

# TAT 蛋白转导肽介导的秀丽线虫体内外源蛋白的跨膜转导研究\*

吴永红<sup>1\*\*</sup> 石锦平<sup>1,2\*\*</sup> 何国维<sup>1</sup> 任长虹<sup>1</sup> 高 艳<sup>1</sup> 张成岗<sup>1,2\*\*\*</sup>

(1 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 蛋白质组学国家重点实验室 北京 100850 2 安徽医科大学生物教研室 安徽 230032)

**摘要** TAT 蛋白转导肽是 HIV-1 病毒编码的一段富含碱性氨基酸序列的多肽,能够高效介导多种外源生物大分子通过多种膜性结构,如细胞质膜和血脑屏障等。为探索 TAT 蛋白转导肽介导的秀丽线虫体内外源蛋白跨膜转导作用,以 EGFP 为报告基因结合常规分子克隆技术构建了原核表达载体 pET28b-EGFP 和 pET28-TAT-EGFP,继而利用诱导剂 IPTG(终浓度 1mmol/L)诱导表达了靶蛋白并结合荧光显微镜观察、SDS-PAGE 和 Western blot 等鉴定技术获得表达靶蛋白的大肠杆菌 BL21(DE3)细胞,最后将其涂布到含有 Kana<sup>+</sup> 的 LB 固体培养基上直接饲喂野生型 N2 株系线虫,利用荧光显微镜观察绿色荧光信号在线虫体内的分布。结果证明,TAT-EGFP 融合蛋白较之于 EGFP 可高效、可溶性表达,而且通过直接饲喂秀丽线虫表达靶蛋白的大肠杆菌 48 小时后,TAT-EGFP 荧光信号明显分布于线虫肠壁细胞,而 EGFP 荧光信号则分布在秀丽线虫肠腔,空载体对照组未见任何荧光信号,说明 TAT 蛋白转导肽能够高效介导外源蛋白在秀丽线虫体内跨膜转导。同时,通过比较空载体对照组与实验组线虫微分干涉图像,未见线虫出现明显的细胞形态变化,说明 TAT 蛋白转导肽介导的外源蛋白跨膜转导作用是安全的,为在秀丽线虫体内直接研究外源蛋白的功能以及进行蛋白药物的研发提供了重要参考。

**关键词** TAT 蛋白转导肽 原核表达 线虫 跨膜转导

**中图分类号** Q78

秀丽隐杆线虫作为第一个完成全基因组序列测定的多细胞真核模式生物,因其细胞数明确、遗传背景清楚、基因组小及易于操作等优点已广泛应用于遗传学、发育生物学、神经生物学和分子生物学等多个研究领域<sup>[1]</sup>。随着分子生物学技术的不断发展进步,许多研究者采用显微注射和 RNA 干涉等方法实现了线虫的转基因操作,主要技术路线包括:首先采用一定的技术手段使外源性遗传物质(如 DNA 和 RNA 等)直接注入线虫体内特定组织细胞并表达,进而通过表型筛选观察外源基因的功能等<sup>[2-3]</sup>。显然,上述方法存在很多

缺陷,如操作繁琐、成本高、周期长及破坏性大等。长期的研究发现自然界中存在一类能够安全高效地实现外源生物大分子跨膜转导的多肽,即蛋白转导域家族<sup>[4-6]</sup>。如果能够利用蛋白转导域家族成员的跨膜转导作用将外源生物大分子导入线虫组织和细胞中,不仅能够克服上述方法的不足,而且可以直接转导体外表达的外源功能性蛋白,无需进一步经体外表达的外源蛋白分离纯化等繁琐步骤,有可能克服显微注射及 RNA 干涉外源基因不表达的缺点,进而节约特异基因功能研究的成本等。

蛋白转导域是一个超家族,迄今为止已发现多种自然界中天然存在及人工合成的蛋白转导域,主要包括人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)编码的反式转录激活因子 TAT<sup>[7-8]</sup>、果蝇同源异型转录因子 ANTP<sup>[9]</sup>、单纯疱疹病

收稿日期:2010-09-21 修回日期:2010-12-30

\* 国家自然科学基金(30973107, 30772293)、国家“973”计划(2006CB504100)、国家“重大新药创制”科技重大专项课题(2009ZX09503-002, 2009ZX09301-002, 2009ZX09103-616)资助项目

