

TAT-凋亡素基因重组质粒的构建、蛋白的表达纯化及体内活性实验

郑天虎 陶站华 刘兴汉

【摘要】 目的 构建 TAT-凋亡素(TAT-Apoptin)质粒并提取融合蛋白,为进一步研究该蛋白功能奠定基础。方法 PCR 合成 TAT-Apoptin 基因,与 pTYB2 质粒连接后转入 *Rosetta* 菌,经 IPTG 诱导表达,几丁质亲和层析一步纯化目的蛋白,用昆明小鼠 H22 动物模型检测活性。结果 克隆载体经过 PCR 筛选、测序鉴定,其核苷酸片段长度和序列与预期序列相符,诱导后融合蛋白出现在上清中,纯化出的 TAT-Apoptin 蛋白具有明显的抗肿瘤活性。结论 该实验所构建的重组质粒 pTYB2/TAT-Apoptin 经诱导表达出了可溶性目的蛋白 TAT-Apoptin,纯化后具有明显的生物活性,为 TAT-Apoptin 蛋白的进一步研究奠定了基础。

【关键词】 TAT-凋亡素; 基因重组; 纯化; 几丁质亲和层析

Construction of Recombinant Plasmid of pTYB2/TAT-Apoptin and Expression , Purification of TAT-Apoptin Protein ZHENG Tian-hu, TAO Zhan-hua, LIU Xing-han (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harbin Medical University , Harbin 150081; Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province-Incubator of State Key Laboratory, Harbin 150081, P. R. China)

Corresponding author: LIU Xing-han. E-mail: lxlxhs@163. com

【Abstract】 Objective To construct pTYB2/TAT-Apoptin expression system and producing TAT-Apoptin protein. **Methods** The TAT-Apoptin gene was cloned by PCR and was ligated to the expression plasmid pTYB2, and the recombinant plasmid was transformed into *Rosetta*. One-step affinity chromatography was used to purify the TAT-Apoptin protein after inducing by IPTG, The protein activity was detected by using H22 animal model, Kunming mice. **Results** The TAT-Apoptin gene was screened by PCR , and the result of sequencing according with the desired sequence. The TAT-Apoptin protein was obtained by affinity chromatography, it had conspicuous antineoplastic activity. **Conclusion** The recombinant plasmid , pTYB2/TAT-Apoptin, can express resolvable TAT-Apoptin protein in the *Rosetta*, and it has obvious biological activity after purifying. This research builds a base for the further study of the function for TAT-Apoptin.

【Key word】 TAT-Apoptin; Recombination; Protein expression; Affinity chromatography

细胞凋亡在肿瘤的发生、清除转化细胞、细胞损伤反应、抗肿瘤药物开发等方面具有十分重要的作用。1994 年, Noteborn 等^[1]将鸡贫血病毒(chicken anemia virus)所表达的 Vp3 命名为凋亡素(Apoptin),它具有对肿瘤细胞的选择性诱导凋亡作用^[2,3]、非 P53 依赖性^[4]及高效广谱的特性^[5,6]。但天然的凋亡素无法跨越细胞膜屏障进入肿瘤细胞内

部,限制了凋亡素作为抗肿瘤药物的开发利用。Hikanru 和 Eguchi 等^[7,8]发现 TAT 蛋白的转导结构域(protein transduction domains, PTDs)与其他蛋白融合表达的蛋白质能够高效的进入体外培养的细胞,并且表现出生物学功能,具有生物活性。陶站华等^[9]研究表明将 TAT 与 Apoptin 进行融合后不但可以穿透细胞膜屏障,而且可以发挥凋亡素的生物学功能。因此构建易于纯化的 TAT-Apoptin 载体和动物体内活性实验对 TAT-Apoptin 的大量制备及进一步研究具有重要意义。

作者单位:150081, 哈尔滨医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室;150081 哈尔滨, 黑龙江省生物医药工程重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地

通讯作者:刘兴汉(E-mail:lxlxhs@163. com)

