

重组 ACTH (4-10) 与 GDNF 融合蛋白 及其生物活性研究*

陈哲宇^{1,2)**} 张勇¹⁾ 何成¹⁾ 路长林¹⁾ 吴祥甫²⁾

(¹⁾第二军医大学神经生物学教研室, 上海 200433; (²⁾中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 通过 PCR 方法构建了促肾上腺皮质激素 4-10 (ACTH (4-10)) 与胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 的融合基因, 并将它重组克隆到表达载体 pET-28a (+) 中, 构建表达质粒 pET-ACTH (4-10)-GDNF, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导可高效表达 ACTH (4-10)-GDNF 融合蛋白. 用 Ni²⁺-NTA 树脂一步法纯化目的蛋白, 纯度达 85% 以上. 纯化和复性的 ACTH (4-10)-GDNF 融合蛋白能显著促进脊髓神经元存活, 作用于 ACTH (4-10) 及 GDNF 蛋白.

关键词 促肾上腺皮质激素 4-10, 胶质细胞源性神经营养因子, 融合蛋白, 基因表达

学科分类号 Q78

神经营养因子在神经元的存活、生长、分化、神经再生、突触形成与突触可塑性以及神经退行性疾病的过程中起着重要的作用, 对它的研究已成为目前神经科学领域中的研究热点之一. 神经营养因子目前分为神经营养素家族^[1], 包括神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养素-3 (neurotrophin-3, NT-3)、神经营养素-4/5 (neurotrophin-4/5, NT-4/5) 等; 睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF)^[2]; 胶质细胞源性神经营养因子家族^[3], 包括 GDNF、NTN (neurturin)、PSP (persephin) 等. 目前有许多实验证据说明神经肽不但对神经细胞发育有调节作用, 而且有神经营养作用. α -促黑素 (α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)、促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 或其片段 ACTH (4-10) 加入胎鼠的脊髓薄片培养时, 可使神经细胞的突起生长加速^[4,5]. 又如人工分散的脊髓神经细胞培养中加入河豚毒使电活动消失, 则神经细胞很快死亡, 同时加入血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 则存活^[6]. 其中, ACTH (4-10) 因具有较强的神经营养活性且又不会促进肾上腺皮质激素的分泌而有可能用于某些神经系统退行性疾病的治疗^[7]. 本研究通过基因工程方法获得以柔软肽段连接的 ACTH (4-10) 与 GDNF 融合蛋白, 并研究其对原代培养的脊髓神经元的作用.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 大肠杆菌 TG1、BL21 (DE3)、载体 pBluescriptSK (+)、表达质粒 pET-28a (+) 均由本实验室保存. pGEM-GDNF 质粒由本实验室构建并保存.

1.1.2 试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Klenow 酶、胎牛血清、马血清、B27 无血清培养基及 DMEM 培养基为 Gibco BRL 公司产品; Taq DNA 聚合酶为生工公司产品; ACTH 抗体为 Peninsula 公司产品; 碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 为华美生物工程公司产品; GDNF 抗体、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷酶 (IPTG) 为 Promega 公司产品; Ni²⁺-NTA Sepharose 6B Fast Flow 为 Sigma 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 PCR 反应: 取 10 ng pGEM-GDNF 质粒为模板, 按常规的 PCR 反应条件, 先将样品于 94 °C 变性 5 min, 加入 2 U 的 Taq DNA 聚合酶, 按下列参数循环 35 次: 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 最后一个循环 72 °C 反应 10 min.

1.2.2 DNA 重组克隆及其鉴定: 质粒构建与抽

* 国家自然科学基金资助项目 (30000048) 及军队“十五”青年基金.

