

## 研究论文

# TAT细胞穿透肽融合小鼠SurvivinT34A重组蛋白的原核表达纯化及其细胞转导效能研究

于海涛<sup>1,2</sup> 陈科达<sup>2</sup> 倪崖<sup>1,2</sup> 阎辉<sup>2\*</sup><sup>1</sup>温州医学院检验医学院, 温州 325035; <sup>2</sup>浙江省医学科学院, 杭州 310013)

**摘要** 为研究细胞穿透肽TAT融合小鼠存活素T34A (survivinT34A)重组蛋白(TAT-msvT34A)转导细胞的效能, 该实验将表达TAT-msvT34A的原核表达载体pTAT-msvT34A转化大肠杆菌表达株*E.coli* BL21(DE3), 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导, 表达的融合蛋白主要以包涵体形式存在。通过亲和层析、离子交换柱层析、分子筛等步骤纯化, 得到TAT-msvT34A融合蛋白的纯度可达98%。纯化的融合蛋白用异硫氰酸荧光素(FITC)标记(FITC-TAT-msvT34A)后, 分别转导HepG2、TC-1、B16及HEK293细胞株, 流式细胞仪检测显示, 较低浓度的重组蛋白即对HepG2、TC-1、B16及HEK293等细胞株具有较高的转导效能, 在100 nmol/L时的转导效率均可达到60%以上, 作为对照, FITC标记的牛血清白蛋白(FITC-BSA)在100 nmol/L时对上述细胞株的转导效率极低, 结果具有显著性差异( $P<0.01$ )。荧光显微镜观察可见, 50 nmol/L和100 nmol/L的TAT-msvT34A融合蛋白对HepG2细胞的转导效率均可达50%, 而对照FITC-BSA对HepG2细胞几乎无转导。表达纯化的TAT-msvT34A融合蛋白对HepG2、TC-1、B16及HEK293等细胞株均有较高的转导效能, 可以用于后续抗肿瘤研究。

**关键词** 抑存活素; TAT细胞穿透肽; 原核表达; 凋亡; 肿瘤

蛋白质转导技术<sup>[1]</sup>是将目的蛋白与一段“蛋白转导域”(或称“细胞穿透肽”)在分子水平连接, 构成融合蛋白, 这样的融合蛋白能自动穿过细胞膜进入细胞内, 而毋需任何其它辅助试剂。目前研究得最为深入的是衍生于艾滋病毒(HIV)的TAT(trans-activator transcription)细胞穿透肽<sup>[2]</sup>, 它是含有11个氨基酸的多肽, 其通过细胞巨胞饮作用迅速将目的蛋白转导进入细胞, 而无明显细胞毒性。

存活素(survivin)是凋亡抑制蛋白(IAP)家族中的重要成员。1997年, 耶鲁大学的Altieri研究组<sup>[3-4]</sup>发现, 其特异性表达于多数人类肿瘤细胞及人的胚胎发育组织, 在正常成年组织不表达或仅低水平表达<sup>[5]</sup>。存活素基因表达在转录水平受到p53基因的抑制, p53蛋白功能丢失, 存活素基因复制增加<sup>[6]</sup>、外显子去甲基化<sup>[7]</sup>、启动子活性增强<sup>[8]</sup>等机制将解除p53对其转录的抑制。早期研究认为, 存活素可能主要是通过直接或间接抑制凋亡终末效应分子caspase-3和caspase-7的活性, 阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过

程, 抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。然而, 近几年的研究表明, 存活素与癌症的关系并不仅限于抑制细胞凋亡, 除了可以调控有丝分裂纺锤体检查点, 使纺锤体缺陷的细胞继续进行分裂直接参与肿瘤形成之外<sup>[10-11]</sup>, 存活素还参与肿瘤血管发生<sup>[12]</sup>, 并与肿瘤化疗耐药有关<sup>[13-14]</sup>。存活素在肿瘤的发生、发展以及肿瘤抗药性中起重要作用, 已经成为倍受关注的抗肿瘤治疗的新靶点<sup>[15]</sup>。

