

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

大腸桿菌異源表現人類血小板衍生生長因子

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNBT93-03

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：張竣凱

共同主持人：黃怡仁

計畫參與人員：洪偉傑

執行單位：生物科技系

中華民國 94 年 2 月 21 日

中文摘要

人血小板衍生生長因子（PDGF）具有癒傷的生理活性，能夠增加粒狀組織的形成。在美國已有使用含 0.01% 人類重組血小板衍生生長因子的羧甲基纖維素鈉膠（NaCMC）於遠端神經性糖尿病潰瘍的治療。國外已有添加 PDGF 的化妝品出現，以幫助面部潰瘍的修復。本研究將人類 PDGF-B 的基因選殖於大腸桿菌載體，以酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)及西方墨點法証實已經成功的將合成於細胞內的重組 PDGF-B 產物送出於培養基中。以 super broth 培養基與大腸桿菌菌株 HB101 於三角瓶振盪培養，可獲得最高的 PDGF-B 產率。

關鍵字：人類血小板衍生生長因子，異源蛋白質表現，融合蛋白質

英文摘要

PDGF is a non-glycosylated protein that belongs to the family of dimeric cystine knot growth factors. There is considerable interest in the therapeutic potential of PDGF antagonists and agonists. The production of large quantities of PDGF is therefore desirable, and the simplest way to achieve this is by recombinant DNA technology. In this study, the human PDGFB gene was subcloned into an *E. coli* expression vector, pEZZ18, and the gene product was successfully secreted into growth medium as expected. The growth medium and *E. coli* strain that most efficiently overexpressed recombinant PDGFB were super broth and HB101, respectively, in the shake-flask studies.

Key words: PDGF-B, recombinant protein, fusion protein

前言

人血小板衍生生長因子（PDGF）具有癒傷的生理活性，能夠增加粒狀組織的形成。在美國已有使用含 0.01% 人類重組血小板衍生生長因子的羧甲基纖維素鈉膠（NaCMC）於遠端神經性糖尿病潰瘍的治療（Habenicht *et al.*, 1990; Robson *et al.*, 1992; Meyer-Ingold 1993; Szabo *et al.*, 1995）。此外，國外已有添加 PDGF 的化妝品出現，以幫助面部潰瘍的修復。於人類的血液中，發現 PDGF 有三種形態存在，而且均為 dimer (PDGF-AA, PDGF-BB 及 PDGF-AB) (Hart *et al.*, 1990; Hamacher *et al.*, 1988)。其為非醣化蛋白質 (non-glycosylated protein) (Isaacs, 1995)，而且只有以 dimer 形態，才具有生理活性。為了達到量產的目的，使用基因工程來異源表現及純化是最佳的選擇。已有多篇文獻，例用細菌、酵母菌及動物細胞表現 PDGF-BB。不過其效率不佳或者所表出來的蛋白質不具有生理活性。由於微生物的細胞質的還原性較高的狀態，而 PDGF-BB 需由雙硫鍵(disulfide bond)結合為 dimer，在這還原性較高的環境下，其雙硫鍵無法正確的形成，所表現出來的蛋白質均以 inclusion body 的不溶形態於細胞中。為了改善這個問題，必需將蛋白質變性後，再 renature 回來。不過效率不佳，同時難度也高。若將表現出來的蛋白質，送出 (secrete) 至培養基中，則可改善這個問題。本研究的目標是將 PDGFB-BB 以融合(fusion)蛋白質的方式於大腸桿菌中表現，並將其送至 (secrete) 培養然後純化。

材料與方法

PDGFB 基因選殖與質體建構

人類 PDGFB 基因由楊寧正醫師提供，並由黃怡仁於台糖研究所 subcloned 於 *E. coli* expression 載體 pEZZ18 (Amersham Pharmacia, USA)。質體以化學法分別轉殖於 JM109, HB101 三株不同的宿主細胞中，並以限制酶分析與平板式電泳確認質體的存在。

E. coli 培養

帶在含人類 PDGFB 之 pEZZ18 載體 *E. coli* 培養於含有 75 μ g/mL 抗生素 ampicillin 的不同培養基，以三角瓶振盪培養 (250 rpm)。生長速率的比較以分光光度計測定培養液於 600 nm 的吸光值。使用的培養基組成如下表：

