

鸡粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的原核表达及生物学活性分析

谭兵¹, 王红宁^{1,2*}, 张毅², 张安云², 樊文樵²

(1. 四川农业大学 动物医学院, 雅安 625014;

2. 四川大学 生命科学院 四川大学“动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室”, 成都 610064)

摘要: 通过 PCR 方法扩增不含信号肽的鸡 GM-CSF 成熟蛋白基因, 克隆至原核表达载体 pET-32a(+), 构建原核表达质粒 p32GM-CSF, 通过 IPTG 诱导重组鸡 GM-CSF 蛋白表达, 经镍离子亲和层析纯化后, 用 MTT 法检测表达重组蛋白的生物学活性, 并制备兔抗鸡 GM-CSF 多克隆抗体。结果表明成功地构建了 p32GM-CSF 原核表达质粒, SDS-PAGE 结果显示表达的重组蛋白约 34 ku, 主要以包涵体形式表达, 纯化后得到高纯度目的蛋白。Western Blot 结果表明, 该重组蛋白能与制备的抗鸡 GM-CSF 抗体特异性结合。MTT 试验证实, 该重组蛋白具有明显增强鸡骨髓细胞增殖的生物学活性; 这些研究结果表明, 表达的重组 chGM-CSF 蛋白及其多克隆抗体拥有相应的生物学功能, 这将为进一步研究鸡 GM-CSF 蛋白的生物学功能及其应用奠定基础。

关键词: 鸡; 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; 原核表达; 生物学活性

中图分类号: S852.4; Q78

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0725-05

Prokaryotic Expression and Purification of Bioactivity Analysis of Chicken Granulocyte Macrophage Clony Stimulating Factor(GM-CSF)

TAN Bing¹, WANG Hong-ning^{1,2*}, ZHANG Yi², ZHANG An-yun², FAN Wen-qiao²

(1. College of Animal Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China;

2. Animal Disease Prevention and Food Safety Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: The ChGM-CSF gene without signal peptide was amplified by PCR method and ligated into the expression plasmid pET-32a(+) to construct prokaryotic plasmid p32GM-CSF. ChGM-CSF recombinant protein was expressed by induction with IPTG in *E. coli* and purified with Ni-NTA column. MTT assay was used to detect bioactivity of rChGM-CSF. Polyclonal antibody was produced by rabbit injected with the purified protein. The result showed that expression plasmid p32GM-CSF was successfully constructed. SDS-PAGE demonstrated that the recombinant protein was expressed in form of inclusion body and was approximately 34 ku. Western Blot analysis showed that it could be specifically recognized by the rabbit sera to chicken GM-CSF. Results of MTT assay confirmed that it can enhance chicken bone marrow cell proliferation obviously. These results demonstrated that the *E. coli*-derived rChGM-CSF and polyclonal antibody against rChGM-CSF have some bioactivities. Our results would provide foundation for further research of biology characteristics and application of ChGM-CSF.

Key words: chicken; GM-CSF; prokaryotic expression; bioactivity

收稿日期: 2008-08-05

基金项目: 国家“十一五” 863 计划资助(2006AA10A205)

作者简介: 谭兵(1978-), 男, 四川简阳人, 博士生, 主要从事动物传染病研究

* 通讯作者: 王红宁(1963-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事畜禽传染病、微生物基因工程研究, Tel/Fax: 028-85471599, E-mail: whongning@

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子是一种具有多项潜能的造血生长因子,不仅能刺激造血祖细胞增殖、分化和成熟并从骨髓向外周转移,而且还能活化中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞及其他单核细胞,在细胞因子网络中占有重要地位,在免疫反应中具有重要作用^[1]。

