山西大学 SHANXI UNIVERSITY

2024 届 硕 士 学 位 论 文

SPRR2A 的原核表达及生物学活性研究

作者姓名　刘红瑞

指导教师　丁国斌

学科专业　微生物学

研究方向　肿瘤靶向药物设计

培养单位　生物技术研究所

学习年限　2021 年 9 月至 2024 年 6 月

二〇二四年六月

山西大学

2024 届硕士学位论文

SPRR2A 的原核表达及生物学活性研究

作者姓名　刘红瑞

指导教师　丁国斌

学科专业　微生物学

研究方向　肿瘤靶向药物设计

培养单位　生物技术研究生

学习年限　2021 年 9 月至 2024 年 6 月

二〇二四年六月

Thesis for Master's degree, Shanxi University, 2022

Prokaryotic expression and biological activity evaluation of SPRR2A

Student Name	Liu Hongrui
Supervisor	Dr. Guo-Bin Ding
Major	Microbiology
Specialty	Design of tumor-targeted agents
Department	Institute of Biotechnology
Research Duration	2021.09-2024.06

June, 2024

中 文 摘 要

近年来，抗菌肽(AMPs)在抗癌治疗领域引起了广泛关注并成为癌症治疗的候选药物。据报道，富含脯氨酸的小蛋白 2A(Small proline-rich protein 2A, SPRR2A)是利用 Sf9 昆虫细胞表达系统成功表达的一种富含脯氨酸、含有 5 对链内二硫键的肠道杀菌蛋白。在蠕虫感染期间其通过膜渗透作用靶向革兰氏阳性菌，从而保护肠道屏障。然而，通过原核表达系统获得有活性的 SPRR2A 仍然是个挑战。本课题首次成功原核表达了有活性的 SPRR2A 的融合蛋白 Trx-SPRR2A，该蛋白由硫氧还蛋白标签 Trx 与 SPRR2A 两部分组成。随后，为了研究该融合蛋白的生物活性，本课题对 Trx-SPRR2A 的抗菌活性及体外抗肿瘤活性进行了评估。本论文主要聚焦于以下三方面展开研究：

利用无缝克隆技术，完成 pET32a-*SPRR2A* 重组质粒的构建工作。由于富含二硫键的蛋白质往往在大肠杆菌的还原型细胞质中表现为无活性的包涵体，因此，改善大肠杆菌表达系统迫在眉睫。实验选择氧化型突变大肠杆菌菌株 Rosetta-gami(DE3) pLysS 作为表达宿主。利用氧化型突变大肠杆菌原核表达系统，成功实现了融合蛋白 Trx-SPRR2A 的高效表达，并利用镍离子亲和层析柱对其进行了纯化。通过 MALIDI-TOF 质谱对目的蛋白进行表征，结果表明，Trx-SPRR2A 成功表达，其分子量为 21.547 kDa。使用圆二色谱检测了 Trx-SPRR2A 在 pH 7.4 的 PB 和 pH 5.5 的 MES 缓冲液中的二级结构与热稳定性，表明该蛋白主要二级结构为β-折叠和无规卷曲，在 75 ℃以下具有较强的热稳定性。将融合蛋白与含有 10%血清的培养基孵育不同时间后通过 SDS-PAGE 进行检测，表明其具有良好的血清稳定性。使用高分辨质谱对蛋白质的二硫键进行分析，表明在非还原条件下蛋白之间形成了二聚体，分子量为 41348.35 Da，蛋白经酶切消化后的肽图分析，单体蛋白含有 7 对二硫键。

选用粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*)为对象，通过平板菌落计数法、扫描电子显微镜、活/死细菌染色、PI 摄取实验研究融合蛋白 Trx-SPRR2A 的抗菌活性。表明，Trx-SPRR2A 对革兰氏阳性细菌粪肠球菌、单核细胞增生李斯特菌和金黄色葡萄球菌表现出剂量依赖的杀灭活性；而对革兰氏阴性细菌柠檬酸杆菌仅表现出微弱的抗菌活性。由此表明，

我们通过原核表达获得的融合蛋白 Trx-SPRR2A 保留了抗菌活性。

利用荧光染料 FITC 对融合蛋白进行标记，通过流式细胞术和荧光倒置显微镜检测了 MCF-7 细胞对 Trx-SPRR2A 的摄取情况，结果表明，在 pH 6.5 的条件下，细胞能够更好地摄取 FITC-Trx-SPRR2A。通过一系列实验，包括 MTT、结晶紫染色、活死细胞染色、细胞膜通透性检测以及 Annexin V-FITC/PI 双染等多种手段评估了该融合蛋白的抗肿瘤活性。结果表明：在弱酸性条件下，Trx-SPRR2A 对对乳腺癌细胞 MCF-7 表现出增强的抗肿瘤活性，凋亡细胞比例明显增加。

综上所述，我们成功利用原核表达系统，首次合成了富含二硫键的融合蛋白 Trx-SPRR2A，对其理化性质进行了较为全面的表征，通过多种实验手段对其抗菌和抗肿瘤活性进行了初步研究，实验结果证实：Trx-SPRR2A 在抗菌与抗肿瘤治疗领域具有较好的应用前景。本研究可为新型抗菌和抗肿瘤药物的研发提供新思路。

关键词：富含脯氨酸的小蛋白 2A（SPRR2A）；Trx-SPRR2A；二硫键；原核表达；抗菌；抗肿瘤

ABSTRACT

In recent years, antimicrobial peptides (AMPs) have attracted widespread attention in the field of anticancer therapy and become promising drugs for cancer treatment. It has been reported that small proline-rich protein 2A (SPRR2A) is an intestinal antibacterial protein rich in proline and contains five pairs of intrachain disulfide-bonds. SPRR2A was successfully expressed in Sf9 insect cells. During helminth infection, it targets gram-positive bacteria through membrane permeation, thereby protecting the intestinal barrier. However, it remains a challenge to obtain active SPRR2A through prokaryotic expression system. This study successfully obtained the active fusion protein SPRR2A (Trx-SPRR2A) via prokaryotic expression system for the first time, which consists of two fragments: the thioredoxin tag Trx and SPRR2A. Subsequently, in order to explore the biological activity of this fusion protein, the antibacterial activity and *in vitro* antitumor efficacy of Trx-SPRR2A were evaluated in this study. This paper mainly focuses on the following three aspects:

(1) The recombinant plasmid pET32a-*SPRR2A* was constructed using seamless cloning technology. Due to the fact that proteins rich in disulfide bonds often exists in the form of inactive inclusion body in the reducing cytoplasm of *Escherichia coli*. It is urgent to improve the expression system of *Escherichia coli*. The oxidative mutant *Escherichia coli* strain Rosetta gami (DE3) pLysS was employed as the expression host. The efficient expression of the fusion protein Trx-SPRR2A was successfully achieved using an oxidative mutant *E. coli* prokaryotic expression system, and it was purified using a nickel ion affinity chromatography column. The target protein was characterized by MALIDI-TOF mass spectrometry, and the results showed that Trx-SPRR2A was successfully expressed with a molecular weight of 21.547 kDa. The secondary structure and thermal stability of Trx-SPRR2A in PB at pH 7.4 and MES buffer at pH 5.5 were determined using circular dichroism, and the results indicated that the main secondary structures of Trx-SPRR2A are β-folding and random coil, and it exhibited strong thermal stability below 75 ℃. The fusion protein was incubated with a cell medium containing 10% serum for different times and detected by SDS-PAGE, Trx-SPRR2A showed good serum stability. The disulfide bonds in

Trx-SPRR2A was analyzed by high-resolution mass spectrometry, the results indicated that dimers with a molecular weight of 41348.35 Da were formed under non-reducing conditions. Peptide map analysis of the Trx-SPRR2A after enzymatic digestion revealed that the monomer protein contained 7 pairs of disulfide bonds.

(2) The antibacterial activity of the fusion protein Trx-SPRR2A was evaluated using *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Citrobacter rodentium*. Plate colony counting, scanning electron microscopy, live/dead bacterial staining and PI uptake experiments were performed. The results indicates that Trx-SPRR2A exhibits dose-dependent killing activity against gram-positive bacteria such as *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. However, it showed weak antibacterial activity against the gram-negative bacterium *Citrobacter*. This indicates that the fusion protein Trx-SPRR2A obtained through prokaryotic expression retains the antibacterial activity.

(3) The fusion protein was labeled with fluorescent dye FITC, and the cellular uptake of Trx-SPRR2A by MCF-7 cells was determined by flow cytometry and fluorescence inverted microscopy. The results showed that an enhanced cellular uptake of FITC-Trx-SPRR2A was observed at pH 6.5. The antitumor activity of the fusion protein was evaluated through a series of experiments, including MTT, crystal violet staining, live and dead cell staining, cell membrane permeability test, and Annexin V-FITC/PI double staining. The results indicated that Trx-SPRR2A displayed obviously enhanced antitumor activity against breast cancer cell MCF-7 under weakly acidic conditions, and the proportion of apoptotic cells increased significantly.

In summary, we have successfully biosynthesized the fusion protein Trx-SPRR2A rich in disulfide bonds via prokaryotic expression system for the first time. Its physicochemical properties were comprehensively characterized. And its antibacterial and antitumor activities were preliminarily investigated through various experimental methods. The experimental results confirmed that Trx-SPRR2A has good application prospects in the fields of antibacterial and antitumor therapy. This study can provide new ideas for the development of new antibacterial and antitumor

agents.

Keywords: Small protein 2A rich in proline (SPRR2A); Trx-SPRR2A; Disulfide bond; Prokaryotic expression; Antibacterial; Antitumor

英文缩略

缩写词	英文全称	中文全称
ABP	antibacterial peptide	抗菌肽
LTP	Lipid transfer protein	脂转移蛋白
SPRR2A	Small proline-rich protein 2A	小蛋白 2A
SEM	Scanning electron microscope	扫描电子显微镜
E. faecalis	*Enterococcus faecalis*	粪肠球菌
L.monocytogenes	*Listeria monocytogenes*	单核细胞增多性李斯特菌
S. aureus	*Staphylococcus aureus*	金黄色葡萄球菌
Citrobacter	*Citrobacter rodentium*	柠檬酸杆菌
CD	Circular Dichroism	圆二色谱
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
SEM	Scanning electron microscope	扫描电子显微镜

目　录

1 绪论.....1
1.1 抗菌肽.....1
1.1.1 抗菌肽的来源.....1
1.1.2 抗菌肽结构特点及理化特性.....2
1.1.3 抗菌肽的作用机制.....3
1.2 抗癌肽.....5
1.2.1 癌症概述.....5
1.2.2 抗癌肽的优势与应用.....6
1.3 肽的异源表达.....7
1.4 SPRR2A 简介.....9
1.5 研究目的及意义.....10
2 SPRR2A 的制备.....11
2.1 实验材料与仪器.....11
2.1.1 实验试剂与材料.....11
2.1.2 主要试剂配制方法.....11
2.1.3 实验仪器.....11
2.2 实验方法.....12
2.2.1 构建 pET32a-SPRR2A 重组质粒.....12
2.2.2 Trx-SPRR2A 蛋白异源表达.....17
2.2.3 Trx-SPRR2A 蛋白的纯化.....18
2.2.4 Trx-SPRR2A 的 SDS-PAGE 鉴定.....19
2.2.5 Trx-SPRR2A 的质谱鉴定.....19
2.2.6 圆二色谱分析.....19
2.2.7 Trx-SPRR2A 蛋白的二硫键鉴定.....20
2.2.8 Trx-SPRR2A 的血清稳定性检测.....20
2.3 结果与分析.....20
2.3.1 重组质粒的构建.....21
2.3.2 Trx-SPRR2A 的异源表达.....22
2.3.3 Trx-SPRR2A 的纯化.....23
2.3.4 Trx-SPRR2A 的质谱鉴定.....24
2.3.5 Trx-SPRR2A 的二级结构分析.....25
2.3.6 圆二色谱分析 Trx-SPRR2A 的热稳定性.....26
2.3.7 Trx-SPRR2A 蛋白的二硫键鉴定.....27
2.3.8 Trx-SPRR2A 的血清稳定性分析.....28

2.4 小结.....29
3 Trx-SPRR2A 的抗菌活性研究.....30
3.1 实验材料与设备.....30
3.1.1 实验试剂与材料.....30
3.1.2 主要试剂配制方法.....30
3.1.3 实验仪器.....30
3.2 实验方法.....31
3.2.1 细胞培养.....31
3.2.2 平板菌落计数法.....31
3.2.3 扫描电镜观察细胞形态.....31
3.2.4 N01/PI 活死染色法.....32
3.2.5 PI 摄取测定.....32
3.3 结果与分析.....33
3.3.1 平板菌落计数法.....33
3.3.2 电镜检测.....34
3.3.3 N01/PI 活死细菌染色法.....35
3.3.4 PI 摄取测定.....38
3.4 小结.....38
4 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤活性评价.....40
4.1 实验材料与仪器.....40
4.1.1 实验试剂与材料.....40
4.1.2 实验仪器.....40
4.1.3 主要试剂配制方法.....40
4.2 实验方法.....40
4.2.1 细胞培养.....40
4.2.2 FITC 标记 Trx-SPRR2A.....41
4.2.3 荧光倒置显微镜检测 Trx-SPRR2A 的细胞内化行为.....41
4.2.4 流式细胞术分析 Trx-SPRR2A 的细胞内化行为.....42
4.2.5 MTT 检测细胞活力.....42
4.2.6 结晶紫染色检测细胞活力.....43
4.2.7 Calcein-AM/PI 染色检测细胞活力.....43
4.2.8 细胞膜通透性检测.....44
4.2.9 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡.....44
4.3 结果与分析.....45
4.3.1 FITC 标记 Trx-SPRR2A.....45
4.3.2 Trx-SPRR2A 的细胞内化行为.....46
4.3.3 MTT 检测细胞活力.....47
4.3.4 结晶紫染色检测细胞活力.....47

4.3.5 Calcein-AM/PI 染色检测细胞活力.....48
4.3.6 细胞膜通透性检测.....49
4.3.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡.....50
4.4 小结.....53
5 结论.....54
参考文献.....55

1 绪论

1.1 抗菌肽

抗生素在抗击细菌感染性疾病方面发挥了至关重要的作用，它们通过杀死或抑制细菌的生长,不仅提高了感染性疾病的治疗效果，也显著提高了患者的生存率。然而，随着抗生素的广泛使用和滥用也带来了一个不容忽视的问题—细菌耐药性。多重耐药病原体的增加使得传统的治疗方法变得无效，给公共卫生带来了前所未有的挑战[1-3]。面对这一严峻的挑战，科学家们正积极投身于研发新型候选治疗药物，为未来的抗感染治疗提供了新的可能[3]。抗菌肽凭借其卓越的抗菌性能，具有较低的耐药风险以及较广泛的生物活性，能有效对抗多种病原体，包括细菌、真菌、病毒、寄生虫和肿瘤细胞等，正是基于这些显著优势，抗菌肽在众多领域得到了广泛应用[4-11]。

1.1.1 抗菌肽的来源

抗菌肽是大多数生物机体免疫系统中的天然防御武器，能有效抵御外界病原体的感染。抗菌肽因其突出的抗菌功能，故被命名为“antibacterial peptide，ABP”，其对应的中文名称为抗菌肽。紧随其后，研究人员发现抗菌肽不仅对革兰氏阳性和阴性细菌具有较强的抑菌效果，某些抗菌肽对部分病毒、真菌、寄生虫甚至癌细胞同样具有强大的破坏力，因此科研人员更偏向于把这类活性多肽称之为“antimicrobial peptide”，意为抗微生物肽[12]。关于抗菌肽的研究最早可以追溯到由 Alexander Fleming 于 1922 年在分泌物、蔬菜、动物组织中发现的溶菌酶[9,13]。随后瑞典科学家于 1972 年成功地从大肠杆菌诱导的甲壳动物惜古比天蚕(Hyatophora cecropia)中识别出全球首个抗菌肽-天蚕素（Cecropins）[14]，自天蚕素之后，研究者就陆续从各种生物体中获得抗菌肽，包括微生物抗菌肽、动物抗菌肽、植物抗菌肽以及人工合成的抗菌肽[15]。

1.1.1.1 微生物抗菌肽

当自然界存在的各类病原体侵入微生物时，微生物会启动自我防御机制，从而产生抗菌肽。根据微生物类型的不同，抗菌肽可划分为细菌素、病毒源抗菌肽以及酵母嗜杀毒素这三种，其中最常见的就是细菌素类[16]。首次从细菌中成功提取出的抗菌肽是乳酸链球菌素（Nisin），该物质由核糖体合成后通过翻译后修

饰活化，最终通过特定运输途径转运到胞外以发挥功能，乳酸链球菌素已被批准作为食品防腐剂并应用于食品工业中[17]。

1.1.1.2 动物抗菌肽

动物是抗菌肽的重要来源，广泛存在于在昆虫、海洋无脊椎动物、两栖动物、哺乳动物以及人体中[18]。在昆虫领域，天蚕素始终是我们对抗病原体的关键武器，同时也是抗菌肽的核心研究领域[19]。在哺乳动物中，组织蛋白酶和防御素分别构成了两大主要抗菌肽家族，其重要性不言而喻[20]。值得注意的是，两栖动物中也存在一种名为 bombesin 的抗菌肽，对维持两栖动物生存起到了至关重要的作用[21]。

1.1.1.3 植物抗菌肽

植物抗菌肽又称为植物防御素，存在于不同种类植物的花、根、胚乳等不同部位，是植物感染后诱导防御反应的物质基础，也对动物病原体、昆虫、原生动物，甚至对肿瘤细胞呈现出强大的活性。截至目前，来源于植物的抗菌肽包括硫素(Thionins)、脂转移蛋白(Lipid transfer protein ,LTP)、防卫素(Defensins)、静脉样肽(Hevein-like peptides)等 8 个家族[22]。

1.1.1.4 人工合成的抗菌肽

考虑到天然抗菌肽获取难度相对较大，且效率低下，所要求的技术与成本较高，难以规模化生产等劣势，研究者利用化学合成法、基因工程合成等方法合成抗菌肽，从而满足人们表达量和节约成本的需要，也可在一定程度上改善抗菌肽的功能[23]。

Mayron Alves Vasconcelos 等人以天然活性肽 KR-12 为模板，合成抗微生物肽[W7]KR12-KAEK，通过对天然肽与合成肽对浮游和粪肠球菌菌株的抗菌和抗生物膜活性研究，发现合成肽[W7]KR12-KAEK 对浮游细胞与粪肠球菌菌株显示出潜在的抗菌活性，然而天然肽 KR-12 没有显示出抗微生物活性[24]。

1.1.2 抗菌肽结构特点及理化特性

开放结构数据库(DBAASP, https:// dbaasp.org/)呈现了多数抗菌肽的氨基酸序列、化学修饰、3D 结构以及抗菌特性等各种相关信息，截止到 2022 年 2 月，抗菌肽数据库 DBAASP 已收录了来自全世界的超过 22000 种抗菌肽[25]。依据抗菌肽的氨基酸序列及其电荷特性，可将其划分为两大类别：阴离子抗菌肽与阳离

子抗菌肽。

1.1.2.1 阴离子抗菌肽

早在 20 世纪 80 年代初科学家们就对阴离子抗菌肽进行了研究。阴离子抗菌肽一般由 5-70 个氨基酸残基组成，净电荷往往在-1 至-7 的区间内。由于其带负电，因此部分阴离子抗菌肽能够与微生物膜上的负电荷成分通过金属离子构建阳离子盐桥，以便促进与其靶生物的相互作用[26]。Bashiyar Almarwani 等人报道了一种阴离子抗微生物肽 GADDDDD（GAD5）的锌复合物在细菌模拟膜中的应用。研究发现，GAD5 中加入锌离子会增加抗菌肽的致密性和热稳定性，进而促进了两性离子膜的内吞摄取[27]。

1.1.2.2 阳离子抗菌肽

一般情况下，阳离子抗菌肽由 12-50 个氨基酸组成，净电荷在+3 到+9 之间[28,29]。带正电荷的抗菌肽与带负电的细胞膜发生静电相互吸引，从而发挥生物学功能。阳离子抗菌肽可根据二级结构的不同分为α-螺旋抗菌肽、β-折叠抗菌肽(β-发夹以及α-螺旋和β-折叠的组合)、伸展性扩展片层抗菌肽、Loop 环抗菌肽等。其中，α-螺旋抗菌肽是溶解微生物最普遍的类型[9]。经研究，α-螺旋抗菌肽富含赖氨酸、亮氨酸和丙氨酸，不含半胱氨酸残基，其在水溶液中以无结构的形式存在，而在膜存在的情况下变成螺旋结构。典型代表有 KLA、盲肠肽（cecropins）、芙清抗菌肽（temporins）、蛙皮素（magainins）、蜂毒肽（melittin）、鸡源抗菌肽（fowlicidins）、人源抗菌肽（LL-37）等。β-折叠抗菌肽一般通过两到十个半胱氨酸残基形成不同数目的二硫键，其在水溶液中呈β-折叠构象，包括人和植物防御素、多酚类毒素、昆虫防御素 A 或 protegrin、thanatin、蚕素、乳铁蛋白等。伸展性扩展片层抗菌肽有菌毒素、吲哚杀菌素（indolicidin）、组蛋白（histatins）、猪骨髓源（tritrpticin）、PR-39。Loop 环抗菌肽为细菌素等[28,30]。

1.1.3 抗菌肽的作用机制

科技工作者们就抗菌肽的作用机制开展了一系列的研究，但仍然无法对其进行详细而全面的说明，抗菌肽的活性机制可能因肽的种类、结构和目标微生物的不同而有所不同，目前研究中关于抗菌肽作用机制较为普遍接受的几种模式有：

1.1.3.1 抗菌肽与细胞膜的作用机制

此类机制强调抗菌肽通过物理的手段破坏细胞膜，其中最受关注的是以下三

种模型：

桶壁模型(Barrel-stave model)需要经历初始结合、构象变化、膜内插入、孔道形成、膜破坏五个关键步骤。首先，抗菌肽通过静电相互作用与膜表面的阴离子脂质相结合，这一结合过程是抗菌肽发挥作用的第一个关键步骤，因为它为后续的构象变化和作用机制奠定基础。结合之后，抗菌肽会发生构象变化。这一变化促使抗菌肽寡聚化，从而更好地插入膜的疏水区域。随着越来越多的抗菌肽插入膜内，它们会在膜内组装成孔道，这些孔道类似于桶壁上的木条呈线性排列，因而被称为桶壁模型。抗菌肽豹鳎毒素（pardaxin）便是借助这种模型发挥作用的典型例子[31]。桶壁模型的形成意味着细菌细胞膜的完整性受到破坏，为抗菌肽进一步发挥作用创造条件。地毯模型（Carpet model）是在感染过程中，抗菌肽通过与膜表面的酸性脂质区域结合，地毯式地覆盖在膜上，当抗菌肽达到临界浓度时，它们会在膜上形成暂时的孔洞，导致膜被局部破坏。这些孔洞的形成会导致细胞膜丧失连贯性，进一步诱发更大孔洞的出现，最终使得细胞内容物外泄、细胞破裂与消亡。Cecropin 作为一种具有代表性的抗菌肽，其作用机制正是基于这种地毯模型[32]。环形孔模型（Toroidal pore model）需要经历初始吸附、结构转变、膜弯曲、细胞内容物泄漏与细胞死亡五个动态过程。首先抗菌肽通过静电相互作用吸附到膜上会刺激抗菌肽结构发生改变，与此同时在膜表面聚集并引起膜的局部弯曲，从而形成跨膜通道，最终导致内容物泄漏与细胞死亡。值得一提的是，部分抗菌肽，如桂皮素 2（Magainin2），展现出典型的环形孔结构。它们借助此模型发挥其强大的抗菌作用，有效地杀死细菌和其他微生物[33-37]。这三种模型均通过物理方式动态破坏膜，然而各自侧重于不同的相互作用和膜破裂过程。这些模型有助于科研人员深入剖析抗菌肽的抗菌机制，并指导新型抗菌剂的设计。

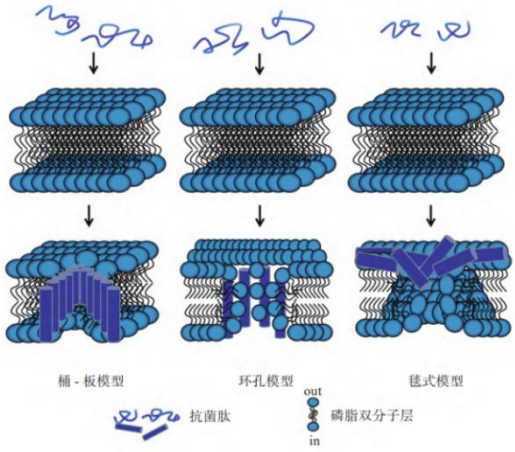

图 1.1 抗菌肽与细胞膜相互作用的示意图[38]。

Fig. 1.1 Schematic diagram of the interaction between antimicrobial peptides and cell membranes [38].