** 通讯联系人.

Tel: (021) 65492132, E-mail: chengzyk@online.sh.cn

收稿日期: 1999-12-04, 修回日期: 2000-04-13

提、酶切反应、电泳分析、DNA回收、连接反应、细菌转化等都参照文献[8]略加修改进行。DNA测序采用Sanger双脱氧终止法。

1.2.3 ACTH (4-10) 与 GDNF 融合基因表达: 接种含表达质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 单菌落于 LB (含卡那霉素 50 mg/L) 培养液中, 于 37℃ 培养过夜。以 2% 的比例, 接种上述过夜菌于新鲜的 LB (含卡那霉素 50 mg/L) 培养液中, 于 37℃ 振荡 (300 r/min) 培养 2 h 至 A_{600} 为 0.6~0.8, 然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 再振荡培养 3~4 h, 最后取样测 A_{600} , 离心收集菌体。按每 0.1 A_{600} 加 10 μ l 重蒸水和等体积 2 \times SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液的比例悬浮样品, 煮沸 5 min 取 20 μ l 上样, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析以鉴定表达结果。

1.2.4 表达产物溶解性分析: 收集表达菌, 用 1 \times PBS 缓冲液 (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.15 g/L Na_2HPO_4 , 0.2 g/L KH_2PO_4) 悬浮后, 超声波破菌, 12 000 g, 4℃ 离心 20 min, 分别取上清及沉淀进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳以分析表达产物的溶解性。

1.2.5 表达产物的亲和层析纯化和复性: 收集一定量的表达菌, 用 1 \times PBS 悬浮后, 超声波破菌, 离心收集包含体溶于 20 ml 结合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.9) 中, 12 000 g, 4℃ 离心 15 min, 取上清直接上预先以 3 倍柱体积平衡的 Ni^{2+} -NTA 树脂亲和柱, 流速为 0.5 ml/min。然后先以 10 倍柱体积的结合缓冲液洗脱, 再以 6 倍柱体积的洗涤缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.9) 洗脱杂蛋白, 最后以 6 倍柱体积的洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, 300 mmol/L 咪唑, pH 7.9) 洗脱目的蛋白。在冰浴条件下, 按 1:10 的比例缓慢地用复性缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 0.25 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 1.25 mmol/L 还原型谷胱甘肽, pH 8.0) 稀释蛋白质。在 4℃ 环境静置复性约 36 h, 然后用 1 \times PBS 缓冲液透析除去复性缓冲液中的各种组分, 透析结束后, 用 30% PEG ($M_r \geq 2 \times 10^4$) 浓缩蛋白质, 测定浓度后, 冷冻干燥, -20℃ 保存。

1.2.6 脊髓神经元培养及存活率测定: 脊髓神经元培养参照文献[9]的方法进行。取昆明种胎鼠 (E12-E15), 无菌解剖, 取出脊髓, 剥掉脊髓膜,

原代分离脊髓神经元, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 接种于预先用多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, Sigma) 包被好的 96 孔培养板, 每孔的加入量为 100 μ l。培养板置 CO_2 培养箱 (含 5% CO_2), 37℃ 培养。培养至第 2 天, 更换为含 2% B27 的无血清培养基, 同时分别加入 ACTH (4-10)、GDNF、ACTH (4-10)-GDNF 融合蛋白及 BSA 至 10^{-8} mol/L, 每隔 3~4 天换液一次, 保持同样条件一直培养到第 14 天。将同一批标本参照文献[10]方法作 MTT 反应, 用 Bio-RAD 550 型 ELISA 读数仪检测 A 值, 检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm, 各组重复 10 次。

2 结 果

2.1 ACTH (4-10) 和 GDNF 融合基因的克隆

以 pGEM-GDNF 为模板, 设计两个引物: 引物 1 为 5'-GGCATATGGAACACTTCCGTTGGGGTGGTGGCGTTCTTCACCAGATAAACAAATGGC-3'; 引物 2 为 5'-GGAAGCTTTCAGATACATCCACACG-3', 扩增 GDNF 基因, 得到一大小约为 450 bp 的片段。在 GDNF 基因的 5' 端引入编码 ACTH (4-10) (Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly) 及柔软肽段 (Gly-Gly-Gly-Ser) 的核苷酸序列及 *Nde*I 酶切位点, 在 GDNF 基因的 3' 端引入 *Hind*III 酶切位点。将 PCR 产物经 Klenow 酶补平, 与经 *Eco*RV 酶切的 pBSK (+) 质粒相连接, 转化大肠杆菌 TG1, 通过 *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切鉴定含有插入片段的重组质粒。挑取阳性克隆进行测序, 所得序列与我们设计的完全一致, 编码 ACTH (4-10) 的核苷酸序列已融入 GDNF 基因的 5' 端, 它们之间以编码柔软肽段的核苷酸序列相连。