大量实验研究已经证明, 抑制存活素能够诱导肿瘤细胞凋亡, 迄今已有多种方法: 反义核酸和核酶方法<sup>[16]</sup>、核酶法<sup>[17]</sup>、RNA干扰<sup>[18]</sup>等, 除了核酸水平上的抑制方法外, 还有采用存活素的“显性性状缺失的突变体(dominant-negative mutant)”干扰细胞内源性野生型存活素的功能, 从而产生抑制效应。存活素T34A突变体即一种“显性性状缺失的突变体”,

收稿日期: 2010-12-30 接受日期: 2011-04-09

国家自然科学基金(No.30873024)和浙江省科技厅重大科技专项(No.2008C13031-1)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0571-88215439, E-mail: yanh98@hotmail.com

它将存活素分子内第34位的苏氨酸残基(T)突变成丙氨酸残基(A),破坏其保守的磷酸化位点<sup>[19]</sup>,非磷酸化的T34A突变体与细胞内源性存活素竞争与激酶的作用,对后者产生竞争性抑制,使野生型存活素不能有效磷酸化。由于存活素的磷酸化是它与凋亡蛋白酶-9(caspase-9)连接抑制所必需的,故外源性存活素T34A突变体的引入不利于内源性野生型存活素与凋亡蛋白酶-9的连接,解除对这一活性酶的抑制,从而启动凋亡过程。

本研究将表达细胞穿透肽TAT与小鼠存活素T34A突变体融合基因的原核表达质粒pTAT-msv-T34A转化到大肠杆菌表达菌株,诱导表达融合蛋白TAT-msvT34A,经纯化后转导人肝癌细胞HepG2、小鼠肺上皮细胞TC-1、小鼠黑色素瘤细胞B16以及人胚肾细胞HEK293等细胞株,观察融合蛋白转导细胞的效率,为后续抗肿瘤研究提供材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

表达质粒pTAT-HA<sup>[20]</sup>由美国加州大学Dowdy博士惠赠,包含编码小鼠存活素T34A突变体cDNA的质粒pTAT-msvT34A由阎辉博士构建,HepG2、TC-1、B16及HEK293细胞株由本实验室保存,*E.coli* BL21(DE3)菌株购自Novagen公司,Ni-NTA Agarose购自Qiagen公司,HiTrap QFF 1 mL离子层析柱、HiTrap 5 mL脱盐柱购自GE公司,DAPI染色试剂盒购于凯基生物公司,蛋白质分子量标准购自NEB公司,ECL显色液、FITC荧光标记试剂盒购自Pierce Biotechnology公司,牛血清白蛋白(BSA)、LB培养基购自上海生物工程公司,兔抗存活素多克隆抗体、HRP标记的羊抗兔IgG抗体均购于武汉博士德公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒、考马斯亮蓝G-250染色液、脱色液购自碧云天公司。

### 1.2 主要仪器

二氧化碳细胞培养箱(Sanyo,日本),蛋白电泳系统(Bio-rad,美国),荧光倒置显微镜(Leica,德国),流式细胞仪(BD,美国),高速冷冻离心机(Backman,美国)。

### 1.3 TAT-msvT34A融合蛋白的表达鉴定

将表达质粒pTAT-HA、pTAT-msvT34A转化大肠杆菌表达株BL21(DE3)感受态细胞,挑取转化pTAT-msvT34A质粒平板上的6个单克隆菌落、转化pTAT-HA质粒平板上1个单克隆菌落,接种于2 mL含100 μg/mL氨苄青霉素LB液体培养基,37 °C摇床