\*\* 共同第一作者

\*\*\* 通讯作者,电子信箱:zhangcg@bmi.ac.cn

毒 1 型(HSV-1)转录因子 VP22 和人工合成的多聚精氨酸及多聚赖氨酸<sup>[10-12]</sup>。这些转导域不仅能够介导多种外源蛋白跨膜转导进入细胞(如超氧化物歧化酶和过氧化氢酶),而且还能够介导多种其他外源生物大分子如核酸和其他颗粒性物质(如纳米材料)等通过多种生物膜性结构进入细胞并保持其生物活性等<sup>[13-16]</sup>。目前,蛋白转导域家族中研究较多且较为深入的是 HIV-1 编码的反式转录激活因子 TAT 蛋白转导肽,其全长及其中的 11 个碱性氨基酸富集区的核心肽段在外源生物大分子的安全高效跨膜转导过程中具有重要作用,而我们新近还发现 TAT 的 11 个碱性氨基酸富集区的核心肽段能够显著地促进外源蛋白高效可溶性表达,解析了 TAT 蛋白转导肽的新功能<sup>[17]</sup>。基于前期研究基础,首先采用荧光显微镜观察、SDS-PAGE 和 Western blot 等技术手段鉴定了 TAT-EGFP 和 EGFP 蛋白的表达,进一步将表达 TAT-EGFP 和 EGFP 蛋白的大肠杆菌 BL21(DE3)直接饲喂 N2 株系线虫,通过荧光显微镜观察绿色荧光信号在线虫体内的分布,48 小时后,TAT-EGFP 荧光信号明显分布于线虫肠壁细胞,而 EGFP 荧光信号则分布在秀丽线虫肠腔,空载体对照组未见任何荧光信号,说明 TAT 蛋白转导肽能够高效介导外源蛋白在秀丽线虫体内跨膜转导。同时,通过比较空载体对照组与实验组线虫微分干涉图像未见线虫出现明显的细胞形态变化,说明 TAT 蛋白转导肽介导的外源蛋白跨膜转导作用是安全的,为在秀丽线虫体内直接、快速研究外源蛋白的功能以及进行蛋白药物的研发提供了重要参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 BL21(DE3)和质粒 pFX-EGFP 由本实验室保存,野生型秀丽线虫 N2 Bristol(简称 N2)由美国秀丽线虫遗传中心(Caenorhabditis Genetics Center)惠赠;原核表达载体 pET28b-TAT 和 pET28b-TAT-EGFP 由军事医学科学院杨晓明教授提供;PCR 扩增仪购自德国 Biometra 公司;37℃ 恒温箱购自湖北黄石仪器公司;恒温摇床购自江苏太仓仪器公司;荧光显微镜购自日本 Nikon 公司;限制性内切酶 *Bam*H I, *Xho* I 和 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;DNA 提取和纯化试剂盒购自美国 Promega 公司;引物合成及测序由 Invitrogen 公司完成;EGFP 单克隆抗体购自 Sigma 公司;GAPDH 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗购

自北京中杉金桥公司;ECL 化学发光检测试剂盒购自 GE 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 原核表达载体 pET28b-TAT-EGFP 和 pET28b-EGFP 的构建及诱导表达 首先以质粒 pFX-EGFP 为模板并利用引物对:pU\_5'-CGCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'; pD\_5'-CCGCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCAT-3'(斜体部分分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点)进行 PCR 扩增获得 EGFP 717bp cDNA 编码序列,然后采用限制性内切酶 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切目的基因 EGFP 和质粒载体 pET28b;酶切产物回收后采用 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶于 16℃ 连接过夜;次日,将转化产物全部转化入大肠杆菌 BL21(DE3)并采用限制性内切酶酶切和直接测序鉴定。