2.2 ACTH (4-10) 与 GDNF 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将克隆在 pBSK (+) 质粒中的融合基因片段以 *Nde*I、*Hind*III 双酶切, 低熔点胶分离后与先经 *Nde*I、*Hind*III 双酶切的质粒 pET-28a (+) 相连接, 构建 T7 启动子控制下的大肠杆菌表达质粒 pET-ACTH (4-10)-GDNF。

将上述构建的表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 进行 IPTG 诱导表达。在 37℃ 条件下诱导表达 3 h, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析观察到与理论分子量一致的诱导表达条带 (图 1), 表达量约占全菌蛋白的 30%。进一步将表达菌破菌离心后, 分别取上清液和沉淀进行 SDS-聚丙烯酰

胺凝胶电泳分析, 结果显示表达产物以不溶性的包涵体形式存在于沉淀中. 改变 IPTG 浓度、诱导表达温度及诱导表达时间对融合蛋白表达量及溶解性影响不大 (结果未列出). 分别用 GDNF 多抗及 ACTH (4-10) 多抗对表达产物进行蛋白质印迹分析, 表达产物都有明显的杂交条带而诱导前的全菌蛋白则无此条带 (图 2), 说明我们所表达的蛋白具有 ACTH (4-10) 及 GDNF 蛋白的免疫原性.

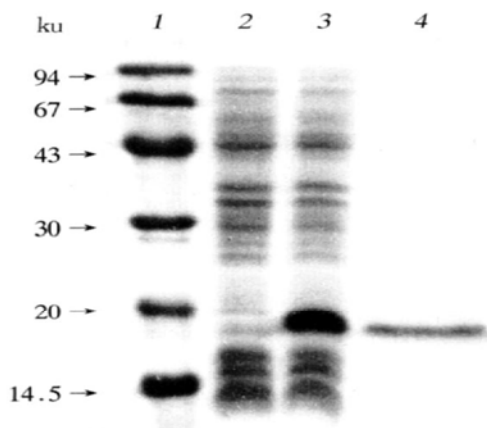


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of overexpression and purification of ACTH (4-10)-GDNF fusion protein in BL21 (DE3)
1: protein molecular mass marker; 2: bacterial total proteins before induction; 3: bacterial total proteins after induction; 4: the purified ACTH (4-10)-GDNF fusion proteins.

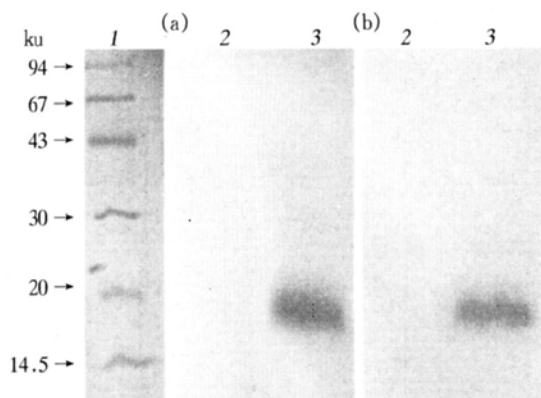


Fig. 2 Analysis of ACTH (4-10)-GDNF fusion protein expressed in BL21 (DE3) by Western blot

(a) Western blot with GDNF polyclonal antibody; (b) Western blot with ACTH (4-10) polyclonal antibody. 1: protein molecular mass marker; 2: bacterial total proteins before induction; 3: bacterial total proteins after induction.

