

插入甘氨酸对 HIV Tat-胸苷激酶融合蛋白生物学活性的影响

阚全程^{1*}, 赵杰¹, 余祖江², 江河清², 李晓菲¹

(1. 郑州大学第一附属医院药剂科, 郑州 450052; 2. 感染科)

[摘要] **目的:**探讨插入甘氨酸(Gly)对 HIV Tat-TK 融合蛋白功能的影响。**方法:**利用基因重叠(gene splicing by overlap extension, gene SOEing)PCR 技术,将不同长度的甘氨酸密码子(0、2、4、6 个)插入 HIV Tat-TK 融合基因,经转染、鉴定证实后诱导表达,并经偶联 Tat 单克隆抗体的 Sepharose CL-4B 亲和层析柱纯化。4 种 HIV Tat-(Gly)_n-TK 系列融合蛋白(*n*=0、2、4、6)、HIV Tat 蛋白、TK 蛋白(1 μg/ml)分别与 HepG2 细胞在普通培养基共培养 24 h 后,间接免疫荧光检测各自透过细胞膜效率;在加入更昔洛韦的培养基培养 3 d 后,锥虫蓝染色计算细胞死亡率,流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果:**精确克隆出 HIV Tat-(Gly)_n-TK 系列融合基因,成功表达 HIV Tat-(Gly)_n-TK 系列融合蛋白以及 HIV Tat 和 TK 蛋白。HIV Tat-(Gly)_n-TK 系列融合蛋白与 HIV Tat 蛋白透过细胞膜的效率相似,但单独 TK 蛋白无法进入细胞;在含有更昔洛韦的培养基中 HIV Tat-(Gly)₄-TK 融合蛋白致 HepG2 细胞凋亡率最高(14.77%),其余依次为 HIV Tat-(Gly)₂-TK 融合蛋白(12.69%)、HIV Tat-TK(8.31%)、HIV Tat-(Gly)₆-TK(4.36%)和 HIV Tat 组(1.03%),组间均有显著性差异(*P*<0.05);细胞死亡率也发现类似的结果(分别为 80.2%、65.4%、58.4%、56.7%、9.1%,组间有显著差异,*P*<0.05)。**结论:**插入 2、4、6 个甘氨酸对 HIV Tat-TK 融合蛋白上游 Tat 蛋白的细胞融合穿透功能不产生影响,而对融合蛋白下游 TK 蛋白介导的更昔洛韦的细胞毒作用干扰较大,其中插入 4 个甘氨酸对 TK 蛋白介导的更昔洛韦的细胞毒作用影响最小。

[关键词] 甘氨酸;胸苷激酶;Tat;重组融合蛋白质类;细胞内化作用

[中图分类号] Q 784 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0244-05

Influence of inserting glycines on biological properties of HIV Tat-(Gly)_n- thymidine kinase fusion proteins

KAN Quan-cheng^{1*}, ZHAO Jie¹, YU Zu-jiang², JIANG He-qing², LI Xiao-fei¹ (1. Department of Pharmacology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Infectious Diseases)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of inserting glycines(Gly) on biological properties of HIV Tat-(Gly)_n-thymidine kinase (-TK) fusion proteins. **Methods:** Different fragments containing 0, 2, 4 or 6 Gly were inserted between the HIV Tat gene and TK using gene splicing by overlap extension (SOEing) PCR, and the products were cloned into PBK vector. The vectors were then transferred into *E. coli* after sequencing. After IPTG induction, bacilli were collected and destructed by ultrasound; the fusion protein was collected and identified by monoclonal antibody of HIV protein. HepG2 cells were incubated with DMEM supplemented with 1 μg/ml fusion protein containing 0, 2, 4 or 6 Gly for 24 h. HepG2 cells of different groups were detected by immunofluorescence assay with HIV Tat monoclonal antibody; the apoptosis rate of HepG2 cells was determined by cell flow cytometry after they were incubated with gencilovir (10 μg/ml) for 3 d and the survival rate of cells was recorded by trypan blue in different groups. **Results:** The recombinant genes containing 0, 2, 4 or 6 Gly were successfully constructed, inserted into PBK vectors, and expressed into *E. coli*. Their proteins were obtained and purified. The level of fluorescence in different groups was similar, but the cell survival rate and apoptosis rate were different. The highest apoptosis rate was 14.77%, which was found in the group containing 4 Gly, followed by 12.69% in 2 Gly group, 8.31% in HIV Tat-TK group, 4.36% in 6 Gly group, and 1.0% in group containing no Gly. Significant differences were found between each 2 groups (*P*<0.05). Trypan blue showed similar results in the cell death rate of different groups; the highest cell death rate was 80.2%, which was found in the group containing 4 Gly, followed by 65.4% in 2 Gly group, 58.4% in HIV Tat-TK group, 56.7% in 6 Gly group, and 9.1% in the group containing no Gly. **Conclusion:** The number of Gly inserted into HIV Tat-TK protein does not alter the transcellular function of upstream Tat protein, but does substantially influence the TK protein-mediated cytotoxic effects of gencilovir, and the influence is the smallest when 4 Gly are inserted.

