

DOI:10.13350/j.cjpb.240307

• 论著 •

人 CSF3 蛋白的原核表达和纯化及其亚细胞定位^{*}

张平, 李贺, 刘晓宇, 李冰清^{**}, 岳盈盈^{**}

(山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所)病原生物学系, 山东济南 250000)

【摘要】 目的 粒细胞集落刺激因子(CSF3)作为免疫调控中的重要细胞因子,在中性粒细胞增殖分化的调控方面发挥关键作用。然而,在病原菌感染中 CSF3 的调控机制仍不清楚。本研究旨在通过原核表达人 CSF3,并观察其在 HEK-293T 细胞中的亚细胞定位,为重组 CSF3 药物开发以及揭示其在病原菌感染和免疫调控中的作用机制奠定基础。**方法** 基于人 CSF3 的生物信息学分析,分别通过 QuikChange 和基因克隆获得 CSF3 pGLO1 和 CSF3-pmCherry 两种重组质粒。前者在大肠埃希菌原核表达系统中表达,并通过镍离子亲和层析和凝胶过滤层析进行蛋白纯化。后者通过 jet-PEI 试剂转染到 HEK-293T 细胞中,48 h 后通过荧光共聚焦显微镜观察,确定其亚细胞定位。**结果** 在原核系统中成功表达人 CSF3 蛋白,其相对分子质量为 18.8×10^3 。该蛋白的溶解性良好,PP 酶酶切后蛋白浓度较高,但蛋白性质相对不稳定,对 pH 值和温度敏感,容易发生聚集和降解。将荧光融合质粒转染到 HEK-293T 细胞中 48 h 后观察,人 CSF3-pmCherry 蛋白定位在细胞质内,呈现出特定的定位和分布模式。**结论** 成功构建人 CSF3 原核表达系统,获得纯度较高的 CSF3 蛋白。通过荧光融合技术确定 CSF3-pmCherry 蛋白主要定位在 HEK-293T 细胞质。为重组 CSF3 药物的开发及其在病原菌感染和免疫调控中的作用机制研究奠定了基础。

【关键词】 粒细胞集落刺激因子;原核表达;蛋白纯化;亚细胞定位;感染免疫

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)03-0285-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Mar.; 19(3): 285-290,296.]

Prokaryotic expression, purification and subcellular localization of human CSF3 protein

ZHANG Ping, LI He, LIU Xiaoyu, LI Bingqing, YUE Yingying (Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China) ^{***}

【Abstract】 Objective Granulocyte colony-stimulating factor 3 (CSF3), a crucial cytokine in immune regulation, plays a key role in the proliferation and differentiation of neutrophilic granulocytes. However, the regulatory mechanism of CSF3 in pathogen infections remains unclear. This study aims to express human CSF3 in prokaryotic cells and observe its subcellular localization in HEK-293T cells. This research lays the foundation for the development of recombinant CSF3 drugs and reveals its mechanism of action in pathogen infection and immune regulation. **Methods** Based on bioinformatics analysis of human CSF3, two types of recombinant plasmids were constructed: CSF3-pGLO1 and CSF3-pmCherry. These were obtained through QuikChange site-directed mutagenesis and gene cloning, respectively. CSF3-pGLO1 was expressed in the *Escherichia coli* prokaryotic expression system and subsequently purified using nickel ion affinity chromatography followed by gel filtration chromatography. CSF3-pmCherry was transfected into HEK-293T cells utilizing jetPEI reagent. After 48 hours, the subcellular localization of the expressed protein was observed using fluorescence confocal microscopy.

Results The human CSF3 protein was successfully expressed in a prokaryotic system, displaying a relative molecular mass of approximately 18.8×10^3 . This protein demonstrated favorable solubility and achieved a high concentration following PPase digestion. However, it exhibited relatively poor stability, being sensitive to changes in pH and temperature, which led to aggregation and degradation. Forty-eight hours after transfecting HEK-293T cells with the CSF3-pmCherry fluorescent fusion plasmid, the fusion protein was observed to localize within the cytoplasm, displaying a distinctive pattern of localization and distribution. **Conclusion** This study successfully established a human CSF3 prokaryotic expression system and obtained relatively pure CSF3 protein. Utilizing fluorescence fusion technology, it was determined that the CSF3-pmCherry protein is primarily localized in the cytoplasm of HEK-293T cells. These findings lay a solid foundation for the development of recombinant CSF3 drugs and for further research into their mechanisms of action in pathogen infection and immune regulation.

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32170034);山东省自然科学基金面上项目(No. ZR2023MH095)。

^{**} **【通讯作者】** 李冰清, E-mail: bingqingsdu@163.com; 岳盈盈, E-mail: yyy0513@163.com

【作者简介】 张平(1998-),女,江苏人,硕士在读。主要研究方向:病原微生物致病机制。E-mail: zp415541@163.com

【Key words】 Granulocyte colony-stimulating factor; prokaryotic expression; protein purification; subcellular localization; infection immunity

粒细胞集落刺激因子(G-CSF, 又称 CSF3)是一种重要的体内细胞因子,于1966年由 Metcalf 团队首次发现并从小鼠内毒素血清中成功分离,因其在半固体培养基中形成微菌落的能力而命名^[1]。研究表明,CSF3 能够诱导粒细胞的增殖分化,并在免疫、炎症和肿瘤等疾病中发挥重要作用^[2-4]。粒细胞是人体血液中最丰富的白细胞,对先天免疫及炎症至关重要,能够被迅速募集到感染部位,识别、吞噬和消除微生物^[5-6]。由于 CSF3 能催化骨髓中性粒细胞成熟和动员,而 CSF3 蛋白的改良形式通常用于治疗化疗引起的中性粒细胞减少症^[7],因此 CSF3 一直是免疫相关炎症主要研究的对象。

