

文章编号: 1001-7445(2002)02-0122-06

人表皮生长因子(hEGF)基因的合成、鉴定 及植物表达质粒的构建

陈廷速^{1,2}, 杨海杰¹, 张 军¹, 夏宁邵¹, 陈如凯³, 李杨瑞²

(1. 厦门大学 肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2 广西农业科学院,
广西 南宁 530007; 3 福建农林大学, 福建 福州 350002)

摘要: 用 PCR 方法合成了人表皮生长因子(hEGF)基因, 构建了原核表达质粒 p20T-hEGF, 研究了原核表达的重组蛋白 hEGF 的生物学活性, 并构建了植物表达质粒。研究表明: 无论是融合蛋白 GST-hEGF 或纯化的 hEGF 蛋白, 都有相当高的生物活性, hEGF 蛋白对 HeLa 细胞的增殖有很好的促进作用, 免疫小鼠亦能产生很高的免疫应答反应。

关键词: 人表皮生长因子(hEGF); 基因克隆; 原核表达

中图分类号: Q 774 **文献标识码:** A

人表皮生长因子(human epidermal growth factor, hEGF)是一种能与靶细胞膜上特异受体(EGF-R)结合并起多种生理作用的小分子多肽, 相对分子量为 6 04 kD。hEGF 能促进多种上皮细胞的分化、增殖, 刺激血管形成, 抑制胃酸分泌, 并与免疫性皮肤病及创面组织修复有密切的关系^[1-3], 在临床上十分广阔的前景^[4,5]。我们根据人表皮生长因子(hEGF)基因的序列用 PCR 的方法人工合成了 hEGF, 并利用原核表达系统验证了其生物活性, 在此基础上进一步构建了植物表达质粒。本文是我们研究工作的一部分。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶 *EcoR* I, *Hind*III 和 T₄DNA 连接酶等均为日本 TAKARA 公司产品; MTT (四甲基偶氮唑), Amresco 产品; HRP (辣根过氧化物酶) 底物, 北京万泰公司惠赠; 商品化人表皮生长因子(hEGF), Amersham 产品; IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷), 上海生工生物工程有限公司产品。

1.2 菌株和质粒

大肠杆菌菌株为 ER 2566, 本实验室保存。质粒为本实验室构建的 pGEX-20T, pBPF-omega-7, pCambia 1301 和购自宝生物大连生物工程有限公司的 pMD-18T。

1.3 hEGF 引物设计和 PCR 扩增

根据 Bell^[9]报道和 Genbank (收录号: E02089) 中的 hEGF 的核苷酸序列, 设计 hEGF 的四条引物: R1, R2, F1 和 F2; 分别进行两次 PCR 反应。反应产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 hEGF 的克隆和测序

经 PCR 扩增得到的 hEGF 经纯化与 pMD-18T 连接, 再经 *EcoR* I, *Bam*HI 双酶切后与经同样酶切的 pGEX-20T 以摩尔比 7 : 1 混合, 加入 T₄DNA 连接酶, 16 ℃ 进行连接过夜。转化大肠杆菌 ER 2566

收稿日期: 2001-12-20; 修订日期: 2002-03-05

基金项目: 福建省自然科学基金(C9910004); 厦门凯立生物制品有限公司资助

作者简介: 陈廷速(1966-), 男(壮族), 广西上思人, 厦门大学博士研究生

感受态细胞 挑取重组克隆进行PCR及酶切鉴定,以正确的重组克隆作序列分析(上海博亚公司)。

1.5 hEGF 原核表达

取经转化并表达hEGF的菌液接种于400 mL LB培养基(Amp⁺)中37℃振荡培养10 h;按1:4的比例转接扩大培养至OD₆₀₀达1.0;加入IPTG至0.1 mmol/L,25℃诱导4 h。