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株和试剂: PET-28a/*TAT-Apoptin* (本室构建); pTYB2 质粒、几丁质树脂、*Nde* I、*Sma* I 限制性内切酶 (NEB); PCR 试剂盒 (上海华舜生物有限公司); IPTG、氨苄青霉素 (华美公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 pTYB2/*TAT-Apoptin* 重组质粒的构建 ① *TAT-Apoptin* 基因的克隆: 根据目的基因在载体 PET-28a/*TAT-Apoptin* 两侧的碱基序列特点利用 Oligo 6.57 软件设计引物如下: 引物 I: 5'-GGAATTCAT-ATGGCAGGAAAAGCGGAGAC-3'; 引物 II: 5'-G-AGT-CTTATACGCCTTTTTCGGTTC-3'。PCR 反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 30 次; 72℃ 延长 10 min。反应结束后 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下切下目的基因并按胶回收试剂盒对目的基因进行回收, 再用 *Nde* I 酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收, -20℃ 储藏备用。② *TAT-Apoptin* 与 pTYB2 连接: 用 T4 DNA 连接酶将胶回收的 *TAT-Apoptin* 与 *Nde* I、*Sma* I 双酶切的 pTYB2 连接, 构建重组质粒 pTYB2/*TAT-Apoptin*。③ pTYB2/*TAT-Apoptin* 质粒转化 *Rosetta* 菌: pTYB2/*TAT-Apoptin* 质粒转化感受态 *Rosetta* 菌, 在含氨苄青霉素的 LB 平板上涂平板, 37℃ 过夜。④ 重组质粒的 PCR 鉴定: 根据 pTYB2 克隆位点两侧序列特点设计 PCR 鉴定引物, 由上海生工合成: 引物 I: 5'-CGCGAA-ATTAATACGACTCAC-3'; 引物 II: 5'-AGGCTGCCA-TCTTTACCCAT-3'。

首先挑取 17 个连接过夜的单菌落并编号, 在每管 5 mL 的 LB 液体培养基上 (37℃) 110r/min 摇床过夜, 按照编号分别取 3 μL 菌液加入 PCR 反应体系, 设定 PCR 参数 94℃、5 min, 然后按照参数 94℃、30 s, 58℃、30 s, 72℃、1 min 循环 30 次, 72℃ 延长 7 min。用一个 pTYB2 原始质粒 (阴性对照)、DL2000 Marker 在 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下检测电泳结果。⑤ 重组 pTYB2/*TAT-Apoptin* 质粒中的 *TAT-Apoptin* 基因测序: 挑取 PCR 验证后的重组菌的单菌落于 10 mL 加入含 Ampicillin 的 ZB 培养基培养过夜。次日, 取出 1 mL 的菌液进行基因测序。

1.2.2 重组 pTYB2/*TAT-Apoptin*/*Rosetta* 的诱导表达, 挑取上述构建成功的 pTYB2/*TAT-Apoptin*/*Rosetta* 单个菌落接种于 10 mL 含 Amp⁺ 的 LB 培养基中, 37℃、120 r/min 培养过夜, 然后按 1:50 转入 100 mL 含 Amp 的 LB 培养基 37℃ 扩大培养, 当 OD₆₀₀

达到 0.5 时加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG, 18℃ 诱导表达 16 h, 5 000 g 离心 10 min 收集菌体。将菌体用超声波细胞粉碎机破碎, 12 000 g 离心 15 min 后分别取上清、沉淀制备 SDS-PAGE 电泳样本, 用 12% 分离胶 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 10 h 后用脱色固定液脱色。观察 *TAT-Apoptin* 表达情况。

1.2.3 *TAT-Apoptin* 融合蛋白的纯化分离 ① 柱平衡及上样: 取 6 mL 几丁质树脂装柱, 用 10 个柱床体积的缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl) 4℃ 进行柱平衡, 待基线平稳后, 将 0.4 μm 孔径滤膜过滤的上清液用 Tris-HCl 缓冲液 2 倍稀释后上样, 流速为 1 mL/min, 再用至少 10 倍柱床体积的缓冲液彻底洗柱至基线, 将 20 mL 含 50 mmol/L DTT 的缓冲液快速过柱; 4℃ 静置 20 h。② 目的蛋白的洗脱释放: 用缓冲液再次洗柱, 裂解反应诱导后目的蛋白与内含肽分离, 有峰出现即是 *TAT-Apoptin* 峰, 收集后 -20℃ 储存备用。③ 几丁质树脂的再生: 用 10 倍柱床体积的 0.3 mol/L NaOH 洗柱, 此时出现的峰即是载体蛋白峰 (内含肽和几丁质结合蛋白), 经过处理的几丁质柱可再次用来进行蛋白纯化。

