

采用蛋白质工程技术将 α B 晶状体蛋白 导入心肌细胞的初步研究*

蒋磊 刘双 袁灿 肖卫民 王慷慨 尤家驷 肖献忠**

(中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 长沙 410078)

摘要 为将 α B 晶状体蛋白 (α B-crystallin, α B-C) 导入心肌细胞, 采用蛋白质工程技术将人 α B 晶状体蛋白全长 cDNA 基因克隆至具有细胞膜通透能力的膜移位序列 (membrane translocating sequence, MTS) 的碱基顺序的下游, 在大肠杆菌中表达谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) -MTS- α B-C 融合蛋白. 用谷胱甘肽-Sepharose4B 亲和层析分离表达产物, 用 Xa 因子将其中 GST 切除, 并通过阴离子交换层析纯化 MTS- α B-C. 纯化的 MTS- α B-C 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 上呈单一条带, 分子质量 23 ku; 免疫印迹显示 GST-MTS- α B-C 与 MTS- α B-C 均能为人 α B-C 抗体识别而在相应位置出现清晰条带. GST-MTS- α B-C 与 MTS- α B-C 均有分子伴侣活性. 用异硫氰荧光素 (FITC) 标记的 MTS- α B-C 与心肌细胞共培养后, 在荧光显微镜下观察到其进入了心肌细胞.

关键词 α B 晶状体蛋白, 蛋白质工程, 膜移位序列, 心肌细胞

学科分类号 R362

细胞内复杂的生命活动过程受到各种各样内源性蛋白质的精确调控. 为深入研究及操纵细胞内的这些生命活动, 不少学者已探索过多种升高某些特定蛋白质的细胞内水平的方法, 如基因转染, 显微注射, 脂质体包裹等^[1-3].

热休克蛋白, 又叫分子伴侣, 是热应激和其他应激条件下细胞内新合成或合成增加的一组蛋白质. 其基本功能是帮助其他蛋白质维持或恢复正确的折叠状态, 参与其移位及促进变性蛋白质的复性或降解. 细胞 α B 晶状体蛋白 (α B-crystallin, α B-C) 是一小分子热休克蛋白, 分子质量约为 22 ku, 在心肌细胞中含量非常丰富, 约占总可溶蛋白的 2%^[4]. 在正常情况下, α B-C 以可溶形式分布于胞浆中, 在心肌缺血, 缺血再灌等应激条件下, 发生多聚化并向细胞骨架成分 Z 线和 I 带移位^[5-7], 与此同时, 其表达水平也明显增加, 以维持细胞骨架的稳定, 从而减轻因缺血, 缺血再灌等引起的心肌损伤^[8]. 鉴于 α B-C 为细胞内蛋白质, 如能将其导入心肌细胞, 则不仅有利于其功能研究, 而且可能为其在防治心肌损伤方面的应用打下基础.

膜移位序列 (membrane translocating sequence, MTS) 是含有 12 个氨基酸残基的疏水短肽, 来自于纤维母细胞生长因子信号肽序列的 h 区. 近年已有学者报道, MTS 可将某些短肽或多肽导入细胞, 并证明肽导入细胞后依然有生物学活性^[9].

本研究采用 MTS 序列与人 α B-C 全长 cDNA 基

因融合, 在细菌中表达出 MTS- α B-C, 借助 MTS 将 α B-C 导入活的心肌细胞, 以便进一步探讨 α B-C 保护心肌损伤的分子机制, 并为其在心肌保护中的应用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

Sephadex G-25 (A. Pharmacia); 纤维素-DEAE-52 (Whatman); 异硫氰荧光素、丙烯酰胺 (Amersco); 甲叉双丙烯酰胺、考马斯亮蓝 R-250、G-250 (Fluka); 牛血清白蛋白 (Serva); 还原型谷胱甘肽 (日本进口分装); IPTG (BBI 进口分装); 分子质量标准 (Bio-Rad); SDS、 α B-C (Sigma); α B-C 抗体 (Stressgen); 其他均为国产分析纯.

1.2 还原型谷胱甘肽-Sepharose4B 的制备

参照文献 [10] 的方法进行, 以短臂环氧氯丙烷活化, 再偶联还原型谷胱甘肽.

