

· 论 著 ·

## 重组人成纤维细胞生长因子-20的原核表达、生物学活性鉴定及抗血清制备

姜治国,殷正丰\*,钱海华,康晓燕,罗祥基,李 瑾

(第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室,上海 200438)

**[摘要]** **目的:**表达具有生物学活性的重组人成纤维细胞生长因子-20(rhFGF-20),并制备 rhFGF-20 抗血清。**方法:**应用 RT-PCR 从人前列腺组织总 RNA 中扩增 FGF-20 的 cDNA,将其克隆到 pET-24a 中,在大肠杆菌中诱导表达,经 NTA-Ni<sup>2+</sup>-琼脂糖亲和层析纯化,应用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、细胞增殖试验进行分析鉴定,并免疫新西兰雄性白兔制备多克隆抗体,免疫双扩散法测定抗体效价。**结果:**构建的 pET-24a-FGF-20 能在大肠杆菌中高表达;诱导表达的 rhFGF-20 蛋白主要存在于包涵体中,经包涵体溶解、Ni<sup>2+</sup>-NTA His-Bind Resins 亲和层析后,纯化产物呈单一条带;细胞增殖试验显示其能促进成纤维细胞生长,并具有剂量依赖性(浓度为 50~5 000 ng/ml);制备的抗血清效价为 1:32,可与 hFGF-20 产生免疫反应。**结论:**大肠杆菌表达的 rhFGF-20 蛋白具有刺激成纤维细胞增殖的活性,制备的抗血清具有特异性。

**[关键词]** 成纤维细胞生长因子-20;原核表达;免疫血清

**[中图分类号]** R 349.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0950-03

### Prokaryotic expression, purification and biological activity determination of recombinant human fibroblast growth factor-20 and preparation of its polyclonal antisera

JIANG Zhi-guo, YIN Zheng-feng\*, QIAN Hai-hua, KANG Xiao-yan, LUO Xiang-ji, LI Jin(Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To express and purify bioactive recombinant human fibroblast growth factor-20 (rhFGF-20) protein and to prepare its polyclonal antisera. **Methods:** FGF-20 cDNA was amplified from human prostate tissue by RT-PCR and was subcloned into expression vector pET-24a, which was then transformed into the *E. coli* DE3. Expression of rhFGF-20 protein was induced in *E. coli* DE3 and the protein was purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA His-Bind Resins. The purity and biological activity of rhFGF-20 protein were determined by SDS-PAGE and cell-proliferation assay, respectively. Two New Zealand white rabbits were immunized with rhFGF-20 protein to prepare polyclonal antisera and the titer of antibody was determined by double diffusion test. **Results:** rhFGF-20 protein was efficiently expressed in *E. coli* DE3 in the form of inclusion body and homogeneous protein was obtained after purification with Ni<sup>2+</sup>-NTA His-Bind Resins. Cell-proliferation assay indicated that rhFGF-20 dose-dependently (50-5 000 ng/ml) promoted fibroblast cells proliferation. The prepared polyclonal antisera, with a titer of 1:32, had immunoreaction with hFGF-20. **Conclusion:** The expressed rhFGF-20 protein can stimulate the proliferation of fibroblast cells and the prepared antisera are antigen specific.

**[KEY WORDS]** fibroblast growth factor-20; prokaryotic expression; immune sera

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9):950-952]

成纤维细胞生长因子-20(fibroblast growth factor-20, FGF-20)是 Kirikoshi 等<sup>[1]</sup>于 2000 年发现的成纤维细胞因子家族(FGFs)的一个新成员,由 3 个外显子和 2 个内含子组成,定位于人类染色体 8p21.3-p22 区域,编码一个由 211 个氨基酸组成的多肽,相对分子质量约 23 500。现有资料表明,FGF-20 在形态发生<sup>[2]</sup>、组织修复<sup>[3,4]</sup>、神经营养<sup>[5,6]</sup>、血管生成<sup>[7]</sup>和肿瘤发生<sup>[8]</sup>等过程中发挥着重要作用。本研究应用 RT-PCR 从人前列腺组织总 RNA 中扩增 FGF-20 cDNA,克隆到 pET-24a,在大肠杆菌中诱导表达,经 NTA-Ni<sup>2+</sup>-琼脂糖亲和层析柱纯化,获得具有细胞因子活性的重组 FGF-20,并制备了相应的抗血清,为进一步研究 FGF-20 生物学功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