1977年 Burgess 等首次在小鼠肺组织培养上清中发现一种能刺激粒细胞和巨噬细胞形成集落的因子,并命名为 GM-CSF^[2]。GM-CSF 是可由人的许多组织器官产生的糖基化蛋白,相对分子质量从 23 到 200 ku 不等。1985年,DeLamarter 等首次利用大肠杆菌表达系统成功表达了鼠的 GM-CSF 蛋白,并利用凝胶过滤层析纯化蛋白,用纯化蛋白免疫家兔制备多克隆抗体,Western Blot 试验证实制备抗体能与天然的鼠 GM-CSF 蛋白特异性结合^[3]。1988年,Greenberg 等采用大肠杆菌表达系统成功表达了人的 GM-CSF 基因,相对分子质量约为 14 ku,并发现非糖基化的蛋白同样具有生物学活性^[4]。在国内,舒邓群等在 2005 年成功构建猪 GM-CSF 基因的真核表达载体 pGM-CSF,在体外转染了 COS-7 细胞,并用细胞表达产物进行 Western Blot 试验,结果表明 COS-7 细胞表达产物能与小鼠抗猪 GM-CSF mAb 特异性结合^[5]。而关于鸡 GM-CSF 基因的原核表达、表达产物活性检测等相关基础研究,国内外未见报道。

本研究以获得的四川山地鸡 GM-CSF DNA 为模板,PCR 扩增获得鸡 GM-CSF 基因表达片段,亚克隆入表达载体,测序鉴定后,转化入大肠杆菌经 IPTG 诱导表达,利用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱对表达重组蛋白进行纯化,制备兔抗鸡 GM-CSF 蛋白的多克隆抗体,并用 MTT 法检测重组蛋白的生物学活性,为下一阶段关于鸡 GM-CSF 重组蛋白生物学功能及其应用的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 DH5 α 、BL21、原核表达载体 pET-32a(+)、pChGM-CSF 由四川大学动物疾病防控生物工程研究中心提供。

1.2 酶及主要相关试剂

限制性核酸内切酶 *Bgl* II、*Eco*R I、*T*₄ 连接酶、DNA Marker、pMD18-T 载体、蛋白质相对分子质量标准等购自大连宝生物(TaKaRa)有限公司;辣

根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 和 DAB 显色试剂盒购自 TIANGEN 公司; Ni-NTA 购自 QIAGEN 公司;弗氏完全佐剂购自 Sigma 公司;胶回收试剂盒为上海华舜生物技术公司产品;新西兰大白兔由四川农业大学实验动物中心提供。

1.3 引物设计

利用 Primer 基因分析软件,参照 Avery 等^[6]发表的鸡 GM-CSF cDNA 基因序列设计 2 条引物 P1、P2,可扩增不包含信号肽成熟蛋白区,分别在引物 5'端插入 *Bgl* II、*Eco*R I 酶切位点。P1:5'-CCA-GATCTGATGACCACAACATACTCCTGCTGTAC-3'; P2:5'-GCGAATTCTTAGATGCAGCTTTTCTCCTCTGGGAGCAC-3'。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.4 鸡 GM-CSF 基因的成熟蛋白编码区的扩增与克隆

对鸡 GM-CSF 基因成熟蛋白编码区的 PCR 扩增按以下程序进行:94 °C 5 min; 94 °C 40 s,55 °C 40 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳,凝胶回收目的条带直接与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态菌,抽提抗性质粒进行酶切鉴定,将阳性重组质粒命名为 pT-GM-CSF,并送大连宝生物公司进行序列测定。

1.5 鸡 GM-CSF 基因原核表达质粒的构建

用 *Bgl* II、*Eco*R I 酶将 pT-GM-CSF 双酶切,凝胶纯化后连入经同样酶切处理的 pET-32a(+) 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态菌,抽提质粒,经酶切鉴定为阳性的命名为 p32GM-CSF,并将阳性重组质粒送大连宝生物公司测序。

1.6 重组鸡 GM-CSF 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

将阳性重组质粒 p32GM-CSF 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落于 37 °C 振荡培养过夜(10~15 h),次日,将培养物以 1:100 的稀释度接种于含相应抗生素的新鲜 LB 液体培养基中,于 37 °C 振荡培养约 3 h,至 OD_{600 nm} 达到 0.6 时,加入终浓度为 1.0 mmol · L⁻¹ IPTG,继续培养 3 h,离心收集菌体,以 SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白的表达。

1.7 重组鸡 GM-CSF 蛋白表达产物的纯化

离心收集 500 mL 诱导表达菌体,将菌体重悬于适量的超声缓冲液(50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH8.0,0.2 mmol · L⁻¹ EDTA)中,加入溶菌酶至

终浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C 作用 30 min, 置冰浴中超声破碎细菌, 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 收集沉淀。将沉淀溶于 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 4°C 溶解过夜, 然后 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清, 用镍离子金属螯合柱纯化蛋白, 收集洗脱液, 待 SDS-PAGE 分析后, 合并含纯化洗脱蛋白质的组分。

