

◇ 药学研究 ◇

蛋白转导结构域 4-铜/锌-超氧化物歧化酶融合蛋白的制备及其穿细胞膜的功能研究

王宇^a, 刘菊英^a, 王贤裕^a, 柯昌斌^a, 李瑞明^b, 王晓勋^b

(十堰市太和医院、湖北医药学院附属医院 a. 麻醉科, b. 生物医学研究所, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 拟构建蛋白转导结构域(PTD)4-铜/锌-超氧化物歧化酶(Cu/ZnSOD)原核表达质粒,纯化制备 PTD4-Cu/ZnSOD 融合蛋白,探讨其穿膜能力。**方法** 设计合成 hCu/ZnSOD 引物,扩增 hCu/ZnSOD cDNA 片段;采用 PCR 靶向克隆法将扩增产物与含有相同酶切位点载体质粒 PET16b-PTD4 进行重组,扩增质粒,双酶切鉴定和 DNA 测序;获得 PET16b-PTD4-Cu/ZnSOD (CDs)原核表达载体,导入感受态 E. coli BL21(DE3)中,进行扩增培养,收集菌体,将其裂解离心、Ni²⁺亲和层析、收集目的蛋白。融合蛋白孵育人心肌细胞,免疫荧光法检测融合蛋白穿膜能力。**结果** 通过测序证实实验扩增所得的 PTD 序列与设计的预期序列一致。设计并简并 PTD4-Cu/ZnSOD 基因长度为 567 bp,通过引物进行正反向测序证实该序列与已被登录的 GENBANK 中 Cu/ZnSOD 序列相一致,并构建了相应的原核表达质粒。并在 E. coli BL21 进行大量表达,最终收集的 PTD4-Cu/ZnSOD 具有良好水溶性。SDS-page 分析显示构建的 PTD4-Cu/ZnSOD 分子量约为 20 kDa,与预期的蛋白分子量 20.45 kDa 相符合。融合蛋白可以穿透心肌细胞膜,进入细胞后主要分布在胞质和胞核内并具有天然活性。**结论** 成功地构建了 PET16b-PTD4-Cu/ZnSOD 原核表达质粒,获得了可穿透心肌细胞膜的 PTD4-Cu/ZnSOD 融合蛋白,为应用 Cu/ZnSOD 治疗缺血性疾病的研究奠定了基础。

关键词:铜/锌-超氧化物歧化酶;蛋白转导结构域;心肌细胞

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.02.007

Preparation of Fusion Protein PTD4-Cu/ZnSOD and verification of its ability to penetrate the cell membrane

WANG Yu^a, LIU Juying^a, WANG Xianyu^a, KE Changbin^a, LI Ruiming^b, WANG Xiaoxun^b

(a. Department of Anesthesiology, b. Institute of Biomedicine, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: **Objective** This study is aimed to construct prokaryotic expression plasmid PTD4-Cu/ZnSOD and purify PTD4-Cu/ZnSOD fusion protein, to explore the property of intercellular transport. **Methods** The primers of hCu/ZnSOD were designed and synthesized to amplify full-length hCu/ZnSOD cDNA by PCR cloning assay. After double-enzyme digestion, the linearized PET16b-PTD4 and hCu/ZnSOD cDNA was ligated with PCR cloning reaction to construct PET16b-PTD4-Cu/ZnSOD. The recombinant plasmid was verified by PCR and DNA sequencing, and transformed into E. coli BL21 (DE3) host bacteria which was induced to obtain fusion protein PTD4-Cu/ZnSOD. The fusion protein was purified with affinity chromatography because of the recombinant protein having an N-terminal His-tag sequence and characterized by SDS-PAGE and Western blot. The transmembrane ability of fusion protein was investigated by examination of PTD4-Cu/ZnSOD in cells using immunofluorescence on cultured cardiomyocytes. **Results** The sequence of amplified PTD4 was identical with the designed. The PTD4-Cu/ZnSOD fusion gene was amplified successfully and the length of this sequence was 567 bp. The PTD4-Cu/ZnSOD (CDs) prokaryotic expression vectors in plasmids were successfully constructed and inserted into E. coli BL21 to produce a large quantity of recombinant PTD4-Cu/ZnSOD proteins. The expressed fusion protein PTD4-Cu/ZnSOD was soluble and about 20 kDa which was according with the expected recombinant products. The result of immunofluorescence suggested that the fusion protein could transduce into cardiomyocytes with native activity. **Conclusion** The PTD4-Cu/ZnSOD fusion protein was successfully prepared and could be efficiently transduced into cardiomyocytes with native activity, which provides a basis for the research on treatment and prevention of myocardial ischemia-reperfusion injury with Cu/ZnSOD.

