网络出版时间: 2018-1-8 11:43 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.009.html

结核分枝杆菌耐药性相关膜蛋白 MmpL6 的表达与纯化

崔克乐¹,李 静²,孙安源¹

摘要 目的 构建结核分枝杆菌外排泵蛋白 MmpL6 (Rv1557) 表达载体,在大肠杆菌 *E. coli* 中诱导 MmpL6 蛋白高表达并进行纯化。方法 以结核分枝杆菌 H37Rv 菌株基因组 DNA 为模板,采用聚合酶链反应扩增目的基因片段,构建 pET21b-MmpL6 表达载体。将表达载体转化至大肠杆菌中,加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导重组蛋白表达,并针对不同表达菌株、温度进行优化,获取最优表达条件。采用 Ni-NTA 亲和层析以及凝胶过滤色谱纯化目标蛋白。结果 成功构建 pET21b-MmpL6 重组表达质粒,经IPTG 诱导后,在 Rosetta 菌株中 25 ℃条件下获得最高表达量。结论 成功表达并纯化了 MmpL6 蛋白,为该蛋白后续的结构与功能研究奠定了基础。

关键词 结核分枝杆菌;外排泵蛋白;原核表达;纯化;亲和 层析

中图分类号 R 378.91

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2018)01 - 0040 - 06 doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.01.009

结核病是世界范围内流行的三大传染性疾病之一,对人类健康具有严重危害^[1]。结核分枝杆菌是 结核病的致病菌,能够产生多种致病因子,并极易发 生毒力、免疫原性和耐药性等变异,其中耐药性变异 是目前结核病治疗上的重要难题。研究^[2]显示,分 枝杆菌存在药物主动外排泵的表达,是结核分枝杆

2017 - 09 - 25 接收	
基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1608085QH177)	
作者单位: 1 安徽医科大学附属省立医院检验科,合肥	230001
² 安徽医科大学生命科学学院生物学教研	F室,合肥
230032	
作者简介:崔克乐,女,博士;	
孙安源,男,博士,副主任技师,责任作者,E-	mail: ustcsu–
nay@163.com	

菌内生耐药性的重要机制。结核分枝杆菌 H37Rv 株基因组有 20 个编码外排泵蛋白的开放阅读框^[3]。 根据氨基酸序列的同源性,这些蛋白大致分为四类: MFS(major facilitator superfamily) 类、RND(resistance-nodulation-division family) 类、ABC 转运体 (ATP-binding castle transporters) 和 SMR(small multi-drug resistance)类。这些药物外排泵蛋白主要 转运氟喹诺酮类、四环素、氨基糖苷类药物^[4]。

在转运蛋白的 RND 超家族中, MmpL 家族蛋白 已经成为研究棒状细菌细胞包膜相关功能的重要切 入点^[3-4]。结核分枝杆菌的基因组编码有 13 个 MmpL 蛋白^[3], 拓扑结构预测表明 MmpL 家族具有 典型的 12 次跨膜结构。然而 MmpL6(Rv1557) 预测 只有 6 次跨膜, 因此是 MmpL 家族中较为特殊的一 个成员, 目前对于其功能尚未有明确报道。该研究 将构建 MmpL6 蛋白的原核表达载体, 在大肠杆菌中 表达目的蛋白, 为进一步制备蛋白, 研究其结构与生 物学功能, 设计针对 MmpL 家族的抗结核药物提供 线索和基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与菌株 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase、dNTP Mixture、100 bp DNA Marker、限制性内切 酶 Nde I、Xho I、T4 DNA Ligase 等购自大连宝生物工 程有限公司; TIANprep mini plasmid kit(50次) 购自 北京天根生化科技有限公司; Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System、anti-His 抗体购自美国 Promega 公司; 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl β-D-I-thiogalactopyranoside, IPTG) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; N-十二烷基-β-D-麦芽糖苷(n-do-

