

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00489

人 Oct4 与细胞穿膜肽融合蛋白的表达

周承亮¹, 徐凤青¹, 王春红², 刘 韬², 彭新荣², 钱其军^{2*}

1. 浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438

[摘要] **目的** 通过原核表达获得人 Oct4(hOct4)与细胞穿膜肽融合蛋白, 优化其表达方法并观察其穿膜效果。 **方法** 通过基因工程手段构建了 pET 原核表达载体, 利用 BL21(DE3)和 Rosetta2(DE3)蛋白表达菌表达蛋白。Ni 亲和纯化方法纯化蛋白, 蛋白质印迹分析检测融合蛋白组成。将融合蛋白用罗丹明染色后加入人正常皮肤成纤维细胞株 BJ 观察其穿膜进入细胞情况。 **结果** 构建了 pET21a(+)-hOct4-11R-His 和 pET21a(+)-EGFP-11R-His 表达载体, 转入大肠杆菌中后诱导获得了 hOct4-11R-His 和 EGFP-11R-His 融合蛋白, 经蛋白质印迹分析检测表明融合蛋白正确。经 BJ 细胞测试, 观察到融合蛋白进入细胞中。 **结论** 成功获得了 hOct4-11R-His 和 EGFP-11R-His 融合蛋白, 且融合蛋白能够高效进入 BJ 细胞并聚集于细胞核周围。

[关键词] 八聚体转录因子 3; 细胞穿膜肽; 重组融合蛋白质类

[中图分类号] Q 816 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0489-05

Expression of human Oct4 and cell penetrating peptide fusion protein

ZHOU Cheng-liang¹, XU Feng-qing¹, WANG Chun-hong², LIU Tao², PENG Xin-rong², QIAN Qi-jun^{2*}

1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China
2. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To express the fusion protein of hOct4 and cell penetrating peptides using prokaryotic expression systems, and to optimize its expression methods and observe the membrane penetrating ability of the fusion proteins. **Methods** The pET-based prokaryotic expression system was constructed by genetic engineering, and the fusion plasmid was transferred into *E. coli* BL21(DE3) and Rosetta2(DE3). The protein was purified by Ni affinity chromatography and identified by Western blotting analysis. The penetrating ability of the Rhodamine-labelled fusion protein was investigated using BJ cells. **Results** We successfully constructed pET21a(+)-hOct4-11R-His and pET21a(+)-EGFP-11R-His vectors. Fusion proteins hOct4-11-His and EGFP-11R-His were generated by transferring the plasmids into *E. coli*. The fusion protein was verified by Western blotting analysis and was detected in BJ cells. **Conclusion** We have successfully generated EGFP-11R-His and hOct4-11R-His fusion proteins, and the proteins can effectively enter the BJ cells and locate around the nuclei.

[Key words] octamer transcription factor 3; cell penetrating peptides; recombinant fusion proteins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):489-493]

Oct4(又称 Oct3、Oct3/4、POU5F1)是哺乳动物胚胎发育,维持胚胎干细胞(ES 细胞)多能性关键基因^[1]。在体内,Oct4 表达开始于 4 细胞 8 细胞期,终止于分化后各种细胞^[2],体外 Oct4 在一些未分化的胚胎细胞株中表达,如 ES 细胞、胚胎癌细胞、原生质细胞。2006 年 Takahashi 和 Yamanaka^[3]利用反转录病毒将转录因子 Oct4 等 4 种转录因子基因转入

成纤维细胞,成功地将成纤维细胞重编程为多能性干细胞(iPS 细胞)。这种方法在接下去的几年中在大鼠^[4]、猪^[5]、猴^[6]和人类^[7-8]中都得到证实。随着 iPS 技术的进步,通过单因子 Oct4 诱导重编程得到 iPS 细胞也获得了成功^[9-10],证明 Oct4 在细胞重编程过程中起到了最关键的作用。然而,引入外源 DNA 的方法容易引起宿主细胞突变,阻碍了 iPS 技

[收稿日期] 2009-12-18 **[接受日期]** 2010-04-11

[基金项目] 国家杰出青年科学基金(30925037)。Supported by National Science Foundation for Distinguished Young Scholars(30925037)。

