

• 基础研究 •

人骨形成蛋白 7 成熟肽在大肠杆菌中的高效表达

王琦, 葛宝丰, 殷莹, 白孟海, 高梅

(兰州军区兰州总医院骨科研究所, 甘肃 兰州 730050)

摘要 目的: 利用大肠杆菌高效表达人骨形成蛋白 7 (human bone morphogenetic protein 7, hBMP-7) 成熟肽。方法: 将编码 hBMP-7 成熟肽 cDNA 的基因片段克隆入受控于 P_{RP_L} 启动子的温控型大肠杆菌表达载体 pDH, 构建成的重组质粒 pDHB-7m 以大肠杆菌 DH5 α 为宿主菌进行温度诱导表达。结果: 含重组质粒的工程菌经 42 °C 诱导表达后在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上显现出一条新蛋白区带, 分子量约为 16 ku, 表达量占菌体总蛋白的 20% ~ 25%, 以包涵体形式存在, 经简单纯化处理, 得到纯度高于 80% 的人骨形成蛋白 7 成熟肽。结论: hBMP-7 成熟肽在大肠杆菌中得到高效表达, 为深入研究其生物学活性和临床应用奠定了基础。

关键词 基因表达; DNA, 重组; 大肠杆菌

Expression of mature peptide of human bone morphogenetic protein 7 in escherichia coli WANG Qi, GE Baofeng, YIN ying, BAI Meng-hai, GAO Mei. The Institute of Orthopedics of Lanzhou Military General Hospital, Lanzhou 730050, Gansu, China

Abstract Objective: To study the expression of the mature peptide of human bone morphogenetic protein 7 (hBMP-7) in escherichia coli. **Methods:** The cDNA fragment encoding the mature peptide of hBMP-7, with start codon and two tandem stop codons, was inserted into expression vector pDH in which foreign gene was controlled by P_{RP_L} promoters. The recombinant plasmid pDHB-7m was transformed into E. coli DH5 α and induced at 42 °C to express the encoded protein. **Results:** After induction, a new anticipated 16 ku protein band appeared on SDS PAGE gel and amounted to 20% to 25% of total bacterial protein. The expressed product existed in a form of inclusion body. After being partially purified and refolded, rhBMP-7m could heterotopically induce the formation of cartilage and bone tissue. **Conclusion:** The mature peptide of hBMP-7 has been successfully expressed in E. coli, and it lays the foundation for the study of biological activity and clinical practice.

Key words Gene expression; DNA, recombinant; Escherichia coli

骨形成蛋白(BMP)属于转化生长因子 β (TGF- β)超家族成员,具有诱导间充质细胞分化为骨和软骨的作用,对骨骼的胚胎发育和再生修复有重要意义^[1,2]。在已克隆出的 18 种人 BMP 中,国内对 BMP-2 的研究起步较早,也较为深入^[3],而 BMP-2 和 BMP-4、BMP-7 一同被认为在骨的发育和修复中起的作用最为重要,这其中的 BMP-7 除诱骨活性外,还在矫形修复、神经系统及造血等方面具有广泛的生物学活性,因而在基础研究和临床应用中都具有广阔的前景。本实验克隆了人骨形成蛋白 7(hBMP-7)完整成熟肽的编码基因,经温度诱导启动子的控制,在大肠杆菌中获得高效表达,表达量占菌体总蛋白的 21%,经纯化后得到较高纯度的 hBMP-7 完整成熟肽。

1 材料与方法

1.1 材料 ①菌株与质粒: 重组质粒 pGEB-7, 含有编码 hBMP-7 完整成熟肽的基因片段,由本人用 PCR 法从骨肉瘤细胞 U2-OS 的 λ gt 11 噬菌体表达文库中克隆得到^[4], 表达载体 pDH 由第四军医大学生化教研室提供, 大肠杆菌 DH5 α 为本所保存菌株。②试剂: 各种限制性内切酶、连接酶均为 Gibco 公司和 Promega 公司产品, 常用试剂为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法 ①hBMP-7 成熟肽基因片段与表达载体的重组、大肠杆菌的转化及阳性克隆的筛选参照《分子克隆实验指南》一书的方法。②目的蛋白的诱导表达: 含重组质粒的工程菌在含苄苄青霉素(100 g/L)的 LB 培养液中 32 °C 震荡培养过夜,次日按 3% 转接扩大培养,继续 32 °C 震荡 2 h 至 A600 约为 0.5 时,转入 42 °C 水浴中继续震荡培养 5 h。③SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE): 4 °C、10 000 r/min 离心 30 s

