

# 大肠杆菌可溶性表达人碱性成纤维细胞生长因子的研究

孙晋华 洪 岸\* 张 玲 孙奋勇 宋照雷

(暨南大学生物工程研究所 广州 510632)

**摘 要** :包涵体的形成与外源基因在大肠杆菌中的表达量高度相关,在适当的范围内,降低 hbFGF 在表达宿主 BL21(DE3)plyS 中的表达,成为实现高可溶性表达的关键。在不改变氨基酸序列的条件下,对 hbFGF 高表达菌株突变重组子起始密码 ATG 下游前 3 个密码子的摇摆碱基进行随机回复突变,共有 7 种组合,合成引物 PCR 扩增后,克隆至表达载体 pET-3c,将重组子转导 BL21(DE3)plyS 后, IPTG 诱导表达,发现其中 1 株有较高可溶性和活性的菌株。可见部分降低外源蛋白的表达量可以避免与减少包涵体的形成。

**关键词** :可溶性表达,包涵体,人碱性成纤维细胞生长因子,大肠杆菌,回复突变

**中图分类号** :Q939 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2003)04-0448-05

人碱性成纤维细胞生长因子(Human basic fibroblast growth factor, hbFGF)是一种有丝分裂源,对于中胚层与外胚层起源的细胞有广泛的促增殖作用,参与多种病理生理活动,因而临床上极具应用价值。hbFGF 分子量小且无糖基化问题,适于原核表达,为目前国际上生产重组 hbFGF 蛋白的主要手段。但是,根据文献,国内尚无非融合表达量超过 10% 的情况<sup>[1]</sup>,本所以前的工作也证明原始的 hbFGF 序列直接构建到原核表达系统中,表达很低。分析原因,主要是 hbFGF 的翻译起始区(Translation Initiation Region, TIR)GC 含量高,大肠杆菌的偏好密码子稀少的缘故,本实验室在此方面取得了一定的突破,建立了一套有效的方法,获得高效表达的菌株<sup>[1]</sup>(本文定义为 1 号)。但毫无例外的是,在高表达的同时,包涵体的存在成为又一大障碍。虽然 hbFGF 蛋白具有肝素亲合域,能够通过肝素亲和层析方便地解决纯化问题,因此包涵体的存在,增加了纯化和复性的工艺,从而降低了产量,增加了生产成本。

包涵体的形成与外源基因在大肠杆菌中的过量表达密切相关,不仅是原核生物,酵母或是高等动物细胞也是如此,甚至是内源性蛋白在过高表达的情况下也会发生此现象<sup>[2]</sup>。因此在适当范围降低外源蛋白的表达量,将是一种非常实用的手段。我所宋照雷等<sup>[1]</sup>曾对 hbFGF 的 TIR 区起始密码子开始前 35 个核苷酸进行了分析,并按照降低 GC 含量与增加密码子偏好性的原则,对部分核苷酸进行了突变,从 32 种突变方式中筛选出 10 条自由能绝对值最小的序列为引物,克隆到表达载体上,最后得到 1 号与 4 号两株高表达菌。本文以 1 号重组子为基础,进行部分回复突变,期望能部分升高自由能,降低表达量,减少包涵体的形成。

基金项目:国家 863 计划资助项目(Z18-03-29)

\* 通讯作者。Tel 86-20-85220220; Fax 86-20-85226616; E-mail: gz-hongan@163.com

作者简介:孙晋华(1977-),男,山东潍坊人,在读硕士生,主要从事基因工程药物研究。E-mail: sunjinhua123456@163.com

收稿日期:2002-10-17,修回日期:2002-12-11

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

1.1.1 主要试剂：*Bam*H I、*Bgl* II、*Nde* I、*pfu* DNA 多聚酶、T4 DNA ligase 均购自 NEB 公司；质粒纯化、PCR 纯化与切胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司；IPTG 与 MTT 购自上海生工生物技术有限公司；引物合成由上海博亚公司完成。

1.1.2 菌种和质粒：表达质粒 pET-3c 与宿主菌大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21( DE3 )均购自 Novagen 携带 hbFGF 基因的质粒 pUC-hbFGF 与 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本所保存。