CSF3 在体内可由多种免疫细胞产生,主要通过二聚形式与其 CSF3 受体(G-CSFR)以 2:2 比例结合,触发下游信号通路,从而发挥抑制细胞凋亡、促进中性粒细胞成熟与分化、诱导中性粒细胞迁移和 IL-8 产生的作用^[2,8]。作为免疫关键因子,其作用是双面的,既可促炎也可抗炎。这些特性与 CSF3 能促进粒细胞增多和先天炎症反应有关,但炎症和中性粒细胞激活通路上调会抑制适应性免疫相关基因的表达,如抗原呈递、共刺激、T 细胞活化和溶细胞效应反应,即 CSF3 具有抑制适应性免疫的作用^[9]。同时 CSF3 能下调 INF- γ 的产生,高剂量 CSF3 能上调激活 T 细胞和白细胞介素-4(IL-4)的产生。因此,CSF3 提供先天免疫刺激信号有助于防止过度 and 潜在恶化炎症反应的发展及免疫记忆形成^[10]。在病原体感染中,CSF3 同样发挥双面作用:小鼠感染流感病毒后,由于 G-CSF 产生不足以及流感病毒引起的中性粒细胞功能障碍,从而导致继发性细菌感染^[11]。在新冠病毒研究中,通过组学分析认为 CSF3 是潜在的药物靶点^[12]。CSF3 可能在血液和免疫系统、肿瘤、神经系统等众多领域具有研究和应用价值,然而 CSF3 与病原菌感染的直接互作证据,及其在感染炎症性疾病中的调控机制尚不明确。

本研究采用生物信息学方法对人 CSF3 蛋白进行分析,因其在不同物种之间的高同源性,可通过动物实验研究 CSF3 的其它未知功能。构建 CSF3 pGLO1 质粒在原核系统中表达 CSF3 蛋白,并进行镍离子亲和层析纯化和 Superdex200Increase 10/300 GL 凝胶过滤层析纯化,以期获得高纯度的重组人 CSF3 蛋白。构建融合 pmCherry 荧光标签的 CSF3 重组质粒,通过转染 HEK-293T 细胞以确定 CSF3 融合 cherry 蛋白的亚细胞定位,为重组 CSF3 药物的研发以及揭示

其在病原菌感染、免疫中的调控机制研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 质粒和细胞 pGLO1 CSF3 质粒引物由生工生物公司制备,其中表达载体 pGLO1 由 pET-15b 改造而来,具有氨苄抗性,N 端 6 个 His 标签含 PPase 酶切位点。荧光质粒 CSF3 pmCherry 引物由生工生物公司合成。HEK-293T 细胞由实验室传代保存。

1.2 主要试剂和仪器 T4 连接酶,限制性内切酶 XhoI 和 BamHI 购于美国 Thermo 公司;2 $\times$ MultiF Seamless Assembly Mix 酶和 DpnI 酶购于中国 AB-clonal 公司;氨苄青霉素钠,硫酸卡那霉素及异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)均购于美国索莱宝公司;镍离子亲和层析柱基质及 AKTA 纯化机器购于美国 GE 公司;Superdex200Increase 10/300 GL 凝胶过滤层析柱购于思拓凡(Cytiva)生物科技有限公司;pmCherry-N1 空载质粒购于科研云生物公司;DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司;jetPEI 试剂购于法国 Polyplus 生物技术公司;荧光共聚焦显微镜为德国蔡司公司生产。

2 方法

2.1 人 CSF3 蛋白的生物信息学分析 在 Uniprot 数据库中获得人 CSF3 蛋白序列及分子质量,利用在线网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)以及 Software Suite for Sequence Analysis 在线软件对其二级结构及理化性质进行分析,将人 CSF3 与其同源序列进行保守结构域比对,结合 PDB 数据库下载的人 CSF3 蛋白预测结构,用 Pymol 软件分析预测人 CSF3 蛋白的理化性质。

2.2 人 CSF3 蛋白原核表达系统的构建和鉴定 由于 CSF3 剪接体-1 只比剪接体-2 多 3 个氨基酸,通过 NCBI 数据库下载人种属来源的目的基因的碱基序列以实验室保存的 CSF3 pGLO1 剪接体-1 为模板,使用 QuikChange 方法设计实验引物(表 1),引物由生工生物公司合成,经 PCR 获得 CFS3 pGLO1 剪接体-2 线性质粒,加入 DpnI 酶切后转化入大肠杆菌感受态细胞 BL21,37 $^{\circ}$ C 培养 1 h。取菌液涂于带有氨苄抗性的固体培养基平板上,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养过夜。挑取平板上的单菌落用含氨苄抗性的 LB 培养基培养 3~4 h,加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导蛋白,进行蛋白表达检测。采用 SDS-PAGE 电泳鉴定阳性克隆菌株送测序。

2.3 人 CSF3 蛋白的大量表达与纯化 取重组菌过

夜培养,次日接种于 1L 含氨苄抗性的 LB 培养基中, 37 ℃、200 r/min 培养至 A₆₀₀ 值为 0.8 时降温至 16 ℃,继续培养 1h,加入 IPTG 诱导培养过夜。收集全菌液离心,收集菌体沉淀,超声破碎后离心,分别取上清和沉淀,流穿亲和镍柱后用 PP 酶酶切过夜,得到纯化的目的蛋白。取纯化蛋白用 Superdex200Increase 10/300 GL 凝胶过滤层析柱作进一步纯化,根据峰值位置收集对应收集管中的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析,制备的高纯度蛋白分装后经液氮速冻后存于-80 ℃冰箱。