200 r/min,培养过夜。次日早上将培养的菌株按1:100转接于4 mL含100 μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 °C摇床200 r/min,37 °C培养4 h(OD值约0.6),取200 μL菌液离心,沉淀中加入30 μL SDS-PAGE电泳上样缓冲液,作为诱导前对照。剩余的菌液中添加IPTG至终浓度为1 mmol/L,30 °C摇床200 r/min继续培养10 h,各取诱导后菌液100 μL离心弃上清,沉淀中加入30 μL SDS-PAGE电泳上样缓冲液。将诱导前后样本煮沸10 min,各取15 μL进行SDS-PAGE电泳,将电泳胶在300 mA、冰浴转硝酸纤维素膜上进行120 min,5%脱脂牛奶37 °C封闭30 min,封闭液为1:400稀释兔抗存活素多克隆抗体,4 °C孵育硝酸纤维素膜过夜,TBST洗膜4次,每次5 min,封闭液为1:2 000稀释HRP标记羊抗兔IgG抗体,37 °C孵育1 h,TBST洗膜4次,每次5 min,ECL显色液显色,暗室压片成像。

### 1.4 重组蛋白的纯化

将表达目的蛋白较高的菌株扩大培养至1 L含100 μg/mL氨苄青霉素LB液体培养基中,200 r/min,37 °C培养4 h后添加IPTG至终浓度为1 mmol/L,30 °C继续培养10 h,离心弃上清,沉淀用PBS缓冲液洗涤2次,加入10 mL菌体裂解液(100 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,10 mmol/L Tris-HCl,8 mol/L Urea,pH8.0),冰浴超声(功率400 W,超声10 s,间歇10 s,10 min),4 °C 10 000 r/min离心20 min,取上清,按照QIAGEN公司the QIAexpressionist TM蛋白纯化系统说明书纯化,并做如下改进:将菌体裂解液与Ni-NTA琼脂糖颗粒按5:(1.5~2)体积比在4 °C混匀孵育2 h,1 000 r/min离心,用洗涤液(裂解液pH调至6.3)洗涤沉淀2次,然后依次用洗脱液I(裂解液pH调至4.5)、洗脱液II(裂解液中加入咪唑至250 mmol/L,pH4.5)、洗脱液III(裂解液中加入咪唑至500 mmol/L,pH4.5)洗脱融合蛋白,分别取3次洗脱液做SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色观察蛋白洗脱情况,将含有目的蛋白的洗脱液混合。

用20 mmol/L Hepes溶液稀释上述亲和层析纯化的蛋白洗脱液至Na<sup>+</sup>浓度为50 mmol/L、尿素浓度为4 mol/L,过HiTrap QFF离子层析柱,先用洗涤液A(50 mmol/L NaCl,20 mmol/L Hepes,pH8.0)洗涤2次,再用洗涤液B(500 mmol/L NaCl,20 mmol/L Hepes,pH8.0)洗涤2次,最后用洗脱液(1.6 mmol/L NaCl,20 mmol/L Hepes,pH8.0)洗脱目的蛋白。

用含10%甘油的PBS平衡HiTrap脱盐柱,然后将离子交换纯化洗脱的蛋白溶液通过脱盐柱,用含10%甘油的PBS洗脱,0.22 μm过滤器过滤除菌,-70 °C

冻存。分别取菌体裂解液与亲和层析、离子交换层析、分子筛等纯化步骤的洗脱液各5  $\mu$ L, 加入等体积蛋白电泳上样缓冲液, 进行SDS-PAGE电泳, 考马斯亮蓝染色, 充分脱色后, 利用BandScan凝胶图像分析软件分析计算每一步纯化所得目的蛋白的纯度。

### 1.5 FITC标记融合蛋白及其转导实验

参照厂商说明书, FITC分别与纯化的融合蛋白、BSA按摩尔比15:1的比例在pH8.0硼酸盐缓冲液中室温标记1 h, HiTrap脱盐柱去除未结合的FITC, 将标记的融合蛋白、BSA分别命名为FITC-TAT-msvT34A和FITC-BSA。将处于指数生长期的HepG2、TC-1、B16、HEK293细胞传代于24孔板, 待细胞汇合度达90%时, 加入FITC-TAT-msvT34A蛋白, 使其终浓度分别为50 nmol/L和100 nmol/L, 每个浓度做4个复孔, 同时设空白对照和100 nmol/L的FITC-BSA对照, 每种处理做4个复孔, 37  $^{\circ}$ C继续培养30 min。将每株细胞的各处理组中的3个复孔吸去培养液, 无钙镁溶液洗涤2次, 0.25%胰蛋白酶消化, PBS洗涤3次, 重悬, 流式细胞仪FITC通道检测荧光细胞百分比。另一复孔细胞PBS洗涤3次, DAPI染色后荧光显微镜观察照相。

