DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.011
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2189-04

论著

人心肌营养素在大肠杆菌中的表达纯化和活性鉴定

张正丰,廖维宏,杨青峰 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042)

提 要:目的 利用大肠杆菌高效表达可溶性具有生物学活性的重组huCT-1蛋白。方法 采用PCR及T-A克隆将huCT-1开放阅读框基因克隆到pMD-18T载体上,再构建原核表达载体pGEX2T-huCT1。在不同温度不同时间,通过IPTG诱导pGEX2T-huCT1在DH5a大肠杆菌中表达,SDS-PAGE分析表达量和可溶性蛋白比例。GST亲和柱纯化huCT-1融合蛋白,凝血酶酶切融合蛋白并纯化。坐骨神经切断模型观察重组huCT-1对脊髓前角神经元的存活作用。结果 构建了huCT-1的融合表达载体pGEX2T-huCT1。通过IPTG诱导,发现29 ℃诱导4 h,目的蛋白表达量占全菌的1/5,可溶性蛋白与包涵体比为2/5。对其进行亲和柱纯化,GST/huCT-1融合蛋白纯度达到85%以上。融合蛋白酶切后,重组huCT-1蛋白纯度达到80%以上。发现原核表达重组huCT-1蛋白能挽救55%成年大鼠脊髓运动神经元的存活。结论 成功地获取了具有生物活性的huCT-1的原核重组蛋白。

关键词:心肌营养素-1;原核重组蛋白;生物活性;神经元
中图法分类号:R392.13;R378.21;R394-33 文献标识码:A

Expression and purification of human cardiotrophin-1 in *E. coli* and identification of its biological activity

ZHANG Zheng-feng, LIAO Wei-hong, YANG Qing-feng (Department 3, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To express recombinant human cardiotrophin-1 (huCT-1) protein with biological activity in *E. coli*. Methods huCT-1 open reading frame gene from plasmid pBSSK-huCT1 was cloned into plasmid pMD18-T by PCR and T-A cloning, and then cloned into prokaryotic GST-fusion expression vector pGEX-2T to give pGEX2T-huCT1. After pGEX2T-huCT1 expression was induced by IPTG in *E. coli* at different temperature and different time, the expression level and the proportion of the soluble protein were analyzed by SDA-PAGE. Then the soluble GST/huCT1 was purified by immobilized glutathione columns. The GST-fusion protein was cleaved by thrombin and purified again. The recombinant huCT-1 with biological activity was identified according to the survival of axotomized sciatic motoneurons. Results After the induction of pGEX2T-huCT1-DH5α cells by IPTG at 29 ℃ for 4 h, the highest expression level of the recombinant protein was about 1/5 of total cell proteins, and the soluble portion was about 2/5 of fusion protein. Purification of the soluble portion and thrombin-cleaved fusion protein resulted in 85% and 80% purified recombinant GST-fusion protein and huCT-1 protein, respectively. Recombinant huCT-1 protected 55% motoneurons in spinal cord against sciatic axotomy *in vivo* in adult rats. Conclusion Recombinant huCT-1 has biological activity in rat neurons.

Key words: cardiotrophin-1; prokaryotic recombinant protein; biological activity; neuron

心肌营养素-1(Cardiotrophin-1, CT-1)是1995年由Pennica等[1]发现的一种新的细胞因子,能够刺激体外新生大鼠心肌的生长。随后的研究表明,它属于IL-6家族,对心肌细胞和非心肌细胞,特别是神经系统具有广泛的生物学作用[2]。本实验的目的是利用大肠杆菌高效表达可溶性具有生物学活性的重组huCT-1蛋白,以满足对CT-1生物学作用研究的需要。

基金项目:重庆市科委院士基金(1999)
Supported by Funds for Academicians by Scientific Committee of Chongqing (1999)

作者简介:张正丰(1968-),男,四川省青川县人,博士,主治医师,主要从事脊柱脊髓损伤方面的研究。现在附属新桥医院骨科工作。电话:(023)68774908

收稿日期:2002-10-14;修回日期:2003-02-10

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

pBSSK-huCT1:包含huCT-1 cDNA 1-1018(美国Dinna Penni-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ca 教授惠赠)；pGEX-2T：GST 融合蛋白的原核表达载体(意大利Stefano Rosati 教授惠赠)；pMD18-T：T 载体(Takara)。大肠杆菌 DH5α(为本室保存)。

