

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)10-0888-04

重组人血小板因子 4 的表达、纯化及活性鉴定

李岩, 黄勇, 陈南春, 陈苏民 (第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710033)

Cloning, expression, purification and bioassay of recombinant human platelet factor 4

Li Yan, HUANG Yong, CHEN Nan-Chun, CHEN Su-Min

Department of Biochemistry & Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To obtain human platelet factor 4 (hPF4) with biological activity by means of genetic engineering. METHODS: DNA coding sequence for hPF4 was obtained by PCR and cloned into plasmid pRSET to construct fusion expressed vector pRSET-PF4. After pRSET-PF4 was transformed to *E. coli* DH5a, the bacteria were induced by IPTG. The expressed hPF4 fused protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and identified by SDS-PAGE. The activity of rhPF4 was detected by choriollantoic membrane assay (CAM). RESULTS: The DNA sequencing showed that the expression vector pRSET-PF4 was constructed successfully. After induced by IPTG, the target protein accounted for 11% of the total bacterial protein and partly was in a soluble form. The purity of the fused protein was up to 84% after Ni-NTA affinity chromatography. The result of activity analysis by CAM showed that rhPF4 could inhibit the formation of new vessels in chick embryos. CONCLUSION: The recombinant hPF4 fused protein with biological activity is obtained.

【Keywords】 platelet factor 4, gene expression, recombinant fusion proteins

【摘要】目的: 用基因工程手段去获取有活性的重组人血小板因子 4 (rhPF4), 为下一步的基础理论研究和临床应用奠定基础。方法: 用 PCR 手段获得人 PF4 的编码序列, 克隆入质粒 pRSET 构建融合表达载体 pRSET-PF4, 转化大肠杆菌, 以 IPTG 诱导表达融合的人 PF4 蛋白, 经镍柱亲和层析纯化, 用 SDS-PAGE 分析所表达的目的蛋白及纯化后蛋白, 用鸡胚绒毛膜尿囊膜实验 (CAM) 验证 rhPF4 的活性。结果: 成功构建了

表达载体 pRSET-PF4, DNA 序列测定结果与预期结果一致。IPTG 诱导表达的 rhPF4 融合蛋白部分以可溶形式存在, 占菌体总蛋白量的 11%。亲和层析纯化后目的蛋白纯度为 84%。CAM 实验表明, 经纯化获得的 rhPF4 对鸡胚血管形成具有抑制作用。结论: 成功地获得了具有高度生物学活性的 rhPF4 蛋白。

【关键词】 血小板因子 4; 基因表达; 重组融合蛋白质类

【中图分类号】 Q786 **【文献标识码】** A

0 引言

血小板因子 4 (platelet factor 4, PF4) 属趋化性细胞因子 CXC 亚家族, 具有多种生物学功能。其除了趋化因子共有的调节炎症反应和介导免疫应答的作用外, 更主要的是一种造血和血管生成的负性调控因子^[1-3]。PF4 能降低正常造血干细胞对化疗药物的敏感性, 而不影响肿瘤细胞对化疗敏感性, 其机制是 PF4 可逆性地抑制细胞增殖, 将细胞阻止在 S 期, 同时还保持细胞的生存力和活力^[4]。因此, PF4 可作为造血细胞的防护剂用于肿瘤临床治疗中。PF4 还是一种血管生成的抑制因子, 已证实 PF4 在体内有抑制实体肿瘤生长的作用, 其机制是通过抑制肿瘤的新生血管形成来抑制肿瘤生长^[5]。同时, PF4 可优先同体内血管生成活跃的组织部位结合, 这为肿瘤的靶向治疗提供了可能。本研究用分子克隆技术构建表达重组人 PF4 (rhPF4) 的载体, 转化大肠杆菌, 经诱导表达后, 纯化所表达的 rhPF4 融合蛋白, 并分析其生物学活性, 为下一步的深入研究和临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 编码 hPF4 的 DNA 序列已人工合成, 并插入 pUC19 构建成为质粒 pUC19-PF4, 保存于本课题组 pDH2 为本课题组构建的融合蛋白表达载体。pRSET 为 Invitrogen 公司产品, 带有 6His 标签; 限制性内切酶 (*EcoRI*, *Xba I*, *Hind III*), *T₄* DNA ligase 及 DL2000 DNA marker 均购自 TaKaRa 公司; 镍柱购于 QIAGEN 公司; 蛋白 marker 购自华美生物工程公司; 其他试剂均为分析纯。

