

原核表达 hbFGF 结构与功能优化的研究

孙奋勇¹ 潘秋辉² 余榕捷¹ 谢秋玲¹ 洪岸^{1*}

(¹暨南大学生物工程研究所 广州 510632)

(²中山大学附属第二医院 林百欣医学研究中心 广州 510632)

摘 要 野生型 hbFGF 蛋白可溶性与稳定性较低一直是困扰研发人员的难题。分析其氨基酸序列发现含有 4 个游离巯基,其中第 78、96、101 位半胱氨酸游离巯基可能直接影响其可溶性、稳定性及活性。对天然 hbFGF 进行定点突变,一组将 Cys78、Cys96 同时突变,另一组将 Cys78、Cys96 与 Cys101 进行联合突变,均改为丝氨酸密码子,然后克隆入原核表达载体 pET-3c,进行表达,结果发现两种突变蛋白的可溶性大幅度增加,稳定性明显上升,其中三点突变的效果更为显著,但蛋白质的活性明显下降。可以认为 78、96 与 101 位半胱氨酸的游离巯基同时参与了天然 hbFGF 多聚体的形成,是导致野生型 hbFGF 可溶性与稳定性较低的主要原因,Cys101 还与维持 hbFGF 的活性直接有关。

关键词 人碱性成纤维细胞生长因子 二硫键 定点突变 包涵体

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)04-0504-03

目前,重组人碱性成纤维细胞生长因子(Human basic fibroblast growth factor, hbFGF)的生产主要依靠大肠杆菌表达系统,但是,可溶性与稳定性较低:一是 hbFGF 在溶液中很不稳定,静置后极易形成二聚体、三聚体甚至是多聚体,严重时出现明显的絮状沉淀,极大地影响了蛋白质的活性;其二,原核表达的 hbFGF 可溶性很差,容易在胞内形成包涵体,虽然包涵体形式有利于蛋白质的纯化,同时也可以防止重组蛋白在胞内受到蛋白酶的攻击而提高产量,但对于纯化方法简单方便的 hbFGF 来说,包涵体的复性会明显增加生产成本,因此应尽量避免^[1]。

分析 hbFGF 的序列可以发现,一共有 34、78、96 与 101 位 4 个半胱氨酸残基(这里指 155 氨基酸形式的 hbFGF),一般认为 hbFGF 不形成分子内二硫键。从三维结构与功能上看,Cys78、Cys96 暴露在分子的表面且与活性无关,Cys101 部分暴露但其对活性的影响尚不明确,Cys34 完全包埋在蛋白质大分子内部并对于维持蛋白质的活性有重要作用^[2,3]。我们推测游离巯基的存在促进了多聚体与包涵体的形成。本文探讨了 Cys78、Cys96 两点联合突变以及 Cys78、Cys96、Cys101 三点联合突变两种形式对 hbFGF 可溶性、稳定性与活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 由本室保存,表达菌株 BL21(DE3)plysS 购自 Novagen,T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶购自 TaKaRa 公司,高保真 DNA 多聚酶购自 NEB,引物及全基因合成与测序由上海博亚公司完成。

1.2 hbFGF 突变子全基因合成

两种联合突变基因全序列合成后,Cys78、Cys96、Cys101 的密码子 TGT 均改为编码丝氨酸的 AGC,该密码子在大肠杆菌中的偏好性较高。同时,为了进一步提高 hbFGF 的表达,根据宋照雷等^[4]的报道,我们对基因 5'端 20 个氨基酸的密码子的摇摆碱基进行了调整,在不改变其氨基酸序列的前提下可以明显提高 hbFGF 的表达量。调整的方式如下:ATG GC(C \rightarrow T)GC(C \rightarrow T)GC(G \rightarrow T)AC(C \rightarrow T)AT(C \rightarrow T)AC(C \rightarrow T)AC(G \rightarrow T)CTG CC(A \rightarrow G)GC(C \rightarrow T)CTG CCG GA(G \rightarrow A)GA(C \rightarrow T)GC(C \rightarrow T)GG(C \rightarrow T)AC(C \rightarrow T)GC(C \rightarrow T)GC(C \rightarrow T)。

1.3 重组子的构建

PCR 引物序列如下:正向引物 5'-CTGATCATATGGCTGCTGCTAGTACTACT-3',划线部分为 *Nde* I 酶切位点,斜体部分为保护碱基;反向引物 5'-

基金项目 国家 863 计划(Z18-03-29)

