

人脑源性神经营养因子基因表达*

陈 燕 张 瑛 李金照 邓 巍 夏另朝 邱 蓉

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用聚合酶链式反应 (PCR) 从人基因组 DNA 中扩增了人脑源性神经营养因子 (hBDNF) cDNA 和 hBDNF 成熟蛋白编码片段, 分别克隆到 pUC18 中. 经测序确认两个插入片段序列正确. hBDNF cDNA 在 CMV 启动子控制下在 NIH/3T3 细胞中表达, 用 RT-PCR 检测转染细胞确有 BDNF mRNA 存在. BDNF 成熟蛋白编码序列在 T7 启动子控制下在 *E. coli* 中表达, SDS-PAGE 表明, BDNF 得到表达, 以包涵体形式存在.

关键词 脑源性神经营养因子, 聚合酶链反应, 基因表达

学科分类号 Q78

脑源性神经营养因子 (BDNF) 是低分子质量的碱性蛋白, 属神经生长因子 (NGF) 家族^[1]. 它对多种神经元有促进存活、增进代谢、有助分化与再生的功能^[2]. 近期研究表明, 在体内 BDNF 能防止受 6-羟基多巴胺损伤的多巴胺能神经元的死亡^[3]且能阻止切断轴突的胆碱能神经元^[4]、切断视神经的视网膜节细胞^[5]以及切断坐骨神经的脊髓运动神经元的死亡^[6]. 显示出它在治疗神经系统疾病中的应用潜力.

为了开展 BDNF 对中枢神经系统损伤修复的研究, 我们采用 PCR 技术从人基因组 DNA 中分别扩增并克隆了 BDNF 的成熟蛋白编码序列和它的 cDNA, 并分别将二者插入到含 T7 启动子的 pET-3a 原核表达载体及含 CMV 启动子的 pCB6 真核表达载体中. 在大肠杆菌中表达了人 BDNF, 同时用含 BDNF cDNA 的重组质粒转染 NIH/3T3 细胞, 检测到 BDNF mRNA 的表达.

1 材料与方法

1.1 引物

扩增 BDNF 成熟蛋白编码序列及其 cDNA 的引物根据人 BDNF 基因序列设计, 三引物分别为:

引物 I: 5' GCGCATATGCACTCTGACC-CTGCCCCGC3'; 引物 II: 5' GGGAAGCTTATGACCATCCTTTTCCTT3'; 引物 III: 5' GCGGGATCCTATCTTCCCCTTTTAAT3', 引物 5' 端分别带有 *Nde* I, *Hind* III 及 *Bam* H I 位点.

1.2 PCR 扩增

提取人基因组 DNA 作扩增模板, 在 50 μ l 反应总体积中, 模板 DNA 200 ng, 四种 dNTP 各 200 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 引物分别为 25 pmol, 反应参数为 94℃变性 45 s, 58℃退火 45 s, 72℃延伸 90 s, 30 个循环.

1.3 人 BDNF 基因克隆及测序

PCR 产物克隆到 pUC18 载体中, 用 Pharmacia T7 测序盒进行 DNA 测序.

1.4 表达质粒构建

用 *Nde* I - *Bam* H I 切下 BDNF 成熟蛋白编码片段插入 *Nde* I - *Bam* H I 酶切的 pET3a 载体中, 构成原核表达质粒 (pET-BDNF). *Hind* III - *Bam* H I 切下的 BDNF cDNA 与 *Hind* III - *Bam* H I 酶切的 pCB6 载体相连, 组建真核表达质粒 (pCB6-BDNF).

* 中国科学院视觉信息加工开放实验室资助.

收稿日期: 1997-07-25, 修回日期: 1997-11-28

1.5 人 BDNF 成熟蛋白在大肠杆菌中的表达

含重组质粒 pET-BDNF 的 BL21 (DE3) 单菌落接种在加氨苄青霉素 (200 mg/L) 的 LB 培养液中, 37℃ 振荡培养 3 h. 培养液 A₆₀₀ 达到 0.8~0.9 时, 加入诱导剂 IPTG 至 1.0 mmol/L 诱导表达, 诱导 3 h 后收集菌液, 进行 16% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析.

