF cDNA
1 DL 2000 marker; 2 Product of PCR

5'-GAA TTC ATG AAT AGT GAC TCT GAA TGT CCC
CTG TCC CAC GAT GGG TAC TGC CTC CAT GAT GGT
GTG TGC ATG TAT ATT GAA GCA TTG GAC AAG TAT
GCA TGC AAC TGT GTT GTT GGC TAC ATC GGG GAG
CGA TGT CAG TAC CGA GAC CTG AAG TGG TGG GAA
CTG CGC TGA TAA-3'

图 2 hEGF 序列分析结果

Fig 2 The analysis result of the hEGF sequence

2.3 融合表达载体的构建

将连有 hEGF 基因的载体 pUCm-T-hEGF 和 pGEX-6p-1(+), pGEX-4t-1(+) 分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切, 回收特定的片段, 将目的片段定向连入到表达载体 pGEX-6p-1(+), pGEX-4t-1(+) 上, 分别转化大肠杆菌 JM 109, 得到含有重组质粒的 pGEX-6p-1(+)-hEGF, pGEX-4t-1(+)-hEGF 工程菌, PCR 及酶切鉴定表明表达载体构建正确。结果见图 3 和图 4。

2.4 pGEX-4t-1(+)-hEGF 和 pGEX-6p-1(+)-hEGF 的诱导表达

重组质粒分别转化入 BL₂₁-Codon plusTM-RP, BL₂₁-Codon plusTM-R_L 后, 进行单菌落培养, 再在 LB 培养基中进行诱导表达。经 SDS-PAGE 蛋白电泳分析, 重组质粒 pGEX-4t-1(+)-hEGF, pGEX-6p-1(+)-hEGF 转化菌诱导后在约 32 ku 处出现一条主带, 与预计的产物条带大小相符, 而无目的片段插入或插入目的片段但未诱导的菌体均无此产物出现 (图 5, 6)。经光密度扫描测定, 目的蛋白浓度约为 30% 左右, 而且多数是以包涵体的形式存在。

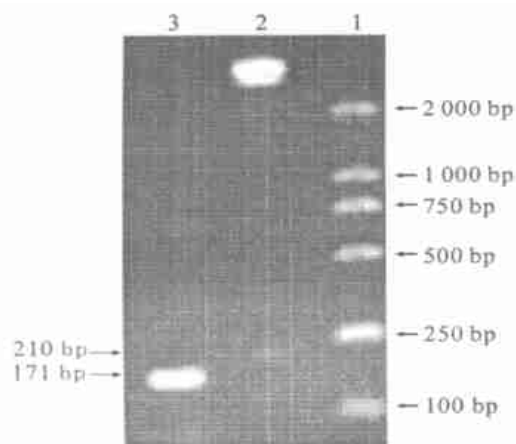


图 3 pGEX-6p-1(+)-hEGF 酶切及 PCR 分析

1 DL 2000 标准分子量; 2 pGEX-6p-1(+)-hEGF 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切; 3 pGEX-6p-1(+)-hEGF PCR
Fig 3 A analysis of recombination pGEX-6p-1(+)-hEGF by endonuclease digestion and PCR
1 DL 2000 marker; 2 pGEX-6p-1(+)-hEGF/*EcoR* I + *Sal* I; 3 pGEX-6p-1(+)-hEGF product of PCR

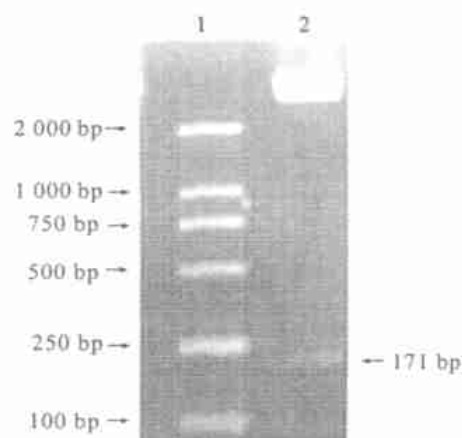


图 4 pGEX-4t-1(+)-hEGF 酶切及 PCR 分析

1 DL 2000 标准分子量; 2 pGEX-4t-1(+)-hEGF 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切
Fig 4 A analysis of recombination pGEX-4t-1(+)-hEGF by endonuclease digestion and PCR
1 DL 2000 marker; 2 pGEX-4t-1(+)-hEGF/*EcoR* I + *Sal* I

