论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1427-03

# 人 S100A2-GST 融合蛋白原核表达和纯化

卫 佳[1],王 胜[1],苗静琨[1],陈英华[1],李星星[1],吴丽美[1],左国伟[1],何通川[2], 周 兰[1]
(1. 重庆医科大学生物医学工程系,重庆 400016;2. 美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室,美国 Chicago IL 60637)

【摘 要】目的:制备人 S100A2-GST 融合蛋白(Human S100A2-GST fusion protein,hS100A2-GST),为进一步研究人 hS100A2 蛋白的功能及其与其它因子或系统的相互作用奠定基础。方法:从 pHAHA-hS100A2 中双酶切获取 hS100A2 基因,亚克隆至原核表达载体 pGST-moluc, 构建 pGST-moluc-hS100A2, 转化 BL21 后酶切鉴定,IPTG 诱导重组菌表达融合蛋白 hS100A2-GST, 再经过 Glutathion-Sepharose 4B 球珠分离纯化、SDS-PAGE 及 Western Blot 鉴定,Bradford 法蛋白定量。结果:*Xho* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ双酶切该重组质粒后获得 2 个片段,分别约 300 bp 和 5 kb,提示 pGST-moluc-hS100A2 构建正确;重组菌株经过 IPTG 诱导后,表达分子量约为 36 kD 的蛋白,产率达 5 mg/L 菌液;Glutathion-Sepharose 4B 球珠纯化后,该融和蛋白纯度达 92%;Western Blot 显示该蛋白可以被 S100A2 的抗体特异识别,证实其为 hS100A2-GST 融合蛋白。结论:成功构建了 hS100A2-GST 原核表达质粒 pGST-moluc-hS100A2;该质粒可在大肠杆菌中诱导表达 hS100A2-GST 融合蛋白,产率高;应用 Glutathion-Sepharose 4B 球珠可获得纯度达 92%的该蛋白。为后续有关 hS100A2 的研究打下了基础。

【关键词】人 S100A2-GST 融合蛋白;诱导表达;蛋白纯化;蛋白鉴定
【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-07

# Expression and purification of human S100A2-GST fusion protein in prokaryotic cells

*WEI Jia, et al*
(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To obtain human S100A2-GST fusion protein for further research on human S100A2(hS100A2)protein function and its interactions with other proteins and systems. *Methods*: hS100A2 gene from pHAHA-hS100A2 was subcloned into an expression vector pGST-moluc to construct pGST-moluc-hS100A2.The new plasmid was identified by digestion with *Xho* Ⅰ and *EcoR* Ⅰ.The recombinant BL21 was induced with IPTG to express recombinant fusion protein hS100A2-GST,which was purified by Glutathion-Sepharose 4B ball beads,identified by SDS-PAGE and Western Blot,and quantified by Bradford method. *Results*: After the digestion,the recombinant plasmid was cutted into two fragments,300 bp and 5kb.After treated with IPTG,the recombinant BL21 strain expressed a protein,which was about 36 kD and was recognized specifically by anti-hS100A2. Its yield was 5 mg/L bacterial culture. After isolated by Glutathion-Sepharose 4B ball beads,its purity was 92%. *Conclusion*: hS100A2-GST expression plasmid pGST-moluc-hS100A2 was constructed successfully. hS100A2-GST fusion protein could be expressed in Escherichia coli with higher yield and isolated with higher purity,which lays the foundation for the follow-up of the hS100A2 research.

【Key words】 HumanS100A2-GST fusion protein;Induced expression;Protein purification;Protein identification

S100 家族是一类 EF- 手型钙结合蛋白,通过与钙离子的结合等,在体内发挥多种生物学作用。目前发现该家族至少有 25 个成员,其中 21 个成员的基因定位在人染色体 1q21 上,该区染色体稳定性差,易发生人染色体重排,与肿瘤关系密切。S100A2 是 S100 家族中与肿瘤关系密切的成员之一。有研究发现其在前列腺癌、肺腺癌、乳癌等肿瘤组织中以及头颈肿瘤的转移淋巴结中表达下调[1-3];而在另一些肿瘤中表达增高,如:Barrett 食管腺癌、食管鳞癌和皮肤的一些上皮肿瘤[4-6]。提示其可能与肿瘤的进展和预后有关。但是,其在肿瘤发生发展过程中的作

