

多聚精氨酸融合增强型绿色荧光蛋白制备方法及其穿膜效果

张楠, 白银, 赵景壮, 叶贤龙, 王文飞, 任桂萍, 李德山, 荆燕

东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

张楠, 白银, 赵景壮, 等. 多聚精氨酸融合增强型绿色荧光蛋白制备方法及其穿膜效果. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1644-1653.

Zhang N, Bai Y, Zhao JZ, et al. Preparation and penetrating effect of polyarginine fusion enhanced green fluorescence protein. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1644-1653.

摘要: 为了方便细胞穿膜肽 R9 融合蛋白的可溶性表达及功能上的研究, 构建了 pSUMO (小分子泛素样修饰蛋白)-R9-EGFP (增强型绿色荧光蛋白) 原核表达载体。分别纯化 EGFP 及 R9-EGFP 蛋白后, 作用于 HepG2, 细胞经流式细胞仪及激光共聚焦检测 R9 细胞穿膜肽的作用效果。实验结果显示在 SUMO 分子伴侣的作用下, R9-EGFP 融合蛋白获得可溶性表达。经流式细胞仪检测, R9 细胞穿膜肽可以快速有效的携带目的蛋白进入细胞内部且呈时间、剂量依赖性, 大约 1.5 h 以后荧光强度进入平台期。共聚焦显微镜检测结果表明 R9 细胞穿膜肽可以有效携带 EGFP 进入 HepG2 细胞, 并显示主要聚集在细胞浆内。同时体外经肝素抑制实验显示, 肝素抑制 R9-EGFP 穿膜的效率达到 50%。这些结果表明, 可以利用 pSUMO-R9/Ni-NTA 表达纯化系统, 快速、有效地表达出可溶性多聚精氨酸融合蛋白, 同时 R9 细胞穿膜肽可以有效地携带目的蛋白进入细胞内, 为进一步研究多聚精氨酸的穿膜机制提供了基础。

关键词: 细胞穿膜肽, 多聚精氨酸, 融合蛋白, 可溶性表达

Received: January 28, 2013; **Accepted:** April 3, 2013

Supported by: Industrialization Project for Academic Institutions in Heilongjiang Province (No. 1252CGZH29), Harbin Municipal Science and Technology Innovation Fund (No. 2012RFXXS03).

Corresponding author: Deshan Li. Tel: +86-451-55190645; E-mail: Deshanli@163.com

黑龙江省高校科技成果产业化前期研发培育项目 (No. 1252CGZH29), 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金 (No. 2012RFXXS034) 资助。

网络出版时间: 2013-06-21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130621.1432.002.html>

Preparation and penetrating effect of the polyarginine-enhanced green fluorescence protein fusion protein

Nan Zhang, Yin Bai, Jingzhuang Zhao, Xianlong Ye, Wenfei Wang, Guiping Ren, Deshan Li, and Yan Jing

College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: The aim of the study is to establish a platform to deliver therapeutic proteins into target cells through a polyarginine-based cell penetrating peptide. To facilitate the expression of therapeutic proteins, a pSUMO (Small Ubiquitin-like Modifier)-R9-EGFP (enhanced green fluorescence protein) prokaryotic expression vector was constructed. After induction, the fusion protein SUMO-R9-EGFP was efficiently expressed. To validate the cell penetrating ability of the fusion protein, HepG2 cells were incubated with the purified R9-EGFP or EGFP protein as control, internalization of the fluorescent proteins was examined by either flow cytometry or confocal microscopy. The result obtained by flow cytometry showed that the R9-EGFP fusion protein could efficiently penetrate into the HepG2 cells in a dose and time-dependent manner. In contrast, the fluorescence was barely detected in the HepG2 cells incubated with EGFP control. The fluorescence intensity of the R9-EGFP treated cells reached plateau phase after 1.5 h. The result obtained by confocal microscopy shows that R9-EGFP efficiently entered into the HepG2 cells and was exclusively located in the cytoplasm, whereas, no fluorescence was detected in the cells incubated with the EGFP control. The heparin inhibition experiment showed that heparin could inhibit penetrating effect of the R9-EGFP protein by about 50%, suggesting that the penetrating ability of the fusion protein is heparin-dependent. In summary, the study has established a platform to deliver therapeutic proteins into target cells through a polyarginine-based penetrating peptide.

