文章编号:1000-5404(2008)01-0015-04

论著

穿膜肽 TAT-p38αG 融合基因的构建、表达及穿膜特性的鉴定

张家平[1],应 希[2],陈 渝[1],张 琼[1],黄跃生[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]全军眼科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 构建穿膜肽 TAT-p38αG 融合基因,进行原核表达及穿膜特性鉴定。**方法** 提取人 EVC304 细胞总 RNA,巢式 PCR 扩增 p38αG 基因片段,T-A 克隆,测序证实片段无误后,将 p38αG 基因片段亚克隆入原核表达载体 pTAT-HA,获得 pTAT-p38αG 融合基因表达载体。将表达载体转化大肠杆菌,IPTG 诱导表达获得 TAT-p38αG 融合蛋白,并行 Ni-NTA 柱过柱和超滤纯化,抗 His 抗体免疫印迹法鉴定。采用荧光素 FITC 体外标记 TAT-p38αG 融合蛋白,与 EVC304 细胞共培养,荧光显微镜下观察其穿膜特性。**结果** 成功构建了融合基因原核表达载体 pTAT-p38αG,并表达出大小约 30×10^3 的蛋白产物,与融合蛋白 TAT-p38αG 理论计算值相符。细胞实验结果显示,TAT-p38αG 能呈浓度依赖性方式转导进入 EVC304 细胞。**结论** TAT -p38αG 融合蛋白具有良好的穿膜特性,研究为下一步鉴定 TAT-p38αG 融合蛋白对 p38α 激酶的抑制作用奠定了良好的实验基础。

关键词:p38 激酶 α 亚型 穿膜肽 融合基因
中图法分类号:R345;R394-33;R394.2 **文献标识码:**A

Construction, expression of TAT-p38αG and its capability of transduction into endothelial cells *in vitro*

ZHANG Jia-ping[1], YING Xi[2], CHEN Yu[1], ZHANG Qiong[1], HUANG Yue-sheng[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [2]Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant vector containing TAT-p38αG fusion gene HIV transcription factor TAT and a docking motif of p38α MAP kinase and investigate the transduction capability of the expressed TAT-p38αG fusion protein into endothelial cells. Methods The p38αG fragment was amplified by PCR, cloned into pMD18-T vector, and then subcloned into pTAT-HA vector. The constructed vector pTAT-p38αG was further transfected into *E. coli* DH5α, and then into BL21 after sequencing. The expression of TAT-p38αG protein was induced by IPTG. After purification by Ni-NTA column and ultrafiltration, the fusion protein was labeled by FITC, and cocultured with endothelial cell line EVC304. The transduction capability of TAT-p38αG into EVC304 cell was then determined. Results The recombinant vector containing TAT-p38αG was constructed and TAT-p38αG protein was expressed successfully. FITC labeled TAT-p38αG protein was able to be transducted into EVC304 cells in a dose-dependent manner. Conclusion TAT-p38αG protein shows a high capability of transduction into endothelial cells, which enable us to further investigate its possible inhibitory role in p38α kinase activity.

Key words: p38α mitogen-actionted protein kinase; TAT; fusion gene

p38 激酶 α 亚型在调控细胞炎症反应中的重要性已取得共识。然而,国内外至今尚缺乏针对该亚型的特异抑制剂。近年来,人们认识到酶与上下游分子间对接交互作用(docking interaction)是决定酶与上下游分子特异识别的关键,并进一步发现和证实了酶蛋白分子上的某些蛋白结构域是引导对接交互作用实现的结构基础。这些发现为基于这类结构域设计针对酶蛋白分子的全新竞争性特异抑制剂带来了新的思路和突破。

共用对接槽(common docking groove)是新近发现的一处人 p38α 激酶分子的重要功能结构域。研究证实,该结构域是 p38α 激酶的重要分子识别结构,介导了 p38α 激酶与其上下游分子的特异结合[1,2]。理论

基金项目:国家自然科学基金(30300366)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30300366)
作者简介:张家平,男,湖南省醴陵市人,博士,主治医师,主要从事烧伤后早期损害方面的研究。电话:(023)68754148-8027;E-mail:japzhang@gmail.com
收稿日期:2007-07-12 修回日期:2007-10-30