1.2.4 *TAT-Apoptin* 融合蛋白的体内活性检测 ① 将小鼠 H22 肝癌细胞按 10⁷ 个细胞/只注入小鼠腹腔, 6 d 后, 待小鼠腹腔长满腹水后, 将其处死, 取腹水, 用生理盐水调整细胞浓度为 3 × 10⁷ 个/mL。② 取 16 只体重 18 ~ 22 g 雄性昆明种小白鼠, 每只小鼠右前肢腋下皮下注射 0.15 mL 上述浓度的腹水。③ 5 d 后, 将小鼠随机分成两组, 每组 8 只。对照组每只腹腔注射 0.2 mL 生理盐水, 给药组按 50 μg/kg 腹腔注射 *TAT-Apoptin* 融合蛋白。④ 连续给药 7 d 后, 处死小鼠, 测定瘤重并计算抑瘤率, 抑瘤率计算公式为: (1 - 给药组瘤重/对照组瘤重) × 100%。⑤ 将上述小鼠的肿瘤, 切成组织块, 经甲醛溶液固定、包埋、组织病理学切片后, HE 染色, 显微镜观察, 进行病理学分析。

2 结果

2.1 PCR 产物的鉴定: 经琼脂糖凝胶电泳, PCR 扩增产物 (405 bp) 与目的片段相一致 (见图 1)。

2.2 重组质粒 pTYB2/*TAT-Apoptin* 的 PCR 鉴定: 多克隆位点之间若有目的基因则 PCR 产物大约为 600 bp, 而双酶切后又自连的质粒 PCR 产物中无目的基因, 只有 200 bp, 二者差距明显 (见图 2)。

2.3 *TAT-Apoptin* 基因测序结果: 测序结果表明融合基因的序列与预期序列相符, 无移码及突变。

2.4 *TAT-Apoptin* 的诱导表达: *TAT-Apoptin* 蛋白在载体 pTYB2 中以融合形式表达, *TAT-Apoptin* 含有 137 个氨基酸, 载体蛋白含有 484 个氨基酸, 所以融合蛋白的相对分子质量大约为 69 kDa, 目的蛋白条带主要出现在上清液中, 与预期的相对分子质量相符, 而未诱导的 *TAT-Apoptin* 工程表达菌在此处无明显蛋白条带, 同时沉淀中几乎没有, 说明诱导条件适中, *TAT-Apoptin* 为可溶性表达 (见图 3)。

表 1 *TAT-Apoptin* 融合蛋白对小鼠移植型肝癌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of *TAT-Apoptin* fusion protein on mouse transplanted hepatocellular carcinoma ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	n	平均瘤重(g)	IR(%)
对照组	8	3.328 ± 0.474	
治疗组	8	1.985 ± 0.436*	42.46

* 与对照组比较 $P < 0.01$

* $P < 0.01$ vs control group

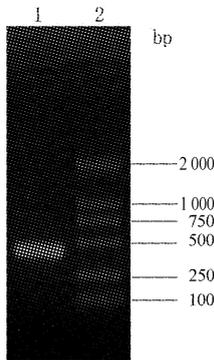


图 1 目的基因制备结果

Fig. 1 PCR product of *TAT-Apoptin*

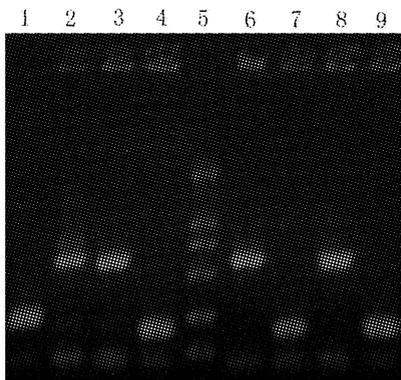


图 2 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant vector

1: pTYB2 质粒; 2、3、6、8: 阳性克隆结果 4、7、9: 自身环化; 5: DL2000 Marker

1: TYB2 plasmid; 2、3、6、8: positive clonal result; 4、7、9: self-cyclization; 5: DL2000 Marker

