

融合蛋白 CTP-SOD 在毕赤酵母中的表达、纯化及抗氧化能力

李沛志, 任军乐, 安婷, 刘堰

西南大学生命科学学院, 重庆 400715

摘要: 超氧化物歧化酶(SOD)是一种在生物界广泛存在的抗氧化酶, 在抗衰老、抗肿瘤、抗免疫疾病和电磁辐射上都起着重要的作用。本实验利用含有细胞质转导肽 (CTP, 一种能够携带外源大分子穿过细胞膜, 定位于细胞质的短肽) 基因序列的特异引物, 以人总 RNA 反转录产物为模板, 扩增出了 CTP 和人铜锌超氧化物歧化酶 (Cu/Zn SOD) 的融合基因。运用毕赤酵母表达系统成功表达了具有活性的 CTP-SOD 融合蛋白。CTP-SOD 预处理 HeLa 细胞后, 明显提高了邻苯三酚 (Progallo) 诱导氧化胁迫下 HeLa 细胞的存活率, 和对照组野生型 SOD 相比具有显著性差异。结果表明, CTP-SOD 融合蛋白比野生型 SOD 更容易进入细胞, 具有更高效的抗氧化功能。

关键词: 细胞质转导肽, 毕赤酵母, 分泌表达, 氧化胁迫

Expression and purification of fusion protein CTP-SOD in *Pichia pastoris* and antioxidant capacity analysis

Peizhi Li, Junle Ren, Ting An, and Yan Liu

School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Cytoplasmic transduction peptide (CTP) is a newly designed transduction peptide, by which special molecules can be carried out and localized into cytoplasmic compartment. Superoxide dismutase (SOD) is a protein that is difficult to go into cytoplasm. In this study, CTP-SOD fusion gene was amplified from human cDNA by PCR, and the active recombinant protein was successfully expressed in *Pichia pastoris*. HeLa cells pretreated with CTP-SOD showed a significantly improved survival against the pyrogallol-induced oxidative stress, suggesting CTP-SOD could cross the cell membrane more efficiently and protect cells from oxidative stress.

Keywords: cytoplasmic transduction peptide, *Pichia pastoris*, secretory expression, oxidative stress

由于细胞膜对细胞外环境的天然屏蔽作用, 除了具有特定转运机制的短肽可以进入细胞, 外源多肽、蛋白质、纳米药物运输载体等大分子物质很难

进入细胞。向细胞内高效运输大分子药物是药物运输中的难题。细胞质转导肽 (Cytoplasmic transduction peptide CTP) 是人工设计的一种新型转导肽, 可以

Received: October 29, 2009; **Accepted:** January 18, 2010

Supported by: Natural Science Foundation of Chongqing (No. CSTC2009BB1131).

Corresponding author: Yan Liu. Tel: +86-23-68388099; E-mail: liuyan@swu.edu.cn

重庆市自然科学基金项目 (No. CSTC2009BB1131) 资助。

转运大分子穿过细胞膜定位于细胞质^[1], CTP 作为一种新型运输工具为细胞质靶向大分子药物的应用提供了很大的便利。

铜锌超氧化物歧化酶 (Cu/Zn superoxide dismutase, Cu/Zn SOD) 是一种能专一清除超氧阴离子自由基的抗氧化酶。目前, SOD 作为药用酶已开始应用于骨关节炎、类风湿性关节炎以及红斑狼疮等疾病的治疗, 尤其对治疗关节炎及类风湿关节炎有明显疗效。在治疗心肌缺血症与缺血再灌注综合症及某些心血管疾病方面也有可喜的效果, 并能够防辐射, 目前临床上常用来辅助放疗和化疗以降低大剂量照射引起的副作用。SOD 主要在细胞质中发挥作用, 但是由于 SOD 是生物大分子, 没有特异性的受体和通道, 不容易跨过细胞膜进入细胞质, 大大降低了生物利用度。本实验将 CTP 基因和人 Cu/Zn SOD 基因融合, 成功的在毕赤酵母表达系统表达了具有生物活性的 CTP-SOD 融合蛋白, 显著地提高了 SOD 保护 HeLa 细胞免受氧化损伤的能力; 与野生型 SOD 相比有明显差异, 统计学上具有极显著意义。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 人胎盘组织