1.2 主要试剂

B-PER GST fusion protein purification kit (Pierce)；*Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ 内切酶(MBI)，Takara LA *Taq* (Takara)；凝血酶(Thrombin)：Human plasma，Activity≥ 2 800NIH units per mg protein (Sigma)；透析卡：Slide-A-Lyzer cassette，MWCO= 7 000 (Pierce)；Fluoro-Gold (FG) (Fluorochrome，INC)。

1.3 PCR 引物

自行设计，上海生工合成。P1：5′-GGATCCATGAGCCGGAGGGAGG-3′ (33— 49 of the human CT-1 cDNA sequence；genebank accession number：U43030)，下画线为 *Bam*H Ⅰ 酶切位点。P2：5′-GAATTCGAACCCAGCGGGAGGA-3′ (679-664 of the human CT-1 cDNA sequence) 下画线为 *Eco*R Ⅰ 酶切位点。HuCT-1 mRNA CDS 为 33～638 bp 编码 201 个氨基酸。P1 和 P2 的 PCR 产物为 33～679，加上多克隆位点，共 658 bp，包含 huCT-1 的开放阅读框和终止密码。P1 包含 huCT-1 的第 1 个氨基酸，并符合 pGEX-2T 载体GST 的读码框。

1.4 PCR 及 T-A 克隆

以 pBSSK-huCT1 为模板，P1、P2 为引物，进行 PCR。条件：94 ℃变性 40 s，61 ℃退火 50 s，72 ℃延伸 90 s，共 30 循环。PCR 产物与 pMD18T 连接，连接产物转化 DH5α，X-Gal/IPTG/AMP 的LB 琼脂糖上培养，挑取白色菌落，细菌培养，质粒提取，*Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ 酶切鉴定，以 SP6 引物测序。命名为 pMD18T-huCT1。

1.5 pGEX2T-huCT1 构建

将 pMD18T-huCT-1、pGEX2T 质粒 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ 酶切，回收 huCT1、pGEX2T 酶切片段，并连接，转化 DH5α，挑取菌落，细菌培养，质粒提取，酶切鉴定，命名为 pGEX2T-huCT1。

1.6 pGEX2T-huCT1 在大肠杆菌中的表达诱导及 SDS-PAGE 分析

挑取单菌落接种于培养基中，37 ℃振荡培养至为 A_{600} = 0.5，加入 IPTG 至 0.2 mmol/L，29、31、35、37 ℃继续培养，分别诱导 1、2、3、4、5 h。取出 1 ml 菌液离心收集菌体，加入 50 μl 水和 50 μl 2× SDS 上样缓冲液，悬浮后煮沸 5 min。另取 5 ml 菌液离心，菌体 B-PER 裂解离心提取蛋白，上清为可融性蛋白，沉淀包涵体，加等量的 2× SDS 上样缓冲液，12% SDS-PAGE 分析。

1.7 GST-huCT1 融合蛋白纯化及酶切

将 250 ml 诱导细菌离心，融合蛋白纯化：B-PER GST fusion protein purification kit 说明进行。B-PER 裂解菌体，27 000× *g* 离心，吸出上清加入 GST 亲合柱，还原性谷胱甘肽洗脱。A_{260} 测量浓度，SDS-PAGE 分析。凝血酶酶切 GST-huCT1 融合蛋白，GST 亲合柱纯化。收集酶切蛋白，SDS-PAGE 分析，紫外分光度法测量浓度。将融合蛋白、酶切纯化蛋白分别注入透析卡，4 ℃ 20 mmol/L Tris (pH 7.6) 透析 24 h。吸出蛋白，部分冷冻干燥，部分加入终浓度 10% 甘油，－70 ℃保存。

1.8 huCT-1 对脊髓神经元的存活作用

成年 Wistar 大鼠(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所动物中心提供)体质量 200～250 g，1% 戊巴比妥腹腔麻醉。切除股后侧坐骨神经 2 mm，用内径 1 mm 硅胶管将断端连接，断端神经外膜缝合于硅胶管中。硅胶管神经断端间距 5 mm，内置 3 μl huCT-1(0.5 μg/ul) 和 1 μl FG(2%)。8 只动物分为 A、B 组，每组 4 只。A 组动物双侧坐骨神经切断，左侧置入 huCT-1 和 FG，右侧置入等体积的 0.01 mol/L PBS 和 2% FG。B 组动物仅于左侧坐骨神经注入 1 μl 2% FG。动物自由喂养 1 周后，动物灌注固定，取 $L_{1\sim6}$ 脊髓。冷冻切片，厚度 30 μm，切片按序置于载玻片。荧光显微镜紫色激发荧光(325～440 nm)下观察 FG 标记 $L_{3\sim6}$ 腹角的神经元。在× 40 放大倍数下计数每一个标记的神经元，$L_{1\sim6}$ 脊髓大约 90～120 张切片。