Keywords: cell penetrating peptides, polyarginine, fusion protein, soluble expression

随着人们对疾病的发生机理了解日益深入,一大批具有治疗价值的多肽类药物陆续被人们发现并进入市场,每年平均 16.8%多肽类药物进入临床研究^[1]。可是目前市场上没有一个多肽类药物作用于胞内蛋白,如此便限制了它们的治疗空间。根据 Lipinski 五规则^[2],蛋白多肽类药物没有良好的渗透性,不能自由进入细胞内部。目前所使用的多肽类药物均只能作用于胞外及细胞表面,如此便有大量的靶点未能开发及利用^[3],而且皮下和静脉给药的方式又给病人的身体带来了痛苦。

细胞穿膜肽又称蛋白转导域、特洛伊肽,具有携带比起自身大 100 倍的物质穿透细胞膜进入

细胞内部的能力。自 1988 年首次被人们发现以来^[4-5],细胞穿膜肽已经被应用于多方面的研究及应用。一小部分基于细胞穿膜肽研发的药物已经进入了临床试验,例如: AZX100 (Capstone Therapeutics), RT001 (ReVance Therapeutics), KAI-9803 (KAI Pharmaceuticals), XG-102 (Auris Medical)。

多聚精氨酸作为目前已知最为简单有效的细胞穿膜肽,其中以九聚精氨酸 (R9) 效率最高(大约为 TAT 的 20 倍)^[6-7],具有极大的研究及应用价值。为了便于纯化 R9 融合蛋白,我们在 pSUMO 载体基础上构建 pSUMO-R9-EGFP 原核蛋白表达载体。虽然 R9 具有很高的穿膜效率,

但精氨酸作为一种极性很强的氨基酸,大量精氨酸的存在极易使重组蛋白过表达时形成包涵体,从而增加纯化难度。SUMO 广泛存在于各种真核细胞中,参与调节细胞凋亡、信号转导、RNA 转录、蛋白的核质运输以及细胞周期等多种生理进程^[8],SUMO 作为一个分子伴侣可增加重组蛋白在大肠杆菌高效表达时的可溶性^[9],再经 SUMO 酶 1 酶切后可得高度提纯的目的蛋白,且不残留额外的氨基酸^[10]。为避免 R9 对 EGFP 的空间结构造成影响,两者经一个 15 氨基酸的 GS 柔性连接肽 (Gly₄Ser)₃ 相间隔。本研究的目的是利用 SUMO 表达和纯化系统,高效、可溶性表达 R9 融合蛋白 R9-EGFP,并检验该融合蛋白进入细胞的能力。

实验结果显示,细胞穿膜肽 R9 可快速有效地携带 EGFP 进入细胞内部,经流式细胞仪检测,胞内 EGFP 荧光强度呈时间、剂量依赖性,大约 1.5 h 以后荧光强度增加不显著。这些数据显示,我们可以利用 SUMO-R9 表达系统快速高效地表达 R9 融合蛋白,进行蛋白和细胞间的瞬时相互作用。同时为临床蛋白药物研发和改进提供了新的思路。

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
RF	AGGTAGAAGGCGTAGAAGAAGGAGAAGGAGAG	32
RR	CTAGCTCTCCTTCTCCTCTACGCCTTCT	28
LF	CTAGCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCG	45
LR	GATCCGCCGCCACCCGACCCACCCGAGCCACCCGAGCCACCCGAGCCACCCG	45
E1	GGATCCGTGAGCAAGGGCGAGG	22
E2	GCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTC	26
E3	AGGTCTCAAGGTGTGAGCAAGGGCGAGGA	29

1 材料与方法

1.1 材料

菌种大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α , Rosetta(DE3) 用于质粒扩增及蛋白表达。表达质粒 pSUMO 及 pEE6.4-EGFP 为本实验室保存, Ni-NTA 树脂购自 Qiagen 公司。引物由 Invitrogen 公司合成。

其中引物 RF 及 RR 变性复性后为 R9 序列两端预留 *Bsa* I 及 *Nhe* I 黏性末端;引物 LF 及 LR 变性复性后为(Gly₄Ser)₃ 序列两端预留 *Nhe* I 及 *Bam*H I 黏性末端;引物 E1、E2、E3 用于 EGFP 的克隆。

1.2 pSUMO-EGFP 及 pSUMO-R9-EGFP 的构建

以引物 E3、E2 克隆 EGFP 基因后,利用引物上的 *Bsa* I、*Not* I 酶切位点将片段制备出粘性末端。利用连接酶将基因插入相应的 SUMO 载体,获得的重组载体命名为 pSUMO-EGFP。

以引物 E1、E2 克隆 EGFP 基因后利用引物上的 *Bam*H I、*Not* I 酶切位点将片段制备出粘性末端。利用连接酶将基因插入相应的 SUMO 载

体,再经 *Bsa* I、*Bam*H I 酶切制备出粘性末端,插入 R9 及 GS linker 序列,重组载体经测序鉴定正确后,将重组载体命名为 pSUMO-R9-EGFP。

1.3 SUMO-EGFP 及 SUMO-R9-EGFP 的蛋白表达

将构建好的 pSUMO-EGFP 及 pSUMO-R9-EGFP 转化 Rosetta(DE3)。挑取单克隆于 LB 培养基(氨苄青霉素 100 mg/L),37 °C 培养过夜。将过夜培养物以 1:100 的比例接种至 0.5 L 上述抗性的 LB 培养基中,37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.4 时,加入 IPTG 使其终浓度达 0.25 mmol/L,30 °C 继续培养 4 h 后,离心收获菌体。

