文章编号:1000-5404(2005)06-0529-03

论著

抗菌多肽葛佬素的原核表达纯化及活性鉴定

许 波[1],周 红[2],李慧增[1],鲁永玲[2],王良喜[2],丁国富[2] (第三军医大学:[1]西南医院口腔科,[2]基础医学部药理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 原核表达抗菌肽葛佬素,并对其生物学活性进行初步鉴定。**方法** 应用pET原核表达系统进行目的蛋白的表达,应用蛋白免疫印迹对蛋白进行鉴定,并采用鲎试剂法,对表达产物的生物活性进行初步鉴定。**结果** 体外表达产物经蛋白免疫印迹鉴定,为融合有聚组氨酸标签的葛佬素抗菌肽,鲎试剂检测结果表明,该表达产物对LPS有明显的中和活性。**结论** 在原核表达系统中成功表达了具有生物活性的抗菌肽葛佬素。

关键词:葛佬素;抗菌肽;原核表达;内毒素
中图法分类号:R394.3; R977.6 **文献标识码**:A

Prokaryotic expression, purification and identification of anti-bacterial peptide gloverin

XU Bo[1], ZHOU Hong[2], LI Hui-zeng[1], LU Yong-ling[2], WANG Liang-xi[2], DING Guo-fu[2] ([1]Department of Stomatology, Southwest Hospital, [2]Department of Pharmacology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express anti-bacterial peptide gloverin in prokaryotic system and investigate its bioactivity. **Methods** *E. coli* BL21 was used to express gloverin. Western blot was used to identify the production and Tachypleus Amebocyte Lysate (TAL) was used to detect the bioactivity of the production. **Results** The production was identified as gloverin peptide by Western blotting, and the TAL data indicated that the production could neutralize LPS. **Conclusion** Anti-bacterial peptide gloverin is successfully expressed in *E. coli* BL21.

Key words: gloverin; anti-bacterial peptide; prokaryotic expression; lipopolysaccharide

葛佬素(gloverin)是从蚕蛹中发现的昆虫抗菌肽,葛佬素既能够拮抗 G^- 菌,又能结合内毒素(LPS),阻断LPS的生物学效应[1,2],目前对于该抗菌肽的研究主要集中在理化特性、生物活性等方面,尚少见体外表达方面的研究。此前,我们应用体外快速翻译系统RTS500对葛佬素进行了表达,表达产物与LPS核心成分类脂A具有亲和活性(另文发表),由于体外表达可能在翻译后加工方面,如糖基化、磷酸化等与天然蛋白存在差异,因此在原核系统中表达葛佬素并进一步研究其生物学活性是有必要的。

本研究采用基因工程技术对葛佬素多肽进行原核表达,并观察表达产物对内毒素的中和活性,为葛佬素的进一步应用研究奠定理论基础。

基金项目:中关村科技生物医药创新研究基金(2001)
Supported by the Research Foundation for Innovative Projects of Biomedicine of Zhongguancun in China (2001)

作者简介:许 波(1974-),女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事口腔颌面外科方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)66810689
通讯作者:周 红,电话:(023)68752266