1.8 鸡 GM-CSF 蛋白的生物活性检测

无菌采集 20 日龄鸡胫骨内骨髓细胞, 制备骨髓细胞悬液, 用 1640 细胞培养液(含 5% 新生牛血清, $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 双抗)重悬细胞, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 将细胞加入 96 孔板内, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 将纯化的表达产物加入试验孔, 使其终浓度为 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并设阴性和空白对照。将 96 孔板置于 37°C 5% CO_2 培养箱培养 40~48 h; 每孔加入 $20 \mu\text{L}$ 3-(4,5)-双甲基-2-噻唑-(2,5)-二苯基溴化四氮唑蓝(MTT)($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 再置 37°C 5% CO_2 培养箱培养 3~4 h; 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 20% SDS-0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 混匀, 继续 37°C 5% CO_2 培养箱培养 3~4 h。以空白对照孔调零, 波长 570 nm 测每个孔的 OD 值。计算增殖指数 SI(增殖指数 = 试验组的 A_{570} /对照组的 A_{570})。

1.9 鸡 GM-CSF 蛋白的 Western Blot 分析

取纯化的重组鸡 GM-CSF 蛋白免疫成年新西兰大白兔, 常规制备多克隆抗体, -20°C 冻存。

将纯化的重组鸡 GM-CSF 蛋白作 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后电转到硝酸纤维素膜上进行 Western Blot 检测, 具体方法: 将膜置 1% 牛血清白蛋白(BSA)中 37°C 封闭 2 h, 于兔抗鸡 GM-CSF 多克隆抗体(1:500 稀释)中 37°C 温育 1.5 h, 用含 1% Tween20 的 TBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 于二抗(羊抗兔 IgG-HRP, 工作浓度为 1:2000)中 37°C 温育 1 h, 用含 1% Tween20 的 TBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, DAB 显色后观察结果。

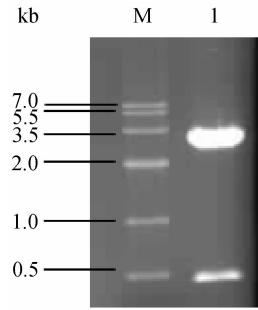
2 结果与分析

2.1 鸡 GM-CSF 成熟蛋白编码区扩增与克隆

抽提重组质粒经 *Bgl* II、*Eco*R I 双酶切, 电泳出现 2 条带: 其中一条带为载体质粒, 约 3 000 bp, 另一条带为所克隆的 GM-CSF 成熟肽编码区片段, 约 4 00 bp(图 1), 与预期的大小一致。

2.2 鸡 GM-CSF 基因原核表达质粒的构建

抽提筛选阳性质粒经 *Bgl* II、*Eco*R I 双酶切鉴



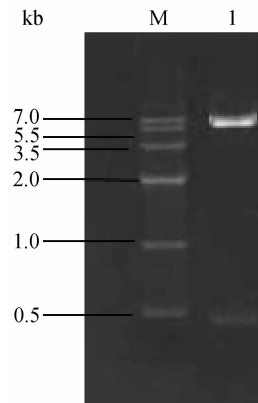
M. DNA 相对分子质量标准 IV; 1. pG-GM-CSF 双酶切产物

M. DNA marker IV; 1. pG-GM-CSF digested with *Bgl* II/*Eco*R I

图 1 pG-GM-CSF 的 *Bgl* II 和 *Eco*R I 双酶切鉴定结果

Fig. 1 Result of pG-GM-CSF digested by *Bgl* II/*Eco*R I

定, 电泳后出现约 400 和 6 000 bp 2 个片段(图 2), 与预期大小一致。阳性重组质粒 p32GM-CSF 的测序结果表明 GM-CSF 基因已正确插入到表达质粒 pET-32a(+), 无突变和移码。



M. DNA 相对分子质量标准 IV; 1. p32GM-CSF 的双酶切产物

M. DNA marker; 1. p32GM-CSF digested with *Bgl* II/*Eco*R I

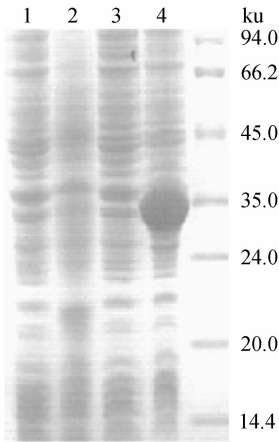
图 2 p32GM-CSF 的 *Bgl* II 和 *Eco*R I 双酶切鉴定结果