activity of $\Delta Np63\alpha$; ③ STAT3 stimulant and inhibitor can activate and inhibit the expression of $\Delta Np63\alpha$ detected by Western blot; ④ Overexpression of $\Delta Np63\alpha$ negatively control the phosphorylation level of STAT3 and knockdown of $\Delta Np63\alpha$ can activate the expression of P-STAT3, but no effects on HEK293T cells. *Conclusion* STAT3 can positive regulate the expression of $\Delta Np63\alpha$, while $\Delta Np63\alpha$ in turn inhibits the activity of STAT3 in cervical cells. It is presumed that $\Delta Np63\alpha$ may affect the malignant biological behavior of tumor cells through the complex regulatory mechanism with STAT3.

Key words cervical cancer; $\Delta Np63\alpha$; STAT3; IL-6

decyl-β-D-maltoside, DDM)、十二烷基二甲基氧化 胺(lauryl-dimethylamine-N-oxide, LDAO)等去垢剂 购自美国 Anatrace 公司; PageRuler Protein Ladder 购 自美国 Thermo 公司; Ni-NTA 蛋白纯化凝胶以及 Superdex200 10/300GL 色谱柱、AKTA Purifier 液相层

析系统购自美国 GE 公司。引物合成与 DNA 测序 由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 MmpL6 表达载体的构建 运用 PCR 方法, 从结核分枝杆菌 M. tuberculosis H37Ra 菌株基因组 中扩增得到 MmpL6(Rv1557) 全长 DNA 片段,所用 引物序列为 5´-AGGAATTCCATATGGTGCAGGG-GATTTCAGTGACTG-3(正向引物),引入Nde I 酶 切位点(酶切位点用下划线标注); 5´-ATC-CGCTCGAGACGGTGGG TAGCCACCTGAG-3′(反向 引物),引入 Xho I 酶切位点。PCR 扩增反应条件为 95 ℃预变性 2 min、98 ℃变性 30 s、58 ℃退火 30 s、 72 ℃延伸1 min、循环 30 次、72 ℃延伸5 min。琼脂 糖凝胶电泳后,切胶回收大小为1194 bp 左右 MmpL6 目的片段,将目的片段及 pET21b 载体分别 经 Nde I/Xho I 双酶切后,采用 T4 连接酶 16 ℃连接 12 h,转化连接产物至 E. coli Top10 感受态细胞中, 挑取卡那霉素(50 µg/ml)阳性平板上的克隆,以通 用引物 T7/T7 Terminate 进行 PCR 扩增,挑选阳性 克隆提取质粒,进行双酶切及测序鉴定。

1.2.2 MmpL6 蛋白的表达条件筛选及优化 将构 建成功的 pET21b-MmpL6 表达载体分别转化至 E. coli BL21(DE3)、RP、Rosetta 等表达菌株中。挑 取单克隆菌落接种至4 ml 液体 LB 培养基,加入终 浓度为100 µg/ml的氨苄青霉素,37 ℃摇床过夜培 养。按1:50的比例将过夜培养的菌液接种至10 ml 含抗生素的 LB 培养基中,于 37 ℃摇床中震荡培养 至600 nm 光吸收(optical delnsity, OD₆₀₀) 值约为 0.6,再分别转移至不同温度(37、25、12 ℃)的摇床 中继续培养至 OD₆₀₀ ≈ 0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L的 IPTG 诱导蛋白表达; 37、25、12 ℃条件下 分别继续培养4、12、24 h。收集诱导表达后的菌液, 14 000 r/min 离心 5 min 后去除上清液,菌体沉淀用 500 μ l lysis buffer (70 mmol/L Tris pH 8.0, 300 mmol/L NaCl、5 mmol/L imidazole) 重悬并在冰浴中 超声裂解。裂解后的菌液 14 000 r/min、4 ℃条件 下离心 20 min,保留上清液。将上述细菌上清液进 行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜,用含 3% BSA 的 PBS 封闭过夜, 加入 1:2 000 的 anti-His 鼠源