1.6 GST-hEGF 融合蛋白的纯化

把经过大量表达并离心得到的菌体,加裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 100 mmol/L NaCl) 40 mL,用超声破碎之后,离心15 min,将上清液用0.45 μm的滤膜过滤两次,将此得到的超声上清液上样到经1×PBS平衡的glutathione sepharose 4B介质的亲和层析柱中,室温下孵育30 min,打开下样孔,让穿透峰自然流下,让柱子流干,用10 mL 4℃预冷的1×PBS洗柱,重复3次,堵住下样孔,加入1 mL的谷胱甘肽缓冲液,室温下孵育10 min,用1.5 mL的离心管收集样品,即为纯化的GST-hEGF。

1.7 hEGF 蛋白的纯化

将1.6中得到的超声上清液上样到经1×PBS平衡的glutathione sepharose 4B介质的亲和层析柱中,室温摇床中平放振荡温育1 h之后,4℃静置5~6 h,收集穿透峰,用1×PBS平衡,并用凝血酶酶切10 h,收集得到纯化的hEGF蛋白。

1.8 抗血清的制备

实验小鼠为2~7周龄的雌性BALB/c小鼠,实验组3只,对照组3只(GST超声离心上清液注射)。用经大量表达并纯化的GST-hEGF加弗氏完全佐剂后注射小鼠(0周),在第4、8和11周加强注射,分别于第0、2、3、4、5、6、8、10、12、13和14周采血;每只采血20 μL,放入事先准备的400 μL生理盐水;采血后将血清置37℃2 h,放4℃1~2 h,5 000 r/min离心10 min,取上清液-20℃贮存备用。

1.9 聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考文献[10]的方法

1.10 MTT 法检测 EGF 蛋白活性

培养HeLa细胞一瓶,细胞培养到OD值为0.8~1.0,然后用versen消化,完全培养基吹打成悬液,用细胞计数器计数,细胞溶液稀释到2×10⁵/mL。将细胞溶液滴加到96孔板中,每孔50 μL,37℃培养24 h。在每孔加各种稀释比例的待测溶液(hEGF, GST-EGF, 阴性对照),37℃培养3 d,用MTT试剂盒检测细胞增殖,用酶标仪测OD值,测定波长570 nm,以630 nm为参照。

1.11 ELISA 间接法检测

用商品化标准hEGF经CB(50 mM 碳酸盐缓冲液 pH 7.6)适度稀释后包被,37℃温育2 h,4℃过夜,甩去孔内液体, PBST 洗涤1次,吸干之后每孔加200 μL 封闭液(20 mM PBS pH 7.2; 2% BSA; 2% Casin),37℃温育2 h,甩去孔内液体,吸干,每孔加100 μL 样品稀释液(20 mM PBS pH 7.2; 2% BSA; 2% Casin)及5 μL 待测血清,37℃温育0.5 h,甩去孔内液体, PBST 洗涤6次,吸干,然后每孔加100 μL 酶标二抗(1:2 000)(羊抗鼠酶标二抗,晶美生物公司产品),37℃温育0.5 h,甩去孔内液体, PBST 洗涤6次,吸干,随后每孔各加HRP底物(显色剂A液及显色剂B液)各50 μL,37℃显色10 min,每孔加反应终止液50 μL,终止反应,用酶标仪测OD值,测定波长450 nm。

2 结果和分析

2.1 hEGF 合成和克隆

设计的4条引物分别为:

EGFF1: 59mer

5'-GGA TCC ATG AAC TCC GAC TCT GAA TGC CCG CTG TCC CAC GAT GGT TAC TGC CGT CAC GA-3'

BamH I

EGFF2: 59mer

5'-GAT GGT TAC TGC CTG CAC GAC GGC GTT TGT ATG TAT ATC GAG GCG CTG GAC AAA TAT GC-3'

EGFR 2: 59mer

5'-G GCA GCG TTC GCC GAT GTA GCC TAC TAC ACA GTT ACA CGC ATA TTT GTC CAG CGC CTC G-3'

EGFR 1: 59mer

5'-GAA TTC TTA GCG CAG TTC CCA CCA TTT CAG GTC ACG GTA CTG GCA GCG TTC GCC GAT GT-3'

