

重组角质细胞生长因子-1 在杆状病毒表达系统中的表达及其生物活性研究

朱小静 姜 潮* 薛 萍 王晓艳 徐 丹 南 佳 艾 君 李校堃*

(温州医学院药学院 浙江省生物技术与制药工程重点实验室 温州 325035)

摘要 目的:利用杆状病毒载体表达系统(baculovirus expression vector system, BEVS)表达重组角质细胞生长因子-1(KGF-1),并对其进行鉴定纯化及活性测定。方法:PCR 扩增角质细胞生长因子-1 基因(*KGF-1*)序列,克隆到 pFastBac 杆状病毒转座载体,经酶切测序鉴定出阳性重组转座载体 pFastBac-kgf1 后,转化含有穿梭载体 Bacmid 的 DH10Bac 感受态细胞,蓝白斑筛选出阳性质粒 Bacmid-kgf1,转染 *Spodoptera frugiperda* (sf9) 昆虫细胞。对收获的蛋白进行 SDS-PAGE、Western blot 鉴定。利用肝素亲和层析柱和阳离子交换柱对目的蛋白进行纯化, BaF3 细胞检测细胞增殖活性,并利用 C57BL/6 小鼠检测促毛囊增殖活性。结果:分子量约 21 kDa 的 KGF-1 在昆虫细胞中实现了表达。病毒侵染细胞 48 h 时开始表达目的蛋白,到 96 h 时表达量达到最高;且感染复数 multiplicity of infection(MOI)为 4 时表达量较好。经过纯化之后,蛋白纯度达到 90% 以上,蛋白产量达 2 mg/L。纯化之后的蛋白对转染 FGFR2 IIIb 的 BaF3 细胞在 0.10 ng/ml-1.56 ng/ml 之间有促增殖活性,呈剂量依赖关系。并且 KGF-1 处理后小鼠毛囊增殖效果有所加强。

关键词 角质细胞生长因子-1 sf9 细胞 杆状病毒表达系统

中图分类号 Q78

角质细胞生长因子-1(keratinocyte growth factor-1, KGF-1),即 FGF-1,是成纤维细胞生长因子家族(FGFs)中的一员。最早于 1989 年,由 Rubin 等^[1]首次从人胚胎性肺纤维细胞中提取获得。KGF-1 由间质细胞产生,通过旁分泌途径与上皮细胞上的特异性受体 FGFR2 IIIb 结合,从而促进上皮细胞的增殖^[2]。人源 *KGF-1* 的 cDNA 序列是由 194 个氨基酸编码的单链多肽^[3],成熟的 *KGF-1* 是由去掉 N 端 31 个氨基酸信号肽^[4]的 163 个氨基酸残基组成的多肽,相对分子质量为 26~28 kDa,与肝素有高度亲和力^[5]。2004 年,美国 FDA 批准了 Amgen 公司生产的重组人源 KGF-1 药物 Palifermin,用于治疗血癌患者高剂量化疗引起的口腔黏膜炎^[6]。但由于重组蛋白存在表达量低、稳定性差等原因,严重制约了该药在临床上的应用及药理研究。

杆状病毒表达载体系统(BEVS)是 1983 年由 Smith 等^[7]建立,具有蛋白表达水平高、周期短、对目的蛋白有翻译后修饰作用等优势。经过学者们多年来不断地研究改进,现已广泛用于生物制药、基因工程及疫苗的研究及生产当中。

本实验欲运用杆状病毒表达载体系统表达成熟的 KGF-1 蛋白,希望能够获得具有生物活性的重组蛋白,为 KGF-1 的表达研究奠定基础并开拓新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体及菌种 含有 *KGF-1* 基因序列(昆虫密码子优化)的 PUC57 载体、pFasBac 载体、*E. coli* DH10Bac 菌种、*E. coli* DH5 α 菌种均由本实验室保存。

1.1.2 试剂 Ex-Taq 酶、限制性内切酶、DNA Marker 2 000、DNA 连接试剂盒均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。高纯质粒小量制备试剂盒、琼脂糖凝胶