2.3 亲和层析纯化 ACTH(4-10)与 GDNF 融合蛋白

固定化金属离子配体亲和层析技术, 是基于过渡态金属离子 (如 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等) 与多聚氨基酸的高亲和力结合性质而建立. 由于在 ACTH

(4-10)-GDNF 融合蛋白的 N 端融合了 $6 \times \text{His}$, 所以表达产物以 Ni^{2+} -NTA 树脂来纯化. 包涵体溶解于结合缓冲液后, 控制缓慢流速通过 Ni^{2+} -NTA 固相柱, 以使重组融合蛋白能充分与 Ni^{2+} 结合. 用洗涤缓冲液充分洗柱除去非专一结合的杂蛋白后, 再以洗脱缓冲液洗脱专一结合产物 ACTH (4-10)-GDNF 融合蛋白. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果表明, 经此一步纯化, ACTH (4-10)-GDNF 融合蛋白的纯度达 85% 以上. 纯化过程中发现, 咪唑的浓度对纯化结果有较大影响, 可通过摸索适宜条件, 进一步亲和纯化提高纯度. 融合蛋白经蛋白质复性、浓缩及蛋白质浓度测定后以待活性检测.

2.4 ACTH(4-10)与 GDNF 融合蛋白的活性测定

我们取胎鼠脊髓神经元做原代培养, 在培养第 2 天换用含 2% B27 的无血清培养基以抑制神经胶质细胞的生长及排除血清成分对神经元生长的影响. 体外培养的脊髓神经元在培养的 7~10 d 要经历一个自然死亡的过程. 我们在培养的第 14 天镜下观察脊髓神经元并进行神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 免疫细胞化学染色, 发现神经元 (NSE 阳性细胞) 纯度较高, 占总细胞的 90%, 阴性对照组 (10^{-8} mol/L BSA) 中多数神经元已萎缩、死亡, 存活的神元胞体普遍较小, 突起短, 细胞核偏位的比例较高. 而实验组 (10^{-8} mol/L ACTH (4-10)-GDNF 融合蛋白) 中存活的神元胞体数目较多, 神经元胞体粗壮, 突起较长, 未出现核偏位、核萎缩等神经元衰老死亡迹象, 甚至在个别细胞轴突上还能见到生长锥. 由于我们培养的脊髓神经元中神经元纯度高达 90%, 且在培养过程中使用了无血清培养基能排除血清成分的干扰, 因此 MTT 法测定结果基本能反映脊髓神经元的存活率, 而不是胶质细胞或其他. 图 3 结果表明 ACTH (4-10)-GDNF 融合蛋白与阴性对照相比能明显促进

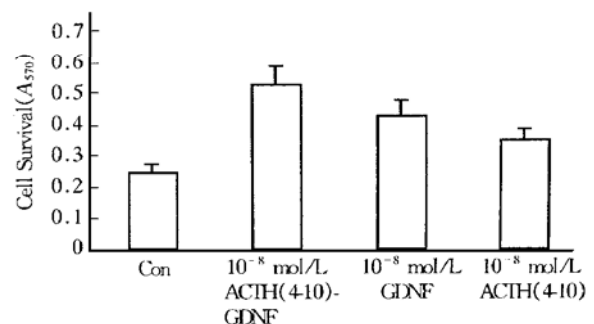


Fig. 3 Effect of ACTH (4-10)-GDNF fusion protein on the survival of spinal cord neurons by MTT measure

脊髓神经元存活 ($P < 0.01$), 其促脊髓神经元存活作用也强于 GDNF 蛋白 ($P < 0.05$) 与 ACTH (4-10) 多肽 ($P < 0.01$).