[作者简介] 周承亮,硕士生。E-mail: chengliang.zhou@gmail.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81875371, E-mail: qianqj@163.com

术在临床治疗方面的应用。

细胞穿膜肽(cell penetrating peptides)又可称为蛋白转导域(protein transduction domain)或者膜转导肽(membrane transduction peptides),是一种能携带大分子物质穿过细胞膜进入细胞的短肽。最受关注的是来自于 HIV 的 TAT^[11]和果蝇触角基因转录因子同源结构域^[12]。通过对 TAT、Antp 等天然穿膜肽的研究,利用细胞穿膜肽富含精氨酸、赖氨酸等碱性氨基酸残基这一特性,人工合成的多聚精氨酸和多聚赖氨酸也具有穿膜能力,而且 11 个精氨酸(11R)或者 11 个赖氨酸残基(11K)构成的基序比 TAT 的蛋白转导活性还要强,可以高效率地穿进细胞核^[13]。通过细胞穿膜肽携带转录因子蛋白将其导入靶细胞中诱导 iPS 细胞,消除引入外源 DNA 诱导 iPS 细胞方法带来的遗传修饰风险,是现在最安全的 iPS 细胞诱导方法之一。

本研究希望通过原核表达系统获得人 Oct4 转录因子与穿膜肽 11-Arginine 融合蛋白,并观察其穿膜效果,为进一步重编程研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 pET21a(+)-11R-His 载体由 Okayama University Medical School(日本冈山大学医学院)Hideki Matsui 教授馈赠,人 Oct4 基因购自武汉三鹰生物技术有限公司。蛋白表达菌 BL21(DE3)和 Rosetta2(DE3)、细菌蛋白抽提试剂、核酸酶购自 Merck 公司。限制性内切酶购自 NEB 公司,

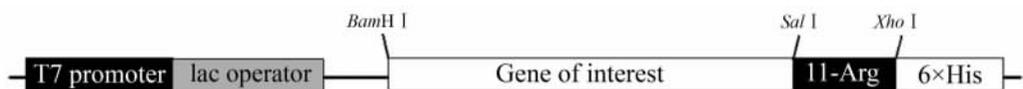


图 1 pET21a(+)-11R-His 表达质粒结构

Fig 1 Schematic representation of pET21a(+)-11R-His

1.4 融合蛋白表达与纯化 将鉴定正确的表达质粒 pET21a(+)-hOct4-11R-His 和 pET21a(+)-EGFP-11R-His 转化至 BL21(DE3)和 Rosetta2(DE3)蛋白表达菌株中,铺板挑取单克隆,接种于含有相对抗性[BL21(DE3):50 μg/ml 氨苄青霉素, Rosetta2(DE3):34 μg/ml 氯霉素及 50 μg/ml 氨苄青霉素]的 5 ml LB 培养液中,培养过夜。

融合蛋白表达:将新鲜菌液按 1:1 000 接种于含抗性的 LB 培养液中,37℃ 150 r/min 震荡至 D_{600} 值 0.5~0.7。加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,28℃ 继续培养 12 h 后离心收集菌体,-20℃ 保存。

Ni 亲和纯化:细菌沉淀裂解重悬于细菌蛋白抽

Ni-sepharose-6FF 填料购自 GE 公司,蛋白上样缓冲液购自 Fermentas 公司,NC 膜购自 Schleicher & Schuell 公司。Oct3/4 抗体(sc-5279)购自 Santa Cruz 公司,His-tag 抗体(SUB0081)购自 Univ-bio 公司,二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(GGHL-90P)购自 Immunology Consultants Laboratory 公司。ECL 底物、罗丹明标记试剂盒购自 Pierce 公司,X 光胶片购自 Kodak 公司,人正常皮肤成纤维细胞株 BJ 购自 ATCC 公司,胎牛血清、MEM 培养液购自 Gibco 公司。