收稿日期:2012-11-20 修回日期:2012-12-17

* 通讯作者,电子邮箱:proflixk@163.com

DNA 回收试剂盒购自 BioTeke 公司。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、PVDF 膜购自碧云天生物技术研究。KGF 单克隆抗体购自 R&D 公司。辣根过氧化物酶标记的驴抗鼠抗体购自 Santa Cruz 公司。Cellfectin II Reagent 购自 Invitrogen 公司。sf900 II SFM 1×、sf900 II SFM 1.3×细胞培养基均购自 Gibco 公司。苏木素、伊红染色液购自碧云天生物技术研究。引物由 Inovogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 设计引物 PCR 扩增 *KGF-1* 基因片段 PUC57 载体中包含编码 *KGF-1* 全长的 194 个氨基酸序列。本实验预表达的成熟 *KGF-1* 由去掉信号肽后的 163 个氨基酸组成。运用 Primer 5.0 软件设计含有 *Not* I 和 *Pst* I 酶切位点的上游引物和下游引物,得到目的片段。

上游引物:5'-GCGGCCGCATGTGTAACGAC-3';下游引物:5'-CTGCAGTTAGGTGAT-3';PCR 扩增体系:Ex-Taq 酶 0.25 ul,10×Ex buffer 5 ul,dNTP Mixture 4 ul,pUC57-kgf1 1 ul,上游引物 1 ul,下游引物 1 ul,dd H₂O 37.75 ul,混匀。PCR 反应条件:94℃预变性 3 min;94℃30 s;55℃30 s;72℃40 s,共 25 个循环,72℃后延伸 8 min,PCR 产物切胶回收。

1.2.2 重组 pFasBac-KGF-1 载体的构建 同时对 pFastBac 质粒及 *KGF-1* 基因进行 *Pst* I、*Not* I 双酶切,切胶回收酶切产物。DNA 连接试剂盒连接大小片段,16℃过夜。将连接产物转化感受态 DH5α,37℃培养 16~18 h,挑取单菌落进行 PCR 及酶切鉴定,将鉴定正确的菌液送华大基因测序。

1.2.3 重组 Bacmid-KGF-1 载体的构建 将测序正确的 pFastBac-KGF-1 质粒转化含有 Bacmid 及 helper 质粒的 DH10Bac 感受态,37℃培养过夜,通过蓝白斑筛选出阳性单菌落进行 PCR 鉴定,运用目的基因 *KGF-1* 上游引物和 Bacmid 质粒含有的 M13 下游引物。

1.2.4 重组杆状病毒的获得 将鉴定正确的 Bacmid-KGF-1 质粒与 Cellfectin Reagent 混合均匀,室温孵育 30 min。六孔板中铺对数生长期的 sf9 细胞,约每孔 80 万,静置贴壁 15 min。将转染混合液滴加到细胞上,27℃培养。5 h 后轻轻吸除上清液,添加 sf900 II 培养基 2 ml,27℃培养。每天观察细胞形态,待到 75% 细胞发生病变时收获培养基和细胞,500r/min 离心 5 min,取上清即 P1 病毒。4℃避光加 2% FBS 保存备用。取 P1 病毒连续感染昆虫细胞 2 次后即获得 P3 病毒。

利用噬斑法测定 P3 代病毒滴度:取对数生长期细

胞接种于六孔板中,每孔约 50 万细胞,室温贴壁孵育 1 h。准备连续稀释的病毒,取 10⁻³ 到 10⁻⁸ 连续六个稀释梯度。将细胞上清弃掉,立即加入 1 ml 每个稀释度的病毒,室温孵育 1 h。将 4% 琼脂糖与 1.3×sf900 培养基按 1:3 比例混和均匀,制成覆盖物。移除病毒后迅速加入覆盖物。静置 30 min 后,27℃一定湿度条件下孵育 7~10d,每天观察噬斑数直到连续 2d 计数不变。按照公式计算病毒滴度。

