

细胞穿膜肽 TAT 与小鼠干细胞转录因子 Oct4 融合表达及纯化

王 军, 雷捷勇, 陈 蕴, 金 坚*

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 将 TAT-Oct4 目的基因插入 pET28a 表达载体, 构建重组表达质粒 pET28a-TAT-Oct4, 形成大肠杆菌重组表达体系。融合蛋白 TAT-Oct4 在大肠杆菌中主要以包涵体形式表达, 表达产物经纯化后, 纯度可达 90% 以上。通过尿素梯度透析复性, TAT-Oct4 平均复性收率为 8.8%。细胞免疫荧光技术分析表明, TAT-Oct4 融合蛋白可穿透近 100% 细胞的细胞膜, 其进膜后主要分布于细胞核内。建立了具有活性的 TAT-Oct4 融合蛋白生物制备方法, 为细胞重编程提供了一种有效的研究材料, 并可为其他用于细胞重编程的干细胞转录因子设计提供实用的方法学。

关键词: 细胞穿膜肽; 干细胞转录因子 Oct4; 包涵体; 纯化

中图分类号: Q 813.2 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)09—0962—05

Expression and Purification of Cell Penetrating Peptide TAT and Mouse Stem Cell Transcriptional Factor Oct4 Recombinant Protein

WANG Jun, LEI Jian-yong, CHEN Yun, JIN Jian*

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, TAT-Oct4 target gene was inserted into pET28a expression vector to construct pET28a-TAT-Oct4 recombinant expression vector. TAT-Oct4 fusion protein was mainly expressed with insoluble inclusion bodies in *E.coli*. The purity of expression product was more than 90% after purification. And the average refolding field is 8.8% using urea gradient dialysis. Immunocytochemistry analysis showed that TAT-Oct4 recombinant protein could penetrate nearly 100% cells membrane and was mainly concentrated in nucleus. The method of generating active TAT-Oct4 recombinant protein was established in this article. It provided not only effective study materials for cell reprogramming but also practical method for other reprogramming factors design.

Keywords: TAT, Oct4, inclusion body, purification

Oct4 是维持胚胎干细胞自我更新和多潜能性 的重要的转录因子之一, 被广泛应用于细胞重编

收稿日期: 2013-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273437); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA01040200)。

* 通信作者: 金 坚(1960—), 男, 浙江东阳人, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事长效蛋白重组药物与肿瘤多药耐药机制的研究。E-mail: jinjian31@126.com

程,形成了具有类似胚胎干细胞性质的诱导多功能干细胞 IPS(induced pluripotent stem cells)^[1-3]。目前,由不同量组合的 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 等转录因子形成的细胞重编程技术,主要采用病毒包装转染的方式将转录因子整合入细胞中^[4-5]。由于病毒载体转染效率和整合位点的差异,导致转录因子无法准确定量干预。作者利用细胞穿膜肽 TAT 可高效介导蛋白进入细胞的特征^[6-7],设计和生物制备 TAT-Oct4 融合蛋白,并评价其穿透细胞的能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及细胞 TAT-Oct4 基因、pET28a 表达载体、BL21 (DE3) 原核表达菌株、NIH 3T3 细胞,均由作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Pfu DNA 聚、Nco I、Xho I 限制性内切酶,T4 连接酶,均购自 Fermentas 公司;胶回收试剂盒、IPTG、卡那霉素,购于上海生工生物工程股份有限公司;Anti-6*His 一抗,购自 Abcam 公司;Alexa Fluor 488 荧光标记的二抗,购于碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 TAT-Oct4 目的基因的克隆 设计含 Nco I 和 Xho I 上下游引物,引物序列如下:

上游引物:5'-CATGCCATGGCAATGCATCATCATCATCATCTTC-3'

下游引物:5'-CCGCTCGAGCGGTCAGTTTGAA TGCATGGGAGAGC-3'

以 TAT-Oct4 基因为模板,经 PCR 扩增目的基因,反应条件如下:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 45 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 2 min,循环 30 次;72 °C 延伸 10 min;最后 4 °C 保存。

1.2.2 pET28a-TAT-Oct4 表达载体的构建 将 PCR 扩增获得 TAT-Oct4 基因与 pET28a 空载体分别用 Nco I 与 Xho I 双酶切,经胶回收后,在 T4 连接酶作用下连接转化入 DH5 α 菌株,挑取单菌落,经双酶切验证后,送至上海“生工”进一步测序验证。pET28a-TAT-Oct4 重组表达载体如图 1 所示。

