2.4　融合蛋白的鉴定

Western blot化学发光(120 s/张)分析显示，经诱导的菌体裂解物与鼠抗His单克隆抗体反应，在相对分子质量约29×10^3处出现单一条带，而未经诱导的菌体裂解物则无此反应，说明所表达的融合有N端6×His的目的蛋白是正确的，见图5



M：蛋白标准；1：阴性对照；2－5：诱导蛋白

图5　重组蛋白的免疫印迹分析

3　讨论

烧伤后增生性瘢痕的发生机制尚不清楚，组织学上以成纤维细胞的过度增生和细胞外基质的过度聚集为特征[7]。细胞外基质、成纤维细胞和细胞因子是研究的热点。我们在基因芯片发现早期增生性瘢痕中P311基因表达显著差异后，通过构建P311蛋白诱饵表达载体，利用酵母双杂交系统筛选出与之相互作用蛋白HT036。HT036蛋白很可能是目前存在于哺乳动物细胞内的结构、功能未知的一种新蛋白，有可能与P311蛋白和内皮抑制素的作用机制有关[8]。最新NCBI蛋白序列比对提示HT036蛋白又名羟基丙酮酸异构酶同系物，而羟基丙酮酸异构酶在乙醛酸代谢通路中能特异性催化羟基丙二酸半醛向羟基丙酮酸转化，最后经由丝氨酸转变为丙酮酸盐[9,10]。但是HT036蛋白和增生性瘢痕有什么样的关系？在增生性瘢痕发生发展中起什么样的作用？这些都是值得我们去深入探讨的问题。

本实验在克隆了HT036基因编码序列后，构建至原核表达载体pET30a(＋)，经IPTG诱导后进行表达，由于pET30a(＋)载体带有6个连续组氨酸残基序列(6×His Tag)，在重组质粒进行诱导表达时，6×His Tag与HT036蛋白片段共同表达，为进一步鉴定和纯化提供了亲和位点。我们还探索了其最佳表达条件，从而为HT036蛋白的大量表达奠定了基础。总之，这些都将为我们后续探讨HT036蛋白在增生性瘢痕中的作用创造了条件，为了解增生性瘢痕的发生机制提供帮助。

参考文献：

[1] 马　兵，吴　军，易绍堂，等. 表达谱基因芯片筛选烧伤后增生性瘢痕相关基因的研究[J]. 中华创伤杂志，2001，17(6)：334－337.

[2] 马　兵，吴　军，易绍堂，等. 烧伤后早期增生性瘢痕相关细胞骨架基因表达研究[J]. 中华烧伤杂志，2002，18(1)：29－31.

[3] Studler J M, Glowinski J, Levi-Strauss M. An abundant mRNA of the embryonic brain persists at a high level in cerebellum, hippocampus and olfactory bulb during adulthood[J]. Eur J Neurosci, 1993, 5(6): 614－623.

[4] Fujitani M, Yamagishi S, Che Y H, *et al*. P311 accelerates nerve regeneration of the axotomized facial nerve[J]. J Neurochem, 2004, 91(3): 737－744.

[5] Pan D, Zhe X, Jakkaraju S, *et al*. P311 induces a TGF-beta1-independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype[J]. J Clin Invest, 2002, 110(9): 1349－1358.

[6] 袁顺宗，吴　军，易绍堂，等. 以酵母双杂交系统从成人肝cDNA文库中筛选与研究P311相互作用蛋白的基因序列[J]. 第三军医大学学报，2005，27(14)：1428－1431.

[7] 陈　璧. 增生性瘢痕机制研究进展[J]. 中华创伤杂志，2001，17(6)：325－326.

[8] 张宝林，贾向旭，苑晓玲，等. 酵母双杂交技术研究与内皮抑制素相互作用的蛋白质[J]. 军事医学科学院院刊，2003，27(3)：180－182，219.

[9] De-Windt F E, Van-Der-Drift C. Purification and some properties of hydroxypyruvate isomerase of *Bacillus fastidiosus*[J]. Biochim Biophys Acta, 1980, 613(2): 556－562.

[10] Ashiuchi M, Misono H. Biochemical evidence that *Escherichia coli* hyi(orf b0508, gip) gene encodes hydroxypyruvate isomerase[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1435(1－2): 153－159.

（编辑　薛国文）

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以Word格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或E-mail：aammt@mail.tmmu.com.cn(校外稿件请邮寄)。

本刊编辑部