滴度 (pfu/ml) = 噬斑数 × 稀释倍数 × 1/每孔病毒体积

1.2.5 *KGF-1* 蛋白的表达与鉴定 取对数生长期悬浮培养昆虫细胞,细胞密度 2×10⁶ 个/ml。用 P3 代病毒进行转染,27℃、无 CO₂、110r/min 悬浮培养。分别于 24,36,48,60,72,84,96,108,120 h 收获细胞上清。并取同样生长状态下细胞五瓶,用不同感染复数 MOI 感染细胞,96 h 后收获蛋白。取相同体积上清液加 5×SDS loading buffer 后煮沸 10 min。SDS-PAGE 电泳后,取下聚丙烯酰胺凝胶,300 mA 转膜 100 min,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,3% 牛奶按照 1:3 000 比例稀释鼠源 FGF-1 单抗,Ⅰ抗孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,1:7 000 稀释驴抗鼠二抗,室温孵育 Ⅱ抗 1h,TBST 洗涤 3 次,曝光。

1.2.6 *KGF-1* 蛋白的纯化 收获转染病毒后的细胞上清,上样于 50mmol/L PB 平衡过的肝素亲和柱上,用含有 0.3mol/L,0.45mol/L,0.6mol/L NaCl 的 50mmol/L PB 进行梯度洗脱,将各部分洗脱样跑 SDS-PSGE 分析目的蛋白洗脱位置。

收集含有目的蛋白 *KGF-1* 的洗脱样品,用蛋白超滤管进行蛋白超滤除盐处理。将除盐后的样品上到 50mmol/L PB 平衡的阳离子交换柱,用含有 0.3mol/L,0.4mol/L,0.45mol/L,0.6mol/L,1.2mol/L NaCl 的 PB 进行梯度洗脱,将各部分洗脱样跑 SDS-PSGE 分析目的蛋白洗脱位置。

1.2.7 *KGF-1* 蛋白细胞活性测定 BaF3 细胞为转染 FGFR2 IIIb 的转基因细胞,FGFR2 IIIb 为 *KGF-1* 的特异性受体。因此 *KGF-1* 能够促进 BaF3 细胞的增殖。于 96 孔圆底板中加入 100 ul 饥饿培养基后梯度稀释 *KGF-1*。起始蛋白浓度为 100 ng/ml,二倍稀释,终止浓度为 0.1 ng/ml。加药后每孔铺大约 10 000 细胞,37℃、5% 二氧化碳培养 48 h。每孔加 MTT 25 ul,37℃、5% 二氧化碳培养 4 h。2 500r/min 离心 10 min 后小心移除每孔上清,加入 200 ul 二甲基亚砷震荡 10 min 至沉淀完全溶解,以 630 nm 为参比波长,于波长 570 nm

处测定吸光度,记录测定结果。

1.2.8 KGF-1 蛋白动物活性测定 C57BL/6 小鼠是研究毛囊生长的常用的动物体系之一。该小鼠躯干皮肤的黑素细胞只存在于毛囊中,而且仅在生长期时合成黑色素使皮肤变成黑色,而退行期皮肤变成灰色,休止期皮肤变为粉红色,因此可根据皮肤颜色大致判断毛发生长周期情况^[8]。16 只近交系小鼠编号,采用随机排列表法分为 KGF-1 给药组和阴性对照组,每组 8 只。给药组每天按 1 mg/kg 剂量皮下注射 KGF-1 一次,连续 3d;阴性对照组注射生理盐水。第 4d,小鼠经水合氯醛麻醉后剃毛,将脱毛膏涂于背部去毛,以小鼠背部光滑无伤无毛根为净。诱导毛发由休止期进入生长期。

每日观察小鼠毛发生长情况。记录小鼠背部颜色变黑时间、变灰黑时间、及持续黑色时间。脱毛后第九天每组处死小鼠 3 只,取背部皮肤多聚甲醛固定后石蜡包埋、切片后苏木素伊红染色观察毛囊生长情况。