IgG 单克隆抗体(一抗),4 ℃ 孵育 2 h 后洗去一抗; 加1:5000 的羊抗鼠 IgG 抗体(二抗) 孵育 2 h;洗 去二抗,加入辣根过氧化酶/碱性磷酸酶显色剂孵育 后进行化学显色检测。

1.2.3 MmpL6 蛋白纯化去垢剂的筛选 选取小量 表达筛选到的最适表达条件表达约1L菌液,离心 收集菌体沉淀,并用适量 lysis buffer (50 mmol/L Tris pH 8.0、500 mmol/L NaCl、5 mmol/L imidazole, 5% glycerol) 重悬,进行超声破碎。将超声破碎后 的菌液 14 000 r/min, 4 ℃下离心 20 min,取上清 液。剩余上清分成若干份,分别加入不同种类的去 垢剂,包括 SDS、Empigen、Triton-X100、DM、DDM、 LDAO、Cl2E8、C8E4、β-OG 等,终浓度 1% ~ 2% (w/v),在室温下混合约1h。将混合液在 32 000 r/ min,4℃条件下超速离心1h,取超速离心前后的 上清样品用于 Western blot 检测。比较超速离心前 后样品上清液中蛋白的含量,判定去垢剂对膜蛋白 的溶解能力。

1.2.4 MmpL6 蛋白的 Ni-NTA 磁珠亲和纯化 转 化有 pET21b-MmpL6 表达载体的表达菌株接种至 LB 培养基中,37 ℃条件下培养至 OD₆₀₀约为 0.6,随 后转至12℃摇床中,培养至OD₆₀₀≈0.8,加入终浓 度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,继续在 12 ℃摇床中培养 48 h,诱导目标蛋白表达。收集诱导表达后的菌液, 4 000 r/min 离心 20 min 后去除上清液,菌体沉淀用 话量 lysis buffer [50 mmol/L Tris pH 8.0、500 mmol/ L NaCl、5 mmol/L β-ME]重悬 (1 L 菌液约 50 ml lysis buffer)。将重悬后的菌液放至冰水浴中冷却并 进行超声裂解。裂解后的菌液在14 000 r/min、4 ℃ 条件下离心 20 min,保留上清液。向上清液中加入 终浓度为1% (w/v) 的 LDAO, 4 ℃条件下混合孵 育约2 h。随后向溶液中加入4 ml Ni-NTA 凝胶,在4 ℃条件下混合约 30 min。将混合液加入 25 ml 层析 柱中让其自然流穿。待液体全部流穿后,逐步加入 10 倍柱体积的 washing buffer I [50 mmol/L Tris pH 8.0,500 mmol/L NaCl,5 mmol/L β-ME,0.1% (w/ v) LDAO]洗脱未结合的杂蛋白。随后逐步加入10 倍柱体积的 washing buffer II [50 mmol/L Tris pH 8.0,500 mmol/L NaCl,5 mmol/L β-ME,0.1% (w/ v) LDAO、20 mmol/L imidozole]洗脱非特异结合的 杂蛋白。最后,逐步加入5倍柱体积的 elution buffer [50 mmol/L Tris pH 8.0,500 mmol/L NaCl,5 mmol/ L β-ME、0.2% (w/v) LDAO、200 mmol/L imidozole]洗脱目的蛋白,收集全部洗脱液。上述步骤所