1.2.3 融合蛋白 TAT-Oct4 的表达鉴定 将测序正确重组表达质粒转入表达菌株 BL21(DE3) 获得重组表达菌株,挑取单菌落接种到含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 °C 培养,当 OD 值达到 0.6,

加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,30 °C 诱导表达 8 h。8 000 r/min 冷冻离心收集菌体,超声破碎,离心分离上清与沉淀,进行 SDS-PAGE 分析。

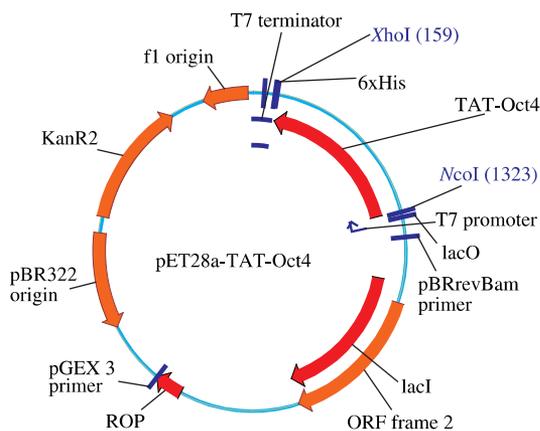


图 1 重组表达载体 pET28a-TAT-Oct4 图谱

Fig. 1 Schematic description of recombinant expression plasmid pET28a-TAT-Oct4

1.2.4 包涵体洗涤、纯化及复性 表达产物分别经洗涤液缓冲 I (50 mmol/L 的 Tris-HCl,300 mmol/L 的 NaCl, 质量分数 1% 的 TritonX-100,2 mmol/L 的尿素,pH 8.0) 和洗涤缓冲液 II (50 mmol/L 的 Tris-HCl,300 mmol/L 的 NaCl,2 mol/L 的尿素,pH 8.0) 洗涤后,在变性缓冲液 (50 mmol/L 的 Tris-HCl,8 mol/L 的尿素,300 mmol/L 的 NaCl,25 mmol/L 的咪唑,pH 8.0) 中溶解 TAT-Oct4 包涵体。在变性条件下,利用 Ni-NTA sepharose 纯化,纯化条件为:上样缓冲液 A (50 mmol/L 的 Tris HCl,8 mol/L 的尿素,300 mmol/L 的 NaCl,25 mmol/L 的咪唑,pH 8.0) 和洗脱缓冲液 B (50 mmol/L 的 Tris HCl,8 mol/L 的尿素,300 mmol/L 的 NaCl,250 mmol/L 的咪唑,pH 8.0) 分段洗脱收集各洗脱峰进行 SDS-PAGE 分析。将纯化获得 TAT-Oct4 重组蛋白经尿素梯度透析 (4,2,1,0.5,0 mol/L 的尿素,50 mmol/L 的 Tris-HCl,100 mmol/L 的 NaCl, 质量分数 10% 的甘油,300 mmol/L 的精氨酸,2 mmol/L 的 GSH/0.2 mmol/L 的 GSSG,1 mmol/L 的 EDTA,0.2 mmol/L 的 PMSF,pH 8.0) 复性,最后用 PBS 透析 3 次除去其它小分子,获得具有活性的 TAT-Oct4 目的蛋白质。

1.2.5 细胞免疫荧光 NIH 3T3 细胞培养于含质量分数 10% 的 FBS 的 DMEM 培养液,待细胞贴壁 24 h 后,加入 TAT-Oct4 目的蛋白共培养 6h。细胞经预冷的细胞固定液 (体积分数 95% 的乙醇和质量分数

5%的乙酸)固定 10 min 后,用含质量分数 0.2%的 TritonX-100 的 PBS 室温下穿透细胞膜 15 min。经 PBS 漂洗及封闭处理后,加入 Anti-6*His 一抗(稀释比例 1:250),4 °C 过夜孵育。PBS 洗涤后,加入相应的 Alexa Fluor 488 荧光标记的二抗(稀释比例 1:500)室温处理 1 h。细胞核经 DAPI 复染定位后,在 Nikon TE 2000 型荧光显微镜下观察拍照。

2 结果与讨论

2.1 目的基因 TAT-Oct4 扩增及构建

PCR 扩增 TAT-Oct4 目的基因经质量分数 1.5% DNA 琼脂糖凝胶电泳分析,可见其相对分子质量大小与理论值 1 158 bp 接近,如图 2 所示。获得的重组表达质粒 pET28a-TAT-Oct4 经 Nco I 和 Xho I 双酶切,可形成约有 5 300 bp 的载体片段和 1 158 bp 的 TAT-Oct4 目的基因片段(见图 3),结果与理论值相符。重组质粒送至上海“生工”测序,其测序结果与理论序列完全一致。

