

Tat 蛋白的 PTD 区段促进 GFP 蛋白进入骨髓瘤细胞 SP2/0

李志奇 胡小波 杨胜利 龚毅*

(中国科学院上海生命科学研究院生物工程研究中心,上海 200233)

关键词 Tat 蛋白,融合蛋白传递,骨髓瘤细胞

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0644-04

随着生物工程技术的迅速发展,多肽与蛋白质类药物的增长速度相当可观,可是这些药物常因受到各种因素的影响而疗效偏低,其中生物膜的屏障作用是主要因素之一。近年来发现一种来源于人类免疫缺陷病毒 HIV-1 Tat (Trans-activator)蛋白的蛋白功能区,称之为 PTD 区段(Protein transduction domain, YGRKKRRQRRR)^[1,2],能够有效引导肽段或者蛋白质进入细胞,具有蛋白传递的功能^[3]。1988 年 Maurice 和 Paul 发现 Tat 蛋白能够穿过细胞膜^[4];1994 年 Stephen 将 Tat 蛋白质中包含 PTD 区段的不同肽段和其他外源蛋白用化学方法交联,成功地将外源蛋白导入到了体外培养的细胞以及小鼠的部分组织中^[5];1998 年 Hikaru 发现 Tat 蛋白 PTD 区段与其他蛋白融合表达的蛋白质(TAT-蛋白质)能够高效地进入体外培养的细胞,并且表现出生物学功能^[6,7,12];1999 年 Schwarze S. R. 研究发现:TAT-蛋白质能够通过血脑屏障,积累到一定浓度并表现出蛋白的活性^[8]。类似的 PTD 区段还发现在果蝇触角足蛋白中^[11]。PTD 区段蛋白传递功能的发现对于蛋白质和多肽类药物传递系统的开发以及蛋白质功能的研究提供了一个有效的手段。国外的研究人员已经开始利用这一蛋白传递工具进行一些蛋白质的功能研究^[6,9,10]。本研究通过构建 PTD 区段和 GFP 融合表达载体获得 TAT-GFP 融合蛋白,旨在通过对该融合表达蛋白进入细胞能力的检测,对 PTD 区段的蛋白传递功能做一些试验性的工作,最终建立一个有效的蛋白传递系统。其目的在于通过确认其功能来摸索建立一个可行的蛋白传递载体系统,并用以研究某些未知蛋白的功能,同时希望能够获得蛋白药物传递的一个可能的手段。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和细胞株:大肠杆菌 JM105、ER2566,骨髓瘤细胞 SP2/0 以及 pT7450、p35S-GFP Vector 质粒均由本实验室保存。

1.1.2 试剂和培养液:各种限制酶、连接酶以及其它一些分

子生物学试剂均购自 TaKaRa、Sangon、Qigen、Gibco BRL、博彩、博亚等公司。

1.2 方法

1.2.1 带 PTD 区段 DNA 序列的载体 pT7460 的构建:合成 Tat 蛋白质 PTD 区段 DNA 序列的两条单链:

正链:5' TATGTACGGTTCGTAAGAAACGTCGCCAGCGTCCGCGTGGATCCG 3'

负链:5' AATTCGGATCCACGGCGACGCTGGCCACGTTTCT-TAC-GACCGTAC 3'

把两条寡核苷酸链退火得到的双链 DNA 片段插入到 pT7450 载体的 *Nde*I 和 *Eco*RI 位点之间,得到的载体命名为 pT7460。酶切检测后,测序检验。

1.2.2 pT7460-GFP 载体以及负对照的 pT7460-nGFP 载体的构建:从 p35S-GFP 载体里扩增出 GFP 基因,PCR 反应正向引物为:5' GCGGATCCATAGATCTGATAACAAAGATG 3';反向引物为:5' TGGAGCTCCGTTTGTATAGTTCATCCATGCCA 3'。反应条件为 94℃ 1min 54℃ 1min 72℃ 2min 30 个循环,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将该 PCR 产物插入到 pT7460 载体的 *Bam*H I 和 *Sac* I 位点之间,得到的 pT7460-GFP 载体,酶切检测后,测序检验。以一个人工合成的 DNA 片段(5'TGATCAG-TAGGC 3'由 *Spe* I 和 *Stu* I 位点组成)替代 pT7460-GFP 载体里 PTD 区段的 DNA 序列,得到的负对照的 pT7460-nGFP 载体,酶切检测后,测序检验。

1.2.3 TAT-GFP 融合蛋白的表达:从转化选择的平板上挑取单菌落,接入 100mL 加有氨苄青霉素的 LB 培养液中过夜培养,然后转接入 2L 的 LB 培养基中放大培养,当细菌生长浓度在 OD_{600} 约为 0.6 时加入 IPTG(终浓度为 1mmol/L)诱导 4~5h 后收集菌体。每克湿菌体以 5mL 超声缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 0.1% TritonX-100, pH8.0)悬浮,超声破碎细胞后,4℃,15000r/min,15min,SDS-PAGE 电泳分析融合蛋白表达情况。

