文章编号:1000-5404(2006)22-2213-03

论著

融合蛋白TAT-HIF-1α-PAS-B原核表达载体的构建、表达及纯化

戚华兵,汪仕良,王凤君 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建蛋白转导结构域TAT和人缺氧诱导因子1α PAS-B结构域融合蛋白的原核表达载体,并在大肠杆菌中表达及纯化。**方法** 分别构建原核表达质粒pTAT-PAS-B、pET-PAS-B和pTAT-EGFP;在大肠杆菌BL21(DE3)pLysS内,以IPTG诱导融合蛋白的表达,表达产物经SDS-PAGE及Western blot分析鉴定,利用镍-亚硝胺乙酸-组氨酸(Ni-NTA-His)亲和层析法对重组蛋白进行纯化。**结果** 成功构建了PAS-B结构域的原核表达载体,经过优化表达和纯化条件,融合蛋白在IPTG诱导下获得特异性表达,纯化得到了高纯度的目的蛋白。**结论** 含人缺氧诱导因子1αPAS-B和TAT结构域融合蛋白的成功表达及纯化,为应用该融合蛋白调控体内HIF-1α的活性奠定了基础。

关键词:原核表达系统;TAT蛋白转导结构域;缺氧诱导因子1α;PAS-B结构域
中图法分类号:Q503;Q51;Q782 **文献标识码**:A

Construction, expression and purification of pTAT-HIF-1α-PAS-B in prokaryotic expression system

QI Hua-bing, WANG Shi-liang, WANG Feng-jun (State Key Laboratory of Burns, Trauma, and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct a prokaryotic expression vector for a fusion protein, TAT protein transduction domain (PTD) and the PAS-B domain of hypoxia inducible factor 1α(HIF-1α), and then express and purifr the fusion protein. **Methods** The expression plasmids pTAT-PAS-B, pET-PAS-B and pTAT-EGFP were constructed respectively, and transformed into *E. coli.* BL21(DE3)pLysS strain to be induced by IPTG. The obtained proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The fusion protein were purified with Ni-NTA-His affinity chromatography. **Results** The three recombinant plasmids were constructed successfully. The objective fusion proteins were obtained by optimizing the conditions for expression and purification. **Conclusion** The successful expression and purification of the fusion protein TAT-HIF-1αPAS-B has laid the foundation for using it to modulate the activity of HIF-1α *in vivo*.

Key words: prokaryotic expression system; TAT protein transduction domain; hypoxia inducible factor 1α; PAS-B domain

缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor 1, HIF-1)是机体适应缺氧应激过程中关键的调控因子。越来越多的研究表明,调控HIF-1的活性是缺血缺氧性疾病治疗和药物设计的重要策略[1]。但是,迄今尚无针对HIF-1的特异抑制剂。研究表明,HIF-1二聚体中PAS-B结构域相互作用细微的干扰,使其空间构像发生变化,足以阻止有功能活性的HIF-1转录因子的形成,抑制机体对缺氧的反应[2]。本研究中,我们利用TAT蛋白转导结构域广谱的蛋白转导作用[3],通过构建TAT和人HIF-1α-PAS-B结构域融合蛋白的原核表达载体,经诱导表达后,行SDS-PAGE分析和Western blot鉴定,并对表达的融合蛋白进行了初步的分离、纯化,为构建新型特异的HIF-1α抑制剂奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含有全长HIF-1α-cDNA序列的pCDNA3.1-V5-HisA-HIF-1α质粒由美国德克萨斯西南医学中心Bruick博士惠赠,pEGFP-N_2为美国Clontech公司产品,表达载体pTAT-HA由美国加州大学Doudy教授惠赠,pET28a(+)购自Merck公司。大肠杆菌JM109、pGEM-T载体购自Promega公司,表达菌株BL21(DE3)pLysS、低分子量蛋白标准购自北京天为时代公司。Ex *Taq* DNA多聚酶、限制性内切酶、连接酶和DNA标准均购自TaKaRa公司,抗His抗体以及HRP标记的二抗购自Santa Cruz

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB522601) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522601)
作者简介:戚华兵(1977-),男,云南省陆良县人,博士研究生,主要从事严重烧伤后肠道功能损伤机制及其调理方面的研究。电话:(023)68754148-8051,E-mail: hbingqi3@gmail.com
通讯作者:王凤君,电话:(023)68754148-8031,E-mail:wangfj@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-12-20;**修回日期**:2006-06-30