Keywords: Cu/ZnSOD; PTD; cardiomyocytes

铜/锌超氧化物歧化酶(Cu/ZnSOD)是一种广泛存在于真核生物细胞质及过氧化物酶体中的大分子蛋白,是机体内主要的具有特异性的内源性氧自由基清除剂^[1]。因此增加细胞内 Cu/ZnSOD 水平有望成为防治缺血再灌注损伤的有力措施之一,但由于 Cu/ZnSOD 在细胞膜上没有专一受体或通道,外源性 Cu/ZnSOD 难以进入细胞和组织内发挥生物学作用,因而限制了其临床应用。蛋白转导结构域(PTD)是一种能携带大分子物质无特异性的穿透哺乳动物细胞膜的阳离子小分子多肽^[2-3]。研究发现可以通过优化 PTD 结构域的空间结构和表面的电子分布来提高 PTD 结构的内化效率,达到携带大分子物质高效进入细胞内发挥生物学效应的目的。本研究拟构建具有高效穿膜特性的人类 PTD4-Cu/ZnSOD 原核表达质粒,在大肠杆菌中制备和纯化蛋白,并观察这种 PTD4-Cu/ZnSOD 融合蛋白穿膜能力,为利用细胞穿透肽携 Cu/ZnSOD 治疗缺血性疾病的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 PGEM-T 载体购自 Promaga 公司。pET-16b、E. coli BL21(DE3)购于 Novagen 公司。

1.1.2 主要仪器设备 PCR 仪(EPPENDORF,美国),凝胶数字图像分析仪(Alpha ImagerTM2200, Alpha Innotech,美国),基因测序仪(ABI310,美国),电泳仪(MINI-PROTEAN3BIO-RAD,德国)。RobusT[®] RT-PCR_kit、限制性内切酶:BamHI、XhoI、Nde I、T4 连接酶、PfuUltra[™] high-fidelity 酶、TAQ 酶、Wizaad[®] SV Gel and PCR Clean-Up System、Wizard[®] Plus SVminipreps DNA Purification System、DCFH-DA 分别购自 Gibicol、Finnzymes、New England、Stratagene、SABC、Promaga、碧云天公司。IPTG 购自 Duchefa 公司。Ni²⁺-nitrilotriacetic acid Sepharose superflow 购自 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 PTD4 多肽跨膜结构域的设计 根据 PTD 多肽跨膜结构域的特点,利用软件设计具有高效跨膜活性的蛋白结构域 YARAAARQAR(Q)A,并简并设计的寡核苷酸序列。在两端修饰添加 NdeI、XhoI 限制性内切酶位点:5'-T ATG ACC TAT GCG CGT GCG GCA GCG CGT CAG GCT CGT GCC C-3';5'-TCG AGG GGC ACG AGC CTG ACG CGC TGC CGC ACG CGC ATA GGT CA-3'设计扩增人 Cu/Zn SOD 蛋白全长 CDS 引物。5'-CCG CTC GAG GCG ACG

AAG GCC GTG TGC GTG-3';5'-CGG GAT CCT ATT ATT GGG CGA TCC CAA TTA C-3',两端分别修饰加入限制性内切酶 XhoI、BamHI 酶位点。

1.2.2 Cu/ZnSOD 蛋白全长 cDNA 序列的获得及鉴定 提取胚胎肝脏组织的总 RNA,以其为模板用于 Cu/ZnSOD 全长 CDs 的逆向转录和扩增。PCR 总反应体系(20 μ L)如下:Oligo(dT)15 primer(0.5 mg $\cdot$ L⁻¹)1 μ L,total RNA sample 1 μ L,DEPC water 补足 12 μ L,在反应体系中加入 dNTP (10 mmol $\cdot$ L⁻¹)2 μ L,5 $\times$ Reaction Buffer 4 μ L,RNase inhibitor (20 U $\cdot$ μ L⁻¹)1 μ L,M-M μ IV RT(200 U $\cdot$ μ L⁻¹)1 μ L置于 PCR 仪中 42 $^{\circ}$ C 1 h。PCR 扩增目的片段扩增体系(50 μ L)如下:10 $\times$ buffer 5 μ L,dNTP(10 mmol $\cdot$ L⁻¹)1 μ L,MgCl₂(25 mmol $\cdot$ L⁻¹)5 μ L,上游引物 15 μ L,下游引物 25 μ L,pfuDNA 聚合酶 1 μ L,反转录产物 1 μ L,加去离子水至 50 μ L。将上述各组分混合均匀,预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min、变性 94 $^{\circ}$ C 30 s、退火 68 $^{\circ}$ C 30 s、延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s。经过 30 个循环后在 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将获得的人 Cu/ZnSOD 蛋白全长 CDs 片段,加腺嘌呤(A)处理纯化后插入 PGEM-T 载体,获得 PGEM-Cu/ZnSOD (CDs)载体。