1.3 MTS- α B-C 表达载体的构建

含有谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 及 MTS 序列的原核表达载体 pGEX-MTS (美国 Vanderbilt 大学

* 国家自然科学基金 (39770307) 及教育部骨干教师资助计划资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805491, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com

收稿日期: 2001-07-27, 接受日期: 2001-09-28

Lin 赠送) 经 *EcoRI* 酶切线性化, 含有人 α B-晶状体蛋白 cDNA 基因的 pRF14G 质粒 (美国德克萨斯大学西南医学中心 Benjamin 赠送) 亦经同一酶消化以获取 α B-晶状体蛋白基因插入片段. 将插入片段与上述载体连接, 构建成融合蛋白表达质粒 pGEX-MTS- α B-C, 转染大肠杆菌 DH5 α , 用 *EcoRI* 酶切鉴定重组质粒, 挑选阳性克隆进行 DNA 测序, 以确定融合蛋白的阅读框架未变.

1.4 GST-MTS- α B-C 融合蛋白的表达与分离

参照文献 [11] 进行. 表达质粒 pGEX-MTS- α B-C 转染大肠杆菌 DH5 α 后, 37℃ 振荡培养至 $A_{600} = 0.7$, 用终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 3 h. 离心收集菌体. 以 30 ml 含 4 mol/L 尿素的 PBS (150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.3) 将菌体悬浮, -20℃ 过夜. 解冻后, 菌体在冰上用超声破裂, 10 000 $\times g$ 离心 10 min 去沉淀. 将上清对 PBS 透析去尿素后, 上预先用 PBS 平衡的谷胱甘肽亲和柱 (1.5 cm $\times$ 10 cm). GST-MTS- α B-C 融合蛋白用含 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽的 PBS 缓冲液洗脱.

1.5 MTS- α B-C 的纯化

利用 GST 与 MTS- α B-C 之间克隆的 Xa 因子的酶切位点 (图 1), 按 Pharmacia 说明书, 用 Xa 因子切断融合蛋白后, 将溶液对含 8 mol/L 尿素的 TBS 缓冲液 (25 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris HCl, pH 8.0) 透析, 再上预先用透析缓冲液平衡的 DEAE-52 离子交换柱 (2.2 cm $\times$ 26 cm), 用含 0~0.3 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素的 TBS 缓冲液进行线性梯度洗脱. 第一峰洗下 MTS- α B-C, 收集之, 对 TBS 透析去尿素, 超滤浓缩^[11].

1.6 MTS- α B-C 的电泳和免疫印迹分析

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按 Laemmli 方法^[12], $T = 15\%$, $C = 2.6\%$, 用考马斯亮蓝 R-250 染色. 免疫印迹分析参照 Pharmacia Biotech 方法进行.

1.7 MTS- α B-C 对变性蛋白质的解聚作用

为检测 MTS- α B-C 的分子伴侣功能, 取心肌组织蛋白, 用 Bradford 法进行蛋白质定量. 取 100 μ g 总蛋白, 在其中加入 200 mmol/L H_2O_2 , 在 37℃

孵育 30 min 后, 离心收集蛋白沉淀. 于蛋白质沉淀中加入 2 μ g MTS- α B-C 或 HSP25, 以含 140 mmol/L NaCl, pH 7.4, 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液加至总体积 30 μ l, 在 37℃ 共孵育 4 h, 离心, 分别取上清和沉淀, 进行免疫印迹检测其中肌动蛋白的含量变化. 以上清中出现的可溶性肌动蛋白的多少来评价 MTS- α B-C 的分子伴侣活性^[13].

1.8 MTS- α B-C 的荧光素标记

MTS- α B-C 的异硫氰 (FITC) 荧光素标记参照文献方法进行^[14]. 用 Sephadex G-25 凝胶过滤去除游离荧光素. 以同样条件标记的纯化的人 α B-C 和牛血清白蛋白 (BSA) 作阴性对照.

1.9 MTS- α B-C 导入心肌细胞

荧光素标记的 MTS- α B-C (6.0 μ mol/L), 以 DMEM 培养基稀释 10 倍, 与心肌细胞共培养, 8 h 后, 用生理盐水充分洗涤, 将细胞置荧光显微镜下观察. 以荧光素标记的人 α B-C (6.0 μ mol/L) 和 BSA (6.0 μ mol/L) 作对照, 操作同 MTS- α B-C.

2 结 果

2.1 MTS- α B-C 的克隆

经 *EcoRI* 酶切后, 重组质粒可见一约 4.9 kb 的 pGEX 载体及 700 bp 的 α B-C 插入片段 (图 1b). 经上海博亚生物技术有限公司测序证实, 重组质粒中的 GST-MTS- α B-C 融合蛋白的序列处于同一阅读框架.