2 结果

2.1 Bacmid-KGF1 表达载体构建示意图

杆状病毒表达载体 Bacmid-kgf1 的构建,如图 1 所示。

2.2 KGF-1 基因 PCR 扩增鉴定

KGF-1 基因由 163 个氨基酸组成,全长 489 bp。以克隆有 KGF-1 基因的 PUC57 载体为模板,PCR 扩增目的基因片段。将产物进行琼脂糖凝胶电泳,在 500 bp 左右可见特异性目的条带(图 2)。

2.3 重组穿梭载体 pFastBac-KGF-1 双酶切鉴定结果

提取 pFastBac-KGF-1 质粒,用 *Pst* I、*Not* I 进行双酶切鉴定,酶切后在大小片段位置预期结果一致(图 3)。

2.4 重组杆状病毒载体的鉴定

以 Bacmid-KGF-1 质粒为模板,KGF-1 上游引物及 M13 下游引物进行 PCR,对重组杆状病毒进行鉴定。结果显示在大约 1 000bp 位置处有目的条带出现,与预计结果一致(图 4)。

2.5 转染病毒后昆虫细胞形态鉴定

重组杆状病毒载体在转染试剂的介导下侵染昆虫细胞,72 h 后于光学显微镜下观察到被侵染的细胞与正常细胞相比,变大,变圆,出现细胞破裂,证明杆状病毒已经包装完成,成为成熟杆状病毒(图 5)。

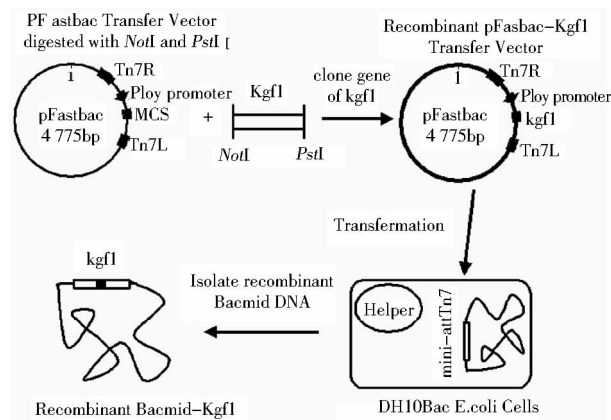


图 1 杆状病毒表达载体的构建

Fig.1 Construction of recombinant baculovirus expression vector, Bacmid-KGF-1

The coding sequence of the human KGF-1 gene was cloned into baculovirus transfer vector pFastbac between *Not* I and *Pst* I restriction enzyme sites. The pFastbac-KGF-1 transfer vector was transformed into DH10Bac cells and the transposition occurred between the mini-Tn7 element on the pFastbac vector and the mini-attTn7 target site on the bacmid. This reaction occurred in the presence of transposition proteins supplied by the helper plasmid. Then, the Bacmid-KGF-1 vector was isolated from DH10Bac cells

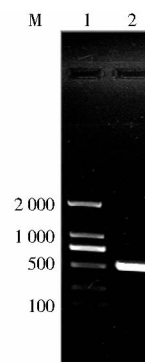


图 2 PCR 扩增 KGF-1 基因

Fig.2 PCR product of KGF-1 gene

1: DNA Marker DL 2000; 2: KGF-1 gene

2.6 KGF-1 蛋白的表达

P3 代病毒转染细胞后于不同时间点收获相同体积细胞上清进行 Western blot 鉴定。结果证明,转染 48 h 开始表达蛋白,96 h 时蛋白的表达量较高;MOI 为 4h 蛋白表达相对较高(图 6)。

2.7 KGF-1 蛋白纯化

将收获的细胞及上清上样于肝素亲和柱,从洗脱样品 SDS-PAGE 条带来看(图 7a),目的蛋白在含有

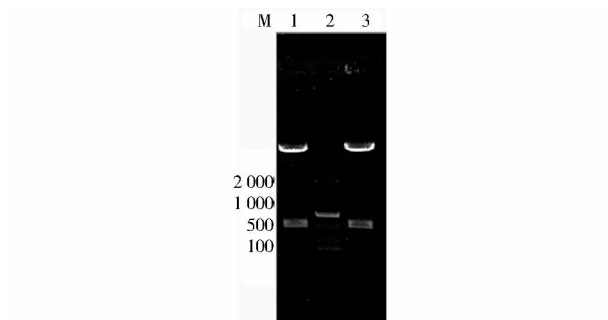


图3 pFastbac-KGF-1 双酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pFastbac-KGF-1

