DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.017
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)02-0131-04

论著

重组大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位的纯化及生物学活性鉴定

田文标,邹全明,吴 超,张卫军,杨 玉君,冉向阳,王缚鲲 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 纯化rLTB并对其生物学功能进行初步研究。方法 重组基因工程菌发酵后,以包涵体形式表达的rLTB经过洗涤、变性溶解后,分别采用Q Sepharose™ High Performance阴离子交换层析和Phenyl FF(high sub)疏水层析对其进行纯化并透析复性,然后采用SDS-PAGE和HPLC检测纯度,并选用ELISA、动物实验和Western-blotting实验对纯化蛋白的生物学活性进行鉴定。结果 得到纯度达97.85%的rLTB,复性的rLTB经检测具有良好的生物学活性。结论 得到纯度较高、生物学活性较好的rLTB,可用于进一步的研究。

关键词:不耐热肠毒素;包涵体;纯化
中图法分类号:Q93-331;Q933;R378.21 文献标识码:A

Purification and evaluation of the biological activity of recombinant *E. coli* heat-labile enterotoxin B

TIAN Wen-biao, ZOU Quan-ming, WU Chao, ZHANG Wei-jun, YANG Jun, RAN Xiang-yang, QANG Fu-kun (Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To purify and evaluate the activity of recombinant *E. coli* heat-labile enterotoxin B. Methods The inclusion body of the LTB expressed in *E. coli* was washed, denatured and renatured. The two-step chromatographic procedure, Q Sepharose™ High Performance and Phenyl FF (high sub), was used for the purification. The purity of the rLTB was detected by SDS-PAGE and HPLC, and the specific biological activity of the purified rLTB was detected by enzyme linked immunosorbent assay, animal test and Western-blotting. Results The purity of rLTB was up to 97.85% and the renatured rLTB had a high specific biological activity. Conclusion The prepared rLTB with high purity and biological activity can be applied for further studies.

Key words: heat-labile enterotoxin; inclusion body; protein purification

不耐热肠毒素(Heat-labile enterotoxin, LT)是肠产毒性大肠杆菌(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)分泌的一种热不稳定性(65 ℃, 30 min即失活)肠毒素,能引起人和猪等家畜的严重腹泻。它是由A、B两种亚单位组成的AB5型杂六聚体蛋白,是目前人们发现的最强有力的粘膜免疫原和粘膜免疫佐剂之一,尤其是其中的B亚单位以其毒性低、粘膜佐剂效应高已经成为研究热点[1,2]。本室已经构建了以包涵体形式高效表达的LTB基因工程菌株,在此基础上我们进一步探讨rLTB的纯化工艺,制备了纯度达97.85%、具有较好生物活性的rLTB产品,并初步研究其生物学活性,本实验报道了有关的研究结果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 工程菌LTB-petTT-JM109由本室吴超硕士构建并保存,表达量约占全菌总蛋白的20%,见另文报道。

1.1.2 主要实验仪器 凝胶扫描分析仪、AKTA explorer-100、酶标分析仪、HPLC 1100 Series、细胞匀浆机;上海东华公司均质机;Beckman高速离心机。

1.1.3 主要实验试剂 纯化介质Q Sepharose™ High Performance和Phenyl FF(high sub)购自Amersham Pharmacia Biotech公司;辣根过氧化物标记的羊抗兔IgG和兔抗CTB血清由本室马颖硕士提供;霍乱毒素B亚单位(CTB)购自Sigma公司;氧化型(GSSG)和还原型谷胱苷肽(GSH)购自上海生工;包涵体鉴定液(1 mg/ml溶菌酶、1 mmol/L EDTA、50 mmol/L Tris, pH 8.0),包涵体裂解缓冲液(1 mmol/L EDTA、50 mmol/L Tris, pH 8.0),洗涤液A(1 mmol/L EDTA、1% Triton-X100、50 mmol/L Tris, pH 8.0),洗涤液B(1 mmol/L EDTA、2 mol/L尿素、50 mmol/L Tris, pH 8.0),包涵体溶解液(1 mmol/L EDTA、8 mol/L尿素、50 mmol/L Tris, pH

基金项目:国家"九五"科技攻关重点项目(969010154)
作者简介:田文标(1970-),男,河北省石家庄市人,硕士,主管技师,主要从事临床微生物学及免疫学方面的研究。电话:(023)68753591
通信作者:邹全明,电话:(023)68752315;E-mail:QMZOU@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-03-05;修回日期:2002-06-10

