

## · 论 著 ·

## STAT3 蛋白表达与纯化

蔡欣宏 刘千慧 卢淑珍 徐 伟\* 许 文\*

福建中医药大学药学院 福建福州 350122

**【摘要】目的** 开展信号转导及转录激活因子 3 (STAT3) 蛋白在原核系统内进行表达, 筛选出不同诱导温度、IPTG 浓度下最佳的表达条件, 并进行大量表达纯化, 获得 STAT3 纯化蛋白, 为 STAT3 蛋白功能研究奠定基础。**方法** 利用大肠杆菌系统表达 STAT3, 转化至 Rosetta-gami (DE3) pLysS、Rosetta-gami 2 (DE3)、BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达, 优化表达条件。最后通过 Ni-NTA 琼脂糖纯化树脂纯化和分子排阻层析技术进一步纯化蛋白。**结果** 将 STAT3 质粒成功转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞并优化出最佳表达条件为 16 °C、0.2 mM IPTG 诱导 18 h, 利用 His 标签与钴亲和层析填料柱结合纯化出目的蛋白, 最后运用 ÄKTA pure 层析系统进一步纯化。**结论** 成功表达出 STAT3 蛋白, 筛选出最佳的诱导条件和蛋白纯化条件, 为后续进一步筛选靶向 STAT3 的天然产物及结构功能研究奠定基础。

**【关键词】** STAT3; 蛋白表达; 蛋白纯化

**【中图分类号】** R737

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1009-4393 (2026) 06-002-03

**【基金项目】** 资助课题: 福建省卫健委中青年科研重大项目 (2023ZQNZD017)

信号转导及转录激活因子 3 (STAT3) 是 STAT 蛋白家族中研究最为深入的成员之一, 也是一种关键的细胞内信号转导蛋白与转录因子。STAT3 广泛存在于多种组织和细胞类型中, 在胚胎发育、细胞增殖、分化、存活及免疫调节等生理过程中发挥着不可或缺的作用。STAT3 作为连接细胞膜受体信号与核内基因转录的核心枢纽, 其活性受到酪氨酸和丝氨酸磷酸化修饰的严密调控。在炎症<sup>[1]</sup>、自身免疫性疾病<sup>[2]</sup>、心血管疾病<sup>[3]</sup>、多种恶性肿瘤<sup>[4]</sup>及神经退行性疾病<sup>[5]</sup>的发生发展中, STAT3 的异常持续激活均体现出极其重要的推动作用。白介素-6 (IL-6) 家族细胞因子是 STAT3 最主要的激活信号, 通过 JAK 激酶介导的磷酸化级联反应, STAT3 被招募至受体复合物并形成同源二聚体, 随后转位至细胞核内启动下游靶基因的转录<sup>[6]</sup>。STAT3 调控的靶基因广泛涉及细胞周期 (如 Cyclin D1)、抗凋亡分子 (如 Bcl-xL、Survivin)、血管生成因子 (如 VEGF)、基质金属蛋白酶 (MMPs) 以及免疫检查点分子 (如 PD-L1) 等。因此, STAT3 信号通路的持续性活化不仅直接驱动肿瘤细胞的增殖、存活、侵袭与转移, 还与心脏肥大、冠心病等病因密切相关<sup>[4]</sup>。靶向 STAT3 的药物发现已成为改善心脏重塑、抗肿瘤和抗炎症性疾病治疗领域的研究热点。在体外获得高纯度且具有生物学活性的 STAT3 蛋白, 可为后续的抑制剂筛选、药物作用机制的验证以及蛋白质结构与功能关系的研究奠定关键基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、试剂

重组质粒 pCDFDuet-1-stat3-V2 委托北京擎科生物公司构建, BL21 (DE3) 感受态细胞为实验室保存菌种, 酵母提取物、胰蛋白胍均购自英国 Oxoid 公司; 咪唑、IPTG、链霉素、HEPES 和预染彩虹蛋白 Marker 均购自大连美仑生物技术有限公司; SDS 均购自合肥兰杰柯科技有限公司; NaCl 和 DTT 均购自北京兰博利德商贸有限公司。Ni-NTA 购自德国 Qiagen 公司。