### 1.6 统计方法

采用GraphPad Prism软件进行数据分析, 实验结果以means $\pm$ SD表示, 显著性检验采用 $t$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。分别比较不同浓度融合蛋白转导HepG2、TC-1、B16、HEK293等细胞株的效率与对照BSA的转导效率是否有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 TAT-msvT34A分子结构图(图1)

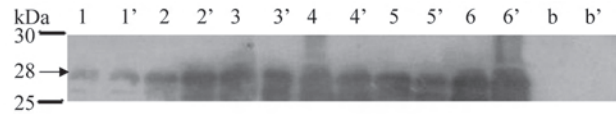


图1 融合蛋白TAT-msvT34A分子结构示意图

Fig.1 Molecular structure of fusion protein TAT-msvT34A

### 2.2 TAT-msvT34A融合蛋白的表达鉴定

Western blot结果显示, 约28 kDa处出现了特异性条带, 各菌株诱导表达前后均有表达, 但诱导后目的蛋白表达量高于诱导前(图2)。



转化了质粒pTAT-msvT34A的6个菌株(1~6)和转化了质粒pTAT-HA的1个菌株(b)在37  $^{\circ}$ C含IPTG的培养液中诱导培养4 h(1~6), 之后在30  $^{\circ}$ C用IPTG诱导培养10 h(1'~6', b'), 分别取样电泳。一抗为兔抗小鼠存活素多克隆抗体, 二抗为HRP标记的羊抗兔IgG抗体, 在28 kDa大小位置可见一特异性条带。

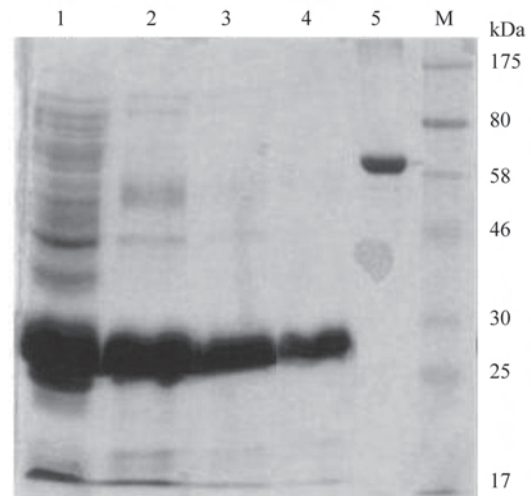
Bacterial colonies containing vector pTAT-msvT34A (1~6) and bacterial colony containing vector pTAT-HA (b) were cultured for 4 hours at 37  $^{\circ}$ C, and then were induced with IPTG for 10 hours (1'~6', b') at 30  $^{\circ}$ C. The primary antibody was rabbit anti-mouse survivin polyclonal antibody and secondary antibody was goat anti-rabbit IgG-HRP, and the positive band was visible at about 28 kDa.

图2 Western blot检测TAT-msvT34A融合蛋白的表达

Fig.2 Screening of the expression of TAT-msvT34A fusion protein in *E. coli* by Western blot

### 2.3 目的蛋白的纯化

融合蛋白纯化后经SDS-PAGE蛋白电泳、考马斯亮蓝染色后如图3所示, 可见在28 kDa大小位置有特异条带, 用BandScan软件分析计算亲和层析、离



1: 表达TAT-msvT34A融合蛋白的菌裂解液; 2: 亲和层析纯化后的融合蛋白; 3: 采用离子交换层析柱HiTrap QFF纯化的融合蛋白; 4: 经HiTrap脱盐柱进一步纯化后的融合蛋白; 5: BSA对照; M: 蛋白质分子量标记。

1: the TAT-msvT34A proteins expressed in *E. coli* sonicated lysates; 2: fusion protein purified by affinity chromatography; 3: fusion protein purified by HiTrap QFF column; 4: fusion protein purified by HiTrap desalting column; 5: BSA; M: protein molecular weights marker.