LB	2XYT	Super broth	TSY
10 g tryptone	16 g tryptone	25g tryptone	30 g Tryptic-soybroth
5 g yeast extract	10 g yeast extract	15 g yeast extract	5 g yeast extract
5 g NaCl	5 g NaCl	5 g NaCl	

ELISA

取 $100 \mu\text{L}$ 的 sample(每個時間點的上清液)coat 至 96 well plate 並保存在 4°C over night。以 anti-human PDGFB polyclonal 抗體做為一級抗體及以 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG 為二級抗體進行反應。

Western immunodetection

培養液中的蛋白質溶液以 10% 的 SDS-PAGE 分開後，轉漬至 nitrocellulose 膜。轉漬於膜上的蛋白質以 anti-human PDGFB polyclonal 抗體做為一級抗體及以 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG 為二級抗體進行偵測。

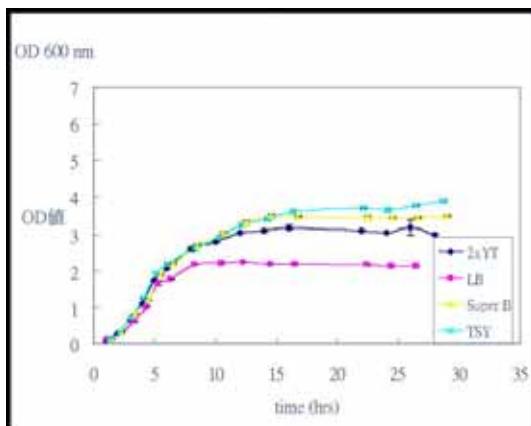
PDGFB 融合蛋白純化

將由釀酵槽所之釀酵液注入自行組裝的含 IgG sepharose 層析管柱，經清洗後再以醋酸沖提出。以偵測 280 nm 的吸光做為觀察蛋白質被沖提出的情形。

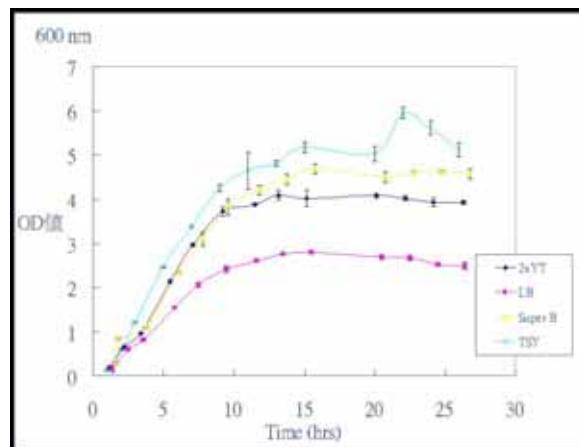
結果與討論

培養基對不同 *E. coli* 菌株的生長影響

由於 pEZZ18 是個 noninducible 的表現載體，所以理論上選殖於此載體的基因會隨著宿主的生長表現。為了得到較高的重組蛋白產率，必需選擇最佳的宿主與培養基。以三角瓶於 37°C 恒溫振盪培養箱培養，並取樣測定 600 nm 的吸光以比較生長速率。結果顯示，HB101 培養於 TSY 培養基時可得到最多的細胞數(圖一，圖二)。



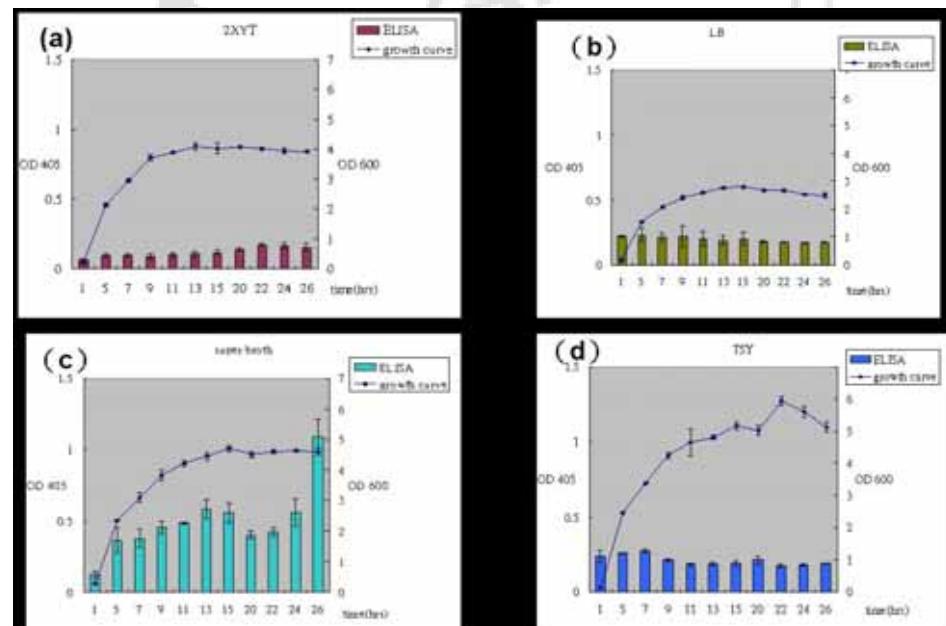
圖一 帶有 pEZZ18-PDGFB 質體之 JM109 於不同培養基的生長曲線