表 1 PCR 引物设计
Table 1 Primers used in PCR amplification

引物名称 Segment	引物序列 Sequences of primer	用途 Application
hCSF3-F	CTGTGCCATCCGAAGAAGACTGG	QuikChange 扩增引物
hCSF3-R	GCGCACAGTTTTCCTGCAGGGC	
OVERLAP-F	GGAAAACTGTGCGCAACCTA TAAACTGTCCATCCGAAG	
OVERLAP-R	TTCCGGATGGCACAGTTTATAG GTTGCGCACAGTTTTCCT	
hCSF3-pmCherry-F	ATAGGATCCGCGGCTGTGCCA GATGGCGC	扩增 hCSF3
hCSF3-pmCherry-R	CTCGAGCCACCATGGATGACCC CGCTGGGTCCGG	

2.4 CSF3 基因融合荧光质粒的构建和鉴定 使用 SnapGene 软件以及 pmCherry-N1 图谱设计 PCR 引物(表 1),引物由生工生物公司合成。以 CSF3 pG-LO1 为模板进行 PCR 扩增,将 PCR 产物与带有卡那抗性的 pmCherry -N1 质粒用 XhoI 和 BamHI 同步进行双酶切,然后进行连接,连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中过夜,第 2 d 挑单克隆菌落接种于含卡那抗性的 LB 培养基中培养 5~6 h 后送生工生物公司测序。

2.5 CSF3 基因的亚细胞定位 将测序正确的重组菌用 200 mL 带有卡那抗性的 LB 培养基培养过夜,用 Endo-Free Plasmid Maxi Kit 试剂盒大量抽提质粒。在六孔板中培养 HEK-293T 细胞,两次传代至状态良好。将 jetPEI 试剂和质粒分别用 100 mmol/L NaCl 稀释,混合后孵育 15~30 min,然后添加到 HEK-293T 细胞中转染 48 h,用 4%多聚甲醛固定 10~20 min,用 PBS 洗涤两次。用 DAPI 染色 5~8 min,PBS 洗涤 3~5 次,通过荧光显微镜观察确定 CSF3 在细胞中的亚定位,并记录观察结果。

结 果

1 人 CSF3 蛋白的生物信息学分析

1.1 人 CSF3 理化性质 人 CSF3 蛋白是一种糖蛋白,查阅 Uniprot 数据库得知人 CSF3 蛋白共有三种

剪接体,其中发挥功能最多最常见的是剪接体-2(本文研究以剪接体-2 为主,全文中 CSF3 指剪接体-2),全长有 204 个氨基酸,相对分子质量 22×10^3 ,其中第 1-30 位氨基酸是信号肽,信号肽部分被切割从而形成 31-204 位氨基酸构成的多肽,相对分子质量 18.8×10^3 [13]。CSF3 第 163 位氨基酸为糖基化修饰位点,全长包含 5 个半胱氨酸,构成两个二硫键,等电点为 5.81,属于 IL-6 超家族(图 1)。人 CSF3 的不稳定系数为 60.95,为不稳定蛋白。通过网址对其亲疏水性进行预测,为亲水蛋白(图 2)。

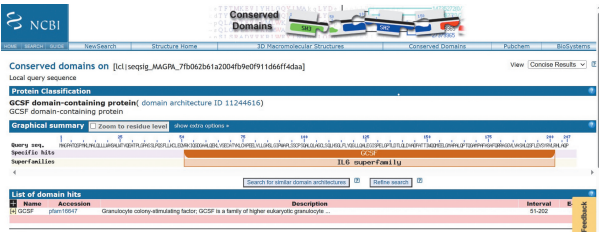


图 1 人 CSF3 蛋白保守结构域分析
Fig. 1 Conservative domain analysis of hCSF3 protein

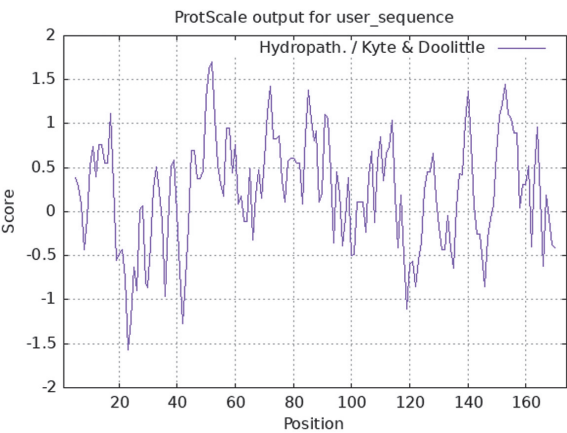


图 2 人 CSF3 蛋白亲水性预测
Fig. 2 Analysis of the hydropathy prediction of the CSF3 protein

1.2 CSF3 同源序列比对及保守结构域分析 人类 CSF3 编码基因位于第 17 号染色体的 q21-22 区,由 Uniprot 数据库中已通过实验测定并提交到蛋白质结构数据库的信息,以及 CSF3 全长蛋白的预测结构可看出,CSF3 的三级结构由信号肽 α 螺旋,4 个反平行的 α 螺旋,β 平片和不规则卷曲组成(图 3)。CSF3 的同源蛋白 234 个,在真核生物、细菌、古菌、病毒中广泛存在。将人源 CSF3 的 3 种剪接体与其他物种 CSF3 蛋白的同源序列进行比对,整体同源率为 78.64%。在比对的序列中使用一种保守性色阶标示不同保守程度的氨基酸残基,结果如图 4。其中紫色表示该区域氨基酸与同源氨基酸序列 100% 保守,深红色表示保守性>75%,粉红色代表保守性>50%。表明 CSF3 的主链结构域在不同物种中具有高度的保守性。