1.1.3.2 抗菌肽与细胞壁的作用机制

细胞壁，作为细胞的基本构造支柱，承担着支持与防护细胞的双重职责。抗菌肽则通过其独特的机制，对细胞壁产生作用。一方面，它通过干预细胞壁的正常合成过程，打破其原有的平衡状态；另一方面，它还能破坏细胞壁的结构完整性，从而发挥其独特的生物学活性。具体来说，抗菌肽与细胞壁合成前体脂质 II 结合以阻止随后的酶促反应，最终抑制肽聚糖的形成[39]；抗菌肽通过抑制磷壁酸的合成来阻碍细胞壁的形成[40]；部分抗菌肽通过释放自溶素来破坏细胞壁[37]。

1.1.3.3 抗菌肽与细胞质内靶目标的作用机制

抗菌肽不仅可以与细胞壁、细胞膜发生相互作用，其也可以通过渗透等方式进入细胞，进而靶向细胞内的结构与物质[41]。主要体现在以下几个方面：抗菌肽穿过细胞膜，进入细胞内部并与核酸（DNA 或 RNA）结合，破坏其结构，从而干扰微生物的基因表达与蛋白质合成；抗菌肽通过干扰细胞内核酸和蛋白质的合成代谢途径中酶的活性，抑制核酸与蛋白质合成；抗菌肽干扰蛋白质的正确折叠和组装等[37,42]。

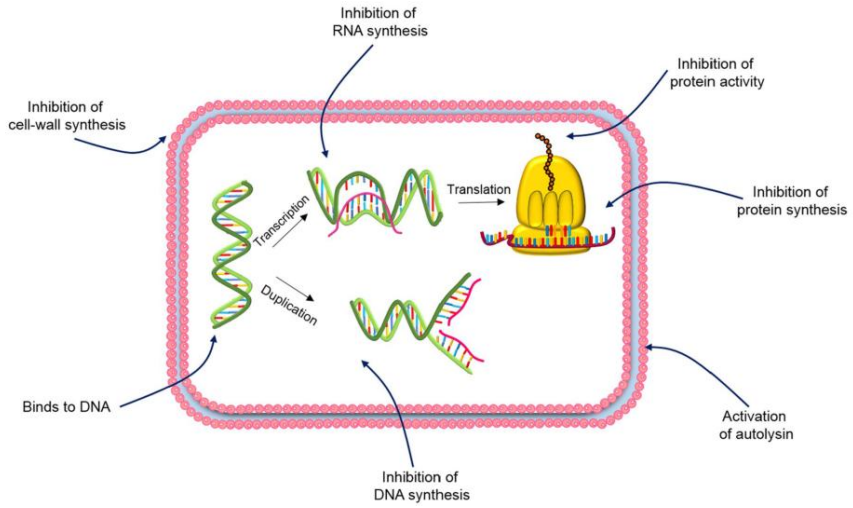

图 1.2 抗菌肽的非膜靶向作用机制[43]。

Fig. 1.2 Non-membrane targeting mechanism of antimicrobial peptides[43].

1.2 抗癌肽

1.2.1 癌症概述

正常细胞生长与分化失去控制而引发的癌症是影响全球生命健康的主要威胁，其中，肺癌最为常见，紧随其后的是结直肠癌、前列腺癌和乳腺癌[44]。它们具有较高的发病率与死亡率，仅次于心血管疾病[45,46]。全球癌症统计报告显示，截止到 2020 年全球大概有 1930 万癌症病例，1000 万死亡病例[47]。尽管医学研究取得了显著进步，但是癌症治疗依然是一个巨大的医学挑战。预计至 2030 年，全球癌症死亡人数将攀升至 1300 万,这是一个令人担忧的趋势[48]。为了应对癌症带来的伤害，全球科学家、医疗工作者一直在积极探索和研发更有效的治疗策略以提高癌症患者的生存率。化学治疗是一种通过使用单一或多种化学药物来干扰肿瘤细胞生长和分裂的治疗方法，然而，大多数化疗药物具有非特异性，这意味着它们在随血液循环分布到达全身各处时，除了能杀死癌症细胞，还对正常细胞和组织具有毒性[49]。除此以外，化疗药物还具有溶解性较差、循环半衰期短、潜在耐药性等特点，这些特性使得化疗药物在治疗过程中会产生强烈的副作用，进一步限制了其治疗效果和临床应用[50]。为了克服这些问题，科研工作者将目光投向了新型抗肿瘤药物的研究与开发，以及药物抗肿瘤作用模式的革新。此举不仅能够解决化疗药物在安全性、疗效、耐药性和预后性等方面的难题，还有助于实现彻底治愈肿瘤的目标。这是一项至关重要的课题，也是科研工作者所面临的严峻挑战。

1.2.2 抗癌肽的优势与应用

近几年，单克隆抗体、蛋白质和多肽等药物凭借其独特的生物选择性而成为癌症治疗领域中的核心研究对象[51,52]。相较于传统化疗药物，抗癌多肽类药物展现出明显的优越性：其分子量较小，从而简化了合成与修饰过程，有效提高了药物在体内的稳定性；展现出强烈的靶向性，多样化的给药途径；在保持显著疗效的同时，其副作用相对较小[53]。经过科学研究和严格审批，截至目前，已有若干多肽类药物顺利进入癌症治疗的临床试验阶段，更值得一提的是，其中部分药物如杆菌肽（Bacitracin）、硫酸粘菌素（Colistin sulphate）已成功通过审批，获得了上市资格，为癌症治疗领域带来了新的希望与突破[54-55]。

癌细胞膜由于磷脂转运机制失调使得带负电荷的磷脂酰丝氨酸（PS）和磷脂酰乙醇胺（PE）由原来细胞膜内层转向细胞膜的外层，导致癌细胞膜的电负性增加。因此，癌细胞膜与细菌膜具有相似且较高的电负性，同时，其电负性也比正常细胞膜高，这也就意味着癌细胞膜也可以凭借静电相互作用成为抗菌肽的

潜在靶点[56,58]。已经有科研工作者就抗菌肽作为潜在的癌症治疗药物进行了研究。Dan Hou 等人评估了普洛菌素家族阳离子抗菌肽 NRC-03 在 CAL-27 和 SCC-9 两种口腔鳞状细胞癌（OSCC）中的细胞毒性、细胞凋亡和 DNA 损伤潜力，结果表明，NRC-03 能够快速内化到 OSCC 细胞，并与线粒体和细胞核结合，导致细胞膜起泡、线粒体肿胀和 DNA 断裂[59]。Dongying Wang 等研究人员深入探索了基于蜂毒肽合成的新型抗癌肽 UM-6 在宫颈癌细胞系（Caski 和 Hela）中的抗增殖和抗迁移作用，研究结果显示，UM-6 通过诱导自噬和凋亡，以及激活 Hippo-YAP 信号转导途径，有效抑制了宫颈癌细胞的增殖和转移。这一发现表明 UM-6 具有作为新型抗癌药物的巨大潜力[60]。除此以外，研究人员还发现部分抗癌肽在肺癌[61,62]、前列腺癌症细胞系[63]、乳腺癌[61,64,65]、肝癌[66,67]等癌症治疗中显示出很强的细胞毒性。

1.3 肽的异源表达

肽的异源表达是指其可以在非原生宿主系统中作为融合肽进行表达。该表达技术是优化肽产量、解决产量瓶颈问题有效途径，根据表达宿主的差异，可分为真核表达系统与原核表达系统，主要包括大肠杆菌表达系统和酵母菌表达系统，二者占所有异源表达系统的 97.4%，因此，这两种表达系统成为科研工作者最先考虑的肽生产系统[68,69]。相比于真核表达系统，原核表达系统速度快，培养基简单且成本较低。

根据相关报道，30%以上的重组蛋白质药物和 50%以上重组蛋白质是利用大肠杆菌进行表达的[70]。大肠杆菌作为肽常用的表达宿主，具备诸多优势，如生长迅速、易于操作、成本较低、有大量的商业表达载体、表达量较高、周期较短、适用于大规模生产等[70]。尽管大肠杆菌表达系统具有众多优势，但也存在一定的局限性：大肠杆菌表达系统不具备真核表达系统某些关键的翻译后修饰—磷酸化、糖基化及二硫键的氧化，这是蛋白质功能所必需的修饰；缺乏真核表达系统中的分子伴侣，导致融合蛋白无法正确折叠，影响其结构与功能[72]。

二硫键在活性蛋白质的合成和功能中起着至关重要的作用，其是由两个半胱氨酸中的巯基经氧化反应而形成的共价键，因此氧化型环境是二硫键形成的必要条件。在许多生命体中，二硫键的形成和异构化过程也都是在能够为其提供电子转移蛋白、氧化还原酶以及辅因子的氧化空间中自发进行。大肠杆菌周质空间就是一种二硫键形成的典型场所，在这个环境中，大肠杆菌中的 DsbA-DsbB 对和 DsbC-DsbD 对在形成和异构化二硫键中扮演着关键角色，DsbA 催化蛋白质中二

硫键的形成，DsbB 通过跨膜结构将电子传递给呼吸链，DsbC 和 DsbD 将异构化错误形成的二硫键。然而，在周质中表达融合蛋白质时可能会遇到一些问题，如产量低、缺乏 ATP 导致的折叠效率低下和蛋白质稳定性差等。这些问题在一定程度上影响了融合蛋白质的研究和应用。

为了避免这些问题，细胞质被认为是更适合高产蛋白质表达的区室。然而，由于大肠杆菌细胞质中存在多种还原系统，谷胱甘肽还原酶（gor）和硫氧还蛋白还原酶（trxB）系统被认为是最主要的一种还原系统，这会阻碍富含二硫键蛋白质的表达[73]。为了解决这一问题，科研人员一直在寻找方法来克服这种阻碍，使大肠杆菌能够高效地表达富含二硫键的蛋白质。常用的策略主要有以下两种。(1)选择商业菌株，比如来自 Novagen 公司的 *origami* 或 *rosetta gami* 菌株或 *SHuffle*，这些菌株细胞质中的两种二硫键还原途径均遭受损坏，使得这些菌株的细胞质得以表达通常在周质空间存在的二硫键异构酶蛋白 DsbC，进而解决细胞质中不利的氧化还原电位问题，此特性有助于确保二硫键的正确生成。SARS-CoV-2 Omicron BA.5 变体的受体结合域（RBD）由八个半胱氨酸残基形成四个二硫键，为了正确配对二硫键，Rawiwan Wongnak 等研究人员选择经过基因工程改造的 *E. coli T7 SHuffle* 菌株，在高通气条件下和 16 °C 的低温环境下表达 RBD，以促进二硫键的形成和非天然二硫键的重排，他们成功实现了在 *E. coli* 中生产具有正确二硫键配对的 RBD。尤为重要的是，通过原核表达的 RBD 表现出与天然 RGD 相似的生物化学和生物物理特性[74-77]。(2)在大肠杆菌细胞质中引入来自酿酒酵母线粒体的巯基氧化酶 Erv1p 与二硫键异构酶，以建立一种高效的系统来表达富含二硫键的蛋白质[74]。Daniel S. Yu 等研究者在 SHuffle 大肠杆菌中采用 CyDisCo 系统共表达蛋白二硫键异构酶 PDI 和硫醇氧化酶 Erv1p 来进一步提升氧化途径的效能。借助这种共表达策略，CyDisCo 系统能够在 *SHuffle* 大肠杆菌中成功促进含有二硫键的蛋白质正确折叠和生成[76]。据此，研究人员可以成功地在大肠杆菌中制备出具有正确二硫键配对的蛋白质。

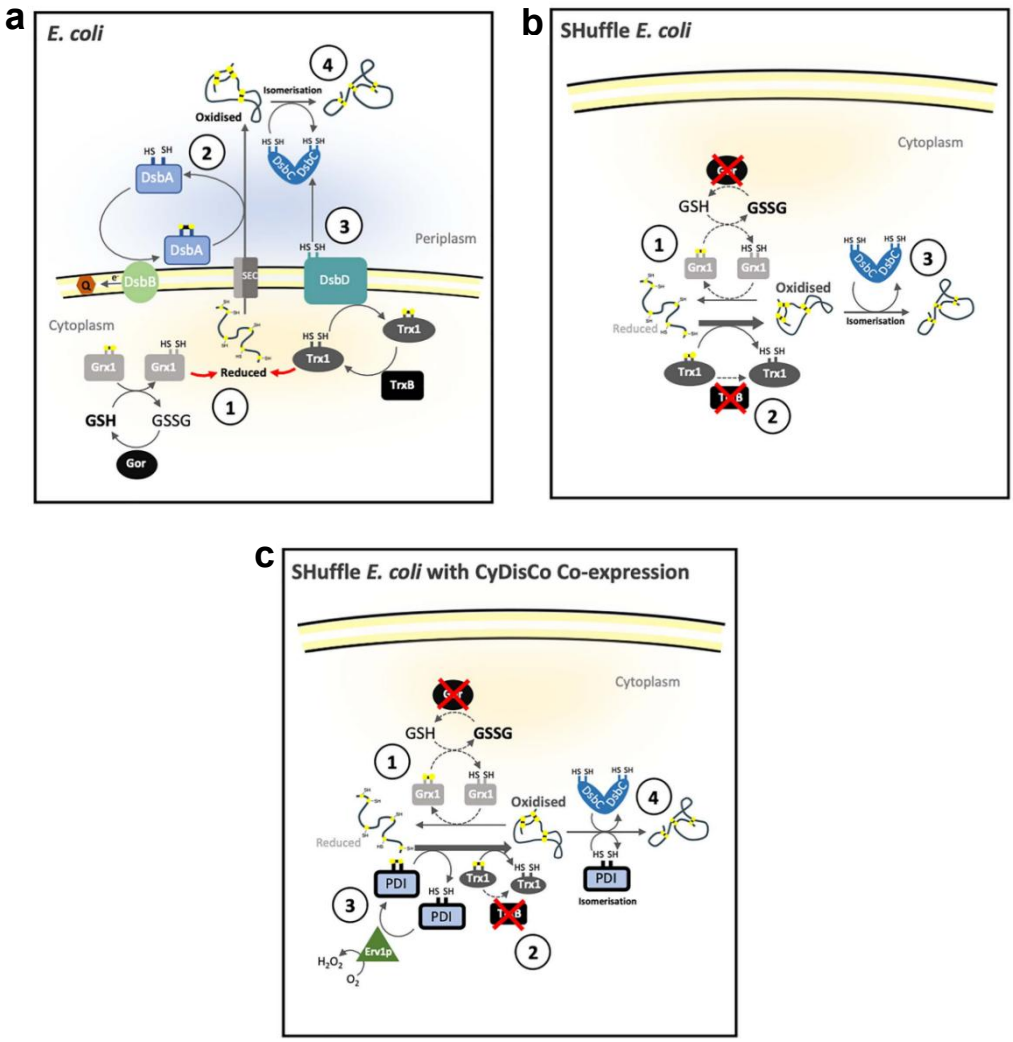

图 1.3 大肠杆菌表达系统中二硫键的形成。（a）蛋白质在野生型大肠杆菌中的表达。（b）经过基因工程改造的 *SHuffle* 大肠杆菌，其细胞质环境由还原型转变成氧化型[78]。（c）在 *SHuffle* 大肠杆菌中利用 CyDisCo 系统共表达蛋白二硫键异构酶 PDI 和硫醇氧化酶 Erv1p 来进一步增强氧化途径[76]。

Fig. 1.3 Formation of disulfide bonds in *E. coli* expression system. (a) Protein expression in wild-type *E. coli*. (b) The cytoplasmic environment of genetically engineered E. coli *SHuffle* was changed from reduced to oxidized type [78]. (c) In E. coli *SHuffle*, co-expression of protein disulfide isomerase PDI and mercaptan oxidase Erv1p by CyDisCo system was used to further enhance the oxidation pathway [76].

1.4 SPRR2A 简介

研究报道，小蛋白 2A(SPRR2A)是一种富含脯氨酸及和二硫键的肠道杀菌蛋白，其产生主要受到肠道微生物群的刺激。值得注意的是，这种小蛋白在人类肠

道中同样表达，其位置主要集中于杯状细胞。在低盐浓度和酸性条件下，SPRR2A 能够与带负电的细菌细胞膜发生静电相互作用，实现对革兰氏阳性细菌的选择性杀消灭，若 SPRR2A 缺失，将会导致革兰氏阳性细菌在小肠管腔和黏液层中的增殖[79]。这一发现为抗菌药物的研究提供了新思路。该研究通过 Sf9 细胞真核表达获得 SPRR2A，并且证实：在不支持二硫键形成的 *E. coli* BL21(DE3)中表达纯化获得的 SPRR2A 不具有抗菌活性，所以二硫键对于其抗菌活性至关重要。以期在降低成本和提高效率的同时，探索更为简便的表达方法。

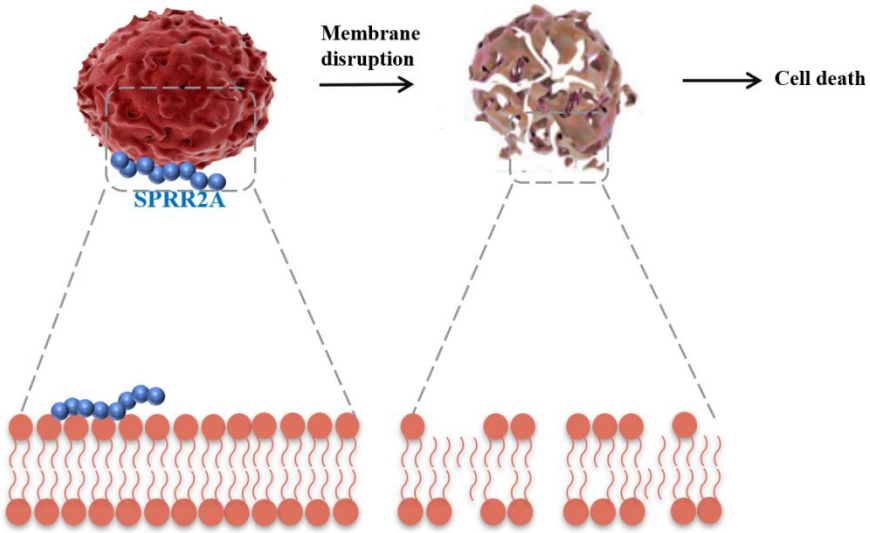

图 1.4 SPRR2A 的膜靶向作用机制。

Fig. 1.4 Membrane targeting mechanism of SPRR2A.

