

猪表皮生长因子在大肠杆菌中的表达

杨桂香, 黄伟华, 彭险峰

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:采用 RT-PCR 方法从猪肾脏皮质组织中扩增出 pEGF 基因, 将其连接到克隆载体 pMD18-T 上, 经测序鉴定正确后, 再克隆到原核表达载体 pET-41a(+) 上, 构建重组表达质粒 pET-EGF。用重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 宿主菌, 经 IPTG 诱导表达后利用 SDS-PAGE 电泳和 Western-blotting 对 GST-EGF 融合蛋白进行分析, 结果表明 37 °C 诱导表达的融合蛋白含量较高, 占菌体总蛋白的 20.2%; 30 °C 诱导表达的可溶性融合蛋白含量较高, 占菌体总蛋白的 7.7%。

关键词:猪表皮生长因子; 原核表达; Western-blotting

中图分类号: S859.79

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2006)04-0090-04

Expression of Porcine Epidermal Growth Factor in *Escherichia coli*

YANG Gui-xiang, HUANG Wei-hua, PENG Xian-feng

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Porcine epidermal growth factor (pEGF) cDNA was amplified from the RNA of swine kidney cortex by RT-PCR, and then the amplicon was cloned into pMD18-T for sequencing. After confirmation by sequencing, the pEGF cDNA fragment was inserted into prokaryotic expression vector pET-41a(+) to construct recombinant plasmid pET-EGF. Then the constructed plasmid was transformed into host cell *E. coli* BL21(DE3), and induced with IPTG. The expression of GST-EGF fusion protein was analyzed by SDS-PAGE and Western-blotting. The SDS-PAGE result indicated that fusion protein GST-EGF was 20.2% of the total bacterial proteins, and the yield of the soluble target protein accounted for 7.7% of the total bacterial proteins.

Key words: porcine epidermal growth factor; prokaryotic expression; Western-blotting

猪表皮生长因子 (porcine epidermal growth factor, pEGF) 是一种含有 53 个氨基酸的单链多肽类生长因子, 与人、牛、鼠等动物的表皮生长因子类似, 具有刺激细胞分裂、增殖与分化, 促进离子交换和细胞外基质合成等生物学特性^[1]。据文献报道: pEGF 有利于猪的早期胚胎发育^[1]、能提高母猪的窝产仔数^[2]、提高仔猪成活率^[3-4]以及促进断奶仔猪的生长^[5], 因此, 在兽医临床上具有十分广阔的应用前景。本文根据 pEGF 基因的 mRNA 序列采用 RT-PCR 方法合成 pEGF 的 cDNA, 并将其克隆到原核表达载体中, 利用原核表达系统进行表达。对融合蛋白进行

可溶性分析和 Western-blotting 鉴定, 为 pEGF 的研究和开发打下基础。

1 材料与方法

1.1 质粒

克隆载体 pMD18-T kit 购自 TaKaRa 公司; 原核表达载体 pET-41a(+) 购自 Novagen 公司。

1.2 PCR 引物

根据 GenBank 中 pEGF 基因的 mRNA 序列设计引物, 上游引物 F: 5'-GCC GAC GCG AGT CAA AAT AGT TAC TCT GAA TGC CCG-3' (下划线处为 *Pst*I

酶切位点);下游引物 R: 5'-AAC GGA TCC TTA GCG CAG CTC CCA CCA TTT CAA-3' (下划线处为 *Bam*H I 酶切位点)。该引物由上海基康生物技术有限公司合成。

1.3 其他主要试剂

Trizol Reagent 购自 Gibco 公司; M-MLV Reverse Transcriptase、Oligo(dT)₁₅ primer、Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor、无核酸酶的水购自 Promega 公司; Qiaprep® Spinminiprep Kit、Qiaquick® Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司; 鼠源性的抗谷胱甘肽硫转移酶(GST)的单克隆抗体购自 Novagen 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗购自广州华美公司; IPTG 及其他酶为 TaKaRa 公司产品。