人胎盘组织采自重庆市第九人民医院。

1.1.2 菌株与质粒

P. pastoris GS115(*his4-*) 甲醇表达宿主菌、*P. pastoris* 整合型分泌表达质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司; 克隆宿主菌 *E. coli* Top10 由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂

Total RNA 提取试剂 (RNAisoTM Plus) 与 PrimerScriptTM RT reagent Kit、高保真 PrimerSTAR 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、dNTPs 均购自 TaKaRa 公司; 凝胶回收试剂盒购自 BioFlux 公司; 邻苯三酚 (Pyrogallol) DMSO、SOD 购自 Sigma 公司; 引物由上海生工生物技术有限责任公

司合成; His6 多克隆抗体 (鼠抗) 购自上海中国科学院抗体中心; 羊抗鼠 IgG-HRP 购自 Santa Cruz; DAB 显色试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 RT-PCR

参照 TaKaRa 公司的 Total RNA 提取试剂和反转录试剂盒的操作说明书进行总 RNA 的提取和 RT-PCR。

1.2.2 CTP-SOD 融合基因扩增及分泌表达质粒的构建

按照 Hallewell 等^[2]发表的人 Cu/Zn SOD cDNA 序列, 经 Oligo6 软件分析, 设计含有细胞质转导肽 (Cytoplasmic transduction peptide, CTP)^[1]基因序列 (阴影部分) 的上游引物 Primer 1, 引入 *Xho* I 酶切位点; 含有编码 His₆ 纯化标签基因序列 (阴影部分) 的下游引物 Primer 2, 引入 *Eco*R I 酶切位点。以 RT-PCR 产物为模板, 用 Primer 1 和 Primer 2 进行 PCR。纯化的 PCR 产物经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切, 连接至经相同限制性内切酶酶切的 (pPIC9K 质粒有 2 个 *Xho* I 酶切位点, 分别在 1193 bp 和 5710 bp; *Xho* I 采用部分酶切) pPIC9K 质粒, α -factor 信号肽 KEX2 切割位点的下游位置, 转化 *E. coli* Top10, 菌落 PCR 筛选。少量抽提质粒酶切鉴定并进行 DNA 序列测定。

表 1 PCR 扩增所用引物及其序列

Table 1 Primers used for PCR amplification

Primer name	Primer sequence(5'-3')
Primer1	CCGCTCGAGAAAAGATATGGTAGAAGAG CTAGAAGAAGAAGAAGAAGAATGGCGA CGAAGGCCGTG
Primer2	CGGAATTCCTTAATGATGATGATGATGAT GTTGGGCGATCCCAATTAC

1.2.3 重组质粒的电击转化

CTP-SOD/pPIC9K 质粒用 *Sal* I 酶切线性化, 于 Bio-Rad Gene Pluser 电转仪 2000 V, 25 μ F, 200 Ω , 4.6 ms 条件下电击转化感受态酵母细胞, 涂布于不含组氨酸的 RDB 平板上筛选转化子。详细操作参考

Invitrogen Kit 说明书。

1.2.4 *P. pastoris* 菌落 PCR 鉴定重组子

平板培养 36 h 左右, 观察到乳白色菌落的转化子。挑出这些单克隆接于 YPD 培养基中, 培养 4~8 h 后吸取 50 μ L 菌液, 煮-冻-煮法提取基因组 DNA, 用 3'AOX1 和 5'AOX1 引物, 菌落 PCR 来验证目的基因是否整合进入酵母基因组。

1.2.5 重组酵母菌的诱导表达

参照 Invitrogen Multi-Copy Pichia Expression Kit 的使用说明进行酵母重组子的诱导表达, 每隔 12 h 补加甲醇至终浓度为 0.5%。分别在 0、24、36、48、60、72、84、96 h 取发酵液 1 mL, 12 000 r/min 离心 1 min, TCA 沉淀蛋白, 30 μ L 上样缓冲液溶解沉淀, 取 15 μ L 进行 SDS-PAGE, 分析诱导时间和表达量的关系。

1.2.6 诱导表达产物的纯化及 Western blotting 分析

诱导 72 h 的培养液 4 $^{\circ}$ C、6000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 冰浴后加入固体硫酸铵至 75% 饱和度沉淀蛋白, 4 $^{\circ}$ C 放置 6 h, 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。沉淀用 1/25 体积冰冷的镍亲和层析柱 (Ni Sepharose 6 Fast Flow) 柱平衡液溶解, 并在此溶液中 4 $^{\circ}$ C 透析 72 h, 6 h 更换一次透析液。将透析好的样品 0.45 μ m 滤膜过滤, 上样镍亲和层析柱。样品过柱后, 用 400 mmol/L 咪唑洗脱, 收集目的蛋白, 进行 SDS-PAGE 检测和 Western blotting 分析。