[KEY WORDS] glycine; thymidine kinase; Tat; recombinant fusion proteins; cellular uptake

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3):244-248]

人类免疫缺陷病毒-1型的 Tat 蛋白对 HIV 基因表达具有有力的反式调控作用,在 HIV 的长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)启动子区, Tat 蛋

[基金项目] 国家自然科学基金(30472031). Supported by National Natural Science Foundation of China(30472031).

[作者简介] 阚全程,博士,教授、主任药师,博士生导师。

* Corresponding author. E-mail: johnnyu@zzu.edu.cn

白可以结合 RNA 顺式作用元件,促进病毒蛋白的表达^[1]。近年发现 HIV Tat 的残基序列可以介导大分子蛋白质由细胞外进入细胞内即细胞内化作用,这种特性同时也在其他蛋白分子中被发现^[2,3]。

为了进一步利用 HIV Tat 蛋白的内化作用,同时保护下游目的基因蛋白生物活性,本研究利用基因重组技术,根据胸苷激酶基因在体外细胞内催化更昔洛韦改变为细胞毒性 6-甲氧嘌呤阿糖苷腺苷三磷酸(araMTP),导致培养细胞大量死亡^[4]这一原理,以胸苷激酶基因代替常用绿色荧光蛋白(GFP)作为报告基因,在 HIV Tat-TK 融合蛋白之间插入不同数目的甘氨酸,即 HIV Tat-(Gly)_n-TK($n=0, 2, 4, 6$,下同),探讨插入何种长度的甘氨酸能更有效的保护 HIV Tat 与胸苷激酶基因的生物学活性,为进一步开发和利用 HIV Tat 蛋白的细胞内化作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 载体 pcDNA3、T₄ DNA 连接酶和凝胶回收试剂盒,均购置德国 Qiagen 公司; *Puf* 酶,加拿大 Bio-star 公司; *EcoR* I、*Bam*H I, 洛阳华美生物工程公司。pcDNA3-Tat(1~200 nt)、pcDNA3-TK 基因质粒(由郑州大学第一附属医院河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室构建),羊抗鼠免疫荧光抗体购自 Gibco BRL 公司。基因工程大肠杆菌 DH5 α 、PBK 载体和 HepG2 细胞均系华中科技大学同济医学院临床免疫室杨东亮教授友好提供。Sephadex G-100 和 Sepharose CL-4B 购自 Pharmacia 公司。HIV-Tat 鼠单克隆抗体由美国西北大学医学院纪念医院韩志强博士提供。

1.2 引物

1.2.1 共同引物 本实验构建的是 HIV Tat-(Gly)_n-TK 系列融合蛋白,改变的是连接在二者间的甘氨酸数目($n=0, 2, 4, 6$),因此相应基因 mRNA 的 PCR 引物两段相同。具体表示如下,HIV Tat 上游引物(P1):5'-GTG AAT TC A TGG AGC CAG TAG ATC CTA-3',引物中含有 *EcoR* I 酶切位点(下划线所示);TK 基因的下游引物(P2):5'-CA G GAT CC A GTT AGC CTC CCC CAT CTC-3',引物中含有 *Bam*H I 酶切位点(下划线所示)。