1.6 细胞培养及 DNA 转染

NIH/3T3 细胞培养使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基. 转染时, 在六孔培养板每孔中接种 1 × 10⁵ 细胞, 次日按 GIBCO BRL 说明用 1 μg pCB6-BDNF DNA 和 10 μl Lipofectin Reagent (1 g/L) 进行转染.

1.7 RT-PCR 检测 BDNF 表达

从转染重组质粒的细胞中提取总 RNA, 并用不含 RNA 酶的 DNA 酶处理. 按标准方法进行 RT-PCR^[7], 在 RT-PCR 中使用了扩增成熟 BDNF 编码区域的引物 I 和引物 III, 扩增过程同 1.2.

2 结果与讨论

2.1 人 BDNF 基因的扩增、克隆和测序

为 PCR 扩增设计了三个引物, 各引物中分别带有酶切位点, 以便克隆并构建表达质粒. 用引物 I 和引物 III 的扩增产物为 360 bp 的电泳带, 是人 BDNF 成熟蛋白编码片段. 引物 II、III 的扩增片段为 750 bp, 大小符合预期的人 BDNF cDNA.

回收引物 I、III 的扩增产物, 经 *Bam*H I 酶切, 连入 *Sma*/*Bam*H I 双酶切的 pUC18 载体; 引物 II、III 的 PCR 产物, 经 *Hind* III *Bam*H I 双酶切, 与相应双酶切的 pUC18 载体连接. 两种连接产物转化 DH1 受体菌, 挑取白色菌落, 抽提质粒, 并用 *Pst* I、*Nde* I、*Bam*H I 单酶或双酶切鉴定, 初步证明, 克隆的 DNA 片段与预期的一致. 测序表明, 克隆的人 BDNF 成熟蛋白编码序列、BDNF cDNA 序列与基因库中的相应序列完全一致. 图 1 示出 BDNF cDNA 的序列.

```
1   ATG ACC ATC CTT TTC CTT ACT ATG GTT ATT TCA TAC TTT
40  CCC ATG AAA GAA GCA AAC ATC GGT TGC ATG AAG GCT GCC
79  CGA GGA CAA GGT GGC TTG GCC TAC CCA GGT GTG CGG ACC
118 CAT GGG ACT CTG GAG AGCGTG AAT GGG CCC AAG GCA GGT
157 TCA AGA GGC TTG ACA TCA TTG GCT GAC ACT TTC GAA CAC
196 GTG ATA GAA GAGCTG TTG GAT GAG GAC CAG AAA GTT CGG
235 CCC AAT GAA GAA AAC AAT AAG GAC GCA GAC TTG TAC ACG
274 TCC AGG GTG ATGCTC AGT AGT CAA GTG CCT TTG GAG CCT
313 CCT CTT CTC TTT CTG CTG GAG GAA TAC AAA AAT TAC CTA
352 GAT GCT GCA AAC ATG TCC ATG AGG GTC CGG CGC CAC TCT
391 GAC CCT GCC CGC CGA GGGGAG CTG AGC GTG TGT GAC AGT
430 ATT AGT GAG TGGGTA ACG GCG GCA GAC AAA AAG ACT GCA
469 GTG GAC ATG TCG GGC GGGACG GTC ACA GTC CTT GAA AAG
508 GTC CCT GTA TCA AAA GGC CAA CTG AAG CAA TAC TTC TAC
547 GAG ACC AAG TGC AAT CCC ATG GGT TAC ACA AAA GAA GGC
586 TGC AGG GGC ATA GAC AAA AGG CAT TGG AAC TCC CAG TGC
625 CGA ACT ACC CAG TCG TAC GTG CGG GCC CTT ACC ATG GAT
664 AGC AAA AAG AGA ATT GGCTGG CGA TTC ATA AGG ATA GAC
703 ACT TCT TGT GTATGT ACA TTG ACC ATT AAA AGG GGAAGA
742 TAG
```