1.5 研究目的及意义

基于以上研究背景，本研究尝试通过原核表达系统实现含有二硫键的 SPRR2A 的异源表达。为了确保二硫键的顺利形成，本研究选用氧化型突变大肠杆菌菌株 Rosetta-gami (DE3) pLysS 作为表达宿主，并对获得的 SPRR2A 的抗菌活性和抗肿瘤活性进行初步研究。本研究可为富含二硫键蛋白的原核表达提供参考，并可为新型抗菌和抗肿瘤药物的研发提供新思路。

2 SPRR2A 的制备

2.1 实验材料与仪器

2.1.1 实验试剂与材料

SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒与 PCR 产物纯化试剂盒、氯霉素购自生工生物工程（上海）股份有限公司；DNA Marker（100~8000 bp）与 Protein Marker（10~150 kDa/14~120 kDa/10~250 kDa）购自全式金生物技术有限公司；2-（N-吗啡啉）乙磺酸（MES）购自索莱宝科技有限公司；咪唑购自源叶生物科技有限公司；三羟甲基氨基甲烷（Tris）购自 biosharp；镍层析介质购自博奥龙免疫技术有限公司。

2.1.2 主要试剂配制方法

试剂	配方	
10mM MES 缓冲液（pH 5.5）	MES	0.46g
	NaCl	0.29g
	去离子水	200 mL
20 mM Tris 缓冲液	NaCl	2.42 g
	Tris	4.84 g
	去离子水	1 L
5×Tris-Gly 电泳缓冲液	SDS	5 g
	Tris	15.1 g
	甘氨酸	94 g
	去离子水	1 L
5×Loading buffer	溴酚蓝	25 mg
	SDS	0.5 g
	2-巯基乙醇	125 μL
	甘油	2.5 mL
	去离子水定容至 5 mL	

2.1.3 实验仪器

仪器设备	型号	产家
恒温金属浴	DH300	杭州瑞诚仪器有限公司
圆二色谱仪	SW-CJ-IFD	苏净安泰
超声破碎机	Q500	Qsonica
PCR 仪	T100	Bio-Rad
pH 计	HI2223	北京哈纳沃德仪器有限公司
酶标仪	ELx800	BioTek
核酸定量仪 NanoDrop	NanoDrop One	Thermo Fisher Scientific

2.2 实验方法

2.2.1 构建 pET32a-*SPRR2A* 重组质粒

2.2.1.1 设计用于扩增 *SPRR2A* 基因的引物

针对 *SPRR2A* 片段，制定 PCR 扩增引物设计方案（见表 2.1）。

表 2.1 扩增 *SPRR2A* 基因的引物序列

Tab. 2.1 The primer sequences for amplification of *SPRR2A* gene

Name	Primer sequences (5'→3')	Length (bp)
SPRR2A-F	CTCGACGCTAACCTGGCCATGTCTTA CCAGCAGCAG	36
SPRR2A-R	GTGGTGGTGGTGCTCGAGTTTAGATT TCGGCGGGTA	36

2.2.1.2 高效扩增与纯化目的基因 *SPRR2A*

利用 pUC-57-*SPRR2A* 载体作为模板，通过 PCR 技术扩增四组目标基因，即 *SPRR2A*。每一组 PCR 反应均在 50 μL 的体系中进行。

（1）PCR 反应体系

试剂	体积
ddH_2O	32.0 μL
5×TransStart FastPfu Fly buffer	10.0 μL
dNTPs	4.0 μL
SPRR2A-F	1.0 μL

SPRR2A-R	1.0 μL
pUC-57-*SPRR2A*	1.0 μL
TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase	1.0 μL
Total	50.0 μL

（2）PCR 反应程序

编号	温度	时间	循环
①	95 °C	2 min	
②	95 °C	20 s	
③	65 °C	20 s	步骤②到④
④	72 °C	30 s	循环 30 次
⑤	72 °C	5 min	
⑥	4 °C	~	

（3）模板消化

为了消化 DNA 模板链，向每个 PCR 产物管中添加 1 μL Dpn 1，且按照适当比例加入 10×buffer，随后，37 °C 反应 2 h，以确保消化过程完全。

（4）PCR 产物的提纯

①向 PCR 反应液中以 1:5 的体积比加入 Buffer B3 且吹吸混匀；

②将混合物注入吸附柱，9000 rpm 离心 30 s，移除收集管内的液体；

③在吸附柱中注入 500 μL 的 Wash solution，然后用 9000 rpm 的速度离心 30 s，最后把管里的液体弃去；

④再次执行步骤③；

⑤经过 8000 rpm 的离心处理 1 min 后，更换收集管，向吸附膜中央滴加 35 μL Elution Buffer，静置 2 min 后于离心机以 12000 rpm 离心 1 min 以达到纯化 PCR 产物的目的。

2.2.1.3 线性化扩增 pET32a 载体的引物设计

采用 PCR 的技术对 pET32a 载体进行线性化扩增，并为其设计引物。（见表 2.2）。

表 2.2 扩增 pET32a 载体的引物序列

Tab. 2.2 The primer sequences for amplification of pET32a cloning vector

Name	Primer sequences (5'→3')	Length (bp)
pET32a-F	CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAG	28
pET32a-R	GGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACTCTTTC	28

2.2.1.4 载体 pET32a 的线性化扩增

以 pET32a 为模板，终体系为 50 μL，通过 PCR 技术分别扩增得到四组线性化载体。

（1）PCR 反应体系

试剂	体积
ddH_2O	32.0 μL
5×TransStart FastPfu Fly buffer	10.0 μL
dNTPs	4.0 μL
pET32a-F	1.0 μL
pET32a-R	1.0 μL
pET32a	1.0 μL
TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase	1.0 μL
Total	50.0 μL

（2）PCR 反应程序

编号	温度	时间	循环
①	95 °C	2 min	
②	95 °C	20 s	
③	60 °C	20 s	步骤②到④
④	72 °C	1 min	循环 30 次
⑤	72 °C	5 min	
⑥	4 °C	~	

（3）模板消化与 PCR 产物纯化

使用 Dpn 1 消化模板，步骤同 2.2.1.2（3）。

（4）PCR 产物纯化

使用试剂盒回收 DNA 片段，步骤同 2.2.1.2（4）。

2.2.1.5 利用无缝克隆构建 pET32a-*SPRR2A* 重组质粒

（1）无缝克隆反应体系

试剂	体积
2×Seamless cloning Master Mix	10.0 μL
Sterlized ddH_2O	8.9 μL
线性化 pET32a 产物	0.9 μL
SPRR2A	0.2 μL
Total	20.0 μL

（2）无缝克隆反应条件

根据既定体系，将各类试剂加入已灭菌的 1.5 mL 离心管中，并确保充分混合均匀，随后，将离心管放入预先设定为 50 ℃的恒温水浴锅中，维持反应时长 20 min。反应结束后，立即将离心管转移到冰上进行冷却，以便进行转化步骤。

2.2.1.6 pET32a-*SPRR2A* 重组反应产物转化至 *E.coli* DH5α

将 pET32a-*SPRR2A* 序列的重组反应产物转化至 *E.coli* DH5α感受态细胞中，以实现质粒的克隆：

（1）将预先在-80 °C 条件下储存的 *E.coli* DH5α感受态细胞取出，并放置在冰上缓慢融化；

（2）将 50 μL 感受态细胞与 10 μL 预冷的重组反应产物轻柔混合均匀，随后将混合物置于冰上静置 30 min；

（3）将待处理的混合物缓慢而谨慎地转移至预先设定为 42 °C 的恒温水浴锅中，待其经历 45 秒的热激时间后，迅速转移至冰上，静置 2 min；

（4）在超净工作台中，取 600 μL 未添加抗性的 LB 培养基，并将其转移至（3）中，随后在 37 °C 恒温摇床中震荡 1 h，转速设置为 210 rpm；

（5）复苏后的菌液以 4000 rpm 离心 2 min，弃 400 μL 上清液，然后将剩余上清与菌体沉淀混匀后均匀涂布于含有 100 ng/μL Amp 的 LB 固体培养基表面，随后将其放入恒温培养箱中，在 37 °C 的条件下进行过夜培养。

2.2.1.7 阳性克隆的鉴定

（1）在平板上随机挑选 10 个单克隆菌落，用牙签小心挑取后，分别加入 20 μL LB 培养基中并充分混合，随后，从每个混合液中取出 1 μL，加入菌落 PCR 的反应体系中，以检测目的基因 *SPRR2A* 是否已成功无缝克隆；

（2）通过琼脂糖凝胶电泳检测菌落 PCR 产物的条带是否正确。

（3）选取琼脂糖凝胶电泳检测中最亮条带对应的菌液，并将其接种到含有 10 mL LB 培养基的试管中，于 37 °C 过夜培养。

（4）提取 pET32a-*SPRR2A* 重组质粒。

（5）以 pET32a-*SPRR2A* 为模板，利用通用引物与特异性引物进行 PCR 双重鉴定。

（6）确定无误后将 pET32a-*SPRR2A* 重组质粒送往 Sangon Biotech 公司测序。

A. PCR 反应体系（通用引物）

试剂	体积
ddH_2O	32.0 μL
5×PCR buffer	10.0 μL
dNTPs	4.0 μL
DNA template	1.0 μL
T_7 Terminator Primer	1.0 μL
T_7 Primer	1.0 μL
EasyPfu DNA Polymerase	1.0 μL
Total	50.0 μL

B. PCR 反应程序（通用引物）

编号	温度	时间	循环
①	95 °C	2 min	
②	95 °C	20 s	
③	50 °C	20 s	步骤②到④
④	72 °C	30 s	循环 30 次
⑤	72 °C	5 min	
⑥	4 °C	~	

C. PCR 反应体系（特异性引物）

试剂	体积
ddH_2O	32.0 μL
5×PCR buffer	10.0μL
dNTPs	4.0 μL
DNA template	1.0 μL

SPRR2A-F	1.0 μL
SPRR2A-R	1.0 μL
EasyPfu DNA Polymerase	1.0 μL
Total	50.0 μL

D. PCR 反应程序（特异性引物）

编号	温度	时间	循环
①	95 °C	2 min	
②	95 °C	20 s	
③	65 °C	20 s	步骤②到④
④	72 °C	30 s	循环 30 次
⑤	72 °C	5 min	
⑥	4 °C	~	

2.2.2 Trx-SPRR2A 蛋白异源表达

在确定测序结果无误后，将 pET32a-*SPRR2A* 重组质粒按照 2.2.1.6 中的转化步骤转化至 Rosetta-gami (DE3) pLysS 感受态细胞中，这一操作旨在构建具有异源表达 Trx-SPRR2A 能力的工程菌，以满足后续实验需求。

（1）从过夜培养 Rosetta-gami (DE3) pLysS 的 LB 固体培养基中挑取单菌落于 2 支 5 mL LB 培养基试管中（含 100 ng/μL Amp 与 CAP），编号为①-②；在 1 支含 5 mL LB 液体培养液（含 100 ng/μL Amp）中接种含重组质粒 pET-32a 的 Rosetta-gami (DE3) pLysS，编号为③，三支试管置于恒温台式摇床中培养 8 h，温度设置为 37 °C，转速为 210 rpm；

（2）将培养后的菌液分别接种于 3 瓶 0.4 L 的 LB 液体培养基中进行扩大培养，编号分别为④-⑥温度设置为 37 °C，转速为 220 rpm；

（3）当 OD_{600} 接近 1.0 时，④与⑥各加入 200 μL 的 IPTG（终浓度为 0.5 mM），随后三瓶菌液培养 12 h，温度设置为 16 °C，转速为 180 rpm；

（4）将经过培养后的菌液分别于大型离心机以 8000 rpm 离心 15 min，随后，去除上清液，收集菌体沉淀并进行称重；

（5）分别将经过称重后的菌体沉淀以 1:12（W/V）的比例与 20 mM Tris 缓冲液混合，制备成均匀的悬浮液。随后，采用超声破碎技术以 40%的功率对菌体进行破碎处理，直至菌体变得透亮，在此过程中，以工作 4 s、间歇 6 s 的模式运

行；

（6）分别取超声破碎后的 40 μL 菌液做样，剩余部分于 4 °C、12000 rpm 离心 40 min 后，取 40 μL 上清液做样，沉淀由 20 mM Tris 缓冲液以 1:12（W/V）的比例重悬制成样品。

（7）将含有质粒 pET-32a 且经过诱导处理的上清液、未加 IPTG 诱导剂含重组质粒的上清液、加 IPTG 诱导剂含重组质粒的全菌、上清液以及沉淀样品通过 SDS-PAGE 检测，以比较不同情况下 Trx-SPRR2A 的表达水平。

2.2.3 Trx-SPRR2A 蛋白的纯化

2.2.3.1 蛋白纯化条件摸索

（1）用 40 mL 的 100 mM $NiSO_4$ 将镍离子进行三次重复的挂柱操作；

（2）用 40 mL 的 20 mM Tris 缓冲液对镍柱进行平衡处理；

（3）将经过超声破碎和离心处理后的蛋白上清液进行两次重复的挂柱操作；

（4）用 2 倍柱体积的 20 mM Tris 缓冲液过柱去除样品中的杂蛋白；

（5）探究目的蛋白的洗脱条件；使用不同浓度的咪唑溶液来收集蛋白，具体来说，使用 20、40、60、80、100、150、200 和 300 mM 的咪唑溶液，且每种浓度使用 8 mL，以确保有效地从各阶段中分离和收集目标蛋白；

（6）将收集的蛋白液与 5×Loading buffer 以 1：4 的比例混合，在振荡器上振荡均匀并在 100 °C 金属浴中煮沸 6 min 以制备样品，最后通过 SDS-PAGE 观察洗杂效果；

（7）利用 40 mL EDTA（pH 8.0）与镍柱上的镍以及蛋白发生化学反应，进而达到去镍与残存蛋白的目的；

（8）用 200 mL 去离子水冲洗柱材料；

（9）通过 20 mL 的 100 mM $NiSO_4$ 再镀镍，封柱。

2.2.3.2 Trx-SPRR2A 蛋白纯化

（1）使用 30 mL 的 100 mM $NiSO_4$ 将镍离子填充到层析柱中；

（2）用 40 mL 的 20 mM Tris 缓冲液对镍柱进行平衡处理；

（3）将经过超声破碎和离心处理后的蛋白上清液进行两次重复的挂柱操作；

（4）用 2 倍柱体积的 20 mM Tris 缓冲液过柱去除样品中的杂蛋白；

（5）用 200 mL 的 50 mM 咪唑溶液通过层析柱，以进一步去除杂蛋白；

（6）用 40 mL 的 200 mM 咪唑溶液通过层析柱进行洗脱，以收集目标蛋白

Trx-SPRR2A；

（7）利用 40 mL 的 40 mL EDTA（pH 8.0）与镍柱上的镍以及蛋白发生化学反应，进而达到去镍与残存蛋白的目的；

（8）用 200 mL 去离子水冲洗柱材料；

（9）通过 20 mL 的 100 mM $NiSO_4$ 再镀镍，封柱；

（10）将洗脱后的 Trx-SPRR2A 通过超滤离心管除盐浓缩，以溶解于 MES 缓冲液中，随后用 0.22 μM 的滤器除菌并用 BCA 法测定 Trx-SPRR2A 的浓度。

2.2.4 Trx-SPRR2A 的 SDS-PAGE 鉴定

（1）将纯化后的 Trx-SPRR2A 蛋白样品与 5×Loading buffer 以 1：4 的比例混合，在震荡器上震荡均匀，混合好的样品在 100 °C 金属浴中煮沸 6 min；

（2）蛋白 Marker 和煮沸过的样品上样于预先准备好的 SDS-PAGE 蛋白胶上样孔中（15%的分离胶和 5%的浓缩胶），样品于浓缩胶中时电泳仪以 60 V 运行，溴酚蓝指示剂显示蛋白样品已经到达分离胶时，以恒定的 120 V 继续电泳，溴酚蓝迁移至距离前沿 1～2 cm 的位置后停止电泳；

（3）电泳结束后，将凝胶置于考马斯亮蓝染色液中，进行 2 小时的染色处理。随后，将染色液去除；使用蒸馏水把凝胶表面清洗几次，随后加入脱色液并不定时更换脱色液，直至蛋白质条带清晰可见；

（4）利用凝胶扫描仪观察与扫描，使用 Image J 图像处理软件分析 Trx-SPRR2A 蛋白的纯度。

2.2.5 Trx-SPRR2A 的质谱鉴定

将考马斯亮蓝染色的纯化 Trx-SPRR2A 条带切割下来置于 EP 管中，寄往 Sangon Biotech 公司利用高质量、高灵敏度、精确度和高分辨率的基质辅助激光解析离子化串联飞行时间质谱仪（MALDI-TOF/TOF）进行质谱分析。

2.2.6 圆二色谱分析

2.2.6.1 Trx-SPRR2A 的二级结构检测

（1）经过纯化处理的 Trx-SPRR2A，通过超滤离心管进行除盐与浓缩操作。

（2）利用圆二色谱（Circular Dichroism, CD）对 Trx-SPRR2A 进行分析，选取 0.05 cm 光程的比色皿，于 25 °C，1 nm/s 的速度下在波长为 195~260 nm 的区

间内扫描；

（3）以 5 mM PB 缓冲液（pH 7.4）与 10 mM MES 缓冲液（pH 5.5）为基线，扫描 Trx-SPRR2A 的 CD 光谱；

（4）根据 CD 光谱数据，利用 CDNN 软件分析 Trx-SPRR2A 的二级结构类型与含量。

2.2.6.2 Trx-SPRR2A 的热稳定性分析

（1）用 10 kD 的超滤离心管对纯化后的 Trx-SPRR2A 进行除盐浓缩处理，分别置换到 PB 缓冲液（pH 7.4）以及 MES 缓冲液（pH 5.5），蛋白终浓度均为 15 μM；

（2）在 25~95 °C 的范围内通过圆二色谱仪以每上升 5 °C 扫描一次的频率采集 Trx-SPRR2A 的 CD 光谱，圆二色谱仪的加热速率为 2 °C /min；

（3）根据 CD 光谱数据，绘制 Trx-SPRR2A 的温度变化曲线。

2.2.7 Trx-SPRR2A 蛋白的二硫键鉴定

（1）收集经纯化、除盐、浓缩最后置换到 10 mM MES 缓冲液的 Trx-SPRR2A；

（2）寄往 Sangon Biotech 公司进行蛋白质二硫键配对分析。

2.2.8 Trx-SPRR2A 的血清稳定性检测

（1）经过纯化处理的 Trx-SPRR2A，通过超滤离心管（10 kD）进行除盐与浓缩操作。随后，将其置换至 20 mM Tris 缓冲液中；

（2）将 Trx-SPRR2A 按照 20 μM 的终浓度，分别添加到 pH 值为 6.5 和 7.4 的细胞培养液中，这两种培养液均含有 10%的胎牛血清；

（3）将其放置在 CO_2 细胞培养箱中，严格控制孵育温度为 37 °C，并分别在 0、2、6、12、24、48 小时的时间点取出。在每个预定时间点，使用 5×Loading Buffer 制备 SDS-PAGE 蛋白样品，制备好的样品储存于-20 °C，以备后续实验使用；

（4）通过 SDS-PAGE 进行检测。随后，利用 Image J 软件对这些蛋白条带的灰度值进行分析，基于这些分析数据，进一步计算相对强度，该相对强度即为不同孵育时间点的蛋白条带灰度值与 0 h 时条带灰度值的比值。

2.3 结果与分析

2.3.1 重组质粒的构建

2.3.1.1 线性化载体与目的基因的 PCR 扩增

将扩增产物和 DNA Loading 以 1：5 的体积比吹吸均匀后通过 1%琼脂糖凝胶胶进行了电泳，电压设置为 120 V，时间设置为 35 min，最后用核酸成像仪成像分析 PCR 产物的长度。如图 2.1 所示，分别在泳道 1 与泳道 2 的 5000 bp-8000 bp、100 bp-250 bp 之间出现了明显的电泳条带，这和线性化载体 pET32a（5698 bp）与目的基因 *SPRR2A*（216 bp）的理论值相符。由此表明，线性化载体 pET32a 与目的基因 *SPRR2A* 扩增成功。

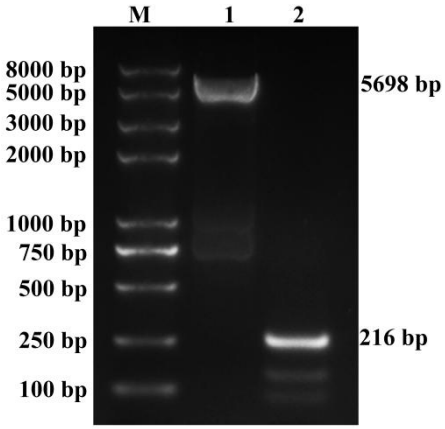

图 2.1 线性化载体 pET32a 与 *SPRR2A* 基因扩增。

Fig. 2.1 Amplification of linearized vector pET32a and *SPRR2A* gene.

2.3.1.2 重组质粒 pET32a-*SPRR2A* 的鉴定与测序验证

利用无缝克隆技术将线性化载体 pET32a 与目的基因 SPRR2A 通过同源序列之间的配对形成闭环以得到重组质粒 pET32a-*SPRR2A*。重组质粒转化至 *E.coli* DH5α，选取琼脂糖凝胶电泳检测中最亮条带相对应的菌液进行重组质粒的提取，然后分别利用通用引物与特异性引物进行 PCR 鉴定。PCR 产物与 6×DNA loading buffer 以 1：5 的体积比混合均匀后上样至核酸胶点样孔，电压设置为 90 V，时间设置为 35 min，最后用核酸成像仪成像分析 PCR 产物的长度。如图 2.2（a）所示，可以观察到泳道 1-4 在 500 bp-750 bp 的范围内均显示出清晰的条带，这些条带的长度与 pET32a-*SPRR2A* 重组质粒中通用引物间片段长度的理论值（721 bp）相吻合。如图 2.2（b）所示，泳道 1-3 均在 100 bp-250 bp 的范围内均呈现出清晰的条带，这些条带的长度与 pET32a-*SPRR2A* 重组质粒中特异性引物间的片段 *SPRR2A* 长度的理论值（216 bp）相吻合。如图 2.2（c）所示，经过测序验证，所得结果与预期的目的基因 *SPRR2A* 的理论序列吻合，由此可确认，我们已

成功构建了重组质粒 pET32a-*SPRR2A*。

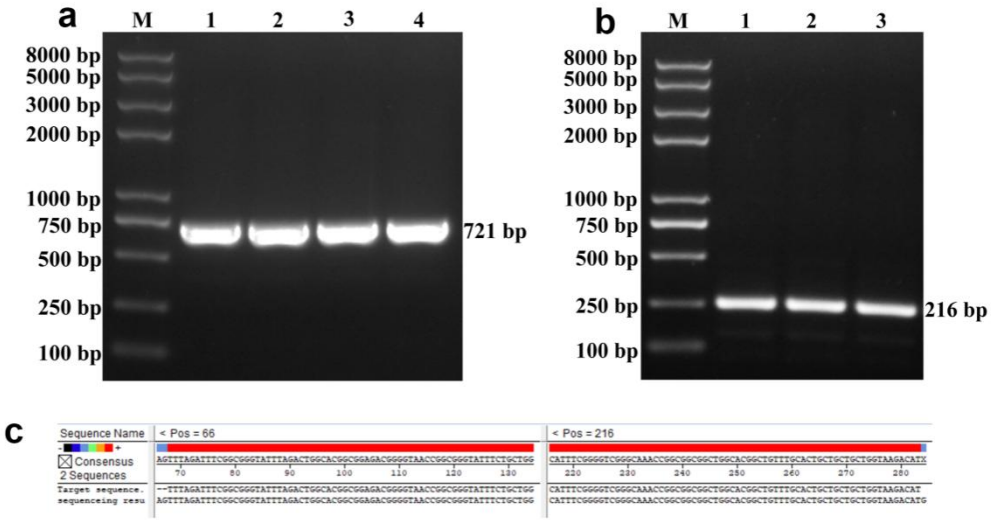

图 2.2 利用通用引物（a）与特异性引物（b）的 PCR 鉴定；（c）为重组质粒 pET32a-*SPRR2A* 的测序结果图。

Fig. 2.2 PCR was used to identify the universal primer (a) and specific primer (b). (c) Sequencing results of recombinant plasmid pET32a-*SPRR2A*.