1.2 引物设计及合成 根据基因序列设计合成引物。hOct4 引物 1(含 BamH I 酶切位点):5'-GCG GAT CCA TGG CGG GAC ACC TGG CT-3', hOct4 引物 2(含 Sal I 酶切位点):5'-ACG CGT CGA CAG TTT GAA TGC ATG GGA G-3';EGFP 引物 1(含 BamH I 酶切位点):5'-CGC GGA TCC GTG AGC AAG GGC GA-3', EGFP 引物 2(含 Sal I 酶切位点):5'-ACG CGT CGA CAG GAC TTG TAC AGC TC-3'。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 携带 hOct4 或 EGFP 与 11R-His 融合蛋白表达载体的构建 利用 hOct4 引物 1、2,以及 EGFP 引物 1、2 分别 PCR 获得两端带有 BamH I 和 Sal I 的 hOct4 和 EGFP 基因,酶切插入 pET21a(+)-11R-His 载体中(图 1),鉴定正确后,送上海生工生物工程技术有限公司测序。

提试剂中(5 ml/g),加入核酸酶 10~15 U/μl,室温震荡 10~20 min。离心(16 000×g,4℃,20 min)后,分离上清沉淀,将上清同 Ni-sepharose-6FF 填料 4℃ 孵育 1 h。将混合物加入层析柱中,加入 5 倍体积 PBS(含 50mmol/L 咪唑)洗涤。加入 3 倍柱体积的洗脱液(含 500 mmol/L 咪唑),收集洗脱液。

1.5 蛋白质印迹分析 样品中加入蛋白上样缓冲液,98℃ 10 min 使蛋白变性。以 10% SDS-PAGE 分离蛋白,电转至 NC 膜,5% 脱脂奶粉三羟甲基氨基甲烷溶液(TBST)封闭 2 h。抗体用封闭液稀释到工作浓度后,室温下一抗孵育 2 h 或 4℃ 过夜, TBST 洗涤 3 遍,加入二抗室温孵育 2 h, TBST 洗

漆 3 遍, 加入 ECL 底物, X 光胶片曝光。

1.6 罗丹明标记 通过透析将融合蛋白缓冲液置换为 PBS 后, 浓缩为 1 mg/ml。利用罗丹明标记试剂盒将蛋白与标记试剂混匀, 按试剂盒操作说明标记并纯化蛋白。

1.7 蛋白穿膜实验 BJ 细胞株用含 10% FBS 的 MEM 培养液, 于 5% CO₂ 孵箱 37℃、饱和湿度条件下培养。取对数生长期的细胞计数, 铺 24 孔板, 1 × 10⁵/孔, 将融合蛋白加入细胞培养液中, 12 h 后用 PBS 洗 3 次去除未结合蛋白, 换新鲜培养液, 荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 载体构建 重组质粒测序正确, 命名为 pET21a (+)-hOct4-11R-His, pET21a (+)-EGFP-11R-His。

2.2 融合蛋白表达 将表达质粒转化至 BL21 (DE3) 蛋白表达菌株, 诱导表达后将菌裂解上清过 Ni 柱纯化。10% SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色检测后发现预测相对分子质量区域 (hOct4-11R-His: 43 300; EGFP-11R-His: 34 600) 存在蛋白条带, 证明目的蛋白表达 (图 2)。

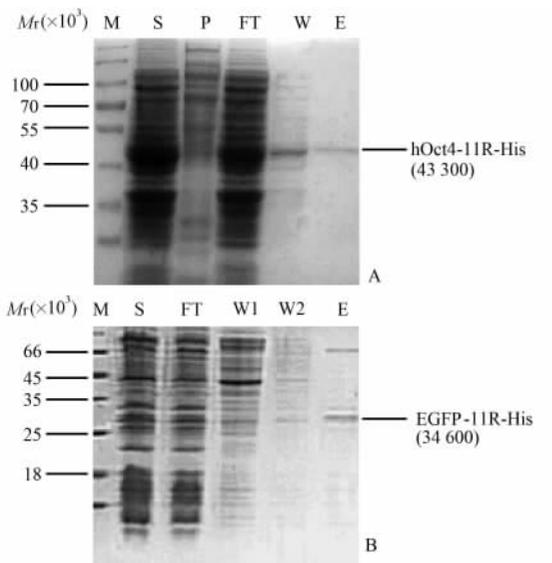


图 2 hOct4-11R-His 与 EGFP-11R-His 蛋白纯化 SDS-PAGE 检测

Fig 2 SDS-PAGE analysis of hOct4-11R-His(A) and EGFP-11R-His(B) protein purification