作者简介: 蔡欣宏, 男, 硕士研究生在读, 从事中药质量控制研究。

\* 通讯作者: 徐伟, 男, 教授, 从事中药药效物质基础研究。

\* 通讯作者: 许文, 男, 副教授, 从事中药药效物质基础研究。

### 1.2 溶液配制

Lysis buffer 的配制: 20 mM HEPES pH 8.0, 200 mM NaCl; Buffer A1 的配制: 20 mM HEPES pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM 咪唑; Buffer A2 的配制: 20 mM HEPES pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM 咪唑; Buffer B 的配制: 20 mM HEPES pH 8.0, 200 mM NaCl, 200 mM 咪唑; 分子筛 buffer 配制: 20 mM HEPES pH 8.0, 200 mM NaCl; 1000× 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 溶液的配制: 用电子天平称取 4.8 g 的 IPTG 置于烧杯中, 加 RO 水定容至 50 mL, 在超净台中用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤除菌后收集至无菌管中, -80 °C 低温保存; 1000 × 链霉素溶液的配制: 用电子天平称取 2.5 g 的链霉素置于烧杯中, 加纯水定容至 50 mL, 在超净台中用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤除菌后收集至无菌管中, -80 °C 低温保存。

### 1.3 感受态的确定

将 STAT3 质粒分别转化至 Rosetta-gami (DE3) pLysS、Rosetta-gami 2 (DE3)、BL21 (DE3) 感受态细胞, 并涂布至含有链霉素溶液的 LB 固体平板上, 37 °C 培养过夜。分别挑取单克隆菌落, 转入含有 5 mL LB 液体培养基的摇菌管中, 200 rpm 37 °C 培养至 OD600 值 0.8 时, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG, 在 18 °C 下诱导 18 h。最后 4000 rpm 离心 10 min 收集菌体。

### 1.4 诱导浓度的确定

将 STAT3 质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 按照 1.3 的方法将菌液在摇菌管中培养至 OD600 值 0.8 时, 分别加入终浓度为 0.1、0.2、0.4 mmol/L IPTG, 在 18 °C 下诱导 18 h。最后 4000 rpm 离心 10 min 收集菌体。

### 1.5 诱导温度的确定

将 STAT3 质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 按照 1.3 的方法将菌液在摇菌管中培养至 OD600 值 0.8 时, 分别加入终浓度为 0.2 mmol/L IPTG, 分别在 12 °C、16 °C、18 °C、37 °C 下诱导 18 h。最后 4000 rpm 离心 10 min 收集菌体。

### 1.6 蛋白大量纯化

#### 1.6.1 细菌破碎

将 STAT3 质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 冰浴 30

min 后 37℃ 热激 5 min, 加入 300 μL LB 培养基, 37 °C 200 rpm 培养 1-2h 后, 涂到链霉素抗性的固体平板上, 37℃ 在生化培养箱中过夜培养。挑取单克隆菌落, 转入含有 100 mL LB 液体培养基的小瓶中, 将菌液在摇菌瓶中培养至 OD<sub>600</sub> 值 0.8 时, 取 5 mL 转入含有 1L LB 液体培养基的摇菌瓶中, 37 °C 200 rpm 培养至 OD<sub>600</sub> 值 0.8 时, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG, 16 °C 诱导 18 h。最后 5000 rpm 离心 10 min 收集菌体。

1.6.2 蛋白纯化

取 10 mL 菌体, 加入 50 mL lysis buffer 混合均匀后, 使用低温超高压连续流细胞破碎仪, 压力 1000 bar 左右, 连续破碎 4-5 次, 直至菌液成水滴状不粘稠为止。破碎后的菌液在 4 °C 下 21500 rpm 离心 30 min, 收集上清液。上清液流穿至装有 Ni-NTA 琼脂糖树脂填料的重力柱中, 使菌液和填料充分结合, 再加入 buffer A 洗杂, 最后用 buffer B 将蛋白洗脱, 置于 30 kDa 超滤管中浓缩至 500 μL。选择 Superdex 200 Increase 凝胶层析柱, 在 ÄKTA pure 层析系统上进一步纯化。

