

# 重组人 LIF 融合蛋白表达纯化及其活性鉴定

孙 静 王 斌 段志青 胡凝珠 李建芳 李彦涵 胡云章\*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室 昆明 650118)

**摘要** 目的: 原核表达重组 hLIF 融合蛋白并进行诱导表达、纯化及活性鉴定。方法: 将 hLIF 基因克隆至 pThioHisA 载体, 构建融合表达载体 pThioHisA-hLIF, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达。表达产物经亲和层析后, Western blot 检测目的蛋白的特异性。用小鼠胚胎干细胞脱饲养层培养对纯化后的重组 hLIF 融合蛋白进行生物活性的鉴定。结果: 降低诱导温度和延长诱导时间能增加 hLIF 融合蛋白的可溶性表达, 纯化后的重组蛋白纯度大于 95%, Western blot 检测显示了良好的特异性。在脱饲养层细胞培养条件下, 添加纯化的 hLIF 融合蛋白能够有效的维持小鼠胚胎干细胞的未分化状态。结论: 重组 hLIF 融合蛋白可在大肠杆菌中高效表达, 具有良好的特异性, 为干细胞研究及 hLIF 蛋白的其他功能研究奠定了基础。

**关键词** 重组人 LIF 融合蛋白 原核表达 纯化 小鼠胚胎干细胞 生物活性鉴定

**中图分类号** Q786

白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 是由 Tomida 于 1984 年研究鼠骨髓样白血病 M1 细胞时发现的, 它对鼠髓样白血病细胞具有抑制作用, 故根据其功能而得名。LIF 属于白介素 6 (IL-6) 细胞因子家族中的一员, 是一种多功能的细胞因子, 其靶细胞范围广泛, 包括胚胎干细胞、造血干细胞、神经细胞、肝细胞、脂肪细胞、成骨及破骨细胞、肾脏及乳房上皮细胞等。LIF 是典型的多功能生长因子, 对于细胞生长、增殖与分化有着广泛的作用, 与胚胎发育, 神经发育和造血系统的发育有着密切的联系, LIF 最显著的生物学功能是抑制胚胎干细胞的分化, 维持其多能性<sup>[1]</sup>。在不产生 LIF 或产生 LIF 的饲养层细胞时, 胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 即使在含有血清的培养基中, 也会向非神经细胞类型分化<sup>[2]</sup>。

自 1981 年小鼠 ESC 被发现以来, 人们利用多种培养方法来维持 ESC 的自我复制, 包括利用饲养层细胞培养和向培养基中加入细胞因子、生长因子、激素、胎牛血清或血清抽提物等。最经典的培养方法是利用血清和产生 LIF 的饲养层细胞共培养<sup>[3]</sup>。LIF 活化的 STAT3 信号途径是小鼠 ESC 维持未分化状态的必要条

件, 能够在血清存在的条件下促进培养的小鼠 ESC 的自我更新<sup>[2]</sup>。研究表明: 体外培养鼠 ESC 时, 既可以用鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) 作为饲养层, 也可以在培养基中添加 LIF 代替饲养层维持其未分化状态<sup>[4,6]</sup>。

构建含有人 LIF (hLIF) 基因的融合表达载体 pThioHisA-hLIF, 使硫氧还蛋白基因 (Trx) 与 hLIF 基因 N 端融合, 并诱导了重组 hLIF 融合蛋白的高效表达, 经纯化最终获得了纯度较高的蛋白, Western blot 实验证明其具有特异性, 并最终在小鼠胚胎干细胞脱饲养层培养体系中验证了重组 hLIF 融合蛋白的生物活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株

表达菌株 BL-21 (DE3) 购自北京天根生物公司; 表达载体 pThioHisA 购自 Invitrogen 公司; 克隆菌株 DH5 $\alpha$ , 携带有 hLIF 基因的载体 pTeasy-hLIF 由中国医学科学院医学生物学研究所保存。

### 1.2 试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、IPTG 和 DNA marker 购自 Takara 大连有限公司; 质粒提取试剂盒及总 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen; 逆转录试剂盒和 PCR