1, 3: pFastbac-KGF-1 digested with *Pst* I -*Not* I ;
2: DNA Marker DL 2 000

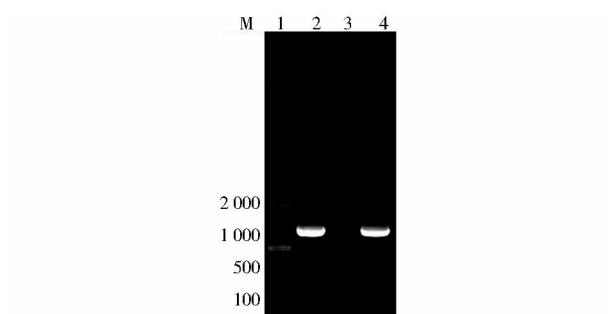


图4 PCR 鉴定重组杆状病毒 DNA

Fig.4 Identification of recombinant baculovirus DNA by PCR

1: DNA Marker DL 2 000; 2,4: Bacmid transposed with pFastbac-KGF-1; 3: Negative control

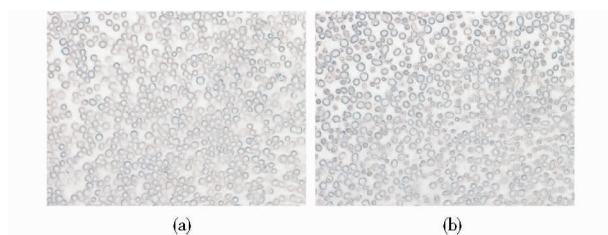


图5 正常及感染后的sf9细胞

Fig.5 Normal sf9 and sf9 cells infected after 72h

(a) Normal sf9 cells (b) sf9 cells infected 72h

0.6mol/L NaCl 的 PB 中被洗脱下来。将此部分蛋白样品进行超滤除盐后,上样于阳离子交换柱,目的蛋白在含有 0.6mol/L NaCl 的 PB 中被洗脱下来(图 7b)。由 SDS-PAGE 条带分析结果显示,蛋白纯度达到 90% 以上。

2.8 KGF-1 蛋白促 BaF3 细胞增殖实验

酶标仪检测 570 nm 处吸光度后将数据整理后作

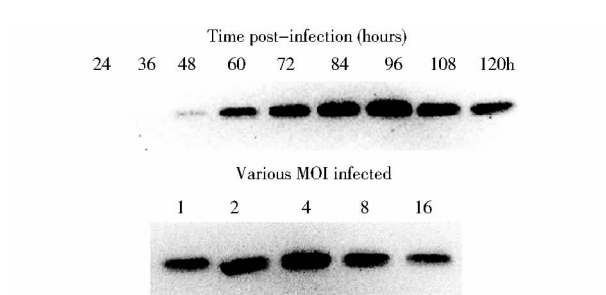


图6 Western blot 检测不同时间表达蛋白表达情况

Fig.6 Detection of expression of recombinant KGF-1 protein in different infection time by Western blot