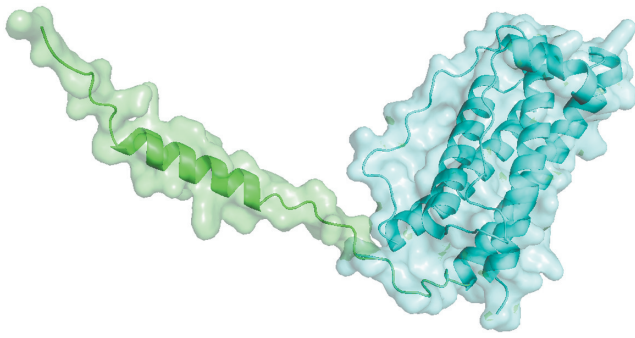


图3 人CSF3 fl蛋白三级结构预测

Fig. 3 Tertiary structure prediction of the human CSF3 fl protein

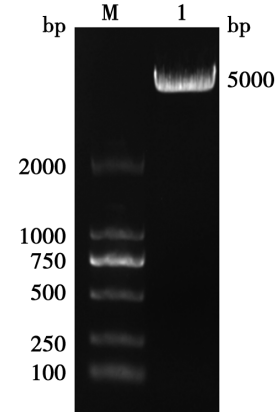
人CSF3-1	MAGPATQSPMKINALQLLLWHSALWVQEAFLG.....	34
人CSF3-2	MAGPATQSPMKINALQLLLWHSALWVQEAFLG.....	34
人CSF3-3	MAGPATQSPMKINALQLLLWHSALWVQEAFLG.....	34
鼠CSF3	MAQLSAGRRMKINALQLLLWQSALWSGREFFVPIVTVSAIP	40
羊CSF3	TFLG.....	4
猪CSF3	MKINALQLLLWHSALWVQEAFLG.....	25
牛CSF3	MKINVLQLLWHSALWVQEAFLG.....	25
犬CSF3	MAFLG.....	5
Consensus	p l	
人CSF3-1	PASSLPQSFLKLCIECVRRKIQGGAFLQEKIVSECATYKL	74
人CSF3-2	PASSLPQSFLKLCIECVRRKIQGGAFLQEKLCAT...YKL	71
人CSF3-3	PASSLPQSFLKLCIECVRRKIQGGAFLQEKIVSE.....	68
鼠CSF3	PSLELHSFLLKSLIECVRRKIQGGSVILQCLCAT...YKL	77
羊CSF3	PASSLPQSFLKLCIECVRRKIQGGAFLQEKLCAT...HKL	41
猪CSF3	PASSLPQSFLKLCIECVRRKIQGGAFLQEKLCAT...HKL	62
牛CSF3	PASSLPQSFLKLCIECVRRKIQGGAFLQEKLCAT...HKL	62
犬CSF3	ETGFLQSFLKLCIECMRFVQAGETLQETLCAT...HCL	42
Consensus	p lp sflk leq rk q g l e l	
人CSF3-1	CHPEEIVLGHSLGIHFAFLSSQPSQALCIAGCISQIHSG	114
人CSF3-2	CHPEEIVLGHSLGIHFAFLSSQPSQALCIAGCISQIHSG	111
人CSF3-3	AGCISQIHSG	78
鼠CSF3	CHPEEIVLGHSLGIHFAFLSSQPSQALCIAGCISQIHSG	117
羊CSF3	CHPEEIVLGHSLGIHFAFLSSQPSQALCIAGCISQIHSG	81
猪CSF3	CHPEEIVLGHSLGIHFAFLSSQPSQALCIAGCISQIHSG	102
牛CSF3	CHPEEIVLGHSLGIHFAFLSSQPSQALCIAGCISQIHSG	102
犬CSF3	CHPEEIVLGHSLGIHFAFLSSQPSQALCIAGCISQIHSG	82
Consensus	cl qlh g	
人CSF3-1	LFLYQGLLQALGISEPFLGFTLDTLQIDVADFATTIWOQM	154
人CSF3-2	LFLYQGLLQALGISEPFLGFTLDTLQIDVADFATTIWOQM	151
人CSF3-3	LFLYQGLLQALGISEPFLGFTLDTLQIDVADFATTIWOQM	118
鼠CSF3	LFLYQGLLQALGISEPFLGFTLDTLQIDVADFATTIWOQM	157
羊CSF3	LFLYQGLLQALGISEPFLGFTLDTLQIDVADFATTIWOQM	121
猪CSF3	LFLYQGLLQALGISEPFLGFTLDTLQIDVADFATTIWOQM	142
牛CSF3	LFLYQGLLQALGISEPFLGFTLDTLQIDVADFATTIWOQM	142
犬CSF3	LFLYQGLLQALGISEPFLGFTLDTLQIDVADFATTIWOQM	122
Consensus	l lyqgllqal gisp l p ld lql d a iw qm	
人CSF3-1	EDLGMAFAVPTCGAMPAFAFAFCRRAGGVIVASHLQCSFL	194
人CSF3-2	EDLGMAFAVPTCGAMPAFAFAFCRRAGGVIVASHLQCSFL	191
人CSF3-3	EDLGMAFAVPTCGAMPAFAFAFCRRAGGVIVASHLQCSFL	158
鼠CSF3	ENLGVAHTVPTCGAMPAFAFAFCRRAGGVIVASHLQCSFL	197
羊CSF3	EDLGVAFAVPTCGTMTETSAFCRRAGGVIVASHLQCSFL	161
猪CSF3	EDLRAPASIPTCGTMTETSAFCRRAGGVIVASHLQCSFL	182
牛CSF3	EDLGVAFAVPTCGAMPAFAFAFCRRAGGVIVASHLQCSFL	182
犬CSF3	EDLGMAFAVPTCGTMTETSAFCRRAGGVIVASHLQCSFL	162
Consensus	e l ap ptq p f safcrraggvl s l fl	
人CSF3-1	EVSFFVLRHIAQ	206
人CSF3-2	EVSFFVLRHIAQ	203
人CSF3-3	EVSFFVLRHIAQ	170
鼠CSF3	ETARLRHIAA	208
羊CSF3	GLAYRGLRYIAE	173
猪CSF3	ELAYRGLRYIAE	194
牛CSF3	ELAYRGLRYIAE	194
犬CSF3	ELAYRGLRYIAE	174
Consensus	l a	