1.2.4 TAT-GFP 融合蛋白在变性条件下的纯化:离心沉淀以含 20mmol/L 咪唑的 Buffer A(8mol/L 尿素,20mmol/L Hepes,

100mmol/L NaCl, pH8.0)溶解过夜, 4℃, 15000r/min, 15min, 取上清。将过量蛋白质溶液和 Ni-NTA 树脂混合, 4℃在脱色摇床上振荡 2 h, 充分结合后, 将混合物装柱, 收集流出液, 洗去未吸附的蛋白, 然后以含 100, 150, 250mmol/L 咪唑的 Buffer A 进行梯度洗脱。收集洗脱下来的蛋白。

1.2.5 可溶性的变性 TAT-GFP 融合蛋白的制备: 以含 20mmol/L 咪唑的 Buffer A 平衡 Sepharose Q 柱, 收集的洗脱蛋白上 Sepharose Q 柱后, 洗去未吸附的蛋白, Buffer B (20 mmol/L Hepes, 50mmol/L NaCl, pH8.0) 洗去尿素, Buffer C 洗脱 (20mmol/L Hepes, 1.5mol/L NaCl, pH8.0)。收集的蛋白浓缩后于含 10% 甘油的 pH7.4 PBS 缓冲液中 -72℃ 保存。BCA 法测蛋白含量。负对照的 TAT-nGFP 融合蛋白用同样的方法可以制备得到。

1.2.6 骨髓瘤细胞 SP2/0 的培养: 对复苏的骨髓瘤细胞 SP2/0 进行传代培养, 培养瓶中加入大约 10mL 含 20% 新生小牛血清的 DEME 培养基, 37℃, 5% CO₂ 培养。倒置显微镜下观察细胞生长情况, 接种细胞到 60mm 培养皿中。

1.2.7 TAT-GFP 融合蛋白进入细胞: 培养板中的细胞先置于 4℃ 适应约 20 min 后, 不同量的融合蛋白 (50 μ g, 100 μ g, 150 μ g) 分别被加到培养基中, 在不同时间检测 (15min, 45min, 90min, 120min), 负对照蛋白也在同样条件下进行检测。荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

测序检验 pT7460 载体质粒的插入序列正确。随后将 GFP 基因插入在 BamH I 和 Sac I 位点之间, 得到融合表达载体 pT7460-GFP。测序结果表明框正确, 而且插入序列无突变。同时测序表明负对照载体 pT7460-nGFP 中, PTD 区段 DNA 序列被取代。

2.2 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

按材料方法所述获得 TAT-GFP 蛋白, 该表达蛋白主要存在于包涵体中 (Fig. 1), 分子量约为 31kD。纯化表达产物, 经 Sepharose Q 柱去尿素、浓缩, 对 PBS 透析脱盐后, 得到了纯化的变性的可溶 TAT-GFP 变性蛋白 (Fig. 2)。可溶的变性 TAT-nGFP 融合蛋白用同样的方法可以得到。

2.3 融合蛋白进入细胞的检测

不同浓度的 TAT-GFP 蛋白加到含 SP2/0 细胞的培养基中以后, 荧光显微镜下观察, 在 15min 的时候在显微镜下检测不到荧光蛋白, 而 45min 以后细胞则呈现出绿色并即清晰可辨 (Fig. 3)。而负对照组的细胞仅在荧光下显现出略强于背景颜色的细胞形态。结果表明, PTD 区段能够有效地引导 GFP 蛋白进入到视野中的绝大部分细胞, 并且变性的 GFP 蛋白在进入细胞之后能够表现出活性, 在荧光显微镜下激发产生荧光, 可能这一过程还牵涉到细胞中蛋白重折叠的机制。

3 讨论

研究工作还对 NIH Swiss 小鼠胚细胞 (NIH-3T3 细胞) 中

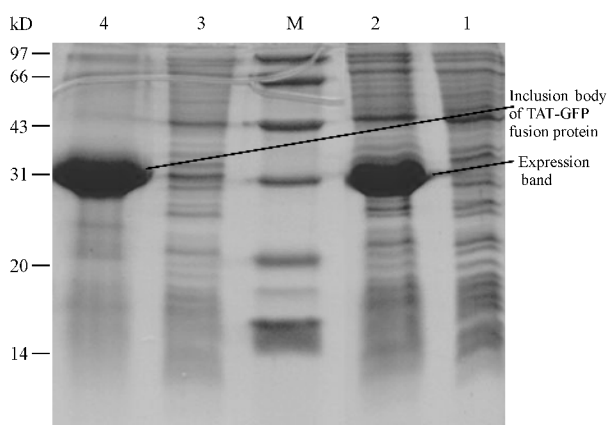


图1 表达的 TAT-GFP 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressed TAT-GFP protein

