

# 人神经营养索-3 成熟区基因在大肠杆菌内的表达

董志宏<sup>1</sup>, 任惠民<sup>2</sup>, 姚志彬<sup>1</sup>, 胡海涛<sup>2</sup>, 刘 勇<sup>2</sup>

(1. 中山医科大学人体解剖学教研室, 广东 广州 510089; 2. 西安医科大学神经生物研究中心, 陕西 西安 710061)

**摘要:**【目的】应用基因工程方法制备人神经营养索-3(hNT-3)蛋白, 为探讨其对阿尔茨海默病等中枢神经退行性疾病的治疗作用提供材料。【方法】将通过序列分析确定的 hNT-3 成熟区基因重组至原核表达质粒 pBV220 中, 构建了重组表达载体 pBV/mhNT-3, 在大肠杆菌中表达后, SDS-PAGE 法测定表达蛋白的相对分子质量, 鸡胚背根节培养法检测其生物学活性。【结果】pBV/mhNT-3 可在大肠杆菌中表达出一相对分子质量为  $15 \times 10^3$  的新蛋白, 与 hNT-3 蛋白相对分子量相符。表达蛋白主要以包涵体形式存在, 经纯化复性后, 可明显促进鸡胚背根节的生长。【结论】人神经营养索-3 成熟区基因可在大肠杆菌内高效表达 hNT-3。

关键词: 神经营养索-3; 基因表达; 大肠杆菌

中图分类号: R322.18; Q189

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0092-03

## Expression of the Mature Human Neurotrophin-3 Gene in *E. Coli*

DONG Zhi-hong<sup>1</sup>, REN Hui-min<sup>2</sup>, YAO Zhi-bin<sup>1</sup>, HU Hai-tao<sup>2</sup>, LIU Yong<sup>2</sup>

(1. Department of Anatomy, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China;

2. Research Center of Neurobiology, Xi'an Medical University, Xi'an 710061, China)

**Abstract:** 【Objective】To prepare the human neurotrophin-3(hNT-3) by genetic engineering method, and provide materials for estimating its therapeutical effects on neurodegenerative disorders of central nervous system, including Alzheimer's disease. 【Methods】Identified by sequence analysis, the mature hNT-3 gene was recombined into the prokaryotic expression plasmid pBV220, thus the expression vector pBV/mhNT-3 was constructed and expressed in *E. coli*. The relative molecular mass of the novel protein was estimated by SDS-PAGE, and its bioactivity was measured by chicken embryo dorsal root ganglion (DRG) culture. 【Results】The recombinant pBV/mhNT-3 produced a novel protein of  $15 \times 10^3$  in *E. coli*, which matches the relative molecular mass of hNT-3. The expressed protein mainly recovered as inclusion body. After purification and renaturation, it could promote survival and neurite outgrowth of DRG neurons. 【Conclusion】The gene encoding mature hNT-3 could highly express hNT-3 in *E. coli*.

**Key words:** neurotrophin-3; gene expression; *Escherichia coli*

神经营养索-3 (neurotrophin-3, NT-3) 是一种由 119 个氨基酸组成的碱性蛋白质。研究表明, NT-3 对神经元和神经胶质细胞有促进分化、发育, 促进存活和再生, 阻止其萎缩和死亡等作用<sup>[1~3]</sup>。研究提示 NT-3 对阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 等中枢神经退行性疾病有潜在的治疗作用<sup>[1]</sup>。但因 NT-3 在组织内的含量很少, 用传统方

法直接从组织内提取足以进行功能研究的纯化的 NT-3 蛋白, 需要消耗大量财力和物力。现代分子生物学和生物化学的飞速发展, 为我们提供了极为快速、经济的方法, 即应用基因工程方法在大肠杆菌内表达大量的目的蛋白。在完成了 hNT-3 成熟区基因克隆和序列分析<sup>[4]</sup>的基础上, 本文应用原核高表达载体 pBV220 在大肠杆菌中表达了重组人

