

[文章编号] 1000-2200(2008)06-0640-04

· 校庆约稿 ·

Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因表达载体的构建及融合蛋白的表达鉴定

潘庆春,余永胜,汤正好,张 韡,韩进超,臧国庆

[摘要]目的:探讨融合蛋白 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 原核表达的可行性,并分析其表达形式,为研究其功能提供理论基础。方法:合成 Tat₄₇₋₅₇ 编码序列,PCR 技术扩增 HBcAg 基因,通过重叠延伸 PCR 片段拼接法,将 Tat₄₇₋₅₇ 编码序列和 HBcAg 基因拼接,将融合基因克隆到 pET28 原核表达载体中。挑选测序正确的构建质粒转化大肠埃希菌 Rosetta-gamiTM2(DE3),异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导融合蛋白表达,表达产物超声破壁,十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析融合蛋白的表达形式,Western 印迹鉴定。结果:Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白在大肠埃希菌中主要以可溶性形式过度表达,Western 印迹分析表明 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白可与 HBcAg 单克隆抗体反应。结论:融合蛋白 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 以可溶性形式在原核表达系统中高效表达,并能特异性的被 HBcAg 单克隆抗体所识别。

[关键词] 乙型肝炎核心抗原;Tat₄₇₋₅₇;融合基因;重组融合蛋白质类;基因表达;大肠埃希菌

[中国图书资料分类法分类号] R 392.11 **[文献标识码]** A

Construction, expression and identification of fusion protein Tat₄₇₋₅₇-HBcAg in *E. coli*

PAN Qing-chun, YU Yong-sheng, TANG Zheng-hao, ZHANG Wei, HAN Jin-chao, ZANG Guo-qing

(Department of Infectious Disease, Shanghai No. 6 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China)

[Abstract] **Objective:** To construct recombinant plasmid with fusion gene Tat₄₇₋₅₇-HBcAg, express fusion protein Tat₄₇₋₅₇-HBcAg in *E. coli* and identification the Tat₄₇₋₅₇-HBcAg by western blot analysis. **Methods:** To synthesize the sequence of Tat₄₇₋₅₇ and amplify HBcAg gene by PCR, splice the two sequences with splicing by overlap extension PCR, link fusion gene into pET28a, the sequences correct vector be transformed into *E. coli* Rosetta-gamiTM2 (DE3), then the transformed *E. coli* is induced by isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside and the expression product is analyzed by SDS-PAGE, furthermore, identification the expression product by Western blot with HBcAg monoclonal antibody. **Results:** Fusion protein Tat₄₇₋₅₇-HBcAg is highly effective expressed in *E. coli* Rosetta-gamiTM2 (DE3). The solubility analysis of expression product indicated that the fusion protein are mostly expressed in supernatant and expression product could react with HBcAg monoclonal antibody by western blot analysis. **Conclusions:** The Tat₄₇₋₅₇-HBcAg fusion protein can be expressed in *E. coli* Rosetta-gami 2 correctly as soluble protein and be recognized by HBcAg monoclonal antibody.

[Key words] hepatitis B core antigen; Tat₄₇₋₅₇; fusion gene; recombinant fusion proteins; gene expression; *E. coli*

近年来,利用基因重组技术生产外源性的重组蛋白来纠正蛋白相关性疾病的研究取得巨大进展,介导外源性蛋白进入靶目标的手段也愈来愈丰富,从经典的病毒载体如腺病毒到非病毒载体如脂质体甚至纳米微粒,都能将外源蛋白转运至不同细胞、组织和器官,发挥外源性蛋白的效应。但是病毒载体的安全性和非病毒载体昂贵的价格以及转运外源性蛋白的效率低下限制了其更多的临床应用^[1]。多个研究报道来源于 HIV 的 Tat 蛋白(human immunodeficiency virus trans-activator of transcription, HIV-Tat)是一种有效的蛋白转运工具,能够携带外源性生物活性分子穿透细胞膜^[2,3],其具备穿透细胞膜

