

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.009

· 基础研究 ·

TAT-ASPP2 融合蛋白的制备及其对胶质瘤细胞增殖的抑制作用

何火聪¹, 苏颖¹, 潘剑茹², 黄争荣¹(1. 福建医科大学 附属教学医院 暨 福建省肿瘤医院 放射生物研究室, 福建 福州 350014; 2. 福州大学 生物工程研究所 福建 福州 350002)

[摘要] 目的:制备 TAT-ASPP2 融合蛋白,探讨其对人胶质瘤 U-87MG 细胞和 U251 细胞增殖的抑制作用。方法:设计 TAT-ASPP2 引物,应用 IN-Fusion 技术构建原核表达质粒 pET-TAT-ASPP2,双酶切、DNA 测序鉴定后转化大肠杆菌 *E. coli* BL21, IPTG 诱导 TAT-ASPP2 融合蛋白的表达, SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定 TAT-ASPP2 融合蛋白。MTT 法检测 TAT-ASPP2 融合蛋白对 U-87MG 和 U251 细胞增殖的作用。结果:成功构建了原核表达质粒 pET-TAT-ASPP2,转化 *E. coli* BL21 后成功表达 TAT-ASPP2 融合蛋白,其相对分子质量约为 128 000,并可被 ASPP2 特异性抗体所识别。TAT-ASPP2 融合蛋白对 U-87MG 和 U251 细胞增殖的抑制率分别为(65.0 ± 3.0)%和(64.7 ± 2.5)%,而 ASPP2 蛋白则不能抑制 U-87MG 和 U251 细胞的增殖。结论:成功地克隆、表达及纯化 TAT-ASPP2 融合蛋白,该融合蛋白可抑制胶质瘤细胞的增殖。

[关键词] 胶质瘤; TAT-ASPP2; 融合蛋白; 增殖

[中图分类号] R739.41; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)01-0042-06

Preparation of TAT-ASPP2 fusion protein and its inhibitory effect against proliferation of glioma cells

HE Huo-cong¹, SU Ying¹, PAN Jian-ru², HUANG Zheng-rong¹(1. Laboratory of Radiobiology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Affiliated Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare the TAT-ASPP2 fusion protein and investigate its inhibitory effect against the proliferation of glioma U-87MG and U251 cells. **Methods:** TAT-ASPP2 specific primer was designed and recombinant prokaryotic expression vector pET-TAT-ASPP2 was constructed using the In-Fusion cloning technique. After identified by double endonuclease digestion and DNA sequencing, pET-TAT-ASPP2 vector was transformed into *E. coli* BL21 and TAT-ASPP2 fusion protein was induced by IPTG. TAT-ASPP2 fusion protein was further identified by SDS-PAGE and Western blotting analysis. The effects of TAT-ASPP2 fusion protein on proliferation of U-87MG and U251 cells were detected by MTT assay. **Results:** The prokaryotic expression plasmid pET-TAT-ASPP2 was successfully constructed, and TAT-ASPP2 fusion protein was induced by IPTG in transformed *E. coli* BL21; the molecular weight of the fusion protein was about 128 000 and it could be specifically recognized by ASPP2 antibody. TAT-ASPP2 fusion protein significantly inhibited the proliferation of U-87MG and U-251 cells, with the inhibitory rates being about (65.0 ± 3.0)% and (64.7 ± 2.5)%, respectively; while ASPP2 protein did not inhibit the proliferation of U-87MG and U-251 cells. **Conclusion:** TAT-ASPP2 fusion protein has been successfully expressed and purified, and the fusion protein can significantly inhibit the proliferation of glioma cells.