收稿日期: 2013-01-15 修回日期: 2013-03-22

\* 通讯作者, 电子信箱: huyunz@21.cn

试剂盒购自 Promega; One Step SYBR PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒购自 Takara 大连有限公司; 预染低分子量蛋白质 Marker 购自北京索宝莱; 层析填料购自 GE Healthcare; 羊抗人 LIF 多克隆抗体购自 Santa Cruz; 羊抗鼠 Oct4, Sox2, Nanog, Tublin 多克隆抗体购自 Millipore; HRP 标记的兔抗羊 IgG 购自中杉金桥; 碱性磷酸酶检测试剂盒购自碧云天; 酵母提取物和蛋白胨为 Oxoid 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 细胞株及培养基

M1 小鼠胚胎干细胞购自上海斯丹赛生物技术有限公司; DMEM 培养基, 胎牛血清, 谷氨酰胺, 非必需氨基酸, 胰蛋白酶购自 Gibco;  $\beta$ -巯基乙醇购自 Sigma; hLIF 蛋白购自 Peprotech; 青链霉素购自 Invitrogen。

ES 细胞培养液: DMEM 高糖培养基, 添加 15% 胎牛血清, 1 ng/ml 的 LIF, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 0.1 mmol/L 非必需氨基酸, 0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 100  $\mu$ g/ml 青链霉素双抗。

### 1.4 pThioHisA-hLIF 质粒构建

1.4.1 hLIF 基因的获取 PCR 扩增 hLIF 基因的引物由 Invitrogen 公司合成, 引入酶切位点以下划线表示。pTha-hLIF (For): 5'-CCGGAATTCATGAAGCTCTTGGC GGCAGG-3' (酶切位点 EcoR I); pTha-hLIF (Rev): 5'-ACGCGTCGACTTACTAGAAGGCCTGGGCC-3' (酶切位点 Sal I); 以 pTeasy-hLIF 为模板, 用引物 pTha-hLIF (For) 和 pTha-hLIF (Rev) 进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94℃, 5 min; 94℃, 30 s; 50℃, 40 sec; 72℃, 1 min; 30 个循环; 72℃ 8 min; 终止反应。

1.4.2 重组质粒的构建和转化 将 PCR 胶回收产物用限制性内切酶双酶切 (及) 与相同酶切处理的质粒 pThioHisA 连接, 转化宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 双酶切鉴定阳性克隆, 由华大基因公司测序验证其正确性。

### 1.5 重组 hLIF 融合蛋白的表达、表达条件的优化

将构建的重组质粒 pThioHisA-hLIF 转化到 BL-21 (DE3) 菌中, 以 IPTG 诱导, 优化表达件, SDS-PAGE 鉴定。将 pThioHisA-hLIF/BL21 阳性克隆接种于含有 50  $\mu$ g/ml 氨苄西林的 5 ml LB 培养基, 同时以空载体 pThioHisA 转化的大肠杆菌 BL-21 (DE3) 作为阴性对照, 37℃ 培养 12 h 后 1:200 接种于含新鲜 LB 培养基的摇瓶。

诱导时间的优化: 当  $OD_{600}$  达 0.4~0.6 时, 以 1:1 000 比例加入浓度为 0.1 mol/L 的 IPTG 诱导, 降低诱导温度至 25℃<sup>[7-8]</sup>, 之后在第 4 h, 6 h, 8 h 分别取样; SDS-

PAGE 鉴定, 确定最佳的表达时间。

诱导剂浓度的优化: 当  $OD_{600}$  达 0.4~0.6 时, 分别以终浓度 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mmol/L 的 IPTG 25℃ 诱导培养; SDS-PAGE 鉴定, 确定最佳诱导剂浓度。

### 1.6 重组 hLIF 融合蛋白的纯化

收集 hLIF 融合蛋白诱导表达后的菌液, 离心后以 A 液 (20 mmol/L PBS, pH 7.8, 0.5 mol/L NaCl) 重悬, 在冰浴中超声破菌, SDS-PAGE 电泳分析破菌情况。10 000 r/min 离心 20 min, 分离上清, 将上清液通过  $Ni^{2+}$  固相化的 Chelating Sepharose F.F 亲和柱后, 用 2 倍体积以上的 A 液洗柱, B 液 (A 液中加入咪唑至终浓度 250 mmol/L) 洗脱目的蛋白<sup>[8]</sup>, 收集洗脱峰进行 SDS-PAGE 分析。取亲和层析后的目的蛋白, 用 Bradford 法测定蛋白含量。