随后,将转化有质粒载体 pET28b-TAT-EGFP 和 pET28b-EGFP 的宿主菌 BL21(DE3)涂布到含有卡那霉素(终浓度 100μg/ml)的 LB 固体培养基,37℃ 恒温箱孵育 10~12 小时待长出克隆。次日,挑取阳性克隆接种到 5ml 含有卡那霉素(终浓度 100μg/ml)的 LB 液体培养基中,37℃、220r/min 摇菌过夜使菌体完全复苏;然后按照 1:100 的比例将菌液接种到 150ml 新配置的含有卡那霉素(终浓度 100μg/ml)的 LB 液体培养基中,37℃、220r/min 摇菌约 4~5 小时,待 OD<sub>600</sub> 为 0.6~1.0 时加入诱导剂异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG),终浓度 1mmol/L),迅速置于 30℃、220r/min 摇床诱导表达 6 小时,并于第 2 小时,第 4 小时和第 6 小时收集菌体细胞,部分菌体细胞待荧光显微镜观察,其余菌体细胞超声破碎后直接制备上清蛋白样品待 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。上述实验过程均以 pET28b 和 pET28b-TAT 为空载体对照,具体诱导表达过程参见文献[17]。

1.2.2 诱导表达菌体荧光显微镜观察 将上述诱导表达的菌体细胞采用 10μl 接种环均匀地涂布到干净的载玻片上,待其自然风干后采用荧光显微镜观察菌体细胞荧光信号,分别采集诱导表达不同时间点菌体细胞的荧光图像及微分干涉图像,最后通过图像合并技术观察 TAT-EGFP 和 EGFP 在大肠杆菌细胞中的表达情况,以 pET28b 和 pET28b-TAT 为空载体对照。

1.2.3 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 将上述超声破碎后直接制备的上清蛋白样品采用 15% SDS-PAGE 分离,然后采用考马斯亮蓝 R-250 染色并脱色,最后采用凝胶成像仪采集图像。

随后,将上述制备的上清蛋白样品经 15% SDS-PAGE 分离后按照说明书所述方法转印到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 30 分钟;其次采用 EGFP(TBST 1:3 000 稀释)和 GAPDH(TBST 1:500 稀释)单克隆抗体室温共孵育 1.5 小时,TBST 室温洗膜三次(10 分钟/次);然后采用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(TBST 1:5 000 稀释)室温孵育 30 分钟,TBST 室温洗膜三次(10 分钟/次);最后采用 ECL 化学发光检测试剂盒显影并扫描,以 pET28b 和 pET28b-TAT 为空载体对照。

1.2.4 N2 株系线虫的饲喂及荧光显微镜观察 将诱导表达 TAT-EGFP 和 EGFP 融合蛋白的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌体细胞涂布到 LB 平皿中,待其室温稍干后置于 20℃ 生化培养箱培养 72 小时待大量克隆长出,挑取 N2 株系线虫 20 只于 20℃ 生化培养箱培养并采用荧光

显微镜观察 TAT-EGFP 和 EGFP 荧光信号在线虫体内分布,并于饲喂第 48 小时采集荧光图像和微分干涉图像,最后通过图像合并技术观察 TAT-EGFP 和 EGFP 融合蛋白在线虫体内的分布情况,以 pET28b 和 pET28b-TAT 为空载体对照。

2 结 果

2.1 原核表达载体 pET28b-EGFP 的构建

大量研究数据表明 TAT 蛋白转导肽具有显著的外源蛋白跨膜转导作用,为明确其介导的线虫体内外源蛋白的跨膜转导作用,以 EGFP 为报告基因并采用常规分子克隆方法构建了原核表达载体 pET28b-EGFP,进一步通过酶切和直接测序鉴定上述原核表达载体构建正确(图 1)。