[Key words] glioma; TAT-ASPP2; fusion protein; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(1): 42-45]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30800285);福建省卫生厅青年科研课题(No. 2007-1-20)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30800285), and the Young Scientist Foundation from Health Bureau of Fujian Province (No. 2007-1-20)

[作者简介] 何火聪(1973-),男,福建省福州市人,理学硕士,主管技师,主要从事肿瘤放射治疗基础和临床的研究

[通信作者] 何火聪(HE Huo-cong, corresponding author), E-mail: hconghe@163.com

[网络出版] 2011-01-25; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110125.1120.018.html>

胶质瘤是颅内发病率最高的原发性脑肿瘤,其治疗效果不明显的一个重要原因就是药物难以突破血脑屏障到达大脑^[1-3]。多种肿瘤的发生都是由于 p53 蛋白功能的丧失,胶质瘤也不例外^[4-5]。Henson 等^[6-7]发现,胶质瘤的发生及恶性进展与抑癌基因 p53 的缺失及 p53 蛋白失活有关。研究^[8-12]证明,ASPP2(apoptosis-stimulating protein 2 of p53)蛋白是 p53 的关键调节蛋白,ASPP2 可增强 p53 蛋白与 DNA 的结合,促进 p53 基因启动子的活化,增强 p53 蛋白的细胞凋亡功能。11 个氨基酸 (YGRKKRRQRRR)组成的 TAT(trans-activator transcription)短肽具有介导外源生物大分子跨膜递送进入细胞的功能^[13-17]。本实验把具有跨膜转导功能的 TAT 与能特异性诱导激活 p53 的 ASPP2 融合,构建 TAT-ASPP2 融合蛋白,观察 TAT-ASPP2 融合蛋白对胶质瘤细胞 U-87MG 和 U-251 的作用,以期为临床胶质瘤的生物治疗研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要实验材料

人肝细胞 L-02、人胶质瘤细胞 U-87MG 和 U251 购自中科院上海细胞库。pET303/CT-His 和 Trizol 购自 Invitrogen 公司,In-Fusion 酶试剂盒和 EX Taq 酶购自 TaKaRa 公司,质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司,限制性内切酶 *Xba*I 和 *Xho*I 购自 NEB 公司,大肠杆菌 *E. coli* BL21 购自 Novagen 公司。兔抗人 ASPP2 一抗购自 Abcam 公司,羊抗兔二抗购自 Pierce 公司,Ecl Dual Vue marker 购自 GE 公司,ECL 化学发光试剂盒购自碧云天公司。PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 引物设计与合成

根据 Gene Bank 中 ASPP2 基因 mRNA 序列 (BC058918)及 In-Fusion 酶的要求设计与合成引物。上游引物:5'-AGAAGGAGCTCTAGAATGTATGCGAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCGATGTTTCTTACCGTGTATCTCA-3',下游引物:5'-GTGGTGGTCTCGAGGCCAAGCTCCTTTGTCTTGGTTT-3'。其中上下游引物的 5' 各含有与 pET303/CT-His 载体两端相同的 15 个碱基,上游引物还引入 TAT 的序列。

1.3 原核表达质粒 pET-TAT-ASPP2 的构建

抽提 L-02 细胞 mRNA,反转录为 cDNA,进行 PCR 扩增。扩增程序为:94 °C 预变性 4 min 后进入循环,94 °C 30 s,58.1 °C 30 s,72 °C 4 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,胶回收纯化目的 DNA 片段,与经

Xba I 和 *Xho* I 双酶切的 pET303/CT-His 载体连接,构建重组质粒 pET-TAT-ASPP2。重组质粒转化感受态细胞 BL21 后,筛选阳性重组子,最后进行阳性克隆的 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切、PCR 鉴定和 DNA 测序鉴定。

1.4 TAT-ASPP2 融合蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析鉴定

挑取经鉴定正确的阳性克隆接种于 100 ml 含 50 μg/ml Amp 的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养至对数生长期;按 1:10 接种至 1 000 ml 新鲜的 LB 培养基中,30 °C 振荡培养到 $D_{600} = 0.6 \sim 0.8$,加 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L,于 16 °C 振荡过夜,诱导 TAT-ASPP2 融合蛋白表达。离心收集菌体,超声破碎,离心收集裂解液上清,用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化 TAT-ASPP2 融合蛋白,纯化产物以 7.5% SDS-PAGE 分析鉴定。

1.5 Western blotting 检测 TAT-ASPP2 融合蛋白的表达

将上述诱导表达后的 TAT-ASPP2 融合蛋白行 7.5% SDS-PAGE,恒流转移至 PVDF 膜上,用 3% BSA 封闭 1 h,TTBS 洗膜 3 min × 6 次,加入兔抗人 ASPP2 抗体与膜上的抗原结合,用相应的 HRP 偶联的二抗与其反应后,加 ECL 化学发光试剂,经压片曝光后显影和定影分析。