图4 CSF3同源氨基酸序列比对

Fig. 4 Alignment of the homologous amino acid sequence of CSF3

2 人CSF3蛋白的原核表达与鉴定

对 QuikChange PCR 扩增的产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,其大小约为 5 kb(图 5)。通过转化后抗性筛选,获得阳性克隆菌株。选取单克隆菌株进行培养,经过 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳分析,表达蛋白分子质量约为 20.8×10^3 (图 6)。选取 1 号和 2 号菌株进行测序,经比对验证测序结果正确。

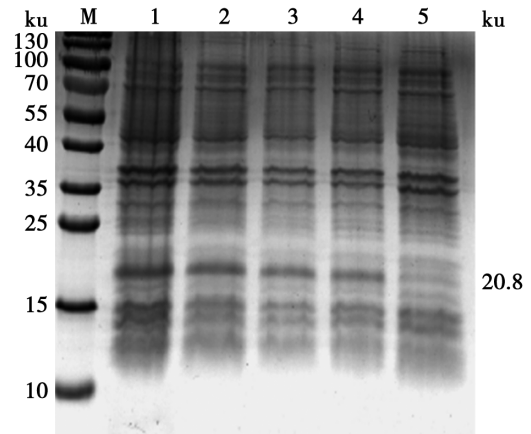


M DNA 标志物 1 QuikChange PCR 产物

图5 QuikChangePCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定

M DNA Marker 1 QuikChange PCR products

Fig. 5 Identification of QuikChange PCR products



M 蛋白分子质量标准 1~4 人CSF3重组菌克隆 5 阴性对照

图6 单克隆菌株表达人CSF3蛋白的SDS-PAGE电泳分析

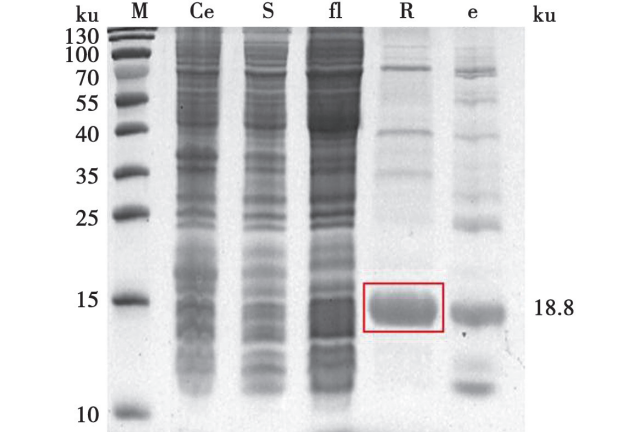
M Protein molecular 1-4 The hCSF3 clone of the recombinant strain 5 Negative control

Fig. 6 Identification of the monoclonal strains expressing the hCSF3 protein

3 人CSF3蛋白的纯化

将重组菌过夜培养后进行低温诱导表达,通过镍柱亲和层析获得纯度较高的目的蛋白,结果如图 7。其中 R 为酶切后的目的蛋白,预测该蛋白性质较为不稳定,对热以及酸碱较为敏感,且容易聚集。用 Superdex200Increase 10/300 GL 凝胶过滤层析柱进行纯化,取收集的第 4~12 管样品进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 8 和图 9。表明蛋白 CSF3 切掉标签后性质更为稳定,凝胶过滤层析纯化峰值单一,蛋白纯度较

好。



M 蛋白分子质量标准 Ce IPTG 诱导重组菌超声破碎全蛋白悬液 S IPTG 诱导重组菌超声破碎上清 fl IPTG 诱导重组菌超声破碎上清镍离子亲和层析柱流穿液 R 无组氨酸标签蛋白洗脱液 e 镍离子亲和层析柱总蛋白洗脱液

图 7 镍离子层析纯化人 CSF3 蛋白 SDS-PAGE 分析

M Protein molecular Ce The resuspension bacterial solution was broken by sonication S Ultrasonically lysed whole protein suspension of IPTG-induced recombinant bacteria fl Nickel ion affinity chromatography column flow-through of the supernatant from ultrasonically lysed IPTG-induced recombinant bacteria R Elution buffer for non-histidine-tagged proteins e Total protein elution buffer from a nickel ion affinity chromatography column