1.4 SUMO-EGFP 及 SUMO-R9-EGFP 可溶性的比较

收获的菌体以缓冲液 1 (50 mmol/L 磷酸三钠, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑) 重悬,超声破碎菌体后离心,分别取上清液和沉淀进行 15% SDS-PAGE 电泳分析。比较 SUMO-EGFP 融合蛋白和 SUMO-R9-EGFP 融合蛋白的可溶性表达。

1.5 SUMO-EGFP 及 SUMO-R9-EGFP 蛋白的提取

收获的菌体以缓冲液 1 重悬,进行超声破碎。4 °C、12 000×g 离心,留取细菌裂解上清,将裂解上清经 AKTA purifier 100 系统进行纯化。首先将裂解上清上样于已用缓冲液 1 预平衡过的 5 mL Ni-NTA 柱,上样速度 0.5 mL/min。上样完毕后,先用缓冲液 1 充分洗柱,后用缓冲液 2 (50 mmol/L 磷酸三钠, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 400 mmol/L 咪唑) 进行洗脱。洗脱后组份经 HiPrep 26/10 Desalting 脱盐至 PBS 中。

1.6 EGFP 及 R9-EGFP 蛋白的提取

将上述融合蛋白加入 SUMO 蛋白酶 1 (摩尔比 20:1) 后 4 °C 过夜酶切,酶切产物上样于 PBS 平衡过的 Ni-NTA 柱,流穿组分即为纯化后的 EGFP 及 R9-EGFP 蛋白。

1.7 R9-EGFP 穿膜活性的检测

将 EGFP 及 R9-EGFP 稀释至 50 μg/mL 添加至细胞密度为 1.5×10^6 /孔、培养于 6 孔板的 HepG2 细胞培养基中,分别在孵育 0.5、1、1.5、2 h 后胰酶消化、PBS 洗涤后重悬经 BD Aria 流式细胞仪检测 R9-EGFP 穿膜效率(激发波长 488 nm,检测波长 525 nm)。同时将 EGFP 及 R9-EGFP 稀释浓度梯度 5 μg/mL、10 μg/mL、15 μg/mL、20 μg/mL 添加至细胞密度为 1.5×10^6 /孔、培养于 6 孔板的 HepG2 细胞培养基中,孵育 1 h 后胰酶消化、PBS 洗涤后重悬进行流式检测 R9-EGFP 穿膜效率。

1.8 R9-EGFP 穿膜活性的激光共聚焦观测

将 R9-EGFP 稀释至 40 μg/mL 添加至细胞密度为 1×10^6 /孔、培养于 6 孔板的 HepG2 细胞爬片后培养基中,分别在孵育 1.5 h,5 μg/mL DAPI 孵育 10 min 后,PBS 洗涤后经激光共聚焦 (Leica TCSSP2AoBS) 观测。同时,以相同浓度 EGFP 处理的 HepG2 细胞作为对照。

1.9 肝素对 R9-EGFP 穿膜效率的抑制试验

将肝素稀释至 1 μg/mL、2 μg/mL、3 μg/mL、4 μg/mL 添加至细胞密度为 1.5×10^6 /孔、培养于 6 孔板的 HepG2 细胞培养基中,孵育 30 min 后,加入 40 μg/mL R9-EGFP 蛋白。同时只添加同样浓度的 EGFP、R9-EGFP 蛋白于另外两个培养孔中,作为对照。继续孵育 1.5 h 后,胰酶消化、

PBS 洗涤后重悬进行流式检测 R9-EGFP 穿膜效率。

2 结果

2.1 SUMO-EGFP 与 SUMO-R9-EGFP 的表达

SUMO-EGFP 蛋白表达情况见图 1, SUMO-R9-EGFP 蛋白表达情况见图 2。由图 1、图 2 可以看出两种蛋白都不同程度以可溶形式表达,但蛋白在上清中相对表达量 SUMO-R9-EGFP (30%) 相对 SUMO-EGFP (50%) 略有降低。

2.2 EGFP 及 R9-EGFP 的纯化

EGFP 和 R9-EGFP 蛋白纯化结果见图 3。SDS-PAGE 电泳结果显示经 SUMO 酶 1 酶切后再次经 Ni-NTA 柱层析, 均可得到高度纯化的 EGFP 及 R9-EGFP 蛋白。电泳结果显示 R9-EGFP (29 kDa) 蛋白分子量略大于 EGFP (27 kDa) 蛋白。灰度扫描分析两种蛋白纯度均 95% 以上。