作者介绍:卫 佳(1979- )女,硕士,
研究方向:分子肿瘤学。
通讯作者:周 兰,女,教授,E-mail:zhoulan0111@gmail.com。
基金项目:国家自然科学基金(30340039);教育部"春晖计划"科研启动经费资助项目(2003 年);2004 年重庆市留学回国人员启动基金。

用及机制都有待进一步探讨。

本研究利用基因重组技术将 hS100A2 基因插入原核表达载体 pGST-moluc 中,在大肠杆菌中诱导表达,并用谷胱甘肽 - 琼脂糖 4B 球珠(Glutathion-Sepharose 4B beads)分离纯化出高浓度的人 S100A2-GST 融合蛋白(Human S100A2-GST fusion protein,hS100A2-GST)为我们进一步研究 hS100A2 蛋白的功能及其与其它因子或系统的相互作用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

pGST-moluc、pHAHA-hS100A2 质粒为美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室馈赠;限制性核酸内切酶、DNA 连接试剂盒购自 Takara 公司;质粒小量抽提试剂盒购自天为时代公司;IPTG、Bradford 蛋白定量试剂盒、细菌蛋白提取试剂盒购自 Bio Basic Inc; 预染的蛋白质分子量标准购自 Fermertans; 丙烯酰胺、还原型谷胱甘肽购自 Amresco; Glutathion-Sepharose 4B 球珠购自 Amersharm Biosciences;蛋白酶抑制剂 Protease Inhibitor Cocktail Tablets 购自 Roche。

### 1.2 pGST-moluc-hS100A2 表达质粒的构建

质粒提取参照质粒抽提试剂盒说明书进行。用 *Nhe* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ酶切质粒 pHAHA-hS100A2 和 pGST-moluc 后,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,DNA 回收试剂盒回收 hS100A2 基因片段和 pGST-moluc 质粒片段。再用 DNA 连接试剂盒快速连接,构建 pGST-moluc-hS100A2 重组质粒。

### 1.3 重组质粒转化大肠杆菌及提取质粒酶切鉴定

制备感受态的大肠杆菌 BL21,加入重组质粒置冰浴 30 min,42℃热休克 90 s,再放冰上 2 min;加入 LB 培养基,37℃振荡培养 45 min 后,将菌液铺于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,倒置 37℃孵箱过夜,次日观察菌落,并挑取数个菌落分别培养后,提取质粒经 *EcoR* Ⅰ单酶切和 *Xho* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ双酶切后电泳,结果与限制性内切酶图谱对照分析,鉴定宿主细菌重组质粒。

### 1.4 hS100A2-GST 融合蛋白的诱导表达

在氨苄青霉素抗性平板上挑取鉴定的含构建正确的 pGST-Moluc-hS100A2 质粒的 BL21 重组菌, 接种入 5 ml 含氨苄青霉素(200 μg/ml)的 LB 培养基中,37℃,200 r/min 振荡培养过夜。次日按 1∶100 稀释培养过夜的菌液 3 h,待菌液 $OD_{600}$=0.4 ~ 0.6 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG[7],继续培养 4~6 h。离心收集菌体置于冰上待用或置于 -80℃保存备用。

### 1.5 谷胱甘肽-琼脂糖 4B 球珠的的预处理

将购得的谷胱甘肽 - 琼脂糖 4B 球珠储存液摇匀,吸取适量的混悬液至离心管,4℃,1 000 g 离心 5 min,吸弃上清;再用冰冷的 PBS 洗涤球珠 1 次,沉淀用等体积冰冷的 PBS 重悬,制成 50%谷胱甘肽 - 琼脂糖 4B 球珠混悬液, 保存于 4℃备用。