上,若克隆并表达出该结构域蛋白片段(以下简称 p38αG 蛋白),并设法将其导入细胞,将有可能竞争性结合 p38α 激酶的上游激酶和下游底物,从而发挥特异性抑制 p38α 激酶的作用。本研究利用人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的转录活化因子-TAT 蛋白具有的自由通过细胞质膜的特性,旨在构建含 TAT 和 p38αG 的融合蛋白表达载体,进行原核表达及纯化,并进一步观察融合蛋白的穿膜特性,为研制 p38α 激酶新型特异抑制剂奠定前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 大肠杆菌 DH5α 菌株、大肠杆菌 BL21 菌株和 ECV304 细胞株由本室保存,质粒 pTAT-HA 由第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤中心戚华兵博士惠赠。

1.1.2 主要试剂和耗材 质粒提取及胶回收试剂盒为 Omega公司产品。引物由博亚公司合成。荧光素 FITC 标记融合蛋白 TAT-p38αG 委托北京博奥森有限公司完成。限制性内切酶、T_4 连接酶及 *Taq* 酶为 TaKaRa 公司产品。His6-Ni-NTA 亲和层析柱和鼠抗 6×His 单克隆抗体为 Merck 公司产品。超过滤离心器购自 Miliple 公司。cDMEM 培养基(Gibico 公司),胎牛血清(北京鼎国公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 p38aG 基因片段的扩增和 T-A 克隆 以人 p38α 激酶 ORF 基因序列为模板,设计两套引物,RT-巢式 PCR 法扩增 p38aG 基因片段(第 463~975 位碱基)。RT-PCR 第 1 套引物:正义链 5′-TTCTCCGAGGTCTAAAGT-3′,反义链 5′-ATCATAGGTCAGGCTTTT-3′ 第 2 套引物:正义链 5′-CTGCCATGGCCAATCTAGCTGTGAATGAA-3′,反义链 5′-CTGCTCGAGTTACTGATCATAAGGATCGGC-3′。第 2 套引物的正义链 5′端设计加入保护碱基和 *Nco* Ⅰ酶切位点;反义链引物的 5′端加入保护碱基、*Xho* Ⅰ酶切位点和终止密码子。以第 1 套引物 RT-PCR 扩增所得 cDNA 为模板,经第 2 套引物 PCR 扩增,得到大小为 535 bp的 p38αG 基因片段。产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳及胶回收后,与 pMD18-T 载体连接,将连接产物转化 DH5α 感受态细胞,筛选阳性克隆。

1.2.2 pTAT-p38αG 融合基因原核表达载体的构建 提取上述阳性克隆质粒,行 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,回收 p38αG cDNA片段,用 T4 连接酶连接,克隆入原核表达质粒 pTAT-HA。将连接产物转化 DH5α 感受态细胞,筛选阳性克隆。37 ℃ LB 培养液中摇菌,扩增阳性菌落。行菌落 PCR 和测序鉴定插入的 p38αG 基因片段序列无误后,提取质粒 pTAT-p38αG,-70 ℃保存。

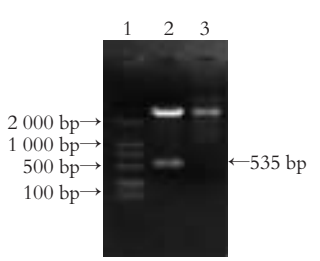
1.2.3 pTAT-p38αG 融合基因的原核表达、鉴定与纯化 将上述测序正确的质粒 pTAT-p38αG 转化大肠杆菌 BL21,挑取阳性单克隆培养过夜,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导不同时间后,取菌体裂解液行凝胶电泳和抗 His 抗体免疫印迹法鉴定融合蛋白。取阳性表达克隆,扩大培养,IPTG 诱导 TAT-p38αG 表达,收集菌体,超声裂菌,20 000×*g* 离心弃上清。向沉淀中加入 2 mol/L 尿素,20 000×*g* 离心弃上清以去除杂蛋白。以 8 mol/L 尿素溶解沉淀的蛋白,变性稀释液稀释、过滤,然后于 His6-Ni-NTA 亲和层析柱上行亲和层析。分别以 4 种洗脱液(B,C,D,E 洗脱液)过柱洗脱蛋白,将收集的洗脱液行凝胶电泳,考马斯亮蓝染色。以 E 洗脱液洗脱过柱,收集洗脱液 E_3 和 E_4,通过超过滤离心装置脱盐和去除小分子物质,得到进一步纯化和浓缩的融合蛋白,并行凝胶电泳鉴定。