### 1.7 Western blot 检测纯化蛋白

电泳后, 将凝胶上的蛋白用半干法转移至 PVDF 膜上, 用封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 1  $\times$  PBS) 封闭 2 h, 用羊抗人 LIF 多克隆抗体作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 作为二抗, 分别在室温作用 2 h, 用 ChemiDoC-It (UVP) 化学发光检测仪进行检测。

### 1.8 重组 hLIF 融合蛋白生物学活性测定

用小鼠 ESC 脱饲养层培养来对纯化后的重组 hLIF 融合蛋白进行生物活性的鉴定。将纯化后的重组 hLIF 融合蛋白与市售的商品化 hLIF 蛋白 (Peprotech) 作比较。将纯化的 hLIF 融合蛋白和商品化 hLIF 蛋白分别加入培养基中, 终浓度调整至 10 ng/ml。以不加 hLIF 蛋白培养的小鼠 ESC 作为阴性对照。

1.8.1 小鼠 ESC 的传代 M1 小鼠 ESC 接种于用 0.1% 明胶包被过的 T25 培养瓶后 3 d, 吸去原培养液, 加入 10 ml PBS 洗涤 1 次。加入 1 ml 0.25% 胰蛋白酶, 37℃ 消化 5 min, 加入 5 ml ES 细胞培养液终止消化, 用吸管轻轻吹打, 移入 15 ml 离心管中, 1 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清。加入 ES 细胞培养液, 吹打成细胞悬液。按 1:6 或 1:8 的比例移入已预先包被过明胶的 T25 培养瓶中, 补充适量的培养液至总体积为 10 ml, 放入 37℃, 5%  $CO_2$  培养。每天更换新鲜的 ES 细胞培养液。

1.8.2 RT-PCR 检测 用 Trizol 提取连续传代 5 次后的小鼠 ESC 总 RNA, 按 One Step SYBR PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒说明书进行 realtime RT-PCR 检测。用 Bio-Rad CFX-96 实时定量 PCR 仪检测细胞内 Oct-4, Sox-2, Nanog 基因 mRNA 的表达水平。以 GAPDH 为内参, 所得 Ct 值以  $2^{-(\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}})}$  方式进行

mRNA 相对含量换算。

表 1 PCR 用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')	Expected lengths
Oct4f	GGGAGGAGCTAGGGAAGAAACCT	142bp
Oct4r	GAACCTCACCTTCCCTCCAACCAGT	
Nanogf	ATGGAGGGTGGAGTATGGTTGG	206bp
Nanogr	AGGCTGAGGCAGGAGAATGG	
Sox2f	TTAGAGCTAGTCTCAAGCGACGA	289bp
Sox2r	CCACAGAGATGGTTCGCCAG	
GAPDHf	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	252bp
GAPD Hr	AGGGGCCATCCACAGTCTTC	

1.8.3 Western blot 检测 收集连续传代 5 次后的细胞,样品经 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印到 PVDF 膜上进行 Western blot 分析。一抗为羊抗鼠 Oct-4, Sox-2, Nanog 多克隆抗体(1:1 000),内参为羊抗鼠 Tubulin(1:1 000)。二抗为 HRP 标记的兔抗羊 IgG(1:5 000),使用 Supersignal West Pico HRP 化学发光底物进行化学发光,用 ChemiDoc-It(UVP)化学发光检测仪进行检测。

1.8.4 碱性磷酸酶(AKP)染色 连续传代 5 次后,按照碱性磷酸酶(AKP)显色试剂盒的说明,先将细胞用多聚甲醛固定,然后用 PBST 溶液清洗 3 次;之后加入显色液于 37℃ 孵育 15min,然后用蒸馏水终止反应;晾干,镜检。

