

本文引用:曹顺,杨玉露,徐光华,等.重组人白血病抑制因子的原核表达及优化[J].新乡医学院学报,2019,36(3):228-233. DOI:10.7683/xyxyxb.2019.03.006.

【基础研究】

重组人白血病抑制因子的原核表达及优化

曹 顺¹, 杨玉露¹, 徐光华², 陈思佳³, 王天云³

(1. 新乡医学院临床医学专业 2014 级, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院临床医学专业 2015 级, 河南 新乡 453003; 3. 新乡医学院生物化学与分子生物学教研室, 河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 在大肠杆菌中表达重组人白血病抑制因子(HLIF)蛋白,并探索其高效表达的条件。**方法** 将HLIF重组质粒转化至大肠杆菌BL21,分别给予不同诱导时间(4、8、12、16、20、24 h)、不同浓度大肠杆菌(吸光度值分别为0.5、0.6、0.8、1.0)、不同诱导温度(20、25、30、37、42℃)、不同浓度诱导剂异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol·L⁻¹)、不同浓度乙酸(0.0、0.1、0.2、0.3、0.4 mmol·L⁻¹)进行培养,蛋白电泳考马斯亮蓝染色后,采用Image J软件分析HLIF蛋白的相对表达量,观察不同干预条件对HLIF表达的影响。**结果** 不同诱导时间下HLIF蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F=22.088, P<0.05$),诱导16 h时的HLIF蛋白相对表达量显著高于诱导4、8、12、20、24 h($P<0.05$)。不同浓度(以吸光度值表示)大肠杆菌诱导时HLIF蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F=17.153, P<0.05$);吸光度值为0.8时HLIF蛋白相对表达量显著高于吸光度值为0.5、0.6时($P<0.05$),吸光度值为1.0时与吸光度值为0.8时HLIF蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。不同温度诱导时HLIF蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F=18.053, P<0.05$),25℃时HLIF蛋白相对表达量显著高于20、30、37、42℃时($P<0.05$)。不同浓度诱导剂诱导时HLIF蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($F=1.181, P>0.05$)。不同浓度乙酸诱导时HLIF蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F=27.181, P<0.05$),乙酸浓度为0.00 mmol·L⁻¹时HLIF蛋白相对表达量显著高于乙酸浓度为0.1、0.2、0.3、0.4 mmol·L⁻¹时($P<0.05$)。**结论** 成功在大肠杆菌表达了HLIF,并探索出了适合最佳表达的诱导时间、大肠杆菌浓度、诱导温度、诱导剂浓度、乙酸浓度等条件。

关键词: 人白血病抑制因子;原核表达;优化

中图分类号: R34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2019)03-0228-06

Prokaryotic expression and optimization of recombinant human leukemia inhibitory factor

CAO Shun¹, YANG Yu-lu¹, XU Guang-hua², CHEN Si-jia³, WANG Tian-yun³

(1. Grade 2014, Clinical Medicine Specialty, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Grade 2015, Clinical Medicine Specialty, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To recombine and express human leukemia inhibitory factor (HLIF) recombinantly in *E. coli* and explore the conditions for its high expression. **Methods** The HLIF plasmid was transformed into *E. coli* BL21. The transformed BL21 were cultured at different induction time (4, 8, 12, 16, 20, 24 h), concentration of *E. coli* (absorption value was: 0.5, 0.6, 0.8, 1.0), induction temperature (20, 25, 30, 37, 42℃), concentration of isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mmol·L⁻¹) and concentration of acetic acid (0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mmol·L⁻¹). After protein electrophoresis with Coomassie brilliant blue staining, the relative expression of HLIF protein was analyzed by Image J software, and the effect of different intervention conditions on the expression of HLIF was observed. **Results** There was significant difference in the relative expression of HLIF protein at different induction time ($F=22.088, P<0.05$). The relative expression of HLIF protein at 16 hours of induction was significantly higher than that at 4, 8, 12, 20 and 24 hours of induction ($P<0.05$). There was significant difference in the relative expression of HLIF protein with different concentration of *E. coli* ($F=17.153, P<0.05$). The relative expression of HLIF protein at absorbancy value of 0.8 was significantly higher than that at absorbancy value of 0.5 and 0.6 ($P<0.05$). There was no significant difference in the relative expression of HLIF protein between absorbancy value of 1.0 and 0.8 ($P>0.05$). There was significant difference in the relative expression

