



· 论 著 ·

苏云金芽孢杆菌抗癌晶体蛋白 Parasporin-2 的优化提纯

向 雨¹ 何建文¹ 邓金玲¹ 陈永兴¹ 欧 波¹ 李 敏* (长沙医学院 410219)

摘要:目的 寻找最适宜的方法从土壤中分离出苏云金芽孢杆菌抗癌晶体蛋白 Parasporin-2。方法 从我国各个省市采集土壤 180 份, 采用细胞毒力试验挑选具有抗癌活性的菌株, 并用超声波破碎法和机械破碎法提取芽孢蛋白, 并测定出蛋白浓度及分析。

关键词: 抗癌晶体蛋白 Parasporin-2 分离 超声波破碎法

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2019) 01-002-02

基金项目: 长沙医学院 大学生研究性学习和创新性实验计划项目——长医教 [2017]18 号 -073

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是一种广泛分布于土壤的革兰氏阳性细菌。随着 Bt 研究的发展, 人们在自然环境中发现了一种 Parasporin-2 伴孢晶体蛋白, 它能优先杀死肝细胞组织碎片中的癌细胞而对正常细胞影响较小^[1-4]。我国是肝癌的高发区。肝癌具有高度恶性, 进展也很迅猛, 肝癌根治性切除手术后 5 年复发率高达 80%^[5]。因此, Parasporin-2 伴孢晶体蛋白的提取显得尤为重要。

1 材料与方法

1.1 土样的采集及菌种的分离

将采集的土壤保存于 4℃ 冰箱并编号, 称取土样各 0.1-0.2g 分别加入到已灭菌具玻璃珠的试管中, 加入 10ml 灭菌去离子水混匀后在恒温摇床振荡 20min: 水浴锅中水浴 17min, 再将土壤悬浊液稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 三个稀释度, 每个梯度均匀涂布在 1/2LB 培养基上, 30℃ 恒温培养三天, 挑取边缘不整齐, 表面粗糙的暗白色菌落连续划线培养, 用碱性复红染色, 油镜下观察培养的菌株晶体的有无及形态。

1.2 苏云金芽孢杆菌的初步鉴定

油镜下检测是否存在芽孢和伴孢晶体。通常 Bt 芽孢为透明椭圆形, 伴孢晶体紫红色, 呈圆形, 椭圆形, 不规则等形状。有以上特征的菌株可初步鉴定为 Bt 株, 保存备用。

1.3 筛选苏云金芽孢杆菌中含有抗癌晶体的芽孢杆菌

将分离到的 Bt 菌株接种在固体培养基上 30℃ 培养 5 天左右再制备发酵液, 将其稀释成不同梯度与培养好的肝癌细胞和正常肝细胞混合, 相同条件下继续培养 24h, 采用血球计数板统计细胞死亡率, 计算发酵液的抗癌活性。

1.4 鉴定并筛选抗癌晶体蛋白 Parasporin-2 菌株

将 Bt 菌株在恒温摇床中振荡培养约 60h, 直到菌体裂解并释放晶体。提取芽孢晶体混合物进行 SDS-PAGE 检测, 脱色后用蛋白胶扫描仪扫描结果并进行分析。

1.5 苏云金芽孢杆菌抗癌晶体蛋白 Parasporin-2 的提纯与分离

①将筛选出的 Bt 菌株在液态培养基中培养成熟并将其发酵液用磁力搅拌器搅拌, 除去泡沫, 经多次重复以达到除去孢子的目的。②用超声波处理, 使芽孢、晶体以及碎片在水中均匀分散。在 4℃ 冰箱内放置 24h, 使芽孢和伴孢晶体充分游离。离心后弃上清, 加蒸馏水制成悬浮液, 离心洗涤 3 次, 然后用 NaCl 溶液洗涤 2 次, 收集沉淀物。③将孢晶悬液离心分离, 使沉淀悬浮于 0.4mol/L 的 NaCl+ 质量分数为 0.01% 的 TritonX-100 的溶液中, 在冰箱静置 7-8h。离心分离, 取沉淀物, 制水悬液。④配制浓度不同的溴化钠溶液, 将水悬液放在溶液中, 再次离心分离。在界面处得到伴孢晶体层, 用弯头注射器收集含有晶体的溴化钠溶液; 离心分离 10min, 收集晶体沉淀, 用蒸馏水洗涤 3~4 次, 置入冰箱冷冻 7-8h, 得到晶体蛋白 Parasporin-2 悬浊液。

1.5 抗癌晶体蛋白 Parasporin-2 的 SDS-PAGE

采用 SDS-PAGE 技术对含有抗癌晶体蛋白的苏云金芽孢杆菌进行电泳分析与质谱鉴定, 快速确定抗癌蛋白 Parasporin-2 数量及在总蛋白中的表达含量。

2 结果

2.1 各省市苏云金芽孢杆菌分出情况

对各省市自治区的 180 份土样进行 Bt 的分离, 从其中 30 份土样中分离出苏云金芽孢杆菌 (表 1)。除湖北、海南、河北、陕西和贵州 5 省没有分出 Bt 外, 其他省市均出现不同比例的分出率, 其中山西的土样的分出率最高, 达 172.7%; 全国土壤样品的平均分出率为 24%。

