论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0648-04

TAT/CT-1及TAT/EGFP融合蛋白的表达与纯化及其在小鼠体内分布的观察

李兴鑫,周 跃,张正丰 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要: 目的 分别构建含蛋白转导域(protein transduction domain, PTD)TAT与小鼠心肌营养素-1(CT-1)及TAT与增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)融合基因片断的原核表达质粒TAT/CT-1及TAT/EGFP,利用大肠杆菌进行表达并纯化;观察融合蛋白在小鼠体内的分布。**方法** 采用PCR及克隆技术将CT-1编码区基因以及EGFP基因分别与TAT连接到原核表达载体pGEX-4T3上。用IPTG诱导表达融合蛋白,谷胱甘肽琼脂糖4B纯化融合蛋白。小鼠尾静脉注射融合蛋白,脑、脊髓、肝、心肌等器官冰冻切片,免疫荧光观察融合蛋白的存在。**结果** 目的片断CT-1及EGFP被有效的扩增,构建后质粒测序表明无PCR引起的突变,TAT/CT-1及TAT/EGFP在转化的大肠杆菌中获得高效表达,并成功纯化。脑、脊髓、肝、心肌等组织切片免疫荧光检测呈阳性。**结论** 成功获得了有活性的TAT/CT-1及TAT/EGFP的基因表达产物;TAT可介导CT-1及EGFP由细胞外跨膜转导进入细胞内;为CT-1功能的进一步研究打下了基础。

关键词: 心肌营养素-1;重组融合蛋白质;蛋白转导域;小鼠

中图法分类号: R394.3; R378.21; R349.64 **文献标识码**: A

Expression and purification of TAT/CT-1 and TAT/EGFP fusion proteins

LI Xing-xin, ZHOU Yue, ZHANG Zheng-feng (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct a vector containing protein transduction domain (PTD) and cardiotrophin-1 and a vector containing PTD and EGFP, express them in *E. coli.* and purify them. To detect the distribution of the two fusion proteins in mice. **Methods** CT-1 and EGFP were cloned to GST-fusion expression vector pGEX-4T3 by PCR and cloning techniques respectively, and then TAT was cloned into the vectors respectively to give pGEX-TAT/CT-1, pGEX-TAT/EGFP. After induced by IPTG the soluble protein GST-TAT/CT-1 and GST-TAT/EGFP was purified by Glutathione Sepharose 4B. The purified fusion proteins were injected into mice through caudal vein and examined in tissue section by immunohistochemical staining. **Results** CT-1 and EGFP were effectively amplified and the TAT/CT-1 and TAT/EGFP gene sequencing showed the same sequence as scheduled. The fusion proteins was successfully expressed in *E. coli.* and purified. **Conclusion** TAT/CT-1 and TAT/EGFP fusion proteins were expressed and purified successfully. The two fusion proteins were all detected positively in mouse brain, spinal cord, heart and liver.

Key words: cardiotrophin-1; recombinant fusion proteins; protein transportation domain; mouse

心肌营养素-1 (cardiotrophin-1, CT-1) 是1995年由Pennica等[1]发现的一种新的细胞因子,由201个氨基酸组成,属IL-6家族,能够刺激体外新生大鼠心肌的生长。已报道CT-1对神经损伤方面有治疗作用[2]。然而可溶性生物大分子物质很难自由通过血脑屏障,从而限制了CT-1的应用及给药方式。

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)-1编码的反式激活蛋白TAT中含有一段与蛋白转导功能相关联的多肽片段[3],称之为蛋白转导域。其介导的蛋白转导过程甚至可以穿过血脑屏障[4]。本实验的目的是利用大肠杆菌高效表达可溶性重组TAT/CT-1蛋白,并观察其在小鼠体内的分布,以满足对CT-1生物学作用进一步研究的需要。由于绿色荧光蛋白易于观察,便于定位,故同时构建了重组TAT/EGFP质粒。为融合蛋白在动物体内的分布观察提供方便。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

pGEX-4T3-CT-1/TTC:包含CT-1(法国Bordet教授惠赠);

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472008)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30472008)

作者简介:李兴鑫(1980-),男,四川省成都市人,硕士研究生;主要从事脊柱外科方面的研究。E-mail:StarPre@163.com

通讯作者:张正丰,电话:(023)68774908

收稿日期:2005-11-02;修回日期:2006-01-10

pEGFP-C1（Clontech 公司）；大肠杆菌：BL-21（DE3）（博大泰克），DH5α（新桥医院中心实验室保存）。

1.2　主要试剂

*Bam*H Ⅰ，*Sal* Ⅰ，*Not* Ⅰ 内切酶（NEB）；T_4 DNA 连接酶（NEB）；Takara LA *Taq*（Takara）；Glutathione Sepharose 4B（Amersham Biosciences）；山羊抗 CT-1 抗体（Santa Cruz Biotechnology）；异硫氰酸荧光素（FITC）标记抗山羊 IgG（北京中杉金桥公司）。