收稿日期: 2000-03-22

基金项目: 中华医学会基金(CMB)资助项目(82413)

作者简介: 董志宏(1965-), 男, 陕西西安人, 讲师, 博士后。

© 1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

神经营养素-3(hNT-3)蛋白, 并进行了生物活性检测, 为进一步的研究工作奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒和菌种

原核高表达质粒 pBV 220, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 由西安华广生物工程公司提供。重组质粒 pUC/mhNT-3 为本室构建<sup>[4]</sup>。

### 1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶 *EcoRI*、*BamHI*、*ScaI*、T4 DNA 连接酶均购自华美公司。

### 1.3 重组原核高表达质粒构建和鉴定

联合使用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *BamHI* 消化重组质粒 pUC/mhNT-3, 琼脂糖凝胶电泳分离回收 0.38 kb 的基因片段。同样方法消化载体质粒 pBV 220 并回收其 3.656 kb 基因片段。在 T4 DNA 连接酶作用下连接两个回收片段, 建立重组原核表达质粒。用该重组质粒转染经 *CaCl<sub>2</sub>* 法制备的感受态细菌 DH5 $\alpha$ , 接种琼脂平板(Amp<sup>+</sup>)上, 37 °C 温箱孵育 12 h。挑选单菌落接种于含有氨苄青霉素的 LB 培养基中, 30 °C 振荡培养。用碱裂解法提取质粒, 限制性内切酶 *EcoRI* 和 *BamHI* 联合酶切, *ScaI* 单酶切进行筛选鉴定。

### 1.4 克隆基因的诱导表达

将筛选出的含重组表达质粒 pBV 220/mhNT-3 的大肠杆菌单菌落在 30 °C 振荡培养过夜, 次日以 1:20 接种在加有氨苄青霉素的 LB 培养基中, 继续 30 °C 振荡培养, 至培养液的 *A*<sub>600</sub> 达 0.4~0.6, 迅速升温至 42 °C 诱导表达 5 h, 离心收集细菌, 重悬于裂解缓冲液(50 mmol/L NaAc, 150 mmol/L NaCl; pH 5.0)中, 反复冻融数次后, 超声破碎细菌, 离心收集包涵体, 经洗涤纯化<sup>[5]</sup>后, 用 8 mol/L 脲素室温溶解 1 h, 氧化型和还原型谷胱甘肽法<sup>[6]</sup>复性 1 h, 再于 4 °C 透析 16 h。用 15% SDS-PAGE 分析表达蛋白的相对分子质量。

### 1.5 表达蛋白的生物活性检测

显微镜解剖镜下摘取胚龄为 10 d 的鸡胚背根神经节, 分散种植于涂布有鼠尾胶原的平皿内, 加 DMEM(含 5 $\times$ 10 g/L 新生牛血清, 100 U/mL 青霉素、氨苄青霉素, 2 $\times$ 10 g/L NaHCO<sub>3</sub>)至神经节刚好浸湿。37 °C 封闭培养 12 h, 加入复性后蛋白 0.1  $\mu$ g(终浓度为 0.02 g/L)继续培养 24 h。对照

组加入 0.1  $\mu$ g(终浓度为 0.02 g/L)牛血清白蛋白。

## 2 结 果

### 2.1 重组原核表达质粒构建

重组质粒 pUC/mhNT-3 经 *EcoRI* 与 *BamHI* 联合消化后, 将回收的 mhNT-3 基因片段(0.38 kb)插入载体 pBV 220 启动子 P<sub>R</sub>PL 下游 *EcoRI* 与 *BamHI* 间, 所得重组原核表达质粒命名为 pBV/mhNT-3。

### 2.2 阳性克隆的筛选鉴定

理论上, 重组表达质粒 pBV/mhNT-3 应为 4.03 kb; *EcoRI* 与 *BamHI* 联合酶切可得到 0.38 kb 和 3.66 kb 两个片段; *ScaI* 单酶切可得到 1.19 kb 和 2.84 kb 两个片段。实验所得重组表达质粒 pBV/mhNT-3 经如上酶切后, 1 $\times$ 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)显示, 实际值与理论值完全一致。

