

成纤维细胞生长因子与单核—巨噬细胞集落刺激因子 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

胡 弼 刘革修^① 杨君佑 杨永宗^①

(衡阳医学院生理学教研室, ①分子生物学中心, 衡阳 421001)

Expression of Recombinant Fusion Protein Basic Fibroblast Growth Factor and Granulocyte—Macrophage Colony Stimulating Factor in *E coli*

HU Bi, LIU Ge-Xiu, YANG Jun-You and YANG Yong-Zong

(Department of Physiology, ^①Molecular Biology Center, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT

Aim This research has made a new gene product for the treatment of atherosclerosis and arterial stenosis.

Methods By means of gene engineering technology, basic fibroblast growth factor (bFGF) cDNA and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) cDNA were cloned into the vector pGEM-3Zf(+) at the EcoR I and BamHI sites. Subsequently subcloned into the expression vector pBV₂₂₀ of the EcoR I and BamH I sites. The bFGF-GM-CSF was expressed in *E coli* confirmed by SDS-PAGE and Western-bolt.

Results The recombinant fusion protein was expressed successfully in *E coli*. They have immunological activities of bath bFGF and GM-CSF.

Conclusion The recombinant fusion protein may have biological activities of GM-CSF.

KEY WORDS Basic fibroblast growth factor; Granulocyte macrophage-colony stimulating factor; Fusion protein; Recombinant expression

摘要 为获得防治动脉粥样硬化和再狭窄的新型基因产品,应用基因工程技术将碱性成纤维细胞生长因子和单核—巨噬细胞集落刺激因子基因克隆到 pGEM-3Zf(+)载体的 EcoR I 和 BamHI 位点上,重组成融合基因,亚克隆到 pBV₂₂₀表达载体上,并在大肠杆菌 DH₅ 中进行表达,然后用十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 进行分析。结果发现,融合蛋白可获得表达,且具有成纤维细胞生长因子与单核—巨噬细胞集落刺激因子的免疫学活性。这为进一步研究该融合蛋白的功能及防治动脉粥样硬化和动脉再狭窄提供一种新的基因产品。

关键词 碱性成纤维细胞生长因子; 单核—巨噬细胞集落刺激因子; 融合蛋白; 原核表达

利用基因工程技术,以特异性的配体与细胞毒素交联形成融合物,用它去靶向性杀伤细胞来防治疾病^[1],目前这仍然是研究热点之一。Casscell 等^[2]制备了碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)与 Saporin 融合蛋白,来靶向性抑制动脉再狭窄中的平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖。但是 bFGF-Saporin 可致中层 SMC 灶性死亡,甚至弹性层崩解,这就有形成动脉瘤和导致动脉破裂的危险^[3,4]。因此有必要研究其他的靶向性交联物。我们选择对 SMC 增殖具有高亲和性的 bFGF 作为配体,单核—巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)细胞毒素^[5,6]作为配基,采用基因工程技术,使 bFGF 与 GM-CSF 融合基因在大肠杆菌中高效表达,并证实该融合蛋白具有 bFGF 和 GM-CSF 的生物学活性。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH₅ α , JM101, 由厦门大学厦宁珊副教授提供。pGEM-3Zf(+)和 pBV 220 质粒由中国预防医学科学院王海林博士赠送。bFGF、GM-CSF 基因来自培养的人动脉 SMC, 由本室保存。

IPTGx-gal 和 Taq 酶分别购自北京华美生物公司和上海生物工程公司。免疫学试剂 anti-bFGF、anti-GM-CSF、EcoR I 和 Kpn I 等内切酶购自 Promega 公司, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据文献[7,8]已知序列设计 bFGF 上下游引物分别为:

5'-CCGAATTCATGCCCCGCTTGCCCGAGGAT-3'

5'-CCAGGTACCGCTCTTAGCAGACATTGGAA-3'

和 GM-CSF 上下游引物分别为:

5'-GGGGTACCGCACTGCCCCGTTCTCCAG-3'

5'-GGGGATCCGCTCTCACTCCTGGACTTG-3',

由上海生物工程公司合成。

1.2.2 PCR 法修饰 bFGF 和 GM-CSF 基因 10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ L, 10 mmol/L 的各种 dNTP 混合液 1 μ L, 15 mmol/L MgCl₂ 12 μ L, 上下游引物各加 1 μ L, 模板(来自培养的人动脉平滑肌细胞)1 μ L, Taq 酶 1 μ L(5 单位), 加水到 100 μ L, 铺盖 100 μ L 石蜡油。94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 扩增参数: 94 $^{\circ}$ C 50 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s, 30 个循环, 最后延伸 5 min。