EcoR I

先以引物 R 2, F2 进行第一次扩增(PCR 1), 再用此扩增得到的 PCR 1 产物为模板, 以 R 1, F1 为引物进行第二次扩增(PCR 2). 在 F1 和 R1 的 5 端设计了两个酶切位点(*Bam* H I 和 *Eco*R I). 将第二次扩增得到的 PCR 产物连接到 pMD-18T, 并对其进行测序(上海博亚公司), 测序结果证明得到的基因是正确的. 从对 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳(3%)分析(图 1), 引物 59bp, PCR 1 为 78bp, PCR 2 为 177bp, 与图中的 M arker 位置相比较说明结果是正确的

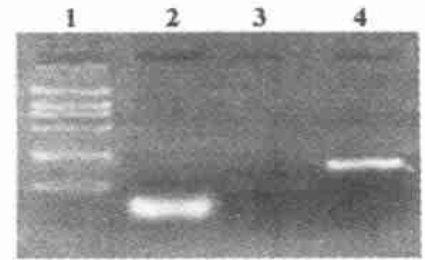


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶鉴定

Fig 1 Identification of PCR products

Note: 1-M arker, 2-Primer, 3-PCR 1, 4-PCR 2

2.2 hEGF 表达质粒的构建

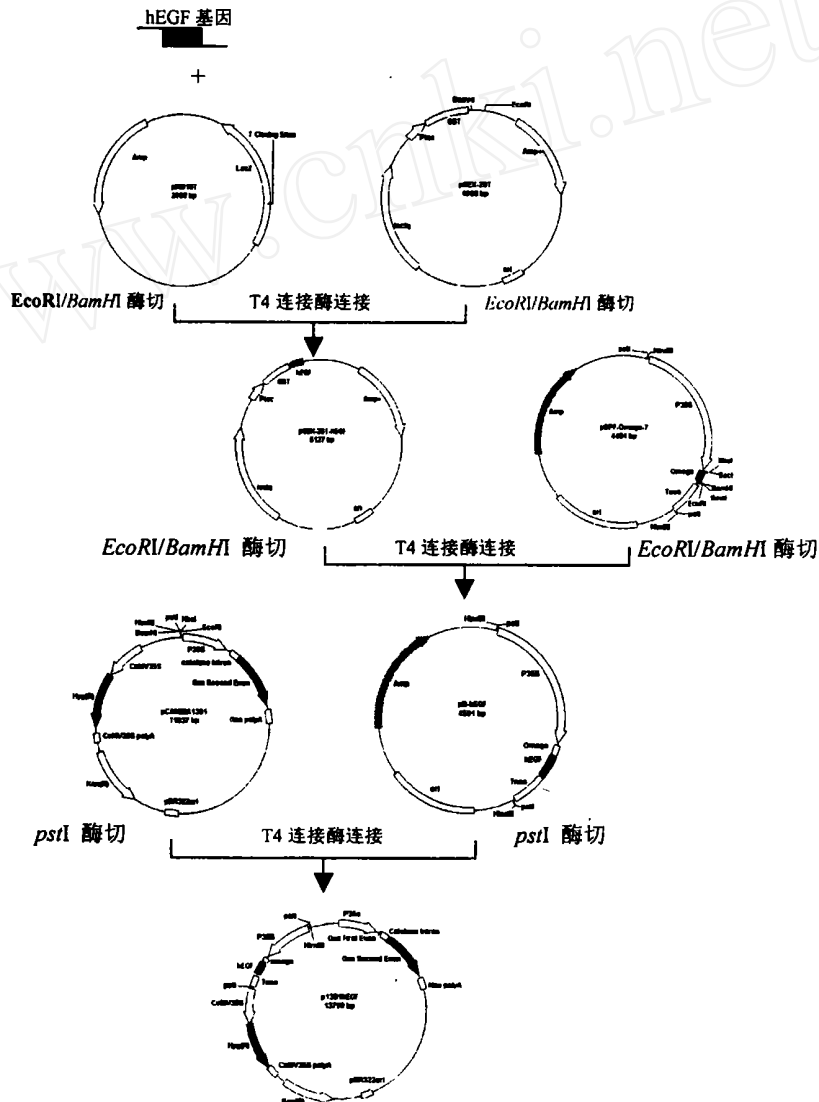


图 2 hEGF 基因表达质粒构建流程图

Fig 2 The diagram of construction of plasmid for hEGF

我们构建的表达质粒具体如图2。在构建原核表达质粒过程中,我们用小量表达和酶切鉴定相结合,酶切鉴定如图3,分别用扩增得到的hEGF, pMD-18T-hEGF和pGEX-20T-hEGF (*EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切);植物表达质粒构建用酶切进行鉴定(图4),对 pBPF-hEGF, p1301-hEGF, p1301 用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 进行双酶切,并单酶切(*Bam* H I)处理 p1301, p1301-hEGTF, 琼脂糖凝胶电泳(3%) 鉴定结果证明是正确的

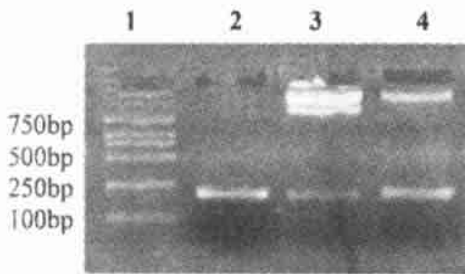