图 1 BDNF cDNA 序列

2.2 BDNF 在大肠杆菌中表达的分析

BDNF 编码序列插入 pET3a 载体, 转化大肠杆菌菌株 BL21 (DE3). SDS 聚丙烯酰胺

凝胶电泳图中可见到分子质量为 14 ku 的明显条带, 大小与人 BDNF 成熟蛋白一致 (图 2). 产物以包涵体形式存在. 用 Bio-Rad 光密度仪

对凝胶染色带进行扫描测定表明, 表达的人 BDNF 成熟蛋白占整个细菌细胞质蛋白的 5% ~ 10% .

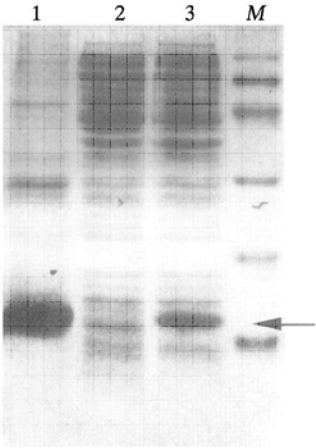


图 2 大肠杆菌中表达产物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
1: 包涵体样品; 2: 含对照质粒 pET3a 的 BL21 (DE3) 菌液样品; 3: 诱导后含表达质粒 pET-BDNF 的 BL21 (DE3) 菌液样品; M: 蛋白质分子质量标准.

2.3 BDNF 在真核细胞中表达的分析

BDNF cDNA 片段, 连入 pCB6 载体, 构成表达质粒 pCB6-BDNF. 将此重组质粒在 Lipofectin 介导下转染 NIH/3T3 细胞, 转染 72 h 后收集细胞, 提取总 RNA. 用引物 III 和 AMV 酶将总 RNA 逆转录成 cDNA 的第一条链, 再经 Taq 聚合酶扩增反应, 在琼脂糖电泳上可以看到 360 bp 大小的扩增产物, 表明 pCB6-BDNF 在细胞转录水平上得到表达. 而未经 pCB6-BDNF 质粒转染的 NIH/3T3 细胞总 RNA 中则没有 RT-PCR 扩增产物出现 (图 3).

我们另外的实验^[8]表明, BDNF cDNA 在雏鸡的肌肉里也得到了表达, pCB6-BDNF 质粒在 Lipofectin 介导下注射到雏鸡切断的坐骨神经附近的肌肉里, 在转染 10 d 后, 可以阻止 30% 受损的脊髓运动神经元死亡, 并促进切断的坐骨神经的近体端向另一端生长. 与未注射 BDNF cDNA 的对照相比较, BDNF 在肌肉组织中的表达促进了损伤运动神经元的存活和再生.

在本工作中, 成熟人 BDNF 在大肠杆菌和培养的 NIH-3T3 细胞中均得到了表达, 为进一步应用重组 BDNF 和 BDNF cDNA 进行神经系统损伤的修复研究提供了便利条件.

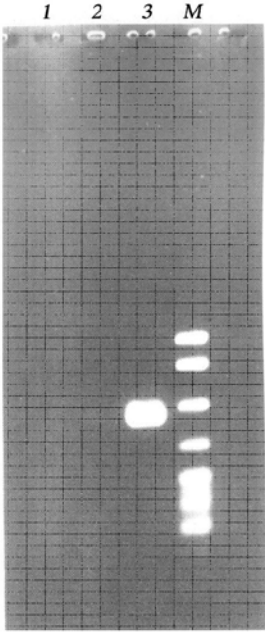


图 3 转染 pCB6-BDNF 质粒的细胞总 RNA 的 RT-PCR 分析
1: 转染 pCB6-BDNF 质粒的细胞总 RNA 的 PCR; 2: 不加 pCB6-BDNF 质粒的对照细胞总 RNA 的 RT-PCR; 3: pCB6-BDNF 表达质粒经 Lipofectin 介导转染的细胞总 RNA 的 RT-PCR; M: pBR322/ Msp I .