收稿日期 2004-11-25; 修回日期 2004-12-21

通讯作者 陈苏民. Tel. (029) 83376799 Email. chensm@fmmu.edu.cn

作者简介 李岩 (1976-), 女 (汉族), 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士生 (导师 陈苏民). Tel. (029) 83374516 Email. yan_yan_li_li@163.com

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pRSET-PF4 的构建 设计 PCR 引物, 序列如下: 正向引物(P1): 5'-CG G AAT TCA TGG AAG CTG AAG AAG AC-3'; 反向引物(P2): 5'-GC T CTA GAT TAA GAT TCC AGC AGT TT-3'。其上游和下游引物分别加入了 *EcoRI* 和 *Xba I* 酶切位点(引物序列下划线部分)。以 pUC19-PF4 为模板, 通过 PCR 扩增目的基因 PF4。反应条件: 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 8 s, 共 30 个循环。纯化的 PCR 产物用 *EcoRI* 和 *Xba I* 双酶切, 连接到经同样酶切的 pDH2 中, 构建重组质粒 pDH2-PF4。DNA 测序正确后, 再用 *EcoRI* 和 *Hind III* 双酶切, 连接到经同样酶切的 pRSET 中, 构建重组质粒 pRSET-PF4。酶切鉴定正确的重组克隆将进一步作 DNA 测序分析。

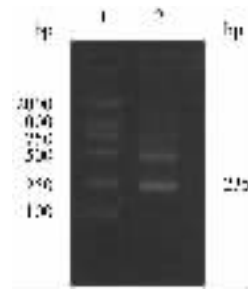
1.2.2 6 HisPF4 的诱导表达 挑取 pRSET-PF4 重组表达菌株, 于 30℃ 培养至对数生长期($A_{600} = 0.4 \sim 0.6$)时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 30℃ 诱导 4 h。收集菌体进行 120 g/L SDS-PAGE, 分析目的蛋白的表达情况。

1.2.3 6 HisPF4 的纯化 离心收集 500 mL 诱导菌液的菌体, 悬浮后于冰浴中进行超声处理(150 W, 30 s, 15 次)。裂解物离心, 收取上清。将样品上镍柱亲和层析, 将穿过峰、洗涤峰及洗脱峰分别收集, SDS-PAGE 分析各峰中蛋白分布状况, 激光薄层扫描分析纯化后目的蛋白纯度, 并用 BCA 法测定目的蛋白含量。

1.2.4 初步活性鉴定 采用鸡胚绒毛膜尿囊膜实验(CAM)检测重组 PF4 的活性。实验分为 3 组: 阴性对照组(只加 Native Elution Buffer), 空白对照组(不加任何试剂), 实验组(加 6HisPF4)。将受精鸡胚于 38℃ 孵育 9 d 后, 在蛋壳上开一直径为 1 cm 的小孔, 将定量后的 6HisPF4 按 4, 8, 16, 32 μL 样品加样于消毒灭菌的小滤纸片上放置于鸡胚绒毛膜尿囊膜上, 阴性对照组分别加入等量的 Native Elution Buffer, 灭菌封口膜封住小孔, 置于 38℃ 孵育箱中继续孵育。72 h 后观察结果。

2 结果

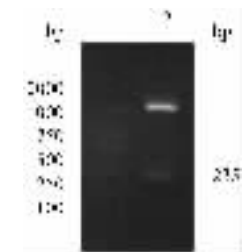
2.1 pDH2-PF4 重组质粒的构建 以 pUC19-PF4 为模板, 经 PCR 扩增获得编码 hPF4 的 DNA 序列, 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 与预期产物大小相符(Fig 1)。将扩增的序列克隆入 pDH2 质粒, *EcoRI* 和 *Xba I* 双酶切鉴定(Fig 2)。



1: DL2000 marker; 2: hPF4.