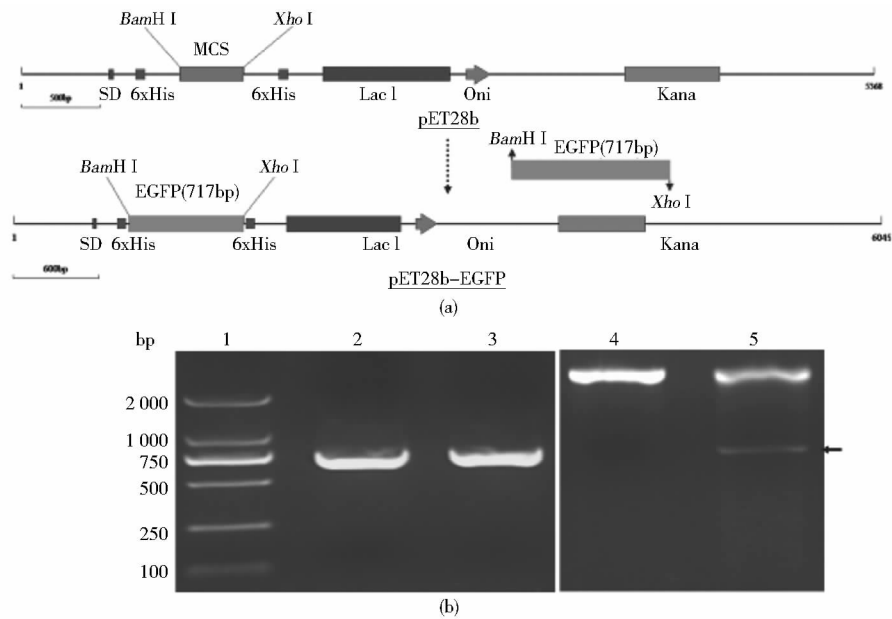


图 1 原核表达载体 pET28b-EGFP 构建示意图及鉴定

**Fig. 1 Schematic diagram of the construction of prokaryotic expression vectors pET28b-EGFP and its identification**  
(a) Schematic diagram of prokaryotic expression vectors pET28b-EGFP construction (b) Identification of prokaryotic expression vectors pET28b-EGFP. 1: DL2000 DNA marker; 2: PCR product of the EGFP DNA fragment; 3: *Bam*H I and *Xho* I double digestion of EGFP DNA fragment; 4: *Bam*H I and *Xho* I double digestion of the pET28b plasmid; 5: *Bam*H I and *Xho* I double digestion identification of pET28b-EGFP, the arrow indicated the EGFP digested DNA fragment

2.2 诱导表达菌体荧光显微镜观察及蛋白表达水平检测

在 TAT-EGFP 和 EGFP 蛋白诱导表达过程,肉眼可见明显的绿色荧光信号,且随诱导表达时间的增加而增加。为深入揭示 TAT-EGFP 和 EGFP 蛋白绿色荧光

信号在大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中的分布情况,将诱导表达第 2 小时、4 小时和第 6 小时的菌体细胞采用 10μl 接种环均匀地涂布到干净的载玻片上,自然风干后采用荧光显微镜观察菌体细胞的荧光信号(以 pET28b 和 pET28b-TAT 菌体细胞为空载体对照)。如

图2所示,随着诱导表达时间的增加,TAT-EGFP和EGFP菌体细胞中荧光信号明显增强,而空载体对照组未见任何荧光信号。同时,在诱导表达2小时,TAT-EGFP显示微弱的荧光信号,而EGFP未见荧光信号;诱导表达4小时,TAT-EGFP显示明显的荧光信号,而EGFP的荧光信号也有所增强;诱导表达6小时,TAT-EGFP和EGFP的荧光信号都进一步增强。整个诱导表达过程中TAT-EGFP的荧光信号一直强于EGFP,与先前报道一致<sup>[17]</sup>。

以前的工作显示TAT蛋白转导肽能够显著促进外源蛋白高效可溶性表达,因而直接制备了表达产物的上清蛋白进行15% SDS-PAGE和Western blot检测(图3)。SDS-PAGE鉴定结果显示,随着诱导表达时间的增

加,TAT-EGFP和EGFP蛋白的表达量明显增加,且TAT-EGFP的表达量明显高于EGFP,空载体对照组(以pET28b和pET28b-TAT为空载体对照)在相应位置未见蛋白带;Western blot鉴定显示了相同的结果,即随着诱导表达时间的增加,TAT-EGFP和EGFP蛋白的表达量明显增加,且TAT-EGFP的表达量明显高于EGFP,空载体对照组(以pET28b和pET28b-TAT为空载体对照)在相应靶蛋白位置未见任何蛋白带(以GAPDH为内标)。由此可见,研究实现了TAT-EGFP和EGFP蛋白体外表达,且TAT-EGFP融合蛋白较之于EGFP可高效、可溶性表达,为进一步研究TAT蛋白转导肽介导的线虫体内跨膜转导奠定了基础。