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用 buffer 均在冰水中预冷。

1.2.5 MmpL6 蛋白的大量纯化 将 Ni-NTA 亲和 纯化得到的蛋白洗脱液转入截留分子量为 10 ku 的 超滤离心管中,3 200 r/min、4 ℃条件下离心至终体 积约 1 ml。将浓缩后的蛋白溶液在 14 000 r/min、4 ℃条件下离心 20 min,使用 ATKA Purifier 液相层析 系统进行凝胶过滤色谱(gel-filtration chromatography)纯化。选用 Superdex75 10/300GL 色谱柱层, 流动相成分为 50 mmol/L Tris pH 8.0、500 mmol/L NaCl、2 mmol/L DTT、0.1% (w/v) LDAO,5% (v/ v) glycerol;实验温度 10 ℃。根据 280 nm 吸收曲线 收集状态均一的蛋白洗脱液,并进行 SDS-PAGE 检 测。

2 结果

2.1 原核表达载体 pET21b-MmpL6 的构建及鉴定 以结核分枝杆菌 *M. tuberculosis* H37Ra 菌株基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增,检测到大小位于1 200 bp 附近的条带(图 1A),与目的蛋白 MmpL6的基因片段(1 194 bp)大小一致。PCR 产物连接至pET21b 载体后,经过氨苄青霉素抗性筛选,获得能够扩增出 1 200 bp 大小基因片段的阳性克隆(图 1B);进一步提取 PCR 阳性克隆中的重组质粒并用Nde I/Xho I 对进行双酶切鉴定,产生的两个片段大小与预期结果相符合(pET21b 载体大小为 5 442 bp,MmpL6 基因为 1 194 bp)(图 1B)。最后的测序结果表明,重组质粒中的 MmpL6 序列与 GenBank数据库中的序列完全一致,证明 pET21b-MmpL6 质粒构建成功。

2.2 pET21b-MmpL6 的诱导表达 为获取 MmpL6 蛋白在 *E. coli* 不同菌株中的最优表达条件, 分别检测了在 BL21(DE3)、RP、Rosetta 表达菌株 中,在37、25、12 ℃条件下经 IPTG 诱导蛋白表达量。 用 anti-His 抗体进行 Western blot 检测,结果显示, BL21(DE3) 菌株在 3 个温度条件下均未检测到目 的蛋白条带; RP 菌株中,37 ℃和 12 ℃下检测到极 弱的目的蛋白条带; Rosetta 菌株中,37、25、12 ℃ 三 个温度条件下均检测到目的蛋白的表达,在25 ℃和 12 ℃条件下表达量较高。因此最终确定 MmpL6 蛋 白的最优表达条件为 pET21b 载体, Rossetta 菌株, 25 ℃下 0.5 mmol/L IPTG 诱导 12 h 或 12 ℃下 0.5 mmol/L IPTG 诱导 24 h。见图 2。



A: MmpL6 基因的 PCR 扩增; M: 100 bp DNA Marker; 1: PCR 产物; B: 菌液 PCR 及双酶切鉴定; 1: pET21b-MmpL6 质粒; 2: pET21b-MmpL6 Nde 1/Xho I 双酶切; 3: 菌液 PCR 产物



图 2 Western blot 检验 pET21b-MmpL6 表达 MmpL6 蛋白

2.3 MmpL6 蛋白纯化去垢剂的选择 MmpL6 蛋白是结核分支杆菌细胞膜上的蛋白,体外需借助去垢剂帮助才能在溶液中保持稳定且均一的状态,因此对用于 MmpL6 纯化的去垢剂进行了筛选,以获取最合适的纯化条件。分别检测了在 SDS、DM、DDM、LDAO、AZ312、AZ314、AZ316、Emipgen、β-OG、C12E8、C8E4、Triton-X100 等去垢剂。通过 Western blot 检测去垢剂溶解前与溶解后溶液中蛋白含量(如图 3,分别对应各去垢剂条件下第一与第二个样品),结果显示 SDS、LDAO、AZ312、AZ314、AZ316、Emipgen、C12E8、C8E4 等去垢剂对 MmpL6 的提取能力较好,而 DM、DDM 较弱,Triton-X100、β-OG 几乎不能将 MmpL6 蛋白从 E. coli 细胞膜上提取出来。因此,后续将使用常用的 LDAO 对 MmpL6 蛋白进行纯化。见图 3。