2 结果

2.1 STAT3 的蛋白质序列及表达载体

STAT3 序列如下: MGQANHPTAAVVTEKQQMLEQHLQDVRKRVQDL  
EQMKVVENLQDDFDNYKTLKSKQGMQLNGNNQSVTRQMQLEQMLTALD  
QMRRSIVSELAGLLSAMEYVQKTLTDEELADWKRQRQIACIGGPPNICLDRLE  
NWITSLAESQLQTRQQIKKLEELQKQVSYKGDPIVQHRPMLEERIVELFRNLM  
KSAFVVERQPCMPMHPDRPLVIKTGVQFTTKVRLLVKFPPELNYQLKIKVCIDK  
DSGDVAALRGRKFNILGTNTKVMNMEESNNGSLSAEFKHLTLREQRGNGGR  
ANCDASLIVTEELHLITFETEYVHQGLKIDLETHSLPVVVISNICQMPNAWAS  
ILWYNMLTNNPKNVNFFTKPPIGTWDQVAEVLWSQFSSTTKRGLSIEQLTLA  
EKLLGPGVNYSGCQITWAKFCKENMAGKGFVWVLDNIIDLVKYILALWNE  
GYIMGFISKERERAILSTKPPGTFLLRFSESSKEGGVFTTWEKDISGSTQIQ  
SVEPYTKQLNMSFAEIIMGYKIMDATNILVSPVLVLYPDIPKKEAFGKYCR  
PESQEHPEADPGSAAPYLKTKFICVTPFIDAVWK