## 2 结果

### 2.1 hLIF 基因扩增产物及重组质粒的鉴定

hLIF 基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见约 609bp 的特异片段,大小与理论值相符,见图 1。经 DNA 序列测定,与 GenBank 中(NM\_002309.3)基因序列相同。pThioHisA- hLIF 经酶切鉴定,可见大小为 4.4kb 和 609bp 的片段,与预期大小完全相符,见图 1。

### 2.2 hLIF 融合蛋白诱导表达条件的优化

表达产物(总菌体蛋白)经 15% SDS-PAGE 分析, IPTG 浓度为 0.1mmol/L 时,25℃ 诱导 8h 目的蛋白的表达量达到最大,在相对分子质量约 36kDa 处可见 Trx-hLIF 融合蛋白条带(带 his 标签的硫氧还蛋白大小约 16kDa, hLIF 蛋白大小约 20kDa),大小与预期相符,见图 2a。目的蛋白的表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。分别以终浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1mmol/L 的 IPTG 诱导培养 8h, 结果表明 IPTG 诱导浓度为 0.1mmol/L 以上对蛋白表达没有明显的作用,因此确定以 0.1mmol/L IPTG 诱

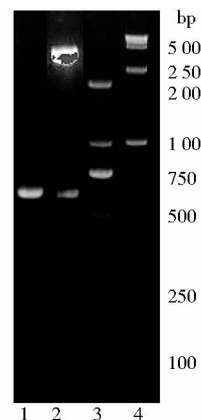


图 1 hLIF 基因 PCR 扩增产物及重组阳性克隆的凝胶电泳分析

Fig. 1 Analysis of PCR amplified hLIF fragment and restriction map of recombinant plasmid

1: Amplified hLIF fragment; 2: pThioHisA-hLIF digested with *EcoRI* and *SalI*; 3: DNA marker DL2000; 4: DNA marker DLI 5000

导浓度、8h 的诱导时间可达到最佳表达,见图 2b。

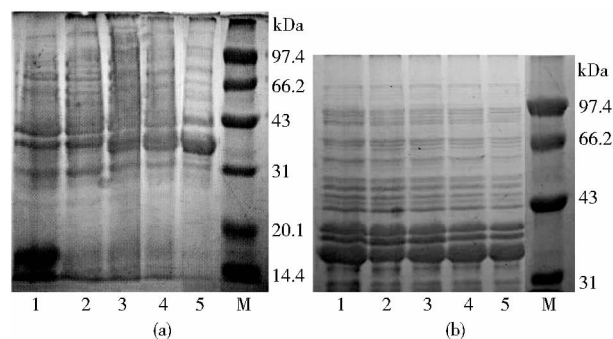


图 2 hLIF 融合蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 15% SDS-PAGE analysis of hLIF fusion protein expressed in *E. coli*

2a: 1: induced *E. coli* BL21 containing pThioHisA; 2: uninduced *E. coli* BL21 containing pThioHisA-hLIF; 3 ~ 5: *E. coli* BL21 containing pThioHisA-hLIF was induced by 0.1mmol/LIPTG for 4h, 6h, 8h, respectively; M: protein marker 2b: 1 ~ 5: *E. coli* BL21 containing pThioHisA-hLIF was induced for 8h by 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1mmol/LIPTG, respectively; M: protein marker

菌体裂解沉淀和上清中均有目的蛋白表达,可溶性表达的量随诱导时间的延长而增加,诱导 8h 可溶性表达的量显著高于包涵体,见图 3。因此,降低诱导温度,延长诱导时间可以获得 hLIF 融合蛋白的高效可溶性表达。

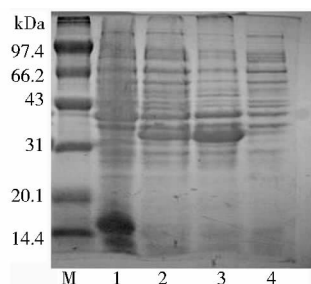


图3 hLIF 融合蛋白可溶性表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 15% SDS-PAGE analysis of hLIF fusion protein soluble expression