2.3.2 Trx-SPRR2A 的异源表达

将含有重组质粒 pET32a-*SPRR2A* 的 Rosetta-gami (DE3) pLysS 菌株与含有质粒 pET32a 的 Rosetta-gami (DE3) pLysS 菌株进行扩大培养。当菌体的 OD_{600} 值接近 1.0 时，加入 IPTG 使其诱导表达。将诱导表达且超声破碎后的 Trx-SPRR2A 进行 SDS-PAGE 检测。如图 2.4 所示，泳道 3 在分子量大约为 20 kDa 的区域呈现出特有的目标条带，这与 Trx-SPRR2A 蛋白的预期分子量非常接近。与泳道 1 和 2 相比较，泳道 3 所展现出的这一条带为成功诱导表达提供了确凿证据。泳道 4 目的蛋白条带亮度显著高于泳道 5，表明 Trx-SPRR2A 目标蛋白主要以可溶性形式表达，而非以包涵体形式存在。

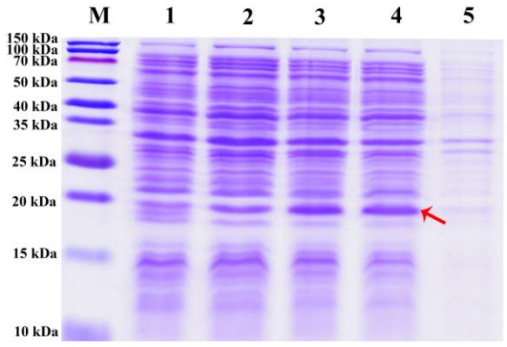

图 2.3 12% SDS-PAGE 分析 Trx-SPRR2A 表达。M 表示分子量范围在 10~150 kDa 的蛋白

Marker；泳道 1 为经过 IPTG 诱导后，含有空质粒 pET32a 的 Rosetta-gami (DE3) pLysS 菌体裂解产生的上清液；泳道 2 呈现的是未经 IPTG 诱导，但含有重组质粒 pET32a-*SPRR2A* 的 Rosetta-gami (DE3) pLysS 菌体裂解后的上清液。泳道 3、4、5 则分别呈现了经过 IPTG 诱导后，含有重组质粒 pET32a-*SPRR2A* 的 Rosetta-gami (DE3) pLysS 菌体裂解液、上清液以及沉淀。

Fig. 2.3 Expression of Trx-SPRR2A analyzed by 12% SDS-PAGE. M represents protein Marker with molecular weight ranging from 10 to 150 kDa. Lane 1 was the supernatant produced by the cleavage of Rosetta-gami (DE3) pLysS containing empty plasmid pET32a after IPTG induction. Lane 2 showed the supernatant of Rosetta-gami (DE3) pLysS, which was not induced by IPTG but contained the recombinant plasmid pET32a-SPRR2A. Lane 3, 4 and 5 showed the lysate, supernatant and precipitation of Rosetta-gami (DE3) pLysS containing the recombinant plasmid pET32a-SPRR2A after IPTG induction, respectively.

2.3.3 Trx-SPRR2A 的纯化

含有 Trx-SPRR2A 的粗蛋白液重复过镍柱两次，然后竞争性洗脱，即先用低浓度的咪唑溶液洗脱杂蛋白与结合力弱的蛋白，然后用合适的咪唑浓度将目的蛋白洗脱下来。为了达到纯化目的，对纯化条件进行了摸索，如图 2.5 所示，在 a 中，用不同浓度的咪唑溶液进行清洗并留样进行 SDS-PAGE 检测，最终确定用含 50 mM 咪唑的 wash buffer 洗杂，而含 200 mM 咪唑的 wash buffer 则用于洗脱目标蛋白。为确保洗脱效果，我们对洗脱下来的目标蛋白进行了保留，并进行 SDS-PAGE 检测。在 b 中，经过纯化处理的 Trx-SPRR2A 于 20-25 kDa 之间呈现出了一条清晰的单一条带，该结果与 Trx-SPRR2A 的理论分子量 21 kDa 相吻合。通过 Image J 对蛋白的纯度进行评估，结果显示 Trx-SPRR2A 的纯度为 94.5%，说明通过镍柱亲和层析技术可以有效地使目标蛋白从复杂的蛋白质混合物中被选择性地分离出来。使用 BCA 法测量蛋白质浓度后，计算得出 Trx-SPRR2A 的产量为 7.18 mg/L，这表明蛋白质的表达和纯化已经达到了相对较高的效率。

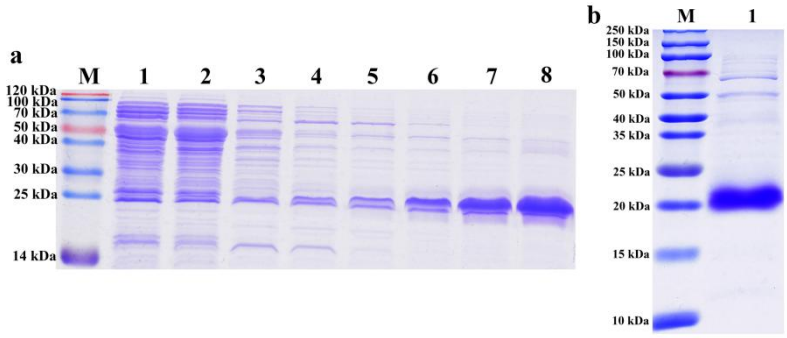

图 2.4 经过镍柱亲和柱层析纯化后，Trx-SPRR2A 的 SDS-PAGE 电泳分析结果。（a）12% SDS-PAGE 检测 Trx-SPRR2A 的纯化摸索。泳道 M 代表 14~120 kDa 的 Marker。泳道 1-8 分别为用 8 mL 含 20 mM、40 mM、60 mM、80 mM、100 mM、150 mM、200 mM、300 mM 的 Wash buffer 洗脱目的蛋白留样。（b）12% SDS-PAGE 检测纯化的 Trx-SPRR2A。泳道 M 代表 10~250 kDa 的 Marker。

Fig. 2.4 SDS-PAGE electrophoretic analysis of Trx-SPRR2A after purification by nickel affinity column chromatography. (a) Purification of Trx-SPRR2A detected by 12% SDS-PAGE. Lane M represents a Marker from 14 to 120 kDa. In lanes 1-8, 8 mL Wash buffer containing 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM was used to elute the target protein samples, respectively. (b) Purified Trx-SPRR2A was detected by 12% SDS-PAGE. Lane M represents a Marker from 10 to 250 kDa.

2.3.4 Trx-SPRR2A 的质谱鉴定

对考马斯亮蓝染色的条带进行质谱鉴定，表 2.3 与图 2.5 的结果显示，Trx-SPRR2A 的序列覆盖率为 89%，分子量为 21547 Da，这与理论值和 SDS-PAGE 的实验数据相一致。说明 Trx-SPRR2A 蛋白成功表达。

表 2.3 Trx-SPRR2A 的质谱鉴定。

Tab. 2.3 MALDI-TOF analysis of Trx-SPRR2A.

Peptides	Position	Observed	Expected	Calculated
SDKIIHLTDDSFDTDVLK	2-19	1031.516	2061.0174	2061.0266
MIAPILDEIADEYQGK	38-53	903.4551	1804.8956	1804.8917
LTVAKLNIDQNPGTAPKYGIR	54-74	568.0736	2268.2653	2268.259
YGIRGIPTLLLFKNGEVAATK	71-91	754.4385	2260.2936	2260.2943
GIPTLLLFKNGEVAATKVGALSK	75-97	776.4612	2326.3618	2326.3624
NGEVAATKVGALSK	84-97	672.8783	1343.742	1343.7409
NGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAMSYQQQQCK	84-118	957.4892	3825.9277	3825.9029
EFLDANLAMSYQQQQCKQPCQPPPVCPTPK	102-131	1187.2153	3558.6242	3558.604

CPEPCPPPKCPEPCPPPK	132-149	1072.4774	2142.9403	2142.9359
CPEPCPPPKCPQPCPPQQCQQK	141-162	906.7294	2717.1663	2717.1641
CPQPCPPQQCQQKYPPVTPSPPCQSK	150-175	1032.7991	3095.3754	3095.3609
YPPVTPSPPCQSKYPPK	163-179	971.991	1941.9675	1941.9659
SKLEHHHHHH	180-189	649.8146	1297.6146	1297.6177

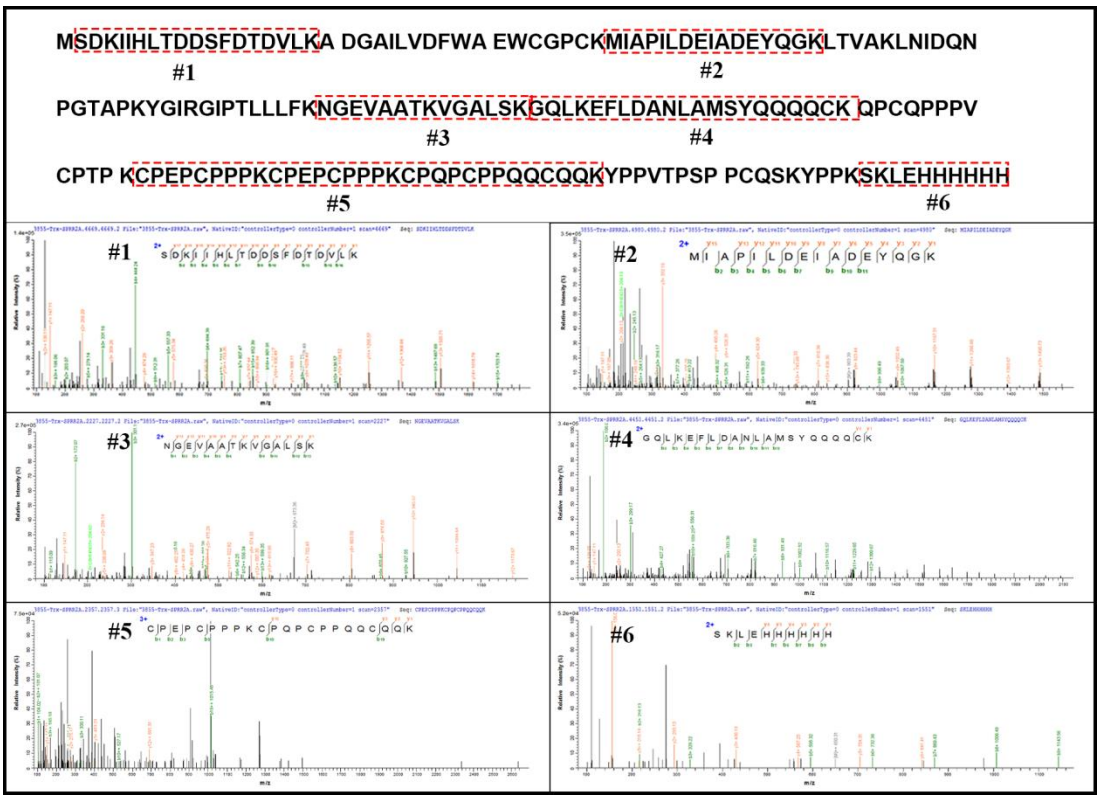

图 2.5 Trx-SPRR2A 的二级质谱图。

Fig. 2.5 Secondary mass spectrum of Trx-SPRR2A.

2.3.5 Trx-SPRR2A 的二级结构分析

圆二色谱分析能够清晰地显示出目标蛋白在不同波长下的吸收差异，从而反映出其二级结构的特征。将 Trx-SPRR2A 分别溶解在 pH 7.4 的 5 mM PB 缓冲液和 pH 5.5 的 10 mM MES 缓冲液中，使其终浓度为 15 μM，利用圆二色谱检测其在不同的酸碱环境下的二级结构。图 2.7 为 Trx-SPRR2A 在 25 °C 时的 CD 光谱图，为我们提供了关于其二级结构的初步信息。为了更深入地了解 Trx-SPRR2A 的二级结构，采用 CDNN 软件对数据进行处理以得到 Trx-SPRR2A 在两种缓冲液中各类二级结构的比例。结果表明，当 Trx-SPRR2A 存在于 pH 7.4 的 5 mM PB 缓冲液时，其二级结构包括 11.3%的α-螺旋、35.9%的β-折叠（平行与反平行）、19.5%的β-转角和 34.2%的无规卷曲。当 Trx-SPRR2A 存在于 pH 5.5 的 10 mM MES 缓冲液时，其二级结构包含 12.9%的α-螺旋、31.8%的β-折叠（平行与反平

行）、20.1%的β-转角和 34.8%的无规卷曲。由此可见，Trx-SPRR2A 的二级结构主要是β-折叠与无规卷曲。

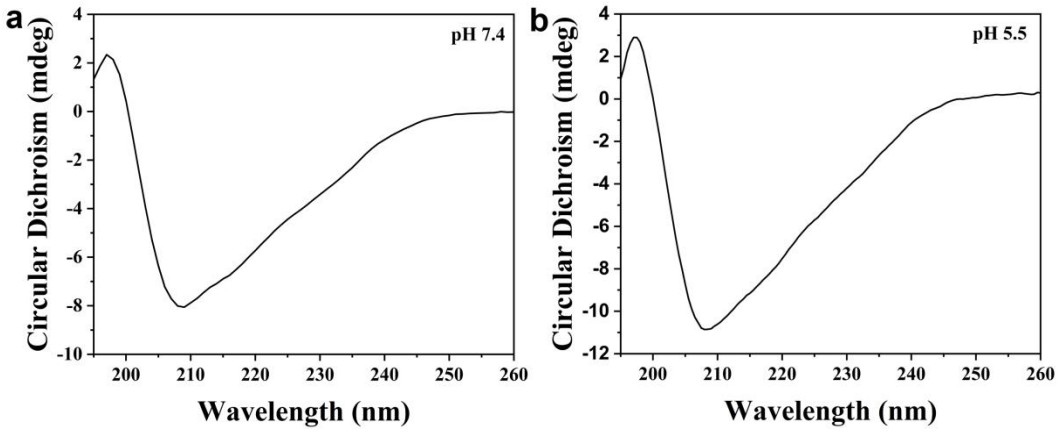

图 2.6 分别溶解于 pH 7.4 的 PB 缓冲液（a）和 pH 5.5 的 MES 缓冲液（b）的 Trx-SPRR2A 在 25 ℃ 下的 CD 光谱。

Fig. 2.6 CD spectra of Trx-SPRR2A dissolved in PB buffer (a) at pH 7.4 and MES buffer (b) at pH 5.5 at 25 ℃, respectively.

2.3.6 圆二色谱分析 Trx-SPRR2A 的热稳定性

为了深入研究蛋白的热稳定性，利用圆二色谱仪对 Trx-SPRR2A 在 25~95 °C 范围内的 CD 光谱进行了全面检测，在这个温度区间内，每 5 °C 进行一次检测，以便更准确地揭示蛋白质在不同温度下的结构变化。如图 2.8 所示，25~80 °C 时 Trx-SPRR2A 的 CD 光谱呈现出高度的相似性，表明 Trx-SPRR2A 在该温度区间内能够保持良好的热稳定性；然而，当温度超过 85 °C 时，可以观察到两种缓冲液中的 Trx-SPRR2A 的 CD 光谱呈现出明显的变化，这一现象表明，高温条件下，Trx-SPRR2A 的二级结构会经历改变，这表明 Trx-SPRR2A 具有较好的热稳定性。

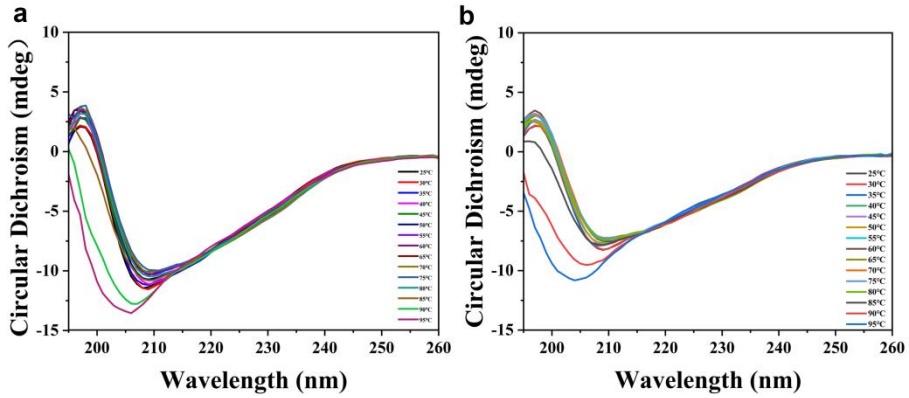

图 2.7 25~95 °C 时 Trx-SPRR2A 的 CD 光谱。a 图为 Trx-SPRR2A 溶解在 pH 7.4 的 5 mM PB 缓冲液；b 图为 pH 5.5 的 10 mM MES 缓冲液中。

Fig. 2.7 CD spectra of Trx-SPRR2A at 25~95 °C. (a) Trx-SPRR2A dissolved in a 5 mM PB buffer at pH 7.4. (b) Trx-SPRR2A dissolved picture in 10 mM MES buffer at pH 5.5.

2.3.7 Trx-SPRR2A 蛋白的二硫键鉴定

二硫键是一种普遍的蛋白翻译后修饰，蛋白质的二硫键对其结构和功能至关重要，因此精确测定二硫键的数量和位置有利于为相关研究和应用提供有价值的信息。我们采用高分辨质谱 Q-Exactive（Thermo Fisher）质谱对 Trx-SPRR2A 蛋白进行二硫键的分析，在非还原条件下，对蛋白质进行酶切，利用高分辨质谱鉴定含二硫键的肽段，进而确认二硫键的连接方式。如图 2.9 与表 2.5 所示为二硫键分析结果，结果表明，Trx-SPRR2A 共有 7 对二硫键，其位点分别是 C132-C136(或 C141-C145)、C172/C172(链间二硫键）、C121-C127、C132，C136,C141，C145、C150,C154,C159/C172、C117/C172、C33-C36，包含真核表达 SPRR2A 所形成的五对二硫键。

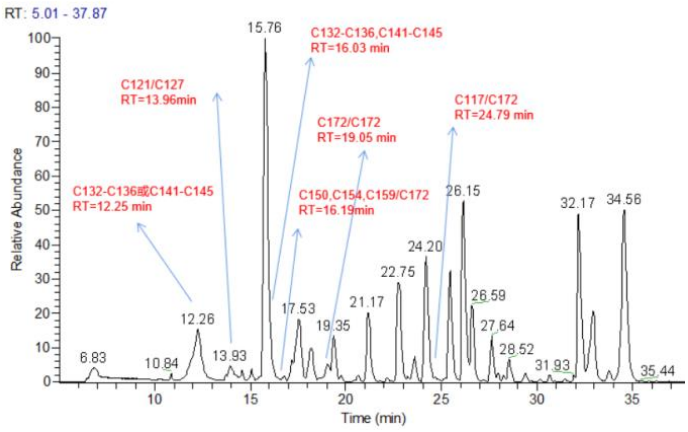

图 2.8 Trypsin 非还原酶切 TIC 总离子流图与各二硫键肽段对应的保留时间。

Fig. 2.8 The total ion flow diagram of non-reductase cleavage by trypsin and the corresponding retention times of each disulfide binding peptide.

表 2.4 Trx-SPRR2A 的二硫键分析。

Table 2.4 Disulfide bond analysis of Trx-SPRR2A.