1.6 MTT 法检测 TAT-ASPP2 融合蛋白对胶质瘤细胞的抑制

取对数生长期的人胶质瘤细胞 U-87MG 和 U251,每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中,37 °C 培养 24 h,加入质量浓度为 500 μg/ml 的纯化 TAT-ASPP2 蛋白,培养 48 h 后弃上清,加入 MTT (2 mg/ml) 50 μl,继续培养 4 h,每孔加入 150 μl 二甲亚砜,室温摇床振荡 10 min,酶标仪上测定 570 nm 处的光密度值 (D_{570})。根据测得的数值计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = $[1 - (D_{490} \text{处理组} / D_{490} \text{对照组})] \times 100\%$ 。相同质量浓度的 ASPP2 (本科室已克隆表达纯化并保存)作用于胶质瘤细胞作为对照。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 14.0 软件,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原核表达质粒 pET-TAT-ASPP2 的构建

抽提 pET-TAT-ASPP2 质粒,*Xba* I 和 *Xho* I 双

酶切,1%琼脂糖电泳,可见在 5 369 bp 和 3 451 bp 处各有一条明亮的谱带(图 1)。以质粒 pET-TAT-ASPP2 为模版,用目的基因 TAT-ASPP2 扩增的上、下游引物进行目的基因的 PCR 鉴定,结果在 3 451 bp 处有一条十分明显的扩增谱带(图 1),与酶切得到的目的基因 TAT-ASPP2 对应的谱带位置一致。另外,把酶切鉴定和 PCR 鉴定的阳性克隆子进行 DNA 测序,通过 BLAST 把测得的序列与设计的基因序列比对,结果一致。由此证明成功构建 pET-TAT-ASPP2 表达质粒。

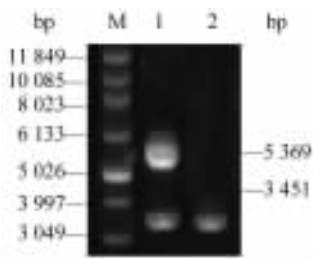


图 1 重组质粒 pET-TAT-ASPP2 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pET-TAT-ASPP2

M: Marker; 1: pET-TAT-ASPP2 plasmid digested by *Xba* I / *Xho* I; 2: PCR product of pET-TAT-ASPP2

2.2 TAT-ASPP2 融合蛋白在大肠杆菌 BL21 的诱导表达

将构建的原核表达质粒 pET-TAT-ASPP2 转化 BL21 菌,TAT-ASPP2 融合蛋白经 IPTG 诱导表达后取样电泳,同时进行 Ni-NTA 亲和层析柱纯化。结果发现,在相对分子质量约为 128 000 的位置有一条明显的蛋白带,其相对分子质量大小与预测值相符;表达产物经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化得到 TAT-ASPP2 融合蛋白的纯度达到电泳纯,其相对分子质量同样约为 128 000(图 2)。用抗 ASPP2 的抗体对纯化的 TAT-ASPP2 融合蛋白进行 Western blotting 分析,结果可见,在相对分子质量约为 128 000 附近出现一特异性抗体结合的条带(图 3),说明 TAT-ASPP2 融合蛋白在大肠杆菌 BL21 内成功获得表达。

2.3 TAT-ASPP2 对不同胶质瘤细胞增殖的抑制作用

MTT 实验结果(图 4)显示,TAT-ASPP2 融合蛋白对胶质瘤细胞 U-87MG 和 U251 的增殖均有明显的抑制作用,对两者的抑制率分别为(65.0 ± 3.0)%和(64.7 ± 2.5)%。而作为对照的 ASPP2 对两种胶质瘤细胞的增殖没有抑制作用,与作为空白对照的细胞培养液无显著差异。

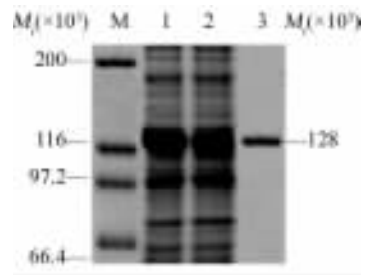


图 2 TAT-ASPP2 融合蛋白的表达与纯化

Fig. 2 Expression and purification of TAT-ASPP2 fusion protein

M: Marker; 1: Expression product of pET-TAT-ASPP2; 2: Flow-through sample; 3: Purified TAT-ASPP2 fusion Protein