2.5 目的蛋白 *TAT-Apoptin* 的纯化: 当上清液通过几丁质亲和层析柱时, *TAT-Apoptin* 蛋白和载体蛋白 (内含肽-几丁质结合蛋白) 与几丁质亲和层析柱结合, 杂蛋白首先被洗去, 再经二硫苏糖醇 (DTT) 的还原作用, *TAT-Apoptin* 蛋白与内含肽裂解, 洗脱的蛋白为 *TAT-Apoptin*。载体蛋白经 NaOH 碱洗脱离开层析柱 (见图 4)。

2.6 *TAT-Apoptin* 蛋白体内活性检测结果: ①小鼠腹腔接种 H22 肝癌细胞 8 d 后, 腹部明显增大, 腹腔内可吸出大量腹水; ② *TAT-Apoptin* 融合蛋白对小鼠移植型肝癌有较强抑制作用, 给药组平均瘤重明显小于对照组 ($P < 0.01$), 抑瘤率达 42.46%。③小鼠肿瘤病理组织切片结果: 小鼠肿瘤病理组织切片 HE 染色, 对照组肿瘤细胞增长非常活跃, 肿瘤细胞弥散性向骨骼肌内侵入, 肿瘤中心仅有散在坏死灶; 给药组实体瘤中心有大片肿瘤细胞坏死 (见图 5)。

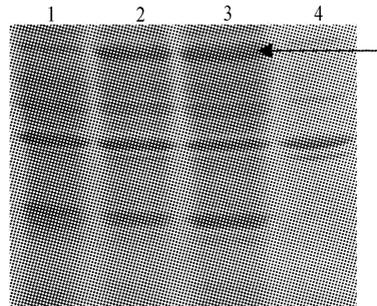


图 3 *TAT-Apoptin* 的诱导表达

Fig. 3 Expressoin of *TAT-Apoptin* induced by IPTG

泳道 1: 未加 IPTG 时表达的蛋白条带; 泳道 2: 加入 IPTG 后表达的蛋白条带; 泳道 3: 上清液; 泳道 4: 离心后沉淀。箭头所示为目的蛋白

Lane1: cellular lysate of *E. coli Rosetta* carrying recombinant vector uninduced; Lane 2: cellular lysate of *E. coli Rosetta* carrying recombinant vector induced by IPTG; Lane 3: Supernatant; Lane 4: Deposition after centrifugalization. The arrow shows the target protein

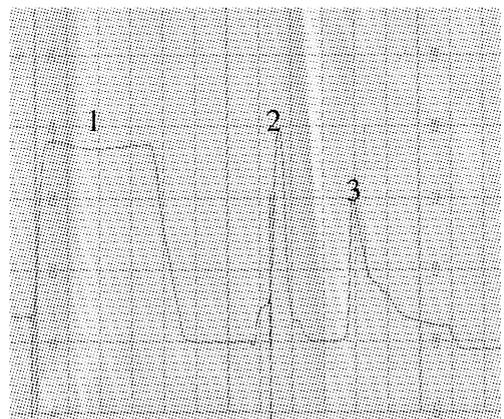


图 4 *TAT-Apoptin* 亲和层析曲线

Fig. 4 Graph of *TAT-Apoptin* by affinity chromatography

1: 杂蛋白峰; 2: 目的蛋白 *TAT-Apoptin* 峰; 3: 载体蛋白峰

1: miscellaneous protein peak;

2: target protein peak; 3: carrier protein peak

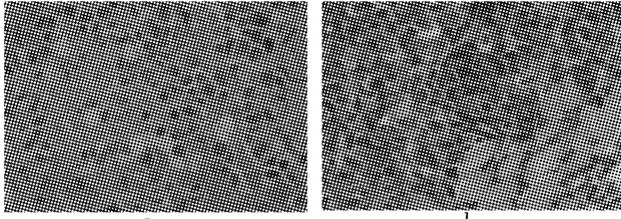


图 5^a 小鼠肿瘤病理组织切片结果(HE × 200)