1.2.7 纯化产物酶比活的测定

Bradford 微板比色法测定蛋白含量^[3]; SOD 试剂盒测定 CTP-SOD 活性。

1.2.8 邻苯三酚对 HeLa 细胞增殖的抑制作用

邻苯三酚 (Pyrogallol), 一种超氧化物阴离子产生剂, 可引起 HeLa 细胞内部 O²⁻量的显著上升^[4], 抑制 HeLa 细胞的生长且诱导其凋亡; 利用邻苯三酚处理 HeLa 细胞, 建立氧化损伤模型。将对数生长期的 HeLa 细胞消化后, 接种于 96 孔培养板, 每孔加 200 μ L 悬液 (2 \times 10⁴ 个/孔), 培养 12 h。弃培养基, 向每孔加入 180 μ L 新鲜 DMEM 培养基和 20 μ L 不同浓度的邻苯三酚 (终浓度为 20、40、60、80、100 μ mol/L), 溶剂对照组为灭菌水, 每组设 6 个平

行孔。培养 48 h 后弃废液, 灭菌 PBS 洗涤细胞, 加入 5 mg/mL MTT 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。弃掉 MTT, 加分析纯 DMSO 150 μ L, 微量振荡器上振荡 10 min。以 DMSO 调零, 在酶联免疫检测仪于 490 nm 波长下测定各孔 OD 值。SPSS 软件计算 IC₅₀ 值。

1.2.9 CTP-SOD 对 HeLa 细胞氧化损伤的保护作用

接种 HeLa 细胞于 96 孔培养板 (2 \times 10⁴ 个/孔), 培养 12 h。弃废液, 加入 180 μ L 无血清培养基和 20 μ L 不同浓度的 CTP-SOD (终浓度为 1、2、4 μ mol/L), 对照组为相同浓度的 SOD, 溶剂对照组加入 20 μ L PBS 每组 6 个平行孔。CO₂ 培养箱中孵育 2 h 后弃液体, PBS 洗涤细胞, 加入 180 μ L 新鲜培养基和 20 μ L 600 μ mol/L 邻苯三酚 (终浓度为 60 μ mol/L)。培养 48 h 后, 弃废液, PBS 洗涤细胞, 加入 MTT, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后弃掉 MTT, 加分析纯 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min。以 DMSO 调零, 在酶联免疫检测仪于 490 nm 波长下测定各孔 OD 值, 分析细胞存活率。

2 结果

2.1 总 RNA 的制备

采用 RNA 提取试剂盒抽提人总 RNA, 经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳可见 18S rRNA 及 28S rRNA 的条带 (图略), 说明提取的 RNA 未被降解, 可用于后续实验。

2.2 CTP-SOD/pPIC9K 重组载体的构建

以反转录产物为模板扩增得到了大小为 539 bp 的产物 (图 1)。纯化 PCR 产物经 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切, 并与载体 pPIC9K 连接。连接产物转化 Top10, 在含 100 mg/L Ampicillin 的低盐 LB 平板上筛选克隆, 并通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆 (图略)。抽提重组质粒经 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切得到相应大小片段 (pPIC9K 质粒在 1193 bp 和 5710 bp 有 2 个 *Xho* I 酶切位点; 经 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切后得到 530 bp 左右的插入片段和 2 个近似相等约为 4600 bp 的片段) (图 2), 说明 CTP-SOD 基因已经连接到载体上。经进一步测序鉴定, CTP-SOD 基因序列与文献报道一致, 插入位点和方向正确。

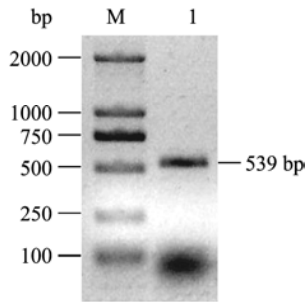


图1 CTP-SOD 基因的扩增

Fig. 1 Amplification result of CTP-SOD gene. M: DNA marker DL2000; 1: CTP-SOD gene was amplified from RT-PCR products by primer 1 and Primer2.