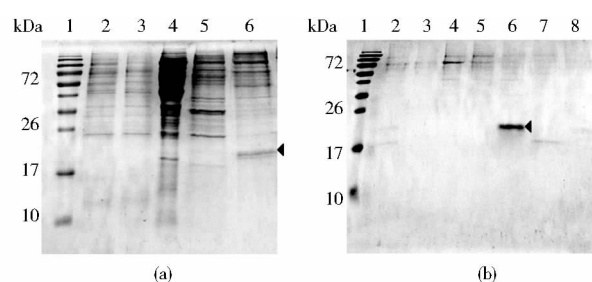


图7 KGF-1 蛋白纯化结果

Fig.7 Purification of KGF-1

A: Purification by heparin affinity chromatography, lane 1 was prestained protein ladder; 2 was crude sample; 3 was flow-through; 4 was 0.3mol/L NaCl eluted fraction; 5 was 0.45mol/L NaCl eluted fraction; 6 was 0.6mol/L NaCl eluted fraction; B: Further purification by SP cation exchange chromatography, 1 was prestained protein ladder, 2 was crude sample, 3 was flow-through, 4 was 0.3mol/L NaCl eluted fraction, 5 was 0.4mol/L NaCl eluted fraction, 6 was 0.45mol/L NaCl eluted fraction, 7 was 0.6mol/L NaCl eluted fraction, 8 was 1.2mol/L NaCl eluted fraction

图(图8)。结果显示 KGF-1 对 BaF3 细胞有明显的促增殖活性,在 0.1 ng/ml ~ 1.56 ng/ml 之间呈剂量依赖性。

2.9 KGF-1 蛋白促小鼠毛囊增殖实验

KGF-1 给药组与阴性对照组小鼠背部毛发生长情况如表 1。给药组小鼠背部皮肤变黑时间与阴性对照组相比明显缩短,变灰时间没有显著性差异,然而持续黑色时间显著延长。第九天处死小鼠如图 9, KGF-1 给药组(9b)背部皮肤颜色呈黑色,阴性对照组(9a)呈暗粉色。取背部皮肤切片并染色后可以看出, KGF-1 给药组(9d)小鼠毛囊已经开始形成,对照组尚未看到毛囊(9c)。

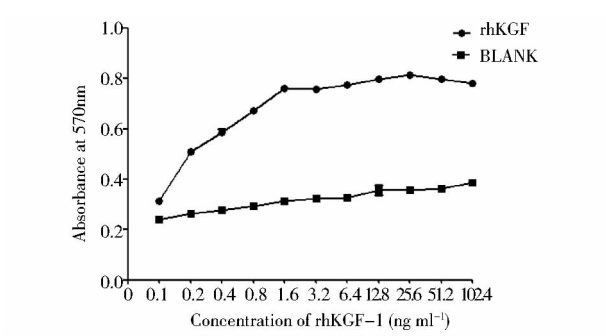


图8 KGF1 促 BaF3 细胞增殖研究
Fig.8 KGF1 promoted BaF3 cells proliferation

表1 小鼠背部脱毛区皮肤颜色变化时间比较
Table 1 Comparison of the time of skin darkening in the back of mice

分组	皮肤颜色变黑时间	皮肤颜色变灰黑时间	皮肤颜色持续黑色时间
KGF-1 给药组	8.37 *	17.5	9.13 *
阴性对照组	10.25	18.0	7.75

* Compared with the negative control group, $P < 0.01$

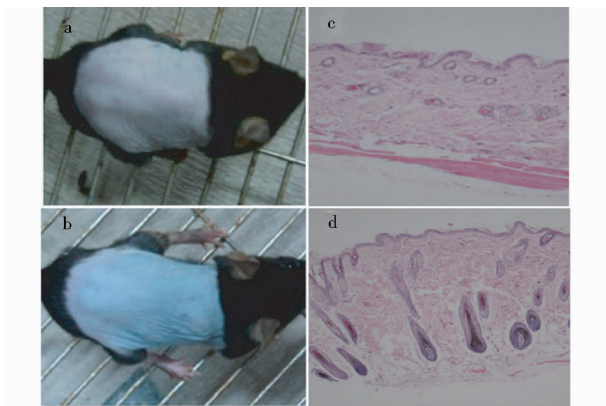


图9 脱毛后第九天小鼠毛囊生长状态比较
Fig.9 Comparison of hair follicles in mice on the ninth day after hair removal

(a) Mice in negative control group (b) Mice in KGF-1 injection group (c) Hair follicles (Negative control group), H&E staining (d) Hair follicles (KGF-1 injection group), H&E staining