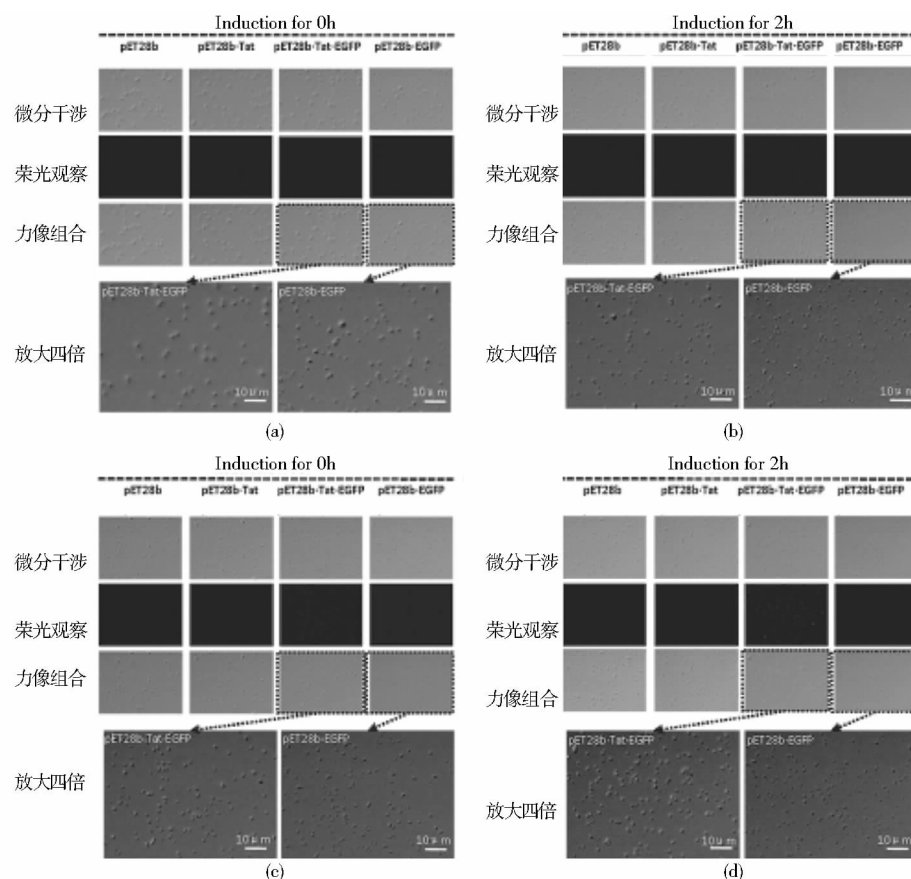


图2 荧光显微镜观察不同诱导时间菌体细胞荧光信号

Fig. 2 Fluorescence microscopy observation of the fluorescence signal in bacterial cells

The figures were displaying the detection of the fluorescence signal in bacterial cells for different time: 0h(a), 2h(b), 4h(c) and 6h(d)

### 2.3 TAT蛋白转导肽介导的线虫体内跨膜转导

微生物大肠杆菌是线虫的主要食物来源,如果通过直接喂饲能够表达TAT-EGFP蛋白的大肠杆菌细胞,通过肠道代谢吸收是否可以观察到TAT-EGFP在

线虫体内的分布变化?为验证这一假设,首先将上述鉴定表达TAT-EGFP和EGFP蛋白的菌体细胞涂布到LB固体培养基,然后挑取N2株系线虫20只并于生化培养箱中培养,最后采用荧光显微镜观察TAT-EGFP和

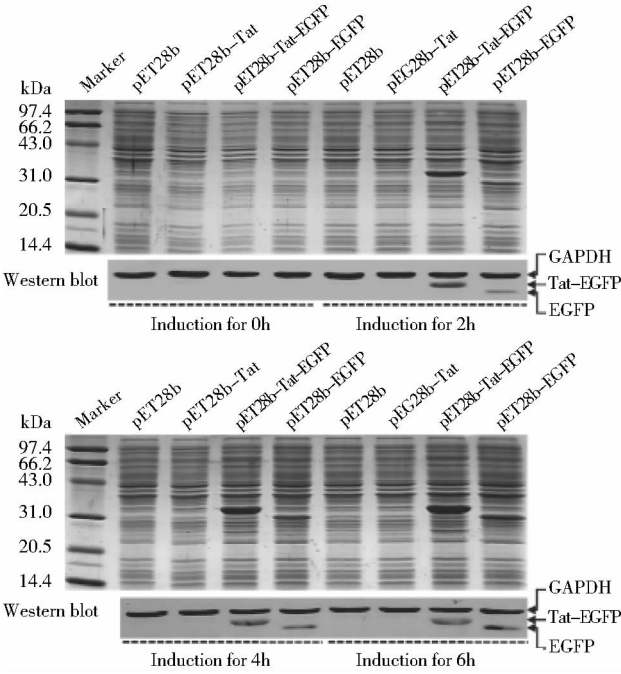


图3 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定蛋白表达  
Fig. 3 Assay of the expression level of target proteins