Fig. 7 Nickel ion column were purified with hCSF3 protein

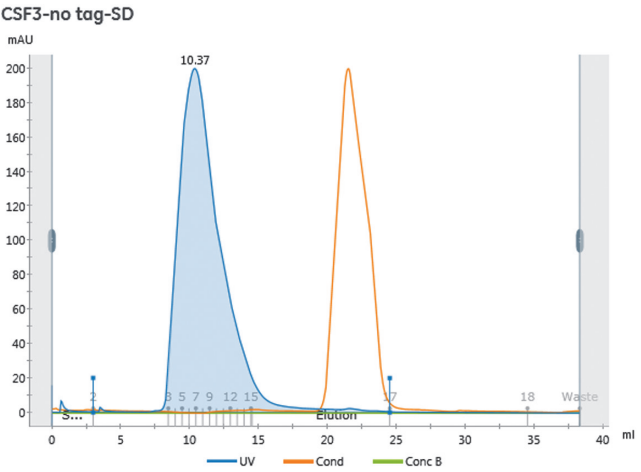
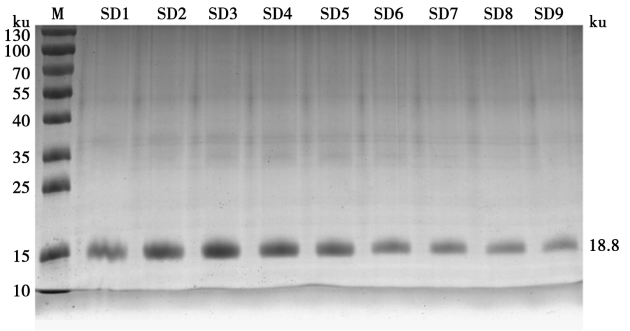


图 8 切标签人 CSF3 蛋白凝胶过滤纯化

Fig. 8 hCSF3 protein was cut labeled and purified by gel filtration chromatography

4 CSF3 基因融合荧光质粒的构建及鉴定

以 CSF3 pGLO1 质粒(剪接体-2)为模板对目的基因片段进行扩增,结果如图 10。扩增产物与实验室保存的 pmCherry-N1 载体质粒进行双酶切,获得预期大小为 522 bp 的目的基因片段和载体片段(图 11)。将目的片段与载体片段连接后获得质粒送测序,结果证明构建的融合荧光标签质粒正确且完整。

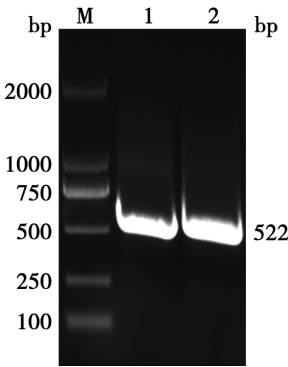


M 蛋白分子质量标准 SD1-9 凝胶过滤第 4-12 管收集液

图 9 凝胶过滤纯化的切标签人 CSF3 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein molecular SD1-9 Protein 4-12 tubes were purified by gel filtration chromatography columns

Fig. 9 hCSF3 protein was identified by gel filtration chromatography and electrophoresis

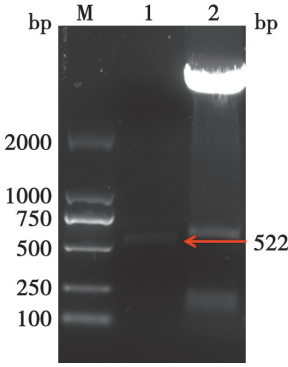


M DNA 标志物 1,2 CSF3 基因 PCR 产物

图 10 CSF3 基因 PCR 结果

M DNA Marker 1,2 PCR product of the CSF3 gene

Fig. 10 PCR product of the CSF3 gene



M DNA 标志物 1 CSF3 基因的 PCR 产物的双酶切产物 2 载体质粒 pmCherry-N1 的双酶切产物

图 11 CSF3 以及 pmCherry-N1 质粒双酶切结果

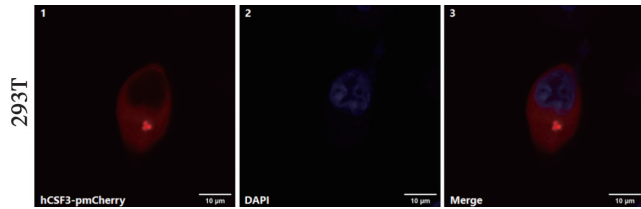
M DNA Marker 1 hCSF3-digested products 2 The vector digestion product of pmCherry

Fig. 11 Results of the double-enzyme digestion products of the recombinant plasmid

5 CSF3 基因在细胞中的定位

将构建的融合 Cherry 标签的 CSF3 分泌肽段的质粒转染到 HEK-293T 细胞中,48 h 后用共聚焦显微镜观察细胞定位情况,结果如图 12。细胞质中出现红

色荧光,显示融合 pmCherry 标签的 CSF3 蛋白在细胞质中呈弥散性分布,且红色荧光在 HEK-293T 细胞中存在局部聚集,提示融合 pmCherry 标签的 CSF3 蛋白定位在细胞质中,并呈现特定的定位和分布模式。



1 人 CSF3-pmCherry 的定位 2 DAPI 的定位 3 人 CSF3-pmCherry 定位与 DAPI 定位融合图

图 12 pmCherry 荧光标签融合人 CSF3 在 HEK-293T 中的亚细胞定位

1 Localization of the hCSF3-pmCherry 2 Positioning of the DAPI 3 Fusion plots of the first two images.

Fig. 12 Subcellular localization of pmCherry fluorescent tag fused hCSF3 in HEK-293T