1.4 pEGF 基因 cDNA 的合成

用 Trizol 提取猪肾脏皮质组织的总 RNA, 进行 pEGF 的 cDNA 第一链的合成。逆转录反应: 2 μg 总 RNA, 0.1 μL Oligo(dT)₁₅, 加无核酸酶的水至 12 μL, 70 °C 加热 5 min, 冰浴冷却 5 min, 然后加入 5 × 逆转录反应缓冲液 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μL, RNA 酶抑制剂 (40 U/μL) 0.625 μL, M-MLV (200 U/μL) 1 μL, 加无核酸酶的水至 25 μL, 混匀后离心 10 s, 室温放置 10 min, 37 °C 孵育 35 min, 42 °C 加热 25 min, 最后冰浴 5 min。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系: 4 μL cDNA; 5 μL 10 × PCR 缓冲液; 4 μL dNTPs (各 2.5 mmol/L); 上、下游引物各 1 μL; 蒸馏水 34.75 μL; EX-Taq DNA 聚合酶 0.25 μL。RT-PCR 产物经 0.025 g/mL 的琼脂糖凝胶电泳, 用 Qiaquick® Gel Extraction Kit 回收胶中目的片段。

1.5 pEGF 基因的 cDNA 克隆

将 RT-PCR 回收产物连接至克隆载体 pMD18-T, 经蓝白筛选、菌落 PCR 和双酶切鉴定获得重组质粒 pMD-EGF, 由上海联合基因公司对 EGF 的 cDNA 进行测序鉴定。

1.6 原核表达重组质粒的构建

用 *Psh*A I 和 *Bam*H I 分别对质粒 pMD-EGF 和 pET-41a(+) 进行双酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离后切胶回收 186 bp 的 pEGF 的 cDNA 片段和 5.9 kb 载体条带, 然后进行连接。连接产物直接用于转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 在含卡那霉素 (30 μg/mL) 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 增菌培养后经菌落 PCR 鉴定为阳性的菌落, 用 Qiaprep® Spinminiprep Kit 提取质粒, 并对质粒进行酶切鉴定, 最后将重组质粒送上海基康生物技术有限公司测序, 了解 pEGF 序列和阅读框均是否正确。构建的表达质粒命名为 pET-EGF。

1.7 GST-pEGF 融合蛋白的诱导表达

将构建的表达载体转化 *E. coli* BL21(DE3) 宿主菌, 阳性克隆菌株在含卡那霉素 (30 μg/mL) 的 LB 液体培养基中 37 °C 培养 12 h 后, 以 1:100 的比例接种新鲜的 LB (30 μg/mL 卡那霉素) 液体培养基, 37 °C 振荡培养至菌液的 $D_{600\text{nm}}$ 约为 0.6, 然后加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 在 30 °C 进行诱导表达, 于诱导后的 1、2、3、4、5 h 各取 1 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液后取 20 μL PBS (16 mmol/L Na₂HPO₄, 4 mmol/L NaH₂PO₄, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 重悬菌体沉淀, 加入 5 μL 5 × 样品缓冲液, 混匀后 100 °C 煮沸 5 min, 进行 15% SDS-PAGE 电泳分析。

1.8 融合蛋白的可溶性分析

pET-EGF 转化的 BL21(DE3) 阳性菌经 30 °C 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 于诱导 4 h 后收集菌液, 离心弃上清液后, 用 PBS 洗涤菌体沉淀 2 次, 然后用细菌裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.8, ϕ = 5% 甘油, 50 mmol/L NaCl, 1 mg/mL 溶菌酶) 重悬菌体沉淀, 室温 50 r/min 轻轻摇动 20 min, 冰浴中对菌体进行超声破碎。超声破碎的工作方式: 400 W 超声破碎 5 s, 间歇 5 s, 循环 30 次, 至液体变透亮为止。4 °C 12 000 r/min 离心 30 min, 分别收集上清液和沉淀。对上清液 (含有可溶性蛋白) 和沉淀进行 15% SDS-PAGE 电泳检测, 观察融合蛋白的可溶性部分的含量。

1.9 Western-blotting 鉴定

表达产物先进行 SDS-PAGE 电泳, 再经转膜、封闭, 然后依次加入鼠抗 GST 的单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG, 最后加 DAB (diaminobenzidine) 显色, 拍照。

2 结果

2.1 pET-EGF 原核表达载体的构建

采用引物 Oligo(dT)₁₅ 在 M-MLV 反转录酶的作用下, 对肾脏皮质总 RNA 进行 pEGF 基因的 cDNA 第一链的合成, 然后以 pEGF 基因的全长 cDNA 为模板, 以合成的特异性引物进行 PCR, 得到大小约为 180 bp 的片段 (图 1)。将该 cDNA 片段先克隆至 pMD18-T 载体, 然后再亚克隆到 pET-41a(+), 构建融合表达载体 pET-EGF (图 2)。测序表明, 所插入的片段与 GenBank 中 pEGF 基因的 mRNA 序列完全一致, 而且 pEGF 在表达载体 pET-EGF 中与融合蛋白 GST 的读码框正确。