文章编号:1000-5404(2006)08-0795-03

论著

TAT修饰的小鼠IFNγ的制备

胡大强[1],何凤田[1],郑英如[2],李蓉芬[1],高会广[1],龚薇[1],黄 刚[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042)

提 要:目的 制备小鼠IFNγ-TAT,为TAT影响IFN体内分布等研究作准备。**方法** 采用RT-PCR扩增编码mIFNγ的cDNA序列,经3轮PCR扩增编码mIFNγ-TAT片段,克隆到质粒pUC19,测序鉴定正确后构建到pQE80L表达质粒载体中,经*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ双酶切后1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定;利用SDS-PAGE和Western blot检测表达的目的蛋白。**结果** PCR扩增得到编码mIFNγ-TAT的cDNA片段,测序结果正确,SDS-PAGE和Western blot分析显示重组蛋白在大肠杆菌中获得了高效表达。**结论** 成功制备了TAT修饰的小鼠IFNγ,为进一步实验室研究奠定了基础。

关键词:干扰素;蛋白转导域;构建;表达;蛋白纯化
中图法分类号:Q503;Q51;Q75 **文献标识码**:A

Preparation of TAT modified mouse IFNγ

HU Da-qiang[1], HE Feng-tian[1], ZHENG Ying-ru[2], LI Rong-fen[1], GAO Hui-guang[1], GONG Wei[1], HUANG Gang[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To prepare mouse IFNγ-TAT to make preparations for researching IFN internal distribution affected by TAT. **Methods** A cDNA fragment encoding mIFNγ was amplified by RT-PCR and the cDNA fragment encoding mIFNγ-TAT was amplified by three turns of PCR. After cloned into pUC19 plasmid and sequenced, the PCR product was cloned into expression plasmid vector pQE80L. The recombinant vector was identified with *Bam*HⅠ and *Hind*Ⅲ in 1.2% agarose gel electrophoresis. The recombinant protein mIFNγ-TAT was checked by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** The cDNA fragment encoding mIFNγ-TAT amplified by three turns of PCR was confirmed by sequencing. SDS-PAGE and Western blotting showed that the recombinant protein mIFNγ-TAT was highly expressed in *E. coli*.. **Conclusion** TAT modified mouse IFNγ was successfully prepared. These results provide the basis for further research of mIFNγ-TAT in laboratory.

Key words: interferon; protein transduction domain; construction; expression; protein purification

干扰素(interferon, INF)具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等作用,临床上已广泛使用。INF作为1种分子量超过一万的蛋白质,血脑屏障(blood brain barrier, BBB)对其有屏闭作用,从而限制了INF对脑部肿瘤和病毒感染等疾病的临床应用。TAT蛋白转导域(TAT protein transduction domain, TAT/PTD)是一种在蛋白转导过程中能高效跨膜的结构域。TAT为人Ⅰ型免疫缺陷病毒(HIV-1)的反式激活因子,含有86个氨基酸。蛋白转导域主要是指HIV-1 TAT的11肽(47~57, YGRKKRRQRRR)。TAT/PTD可介导多肽、蛋白质、DNA、脂质体和纳米粒[1-3]等跨越包括血脑屏障在内的多种膜结构进行转运,转运效率高且对细胞没有损伤。采用蛋白融合技术,把TAT的11肽结合到小鼠INFγ(mouse interferon gamma, mINFγ)上,制备mINFγ-TAT融合蛋白,为扩大INF的临床应用提供研究资料。本实验对mINFγ-TAT的重组质粒的构建和蛋白表达进行研究,为mINFγ-TAT的功能学研究打下基础,从而为下一步研究TAT修饰人IFN的功能作铺垫。

1 材料与方法

1.1 动物、质粒和菌株

BALB/c雌性小鼠,体质量(20±2)g,购自大坪医院实验动物中心;pUC19、pQE80L质粒和DH5α菌株,由本教研室保存。

1.2 试剂和仪器

Tripure RNA提取试剂为Roche公司产品,限制性内切酶*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ, DNA聚合酶,T_4连接酶购自大连宝生生物公司。RT-PCR试剂盒为Promga公司产品,质粒提取试剂盒、DNA片段胶回收和PCR产物回收试剂盒为Omega公司产品,

作者简介:胡大强(1974-),男,重庆市巴南区人,硕士研究生,主管药师,主要从事抗肿瘤药物方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752949
通讯作者:何凤田,电话:(023)68752262
收稿日期:2005-09-12;修回日期:2005-11-11