1. Total extract in pT7460-GFP before Induction; 2. Total extract in pT7460-GFP after Induction; M. Molecular weight markers; 3. Total extract in sonication supernatant; 4. Inclusion Body

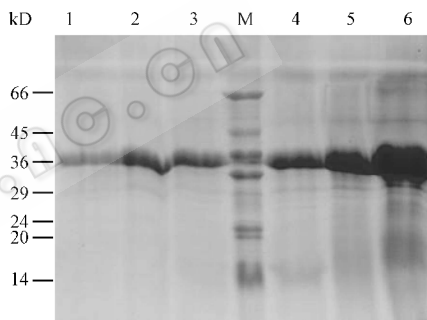


图2 Ni²⁺ 亲和层析纯化 TAT-GFP 蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of TAT-GFP protein purified by Ni²⁺ affinity chromatography

1. Soluble purified TAT-GFP protein; 2. Purified TAT-GFP protein washed by Buffer A plus 250mmol/L imidazole; 3. Purified TAT-GFP protein washed by Buffer A plus 150mmol/L imidazole; M. Molecular weight markers; 4. Purified TAT-GFP protein washed by Buffer A plus 100mmol/L imidazole; 5. Flow through; 6. Inclusion body dissolved in Buffer A

国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) 以及 SV40 转化的非洲绿猴肾 (COS-7) 进行了 TAT-GFP 蛋白导入的试验。没有明显的结果显示有 GFP 蛋白进入细胞表现出活性。可能是由于 SP2/0 作为一种癌细胞, 较之正常的细胞来说细胞的种种性质有所改变。例如细胞膜透性的改变或者细胞膜结构的改变导致 TAT-GFP 融合蛋白更容易进入细胞; 也有可能由于 SP2/0 细胞由于细胞之间连接不够紧密, 贴壁性能差, 基膜结构不紧密, 使蛋白和细胞表面有更多的作用位点; 另外也许是 SP2/0 细胞内某种蛋白酶活力降低所致。但这并不说明 TAT-GFP 不能进入另外几种细胞。或许是由于这几种细胞对 Tat 蛋白的 PTD 区段的作用更不敏感。国外研究者所做的一系列工作则表明发现不同的 TAT-融合蛋白质 (15 ~ 120kD) 可以进入大部分细胞并且能够进入到动物组织中表现活性。由于他们的工作主要也是在融合蛋白处于变性条件下进行的, 考虑到融合蛋白基因载体结构以及组合方式的不同, 有可能

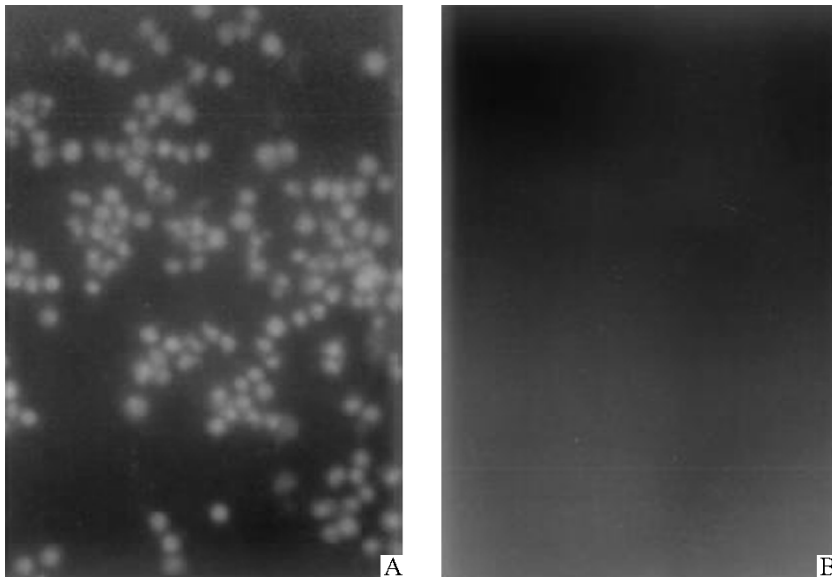


图3 荧光显微镜下观察 TAT-GFP 蛋白和负对照的 TAT-nGFP 蛋白进入细胞的情况(放大 400 倍)

Fig.3 Observing TAT-GFP fusion protein and negative TAT-nGFP protein in SP2/0 cell under fluorescent microscope (400 magnification)

A. TAT-GFP Fusion protein detected under fluorescent microscope in SP2/0 cells ; B. Negative control no fluorescent detected