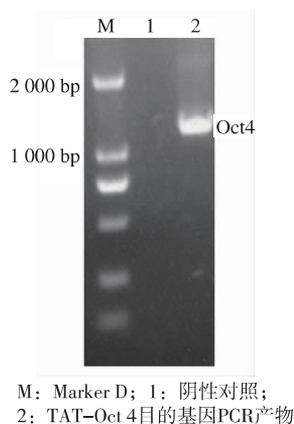


图 2 TAT-Oct4 基因的扩增结果

Fig. 2 Result of TAT-Oct4 amplification

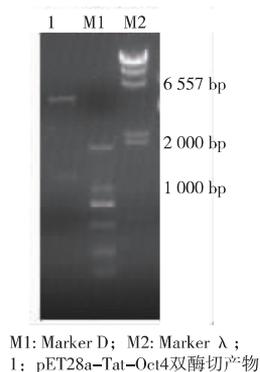
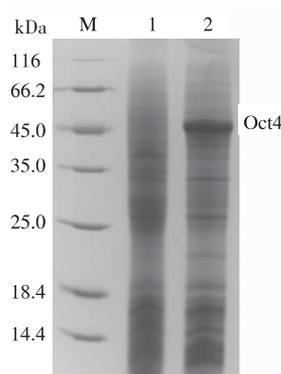


图 3 重组质粒 pET28a-TAT-Oct4 双酶切验证

Fig. 3 Double digestion result of recombinant plasmid pET28a-TAT-Oct4

2.2 融合蛋白 TAT-Oct4 表达产物鉴定

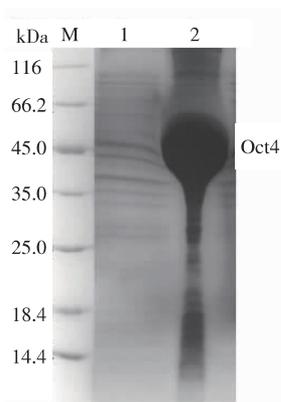
含有 pET28a-TAT-Oct4 宿主菌经 IPTG 诱导表达后,经质量分数 15% SDS-PAGE 分析,在相对分子质量约 45 kDa 处有特异性蛋白条带,与理论值相符(见图 4)。超声破碎后,分离收集上清与沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析,可以看到沉淀中含有大量目的蛋白质(见图 5),由此可见目的蛋白质主要以包涵体形式表达。



M: 蛋白Marker; 1: 未加IPTG诱导菌体; 2: 加入IPTG诱导菌体

图 4 融合蛋白 TAT-Oct4 表达 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of TAT-Oct4 fusion protein expression in *E.coli*



M: 蛋白Marker; 1: 破碎上清; 2: 破碎沉淀

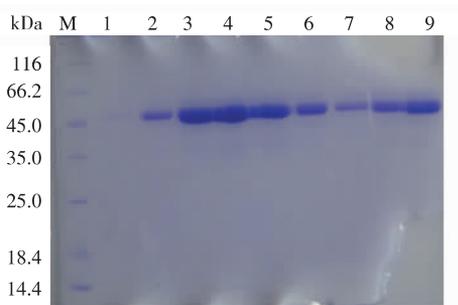
图 5 TAT-Oct4 破碎上清与沉淀 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of TAT-Oct4 supernatant and pellets after lysis

2.3 TAT-Oct4 纯化及复性收率

在分子设计时,上游引物引入 His 标签,方便目的蛋白质使用镍离子亲和柱进行分离纯化。TAT-Oct4 重组蛋白质在变性条件下,经镍柱分段洗脱后,洗脱收集峰进行质量分数 15% SDS-PAGE 分析,如图 6 所示,在 100 mmol/L 咪唑洗脱条件下(泳

道 6 与 7), 可获得纯度 90% 以上的目的蛋白质。同时也可观察到, 整个纯化过程中杂蛋白相对较少, 说明包涵体经洗涤后, 其纯度已经相对较高。研究表明, 在包涵体复性过程中, 降低蛋白质初始浓度和化学添加剂如甘油, 可有效减少蛋白质分子之间的聚集, 从而提高复性收率^[8]。同时对于含有二硫键的蛋白质, 引入氧化还原体系 GSH/GSSG 能促进蛋白质在复性过程中正确折叠^[9]。作者采用尿素梯度透析复性, 同时加入促进复性的化学添加物, 最终 TAT-Oct4 平均收率 8.8%, 同时可观察到复性蛋白初始浓度越高, 其收率越低, 见表 1。