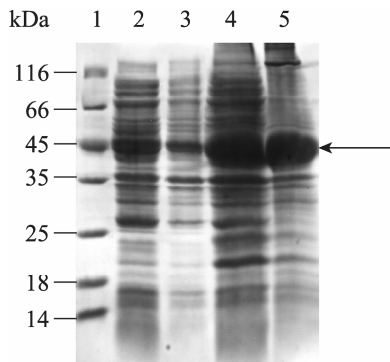


图 1 SUMO-EGFP 蛋白表达电泳分析

Fig. 1 Expression analysis of the SUMO-EGFP fusion protein. 1: protein molecular weight marker; 2: supernatant of SUMO-EGFP cell lysates before induced; 3: precipitate of SUMO-EGFP cell lysates before induced; 4: supernatant of SUMO-EGFP cell lysates after induced; 5: precipitate of SUMO-EGFP cell lysates after induced.

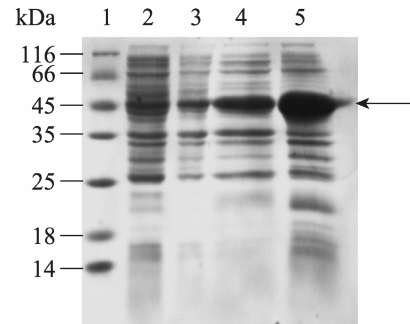


图 2 SUMO-R9-EGFP 蛋白表达电泳分析

Fig. 2 Expression analysis of the SUMO-R9-EGFP fusion protein. 1: protein molecular weight marker; 2: supernatant of SUMO-R9-EGFP cell lysates before induced; 3: precipitate of SUMO-R9-EGFP cell lysates before induced; 4: supernatant of SUMO-R9-EGFP cell lysates after induced; 5: precipitate of SUMO-R9-EGFP cell lysates after induced.

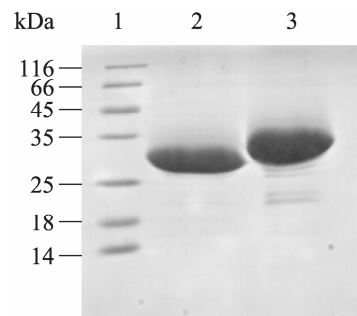


图 3 纯化后 EGFP 及 R9-EGFP 蛋白电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the mature EGFP and R9-EGFP peptides. 1: protein molecular weight marker; 2: purified mature EGFP protein; 3: purified mature R9-EGFP protein.

2.3 R9-EGFP 穿膜能力的检测

流式检测结果显示只有 R9-EGFP 蛋白可以检测到荧光信号, 单独 EGFP 无信号。R9-EGFP 信号强度呈现出时间 (图 4) 及剂量 (图 5) 依赖性。大约 1.5 h 后信号强度达到平台期, 与未处理及 EGFP 处理相比大约 50% 的细胞表现出强荧光信号。只添加 EGFP 蛋白的细胞未检测到荧