### 1.6 hS100A2-GST 融合蛋白的分离纯化

在上述收集所得的菌体沉淀中加入蛋白酶抑制剂用冰 PBS 重悬溶解, 冰上超声裂解,0.1%曲拉通 Triton-X100 处理,冰上摇动孵育 3 h 后离心,所得上清液用 50%的 Glutathion-Sepharose 4B 球珠亲合纯化。冷 PBS 洗涤沉淀的球珠 3 次,再用适量谷胱甘肽 - 琼脂糖球珠洗脱缓冲液洗脱 3 次,离心后收集上清。取所得的上清液 10 μl 进行 SDS-PAGE,考马司亮蓝染色、凝胶成像仪采集图像,并用 Quantity One 软件分析纯化效果,其余的分装后保存于 -80℃。

### 1.7 Western Blot 鉴定融合蛋白

取适量纯化所得的融合蛋白,以 pGST-Moluc 转化 BL21 后的诱导表达产物 GST 蛋白为阴性对照,加入 5 × SDS 凝胶加样缓冲液, 煮沸后取 10 μl 上样,SDS-PAGE,Western Blot 进行鉴定。

### 1.8 融合蛋白的定量(Bradford 法)

按 Bio-Rad Protein Assay 说明书操作,在 751 分光光度计的 595 nm 处读取吸光度值 $A_{595}$;以 $A_{595}$ 值为纵坐标、浓度为横坐标绘制牛血清白蛋白(BSA)标准曲线,并据之计算出所制备的融合蛋白的浓度和产量。

整个实验以 pGST-Moluc 为对照质粒,同时进行 GST 的诱导表达、分离纯化和鉴定。

## 2 结 果

### 2.1 pGST-moluc-hS100A2 表达质粒的鉴定

pGST-moluc-hS100A2 的图谱见图 1。在 hS100A2 基因的两侧有 *Xho* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ酶切位点,用这两个酶对该质粒进行双酶切后产生的 300 bp 和 5 kb 左右的 2 个片段与图谱符合(见图 2)。提示质粒构建正确。

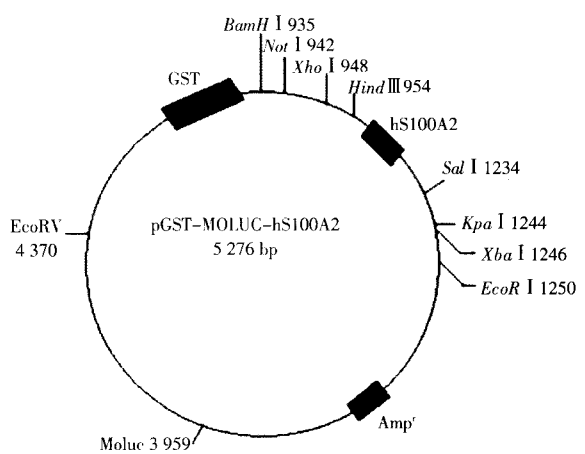
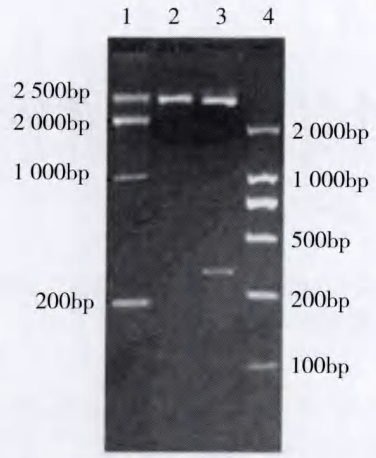



图 1 pGST-moluc-hS100A2 质粒图谱




1. marker 1；2. *EcoR* Ⅰ单酶切质粒；3. *Xho* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ双酶切该质粒；4. marker