DOI:10.7683/xyxyxb.2019.03.006

收稿日期:2018-03-20

基金项目:新乡医学院大学生科研创新课题(编号:201705)。

作者简介:曹 顺(1995-),男,河南周口人,新乡医学院第三临床学院临床医学2014级本科生。

通信作者:王天云(1968-),男,山东梁山人,博士,教授,研究方向:基因表达调控与基因治疗;E-mail:1790621139@qq.com。

of HLIF protein at different induction temperatures ($F = 18.053, P < 0.05$). The relative expression of HLIF protein at temperature of 25 °C was significantly higher than that at 20,30,37 and 42 °C ($P < 0.05$). There was no significant difference in the relative expression of HLIF protein between different induction concentrations of inducer ($F = 1.181, P > 0.05$). There was significant difference in the relative expression of HLIF protein at different concentrations of acetic acid ($F = 27.181, P < 0.05$). The relative expression of HLIF protein at acetic acid concentration of 0.00 mmol · L⁻¹ was significantly higher than that at acetic acid concentrations of 0.1,0.2,0.3,0.4 mmol · L⁻¹ ($P < 0.05$). **Conclusion** HLIF was successfully expressed in E. coli, and the optimum conditions were determined, such as the induction time, concentration of E. coli, induction temperature, concentration of inducer and acetic acid.

Key words: human leukemia inhibitor factor; prokaryotic expression; optimization

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是一种分泌型的糖基化蛋白,属于白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)细胞因子家族中的一员^[1],具有诱导鼠源骨髓白细胞M1细胞系分化并抑制其增殖的能力,对造血干细胞的存活、增殖及各种神经细胞的分化、成熟有重要作用^[2],目前常用于胚胎干细胞的研究^[3]。然而,天然状态下动物体内LIF含量很少,纯化困难,价格昂贵,使其研究应用受到极大限制。为了克服这一难题,本研究针对人白血病抑制因子(human leukemia inhibitory factor, HLIF)蛋白的结构特性,采用改变单一变量的方法优化HLIF蛋白的表达,探索获得HLIF的优化表达条件,旨在为HLIF生物活性的研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 细菌 大肠杆菌BL21(DE3)由新乡医学院河南省重组药物蛋白表达系统国际联合实验室提供。

1.2 质粒 PET-28a质粒(非重组质粒)为新乡医学院河南省重组药物蛋白表达系统国际联合实验室保存,含有HLIF的PET-28a重组质粒由安徽通用生物有限公司合成。

1.3 主要试剂与仪器 DNA Marker、蛋白分子质量标准购自康为世纪生物科技有限公司,限制性内切酶*Xba* I、*Xho* I购自大连TaKaRa公司,鼠抗tag抗体(2D5)购自北京博奥生物技术有限公司,羊抗小鼠抗体购自美国Clontech公司,增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)化学发光液、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)均购自上海碧云天生物技术有限公司,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl beta-D-thiogalactoside, IPTG)购自宁波欧曼生物科技有限公司;高速冷冻离心机购自美国Thermo Scientific公

司,ChemiDoc XRC凝胶成像系统购自美国BIO-RAD公司;紫外分光光度计购自四川赛恩思仪器有限公司。LB培养基参考《分子克隆实验指南》^[4]进行配制。LK培养基为含卡那霉素的LB培养基(1:1 000)。2.5 g · L⁻¹考马斯亮蓝R-250配置:45 mL甲醇,45 mL蒸馏水,10 mL冰乙酸,0.25 g考马斯。考马斯亮蓝脱色液配置:50 mL乙醇,100 mL冰乙酸,850 mL蒸馏水。