图 3 Western blot 法检测不同去垢剂对 MmpL6 蛋白提取效果

2.4 MmpL6 蛋白的大量纯化及凝胶排阻色谱分析 大量表达 MmpL6 蛋白,采用 Ni-NTA 亲和层析 纯化,对纯化各步骤样品进行 SDS-PAGE 检测。经 过含 20 mmol/L 咪唑的缓冲液洗去杂蛋白,最后用 含 200 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱目的蛋白(图 4A),在 SDS-PAGE 图上可以看到明显的蛋白条带, 位于 35~45 ku,与 MmpL6 蛋白的理论分子量 42.4 ku 相符合(图 4B)。



图 4 MmpL6 蛋白 Ni-NTA 亲和纯化结果

A: MmpL6 蛋白 Ni-NTA 亲和层析纯化谱图; 峰 1: 含 20 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱; 峰 2: 含 20 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱; B: MmpL6 蛋 白 Ni-NTA 亲和层析纯化的 SDS-PAGE 检测; 1: 全细胞裂解液; 2: 全 细胞裂解液 14 000 r/min 离心后沉淀; 3: 全细胞裂解液 14 000 r/min 离心后上清液; 4: 加入 LDAO 提取后的上清液; 5: Ni-NTA 结合后流 穿液; 6: 含 20 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱; 7: 含 200 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱; M: Marker

对 Ni-NTA 亲和层析纯化得到的 MmpL6 进行 凝胶过滤色谱(分子筛)分析。经 Superdex75 10/ 300 色谱柱纯化后,在 280 nm 波长下出现两个明显 的吸收峰,分别位于 8.05 ml 及 11.04 ml(图 5A)。 8.05 ml 位于色谱柱外水体积附近,是高度聚集的 (分子量超过 200 ku)蛋白组分;根据标定的色谱柱 标准曲线,计算得出 11.54 ml 对应的蛋白表观分子 量约为 39.5 ku,与 MmpL6 蛋白的理论分子量 42.4 ku 一致,表明 MmpL6 蛋白在溶液中以单体形式存 在。凝胶过滤色谱图上目的蛋白吸收峰形状对称, 表明蛋白均一性很好; SDS-PAGE 结果显示经凝胶 过滤色谱纯化后的目的蛋白纯度达到了 95% 以上 (图 5B)。



图 5 MmpL6 蛋白凝胶过滤色谱纯化结果

A: MmpL6 蛋白凝胶过滤色谱纯化谱图; B: MmpL6 蛋白凝胶过滤色谱纯化的 SDS-PAGE 检测; 1~6: 对应 A 图各收集管数; 7: 1~6 管混合后样品; M: Marker

3 讨论

由细胞膜上的转运蛋白或者外排泵蛋白参与的 物质外排,被认为是细菌耐药的重要机制。与其他 RND 蛋白一致,如被广泛研究的大肠杆菌多药物外 排泵蛋白 AcrB (AcrAB-TolC 外排泵系统的主要功 能分子)^[5],结核分枝杆菌 MmpL 转运蛋白具有典 型的拓扑结构,同样需要内膜电化学质子梯度以发 挥功能^[6-7]。然而,不同于介导外源化合物外排的 AcrAB-TolC 系统, MmpL 蛋白质似乎倾向于以较高 的底物特异性输出内源亲脂性分子^[8-9]。目前已有 的研究^[10]显示, MmpL家族蛋白参与多种物质的转 运,如海藻糖单环孢菌素(MmpL3);聚酮化合物硫 青霉烯二肌酸酯(MmpL7)^[11],磺脂酰-4 (MmpL8)^[12]; 酰化海藻糖的转运(MmpL10)^[13], 二 甲酰基甘油和非糖酸酯(MmpL11)^[14]。另外, MmpL5 和 MmpL7 参与药物外排过程也得到了证 实^[15]。外排泵赋予一种或几种药物耐受性的研究 已经在分枝杆菌中得以证实。但是,这些研究多限 于野牛株及其实验突变株,有关泵的底物与耐药表 型的关系还未完全明确。