公司，ECL 试剂盒购自美国 Pierce 公司，色谱柱、带 Ni 的 NTA 琼脂糖购自美国 Merck 公司。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建 分别以 pCDNA3.1-V5-HisA-HIF-1α 和 pEGFP-N2 为模板，PCR 扩增 HIF-1α-PAS-B 结构域对应的 DNA 序列和绿色荧光蛋白的全长 DNA 序列，引物序列如下：pTAT-PAS-B-1（上游引物）：5′-CTGCCATGGCCGATAGCAAGACTTTCCTCA-3′，p TAT-PAS-B-2（下游引物）：5′-CTGCTCGAGTTAGTCGTGCTGAATAATACCAC-3′；pET-PAS-B-1（上游引物）：5′-CTGGAGCTCGATAGCAAGACTTTCCTCA-3′，pET-PAS-B-2（下游引物）：5′-CTGCTCGAGGTCGTGCTGAATAATACCAC -3′；pEGFP-1（上游引物）：5′-CACTGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3′，pEGFP-2：5′-CTGGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3′（下游引物）。经回收的 PCR 产物分别与 pGEM-T 载体相连，所获阳性重组子分别经 *Nco* Ⅰ/*Xho* Ⅰ、*Sac* Ⅰ/*Xho* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切后与同样酶切的表达载体 pTAT-HA、pET28a（+）进行连接反应。得到的阳性克隆分别命名为 pTAT-PAS-B、pET-PAS-B 和 pTAT-EGFP，测序。

1.2.2 融合蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE 电泳分析 分别将 pTAT-PAS-B、pET-PAS-B 和 pTAT-EGFP 质粒转化大肠杆菌 BL21（DE3）pLysS 菌株，挑取单克隆，接种于 6 ml 含 Amp 的 LB 培养基中，37 ℃，250 r/min 震荡培养 3～4 h 至光密度 $D(600)$ 达到 0.4～1.0，从中取出 3 ml 作为未诱导对照，在剩下的样品中加入 IPTG，终浓度为 1 mmol/L，菌液继续震荡培养 3 h。培养结束后，将菌液置于冰上 5 min，取 1 ml 菌液以 12 000 r/min 离心 5 min，弃上清，收集菌体，重悬于 0.25 ml 冰预冷的 20 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）中，再次离心去除上清，加入 1% SDS 上样缓冲液 0.1 ml 重悬沉淀，超声破菌，加入 2×SDS 上样缓冲液 0.1 ml，沸水浴中煮沸 3～5 min。进行 SDS-PAGE 电泳，并行凝胶扫描测定。经诱导表达得到的融合蛋白分别记为 TAT-HIF-1α-PAS-B、HIF-1α-PAS-B 和 TAT-EGFP。

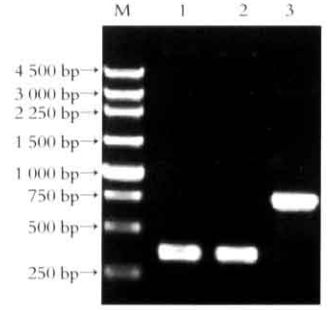
1.2.3 融合蛋白 TAT-HIF-1α-PAS-B、HIF-1α-PAS-B 和 TAT-EGFP 的免疫印迹分析 原核质粒 pTAT-PAS-B、pET-PAS-B 和 pTAT-EGFP 转化的 BL21（DE3）pLysS 经 IPTG 诱导，12% SDS-PAGE 电泳分离后，将融合蛋白转移至 PVDF 膜上，50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h，抗 His 抗体（1∶200）4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 4 次，每次 10 min，羊抗兔的 IgG-HRP（1∶1 000）37 ℃温育 1 h，TBST 洗膜 4 次后，ECL 化学发光显色。

1.2.4 融合蛋白 TAT-HIF-1α-PAS-B、HIF-1α-PAS-B 和 TAT-EGFP 的纯化 参照 Dowdy 等[4]的方法进行。简述如下：过夜培养 pTAT-PAS-B、pET-PAS-B 和 pTAT-EGFP 转化的 BL21（DE3）pLysS 菌液 100 ml，加入 IPTG（终浓度为 1 mmol/L）。37 ℃，250 r/min 震荡培养 3 h，12 000 r/min，5 min 收集菌体，12.5 ml PBS 清洗沉淀 2 次。加入 10 ml Buffer Z 溶液（8 mol/L 尿素，100 mmol/L NaCl，20 mmol/L HEPES，pH 8.0），混匀，冰浴条件下行超声破碎（3×15 s）。12 000 r/min，4 ℃，离心 10 min，保留上清，加入咪唑（终浓度为 20 mmol/L）。将该上清液直接加入经过结合缓冲液（含 20 mmol/L 咪唑的 Buffer Z）平衡的 His-Band 色谱柱，收集直接流出液。以 10 ml 结合缓冲液漂洗色谱柱，然后依次以 1 ml 含 100 mmol/L、250 mmol/L（0.5 ml×2）、500 mmol/L（0.5 ml×2）、1 mol/L（0.5 ml×2）咪唑的 Buffer Z 洗脱目的蛋白，直接流出液、漂洗液以及各组洗脱液行 SDS-PAGE 分析。收集各相应的组分，置于 -80℃备用。