图3 TAT-msvT34A融合纯化蛋白SDS-PAGE电泳图片

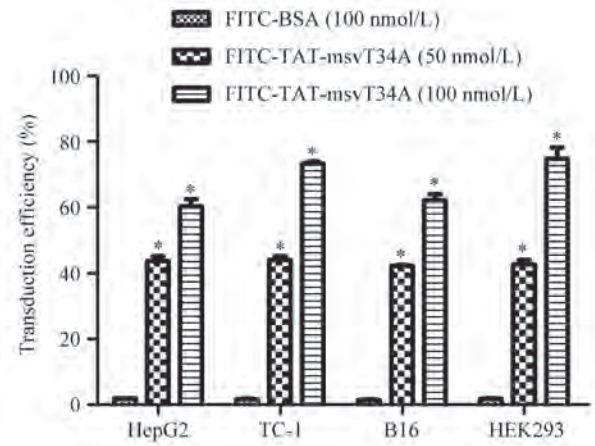
Fig.3 Coomassie-stained SDS-PAGE gel showing purification of TAT-msvT34A protein



子交层析、分子筛层析等步骤纯化后蛋白样品的纯度,分别可达79%、92%、98%,用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测最终纯化的目的蛋白浓度可达6 mg/mL,经计算1 L菌液经诱导表达,最终可纯化出目的蛋白约80 mg。

#### 2.4 FITC标记融合蛋白转导细胞效能检测

流式细胞仪检测显示, FITC-TAT-msvT34A在50 nmol/L和100 nmol/L浓度转导HepG2、TC-1、B16及HEK293等细胞株的效率分别可达40%和60%以上,而对照FITC-BSA在100 nmol/L转导细胞的效率小于2%(表1、图4)。统计分析显示,不同浓度融合蛋白对同一细胞的转导效率与对照组相比有统计学差异( $P<0.01$ )。流式细胞仪检测50 nmol/L和100 nmol/L FITC-TAT-msvT34A对HepG2、TC-1细胞株转导效率与对照组相比叠加如图见(图5)。荧光显微镜检测显示:50 nmol/L、100 nmol/L的FITC-TAT-msvT34A处理



\* $P<0.01$ 与FITC-BSA对照相比较。

\* $P<0.01$  vs FITC-BSA.

图4 融合蛋白对HepG2、TC-1、B16和HEK293细胞的转导效率

Fig.4 The transduction efficiency of the fusion protein in HepG2, TC-1, B16 and HEK293 cells