Fig. 2 Results of p32GM-CSF digested with *Bgl* II and *Eco*R I

2.3 重组鸡 GM-CSF 蛋白的诱导表达及鉴定

收集诱导后的菌体, 加 $2 \times$ 上样缓冲液处理后进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色鉴定, 融合表达产物的相对分子质量约为 34 ku(图 3), 由于 pET-32a(+), 自带的 Trx 蛋白相对分子质量约 20

ku,因此,鸡 GM-CSF 蛋白相对分子质量约 14 ku,与文献报道的哺乳动物 GM-CSF 基因大肠杆菌表达产物大小一致^[4]。



1. pET32 空载体;2. pET32 空载体诱导结果;3. 重组 p32GM-CSF;4. 重组 p32GM-CSF 诱导结果

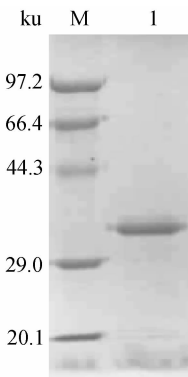
1. Empty vector pET32; 2. Induced empty vector pET32; 3. Recombinant p32GM-CSF; 4. Induced recombinant p32GM-CSF

图 3 重组 p32GM-CSF 在 BL21 菌中表达产物 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 The expression of the recombinant p32GM-CSF in *E. coli* BL21

2.4 重组鸡 GM-CSF 蛋白的纯化

通过镍离子金属螯合柱对重组鸡 GM-CSF 蛋白进行纯化,SDS-PAGE 分析发现在约 34 ku 处有 1 条清晰的条带,显示了目的蛋白良好的纯化效果(图 4)。



M. 蛋白质分子质量标准;1. GM-CSF 纯化产物
M. Protein marker; 1. Purification product of chGM-CSF

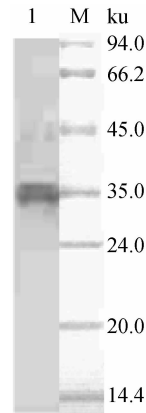
图 4 鸡 GM-CSF 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purification of chGM-CSF

2.5 鸡 GM-CSF 蛋白生物活性测定

骨髓细胞增殖试验表明鸡 GM-CSF 重组蛋白具有明显促进鸡骨髓细胞增殖的生物学活性,增殖指数(SI)达到了 3.13。

2.6 Western Blot 分析

以制备的兔抗鸡 GM-CSF 蛋白多克隆抗体进行 Western Blot 分析,结果显示在相对分子质量 34 ku 处有 1 条明显的显色带,表明鸡 GM-CSF 重组蛋白能与制备的兔抗鸡 GM-CSF 蛋白多克隆抗体特异性结合(图 5)。



M. 蛋白质标准分子质量;1. 鸡 GM-CSF 蛋白

M. Protein marker;1. Chicken GM-CSF

图 5 鸡 GM-CSF 蛋白的 West Blot 分析

Fig. 5 Western Blot analysis of chicken GM-CSF protein

3 讨论

GM-CSF 具有多种生物学活性,它可诱导造血前体细胞分化增殖,维持造血前体细胞和成熟血细胞(粒细胞系和单核细胞系)的存活,增强中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬和杀伤功能,促进嗜酸性粒细胞的杀伤活性,诱导树突状细胞成熟^[7],并向疫苗注射部位集聚^[8],使其具有明显的增强疫苗免疫反应的作用。目前,GM-CSF 已被广泛应用于器官移植、肿瘤病治疗和疫苗佐剂等研究^[9-12]。国内研究证明 GM-CSF 对生长抑素 DNA 疫苗有一定的免疫增强作用^[13]。

目前,人和鼠的 GM-CSF 基因已在大肠杆菌表达系统实现表达,相对分子质量约 14 ku。而对于鸡 GM-CSF 基因的原核表达、生物学活性的相关研究国内外未见报道。