1.2.2 Tat-(Gly)_n-TK 系列融合蛋白 mRNA PCR 引物 HIV Tat 基因下游引物和 TK 基因上游引物

之间存在互补序列(下文下划线所示),具体序列如下:HIV Tat-(Gly)₂-TK:HIV Tat 下游引物(P3)5'-ATC GAA GCA TAC CTC CCT TTT CCT TCG GGC CAG-3',TK 基因的上游引物(P4)5'-GGAGGT ATG CTT CGA T CC CCT GCC ATC-3(斜体为甘氨酸密码子)。HIV Tat-(Gly)₄-TK:HIV Tat 下游引物(P5)5'-GCA TAC CTC CAC CTC CC T TTT CCT TCG GGC CAG-3',TK 基因的上游引物(P6)5'-GGA GGT GGA GGT ATG C TT CGT ACC CCT GCC-3'。HIV Tat-(Gly)₆-TK:HIV Tat 下游引物(P7)5'-ACC TCC ACC TCC ACC TCC CTT TTC CTT CGG GC-3',TK 基因的上游引物(P8):5'-GGA GGT GGA GGT GGA GGT ATG CTT CGT AC-3'。

1.3 目的基因的克隆、转染及酶切鉴定

1.3.1 HIV Tat-TK、HIV Tat-(Gly)₂-TK 基因的克隆 常规提取 HIV pcDNA3-Tat 和 pcDNA3-TK 质粒,利用 P1、P3 引物,P4、P2 引物分别扩增 Tat 和 TK 基因,按下列程序进行第 1 次 PCR 扩增:主循环 92 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物利用 Qiagen 提纯试剂盒分别提纯,获得 HIV Tat-TK PCR 连接产物备用。按照 Horton 等^[5]方法进行 SOEing PCR,*Puf* 保守扩增。将 Tat 基因和 TK 基因扩增产物按一定的比例混合后,以 P1 和 P2 为 1 对引物进行第 2 次 PCR 扩增,反应按下列程序进行:主循环 92 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 60 s PCR 扩增 30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min,获得目的基因产物,提纯后备用,并作为下一步 PCR 扩增反应的模板和克隆。

1.3.2 HIV Tat-(Gly)₄-TK 基因的克隆 以 HIV Tat-(Gly)₂-TK 基因为模板,分别利用 P1 和 P5、P6 和 P2 作为 2 对引物进行第 1 次 PCR 扩增(反应程序同前),扩增产物按一定比例混合后,以 P1 和 P2 为 1 对引物进行第 2 次 PCR 扩增(反应程序同前),提纯后备用,并作为下一步 PCR 扩增反应的模板和克隆。

1.3.3 HIV Tat-(Gly)₆-TK 基因的克隆 以 HIV Tat-(Gly)₄-TK 基因为模板,分别利用 P1 和 P7、P8 和 P2 作为 2 对引物进行第 1 次 PCR 扩增(反应程序同前),扩增产物按一定比例混合后,以 P1 和 P2 为 1 对引物进行第 2 次 PCR 扩增(反应程序同前),提纯后备用。

1.3.4 目的基因的转染及酶切鉴定 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切上述 4 种连接产物和 PBK 载体,提纯, T_4 DNA 连接酶连接。连接产物按常规方法转化感受态细胞 DH5 α 后,筛选,常规培养转化后的菌株,以 P1 和 P2 为 1 对引物进行 PCR 和 *Bam*H I、*EcoR* I 双酶切鉴定,鉴定后送大连 TaKaRa(宝信)生物工程有限公司测序证实。

1.4 Tat-(Gly) $_n$ -TK 系列融合蛋白的诱导表达及纯化 将阳性克隆菌接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养,当菌液光密度值(D_{600})达到 0.4~0.6 时,立即加入 IPTG(终浓度为 0.4 mmol/L)诱导表达,6 h 后收集细菌,在冰浴中以间歇法超声破碎菌体,收集包涵体沉淀。用含 4 mol/L 尿素的洗液洗涤包涵体后将包涵体溶于含 8 mol/L 尿素的裂解液中蛋白变性,通过 Sephadex G-100 凝胶层析获得粗制重组蛋白,将其置于 pH 8.0 复性液(含 10 mmol/L PBS,5 mmol/L 还原型谷胱甘肽,2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽)中 16 $^{\circ}$ C 过夜,透析后通过 Tat 单克隆抗体偶联后的 Sepharose CL-4B 亲和层析柱获得纯化^[6],纯化后常规作 SDS-PAGE,测定蛋白纯度。