M: 蛋白Marker; 1: 流穿液; 2: 50mM咪唑洗脱; 3,4,5: 75mM咪唑洗脱; 6,7: 100mM咪唑洗脱; 8: 150mM咪唑洗脱; 9: 250mM咪唑洗脱

图 6 TAT-Oct4 纯化产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of TAT-Oct4 after purification

表 1 TAT-Oct4 复性收率

Table 1 Refolding filed of TAT-Oct4 using urea gradient dialysis

复性浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	收率/%
70.0	10.6
98.4	9.9
183.4	6.0

2.4 TAT 介导 Oct4 穿透细胞能力

细胞穿膜肽(cell penetrating peptides)是一类富

含精氨酸或赖氨酸^[10], 并且能将大分子物质携带到细胞胞浆甚至细胞核内部的一类短肽^[11]。常用的有 TAT(YGRKKRRQRRR)和人工合成的多聚精氨酸或赖氨酸。作者在 Oct4 的 N 端引入细胞穿膜肽 TAT 介导其快速进入细胞。NIH 3T3 与重组蛋白 TAT-Oct4 (终质量浓度 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共培养 6 h 后, 在荧光显微镜下观察, 近 100% 的细胞含有 TAT-Oct4 融合蛋白, 并集中分布于细胞核内(如图 7(b))。对照组(图 7(a))加入相应的荧光标记二抗。

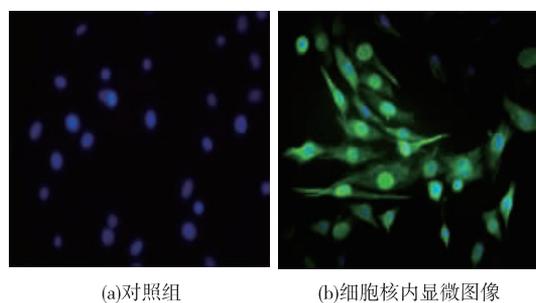


图 7 TAT-Oct4 穿透细胞免疫荧光分析

Fig. 7 Immunocytochemistry analysis of TAT-Oct4 penetrating cells

3 结语

诱导多功能干细胞的产生, 避开了干细胞伦理和免疫排斥两大难题^[12], 然而利用病毒技术获得的诱导多功能干细胞具有致癌的风险, 因此限制其临床应用^[13-14]。作者成功构建并制备了 TAT-Oct4 融合蛋白, 镍柱纯化后, 其纯度高达 90%。通过尿素梯度透析复性的方法, TAT-Oct4 的平均收率为 8.8%。同时验证了细胞穿膜肽 TAT 能高效地将 Oct4 转导进细胞内, 为建立蛋白质诱导 IPS 奠定了基础。然而 TAT-Oct4 在大肠杆菌中的表达主要以包涵体形式存在, 其可溶性表达有待进一步摸索与改造。

参考文献:

- [1] 郑彭生, 曹浩泽. Oct4 基因的研究进展[J]. 西安交通大学学报, 2010, 31(5): 521-526. ZHENG PENG-sheng, CAO Hao-zhe. Advances of Oct4 gene research [J]. *Journal of Xi'an Jiao tong University: Medical Sciences*, 2010, 31(5): 521-526. (in Chinese)
- [2] Pan G J, Chang Z Y, Scholer H R, et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4[J]. *Cell Research*, 2002, 12(5): 321-329.
- [3] Shi G, Jin Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency[J]. *Stem Cell Research*, 2010, 1(5): 39-47.
- [4] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined

- factors[J]. **Cell**, 2006, 126(4):663-676.
- [5] Yu J, Vodyanik M A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. **Science**, 2007, 318(58):1917-1920.
- [6] 罗海兰, 毋辉玲, 路君. TAT-Mafa 融合蛋白诱导小肠细胞系 IEC-6 表达胰岛素[J]. 生物技术通报, 2008(5):141-144.
LUO Hai-lan, WU Hui-ling, LU Jun. TAT-Mafa inducing intestinal epithelial cells IEC-6 into insulin positive cells[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2008(5):141-144. (in Chinese)
- [7] Ziegler A, Seelig J. High affinity of the cell-penetrating peptide HIV-1 Tat-PTD for DNA[J]. **Biochemistry**, 2007, 46(27):8138-8145.
- [8] Guise A D, Chaudhuri J B. Initial protein concentration and residual denaturant concentration strongly affect the batch refolding of hen egg white lysozyme[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2001(6):410-418.
- [9] Alibolandi M, Mirzahoseini H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies[J]. **Biochemistry Research International**, 2011(1):631607-631612.
- [10] 吴永红, 张成岗. HIV-1 TAT 蛋白转导肽的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 30(10):66-73.
WU Yong-hong, ZHANG Cheng-gang. Current progress on the HIV-1 TAT protein transduction peptide [J]. **China Biotechnology**, 2010, 30(10):66-73. (in Chinese)
- [11] El-Sayed A, Futaki S, Harashima H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment[J]. **Aaps Journals**, 2009, 11(1):13-22.
- [12] Lee H, Park J, Forget B G, et al. Induced pluripotent stem cells in regenerative medicine: an argument for continued research on human embryonic stem cells[J]. **Regenerative Medicine**, 2009, 4(5):759-769.
- [13] Zhang G, Shang B, Yang P, et al. Induced pluripotent stem cell consensus genes: implication for the risk of tumorigenesis and cancers in induced pluripotent stem cell therapy[J]. **Stem Cells Development**, 2012, 21(6):955-964.
- [14] Sipp D. Challenges in the clinical application of induced pluripotent stem cells[J]. **Stem Cell Research and Therapy**, 2010, 1(1):9.

科 技 信 息

卫生部拟撤销 14 种食品添加剂 儿童膨化食品拟禁铝

卫生部发布《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》(征求意见稿), 修订含铝食品添加剂规定, 以解决我国居民铝摄入量超量问题, 其中儿童膨化食品拟禁含铝添加剂。从总体品种上看, 卫生部共拟撤销 14 种食品添加剂。

据了解, 标准修订在 2011 年立项, 由国家食品安全风险评估中心(以下简称“评估中心”)牵头, 中国食品工业协会、国家粮食局标准质量中心等机构参与。其间工作组召开了 10 多次标准修订会议, 完成了食品添加剂的管理范畴、食品添加剂的使用原则等内容修订工作。

据了解, 2011 年 6 月, 在联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会第 74 次大会上, 将铝的暂定每周耐受摄入量(PTWI)修订为每公斤体重 2 mg。参考这一评价结果, 我国评估中心 2011 年组织的对食品中铝的风险评估结果显示, 我国全人群平均膳食铝摄入量低于 2 mg/kg 体重/周; 但低年龄组和高食物消费量人群膳食铝摄入量均已超量。

面粉及面制品是我国膳食铝的主要来源, 北方地区居民由于面食消费量高, 有 60% 居民的铝摄入量超量。相比之下, 我国膳食铝摄入量高于其他国家。显示我国需要采取措施降低居民膳食铝摄入量, 以降低铝摄入过量可能带来的健康风险。

我国居民膳食铝暴露风险评估结果显示, 7-14 岁儿童通过膨化食品摄入的铝相对较高, 并且随着年龄降低, 铝摄入量有增高的趋势, 膨化食品成为儿童铝摄入量主要来源之一。为保护儿童身体健康, 新标准拟撤销膨化食品中 12 种含铝食品添加剂的使用规定, 其中涉及的合成着色剂品种有: 赤藓红及其铝色淀、靛蓝及其铝色淀、亮蓝及其铝色淀、柠檬黄及其铝色淀、日落黄及其铝色淀、胭脂红及其铝色淀、诱惑红及其铝色淀。

此外, 新标准还将撤销含铝食品添加剂酸性磷酸铝钠、硅铝酸钠和辛烯基琥珀酸铝淀粉的品种。

根据评估结果, 面食含铝量最高, 且面粉、馒头、油条对铝暴露量的贡献率最高, 因此新标准中硫酸铝钾和硫酸铝铵两种含铝食品添加剂使用范围由原来的“小麦粉及其制品”修改为“油炸面制品”和“面糊(如用于鱼和禽肉的拖面糊)、裹粉、煎炸粉”, 并规定了使用量和残留量。这意味着含铝食品添加剂使用范围大大缩小。

[信息来源] 新华网. 卫生部拟撤销 14 种食品添加剂 儿童膨化食品拟禁铝 [EB/OL]. (2013-3-16). http://news.xinhuanet.com/food/2013-03/16/c_124465689.htm.