No	Peptide Sequence	Site
1	CPEPCPPPK	C132-C136（或 C141-C145）
2	YPPVTPSPPCQSK/YPPVTPSPPCQSK	C172/C172（链间二硫键）
3	QPCQPPPVCPTPK	C121-C127
4	CPEPCPPPKCPEPCPPPK	C132,C136,C141,C145
5	CPQPCPPQQCQQK/YPPVTPSPPCQSK	C150,C154,C159/C172
6	EFLDANLAMSYQQQQCK/YPPVTPSPPCQSK	C117/C172

7	EWCGPCKM	C33-C36

2.3.8 Trx-SPRR2A 的血清稳定性分析

分别在不同 pH 值（7.4 和 6.5）的条件下，使用含 10%血清的完全培养基与 Trx-SPRR2A 进行孵育。在特定的时间节点，收集并制备相应的蛋白样品，进而采用 SDS-PAGE 技术对其进行详细的蛋白质电泳分析，以观察 Trx-SPRR2A 在不同条件下的稳定性。如图 2.10 所示，Trx-SPRR2A 经过 48 h 的 CO_2 细胞培养箱中孵育后，在预期的位置均成功检测到清晰的目的蛋白条带。这一结果表明，Trx-SPRR2A 在两种不同 pH 值的情况下均具有较高的稳定性。为了更精确地评估 Trx-SPRR2A 的稳定性进行了灰度分析，结果显示，经过 48 小时与不同 pH 值的完全培养基共同孵育后，Trx-SPRR2A 未展现出显著的降解现象。值得注意的是，目的蛋白的条带强度始终保持在 90%以上，这一数据充分说明，无论是在中性还是酸性环境下，Trx-SPRR2A 均展现出了卓越的血清稳定性，为进一步探索 Trx-SPRR2A 在生物医学领域的应用奠定了基础。

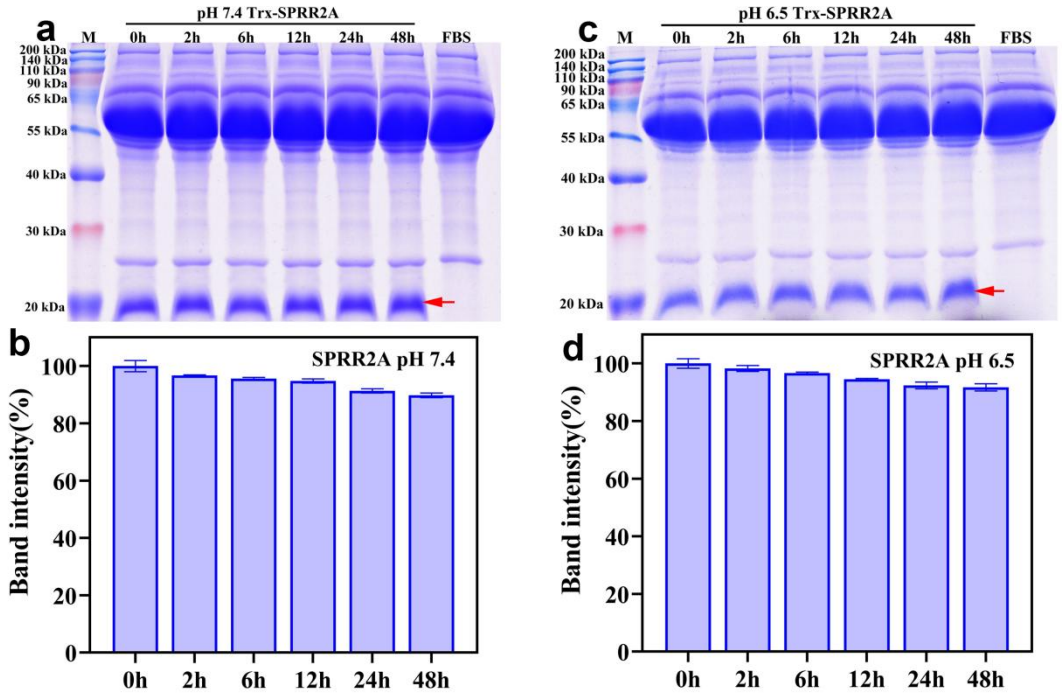

图 2.9 Trx-SPRR2A 的血清稳定性检测。(a、c)20 μM 的 Trx-SPRR2A 与 pH 值为 7.4 或 6.5 且含有 10%胎牛血清的细胞培养基在 37 ℃条件下孵育不同时间（0, 2, 6, 12, 24, 48 h）后，通过 SDS-PAGE 检测蛋白稳定性。泳道 M 是分子量在 20~200 kDa 范围内的蛋白 Marker；FBS 是含有 10%FBS 的细胞培养基。图中红色箭头明确指出了 Trx-SPRR2A 的位置。(b、d)分别为 a、c 中目的条带的定量分析结果。

Fig. 2.9 Serum stability of Trx-SPRR2A. (a, c) SDS-PAGE diagram obtained after 20 μM Trx-SPRR2A was incubated with cell medium (pH 7.4 or 6.5) containing 10% fetal bovine serum (FBS) at 37℃ for different times (0, 2, 6, 12, 24, 48 h), and subjected to SDS-PAGE analysis. Lane M is the protein marker in the range of 20~200 kDa. FBS is the cell medium containing 10% FBS. The red arrow indicates the location of Trx-SPRR2A. b and d are the quantitative analysis results of target bands in a and c, respectively.

2.4 小结

我们利用 Rosetta-gami (DE3) pLysS 原核表达系统成功表达了富含二硫键的融合蛋白 Trx-SPRR2A。为了获得高纯度的目标蛋白质，我们采用镍柱亲和层析技术对蛋白质进行纯化，并通过质谱对 Trx-SPRR2A 蛋白进行了检测，证实我们成功通过原核表达系统获得了该蛋白。Trx-SPRR2A 的纯度为 94.5%纯度、产率为 7.18mg/L。我们还通过圆二色谱技术对 Trx-SPRR2A 蛋白的二级结构及热稳定性进行了检测。研究结果显示，表明该蛋白主要二级结构为β-折叠和无规卷曲，在 85 ℃以下具有较强的热稳定性。通过高分辨质谱 Q-Exactive，对 Trx-SPRR2A 的二硫键进行了分析，结果表明，该蛋白成功形成了 7 对二硫键，这对于蛋白质的结构和功能具有重要意义。此外，Trx-SPRR2A 具有良好的 pH 和血清稳定性

通过上述一系列研究，我们全面了解了 Trx-SPRR2A 蛋白的性质，包括分子量、二级结构、热稳定性、二硫键配对以及血清稳定性。这些研究为我们之后的研究奠定了坚实基础，有助于深入探索 Trx-SPRR2A 在生物医学领域的潜在应用价值。

3 Trx-SPRR2A 的抗菌活性研究

3.1 实验材料与设备

3.1.1 实验试剂与材料

名称	生产厂家
脑心浸出液肉汤（BHI）	青岛高科技工业园海博生物技术有限公司
染色液 PI	上海贝博生物科技有限公司
活细菌/死细菌染色试剂盒	上海贝博生物科技有限公司

3.1.2 主要试剂配制方法

试剂	配制方法	
BHI 液体培养基	脑心浸出液肉汤	38.5 g
	去离子水	1 L
LB 固体培养基	琼脂糖	3 g
	BHI 液体培养基	100 mL
0.85%NaCl	NaCl	0.85 g
	去离子水定容至	100 mL
0.5% SDS	SDS	2.5 g
	去离子水定容至	500 mL

3.1.3 实验仪器

仪器设备	生产厂家
超净工作台	苏净安泰
高压灭菌锅	ZEALWAY
涡旋振荡器	Sangon Biotech
恒温水浴锅	SCANVAC
酶标仪	BioTek
小型离心机	Eppendorf
恒温摇床	LONGYUE

三维摇床	DRAGONLAB
荧光显微镜	尼康

3.2 实验方法

3.2.1 细胞培养

选择四种微生物作为研究对象，它们分别是粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）、单核细胞增多性李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）、金光色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）三种革兰氏阳性细菌以及柠檬酸杆菌（*Citrobacter rodentium*）一种革兰氏阴性细菌。为了培养这四种微生物，我们选择了不同的培养基。粪肠球菌、单核细胞增多性李斯特菌、金光色葡萄球菌采用 BHI 培养基进行培养，柠檬酸杆菌则选用 LB 培养基进行培养。在以下实验过程中，严格遵循无菌操作流程，避免外源性微生物污染。

3.2.2 平板菌落计数法

（1）将四种细菌分别接种到 10 ml 培养基中，待其生长至对数生长期；

（2）将菌液 8000 rpm，离心 5 min，并用 10 mL 的 MES 缓冲液（10 mM MES 和 25 mM NaCl，pH 5.5）进行清洗与重悬；

（3）不同菌液以各种稀释液与不同浓度的 Trx-SPRR2A 混合均匀，置于 37 ℃孵育 2 h；

（4）孵育后的混合物分别均匀涂布在固体培养基上，并在 37 ℃.下过夜培养；

（5）对存活的菌落进行计数，并计算相对于对照组样品中剩余菌落的百分比。

3.2.3 扫描电镜观察细胞形态

（1）将四种细菌分别接种到 10 ml 培养基中，待其生长至对数生长期；

（2）将菌液 8000 rpm，离心 5 min，并用 10 mL 的 MES 缓冲液（10 mM MES 和 25 mM NaCl，pH 5.5）进行清洗与重悬；

（3）各取 1 mL 菌液 8000 rpm 离心 5 min，与不同浓度的 Trx-SPRR2A 混合均匀，置于 37 ℃孵育 2 h；

（4）孵育后的混合物 8000 rpm 离心 5 min，弃上清液，收集菌体；

（5）将菌体吹吸悬浮于固定液内，室温避光固定 30 min，再转移至 4 ℃过夜保存；

（6）进行 SEM 检测。

3.2.4 N01/PI 活死染色法

（1）将四种细菌分别接种到 10 ml 培养基中，待其生长至对数生长期；

（2）将菌液 8000 rpm，离心 5 min，并用 10 mL 的 MES 缓冲液（10 mM MES 和 25 mM NaCl，pH 5.5）进行清洗与重悬；

（3）取 700 μL 菌液 8000 rpm 离心 5 min，收集菌体，用 0.85% NaCl 溶液清洗细胞 3 次；

（4）配制染色工作液：用 0.85% NaCl 溶液将 N01 荧光染液稀释 300 倍，将 PI 稀释 200 倍，即在 3 mL 0.85% NaCl 溶液中加入 10 μL 染色液 A，混合均匀为染色工作液 A，在 2 mL 0.85% NaCl 溶液中加入 10 μL 染色液 B，混合均匀为染色工作液 B；

（4）分别用 100 μL 的染色工作液 A 和 B 对粪肠球菌、单核细胞增多性李斯特菌、金光色葡萄球菌进行重新悬浮，用 110 μL 的染色工作液 A 和 B 对柠檬酸杆菌进行重新悬浮，并在室温条件下，于暗处静置 15 min 以完成孵育过程；

（5）利用 0.85% NaCl 溶液对细菌进行一次清洗，然后用 400 μL 0.85% NaCl 溶液对清洗后的细菌进行重悬操作；

（6）取 10 μL 菌液滴加至载玻片上，轻缓盖上盖玻片，确保无气泡产生，随后，将制备好的样本置于荧光倒置显微镜下观察。

3.2.5 PI 摄取测定

（1）将粪肠球菌分别接种到 10 mL 培养基中，待其生长至对数生长期；

（2）将菌液 8000 rpm，离心 5 min，并用 10 mL 的 MES 缓冲液（10 mM MES 和 25 mM NaCl，pH 5.5）进行清洗与重悬；

（3）用 MES 稀释 PI，使其终浓度为 11 μg/mL，在 180 μL 稀释后的 PI 中加入 200 μL 稀释了 10^6 倍的菌液，使其混合均匀；

（4）将（3）均分成 6 份，依次加入等量的 0.05% SDS 和不同浓度的 Trx-SPRR2A，使其终浓度分别为 0、5、10、20、40 μM；

（5）将（4）加入 96 孔平板中，每孔 100 μL，利用酶标仪每 5 分钟检测一次荧光强度（激发波长：535 nm；发射波长：617 nm），持续检测 1 h。以 0.05%

SDS 处理组作为阳性对照，计算各处理组的 PI 摄取率。

3.3 结果与分析

3.3.1 平板菌落计数法

为了探索 Trx-SPRR2A 的杀菌活性，将纯化的 Trx-SPRR2A 添加到粪肠球菌、单核细胞增多性李斯特菌、金光色葡萄球菌（三种革兰氏阳性菌）以及柠檬酸杆菌（革兰氏阴性菌）培养物中，以观察其对不同细菌的抗菌效果，如图 3.1 所示，随着 Trx-SPRR2A 浓度的增加，粪肠球菌、单核细胞增多性李斯特菌、金光色葡萄球菌的菌落数量逐渐减少。这一与剂量依赖性的抗菌效果表明，Trx-SPRR2A 对这三种革兰氏阳性菌的生长具有抑制作用。进一步观察发现，粪肠球菌对 Trx-SPRR2A 最为敏感，20 μM 与 40 μM Trx-SPRR2A 处理后剩余菌落数分别降至 44.5%与 0，表明其对粪肠球菌的抗菌效果最为显著。相比之下，Trx-SPRR2A 对柠檬酸杆菌活性很弱，40 μM 时剩余菌落百分比为 70%。由此表明，Trx-SPRR2A 能够选择性杀死革兰氏阳性细菌，这与文献结果一致[79]。这一发现为后续研究 Trx-SPRR2A 在其他细菌上的应用提供了依据。

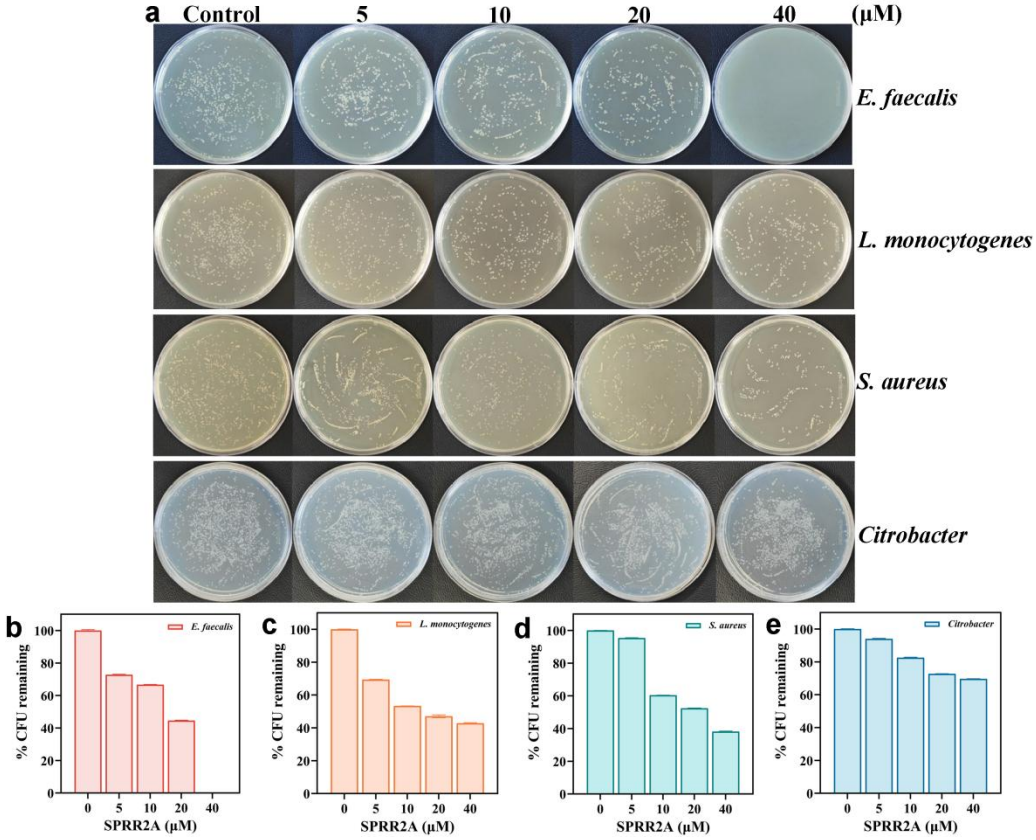

图 3.1 平板菌落计数法检测 Trx-SPRR2A 对四种不同细菌的抗菌效果。不同浓度的

Trx-SPRR2A 分别处理粪肠球菌、单核细胞增多性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、柠檬酸杆菌后的菌落照片。（b-e）是其图 a 的定量分析结果。

Fig. 3.1 Antibacterial effect of Trx-SPRR2A against four different bacteria was determined by plate count method. (a) Photos of bacterial colonies of *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *Citrobacter* after treatment with different concentrations of Trx-SPRR2A. (b-e) are the quantitative results of (a).

3.3.2 电镜检测

利用 Trx-SPRR2A 处理四种不同细菌后，我们采用扫描电子显微镜观察了各种细菌的形态变化。图 3.2 所示为四种细菌与 Trx-SPRR2A 作用后的扫描电镜图。结果显示，未经处理的细菌细胞形态完整，而三种革兰氏阳性菌的 Trx-SPRR2A 处理组细菌细胞膜完整性受损，出现凹陷、破损及内容物泄漏等形态变化，表明 Trx-SPRR2A 通过与细菌细胞膜结合，破坏其细胞壁和细胞膜的完整性，导致细胞质泄漏，从而实现对细菌的杀灭。另外，我们还注意到，柠檬酸杆菌的细胞形态没有发生明显变化。结果表明，Trx-SPRR2A 会选择性杀灭革兰氏阳性细菌。这可能与革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的细胞壁和细胞膜的成分、结构差异有关。

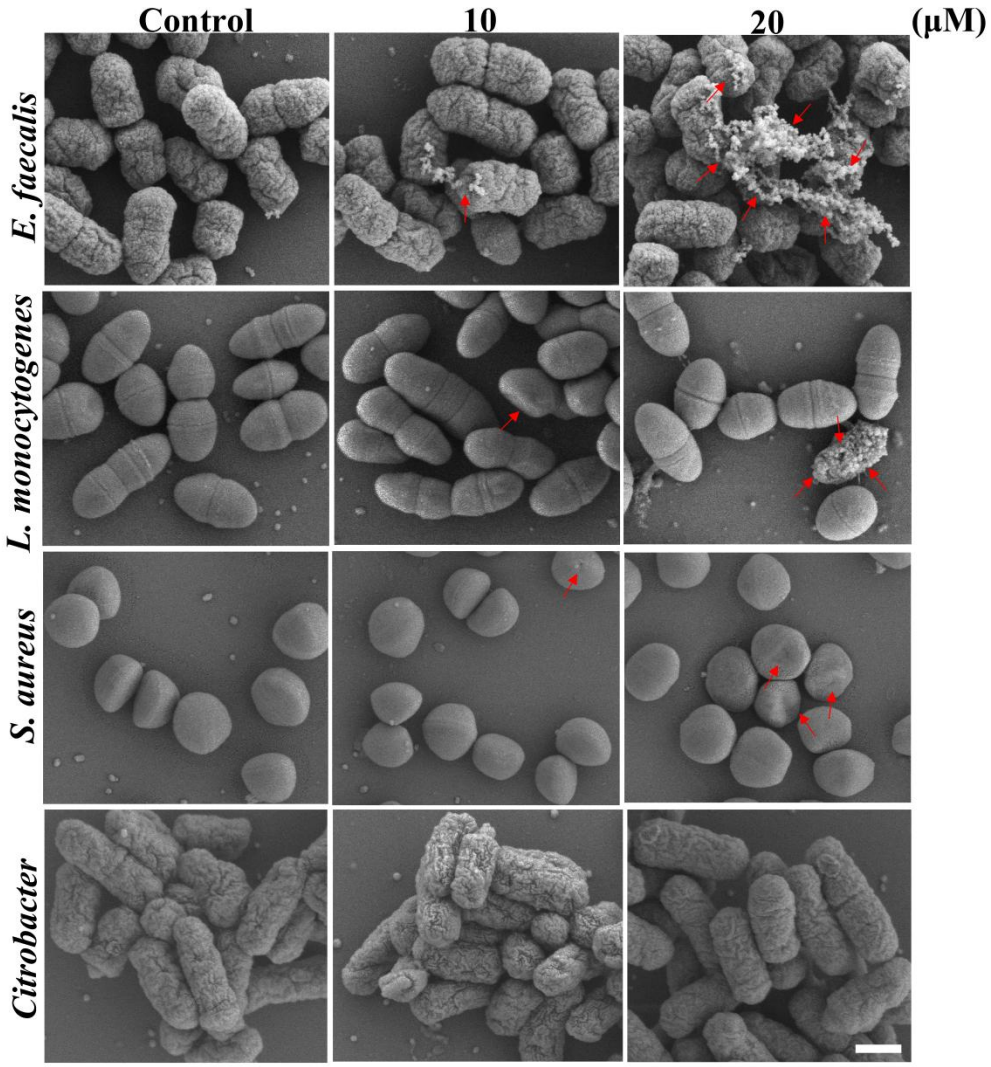

图 3.2 经不同浓度 Trx-SPRR2A 处理 2 h 后的粪肠球菌、单核细胞增多性李斯特菌、金黄色葡萄球菌以及柠檬酸杆菌的扫描电镜图像（标尺：5 μm）。

Fig. 3.2 SEM images of *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *Citrobacter* after treatment with different concentrations of Trx-SPRR2A for 2 h. The arrows indicate the bacteria that have undergone morphological changes (scale bars: 5 μm).