1.4 重组HLIF表达质粒的合成与鉴定 根据HLIF的基因序列(GenBank: BC069540.1),由安徽通用生物公司合成HLIF序列,并合成含有HLIF的PET-28a重组质粒,将重组质粒进行双酶切鉴定,酶切体系:*Xba* I、*Xho* I各1 μL,重组质粒10 μL,buffer 2 μL,补ddH₂O至20 μL,37 °C反应3 h,取10 μL反应液进行琼脂糖电泳检测酶切结果。

1.5 感受态大肠杆菌的制备 参照《分子克隆实验指南》^[4]方法制备感受态大肠杆菌:取-20 °C冰冻大肠杆菌BL21菌种,接种于培养皿,37 °C培养过夜。从平板上挑取单个菌落,接种至含有3 mL LB培养液的试管中,37 °C震荡培养过夜。次日取菌液1 mL接种至含有50 mL LB培养基的500 mL烧瓶中,37 °C摇床慢速震荡,使用紫外分光光度仪于600 nm处动态检测菌液的吸光度值,当吸光度值为0.3时,将烧瓶取出放置冰上10 min。在无菌条件下把菌液倒入50 mL离心管中,4 °C 4 000 r · min⁻¹离心10 min;弃上清,将离心管倒置于干滤纸上1 min,吸干残留培养液,加入100 mmol · L⁻¹的CaCl₂液10 mL,震荡混匀,悬浮菌体,冰浴30 min;4 °C 4 000 r · min⁻¹离心10 min,弃上清,将管倒置于干滤纸上1 min,吸干残留的培养液,加入冰预冷的100 mmol · L⁻¹ CaCl₂液4 mL,重悬浮菌体,然后将菌液按每管0.2 mL进行分装,4 °C保存备用。

1.6 感受态大肠杆菌的转化 取2份“1.5”项制备的感受态大肠杆菌,每份50 μL,分别加入3 μL

含有 HLIF 的 PET-28a 重组质粒和不含 HLIF 的 PET-28a 非重组质粒,冰浴 30 min 后,42 ℃ 热激 90 s,马上放回冰上,冰浴 2 min,加 400 μL LB 培养基,于 37 ℃ 摇床慢摇震荡培养 60 min,取 20 μL 涂在 LK 固体培养基上,37 ℃ 倒置培养过夜。

1.7 Western blot 法鉴定重组大肠杆菌质粒表达

以含非重组质粒的大肠杆菌菌落作为阴性对照,分别挑取“1.6”项中含非重组质粒及 HLIF 重组质粒的大肠杆菌菌落接种于 50 mL LK 培养液中,37 ℃ 震荡培养 2 h,使用紫外分光光度仪于 600 nm 处动态检测菌液的吸光度值,当吸光度值为 0.6 时,在培养基中加入诱导剂 IPTG (终浓度为 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导 8 h,取 1 mL,1 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取沉淀,将得到的样本加入 1 \times 蛋白上样缓冲液 100 μL ,经煮沸变性 10 min,然后按试剂盒要求进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色、脱色,利用 BIO-RAD 转膜仪转膜,用 50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉封闭 1 h 后,加鼠抗 tag(2D5) 一抗,室温孵育过夜,洗膜,加酶标羊抗小鼠二抗孵育,洗膜,加 ECL 化学发光液,移入 X 射线摄影暗盒,暗室中曝光,用 ChemiDoc XRC 凝胶成像系统观察图片结果。选择稳定表达含 HLIF 重组质粒的大肠杆菌菌落进行后续试验。

1.8 HLIF 表达的优化 将含 HLIF 重组质粒的菌落先在 LK 培养基中培养 8 h,吸取 0.5 mL 接种到 50 mL LK 培养基中,分别给予不同诱导时间、不同浓度大肠杆菌、不同诱导温度、不同浓度诱导剂、不同浓度乙酸,蛋白电泳考马斯亮蓝染色后,采用 Image J 软件分析 HLIF 蛋白的相对表达量,观察不同干预条件对 HLIF 表达的影响。HLIF 蛋白相对表达量 = 相对应区域灰度值/总条带灰度值。每项实验重复 3 次。