M: Protein marker; 1: Total protein of *E. coli* BL21 containing pThioHisA induced for 8h; 2: Total protein of *E. coli* BL21 containing pThioHisA-hLIF induced for 8h; 3: Soluble product of *E. coli* BL21 containing pThioHisA-hLIF induced for 8h; 4: Inclusion bodies of *E. coli* BL21 containing pThioHisA-hLIF induced for 8h

### 2.3 重组 hLIF 融合蛋白的纯化

超声破菌后,离心收集破菌上清液。将上清通过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜后,经  $\text{Ni}^{2+}$  固相化的 Chelating F.F 柱亲和层析,SDS-PAGE 分析,约 36kDa 处获得纯度大于 95% 的蛋白,见图 4。

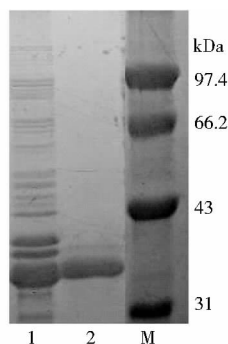


图4 重组 hLIF 融合蛋白的层析分离纯化

SDS-PAGE 电泳分析

Fig.4 15% SDS-PAGE analysis of chromatography for separation and purification of recombinant hLIF fusion protein

1:hLIF fusion protein before purification;2:hLIF fusion protein after purification;M:Protein marker

### 2.4 重组 hLIF 融合蛋白的 Western blot 检测

对纯化后的蛋白进行 Western blot 分析,结果显示抗 hLIF 特异性条带,而对照菌体无此条带,表明重组 hLIF 蛋白能够与抗 hLIF 抗体发生特异性结合,见图 5。

### 2.5 重组 hLIF 融合蛋白的生物学活性测定

小鼠 ES-M1 细胞经过 5 次传代(10 ~ 15d 后),用

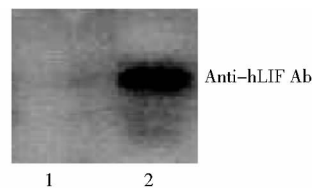


图5 纯化的重组 hLIF 融合蛋白的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot of purified recombinant hLIF fusion protein

1: Uninduced *E. coli* BL21 containing pThioHisA-hLIF;  
2: Recombinant hLIF fusion protein after purification

realtime RT-PCR 和 Western blot 方法检测 Oct-4, Sox-2, Nanog 未分化标志基因的表达。结果发现:小鼠 ES-M1 细胞脱饲养层添加纯化的 hLIF 融合蛋白(Trx-hLIF)或商品化 hLIF 蛋白(C-hLIF)培养后,仍能维持良好的克隆状生长,保持未分化状态,胚胎干细胞标志性基因在 mRNA 水平及蛋白质水平变化没有明显的差别;而不添加 hLIF 因子培养基(w/o-hLIF)中的细胞,其干性标志基因的表达显著性地降低(图 6a、b)。

用多聚甲醛固定细胞后,经 AKP 染色观察发现,添加纯化的 hLIF 融合蛋白和商品化 hLIF 蛋白后,细胞 AKP 染色呈阳性,而未添加 hLIF 因子培养基中的细胞,部分产生分化,AKP 染色呈阴性(图 6c)。

## 3 讨 论

LIF 是一种具有广泛生物学功能的细胞因子,人们经过近 30 年的研究发现了其许多重要的功能,然而 LIF 的研究尚需进一步深入和拓展,因此表达 LIF 蛋白具有重要的基础研究和应用研究价值。

*hLIF* 基因为单拷贝基因,位于染色体的 22q12.1-12.2,长度大约为 6.3kb,含有 3 个外显子、2 个内含子及 5'端和 3'端侧翼非编码区。*hLIF* 基因的 cDNA 编码序列大约为 609bp, hLIF 蛋白由 180 个氨基酸残基组成,其核心蛋白分子量为 20kDa。鼠和人 *LIF* 基因显示出 78% ~ 94% 的同源性,而在氨基酸水平鼠和人的 LIF 具有 79% 的同源性。