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

8.0)均为本室配制。

1.2 方法

1.2.1 基因工程菌的培养及诱导表达 将含 rLTB 的大肠杆菌接种于 LB 培养基中 37 ℃振荡培养过夜。次日以 1∶50 稀释到同样的培养基中，继续在 37 ℃摇床培养至对数生长中期。当培养液吸光度 A_{600} 为 0.5~0.6 时，加入 0.8 mmol/L IPTG 进行诱导，观察 IPTG 诱导时间对 rLTB 表达的影响[3]。采用 SDS-PAGE 分析表达产物。

1.2.2 包涵体鉴定实验[4~6] 取 3 ml 细菌培养液离心获菌，然后加入 0.5 ml 包涵体鉴定液，室温作用 15 min 后 12 000× g 离心 10 min 留上清。沉淀用 8 mol/L 尿素 0.5 ml 重悬，50 ℃作用 15 min，将上清和沉淀标本做 SDS-PAGE 电泳。如发现目的蛋白带主要在沉淀标本中，则证明目的蛋白是以包涵体形式表达。

1.2.3 包涵体的分离、洗涤和溶解[4~7] 将高效表达的菌体与裂解缓冲液以 1∶10(W/V)比例混合，其中每克大肠杆菌加入 3 μl 50 mmol/L 的蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)并经细胞匀浆机作用使其均匀，用高压均质机在压力为 50 MPa 的条件下进行破菌(共破菌 6 次)，然后以 500× g 离心 20 min，弃沉淀，再以 15 000× g 离心 40 min，弃上清收集包涵体沉淀，以 1∶10 比例分别用洗涤液 A 和 B 进行洗涤(各洗涤 2 次)，洗涤条件为 4 ℃搅拌 20 min，然后 15 000× g 离心 40 min 收集包涵体沉淀；最后将洗涤后的包涵体与包涵体溶解液按体积比 1∶10 混合，4 ℃搅拌 3 h 后，20 000× g 离心 45 min，取上清作为下一步纯化的原料。

1.2.4 rLTB 的纯化 用 Q Sepharose™ High Performance 装柱，用 3 倍柱体积的 20 mmol/L Tris-HCl 8 mol/L 尿素(pH 8.5)平衡柱子，将 rLTB 直接上样，控制流速为 5 ml/min，用 20 mmol/L Tris-HCl 8 mol/L 尿素 0.5 mol/L NaCl(pH 8.5)进行洗脱，收集洗脱峰作为下一步纯化的样品。

用 Phenyl FF(high sub)装柱，用 3 倍柱体积的 20 mmol/L Tris-HCl 0.5 mol/L NaCl 和 8 mol/L 尿素(pH 7.5)平衡柱子，将上一步所取样本的 pH 调为 7.5 后直接上柱，用 20 mmol/L Tris-HCl 8 mol/L 的尿素(pH 7.5)进行连续梯度洗脱，收集洗脱峰。用 SDS-PAGE 分析纯化产物。

1.2.5 rLTB 的复性[8~10] 先在纯化样品中加入 2 mmol/L GSH 和 0.2 mmol/L GSSG，然后用 10 倍体积的 0.1 mol/L 的 PB(pH 8.5)作为透析缓冲液对纯化产物进行透析复性 48 h，其间换液 5 次。

1.2.6 纯化产物的活性鉴定

1.2.6.1 rLTB 抗血清的制备 家兔的免疫：1.0 ml rLTB 纯化产物(1 mg)与等体积 CFA 充分乳化后于家兔背部皮下、足多点注射，1 周后，同样剂量的抗原加等体积的 IFA 充分乳化后同法加强免疫，重复 2 次，最后用 1.0 ml 无佐剂 rLTB 纯化产物再加强免疫一次。从第 4 周开始取血，双向免疫扩散效价达 1∶16 以上时，从心脏采血，分离血清，分装后于-70 ℃保存备用。

1.2.6.2 ELISA 检测系统 用 GM1-神经节苷脂(5 μg/ml)包被酶联板，加入纯化产物后，用阴性兔血清(1∶400)作为阴性对照，以 CTB(1∶400)为阳性对照，免疫的兔抗 rLTB(1∶100)为一抗，以 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1∶20 000)为二抗进行 ELISA 实验。每个样本均作复孔。

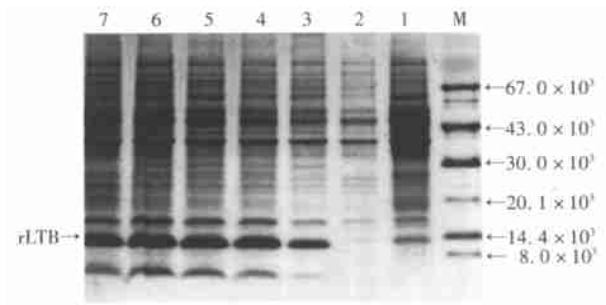
1.2.6.3 Western blotting 分析 纯化产物行 SDS-PAGE 后，电转移至硝酸纤维素膜上，以兔抗 CTB 血清(1∶1 000)为一抗，HRP 标记的羊抗兔 IgG(1∶20 000)作二抗，按文献[11, 12]进行 Western blotting。