1.5 Tat-(Gly) $_n$ -TK 系列融合蛋白活性测定

1.5.1 细胞培养、转化 常规培养细胞,转染前 1 d 将 HepG2 细胞接种到 8 孔槽中,按转化蛋白不同将细胞分为 6 组[HIV Tat-(Gly) $_n$ -TK 系列融合蛋白($n=0,2,4,6$)+HIV Tat 蛋白+TK 蛋白],细胞密度为 $(1\sim2)\times 10^4/cm^2$,加入含 10% FCS 的 DMEM 培养基,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下培养,24 h 后应用含有 10% FCS、1 μ g/ml 各组融合蛋白和 100 μ mol/L 的氯喹孵育,24 h 后移去培养基,PBS 洗涤后再用含 10% FCS 的 DMEM 培养,24 h 后进行免疫荧光测定。或加入含 10 μ g/ml 更昔洛韦完全 DMEM 培养基,孵化 36 h,培养 3 d 后室温下流式细胞仪检测和锥虫蓝染色。

1.5.2 间接免疫荧光检测 PBS 洗涤转化的 HepG2 细胞 2 次后,用 4 $^{\circ}$ C 的等体积甲醇、丙酮混合液低温固定 15 min。HIV Tat 单克隆抗体作为间接免疫荧光检测一抗,牛血清白蛋白封闭,荧光标记的羊抗鼠抗体为二抗,0.1% 的伊文斯蓝衬染,荧光显微镜下检测,有绿色荧光者为阳性表达。根据细胞内荧光表达的强度,判断 HIV Tat 内化进入细胞内量的多少。

1.5.3 锥虫蓝染色和显微镜观察 含更昔洛韦(10 μ g/ml)的 DMEM 培养 3 d,转化的 HepG2 细胞收集后,0.1% 的锥虫蓝染色 5 min,光学显微镜下直接计数,比较 HIV Tat-(Gly) $_n$ -TK 系列融合蛋白转化后第 3 天各自 HepG2 细胞的生存率。

1.5.4 流式细胞仪检测 收集培养孔内所有细胞,贴壁细胞(加 0.25% 的胰酶,0.02% 的 EDTA)消化后,PBS 洗涤后 70% 的 4 $^{\circ}$ C 乙醇固定;1 500 r/min 离心后 PBS 洗涤;加 10% 50 μ l RNA 酶,PBS 洗涤后重悬细胞,加 50 μ l PI(碘化丙啶,250 μ g/ml),避光 15~20 min,上机(FAScan)检测 Tat 融合蛋白转化后第 3 天各组 HepG2 细胞的凋亡率。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 10.00 软件,组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 目的基因的连接及克隆结果 将 HIV Tat-(Gly) $_n$ -TK 按要求不同,通过不同的引物进行第 1 次和第 2 次 PCR 扩增,获得插入片段大小不同的甘氨酸的 HIV Tat-(Gly) $_n$ -TK 融合基因,大小为 1 200 bp,与预期大小一致(图 1)。

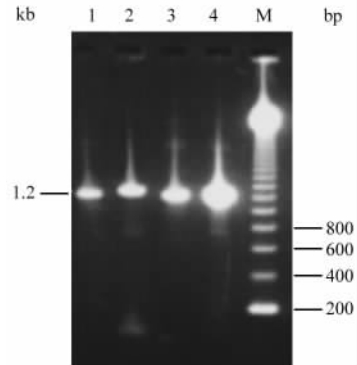


图 1 3 种不同重组基因的电泳图

Fig 1 Electrophoresis results of 3 fragments containing 2,4 and 6 Gly

M:Marker; 1: HIV Tat-TK; 2: HIV Tat-(Gly) $_2$ -TK; 3: HIV Tat-(Gly) $_4$ -TK; 4: HIV Tat-(Gly) $_6$ -TK

2.2 融合蛋白纯化后 SDS-PAGE 结果 HIV Tat-(Gly) $_n$ -TK 融合基因通过大肠杆菌表达后,Tat 单克隆抗体偶联后的 Sepharose CL-4B 亲和层析柱获得纯化,纯化后常规作 SDS-PAGE,相对分子质量都在 53 000 左右,与预期结果一致(图 2)。

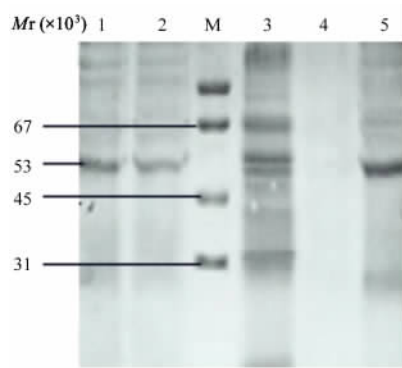


图2 融合蛋白纯化后 SDS-PAGE

Fig 2 SDS-PAGE of recombinant protein after purification

M: Marker; 1: HIV Tat-(Gly)₂-TK; 2: HIV Tat-(Gly)₄-TK; 3: Mixed proteins after cells were broken; 4: HIV Tat; 5: HIV Tat-(Gly)₆-TK