光信号。随蛋白浓度增加 R9-EGFP 处理细胞荧光信号强度呈递增趋势 (由 9.6% 递增至 48%),

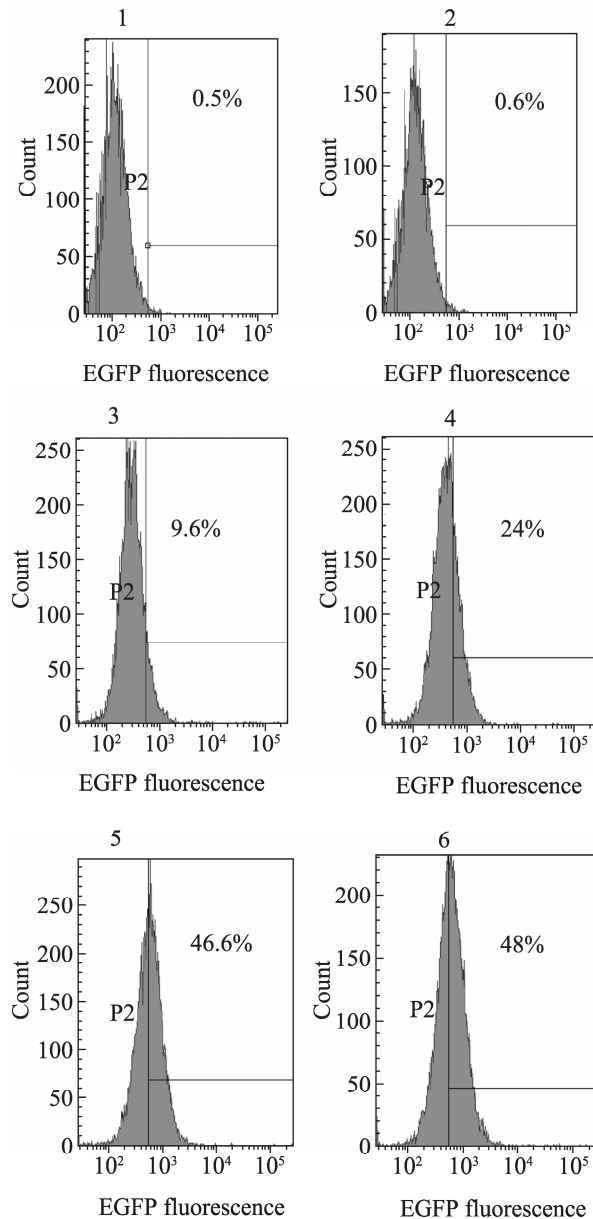


图 4 R9-EGFP 时间梯度流式检测结果

Fig. 4 Incubation of HepG2 cells with time gradients of R9-EGFP. 1: HepG2 cells without protein; 2: HepG2 incubated with EGFP 2 h; 3: HepG2 incubated with R9-EGFP 0.5 h; 4: HepG2 incubated with R9-EGFP 1 h; 5: HepG2 incubated with R9-EGFP 1.5 h; 6: HepG2 incubated with R9-EGFP 2 h.

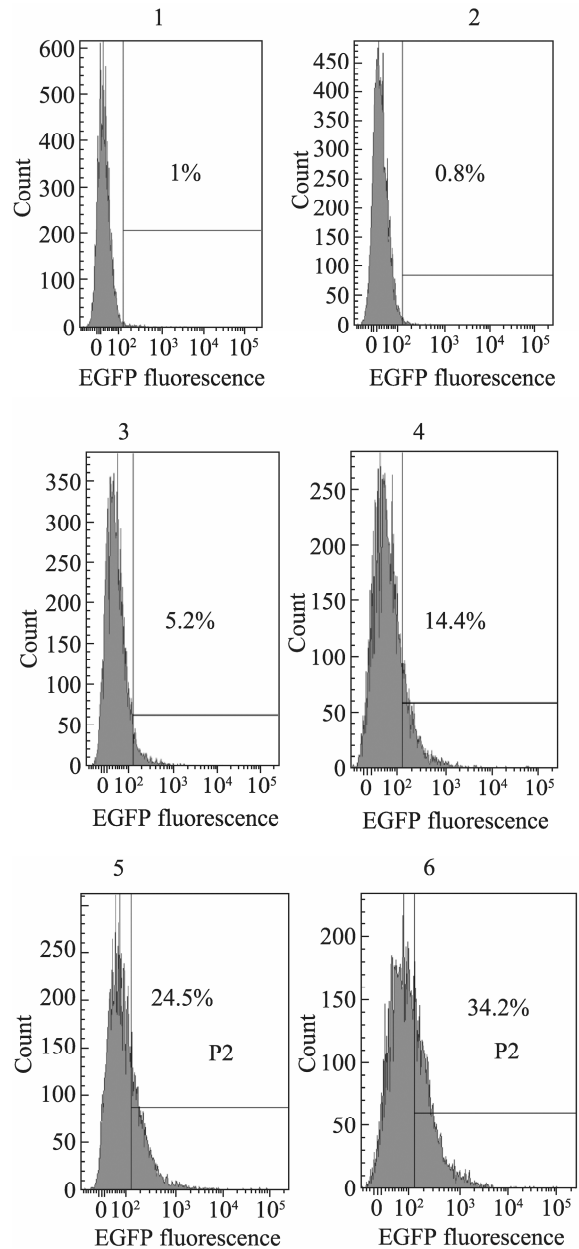


图 5 R9-EGFP 剂量梯度流式检测结果

Fig. 5 Incubation of HepG2 cells with dosage gradients of R9-EGFP. 1: HepG2 cells without protein; 2: HepG2 incubated with 20 μg/mL EGFP 1 h; 3: HepG2 incubated with 5 μg/mL R9-EGFP 1 h; 4: HepG2 incubated with 10 μg/mL R9-EGFP 1 h; 5: HepG2 incubated with 15 μg/mL R9-EGFP 1 h; 6: HepG2 incubated with 20 μg/mL R9-EGFP 1 h.

而 EGFP 处理细胞与空细胞相比荧光信号未有变化。

2.4 R9-EGFP 穿膜活性的激光共聚焦观测

激光共聚焦结果 (图 6) 显示, 单独 EGFP 没有进入细胞内部的能力, 而 R9-EGFP (绿色) 可以进入细胞内部, 聚集于细胞质内, 没有继续进入细胞核 (蓝色区域) 中。

2.5 肝素对 R9-EGFP 穿膜活性的抑制结果

肝素抑制结果 (图 7) 显示, 肝素对 R9-EGFP 的穿膜效果有明显抑制作用, 在 $2 \mu\text{g/mL}$ 的浓度下可抑制 50% 左右的穿膜效率, 随着肝素浓度的增加抑制效果没有明显增加。由此可以推断出 R9 的穿膜机制一定程度上依赖于与细胞表面的肝素结合, 但并不完全依赖肝素一条途径。