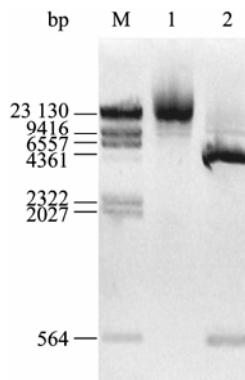


图2 重组质粒酶切分析

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid. 1: plasmid pPIC9K-CTP SOD; 2: pPIC9K-CTP SOD digested with *Xho* I and *Eco*R I.

2.3 酵母染色体的重组和 PCR 鉴定

重组质粒线性化后, 电转化酵母 GS115, 涂布不含组氨酸的 RDB 平板。培养 36 h 左右, 挑单克隆接种于 YPD 培养基中, 培养 4~8 h 吸取 50 μ L 菌液, 煮-冻-煮法提取酵母基因组 DNA, 用 3'AOX1 和 5'AOX1 引物来验证目的基因是否整合到基因组中。

如果目的基因整合, 扩增产物大小应该是 1000 bp 左右。经 PCR 鉴定, 几乎所有克隆中都出现了大小约为 1000 bp 的特异性条带 (图 3), 说明目的基因已整合到转化子的基因组中。

2.4 CTP-SOD 的诱导表达与纯化

将筛选得到的重组菌株诱导培养 96 h, 24 h 后每隔 12 h 取样 1 次, SDS-PAGE 分析诱导后的上清。可见在诱导培养 36 h 后, 目的条带已很明显, 延长诱导时间, 蛋白量逐渐增多, 72 h 时趋于稳定 (图 4)。因此, 选择 72 h 为最佳诱导时间。在候选株中选择表达量较高的克隆作为表达菌株, 扩大培养, 收集发酵液并沉淀、纯化蛋白, 进行 SDS-PAGE 检测和 Western blotting 分析。凝胶经 Band Scan 灰度扫描, 纯化蛋白的纯度达到 (图 5A), Western blotting 结果显示 (图 5B), 在相应的位置出现了特异的免疫条带 (图 5B)。

2.5 CTP-SOD 对氧化胁迫下细胞的保护作用

经 MTT 法分析存活细胞的相对数量, 得出不同浓度的邻苯三酚 (0、20、40、60、80、100 μ mol/L) 对细胞增殖的抑制作用 (图 6)。经 SPSS 统计软件分析, 邻苯三酚(Pyrogallol)对细胞增殖的半抑制剂量 (IC_{50}) 为 54 μ mol/L。为了分析 CTP-SOD 体外保护 HeLa 细胞免受氧化损伤的能力, 分别用 1、2、4 μ mol/L 的 CTP-SOD 预处理细胞 2 h, 对照组为相同浓度 SOD, 然后 60 μ mol/L 的邻苯三酚处理细胞 48 h, MTT 法分析存活细胞的相对数量。结果显示 CTP-SOD 明显地提高了 HeLa 细胞的存活率, 和对照组相比有显著的差异 (图 7)。

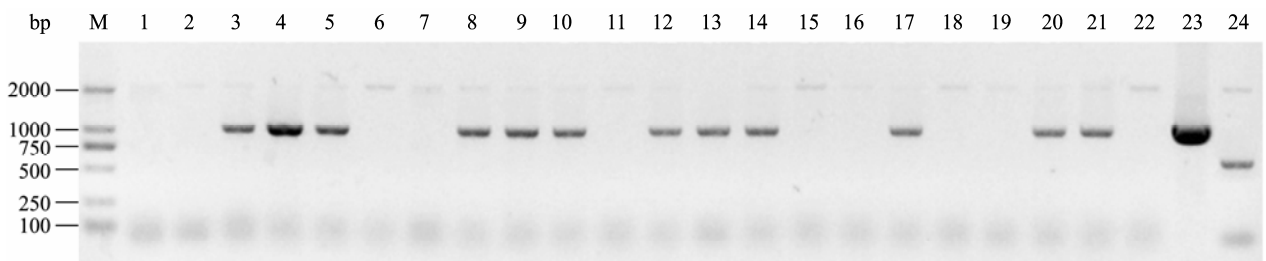


图3 菌落 PCR 筛选阳性酵母重组子

Fig. 3 PCR screening after *Sal* I digestion and electroporation. M: DNA marker; 22: GS115; 23: CTP-SOD-pPIC9K; 24: pPIC9K/GS115; 3-5, 8-10, 12-14, 17, 20, 21: CTP-SOD-pPIC9K/GS115 positive clones.