引物由上海生工公司合成，抗-His 单抗和 Ni^{2+}-NTA 层析系统购自德国 Qiagen 公司，异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)为 sigma 公司产品，卡介菌多糖核酸注射液(斯奇康针)购自湖南斯奇生物制药有限公司，批号:20030131。小鼠 IFNγ ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

1.3 引物的设计合成

为得到实验所需目的片段和研究室以后的实验研究，我们设计了扩增 mIFNγ 的引物和 mIFNγ-TAT 引物。上、下游引物分别选用 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ两个酶切位点，引物序列如下：

引物 1:5′-GCAGGATCCATGAACGCTACACACTG-3′;引物 2:5′-TCTAAGCTTTCAGCAGCGACTCCTTTTCC-3′;引物 3:5′-GTCGGATCCCACGGCACAGTCATTG-3′;引物 4:5′-GCTTCTTC-CTGCCATAGCAGCGACTCCTTTTC-3′;引物 5:5′-CTTCGTCGCTG TCTCCGCTTCTTCCTGCCAT-3′;引物 6:5′-GCAAGCTTTTATCT-TCGTCGCTGTCTCCG-3′。

1.4 小鼠脾脏总 RNA 提取

取 BALB/c 小鼠 1 只，腹腔注射卡介菌多糖核酸注射液 0.05 ml/次，1 次/d，给药 2 d，初次给药 36 h 后脱臼处死小鼠，分离脾脏，提取脾脏总 RNA。有关操作依照 RNA 提取试剂盒说明操作，所得总 RNA 于 -70 ℃保存。

1.5 RT-PCR 和 pUC19/mIFNγ 测序载体的构建

采用 RT-PCR 技术扩增出编码 mIFNγ cDNA 片段。RT-PCR 反应以小鼠脾脏总 RNA 为模板，引物 1 为上游引物，引物 2 为下游引物。循环条件:45 ℃反转录 45 min;94 ℃ 2 min 激活热启动 *Taq* DNA 聚合酶;以 cDNA 第一链为模板，94 ℃ 30 s，60 ℃ 1 min，68 ℃ 2 min，共进行 35 个循环;最后 68℃延伸 7 min。RT-PCR 产物纯化后经 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ两个内切酶酶切，回收目的片段构建到 pUC19 质粒，然后转化感受态 DH5α 细菌，蓝白斑筛选，挑选白斑单克隆接种培养后，小量法提取质粒，进行双酶切鉴定，送含阳性重组质粒细菌测序。

1.6 PCR 法扩增编码 mIFNγ-TAT 片段

小量法提取测序正确的 pUC19/mIFNγ 重组质粒作为第 1 轮 PCR 扩增模板，第 2 轮和第 3 轮 PCR 扩增模板分别为前 1 轮 PCR 产物;上游引物都为引物 3 分别与引物为 4 ~ 6 组成 3 对引物，依次经 3 轮 PCR 扩增得到编码 mIFNγ-TAT 片段，PCR 反应条件为 94 ℃ 5 min 激活热启动 *Taq* DNA 聚合酶，然后 94 ℃ 30 s，63 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，共 30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。回收 PCR 产物，构建 pUC19/mIFNγ-TAT 测序质粒送测序，操作同 pUC19/mIFNγ 测序载体的构建。

1.7 pQE80L/mIFNγ-TAT 表达载体的构建

将测序正确的重组 pUC19/mIFNγ-TAT 质粒经小量法提取，经 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ双酶切后琼脂糖电泳胶回收 mIFNγ-TAT 片段，构建到 pQE80L 载体上。再转化感受态 DH5α 细菌，氨苄青霉素抗性筛选，挑选转化单克隆接种培养后，小量法提取质粒，进行双酶切鉴定阳性克隆。

1.8 蛋白的诱导表达

挑取含重组原核表达载体的单个菌落接种于 LB 培养液中，37 ℃，225 r/min振荡培养过夜，次日以 1% 接种到 5 ml LB 培养液中，37 ℃，振荡培养至 $D(600)$ 为 0.6 时，加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，继续培养 4 h，取上述培养液 1 ml，离心 10 000 ×g，1 min，沉淀行 SDS-PAGE。

含重组原核表达载体的细菌 50 ml，诱导表达蛋白，操作同前，菌液离心后，弃去上清，加入 TE，超声碎菌，功率为总工率的 28%，工作时间 2 s，间隔时间 2 s，碎菌 16 min。碎菌液 10 000 ×g，4 ℃离心 15 min，收集上清和沉淀分别行 SDS-PAGE。SDS-PAGE 参照文献[4]进行，使用15% 的聚丙烯酰胺分离胶和5% 浓缩胶。