3.3.3 N01/PI 活死细菌染色法

为了进一步验证 Trx-SPRR2A 的杀菌效能，我们进行了 N01/PI 活死细菌染色实验。利用 N01/PI 活死细菌染色试剂盒对细菌进行染色后，通过荧光倒置显微镜可以明确地分辨出活细菌与死细菌，从而直观地观察到 Trx-SPRR2A 对细菌的杀灭效果。N01 活细菌染色探针是一种绿色荧光标记的探针，它可以透过具有完整细胞膜的活细菌，相较之下，PI 是一种红色荧光核酸染色剂，只对那些“受伤”的细菌进行染色。因此，细胞膜完整的细菌能够被荧光染料染成绿色，而膜

受损的细菌会发出较强的红色荧光。如图 3.3 给出了四种细菌对照组与三个不同浓度（10、20 和 40 μM）的 Trx-SPRR2A 处理组的染色结果。实验结果显示，经过 Trx-SPRR2A 处理的革兰氏阳性菌，呈现出较强的红色荧光以及较弱的绿色荧光（图 3.3 a-c）。这一现象说明，Trx-SPRR2A 处理导致细菌细胞膜受损，进而使 PI 染色剂能够进入细胞，使细菌呈现红色荧光。进一步分析可知，随着 Trx-SPRR2A 浓度的升高，细菌的红色荧光强度逐渐增强。这表明，Trx-SPRR2A 在较高浓度下对细菌细胞膜的损伤作用更为明显，使得 PI 染色剂更容易进入细胞，从而增强红色荧光。同样，在革兰氏阴性细菌 *Citrobacter* 中观察到强烈的绿色荧光和微弱的红色荧光。

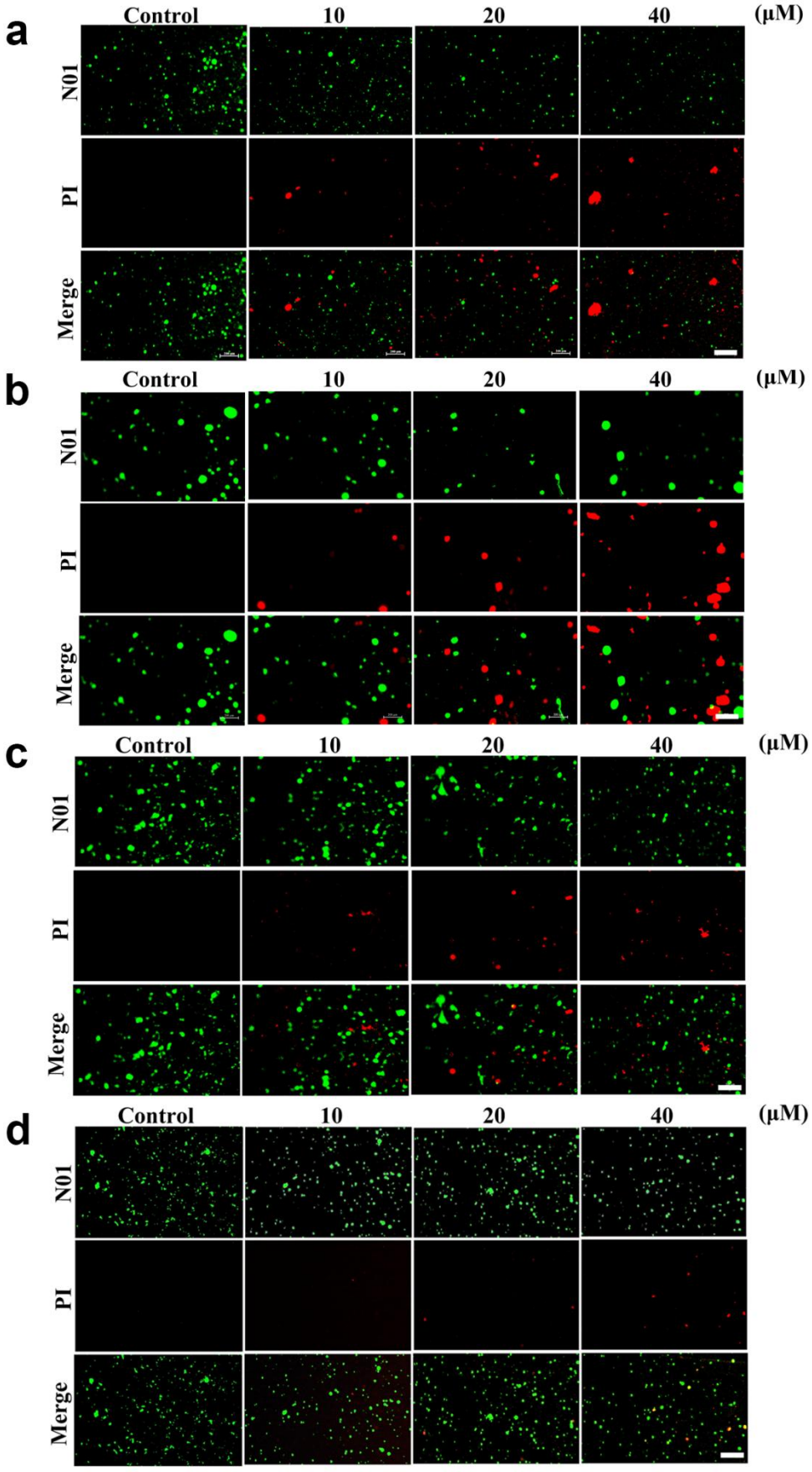

图 3.3 N01/PI 活死细菌染色法检测 Trx-SPRR2A 的抗菌活性。不同浓度的 Trx-SPRR2A 分别

处理（a）粪肠球菌（b）单核细胞增多性李斯特菌（c）金黄色葡萄球菌（d）柠檬酸杆菌，利用 N01/PI 活死细菌染色试剂盒进行染色后，通过荧光倒置显微镜采集图像（标尺：200 μm）。

Fig. 3.3 The antimicrobial activity of Trx-SPRR2A was detected by N01/PI live/dead bacteria staining. *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *Citrobacter* were treated with different concentrations of Trx-SPRR2A, stained with N01/PI live/dead bacteria staining kit, and images were collected by inverted fluorescent microscope (scale bars: 200 μm).

3.3.4 PI 摄取测定

为了验证 Trx-SPRR2A 可能通过破坏细菌细胞膜来杀死细菌，我们选取粪肠球菌作为实验模型，采用膜不透性染料 PI 对 Trx-SPRR2A 处理后细菌的通透性进行检测。我们采用不同浓度的 Trx-SPRR2A 处理粪肠球菌，在一小时内每隔 5 min 检测细菌对 PI 的摄取量的变化。如图 3.4 所示，随着 Trx-SPRR2A 浓度的增加，细菌对 PI 的摄取量也随之增加，从而增强杀菌效果。该结果表明，Trx-SPRR2A 通过破坏细菌细胞膜的通透性来发挥抗菌活性。此结果进一步证实：Trx-SPRR2A 具备破坏细菌细胞膜的能力，进而导致细菌失去保护并最终死亡。

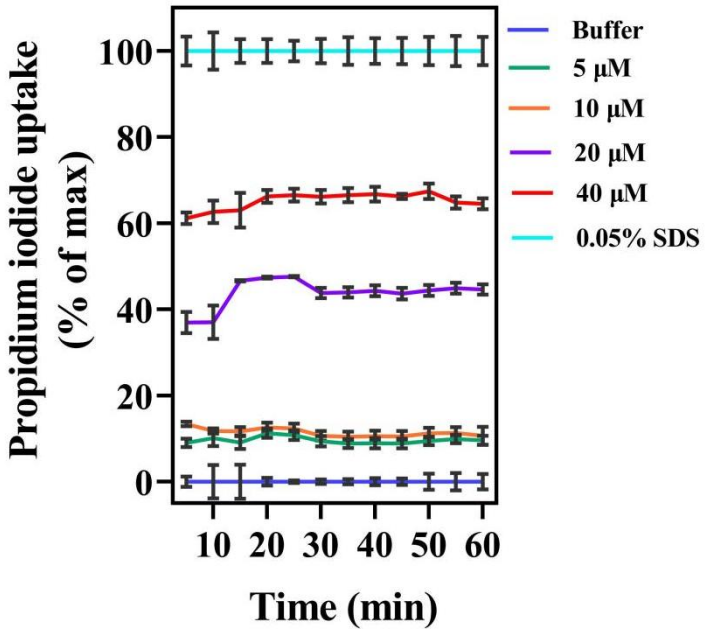

图 3.4 经不同浓度 Trx-SPRR2A 处理粪肠球菌后，在 1 h 内每隔 5 min 检测 PI 摄取量。用 0.05% SDS 处理组作为阳性对照。

Fig 3.4 *E. faecalis* was treated with different concentrations of Trx-SPRR2A, and propidium iodide (PI) uptake was measured over 1 hour. 0.05% SDS was used as positive control.

3.4 小结

由于细菌对抗生素的耐药性日趋加重，新型抗菌药物的研发备受关注。为了评估 Trx-SPRR2A 的抗菌活性，我们使用平板菌落计数法、扫描电镜观察、N01/PI 活死染色法以及 PI 摄取测定法对 Trx-SPRR2A 处理后的细菌进行了检测，实验结果显示，Trx-SPRR2A 处理后菌落数量减少、细菌细胞形态发生改变、PI 的摄取量增加。综上所述，Trx-SPRR2A 对革兰氏阳性细菌具有一定的抗菌活性。这为后续研究 Trx-SPRR2A 的抗菌应用提供了实验依据。

4 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤活性评价

4.1 实验材料与仪器

4.1.1 实验试剂与材料

人乳腺癌细胞 MCF-7 与人肝癌细胞 HepG2 购自中科院上海细胞库；活细胞/死细胞染色试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司；胰蛋白酶深圳市康初源有限公司；4%多聚甲醛固定液、Annexin V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒、抗荧光衰减封片剂、结晶紫、MTT、Triton X-100、DAPI（即用型）均购自索莱宝科技有限公司。

4.1.2 实验仪器

仪器	型号	产家
恒温培养箱	Galaxy 170 s	Eppendorf
超净工作台	HFsafe-1200	Heal Force
低速离心机	SC-3610	Eppendorf
流式细胞仪	CFX Connect	Beckman
酶标仪	ELx800	BioTek

4.1.3 主要试剂配制方法

试剂	配制方法	
RPMI-1640 细胞培养液	RPMI-1640 培养基	6.4 mL
（pH 7.4）	胎牛血清	8 mL
	青链霉素混合物	800 μL
RPMI-1640 培养基	RPMI-1640 培养基	2.08 g
	去离子水	200 mL
（无 FBS，pH 6.5）	$NaHCO_3$ 调节 pH 至 6.5	

4.2 实验方法

4.2.1 细胞培养

选择两种常见的细胞系：乳腺癌细胞系(MCF-7 细胞)与肝细胞癌细胞系

（HepG2 细胞）。为了保证细胞的正常生长，我们需要为它们提供合适的培养基。MCF-7 细胞通过含有 10%胎牛血清（FBS）和 1%抗生素的 DMEM 培养基培养，HepG2 细胞则使用 RPMI 1640 培养基进行培养。二者均置于 37 °C、5% CO_2 的恒温培养箱。利用倒置显微镜定期观察细胞的贴壁情况与生长状态，当细胞生长达到 80%的覆盖率时，进行新鲜培养基的更换或者传代，这样可以保证细胞继续正常生长，同时避免细胞过度拥挤导致生长受限。

4.2.2 FITC 标记 Trx-SPRR2A

（1）将 FITC-SCN 完全溶解于 PBS 缓冲液中，以配置 1 mg/mL 的 FITC 标记液。

（2）分别在含有 1 mg Trx-SPRR2A 的 PBS 缓冲液（pH 7.4）与 MES 缓冲液（pH 5.5）中，按照 1:2 的摩尔比例加入 FITC 标记液。随后利用相应的缓冲液使总体系达到 1 mL。混合液在避光条件下置于三维摇床上，并在 4 °C 温度下反应过夜。

（3）在反应完成后，将反应液用 14 mL 缓冲液进行稀释，并利用 10 kDa 的超滤离心管进行浓缩，使得体积降至 1 mL 以下，以除去未反应的 FITC-SCN，经过上述操作，最终制备了 FITC 标记的蛋白样品，即 FITC-Trx-SPRR2A。

（4）根据紫外可见分光光度计制作吸光度曲线，以客观评估标记效果。

4.2.3 荧光倒置显微镜检测 Trx-SPRR2A 的细胞内化行为

（1）在 12 孔板中放置已灭菌且完全干燥的盖玻片，将 MCF-7 细胞接种在 12 孔板中，每孔密度设定为 1×10^6 个细胞，将此培养板置于 37 °C 的恒温环境下进行过夜培养，以确保细胞的正常生长；

（2）通过 pH 值为 7.4 或 6.5 的无血清培养基将 FITC-Trx-SPRR2A 溶液稀释至 1 μM；

（3）将原有培养基从细胞孔中彻底移除，随后将细胞分别置于以下四种培养基中进行培养：①pH 值为 7.4 且不含胎牛血清的中性培养基；②pH 值为 6.5 且不含胎牛血清的酸性培养基；③含有 1 μM FITC-Trx-SPRR2A 且 pH 值为 7.4 的培养基；④含有 1 μM FITC-Trx-SPRR2A 且 pH 值为 6.5 的培养基，最后在细胞培养箱中静置孵育 12 小时；

（4）移除孔中原有的培养基，将 4%的多聚甲醛加入其中，并在室温条件下保持 30 分钟，确保细胞得到充分固定；

（5）利用 PBS 缓冲液对细胞进行两次温和清洗，随后加入浓度为 10 μg/mL 的 DAPI 溶液 160 μL，在室温下保持 10 分钟以完成孵育过程；

（6）从孔板中吸出 DAPI，并用 PBS 对细胞进行两次温和洗涤，同时在载玻片上滴加 10 μL 抗荧光衰减封片剂，轻轻除去爬片上的多余液体，将其放置在已滴有抗荧光衰减封片剂的载玻片上，确保细胞面与封片剂充分接触，最后采用指甲油轻轻覆盖爬片周围，确保封片剂不会溢出并固定封片；

（7）采用荧光倒置显微镜进行观测，并捕获相关图像。

4.2.4 流式细胞术分析 Trx-SPRR2A 的细胞内化行为

（1）将 MCF-7 细胞分别以 2×10^6 个细胞的密度均匀接种至 6 孔板，并将之置于 CO_2 培养箱中，进行过夜培养；

（2）将 FITC-Trx-SPRR2A 溶液在无血清培养基中稀释至 1 μM，培养基的 pH 值分别为 7.4 和 6.5。同时，设立不含 FITC-Trx-SPRR2A 的中性和酸性培养基作为阴性对照。所有样品均置于恒温 37 °C 的环境中，进行为期 12 h 的孵育；

（3）废弃培养基，利用 PBS 进行两次温和洗涤，随后利用 0.25%的胰蛋白酶消化与含 10%血清的正常培养基中止消化过程，之后，将细胞悬液小心转移至 4 mL EP 管中，3000 rpm 离心 5 min；

（4）倒掉培养液的上清部分，用 PBS 溶液对细胞进行两次清洗；

（5）利用流式细胞仪进行检测和分析。

4.2.5 MTT 检测细胞活力

（1）将 MCF-7 细胞和 HepG2 细胞以每孔 3×10^3 个细胞的密度均匀接种在 96 孔板中，随后将此板放入温度设定为 37 °C 培养箱中，进行过夜培养。

（2）通过含有 10%胎牛血清（FBS）的 pH 7.4 或 pH 6.5 培养基，将 Trx-SPRR2A 按照 40 μM、20 μM、10 μM、5 μM 的浓度依次进行梯度稀释。

（3）废弃培养基,每孔分别加入 100 μL 含不同浓度 Trx-SPRR2A 的 pH 7.4 或 pH 6.5 的培养基，置于 CO_2 培养箱中培养 12 h。

（4）移除液体，使孔内无残留，随后，在每孔中加入 100 μL 无血清培养基，同时加入 20 μL MTT 溶液，该溶液的浓度为 5 mg/mL，接着将 96 孔板放置于 37 °C 培养箱持续孵育 4 小时。

（5）移除孔内混合物，各孔加入 150 μL DMSO，并在室温下进行 10 min 的振荡处理。

（6）使用酶标仪在 570 nm 波长下测量细胞的光吸收值，并基于这些数据计算细胞的相对活力。

4.2.6 结晶紫染色检测细胞活力

（1）以每孔 5×10^3 个细胞的密度，将 MCF-7 细胞均匀接种至 96 孔板中，随后将板置于 37 °C 的培养箱中进行过夜培养。

（2）通过含有 10%胎牛血清（FBS）的 pH 7.4 或 pH 6.5 的 DMEM 培养基，将 Trx-SPRR2A 按照 40 μM、20 μM、10 μM、5 μM 的浓度依次进行梯度稀释。

（3）废弃培养基,每孔分别加入 100 μL 含不同浓度 Trx-SPRR2A 的 pH 7.4 或 pH 6.5 的培养基，置于 CO_2 培养箱中培养 12 h。

（4）移除液体，使孔内无残留，随后，用 PBS 溶液对细胞进行两次清洗后在各孔中加入 50 μL 的 5%结晶紫溶液，将 96 孔板放置于 37 °C 摇床中孵育 20 min，以确保结晶紫能够充分染色。

（5）将结晶紫溶液吸出，并 PBS 进行 3 次清洗。

（6）将 96 孔板倒置放置在滤纸上方，于室温下晾晒一晚使其干燥。

（7）在完成显微镜图像采集后，我们向每孔加入 200 μL 甲醇以使其中的结晶紫得到充分溶解。接着，我们将孔板置于振荡器中进行 15 分钟的振荡处理。

（8）采用酶标仪对 570 nm 波长的吸光度进行测定，同时以阴性对照作为基准，设定其吸光度为 100%。进一步推算出细胞的相对活力。

4.2.7 Calcein-AM/PI 染色检测细胞活力

（1）以每孔 5×10^3 个细胞的密度，将 MCF-7 细胞均匀接种至 96 孔板中，随后将板置于 37 °C 的培养箱中进行过夜培养。

（2）利用 pH 7.4 和 pH 6.5 的含有 10%胎牛血清（FBS）的 DMEM 培养基将 Trx-SPRR2A 稀释至 40 μM，同时设立不含 Trx-SPRR2A 的 pH 7.4 和 pH 6.5 的含有 10%胎牛血清（FBS）的 DMEM 培养基作为阴性对照。置于 CO_2 培养箱与细胞共孵育 12 h。

（3）分别将将染色液 A 与染色液 B 以 1:10 的比例通过试剂 C 进行稀释。随后将经过稀释的染色液 A 按 100:1 的比例利用无血清培养基再次稀释混合，从而制备染色工作液 A（Calcein-AM）。同样地，按照 1000:1 的比例，将经过稀释的染色液 B 利用无血清培养基进行再次的稀释与混合，进而制备染色工作液 B（PI）。

（4）将 96 孔板置于离心机中，以 1000 rpm 的转速进行离心，持续时间为 5 min。离心结束后，吸走孔中的液体。接着，用 PBS 溶液进行温和洗涤，重复此操作两次。每次洗涤后，将 96 孔板再次进行离心。自此步骤起，任何 PBS 洗涤环节均需进行离心。

（5）向每个孔内添加 50 μL Calcein-AM 染色工作液，进行 30 分钟的避光染色处理。完成染色后，将染色液吸出。接着，利用 50 μL PI 染色工作液染色后 PBS 清洗两次。最后采用荧光倒置显微镜捕捉图像。

4.2.8 细胞膜通透性检测

（1）以每孔 1×10^6 个细胞的密度，将 MCF-7 细胞均匀接种至 12 孔板中，随后将板置于 37 °C 的培养箱中进行过夜培养。

（2）通过含有 10%胎牛血清（FBS）的 pH 6.5 的 DMEM 培养基，将 Trx-SPRR2A 按照 30 μM、20 μM、10 μM 的浓度依次进行梯度稀释。使用不含 Trx-SPRR2A 的酸性培养基作为阴性对照，置于 37 °C 环境中，进行过夜孵育。

（3）胰酶消化细胞后离心收集细胞，利用 PBS 进行两次温和洗涤。

（4）向每个孔内添加 50 μL PI 染色工作液，4 °C 避光孵育 5 分钟，弃去染色液。

（5）运用流式细胞术对细胞膜通透性进行检测。

4.2.9 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

通过流式细胞仪对细胞凋亡进行分析：

（1）以每孔 1×10^6 个细胞的密度，将 MCF-7 细胞均匀接种至 12 孔板中，随后将板置于 37 °C 的培养箱中进行过夜培养。

（2）通过 pH 值为 7.4 或 6.5 的无血清 DMEM 培养基将 Trx-SPRR2A 溶液稀释至 10、20 和 40 μM，使用不含 Trx-SPRR2A 的中性或酸性培养基作为阴性对照，置于 37 °C 环境中，进行过夜孵育。

（3）胰酶消化细胞后通过离心操作收集细胞，为确保细胞的纯净度，利用 PBS 对细胞进行两次温和洗涤。

（4）Annexin V-FITC 染色液与 1×Annexin V 结合液以 1：200 的比例混合，然后将 400 μL 的稀释液添加至各平行细胞中，在 4 °C 环境下，将样品置于避光条件下进行孵育，持续时间为 15 min。接下来，向样品中加入适量的 PI 染液，并在相同条件下继续孵育 5 min。

（5）运用流式细胞术对各类细胞的占比进行定量统计和分析。

荧光倒置显微镜观察细胞凋亡：

（1）以每孔 1×10^5 个细胞的密度，将 MCF-7 细胞均匀接种至 24 孔板中，随后将板置于 37 °C 的培养箱中进行过夜培养。

（2）通过 pH 值为 7.4 或 6.5 的无血清 DMEM 培养基将 Trx-SPRR2A 溶液稀释至 10、20 和 40 μM，使用不含 Trx-SPRR2A 的中性或酸性培养基作为阴性对照，置于 37 °C 环境中，进行过夜孵育。

（3）移除液体，使孔内无残留，利用 PBS 进行两次温和洗涤。

（4）Annexin V-FITC 染色液与 1×Annexin V 结合液按照 1：200 的体积比进行混合，然后将 200 μL 的稀释液添加至各平行细胞中，4 °C 下避光孵育 15 分钟。随后加入 PI 染液，继续孵育 5 分钟。

（5）利用荧光倒置显微镜捕获相关图像。

4.3 结果与分析

4.3.1 FITC 标记 Trx-SPRR2A

我们对 Trx-SPRR2A 进行了 FITC 标记，并借助紫外可见分光光度计对标记后的蛋白进行了检测。如图 3.1 所示，未标记的 Trx-SPRR2A 在 280 nm 处呈现出强烈的蛋白质特征吸收峰。而对于经过 FITC 标记的 Trx-SPRR2A，除了保留蛋白的 280 nm 特征峰外，还在 495 nm 附近显现出 FITC 的信号峰，这一结果强烈证实了 FITC 已成功连接到 Trx-SPRR2A 上，使我们能通过荧光显微镜或流式细胞仪对 FITC-Trx-SPRR2A 进行观察与检测。

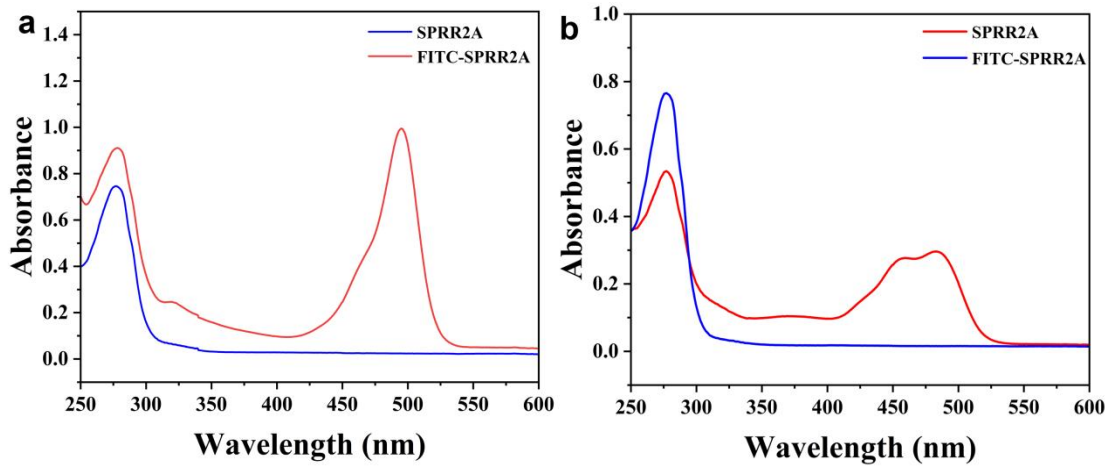

图 4.1 溶于 PBS 缓冲液（pH 7.4）的 FITC-Trx-SPRR2A（a）、溶于 MES 缓冲液（pH 5.5）

的 FITC-Trx-SPRR2A（b）的紫外可见吸收光谱图。

Figure 4.1 UV-VIS absorption spectra of FITC-Trx-SPRR2A (a) dissolved in PBS buffer (pH 7.4) and FITC-Trx-SPRR2A (b) dissolved in MES buffer (pH 5.5).