The arrows indicated the protein bands  
of GAPDH, Tat-EGFP and EGFP

EGFP 荧光信号在线虫体内分布变化并采集荧光图像和微分干涉图像(图4)。通过直接饲喂秀丽线虫表达靶蛋白的大肠杆菌细胞 48 小时后,TAT-EGFP 荧光信号明显分布于线虫肠壁细胞,而 EGFP 荧光信号则分布在秀丽线虫肠腔,空载体对照组未见任何荧光信号,说明 TAT 蛋白转导肽能够高效介导外源蛋白在秀丽线虫体内跨膜转导。同时,通过比较空载体对照组与实验组线虫微分干涉图像未见其出现明显的细胞形态变化,由此说明 TAT 蛋白转导肽具有相对安全的跨膜转导作用,能够介导外源蛋白跨膜转导进入线虫肠壁细胞,为 TAT 蛋白转导肽药用功能的开发奠定了基础。

3 讨论

TAT 蛋白转导现象最早分别由 Green 等<sup>[7]</sup>和 Frankel 等<sup>[8]</sup>于 1988 年在 Cell 同期报道,通过直接给予外源 TAT 蛋白,发现其能够通过 HeLa 细胞的细胞膜而反式激活 HIV-1 长末端重复序列操纵的氯霉素乙酰转移酶 mRNA 的转录;其中位于 TAT 蛋白转导肽 47~57 位富含碱性氨基酸、带正电荷的核心肽段是其跨膜转导的功能区,在外源蛋白跨膜转导中起着十分重要的作用<sup>[4]</sup>。通过改造和重组该核心肽段中碱性氨基酸的

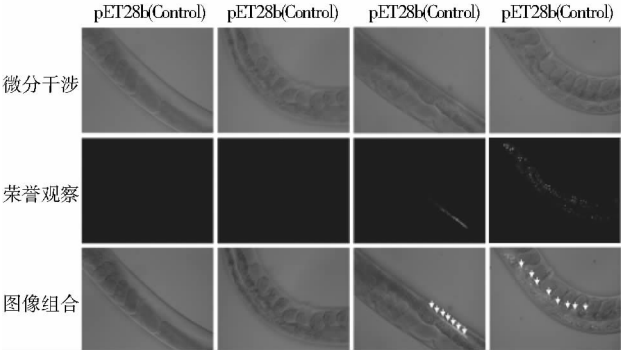


图4 荧光显微镜观察 TAT-EGFP 和 EGFP 蛋白荧光信号在线虫体内分布变化  
Fig. 4 Fluorescence microscopy viewing of the distribution of TAT-EGFP and EGFP in *C. elegans*

The arrows indicated the location of TAT-EGFP and EGFP

数目和荷电性为 TAT 蛋白转导肽介导的外源生物大分子跨膜转导提供了重要依据,但 TAT 蛋白转导肽介导的外源生物大分子跨膜转导是一个多因素、多层次共同控制的过程,其介导生物大分子的跨膜转导作用的机制依然不明。目前,TAT 蛋白转导肽跨膜转导作用的研究主要围绕此核心肽段展开。