A: hOct4-11R-His (43 300); B: EGFP-11R-His (34 600). M: Marker; S: Supernatant of bacterial lysate; P: Pellet; FT: Flow-through; W, W1, W2: Wash fraction; E: Eluted fraction

2.3 融合蛋白表达优化 实验发现融合蛋白在 BL21 (DE3) 表达菌中纯化后得到量很低, 将

hOct4-11R-His 开放阅读框经 <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/> 软件分析后, 发现 11-Arginine 序列中 (CGC CGC AGG AGA CGA CGG CGA AGA AGG) 含有两组连续的 3 个大肠杆菌稀有密码子, 我们推断是由于稀有密码子使蛋白表达不完整, 造成纯化得到融合蛋白量低。将表达菌换为 Rosetta2 (DE3) 后, 蛋白纯化后得到目的蛋白量明显提高 (图 3)。

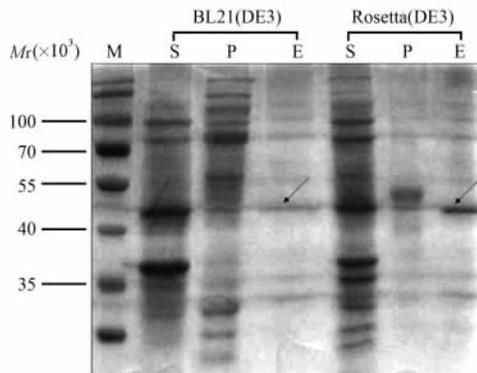


图 3 融合蛋白 hOct4-11R-His 表达优化

Fig 3 Optimization of hOct4-11R-His fusion protein expression M: Marker; S: Supernatant of bacterial lysate; P: Pellet; E: Eluted fraction. Arrows indicate hOct4-11R-His fusion protein

2.4 蛋白质印迹分析结果 蛋白质印迹分析检测证明融合蛋白中含有 hOct4 和 His-tag (图 4)。

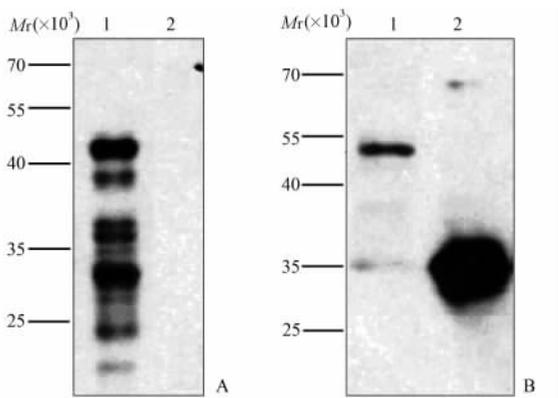


图 4 蛋白质印迹分析检测

Fig 4 Identification of proteins by Western blotting analysis A: Anti-Oct3/4 antibody; B: Anti-His-tag antibody. 1: hOct4-11R-His(43 300); 2: EGFP-11R-His(34 600)

2.5 蛋白穿膜 为检测 11R 的穿膜效率, 将 EGFP-11R-His 和罗丹明标记的 hOct4-11R-His 蛋白以终浓度为 10 μg/ml 加入 BJ 细胞培养液中。12 h 后, PBS 洗涤 3 次。荧光显微镜观察发现, 荧光多集中于细胞核周围, 证明融合蛋白能高效穿膜进入细胞 (图 5), 并具有核趋向性。

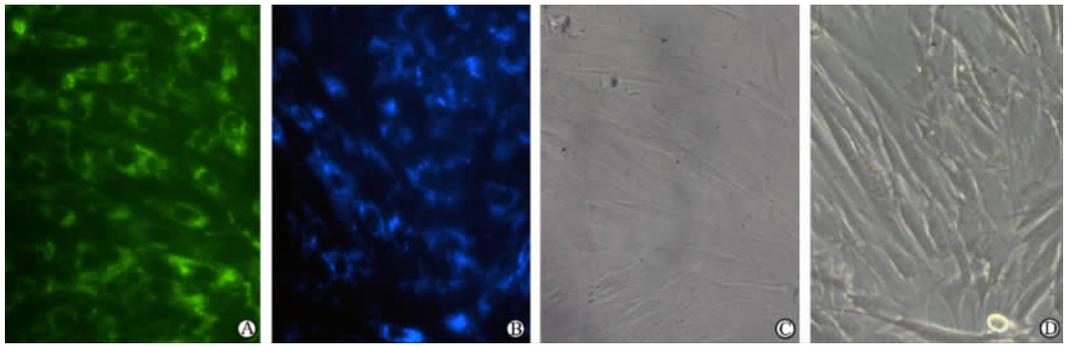


图5 荧光显微镜(A,B)及相差显微镜(C,D)观察融合蛋白穿膜进入BJ细胞

Fig 5 Fluorescence microscopic(A,B) and phase contrast microscopic(C,D) analysis of fusion protein entering BJ cells