Fig 1 Electrophoretic analysis of PCR products in 10 g/L agarose gel

图 1 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物

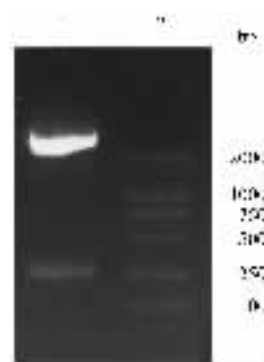


1: DL2000 marker; 2: Recombinant plasmid pDH2-PF4 digested with *EcoRI* and *Xba I*.

Fig 2 Recombinant plasmid pDH2-PF4 identified with *EcoRI* and *Xba I* digestion

图 2 重组质粒 pDH2-PF4 的 *EcoRI* 和 *Xba I* 双酶切鉴定

2.2 pRSET-PF4 重组质粒的构建 pDH2-PF4 经 *EcoRI* 和 *Hind III* 双酶切, 获取目的基因 PF4, 克隆入经同样酶切的 pRSET 载体, 构建重组质粒 pRSET-PF4(Fig 3)。



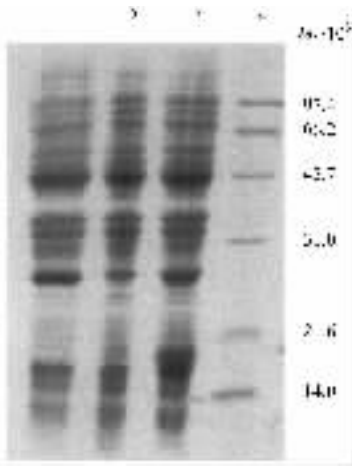
1: Recombinant plasmid pRSET-PF₄ digested with *EcoRI* and *Hind III*; 2: DL2000 marker.

Fig 3 Recombinant plasmid pRSET-PF4 identified with *EcoRI* and *Hind III* digestion

图 3 重组质粒 pRSET-PF4 的 *EcoRI* 和 *Hind III* 双酶切鉴定

2.3 6HisPF4 的诱导表达 含 pRSET-PF4 质粒的 DH5a 菌株, 于 LB 培养基 30℃ 培养过夜, 次日按 2%

转接 IPTG 诱导表达. 120 g/L SDS- PAGE 结果显示: 与未诱导的对照菌相比, 诱导菌在 M_r 18 × 10³ 处有明显的新生蛋白表达带出现, 其分子量大于 6HisPF4 蛋白的理论计算值, 激光薄层扫描表明表达蛋白占菌体总蛋白的 11%(Fig 4).

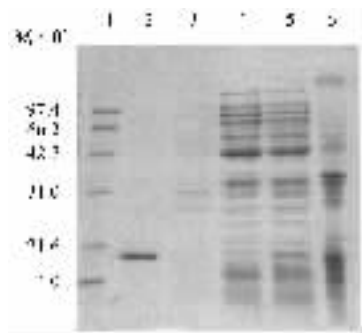


1 : Non-induced bacteria with pRSET ; 2 : Non-induced bacteria with pRSET-PF4 ; 3 : Induced bacteria with pRSET-PF4 ; 4 : Protein marker.

Fig 4 SDS-PAGE of 6HisPF4 expressed in *E. coli*
图 4 大肠杆菌表达 6HisPF4 的 SDS-PAGE

2.4 6HisPF4 的纯化 在大肠杆菌 DH5 α 中诱导表达的 6HisPF4 融合蛋白主要以可溶形式存在(Fig 5),

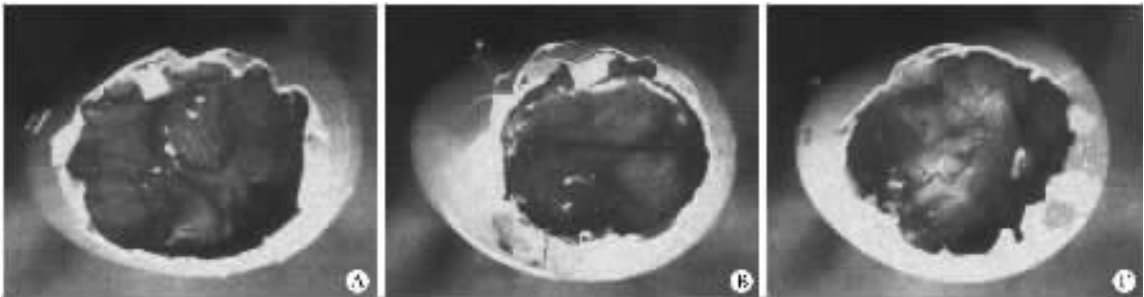
用镍柱亲和层析纯化此融合蛋白, 收集洗脱峰作蛋白定量, SDS-PAGE 后激光薄层扫描显示, 目的蛋白占菌体总蛋白的 84% .



