

## 鲎血细胞中脂多糖结合蛋白 TALF 在大肠杆菌中的表达研究

王东宁<sup>1\* \*</sup> 孙向军<sup>2\* \*</sup> 张惟杰<sup>1\*</sup> 吴祥甫<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>( 上海交通大学生命科学与技术学院 ,上海 200030 )

<sup>2</sup>( 上海交通大学农业与生物技术学院 ,上海 200030 )

<sup>3</sup>( 中科院上海生命科学研究院生物化学与细胞学研究所 ,上海 200031 )

**摘 要** TALK( Tachyleus anti-lipopolysaccharide factor )对细菌内毒素( LPS )的核心部分有抑制作用。研究 TALF cDNA 基因在大肠杆菌中的表达 ,首先将 TALF cDNA 基因分别插入大肠杆菌表达载体 pGEX-4T-2、pET22b、pET28a 中 ,构建重组表达质粒 ,转化于大肠杆菌 BL21( DE3 )。结果表明克隆于 pET22b、pET28a 中的 TALF cDNA 基因没有表达 ,而融合了 GST 的 TALF 基因( GST-TALF )能够在大肠杆菌中表达 ,并形成包涵体。从 1L 培养基中可获得 4mg 纯度为 91% 的 GST-TALF 融合蛋白。经复性和纯化后的融合蛋白 GST-TALF 几乎检测不到抑菌活性及 LPS 中和活性 ,但该融合蛋白经凝血酶消化后表现出明显的体外抑菌活性及 LPS 中和活性。

**关键词** 融合蛋白 ,包涵体 ,变复性 ,抑菌活性 ,LPS 中和活性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061( 2004 )04-0540-04

脂多糖( Lipopolysaccharide ,LPS )是革兰氏阴性菌(  $G^-$  )细胞外壁的主要成分 ,是  $G^-$  菌引起的败血症或脓毒性休克的主要原因。脂多糖刺激单核巨噬细胞活化 ,从而介导了一个复杂的炎症级联反应。阻断 LPS 不仅可以钝化或阻断其后引起败血症的一系列的炎症级联反应 ,而且并不妨碍次级因子在抵御感染中的积极效应。因此 ,内毒素结合蛋白在医药领域具有重要意义。1982 年 ,Tanaka S 等在分离纯化美洲鲎血细胞组分时 ,发现其中一种蛋白能够阻断内毒素介导的鲎血凝集反应的激活 ,该蛋白当时被命名为抗脂多糖因子( anti-LPS factor found in hemocytes from Limulus polyphemus ,LALF )<sup>[2]</sup>。随后 ,具有同样活性的蛋白也在东方鲎血细胞中被发现<sup>[3]</sup> ,即 TALK( Tachyleus anti-lipopolysaccharide factor )。1986 年 ,Aketagawa J 等测定了 TALF 的氨基酸序列 ,表明它是一种简单的单链碱性蛋白 ,其分子量为 11.6kD<sup>[4]</sup>。已有报道表明 TALF 对 LPS 的毒性部分脂质 A 有极高的亲和性 ,因而它可以中和不同  $G^-$  菌株的 LPS<sup>[6]</sup>。同时 ,由于 TALF 是鲎体内的天然存在物而具有结构与功能上的稳定性 ,它们有望开发成为一类新型的抗内毒素药物。

尽管很多研究已经表明 TALF 对于 LPS 具有高特异的结合性 ,而且正是通过结合了这种细菌表面的成份抑制了细菌诱发的各种感染 ,但是迄今从未有研究论文报道过利用细菌作为宿主直接将 TALF 进行表达。一直以来用于功能活性鉴定的蛋白质都来自于天然鲎血的分离纯化物 ,由于天然鲎血细胞中 TALF 的含量有限 ,且需在无菌环境下纯化 ,因此较难获得大量高纯度的 TALF。我们希望利用基因工程的手段大量制备具有生物活性的重组 TALF 蛋白 ,以满足用于研究或临床治疗的需要。本文尝试构建不同的大肠杆菌重组表达质粒以表达 TALF 基因 ,并对重组表达产物进行了活性测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** :用于质粒扩增的大肠杆菌 TG1、大肠杆菌表达菌株 BL21( DE3 ) ,质粒 pBS-SK ( + ) pGEX-4T-2、pET22b( + ) pET28a( + ) ,均由中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫教授实验室保存 ,大肠杆菌  $K_{12}$  D<sub>31</sub> 为生物工程中心庞英明同学惠赠。