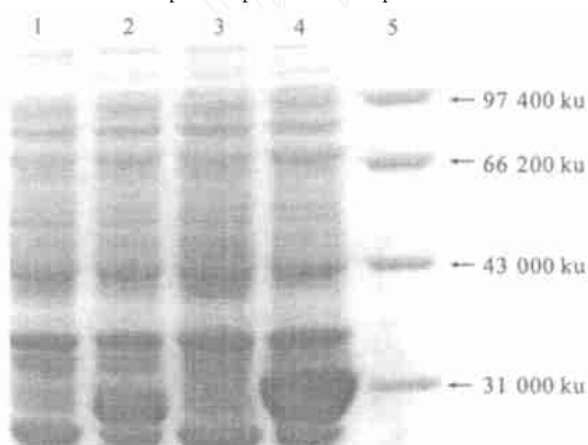


图 5 hEGF SDS-PAGE 分析

1 pGEX-6p-1(+)-hEGF 未经 IPTG 诱导; 2 pGEX-6p-1(+)-hEGF 经 IPTG 诱导; 3 pGEX-6p-1(+)-hEGF 未经 IPTG 诱导; 4 pGEX-6p-1(+)-hEGF 经 IPTG 诱导; 5 蛋白质标准分子量

Fig 5 SDS-PAGE analysis for hEGF

1 pGEX-6p-1(+)-hEGF uninduced; 2 pGEX-6p-1(+)-hEGF induced by IPTG; 3 pGEX-6p-1(+)-hEGF uninduced; 4 pGEX-6p-1(+)-hEGF induced by IPTG; 5 Protein molecular weight marker

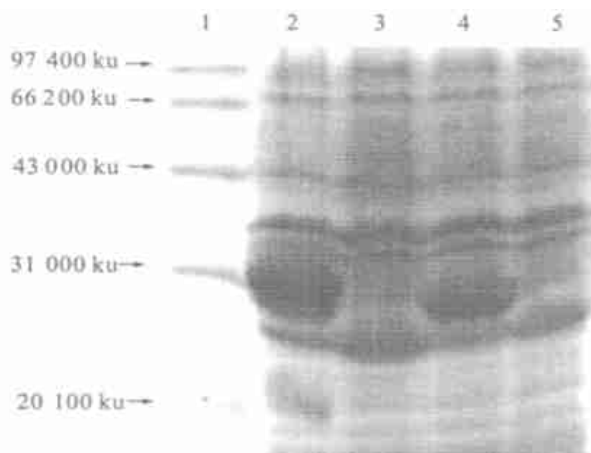


图 6 hEGF SDS-PAGE 分析

1 蛋白质标准分子量; 2 pGEX-4t-1(+)-hEGF 经 IPTG 诱导; 3 pGEX-4t-1(+)-hEGF 未经 IPTG 诱导; 4 pGEX-4t-1(+)-hEGF 经 IPTG 诱导; 5 pGEX-4t-1(+)-hEGF 未经 IPTG 诱导

Fig 6 SDS-PAGE analysis for hEGF

1 Protein molecular weight marker; 2 pGEX-4t-1(+)-hEGF induced by IPTG; 3 pGEX-4t-1(+)-hEGF uninduced; 4 pGEX-4t-1(+)-hEGF induced by IPTG; 5 pGEX-4t-1(+)-hEGF uninduced

3 讨论

hEGF 广泛存在于组织和体液中, 但含量极低。早期主要是从人尿中提取 hEGF, 纯化步骤复杂, 产率很低, 从几百升人尿中仅能得到 1 mg hEGF, 远不能满足科研和临床应用的需求。1980 年以来, 国内外竞相利用基因工程技术对 hEGF 进行原核和真核表达系统的研究^[4-10]。研究热点集中在: 寻求

新的表达系统; 构建稳定性好, 拷贝数高, 可控制的原核和真核表达载体; hEGF 的表达与调控机理研究。

由于成熟的 hEGF 没有糖基化位点, 其生物活性与糖基无关, 所以通过原核表达可获得有生物活性的 hEGF。本试验在前人对 hEGF 进行原核表达研究的基础上, 从 hEGF 高效表达和便于纯化两方面考虑, 做了如下试验改进:

载体的选择。由于 hEGF 是小分子多肽,在细菌中表达量很低,在细胞浆中难以形成包涵体,易被蛋白酶降解,若采用分泌性表达载体或融合表达载体可实现 hEGF 在细菌中的高水平 and 稳定性表达。本试验选用融合表达 pGEX 载体系列—4t-1 和 6p-1 作为 hEGF 表达载体。该载体含有一个日本血吸虫谷胱甘肽转移酶(GST)基因,可与 hEGF 基因进行融合表达,表达产物为 GST 和 hEGF 融合蛋白。该融合蛋白可以利用商品化亲和层析柱 Glutathione Sepharose 4B 快速纯化,采用解离蛋白凝血酶和 PreScissionTM protease 进行解脱,可确保蛋白的纯度^[11,12];在纯化蛋白的同时还可以用还原型的谷胱甘肽对表达的蛋白进行复性,得到有生物活性的 hEGF^[13]。