参 考 文 献

- 1 Hohn A, Leibrock J, Bailey K, *et al.* Identification and characterization of a member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*, 1990, **344** (6264): 339~ 341
- 2 Maness L M, Kastin A J. The neurotrophins and their receptor: structure function and neuropathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1994, **18** (1): 143~ 159
- 3 Shults C W, Kimber T, Altar C A. BDNF attenuates the effects of intrastraital injection of 6-hydroxy dopamine. *Neuroreport*, 1995, **6** (8): 1109~ 1111
- 4 Widmer H R, Knusel B, Hefti F. BDNF protection of basal forebrain cholinergic neurons after axotomy-complete protection of p75 NGFR-positive cells. *Neuroreport*, 1993, **4** (4): 363~ 366
- 5 Weibel D, Kreutzberg G W, Schwab M E. Brain-derived

- neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in yong rat optic nerve. *Brain Res*, 1995, **679** (2): 249~ 254
- 6 Yan Q, Elliott J, Sinder W D. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature*, 1992, **360** (6406): 753~ 755
- 7 Kawasaki E S. Amplication of RNA. In: Innis M A Eds., PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. 21~ 27
- 8 李金照, 陈 燕, 夏另朝, 等 (Li J Z, Chen Y, Xia L C, *et al.*). 脑源神经营养因子基因转染神经断端促进切断坐骨神经再生. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1997, **13** (3): 448~ 452

Expression of Human Brain-derived Neurotrophic Factor Gene. CHEN Yan, ZHANG Ying, LI Jir-Zhao, DENG Wei, XIA Ling-Chao, QIU Rong (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract The cDNA of human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) and the fragment encoding mature hBDNF were amplified from human genomic DNA by PCR, and separately ligated into pUC18. Two inserted fragments were analysed by sequencing, which are correct. The expression of the hBDNF was controlled by CMV promotor in NIH/3T3 cells transfected with recombinant plasmid, and analysed by RT-PCR, showing existance of BDNF mRNA in cells. The expression product of the mature hBDNF under the control of T7 promotor was in the inclusion body of *E. coli*, and visualized by SDS-PAGE analysis.

Key words brain-derived neurotrophic factor, PCR, gene expression

有机相酶促酯化反应中水分调控技术的研究*

崔玉敏 魏东芝 俞俊棠

(华东理工大学生物化学研究所, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要 在有机相酶促反应中, 水含量是影响酶活力的关键因素. 对异辛烷/正辛醇体系中柱状假丝酵母脂肪酶催化萘普森酯化反应中的水分调控技术进行了研究. 结果表明: 水合盐对—— $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{SO}_4$ 对系统水分的变化具有有效的缓冲作用; 非极性硅藻土吸附固定酶, 使之对水分的敏感性得到缓解; 另外, 加入分子筛去除副产物——“水”可促进酯化过程的进行.

关键词 有机相酶催化, 酯化反应, 萘普森, 水分调控

学科分类号 Q55

酶在含微量水的有机溶剂中不仅可以保存其活力, 而且可以获得在水溶液中所不具备的新特性^[1]. 常规条件下催化水解反应的酶, 如脂肪酶, 在有机溶剂中催化反应的平衡点发生转移, 可催化酯的合成反应. 其催化酯化反应活力的高低与体系中的水含量 (或水活度) 密切相关. 无水或过少的水不足以使酶分子形成其活性构象, 而过量的水又会使酶发生粘结, 催化效率大大降低, 而且酶长时间暴露于含过量水的有机溶剂中时, 热稳定性下降, 易于失

活^[2]. 所以, 控制适宜的水含量是酶在有机溶剂中有效催化的关键. 特别在有水生成的酯化反应中, 水的调节与控制更加重要. 本文对有机溶剂体系中脂肪酶催化萘普森酯化反应中游离酶发挥活力的最适水含量、水合盐对体系中水的缓冲作用及硅藻土作为固定化载体对水分的调控能力进行了探讨.

* 国家自然科学基金资助项目 (29706003).

收稿日期: 1997-07-28, 修回日期: 1998-01-07