构建载体: STAT3 蛋白质序列经过密码子优化后委托北京擎科生物公司合成, 构建到 pCDFDuet-1-STAT3-V2 载体。

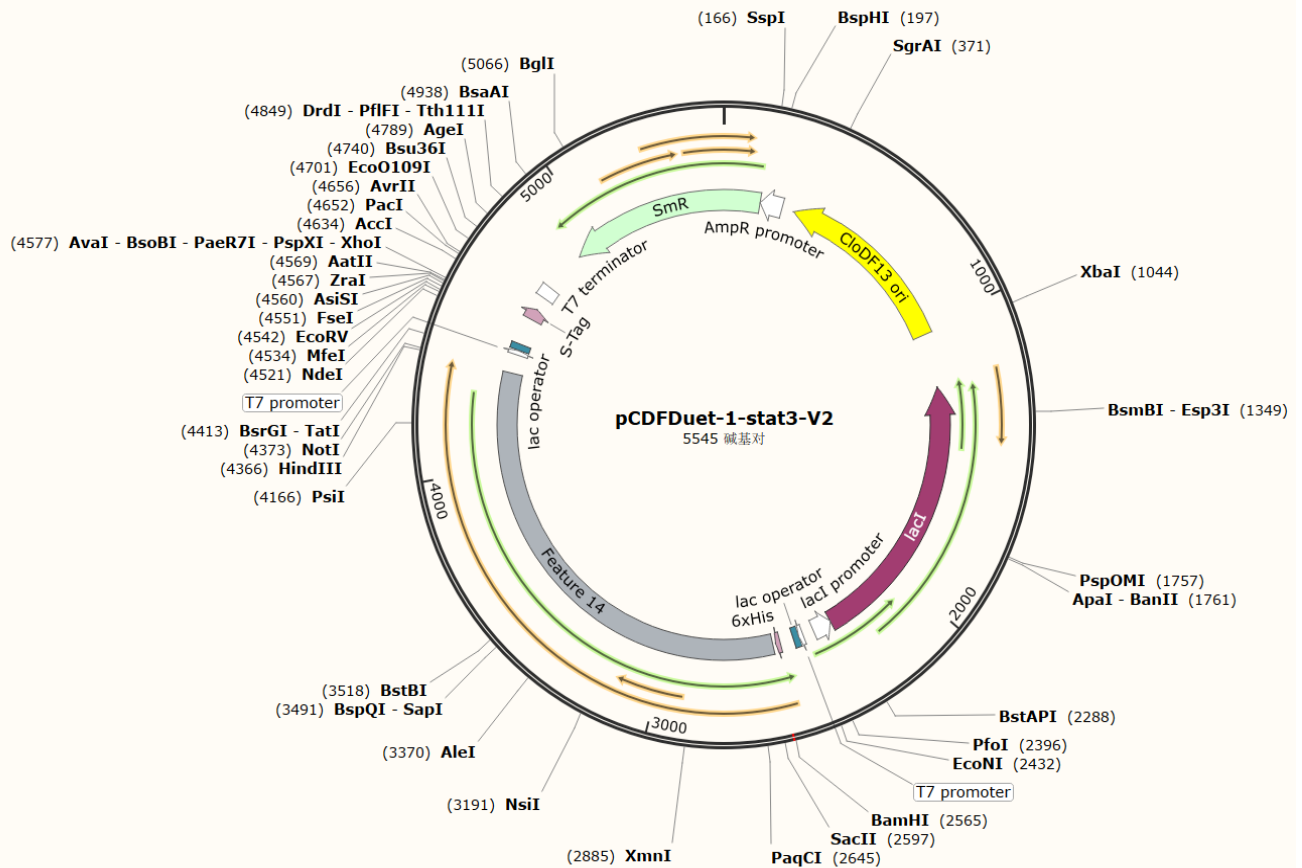


图 1: STAT3 蛋白原核表达载体图谱

2.2 STAT3 蛋白表达条件的优化

2.2.1 表达最佳的感受态细胞

本次实验选择了三种感受态细胞, 其中蛋白在 BL21 (DE3) 感受态细胞中有明显表达, 因此, 选择 BL21 (DE3) 感受态细胞作为表达菌株。

2.2.2 最佳表达的诱导条件

通过设计了不同浓度 IPTG 诱导的小量检测结果显示, 终浓度 0.2 mmol/L IPTG 诱导时, 目的蛋白以包涵体的形式表达得最少, 可溶表达量最多。终浓度 0.1、0.4 mmol/L IPTG 诱导时, 蛋白虽也有表达, 但是可溶蛋白表达量并不多, 大

多数也是以包涵体的形式表达在沉淀中。因此, 选择终浓度 0.2 mmol/L IPTG 为诱导条件。在四种不同的诱导温度下, 其中 16 °C 的诱导温度表达量最多, 12 °C、18 °C、37 °C 温度诱导的表达量较少。因此, 选择 16 °C 为诱导温度。

2.3 STAT3 大量表达与纯化

通过对纯化条件的多次优化之后, 最后确定了分子筛 buffer 为 20 mM HEPES pH 8.0, 200 mM NaCl。根据凝胶排阻层析的紫外吸收峰并通过比对 SDS-PAGE 凝胶, STAT3 蛋白在 12 ml-14 ml 位置得到大量均一性高纯度好的蛋白, 并与理论分子量相符 (图 2、图 3)。

2026-1-24-STAT3 001

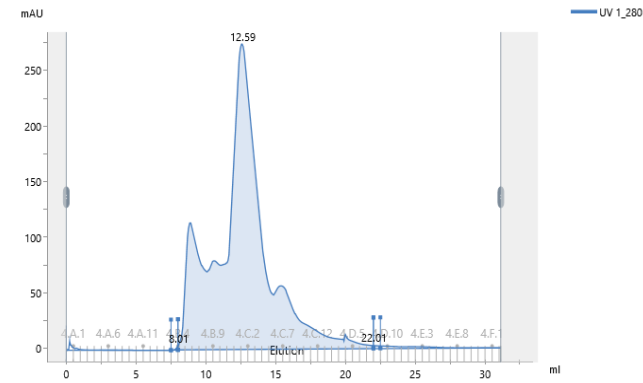
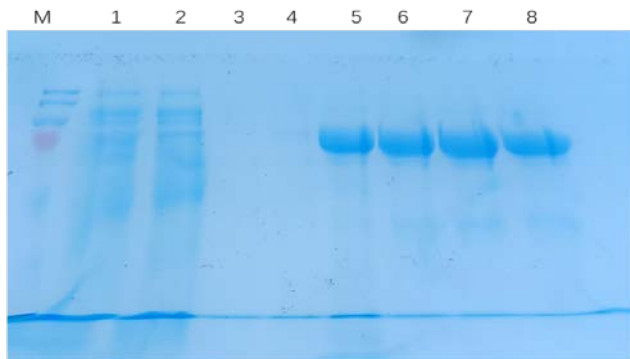


图 2: STAT3 分子筛纯化图



1: 总样 2: 流穿 3: 10mM咪唑洗杂 4: 40mM咪唑洗杂 5: 150mM咪唑洗脱 6-8: 分子筛12.5 ml-14 ml

图 3: STAT3 SDS-PAGE 凝胶图

注: 1: 总样; 2: 流穿; 3: BufferA1:10mM 咪唑洗杂; 4: Buffer A2:20mM 咪唑洗杂; 5: BufferB:200mM 咪唑洗脱; 6-8: 分子筛 12 ml-14 ml

### 3 讨论

STAT3 蛋白在心血管疾病均扮演着关键角色。心脏重塑(如心肌肥大、纤维化、心室扩张)是心力衰竭的核心病理过程,其中 STAT3 的激活尤其在成纤维细胞中的过度激活是