## 1.2 引物合成

1 号重组子起始密码子后 32 个核苷酸序列如下：GCT GCT GGT AGT ATT ATT ACT CTG CCG GCT CT。我们选取 ATG 下游前 3 个密码子的摇摆碱基( 上标号标出 )为回复突变的位点，这样三碱基、二碱基、单碱基突变，共产生 7 种方式，分别设计引物，上游引物通用序列如下 5'-ATGGA CATATG GCN<sup>1</sup> GCN<sup>2</sup> GGN<sup>3</sup> AGT ATT ATT ACT CTG CCG-3'，斜体部分为保护碱基，下划线部分为 *Nde* I 酶切位点。不同突变方式的自由能由 DNASIS V 2.5 软件计算给出。下游引物序列：5'-ATCG AGATCT TTA TCA GCT CTT AGC AGA CAT TGG AAG-3'，斜体部分为保护碱基，下划线部分为 *Bgl* II 酶切位点( 因 hbFGF 基因内部有一 *Bam*H I 位点，所以选择其同尾酶 *Bgl* II 为克隆位点 )。

## 1.3 重组子构建及表达

7 条上游引物配合共同的下游引物，分别以 pUC-hbFGF 为模板进行 PCR 扩增( 94 $^{\circ}$ C 4min，58 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 30s，94 $^{\circ}$ C 30s，58 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 30s，循环 30 次，94 $^{\circ}$ C 30s，58 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 10min )。以 *Nde* I 与 *Bgl* II 消化 PCR 产物，并用 *Nde* I 与 *Bam*H I 消化质粒载体 pET-3c，将二者连接后转化 DH5 $\alpha$ ，提取质粒筛选阳性重组子。

## 1.4 重组子的诱导表达及可溶性分析

重组子转化表达菌 BL21( DE3 )*plyS*，500mL LB 培养至 OD 值为 0.3 左右时，1mmo/L IPTG 诱导表达，超声破碎后，SDS-PAGE 检测上清与沉淀。

## 1.5 重组蛋白的纯化与活性检测

纯化分别用离子交换与肝素亲和层析。测活采用 MTT 法<sup>[3]</sup>对 3T3 进行。

# 2 结果

## 2.1 TIR 区域结构分析

对 7 种突变序列的 TIR 区域 ATG 上下游-35 到 +35 进行结构稳定性分析，表 1 给出了不同序列的自由能值。其中 mm3 与 mm4 的自由能绝对值最低。

表 1 1 号高表达突变子 ATG 下游 3 个位点突变方式及 TIR 区域自由能值  
Table 1 The mutated styles of the three nucleotides downstream ATG of No. 1 recombinant and the TIR free energy

Order	Mutated bases( the third site )			Free energy( G $^{\circ}$ ) ( Kcal/mol )	Order	Mutated bases( the third site )			Free energy( G $^{\circ}$ ) ( Kcal/mol )
	1	2	3			1	2	3	
mm1	T	C	G	- 19.7	mm6	T	C	T	- 17.0
mm2	C	T	G	- 17.0	mm7	C	C	G	- 22.2
mm3	C	T	T	- 14.3	No. 1	T	T	T	- 11.8
mm4	T	T	G	- 14.5	Original hbFGF	G	G	C	- 19.8
mm5	C	C	T	- 19.5					

2.2 重组子的酶切鉴定

PCR 扩增产物克隆至 pET-3c 后 ,用 *Nde* I 与 *Bam*H I 酶切鉴定 ,酶切产物大小应为 400bp 左右( hbFGF 基因 406 碱基处有一 *Bam*H I 酶切位点 ) ,如图 1 所示。

2.3 诱导表达及纯化

rm3、4 号菌株中 hbFGF 有表达 ,其余几乎没有表达。对比 1 号菌株与 rm3 号发现 ,1 号菌株表达量占总蛋白的 30% ,但未见可溶性成分 ,rm3 号约占 10% 左右 ,可溶性成份明显增多( 图 2 )。rm3 突变重组子表达产物纯化后经 SDS-PAGE 验证为电泳纯( 图 3 )。

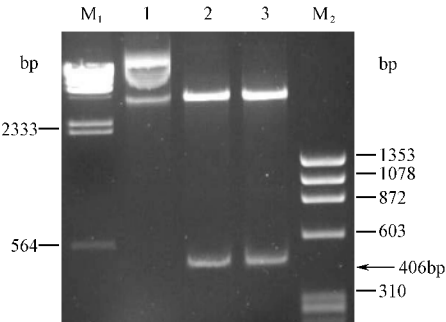


图 1 重组质粒 pET-3c-hbFGF 的酶切鉴定

Fig.1 The restriction analysis of recombinant plasmid pET-3c-hbFGF  
M<sub>1</sub>. λDNA/*Hind* III marker ; M<sub>2</sub>. φ<sub>x</sub>174DNA/*Hae* III marker ;1. pET-3c vector ;2 and 3. Recombinants rm3 and rm4 digested by *Nde* I and *Bam*H I .