收稿日期 2003-11-17 ,修回日期 2004-02-20。

\* 通讯作者。 张惟杰 ,E-mail : yrszhang@hotmail.com ;

吴祥甫 ,Tel : 86-21-54921253 ,E-mail : xfwu@sunm.sh.cn

\*\* 并列第一作者。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

**1.1.2 试剂及工具酶** :限制性内切酶 ,T4 DNA 连接酶 ,*Klenow* 酶 ,*Taq* 酶及 AP 标记的羊抗兔 IgG 多克隆抗体为 GIBCO BRL 公司产品 ;X-Gal、IPTG 为 Boehringer mannheim 产品 ;6 × His 单克隆抗体 ,AP 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体 ,谷胱甘肽琼脂及人血浆来源的凝血酶 Thrombin 为 SIGMA 公司产品 ;谷胱甘肽 S-转移酶( GlutathioneS-Transferase ,GST)抗血清由生物工程中心惠赠。

## 1.2 方法

**1.2.1 重组表达质粒的构建** :利用 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切 ,将克隆在以 pBS-SK( + )载体上的 TALF 基因切下并连接于 pET-28a( + )、pET-22b( + ) ,构建重组表达质粒 pET28a-TALF 和 pET22b-TALF。另外 ,以 pSK-TALF 为模板 ,利用引物 5'-AACGGATC-CATGGAGGGAGGAATCTGGAC-3' 及 5'-TAGAATTCT-TACTGATACTGAGAGATAAAGG ,进行 PCR 扩增 ,并利用 *Bam* H I 和 *Eco* R I 酶切位点将 PCR 产物插入 pGEX-4t-2 载体 ,构建重组表达质粒 pGEX-4t-2-TALF。

**1.2.2 TALF 基因在大肠杆菌中的表达** :将所有重组表达质粒转化 BL21( DE3 )于新鲜的 LB 中培养至  $A_{600}$  为 0.6。以 2% 接种量转接菌体于新鲜 LB 中 ,37℃ 温育 2h ,然后加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG ,37℃ 诱导表达 2 ~ 3h。收集菌体 ,用 SDS-PAGE 进行分析检测。

**1.2.3 包涵体的洗涤与变复性** :收集诱导表达后的菌体经超声波破碎 ,4℃ ,16000g 离心 20min 后收集上清和沉淀 ,用 SDS-PAGE 判定表达产物的存在形式。包涵体用 6mol/L 的尿素 ,50mmol/L Tris-HCl , pH8.0 溶解 ,离心后保留上清。溶解的包涵体用 10 倍体积的复性缓冲液( 50mmol/L Tris-HCl ,5mmol/L EDTA ,0.25mmol/L 氧化型谷胱甘肽 ,1.25mmol/L 还原型谷胱甘肽 ,pH8.0 )在 4℃ 静置复性约 36h ,然后用 1 × PBS 透析。

**1.2.4 重组表达产物的纯化** :表达产物以谷胱甘肽亲和层析柱来纯化。透析后的融合蛋白经 4℃ ,16000g 离心 10min 后可直接上柱。分别用 10 倍柱体积的 PBST( PBS 中含 0.1% 的 TritonX-100 )和 PBS 洗柱 ,最后用新鲜配置的洗脱液( 50mmol/L Tris-HCl , pH8.8 ,5 ~ 10mmol/L 还原型谷胱甘肽 )洗脱蛋白 ,收集流出液 ,透析 ,冻干。