圖二 帶有 pEZZ18-PDGFB 質體之 HB101 於不同培養基的生長曲線

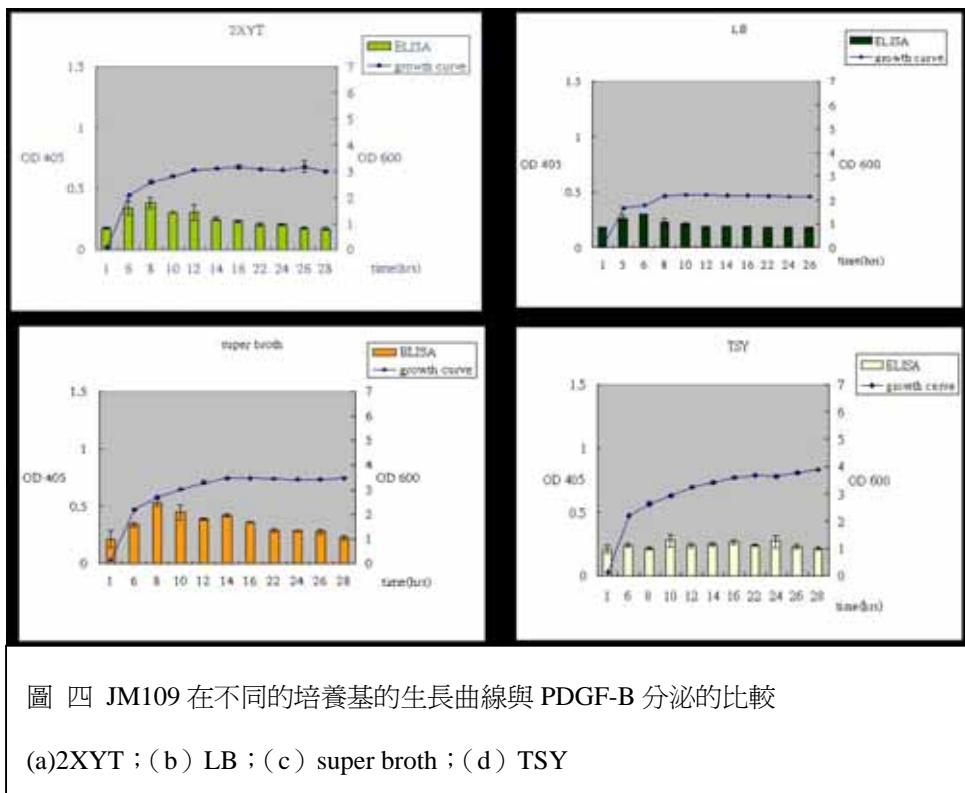
不同培養基與宿主的重組 PDGFB 表現情形

由於 PDGFB 的表現與分泌至培養基能力也可能受到宿主與培養基的影響，我們以 ELISA 的方式來測定 PDGFB 被分泌於培養基的含量。結果顯示，以 HB101 為宿主及培養於 super broth 時的 PDGFB 產量最高(圖三，圖四)。



圖三 HB101 在不同的培養基生的長曲線與 PDGF-B 分泌的比較

(a)2XYT ; (b) LB ; (c) super broth ; (d) TSY



PDGFB 純化
分泌於培養基的 PDGFB 注入自行 pack 的 IgG sepharose 管柱後，以 acetic acid 沖提出，經 SDS-PAGE 與 wesetern immunodetection，証實得到重組人類 PDGFB(圖五，六，七)。