1.8.1 诱导时间 在 50 mL 的 LK 培养基中接种 0.5 mL 培养液继续培养 4、8、12、16、20、24 h,分别取 1 mL 培养液,离心取沉淀,将得到的样本加入 1 \times 蛋白上样缓冲液 100 μL ,煮沸变性 10 min,然后按试剂盒说明书要求进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色、脱色,采用 Image J 软件分析 HLIF 蛋白的相对表达量。

1.8.2 大肠杆菌浓度 在 50 mL 的 LK 培养基中接种 0.5 mL 培养液后,使用紫外分光光度仪于 600 nm 处动态检测菌液的吸光度值(吸光度值代表大肠杆菌浓度),当吸光度值为 0.5、0.6、0.8、1.0 时,分别加入诱导剂 IPTG (终浓度为

0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),培养 6 h 后分别取 1 mL 培养液,1 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,取沉淀,将得到的样本加入 1 \times 蛋白上样缓冲液 100 μL ,经煮沸变性 10 min,然后按试剂盒要求进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色、脱色,采用 Image J 软件分析 HLIF 蛋白的相对表达量。

1.8.3 诱导温度 在 50 mL 的 LK 培养基中接种 0.5 mL 培养液,至吸光度值为 0.6 时,加入诱导剂 IPTG(终浓度为 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),分别在 20、25、30、37、42 ℃ 下培养 6 h,取 1 mL 培养液,1 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,取沉淀,将得到的样本加入 1 \times 蛋白上样缓冲液 100 μL ,煮沸变性 10 min,然后按试剂盒说明书要求进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色、脱色,采用 Image J 软件分析 HLIF 蛋白的相对表达量。

1.8.4 诱导剂浓度 在 50 mL 的 LK 培养基中接种 0.5 mL 培养液后,至吸光度值为 0.6 时,分别加入 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导剂 IPTG,培养 6 h 后取 1 mL 培养液,1 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min 取沉淀,将得到的样本加入 1 \times 蛋白上样缓冲液 100 μL ,煮沸变性 10 min,然后按试剂盒说明书要求进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色、脱色,采用 Image J 软件分析 HLIF 蛋白的相对表达量。

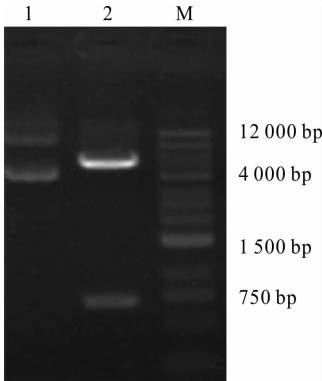
1.8.5 乙酸浓度 在 50 mL 的 LK 培养基中接种 0.5 mL 培养液,至吸光度值为 0.6 时,加入诱导剂 IPTG(终浓度为 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),分别加入 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酸 5 mL,培养 16 h 后取 1 mL 培养液,1 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,取沉淀,将得到的样本加入 1 \times 蛋白上样缓冲液 100 μL ,煮沸变性 10 min,然后按试剂盒说明书要求进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色、脱色,采用 Image J 软件分析 HLIF 蛋白的相对表达量。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Turkey 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒鉴定结果 将重组质粒用 *Xba* I、*Xho* I 进行双酶切后,琼脂糖电泳图谱显示 5 300 bp 和 540 bp 2 个条带,与插入片段大小相符(图 1);测序结果表明,插入片段的核苷酸序列与 GenBank 公布的 HLIF 序列完全一致,表明重组质粒

构建成功。Western blot 结果显示,HLIF 泳道中相应位置能够观察到印迹条带,而空质粒泳道相应位置无明显显影条带出现(图2),证明纯化得到的蛋白是 HLIF 融合蛋白。



1:未酶切质粒;2:*Xba* I/*Xho* I 酶切质粒;M:DNA marker。

图1 HLIF 原核表达质粒酶切鉴定

Fig.1 Identification of prokaryotic expression plasmid of HLIF by restriction enzyme digestion