**1.2.5 融合表达蛋白的酶解** :将冻干的 GST-TALF 融合蛋白 样品溶解于 NaCl 和 CaCl<sub>2</sub> 终浓度分别为 150mmol/L 和 2.5mmol/L 溶液中 ,然后按 1 : 500

( Thrombin :融合蛋白 )的质量比向上述溶液中加入凝血酶( Sigma T7009 ,1325 NIH Units/mg ) ,25℃ 酶切 12h。

**1.2.6 重组表达产物的体外抑菌活性测定** :采用典型的革兰氏阴性菌 *K<sub>12</sub>D<sub>31</sub>* 作为指示菌。将 *K<sub>12</sub>D<sub>31</sub>* 接于 37℃ 培养至 OD 0.6 取纯化后未经酶切的重组蛋白 GST-TALF 样品、经 Thrombin 酶切后的样品以及对照样品 ,加入不同管菌液中 ,37℃ 摇床温育 1h ,稀释涂板。平板于 37℃ 温育过夜 ,计数。以不含 GST-TALF 融合蛋白的酶解液作为 TALF 抑菌活性分析的对照。

**1.2.7 重组 TALF 体外 LPS 中和活性的测定** :将经过酶解或未经酶解的样品对双蒸水透析 ,冷冻干燥。然后将冻干的样品重新溶解于 1/10 体积的去热源水中 ,以用于体外 LPS 中和活性测定。根据所购鲎试剂说明书 ,首先将所有溶解于去热源水中的样品与等体积不同浓度的标准 LPS 样品混合于去热源的小玻璃管中 ,37℃ 温育 30min ;然后向小玻璃管中加入等体积的鲎试剂 ,再于 37℃ 温育 60min ,观察鲎试剂的凝固情况。另外 ,以去热源水代替表达样品与标准 LPS 样品混合后 ,加入鲎试剂进行上述实验作为对照以说明鲎试剂的可用性

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组表达质粒的构建

构建重组表达质粒 pET28a-TALF 和 pET22b-TALF ,其中 pET28a-TALF 中 TALF 编码基因的 5' 端融合了 6 × His ,而 pET22b-TALF 中则仅在 TALF 的编码基因前多了一个起始密码子 ATG ,它编码一个甲硫氨酸 Met。

另外 ,也构建了重组表达质粒 pGEX-4t-2-TALF ,在 TALF 编码基因的 5' 端融合了谷胱甘肽 S-转移酶 ( GST )蛋白的编码基因 ,从而使表达产物为融合蛋白 GST-TALF。

### 2.2 TALF 基因在大肠杆菌中的表达

Tris-tricine 的分析表明 ,重组质粒 pET28a-TALF 和 pET22b-TALF 均没有表达。同时在实验过程中 ,我们发现转化了这几个重组质粒的菌体在加入诱导剂后几乎完全停止了生长 ,甚至有部分死亡。这一结论可以通过我们测定的诱导前后的菌体在 600nm 波长处的吸光度加以证明 ,以 pET28a-TALF 的转化菌为例 ,诱导前菌体的  $A_{600}$  为 0.47 ,加入诱导剂 2 ~ 3 h 后菌体的  $A_{600}$  为 0.33。这可能是由于对数生长期的菌一旦被诱导启动外源基因 TALF 的表达 ,其生

长就会受到抑制甚至被致死 ,当然也就无法得到重组表达的外源蛋白。

SDS-PAGE 及 Westen-blot 的分析表明 ,在重组质粒 pGEX-4t-2- *TALF* 转化的 *BL21* 中 ,在分子量约 37kD 左右处有一细细的表达条带( Fig.1 , Fig.2 ) ,这与 GST-*TALF* 融合蛋白的计算分子量是相符合的。

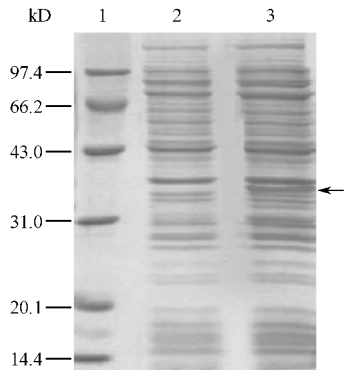


图 1 GST-*TALF* 在大肠杆菌中表达的 SDS 电泳图  
Fig.1 SDS-PAGE analysis of GST-*TALF* expressed in *E. coli*  
1 : protein marker ; 2 : sample without induction ; 3 : sample induced with 1mmol/L IPTG