1.2.7 SDS-PAGE 由于 LTB 分子量较小(11.8× 10^3)，电泳均采用 Tris-Tricine 系统[11]。

2 结果

2.1 表达产物的分析鉴定

重组菌经 IPTG 诱导后，离心收集菌体，用 Tricine SDS-PAGE 进行分析，图 1 即为不同诱导时间 rLTB 的表达情况。从图中可以看出，诱导 4 h 时表达量最高，可达 20%，且明显高于未诱导菌的表达量。



M: Protein molecular weight marker; 1: Uninduced bacterium protein; 2: Before induction; 3~7: 1, 2, 3, 4 and 5 h after induction

图1 IPTG 诱导时间对 rLTB 表达的影响

Fig 1 Influence of induction time with IPTG on the expression of rLTB

2.2 包涵体鉴定、分离和洗涤

经包涵体鉴定实验发现 rLTB 条带均在沉淀标本中，证明 rLTB 是以包涵体形式表达的。经洗涤后的包涵体在包涵体溶解液中的溶解性良好，经凝胶扫描分析仪分析 rLTB 纯度达 52%。

2.3 rLTB 的纯化和复性

在用阴离子介质 Q Sepharose™ High Performance 进行纯化时，经 SDS-PAGE 电泳分析表明其中洗脱峰(峰 2)为目的蛋白峰，见图 2；在用疏水介质 Phenyl FF(high sub)进行的第二步纯化中，经电泳分析得知后面的洗脱峰(峰 2)为目的蛋白峰，见图 3，经凝胶扫描分析仪分析，两步纯化目的蛋白的纯度分别大于 80%和 95%。纯化产物在透析复性过程中，蛋白溶解度良好，蛋白溶液清亮透明，无明显蛋白析出。蛋白纯化结果见图 4。

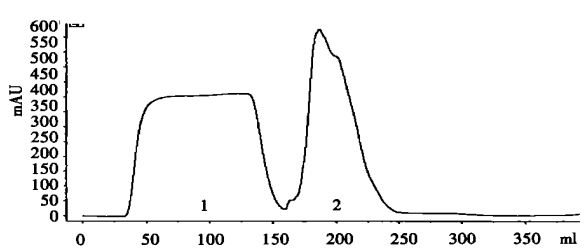


图2 rLTB Q SepharoseTM High Performance 层析峰型图

Fig 2 Q SepharoseTM High Performance chromatography of rLTB

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

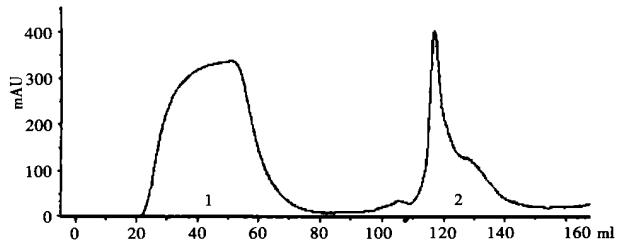
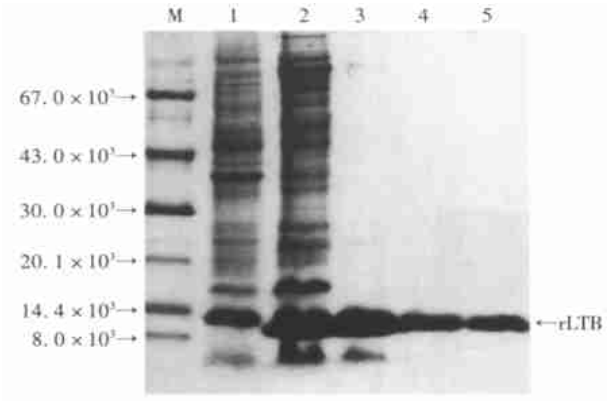


图 3　rLTB Phenyl FF(high sub)层析峰型图

Fig 3　Phenyl FF(high sub) chromatography of rLTB



M: Protein molecular weight marker; 1: Total bacterium protein; 2: Inclusion body in 8 mol/L urea; 3: Purified rLTB by Q Sepharose™ High Performance; 4: Purified rLTB by Phenyl FF(high sub); 5: Purified sample of rLTB after dialysis