3 讨论

目前将多肽类药物、DNA 等导入细胞内普

遍采用的手段有: 物理方法, 如电穿孔^[11]、显微注射^[12]等; 生物及化学方法, 如洋地黄皂苷处理法^[13]、成孔蛋白质法^[14]等; 其他方法, 如运用免疫毒素^[15]等蛋白质载体、颗粒 (如脂质体) 包裹法^[16]和病毒载体^[17]等。但由于上述方法存在分子导入率低、易造成细胞损伤甚至死亡, 以及细胞内部无相应靶向性等诸多不足, 使得许多无生物膜通透性且易降解的亲水性多肽、蛋白质及寡核苷酸在药学领域的应用大大受限。相比之下, 细胞穿膜肽在这方面显然具有很大优势: 细胞膜亲和性高, 穿膜速度快, 最重要的是对细胞膜没有破坏性。将它们作为生物活性分子的细胞内转运工具, 应用于细胞生物学、基因治疗、药物体内转运、临床药效评价等领域, 具有诱人的前景。同时研究发现细胞穿膜肽可增加多肽类药物的口服^[18]、肺部^[19]、肠道^[20]给药的吸收及生物利用度, 基于细胞穿膜肽所开发的多肽药物及给药方式国内外均有所研究。未来的几十年里对于多

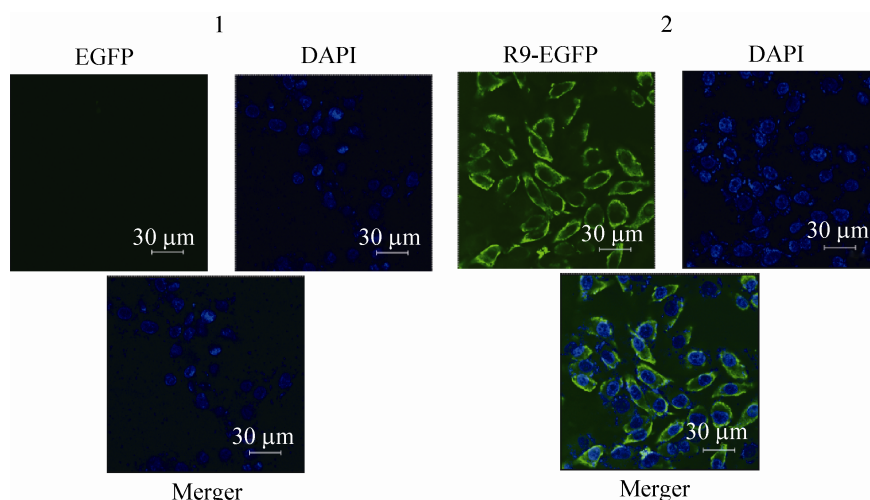


图 6 R9-EGFP 激光共聚焦检测结果

Fig. 6 Confocal fluorescence microscopy of HepG2 cells incubated with R9-EGFP. 1: HepG2 incubated with $50 \mu\text{g/mL}$ EGFP 1.5 h; 2: HepG2 incubated with $50 \mu\text{g/mL}$ R9-EGFP 1.5 h.