1.1 实验材料 限制性内切酶、T<sub>4</sub>连接酶、RT-PCR 试剂盒和 MTT 均为 Promega 公司产品,TRIzol、DMEM 和小牛血清为 Gibco BRL 公司产品,PCR 产物克隆载体 pUCm-T 为上海博彩生物科技有限公司产品,原核表达载体 pET-24a、BL21(DE3)和 Ni<sup>2+</sup>-NTA His-Bind Resins 为 Novagen 公司产品,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为武汉博士德

**[基金项目]** 上海市自然科学基金(05ZR14149). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai Municipal Government(05ZR14149).

**[作者简介]** 姜治国,硕士生。

\* Corresponding author. E-mail: yinzfk@yahoo. com. cn

生物工程有限公司产品,ECL试剂为上海普飞生物技术有限公司产品,完全弗氏免疫佐剂和不完全弗氏免疫佐剂为Sigma公司产品,菌种 *E. coli* JM109和细胞 NIH3T3 为本实验室保存。

1.2 人 FGF-20 cDNA 的克隆 采用 TRIzol 一步抽提法从人前列腺组织中提取总 RNA,在逆转录酶系统中以标准方法合成 cDNA 第一链,取 2  $\mu$ l cDNA 产物作模板进行 PCR 反应,引物由上海生物工程服务有限公司合成,序列如下:上游引物:5'-CAT ATG GCT CCC TTA GCC GAA GTC GGG-3';下游引物:5'-CTC GAG AGT GTA CAT CAG TAG GTC CTT-3',其中上游引物中预置了 *Nde* I 酶切位点,下游引物中预置了 *Xho* I 酶切位点。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,56 $^{\circ}$ C 退火 50 s,70 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共 35 个循环,之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经电泳分析确认后与 pUCm-T 连接,转化感受态细胞 JM109,氨苄青霉素和蓝白斑筛选,挑取白斑菌落培养扩增,抽提质粒后酶切、测序鉴定插入片段,取名为 pUCm-T-FGF-20。

1.3 pET-FGF-20 的构建和 rhFGF-20 的诱导表达 以 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切 pUCm-T-FGF-20,回收酶切片段,与经相同双酶切的载体 pET-24a 连接,转化 BL21 (DE3),经卡那霉素筛选,挑取单菌落接种于 2 ml 含 50  $\mu$ g/ml 卡那霉素的 LB 培养液中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,次日以 1:100 的比例放大过夜培养物,以异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达,优化表达条件,培养至  $D_{550}$  值为 0.5~1.0。

1.4 细菌和包含体的裂解 以最佳表达条件大量培养细菌,4 000 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C 离心 30 min 后收集细菌沉淀。用含 8 mol/L 尿素的缓冲液(8 mol/L 尿素;0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;0.01 mol/L Tris-Cl,pH 8.0)溶解细菌和包含体,4 000 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C 离心 30 min 后收集上清。

1.5 rhFGF-20 蛋白的纯化和复性 将细菌裂解液与  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA His-Bind Resins 轻微摇晃混合 30 min 后小心移入层析柱,用含 40 mmol/L 咪唑的 6 mol/L 尿素溶液(6 mol/L 尿素;0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;0.01 mol/L Tris-Cl,pH 8.0)洗柱至流过液  $D_{280} < 0.01$ ,最后用含 250 mmol/L 咪唑的 6 mol/L 尿素溶液(6 mol/L 尿素;0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;0.01 mol/L Tris-Cl,pH 8.0)洗脱,1 ml 分部收集蛋白,15% SDS-聚丙烯酰胺电泳分析蛋白。PBS 透析 24 h 使蛋白复性。

1.6 细胞增殖试验 将 NIH3T3 细胞以  $5 \times 10^3$ /孔的密度接种于 96 孔培养板,在 0.1 ml DMEM 培养液(含 1% 小牛血清)中于 37 $^{\circ}$ C、含 5%  $\text{CO}_2$  的孵箱

中培养 24 h,吸去培养液,加入 0.1 ml 新鲜 DMEM 培养液(不含小牛血清,但分别含有浓度为 50、500 和 5 000 ng/ml 的 rhFGF-20 蛋白纯品)继续培养 72 h。终止培养前加入 5% MTT 20  $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C 温育 4 h 后吸尽上清,每孔加入 DMSO 100  $\mu$ l,振荡混匀至完全溶解,测定  $D_{570}$  值。上述实验重复 3 次,结果取其平均值。