1.2.3 克隆载体的构建 (1)PCR 产物用氯仿去石蜡, 乙醇沉淀后用 EcoR I, Kpn I 酶切 bFGF 基因; (2)用 Kpn I, BamH I 酶切 GM-CSF 基因; (3)用 EcoR I, BamH I 酶切 pGEM-3Zf(+), 上述三种酶切产物经低熔点琼脂糖回收, 保存备用; (4)将酶切后的 bFGF, GM-CSF, pGEM-3Zf(+)三个 DNA 片段用 T₄ DNA 连接酶连接, 反应条件为 10 $\times$ T₄ DNA 连接缓冲液 2 μ L, DNA 3 μ L, 水 8.5 μ L, 连接酶 1 μ L, 16 $^{\circ}$ C 水浴 16 h, 连接产物转化感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C LB 琼脂培养基培养, 氨苄青霉素及兰白斑筛选, 挑白色菌落液体培养扩增, 提取质粒 DNA 作酶切及 PCR 鉴定, 筛选出正确插入克隆。

1.2.4 表达载体的构建 (1)用 RclI, BamH I 酶切 pGEM-3Zf(+)/bFGF-GM-CSF 质粒 DNA, 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离, 回收目的片段。用 EcoR I, BamH I 酶切 pBV220 载体, 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离, 回收载体片段。(2)用 T₄ DNA 连接酶将重组基因与

pBCV220 载体片段相连, 转化 DH₅ α 感受态细胞, 再作酶切及 PCR 筛选所需的 bFGF-GM-CSF/PBV220。

1.2.5 bFGF-GM-CSF 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将筛选出的重组质粒菌种过夜活化培养 1:50 转种, 35 $^{\circ}$ C 生长到对数生长期, 迅速将温度提高到 42 $^{\circ}$ C 诱导表达。诱导后 3 h、4 h、5 h, 各收集 1.5 mL 菌液。12 000 r/min 离心 1 min, 去上清, 加 100 μ L 1 $\times$ SDS 上样缓冲液悬浮沉淀, 沸水浴 3 min, 再用 12 000 r/min 离心 1 min 备用。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 参见卢圣栋主编《现代分子生物学实验技术》进行 SDS-PAGE 电泳。在凝胶最中间两孔点标准蛋白分子量, 两侧对称点同样的样品, 电泳结束后, 将凝胶最中间两孔点标准蛋白分子量, 两侧对称点同样的样品, 电泳结束后, 将凝胶从两标准蛋白分子量中间分成两份。一份用考马斯亮蓝 R250 染色; 另一份转印于硝酸纤维素膜上后, 用 1% 的 BSA 封闭 1 h, 依次用鼠抗人 GM-CSF 或抗人 bFGF, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 以及 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)底物液处理。

2 结果

2.1 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

扩增的 pGEM-2Zf(+)/bFGF 质粒和 pGFGM-3Zf(+)/GM-CSF 质粒经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外分光光度计检测结果是, bFGF-cDNA 465 bp, GM-CSF cDNA 400 bp (图 1, Figure 1)。

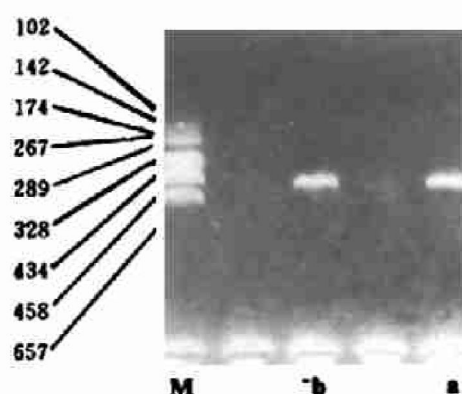


Figure 1. GM-CSF-cDNA and bFGF cDNA modified by PCR. a: Amplified bFGF cDNA product 465 bp. B: Amplified GM-CSF cDNA product 400 bp. M. pGEM-3Zf(+)/Hae III DNA Marker.

2.2 克隆载体的构建

用 EcoR I、Kpn I、BamHI 分别酶切 PCR 修饰后的 bFGF、GM-CSF 基因及 pGEM-3Zf (+)DNA, 在 T₄DNA 连接酶的作用下, 使之连接, 将连接产物转化感受态细胞, 转化后挑白色菌落扩增, 提取质粒 DNA 作内切酶。

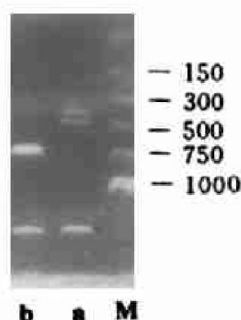


Figure 2. Restriction enzyme identification. M: PCR DNA Marker (Promega), a: digested by Kpn I, 13 amHl, b: digested by EcoR I BamHI.

2.3 表达载体的构建

用 EcoRI、BamHI 分别酶切 bFGF-GM-CSF/pGEM-3Zf (+) DNA 和 pBV 220 DNA, 在 T₄DNA 连接酶作用下, 使之连接, 将连接产物转化 DH₅感受态细胞, 内切酶鉴定电泳图。

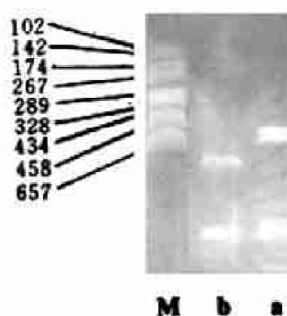


Figure 3. Restriction enzyme identification 2% A-groose electrophoresis. M: pGEM-7Zf (+)/Hae III DNA Marker, a: digested by EcoRI, KpnI BamHI, b: digested by EcoRI BamHI