图 4　rLTB 的各级纯化图

Fig 4　SDS-PAGE analysis of stages in the purifacation of rLTB

2.4　HPLC 纯度检测

经 HPLC 检测, rLTB 纯化产物的纯度为 97.85%, 见图 5。

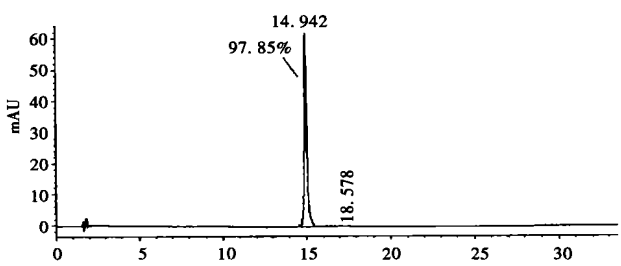


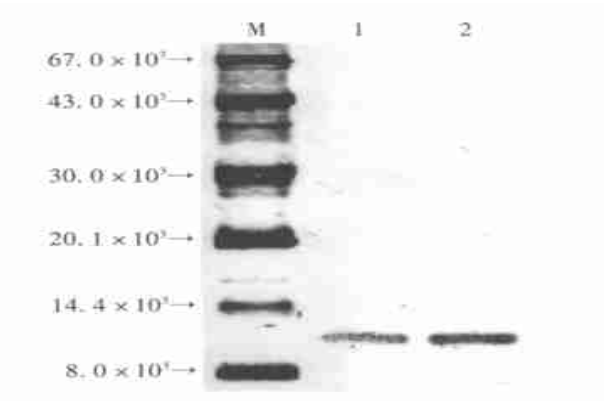
图 5　rLTB 纯化标本 HPLC 纯度检测结果

Fig 5　HPLC results of purification sample of rLTB

2.5　免疫活性检测

2.5.1　ELISA　　rLTB 的纯化产物可与 GM1-神经节苷脂发生阳性结合反应。

2.5.2　Western blotting　　在 rLTB 相应分子量处出现单一显色条带, 见图 6。



M: protein molecular weight marker; 1, 2: rLTB

图 6　Western-blot 实验结果

Fig 6　Western-blot analysis of purified rLTB

3　讨论

蛋白质纯化和复性是基因工程重要的中下游工艺, 不同的蛋白质由于其理化性质不同, 其纯化工艺和复性条件也不同。由于我们采用了以包涵体方式来表达 rLTB, 所以在验证了 rLTB 确实是以包涵体形式进行表达后要解决的首要问题就是包涵体的纯化。包涵体的纯化包括破菌、洗涤和溶解, 其中最关键的步骤是破菌。细菌破碎的完全程度在很大程度上决定了包涵体产品的纯度。我们采取了用均质机对工程菌进行多次破菌(6 次)(通过显微镜进行辅助检查以判断破菌的程度, 以每个油镜视野中不超过 3 个未破菌为破菌终点[4])和差速离心相结合的方法来保证破菌的完全性。另外我们在工程菌破壁的过程中还加入了蛋白酶抑制剂(PMSF 和 EDTA), 以防止目的蛋白的降解。由于考虑到盐酸胍的毒性作用较大, 在包涵体的溶解中我们采用 8 mol/L 尿素作为溶解剂[4,13], 实验证实效果良好。

在精细纯化中, 我们采用了 Q Sepharose™ High Performance 和 Phenyl FF(high sub)作为两步纯化的介质。rLTB 在经过第一步纯化时, 由于洗脱液中含有 0.5 mol/L 的 NaCl, 所以纯化样本在上第二根柱子时可以直接上样而不必再加盐, 因而这种纯化工艺的衔接组合是合理的。由于在整个工艺中省却了加盐一步, 这样就简化了纯化步骤。纯化产物在透析复性过程中, 我们采用了传统的加入氧化型、还原型谷胱苷肽多次换液的方法[9,10], 实践证明效果良好。

由于天然的 LTB 有可以和真核细胞表面的 GM1 神经节苷脂受体特异结合的生物活性[1,2], 所以我们设计了相应的 ELISA 系统对 rLTB 进行生物学活性检测, 结果证明rLTB具有良好的生物学活性。另外通过动

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

物实验和Western-blotting也验证了rLTB的免疫原性和免疫反应性。

但是在两步纯化过程中存在回收率不高的问题，为此我们正在进一步进行实验加以解决。

参考文献：

[1] 郭学青，邹全明. 霍乱毒素及大肠杆菌不耐热肠毒素生物学特性的研究[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(3)：325－326.