2.2 GST-MTS- α B-C 和 MTS- α B-C 的表达与纯化

将 pGEX-MTS- α B-C 原核表达质粒导入大肠杆菌 DH5 α , 阳性克隆经 IPTG 诱导, 细菌裂解产物经 SDS-PAGE 分离及考马斯亮蓝染色. 在未诱导的细菌中, 仅有极少量的融合蛋白表达. IPTG 诱导 3 h 后, GST-MTS- α B-C 大量表达. 用谷胱甘肽亲和层析将表达组分分离, 其相对分子质量约 50 000, 与预期的 GST-MTS- α B-C 融合蛋白大小一致. 用 Xa 因子将 GST-MTS- α B-C 切成二部分, 其中 MTS- α B-C 约 23 000, 与推测的 MTS- α B-C 的大小相符 (图 2a). 采用抗人 α B-C 抗体进行的免疫印迹分析显示, GST-MTS- α B-C 及 MTS- α B-C 均在相应位置显出清晰的识别条带 (图 2b).

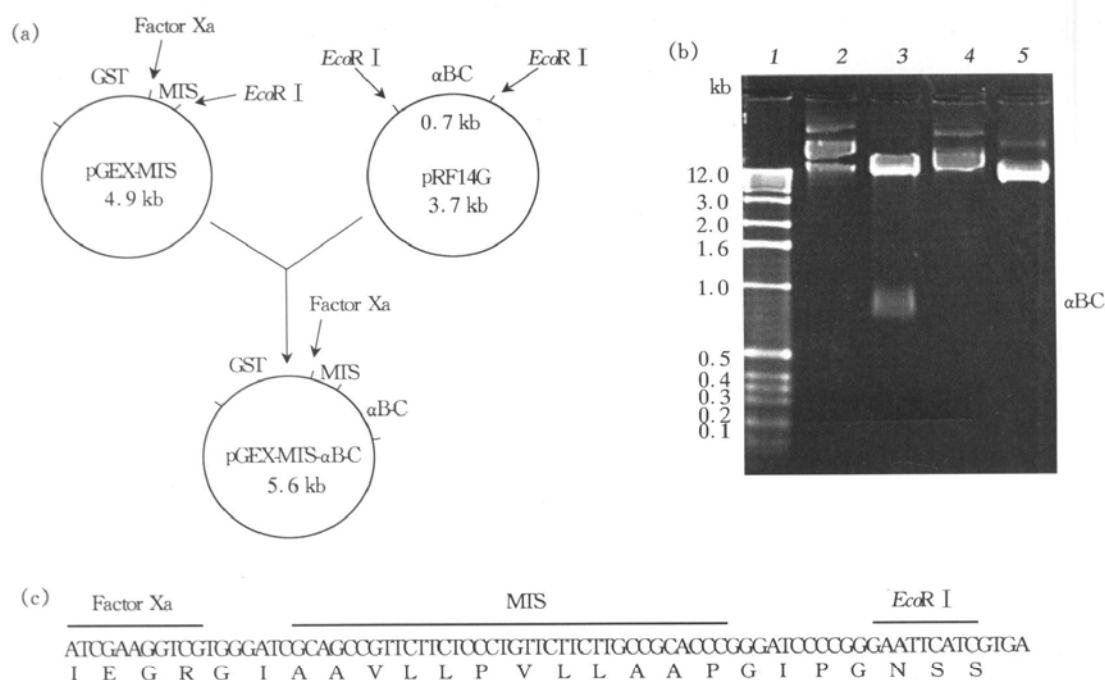


Fig. 1 Construction of the bacterial expression vector pGEX-MTS-αB-C

(a) construction scheme of the bacterial expression vector pGEX-MTS-αB-C. (b) diagnostic EcoRI digestion of pGEX-MTS and recombinant pGEX-MTS-αB-C plasmids. 1: 1 kb ladder; 2: pGEX-MTS-αB-C; 3: EcoRI-digested pGEX-MTS-αB-C; 4: pGEX-MTS; 5: EcoRI-digested pGEX-MTS. (c) the location of vector-derived recognition site for protease factor Xa and restriction endonuclease are indicated.