拓扑结构预测表明 MmpL 家族具有典型的 12 次跨膜结构,然而 MmpL6(Rv1557)预测只有 6 次跨 膜,是 MmpL 家族中较为特殊的一个成员。理论上, 6 次跨膜蛋白在功能上能够行使物质转运功能,因 此推测 MmpL6 可能代表了 MmpL 家族蛋白发挥生 物学功能的最小单元。目前,对于 MmpL6 的研究并 不透彻,其结构模式、转运分子以及物质转运机制仍 有待揭示。本项目的研究成功实现了 MmpL6 蛋白 在原核表达系统中的高表达,纯化结构也显示了 MmpL6 蛋白在体外的状态稳定性和均一性,为后续 深入研究其结构与功能奠定了基础。

以 MmpL6 的表达纯化为基础,将能够借助生物 化学手段对 MmpL6 的物质转运以及相关药物外排 功能进行鉴定,阐明结核分枝杆菌耐药性发生的结 构基础和分子机制。这些研究也将对抗结核病新型 药物的开发产生影响,诸如改进药物设计、避免药物 成为外排泵的底物、增加药物的持续内流、筛选有效 的外排泵特异抑制剂,这些都将为临床上更有效地 预防和治疗疾病有价值的线索。

参考文献

 Organization W H. Global tuberculosis report 2016 [R]. Geneva: World Health Organization, 2016.

- [2] De Rossi E, Ainsa J A, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question [J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(1): 36 – 52.
- [3] Cole S T, Brosch R, ParkhiH J, et al. Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence
 [J]. Nature, 1998, 393(6685): 537 - 44.
- [4] 陈 敏, 王 跃. 分枝杆菌药物外排泵及其在耐药机制中作用[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(6): 697-9.
- [5] Eicher T, Seeger M A, Anselmi C, et al. Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB [J]. Elife, 2014, 3: e03145.
- [6] Bernut A, Herrmann J L, Kissa K, et al. Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(10): E943 – 52.
- [7] Chim N, Torres R, Liu Y, et al. The structure and interactions of periplasmic domains of crucial MmpL membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chem Biol, 2015, 22(8): 1098 – 107.
- [8] Székely R, Cole S T. Mechanistic insight into mycobacterial MmpL protein function [J]. Mol Microbiol, 2016, 99(5): 831 -4.
- [9] Chalut C. MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria [J]. Tuberculosis (Edinb), 2016, 100: 32-45.
- [10] Varela C, Rittmann D, Singh A, et al. MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria [J]. Chem Biol, 2012, 19(4): 498 - 506.
- [11] Jain M, Cox J S. Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. tuberculosis* [J]. PLoS Pathog, 2005, 1(1): e2.
- [12] Converse S E, Mougous J D, Leavell M D, et al. MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(10): 6121 -6.
- [13] Belardinelli J M, Larrouy-Maumus G, Jones V, et al. Biosynthesis and translocation of unsulfated acyltrehaloses in *Mycobacterium tu*berculosis [J]. J Biol Chem, 2014, 289(40): 27952 - 65.
- [14] Pacheco S A, Hsu F F, Powers K M. MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis* [J].
 J Biol Chem, 2013, 288(33) : 24213 – 22.
- [15] Hartkoorn R C, Uplekar S, Cole S T. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in Mycobacterium tuberculosis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(5): 2979 – 81.