1.2.3 pET16b-PTD4-Cu/ZnSOD 蛋白原核表达载体的构建 用 XhoI、BamHI 酶切获得的 pGEM-Cu/ZnSOD(CDs)载体,获得两端带有黏性末端的双链全长 Cu/ZnSOD CDs 片段,同时用同样的酶对 pET-16b 空载体进行双酶切。胶回收两端带有黏性末端的线性载体及 Cu/ZnSOD 全长 CDs 片段,将其定向插入 pET-16b 空载体,获得 pET-Cu/ZnSOD (CDs)原核表达载体。对上述获得的 pET-Cu/ZnSOD (CDs)原核表达载体进行特异性酶切,并根据 PTD4 设计的两条简并寡核苷酸序列进行高特异性退火杂交,获得人工合成的两端带有限制性内切酶黏性末端的小片段简并双链 DNA 序列,将其插入上述线性载体中,获得 pET-PTD4-Cu/ZnSOD (CDs)原核表达载体。

1.2.4 重组质粒 pET16b-PTD4-Cu/ZnSOD 酶切鉴定 选用引物设计时修饰的所带有的酶切位点 XhoI 和 BamHI 酶切鉴定正确重组的 PDC315-TRAIL 载体。酶切体系如下:10 $\times$ Buffer 5 μ L,Plasmid 5 μ L,100 $\times$ BSA 1 μ L,内切酶各 2 μ L,加去离子水至总体积 50 μ L,反应条件 37 $^{\circ}$ C 过夜,分别加入 1% 琼脂糖凝胶中,在 1 $\times$ TAE 中进行电泳,观察酶切结果,选取正确的克隆送上海生工生物技术有限公司测序鉴定,用 T7、SP6 测序引物测序与

GENEBANK X02317 CDs 比对。

1.2.5 PTD4-Cu/ZnSOD 融合蛋白的诱导、表达与纯化 将上述原核表达载体导入感受态 *E. coli* BL21 (DE3) 中,铺叠到含氨苄青霉素 ($100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 TB 固体培养基中培养 16 h,挑取单个菌落至 50 mL 含氨苄青霉素 ($100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 LB 液体培养液中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增扩培养。当细菌生长至 OD_{600} 为 0.6 时(大约 3 h)加入 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 至终浓度 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,置 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导培养过夜。低温离心收集细菌,将收集的菌体溶于 25 mL 结合缓冲液,然后冰浴超声破菌,低温离心收集上清。把上清缓慢通过 Ni_2^{+} -亲和层析柱,完毕后,静置 1~2 h,使融合蛋白上的 His-Tag 与层析柱内的 Ni_2^{+} 结合,再用 10 倍体积的结合缓冲液和 6 倍体积的漂洗缓冲液 ($60\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole, $500\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris HCl, pH 7.9) 分别过柱,洗脱未结合的其它蛋白,然后用洗脱缓冲液 ($1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ imidazole, $500\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.9) 洗脱蛋白,分别得到 His-Tag-Human Cu/ZnSOD 和 His-Tag-PTD4-Human Cu/ZnSOD 两种融合蛋白。分别储存于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内用于以下的实验。

1.2.6 PTD4-Cu/ZnSOD 融合蛋白穿膜能力检测 人心肌细胞株购于 ATCC。在细胞的培养液中不加任何处理因素(对照组),或分别加入 $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu/ZnSOD (Cu/ZnSOD 组)、 $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PTD4-Cu/ZnSOD (PTD4-Cu/ZnSOD 组),孵育 10 min。免疫组织化学法检测融合蛋白穿膜能力: $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 4% 多聚甲醛固定 24 h、PBS 洗涤后,加入抗 His 或抗 SOD 的单克隆抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 12 h。PBS 洗涤后每孔加入浓度为 FITC 标记二抗,孵育、洗涤,用 DAPI 染色液复染细胞核,用荧光显微镜照相。