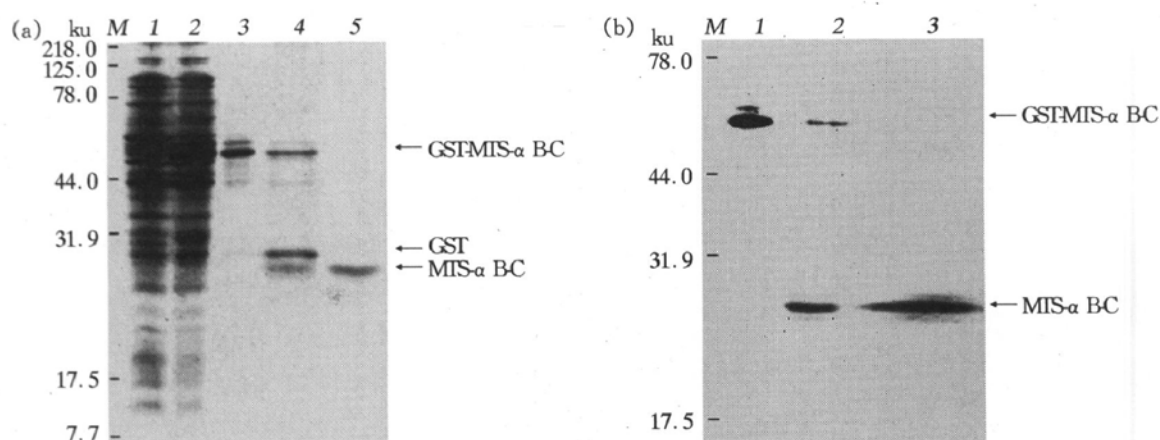


Fig. 2 Expression and purification of recombinant MTS-αB-C in *E. coli*

(a) SDS-PAGE analysis of the expression and purification of MTS-αB-C. A Coomassie Blue stain is shown. 1 and 2: crude cell lysates of bacterial cultures transformed with pGEX-MTS-αB-C before and after induction with 1 mmol/L IPTG, respectively; 3: affinity-isolated GST-MTS-αB-C fusion protein; 4: factor Xa-cleaved GST-MTS-αB-C fusion protein; 5: purified recombinant MTS-αB-C. (b) Western immunoblot of recombinant MTS-αB-C. Proteins were SDS-electrophorized and then transferred to a nitrocellulose membrane and reacted with human αB-C antibody. Shown is a horseradish peroxidase development of bound MTS-αB-C-IgG complexes. 1: GST-MTS-αB-C fusion protein; 2: factor Xa-cleaved GST-MTS-αB-C fusion protein; 3: purified recombinant MTS-αB-C; M: kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad).

2.3 MTS对变性蛋白质的解聚作用

用 200 mmol/L H_2O_2 处理心肌组织蛋白后, 肌动蛋白大部分沉淀, 上清中很少 (图 3a). 在沉淀中加入 MTS-αB-C, 37 °C 孵育 4 h, 可见沉淀中

肌动蛋白重新解聚复性而溶于上清中. 而在仅含 ATP 的缓冲液对照组肌动蛋白基本上还在沉淀中. MTS-αB-C 的分子伴侣活性与 HSP25 大小相当 (图 3b).

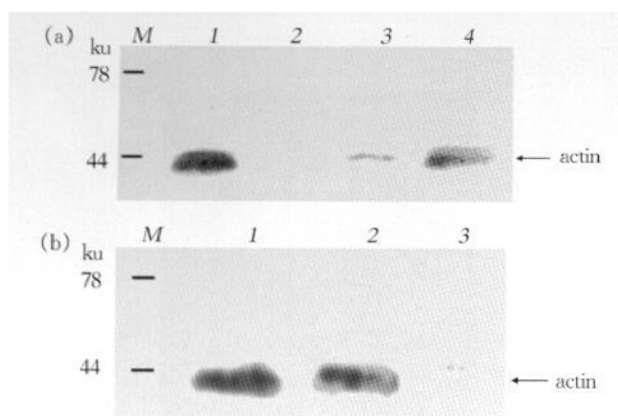


Fig. 3 *In vitro* determination of chaperone like activity of purified MTS- α B-C

(a) H_2O_2 (200 mmol/L) resulted in precipitation of myocardial homogenate. Only actin of which was analyzed by Western immunoblot. 1: the supernatant of normal control. 2: the precipitate of normal control. 3: the supernatant of H_2O_2 induced myocardial homogenate. 4: the precipitate of H_2O_2 induced myocardial homogenate. (b) MTS- α B-C mediated disaggregation of actin precipitates induced by H_2O_2 . After precipitates induced by H_2O_2 were incubated with buffers containing MTS- α B-C (1) or HSP25 (2) or with buffer only (3), the supernatants of the reaction mixtures were used for analysis of the disaggregated actin by Western immunoblot. M: kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad).