1.9 Western blot

经诱导的 pQE80L/mIFNγ-TAT/DH5α 工程菌行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，将凝胶上的蛋白半干法电转移至硝酸纤维素膜上，丽春红 S 染色后标出 marker 的位置，去离子水洗去膜上的丽春红 S，5% 脱脂奶粉室温封闭，加抗 His 单抗孵育，洗涤后加 HRP 标记的第二抗体室温孵育 1 h，洗膜后加 DAB 闭光显色。

1.10 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化表达蛋白和蛋白的含量测定

将含重组质粒 pQE80L/mIFNγ-TAT 的表达菌株接种于 500 ml LB 中做大量表达(方法同 1.8)，离心收集诱导表达后的细菌，Lysis 缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl，10 mmol/L 咪唑，NaOH 调至 pH 8.0)悬浮细菌，并加入溶菌酶置冰上 30 min 后超声波破碎菌体，离心得到上清。上清过 Ni^{2+} NTA 树脂层析柱，用 Lysis 缓冲液和 Wash 缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl，20 mmol/L 咪唑，NaOH 调至 pH 8.0)洗柱，直至 $D(280)$ 小于 0.01，Elution 缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl，250 mmol/L 咪唑，NaOH 调至 pH 8.0)洗脱目的蛋白。行 SDS-PAGE 分析，透析纯化蛋白。纯化的蛋白冷冻干燥后 -20 ℃保存。

冷冻干燥的 mIFNγ-TAT 蛋白为白色疏松粉末，蛋白的测定使用小鼠 IFNγ ELISA 试剂盒，采用双抗夹心 ELISA 法测定。精密称取纯化蛋白约 0.015 g，PBS 溶解并稀释成 15 ~ 2 000 pg/ml 浓度范围内，mIFNγ ELISA 试剂盒测定，操作按试剂盒说明书进行。

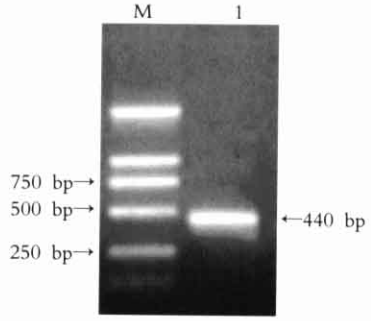
2 结果

2.1 RT-PCR 扩增的 mIFNγ cDNA 片段

1.2% 琼脂糖凝胶电泳显示在 480 bp 处有一特异扩增条带，片段大小与理论预期值一致。

2.2 PCR 扩增的 mIFNγ-TAT 片段

经 3 轮 PCR 扩增后得到的 mIFNγ-TAT 片段，经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后显示在 440 bp 左右处有一特异扩增条带，片段大小与理论预期值一致(图 1)。



M:DNA 标准(DL2000)；1：mIFNγ-TAT 的 PCR 产物

图1 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 mIFNγ-TAT PCR 产物

2.3　pQE80L/mIFNγ-TAT 重组质粒构建

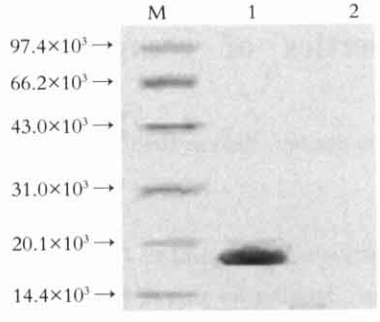
pQE80L-mIFNγ-TAT 经 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切后琼脂糖凝胶电泳显示在 440 bp 和 4.7 kb 各有 1 条带，证明 pQE80L/mIFNγ-TAT 重组质粒已经被成功构建。

2.4　重组蛋白的诱导表达

pQE80L/mIFNγ-TAT 质粒的 DH5α 菌，经 IPTG 诱导后表达了重组目的蛋白。诱导表达蛋白的细菌在 TE 中超声碎菌后的电泳结果显示目的蛋白主要存在于上清，包涵体中 mIFNγ-TAT 量少，说明 mIFNγ-TAT 主要以可溶性形式存在于细菌中。

2.5　融合蛋白的鉴定

Western blot 分析显示，经诱导的菌体裂解物与抗 His 单抗反应，在分子量约 1.7×10^4 处出现单一条带，而未经诱导的菌体则无此反应，说明所表达的融合蛋白有 6×His，该蛋白的确是目的蛋白。结果见图 2。



M：蛋白标准；1：融合蛋白 mIFNγ-TAT；2：阴性对照

图 2　重组蛋白的免疫印迹分析

2.6　表达蛋白的纯化和蛋白的含量测定

表达蛋白经 Ni-NTA 纯化后行 SDS-PAGE，结果电泳谱中呈单一条带，说明目的蛋白得到了较高程度的纯化。用 mIFNγ ELISA 试剂盒测定冷冻干燥的 mIFNγ-TAT 的含量在 36% 以上。