收集诱导后菌体,用含 3 ml/L β-巯基乙醇的上样缓冲液重悬菌体,100 °C 煮沸 5 min,采用 Leammli 不连续 PAGE, 55 g/L 浓缩胶, 100 g/L 分离胶,考马斯亮蓝 R-250 染色。④表达产物的纯化:400 ml 诱导表达菌液离心收集菌体,然后用 40 ml A 液(含 20 mmol/L pH 值为 8.0 的 Tris HCl, 125 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 5 ml/L DOC, 3 ml/L β-巯基乙醇,蔗糖 300 g/L)重悬菌体,冰浴中超声洗涤,离心后弃去上清液,再分别用 40 ml B 液(20 mmol/L pH 值为 8.0 的 Tris HCl, 2 mmol/L EDTA, 20 ml/L DOC, 3 ml/L β-巯基乙醇)和 C 液(20 mmol/L pH 值为 8.0 的 Tris HCl, 2 mmol/L EDTA, 2 ml/L Triton X 100, 2 mol/L 尿素)各洗涤包涵体 2 次,然后把初步纯化的包涵体置于 40 ml 包涵体溶解液(50 mmol/L pH 值为 6.5 的 Tris HCl, 0.1 mmol/L EDTA, 8 mol/L 尿素, 3 ml/L β-巯基乙醇)过夜溶解,离心除去沉淀,蒸馏水透析,浓缩,冻干。

2 结果

2.1 表达质粒 pDHB-7m 的构建 编码 hBMP-7 成熟肽的 cDNA 基因序列位于质粒 pGEB-7 中,其 5' 端含 Dra I 酶切位点和起始密码子 ATG, 3' 端含终止密码子 TAA 和 Pst I 酶切位点,在此质粒上 PCR 扩增目的基因片段^[4], Pst I 消化后琼脂糖凝胶电泳分离,回收 0.42 kb 片段;大肠杆菌表达载体 pDH 用 EcoRI 消化后, Klenow 补平酶切产生的 5' 凸出端,再用 Pst I 消化。在 T₄ 连接酶作用下,将 0.42 kb 片段克隆到表达载体 pDH 上(图 1),连接产物用氯化钙法转化大肠杆菌 DH5α,挑取转化菌落,提取质粒,用 Dra I 和 Pst I 进行酶切电泳分析,将正确的阳性克隆命名为 pDHB-7m(图 2)。

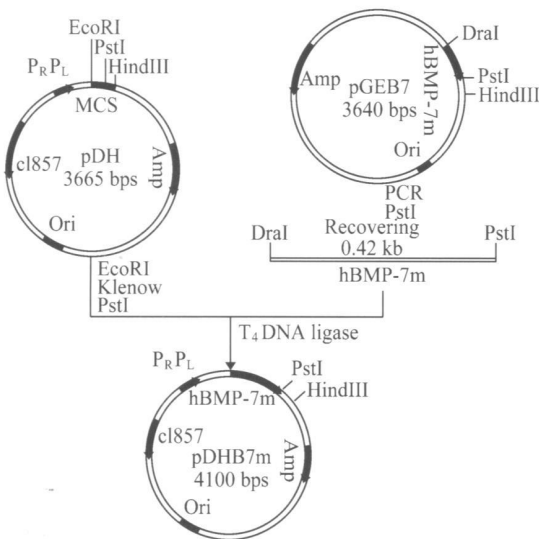


图 1 重组表达质粒 pDHB-7m 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant expression plasmid pDHB-7m

2.2 重组 hBMP-7 成熟肽在大肠杆菌中的表达和初步纯化 pDHB-7m 重组质粒以大肠杆菌 DH5α 为宿主菌,按方法②进行温度诱导表达,然后按方法③进行 SDS-PAGE,可见工程菌在分子质量 16 ku 处出现一条明显的新蛋白带,其含量随诱导时间的延长而增加,5 h 时最高,而后趋于稳定,5 h 诱导的工程菌经电泳薄层扫描显示新表达蛋白带约占菌体总蛋白

的 21%。取诱导表达后培养液上清、超声裂菌后的上清和沉淀, SDS-PAGE 分析表明目的蛋白以包涵体形式存在。包涵体按方法④洗涤和纯化处理后,纯度在 80% 以上(图 3)。