Fig. 5 Result of mouse' tumor pathological slice(HE × 200)

a. 对照组; b. TAT-Apoptin 治疗组

a. Control group; b. TAT-Apoptin treated group

3 讨论

细胞凋亡是生长发育、细胞分化和病理状态中细胞自主性死亡的过程,随着细胞凋亡研究的深入,人们逐渐认识到细胞凋亡与肿瘤的发生关系密切。肿瘤的发生是细胞增殖与凋亡平衡失调的结果,肿瘤细胞过少的死亡与过多的增殖导致肿瘤过快的生长,因此通过诱导肿瘤细胞凋亡来治疗肿瘤将成为一条有效的途径。一般说来, *p53* 表达产物促进突变的细胞凋亡,而 *Bcl-2* 过表达抑制细胞凋亡。大多数肿瘤细胞都存在 *p53* 突变和(或) *Bcl-2* 过表达,使肿瘤细胞凋亡过程受到抑制,对化疗药物产生耐药性。能否克服这种凋亡抗性,即有效地且有选择地杀伤肿瘤细胞决定着肿瘤治疗的效果。近年来,病毒基因产物对细胞凋亡的调节作用正日益受到人们的重视。Noteborn 等^[1]的研究发现,鸡贫血病毒 *vp3* 基因编码的凋亡素对正常细胞无毒性和转化活性,只选择性地诱导肿瘤细胞凋亡。凋亡素促肿瘤细胞凋亡作用不依赖于 *p53* 的介导,部分肿瘤细胞系可不被 *Bcl-2* 过度表达所抑制^[10],有可能成为一种极具潜力的肿瘤抑制剂。凋亡素为相对分子质量 13.6 kDa 的蛋白质分子,天然状态的凋亡素很难透过细胞膜屏障进入肿瘤细胞内发挥诱导肿瘤细胞凋亡的作用。因而以往对凋亡素的研究多采用基因治疗的方法,即构建凋亡素的真核表达载体,通过非病毒载体转染或病毒载体感染的方法将凋亡素基因转入真核细胞,在细胞内表达凋亡素并研究其促凋亡活性。但目前基因治疗技术还不成熟,制约了凋亡素的临床应用。利用 TAT 的蛋白转导活性将凋亡素送入细胞内并诱导肿瘤细胞凋亡的方法与基因治疗相比具有许多优点:①蛋白质转导技术转入胞内的是蛋白质,不存在外源基因随机插入宿主基因组的风险;②TAT 肽段较短,免疫原性远远小于基因治疗中的病毒蛋白,不会引起基因治疗中常见的炎症反应;③TAT 的转导效率远远高于基因治疗中非病毒载体的

转染效率;④现阶段对真核细胞的基因表达调控规律认识还很有限,因此很难对转入的外源基因的表达强度进行有效调控;而蛋白转导中转入细胞内的外源蛋白的浓度依赖于加入的融合蛋白的浓度,因而可以通过调整给药剂量对细胞内导入的治疗蛋白浓度进行有效地调控。

通过基因工程菌获得目的蛋白,载体和宿主菌的选择对于表达和纯化效果至关重要。*pTYB2* 多克隆位点有 *Nde* I 黏性酶切位点和 *Sma* I 平端酶切位点利于目的基因的定向克隆,同时含有的内含肽和几丁质结合蛋白基因与 *TAT-Apoptin* 基因融合,经诱导表达出从 N 端到 C 端为(*TAT-Apoptin*)-内含肽-几丁质结合蛋白的融合蛋白,利于表达可溶性目的蛋白并可用几丁质亲和层析一步纯化出目的蛋白,减少了在纯化过程中目的蛋白的丢失。由于 *Sma* I 酶切处带有一个甘氨酸碱基密码,使得 *TAT-Apoptin* C 端多出一个甘氨酸,但甘氨酸相对分子质量小,一般不影响目的蛋白活性。本次实验使用陶站华等^[9]构建的 *PET-28a/TAT-Apoptin* 经 PCR 扩增目的基因,在设计中将组氨酸标签去除,避免了 *TAT-Apoptin* 在今后活体实验及临床应用中可能出现的免疫反应。在本研究中我们最初选择常用的 *Bl 21 (DE3)* 作为表达菌,反复优化诱导条件,但表达量仍不理想,我们对融合蛋白的编码序列进行了分析,发现其中含有较多的大肠杆菌稀有密码子,有些还成簇排列,于是我们改用 *Rosetta (DE3) pLySS* 菌株作为宿主菌。这种菌株能够由一种氯霉素抗性的与 *pET* 相容的质粒提供 *AUA*、*AGG*、*AGA*、*CUA*、*CCC* 和 *GGA* 7 种稀有密码子的 tRNA,明显改善大肠杆菌中由于稀有密码子造成的表达限制。另外, *Rosetta (DE3) pLySS* 还能表达 T'7 溶菌酶, T'7 溶菌酶是 T7 RNA 聚合酶的天然抑制物,这样可以减少在未诱导的情况下目的基因的转录,从而减少基础表达,避免基因产物对重组质粒及宿主的危害,增加质粒在宿主细胞中的稳定性。此外,由于表达了少量的溶菌酶,也有利于诱导表达后的细胞裂解。除了载体和宿主菌的选择,诱导表达的时间、温度及诱导剂的浓度对重组基因的表达有很大影响。参考王淑静等^[11]优化的表达条件,我们采用低温、低剂量 IPTG、长时间诱导方法表达融合蛋白取得了理想的效果。