1.9 统计学处理

脊髓前角运动神经元计数以 $\bar{x}\pm s$ 表示，行 t 检验。

2 结果

2.1 表达载体 pGEX2T-huCT1 的构建

PCR 产物为 685 bp，无其它杂带，PCR 产物大小与目的条带一致。PCR 产物与 pMD18T 连接后，转化大肠杆菌，在含有 X-Gal/IPTG/AMP 的琼脂糖上培养，大约有 300 个单克隆生长，白：蓝比约为 4∶1。挑取的白色克隆进行 PCR，产物大小为 685 bp，证明插入片段为第 1 次 PCR 产物。pMD18T-huCT1 酶切大小也与 PCR 产物一致。pMD18T-huCT1 双向测序完全正确，无 PCR 引起的突变(测序图略)。pGEX2T-huCT1 酶切大小与 PCR 产物大小一致，原核表达载体 pGEX2T-huCT1 构建成功，见图 1。



M：Marker；1：PCR product；2：pMD18T-huCT1；3：pMD18T-huCT1，*Bam*H Ⅰ and *Eco*R Ⅰ enzymes；4：huCT-1 DNA；5：pGEX-2T；6：pGEX-2T，*Bam*H Ⅰ and *Eco*R Ⅰ enzymes；7：pGEX2T-huCT1；8：pGEX2T-huCT1，*Bam*H Ⅰ and *Eco*R Ⅰ enzymes

图1 pGEX2T-huCT1 构建

Fig 1 Construction of pGEX2T-huCT1

2.2 pGEX2T-huCT1 在大肠杆菌中的表达

经过 IPTG 诱导后，SDS-PAGE 分析表明在相对分子量 47.5 × 10^3 处有 GST/huCT-1 融合蛋白分子量相当的蛋白条带。目的条带随诱导温度的增高和时间延长而增加，在 37 ℃诱导 4 h，表达处于高值平台期，融合蛋白表达量占菌体蛋白的 16% 左右。破菌处理后，分别对上清和沉淀 SDS-PAGE 分析。结果显示 pGEX2T-huCT1 有可溶性和包涵体两种形式。虽然 37 ℃蛋

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

白表达量最高, 但包涵体含量也高, 可溶性蛋白与包涵体比为 1/5。降低诱导温度, 在 29 ℃, 可溶性蛋白与包涵体比为 2/5 左右, 并且可溶性蛋白含量为最高。因此, 本实验选用 29 ℃诱导 4 h 为诱导条件, 见图 2。



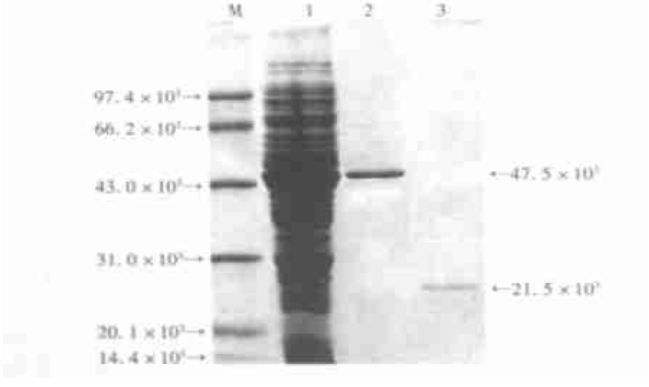
M: Marker; 1: pGEX2T-huCT1 without IPTG; 2: IPTG, at 37 ℃ for 1 h; 3: IPTG, at 37 ℃ for 4 h; 4: at 37 ℃ for 4 h, inclusion bodies; 5: at 37 ℃ for 4 h, soluble portion; 6: at 29 ℃ for 4 h, inclusion bodies; 7: at 29 ℃ for 4 h, soluble portion

图 2　**pGEX2T-huCT1** 在 **DH5α** 大肠杆菌中的表达

Fig 2　Expression of pGEX2T-huCT1 in DH5α

2.3　GST/huCT-1 融合蛋白的纯化及酶切

pGEX2T-huCT1 在大肠杆菌 29 ℃诱导 4 h 后, 采用 B-PER 裂解细菌。可溶性上清经过固化的谷胱甘肽亲和柱, 还原性谷胱甘肽洗脱, 产物 SDS-PAGE 分析, GST/huCT-1 融合蛋白纯度达 85%左右, 浓度为 1.2 mg/ml。酶切蛋白确定反应条件在 50 mmol/L Tris HCl pH 7.5 溶液中, 25 ℃温育 1 h, 裂解效率最高。酶切蛋白经过固化的谷胱甘肽亲和柱, 洗脱后纯度达 80% 左右, 浓度为 0.8 mg/ml, 见图 3。