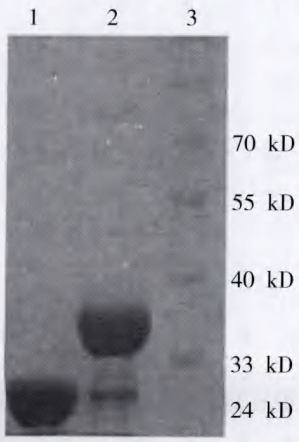
**图 2　pGST-moluc-hS100A2 的酶切鉴定**

### 2.2　融合蛋白纯度分析

利用与琼脂糖偶联的谷胱甘肽与 GST 之间的特异结合能力，将 GST 融合蛋白从细菌总蛋白溶液中分离出来，并通过还原型谷胱甘肽洗脱，使融合蛋白与球珠分离，离心得到的上清中即含有分离纯化的融合蛋白。取 10 μl 上样，通过 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色后，可见位于大约 36 kD 处的 hS100A2-GST 条带，以及位于 26 kD 处的 GST 条带，参见图 3。用 Quantity One 软件分析，其纯度接近 92%。

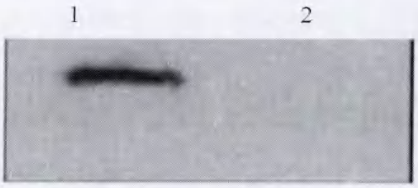
### 2.3　Western Blot 鉴定融合蛋白

Western blot 分析发现：pGST-Moluc-BL21 诱导表达产物泳道上没有杂交条带出现，而 pGST-Moluc-hS100A2-BL21 诱导表达产物泳道上则呈现出一条较明显的杂交条带，见图 4。进一步提示该质粒构建正确并能够成功表达 hS100A2。




1. 纯化后的 GST；2. 纯化后的 GST-S100A2；3. marker

**图 3　重组蛋白纯度分析**




1. GST-S100A2 融合蛋白；2. GST

**图 4　Western Blot 鉴定 GST-S100A2 融合蛋白**

### 2.4　融合蛋白的定量测定

采用 Bradford 法绘制的牛血清白蛋白（BSA）标准曲线如图 5 所示，测得 hS100A2 重组蛋白在 3 次洗脱液中的浓度分别为 4.0 mg/ml、2.5 mg/ml 和 2.25 mg/ml，3 次洗脱液体积分别为 300 μl、300 μl 和 250 μl，计算得出 1 L 菌液共收获约 5 mg 蛋白。

## 3　讨　论

S100A2 是 S100 家族中与肿瘤关系密切的成员之一。其基因定位于染色体 1q21，该区稳定性差，与肿瘤关系密切。以前的研究发现 S100A2 是 S100 家族中唯一与肿瘤呈负相关的蛋白，即在肿瘤细胞中表达缺失或者减低，故称抑癌基因。但是进一步的研究却发现了 S100A2 可能有促瘤活性，因此进一步探讨 S100A2 在肿瘤发生发展过程中的作用及机制具有重要意义。

为此，本研究选择 pGEX 系列表达载体表达 hS100A2-GST 融合蛋白来研究其生物学功能和作用。该表达载体表达的融合蛋白既易于制备，纯度较高，且保持有外源蛋白的生物学活性。我们通过基因重组技术将 hS100A2 基因插入融合表达载体 pGST-moluc 中构建了质粒 pGST-Moluc-hS100A2，经过 *Xho* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ双酶切鉴定，其所产生的两个片段与限制性内切酶图谱相符，提示质粒构建成功。

将质粒转化大肠杆菌，经 IPTG 诱导表达融合蛋白 hS100A2-GST。随后利用谷胱甘肽偶联球珠分离出融合蛋白，再经含有还原型谷胱甘肽的洗脱缓冲液洗脱，离心后在上清中得到纯化的融合蛋白。对纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色以及 Western blot 鉴定，证实诱导表达的融合蛋白为 hS100A2-GST，且纯度达 92%，与通常报道的一步亲和层析可分离纯化纯度 90%以上蛋白一致；这也进一步明确了该融合蛋白质粒构建正确。Bradford 测定 1 L 诱导表达的菌液中获得了 5 mg 融合蛋白。这为我们进一步研究人 hS100A2 的功能及其

论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1430-04

# 家蝇幼虫抗菌肽对阴沟肠杆菌感染小鼠创面的抗菌活性

陈 曼[1],文阳安[2],刘银河[2],周义文[3],涂植光[2]