2.3 间接免疫荧光检测结果 HIV Tat-(Gly)_n-TK 系列融合蛋白与 HepG2 细胞混合培养 3 d 后, PBS 洗涤转化的 HepG2 细胞 2 次后, 间接免疫荧光检测显示, 除单独 TK 组外, 另 5 组细胞中均可见绿色荧光物质表达, 荧光表达强度基本相同, 表明 5 组细胞中重组蛋白穿透透过细胞膜效率相似, 而单独 TK 组未见荧光物质表达。

2.4 锥虫蓝染色计数比较 结果表明 HIV Tat 组细胞死亡率为 9.1%, HIV Tat-TK、HIV Tat-(Gly)₂-TK、HIV Tat-(Gly)₄-TK 和 HIV Tat-(Gly)₆-TK 分别是 58.4%、65.4%、80.2% 和 56.7%, 组间均有显著差异 ($P < 0.05$)。见图 3。

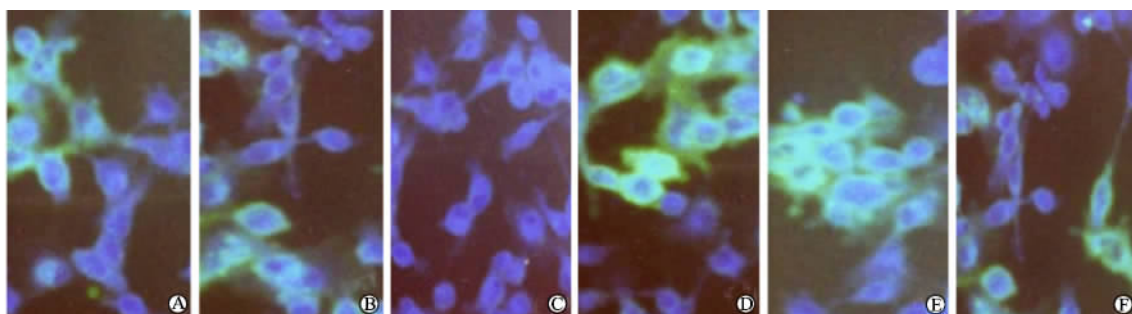


图3 6组细胞免疫荧光检测

Fig 3 Results of immunofluorescence assay of 6 groups

A: HIV Tat; B: HIV Tat-(Gly)₂-TK; C: PBK-TK; D: HIV Tat-(Gly)₄-TK; E: HIV Tat-(Gly)₆-TK; F: HIV Tat-TK

2.5 流式细胞仪检测结果 经过含有更昔洛韦的培养基培养 3 d 后检测, HIV Tat 组细胞凋亡率为 1.03%, 而 HIV Tat-(Gly)₄-TK 组细胞凋亡率为 14.77%, 在各组中处于最高水平, 其次分别为 HIV Tat-(Gly)₂-TK 组 (12.69%), HIV Tat-TK 组 (8.31%) 和 HIV Tat-(Gly)₆-TK 组 (4.36%), 组间比较均有显著差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

研究发现, 许多蛋白拥有从外周环境穿透细胞膜活性(也称细胞内化作用), 如单纯疱疹病毒 VP22 蛋白^[7], 人类免疫缺陷病毒 Tat 蛋白。早在 1988 年 Frankel 等^[2]第 1 次发现 HIV Tat 蛋白可以穿透细胞膜。后来的研究^[8,9]发现 HIV Tat 蛋白的 11 个氨基酸序列 (protein transduction domain, PTD, 蛋白转导区), 即 YGRKKRRQRRR, 对这种穿透活性起着重要作用。充分利用 HIV Tat 蛋白的这种细胞内化功能必须依赖于目的基因之间的相互融合, 但由于蛋白质的空间结构存在相互影响, 可能会导

致融合蛋白各自组分之间的生物学功能发生改变。因此必须通过多种方法来减少蛋白质之间的相互影响。目前研究表明在蛋白质组分之间添加适当的氨基酸, 如丝氨酸、甘氨酸肽段等是一种常见的方法。既往研究表明甘氨酸分子结构中没有苯环, 是一种相对“柔性”的氨基酸, 可以减少蛋白质之间的相互折叠, 用于多种基因融合表达之中^[10,11], 以保护各种融合蛋白的生物学功能。