1.2.4 pTAT-p38αG 融合蛋白穿膜特性的鉴定 ECV304 细胞按 2×10^5个/孔接种于 24 孔培养板中。将荧光素 FITC 标记的融合蛋白 TAT-p38αG 与 ECV304 细胞共孵育 2 h(TAT-p38αG 的终浓度分别为 0、250、500 nmol/L 和 10 μmol/L),PBS 轻洗细胞 3 次后,荧光显微镜观察。

2 结果

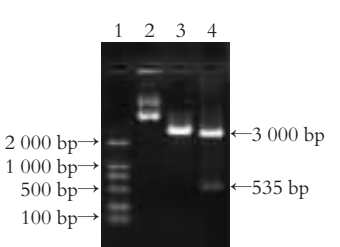
2.1 人 p38αG 基因片段的扩增及 pTAT-p38αG 融合基因原核表达载体的构建

PCR 扩增出约 535 bp 的片断,与预期相符。将该片段与 pMD18-T 载体连接,进行 TA 克隆,提取质粒行 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,得到带酶切位点粘性末端的人 p38αG 基因片段(图 1)。在连接酶作用下,将经 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后的线性化 pTAT-HA 质粒与上述人 p38αG 基因片段连接,并转化 DH5α 感受态细菌,挑选阳性单菌落,提取质粒后行 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,结果显示重组质粒在约 3 000 bp 和 535 bp 处各出现一清晰亮带,提示 pTAT-p38αG 载体构建成功(图 2)。质粒测序证实,所插入 p38αG 基因片段无突变,与 GenBank 中序列一致。



1:DNA 标准;2:质粒双酶切后;3:质粒双酶切前

图1 p38αG 基因亚克隆入 T 载体酶切鉴定



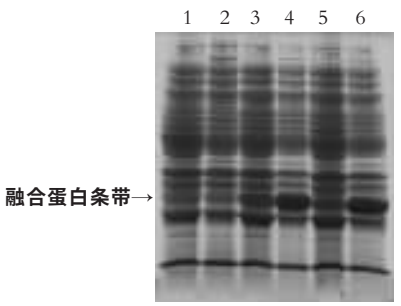
1:DNA 标准;2:pTAT-p38α 酶切前;3:pTAT-p38αG 质粒单酶切;4:pTAT-p38αG 质粒双酶切

图2 pTAT-p38αG 载体酶切鉴定

2.2 pTAT-p38αG 融合基因的原核表达、鉴定与纯化

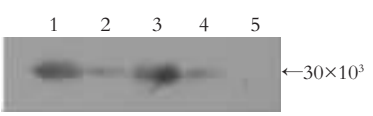
2.2.1 IPTG 诱导融合蛋白 TAT-p38αG 表达和鉴定 取对数生长期已转化质粒 pTAT-p38αG 的大肠杆菌 BL21 进行 IPTG 诱导,不同时间后,收集菌体,超声裂菌,裂解液行 SDS-PAGE

电泳。结果显示，在预期的 30×10^3 水平附近出现融合蛋白表达条带（融合蛋白 TAT-p38α 理论计算相对分子质量约为 30.44×10^3），且在 37 ℃ 诱导 4 h 条件下表达最强（图 3）。抗 His 抗体免疫印迹法结果显示，IPTG 诱导产生的融合蛋白能与抗 His 抗体特异结合，在 30×10^3 水平附近出现特异条带，证明融合蛋白 TAT-p38αG 表达成功（图 4）。



1：空菌落；2：空菌落 + IPTG；3：阳性菌落（诱导 2 h）；4：阳性菌落 + IPTG（诱导 2 h）；5：阳性菌落（诱导 4 h）；6：阳性菌落 + IPTG（诱导 4 h）