表 1: 苏云金芽孢杆菌分出情况

采样地点 (省)	采集土样数 (个)	分出 Bt 数 (个)	Bt 出土率
湖南	25	2	8
湖北	14	0	0
河北	15	0	0
广东	9	1	11.1
海南	10	0	0
贵州	17	0	0
吉林	16	9	56
四川	18	3	16.7
陕西	14	0	0
云南	12	4	33.3
北京	7	4	57.1
山西	11	19	172.7
河南	12	5	41.7
总计	180	43	24

2.2 芽孢杆菌菌体蛋白 Parasporin-2 的晶体形态

经超声波破碎法和机械破碎法后完整形态细胞存在较少, Parasporin-2 的镜下形态如图所示:

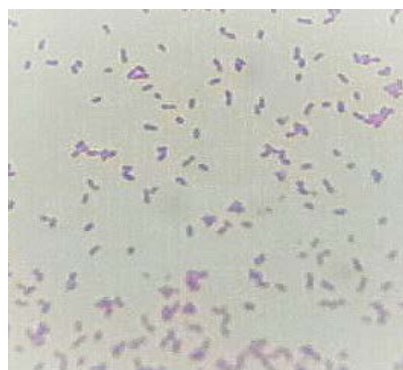


图 1: 电子显微镜下的蛋白 Parasporin-2

* 通讯作者: 李敏

(下转第 4 页)



康,甚至危及生命安全。急性格林巴利综合征是一种急性起病、以损害神经根和外周神经为主的病变,多伴有脑脊液蛋白-细胞分离为主要特征的综合征。急性格林巴利综合征是一种患者自身机体的免疫机制出现异常而引起的周围神经病变,进而导致患者出现髓鞘损伤以及轴索变性等病变,进而影响患者的身心健康^[2]。大剂量的丙种球蛋白静脉滴注治疗是临床上的常用手段,可通过中和超抗原、自身抗体,影响巨噬细胞功能,进而改善临床症状。临床上,对于急性格林巴利综合征多采取丙种球蛋白静脉注射的免疫疗法,能够通过免疫抗体 IgG 来中和体内致病抗原,减少患者的神经损伤。此外,丙种球蛋白能够阻断单核细胞和巨噬细胞的产生,进而减少炎症反应的出现,同时阻断补体的结合,既发挥免疫调节功能,同时发挥免疫替代作用。在急性期,大剂量使用丙种球蛋白能够明显减轻异常免疫反应对自身的损伤。相比于大剂量的丙种球蛋白单独治疗,联合糖皮质激素的使用能够有效抗炎,减少机体产生的非特异性反应,帮助髓鞘尽早的恢复,进而改善传导功能^[3]。

糖皮质激素是临床上常见的一种免疫抑制剂,主要在肝脏中代谢,其药理作用包括对糖类、脂类、蛋白质以及水和电解质代谢的影响,抗炎作用、免疫抑制和抗过敏作用、抗休克作用,应用于急性期格林-巴利综合征患者能够诱导淋巴细胞 DNA 降解,影响淋巴细胞的物质代谢,减少淋巴细胞中 RNA 聚合酶的活力和 ATP 的生成量,同时能够诱导免疫细胞的凋亡^[4],进而缓解免疫反应的过度激活,同时减少多种炎症介质和细胞因子对神经髓鞘的损害,同时大剂量的甲泼尼龙能够起到稳定细胞膜减轻脱髓鞘的作用^[5]。因此,将大剂量的丙种球蛋白和糖皮质激素联合应用能够有效缓解患者的临床症状,从根本上减轻脱髓鞘的病理改变,进而改善临床症状,同时缩短四肢肌力的恢复时间^[6]。另外,在

本次试验中,两组患者在采取相应的治疗措施外,均统一接受常规治疗,即采用呼吸机辅助呼吸,同时给予抗生素、维生素、能量合剂、改善微循环的药物等,根据患者的呼吸情况,必要时给予气管插管。在实验结果方面,采取大剂量丙种球蛋白的基础上联合糖皮质激素相比于采取大剂量丙种球蛋白单独治疗的患者的治疗效果更好,治疗的总体有效率更高,同时四肢肌力恢复时间更短,住院时间相比更低,具有统计学意义($p < 0.05$)。

综上所述,相比于大剂量丙种球蛋白单独使用,大剂量使用丙种球蛋白的基础上联合糖皮质激素治疗急性格林巴利综合征患者可明显提高疗效,改善临床症状恢复时间,减少四肢肌力恢复时间,值得临床推广。