2 结果

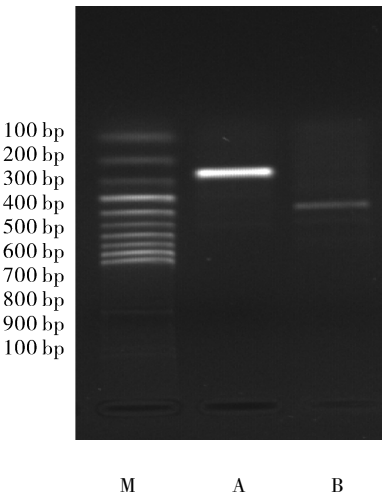
2.1 Cu/ZnSOD 全长 CDs 的克隆及序列测定

Cu/ZnSOD cDNA 上下游引物扩增后,行琼脂糖凝胶电泳,可见预期的 482 bp 大小的片段(图 1)。

2.2 pET16b-PTD4-Cu/ZnSOD 双酶切鉴定

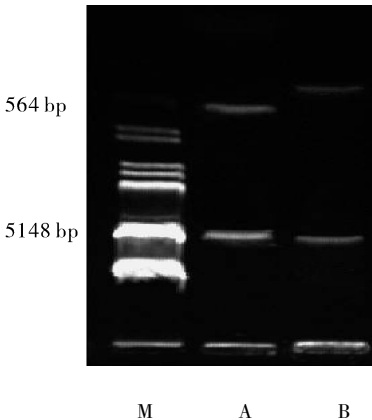
pET16b 表达系统为了便于克隆表达蛋白,设计有 NdeI、XhoI、BamH 三个酶切位点,将 hCu/ZnSOD CDs 插入 XhoI、BamHI 两位点之间,得到 pET16b-Cu/ZnSOD 原核表达载体。接着把人工设计合成 PTD4 的核酸片段插入 NdeI、XhoI 位点之间,得到 pET16b-PTD4-Cu/ZnSOD 原核表达载体。Cu/ZnSOD cDNA 序列有 XhoI、BamHI 两个酶切位点,经

过 XhoI、BamHI 酶切后,出现预期的 564 bp 和 5148 bp 的 2 条带(图 2)。



注:M 分子量范围是 100~1 000 bp,A 是内参 β -actin,分子量是 279 bp,B 是 sod RT-PCR 产物,分子量为 482 bp。

图 1 RT-PCR 产物电泳结果



注:M 为 Lambda DNA/EcoRI + HindIII, A 为 pET16b-PTD4-Cu/ZnSOD 用 NdeI、BamH 双酶切, B 为 pET16b-Cu/ZnSOD 用 XhoI、BamHI 双酶切。

图 2 重组质粒酶切电泳

2.3 pET16b-PTD4-Cu/ZnSOD 质粒测序结果

将 RT-PCR 获得的人 Cu/Zn SOD 全长 CDs 插入 PGEM-T 载体中,酶切,选取正确的克隆。用 T7、SP6 引物进行正反向测序获得的序列经过软件对比显示我们测序的序列与已被登陆的 GENBANK “X02317” CDS 序列一致(图 3)。

2.4 表达后细菌的蛋白提取物和融合蛋白纯化后的 SDS Page 分析 融合蛋白提取物和融合蛋白纯化后 SDS-PAGE(图 4)结果表明,分别在 18.6 kDa 和 20 kDa 出现 Cu/ZnSOD 和 PTD4-Cu/ZnSOD 目标表达条带,显示目的融合蛋白的表达量在约占宿主总蛋白表达量的 46%。图象显示洗脱液里含有的纯化融合蛋白量,提取后分装放置在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

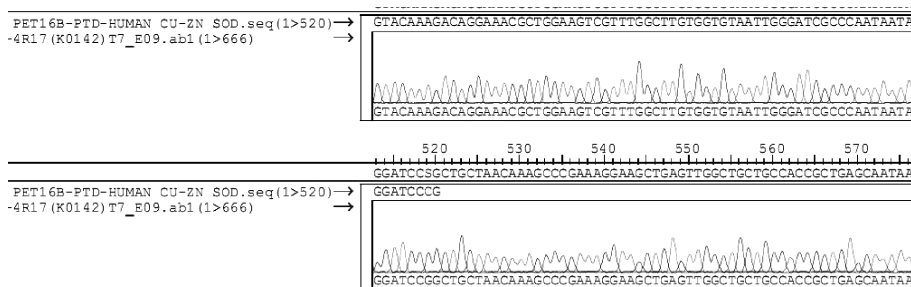


图3 pET16b-PTD4-Cu/ZnSOD 原核表达质粒测序结果

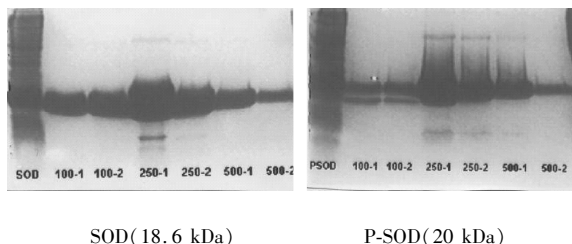


图4 蛋白提取物和融合蛋白纯化后的 SDS Page 分析

2.5 融合蛋白质穿膜能力检测 与对照组和 Cu/ZnSOD 组比较,PTD4-Cu/ZnSOD 组细胞内绿色荧光显著增强。显示融合蛋白 PTD4-Cu/ZnSOD 能穿透心肌细胞,分布于胞质及胞核中。