宿主菌的选择。由于 hEGF 为真核基因,其在原核中表达具有密码子偏爱性问题,导致在大肠杆菌中表达量低。本试验首次采用 BL 21-Codon plusTM 宿主菌表达 hEGF。该宿主菌带有大肠杆菌稀有 tRNA 的额外基因拷贝,解决了大肠杆菌密码子偏爱性问题,不需要对克隆得到的真核基因进行密码子改变,就可以高水平表达许多在常规大肠杆菌宿主中难以表达或不能表达的蛋白,提高 hEGF 在细菌中的表达率。

经过以上改进后,本试验较刘革修等^[14]、赵忠良等^[15]有关研究报道的 hEGF 表达率有了大幅度提高,从 20% 提高到 30% 左右,而且为获得有生物活性的 hEGF 打下了基础。

[参考文献]

- [1] Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF) [J]. *Development Biology*, 1965, 12(3): 394- 407.
- [2] Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(14): 7709- 7712.
- [3] 周延冲. 多肽生长因子——基础与临床 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1991. 136- 158.
- [4] Graeme IBell, Noel M Fong, Michelle M Stempien, et al. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression *in vitro* and gene organization [J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(21): 8427- 8446.
- [5] Greenbaum L E, Cressman D E, Haber B A, et al. Coexistence of C/EBP alpha beta growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration. Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96: 1351- 1365.
- [6] Takanori Oka, Shunji Sakamoto, Ken-ichi Miyoshi, et al. Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli* [J]. *Nat Acad Sci USA*, 1985, 82: 7212- 7216.
- [7] Kishimoto F, Gomi H, Kanaoka M, et al. Direct expression of urogastrone gene in *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 1986, 45: 311- 316.
- [8] 袁汉英, 闵永洁, 石松, 等. 人表皮生长因子基因的化学合成和克隆及其在酵母中的表达 [J]. *生物工程学报*, 1991, 7(4): 300- 306.
- [9] 黄秉仁, 蔡良琬, 廖洪涛, 等. 人工合成表皮生长基因在甲基营养型酵母中的高效表达 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, 14(5): 512- 517.
- [10] Huang R C, Lam E, Chen Y H, et al. Human epidermal growth factor excreted by recombinant *Escherichia coli* K-12 has the correct N-terminus and is fully bioactive [J]. *Process Biochemistry*, 1999, (35): 1- 5.
- [11] 奥斯特伯 F, 布伦特, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 33- 34, 643- 644, 641- 652.
- [12] Cording Ley M G, Callahan P L, Sardana V V. Substrate requirements of human rhinovirus 3C protease for peptide cleavage *in vitro* [J]. *Bio Chem*, 1990, 265(16): 9062.
- [13] 路凡, 赵忠良, 陈南春, 等. 底物诱导重组人表皮生长因子的复性 [J]. *细胞与分子生物学杂志*, 1998, 14(3): 228.
- [14] 刘革修, 张彤, 吴孟津. 人表皮生长因子序列分析及其在大肠杆菌中的表达 [J]. *衡阳医学院学报*, 1997, 25(2): 121- 124.
- [15] 赵忠良, 路凡, 陈南春, 等. 人表皮生长因子在大肠杆菌中的表达与活性分析 [J]. *第四军医大学学报*, 1997, (18): 497- 498.

Gene cloning and expression of human epidermal growth factor

WANG Bao-li^{1,2}, WU Fang-li¹, ZHANG Yong², GUO Aiguang¹

(1 College of Life Sciences; 2 Institute of Bio-Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract Human EGF gene was successfully amplified from human placenta with RT-PCR method, then cloned it into expression vector: pGEX-4t-1(+) and pGEX-6p-1(+) and shift them to BL 21 (DE3) -Codon plusTM, which don't need added program to solve the coding of rare codons pGEX-4t-1(+)-hEGF, pGEX-6p-1(+)-hEGF was highly expressed in BL 21 (DE3) -Codon plusTM-RP, BL 21 (DE3) -Codon plusTM-RL and the recombinant hEGF was about 30% of total protein measured with SDS-PAGE.

Key words: hEGF; gene cloning; rare codons; gene expression