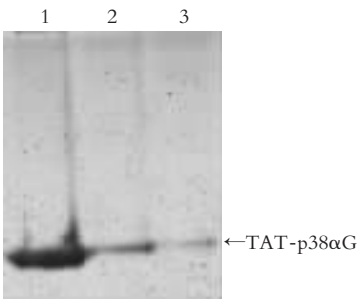
图 3　IPTG 诱导融合蛋白表达



1、3：IPTG 诱导表达；2、4：无 IPTG 诱导表达；5：阴性对照

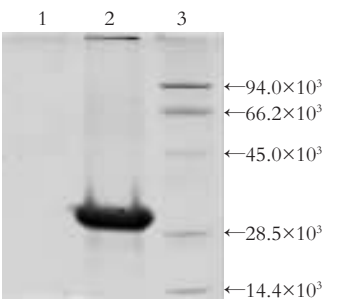
图 4　抗 His 抗体 western blot 检测融合蛋白表达

2.2.2　Ni-NTA 柱及超滤纯化融合蛋白 TAT-p38αG　　将融合蛋白过柱亲和层析，收集洗脱液行凝胶电泳，考马斯亮蓝染色。结果显示，以 E 洗脱液洗脱的目的蛋白丰度最高，且无明显杂带，表明过柱纯化成功（图 5）。以 E 洗脱液洗脱过柱，收集洗脱液 E_3 和 E_4，通过超过滤离心装置脱盐和去除小分子物质，得到进一步纯化和浓缩的融合蛋白，并行凝胶电泳鉴定（图 6）。



1：E 洗脱液；2：D 洗脱液；3：C 洗脱液

图 5　Ni-NTA 柱纯化融合蛋白 TAT-p38αG

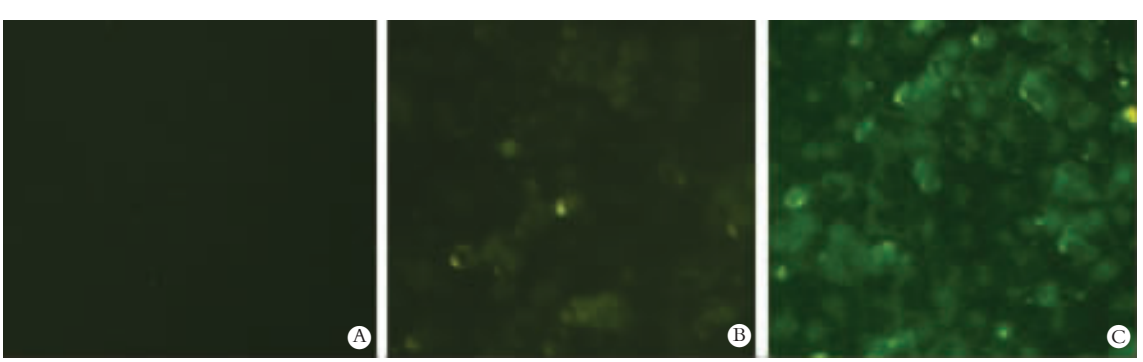


1：超滤滤过液；2：超滤后收集的浓缩液；3：蛋白分子标准

图 6　Western blot 检测超滤后融合蛋白

2.3　pTAT-p38αG 融合蛋白的穿膜特性呈浓度依赖性

为检测融合蛋白 TAT-p38αG 的穿膜特性，我们将荧光素 FITC 标记融合蛋白 TAT-p38αG，通过与细胞共孵育，在荧光显微镜镜下观察 TAT-p38αG 在细胞内的分布。结果显示，在观察的 2 h 之内，随着 TAT-p38αG 浓度的增加，进入内皮细胞的 TAT-p38αG 明显增多，且主要分布于细胞质中，提示 TAT-p38αG 具有良好的细胞膜穿透性（图 7）。



A：0 nmol/L TAT-p38αG；B：500 nmol/L TAT-p38αG；C：10 μmol/L TAT-p38αG

图 7　pTAT-p38αG 融合蛋白的穿膜特性鉴定（与内皮细胞共孵育 2 h）（荧光显微镜 ×100）

3　讨论

p38 激酶属丝裂素活化蛋白激酶家族成员，包括 4 种亚型（α-δ），其中，主要是 α 亚型介导炎症反应。p38 激酶 α 亚型在粒细胞、巨噬细胞等多种细胞中有表达，在细胞受到炎性刺激后，通过对底物的磷酸化作用，可直接或间接促成包括 NF-Kappa B、AP-1 在内的多种炎症相关核因子启动基因转录功能，进而上调多种促炎因子表达。因此，抑制过度活化的 p38α 激酶被认为是极具潜力的抗炎策略[3]。SB 类化合物（如 SB203580、SB202190 等）是目前使用最多的 p38 激酶抑制剂，它们虽能抑制 α 亚型，但特异性不高。在一项考察 SB 类化合物特异性强弱的实验中，研究发现，在所观察的 24 个激酶中，常规浓度的 SB202190 除抑

制 p38 激酶外还使 LCK、PKB 等另外 7 个激酶活性下降达 20% ~63%[4]。另外,这些抑制剂既普遍抑制 p38 激酶 α 亚型,又抑制其 β 亚型,故也缺乏亚型特异性[5]。因此,有必要采用新思路设计仅针对 α 亚型的特异抑制剂,为进一步深入研究 p38 激酶 α 亚型,尤其是其体内作用,提供良好的实验工具。