收稿日期:2004-09-27;**修回日期**:2004-11-16

1 材料与方法

1.1 质粒载体和菌株

原核表达质粒pIVEX2.3-G为本室构建并测序验证,含有葛佬素基因全部开放读框。

1.2 蛋白的原核表达

1.2.1 质粒的转化 质粒pIVEX2.3-G转化感受态大肠杆菌BL21(DE3),参照文献[3]。

1.2.2 IPTG诱导靶蛋白的表达 ①挑取转化的大肠杆菌菌落接种于10 ml含氨苄青霉素(50 μg/ml)的NZCYM培养液(上海生工生物公司),37 ℃培养过夜至饱和。②取5~10 ml过夜培养物接入150 ml含氨苄青霉素(50 μg/ml)的NZCYM培养液,37 ℃培养振荡培养至对数中期(A_{550} = 0.5~1.0)。③加入IPTG至终浓度1 mmol/L,37 ℃,振荡培养3 h后,于4 ℃以5 000×*g*离心15 min收集细胞,-20 ℃保存。④将-20 ℃保存的细胞放入4 ℃复温后按每克湿菌加入3 ml Lysis buffer(Qiagen公司)重悬菌体,在细菌悬液中加入β-巯基乙醇至终浓度10 mmol/L,苯甲酰磺酰氟(PMSF,美国sigma公司)至终浓度0.5 mmol/L,其中PMSF保持每30 min加1次。⑤将细胞悬液置于冰上按下列超声参数进行细胞裂解:功率300~400 W;25 s×20 s×30次(即超声25 s,间隔20 s)至菌液变清。⑥4 ℃,12 000 r/min×30

min 离心，分别收集上清及沉淀。

1.2.3 蛋白的纯化 蛋白纯化采用 Ni^{2+}-NTA 琼脂糖柱层析方法，参照美国 Qiagen 公司的操作说明书（货号 36111）。细菌裂解后蛋白电泳结果显示所表达蛋白大部分位于上清中，配制咪唑（pH 8.0）作为洗脱缓冲液：①菌液的裂解上清中加入 1 ml Ni^{2+}-NTA Agarose，4 ℃轻柔混匀 1 h。②1 000 × *g* 离心 10 s，收集上清。③上清中加入 2 ml Wash buffer，轻柔混匀后，1 000 × *g* 离心 10 s，收集上清。操作进行 2 次。④上清中加入 2 ml Elution buffer，轻柔混匀后，1 000 × *g* 离心 10 s，收集上清。操作进行 3 次，得到纯化的表达蛋白。

1.2.4 纯化蛋白的鉴定 ①SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，考马斯亮蓝染色[4]。②Western Blot：一抗为 Roch 公司提供的小鼠 Anti-His6，二抗为 HRP（辣根过氧化物酶）标记的羊抗小鼠 IgG 抗体（美国 Santa Cruz 公司），增强化学发光显色（美国 Pierce 公司试剂盒）。

1.2.5 蛋白浓度及纯度的检测 ①纯化蛋白浓度的检测采用 Folin-酚法[3]；②纯化蛋白纯度检测采用高压液相色谱法（HPLC，Beckman），测试分析在第三军医大学临床微生物教研室完成。

1.2.6 鲎试剂法检测表达蛋白的生物学活性 试剂盒购自湛江安度斯生物有限公司，参照文献[5]完成。

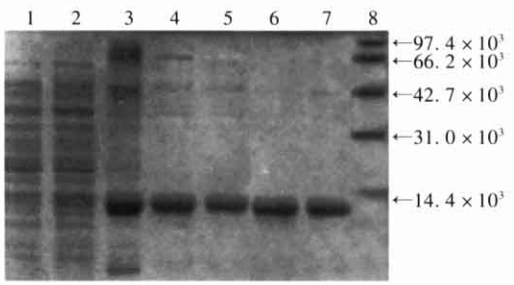
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 原核表达产物的鉴定

菌液经 IPTG 诱导，超声破碎处理后，SDS-PAGE 电泳结果表明，表达蛋白大部分位于上清中（图 1）。上清液经 Ni^{2+}-NTA-Agarose 纯化后，脱盐得到较纯的单一蛋白条带，分子量约 14×10^3 的蛋白条带，符合抗菌肽葛佬素分子量大小（图 1）。

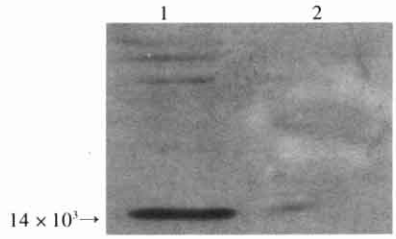


1,2: Sediment after ultrasonic disruption; 3: Supernatant after ultrasonic disruption; 4 - 6: Elution buffer; 7: Protein after desalination; 8: Protein marker