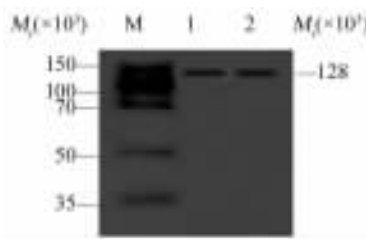


图 3 Western blotting 检测 TAT-ASPP2 融合蛋白的表达

Fig. 3 TAT-ASPP2 fusion protein was detected by Western blotting analysis

M: Marker; 1: Expression product of pET-TAT-ASPP2; 2: Purified TAT-ASPP2 fusion Protein

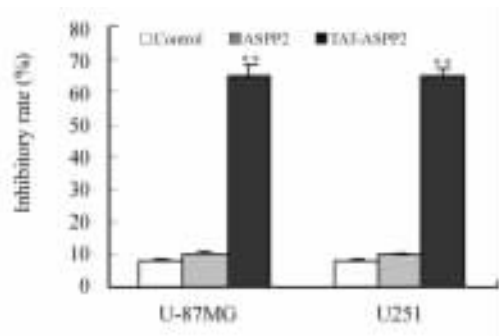


图 4 TAT-ASPP2 融合蛋白对胶质瘤细胞的抑制作用

Fig. 4 TAT-ASPP2 fusion protein inhibited proliferation of glioma cells

** P < 0.01 vs control or ASPP2

3 讨论

In-Fusion 技术是 Clontech 公司新近开发的一种克隆新技术,已广泛应用于克隆实验的研究^[18-19]。Berrow 等^[20]利用这一技术进行高通量载体构建,其克隆效率超过 90%,明显高于 Gate Way 重组技术(79%)和经典的限制性酶切连接技术(87%)。In-Fusion 技术的核心是根据线性化载体

两端序列,在 PCR 引物设计中分别引入 15 个碱基的载体末端序列,使 PCR 引物 5'端分别带有与线性载体两端相同的 15 个碱基;然后在反应体系中加入 In-Fusion 酶,室温反应 30 min,PCR 产物即可与线性化载体两端的序列进行定向交换,使目的基因精确克隆至目的载体。

本研究应用 In-Fusion 技术所构建的 pET-TAT-ASPP2 重组表达质粒经过 PCR、酶切和测序鉴定证实,TAT-ASPP2 基因被成功插入到 pET303/CT-His 载体。实验证实,TAT-ASPP2 融合蛋白能够在大肠杆菌 BL21 中正确诱导表达,其在大肠杆菌 BL21 表达系统中表达量较高,并且通过降低表达温度能够获得可溶性融合蛋白(数据未显示)。可溶性 TAT-ASPP2 应用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化,其纯度达电泳纯。另外,结果表明,TAT-ASPP2 可特异地被抗 ASPP2 抗体识别,从而证实 TAT-ASPP2 在大肠杆菌 BL21 内成功获得表达。MTT 实验表明,TAT-ASPP2 对两种胶质瘤细胞 U-87MG 和 U251 都具有抑制作用,而单纯的 ASPP2 对胶质瘤细胞 U-87MG 和 U251 没有抑制作用。其原因可能是前者携带有 TAT 跨膜递送载体,能把 ASPP2 从细胞外递送到细胞内,ASPP2 可以特异性激活 p53,诱导胶质瘤细胞凋亡;单纯的 ASPP2 无法从细胞外跨膜转导到细胞内,因此不能激活 p53 的促细胞凋亡作用。

TAT 短肽作为一种跨膜递送载体,能突破血脑屏障,将蛋白质、多肽和核酸递送至目的区域^[13-17],有着良好的应用前景。ASPP2 能特异地激活 p53,诱导肿瘤细胞凋亡。因此,本研究获得的 TAT-ASPP2 融合蛋白,将有助于对包括胶质瘤在内的头颅肿瘤的生物治疗奠定基础。