1.7 rhFGF-20 抗血清制备 挑选体重质量 2.5 kg 左右的雄性新西兰白兔 2 只,用纯化 rhFGF-20 蛋白与等体积的完全弗氏免疫佐剂混匀于背部皮下多点注射,第 3 天以同样方法加强免疫 1 次,第 28 天用纯化蛋白与等体积的不完全弗氏免疫佐剂混匀后加强免疫。注射后 7 d 从颈总动脉放血,制作并保存血清。用免疫双扩散法测定抗血清的效价,用 Western 印迹分析抗血清的特异性。

## 2 结果

2.1 人 FGF-20 cDNA 的鉴定 RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,仅在约 600 bp 处显示 1 条条带,与理论预期值一致。pUCm-T-FGF-20 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后释放出 1 条与 PCR 产物大小相近的 DNA 条带。测序结果与 GenBank 数据库资料比对,全部序列和阅读框架正确。

2.2 rhFGF-20 表达条件的优化 通过对表达条件(温度、诱导时间和 IPTG 浓度)的改变和各表达结果的 SDS-PAGE 分析发现,在 37 $^{\circ}$ C 下,用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h 能达到较高的表达效率,诱导表达的蛋白约占菌体总蛋白的 25%,主要以包含体的形式存在。

2.3 rhFGF-20 纯化结果的分析 图 1 表明,IPTG 诱导后的细菌裂解液在相对分子质量约为 23 500 处出现 1 条新的蛋白条带,与理论预计相吻合,而未经诱导的细菌裂解液中不存在该条带。将细菌裂解液上样到 NTA- $\text{Ni}^{2+}$ -琼脂糖亲和层析柱,未经诱导的细菌裂解液的流过液未发生成分改变,而经 IPTG 诱导的细菌裂解液过柱后诱导表达的蛋白被滞留于柱上,因此在流过液中该蛋白条带消失。提高洗脱液咪唑浓度,该条带被洗脱下来,电泳显示为单一条带,扫描结果表明纯度  $> 90\%$ 。同样纯化未经诱导的细菌裂解液未见该条带。

2.4 rhFGF-20 的细胞增殖活性 rhFGF-20 能促进 NIH3T3 细胞的增殖,本实验选用 NIH3T3 细胞作为 rhFGF-20 活性测试的靶细胞。在不含小牛血清和 rhFGF-20 蛋白的培养液中,NIH3T3 细胞生长缓慢, $D_{570}$  为  $0.20 \pm 0.01$ ;而在不含小牛血清

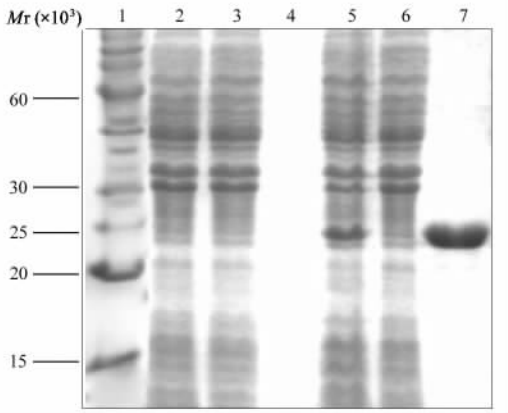


图1 SDS-PAGE分析纯化的rhFGF-20蛋白

Fig 1 SDS-PAGE analysis of purified rhFGF-20 protein

1: BenchMarker™ protein ladder; 2: Cleared lysates prepared from cells grown under repressed conditions; 3: Flow-through of the lysates corresponding to lane 2 after Ni<sup>2+</sup>-NTA chromatography; 4: Eluted sample of the lysates corresponding to lane 2 after Ni<sup>2+</sup>-NTA chromatography; 5: Cleared lysates prepared from cells grown under induced conditions; 6: Flow-through of the lysates corresponding to lane 5 after Ni<sup>2+</sup>-NTA chromatography; 7: Eluted sample of the lysates corresponding to lane 5 after Ni<sup>2+</sup>-NTA chromatography

但加入 rhFGF-20 蛋白(50、500、5 000 ng/ml)的培养液中,NIH3T3 细胞生长速度明显加快, $D_{570}$  分别为  $0.32 \pm 0.012$ 、 $0.42 \pm 0.03$  和  $0.61 \pm 0.04$ ,明显高于未加 rhFGF-20 蛋白组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ,  $t$  检验),且生长速度随 rhFGF-20 蛋白浓度的增加而加快。