虽然 TAT 蛋白转导作用的机制依然是一个谜,但 TAT 蛋白转导肽介导外源蛋白跨膜转导的优点不言而喻,不仅克服了目前常规外源生物大分子跨膜转导技术的缺点和不足,而且因其安全、高效、直接的特点已经被广泛地应用于基础医学和药物研发等多个领域。长期的研究揭示 TAT 蛋白转导肽能够介导多种外源生物大分子安全高效地跨膜转导进入各种膜性结构,如蛋白质、多肽、寡核苷酸、脂质体和颗粒性物质等,其介导的蛋白分子量分别从 10kDa 到 120kDa 不等<sup>[18-20]</sup>。为了明确 TAT 蛋白转导肽在介导线虫体内外源蛋白跨膜转导的作用,以 EGFP 为报告基因构建及重组高效可溶性表达了 TAT-EGFP 和 EGFP 蛋白,进一步将表达 TAT-EGFP 和 EGFP 蛋白的菌体细胞直接饲喂 N2 株系线虫,结果发现通过直接饲喂秀丽线虫表达靶蛋白的大肠杆菌细胞 48 小时后,TAT-EGFP 荧光信号明显分布于线虫肠壁细胞,而 EGFP 荧光信号则分布在秀丽线虫肠腔,空载体对照组未见任何荧光信号,说明 TAT 蛋白转导肽能够高效介导外源蛋白在秀丽线虫体内跨膜转导。同时,通过比较对照组与实验组线虫微分干涉图像未见其出现明显的细胞形态变化,由此说明 TAT 蛋白转导肽具有相对安全的跨膜转导作用,能够介导

外源蛋白跨膜转导进入线虫肠壁细胞,为 TAT 蛋白转导肽药用功能的开发奠定了基础。

综上所述,不仅实现了 TAT-EGFP 和 EGFP 蛋白体外表达,而且研究了 TAT 蛋白转导肽介导的线虫体内跨膜转导作用,为深入研究 TAT 蛋白转导肽的功能及其可能的跨膜转导机制奠定了基础。

### 参考文献

- [ 1 ] Greer E L, Maures T J, Hauswirth A G, et al. Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature*, 2010, 466(7304):383-387.
- [ 2 ] Rieckher M, Kourtis N, Pasparaki A, et al. Transgenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol.* 2009, 561(1):21-39.
- [ 3 ] Shyu Y J, Hiatt S M, Duren H M, et al. Visualization of protein interactions in living *Caenorhabditis elegans* using bimolecular fluorescence complementation analysis. *Nat Protoc*, 2008, 3(4):588-596.
- [ 4 ] 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(25):16010-16017.
- [ 5 ] Palm-Apergi C, Eguchi A, Dowdy S F. PTD-DRBD siRNA delivery. *Methods Mol Biol*, 2011, 683(4):339-347.
- [ 6 ] 吴永红, 张成岗. HIV-1 TAT 蛋白转导肽的研究进展, 中国生物工程杂志, 2010, 30(10):1006-1014.  
Wu Y, Zhang C. *China Biotechnology*, 2010, 30(10):1006-1014.
- [ 7 ] Green M, Loewenstein P M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat transactivator protein. *Cell*, 1988, 55(6):1179-1188.
- [ 8 ] Frankel A D, Pabo C O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988, 55(6):1189-1193.
- [ 9 ] Derossi D, Joliet A H, Chassaing G. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 1994, 269(14):10444-10450.
- [ 10 ] Han K, Jeon M J, Kim S H. Efficient intracellular delivery of an exogenous protein GFP with genetically fused basic oligopeptides. *Mol Cells*, 2001, 12(2):267-271.
- [ 11 ] Jin L H, Bahn J H, Eum W S, et al. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(11):1509-1519.
- [ 12 ] Park J, Ryu J, Jin L H, et al. 9-polylysine protein transduction domain: enhanced penetration efficiency of superoxide dismutase into mammalian cells and skin. *Mol Cells*, 2002, 13(2):202-208.
- [ 13 ] Schwarze S R, Dowdy S F. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 21(11):45-48.
- [ 14 ] Rapoport M, Salman L, Sabag O, et al. Successful TAT-mediated enzyme replacement therapy in a mouse model of mitochondrial E3 deficiency. *J Mol Med*, 2010 Nov 16. [Epub ahead of print].
- [ 15 ] Muniz L, Egloff S, Ughy B, et al. Controlling cellular P-TEFb activity by the HIV-1 transcriptional transactivator Tat. *PLoS Pathog*, 2010, 6(10):e1001152.
- [ 16 ] 陈菁, 刘树滔, 饶平凡, 等. PTD-Tat 之 C 端融合在活体体内的跨膜递送作用. 福州大学学报, 2006, 34(2):301-304.  
Chen J, Liu S T, Rao P F, et al. *Journal of Fuzhou University*, 2006, 34(2):301-304.
- [ 17 ] Wu Y H, Ren C H, Gao Y et al. A novel method for promoting heterologous protein expression in *Escherichia coli* by fusion with the HIV-1 TAT core domain. *Amino Acids*, 2010, 39(3):811-820.
- [ 18 ] Fawell S, Seery J, Daikh Y, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(2):664-668.
- [ 19 ] Torchilin V P, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(15):8786-8791.
- [ 20 ] Lewin M, Carlesso N, Tung C H, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4):410-414.