[参考文献]

- [1] Neuhaus W, Germann B, Plattner VE, et al. Alteration of the glycocalyx of two blood-brain barrier mimicking cell lines is inducible by glioma conditioned media [J]. *Brain Res*, 2009, 1279 (1): 82-89.
- [2] Neuhaus W, Wirth M, Plattner VE, et al. Expression of Claudin-1, Claudin-3 and Claudin-5 in human blood-brain barrier mimicking cell line ECV304 is inducible by glioma-conditioned media [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 446(2-3): 59-64.
- [3] Hsieh CH, Chen YF, Chen FD, et al. Evaluation of pharmacokinetics of 4-borono-2-(18)F-fluoro-L-phenylalanine for boron neutron capture therapy in a glioma-bearing rat model with hyperosmolar blood-brain barrier disruption [J]. *J Nucl Med*, 2005, 46 (11): 1858-1865.
- [4] Luan S, Sun L, Huang F. MicroRNA-34a: A novel tumor suppressor in p53-mutant glioma cell line U251 [J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(2): 67-74.
- [5] Robertson LB, Armstrong GN, Olver BD, et al. Survey of familial glioma and role of germline p16INK4A/p14ARF and p53 mutation [J]. *Fam Cancer*, 2010, 9(3): 413-421.
- [6] Henson JW, Hobbs W, Chakravarti A, et al. Alterations in p53, p21, and MIB-1 labeling index in primary human astrocytomas following radiation therapy [J]. *J Neurooncol*, 2005, 74(2): 151-154.
- [7] Wang Y, Yang J, Zheng H, et al. Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(6): 514-526.
- [8] Liua ZJ, Lub X, Zhong S. ASPP: Apoptotic specific regulator of p53 [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1756 (1): 77-80.
- [9] Patel S, George R, Autore F, et al. Molecular interactions of ASPP1 and ASPP2 with the p53 protein family and the apoptotic promoters PUMA and Bax [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(16): 5139-5151.
- [10] Vives V, Su J, Zhong S, et al. ASPP2 is a haploinsufficient tumor suppressor that cooperates with p53 to suppress tumor growth [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(10): 1262-1267.
- [11] Zhu Z, Ramos J, Kampa K, et al. Control of ASPP2/(53BP2L) protein levels by proteasomal degradation modulates p53 apoptotic function [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(41): 34473-34480.
- [12] Chen D, Padiernos E, Ding F, et al. Apoptosis-stimulating protein of p53-2 (ASPP2/53BP2L) is an E2F target gene [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(4): 358-368.
- [13] Chen X, Lai J, Pan Q, et al. The delivery of HBcAg via Tat-PTD enhances specific immune response and inhibits Hepatitis B virus replication in transgenic mice [J]. *Vaccine*, 2010, 28(23): 3913-3919.
- [14] Zhang K, Fang H, Chen Z, et al. Shape effects of nanoparticles conjugated with cell-penetrating peptides (HIV Tat PTD) on CHO cell uptake [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(9): 1880-1887.
- [15] Ziegler A, Seelig J. High affinity of the cell-penetrating peptide HIV-1 Tat-PTD for DNA [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(27): 8138-8145.
- [16] 何火聪,刘树滔,潘剑茹,等. TAT-PTD 融合蛋白可能存在的跨膜递送作用机制 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(9): 704-710.
- [17] 陈菁,傅蓉,刘树滔,等. Tat 蛋白转导区域位于融合蛋白 C 端时的跨膜递送作用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21(4): 459-464.
- [18] Benoit RM, Wilhelm RN, Scherer-Becker D, et al. An improved method for fast, robust, and seamless integration of DNA fragments into multiple plasmids [J]. *Protein Expr Purif*, 2006, 45 (1): 66-71.
- [19] Jones ML, Seldon T, Smede M, et al. A method for rapid, ligation-independent reformatting of recombinant monoclonal antibodies [J]. *J Immunol Met*, 2010, 354(1/2): 85-90.
- [20] Berrow NS, Alderton D, Sainsbury S, et al. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35 (6): e45.

[收稿日期] 2010 - 11 - 02

[修回日期] 2010 - 12 - 10

[本文编辑] 韩 丹