图3 原核表达质粒酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plasmid for prokaryotic expression by enzyme

Note: 1-M arker, 2-PCR 2, 3-pT-hEGF, 4-p20T-hEGF.



图4 植物表达质粒构建鉴定图

Fig. 4 Restriction endonuclease analysis of p1301-hEGF

Note: 1-M arker, 2-PCR 2, 3-BPF-hEGF (*Bam* H I / *EcoR* I), 4-1310-hEGF (*Bam* H I / *EcoR* I), 5-1310 (*Bam* H I / *EcoR* I), 6-1301 (*Bam* H I), 7-1301-hEGF (*Bam* H I)

2.3 纯化 hEGF 蛋白活性分析

用小量表达的 GST-hEGF 与经纯化的 GST-hEGF 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,以标准 Marker 和小量表达的 GST 为对照,结果如图 5。GST 分子量为 26 kD, GST-hEGF 分子量约为 32 kD。经过纯化的 GST-hEGF 纯度达到 99.7%。将之进行纯化得到的 hEGF 用 HeLa 细胞做蛋白活性分析,结果如图 6。无论是标准 hEGF 或纯化的 hEGF, 作为细胞生长因子, 它们的促进 HeLa 细胞增殖的作用浓度都很低(最大的 OD 值对应浓度为 1 ng/mL), 两者都促进了 HeLa 细胞的增殖, 而且表现的性质一致

2.5 ELISA 检测结果

用纯化的 GST-hEGF 加完全弗氏佐剂后注射小鼠, 将收集到的血清进行 ELISA 检测, 结果如图 7。三只 BALB/c 小鼠血清中的抗体的变化规律基本一致。初次免疫后到第 4 周, 抗体逐渐增强; 只有小鼠 C 在第 4 周和第 8 周之间有变化, 但这种变化可能由于在第 4 周进行加强免疫, 在第 6 周出现回升并在第 8 周和另两只小鼠抗体水平一致。这说明我们注射的融合蛋白能使小鼠产生很好的免疫应答反应, 使小鼠血清中的抗体提高到一个较高的水平。