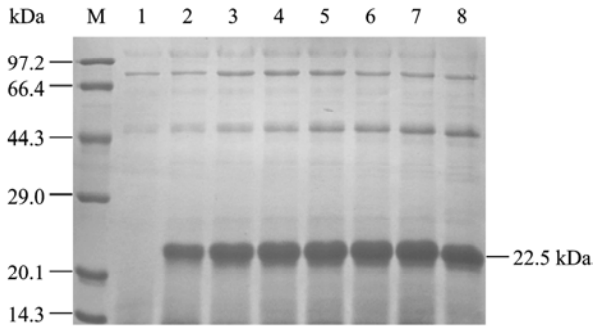


图 4 诱导时间对 CTP-SOD 表达量的影响

Fig. 4 Effects of induction time on the expression of CTP-SOD in *Pichia pastoris*. M: protein marker; 1: pPIC9K/GS115 induced for 48 h. 2-8: fermentation supernatant of pPIC9K-CTP-SOD/GS115 induced for 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 h, respectively.

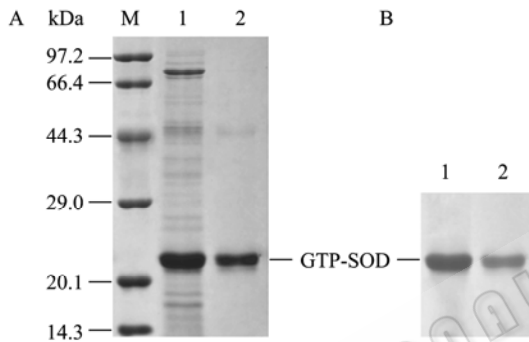


图 5 重组蛋白的纯化及 Western blotting 分析

Fig. 5 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of the purified CTP-SOD protein from fermentation supernatant of *Pichia pastoris*. (A) M: protein marker; 1: fermentation supernatant of *Pichia pastoris*; 2: purified CTP-SOD. (B) 1: fermentation supernatant of *Pichia pastoris*; 2: purified CTP-SOD.

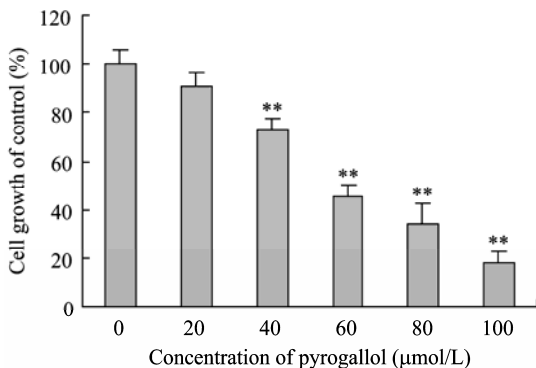


图 6 邻苯三酚对 HeLa 细胞增值的抑制作用

Fig. 6 Effects of pyrogallol on the growth inhibition of HeLa cells *in vitro*. Cell growth inhibition was assessed by MTT assays. $P < 0.01$ compared with the pyrogallol-untreated group.

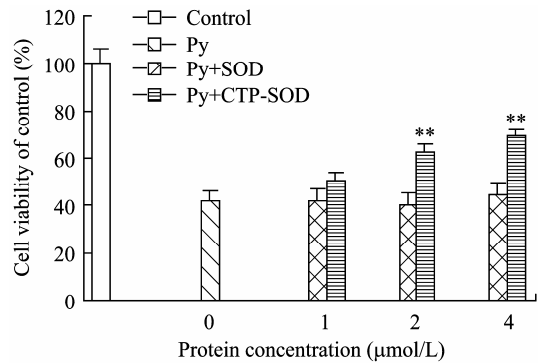


图 7 CTP-SOD 体外对氧化损伤 HeLa 细胞的保护作用

Fig. 7 Effect of transduced CTP-SOD on cell viability of HeLa cells treated with pyrogallol. Pyrogallol was added to HeLa cells pretreated with 1-4 $\mu\text{mol/L}$ CTP-SOD, and control SOD for 2 h, respectively. Cell viability was assessed by MTT assays. Each bar represents the mean \pm S.E.M. obtained from six experiments. Asterisks denote statistical significance at $P < 0.01$, respectively. The statistical analysis was evaluated by Student's *t*-test.