1.3　PCR 引物

自行设计，北京赛百盛公司合成。

CT-1 上游引物：5′-AGAGAGGTCGACAGCCAGAGGGAGGGAAGTC-3′（musCT-1 cDNA 序列的 23～41 碱基；GenBank 索取号：U18366）下划线为 *Sal* Ⅰ 酶切位点；下游引物：5′-AAAAAAGCGGCCGCTCAGGCGACGCCCCCTGGC-3′（musCT-1 cDNA 序列的 631～613 碱基）下划线为 *Not* Ⅰ 酶切位点。CT-1 的编码区为 20～631 bp 编码 204 个氨基酸。P_1 和 P_2 的 PCR 产物为 23 到 631，算上加入的多克隆位点和保护就碱基，共 635 bp，包含 CT-1 的开放阅读框和终止密码子。

EGFP 上游引物：5′-AGAGAG GTCGACGTGAGCAAGGGCGAGGAGC（pEGFP-C1 全长序列的 616～634 碱基；GenBank 索取号：U55763）下划线为 *Sal* Ⅰ 酶切位点。下游引物：5′-AGAGAGGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG（pEGFP-C1 序列的 1330～1311 碱基）下划线为 *Not* Ⅰ 酶切位点。EGFP 基因的编码区为 613～1 329 bp，编码 239 个氨基酸。P_1 和 P_2 的 PCR 产物为 616～1 330 bp，算上加入的多克隆位点和保护碱基，共 743 bp，包含 EGFP 的开放阅读框和终止密码子。

1.4　TAT 的合成

正义链：CCGCGTGGATCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGGCGGAGGCGGAGGCGTCGACTCGAGCA 下划线分别为：*Bam*H Ⅰ，*Sal* Ⅰ 酶切位点，虚线为 5 个甘氨酸。反义链略。由上海博亚公司合成，自行退火成双链 TAT。

1.5　pGEX-TAT/CT-1 的构建

将 pGEX-4T3-CT-1/TTC 载体，CT-1PCR 产物 *Sal* Ⅰ，*Not* Ⅰ 双酶切，回收 CT-1，pGEX-4T3 酶切片段，并连接，转化 DH5α，挑取菌落，细菌培养，质粒提取，酶切鉴定，命名为 pGEX-CT-1；将此载体以及 TAT 双链 *Bam*H Ⅰ，*Sal* Ⅰ 双酶切，回收 TAT，pGEX-CT-1 酶切片段，并连接，转化 DH5α，挑取菌落，细菌培养，质粒提取，酶切鉴定，命名为 pGEX-TAT/CT-1。

1.6　pGEX-TAT/EGFP 的构建

将 pGEX-TAT/CT-1 以及 EGFP PCR 结果 *Sal* Ⅰ，*Not* Ⅰ 双酶切，回收 EGFP，pGEX-TAT 酶切片段并连接，转化 DH5α，挑取菌落，细菌培养，质粒提取，酶切鉴定，命名为 pGEX-TAT/EGFP（图 1）。



图 1　融合基因的结构

1.7　pGEX-TAT/CT-1，pGEX-TAT/EGFP 在大肠杆菌中的表达纯化

分别提取质粒 pGEX-TAT/CT-1，pGEX-TAT/EGFP，转化大肠杆菌 BL-21（DE3）。挑单菌落培养过夜，以 1-100 的比例接种到 LB 培养基中。37 ℃ 培养 3 h［至 $D(600)=0.4$］，加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L。25 ℃ 诱导 4 h，收集细菌，PBS 漂洗 2 次。超声裂菌，离心收集上清，加入 Glutathione Sepharose 4B，室温轻摇 30 min，还原性谷胱甘肽洗脱。$D(260)$ 吸光度测量浓度，SDS-PAGE 分析。蛋白部分冷冻干燥，部分加入终浓度 10% 甘油，－70 ℃保存。