3　讨论

IFNγ 为 Th 细胞和 NK 细胞产生的细胞因子，具有抗肿瘤、抗病毒和免疫调节等功能[5]。临床上可用于肿瘤和类风湿性关节炎治疗。IFNγ 的抗肿瘤作用是 α、β-IFN 的 100 倍。IFN 的分子量超过 10 000，血脑屏障、肾小球屏障等会影响其在脑部组织、肾脏、膀胱和关节等器官和组织的分布，影响 IFN 在这些部位的疗效。TAT 是在蛋白转导过程中能高效穿过生物膜的结构域，有高效穿过细胞膜进入到细胞的功能[6]，且对细胞没有损伤，并且 TAT 可介导细胞器膜、皮肤和血脑屏障[7]等生物膜的跨膜转运。TAT 可与多肽和蛋白质以共价键结合，实现药物跨膜转运的功能。TAT 富含碱性的精氨酸，α 螺旋可使精氨酸残基构像优化从而增加转运效率。TAT 的高效跨膜转运作用为改善 IFN 体内分布提供了新的线索和途径。

在 RT-PCR 试验中，由于使用的是 SPF 级 BALB/c 小鼠，净化条件下生长的小鼠体内 IFN 的表达量低，直接提取的总 RNA 中转录 IFN 的 mRNA 的峰度就非常低，从而影响 RT-PCR 结果。因此，我们筛选细菌内毒素和斯奇康针预先处理小鼠，实验结果显示相同条件下斯奇康针处理小鼠的 RT-PCR 产物明显优于细菌内毒素处理的小鼠，主要是与斯奇康的有效成份有关，斯奇康针为卡介菌多糖核酸注射液，主要成份是卡介菌多糖和核酸，诱生 IFN 的能力强于细菌内毒素。

mIFNγ 的 N 端对功能的影响较 C 端更重要，为了减少 TAT 对 mIFNγ 功能的影响，因此选择在 mIFNγ 的 C 端加上 TAT 肽。TAT 的位置不影响其功能，TAT 为 11 肽[8]，由 33 个碱基编码，在编码 mIFNγ cDNA 的 3′端加上编码 TAT 的 33 个碱基即可。本研究采用 PCR 方法，在下游引物的 5′端逐步加上编码 TAT 的碱基片段，通过 3 轮 PCR 扩增就得到编码 mIFNγ-TAT cDNA 片段，易于操作，方便可行。选择表达载体 pQE80L 可提高目的蛋白的表达量，并且表达的 mIFNγ-TAT 主要为可溶性蛋白，保持其天然活性。由于表达蛋白 N 端含有 6×His 标签，可用 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化目的蛋白，简便可行。

因为 IFN 具有免疫原性和种族特异性，人 IFN（huIFN）用于小鼠可能会产生强烈的免疫反应，影响研究进程和结果，为了便于研究，因此制备 mIFNγ-TAT 来研究 TAT 对 IFN 的功能影响，为下一步 PTD-huIFN 的研究提供基础。

参考文献：

[1] MIE M, TAKAHASHI F, FUNABASHI H, *et al*. Intracellular delivery of antibodies using TAT fusion protein A[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(3): 730 - 734.

[2] HASHIDA H, MIYAMOTO M, CHO Y, *et al*. Fusion of HIV-1 Tat protein transduction domain to poly-lysine as a new DNA delivery tool [J]. Br J Cancer, 2004, 90(6): 1252 - 1258.

[3] MACKAY J A, SZOKA F C, JR. . HIV TAT protein transduction domain mediated cell binding and intracellular delivery of nanoparticles [J]. J Disper Sci Tech, 2003, 24(3-4):467 - 473.

[4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999：379 - 384.

[5] SMITH D M, MAYHEW E, RESZKA R, *et al*. Antiviral and antiproliferative properties of liposome-associated human interferon-gamma [J]. J Interferon Res, 1990, 10(2): 153 - 160.

[6] GUELEN L, PATERSON H, GAKEN J, *et al*. TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(5): 1153 - 1165.

[7] WHEELER D S, DUNSMORE K E, WONG H R. Intracellular delivery of HSP70 using HIV-1 Tat protein transduction domain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(1): 54 - 59.

[8] YANG Y, MA J, SONG Z, *et al*. HIV-1 TAT-mediated protein transduction and subcellular localization using novel expression vectors [J]. FEBS Lett, 2002, 532(1-2): 36 - 44.

（编辑　栾　嘉）