功能的核心区域是位于 47~57 位的氨基酸残基(Tat₄₇₋₅₇)^[4]。更为重要的是,该结构域与其它各种蛋白融合后同样具有很强的蛋白转导特性^[1]。与 Tat₄₇₋₅₇ 融合的蛋白可以穿透细胞膜进入细胞^[4,5]。HIV-Tat₄₇₋₅₇ 的发现开辟了将蛋白转运入细胞和组织的新途径。本实验选用 HBV 慢性感染时细胞免疫的优势抗原 HBcAg,利用基因重组技术将 Tat₄₇₋₅₇ 编码序列与 HBcAg 基因融合构建重组质粒,探讨重组质粒在大肠埃希菌中高效表达 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白的可行性,为进一步将 HBcAg 导入抗原递呈细胞诱导 HBV 特异的细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T cell, CTL)提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 HBV_pADR 质粒由中国科学院上海生物化学和细胞研究所汪垣教授惠赠。pET28a 质粒、Rosetta-gamiTM2 (DE3) 菌株购于 Novagen 公司, KOD-Plus 高保真 DNA 聚合酶为 TOYOBO 公司产

[收稿日期] 2008-07-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30571669)

[作者单位] 上海交通大学附属第六人民医院 感染科,200233

[作者简介] 潘庆春(1979-),男,硕士,住院医师。

[通讯作者] 臧国庆,研究生导师,教授。Email: zangguoqin@126.com

品, pGEM-T Easy 质粒为 Promega 公司产品, JM109 菌株、限制性内切酶、PCR 试剂、DNA 分子量标记均为 Takara 公司产品, 质粒小量抽提试剂盒购自 Qiagen 公司, T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品, 蛋白分子量标记为 Fermentas 公司产品, HBcAg 单克隆抗体为 Chemical 公司产品, 辣根过氧化物酶 HRP-羊抗小鼠 IgG (二抗)、Western 印迹蛋白分子量标记购自 Cell Signal 公司。

1.2 方法

1.2.1 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因的拼接与亚克隆构建

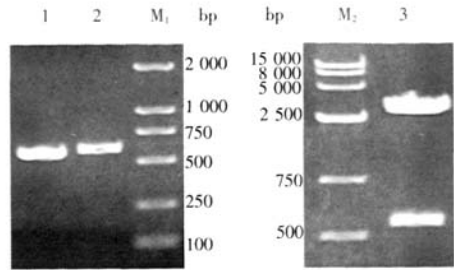
合成寡核苷酸链 TATGCCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA 及其互补链(上海生工生物工程技术有限公司合成), 两条寡核苷酸单链等摩尔 95 °C 10 min, 退火形成双链 DNA, 编码 Tat₄₇₋₅₇, 以双链 Tat₄₇₋₅₇ 编码序列和 HBV_pADR 质粒为模板设计两对引物, 分别为引物 A: CGATCCTATGGCAGGAAGAAG(划线处为 BamH I 酶切位点), 引物 B: CAATGTCCATTCTTCGTCGC, 引物 C: GCGACGAAGAATGGACATTG, 引物 D: AAGCTTACATTGAGATTCCCGAG(划线处为 Hind III 酶切位点), 采用重叠延伸(splicing by overlap extension, SOE)片段拼接法进行 PCR 反应, 直接将 Tat₄₇₋₅₇ 编码序列与 HBcAg 基因融合, 减少待拼接目的片段之间的连接序列。纯化回收的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 在 T4 DNA 连接酶作用下 4 °C 反应 12 h, 连接产物转化 JM109 感受态细胞, 蓝白斑筛选, 挑取白色菌落接种 LB 培养基(氨苄西林 100 mg/L) 振荡 12 h 后抽提质粒, BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 鉴定阳性的质粒测序, 由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2.2 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因原核表达质粒的构建

构建策略(见图 1), BamH I 和 Hind III 分别双酶切测序正确的 pGEM-T Easy-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 质粒和 pET28a 质粒, 纯化回收小片段和双酶切线性化的 pET28a 质粒, 在 T4 DNA 连接酶作用下按摩尔比 8:1 的比例 16 °C 恒温连接 12 h, 连接产物转化 JM109 感受态细胞, 挑取单菌落接种 LB 培养基(氨苄西林 100 mg/L), 振荡 12 h 抽提质粒, 抽提的质粒用 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 鉴定阳性的质粒测序, 由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2.3 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白诱导表达与可溶性分析