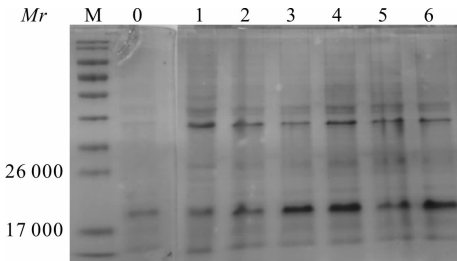


0:阴性对照;1、2:表达目的蛋白。

图2 重组质粒 Western blot 分析结果

Fig.2 Western blot analysis of recombinant plasmids

2.2 不同诱导时间对 HLIF 表达的影响 结果见图3。诱导时间为4、8、12、16、20、24 h 时 HLIF 蛋白相对表达量分别为 11.53 ± 0.22 、 12.19 ± 0.45 、 12.23 ± 0.48 、 14.37 ± 0.62 、 9.52 ± 0.51 、 8.43 ± 0.24 ,不同诱导时间下 HLIF 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F=22.088, P<0.05$)。随着诱导时间延长,HLIF 蛋白相对表达量呈先增加、后降低的趋势,诱导16 h 时 HLIF 蛋白相对表达量显著高于诱导4、8、12、20、24 h,差异有统计学意义($P<0.05$)。

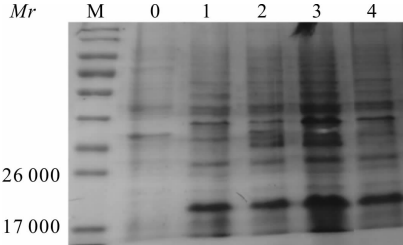


M:maker;0:阴性对照;1:诱导4 h;2:诱导8 h;3:诱导12 h;4:诱导16 h;5:诱导20 h;6:诱导24 h。

图3 不同诱导时间下 HLIF 的表达产物

Fig.3 HLIF expression products at different induction time

2.3 不同浓度大肠杆菌对 HLIF 表达的影响 结果见图4。大肠杆菌浓度,即其菌液吸光度值为0.5、0.6、0.8、1.0 时 HLIF 蛋白相对表达量分别为 7.23 ± 0.56 、 7.70 ± 0.45 、 8.83 ± 0.47 、 8.89 ± 0.62 ,不同浓度大肠杆菌诱导时 HLIF 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F=17.153, P<0.05$)。吸光度值为0.8 时 HLIF 蛋白相对表达量显著高于吸光度值为0.5、0.6 时,差异有统计学意义($P<0.05$)。吸光度值为1.0 时 HLIF 蛋白相对表达量与吸光度值为0.8 时比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

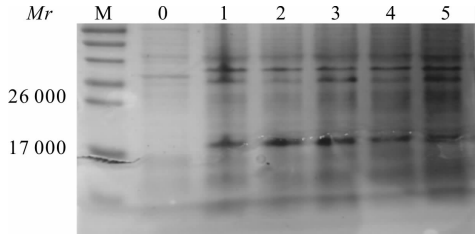


M:maker;0:阴性对照;1:吸光度值为0.5;2:吸光度值为0.6;3:吸光度值为0.8;4:吸光度值为1.0。

图4 不同浓度大肠杆菌下 HLIF 的表达产物

Fig.4 HLIF expression products with different concentration of *E. coli*

2.4 不同诱导温度对 HLIF 表达的影响 结果见图5。诱导温度为20、25、30、37、42 ℃ 时 HLIF 蛋白相对表达量分别为 6.89 ± 0.51 、 10.72 ± 0.55 、 6.88 ± 0.59 、 5.91 ± 0.32 、 4.12 ± 0.29 。不同诱导温度下 HLIF 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义($F=18.053, P<0.05$);25 ℃ 时 HLIF 蛋白相对表达量显著高于20、30、37、42 ℃ 时,差异有统计学意义($P<0.05$)。