目前,肿瘤治疗主要的方法包括手术治疗、放疗和化疗。手术治疗虽然能够切除肿瘤组织,但常常不能彻底清除肿瘤细胞,同时施以放疗、化疗可以清除残存的部分肿瘤细胞,但在放、化疗杀伤肿瘤细胞

的同时,正常组织和细胞也同样受到损伤,导致出现并发症,严重降低患者的生活质量。因此,寻找、建立肿瘤特异性治疗方法是肿瘤治疗的方向之一,TAT-Apoptin 对肿瘤的特异杀伤作用克服了肿瘤传统治疗的弱点。但 TAT-Apoptin 融合蛋白作为一种外源蛋白,长期使用是否会刺激机体产生中和抗体及其他毒副作用还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Noteborn MH, Todd D, Verschueren CA, *et al.* A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol*, 1994, 68:346-351.
- 2 Zhang YH, Leliveld SR, Kooistra K, *et al.* Recombinant apoptin multimers kill tumor cells but are nontoxic and epitope-shielded in a normal-cell-specific fashion. *Exp Cell Res*, 2003, 289:36-46.
- 3 Danen-Van Oorschot AA, Fischer DF, Grimbergen JM, *et al.* Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94:5843-5847.
- 4 Zhuang SM, Shvarts A, Van Ormondt H, *et al.* Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces a p53-Independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res*, 1995, 55:486-489.
- 5 Zhang YH, Abrahams PJ, van der Eb AJ, *et al.* The viral protein induces apoptosis in UV-C-irradiated cells from individuals with various hereditary cancer-prone syndromes. *Cancer Res*, 1999, 59:3010-3015.
- 6 Rohn JL, Noteborn MHM. The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific process. *Apoptosis*, 2004, 9:315-322.
- 7 Hikaru N, Adamina M. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27kip1 induces cell migration. *Nature Med*, 1998, 4:1449-1552.
- 8 Eguchi A, Akuta T, Okwiyama H, *et al.* protein transduction domain of HIV-1 TAT protein Promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J Biol Chem*, 2001, 276:26204-26210.
- 9 Tao ZH, Liu XH, Zhang YW, *et al.* Expression of TAF apoptin fusion protein and its anti-tumor activity. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2006, 22:535-541.
[陶站华,刘兴汉,张宇雯, TAT-调亡素融合蛋白的表达及其抗肿瘤活性. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22:535-541]
- 10 Burek M, Maddika S, Burek CJ, *et al.* Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent. *Oncogene* 25: 2213-2222.
- 11 Wang SJ, Fu Xue, Liu XH, *et al.* Study on anti-tumor activity of tumstatin associated Peptide. *Bull chin Cancer*, 2005, 14:186-188.
[王淑静,付雪,刘兴汉等. 肿瘤抑素相关肽抗肿瘤活性研究. *中国肿瘤*, 2005, 14:186-188]

(收稿日期:2006-06-14)

(本文编辑:高巍)