3 讨论

KGF-1 作为成纤维细胞生长因子家族中的一员,由间质细胞表达分泌,其受体分布于上皮细胞,能够特异性地促进上皮细胞增殖及分化,与器官发育、创面修复、肿瘤发生及免疫重建等多方面关系密切^[9]。目前对 KGF-1 蛋白的重组表达研究主要从三种形式进行,

即重组全长 KGF-1;截去 N 端 31 个氨基酸信号肽的成熟形式;成熟形式 N 端截去 23 个氨基酸的截短形式 (DeltaN23-KGF)。世界卫生组织对这三种形式蛋白明确制定了制备方法,剂量剂型参考标准^[10]。

重组 KGF-1 及其突变体曾经在大肠杆菌、哺乳动物细胞 CHO 及植物中表达过,但仍存在一定的问题。KGF-1 在大肠杆菌中表达量低,Ron 等^[11]为了提高重组 hKGF-1 的表达量,把 hKGF-1 信号肽的前 30 个氨基酸去掉,目的蛋白的表达量也只有全菌蛋白的 1% ~ 2%;卓山龄等高密度培养大肠杆菌来表达 KGF-1^[12],ELISA 检测得到 KGF-1 可溶性蛋白 108μg/L。在市售该蛋白的生物学活性方面,Prospec's 生产的重组 KGF-1 同样在 *E. Coli* 细胞中表达,产物是一个没有糖基化的单链,肽链含有 164 个氨基酸,分子量 18.995 kDa,ED50 通过 KGF-1 剂量依赖型刺激 BaF3 指示细胞反应 < 10ng/ml。

杆状病毒载体表达系统 (BEVS) 用于表达外源重组蛋白具有许多自身的优势:(1) 较高的克隆容量:能够容纳较大的外源基因插入而不影响表达;(2) 周期短:杆状病毒转染起 1 ~ 2 周即可完成蛋白的表达与纯化;(3) 能够对目的蛋白进行翻译后加工:昆虫细胞对蛋白的翻译后加工与哺乳动物细胞十分接近,表达的外源蛋白接近自然产物,具有较高生物活性。

本实验室前期已经完成了 KGF-1 截短型 (DeltaN23-KGF) 在昆虫细胞中的表达研究^[13]。本实验对成熟 KGF-1 的 cDNA 进行昆虫细胞密码子优化,与杆状病毒一起成功转染了 sf9 昆虫细胞。将转染后不同时间点收获蛋白进行 Western blot 鉴定,结果显示:自转染 48 h 时开始表达目的蛋白,96 h 时达到表达量最大值(图 5)。转染 96 h 后收获的蛋白经肝素亲和层析柱及阳离子交换柱后,纯度达到 90% 以上(图 6)。纯化后蛋白产量经 BCA 法检测为 2mg/L,与大肠杆菌产量相比有所提高。且纯化后的 KGF-1 促进 BaF3 细胞增殖实验数据表明(图 7):该蛋白能够明显促进细胞增殖,并且在 0.10 ng/ml-1.56 ng/ml 之间呈剂量依赖性,ED50 值明显小于 Prospec 公司生产的重组 human KGF-1。推测是因为,sf9 昆虫细胞对目的蛋白进行了部分翻译后的加工修饰,有助于提高其对细胞的促增殖活性。在促小鼠毛囊增殖实验中,KGF-1 给药组的小鼠毛发生长状况与阴性对照组相比明显增强,有促进毛囊生长的作用(图 9)。然而在图 6B 中,第 6 孔道 0.45mol/L NaCl 洗脱出目的蛋白后,第 7 孔道中

0.6mol/L NaCl 洗脱样中约 17 kDa 位置有蛋白出现,怀疑是纯化或者储存过程中蛋白发生了部分降解的原因。因此对于如何提高该蛋白的稳定性方面还需要更深入的研究。