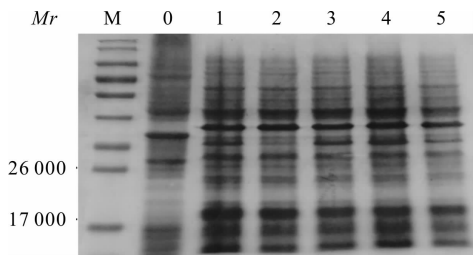


M:maker;0:阴性对照;1:20 ℃;2:25 ℃;3:30 ℃;4:37 ℃;5:42 ℃。

图5 不同诱导温度下 HLIF 的表达产物

Fig.5 HLIF expression products at different induction temperatures

2.5 不同浓度诱导剂对 HLIF 表达的影响 结果见图6。诱导剂浓度为0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mmol · L⁻¹ 时 HLIF 蛋白相对表达量分别为 8.45 ± 0.49 、 8.57 ± 0.57 、 8.42 ± 0.48 、 8.35 ± 0.37 、 8.37 ± 0.30 。不同浓度诱导剂诱导时 HLIF 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($F=1.181, P>0.05$)。

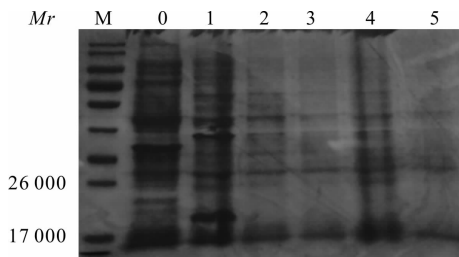


M:maker;0:阴性对照;1:0.1 mmol · L⁻¹ IPTG;2:0.3 mmol · L⁻¹ IPTG;3:0.5 mmol · L⁻¹ IPTG;4:0.7 mmol · L⁻¹ IPTG;5:0.9 mmol · L⁻¹ IPTG。

图 6 不同浓度诱导剂诱导时 HLIF 表达产物

Fig. 6 HLIF expression products induced with different concentrations of inducers

2.6 不同浓度乙酸对 HLIF 表达的影响 结果见图 7。乙酸浓度为 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4 mmol · L⁻¹ 时 HLIF 蛋白相对表达量分别为 14.09 ± 0.72、5.34 ± 0.23、5.32 ± 0.41、5.29 ± 0.35、3.37 ± 0.26。不同浓度乙酸诱导时 HLIF 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 27.181, P < 0.05$)。乙酸浓度为 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4 mmol · L⁻¹ 时 HLIF 蛋白相对表达量均显著低于乙酸浓度为 0.0 mmol · L⁻¹ 时, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但乙酸浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 mmol · L⁻¹ 时 HLIF 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



M:maker;0:阴性对照;1:0.00 mmol · L⁻¹ 乙酸;2:0.10 mmol · L⁻¹ 乙酸;3:0.20 mmol · L⁻¹ 乙酸;4:0.30 mmol · L⁻¹;5:0.40 mmol · L⁻¹ 乙酸。

图 7 不同浓度乙酸诱导时 HLIF 表达产物

Fig. 7 HLIF expression products induced with different concentrations of acetic acid

3 讨论

LIF 的生物功能体现在原始生殖细胞增殖、多潜能胚胎维持、子宫内膜蜕膜化和胚泡着床、海马-垂体-肾上腺素轴活化和垂体发育、成骨细胞和破骨细胞的功能、脂肪细胞脂类和能量的稳定以及对肿瘤应答的自分泌/旁分泌生长调节等多个方面^[5], 随着 HLIF 在生物医学领域的广泛应用, HLIF 的量少、昂贵等问题更加突出, 促使研究者不断对其优化方法进行改进。HLIF 有 3 对二硫键、5 个 α 螺旋和 3 个 β 折叠, 结构相对复杂, 在大肠杆菌中表达时易

形成包涵体, 但有研究表明, 体外表达的 LIF 的功能不受糖基化程度的影响^[6], 因此, 本研究旨在通过原核表达获得大量有活性的 HLIF。

有研究表明, 大肠杆菌 BL21 在培养初期即可达到其对数生长期, 表明其生长力旺盛, 但是较长时间后, 大肠杆菌的浓度和活力均下降^[7]。本研究结果显示, 随着诱导时间延长, HLIF 蛋白相对表达量也会增加, 但诱导时间太长会影响 HLIF 的活性且使 HLIF 产量下降, 以 16 h 最好, 符合预期结果。