2.4 MTS- α B-C 荧光素标记及导入心肌细胞

MTS- α B-C、 α B-C、BSA 标上的 FITC 的量 [μ g (FITC) / mg (蛋白)] 分别为: 43.4、41.7、25, 相当于平均每个蛋白质分子标记 FITC 的个数分别为: 2.8、2.4、4.3. 与新生大鼠心肌细胞共培养 8 h 后, 大量的标记 MTS- α B-C 进入心肌细胞; 而标记的 α B-C 和 BSA 都不能进入细胞 (图 4).

3 讨 论

在升高某种蛋白质细胞内水平的操作中, 基因转染, 显微注射, 脂质体包裹等方法各有优缺点, 如基因转染及脂质体包裹虽能有效地将基因或蛋白质导入细胞, 但具有较大的细胞毒性. 而显微注射难以将基因或蛋白质导入至大量细胞之中, 因而其应用受到一定限制. 本研究采用蛋白质工程技术, 将小分子热休克蛋白 (α B-晶状体蛋白) 与一具有膜通透能力的短肽 MTS 融合, 成功地将其导入心肌细胞之中, 在荧光显微镜下直观地看到了标记的 MTS- α B-C 进入了活的心肌细胞, 而同样标记的 α B-C 与 BSA 则不能进入细胞 (图 4). 证明 MTS- α B-C 进入细胞是 MTS 介导的结果.

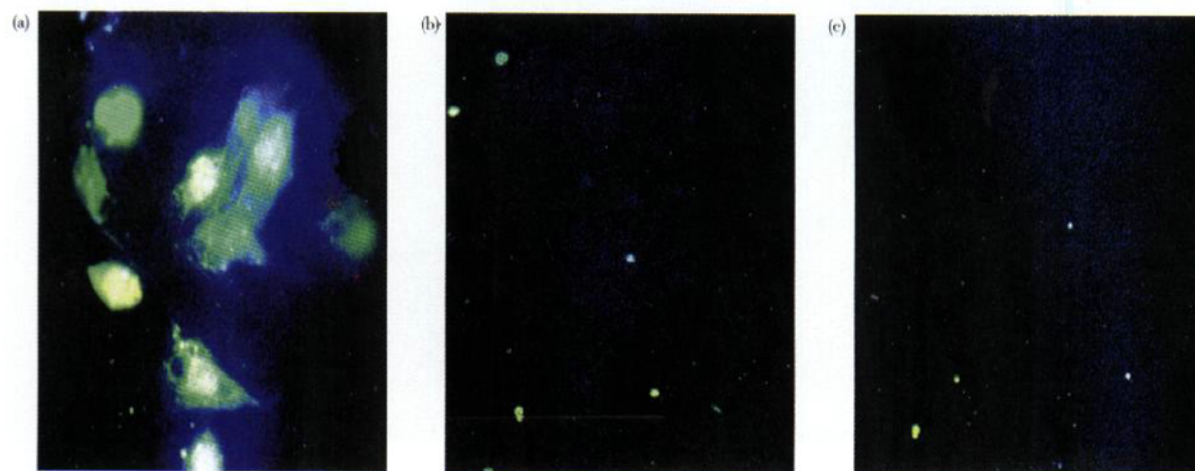


Fig. 4 Fluorescence microscopy of neonatal rat cardiomyocytes incubated with FITC labeled MTS- α B-C (a), α B-C (b) and BSA (c) (40 × 10)

我们还检测了不同浓度及不同孵育时间对导入的影响, 发现当 MTS- α B-C 的浓度减少一半, 只有 3.0 μ mol/L 时, 荧光显微镜下仍观察到了大量 MTS- α B-C 进入细胞; 与此相反, 当 BSA 的浓度达到 90 μ mol/L, BSA 也不能进入细胞. MTS- α B-C 4 h 已进入细胞, α B-C 及 BSA 大于 8 h 仍不能进入细胞.

MTS- α B-C 导入心肌细胞的成功, 将为进一步

研究 α B-C 在心肌细胞中移位及其保护心肌损伤的机理提供新的思路, 为将热休克蛋白用于抗损伤治疗奠定了基础, 亦为探讨其他蛋白质的功能或将某些具有治疗价值的蛋白质 (或某些结构域) 导入存活细胞提供了经验.

致谢 赵震宇, 夏珂, 徐志文, 蒋碧梅等同志及中心实验室刘健平同志参加过部分工作, 或提供过

许多帮助, 在此对他们表示感谢.