网络出版时间: 2018-1-8 11:43 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.010.html

丹皮酚逆转内质网应激诱导的 HepG2 细胞凋亡抵抗

范璐璐¹,孙国平¹,查丽霞²,马 泰¹

摘要 目的 探讨丹皮酚逆转内质网应激诱导的 HepC2 肝 癌细胞凋亡抵抗的作用机制。方法 采用 MTT 及末端双脱 氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口标记技术(TUNEL) 观察 内质网应激诱导剂衣霉素对正常人肝细胞株 HL-7702 及人 肝癌细胞株 HepC2 细胞的增殖抑制及凋亡作用; Western blot 法测定内质网应激诱导剂衣霉素对正常肝细胞 HL-7702 及肝癌细胞 HepC2 的环氧合酶-2(COX-2) 表达的影响; 采 用 Western blot 法及 TUNEL 法观察 COX-2 的选择性抑制剂 塞来昔布对内质网应激下的肝癌细胞 HepC2 COX-2 的表达 及凋亡的影响; 采用 MTT 及 TUNEL 法观察丹皮酚对内质网 应激下的 HepC2 肝癌细胞的增殖抑制及凋亡作用; Western

```
基金项目:国家自然科学基金(编号:81402040、81572430);安徽省自
然科学基金(编号:1408085QH151)
作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022
<sup>2</sup>安徽医科大学第四附属医院肿瘤内科,合肥 230022
```

作者简介:范璐璐,女,主治医师; 孙国平,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,Email: sungp@ ahmu. edu. cn blot 法观察丹皮酚对内质网应激诱导的 HepC2 肝癌细胞 COX-2 表达的影响。结果 与正常肝细胞 HL-7702 相比,在 TM 诱导的内质网应激作用下肝癌细胞 HepC2 的增殖抑制 率及凋亡率减少(*P*<0.05),并且内质网应激可诱导肝癌细 胞 HepC2 产生 COX-2 蛋白。而丹皮酚可下调内质网应激诱 导的 HepC2 肝癌细胞中 COX-2 的表达,并使内质网应激诱 导的肝癌细胞的凋亡增加。结论 丹皮酚可通过下调 COX-2 的表达从而逆转内质网应激诱导的 HepC2 肝癌细胞凋亡 抵抗。

关键词 肝癌; 内质网应激; 环氧合酶-2; 细胞凋亡; 丹皮酚 中图分类号 R 735. 7

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2018) 01 - 0045 - 06 doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.01.010

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤,据最新统计,全世界新发肝癌患者每年约 60 万,居恶性肿瘤的第 5 位,肝癌因此被称为"肿瘤之王"^[1-2]。有文献^[3-4]报道内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS) 诱导的凋亡抵抗是肝癌化疗耐药的重要原因之一,

Expression and purification of multidrug resistance related membrane protein MmpL6 of *Mycobacterium tuberculosis*

Cui Kele¹, Li Jing², Sun Anyuan¹

(¹Dept of Clinical Laboratories, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001; ²Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract *Objective* To construct the prokaryotic expression vector carrying *Mycobacterium tuberculosis* gene mmpL6 (rv1557), overexpress and purify the recombinant MmpL6 (Rv1557) protein in *Escherichia coli* (*E. co-li*). *Methods* The DNA fragment of MmpL6 was amplified by polymerase chain reaction using the genomic DNA of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain as a template. The target gene was cloned into pET21b vector to construct the pET21b–MmpL6 expression plasmid, and then transformed into *E. coli* for protein expression. Recombinant protein expression was induced by isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and detected by SDS-PAGE combined with Western blot. The overexpressed MmpL6 protein was purified by Ni-affinity chromatography and gel filtration chromatography. *Results* The recombinant pET21b–MmpL6 plasmid was successfully constructed and the highest expression level was obtained at 25 °C in Rosetta strain induced by IPTG. *Conclusion* The successful expression and purification of MmpL6 in *E. coli* lays the foundation for the further structure and function studies of the protein, and also provides clues to the design of anti-tuberculosis drugs targeting efflux pump proteins.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*; efflux pump protein; prokaryotic expression; purification; affinity chromatography

²⁰¹⁷⁻⁰⁹⁻⁰⁶ 接收