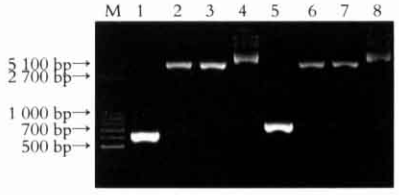
1.8　融合蛋白 TAT/CT-1，TAT/EGFP 在小鼠体内分布的观察

体质量 28～32 g 的昆明小鼠经尾静脉分别注射约含 500 μg TAT/CT-1，TAT/EGFP 融合蛋白的无菌溶液 0.5 ml。注射4 h后戊巴比妥钠腹腔麻醉小鼠，由左心室用生理盐水 50 ml 冲洗，取脑、脊髓、肝、心肌等器官做恒冷箱切片，片厚 10 μm。TAT/CT-1 免疫荧光按试剂盒说明书操作；TAT/EGFP 组织切片直接在荧光显微镜下观察。对照组注射 0.5 ml 无菌生理盐水，余同实验组。

2　结果

2.1　表达载体 pGEX-TAT/CT-1，pGEX-TAT/EGFP 的构建

CT-1，EGFP PCR 产物分别为 635、743 bp，几乎无杂带，pGEX-TAT/CT-1，pGEX-TAT/EGFP 双酶切大小与 PCR 产物一致。分别双向测序完全正确，无 PCR 引起的突变（测序图略）。原核表达载体 pGEX-TAT/CT-1，pGEX-TAT/EGFP 构建成功，见图 2。



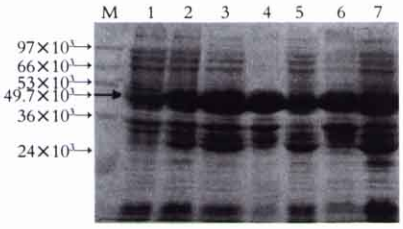
M：标准；1：CT-1 PCR 产物；2：pGEX-TAT/CT-1，*Sal* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 酶切；3：pGEX-TAT/CT-1，*Bam*H Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 酶切；4：pGEX-TAT/CT-1；5：EGFP PCR 结果；6：pGEX-TAT/EGFP，*Sal* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 酶切；7：pGEX-TAT/EGFP，*Bam*H Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 酶切；8：pGEX-TAT/EGFP

图 2　重组质粒 pGEX-TAT/CT-1 及 pGEX-TAT/EGFP 的构建

2.2　pGEX-TAT/CT-1，pGEX-TAT/EGFP 在大肠杆菌中的表达及纯化

经过 IPTG 诱导 4 h 后，超声破菌，分别对上清和沉淀 SDS-PAGE 分析，结果表明 TAT/CT-1，TAT/EGFP 均有可溶性和包涵体两种存在形式。虽然 37 ℃ 蛋白表达量最高，但包涵体含量也高；降低诱导温度，在 25 ℃ 时，TAT/CT-1，TAT/EGFP 可溶性蛋白含量均为最高。因此本实验采用 25 ℃ 诱导 4 h 为诱导

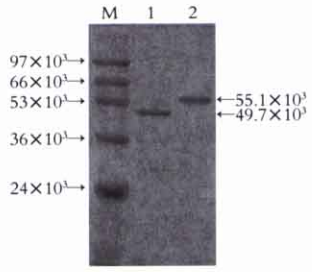
条件，见图3（TAT/EGFP 图略）。



M：标准；1：pGEX-TAT/CT-1 未加 IPTG；2：使用 IPTG，37 ℃诱导 1 h；3：使用 IPTG，37℃诱导 4 h；4：37 ℃诱导 4 h，包涵体；5：37 ℃诱导 4 h，可溶性蛋白；6：25℃诱导4 h，包涵体；7：25 ℃诱导4 h，可溶性蛋白

图3 pGEX-TAT/CT-1 在 BL-21 大肠杆菌中的表达

细菌裂解后，上清经 Glutathione Sepharose 4B，还原性谷胱甘肽洗脱，产物 SDS-PAGE 分析表明在相对分子量 49.7×10^3 和 55.1×10^3 处分别有与 GST-TAT/CT-1 和 GST-TAT/EGFP 融合蛋白分子量相当的蛋白条带。融合蛋白纯度均达 90% 左右，浓度均在 1.2 mg/ml 以上，见图4。



M：标准；1：纯化后的 GST-TAT/CT-1 蛋白；2：纯化后的 GST-TAT/EGFP 蛋白

图4 TAT/CT-1，TAT/EGFP 的表达和纯化

2.3 TAT/CT-1，TAT/EGFP 在小鼠体内分布的观察

小鼠尾静脉注射融合蛋白及生理盐水，4 h 后生理盐水灌注，脑、脊髓、肝、心肌等器官冰冻切片。TAT/CT-1 采用免疫荧光方法检测，TAT/EGFP 直接在荧光显微镜下观察。结果显示：对照组小鼠组织切片抗 CT-1 免疫荧光照片未见阳性结果（图略）；而 TAT/CT-1 各组织切片抗 CT-1 免疫荧光照片检测到 CT-1；TAT/EGFP 在各个组织中均被检测到。图 5～8 示 TAT/CT-1 的脑、心肌切片及 TAT/EGFP 的脊髓和肝切片。