研究显示, 在培养基等外部环境不变的条件下, 初始浓度较高的大肠杆菌较快达到对数期^[8]。本研究结果显示, 大肠杆菌菌液的吸光度值为 0.8 时 HLIF 蛋白的相对表达量最合适, 大肠杆菌菌液的吸光度值为 1.0 时 HLIF 蛋白的相对表达量与大肠杆菌菌液的吸光度值为 0.8 时比较差异无统计学意义, 考虑要获得最大量的 HLIF, 建议在大肠杆菌菌液的吸光度值为 0.8 时开始诱导。

大部分包涵体是克隆表达的产物, 这些产物在一级结构上是正确的, 在立体结构上却是错误的, 目前其产生机制并不清楚, 有研究认为低温通过影响包涵体而促进外源蛋白的表达^[9]。何佳鲜等^[10] 研究表明, 草莓 FaMYB5 重组蛋白在大肠杆菌中表达的最适温度是 25 ℃。本研究结果显示, 不同温度诱导时 HLIF 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义, 其中 25 ℃ 时 HLIF 蛋白相对表达量显著高于 20、30、37、42 ℃ 时, 与文献报道一致^[10]。而王晓雯等^[11] 研究显示, HLIF 最优表达是 20 ℃, 这可能与质粒的不同有关, 需要进一步研究。

IPTG 是一种作用极强的诱导剂, 其十分稳定, 不被细菌代谢, 作用于大肠杆菌乳糖操纵子的 Z、Y、A 等 3 个结构基因而诱导外源基因的表达, 但是高浓度的 IPTG 有害于大肠杆菌^[12]。本研究结果中, 不同浓度诱导剂诱导时 HLIF 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义, 提示 IPTG 浓度对 HLIF 的表达无影响, 很可能与浓度梯度过小有关。

有研究显示, 乙酸不仅导致重组菌生长速率降低及延迟期增长, 而且对外源基因产物的表达具有抑制作用^[13]。本研究中, 不同浓度乙酸诱导时 HLIF 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义, 其中乙酸浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 mmol · L⁻¹ 时的 HLIF 蛋白相对表达量均显著低于乙酸浓度为 0.0 mmol · L⁻¹ 时, 而乙酸浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 mmol · L⁻¹ 时 HLIF 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义, 其结果与文献报道相符^[13]。

综上所述, 本研究用 pET-28a 作为原核表达质粒, 探讨了简单、高效表达重组 HLIF 蛋白的条件,

结果显示,其中诱导时间 16 h、大肠杆菌浓度(吸光度值) 0. 8、诱导温度 25 ℃、诱导剂浓度 0. 1 mmol · L⁻¹、乙酸浓度 0. 0 mmol · L⁻¹ 等为高效表达重组 HLIF 蛋白的最优条件。本研究成功在大肠杆菌表达了 HLIF,并探索出了适合表达的最佳诱导时间、大肠杆菌浓度、诱导温度、诱导剂浓度、乙酸浓度等条件,为进一步研究 HLIF 的生理功能奠定了基础。

参考文献:

[1] YAMAMORI T,FUKADA K,AEBERSOLD R,*et al.* The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor [J]. *Science*, 1989, 246 (4936) : 1412-1416.

[2] PASQUIN S,SHARMA M,GAUCHAT J F,*et al.* Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism [J]. *Cytokine*, 2016, 8 (82) : 122-126.

[3] SUTHERLAND L, RUHE M, GATTEGNO-HO D, *et al.* LIF-dependent survival of embryonic stem cells is regulated by a novel palmitoylated Gab1 signalling protein [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131 (18) : 178-183.

[4] SAM BROOK J, GREEN M R. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂,译. 北京:化学工业出版社,2008:89-92.