参考文献

- [1] Rubin J S, Osada H, Finch P W, et al. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(3):802-806.
- [2] Rubin J S, Bottaro D P, Chedid M, et al. Keratinocyte growth factor as a cytokine that mediates mesenchymal-epithelial interaction. *Exs*, 1995, 74:191-214.
- [3] Kelley M J, Pech M, Seuanez H N, et al. Emergence of the keratinocyte growth factor multigene family during the great ape radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(19):9287-9291.
- [4] Finch P W, Rubin J S, Miki T, et al. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, 1989, 245(4919):752-755.
- [5] Wen J, Hsu E, Kenney W C, et al. Characterization of keratinocyte growth factor binding to heparin and dextran sulfate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1996, 332(1):41-46.
- [6] Blijlevens N, Sonis S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. *Annals of Oncology*, 2007, 18(5): 817-826.
- [7] Smith G E, Fraser M J, Summers M D. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *Journal of Virology*, 1983, 46(2):584-593.
- [8] Slominski A, Paus R. Melanogenesis is coupled to murine anagen: toward new concepts for the role of melanocytes and the regulation of melanogenesis in hair growth. *Journal of Investigative Dermatology*, 1993, 101, 90S-97S.
- [9] Zong X L, Cai J L, Jiang D Y, et al. Research progress on keratinocyte growth factor. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 2009, 23(2):188-193.
- [10] Robinson C J, Das R G, Maile P. The World Health Organization reference reagent for keratinocyte growth factor, KGF. *Growth Factors*, 2006, 24(4):279-284.
- [11] Ron D, Bottaro D P, Finch P W, et al. Expression of biologically active recombinant keratinocyte growth factor. Structure/function analysis of amino-terminal truncation mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(4):2984-2988.
- [12] Zhuo S L, Sun J P, Chen P, et al. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli* expressing human keratinocyte growth factor. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2011(01):82-87.
- [13] Xue P, Zhu X J, Liu X J, et al. Studies on recombinant truncated human keratinocyte growth factor1 (rhKGF1D23) expression in insect cells. *Journal of Jilin University*, 2012, 38(4):633-639.

Expression and Purification of Biological-active Recombinant Human Keratinocyte Growth Factor-1 Base on Baculovirus Expression Vector System

ZHU Xiao-jing JIANG Chao XUE Ping WANG Xiao-yan XU Dan NAN Jia AI Jun LI Xiao-kun
(Wenzhou Medical College, Key Laboratory of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering of Zhejiang Province, Wenzhou 325035, China)

Abstract Objective: the keratinocyte growth factor-1 (KGF-1) was expressed base on baculovirus expression vector system (BEVS). Methods: *KGF-1* gene was amplified by PCR and then the product was cloned into the pFastBac vector at the *Not I* and *Pst I* sites. The recombinant plasmid pFastBac-kgf1 was identified by enzyme digestion and sequencing. The recombinant pFastBac-kgf1 was transformed into *E coli* DH10Bac cells which contains a baculovirus shuttle vector (bacmid) and a helper plasmid. The recombinant Bacmid-kgf1 was identified by Blue-white selection and then transfected sf9 insect cells. P3 baculoviral stock was used to product KGF-1 protein at varying MOIs (1,2,4,8,16) and different times after infection (24,36,48,60,72,84,96,120 hours after infection). The protein KGF-1 was identified by SDS-PAGE and Western Blot and purified with

heparin affinity column and cation-exchange column. And its activity was analyzed by BaF3 cells. Conclusion: After infection happened 48 h, KGF-1 was expressed by s9 cells and at 96 h the expression yield reached the highest level. And the optimum multiplicity of infection (MOI) was 4 pfu/cell. The purity of KGF-1 was more than 90% and the protein production was about 2 mg/L after purification. Mitogenic activity assay demonstrated that KGF-1 could significantly stimulate the proliferation of mouse BaF3 cells in a dose-dependent manner, ranging from 0.1 to 1.56 ng/ml. Besides, subcutaneously injection of KGF-1 could significantly stimulated the growth of hair follicles.

Key words Keratinocyte growth factor-1 s9 insect cells Baculovirus expression vector system