通过基因重组的方法, 我们获得系列融合基因, 分别克隆到原核表达载体 PBK 中, IPTG 诱导表达后, 经 Tat 单克隆抗体纯化, SDS-PAGE 显示, 定量转化 HepG2 细胞或者培养基含有更昔洛韦的 HepG2 细胞。研究结果表明 HIV Tat-(Gly)_n-TK 系列融合蛋白 ($n=0, 2, 4, 6$) 透过细胞膜效率相似, 这表明在 HIV Tat 与 TK 基因之间融合甘氨酸短肽 (2, 4, 6 个氨基酸) 对 Tat 蛋白的细胞融合穿透功能无明显影响。因此 HIV Tat 蛋白的内化功能可能仅仅与 PTD 区相关, 下游蛋白对其无明显影响。

流式细胞仪检测结果表明,在含有更昔洛韦的培养基中 HIV Tat-(Gly)₄-TK 融合蛋白致 HepG2 细胞凋亡率最高,其余依次为 HIV Tat-(Gly)₂-TK, HIV Tat-TK, HIV Tat-(Gly)₆-TK 和 HIV Tat 组,组间均有显著性差异($P < 0.05$);锥虫蓝染色也有类似的结果,与我们前期实验结果(细胞死亡率为 89%)^[4]类似。这表明 HIV Tat 可以显著影响下游蛋白(TK)的生物学活性,但在 HIV Tat 与 TK 基因之间插入 4 个甘氨酸的间隔有利于保护下游蛋白(TK)的生物学功能。

最近 Bocalandro 等^[10]研究发现 Tat 蛋白具有穿透多种细胞膜活性,甚至可以透过血脑屏障。因此,许多研究者逐渐将 HIV Tat 的内化功能应用到一些临床治疗方案,如阻止中枢神经系统、心肌细胞凋亡、促进 I κ B α 活性、增强树突状细胞抗原递呈功能、抑制肿瘤分化等^[12~15]。

本研究发现 Tat 蛋白偶联一定甘氨酸蛋白后对 HIV Tat 内化功能影响较小,但对下游蛋白质(TK)的生物活性的造成一定影响,其中插入 4 个甘氨酸有利于保护下游蛋白(TK)的生物学功能,但其实际的保护效果如何以及如何应用于临床实践仍依赖于动物模型的进一步研究。

[参考文献]

- [1] Berkhout B, Silverman RH, Jeang KT. TAT trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target [J]. *Cell*, 1989, 59: 273-282.
- [2] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus [J]. *Cell*, 1988, 55: 1189-1193.
- [3] Mann DA, Frankel AD. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein [J]. *EMBO J*, 1991, 10: 1733-1739.
- [4] Kan QC, Yu ZJ, Lei YC, et al. Lethiferous effects of a recombinant vector carrying thymidine kinase suicide gene on 2. 2. 15 cells *via* a self-modulating mechanism [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 2216-2220.
- [5] Horton RM, Hunt HD, Ho SN, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension [J]. *Gene*, 1989, 77: 61-68.
- [6] Fittipaldi A, Ferrari A, Zopp M, et al. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 34141-34149.
- [7] Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein [J]. *Cell*, 1997, 88: 223-233.
- [8] Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, et al. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells; TAT-p27^{Kip1} induces cell migration [J]. *Nat Med*, 1998, 4: 1449-1452.
- [9] Fawell S, Seery J, Daikh Y, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 664-668.
- [10] Bocalandro YM, Marin MH, Vallejo RA, et al. Antigenic mixture of synthetic peptides for the immunodiagnosis of HTLV I/II infection [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2004, 25: 205-214.
- [11] Hernandez M, Rodriguez I, Pozo L, et al. Chimeric synthetic peptides from the nucleocapsid p24 protein of human immunodeficiency virus type-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282: 1-3.
- [12] 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: 1569-1572.
- [13] Asoh S, Ohsawa I, Mori T, et al. Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 17107-17112.
- [14] Cao G, Pei W, Ge H, et al. *In vivo* delivery of a Bcl-x_L fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis [J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 5423-5431.
- [15] Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, et al. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8786-8791.

[收稿日期] 2005-07-05

[修回日期] 2006-01-20

[本文编辑] 贾泽军

更正启事

本刊 2005 年第 11 期第 1272 页表 1 中的样本量应表示为“ $n=5$ ”,误作“ $n=3$ ”,特此更正,并向作者和读者表示歉意!

(本刊编辑部)