图 1 原核表达蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

Fig 1 Prokaryotic expression of protein identified by SDS-PAGE

经 Ni^{2+} 柱层析纯化后，脱盐后表达产物用蛋白免疫印迹鉴定，结果如图 2，洗脱液蛋白能够被特异性的抗 His-Tag 抗体识别。结合本实验的设计策略，可以认为葛佬素目的蛋白在大肠杆菌 BL21（DE3）细胞中得以成功表达。



1: Elution buffer; 2: Wash buffer

图 2 纯化后重组蛋白的免疫印迹检测

Fig 2 Purified recombinant protein detected by Western blotting

2.2 蛋白浓度和纯度的测定

Folin-酚法测定纯化后样品的 750 nm 吸光值为 1.635，计算出纯化后的重组蛋白浓度约为 870 μg/ml。采用高压液相色谱法（HPLC）检测 3 次纯化后的蛋白分布：结果表明纯化后目的蛋白占总蛋白量的 95.6%（图 3）。

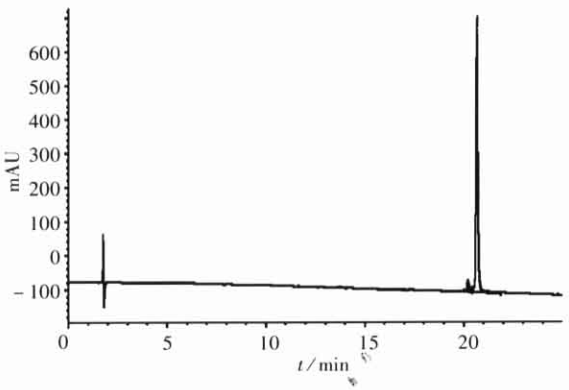


图 3 HPLC 检测重组蛋白的纯度

Fig 3 Purity of recombinant protein measured by HPLC

2.3 原核表达蛋白产物生物活性的初步鉴定

不同浓度的重组蛋白与 0.1 EU/ml LPS 标准品，37 ℃孵育振荡 60 min 后，以鲎试剂法测定内毒素含量，结果表明重组蛋白终浓度为 8、4、2 μg/ml 时，测得的内毒素值分别为 0.019 7、0.026 0、0.041 8 EU/ml，明显低于阳性对照（非中和组）0.051 1 EU/ml（$P < 0.05$），对内毒素的中和率分别达到 61.51%、49.17%、18.12%，说明重组葛佬素蛋白对 LPS 有明显的中和作用，并且呈明显的剂量效应关系。

3 讨论

葛佬素是一种高度稳定的抗菌多肽。周红等[6]根据已公开的葛佬素氨基酸序列，用该种族蛋白质的偏爱密码子设计葛佬素的 cDNA 序列，并成功构建了葛佬素真核表达载体 pBZHG，初步证实设计的葛佬素 cDNA 可在真核细胞 COS-7 中得到表达，表达产物具有杀灭大肠杆菌 J5。但是由于葛佬素在 COS-7 细胞中表

达量较低，大量表达葛佬素蛋白成为亟待解决的问题。

本实验中采用的表达载体 pIVEX2.3 属于 pET 载体系列，该载体带有 T_7 噬菌体启动子、信号序列、Amp 抗性及六聚组氨酸(His.tag)[7,8]。同时本实验采用的 pIVEX2.3 载体带有 ompT 信号序列，该序列可将表达的目的蛋白引导入细胞周质空间，有利于目的蛋白正确的折叠，从而保证该蛋白是以可溶性的活性形式存在。

本实验原核表达并纯化的产物经 SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色，以及免疫印迹鉴定，得到较纯的分子量约 14×10^3 的蛋白条带，该条带能够被抗 His-Tag 抗体识别，表明该蛋白是 IPTG 诱导的葛佬素融合蛋白。HPLC 结果显示，纯化后目的蛋白占总蛋白量的 90% 以上，说明层析纯化的效率较高。鲎试剂结果显示，原核表达的葛佬素蛋白能够中和内毒素，并有一定的剂量效应关系。