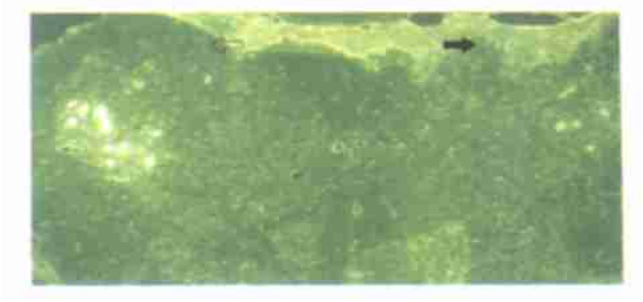
M: Marker; 1: Total pGEX2T-huCT1/DH5α cell proteins; 2: Purified GST-huCT1; 3: Purified huCT1

图 3　重组 **huCT1** 的表达和纯化

Fig 3　Expression and purification of recombinant huCT1

2.4　huCT-1 促进脊髓神经元的存活

huCT-1 能挽救脊髓运动神经元的存活。正常 FG 标记的神经元计数(个)为(974±167)(n=4), 坐骨神经切断 1 周后为 387±106(n=4), 用 huCT-1 治疗后为(586±82)(n=4), 挽救 55%的神经元的存活, 与损伤组相比有显著性差异(P< 0.05), 见图 4。



⇧: huCT-1 and FG; ⬆: PBS and FG

图 4　坐骨神经切断后 **FG** 标记的脊髓前角神经元　(× 50)

Fig 4　Fluorescent images showing FG-labeled axotomized sciatic motoneurons in spinal cord　(× 50)

3　讨论

应用大肠杆菌表达外源蛋白时, 一般希望达到 3 个目的: 高效表达、可溶性表达和外源蛋白具有生物性活性。然而, 到目前为止, 还没有一个可供参考的通用方法或方法学保证每一种蛋白能以有用的形式得到成功的表达。每一种功能基因都有它独特的表达特性, 它在大肠杆菌的表达规律同样难以精确预测。huCT-1 没有 N 端分泌信号肽的疏水性序列和糖基化位点[1], 对翻译后修饰及折叠的要求似乎较低, 因而, 我们尝试大肠杆菌表达系统表达 huCT-1。

大肠杆菌表达系统对表达载体的选择非常重要。一般要考虑载体的表达能力、外源基因是否为大肠杆菌偏性密码、外源蛋白表达后纯化。分析 CT-1 基因序列表明, 大、小鼠和人 huCT-1 蛋白编码的 GC 含量区分别为 67%、69%和 75%, 而且 GC 主要密布在起始密码和终止密码附近。为排除高 GC 含量对 huCT-1 表达量的影响, 我们采用了 PGEX-2T 融合蛋白表达系统对 huCT-1 表达, 其优点是通过在目的基因的上游连接一个融合伴侣分子, 避免了目的基因的结构对载体启动子的影响。同时 PGEX-2T 表达载体表达的融合蛋白含有 GST 融合标签, GST 融合蛋白容易纯化[3]。

本研究设计的 PCR 上游引物含有 *Bam*HⅠ位点和 huCT1 第 1 个编码子, 下游引物含有 *Eco*RⅠ位点并位于 huCT1 终止密码子下游。PCR 产物包含了整个 huCT1 的开放阅读框(ORF)并与 pGEX-2T 表达载体 GST 读框一致。由于 PCR 产物 GS 含量非常高, 直接克隆于 pGEX-2T 测序困难, 通过 T-A 克隆将 PCR 产物克隆于 pMD18-T, 对克隆和测序非常方便。构建的 pGEX2T-huCT1 表达载体含有一个强启动子 Ptac, 通过 IPTG 诱导表达。GST 融合伴侣分子是一个 26× 10^3 的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

单体蛋白分子，在 DH5α 大肠杆菌单独表达时，可达菌体总蛋白的 30％以上。pGEX2T-huCT1 融合表达载体 IPTG 诱导后，GST/huCT-1 融合蛋白表达量占菌体蛋白的 16％左右，其中 2/5 为可溶性上清，有利于纯化。