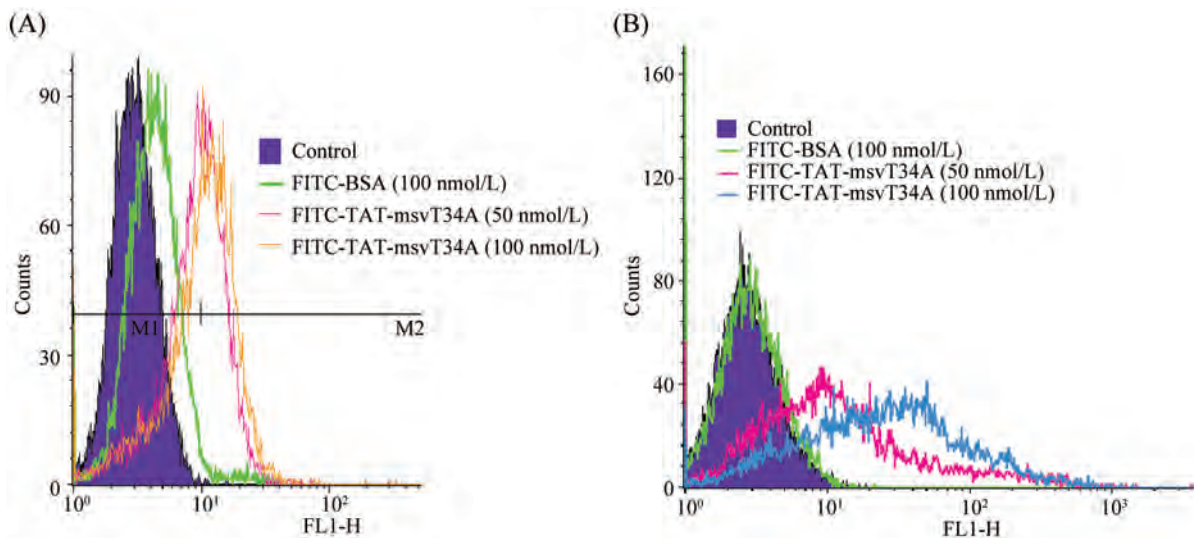
表1 融合蛋白转导细胞效率的流式细胞仪检测

Table 1 Transduction efficiency of fusion protein to cells tested by flow cytometry

蛋白种类 Types of proteins	转导效率 Transduction efficiency			
	HepG2细胞 HepG2 cells	TC-1细胞 TC-1 cells	B16细胞 B16 cells	HEK293细胞 HEK293 cells
FITC-BSA(100 nmol/L)	1.88±0.08	1.63±0.11	1.40±0.17	1.73±0.20
FITC-TAT-msvT34A(50 nmol/L)	43.80±2.51*	44.09±2.03*	42.27±0.43*	42.71±2.44*
FITC-TAT-msvT34A(100 nmol/L)	60.26±3.93*	73.31±1.19*	62.16±3.13*	74.82±5.89*

\* $P<0.01$ 与FITC-BSA对照相比较。

\* $P<0.01$  vs FITC-BSA.



A: 融合蛋白对HepG2细胞的转导效率; B: 融合蛋白对TC-1细胞的转导效率。

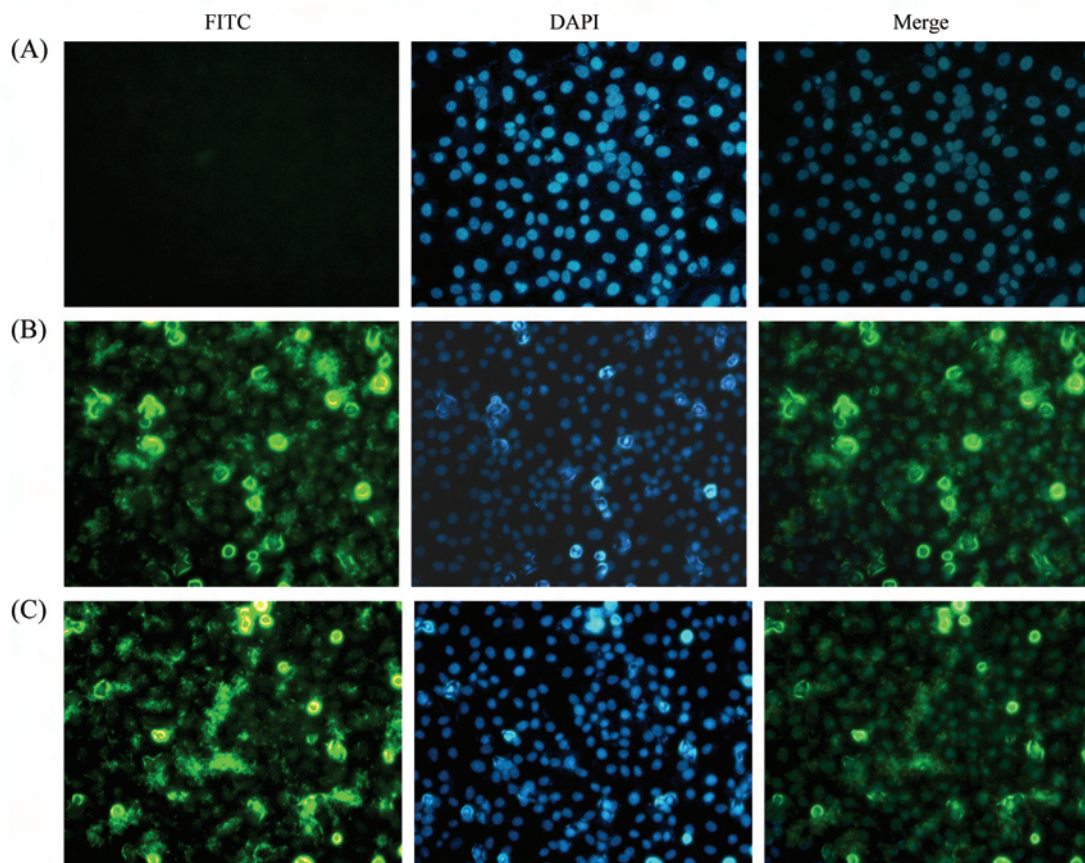
A: the transduction efficiency of fusion protein to HepG2 cells; B: transduction efficiency of fusion protein to TC-1 cells.