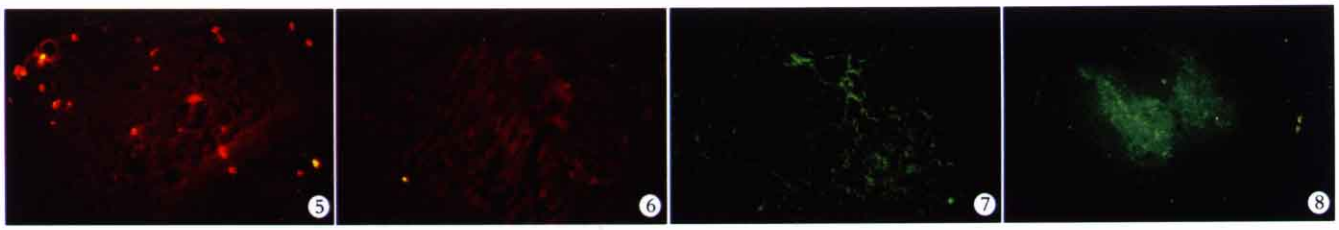


图5 TAT/CT-1 在小鼠脑组织中的分布 可见荧光弥散的分布于整个组织切片中 （免疫荧光×100）

图6 TAT/CT-1 在小鼠心肌中的分布 可见荧光在整个切片中均有分布 （免疫荧光×200）

图7 TAT/EGFP 在小鼠肝脏内的分布 肝细胞索，中央静脉清晰可见 （荧光显微镜×400）

图8 TAT/EGFP 在小鼠脊髓中的分布 灰质前后角均清晰可见，灰质荧光强于白质 （荧光显微镜×50）

3 讨论

CT-1 基因 N 端缺乏分泌信号肽的疏水性序列和糖基化位点[1]，对翻译后修饰及折叠的要求较低，故本实验选用大肠杆菌为表达系统；分析小鼠 CT-1 基因序列表明，其蛋白编码的 GC 含量为 69 %，而且 GC 主要密布在起始密码和终止密码附近。为排除高 GC 含量对 CT-1 表达量的影响，我们采用了 GST 融合蛋白表达系统对 CT-1 进行表达，其目的是通过在目的基因的上游连接一个融合伴侣分子，避免了目的基因的结构对载体启动子的影响。同时 pGEX-4T3 表达载体表达的融合蛋白含有 GST 融合标签，GST 融合蛋白容易纯化[5]。

本实验采用直接在 PCR 引物的两头加入酶切位点及其保护碱基，从而省略了 T-A 克隆的步骤。PCR 产物包含了整个 CT-1 的开放阅读框（ORF）并与 pGEX-4T3 表达载体 GST 读框一致。纯化 PCR 产物后直接进行双酶切，胶回收，再次纯化后克隆入表达载体。并在 TAT 和 CT-1，以及 TAT 和 EGFP 之间插入了 5 个甘氨酸残基，使它们之间可以自由旋转形成各自的高级结构，从而保证了其各自的生物学活性。

大肠杆菌表达系统表达的重组蛋白若要进行功能研究，应尽可能的使其可溶性表达。到目前为止还没有一个可供参考的通用方法来减少包涵体的产生，常用的方法就是降低 IPTG 的浓度，以及降低诱导温度。pGEX-TAT/CT-1 及 pGEX-TAT/EGFP 融合表达载体在经过 IPTG 诱导，超声破菌离心后，分别对上清和沉淀 SDS-PAGE 分析，结果表明二者均有可溶性和包涵体两种存在形式。本实验采用 25 ℃，0.2 mmol/L IPTG 诱导 4 h，可溶蛋白达到了菌体蛋白的 10%。GST-TAT/CT-1 及 GST-TAT/EGFP 蛋白可溶性上清经 Glutathione Sepharose 4B 纯化，蛋白纯度均达到 90% 以上。

很多有治疗作用的蛋白质，多肽等药物很难通过

血脑屏障。而增加血脑屏障的通透性，使治疗药物通过血脑屏障直达病灶一直是人们探索的目标。HIV-TAT蛋白转导域是新近发现的一种在蛋白转导过程中能高效穿过生物膜的结构域，1988年Green首次报道了HIV-1的反式激活蛋白TAT能够跨膜导入细胞内部。我们将TAT与CT-1进行基因融合并表达出可溶性融合蛋白，动物实验证实其在脑、脊髓、肝脏、心肌等均有分布。从而为心肌营养素-1更进一步的功能性研究打下了基础。

参考文献：

[1] PENNICA D, KING K L, SHAW K J, *et al*. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92 (4): 1142-1146.