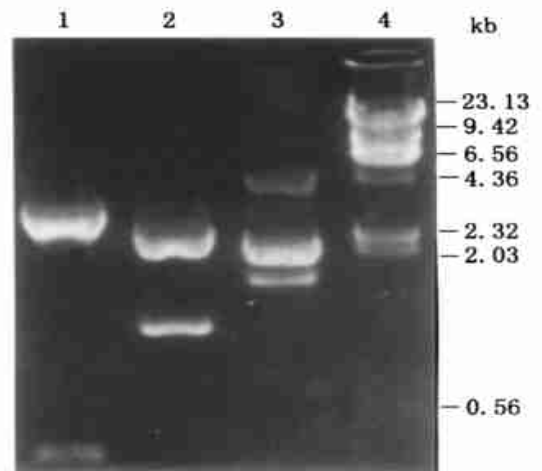


图 1 重组质粒 pBV/mhNT-3 酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant pBV/mhNT-3 by endonuclease digestion

1. pBV/mhNT-3 by *EcoRI* + *BamHI*; 2. pBV/mhNT-3 by *ScaI*; 3. pBV/mhNT-3; 4.  $\lambda$ DNA by *HindIII*

### 2.3 重组质粒在 *E. coli* 的表达

将含有 pBV/mhNT-3 的菌株在 30 °C 振荡培养, 至培养液的 *A*<sub>600</sub> 达 0.4~0.6, 迅速升温至 42 °C 诱导表达 5 h, 离心后, 分别收集培养上清、菌体裂解物进行 SDS-PAGE, 结果(图 2)显示, pBV/mhNT-3 表达产物含有一条新的蛋白条带, 其相对分子质量约为 15 $\times$ 10<sup>3</sup>, 与 hNT-3 蛋白的相对分子质量相符。表达产物以包涵体形式存在的。

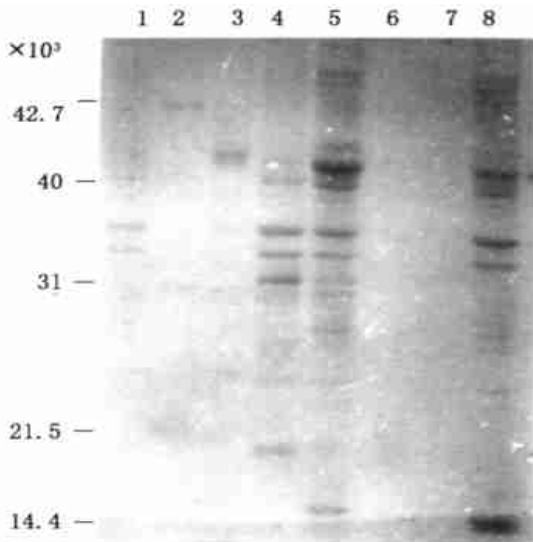


图2 含 pBV/ mhNT-3 DH5 $\alpha$  在 42  $^{\circ}$ C 热诱导表达的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE map of DH5 $\alpha$  with pBV/ mhNT-3 inducing temperature 42  $^{\circ}$ C

1: lysate of DH5 $\alpha$  with pBV220; 2: protein molecular mass marker, 3~6: map of DH5 $\alpha$  with pBV/ mhNT-3; 7: supernatant of DH5 $\alpha$  with pBV/ mhNT-3; 8: lysate of DH5 $\alpha$  with pBV/ mhNT-3

#### 2.4 重组蛋白的生物活性检测

在鸡胚背根神经节组织培养皿中加入复性后的表达蛋白继续培养,可见大量神经突起自神经节周缘向四周呈放射状长出(图3),而对对照组未见神经突起长出,表明表达蛋白具有良好的生物学活性。