2 结果

2.1 人 HIF-1α-PAS-B 以及绿色荧光蛋白全长 cDNA 序列的 PCR 扩增

PCR 扩增得到了相应的目的片段，大小分别为 356、354、740 bp，见图 1。



M：250 bp DNA 标准；1：HIF-1α-PAS-B（356 bp）；2：HIF-1α-PAS-B（354 bp）；3：EGFP cDNA（740 bp）

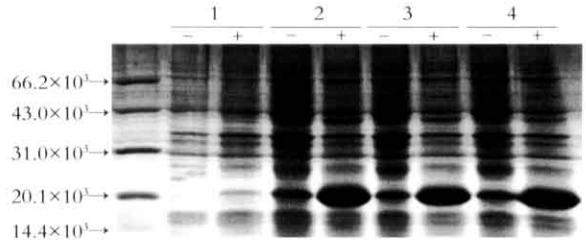
图 1 人 HIF-1α-PAS-B PCR 产物和全长绿色荧光蛋白 cDNA 序列的扩增，0.8% 琼脂糖凝胶电泳图

2.2 重组质粒的酶切鉴定

将已构建的 3 种原核表达质粒 pTAT-PAS-B、pET-PAS-B、pTAT-EGFP 分别经 *Nco* Ⅰ/*Xho* Ⅰ、*Sac* Ⅰ/*Xho* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ行酶切鉴定，其酶切的小片段分别约为 347、346、726 bp，与预期相符。测序报告显示，核苷酸的序列以及表达框无误，表明 3 种重组原核表达质粒构建成功。

2.3 融合蛋白的表达以及 SDS-PAGE 分析

转化 pTAT-PAS-B、pET-PAS-B、pTAT-EGFP 质粒的 BL21（DE3）pLysS 的大肠杆菌，经 IPTG 诱导后，与空载体转化的相同菌株的表达产物相比较，都出现新的蛋白条带，分子量分别约为 21×10^3、18×10^3、35×10^3，与预期的分子量大小相当，结果显示，3 种融合蛋白均表达成功。如图 2 所示（以 TAT-HIF-1α-PAS-B 蛋白电泳结果为例）。



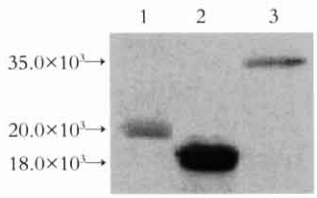
1：pTAT-HA 菌株；2：pTAT-PAS-B-1 号菌；3：pTAT-PAS-B-2 号菌；3：pTAT-PAS-B-3 号菌

图 2 诱导表达的 TAT-HIF-1α-PAS-B 蛋白的 SDS－PAGE 电泳分析

2.4 融合蛋白的免疫印记分析与纯化

利用特异抗组胺酸标签的抗体对目的蛋白行免疫印迹分析，结果如图 3 所示，TAT-HIF-1α-PAS-B 在约 20×10^3、HIF-1α-PAS-B 约在 18×10^3、TAT-EGFP 约在 35×10^3 处出现特异的目的条带，与预期相符，证实融合蛋白在大肠杆菌内获得表达。

经优化咪唑浓度，得到了 3 种组分较纯的融合蛋白。



1：TAT-HIF-1α-PAS-B 蛋白；2：HIF-1α-PAS-B 蛋白；3：TAT-EGFP 蛋白

图 3　表达的融合蛋白的 Western blot 分析

3　讨论

蛋白转导结构域（protein transduction，PTD）是一类在蛋白转导过程中，能高效穿过生物膜的结构域。当其与蛋白质、多肽或 DNA 等分子共价结合时，该结构域通过一个非受体依赖的过程，直接作用于脂质脂质双层，使蛋白高效穿过生物膜，其机制目前尚不完全清楚。TAT 蛋白是人类免疫缺陷性病毒（HIV）的转录因子，其 PTD 核心序列由 11 个氨基酸组成，序列为 YGRKKRRQRRR，这是目前发现最短的 TAT PTD 序列，其转导能力并不比全长 TAT 序列转导能力差，并且转导速度快，效率高。Nagahara 等的研究表明，采用原核表达技术，含 TAT PTD 的融合蛋白能在变性条件下迅速入胞，在细胞内分子伴侣的作用下正确的再折叠，发挥外源蛋白的天然活性。