* 通讯作者。Tel 86-20-85221983 Fax 86-20-85226616 E-mail:gz_hongan@163.com

作者简介 孙奋勇(1970-)男,南京人,助理研究员,博士,主要从事基因工程制药研究。E-mail:sunfenyong@263.net

收稿日期 2003-11-28,修回日期 2004-03-29

ACTGAGATCTTCATTAGCTCTTAGCAGACATTGGAAG-3' 划线部分为 *Bgl* II 酶切位点。以合成的突变基因为模板进行 PCR 反应,产物用 *Nde* I 与 *Bgl* II 双酶切,同时用 *Nde* I 与 *Bam*H I 双酶切表达载体 pET-3c 二者进行连接反应(因为 hbFGF 内部有一个 *Bam*H I 酶切位点,因此我们用其同裂酶 *Bgl* II 酶切 PCR 产物)。转化 DH5 α 后,抽提质粒酶切鉴定。

1.4 hbFGF 诱导表达

重组质粒转导表达菌 BL21(DE3)pLysS,于对数早期用 1mmol/L IPTG 诱导 4~5h 后收获菌液,离心后,分别收集菌体与上清,SDS-PAGE 分析,密度扫描仪定量。

1.5 纯化与稳定性检测

诱导表达的菌液,离心后取上清,经离子柱、肝素亲和柱纯化后得到纯品。室温放置一天和一周后,电泳检测多聚体的量。

1.6 活性检测

MTT 法检测 hbFGF 促进 3T3 细胞的增殖状况。

2 结果

2.1 突变子的构建

两种突变子构建的结果经酶切鉴定正确。因为 hbFGF 内部 400bp 左右有一个 *Bam*H I 酶切位点,因此重组质粒用 *Nde* I 与 *Bam*H I 双酶切后得到一个约 400bp 的片段。

2.2 突变对 hbFGF 表达产物可溶性的影响

对比野生型 hbFGF(本所构建,前 20 个氨基酸的编码序列作了同样的调整)与 Cys78、Cys96 两点突变子的表达发现,前者外源蛋白的表达量占菌体总蛋白的 25%,后者为 16%,可溶性表达明显增加,而前者主要以包涵体形式存在(图 1)。Cys78、Cys

96、Cys 101 三点突变子的情况类似(结果未给出)。

2.3 突变对表达产物稳定性的影响

野生型 hbFGF 蛋白室温放置 1d 后,非还原性 SDS-PAGE 检测,发现有大量二聚体、三聚体甚至是多聚体的形成。Cys78、Cys 96 两点突变蛋白在室温放置一周后,只有少量二聚体形成,未见多聚体(图 2)。Cys78、Cys 96、Cys 101 三点突变蛋白室温放置一周后,二聚体较前者又有明显下降。肉眼观察野生型 hbFGF 一周后有明显絮状沉淀,突变子均未见。

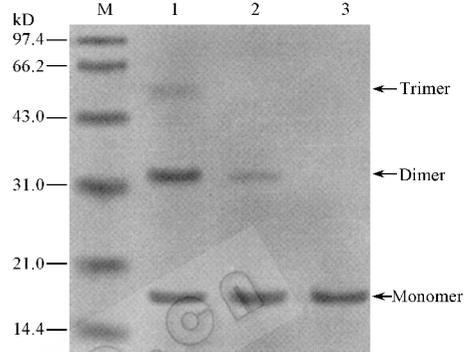


图 2 SDS-PAGE 检测 hbFGF 稳定性

Fig.2 SDS-PAGE analysis of hbFGF stability

1. Natural sequence hbFGF protein stored at room temperature for 1 day ;
2. 2-points mutant hbFGF protein stored at room temperature for 1 week ;
3. 3-points mutant hbFGF protein stored at room temperature for 1 week ;
- M. Protein marker.

2.4 突变对 hbFGF 活性的影响

用 MTT 法检测 hbFGF 突变蛋白促有丝分裂活性,Cys78、Cys 96 两点突变蛋白的活性要高于野生型 hbFGF,而三点突变的活性明显下降(表 1)。因此我们认为 Cys 101 具有维持 hbFGF 活性的作用。

表 1 hbEGF 突变蛋白的活性检测

Table 1 Bioactivity assay of the mutant hbFGF

	ED_{50} (ng/mL)	Specific activity(IU /mg)
Mutant hbFGF	1.07	2×10^6
2-points mutant	0.56	1×10^6
3-points mutant	8.10	3×10^5

ED_{50} (Effect Dosage) referring to the quantity of the sample which can produce 50% of the maximal effects. Specific activity referring to the international units of the sample compared with the standard with the same quantity.