[2] 张正丰，廖维宏，杨青峰. 人心肌营养素在大肠杆菌中的表达纯化和活性鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(24): 2189-2192.

[3] FITTIPALDI A, GIACCA M. Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(4): 597-608.

[4] SCHWARZE S R, HO A, VOCERO-AKBANI A, *et al*. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse [J]. Science, 1999, 285(5433): 1569-1572.

[5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]// 黄培堂译. 北京：科学出版社, 2002: 1245-1248.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2006)07-0651-01

个案与短篇

肾脏后肾腺瘤2例

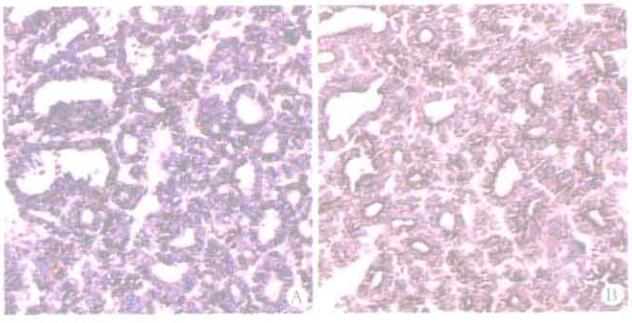
王 玲 （贵州省遵义医学院病理学教研室，遵义 563003）

后肾腺瘤（metanephric adenoma，MA）是一种少见的良性肾脏肿瘤，1988年Mosloft等首次报道，1992年Brisigotti将其称为后肾腺瘤，国内外报道并不多，到目前为止国内报道不足10例[1-3]。我们近2年诊断了2例后肾腺瘤，结合文献报告如下。

1 临床资料

病例1：女性，37岁，体检发现右肾占位1个月，无发热、腰酸背痛、血尿、尿急、尿痛、肾区无压痛。B超示右肾下极占位，大小1.7 cm×1.8 cm；CT示右肾下极占位，肾癌可能；MRI示右肾下极新生物，错构瘤可能。临床诊断为右肾占位，行右肾占位切除术。病例2：男性，70岁，体检发现左肾占位2周，腰酸背痛多年，无发热、血尿、尿急、尿痛，左肾轻叩痛。B超示左肾上极占位，大小8 cm×7 cm×3 cm；CT示左肾上极占位，肾癌可能；MRI示左肾上极新生物，肿瘤可能。临床诊断为左肾癌，行左肾切除手术。

巨检：例1见右肾中下极外侧肿块，边界清，与周围肾组织易分离，呈椭圆形，直径2 cm，包膜完整，切面呈灰黄色，质地中等均匀细腻，少量出血，无坏死。例2见左肾上极结节状肿块，直径8 cm，与周围组织界限清楚，似有包膜，切面灰黄色，质地中等，部分区域囊性变。镜检：2例均见肿瘤组织与周围肾组织界限清楚，无明确包膜。肿瘤组织由均匀一致的小细胞构成，排列成小管样结构，不同区域小管疏密不一。瘤细胞圆形、椭圆形，大小较一致，细胞质少，略嗜酸性，细胞核呈圆形、卵圆形，核染色质细腻，细胞无明显异型，未见病理性核分裂。肿瘤间质较少，呈疏松水肿样，局部可见钙化。免疫组化染色：采用迈新公司提供的抗体，行S-P法。结果显示，肿瘤细胞呈Vimentin阳性（图1A），广谱上皮标记CAM5.2阳性（图1B），EMA、Desmin、Cytocratin、NSE、Chr等其他标记均阴性。病理诊断：2例均诊断为肾脏后肾腺瘤。



A：肿瘤细胞呈Vimentin阳性反应；B：肿瘤细胞呈CAM5.2阳性反应

图1 后肾腺瘤 （S-P×400）

2 讨论

1998年WHO肾脏肿瘤病理组织学分型中将其归入肾脏上皮性良性肿瘤-肾腺瘤中[4]。后肾腺瘤好发于5~83岁的女性，男女之比约1:2.5，临床最常表现为疼痛、血尿和肿块，缺乏特异性，常误诊为肾癌，且多数患者临床表现不明显，约40%

（下转655页）

作者简介：王 玲（1969-），女，四川省广汉市人，主治医师，主要从事临床病理学方面的研究。电话：13518523500

收稿日期：2005-11-28；修回日期：2006-03-10