作者利用本实验室克隆成功的鸡 GM-CSF 基因为模板,通过 PCR、酶切等方法,成功构建了鸡 GM-CSF 基因的原核表达载体,并在大肠杆菌中成功地进行高效表达。针对温度、IPTG 浓度、诱导时间等影响 *E. coli* 中蛋白表达量的因素进行摸索,以期达到高效表达 GM-CSF 蛋白。结果表明 37 °C 条件下,1 mmol · L⁻¹ 的 IPTG 诱导浓度、4 h 诱导时间效果最好,蛋白质表达量最高。对蛋白的可溶性分析发现,在 23~35 °C,表达蛋白都主要以包涵体的形式存在,尽管包涵体具有富集目标蛋白质、抗蛋白酶、对宿主毒性小等优点,但包涵体蛋白质的复性率一般都很低,这大大增加了基因工程产品的制造成本。因此,作者下一步将考虑更换表达载体、利用信号肽序列、融合伴侣等因子来提高重组 GM-CSF 蛋白的可溶性,为重组 GM-CSF 蛋白进一步应用奠定基础。

为了验证试验所获得 GM-CSF 重组蛋白及兔抗鸡 GM-CSF 多克隆抗体的生物学功能,作者进行了 MTT 试验和 Western Blot 试验。MTT 试验表明大肠杆菌表达的重组鸡 GM-CSF 蛋白具有促进鸡骨髓细胞增殖的生物学活性。Western Blot 分析显示制备的多克隆抗体与表达重组蛋白能特异性结合,表明表达的重组蛋白具有免疫反应性。这些结果对于新型鸡用免疫佐剂的研发具有重要意义,同时也为进一步研究鸡 GM-CSF 的生物学功能等提供重要的理论依据及实验材料。

参考文献:

- [1] DISIS M L, BERNHARD H, SHIOTA F M, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines [J]. *Blood*, 1996, 88 (1): 202-210.
- [2] BURGESS A W, CAMAKARIS J, METCALF D. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium [J]. *J Biol Chem*, 1977, 252 (6): 1998-2003.
- [3] DELAMARTER J F, MERMOD J J, LIANG C M, et al. Recombinant murine GM-CSF from *E. coli* has biological activity and is neutralized by a specific antiserum [J]. *The EMBO Journal*, 1985, 4 (10): 2575-2581
- [4] GREENBERG R, LUNDELL D, ALROY Y, et al. Expression of biologically active, mature human granulocyte-macrophage colony stimulating factor with an *E. coli* secretory expression system [J]. *Current Microbiology*, 1988, 17: 321-332.
- [5] 舒邓群, 茆达干, 曹少先, 等. 猪粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因的克隆和序列分析及其基因表达[J]. *江西农业大学学报*, 2007, 29(2): 234-240.
- [6] AVERY S, ROTHWELL L, DEGEN W D, et al. Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34 [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, 24(10): 600-610.
- [7] WANG J, SNIDER D P, HEWLETT B R, et al. Transgenic expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation and activation of a novel dendritic cell population in the lung [J]. *Blood*, 2000, 95(7): 2337-2345.
- [8] KIM J J, YANG J S, LEE, D J, et al. Macrophage colony-stimulating factor can modulate immune responses and attract dendritic cells in vivo [J]. *Human Gene Therapy*, 2000, 11: 305-321.
- [9] WALLER E K. The role of sargramostim (rhGM-CSF) as immunotherapy [J]. *Oncologist*, 2007, 12 (2): 22-26.
- [10] NAKA T, IWAHASHI M, NAKAMURA M, et al. Tumor vaccine therapy against recrudescing tumor using dendritic cells simultaneously transfected with tumor RNA and granulocyte macrophage colony-stimulating factor RNA [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99 (2): 407-413.
- [11] GLENN DRANOFF E J, PAUL GOLUMBEK, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 3539-3543.
- [12] DU Y, JIANG P, LI Y, et al. Immune responses of two recombinant adenoviruses expressing VP1 antigens of FMDV fused with porcine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [J]. *Vaccine*, 2007, 25: 8209-8219.
- [13] 舒邓群, 茆达干, 吴志敏, 等. 以减毒沙门氏菌为载体的 GM-CSF 与生长抑素融合表达质粒对小鼠淋巴细胞增殖和 GH 及 IGF- I 分泌的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37 (8): 814-818.