3 讨论

本研究所采用的两种突变方式明显增加了 hbFGF 的稳定性和可溶性,具体表现为(1)室温静置突变蛋白一周后只有少量二聚体生成(2)突变子在大肠杆菌中的可溶性表达明显增加,包涵体减少。我们认为这主要与游离巯基的作用有关。在野生型

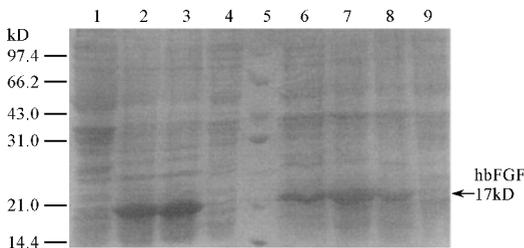


图 1 SDS-PAGE 分析 hbFGF 的可溶性表达

Fig.1 SDS-PAGE analysis of soluble expression of hbFGF

1. The uninduced natural hbFGF recombinant as a negative control
2. The total natural hbFGF protein
3. Insoluble fraction of natural hbFGF
4. Soluble fraction of natural hbFGF
5. Protein marker
6. Soluble fraction of 2-points mutant hbFGF
7. Insoluble fraction of 2-points mutant hbFGF
8. Total protein of 2-points mutant hbFGF
9. Uninduced 2-points mutant hbFGF recombinant.

的蛋白质中,暴露于分子表面的 78 与 96 两个半胱氨酸残基上的游离巯基在不同的蛋白质分子之间可能形成稳固的二硫键,并至少通过两种途径影响蛋白质的结构(1)在宿主菌胞内,核糖体上新生 hbFGF 肽链分子内部过早地形成二硫键,使得多肽结构不能在整体水平上进行有效的折叠,并以此为基础导致包涵体的大量形成(2)纯化后 hbFGF 蛋白在室温、暴露在稀酸或某些组织液等氧化环境中时,蛋白分子的游离巯基之间会形成一定数量的二硫键,导致二聚体、三聚体甚至是多聚体的形成,最终使蛋白的活性丧失。我们采用联合突变的方式,可以最大限度地减少游离巯基的不利影响。

Cys78、Cys96 两点突变蛋白的活性较野生型蛋白增加了一倍,推测是由于这两个氨基酸的游离巯基暴露在蛋白质分子的表面并形成多聚体,干扰了 hbFGF 与其受体的相互作用,阻碍了其生物活性的有效发挥。

Cys101 是一个特殊的半胱氨酸,它部分暴露在蛋白分子的表面,同时在空间上与 Cys96 的位置很近,可以形成分子内和分子间的二硫键,Caccia 等^[5]报道,后者的趋势明显大于前者。本研究发现,Cys78、Cys96 两点突变蛋白仍能够形成少量二聚

体,当引入 Cys101 Ser 的三点突变子却几乎没有二聚体的产生,充分说明不同蛋白分子的 Cys101 的游离巯基之间确实有少量二硫键的形成。此外,据报道,Cys101 与 Cys34 相似对维持蛋白质的活性十分重要,可能参与了其活性中心的组成,我们的结果也证实了这点,Cys78、Cys96、Cys101 三点联合突变的活性下降。

参 考 文 献

- [1] 孙晋华,洪岸,张玲,等. 大肠杆菌可溶性表达人碱性成纤维细胞生长因子的研究. 微生物学报, 2003, 43(4): 448 - 451.
- [2] Eriksson A E, Cousens L S, Weaver L H, et al. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3441 - 3450.
- [3] Zhang J, Cousens L S, Barr P J, et al. Refinement of the structure of human basic fibroblast growth factor at 1.6 Å resolution and analysis of presumed heparin binding sites by selenate substitution. *Protein Sci*, 1993, 2: 1274 - 1284.
- [4] 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: 84 - 89.
- [5] Caccia P, Nitti G, Cletini O, et al. Stability and folding of fibroblast growth factor-2. *Eur J Biochem*, 1983, 204: 649 - 655.

Study on Optimizing The Structure and Function of hbFGF Expressed in *Escherichia coli*

SUN Fen-Yong¹ PAN Qiu-Hui² YU Rong-Jie¹ XIE Qiu-Ling¹ HONG An^{1*}

(¹ Bioengineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(² Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The poor stability and solubility of human basic Fibroblast Growth Factor expressed in *Escherichia coli* is the major problem which prevent the protein to be widely used. The free thiol groups of cysteine residues in the amino acid sequence of hbFGF may play an important role. Two kinds of mutations had been used to investigate the possible reasons: 2-points mutation (in which both Cys78 and Cys96 were replaced by serines) and 3-points mutation (Cys78, Cys96, Cys101 were all changed into serines). Both the mutants were cloned into pET-3c, and transduced into *E. coli* strain BL21(DE3) plysS, induced for expression with IPTG. Solubility and stability were assayed by SDS-PAGE, bioactivity was observed with MTT. The solubility and stability of the two mutants increased significantly, but the mutation of Cys101 destroyed the bioactivity of the mutated protein. It may be concluded that Cys78, Cys96 and Cys101 all contribute to the formation of disulphide bonds among the protein molecules, and as a result, it influences the structure and function of hbFGF directly.

Key words: hbFGF, Site-directed mutation, Disulphide bond

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

* Corresponding author. Tel: 86-20-85221983; Fax: 86-20-85226616; E-mail: zgz_hongan@163.com

Received date: 11-28-2003