3 讨论

Cu/ZnSOD 是一种广泛存在于真核生物细胞的细胞质、植物的叶绿体及过氧化物酶体中的大分子蛋白,在胞质内发挥抗氧化作用,是机体内主要的特异性的内源性氧自由基清除剂^[4]。在正常情况下,细胞内有一定量的表达,以保持机体内氧化-还原的稳态。发生缺血再灌注时,由于氧自由基生成速度远远超过的清除能力,导致氧自由基的堆积,从而发生再灌注损伤。因此增加细胞内 Cu/ZnSOD 的水平则有可能成为防治缺血再灌注损伤的有力措施,但是 Cu/ZnSOD 在哺乳动物细胞膜上没有专一受体或通道,所以外源性的 Cu/ZnSOD 很难进入细胞和组织内发挥生物学作用的,由此限制了其在临床的应用。近年研究发现利用病毒载体、脂质体作为载体转染 SOD 基因对大鼠心肌缺血再灌注损伤有明显保护作用。但这些方法存在一些关键问题尚未解决,主要包括基因导入效率、基因表达的可控性、安全性等,从而能限制了上述方法在临床上得应用^[5]。因此本研究目的是找到一种合适的方法将 Cu/ZnSOD 带入到细胞内,为应用 Cu/ZnSOD 防治心肌缺血再灌注损伤提供参考。

Green 等和 Frankel 等在 1988 年首次报道了 HIV-1 的反式激活蛋白 Tat 具有跨膜进入细胞的功能^[6-7]。进一步研究发现,Tat 蛋白真正具有转导作

用的是其序列中的 47 ~ 57 这 11 个氨基酸残基,称之为 PTD。在研究这些序列特征与结构后,Alan 等应用生物信息学软件通过改变结构域中疏水氨基酸和碱性氨基酸的种类和分布、优化表面电子分布,得到人工设计出比 TAT-PTD 具有更高效率的穿膜活性的 PTD 分子。与此同时,各国的研究者分别把 TAT-PTD、9-Polylysine、以及用生物信息学软件设计的多肽结构引入 Human Cu/ZnSOD 和其它目的蛋白的透膜实验,显示出逐渐增强的穿膜特性^[8]。随后,TAT-PTD 介导多种大分子跨膜进入细胞的实验广泛开展^[9],对其生物合成过程,融合蛋白的免疫活性,毒性,穿膜效能和靶向治疗等进行了深入研究。本研究中,我们设计并合成一段高效 PTD 序列用于融合表达的 PTD4-Cu/ZnSOD 蛋白^[10],并构建出 pET16b-Cu/ZnSOD 和 pET16b-PTD4-Cu/ZnSOD 两种原核表达载体。选用 pET16b 作为原核表达载体,使表达的两种蛋白的 N 段含有连续的 10 个 His 标签融合序列,以便于方便快捷利用 Ni_2^+ 柱层析进行纯化,方便检测。两种载体可以高效地稳定表达两种蛋白,其表达效率可达 49% 和 42%。蛋白以可溶的形式表达,有利于重折叠形成有活性的蛋白,这是其发挥生物学效应的关键^[11]。已有研究证实正确折叠的 TAT-GFP 蛋白虽可高效转导至细胞内但其荧光强度显著降低。蛋白使氧自由基的消除的过程中也同样依赖于过氧化氢酶的作用,PTD-Cu/ZnSOD 进入细胞后把氧自由基转化成 H_2O_2 ,由过氧化氢酶再把 H_2O_2 还原为 H_2O 和新生态氧而转化成 O_2 。因此 PTD-Cu/ZnSOD 蛋白的活性不仅依赖于蛋白表达时的复性重折叠,也依赖于细胞内过氧化氢酶的含量。

本研究发现,经 PTD4-Cu/ZnSOD 处理的心肌细胞,胞内出现高水平的 His,由于正常细胞内几乎没有 His 结构,说明这种 His 结构是外源性的 PTD4-Cu/ZnSOD 导入的,并且 PTD4-Cu/ZnSOD 处理的细胞内 SOD 水平显著高于正常心肌细胞,由此可见,我们实验中构建的 PTD4-Cu/ZnSOD 具有高效的穿