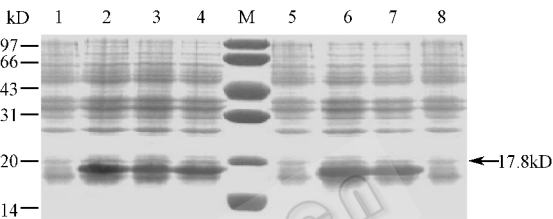


图 2 重组 hbFGF 的 rm3 和 No.1 可溶性表达和包涵体表达比较

Fig.2 Comparison of solubility of rm3 and No.1 protein  
M. Protein marker ; 1&8. rm3&No. 1 , uninduced ; 2&7. rm3&No.1 , total hbFGF protein ; 3&6. rm3&No.1 , insoluble hbFGF ;4&5. rm3&No.1 , soluble fraction .

2.4 活性检测

MTT 法检测突变子 rm3 活性比标准品高( 图 4 )。

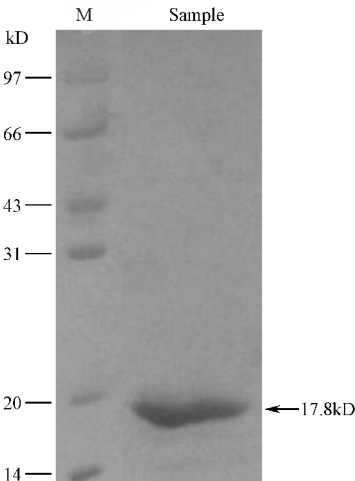


图 3 通过 SDS-PAGE 检测 rm3 可溶性 hbFGF 的纯度

Fig.3 Analysis of purity of soluble hbFGF by SDS-PAGE

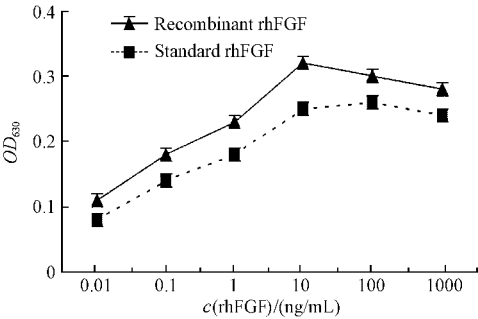


图 4 rm3 重组蛋白的生物活性曲线  
Fig.4 Bioassay of rm3 recombinant protein

### 3 讨论

解决包涵体的实验手段有多种,最常用的为分泌表达和融合表达。分泌表达是将外源蛋白分泌到细菌的周质腔中,周质腔的环境有利于氧化反应,能够促进蛋白质的折叠,而且纯化方便,但并不能完全避免包涵体,同时转运到周质的信号肽蛋白种类比较少,在技术上对大多数蛋白也难以实现<sup>[4]</sup>。疏水性较强的蛋白容易形成包涵体,若将某些亲水性蛋白(如谷胱甘肽巯基转移酶和麦芽糖结合蛋白)与其融合表达,则能增加水溶性,但形成的是融合蛋白,融合蛋白切割和对重组蛋白稳定性的难题,又限制了融合蛋白的应用范围<sup>[5]</sup>。共表达分子伴侣是目前兴起的一种方法,但其结果尚难预料<sup>[6]</sup>。

外源基因在大肠杆菌中的过量表达,是包涵体形成的主要原因。我们的策略是把外源基因表达降低到一个最佳的范围有利于增加可溶性成分,减少包涵体的成分。影响外源基因的表达有两个重要的因素:翻译起始区(TIR)的二级结构和密码子。根据这一特点,我们针对原先高表达的1号重组子进行部分回复突变,目的是为了提高TIR区域的稳定性以降低hbFGF的合成效率。我们仅选择了ATG下游3个密码子的摇摆碱基作为回复突变的对象,而没有大范围的变动,是为了对自由能的变化进行精调控,避免因自由能的剧烈变化而失去表达,结果与预期的相同,当自由能绝对值变得很高时,重组子便失去表达的可能,进一步说明TIR区域对翻译起始效率的决定作用。