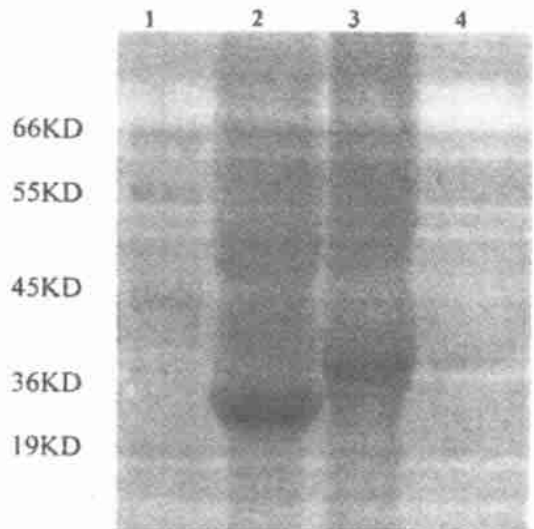


图5 GST, GST-hEGF 和纯化 GST-hEGF 进行 SDS-PAGE 电泳结果(上样量 5 μ L)

Fig. 5 Identification of GST, GST-hEGF and purified GST-hEGF by SDS-PAGE electrophoresis

Note: 1-M arker, 2-GST, 3-GST-hEGF, 4-Purification GST-hEGF

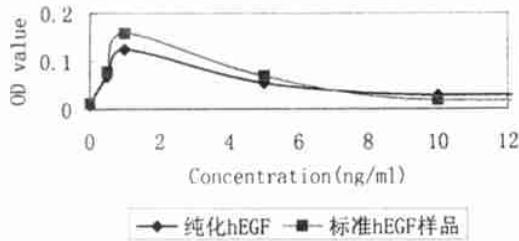


图 6 原核表达 hEGF 经纯化后对细胞 (Hela) 活性的影响

Fig 6 The effect of purified of hEGF

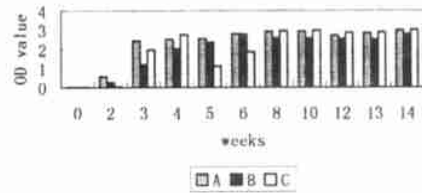


图 7 BALA/c 小鼠血清(注射 GST-hEGF) 的 ELISA 变化曲线

Fig 7 The curve of serum of ELISA analysis on activity of Hela cells

Note: A, B and C represent three BALA/c mice respectively, and B's serum was used for dot blotting analysis

3 讨论与展望

我们通过 PCR 方法合成了人表皮生长因子基因, 由于 PCR 反应体系受多种因素的影响, 控制好反应条件是十分重要的^[9]; 其中 Mg^{2+} 浓度高低是影响结果的主要因子, 浓度过高会引起非特异性扩增产物的增加, 而过低则降低扩增效率。由于我们设计的引物 Loop 值过高, 为了避免引物本身产生二聚体, 增加特异性扩增, 我们采用双温法进行扩增。主要对 Mg^{2+} 浓度、退火温度进行了优化: Mg^{2+} 浓度为 $1.3 \sim 1.5 \text{ mmol/L}$, 退火温度为 $65 \sim 68$ 。两次 PCR 都在 $50 \mu\text{L}$ 的 PCR 反应体系中进行, 按 $94 \quad 3 \text{ min}$ 30 s , $94 \quad 30 \text{ s}$, $68 \quad 30 \text{ s}$ 和 $72 \quad 3 \text{ min}$ 进行 30 个循环 PCR 反应。实验结果证明我们的实验体系是正确的。我们还对 hEGF 蛋白的纯化体系进行了优化, 建立了有效的纯化方法。

近年来, 重组 hEGF 产品的研究与开发有了很大的发展^[2], 商品化 hEGF 的市场价很高, 高达 $210 \sim 1020$ 美元/毫克^[6]。有关这一领域的研究热点体现如下几个方面: 寻求新的表达系统; 构建稳定性好、拷贝数高、可控制的表达载体; hEGF 的表达与调控机理; 开拓新的应用领域。近年来, 转基因植物已被作为一个经济的表达系统引起一场农业的革命, 特别是利用植物表达医药蛋白。由于这一系统能大量种植, 成本低, 能够满足工业的大量需要; 同时, 没有动物或人的病原菌。此外, 转基因植物的种子或块茎能稳定的表达目的产品并且表达的次生代谢物可用现有的设备进行加工。如利用转基因植物生产高价值的新颖的碳水化合物、脂质、生物塑料, 有疗效的蛋白质、酶、抗体和疫苗^[13-16]。我们已用构建的植物表达质粒对模式植物拟南芥进行了转化并已获得转基因植株, 进一步将通过研究 hEGF 的表达与调控, 提高其蛋白活性, 为下一步转化目标植物表达 hEGF 提供可靠的技术基础。