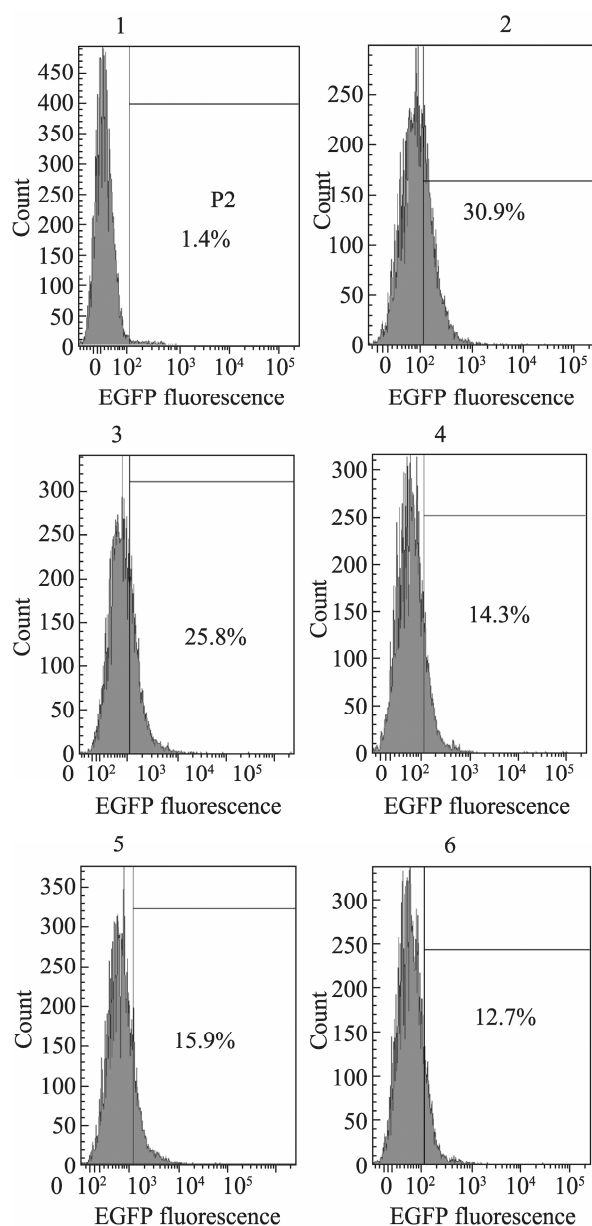


图7 肝素对R9-EGFP活性抑制实验检测结果

Fig. 7 Competitive inhibition of HepG2 uptaking R9-EGFP by heparin. 1: HepG2 incubated with 40 μg/mL EGFP 1.5 h; 2: HepG2 incubated with 40 μg/mL R9-EGFP 1.5 h; 3: HepG2 incubated with 1 μg/mL heparin 30 min and 40 μg/mL R9-EGFP 1.5 h; 4: HepG2 incubated with 2 μg/mL heparin 30 min and 40 μg/mL R9-EGFP 1.5 h; 5: HepG2 incubated with 3 μg/mL heparin 30 min and 40 μg/mL R9-EGFP 1.5 h; 6: HepG2 incubated with 4 μg/mL heparin 30 min and 40 μg/mL R9-EGFP 1.5 h.

肽类药物稳定性及体内转运方面的研究将是整个生物医药领域的发展趋势,而细胞穿膜肽必将是其中研究热点之一。

但典型的细胞穿膜肽富含赖氨酸、精氨酸等极性氨基酸。当蛋白在大肠杆菌中高效表达时大量赖氨酸、精氨酸的存在不利于目的蛋白保持可溶形式。本研究在 pSUMO 载体的基础上添加了 R9, 为防 R9 对 EGFP 蛋白造成影响两者经一个 15 个氨基酸的 GS 柔性连接肽相间隔。我们的结果显示,相对于单独 EGFP,虽然 R9 对 EGFP 的可溶性表达有一定的影响,但在 SUMO 分子伴侣的作用下仍有 30%~40% 融合蛋白呈现可溶状态。我们在对细胞穿膜肽融合 p53 及 CD 基因表达时均得到相同的结论,且最终均未对蛋白活性造成明显影响,为其他 R9 融合蛋白的表达及纯化提供了依据。

经 SUMO 酶 1 酶切及 Ni-NTA 柱层析后可得到高度提纯、有活性、无残留额外氨基酸的目的蛋白。体外细胞实验显示单独的 EGFP 不能进入细胞内部,而 R9 可快速有效地携带 EGFP 进入细胞内部,穿膜效率呈现浓度和时间依赖性,大约 1.5 h 后荧光信号达到最高。同时 HepG2 细胞 MTT 检测发现无论 EGFP 还是 R9-EGFP 均没有对细胞生长造成明显抑制(数据未显示)。

目前关于穿膜肽的确切穿膜机制仍不明确。研究结果显示富含精氨酸类的穿膜肽跨膜运输需与细胞表面的肝素等多糖结合才能发挥作用^[21],但不同实验室得出的结论并不一致^[22-23]。我们实验结果显示,多聚精氨酸的跨膜运输的确与肝素的结合有关^[24],但并不完全依赖肝素一条途径。同时将蛋白 4 °C 过夜孵育显示 R9-EGFP 没有穿膜效果(结果略),这也说明多聚精氨酸的跨膜运

输是一个耗能过程而不是简单的直接跨膜转运。

以往多聚精氨酸融合蛋白制备方法为包涵体变性复性或者体外合成多肽后经二硫键共价偶联。前者蛋白制备时间长,且存在复性率低、蛋白浓度低且末端残留 His 标签(已有文献报道显示 His 标签可将蛋白聚集于肝脏,具有潜在的肝细胞毒副作用^[25])等原因。而后者费用昂贵,不宜工业化生产蛋白。

经 pSUMO-R9/Ni-NTA 系统可快速高效地得到 R9 融合蛋白,简化纯化步骤,方便对蛋白活性及功能的研究。总之,本研究结果证实了应用 pSUMO-R9/Ni-NTA 系统表达 R9 融合蛋白的可行性,为多肽类药物的研发提供了捷径和新的思路。

但是绝大多数细胞穿膜肽自身没有细胞特异性,如此便会造成应用时的靶向性不足以及药品的浪费。因此未来开发具有组织器官靶向性、可胞内定位的细胞穿膜肽类药物并配合合适的剂型将是细胞穿膜肽研究的方向之一。