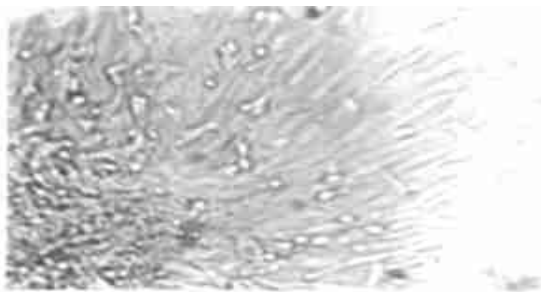


图3 鸡胚背根神经节细胞的生长

Fig. 3 The growth of chicken embryo DRG with 0.1  $\mu$ g mhNT3 cultured at 37  $^{\circ}$ C

### 3 讨论

中枢神经退行性疾病,包括AD,目前已成为主要影响老龄人口生存和生活质量的主要疾病。但迄今为止,它们的病因和发病机制依然不清,亦无

理想的治疗方法。因此,在深入开展中枢神经退行性疾病病因和发病机制研究的同时,有必要不断探索和尝试新的治疗方法。应用神经营养因子进行中枢神经退行性疾病的保护性治疗,是近年来提出的一种新的治疗策略<sup>[7]</sup>。该策略主要选择适当的神经营养因子基因,应用基因治疗的方法使其在病灶局部持续表达和释放,以达到保护正常神经元免受损害,延缓和阻止受损神经元退行性变的进程,促进神经元存活和维持其功能的作用。在神经营养素家族的诸多成员中,NT-3是近年来颇受关注的一个认为对中枢神经具有保护作用的较为理想的生物蛋白,对AD等中枢神经退行性疾病有潜在的治疗作用。为开展这方面的研究工作,我们对hNT-3成熟区基因进行了克隆和序列分析<sup>[4]</sup>,证实所克隆基因与GenBank提供序列(M61180)完全一致。本文选择原核高表达质粒pBV220为载体,在大肠杆菌中对hNT-3成熟区基因进行表达研究。结果显示hNT-3成熟区基因可在大肠杆菌内大量表达,其表达产物相对分子质量与hNT-3相符。表达产物以不溶性包涵体的形式存在于细胞浆内,这虽有利于防止蛋白酶的降解作用,但却为分离和纯化带来困难。且一旦形成包涵体,表达产物就失去天然活性,要得到有活性的表达蛋白,就必须溶解包涵体,并在体外对表达产物进行复性。资料显示,神经营养素家族均有一个保守的结构,即由6个半胱氨酸所形成的半胱氨酸结(cysteine knot)和连接6个半胱氨酸的4个 $\beta$ 片层<sup>[8]</sup>。因此,在体外复性过程中必须形成3对分子内二硫键,方可保证其正确的二级结构和理想的生物学活性。实验中,我们应用强变性剂(8 mol/L尿素)溶解包涵体,用氧化型和还原型谷胱甘肽法进行复性,再于4  $^{\circ}$ C透析16 h,活性测试结果表明,该法具有较好效果,表达产物有较好的生物学活性。

#### 参考文献:

- [1] Arenas E, Persson H. Neurotrophin-3 prevents the death of adult central nor-adrenergic neurons *in vivo* [J]. Nature, 1994, 367(6461): 368.
- [2] Bertolini L, Ciotti M T, Chenubini E, *et al*. Neurotrophin-3 promotes the survival of oligodendrocyte precursors in embryonic hippocampal cultures under chemically defined conditions [J]. Brain Res, 1997, 746(1-2): 19.

(下转第97页)

端调控区 CpG 岛发生异常甲基化而导致该基因的失活<sup>[3, 4]</sup>。

### 3.2 CDKN2 基因在人 BPH 中的主要失活机制

CDKN2 基因是参与调节细胞周期 G1/S 检查点的肿瘤抑制基因, 其蛋白产物 p16 与 CDK4/6 结合抑制抑癌蛋白 RB 的磷酸化, 使细胞停滞在 G1 期, 阻止 DNA 的合成。p16 蛋白的失活则导致细胞无限制的生长引起肿瘤的发生。