1 : Protein marker ; 2 : Column eluted with elution buffer ; 3 : Column washed with wash buffer ; 4 : Flow through peak ; 5 : Supernatant of bacteria products ; 6 : Precipitation of bacteria products.

Fig 5 SDS-PAGE of 6HisPF4 after purification
图 5 6HisPF4 融合蛋白纯化的 SDS-PAGE 结果

2.5 6HisPF4 的活性鉴定 分别取 4 , 8 , 16 , 32 μ L 样品加样于灭菌滤纸小片(约 0.7 cm × 0.7 cm), 置于孵育 9 d 鸡胚的 CAM 上, 38 $^{\circ}$ C 孵育 72 h, 剥开蛋壳观察, 实验组 CAM 血管较空白对照组及阴性对照组为细, 在剂量为 8 μ L 时血管变细最明显, 说明本实验所得到的 hPF4 对 CAM 血管具有抑制活性(Fig 6).



A : Negative group ; B : Blank control group ; C : Experimental group.

Fig 6 CAM assay of 6HisPF4

图 6 6HisPF4 CAM 实验结果

3 讨论

真核表达系统所面临的最大问题是表达效率低, 所以我们仍然用较简便的高表达的原核系统来表达 PF4 蛋白. 用大肠杆菌作宿主, 其优点是遗传背景清楚、转化效率高、易发酵, 而且价格低廉, 易于操作, 可以快速生产蛋白, 目前已经被批准上市的基因工程重组蛋白质还是用大肠杆菌表达制备的^[6,7].

pRSET 是由 P17 启动子调控下带标签的融合蛋白表达载体, 用 pRSET-PF4 作表达有很多优点: 首先

是它表达的是融合蛋白, 能保证有较高的表达水平, 且容易纯化; 其次 6 × His 标签较其他融合蛋白(如 GST 等) 纯化标签要小, 因此对目的蛋白的结构和功能活性影响小. 本实验我们通过 pRSET 的融合表达使 PF4 以部分可溶形式存在, 因此不需通过变性复性来纯化蛋白, 保持了蛋白的活性, 为后续的动物实验奠定了基础.

本实验诱导表达的 6His-PF4 表观分子量比计算分子质量大, 但对克隆表达的基因测序结果完全与

设计的一致 经过软件分析及实际的纯化、活性鉴定,证明表达的条带确实是预期的. 计算所得的分子质量与实际测得的表现分子质量不一致的例子已经有不少的报道 我们的实验结果也是一例⁸。

【参考文献】

- [1] Barrett J. Chemokines[J]. *Blood*, 1997, 90(3): 909-918.
 [2] Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: An update [J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15(6): 675-693.
 [3] Han ZC, Lu I, Li J *et al.* Platelet factor 4 and other CXC chemokines support the survival of normal hematopoietic cells and reduce the chemosensitivity of cells to cytotoxic agents[J]. *Blood*, 1997, 89(7):

2328-2335.