3 讨 论

我们已克隆了 GDNF 基因并实现其在大肠杆菌及昆虫细胞中的高效表达^[11, 12]. 本文通过基因工程方法获得编码 ACTH (4-10) 与 GDNF 融合蛋白的基因, 并在大肠杆菌中表达、纯化获得了 ACTH (4-10) -GDNF 融合蛋白, 为保持 ACTH (4-10) 及 GDNF 各自的活性, 中间以柔软肽段 Gly-Gly-Gly-Ser (GGGS) 相连. ACTH (4-10) -GDNF 融合蛋白能促进脊髓神经元存活, 并且效果强于 GDNF 蛋白或 ACTH (4-10) 多肽分别的作用, 这提示 GDNF 与 ACTH (4-10) 在促进脊髓神经元存活上存在协同或互补作用, 但效应并不是叠加的. GDNF 是通过与 GDNF 受体 α (GFR α) 结合后引起 RET 酪氨酸激酶受体的磷酸化介导细胞内信号传导通路^[13], ACTH (4-10)^[5]主要是通过 G 蛋白耦联受体介导神经营养作用, ACTH (4-10) -GDNF 融合蛋白是否同时激活这两条通路而执行其生物学作用还有待进一步研究.

本文进行了神经肽与神经营养因子融合蛋白的构建、表达及活性的初步研究, 这在国内外文献中还未见到类似报道. 神经肽与神经营养因子的融合有可能获得一种高神经营养活性的新型融合蛋白, 而且克服了神经肽由于分子质量小易于降解、基因工程表达困难的难题.

参 考 文 献

- Bradshaw R A, Blundell T L, Lapatto R, *et al.* Nerve growth factor revisited. *TIBS*, 1993, **18** (2): 48~ 52
- Stockli K A, Lottspich F, Sendtner M, *et al.* Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature*, 1989, **342** (5): 920~ 923
- Milbrandt J, de Sauvage F J, Fahrner T J, *et al.* Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron*, 1998, **20** (3): 245~ 253
- Plantinga L C, Schimchowitsch S, Anglard P, *et al.* Stimulation by melanocortins of neurite outgrowth from spinal and sensory neurons *in vitro*. *Peptides*, 1992, **13** (6): 1109~ 1115
- Hol E M, Gispen W H, Bar P R. ACTH-related peptides: receptors and signal transduction systems involved in their neurotrophic and neuroprotective actions. *Peptides*, 1995, **16** (5): 979~ 993
- Hokfelt T. Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron*, 1991, **7** (4): 867~ 879
- Duckers H J, Soodar P. Non-corticotropin ACTH peptides modulate nerve development and regeneration. *Rev Neurosci*, 1993, **4** (4): 321~ 363
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning — A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~ 60
- Wang F Z, Nelson P G, Fitzgerald S C, *et al.* Cholinergic function in cultures of mouse spinal cord neurons. *J Neurosci Res*, 1990, **25** (2): 312~ 323
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunological Methods*, 1983, **65** (1): 55~ 63
- 陈哲宇, 路长林, 吴祥甫, 等. 人重组 GDNF 及其生物活性研究. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (2): 207~ 210
CHEN Z Y, LU C L, WU X F, *et al.* *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1999, **31** (2): 207~ 210
- 陈哲宇, 路长林, 吴祥甫, 等. 人 GDNF 基因在昆虫细胞中的高效表达. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (3): 245~ 248
CHEN Z Y, LU C L, WU X F, *et al.* *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1999, **31** (3): 245~ 248
- Sanicola M, Hession C, Worley D, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (3): 6238~ 6243

The Recombinant ACTH (4-10) -GDNF Fusion Protein and Study of Its Biological Activity*

CHEN Zhe Yu^{1), 2) **}, ZHANG Yong¹⁾, HE Cheng¹⁾, LU Chang-Lin¹⁾, WU Xiang-Fu²⁾

¹⁾ Department of Neurobiology, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ²⁾ Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract The chimeric gene of ACTH (4-10) with GDNF was constructed by PCR amplification. The fused gene was inserted into the expression vector pET-28a (+) and expressed in *E. coli* with a level of 30% of the total bacterial proteins. The expressed product was purified by Ni²⁺-NTA resin, up to 85% purity. The results

of activity assays showed that the chimeric protein could significantly promote the survival of spinal cord neurons and had a higher neurotrophic activity than ACTH (4-10) and GDNF respectively.