参 考 文 献

- 1 Indraccolo S, Morini M, Gola E, *et al.* Effects of angiotensin gene transfer on functional properties and *in vivo* growth of kaposi's sarcoma cells. *Cancer Res*, 2001, **61** (14): 5441~ 5446
- 2 Aoi M, Date I, Tomita S, *et al.* Single and continuous injection of glial cell line-derived neurotrophic factor in the striatum induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system. *Neuro Res*, 2000, **22** (8): 832~ 836
- 3 Iwata A, Sai S, Nitta Y, *et al.* Liposome-mediated gene transfection of endothelial nitric oxide synthase reduces endothelial activation and leukocyte infiltration in transplanted hearts. *Circulation*, 2001, **103** (22): 2753~ 2759
- 4 Kato K, Shinohara H, Kurobe N, *et al.* Tissue distribution and developmental profiles of immunoreactive α B-crystallin in the rat determined with a sensitive immunoassay system. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1074** (1): 201~ 208
- 5 Golenhofen N, Ness W, Koob R, *et al.* Ischemia-reduced phosphorylation and translocation of stress protein α B-crystallin to Z lines of myocardium. *Am J physiol*, 1998, **274** (5): H1457~ 1464
- 6 Golenhofen N, Htun P, Ness W, *et al.* Binding of the stress protein α B-crystallin to cardiac myofibrils correlates with the degree of myocardial damage during ischemia/reperfusion *in vivo*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, **31** (3): 569~ 580
- 7 Ray P S, Martin J L, Swanson E A, *et al.* Transgene overexpression of α B-crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. *FASEB J*, 2001, **15** (2): 393~ 402
- 8 Dillmann W H. Small heat shock proteins protection against injury. *Ann NY Acad Sci*, 1999, **874**: 66~ 68
- 9 Rojas M, Donahue J P, Tan Z, *et al.* Genetic engineering of protein with cell membrane permeability. *Nat Biotechnol*, 1998, **16** (4): 370~ 375
- 10 Simons P C, Jagt D L V. Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal Biochem*, 1977, **82** (2): 334~ 341
- 11 Muchowski P J, Bassuk J A, Lubsen N H, *et al.* Human α B-crystallin, small heat shock protein and molecular chaperone. *J Biol Chem*, 1997, **272** (4): 2578~ 2582
- 12 Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (259): 680~ 685
- 13 Goloubinoff P, Mogk A, Zvi A P B, *et al.* Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (24): 13732~ 13737
- 14 北京医学院. 实验免疫学. 北京: 人民卫生出版社, 1980. 203~ 214
Beijing Medical College. Experimental immunology. Beijing: People Health Press, 1980. 203~ 214

Cardiomyocytic Import of α B-Crystallin Engineered with Membrane translocating Sequence*

JIANG Lei, LIU Shuang, YUAN Can, XIAO Wei-Min,

WANG Kang-Kai, YOU Jia-Lu, XIAO Xian-Zhong**

(Department of Pathophysiology, Xiang Ya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to deliver α B-crystallin (α B-C) into cardiomyocytes, the full-length cDNA fragment encoding the human α B-crystallin was cloned into the bacterial expression vector pGEX-MTS containing membrane-translocating sequence (MTS) which could mediate intracellular delivery of peptides and expressed as a fusion protein coupled to glutathione S-transferase (GST). After glutathione affinity chromatography and cleaved from GST by factor Xa, the recombinant MTS- α B-C was separated from GST and factor Xa by anion exchange chromatography. Recombinant MTS- α B-C was characterized by SDS-PAGE and Western immunoblot analysis. The purified MTS- α B-C migrated on SDS-PAGE as a single band to an apparent molecular mass (23 ku) that corresponded to total native α B-C and MTS, and was recognized on Western immunoblot by anti-human α B-crystallin antibody. Both MTS- α B-C and GST-MTS- α B-C displayed chaperone like function by disaggregating the denatured and aggregated actin induced by H_2O_2 treatment in an ATP-containing buffer at 37 °C. It was observed under fluorescence microscope that FITC-labeled MTS- α B-C had gone into neonatal rat cardiomyocytes by MTS mediation after the cells were incubated with the MTS- α B-C for 8 hours.

Key words α B-crystallin, protein engineering, membrane-translocating sequence, cardiomyocyte

* This work was supported by grants from the National Natural Science of Foundation of China (39770307) and Key Member Award from the Ministry of Education.

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805491, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com

Received: July 27, 2001 Accepted: September 28, 2001