REFERENCES

- [1] Development Trends for Peptide Therapeutics [EB/OL]. [2011-12-26]. http://www.peptidetherapeutics.org/PTF_Summary.
- [2] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23(1-3): 3-25.
- [3] Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(9): 727-730.
- [4] Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat transactivator protein. *Cell*, 1988, 55(6): 1179-1188.
- [5] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988, 55(6): 1189-1193.
- [6] Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, et al. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(24): 13003-13008.
- [7] Wouter PR, Petra HB, Parvesh W, et al. Preferential uptake of L-versus D-amino acid cell-penetrating peptides in a cell type-dependent manner. *Chem Biol*, 2011, 18(8): 1000-1010.
- [8] Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y, et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci*, 2006, 15(1): 182-189.
- [9] Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif*, 2005, 43(1): 1-9.
- [10] Malakhov MP, Mattern MR, Malakhov OA, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Struct Funct Gen*, 2004, 5(1/2): 75-86.
- [11] Deora AA, Diaz F, Schreiner R. Efficient electroporation of DNA and protein into confluent and differentiated epithelial cells in culture. *Traffic*, 2007, 8(10): 1304-1312.
- [12] Lappe S, Maas C, Kneussel M. Microinjection into cultured hippocampal neurons: a straightforward approach for controlled cellular delivery of nucleic acids, peptides and antibodies. *J Neurosci Methods*, 2008, 175(1): 88-95.
- [13] Lindnér PG, Heath D, Howell SB, et al. Digitonin enhances the efficacy of carboplatin in liver tumour after intra-arterial administration. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1997, 40(50): 444-448.
- [14] Parker MW, Feil SC. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol*, 2005, 88(1): 91-142.
- [15] Zheng L, Tao Y, Ping Z, et al. Immunotoxins and cancer therapy. *Cell Mol Immunol*, 2005, 2(2): 106-112.
- [16] Zelphati O, Wang Y, Kitada S, et al. Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 35103-35110.
- [17] Boeckle S, Wagner E. Optimizing targeted gene

- delivery: chemical modification of viral vectors and synthesis of artificial virus vector systems. *AAPS J*, 2006, 8(4): E731–E742.
- [18] El-Sayed K, Mariko M. Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(6): 531–539.
- [19] Leena NP, Jeffrey W, Kwang J, et al. Conjugation with cationic cell-penetrating peptide increases pulmonary absorption of insulin. *Mol Pharm*, 2009, 6(2): 492–503.
- [20] Morishita M, Kamei N, Ehara J, et al. A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin. *J Control Release*, 2007, 118(2): 177–184.
- [21] Schmidt N, Mishra A, Lai GH et al. Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett*, 2010, 584(9): 1806–1813.
- [22] Richard JP, Melikov K, Brooks P, et al. Cellular uptake of un-conjugated, TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparin sulfate receptors. *J Biologic Chem*, 2005, 280(15): 15300–15306.
- [23] Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, 2004, 10(3): 310–315.
- [24] Fuchs SM, Raines RT. Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry*, 2004, 43(9): 2438–2444.
- [25] Özören N, Kim K, Burns TF, et al. The Caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor Necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6259–6265.

(本文责编 陈宏宇)



中华猕猴桃基因组测序完成

10月18日,中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)“红阳”的基因组测序研究文章在国际权威杂志《自然—通讯》(*Nature Communications*)在线发表。该项研究对广泛栽培的中华猕猴桃品种“红阳”的基因组进行分析,发现猕猴桃进化过程中3次基因组倍增历史事件,揭示猕猴桃富含维生素C、类胡萝卜素、花青素等营养成分的基因组学机制,为猕猴桃品质改良和遗传育种奠定了重要基础。

中华猕猴桃基因组计划由猕猴桃基因组国际合作组织(International Kiwifruit Genome Consortium, IKGC)历时3年完成。该国际组织由合肥工业大学刘永胜教授和美国康奈尔大学汤姆逊植物研究所科学家费章君博士共同领导,参与单位还包括四川大学、四川省自然资源研究院、湖北省农科院、中国科学院广西植物研究所、香港中文大学、复旦大学、西南大学、美国爱达荷大学、美国农业部等国内外高校和科研机构。

猕猴桃,又称“奇异果”,被誉为“水果之王”和“维C之王”。它含有亮氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、丙氨酸等10多种氨基酸,以及丰富的矿物质,包括丰富的钙、磷、铁,还含有胡萝卜素和多种维生素,对保持人体健康具有重要的作用。猕猴桃起源于中国,大约100年前在新西兰开始驯化和栽培。目前已在中國、新西兰、意大利、智利等10多个国家大规模种植,成为风靡全球的营养最为丰富的高端水果之一。

(摘自:科学网;日期:2013-10-22)