4.3.2 Trx-SPRR2A 的细胞内化行为

为了检验 Trx-SPRR2A 能否成功进入肿瘤细胞内，我们对 MCF-7 细胞的 Trx-SPRR2A 的摄取状况进行了检测。首先，在 pH 7.4 和 pH 6.5 条件下，分别将 FITC-Trx-SPRR2A 与 MCF-7 细胞共同培养 3 小时。我们利用流式细胞仪对细胞的 FITC 荧光强度进行测定。如图 4.2（a）所示，在中性环境下，Trx-SPRR2A 处理组的荧光强度相对较低。然而，在弱酸性条件下，Trx-SPRR2A 处理组的荧光信号明显增强，上述结果与荧光倒置显微镜检测结果相互印证，表明在正常生理条件下，FITC-Trx-SPRR2A 不易进入细胞；而在酸性环境下，FITC-Trx-SPRR2A 能够有效地内化至细胞内。同样，我们使用倒置荧光显微镜对细胞内化情况进行了检测。如图 4.2（b）所示，我们观察到在不同 pH 条件下，FITC-Trx-SPRR2A 的摄取情况存在明显差异。在中性条件下，FITC-Trx-SPRR2A 处理组的细胞内荧光信号较弱，表明 FITC-Trx-SPRR2A 在正常生理环境下不易进入细胞。然而，在 pH 6.5 的酸性环境下，FITC-Trx-SPRR2A 处理组的细胞内绿色荧光信号明显增强，这一结果明确表明，在酸性条件下，FITC-Trx-SPRR2A 能够有效地进入细胞。总之，本研究通过检测不同条件下 FITC-Trx-SPRR2A 被 MCF-7 细胞内的摄取状况，证实了酸性环境有助于该蛋白进入肿瘤细胞。由于肿瘤微环境呈弱对于酸性特征，这对于 Trx-SPRR2A 发挥抗肿瘤活性是十分有利的。

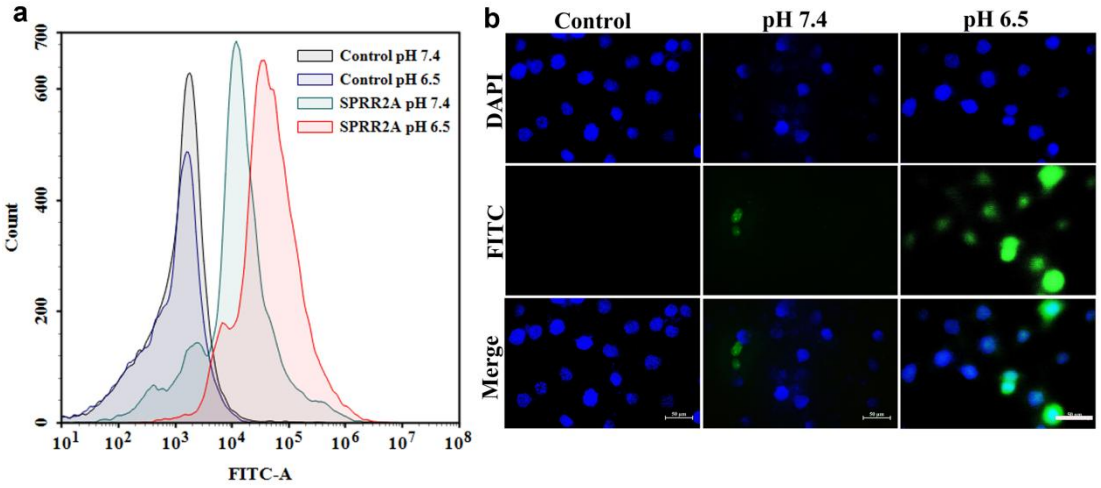

图 4.2 通过流式细胞术(a)以及荧光倒置显微镜（b）检测 MCF-7 细胞对 FITC-Trx-SPRR2A 的摄取（标尺：50 μm）。

Fig 4.2 The cellular uptake of FITC-Trx-SPRR2A by MCF-7 cells was determined by flow cytometry (a) and inverted fluorescence microscopy (b) (scale bar: 50 μm)..

4.3.3 MTT 检测细胞活力

接下来，我们利用 MTT 实验分析了 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤活性。在中性和酸性条件下，以 5 个不同浓度（0、5、10、20、40 μM）的 Trx-SPRR2A 处理 MCF-7 细胞和 HepG2 细胞 12 小时，随后采用 MTT 法检测细胞活力。如图 4.3 所示，Trx-SPRR2A 对两种细胞的抑制作用均呈现出一定的剂量依赖性，即随着药物浓度的增加，Trx-SPRR2A 对两种细胞的抑制作用逐渐增强。且弱酸性环境下的 Trx-SPRR2A 比 pH 7.4 时具有更强的肿瘤杀伤力。具体而言，在酸性条件下，40 μM 的 Trx-SPRR2A 处理后，MCF-7 细胞和 HepG2 细胞的存活率分别为 46.91%、52.85%，表明 MCF-7 细胞对 Trx-SPRR2A 的敏感性较高。综上所述，本研究证实了 Trx-SPRR2A 在弱酸性条件下可有效抑制两种肿瘤细胞的增殖。同时，我们也认识到不同类型肿瘤细胞对 Trx-SPRR2A 的敏感性可能存在差异，这为后续的抗肿瘤活性研究提供了参考。

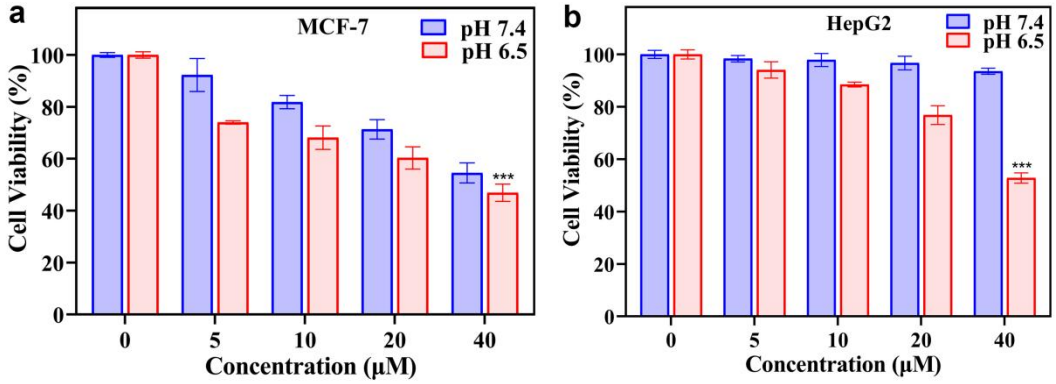

图 4.3 MTT 检测细胞活力。在 pH 7.4 和 pH 6.5 的条件下，分别使用不同浓度的 Trx-SPRR2A 处理（a）MCF-7 细胞和（b）HepG2 细胞，持续时间为 12 小时。随后，通过 MTT 法来检测这些细胞的相对活力。

Fig. 4.3 Cell viability was measured by MTT. Trx-SPRR2A was incubated with (a) MCF-7 cells and (b) HepG2 cells at pH 7.4 and pH 6.5 for 12 h. The relative cell viability was measured by MTT assay

4.3.4 结晶紫染色检测细胞活力

结晶紫，又称龙胆紫，是一种常用于组织或细胞染色的试剂，可将细胞核染

成深紫色，有助于评估细胞存活和生长增殖状况。本研究通过结晶紫染色检测了 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤活性。在 pH 7.4 和 pH 6.5 两种不同的环境下，分别用 4 个浓度（0、5、10、20 和 40 μM）的 Trx-SPRR2A 处理 MCF-7 细胞 12 小时，旨在评估不同酸碱环境与不同浓度下的 Trx-SPRR2A 对细胞活力的影响。如图 4.4a 所示，在两种 pH 条件下，Trx-SPRR2A 对 MCF-7 细胞生长的抑制均表现出浓度依赖性。但在弱酸性条件下，Trx-SPRR2A 对 MCF-7 细胞生长的抑制作用更加明显。进一步的定量分析也证实了这一现象。如图 4.4b 所示，与中性条件相比，pH 6.5 条件下的 Trx-SPRR2A 均表现出对 MCF-7 细胞更为显著的细胞毒性，尤其是在 40 μM 的浓度下，Trx-SPRR2A 使得细胞存活率降低至 49.28%。这些结果清晰地表明，在酸性环境下，Trx-SPRR2A 对肿瘤细胞生长的抑制效果更加明显。

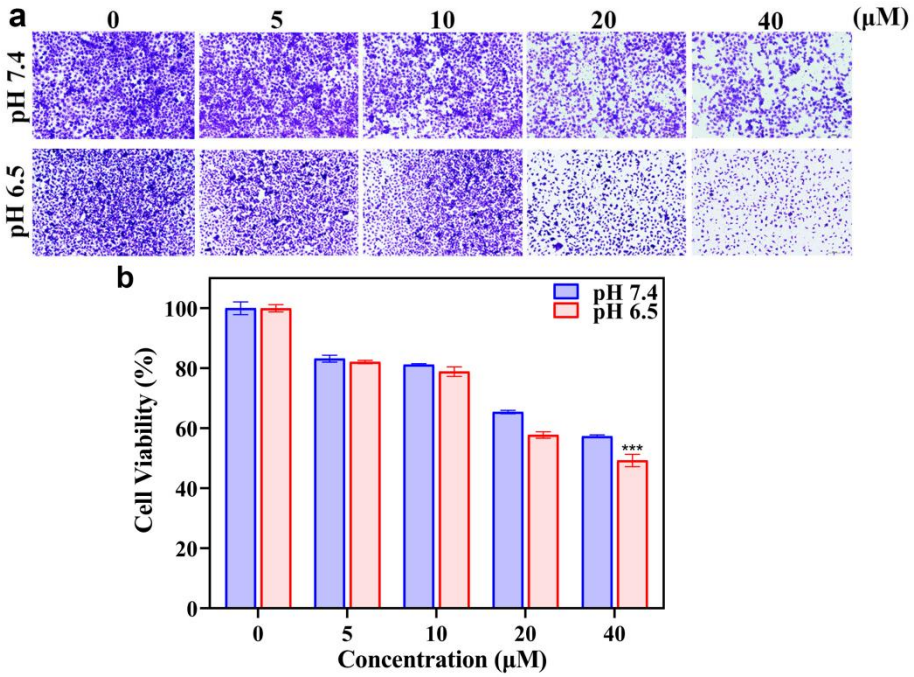

图 4.4 结晶紫染色检测细胞活力。（a）不同处理组细胞的结晶紫染色图片。标尺是 200 μm。（b）图 a 的定量分析结果。

Fig. 4.4 Crystal violet staining was used to detect cell viability. MCF-7 cells were treated with different concentrations of Trx-SPRR2A at pH 7.4 or 6.5, cell viability was detected by crystal violet staining. (a) Crystal violet staining images of cells from different treatment groups. The scale is 200 μm. (b) Quantitative analysis of (a).

4.3.5 Calcein-AM/PI 染色检测细胞活力

Calcein-AM 和 PI 作为两种常用的细胞染色试剂，它们可以通过不同的方式与细胞发生作用，从而区分活细胞和死细胞。Calcein-AM 可以使活细胞呈现绿色荧光，而 PI 这种染料仅能穿过受损的细胞膜，在死细胞中激发出红色荧光。这一特性使得这两种试剂成为检测活细胞和死细胞的有效工具。基于这一点，我们用 40 μM Trx-SPRR2A 在中性和弱酸性条件下处理 MCF-7 细胞 12 h 后，利用 Calcein-AM/PI 对其进行染色，进一步评估了 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤活性。如图 4.5 显示，在 pH7.4 的条件下，Trx-SPRR2A 处理组的大部分细胞呈现绿色荧光，少数细胞显示微弱的红色荧光；而在酸性条件下，大部分细胞发出强烈的红色荧光，这说明大部分细胞已经死亡。此结果表明，Trx-SPRR2A 在弱酸性条件下对 MCF-7 细胞的杀伤效果尤为显著。

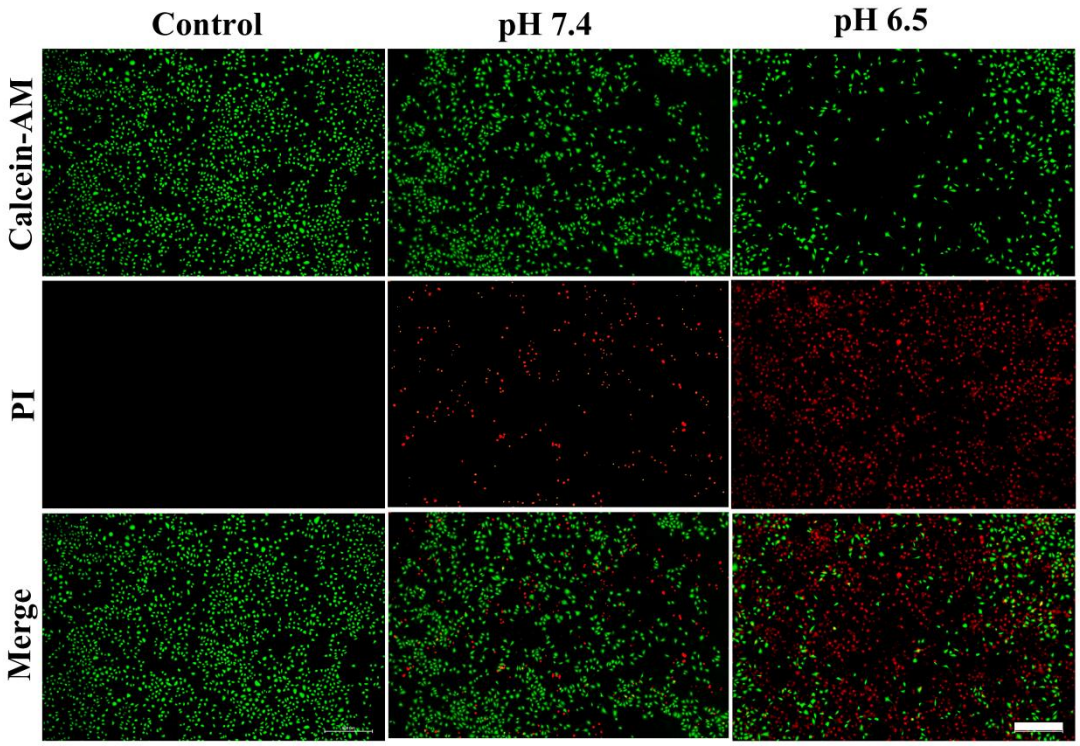

图 4.5 Trx-SPRR2A 在中性和酸性环境下处理 MCF-7 细胞后，通过 Calcein-AM/PI 染色采集图像（标尺：500 μm）。

Fig. 4.4 MCF-7 cells were treated with Trx-SPRR2A for 12 h under neutral or weakly acidic conditions, stained with Calcein-AM/PI and images were recorded with inverted fluorescent microscope (scale bar: 500 μm).

4.3.6 细胞膜通透性检测

PI 是一种常用的荧光探针，具有独特的性质：它仅能穿过受损的细胞膜并

与 DNA 结合，这一特性使得 PI 成为评估细胞膜通透性的理想工具。为了探究 Trx-SPRR2A 是否能通过破坏细胞膜的完整性，我们对处理后的细胞进行 PI 染色后，采用流式细胞术检测 MCF-7 细胞的通透性。结果如图 4.6 所示，在酸性条件下，经 20 μM 与 30 μM Trx-SPRR2A 处理 1 h 后，MCF-7 细胞中的 PI 摄取率显著高于对照组，PI 阳性细胞率分别达到 41.29%和 65.99%，表明 Trx-SPRR2A 可以在 1 h 之内快速有效地破坏细胞膜，从而导致细胞死亡。此外，我们还观察到 Trx-SPRR2A 引起的细胞膜通透性具有剂量依赖性。该结果证实：SPRR2A 通过破坏细胞膜的完整性来发挥抗肿瘤效应。

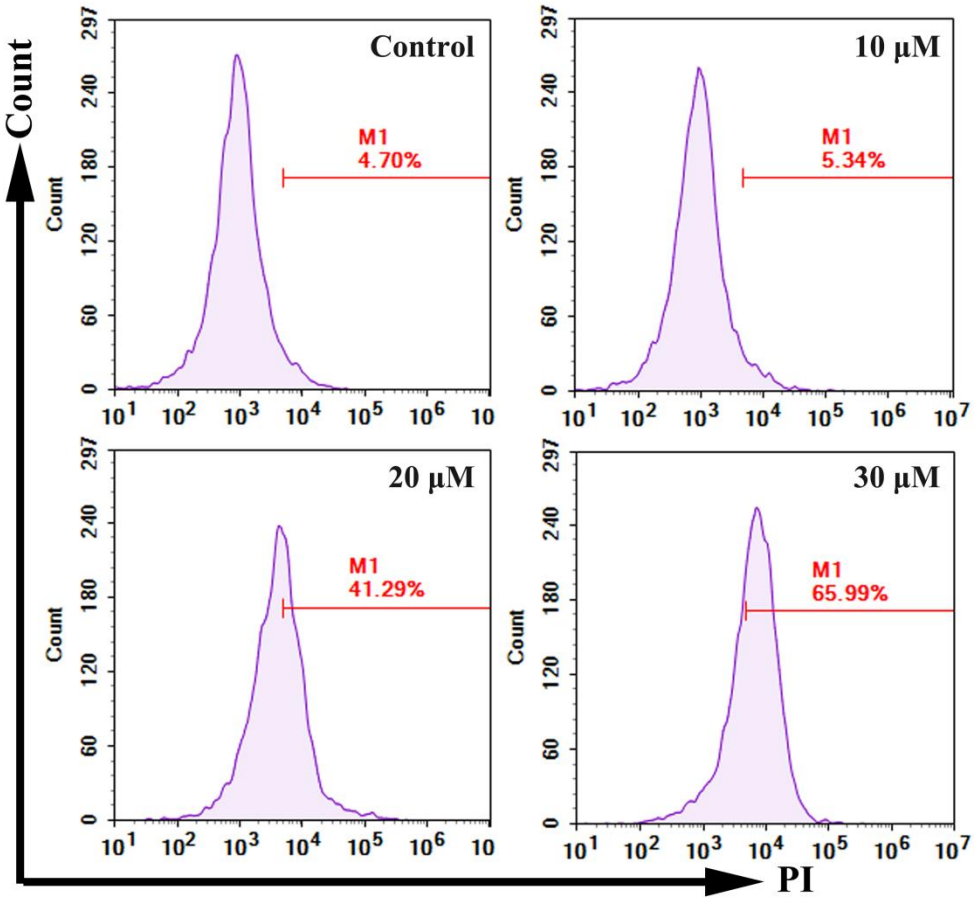

图 4.6 流式细胞仪检测细胞膜通透性。在 pH 6.5 条件下将不同浓度（0、10、20、30 μM）的 Trx-SPRR2A 分别与 MCF-7 细胞过夜孵育，PI 染色后，通过流式细胞仪进行检测。

Fig. 4.6 Cell membrane permeability was determined by flow cytomerey. MCF-7 cells were treated with different concentrations (0, 10, 20, 30 μM) of Trx-SPRR2A overnight at pH 6.5, stained with PI and analyzed by flow cytometry.