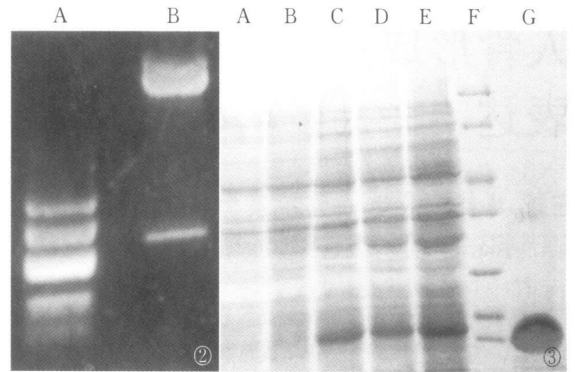


图 2 pDHB-7m 限制性酶切鉴定的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 A: DNA 标准分子量 Maker(由上至下依次为 587 bp, 458 bp, 323 bp, 289 bp, 174 bp) B: pDHB-7m 的 Dra I + Pst I 酶切图谱 图 3 rhBMP-7m 诱导表达后的 10% SDS-PAGE 结果 A: 含空质粒 pDH 的菌株 B: 未诱导的 pDHB-7m 工程菌 C-E: 分别诱导 1、3、5 h 的 pDHB-7m 工程菌 F: 蛋白质标准分子量 Maker(由上至下依次为 116.0ku, 66.2ku, 45.0ku, 35.0ku, 25.0ku, 18.4ku, 14.4ku) G: 纯化处理的 rhBMP-7m

Fig. 2 1.2% agarose gel electrophoresis pattern of restrictive fragments of recombinant plasmid pDHB-7m A: Standard molecular weight of DNA (from above to bottom are 587 bp, 458 bp, 323 bp, 289 bp, 174 bp) B: pDHB-7m + Dra I + Pst I Fig. 3 10% SDS-PAGE results after induced expression of rhBMP-7m A: Bacteria with empty plasmid pDH B: Non-induced engineered bacteria with pDHB-7m C-E: Induced engineered bacteria with pDHB-7m for 1, 3 and 5 h F: Standard molecular weight of protein (from above to bottom are 116.0ku, 66.2ku, 45.0ku, 35.0ku, 25.0ku, 18.4ku, 14.4ku) G: Partially purified rhBMP-7m

3 讨论

人骨形成蛋白 7cDNA 全长 1 878 bp, 其全长基因可在 COS、CHO 等真核细胞中表达为有活性的 hBMP-7 蛋白^[5],但翻译后的前体需要切除信号肽和前肽才能成为有活性的成熟蛋白分子。在机体内, BMP-7 主要存在于骨基质、肾、肾上腺以及骨肉瘤细胞中,是一种低分子量酸性疏水性糖蛋白,具有抗原性和同源性,能够无种属特异性的诱导间充质细胞和骨祖细胞分化为成骨细胞和成软骨细胞,促进骨和软骨缺损的修复和重建,而且在其作用下的再生骨的力学功能和生物学特征优于移植自体骨。有研究表明, BMP-7 复合碎多孔骨和异体移植骨应用于髌关节重建,在动物实验和初期临床实验中显示能够提高移植骨的活性,在短时间内即可形成足量新骨,效果优于单独使用异体移植骨^[6],可见 BMP-7 在关节损伤的治疗上亦有良好的应用前景。但是天然来源的 BMP-7 来源极少,限制了对其功能的研究和应用。

由于 BMP-7 基因结构复杂,在其成熟肽区域内 GC 含量较高,有若干在大肠杆菌中不常见的密码子存在,而且成熟肽的 C 端有 3 个糖基化位点和 1 个含 7 个半胱氨酸的 TGFβ 结构域,因而采用原核系统表达和表达产物的纯化复性比较困难。但是有文献表明,同属 BMP 一族的 BMP-2 在原核表达系统中的表达产物经过处理后是能够具有诱骨活性的^[7],

可见糖基化并非 BMP 活性所必需的,利用原核表达系统表达 BMP 7 是有得到具有生物学活性产物的前景和研究价值的。国外多用真核系统表达 BMP 7,此种方法虽然能得到有活性的目的蛋白,但是成本高、效率低,推广应用有一定难度。本研究利用计算机辅助设计合成的特异性引物,使 BMP 7 成熟肽基因在大肠杆菌中得到成功表达,SDS PAGE 分析,分子量为 16 ku,和预期一致,但是由于大肠杆菌缺乏糖基化系统,因而分子量低于在真核系统中表达得到的蛋白,而且需要进行纯化复性处理后才能具有活性。在本项研究中,采用了自行设计的纯化方法,经过简单的纯化处理后即得到了纯度较高的 BMP 7 成熟肽蛋白。BMP 7 成熟肽在大肠杆菌中的成功表达,为其功能研究和应用奠定了基础。

参考文献

- 1 Chen XQ, Kidder LS, Lew WD, et al. Osteogenic protein 1 induced bone formation in an infected segmental defect in the rat femur. *J Orthop Res*, 2002, 20(1): 142-150.