Key words adrenocorticotropin (4-10), glial cell line derived neurotrophic factor, chimeric protein, gene expression

* This work is supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (30000048).

** Corresponding author. Tel: 86-21-65492132, E-mail: chengzyk@online.sh.cn

Received: December 04, 1999 Accepted: April 04, 2000

小知识

表达序列标签及其应用

王忠华¹⁾ 周美园²⁾ 夏英武^{1, 2)}

(^{1)**} 浙江大学农业与生物技术学院核农所, 杭州 310029; ²⁾ 浙江华川专修学院, 杭州 310020)

宏伟的人类基因组计划自 20 世纪 90 年代初正式启动以来, DNA 序列数据库一直处于指数级水平增长之中, GenBank 的容量每隔 14 个月就翻一番. 如何充分利用这些已有的数据资源, 加速基因克隆研究, 已成为一个急迫而富有挑战性的课题摆在我们面前. 越来越多的基因克隆建立在生物信息学分析的基础之上, 进行同源性比较与计算机辅助结构和功能分析, 尤其是 1995 年以来, 表达序列标签 (简称 EST) 的广泛应用, 为大规模进行基因克隆和表达分析提供了强大的动力, 也为生物信息学功能的充分发挥提供了广阔的空间.

通过从 cDNA 文库中随机挑取的克隆进行测序所获得的部分 cDNA 的 3' 或 5' 端序列称为表达序列标签 (EST), 一般长度为 300~500 bp 左右. 利用 EST 作为标记所构建的分子遗传图谱称为转录图谱. EST 技术最早由 Sikela 和 Matsubara 提出, 并被 Venter 大规模应用. EST 测序的飞速发展, 使得 dbEST 中的记录已经超出一百多万条. 这种方法不仅可以判断一段 DNA 是否包含开放阅读框架 (ORF), 而且能精确地给出该基因的内含子和外显子的剪切模式. 植物 EST 计划主要集中在拟南芥和水稻上, 其他植物的 EST 相对较少. 1998 年 12 月美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 公布的各种植物的 EST 数目总和已达几万条. 这些 EST 不仅为植物基因组遗传图谱的制作提供了大量的分子标记, 也为基因的功能研究提供了有价值的信息. 此外, EST 计划还为基因的鉴定提供了候选基因.

在各类数据中, 目前应用最多的仍为 EST, 其应用范围主要包括以下几个方面: a. 不同剪接型的识别; b. 构建重叠群 Contigs, 加速全长基因的克隆; c. 基因结构分析 (内含子/外显子识别); d. 基因定位分析; e. 基因表达分析. 限于篇幅, 本文从生物信息学的角度来简要阐述 EST 的应用.

生物信息学 (bioinformatics) 是用数理和信息科学的观点、理论和方法来研究生命现象, 组织和分析呈指数增长的生物学数据的一门学科. 生物信息学由数据库、计算机网络和应用软件三大部分组成.

EST 信息分析的基本思路: 基因编码区序列 (简称 CDS) 与 EST 数据比较 → 寻找感兴趣 ESTs (标准: 长度 \geq 100 bp, 同源性介于 50% ~ 85% 之间) → 所选 ESTs 与 GenEmble 数据库比较 → 找出未克隆 ESTs → 再与 dbEST、dsSTS、dbHTGs、MGD 及 UniGene 数据库比较搜寻重叠群 Contigs → 设计引物进行 PCR 扩增或筛选 cDNA 文库或索取 cDNA 克隆号进行电子拼接获取全长 cDNA → 基因定位、结构、功能检测分析等.

随着“后基因组”时代的到来, 生物信息学将在基因功能研究中发挥愈来愈重要的作用. 而 EST 分析是生物信息学分析的核心, 它为新基因的克隆和功能分析提供了出发点. 通过 EST 的综合分析, 克隆、鉴定和定位新基因, 对于我们获取和克隆候选基因有重要参考价值.