参考文献

- [1] 耿娜,张金彪,仲伟斌,等.大剂量丙种球蛋白静脉注射治疗急性期格林-巴利综合征的临床疗效[J].中国医学创新,2015,12(32):65-68.
- [2] 段金平,DUANJinping.丙种球蛋白联合甲泼尼龙冲击治疗急性格林-巴利综合征的疗效观察[J].中国医院用药评价与分析,2016,16(4):458-460.
- [3] 姜颖,赵欢.甲泼尼龙联合丙种球蛋白治疗急性格林巴利综合征的临床效果[J].实用临床医药杂志,2017,21(9):179-180.
- [4] 赵秀梅,康宏,李敏丽.观察丙种球蛋白治疗格林-巴利综合征的效果[J].中国医药指南,2017,15(9):127-128.
- [5] 姜如海.激素联合丙种球蛋白治疗格林巴利综合征的临床效果[J].中国医药指南,2017,15(5):57-57.
- [6] 何雪桃,王丽娟,陈清玲,等.大剂量丙种球蛋白治疗吉兰-巴雷综合征相关因素分析[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2014,21(1):9-11.

(上接第 1 页)

痛^[1-2]。选取合适方式予以急诊胸痛患者临床准确诊断十分重要^[3-4]。

现今,临床对急诊胸痛患者主要采取心电图检查、X线胸片检查、心肌酶学指标检测等予以诊断,其中,血清超敏 C 反应蛋白、肌钙蛋白 I 等指标于胸痛性质鉴别中存在重要价值。此文指标表明,心源性胸痛患者血清超敏 C 反应蛋白检测值、肌钙蛋白 I 检测值比非心源性胸痛患者更高,合并存在心肌梗塞患者血清超敏 C 反应蛋白检测值、肌钙蛋白 I 检测值高于未合并存在心肌梗塞患者,不稳定型心绞痛患者血清超敏 C 反应蛋白检测值、肌钙蛋白 I 检测值高于稳定型心绞痛患者,且采取血清超敏 C 反应蛋白结合肌钙蛋白 I 检测心源性胸痛患者的阳性率比单独指标检测更高。

(上接第 2 页)

3 讨论

现在已经有成熟的蛋白提取方法,但是很多都具有一定的局限性,不太适用于实验室的常规方法不太适用。在本次实验中,主要是根据蛋白质的功能特点、来源、实验要求等综合起来^[7-8]得到更高纯度的 Parasporin-2 伴孢晶体蛋白。但人们只了解到 Parasporin-2 伴孢晶体蛋白具有区分癌细胞和正常细胞并能特异地杀死癌细胞而不影响正常细胞的功能。随着科技的发展,相信人们对蛋白质纯化技术的研究不断延伸将会促进 Parasporin-2 伴孢晶体蛋白性质的探索,从而提高肝癌治疗效果。

参考文献

- [1] SANAHUJA G, BANAKAR R, TWYMANR M, et al. Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(3):283-300.
- [2] OHBA M, MIZUKI E, UEMORI A. Parasporin, a new

综上所述,对急诊心源性胸痛患者采用血清超敏 C 反应蛋白与肌钙蛋白 I 联合诊断得到较好临床效果,诊断准确性较高。

参考文献

- [1] 辛天宇,刘树元,单毅等.实验室检查对急性胸痛性质鉴别的意义[J].解放军医药杂志,2016,28(5):87-90.
- [2] 戴小平.血清 H-FABP、hs-CRP、cTnT 三者联合检测对心肌梗死的诊断价值及临床分析[J].中国生化药物杂志,2017,37(9):409-411.
- [3] 王丽红,贾志.血浆同型半胱氨酸与 C 反应蛋白诊断老年冠心病患者的意义[J].中国老年学杂志,2016,36(21):5334-5335.
- [4] 何成毓,彭兴,阳飞等.脂肪酸结合蛋白、超敏 C 反应蛋白、肌钙蛋白 T 联合检测对心肌梗死的诊断价值分析[J].中国临床医生杂志,2017,45(11):34-36.

anticancer protein group from Bacillus thuringiensis[J]. Anticancer Research, 2009, 29:427-434.

- [3] SANAINENEA E, ORTIZ A. Secondary metabolites of soil Bacillus spp [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(8):1523-1538.
- [4] B CHET M, CARADEC T, HUSSEIN W, et al. Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from Bacillus spp [J]. Applied Microbiology and Biotechnology 2012, 95(3):593-600.
- [5] 李园.李佩文教授治疗肝癌的临床经验整理研究[D].中国.卫生部中日友好医院.2015,5.
- [6] 陈爱明,林毅.II 型抗癌晶体蛋白结构与其抗肝癌活性之间的关系[D].厦门;华侨大学,2012.1998,62(3):775-806.
- [7] 张国强,樊明涛,刘晓娇,等.酒球菌蛋白质提取方法研究[J].中国酿造,2010,29(9):39-41.
- [8] 袁宏,刘晓珂,岳田利,等.酸土脂环酸芽胞杆菌可溶性全细胞蛋白提取工艺优化[J].农业机械学报,2010,43(6):139-146.