在人类 p38α 激酶分子发现的共用对接槽介导了 p38α 激酶与其上下游诸多分子的对接交互作用。该结构域由 CD 域(common docking domain)和 ED 位点两部分构成。实验表明,若将 CD 域和 ED 位点某些氨基酸同时替换,则 p38α 激酶与底物的结合能力完全丧失,表明由 CD 域和 ED 位点共同构成的具有空间结构的共用对接槽是确保 p38α 激酶的重要分子识别结构[1,2]。我们将此蛋白片段做 Blast 分析,发现它与其他分子存在至少 12 个以上的氨基酸序列差异,表明其为 p38α 激酶的特异片段(以下简称 p38αG)。TAT 是一种具有穿膜功能的蛋白(穿膜肽),为人类免疫缺陷性病毒(HIV)的转录因子,能以不消耗能量、非受体依赖、无饱和性和无细胞依赖性的方式入胞。TAT 的 NH_2 末端 11 个氨基酸片段是其蛋白转导结构域(protein transduction domain, PTD)。实验结果显示,含 TAT PTD 的融合蛋白同样具有高效穿膜特性,且经原核表达的含 TAT 的融合蛋白进入细胞后,能在分子伴侣的作用下正确地再折叠,发挥外源蛋白的天然活性[6,7]。基于此现象,我们构建含 TAT PTD 与 p38αG 的融合蛋白,以期设计出能高效进入细胞,并具有特异性竞争作用的 p38α 激酶新型抑制剂。

本研究首先克隆了包含共用对接槽的 p38αG 基因片段(第 463 ~975 位碱基),并亚克隆入 pTAT-HA 载体,成功构建了包含 TAT 和 p38αG 的融合基因,并进行了原核表达。SDS-PAGE 凝胶电泳及免疫印迹显示,经 IPTG 诱导后,大肠杆菌 BL21 能较高丰度表达 TAT-p38αG 融合蛋白。为进一步观察 TAT-p38αG 的穿膜特性,我们采用 Ni-NTA 柱及超滤装置进一步纯化了该融合蛋白,并行荧光素 FITC 体外标记。细胞实验表明,融合蛋白 TAT-p38αG 能呈浓度依赖方式进入 EVC304 细胞,证实 TAT-p38αG 具有良好的穿膜特性。我们观察到,TAT-p38αG 虽然主要分布于细胞质,但在部分细胞的细胞核中也有分布,这与 TAT 既能进入细胞质,也能进入细胞核的特性相符,至于 TAT 如何在细胞内选择性定位,尚需进一步研究。此外,我们也观察到 TAT-p38αG 能呈浓度依赖方式进入心肌细胞,排除了 TAT-p38αG 的穿膜特性与细胞种类有关。本实验为进一步观察 TAT-p38αG 融合蛋白对 p38α 激酶的抑制作用提供了研究基础。

参考文献:

[1] Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, *et al*. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2 (2):110 - 116.

[2] Tanoue T, Maeda R, Adachi M, *et al*. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions[J]. EMBO J, 2001, 20(3):466 - 479.

[3] Hommes D W, Peppelenbosch M P, van-Deventer S J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets [J]. Gut, 2003, 52(1):144 151.

[4] Davies S P, Reddy H, Caivano M, *et al*. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors[J]. Biochem J, 2000, 351(Pt 1):95 - 105.

[5] Saurin A T, Martin J L, Heads R J, *et al*. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes[J]. FASEB J, 2000, 14(14):2237 - 2246.

[6] 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.

[7] Kilic E, Dietz G P, Hermann D M, *et al*. Intravenous TAT-Bcl-Xl is protective after middle cerebral artery occlusion in mice[J]. Ann Neurol, 2002,52 (5):617 - 622.

(编辑 张大春)

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价,确定文献的检索范围,提高检索结果的适用性,每篇文章或资料应标识 1 个文献标识码。一般设置以下 5 种标准:

A 理论与应用研究学术论文(包括综述报告)

B 实用性技术成果报告(科技)、理论学习与社会实践总结(社科)

C 业务指导与技术管理性文章(包括领导讲话、特约评论等)

D 一般动态性信息(通讯、报道、会议活动、专访等)

E 文件、资料(包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等)

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部