[5] NICOLA N A, BABON J J. Leukemia inhibitory factor (LIF) [J].

Cytokine Growth Factor, 2016, 26 (5) : 533-544.

[6] WILLIAM R L, HILTON D J, PEASE S, *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintain the developmental potential of embryonic stem cell [J]. *Nature*, 1988, 336 (6200) : 684-687.

[7] MATHLOUTHI A, PENNACCHIETTI E, BIASE D, *et al.* Effect of temperature, pH and plasmids on *in vitro* biofilm formation in *Escherichia coli* [J]. *Acta Naturae*, 2018, 10 (4) : 129-132.

[8] 于平,陈凯飞,朱祺,等. 重组大肠杆菌生物合成 γ -氨基丁酸的发酵条件优化 [J]. 中国食品学报, 2018, 18 (6) : 112-120.

[9] HUMER D, SPADIUT O. Wanted: more monitoring and control during inclusion body processing [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34 (11) : 153-158.

[10] 何佳鲜,江雷雨,洪敏,等. 草莓 FaMYB5 基因原核表达的响应面优化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36 (1) : 388-394.

[11] 王晓雯,郝雪艳,李小璐,等. 重组人白血病抑制因子在大肠杆菌中的表达及纯化 [J]. 湖北医药学院学报, 2017, 36 (3) : 214-220.

[12] 张彭湃,王松廷. 乳糖诱导剂促进 P450 BM-3 在大肠杆菌中可溶性表达的研究 [J]. 工业微生物, 2016, 46 (4) : 14-18.

[13] 戴琨,王腾飞,郝昭程,等. 乙酸对重组大肠杆菌 BL21 产酶的影响及作用机理研究 [J]. 生物技术通报, 2016, 31 (5) : 206-213.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)

(上接第 227 页)

且肿瘤组织中 FAK 表达量随 PXN 的下调而减少,说明 PXN 和 FAK 之间在信号转导路径中可以相互作用,因此,联合检测 PXN 和 FAK 表达有望成为临床靶向诊治 HCC 的新途径。

参考文献:

[1] 吴孟超. 关于降低肝癌术后复发率之我见 [J]. 中国实用外科杂志, 2012, 22 (10) : 793- 795.

[2] LÓPEZ-COLOMÉ A M, LEE-RIVERA I, BENAVIDES-HIDALGO R, *et al.* Paxillin: a crossroad in pathological cell migration [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10 (1) : 50.

[3] 王波,金雯,杨梅,等. shRNA 下调 Paxillin 表达对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖、侵袭的影响 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34 (7) : 743-747.

[4] HU Y L, LU S, SZETO K W, *et al.* FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells [J]. *Sci Rep*, 2014, 4 : 6024.

[5] SCHALLER M D. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (44) : 6459-6472.

[6] HU C T, CHENG C C, PAN S M, *et al.* PKC mediates fluctuant ERK-paxillin signaling for hepatocyte growth factor-induced migration of hepatoma cell HepG2 [J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (6) :

1457-1467.

[7] KAWADA I, HASINA R, LENNON F E, *et al.* Paxillin mutations affect focal adhesions and lead to altered mitochondrial dynamics: relevance to lung cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14 (7) : 679-691.

[8] DERAMAUDT T B, DUJARDIN D, NOULET F, *et al.* Altering FAK-paxillin reduces adhesion, migration and invasion processes [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (3) : e92059.

[9] CHEN D L, WANG D S, WU W J, *et al.* Overexpression of paxillin induced by miR-137 suppression promotes tumor progression and metastasis in colorectal cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34 (4) : 803-811.

[10] KUBOYAMA T, LUO X, PARK K, *et al.* Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration [J]. *Exp Neurol*, 2013, 248 (5) : 157-169.

[11] 庞霞,李晨磊,赵志华,等. 食管鳞状细胞癌组织中 FAK、Paxillin 和 MMP-9 蛋白的表达及临床意义 [J]. 重庆医学, 2011, 40 (14) : 1367-1369.

[12] CUI S, WANG J, WU Q, *et al.* Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (13) : 21674-21691.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)