- 2 卢卫忠,贺小兵,唐康来,等. BMP 和 TGF β 对兔尺骨骨缺损修复作用的研究. *中国骨伤*, 2003, 16(3): 148-151.
- 3 李万民,赵明,徐杰,等. 猪骨 rhBMP 2 复合重组人工骨的研制及临床应用研究. *中国骨伤*, 2001, 14(12): 719-721.
- 4 王琦,柴玉波,李毅,等. 人骨形成蛋白-7 成熟肽 cDNA 的克隆和序列测定. *细胞与分子免疫学杂志*, 2000, 16(3): 213-214.
- 5 金丹,裴国献,王轲,等. hBMP 7 基因直接体内转染修复兔桡骨缺损实验研究. *骨与关节损伤杂志*, 2003, 18(5): 319-321.
- 6 Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, et al. Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein (BMP 7) in dogs. *J Bone Joint Surg (Am)*, 2003, 85(Suppl3): 116-123.
- 7 Pu Qin, Chen Sumin, Chen Nanchun. Expression of mature peptide of human bone morphogenetic protein 2 in *Escherichia coli*. *J Med Coll PLA*, 1998, 13(1): 40-42.

(收稿日期: 2004-09-15 本文编辑: 王宏)

• 短篇报道 •

跟骨骨折手术后切口不愈合原因分析及预防

程水明, 田小军, 彭文明

(桐庐县中医院, 浙江 桐庐 311500)

2002 年 4 月-2004 年 8 月,开展了跟骨骨折切开复位内固定手术 46 足,手术后共发生 8 足皮肤不愈合,报告如下。

1 临床资料

本组 42 例患者中,男 35 例,女 7 例;年龄 21~51 岁,平均 29 岁。均为高处坠落伤。共 46 足,左 19 足,右 27 足。伤后 1~2 d 就诊入院,均为跟骨闭合性骨折。

2 治疗方法

本组 42 例患者骨折类型均为累及关节骨折,于伤后 3~7 d 手术,平均手术时间 4.5 d。对单侧跟骨骨折采用侧卧位,双侧跟骨骨折采用俯卧位。均在止血带控制下手术,便于手术中对骨折部位的显露。均采用外侧切口,从跟腱止点外前缘,向远侧延伸到外踝前下,切开皮肤、皮下组织、深筋膜,骨膜下剥离,骨折在手术复位后用跟骨钛钢板固定。术中 C 形臂 X 线机透视,保持骨折满意复位,手术后 2~3 周拆线。

3 结果

42 例 46 足,38 足 I 期愈合,8 足切口于外踝尖后下处有 1~4 cm 没有愈合,无脓性分泌物,培养未见细菌生长,经局麻下切除边缘失活组织,重新缝合后愈合。

4 讨论

本组 46 足手术,有 8 足切口不愈合,相对于其他部位手术,这是比较高的。其原因,本人认为有以下几点:①局部解剖关系,由于足跟部位皮肤角质层较厚,血液循环相对较差,

愈合能力差。②手术操作,虽然采用全层切开,但是对于严重骨折的患者,手术时间较长,切口边缘牵拉时间长,破坏了局部的血液循环。③由于跟骨骨折发生跟骨短缩和高度的降低,在待手术期可以发生跟部皮肤一定程度的挛缩,以致骨折复位后造成相对的皮肤紧张缺损,创口皮肤缝合较困难和容易发生创口愈合困难,甚至发生创口裂开和感染。

针对以上原因,采取以下预防可以减少不愈合的发生:①严格手术适应证和手术时间,对于不涉及关节面的骨折和虽然涉及关节面但移位较小的患者,能够保守治疗的,不采用手术办法;对于可用简单方法的患者,则采用透视下经皮克氏针撬拨复位内固定等,患者伤后到医院一般患处都已肿胀明显,皮肤张力高,盲目手术必然增加皮肤不愈合的可能性,必须抬高患肢,等待肿胀消退后手术。②规范操作。由于跟部的解剖特点,切口分层剥离容易破坏血供,手术必须皮肤切开后直至跟骨,做骨膜下剥离,显露骨折,术中可以采用数根克氏针做切口皮肤边缘牵拉替代拉钩;避免阔拉钩长时间强力牵拉,有条件透视下复位,尽量减少手术时间。③手术后要抬高患肢,手术后 24 h 开始脚趾被动活动,48 h 开始趾和踝的主动活动,并逐渐加强。应用甘露醇、双氢克尿噻、氨苯喋啶促进肿胀消退,手术后 1~2 d,患足足背和踝关节用弹性绷带缠绕,可以减少渗出,减轻患部肿胀,减少皮肤不愈合可能。

(收稿日期: 2005-08-09 本文编辑: 李为农)