取 1 μl 测序正确的 pET28-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 质粒加至 200 μl 的 Rosetta-gamiTM 2 (DE3) 感受态细胞, 接种 LB 固体培养基(氨苄西林 100 mg/L, 盐酸四环素 12.5 mg/L, 氯霉素 34 mg/L, 链霉素 50 mg/L), 37 °C 培养 12 h, 挑取单菌落接种 3 ml 含相同上述抗生素的 LB 培养基, 37 °C 振荡 12 h。取



M₁, M₂: DNA 分子量标记; 1: HBcAg 基因; 2: Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因; 3: pGEM-T Easy-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 质粒双酶切鉴定
图 1 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因的拼接和亚克隆构建

1 ml 菌液加入 200 ml 含相同上述抗生素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡, 当菌液 OD₆₀₀ 达 0.8 时, 取 1 ml 离心备用, 其余加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L, 28 °C 振荡 5 h, 离心收集细菌。磷酸盐缓冲液(PBS)重悬菌体, 超声破壁后高速离心。分别取诱导前和诱导后菌液、超声破壁后上清液, 超声破壁后离心沉淀加变性剂煮沸变性行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.2.4 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白的 Western 印迹鉴定

取上述已处理过的诱导前、诱导后、超声破壁后上清液和超声破壁后沉淀样品经 SDS-PAGE 电泳后, 电转移(100 V, 1 h)至硝酸纤维(NC)膜。转移后的 NC 膜用 Western 杂交膜清洗液(TBST)清洗 5 min, 封闭缓冲液[5% (W/V) 脱脂奶粉/TBST 缓冲液]室温封闭 60 min, 加入 1:2 000 稀释的一抗(HBcAg 单克隆抗体, 封闭缓冲液稀释), 4 °C 缓慢振荡孵育过夜, TBST 洗涤液清洗 NC 膜(5 min × 3 次), 加入 1:200 稀释的二抗(辣根过氧化物酶 HRP-羊抗小鼠 IgG, 封闭缓冲液稀释)室温孵育 60 min, TBST 洗涤液清洗 NC 膜(5 min × 3 次); 加入 ECL 发光剂暗盒压片, 3 min 后显影剂显影, 定影摄片。

2 结果

2.1 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因的拼接和亚克隆构建及鉴定

HBcAg 基因、Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果(见图 2), 目标片段分别与 HBcAg 和 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 大小相当, 将构建的 pGEM-T Easy-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 质粒用 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 酶切产物小片段和 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 电泳后在同一位置。双酶切鉴定正确的质粒测序, 显示碱基序列与模板序列完全一致, 表明 pGEM-T Easy-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 质粒构建成功。

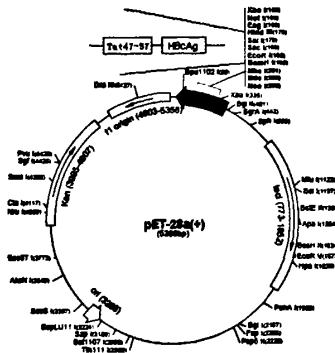
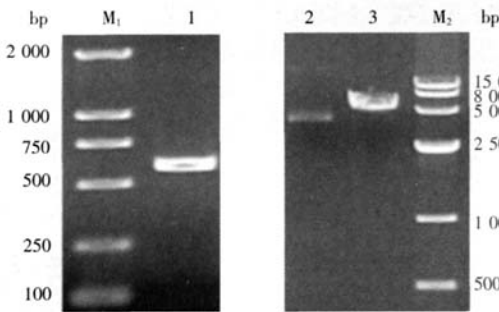
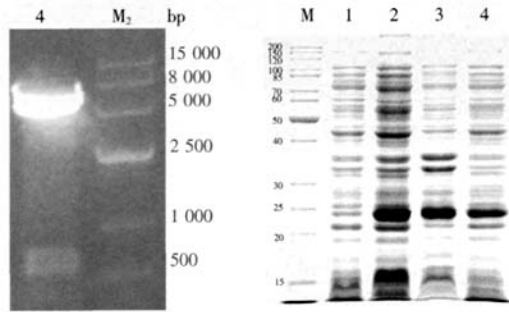