讨 论

CSF3 在临床上被广泛用于预防细胞毒性化疗后的中性粒细胞减少,并动员造血干细胞用于移植^[14]。CSF3 受体在粒细胞形成的所有阶段高表达,表明 CSF3 功能具有广泛多效性。因此,CSF3 介导的中性粒细胞的增殖分化在感染、免疫和肿瘤中扮演重要角色^[15-16]。通过小鼠模型发现,在感染过程中,CSF3 表达量增加促进感染的清除和维持小鼠的存活,因此有助于宿主的防御^[17]。然而大量证据表明 CSF3 在自身免疫性疾病、炎症性肺病以及缺血再灌注损伤中可能加剧炎症性疾病的发展,因此 CSF3 在感染免疫中的作用呈现复杂性^[2]。研究发现 CSF3 在多种肿瘤中高表达,主要通过信号转换器和转录激活因子 3 (STAT3)信号通路促进髓系抑制细胞(MDSCs)的存活和激活,因此成为肠道相关癌症的潜在治疗靶点^[18]。在动物模型中,G-CSF 可激活来自小鼠和人类供体的中性粒细胞和造血干细胞的自噬,因此 CSF3 在造血和髓系细胞的自噬中发挥重要作用^[14]。这些研究结果进一步强调了 CSF3 在不同生理和病理情况下的多重调节作用,为理解其生物学功能提供了线索。

迄今为止,关于人细胞因子 CSF3 与病原菌中蛋白的直接互作的报道尚少。虽已成功解析了 CSF3 及其受体复合物的结构,然而同人与小鼠 GCSF-R 的细胞因子受体同源结构域相比,该复合物的构象存在显著差异。值得注意的是,该构象与 IL-6/gp130 信号复合物的结构相似^[19-20]。为了揭示 CSF3 与病原菌蛋白之间的相互作用关系,有必要进一步开展相关研究,从而为生物医学和免疫学领域提供更加全面和准确的科学支持。Miyafusa 等^[21]通过设计末端环化的 CSF3 变体,并运用分裂蛋白技术,在最小插入的情况下形成

肽键,耐热性和化学变性分析结果表明环状 CSF3 变体相较于线性 CSF3 表现出更高的热稳定性和聚集抗性,这一特性提升了环状 CSF3 变体的免疫原性,对于改进生物医学及其他应用中循环蛋白的设计具有积极意义,该研究成果还为 G-CSF 生物改善剂的发展提供了参考^[22-23]。这些发现不仅有助于揭示 CSF3 与病原菌蛋白之间的相互作用机制,同时在探索免疫调节、感染防御和疾病治疗等领域也具有潜在意义。

本研究采用系统化的生物信息学方法对人 CSF3 蛋白进行了全面分析,并构建了 CSF3 pGLO1 质粒,实现了在原核表达系统中对其进行高效表达。由于该蛋白在不同物种中存在高度同源性,因此可成为未知功能动物实验研究的工具。用构建的融合 pmCherry 荧光标签 CSF3 重组质粒转染 HEK-293T 细胞,初步揭示 CSF3 融合 cherry 的蛋白主要定位在 HEK-293T 细胞质中并有局部聚集现象,为重组 CSF3 药物的开发及其在病原菌感染和免疫调控中的作用机制研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] He RL, Zhou J, Hanson CZ, et al. Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2 [J]. Blood, 2009, 113(2):429-437.
- [2] Martin KR, Wong HL, Witko-Sarsat V, et al. G-CSF-A double edge sword in neutrophil mediated immunity[J]. Semin Immunol, 2021, 54:101516.
- [3] Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(7):533-544.
- [4] Mouchemore KA, Anderson RL. Immunomodulatory effects of G-CSF in cancer: Therapeutic implications[J]. Semin Immunol, 2021, 54:101512.
- [5] Ley K, Hoffman HM, Kubes P, et al. Neutrophils: New insights and open questions[J]. Sci Immunol, 2018, 3(30):eaat4579.
- [6] Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils[J]. Annu Rev Pathol, 2014, 9:181-218.
- [7] Van Raam BJ, Drewniak A, Groenewold V, et al. Granulocyte colony-stimulating factor delays neutrophil apoptosis by inhibition of calpains upstream of caspase-3[J]. Blood, 2008, 112(5):2046-2054.
- [8] Theron AJ, Steel HC, Rapoport BL, et al. Contrasting immunopathogenic and therapeutic roles of granulocyte colony-stimulating factor in cancer[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2020, 13(11):406.
- [9] Buzzeo MP, Yang J, Casella G, et al. Hematopoietic stem cell mobilization with G-CSF induces innate inflammation yet suppresses adaptive immune gene expression as revealed by microarray analysis[J]. Exp Hematol, 2007, 35(9):1456-1465.
- [10] Malashchenko VV, Meniailo ME, Shmarov VA, et al. Direct anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on activation and functional properties of human T cell subpopulations in vitro[J]. Cell Immunol, 2018, 325:23-32.