## TAT Protein Transduction Peptide Mediated Heterologous Proteins Transduction in *C. elegans*

WU Yong-hong<sup>1</sup> SHI Jin-ping<sup>1,2</sup> HE Guo-wei<sup>1</sup> REN Chang-hong<sup>1</sup> GAO Yan<sup>1</sup> ZHANG Cheng-gang<sup>1,2</sup>

(1 Beijing Institute of Radiation Medicine, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing 100850, China)

(2 Department of Biology, Anhui Medical University, Anhui 230032, China)

**Abstract** The TAT protein transduction peptide was enriched in basic amino acids and encoded by the HIV-1 virus. Previous studies have revealed that it could safely and efficiently mediate various heterologous biological macromolecules across a variety of biomembranes, such as the plasmid membrane and the blood-brain barrier et al. To further study its function in mediating heterologous proteins transduction in nematode *in vivo*, the prokaryotic expression vector pET28b-EGFP and pET28b-TAT-EGFP were constructed and induced by IPTG (final concentration 1 mmol/L), followed with the analysis on the expressed protein by fluorescence microscopy, SDS-PAGE and Western blot. Subsequently, the bacterial cells were coated to the LB medium and directly fed to the nematodes followed with capturing the image at 48 h. Results showed when fed to the nematodes for 48 h, the TAT-EGFP fluorescence signals were clearly distributed in the intestinal cells of the worm, while the EGFP fluorescence signals were mainly distributed in the intestinal cavity of the animal. Furthermore, the cellular morphology of TAT-EGFP had no distinct change compared with the EGFP group and controls. Taken together, the data suggested the TAT protein transduction peptide could mediate heterologous protein expression in *C. elegans* and provided an alternative approach for development of new drug transporter.

**Key words** TAT protein transduction peptide Prokaryotic expression *C. elegans* Transmembrane transduction

### 姜老师信箱

蛋白质研讨班学员问:

姜老师,您好!我的主要工作之一是分离蛋白,尤其是未知蛋白,目前我遇到了一个问题想向您请教。我分离到了一个蛋白,无论从分离过程到回收重复都没有问题,但在鉴定上遇到了困难。我测了蛋白 N 端 15 个氨基酸序列,然后到 NCBI 上 BLAST 搜索,结果出来很多,而且不尽相同,于是我又做了酶解质谱鉴定,搜索数据库得到一个阳性结果,却和 N 端测序结果不一样。恳请姜老师指导一下如何确定这个蛋白的身份。谢谢您!

姜老师答:

学员,你好!首先祝贺你获得了纯蛋白。关于新蛋白质的测序和鉴定,有标准方案,基本内容如下:

蛋白质的化学鉴定最终是测序,N 端测 15 个氨基酸残基如果还无法确定的话,可以继续测,足够纯度的蛋白可以测到 50 个,甚至 70 个残基。其次,如果质谱数据库没有收录,表明这很可能就是一个新蛋白,需要在加长 N 端测序的同时(测到读不准为止)做肽谱。使用 BrCN 和胰蛋白酶等测序用切割工具,获得两种以上的 HPLC 肽谱,将切割获得的各个肽段进行测序,然后利用不同的两套肽谱重叠推测,构建出整个序列。如果发生肽段回收不全的情况还要借助第三套肽谱。另外,手工从 C 端也要测序,大概可以测 3-7 个氨基酸残基,这对于鉴定蛋白非常重要。在胰蛋白酶(工具酶,很纯)处理之前,可以先测定这个蛋白的氨基酸组成:获得赖氨酸和精氨酸的个数,以推断酶解后的多肽数量;获得蛋氨酸的个数,以确定 BrCN 切割后的多肽数量。

最后,祝实验顺利!