图2 pET28a-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 表达质粒构建策略(Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因插入到 pET28a 多克隆位点的 BamH I 和 Hind III 之间)



1: 纯化的 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因; 2: pET28a 质粒; 3: 双酶切后的 pET28a 质粒; 4: pET28a-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 表达质粒双酶切鉴定; M₁, M₂: DNA 分子量标记

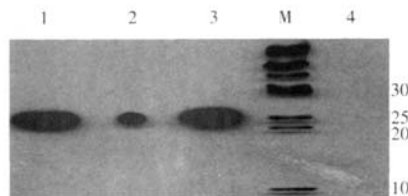
图3 pET28a-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 表达质粒的构建



M: 蛋白分子量标记; 1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 超声破壁后上清液; 4: 超声破壁后沉淀
图4 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白的诱导表达与可溶性分析

2.4 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白的 Western 印迹鉴定

pET28a-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 质粒转化大肠埃希菌 Rosetta-gami™ 2 (DE3), 经 IPTG 诱导后的表达产物及其超声破壁后分离的上清液和沉淀 SDS-PAGE 电泳后电转至 NC 膜, 与单克隆抗体杂交孵育, Western 印迹显示诱导产物及超声破壁后上清液可特异性与 HBcAg 单克隆抗体反应(见图 5)。证实原核表达质粒 pET28a-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 可在大肠埃希菌中正确表达可溶性的 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白。



1: 超声破壁后上清液; 2: 超声破壁后沉淀; 3: 诱导后; 4: 诱导前; M: 蛋白分子量标记[相对分子量(×10³)]
图5 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白的 Western 印迹鉴定

3 讨论

HIV-Tat 蛋白的 Tat₄₇₋₅₇ 是目前研究最为透彻的细胞穿透肽, 可携带多种生物活性分子如核酸、蛋白甚至颗粒性物质穿透细胞膜^[6]。Tat₄₇₋₅₇ 应用于蛋白转导已取得长足进展, 研究表明, Tat₄₇₋₅₇ 可以转运不同大小的蛋白, 甚至可以将 110 kDa 的蛋白转导入不同细胞^[7]。更为重要的是, Tat₄₇₋₅₇ 不但毒性微小, 而且其转运的目的蛋白在体内外实验中均显示了目

2.2 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合基因原核表达质粒的构建

电泳结果显示小片段与 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 在同一位置(见图 3)。酶切鉴定正确的质粒测序碱基序列与模板一致, 表明 pET28a-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 表达质粒构建成功。

2.3 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白的诱导表达与可溶性分析

pET28a-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 质粒转化大肠埃希菌 Rosetta-gami™ 2 (DE3), 经 IPTG 诱导后与诱导前相比较, 在 120 g/L 的 SDS-PAGE 电泳图谱上出现了相对分子量与预计的 His-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 大小相当的新条带(His 为 6 个组氨酸的载体标签蛋白)。诱导产物超声破壁后离心, 上清液和沉淀的 SDS-PAGE 电泳显示 His-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 大部分表达于上清液, 呈可溶性表达(见图 4)。

的蛋白应有的生物学功能^[8], 显示了 Tat₄₇₋₅₇ 在物质转运方面巨大的应用前景。

抗原特异性 CTL, 主要是抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)胞质中的内源性抗原或多肽通过 MHC-I 类分子提呈途径诱导 CD8⁺ 淋巴细胞产生的。HBV 相关抗原对 APC 而言均属外源性抗原, 较难诱导针对 HBV 特异性的 CTL 免疫反应。如能使 HBV 相关抗原特别是细胞免疫优势抗原 HBcAg 进入 APC 的胞质转化为内源性抗原, 诱导机体产生

有效的 CTL 免疫反应,将有助于慢性乙型肝炎的防治^[9,10]。正常情况下,由于膜生理屏障存在,蛋白、多肽很难直接进入细胞内。Tat₄₇₋₅₇携带外源蛋白转运特性的发现为将 HBcAg 导入 APC 的胞质提供了新途径。