A,C: EGFP-11R-His; B,D: Rhodamine-labelled hOct4-11R-His. Original magnification: $\times 200$

3 讨论

建立 iPS 细胞最安全的方法就是完全避免病毒或建立在 DNA 基础上的重编程方法。蛋白质是基因表达产物,多种蛋白质已被用于治疗人类疾病,利用活性蛋白诱导 iPS 细胞成为许多科学家努力的方向。2008 年, Bosnali 等^[14]成功利用原核表达的融合 TAT 细胞穿膜肽的 Oct4 和 Sox2 蛋白维持内源 Oct4 和 Sox2 下调的 ES 细胞的多能性。2009 年 4 月, Ding 等^[15]使用原核表达获得携带 11-Arginine 细胞穿膜肽的小鼠 4 种转录因子的融合蛋白成功诱导小鼠成纤维细胞重编程为 iPS 细胞。同年 5 月, Kim 等^[16]使用真核表达携带 9-Arginine 穿膜肽的人 4 种转录因子融合蛋白成功诱导人成纤维细胞为 iPS 细胞。蛋白直接诱导 iPS 细胞在重编程过程中不涉及任何的遗传修饰,使 iPS 细胞更接近于临床应用。本研究首次利用原核方法表达了人类转录因子 Oct4 蛋白及穿膜肽 11-Arginine 融合蛋白,和 Kim 等^[16]利用真核表达相比,原核表达具有产量高、成本低、纯化方便等优势,更符合产业化要求,且 Ding 等^[15]的研究证明通过原核表达的真核细胞转录因子能够对真核细胞发挥作用,为我们用原核表达蛋白诱导人类 iPS 细胞提供了理论基础。

蛋白纯化中,我们发现 11-Arginine 序列中含有 3 个连续的稀有密码子序列,在 BL21(DE3)表达菌中蛋白表达量很低,我们推测这 3 个连续稀有密码子阻碍了蛋白完整表达,影响了目的蛋白的产量。基因工程菌 Rosetta2(DE3)是携带 pRARE2 质粒的 BL21 衍生菌,补充大肠杆菌缺乏的 7 种(AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA 及 CGG)稀有密码子对应的 tRNA,提高外源基因,尤其是真核基因在原核系统中的表达水平。利用 Rosetta2(DE3)使得蛋白合成可以快速通过 11-Arginine 区域,使蛋白表

达完整,纯化后目的蛋白含量高。经 SDS-PAGE 分析发现,纯化后的蛋白相对分子质量和预计蛋白相对分子质量相符合,裂解后蛋白基本存在于菌体裂解液的上清中,不形成包涵体,有利于纯化,避免了蛋白复性的步骤。通过蛋白质印迹分析检测目的蛋白,证明蛋白中包含人 Oct4,且具有纯化标签 His。BJ 细胞是人成纤维细胞,BJ 细胞也已被成功诱导为 iPS 细胞^[17],本实验选取 BJ 细胞考虑到其细胞形态较大,细胞核较清楚,便于观察。由于蛋白为大分子物质,通常情况下无法通过细胞膜,将融合蛋白加入培养液 12 h 后观察,发现 EGFP-11R-His 和罗丹明标记 hOct4-11R-His 蛋白均能够高效进入细胞,并聚集在细胞核周围,证明 11-Arginine 能很好地穿膜进入细胞。本实验首次利用原核蛋白表达方法成功获得了人 Oct4 和 11-Arginine 细胞穿膜肽的融合蛋白,为后续诱导 iPS 细胞实验奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Rosner M H, Vigano M A, Ozato K, Timmons P M, Poirier F, Rigby P W, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo[J]. *Nature*, 1990, 345: 686-692.
- [2] Schöler H R, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4[J]. *Nature*, 1990, 344: 435-439.
- [3] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126: 663-676.
- [4] Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 11-15.
- [5] Esteban M A, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 17634-17640.
- [6] Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fi-