(下转 296 页)

【参考文献】

- [1] Miller RL, Grayson MH, Strothman K. Advances in asthma: New understandings of asthma's natural history, risk factors, underlying mechanisms, and clinical management[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 148(6): 1430-1441.
- [2] Reddel HK, Bacharier LB, Bateman ED, et al. Global initiative for asthma strategy 2021: executive summary and rationale for key changes[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(1): 17-35.
- [3] Gans MD, Gavrilova T. Understanding the immunology of asthma: Pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes[J]. *Paediatr Respir Rev*, 2020, 36: 118-127.
- [4] Rosas-Salazar C, Chirkova T, Gebretsadik T, et al. Respiratory syncytial virus infection during infancy and asthma during childhood in the USA (INSPIRE): a population-based, prospective birth cohort study[J]. *Lancet*, 2023, 401(10389): 1669-1680.
- [5] Chen X, Qiu C. Respiratory tract mucous membrane microecology and asthma[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(18): 495.
- [6] 刘冬, 林智峰, 张珂, 等. 慢阻肺合并下呼吸道感染患者痰液病原菌分布及血清 SAA 水平变化分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18(12): 1443-1447.
- [7] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2016年版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(9): 1-24.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016年版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(4): 253-279.
- [9] WS/T499-2017. 下呼吸道感染细菌培养操作指南[S]. 中华人民共和国卫生行业标准, 2017.
- [10] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第4版. 北京人民卫生出版社, 2014: 633-643.
- [11] Binns E, Tuckerman J, Licciardi PV, et al. Respiratory syncytial virus, recurrent wheeze and asthma: A narrative review of pathophysiology, prevention and future directions[J]. *J Paediatr Child Health*, 2022, 58(10): 1741-1746.
- [12] Kim SR. Viral infection and airway epithelial immunity in asthma[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9914.
- [13] 游泽林, 陈如寿, 陈家忠, 等. 急性加重期慢性阻塞性肺疾病患者痰色评分与肺部微生物和病情严重程度的相关性[J]. *中国微生态学杂志*, 2022, 34(2): 191-194.
- [14] 曹义, 韩利红, 王彤兵, 等. Cf-DNA/NETs 与重症哮喘并肺部感染患者肺功能及呼吸动力学的关系[J]. *热带医学杂志*, 2022, 22(2): 207-211.
- [15] 张亚丽, 蒋毅. 诱导痰检测技术在支气管哮喘中的应用进展[J]. *山东医药*, 2022, 62(7): 93-96.
- [16] Langouet-Astrie C, Oshima K, McMurtry SA, et al. The influenza-injured lung microenvironment promotes MRSA virulence, contributing to severe secondary bacterial pneumonia[J]. *Cell Rep*, 2022, 41(9): 111721.
- [17] Elbestawy AR, Ellakany HF, Abd El-Hamid HS, et al. Isolation, characterization, and antibiotic sensitivity assessment of *Gallibacterium anatis* biovar *haemolytica*, from diseased Egyptian chicken flocks during the years 2013 and 2015[J]. *Poult Sci*, 2018, 97(5): 1519-1525.
- [18] Suzukawa M, Ohta K, Hashimoto H, et al. NHOM-asthma study group. characterization and cluster analyses of elderly asthma in comparison with nonelderly patients with asthma in Japan[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2023, 130(5): 607-616. e3.
- [19] Yao Z, Fu Y. Glycyrrhizic acid restrains airway inflammation and remodeling in asthma via the TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(5): 461.
- [20] Kang Y, Bai M, Deng L, et al. MiRNA-21 regulates bronchial epithelial cell proliferation by activating Tgf β 1/Smad signaling pathway and its correlation with asthma severity in children[J]. *Iran J Public Health*, 2021, 50(10): 1973-1982.
- 【收稿日期】 2023-10-23 【修回日期】 2024-01-10
- (上接 290 页)
- [11] Ishikawa H, Fukui T, Ino S, et al. Influenza virus infection causes neutrophil dysfunction through reduced G-CSF production and an increased risk of secondary bacteria infection in the lung[J]. *Virology*, 2016, 499: 23-29.
- [12] Fang C, Mei J, Tian H, et al. CSF3 Is a Potential Drug Target for the Treatment of COVID-19 [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 605792.
- [13] Mehta HM, Corey SJ. G-CSF, the guardian of granulopoiesis[J]. *Semin Immunol*, 2021, 54: 101515.
- [14] Leveque-El Mouttie L, Vu T, Lineburg KE, et al. Autophagy is required for stem cell mobilization by G-CSF[J]. *Blood*, 2015, 125(19): 2933-2936.
- [15] Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! [J]. *Growth Factors*, 2005, 23(1): 33-41.
- [16] Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, et al. Roles of Stat3 and ERK in G-CSF signaling[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(2): 252-263.
- [17] Hermesh T, Moran TM, Jain D, et al. Granulocyte colony-stimulating factor protects mice during respiratory virus infections[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37334.
- [18] Li W, Zhang X, Chen Y, et al. G-CSF is a key modulator of MDSC and could be a potential therapeutic target in colitis-associated colorectal cancers[J]. *Protein Cell*, 2016, 7(2): 130-140.
- [19] Aritomi M, Kunishima N, Okamoto T, et al. Atomic structure of the GCSF-receptor complex showing a new cytokine-receptor recognition scheme[J]. *Nature*, 1999, 401(6754): 713-717.
- [20] Tamada T, Honjo E, Maeda Y, et al. Homodimeric cross-over structure of the human granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) receptor signaling complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(9): 3135-3140.
- [21] Miyafusa T, Shibuya R, Honda S. Structural insights into the backbone-circularized granulocyte colony-stimulating factor containing a short connector[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(2): 224-228.
- [22] Miyafusa T, Shibuya R, Nishima W, et al. Backbone circularization coupled with optimization of connecting segment in effectively improving the stability of granulocyte-colony stimulating factor[J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(10): 2690-2696.
- [23] Shibuya R, Miyafusa T, Honda S. Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure[J]. *Febs J*, 2020, 287(8): 1554-1575.
- 【收稿日期】 2023-09-17 【修回日期】 2023-11-26