

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 °C 热激 90 s,马上放回冰上,冰浴 2 min,加 400 μL LB 培养基,于 37 °C 摇床慢摇震荡培养 60 min,取 20 μL 涂在 LK 固体培养基上,37 °C 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 °C 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 °C 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。

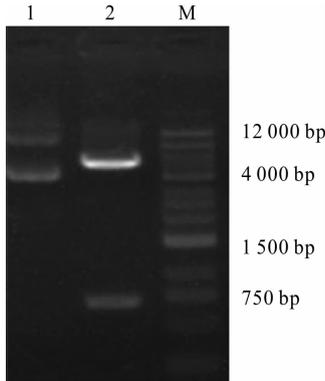
1.8.5 乙酸浓度 在 50 mL 的 LK 培养基中接种 0.5 mL 培养液,至吸光度值为 0.6 时,加入诱导剂 IPTG(终浓度为 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),分别加入 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酸 5 mL,培养 16 h 后取 1 mL 培养液,1 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,取沉淀,将得到的样本加入 1 \times 蛋白上样缓冲液 100 μL ,煮沸变性 10 min,然后按试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

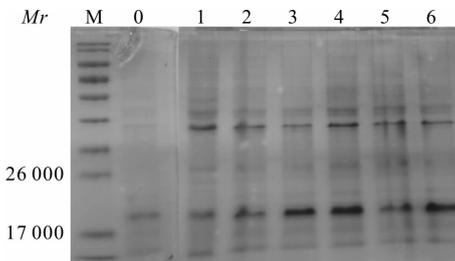


0:阴性对照;1,2:表达目的蛋白。

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($P < 0.05$)。

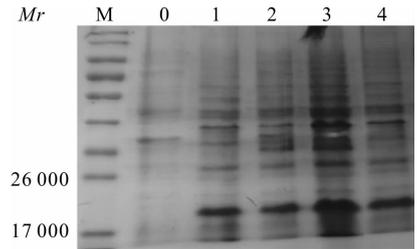


M:maker;0:阴性对照;1:诱导 4 h;2:诱导 8 h;3:诱导 12 h;4:诱导 16 h;5:诱导 20 h;6:诱导 24 h。

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($P > 0.05$)。

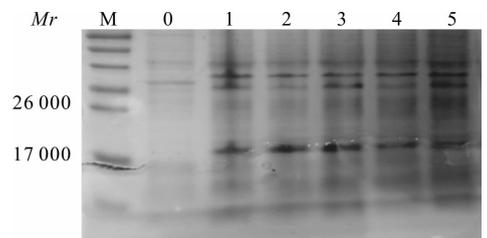


M:maker;0:阴性对照;1:吸光度值为 0.5;2:吸光度值为 0.6;3:吸光度值为 0.8;4:吸光度值为 1.0。

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 °C 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 °C 时 HLIF 蛋白相对表达量显著高于 20、30、37、42 °C 时,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

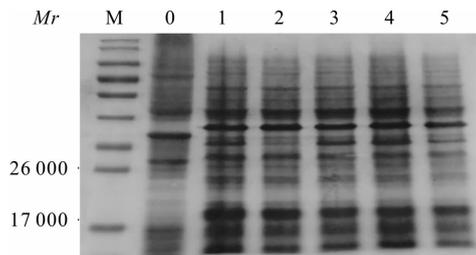


M:maker;0:阴性对照;1:20 °C;2:25 °C;3:30 °C;4:37 °C;5:42 °C。

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($F = 1.181, P > 0.05$)。

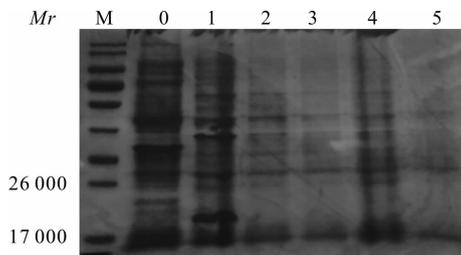


M:maker;0:阴性对照;1:0.1 mmol · L⁻¹ IPTG;2:0.3 mmol · L⁻¹ IPTG;3:0.5 mmol · L⁻¹ IPTG;4:0.7 mmol · L⁻¹ IPTG;5:0.9 mmol · L⁻¹ IPTG。

图6 不同浓度诱导剂诱导时 HLIIF 表达产物

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

2.6 不同浓度乙酸对 HLIIF 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 HLIIF 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 HLIIF 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 HLIIF 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 HLIIF 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 HLIIF 表达产物

Fig.7 HLIIF 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 HLIIF 在生物医学领域的广泛应用, HLIIF 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 HLIIF。

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, HLIIF 蛋白相对表达量也会增加, 但诱导时间太长会影响 HLIIF 的活性且使 HLIIF 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 HLIIF 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 HLIIF 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 HLIIF, 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 °C。本研究结果显示, 不同温度诱导时 HLIIF 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义, 其中 25 °C 时 HLIIF 蛋白相对表达量显著高于 20、30、37、42 °C 时, 与文献报道一致^[10]。而王晓雯等^[11]研究显示, HLIIF 最优表达是 20 °C, 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 HLIIF 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义, 提示 IPTG 浓度对 HLIIF 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 HLIIF 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 HLIIF 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 HLIIF 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 HLIIF 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 °C、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)