4.3.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

Annexin V 可以特异地与在细胞凋亡早期从膜内转移至膜外的磷脂酰丝氨酸（PS）结合，因此，它被视为一种检测 PS 暴露状况的探针，进而指示细胞是否处于凋亡状态。在凋亡晚期或坏死细胞中，由于细胞膜的损伤，PI 可以进入细胞内与 DNA 结合，因此，PI 可以被视为区分细胞凋亡或者坏死的指标[80]。通过结合使用 Annexin V 和 PI，可以分析细胞凋亡情况。为了探究 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤活性是否与诱导细胞凋亡相关，我们在 pH 7.4 和 pH 6.5 两种环境下将不同浓度（0、10、20、40 μM）的 Trx-SPRR2A 分别与 MCF-7 细胞过夜孵育，通过 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒处理，采用流式细胞仪和荧光倒置显微镜对细胞凋亡状况进行检测。如图 4.7（a）所示，弱酸性环境下，Trx-SPRR2A 处理组的细胞凋亡率相较于中性条件有所提高，且在 40 μM 时达到 30.86%。为了进一步验证这一结果，我们通过荧光倒置显微镜采集了细胞图像，如图 4.7（b）所示，与流式细胞仪检测结果一致。当细胞与含有 Trx-SPRR2A 的 pH 6.5 的 DMEM 培养基中孵育后，胞内的绿色荧光和红色荧光强度均显著增强，表明凋亡细胞比例增加；而中性条件下处理组细胞中的绿色荧光和红色荧光强度均相对较弱。以上研究结果表明，Trx-SPRR2A 可在弱酸性条件下有效诱导 MCF-7 细胞凋亡。这为进一步研究 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤作用机制提供了实验依据。

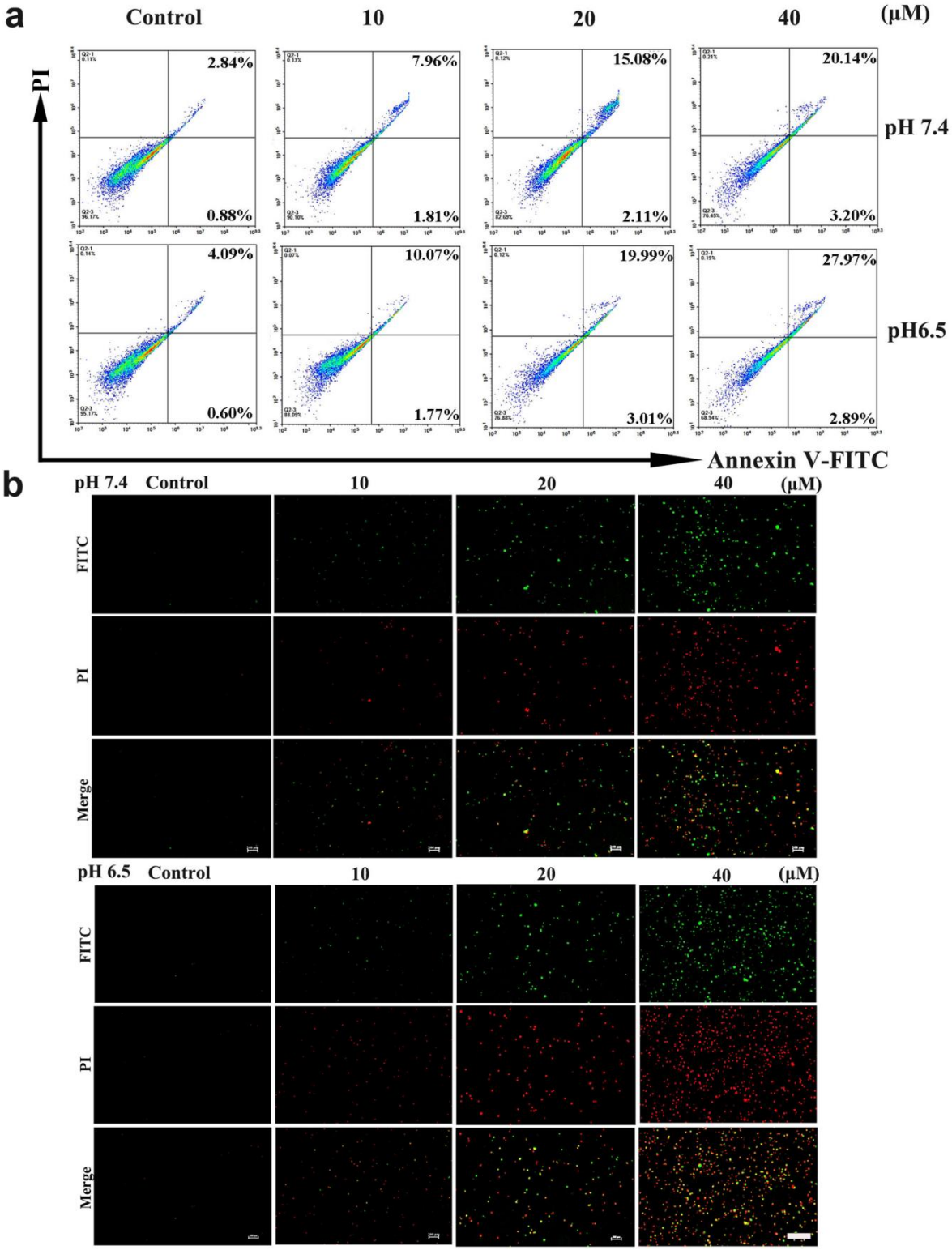

图 4.7 Annexin V-FITC/PI 双染法分析细胞凋亡。在 pH 7.4 和 pH 6.5 两种环境下将不同浓度（0、10、20、40 μM）的 Trx-SPRR2A 分别与 MCF-7 细胞过夜孵育，利用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒对细胞进行染色。(a)利用流式细胞术研究细胞凋亡状况。(b)荧光倒置显微镜观察细胞凋亡状况（标尺：200 μm）。

Fig 4.7 Apoptosis analysis by Annexin V-FITC/PI double staining assay. MCF-7 cells were

exposed to different concentrations (0, 10, 20, 40 μM) of Trx-SPRR2A overnight at pH 7.4 or 6.5, stained with Annexin V-FITC/PI double-staining kit, and cell apoptosis was analyzed by Flow cytometry (a) and inverted fluorescence microscope (b) (scale bar: 200 μm).

4.4 小结

为了探究 Trx-SPRR2A 在肿瘤治疗中的应用潜力，我们首先对 Trx-SPRR2A 进行了荧光标记。通过使用 FITC 对 Trx-SPRR2A 进行修饰，获得了 FITC-Trx-SPRR2A。接下来，我们通过紫外可见分光光度计对 FITC-Trx-SPRR2A 进行了检测，证明了标记成功。随后，我们研究了该蛋白的细胞内化行为。表明在 pH 6.5 的条件下，FITC-Trx-SPRR2A 能够更有效地被肿瘤细胞内吞。接着，我们通过 MTT 法、细胞膜通透性检测、Calcein-AM/PI 双染法等一系列实验手段研究了 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤活性。实验结果表明，Trx-SPRR2A 在弱酸性条件下可有效抑制 MCF-7 细胞的增殖。最后，我们证实 Trx-SPRR2A 可高效诱导 MCF-7 细胞凋亡。此研究为 Trx-SPRR2A 在肿瘤治疗中的应用奠定了基础，并为后续的深入研究提供了宝贵的参考依据。

5 结论

我们成功构建了重组质粒 pET32a-*SPRR2A*。在此基础上，我们使用 Rosetta-gami (DE3) pLysS 原核表达系统成功表达了富含二硫键的融合蛋白 Trx-SPRR2A。为了确保获得高纯度的目标蛋白质，我们采用镍柱亲和层析技术对蛋白质进行纯化。采用 SDS-PAGE、质谱技术、圆二色谱检测、高分辨质谱 Q-Exactive 质谱、血清稳定性测试一系列研究，我们全面了解了 Trx-SPRR2A 蛋白的性质，包括分子量、二级结构、热稳定性、二硫键配对以及血清稳定性。这些特性使得我们为之后 Trx-SPRR2A 的研究奠定了坚实基础。

为了评估由原核系统表达的 Trx-SPRR2A 的抗菌活性，我们选择了粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增多性李斯特菌以及柠檬酸杆菌作为实验对象，通过平板菌落计数、扫描电镜下观察、N01/PI 活死染色法以及 PI 摄取测定多种实验方法，研究了 Trx-SPRR2A 的抗菌活性，结果表明：Trx-SPRR2A 以浓度依赖的方式抑制革兰氏阳性细菌的生长，而对革兰氏阴性细菌的活性较弱。

为了评估由原核系统表达的 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤活性，我们在证实 FITC-Trx-SPRR2A 能够进入肿瘤细胞的基础上，通过 MTT 法、细胞膜通透性检测、Calcein-AM/PI 双染法等一系列实验手段，对 Trx-SPRR2A 的抗肿瘤活性进行了研究。实验结果表明，在酸性环境下，Trx-SPRR2A 可有效抑制 MCF-7 细胞的增殖，并触发细胞凋亡。

由于时间限制，部分科研任务尚待完成。为了更深入地探究 Trx-SPRR2A 的生物学功能，未来我们将致力于优化并完善相关研究，包括探讨 Trx-SPRR2A 在不同类型肿瘤细胞中的活性差异、评估 Trx-SPRR2A 在体内抗菌和抗肿瘤活性以及揭示 Trx-SPRR2A 的作用机制。本研究可为新型抗菌和抗肿瘤药物的研发提供新思路和理论依据。

参考文献

[1] Rangel K., Curty Lechuga G., Almeida Souza A. L., Carvalho J. P. R. D. S., Bôas H. S. V. et al. Pan-Drug resistant acinetobacter baumannii, but not other strains, are resistant to the bee venom peptide melittin[J]. *Antibiotics*, **2020**, 9, 178.

[2] Cassini A., Högberg L. D., Plachouras D., Quattrocchi A., Hoxha A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis[J]. *Lancet Infect. Dis*., **2019**, 19, 56-66.

[3] Rad P. M., Rahbarnia L., Safary A., ShadiDizaji A., Maani Z. et al. The synthetic antimicrobial peptide derived from melittin displays low toxicity and anti-infectious properties[J]. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **2023**, 1-11.

[4] Wang Y., Zhang Y., Lee W. H., Yang X., Zhang Y. et al. Novel peptides from skins of amphibians showed broad-spectrum antimicrobial activities[J]. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2016**, 419-424.

[5] Haney, EF., Mansour S.C., and Hancock R. E. W. Antimicrobial peptides: an introduction[J]. *Methods Mol Biol*, **2017**, 3-22.

[6] Gao X., Ding J., Liao C., Xu J., Liu X. et al. Defensins: the natural peptide antibiotic[J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2021**, 179, 114008-114008.

[7] Bechinger B., Gorr SU. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance[J]. *J. Dent. Res.*, **2017**, 96, 254-60.

[8] Júnior E. F. S., Menezes L. F. S., Araújo I. F. S. D. and Schwartz E. F. Natural occurrence in venomous arthropods of antimicrobial peptides active against protozoan parasites[J]. *Toxins*, **2019**, 11, 563-563.

[9] Tornesello L. A. ,Borrelli A. ,Buonaguro L., Buonaguro F. M. and Tornesello M. L. Antimicrobial peptides as anticancer agents: functional properties and biological activities[J]. *Molecules*, **2020**, 25, 2850.

[10] Zhang J., Zhang J., Wang Y., Zhang X., Nie T. et al. Strategies to improve the activity and biocompatibility: modification of peptide antibiotics[J]. *Foodborne Pathog. Dis.*, **2022**, 376-385.

[11] 吴家明,李芹. 抗菌肽的分类、作用机制与应用研究[J]. 安徽农学通报, **2024**,

30, 101-107.

[12] 张殿卿. 合成绵羊抗菌肽 NK-Lysin 的生物学功能及其对雏鸡沙门氏菌感染的治疗研究[D]. 石河子大学, **2014**.

[13] Fleming A., Allison V. Observations on a bacteriolytic substance (“lysozyme”) found in secretions and tissues[J]. *Br. J. Exp. Pathol.*, **1922**, 3, 252.

[14] Boman H. G., Nilsson I., Rasmuson B. Inducible antibacterial defence system in drosophila[J]. *Nature*, **1972**, 237, 232-235.

[15] 张家欣. 马铃薯内生菌的分离鉴定及 Chaetomium globosum 抗菌肽的筛选[D]. 华中农业大学, **2022**.

[16] 张凯瑛. 抗菌肽对肉鸡生长性能、养分利用率和肠道发育的影响[D]. 山东农业大学, **2021**.

[17] 吴清平. 细菌素的合成与作用机制. 微生物学通报, **2010**, 1519-1524.

[18] Kumar P., Kizhakkedathu N. J., Straus K. S. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo[J]. *Biomolecules*, **2018**, 8, 4.

[19] Dutta P., Sahu K. R., Dey T., Lahkar D. M., Manna P. et al. Beneficial role of insect-derived bioactive components against inflammation and its associated complications (colitis and arthritis) and cancer[J]. *Chem.-Biol. Interact.*, **2019**, 313, 108824.

[20] Reddy K., Yedery R., Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises[J]. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2004**, 24, 536-547.

[21] Anastasi A., Erspamer V., Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians bombina and alytes[J]. *Experientia*, **1971**, 27, 166-167.

[22] Ramanathan B., Davis G. E., Ross R. C., Blecha F. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity[J]. *Microbes Infect.*, **2002**, 4, 361-372.

[23] 彭博,郭中敏,陆家海. 人工合成抗菌肽的常用方法及应用前景[J]. 中国抗生素杂志, **2012**, 37, 176-183.

[24] Vasconcelos M. A., Silva B. R., Andrade A. L., Pinheiro A. A., Evaristo F. F. V. Antimicrobial and antibiofilm activity of synthetic peptide [W7] KR12-KAEK

against enterococcus faecalis strains[J]. *Curr. Microbiol*., **2023**, 80, 325.

[25] 童星琦. 广谱抗菌肽 RW-BP100-4D 的杀菌活性及安全性评价研究[D]. 江苏大学, **2022**.

[26] Harris F., Dennison R. S., Phoenix D. A.Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms[J]. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2009**, 10, 585-606.

[27] Almarwani B. ,Phambu N., Hamada Y. Z., Sunda-Meya A. Interactions of an anionic antimicrobial peptide with zinc(II): application to bacterial mimetic membranes[J]. *Langmuir*, **2020**, 36, 14554−14562.

[28] Wang G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides[J]. *Methods Mol Biol*., **2015**, 1268, 43–66.

[29] Chiangjong W., Chutipongtanate S., Hongeng S. Anticancer peptide: physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application[J]. *Int. J. Oncol.*, **2020**, 57, 678-696.

[30] Piotrowska U., Sobczak M., and Oledzka E. Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides-therapeutic agents and promising delivery vectors[J]. *Chem. Biol. Drug Des*., **2017**, 90, 1079-1093.

[31] Somma D. A., Moretta A., Canè C., Cirillo A., Duilio A. Antimicrobial and antibiofilm peptides[J]. *Biomolecules*, **2020**, 110, 652.

[32] Brady D., Grapputo A., Romoli O., Sandrelli F. Insect cecropins, antimicrobial peptides with potential therapeutic applications[J]. *Int J Mol Sci.*, **2019**, 20, 5862-5862.

[33] Lee T. H., Hall N. K., Aguilar M. I. Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure[J]. *Curr Top Med Chem.*, **2016**, 16, 25-39.

[34] Brogden K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?[J]. *Nat Rev Microbiol*, **2005**, 3, 238-250.

[35] Ciumac D., Gong H., Hu X., Lu J. R. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides[J]. *J Colloid Interface Sci.*, **2019**, 537, 163-185.

[36] Juhl D. W., Glattard E., Aisenbrey C., Bechinger B. Antimicrobial peptides: mechanism of action and lipid-mediated synergistic interactions within membranes[J]. *Faraday Discuss.*, **2021**, 232, 419-434.

[37] Li X., Zuo S., Wang B., Zhang K., Wang Y. Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides[J]. *Molecules*, **2022**, 27, 2675-2675.

[38] 司先懂,姜宏,董悦阳等. 重组抗菌肽的表达及其在饲料中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, **2023**, 59 ,67-73+79.

[39] Malanovic N., Lohner K. Antimicrobial peptides targeting gram-positive bacteria [J]. *Pharmaceuticals*, **2016**, 9, 59-59.

[40] Hussein M., Karas J. A., Schneider-Futschik E. K., Chen F., Swarbrick J. The killing mechanism of teixobactin against methicillin-resistant staphylococcus aureus: an untargeted metabolomics study[J]. *Msystems* ,**2020**, 5, e00077-20.

[41] Luo Y., Song Y. Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities[J]. *Int J Mol Sci*, **2021**, 22, 11401.

[42] Nguyen T. L., Haney F. E., Vogel J. H. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action[J]. *Trends Biotechnol.*, **2011**, 29, 464-472.

[43] Parchebaf A., Tamanaee F., Ehteram H., Ahmad E., Nikzad H. et al. The dual interaction of antimicrobial peptides on bacteria and cancer cells; mechanism of action and therapeutic strategies of nanostructures[J]. *Microb. Cell Fact.*, **2022**, 21, 118-118.

[44] Domalaon R., Findlay B., Ogunsina M., Arthur G., Schweizer F. Ultrashort cationic lipopeptides and lipopeptoids: evaluation and mechanistic insights against epithelial cancer cells[J]. *Peptides*, **2016**, 84 ,58-67.

[45] Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy[J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2015**, 93, 52-79.

[46] Huang F., Shu Q., Qin Z., Tian J., Su Z. et al. Anticancer actions of azurin and its derved peptide p28[J]. *Protein J*, **2020**, 39, 182-189.

[47] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L A et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, **2020**, 70, 313.

[48] Boopathi V., Subramaniyam S., Malik A., Lee G., Manavalan B. et al.

mACPpred: a support vector machine-based meta-predictor for identification of anticancer peptides[J]. *Int J Mol Sci*, **2019**, 20, 1964.

[49] Giuseppina I., Chieffallo M., Occhiuzzi M. A., Luca M. D., Garofalo A. et al. Anticancer drugs: recent strategies to improve stability profile, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties[J].*Molecules*, **2022**, 27, 5436.

[50] Zhang Y., He P., Zhang P., Yi X., Xiao C. et al. Polypeptides–drug conjugates for anticancer therapy[J]. *Adv Healthc Mater*, **2021**, 10, e2001974.

[51] Marqus S., Pirogova E., Piva T. J. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment[J]. *J Biomed Sci*, **2017**, 24, 21.

[52] Xu Y., Li Y.,Pan J., Kang X., Zhang X. et al. EM2D9, A monoclonal antibody against integrin α5β1, has potent antitumor activity on endometrial cancer in vitro and in vivo[J]. *Cancer Lett*, **2020**, 483, 66-74.

[53] Qiao Z., Zhao X., Wang K., Zhang Y., Fan D. et al. Utility of dynamic susceptibility contrast perfusion-weighted MR imaging and 11 c-methionine pET/ct for differentiation of tumor recurrence from radiation injury in patients with high-grade gliomas[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, **2019**, 40, 253-259.

[54] Leite M. L., Cunha N. B., Costa F. F. Antimicrobial peptides, nanotechnology, and natural metabolites as novel approaches for cancer treatment[J]. *Pharmacol Ther*, **2018**, 183, 160-176.

[55] 郭允峰,李晓坤,吴迪等. 抗癌肽抗癌作用机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30, 1875-1879.

[56] Vergote V., Burvenich C., Wiele C. V. D., Spiegeleer B. D. et al. Quality specifications for peptide drugs: a regulatory-pharmaceutical approach[J]. *J. Pept. Sci.*, **2009**, 15, 697-710.

[57] Baxter A. A.., Lay F. T., Poon L. K. H., Kvansakul M., Hulett M. D. et al. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects[J]. *Cell Mol Life Sci*, **2017**, 74, 3809-3825.

[58] Felício M. R., Silva O. N., Gonçalves S., Santos N. C., Franco O. L. Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities[J]. *Front Chem*, **2017**, 5, 5.

[59] Hou D., Hu F., Mao Y., Yan L., Zhang Y. et al. Cationic antimicrobial peptide

NRC-03 induces oral squamous cell carcinoma cell apoptosis via CypD-mPTP axis-mediated mitochondrial oxidative stress[J]. *Redox Biol*, **2022**, 54, 102355-102355.

[60] Wang D., He J., Dong J., Wu S., Liu S. et al. UM-6 induces autophagy and apoptosis via the Hippo-YAP signaling pathway in cervical cancer[J]. *Cancer Lett*, **2021**, 519, 12-19.

[61] Hu C., Huang Y., Chen Y. Targeted modification of the cationic anticancer peptide HPRP-A1 with iRGD To improve specificity, penetration, and tumor-tissue accumulation[J]. *Mol Pharm*, **2019**, 16, 561-572.

[62] Thankappan B., Sivakumar J., Asokan S., Ramasamy M., Pillai M. M. et al. Dual antimicrobial and anticancer activity of a novel synthetic α-helical antimicrobial peptide[J]. *Eur J Pharm Sci*, **2021**, 161, 105784.

[63] Pei P., Chen L., Fan R., Zhou X-R., Feng S. et al. Computer-Aided design of lasso-like self-Assembling anticancer peptides with multiple functions for targeted self-delivery and cancer treatments[J]. *ACS nano*, **2022**, 16, 13783−13799.

[64] Aghamiri S., Zandsalimi F., Raee P., Abdollahifar M-A., Tan S C et al. Antimicrobial peptides as potential therapeutics for breast cancer[J]. *Pharmacol Res*, **2021**, 171, 105777-105777.

[65] Selvarathinam K., Subramani P., Thekkumalai M., Vilwanathan R., Selvarajan R. et al. Wnt signaling pathway collapse upon β-catenin destruction by a novel antimicrobial peptide SKACP003: unveiling the molecular mechanism and genetic activities using breast cancer cell lines [J]. *Molecules*, **2023**, 28, 930-930.

[66] Zhang C., Yang M., Ericsson A. C. et al. Antimicrobial peptides: potential application in liver cancer[J]. *Front Microbiol*, **2019**, 10, 1257.

[67] Zeng J., Wang J., Wu J., Deng R., Zhang L. et al. A novel antimicrobial peptide M1-8 targets the lysosomal pathway to inhibit autolysosome formation and promote apoptosis in liver cancer cells[J]. *J Cell Mol Med*, **2023**, 27, 340-352.

[68] Li Y., Chen Z. RAPD: a database of recombinantly-produced antimicrobial peptides[J]. *FEMS Microbiol Lett*, **2008**, 289, 126-129.

[69] Parachin N. S., Mulder K. C., Viana A. A. B., Dias S. C., Franco O. L.

Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides[J]. *Peptides*, **2012**, 38, 446-456.

[70] 苗朝悦,杜乐,王佳琦等. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略[J]. 中国生物工程杂志, **2023**, 43, 33-45.

[71] Nguyen J. T., Fong J., Fong D., Fong T., Lucero R. M. et al. Soluble expression of recombinant midgut zymogen (native propeptide) proteases from the Aedes aegypti Mosquito Utilizing E. coli as a host[J]. *BMC Biochem*, **2018**, 19, 12.

[72] Villaverde A., Carrió M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies[J]. *Biotechnol Lett*, **2003**, 25, 1385-95.

[73] Manta B., Boyd D., Berkmen M. Disulfide bond formation in the periplasm of *Escherichia coli*[J]. *EcoSal*, **2019**, 8, 10-1128.

[74] Nguyen V. D., Hatahet F., Salo K. E., Enlund E., Zhang C. et al. Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of *E.coli*[J]. *Microb Cell Fact*, **2011**, 10, 1-13.

[75] Outram M. A., Sung Y. C., Yu D., Dagvadorj B., Rima S. A. et al. The crystal structure of SnTox3 from the necrotrophic fungus parastagonospora nodorum reveals a unique effector fold and provides insight into snn3 recognition and pro-domain protease processing of fungal effectors[J]. *New Phytol*, **2021**, 231, 2282-2296.

[76] Yu D. S., Outram M. A., Crean E., Smith A., Sung Y-C. et al. Optimized production of disulfide-bonded fungal effectors in Escherichia coli using CyDisCo and FunCyDisCo coexpression approaches[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, **2022**, 35, 109-118.

[77] Wongnak R., Brindha S., Yoshizue T., Onchaiya S., Mizutani K. et al. *E. coli* production of a multi-disulfide bonded SARS-CoV-2 Omicron BA.5 RBD exhibiting native-like biochemical and biophysical properties[J]. *Biophys Physicobiol*, **2023**, 20, e200036-e200036.

[78] Lobstein J., Emrich C. A., Jeans C., Faulkner M., Riggs P. et al. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm[J]. *Microb Cell Fact*, **2012**, 11, 56.

[79] Hu Z., Zhang C., Dominguez L. S., Zarek C. M., Propheter D. C. et al. Small proline-rich protein 2A is a gut bactericidal protein deployed during helminth infection[J]. *Science*, **2021**, 374, eabe6723-eabe6723.

[80] Shen W., Zhang Y., Wan P., An L., Zhang P et al. Antineoplastic drug-free anticancer strategy enabled by host-defense-peptides-mimicking synthetic polypeptides[J]. *Adv Mater*, **2020**, 32, e2001108.