外源蛋白的过量表达和包涵体之间的关系,Kiefhaber等<sup>[7]</sup>用动力学模型描述了这一关系,认为原核表达系统中可溶性蛋白的产量是翻译后蛋白质折叠与堆积之间竞争关系的函数,它与蛋白质的合成速率成反比,因此某些利于大肠杆菌合成蛋白质的因素,如适宜的温度,强有力的启动子均会增加包涵体的形成。有人选用较难代谢的脱氧葡萄糖作为发酵时的碳源,以降低大肠杆菌的代谢水平,能提高可溶蛋白的表达水平<sup>[7]</sup>。经过回复突变m3与No.1相比,提高TIR区域的稳定性以降低hbFGF的合成效率,重组蛋白表达量降低,但可溶性成分明显增加,纯化后的hbFGF活性也比标准品的高。因此,实验也进一步验证了Kiefhaber等人的动力学模型。

### 参 考 文 献

- [1] Song Z L, Pan Q H, Wang J, et al. Cloning and high expression of hbFGF with a new strategy. *Acta Genetica Sinica*, 2002, **29**(1): 84 ~ 89.
- [2] Gribskov M, Burgess R R. Overexpression and purification of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Gene*, 1983, **26**: 109 ~ 118.
- [3] 刘小青,李志英,林剑. MTT法检测Rh-bFGF提高Balbc3T3细胞酶活性及促细胞增殖作用. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 1998, **5**: 108 ~ 111.
- [4] Georgiou G, Telford J N, Shuler M L, et al. Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing  $\beta$ -lactamase or alkaline phosphatase. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **52**: 1157 ~ 1161.
- [5] Oswald T, Wende W, Pingoud A, et al. Comparison of N-terminal affinity fusion domains: effect on expression level and product heterogeneity of recombinant restriction endonuclease EcoRV. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42**: 73 ~ 77.
- [6] Yasukawa T, Kanei-Lshii C, Maekawa T, et al. Increase of solubility in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 25328 ~ 25331.
- [7] Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler H H, et al. Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic.

competition between folding and aggregation. *Biotechnology* , 1991 , **9** 825 ~ 829 .

[ 8 ] Schein C H , Noteborn M H M . Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Biotechnology* , 1988 **6** 291 ~ 294 .

Study on High-expression of Soluble hbFGF in *Escherichia coli*

Sun Jinhua   Hong An\*   Zhang Ling   Sun Fenyong   Song Zhaolei  
( Bioengineering Institute of Jinan University , Guangzhou 510632 , China )

**Abstract** : The formation of inclusion body is correlated with the overexpression of foreign proteins in *Escherichia coli* . Controlling of the expression level seems to be critical to increase the soluble component . With the prerequisite of no alterations in amino acid sequence , the wobble bases of the first 3 codons downstream the initiation codon ATG of a hbFGF high-expression mutation , established previously , were changed into the bases of the native hbFGF sequences . Seven primers were synthesized for retro-mutations , after PCR were undertaken , the products were cloned into pET-3c , and recombinants were transformed into BL21( DE3 )plysS for expression . One strain with high solubility and bioactivity were identified , indicating that restriction of the expression level of recombinant protein is helpful for high-solubility .

**Key words** : Soluble expression , Inclusion body , hbFGF , *Escherichia coli* , Reverse mutation

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development( Z18-03-29 )

\* Corresponding author. Tel 86-20-85220220 ; Fax 86-20-85226616 ; E-mail :gz-hongan@163.com

Received date :10-17-2002

《中华现代中西医杂志》 征稿  
《中华现代临床医学杂志》

《中华现代中西医杂志》、《中华现代临床医学杂志》是综合性、国际性医学学术期刊。具有 ISSN/CN 标准刊号 ,被收入国内多种学术期刊光盘版。面向医、药、护、卫等专业的科研、教学、临床工作者、本系列刊物发表周期短。栏目设有 :专家论坛、论著、综述、临床医学、中西医结合、中医中药、药物与临床、检验与临床、临床护理、预防医学、医院管理等。来稿免收审稿费。

地址 北京 100039-40 信箱 杂志编辑部收  
电话 010-88285910    邮编 :100039    电子信箱 :YXZZ@sohu.com