大肠杆菌表达系统表达外源蛋白过程中尽量使其可溶性表达，避免或减少包涵体。但到目前为止，还没有一个可供参考的通用方法来预测外源蛋白能以何种形式表达，常用的方法是尝试不同的表达载体和尝试不同的诱导表达温度。pGEX2T-huCT-1 融合表达载体在 IPTG 诱导后 huCT-1/GST 融合蛋白表达，且随诱导时间延长而增加，37 ℃ 4 h 后表达处于高值平台期。破菌处理后，分别对上清和沉淀 SDS-PAGE 分析，结果表明 GST/huCT-1 有可溶性和包涵体两种存在形式。在 37 ℃，可溶性蛋白与包涵体比为 1/5。降低诱导温度，在 29 ℃，可溶性蛋白与包涵体比为 2/5 左右，并且可溶性蛋白与融合蛋白量比例为最高。因此，本研究选用 29 ℃诱导 4 h 为诱导条件。GST/huCT-1 融合蛋白可溶性上清经过纯化经过固化的谷胱甘肽亲和柱进行纯化，蛋白的纯度达到 85％以上。Thrombin 酶切除去 GST 后，重组 CT-1 纯度达到 80％以上。

本研究显示 huCT-1 能支持成年大鼠运动神经元的存活，说明原核重组 huCT-1 具有生物学活性，同时对大鼠神经元作用的无种属特异性，这与文献[4]报道 huCT-1 能诱导大鼠培养心肌细胞肥大一致，但 huCT-1 挽救神经元的能力略有降低。文献[5]报道新生大鼠坐骨神经切断后，CT-1 挽救 64％的神经元。本实验用原核重组 huCT-1 挽救成年大鼠 55％的神经元的存活。其机制可能是 huCT-1 能与大鼠 gp130 和 LIFRb 结合，但结合能力仍然有差异。另外，蛋白的纯度和本实验提取过程中的反复操作可能对活性也有一定影响。

参考文献：

[1] Pennica D, King K L, Shaw K J, *et al*. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy[J]. Proc Natl Acad Sci VSA, 1995, 92(4): 1142－1146.

[2] 张正丰. 心肌营养素-1 的研究进展[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2002, 22(1): 92－94.

[3] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 649－652.

[4] Pennica D, Swanson T A, Shaw K J, *et al*. Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization[J]. Cytokine, 1996, 8(3): 183－189.

[5] Pennica D, Arce V, Swanson A, *et al*. Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long term survival of spinal motoneurons[J]. Neuron, 1996, 17(7): 63－74.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)24-2192-01

青霉素致顽固性呃逆 1 例

A case report of obstinate hiccups caused by penicillin

郭 红，达四平，赵晓晏 （第三军医大学附属新桥医院消化内科，重庆 400037）

患者，男，31 岁，因发热、咽炎、扁桃体炎就诊，以往无药物过敏史，青霉素皮试确定阴性后，给予生理盐水注射液 250 ml，青霉素 400×10^4 U（华北制药股份有限公司生产，批号 B0211003）2 次/d，静脉滴注，共 3 d，给药第 2 次后每次给药 30 min 后开始反复出现呃逆症状，无其它不适，经憋气、穴位按摩、药物治疗后均不能控制，直到静脉输液完毕后 5～7 h 才自行缓解（每次持续时间 1～2 h）。考虑可能为静脉用青霉素引起，遂停药。停药第 2 天症状完全消失，无呃逆。

讨论

青霉素为繁殖期杀菌药，能抑制大多数革兰阳性和阴性球菌等敏感细菌细胞壁生物合成，因其价格低、毒性小，常为临床首选抗生素。其所引起的荨麻疹、过敏性休克、接触性皮炎多有报道，但引起呃逆症状较为少见[1]。本例患者即往体健，静滴青霉素后出现顽固性呃逆症状，停药后消失，说明呃逆由青霉素引起[2]。机制尚不清楚，可能为青霉素对神经系统的毒性作用引起膈肌阵挛所致。由于非典型肺炎导致发热病人增多，发热门诊单独设立，在给予患者治疗时，提醒临床医生注意区别药物原因和其它因素引起的呃逆，以利于正确的诊断和治疗，避免或减少严重药物反应的发生。

关键词：青霉素；顽固性呃逆
中图法分类号：R961 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王川平，苏秀琴，王淑梅. 临床常用药物引起的顽固性呃逆[J]. 中国综合临床, 2002, 18(5): 399－400.

[3] Thompson D F, Landry J P. Drug-induced hiccups[J]. Ann Pharmacother, 1997, 31(3): 367－369.

（编辑 栾 嘉）

作者简介：郭 红(1971－)，女，湖南省湘潭市人，硕士，主治医师，主要从事幽门螺杆菌方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(023)68774604

收稿日期：2003-07-02；修回日期：2003-10-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net