参考文献

- [1] Marti U, Burwen S J, Jones A L. Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: an update [J]. Hepatology, 1989, 9(1): 126-138
- [2] 吴大庆, 吴大鹏. 表皮生长因子的基因工程 [J]. 中国医药工业杂志, 1994, 25(7): 323-328
- [3] 王宏. 表皮生长因子的研究进展 [J]. 国外医学免疫学分册, 1995, (3): 146-148
- [4] Hasegawa N, Yamamoto K. Epidermal growth factor suppresses in vitro senescence in the ability of human umbilical vein endothelial cells to proliferate, but not in the ability to produce prostacyclin [J]. Mech Ageing Dev, 1992, (66): 107-114
- [5] Brown G L. Method of decreasing cutaneous senescence [P]. Patent No. 5618544, 1997.
- [6] 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

- [7] Sivakesava S, Xu ZN, Chen YH, *et al*. Production of excreted human epidermal growth factor (hEGF) by an efficient recombinant *Escherichia coli* system [J]. *Process Biochem*. 1999, 34: 893-900
- [8] Lam KHE, Chow KC, Wong WKR, *et al*. Construction of an efficient *Bacillus subtilis* system for extracellular production of heterologous proteins [J]. *J Biotechnol*, 1998, 63: 167-177.
- [9] Bell G I, Fong N M, Stempien M M, *et al*. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence expression in vitro and gene organization [J]. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14(21): 8 427.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆: 第2版 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1988 888-897.
- [11] Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR [J]. *Clin Chem Lab Med*, 1998, 36(5): 255
- [12] 赵忠良, 路凡, 陈南春, 等. 人表皮生长因子在大肠杆菌中的融合表达与活性分析 [J]. *第四军医大学学报*, 1997, 18(5): 497-498
- [13] Arakawa T, Langridge WHR. Plants are not just passive creatures! [J]. *Nat Med*, 1998, 4: 550-551.
- [14] Mor TS, Gomez-lin MA, Palmer KE. Perspectives: edible vaccines—a concept coming of age [J]. *Trends Microbiol*, 1998, 6: 449-453
- [15] Tacket C O, Mason H S. A review of oral vaccination with transgenic vegetables [J]. *Microbes Infect*, 1999, 1: 777-783
- [16] Koen Peters, Chris De Wilde, Geert De Jaeger, *et al*. Production of antibodies and antibody fragments in plants [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 2 756-2 761.

The cloning and identifying of human epidermal growth factor (hEGF) and its expression plasmid construction in plant

CHEN Ting-su^{1,2}, YANG Hai-jie¹, ZHANG Jun¹, XIA Ning-shao¹,
CHEN Ru-kai³, LI Yang-rui²

(1. Tumour Cell Engineering Lab of Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3. Guangxi Academy of Agriculture Science, Nanning 530007, China)

Abstract: Human epidermal growth factor (hEGF) gene is synthesized through polymerase chain reaction (PCR), and constructed p20T-hEGF for prokaryotic expression and studied the bio-activity of recombinant protein hEGF, and constructed plasmid used for plant transformation. It showed that both fusion protein GST-hEGF and purified protein of hEGF, they all had much higher bio-activity, and the protein of hEGF could facilitate HeLa cell regeneration, and it could strength response reaction in immunity when it immunized mice.

Key words: human epidermal growth factor (hEGF); gene cloning; prokaryotic expression

(责任编辑 刘海涛 唐汉民 张晓云)