硫氧还蛋白(Trx)是一种分子量大小约 12kDa 的氧化还原蛋白,是还原蛋白质二硫键的催化剂,普遍存在于生物体内。它能减轻重组蛋白在宿主菌中的毒性,阻止目的蛋白的降解、加速重组蛋白的可溶性表达<sup>[7]</sup>,因此 Trx 基因融合表达系统有助于在大肠杆菌中表达高产量的可溶性蛋白。本研究采用 PCR 方法扩增

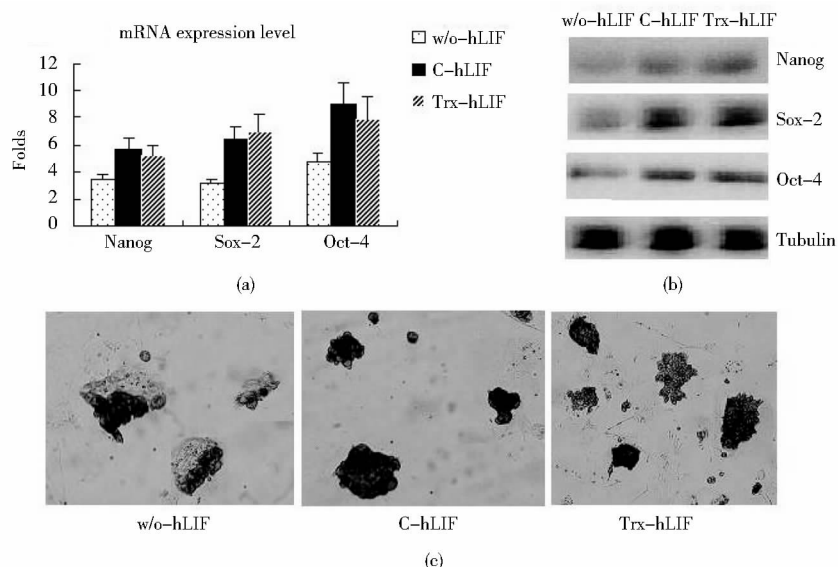


图6 干细胞未分化标志的检测

Fig. 6 Detection of stem cell markers associated with undifferentiated cells

a; Realtime RT-PCR b; Western blot c; Alkaline phosphatase (AKP) staining ( $\times 100$ ); w/o-hLIF: Culture medium without hLIF; C-hLIF: Culture medium with Peprotech hLIF; Trx-hLIF: Culture medium with purified recombinant hLIF fusion protein

出 hLIF 基因, 插入原核表达载体 pThioHisA, 使 hLIF 基因与 Trx 基因融合表达, 不仅能提高表达效率, 而且方便后续的纯化。通过在 BL21 (DE3) 菌中获得高效的表达, 表达产物以包涵体和可溶性两种形式存在, 降低诱导温度和延长 IPTG 的诱导时间可增加可溶性表达。将超声破菌后的上清经亲和和层析纯化后, 获得了高纯度的重组蛋白, Western blot 表明蛋白具有特异性。

ESC 的无饲养层培养常用的方法是在培养液中加入外源 LIF 和使用能分泌 LIF 的细胞制备条件培养基等<sup>[9-11]</sup>。研究证明在脱饲养层细胞培养条件下, 添加浓度为 10 ng/ml 纯化的 hLIF 融合蛋白能够同样有效的维持小鼠 ESC 的未分化状态, 因此说明 hLIF 融合蛋白的 N 末端融合表达并不影响其本身的生物学活性。在常见的 pThioHisA 融合表达系统中, 一般会用肠激酶将表达纯化出的融合蛋白的 Trx 融合头切下, 但因此带来的问题是切割效率低, 增加分离纯化的步骤。利用简单而有效的重组 hLIF 融合蛋白表达、纯化方法, 减少了纯化步骤, 降低了研究成本, 为其他细胞因子、蛋白的开发和利用提供了有利的借鉴。