(1. 成都医学院医学检验系,成都 610083;2. 重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016;3. 深圳市孙逸仙心血管医院检验科,深圳 518035)

【摘 要】目的:观察抗菌肽对阴沟肠杆菌感染小鼠创面的抗菌作用。方法:超声处理诱导家蝇幼虫产生抗菌肽,经分离纯化后,体外实验分析抗菌肽的抑菌特性。取 ICR 小鼠 30 只,切除背部 1 cm × 1 cm 全层皮肤,涂抹阴沟肠杆菌菌液作为感染模型,随机分为 3 组。伤后 2 h 和每天各组分别用等渗生理盐水、100 g/L 的磺胺米隆或 0.1 g/L 抗菌肽滤纸湿敷,伤前和伤后 3 d 抽血观察白细胞变化;伤后 3 d 痂下肌肉组织细菌定量和计算存活率。结果:抗菌肽纯化蛋白对阴沟肠杆菌的抑菌活性较强;术后 3 组白细胞记数均减少,对照组显著低于其他两组($P<0.05$);痂下肌肉组织细菌定量抗菌肽组($99 \pm 32$) $\times 10^2$ CFU/g 和磺胺米隆组($87 \pm 31$) $\times 10^2$ CFU/g,均显著低于对照组($504 \pm 338$) $\times 10^3$ CFU/g($P<0.01$);对照组伤后 3 d 存活率明显少于其他两组($P<0.05$)。结论:超声处理能诱导家蝇幼虫产生抗菌肽,其对阴沟肠杆菌感染的 ICR 小鼠创面有较强抗感染作用。

【关键词】家蝇;抗菌肽;超声诱导;伤口感染;阴沟肠杆菌

【中国图书分类法分类号】Q514.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-03

# Antibacterial effect of the antibacterial peptide from housefly larvae on *Enterobacter cloacae* infected wound in mice

*CHEN Man, et al*

(*School of Laboratory Medicine, Chengdu College of Medicine*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the antibacterial effects of the antibacterial substances on *Enterobacter cloacae* infection of wound in mice. *Methods*: Antibacterial substances of the larvae of housefly were induced by ultrasonic treatment, and its antibacterial activity was investigated with inhibition experiment in vitro. Thirty ICR mice were enrolled in the study, and the *Enterobacter cloacae* infection model was reproduced by excision of the full layer of dorsal skin with an

作者介绍:陈 曼(1980- ),女,硕士,研究方向:天然抗菌肽。

通讯作者:涂植光,男,教授,E-mail:tuzhiguang@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目(30472106)。

与其它因子或系统的相互作用奠定了基础。在随后的研究中我们也证实了该融合蛋白具有生物学活性。

(致谢:感谢美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室全体研究人员;感谢重庆医科大学生物原子工程系技术人员。)

## 参 考 文 献

[1] Gupta S, Hussain T, MacLennan G T, et al. Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(1): 106-112.

[2] Matsubara D, Niki T, Ishikawa S, et al. Differential expression of S100A2 and S100A4 in lung adenocarcinomas: clinicopathological significance, relationship to p53 and identification of their target genes[J]. Cancer Sci, 2005, 96(12): 844-857.

[3] Zhang X, Hunt J L, Shin D M, et al. Down-regulation of S100A2 in lymph node metastases of head and neck cancer[J]. Head Neck, 2007, 29(3): 236-243.

[4] Ok-Jae L, Seung-Mo H, Mohammad H R, et al. Expression of calcium-binding proteins S100A2 and S100A4 in barrett's adenocarcinomas[J]. Neoplasia, 2006, 8(10): 843-850.

[5] Imazawa M, Hibi K, Fujitake S, et al. S100A2 overexpression is frequently observed in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2005, 25(2B): 1247-1250.

[6] Park H R, Min S K. Expression of S100A2 and S100B proteins *in epithelial tumors of the skin*[J]. J Cutan Patho, 2003, 30(6): 373-378.

[7] 苗静琨,赖天霞,左国伟,等.人 S100A6-GST 融合蛋白的原核表达和纯化[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(10): 1009-1012.

(责任编辑:冉明会)