为了使表达的融合蛋白高效地传递入细胞，我们直接加入 8 mol/L 尿素溶解包涵体，随后在冰浴条件下行超声处理。这不仅增加了目的蛋白的溶解度，同时也使目的蛋白变性，生物效应更强[4]。

HIF-1 是 bHLH-PAS 超家族的异二聚体转录因子，由缺氧调控的 HIF-1α 亚基和不受缺氧调控的 HIF-1β 亚基组成。缺氧时，HIF-1α 稳定性增加，转位入核，形成 HIF-1α/HIF-1β 异二聚体，与 DNA 序列中的 HRE（hypoxia response element，缺氧反应元件）结合，诱导缺氧相关基因的表达，参与了缺氧早期组织的血管生成、糖酵解的增强和细胞增殖的变化，是机体适应缺氧应激的重要机制[5]。HIF-1α 含有与 HIF-1β 同源的 bHLH 和 PAS 结构域，这是二者形成二聚体、与 HRE 结合的基础。PAS 结构域空间结构及相互作用的研究表明，HIF-1αC 末端的 PAS 结构域（即 HIF-1α-PAS-B）中核心氨基酸序列构成的 β 片层结构是 HIF-1α 与 HIF-1β 形成二聚体的关键，纯化的 HIF-1α-PAS-B 片段能直接与人 HIF-1β-PAS-B 结构域结合。HIF-1 二聚体中 PAS-B 结构域相互作用细微的干扰，使其空间构像发生变化，足以阻止有功能活性的 HIF-1 转录因子的形成，抑制机体对缺氧的反应[2]。因此若能克隆表达出 HIF-1α-PAS-B 蛋白片段，使其竞争性与内源性的 HIF-1β-PAS-B 结合，即可抑制 HIF-1α 的表达及活性，调控机体对缺氧和炎症的反应。

理论上分析，与目前应用的 HIF-1α 抑制剂相比较，构建含 TAT PTD 与 HIF-1α-PAS-B 的融合蛋白作为 HIF-1α 活性的抑制剂，具有明显的优势：特异：HIF-1α-PAS-B 片段是 HIF-1α 特异的结构片段，它与其它分子存在至少 29 个氨基酸序列的差异。有效：HIF-1α/HIF-1β 二聚体与 DNA 顺式作用元件的结合是 HIF-1 发挥作用的必经之路，通过抑制二聚体的形成，可以抑制多种刺激因素和途径所致 HIF-1α 活性的升高[6]。可控：pTAT-PAS-B 的转导是一个不消耗能量、非受体依赖、无饱和性的过程，调控融合蛋白的浓度即可调节胞内融合蛋白进入的数量。宿主范围广：融合蛋白几乎能够掺入 100% 的培养细胞。注射入动物的腹腔，融合蛋白甚至可以穿过难被外来分子突破的血脑屏障，直接进入脑内发挥作用[7]。靶向性高：pTAT-PAS-B 通过特异抑制缺氧、炎症条件下 HIF-1α 的活性发挥作用而抑制 HIF-1α 的活性对正常组织结构、功能的影响甚微。就其功能而言，靶向性明显增加[8]。

本研究从 HIF-1α 和 HIF-1β 形成二聚体的结构基础出发，借助 TAT 的穿膜特性，构建了含有 TAT PTD 结构域的融合蛋白表达质粒，经表达和纯化后得到了该融合蛋白。这为构建新型的 HIF-1α 抑制剂并评价其生物学功能奠定了坚实的基础。

参考文献：

[1] GIACCIA A, SIIM B G, JOHNSON R S. HIF-1 as a target for drug development[J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(10): 803 - 811.

[2] ERBEL P J, CARD P B, KARAKUZU O, *et al*. Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix-loop-helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(26): 15504 - 15509.

[3] NAGAHARA H, VOCERO-AKBANI A M, SNYDER E L, *et al*. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration[J]. Nat Med, 1998, 4(12): 1449 - 1452.

[4] BECKER-HAPAK M, MCALLISTER S S, DOWDY S F. TAT-Mediated Protein Transduction into Mammalian Cells[J]. Methods, 2001, 24(3): 247 - 256.

[5] PUGH C W, RATCLIFFE P J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677 - 684.

[6] BILTON R L, BOOKER G W. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(5): 791 - 798.

[7] CAO G, PEI W, GE H, *et al*. In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis[J]. J Neurosci, 2002, 22(13): 5423 - 5431.

[8] SUTPHIN P D, CHAN D A, GIACCIA A J. Dead cells dont form tumors: HIF-dependent cytotoxins[J]. Cell Cycle, 2004, 3(2): 160 - 163.

（编辑　王　红）