**致谢** 此研究为协和医学院青年科研基金“microRNA 诱导人胚肺二倍体细胞 (KMB17) 向肝细胞转分化研究”项目资助, 特表感谢。

## 参考文献

- [1] 葛秀国, 徐小明, 李勇, 等. 白血病抑制因子与胚胎干细胞. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 22-30.  
Ge XG, Xu XM, Li Y, et al. Leukemia inhibitory factor and embryonic stem cells. China Biotechnology, 2003, 23(12): 22-30.
- [2] Cartwright P, McLean C, Sheppard A, et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. Development, 2005, 132(5): 885-896.
- [3] Guasch G, Fuchs E. Mice in the world of stem cell biology. Nat Genet, 2005, 37(11): 1201 - 1206.
- [4] Smith A G, Heath J K, Donaldson D D, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature, 1988, 336(6200): 688-90.
- [5] Williams R L, Hilton D J, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature, 1988, 336(6200): 684-687.
- [6] Hanna J, Cheng A W, Saha K, et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(20): 9222 - 9227.
- [7] Tomala M, Lavrentieva A, Moretti P, et al. Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant Escherichia coli using thioredoxin as fusion partner. Protein Expr Purif, 2010, 73(1): 51-57.

- [ 8 ] Imsoonthornruksa S, Noisa P, Parnpai R, et al. A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor ( hLIF ) fusion protein in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2011, 151 ( 4 ) :295-302.
- [ 9 ] 韩甫,叶荣,鲍柳君,等. 小鼠胚胎干细胞无饲养层培养及其生物学特性. *苏州大学学报(医学版)*, 2009, 29(2) :204-206.
- Han F, Ye R, Bao L J, et al. Culture of mouse embryonic stem cells and their biological features without feeder layer cells. *Suzhou University Journal of Medical Science*, 2009, 29 ( 2 ) : 204-206.
- [ 10 ] 刘登华,张苏明,闫秋月,等. 无饲养层条件原代培养小鼠胚胎干细胞的实验研究. *神经损伤与功能重建*, 2011, 6(3) :157-160.
- Liu D H, Zhang S M, Yan Q Y, et al. Culture of mural embryonic stem cells under feeder-free condition. *Neural Injury and Functional Reconstruction*, 2011, 6(3) :157-160.
- [ 11 ] 赵政凯,刘畅,刘福强,等. 饲养层细胞体系及白血病抑制因子对维持小鼠胚胎干细胞未分化状态的作用. *解剖科学进展*, 2009, 15(3) :283-285,289.
- Zhao Z K, Liu C, Liu F Q, et al. Effect of feeder layer culture system and leukemia inhibitory factor on keeping mouse embryonic stem cells in undifferentiation. *Progress of Anatomical Sciences*, 2009, 15(3) :283-285,289.

## Expression, Purification and Bioactivity Identification of Recombinant Human Leukemia Inhibitory Factor ( hLIF ) Fusion Protein

SUN Jing WANG Bin DUAN Zhi-qing HU Ning-zhu LI Jian-fang LI Yan-han HU Yun-zhang

(Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

**Abstract** Objective: To express recombinant human Leukemia inhibitory factor ( hLIF ) fusion protein in prokaryotic cells, purify and identify the bioactivity of expressed product. Methods: The *hLIF* gene was cloned into vector pThioHisA, and the constructed recombinant plasmid pThioHisA-hLIF was transformed to *E. coli* BL21 ( DE3 ) for expression under induction of IPTG. After the expression product was purified by affinity chromatography, the fusion protein was tested for its specificity by western blot detection. To assess the bioactivity of the hLIF fusion protein expressed in *E. coli*, it was tested to maintain the pluripotency of the mouse embryonic stem cells in feeder-independent culture system. Results: Lower the induction temperature and prolong the induction time can increase soluble hLIF fusion protein expression. The recombinant protein reached a purity of more than 95% after purification, and its specificity was successfully proved by western blot detection. In feeder-independent culture system, adding hLIF fusion protein can effectively maintain the mouse embryonic stem cells in an undifferentiated state. Conclusion: The recombinant hLIF fusion protein was highly expressed in *E. coli* and showed good specificity, which lay the foundation for stem cells research and further research on hLIF biological functions.

**Key words** Recombinant hLIF fusion protein Prokaryotic expression Purification Mouse embryonic stem cells Bioactivity identification