TAT PTD 区段在融合蛋白的 N 端要发生效率较高的蛋白传递功能可能还要其他氨基酸作为 PTD 区段的补充来形成一个高效的蛋白转导区,例如文献就认为一个有效的蛋白转导区是 Tat 蛋白的 48 ~ 60 位(GRKKRRQRRPPQ)。另外,课题中表达的融合蛋白的结构是 GFP 蛋白质和 PTD 区段之间仅有 2 个氨基酸的间隔,从分子结构的角度来考虑,可能还需要在 PTD 区段和融合蛋白之间有一段一定长度的比较柔韧并且侧链较小的肽链做为连接,从而使 PTD 区段能够有效地伸出到融合蛋白分子结构表面和细胞表面相接触;或者,由于 PTD 区段和融合蛋白之间的距离过近,融合蛋白的高级结构带来的空间障碍使 PTD 区段不能和细胞表面充分接触而妨碍了 PTD 区段的蛋白转导功能。进一步的工作可能还需要在融合表达载体的构建方面再做一些改造工作,并对 TAT-融合蛋白对不同细胞的蛋白转导能力作进一步的比较和检测。

TAT-融合蛋白系统为蛋白传递提供了一个很好的研究工具,在理论研究和实际应用中有着良好的应用前景。由于进入细胞后的蛋白可以表现出活性,故而这对于蛋白功能研究是一个比较好的手段。TAT PTD 区段的这一功能为生物治疗和科学研究提供了一个很好的操作手段,有着广泛的作为药物传递的前景,并使其对病人直接进行蛋白给药提供了可能。

REFERENCES(参考文献)

- [1] P Bayer , M Kraft , A Ejchart *et al.* . Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J Mol Biol* , 1995 **247** : 529 ~ 535
- [2] Eric V , Prissille Brodin , Bernard L. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* , 1997 **272** : 16010 ~ 16017
- [3] Morris M C , Depollier J , Mery J *et al.* . A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature Biotechnol* , 2001 **19** (12) : 1173 ~ 1176
- [4] Maurice G , Paul M. Autonomous functional domain of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat Trans-activator protein. *Cell* , 1988 **55** : 1179 ~ 1188
- [5] Stephen F , Joe S , Yasmin D *et al.* . Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1994 **91** : 664 ~ 668
- [6] Hikaru N , Adamina M V , Eric S , Snyder *et al.* . Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells : TAT-p27^{Kip1} induces cell migration. *Nature Med* , 1998 **4** : 1449
- [7] Becker-Hapak M , McAllister S S , Dowdy S F. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* . 2001 **24** (3) : 247 ~ 256
- [8] Steven R S , Alan Ho , Adamina V *et al.* . *In vivo* protein transduction : delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* , 1999 **285** : 1569 ~ 1572
- [9] Vocero-Akbani A , Lissy N A , Dowdy S F. Transduction of full-length Tat fusion proteins directly into mammalian cells : analysis of T cell receptor activation-induced cell death. *Methods Enzymol* , 2000 **322** : 508 ~ 521
- [10] Vocero-Akbani A , Chellaiah M A , Hruska K A. Protein transduction : delivery of Tat-GTPase fusion proteins into mammalian cells. *Methods Enzymol* , 2001 **332** : 36 ~ 49
- [11] Daniele D , Sophie C , Alain T *et al.* . Cell internalization of the third Helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* , 1996 **271** : 18188 ~ 18193
- [12] Christine S , Laura S L , Elmar N *et al.* . Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 **93** : 14536 ~ 14541

The PTD Domain of Tat Protein Enhance GFP Protein Delivering into Myeloma Cell SP2/0

LI Zhi-Qi HU Xiao-Bo YANG Sheng-Li GONG Yi*

(Shanghai Research Center of Biotechnology , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200233 , China)

Abstract In order to detect the protein delivery mediated by the PTD (protein transduction domain) of TAT Protein , a expression vector , named pT7460-GFP , was constructed by insert the PTD DNA Sequence , followed by a GFP (green fluorescent protein) gene fused in-frame , into the pT7450 vector. The TAT-GFP fusion protein was expressed in the *E. coli* ER2566 . Most of the fusion protein was presented in the inclusion body. The protein was purified by Ni²⁺ affinity chromatography under denature conditions , then by a Sepharose Q column to remove urea. The soluble denatured protein was added directly to medium containing the Myeloma Cell SP2/0. It came out that the fusion protein could be detected delivered into the cells under fluorescent microscope in a short time.

Key words Tat protein , fusion protein delivery , myeloma cell

Received : 04-04-2002

* Corresponding author. Tel 86-21-64700892-369 ; Fax 86-21-64700244 ; E-mail : ygong@srcb.ac.cn