3 讨论

大多药物需要跨膜运输到细胞质或特定的细胞器才能发挥效用, 但除了具有特定转运机制的短肽可以进入细胞, 细胞膜的屏蔽作用阻止了外源核酸、蛋白质、多肽、纳米药物运输载体等大分子物质的进入。1997年, Vives 等发现 HIV 的 Tat 蛋白中一个带正电荷的碱性结构域与 Tat 的蛋白转导能力密切相关, 称之为蛋白转导域 (Protein transduction domain, PTD)^[5], 自此 PTD 被广泛地利用和报道, 但是由于 TAT-PTD 本身是一个核定位序列 (Nuclear localization sequence, NLS)^[6], 大部分的 PTD 或与 PTD 共价结合的蛋白在跨过细胞膜后被转运到细胞核而不是细胞质或其他细胞器^[7-9], 大量非核内物质在细胞核的累积必然会造成核内遗传物质的损伤, 影响到细胞的正常功能, 因此 PTD 运输系统只适用于在细胞核内发挥功能的药物分子的转运。

细胞质转导肽 (Cytoplasmic transduction peptide CTP) 是在 HIV-Tat PTD 基础上设计的一种新型转导肽, 可以转运大分子穿过细胞进入细胞质^[1], 一些研究也进一步表明 CTP 的确有运输药物分子定位细胞质的偏好性^[10-11]。CTP 作为一种新型运输工具

为细胞质靶向药物大分子的跨膜运送提供了很大的便利。本研究成功地在毕赤酵母表达系统中高效表达了具有生物活性的 CTP-SOD 融合蛋白, 发酵上清中重组蛋白的含量为 156.5 mg/L。纯化得到的 CTP-SOD 分子量约为 22.5 kDa。

CTP-SOD 预处理 HeLa 细胞可显著提高氧化胁迫下细胞的存活率, 较 SOD 有显著性差异。和 Kim 等^[12]的研究结果一致, SOD 和 CTP 或其他种类的 PTD 融合显著地提高了 SOD 的跨膜能力和抗氧化功能, 为提高临床药用 SOD 的生物利用度打下坚实基础。已有的研究表明 CTP 有运输药物分子定位细胞质的偏好性, 但是 CTP 和其他种类的 PTD 相比是否更有利于 SOD 或其他在细胞质中起作用的药物发挥功能都有待进一步深入的研究来证明。现今, 又有多种其他类型的 PTD 被相继发现, 有些已经开始用于临床试验, 具有跨膜转导能力的新一代药物运输载体 PTD 将会促进多肽、核酸等大分子药物的快速发展, 为生物大分子药物的应用带来更广阔的前景。

REFERENCES

- [1] Kim D, Jeon C, Kim JH, *et al.* Cytoplasmic transduction peptide (CTP): new approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res*, 2006, **312**: 1277–1288.
- [2] Hallewell RA, Masiarz FR, Najarian RC, *et al.* Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesizing high levels of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**: 2017–2034.
- [3] Wang DN, Zhao YW, Tian FR. Protein quantification with coomassie brilliant blue microplate-colorimetric. *J Fourth Mil Med Univ*, 2001, **22**(6):528–529.
- [4] Kim SW, Han YW, Lee ST, *et al.* A superoxide anion generator, pyrogallol, inhibits the growth of HeLa cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Mol Carcinogen*, 2008, **47**: 114–125.
- [5] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 16010–16017.
- [6] Truant R, Cullen BR. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 1210–1217.
- [7] Sandgren S, Cheng F, Belting M. Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 38877–38883.
- [8] Potocky TB, Menon AK, Gellman SH. Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 50188–50194.
- [9] Ferrari A, Pellegrini V, Arcangeli C, *et al.* Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol Ther*, 2003, **8**: 284–294.
- [10] Chauhan A, Tikoo A, Kapur AK, *et al.* The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. *J Control Rel*, 2007, **117**: 148–162.
- [11] Huang SF, Liu DB, Zeng JM, *et al.* Cloning, expression, purification and functional characterization of the oligomerization domain of Bcr-Abl oncoprotein fused to the cytoplasmic transduction peptide. *Protein Expr Purif*, 2009, **64**: 167–178.
- [12] Kim DW, Kim SY, Lee SH, *et al.* Protein transduction of an antioxidant enzyme: subcellular localization of superoxide dismutase fusion protein in cells. *BMB Rep*, 2008, **41**: 170–175.