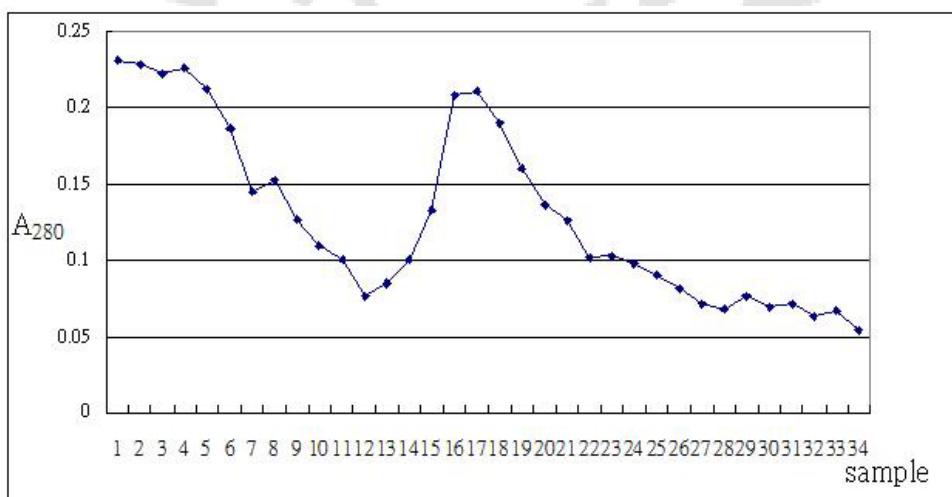


圖 五 Chromatogram of PDGFB eluted from IgG sepharose column.

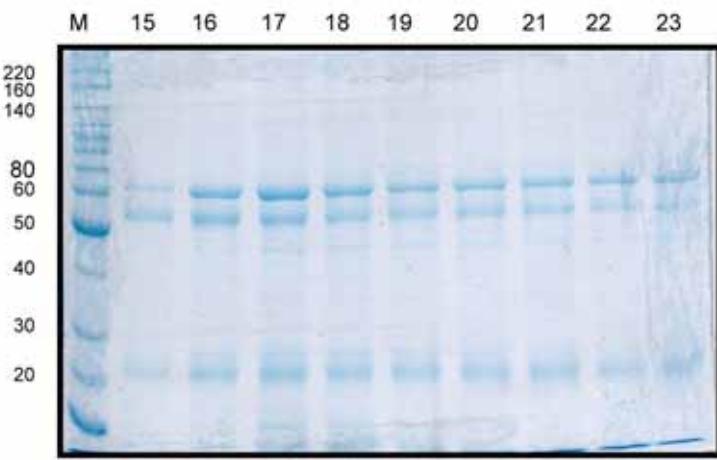


圖 六 由 IgG sepharose 層析所得樣品之 SDS-PAGE 分析結果



圖 七 由 IgG sepharose 層析所得樣品經 Western 分析結果。PDGFB 的位置以箭頭表示。

結論

利用 *E. coli* 蛋白質表現載體 pEZZ18 可成功的將重組人類 PDGFB 於 *E. coli* 中表現，並使其分泌至培養基中。利用這個技術可以簡化純化的步驟，並較可能得到和原來的立體結構相似蛋白質。雖然本研究已經成功的表現及部份純化重組人類 PDGFB，不過利用這個技術所獲得的 PDGFB 是否具有生理活性仍待探討。

參考文獻

- Habenicht, A.J.R., Salbach, P., Janßen-Timmen, U., Blattner, C., Schettler, G. (1990) Klin. Wochenschr. 68: 53
- Hamacher, A., Hellman, U., Johnsson, A., Osttman, A., Gunnarsson, K., Westermark, B., Wasteson, A., Heldin, C-H. (1988) J. Biol. Chem. 263: 16493
- Hart, C. E., Bailey, M., Curtis, D. A., Osborn, S., Raines, E., Ross, R., Forstrom, J. W. (1990) Biochemistry 29: 166
- Isaacs, N. W. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 391
- Meyer-Ingold, W. (1993) Trends Biotechnol. 11: 387
- Robson, M.C., Phillips, L.G., Thomason, A., Robson, L.E., Pierce, G.F. (1992) Lancet 339: 23
- Szabo, S., Kusstatscher, S., Sakoulas, G., Sandor, Z., Vincze, A., Jadus, M. (1995) Scand. J. Gastroenterol. 30 (Suppl. 210) 15