2.5 rhFGF-20 抗血清的鉴定 免疫双扩散法测定抗血清的效价为 1:32。Western 印迹结果显示,该抗血清与 hFGF-20 产生免疫反应,而与同源性较高的 FGF-9 没有交叉免疫反应。

### 3 讨论

FGF-20 是 FGF 家族的一个新成员,在人体正常组织中只存在于小脑,在 LX-1 肺癌细胞、SW480 结肠癌细胞和 NCI-N87 胃癌细胞中也有较高表达<sup>[8]</sup>。FGF-20 与不同的受体结合会产生不同的功能,如与 FGFR-1c 结合能营养小鼠的多巴胺能神经元,提高其生存率;与 FGFR2 $\alpha$ (III b)、FGFR2 $\alpha$ (III c)、FGFR2 $\beta$ (III b)和 FGFR3 $\alpha$ (III c)等结合则可以促进细胞增殖、修复组织甚至导致肿瘤的发生。FGF-20 还有其他一些功能,如在小鼠胚胎的发育阶段可能影响颅骨和颅缝的正常发育<sup>[2]</sup>,另外在血管生成中也可能发挥某种作用<sup>[7]</sup>。因此,随着研究的深入,作为细胞增殖因子、血管形成因子、神经营养因子、形态发生因子、组织修复-再生因子的 FGF-20,在临床上无论是应用于炎症性肠炎、Parkinson 病、口腔

黏膜炎的治疗,还是作为肿瘤诊断和治疗的靶分子,都可能具有广阔的前景。

本研究应用 RT-PCR 技术从人前列腺组织总 RNA 中扩增 FGF-20 cDNA,克隆到表达载体 PET-24a,在大肠杆菌中诱导表达。表达的蛋白主要以包含体的形式存在。由 pET-24a 表达的蛋白为含有 6 个组氨酸标签的融合蛋白,可以利用 NTA-Ni<sup>2+</sup>-琼脂糖亲和层析柱纯化 rhFGF-20。金属螯合剂 Ni<sup>2+</sup> 能与组氨酸结合,在纯化过程中具有分辨率高、选择性好、操作方便、获得蛋白纯度高等特点,而且 His“标签”的相对分子质量很小,且无生物学活性,一般不会影响蛋白质的功能。与 rhFGF-20 融合后对 rhFGF-20 蛋白的结构和功能无明显影响,经检测 rhFGF-20 蛋白能有效促进 NIH3T3 细胞生长,并且其活性具有剂量依赖性。以此免疫新西兰白兔获得的 rhFGF-20 抗血清具有较高的效价和抗原特异性。这些工作为进一步研究 FGF-20 的生物学功能,以及研究 FGF-20 与肿瘤发生、发展的关系创造了条件。

### [参考文献]

- [1] Kirikoshi H, Sagara N, Saitoh T, et al. Molecular cloning and characterization of human FGF-20 on chromosome 8p21.3-p22 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274:337-343.
- [2] Hajihosseini MK, Heath JK. Expression patterns of fibroblast growth factors-18 and -20 in mouse embryos is suggestive of novel roles in calvarial and limb development [J]. *Mech Dev*, 2002, 113:79-83.
- [3] Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, et al. A novel human fibroblast growth factor treats experimental intestinal inflammation [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123: 1151-1162.
- [4] Alvarez E, Fey EG, Valax P, et al. Preclinical characterization of CG53135 (FGF-20) in radiation and concomitant chemotherapy/radiation-induced oral mucositis [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9:3454-3461.
- [5] Ohmachi S, Watanabe Y, Mikami T, et al. FGF-20, a novel neurotrophic factor, preferentially expressed in the substantia nigra pars compacta of rat brain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277:355-360.
- [6] Ohmachi S, Mikami T, Konishi M, et al. Preferential neurotrophic activity of fibroblast growth factor-20 for dopaminergic neurons through fibroblast growth factor receptor-1c [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 72:436-443.
- [7] Gerwins P, Skoldenber E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000, 34:185-194.
- [8] Jeffers M, Shimkets R, Prayaga S, et al. Identification of a novel human fibroblast growth factor and characterization of its role in oncogenesis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61:3131-3138.

[收稿日期] 2006-01-16

[修回日期] 2006-07-07

[本文编辑] 尹 茶