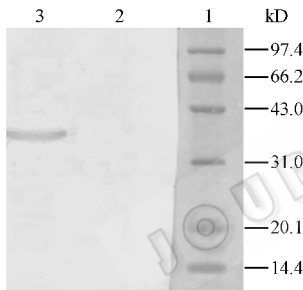


图 2 GST-*TALF* 在大肠杆菌中表达的蛋白印迹图  
Fig.2 Western blot annalysis of GST-*TALF* expressed in *E. coli*  
1 : protein marker ; 2 : sample without induction ; 3 : sample induced with 1mmol/L IPTG

通过与 GST 的融合 ,我们可以使 *TALF* 在大肠杆菌中获得表达。这可能是由于 GST 的分子量约是 *TALF* 的 2 倍 ,它的存在就掩盖了 *TALF* 的结构域 ,从而使其失去了抑菌活性得以表达出来。融合表达产物经类凝血酶水解后才能表现出生物活性 ,这说明与 GST 融合的 *TALF* 无法暴露其 LPS 结合区 ,而经酶解后的样品具有明显的体外抑菌活性及 LPS 中和活性 ,这是酶解后 *TALF* 的 LPS 结合活性区得以充分暴露的反映。

2.3 重组表达的融合蛋白 GST-*TALF* 的变复性与纯化

为了鉴定表达产物的存在形式 ,我们将超声破菌后的上清及沉淀分别进行电泳 ,结果显示表达产

物主要以包涵体形式存在。从 1L 培养基中可获得 5.8g(湿重)菌体 ,将其中所含表达产物的包涵体经过洗涤与变复性处理 ,并采用谷胱甘肽柱进一步纯化 ,可获得 4mg 纯度为 91% 的 GST-*TALF* ( Table 1 ) ,纯化的 GST-*TALF* 蛋白的分子量为 37kD( Fig.3 )。

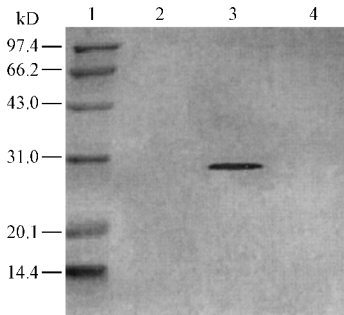


图 3 纯化的融合蛋白 GST-*TALF* 的 SDS 电泳图  
Fig.3 SDS-PAGE anyalysis of purified GST-*TALF* fusion protein  
1 protein marker ; 2 ~ 4 : the 1 ~ 3 tube of eluted samples , the GST-*TALF* was only in the tube2

表 1 GST- <i>TALF</i> 纯化与复性			
Table 1 GST- <i>TALF</i> purification and refolding			
	Urea extract	After refolding	After GST
Protein/mg	8.8	7	4

Note : Representative preparation : 5.8g wet cells/1L  
2.4 融合蛋白 GST-*TALF* 酶解前后的抑菌活性测定

Fig.4 的数据表明 ,对于酶切前的样品来说 ,尽管菌落形成数有所减少 ,但与对照并没有数量级上的差别 ,因此我们认为重组表达的融合蛋白 GST-*TALF* 没有明显的抑菌活性。然而 ,经过蛋白酶消化后的样品明显地表现出抑菌活性 ,这可能是由于 *TALF* 与 GST 分离后 ,其 LPS 结合区被暴露出来的缘故。

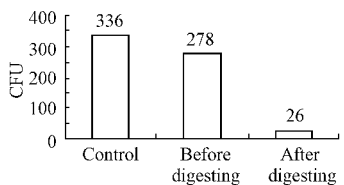


图 4 融合蛋白酶解前后的抑菌活性  
Fig.4 Bactericidal activity of recombinant protein  
About 60μg of *TALF* was contained in each of sample before digesting and sample after digesting

2.5 重组 *TALF* 体外 LPS 中和活性的测定  
LPS 结合蛋白能够抑制 LPS 诱导的鲎血细胞裂解物(加工后即鲎试剂)的凝固 ,因此可用凝胶形成实验检测 *TALF* 对 LPS 的中和活性。表 2 所示的