驱动病理性心脏肥大、纤维化和心力衰竭进展的关键因素。靶向调控 STAT3 信号通路(特别是特定细胞类型或下游效应分子)被视为潜在的治疗策略。本文采用 pCDFDuet 载体构建出 STAT3 质粒,通过大肠杆菌原核表达。重组蛋白以及包涵形式表达,通过对诱导浓度和诱导温度的优化,最后在 16 ℃、0.2 mM IPTG 诱导的条件下蛋白大多数以可溶形式表达,表达量较高。最后运用 Ni-NTA 和 ÄKTA pure 层析系统进一步纯化,得到纯度和均一性较好的 STAT3 蛋白,为后续在体外对 STAT3 结构和功能性的研究奠定基础,也为从天然产物中发现候选的抗冠心病、抗肿瘤药物的筛选提供靶点基础。

### 参考文献:

[1] Espinoza-García N, Palafox-Sánchez C A, De Arellano A R, et al. Aberrant STAT3 activation and overproduction of IL-21 in systemic lupus erythematosus: role of miR-155 and miR-21 in target genes SOCS1, PTEN and PIAS3. *Front Immunol*, 2026, 17:1664409

[2] Mokaram Doust Delkhah A. Identification of STAT3 signaling as a shared pathogenic signature in systemic lupus erythematosus, chronic obstructive pulmonary disease, and asthma. *Sci Rep*, 2025, 15(1):22725

[3] Szczepanek K, Xu A, Hu Y, et al. Cardioprotective function of mitochondrial-targeted and transcriptionally inactive STAT3 against ischemia and reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(6):53

[4] Shi D, Tao J, Man S, et al. Structure, function, signaling pathways and clinical therapeutics: The translational potential of STAT3 as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2024, 1879(6):189207

[5] Apolloni S, D' Ambrosi N. Biochemical dissection of STAT3 signaling in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen Res*, 2025, 20(11):3229-3230

[6] Matsuda T. [IL-6/STAT3 Signaling Pathways: Molecular Insights and Emerging Therapeutic Targets]. *Yakugaku Zasshi*, 2025, 145(12):945-956

(上接第 1 页)

$\chi^2=0.7822, p=0.3765$

### 3 讨论

膀胱过度活动症(OAB)是常见疾病,以尿急、尿频等为主要特征,严重影响患者身心健康和生活质量,及时诊治对改善患者生活质量至关重要<sup>[2]</sup>。

OAB 发病机制复杂,成人发病率约 12%,与膀胱敏感性过高、逼尿肌不稳定等有关。治疗方法多样,药物治疗是首选,如索利那新作为 M 型胆碱受体阻断剂,米拉贝隆作为  $\beta 3$  肾上腺素受体激动剂;行为疗法通过患者教育、膀胱训练和生活方式改变改善症状;神经调节治疗有电刺激方法,如骶神经调节和经皮后胫神经刺激;手术干预针对难治性患者,但风险较大。中医虽无对应病名,但将 OAB 症状纳入“淋证”等范畴,认为与肾气亏虚、膀胱气化失常有关,治疗聚焦于肾与膀胱<sup>[3]</sup>。

尿液神经生长因子(NGF)与 OAB 关系密切,患者尿液

NGF 水平升高且与尿急程度正相关,可作为诊断和评估病情的生物标志物。乌灵胶囊含乌灵菌粉,能调节膀胱功能,其联合索利那新的中西医结合疗法,可缓解患者尿频、尿急症状,降低尿液 NGF 含量,且不增加不良反应,值得推广。

未来,对索利那新的研究将推动其在个性化医疗中的应用,乌灵胶囊与索利那新联合疗法也将进一步探索。后续研究还将探索更多元化治疗方法,针对患者个体差异制定个性化治疗方案,为 OAB 患者带来更多有效治疗选择,提升患者生活质量。

### 参考文献:

[1] 陈锦涛,刘小春,刘红耀.膀胱过度活动症病因及诊疗的研究进展[J].河北医药,2023,45(17):2669-2673.

[2] 朱章基,郎健,戴迪,等.膀胱过度活动症非药物治疗研究进展[J].浙江医学,2023,45(15):1664-1667.

[3] 李瑶,莫霞.乌灵胶囊临床应用处方及相关专利分析[J].中国处方药,2023,21(05):13-16.