本研究已检测了 CDKN2 基因在人 BPH 中的变异情况, 结果发现 CDKN2 基因纯合性缺失是其在 BPH 中的主要失活机制之一。本研究进一步检测了 CDKN2 基因 5' 端 CpG 岛异常甲基化的情况, 发现有 42.1% 的 BPH 存在 CDKN2 基因 CpG 岛异常甲基化, 说明 CDKN2 基因的甲基化亦是其在 BPH 中的主要失活机制之一, 可能导致 BPH 中 p16 蛋白表达的缺如而丧失正常的细胞增殖抑制功能, 参与 BPH 的形成。BPH 中异常甲基化的位点主要在 5' 端 CG 丰富区<sup>[5]</sup>, *Hpa* II 切割的位点为 CCGG, *Sma* I 切割的位点为 CCCGGG, *Msp* I 切割的位点为 CCGG 和 CmCGG, 实验结果表明 BPH 中 CDKN2 基因甲基化的序列主要为 CmCGG 和 CCmCGGG。

PCR-甲基化检测法<sup>[6]</sup>的灵敏度高, 但可能由于酶切不完全而引起假阳性, 我们则用过量的酶量(每 1 μg DNA 用 40 U 酶)完全消化组织 DNA 来防止假阳性。

简言之, 本研究包括: ①首次检测了人 BPH 中 CDKN2 基因 5' 端 CpG 岛异常甲基化的情况; ②发现 42.1% (16/38) 的 BPH 中存在 CDKN2 基因异常甲基化, 认为 CpG 岛异常甲基化是 CDKN2 基因

在 BPH 中的主要失活机制; ③BPH 中 CDKN2 基因异常甲基化的序列主要为 CmCGG 和 CCmCGGG。

### 参考文献:

- [ 1 ] Kamb A, Gruis N A, Weaver-Feldhaus J, *et al* . A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [ J ] . *Science*, 1994, 264(15): 436.
- [ 2 ] Gonzalez-Zulueta M, Bender C M, Yang A S, *et al* . Methylation of 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing [ J ] . *Cancer Res* 1995, 55: 4531.
- [ 3 ] Herman JG, Merlo A, Mao L, *et al* . Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers [ J ] . *Cancer Res*, 1995, 55: 4525.
- [ 4 ] Costello JF, Berger M S, Huang H S, *et al* . Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation [ J ] . *Cancer Res* 1996, 56: 2405.
- [ 5 ] Reed A L, Califano J, Cairns P, *et al* . High frequency of p16(CDKN2/MTS1/LNK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma [ J ] . *Cancer Res* 1996, 56: 3630.
- [ 6 ] Maesawa C, Tamura G, Nishizuka S, *et al* . Inactivation of the CDKN2 gene by homozygous deletion and *de novo* methylation is associated with advanced stage esophageal squamous cell carcinoma [ J ] . *Cancer Res*, 1996, 56: 3875.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 94 页)

- [ 3 ] Zhou X F, Cameron D, Rush R A. Endogenous neurotrophin-3 supports the survival of a subpopulation of sensory neurons in neonatal rat [ J ] . *Neuroscience*, 1998, 86(4): 1155.
- [ 4 ] 董志宏, 任惠民, 胡海涛, 等. 人神经营养索-3 成熟蛋白基因克隆及序列分析 [ J ] . *西安医科大学学报*, 1999, 20(4): 433.
- [ 5 ] 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南 [ M ] . 北京: 科学出版社, 1996. 845—849.
- [ 6 ] 姜泊, 张亚历, 周殿元, 主编. 分子生物学常用实验方法 [ M ] . 北京: 人民军医出版社, 1996. 88~89.
- [ 7 ] Martinez-Serrano A, Bjorklund A. *Ex vivo* nerve growth factor gene transfer to the basal forebrain in presymptomatic middle-aged rats prevents the development of cholinergic neuron atrophy and cognitive impairment during aging [ J ] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(4): 1858.
- [ 8 ] McDonald N Q, Hendrickson W A. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif [ J ] . *Cell*, 1993, 73(3): 421.

(编辑 刘清海)