结果表明,经 thrombin 酶解后的样品管中的溶液没有发生凝固(用‘+’表示,溶液不凝的管子用‘-’表示),也就是说重组表达的 TALF 经酶解后表现出中和 LPS 的活性。

LPS 中和实验表明,TALF 之所以具有抑菌能力是由于 TALF 能够结合 LPS 的缘故。

表 2 凝胶形成实验检测重组 TALF 体外 LPS 中和活性  
Table 2 Recombinant Tachypleus anti-lipopolysaccharide ( LPS )  
Factor ( TALF ) neutralized LPS in vitro by gel-clotting assay

Standard LPS( eu/mL )	Control	Before digesting	After digesting
5	+	+	+
2.5	+	+	+
2	+	+	-
1	+	+	-
0.5	+	+	-
0	-	-	-

1eu≈10ng ,About 60μg of TALF was contained in each of sample before digesting and sample after digesting.

REFERENCES( 参考文献 )

[ 1 ] Wang DN ( 王东宁 ), Zhang WJ ( 张惟杰 ), Wu XF ( 吴祥甫 ).

The new antiendotoxin strategies. *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ), 2001 , **17** : 241 – 245  
[ 2 ] Tanaka S , Nakamura T , Morita T , et al . Limulus anti-LPS factor : an anticoagulant which inhibits the endotoxin mediated activation of *Limulus* coagulation system. *Biochem Biophys Res Commun* , 1982 , **105** : 717 – 723  
[ 3 ] Morita T , Ohtsubo S , Nakamura T et al . Isolation and biological activities of *limulus* anticoagulant ( anti-LPS factor ) which interacts with lipopolysaccharide ( LPS ) . *J Biochem ( Tokyo )* , 1985 , **97** : 1611 – 1620  
[ 4 ] Aketagawa J , Miyata T , Ohtsubo S et al . Primary structure of *limulus* anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. *J Biol Chem* , 1986 , **261** : 7357 – 7365  
[ 5 ] Muta T , Miyata T , Tokunaga F et al . Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab , *Limulus polyphemus* . *J Biochem ( Tokyo )* , 1987 , **101** : 1321 – 1330  
[ 6 ] Elsbach P , Weiss J . Prospects for use of recombinant BPI in the treatment of gram-negative bacterial infections. *Infect Agents Dis* , 1995 , **4** : 102 – 109  
[ 7 ] Wainwright NR . Anti-LPS factor from horseshoe crabs and methods of use , US . *United States patent* , patent number : 5780429 , Jul 14 , 1998  
[ 8 ] Schägger H , Jagow G . Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* , 1987 , **166** : 368 – 379

Research on TALF Expression in *Escherichia coli*

WANG Dong-Ning<sup>1</sup> SUN Xiang-Jun<sup>2</sup> ZHANG Wei-Jie<sup>1\*</sup> WU Xiang-Fu<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>( College of Science and Technology , Shanghai Jiao Tong University , Shanghai 200030 , China )

<sup>2</sup>( College of Agricultural and Biotechnology , Shanghai Jiao Tong University , Shanghai 200030 , China )

<sup>3</sup>( Institute of Biochemistry and Cell Biology , Shanghai Institute for Biological Science , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200031 , China )

**Abstract** The expression of cDNA encoding Tachypleus anti-lipopolosaccharide ( LPS ) factor , which is of interest for use as a potential inhibitor of the common core subunit of Gram-negative bacterial endotoxin. First , the TALF gene was inserted into expression vectors pGEX-4T-2、pET22b and pET28a to construct recombinant expression plasmids. The recombinant plasmids were transformed to *E . coli* BL21 ( DE3 ) and the expression of TALF was examined. Results show that *TALF* in pET22b and pET28a vectors can 't be expressed. Only the fusion protein GST-TALF was expressed in *E . coli* BL21 existing as inclusion bodies. From 1 liter of culture , about 4mg of fusion protein GST-TALF with 91 % purity was finally obtained. No apparent bactericidal activity and LPS neutralizing activity of the fusion protein GST-TALF were found. After digested with thrombin , the fusion protein GST-TALF exhibited strong bactericidal activity and LPS neutralizing activity.

**Key words** expression , fusion protein , inclusion body , refolding , bactericidal activity , LPS neutralizing activity