- [4] Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA *et al.* The role of CXC chemokine as regulators of angiogenesis[J]. *Shock*, 1995, 4(1): 155-172.
 [5] Caen JP, Xi XD, Aidoudi S *et al.* Platelet factor 4, reversible inhibition of megakaryocytogenesis, protector of megakaryocytes during chemotherapy[J]. *Bull Acad Natl Med*, 1995, 179(8): 1657-1893.
 [6] 郭葆玉. 基因工程药学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000: 94-96.
 [7] 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 20-31.
 [8] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 105-106.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)10-0891-01

房间隔缺损介入封堵术并发症的预防及护理

杨文英 杨海宁 郎庆龄 丁守良 胡晓昱 李鲍凤

(武警陕西省总队医院, 陕西 西安 710054)

【关键词】房间隔缺损 封堵术 并发症 护理

【中图分类号】R573.1 【文献标识码】B

1 临床资料 2003-12/2005-01 收治房间隔缺损(ASD)24(男15,女9)例,年龄2~68岁,体质量10~72 kg. 经心脏X线三位片、心电图、彩色多普勒超声心动图确诊为继发型ASD. 经彩色多普勒超声心动图显示ASD直径为4~32 mm,选择的封堵器直径为10~42 mm. 结果:1例术中因封堵器脱落经外科手术抢救治疗无效死亡,1例术后2 d出现Ⅱ度Ⅱ型房室传导阻滞,经药物治疗7 d痊愈,余22例封堵器置入治疗患者无并发症发生,疗效满意.

2 护理

2.1 术前护理 术前患者均有不同程度的焦虑、恐惧心理,主要担心手术能否成功,会不会有严重并发症,手术对机体创伤程度. 针对患者存在的心理问题,责任护士对患者进行术前指导及健康教育. 采用通俗易懂的语言,结合图片、实物,讲解手术的方法、优点、安全性、可靠性及疗效等. 并请手术成功患者现身说法,介绍手术的感受,使患者消除疑虑,增强对手术治疗的信心.

2.2 术中并发症的防护 配合医生选择合适的封堵伞,术中

准确测量ASD直径以>1~4 mm的比例选择合适的封堵伞. 置入封堵伞过程中,及时准确调整造影床及X线显示器,使需手术部位影像达到最清晰,以便医师观察定位. 当封堵伞位置良好,稳定且无明显残余分流而释放封堵器时,严密观察封堵器定位情况,一旦脱落,应立即配合医生用导管把封堵器固定在肺动脉主干壁,尽量减少对血流影响. 同时立即做好急诊开胸手术准备. 急性心包填塞多由于术者操作不当引起心房壁损伤、穿孔,加之术中、术后采取了抗凝治疗,故可导致心包填塞. 术中严密进行心电图监护、观察生命体征、血氧饱和度. 询问患者,有无不适主诉,提醒术者操作规范、熟练避免和减少心包填塞的发生. 术中心律失常多发生在导管进入心房或封堵器展开时. 严密观察心电图监护,提醒术者准确、轻巧操作. 若发生心律失常迅速退出导管、导丝,并遵医嘱iv利多卡因. 患者在行基础麻醉时,要备齐气管导管、喉镜等抢救器材. 严密观察麻醉程度,使其头偏向一侧,保持呼吸道通畅. 一旦出现窒息、心率增快、血压下降、呼吸困难等异常情况,立即报告医生,查找原因进行处理.

2.3 防止房室传导阻滞 术后出现房室传导阻滞,考虑与封堵器置入后,局部受刺激或局部组织水肿导致房室结及其周围组织传导功能减退有关. 术后应严密心电图监护,常规应用激素类药物3 d,可减轻局部组织水肿,有效预防房室传导阻滞发生.

2.4 预防感染 术后严密监测体温变化,如体温升高,应警惕有感染发生的可能. 给予大量抗生素以预防发生感染性心内膜炎. 同时保持股静脉穿刺部位干燥、清洁,防止创口污染.

【参考文献】

- [1] 陈务贤. 经皮导管Amplatzer封堵器治疗房间隔缺损的护理[J]. 护士进修杂志, 2001, 16(7): 522-523.
 [2] 王晓燕, 王晓媛, 卢文英. 房间隔封堵器治疗的并发症原因分析及护理[J]. 护士进修杂志, 2004, 19(4): 336-337.
 [3] 张玉顺, 贾国良, 刘建平, 等. 应用Amplatzer封堵器治疗房间隔缺损疗效评价[J]. 心脏杂志, 2001, 13(6): 476.

编辑 许昌泰

收稿日期 2005-04-30; 修回日期 2005-05-09

作者简介 杨文英(1968-)女(汉族)陕西省周至县人. 主管护师. Tel.

(029)82245615 Email: Yangwy1968@163.com