本实验通过构建 pET28-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 原核表达载体,探讨了 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 重组蛋白原核表达的可行性,分析其是否以可溶性形式表达,为进一步研究 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 重组蛋白的功能提供了实验基础。为增加 PCR 反应的保真性,减少普通 Taq 酶在 PCR 扩增时产生较高的错配率,我们选用 TOYOBO 公司生产的高保真 DNA 聚合酶(KOD-Plus)作为 DNA 聚合酶。同时为尽可能减少 Tat₄₇₋₅₇序列与 HBcAg 基因之间的非目的序列,我们采用了重叠延伸 PCR 片段拼接法^[11]来直接拼接 Tat₄₇₋₅₇序列与 HBcAg 基因。本实验中所有 PCR 产物均通过回收纯化来提高其纯度和反应的特异性。有趣的是,我们将构建正确的 pET28-Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 质粒转化普通的大肠埃希菌 BL21(DE3),IPTG 诱导后行 SDS-PAGE 电泳未见诱导前后有明显差别,表明目的蛋白 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 可能未能表达,更换宿主菌,表达质粒转化大肠埃希菌 Rosetta-gamiTM 2(DE3),经 IPTG 诱导后 SDS-PAGE 电泳显示出现新的清晰条带,大小与预计的目的蛋白相当。提示人源性 HBcAg 基因含有较多稀有密码子[Rosetta-gamiTM 2(DE3)可以提供稀有密码子翻译时需要的稀有 tRNA^[12],而 BL21(DE3)不能]。原核表达的 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白的可溶性表达,为蛋白的大量生产、纯化和进一步的功能研究提供了诸多便利,为 Tat₄₇₋₅₇-HBcAg 融合蛋白的体内外实验提供了基础。

(本课题受到上海瑞金医院分子医学中心宋怀东教授和感染科张欣欣教授的大力支持,特此致谢!)

[参 考 文 献]

- [1] Chauhan A, Tikoo A, Kapur AK, et al. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities [J]. *Control Release*, 2007, 117(2): 148-162.
- [2] Gupta B, Torchilin VP. Transactivating transcriptional activator-mediated drug Delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006, 3(2): 177-190.
- [3] Dietz GP, Bahr M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27(2): 85-131.
- [4] Ignatovich IA, Dizhe EB, Pavlotskaya AV, et al. Complexes of plasmid DNA with basic domain 47-57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(43): 42 625-42 636.
- [5] Rinne J, Albarran B, Jylhävä J, et al. Internalization of novel non-viral vector TAT-streptavidin into human cells [J]. *BMC Biotechnol*, 2007, 7: 1. doi: 10.1186/1472-6750-7-1.
- [6] Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 637-651.
- [7] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, et al. In vivo protein transduction; delivery of a biologically active protein into the mouse [J]. *Science*, 1999, 285(5433): 1 569-1 572.
- [8] Domínguez-Bendala J, Klein D, Ribeiro M, et al. TAT-mediated neurogenin 3 protein transduction stimulates pancreatic endocrine differentiation in vitro [J]. *Diabetes*, 2005, 54(3): 720-726.
- [9] Vierling JM. The immunology of hepatitis B [J]. *Clin Liver Dis*, 2007, 11(4): 727-759.
- [10] Bertoletti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control [J]. *Antiviral Res*, 2003, 60(2): 61-66.
- [11] Liu S, Yu X, Wang C, et al. Quadruple antigenic epitope peptide producing immune protection against classical swine fever virus [J]. *Vaccine*, 2006, 24(49-50): 7 175-7 180.
- [12] Oertelt S, Lian ZX, Cheng CM, et al. Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF-beta receptor II dominant-negative mice [J]. *J Immunol*, 2006, 177(3): 1 655-1 660.

《蚌埠医学院学报》改月刊启事

《蚌埠医学院学报》为公开发行的医学综合性学术期刊,是中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。经安徽省新闻出版局(皖新出[2008]51号)批准,自2009年第1期起由双月刊改为月刊。办刊宗旨、版式、主要栏目、每册定价均不变,页码由128页改为96页。A4开本,铜版纸印刷,每月15日出版。

多年来,作者和读者对《蚌埠医学院学报》给予了热情的支持和厚爱,历届编委、审稿专家、学者为学报的成长付出了辛勤的劳动,在此致以诚挚的谢意!改为月刊后,将进一步提高学报质量,缩短出版时滞,为读者、作者提供更好的服务。

《蚌埠医学院学报》编辑部