2.4 重组基因在大肠杆菌中表达产物的鉴定

pBV220/bFGF-GM-CSF 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot。结果显示(见图 4)在

34 kDa 处有一产物带, 与推测的结果一致。在 Western-blot 实验中, 表达产物与抗 bFGF 和抗 GM-CSF 发生免疫反应, 由此可见, 表达产物有较好的免疫学活性。

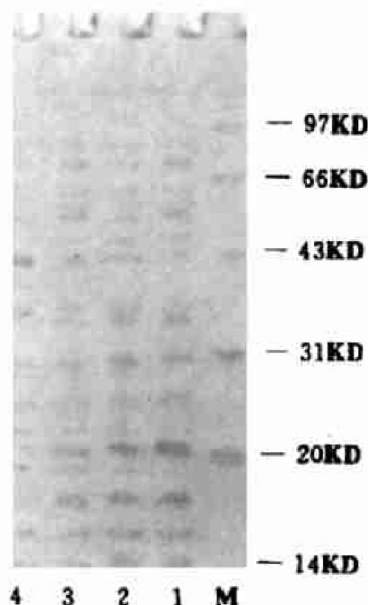


Figure 4. SDS-PAGE electrophoresis. M: Protein molecular weight. Marker 1, 2, 3: induced 3, 4, 5 h, 4: vector control.



Figure 5. Western blot. a: anti bFGF/bFGF western blot, b: anti GM-CSF/GM-CSF western blot.

3 讨论

近些年, 国外兴起了以特异性配体与细胞毒素交联形成融合蛋白、用来靶向性杀伤的研究热点^[1]。防治动脉再狭窄的靶细胞是增殖 SMC。抑制 SMC 增殖的因素有白细胞介素 1 (IL-1), 转移生长因子 (TGF β) 和 γ -干扰素

(IFN γ), 它们及其相应受体在增殖 SMC 中表达较低。故应选择对增殖 SMC 具有特异高亲和性的配体与细胞毒素结合形成融合物, 用它去靶向性抑制再狭窄动脉 SMC 的增殖, 才能达到防治目的。bFGF 是一种具有肝素亲和性的 18 kDa 蛋白^[3], Casscell 等^[2]发现球囊导管损伤的动脉中 bFGF 受体均明显增加, bFGF 对球囊导管损伤区动脉 SMC 具有高亲和性。因此, 我们选择对增殖的 SMC 具有高亲和性的 bFGF 作为配体。Wieslaw 等^[9]报道: CSF-1 在阻碍炎症发生与发展的过程起了重要作用, 且 CSF-1 能募集单核-巨噬细胞到动脉壁, 还能降低脂蛋白水平。Dipersio 和 Weisbart 等报道^[5,6], GM-CSF 具有激活巨噬细胞, 释放一些对增殖 SMC 有明显抑制作用的药理活性物质。因此我们选择 GM-CSF 作为配基, 用基因工程技术使 bFGF 与 GM-CSF 融合基因在大肠杆菌中得到高效表达, 并经 SDS-PAGE 和免疫印迹鉴定证实 bFGF-GM-CSF 融合蛋白具有 bFGF 和 GM-CSF 的生物学活性。bFGF-GM-CSF 融合蛋白有望成为防治动脉再狭窄的新的基因工程产品, 其生物学功能有待进一步研究。

参考文献

- 1 Lorberoum H, Kozak RW, Waldmann TA, et al. Interleukin 2 (IL-2) PE40 is cytoxic to cells displaying either the P55 or P70 subunit of the IL-2 receptor. *J Biol Chem*, 1988, **265** (35): 18 650~665.
- 2 Casscells W, Lappi DA, Olwin BB, et al. Elimination of

smooth muscle cells in experimental restenosis: targeting of fibroblast growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(15): 7 159~163.

- 3 Gospodarowicz-D, Ferrara N, Schweigere L, et al. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrinol Rev*, 1987, **8**(2): 95~114.
- 4 Lappi DA, Esch FS, Barbier L, et al. Characterization of a *Saponaria officinalis* Seed ribosome-inactivating protein: immunoreactivity and sequence homologies. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, **129** (3): 934~942.
- 5 Dipersio JF, Billing P, Williams R, et al. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines prime human neutrophils for enhanced arachidonic acid release and leukotriene B₄ synthesis. *J Immunol*, 1988, **140** (12): 4 315~322.
- 6 Weisbart RH, Kwan L, Golde DW, et al. Human GM-CSF primes neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to the major physiological chemoattractants. *Blood*, 1987, **69** (1): 18~21.
- 7 Abraham JA, Whang JL, Tumolo, A. et al. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J*, 1986, **5** (10): 2 523~528.
- 8 Wong GG, Wiekman JS, Temple PA, et al. Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant protein. *Science*, 1985, **228**: 810~815.
- 9 Wieslaw WJ, Slamon S. Cytokine regulation of the macrophage (M Φ) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev*, 1996, **76**(4): 927~947.

(1998-02-05 收到, 1998-05-22 修回)