- broblasts[J]. Cell Stem Cell,2008,3:587-590.
- [7] Takahashi K,Tanabe K,Ohnuki M,Narita M,Ichisaka T,Tomoda K,et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell,2007,131:861-872.
- [8] Yu J,Vodyanik M A,Smuga-Otto K,Antosiewicz-Bourget J,Frane J L,Tian S,et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science,2007,318:1917-1920.
- [9] Kim J B,Sebastiano V,Wu G,Araújo-Bravo M J,Sasse P,Gentile L,et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells [J]. Cell,2009,136:411-419.
- [10] Kim J B,Greber B,Araújo-Bravo M J,Meyer J,Park K I,Zachres H,et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4[J]. Nature,2009,461:649-653.
- [11] Green M,Loewenstein P M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein[J]. Cell,1988,55:1179-1188.
- [12] Derossi D,Calvet S,Trembleau A,Brunissen A,Chassaing G,Prochiantz A. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent [J]. J Biol Chem,1996,271:18188-18193.
- [13] Matsushita M,Tomizawa K,Moriwaki A,Li S T,Terada H,Matsui H. A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation[J]. J Neurosci,2001,21:6000-6007.
- [14] Bosnali M,Edenhofer F. Generation of transducible versions of transcription factors Oct4 and Sox2[J]. Biol Chem,2008,389:851-861.
- [15] Zhou H,Wu S,Joo J Y,Zhu S,Han D W,Lin T,et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. Cell Stem Cell,2009,4:381-384.
- [16] Kim D,Kim C H,Moon J I,Chung Y G,Chang M Y,Han B S,et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins[J]. Cell Stem Cell,2009,4:472-476.
- [17] Zhao Y,Yin X,Qin H,Zhu F,Liu H,Yang W,et al. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation[J]. Cell Stem Cell,2008,3:475-479.

[本文编辑] 商素芳,邓晓群

· 书 讯 ·

《爱我乳房——健康咨询 400 问》(第 2 版)和《常用针灸腧穴速记手册》已出版

《爱我乳房——健康咨询 400 问》(第 2 版)由王燕蓉、何仲义主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-993-7,32 开,定价:18.00 元。

该书本着引领健康科普、增强自我保健的目的,从乳房的基本知识,生理结构和变化,乳房自我检查和护理,常见乳腺疾病及各种检查方法,乳腺癌的发生、诊断、治疗和康复,乳房整形和美容等方面进行了阐述。该书不仅有助于女性朋友更多地了解保护乳房健康的知识,而且有助于更好地了解自身的健康状况。该书应读者需求而再版,再版时保留了深入浅出、简明扼要的特点,并增加了一些图片,使读者更易于理解,对常见的检查进行了修订和增加,突显其实用性。

该书适于各年龄段、不同文化程度的女性阅读,尤其适合于有乳房疾患的读者。

《常用针灸腧穴速记手册》由王珑、吴仁培主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-997-5,32 开,定价:10.00 元。

针灸疗法是中医疗法的重要组成部分,也是现代医学所提倡的“绿色疗法”之一。经络腧穴理论是针灸理论体系中的核心内容,针灸疗法具有药物所不及的独特疗效。该书以十四经脉为序,内容包括每条经脉的循行原文、病候原文、主治概要、腧穴歌赋,重点对每条经脉中的常用腧穴作以详讲。针对每一个临床常用腧穴,设置了特定穴名、穴名由来、简便取穴、穴性功效、刺灸法、效穴验穴、注意事项等内容,并且对大部分腧穴还设置了功能鉴别、常用配伍、针灸处方、保健灸法等项目,对每一个腧穴做到讲述翔实、全面、具体、实用。为了使读者熟练掌握部分腧穴的简便取穴方法,还对 64 个腧穴的点穴方法拍摄了照片,更直观地展现临床常用的简便取穴法。

该书适合不同层次的中医、针灸师参考,也可供对中医针灸感兴趣的读者阅读。

以上两书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>