综上所述，抗菌肽葛佬素成功地在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达，并具有中和 LPS 活性，为进一步生物活性研究奠定了基础。

参考文献：

[1] Axen A, Carlsson A, Engstrom A, *et al*. Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of Hyalophora pupae[J]. Eur J Biochem, 1997, 247(2): 614 - 619.
[2] Mackintosh J A, Gooley A A, Karuso P H, *et al*. A gloverin-like antibacterial protein is synthesized in Helicoverpa armigera following bacterial challenge[J]. Dev Comp Immunol, 1998, 22(4): 387 - 399.
[3] 姜　泊，张亚历，周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京：人民军医出版社，1998. 56 - 64.
[4] 金冬雁，黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京. 科学出版社，2000. 821 - 830.
[5] 黄义德，叶锦林，唐良华. 一种简单实用的鲎试剂检测细菌内毒素法[J]. 福建师范大学学报(自然科学版)，2000, 16(3): 118 - 120.
[6] 周　红，郑　江，鲁永玲，等. 抗菌肽葛佬素在非洲绿猴肾细胞株 COS27 中的表达及其活性的初步分析[J]. 中华烧伤杂志，2003, 19(2): 86 - 88.
[7] Mootz H D, Blum E S, Tyszkiewicz A B, *et al*. Conditional protein splicing: a new tool to control protein structure and function *in vitro* and *in vivo* [J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(35): 10561 - 10569.
[8] Monteiro R A, Souza E M, Geoffrey Y M, *et al*. Expression, purification, and functional analysis of the C-terminal domain of Herbaspirillum seropedicae NifA protein[J]. Protein Expr Purif, 2003, 27(2): 313 - 318.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2005)06-0531-01

个案与短篇

米非司酮和甲氨喋呤联合治疗异位妊娠 30 例疗效分析

Combination of mifepristone and MTX in treating the ectopic pregnancy

马艳秋，杨少琴，田清玉　（河南大学淮河医院妇产科，开封 475000）

异位妊娠的发生率呈逐年上升趋势，随着诊断和治疗技术的进步，异位妊娠保守治疗正在国内外普遍开展。本研究应用米非司酮和甲氨喋呤(methotrexate, MTX)联合治疗异位妊娠 30 例，取得了较好的疗效，现报告如下。

1　资料与方法

1.1　研究对象

1995 年 1 月至 2002 年 1 月在我科住院经保守治疗的异位妊娠患者 60 例，分成试验组 30 例，对照组 30 例。每例均经血 HCG 检查，结合 B 超检查或后穹隆穿刺确诊。所有病人生命体征稳定，无明显腹腔内出血，无下腹痛或短暂下腹痛。B 超测定一侧附件包块 $\leq$ 6 cm，少量或无盆腔积液征；肝、肾功能正常，无米非司酮及 MTX 用药禁忌证。两组平均年龄、孕产次，平均停经天数，治疗前盆腔包块直径及血 HCG 水平均无显著差异($P>0.05$)。

1.2　治疗方法

试验组：米非司酮 50 mg/d，连服 3 d，同时 MTX 20 mg/d 肌肉注射，1 次/d，5 d 为 1 疗程。对照组单用 MTX，治疗方法同上，治疗期间观察腹痛、阴道流血和生命体征的改变，隔日查血常规，每周检查盆腔 B 超及血 HCG，治疗前后常规查肝、肾功能。

1.3　疗效评价

治疗成功：症状消失，盆腔包块缩小或消失，血 HCG 恢复正常。治疗失败：血 HCG 不降或上升，盆腔包块不缩小或增大，出现内出血征象。

1.4　统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 示，采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验。

2　结果

治疗效果：试验组 30 例中 27 治愈，治愈率 90%，对照组 30

（下转 534 页）

作者简介：马艳秋(1964 -)，女，河南省开封市人，副主任医师，副教授，主要从事妇产科临床与教育方面的研究。电话：13949438903

收稿日期：2004-05-02；修回日期：2004-10-21