[2] 李文建，邹全明. 粘膜免疫佐剂：肠产毒性大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)研究进展[J]. 免疫学杂志，2000，16(4)：85－87.

[3] 裴冬生，胡书群，赵惠仁. 人白细胞介素18在大肠杆菌中的表达纯化和复性[J]. 生物化学和生物物理学报，2000，32(4)：397－400.

[4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999. 261－284.

[5] 范 慧，莫晓宁，张颖妹，等. 人重组粒细胞集落刺激因子突变体rhG-CSF-Ala-17的纯化及部分理化性质[J]. 北京医科大学学报，2000，32(4)：337－339.

[6] Sunitha K, Chung B H, Jang K H, *et al*. Refolding and purification of Zymomonas mobilis levansucrase produced as inclusion bodies in fed－batch culture of recombinant Escherichia coli[J]. Protein Expr Purif, 2000, 18(3)：388－393.

[7] Lajmi A R, Wallace T R, Shin J A. Short, hydrophobic, alanine-based proteins based on the basic region/leucine zipper protein motif：overcoming inclusion body formation and protein aggregation during overexpression, purification, and renaturation[J]. Protein Expr Purif, 2000, 18(3)：394－403.

[8] Cho W K, Sohn U, Kwak J W. Production and *in vitro* refolding of a single-chain antibody specific for human plasma apolipoprotein A-I[J]. J Biotechnol, 2000, 77(2－3)：169－178.

[9] 杨晓梅. 包涵体蛋白的复性技术[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册，2000，21(2)：98－99.

[10] Patra A K, Mukhopadhyay R, Mukhija R, *et al*. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from Escherichia coli[J]. Protein Expr Purif, 2000, 18(2)：182－192.

[11] 颜子颖，王海林，译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，1999. 363.

[12] D R马歇克，J T门永，R R布格斯，等. 蛋白质纯化与鉴定实验指南[M]. 北京：科学出版社，1999. 160－161.

[13] Pandjaitan B, Swoboda I, Brandejsky P F, *et al*. Escherichia coli expression and purification of recombinant dog albumin, a cross-reactive animal allergen[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(2)：279－285.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)02-0134-02

三种止吐药预防化疗后呕吐的临床观察

Clinical observation of three groups of antiemetic to prevent emesis from chemotherapy

饶 芸 （第三军医大学附属西南医院普通外科，重庆 400038）

临床使用的抗癌药大多有恶心呕吐等副作用，目前解除恶心呕吐痛苦的药物很多，其止吐效果各家报道不一[1,2]。为筛选出一些有效、价格便宜、应用方便、便于推广的止吐药物，作者观察了从2000年6月以来几组止吐药物，并进行了以止吐效果为主要项目的多侧面比较。

1 材料与方法

1.1 病例选择

1.1.1 病例纳入标准 年龄27～70岁；体重48～70 kg；功能状态Karnofsky＞60分[3]；经病理和脱落细胞学检查确诊的恶性肿瘤病人并需化疗者。化疗前常规检查：肝、肾功能及血象检查均正常者；试验前24 h内未用过其他止吐药物者。

1.1.2 病例分组 A组52例；B组47例；C组50例。A、B、C组的年龄、性别、病种分布情况及化疗周期相仿，具有可比性（P＞0.05）。

1.2 药品选择

A组药品：国产格拉司琼注射液，3 mg/3 ml。B组药品：恩丹西酮注射液4 mg/2 ml。C组药品：胃复安10 mg/ml＋地塞米松5 mg/ml。

1.3 给药方法

根据不同的病种采用不同的化疗方案。A、B、C组均于化疗前30 min用止吐药物。A组：国产格拉司琼3 mg，B组：恩丹西酮注射液8 mg，C组：地塞米松5 mg，分别溶于100 ml NS或5% GNS中，静脉滴注5 min以上。C组同时肌肉注射胃复安10 mg。

1.4 观察方法及疗效评价

按WHO规定，本研究止吐及止恶心疗效分级标准见表1[4]。临床止恶心、止吐有效率＝（完全控制＋基本控制）/总例数×100%。观察头晕、头痛、腹部不适和便秘等不良反应发生率。

表1 止吐及止恶心疗效分级标准（次/d）

疗效	呕吐	恶心
完全控制(CR)	无呕吐	无恶心
基本控制(PR)	1～2	1～4
中度控制(MR)	3～5	5～12
无 效(F)	＞5	＞12

作者简介：饶 芸(1975－)，女，四川省大竹县人，护师，主要从事普通外科护理方面的研究。电话：(023)68754000－73172

收稿日期：2002-01-13；修回日期：2002-06-12

（下转137页）

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