图5 流式细胞仪检测融合蛋白对HepG2和TC-1细胞的转导效率

Fig.5 Flow cytometry analysis in the transduction efficiency of fusion protein to HepG2 and TC-1 cells

HepG2细胞株, 绿色荧光细胞百分比可达50%以上; 对照100 nmol/L的FITC-BSA处理组阴性(图6), TC-1、

B16及HEK293细胞株检测结果与HepG2细胞基本一致(结果未列出)。



荧光显微镜观察50 nmol/L(B)和100 nmol/L(C)的TAT-msvT34A融合蛋白处理组具有绿色荧光的细胞可达50%以上, 而对照BSA处理组细胞几乎无绿色荧光(A)。

Fluorescence microscopy showed that the transduction efficiency of TAT-msvT34A to HepG2 cell could reach to 50% at the concentration 50 nmol/L(B) and 100 nmol/L(C), while no transduction was observed in the treatment group with FITC-BSA(A).

图6 荧光显微镜检测TAT-msvT34A融合蛋白转导HepG2细胞的效率

Fig.6 The transduction efficiency of the fusion protein TAT-msvT34A assayed by fluorescence microscopy

### 3 讨论

随着细胞凋亡机制的逐渐阐明, 细胞凋亡与肿瘤治疗的关系日益受到重视, 诱导肿瘤细胞凋亡已成为目前肿瘤治疗研究的热点。近年来利用基因工程制备特异性杀伤肿瘤细胞的重组蛋白是目前抗肿瘤药物研究的新领域。目前, 肿瘤生物治疗研究和临床实践中还存在很多问题, 如何将目的基因或蛋白质等治疗材料有效地透过细胞膜传送到细胞内, 这往往是整个治疗过程的限速“瓶颈”。因为真核细胞经过亿万年进化, 形成的浆膜乃有效屏障, 能阻拦生物大分子的自由出入(仅分子量<500 Da的非极性分子允许被动进入)。当前导入外源基因的方法

有病毒载体法(如腺病毒载体法)<sup>[21]</sup>和非病毒载体法(如脂质体转染法)<sup>[22]</sup>两类。然而, 它们都有一些潜在的问题和固有的局限性。首先, 导入的外源基因必须经过宿主细胞器的转录翻译, 才能产生所期待的治疗蛋白, 受限于具体目的蛋白质本身的内在性质及其调控条件, 不一定能保证蛋白产量在短时内达到治疗所必需的量; 其次, 病毒载体法虽然导入外源基因效率最高, 然而许多病毒载体本身有潜在安全问题, 如病毒基因插入宿主基因组可能诱发突变; 再次, 接种时机体抗病毒免疫排斥载体病毒导致重复使用无效, 以及在免疫缺损患者中造成病毒播散的危险, 等。传统的非病毒载体法虽相对安全, 但这些



方法往往转导效率太低,或不适于活体使用<sup>[23]</sup>。与传统的病毒载体和脂质体转染等方法相比,蛋白质转导技术能通过细胞内吞作用(endocytosis)的方式迅速将目的蛋白转导进入几乎所有类型的细胞而发挥其生物学效应,而无明显细胞毒性。

目前,国内外的研究成果表明,抑制存活素的功能可以诱导肿瘤细胞特异性凋亡。存活素功能在进化上具有保守性,不同物种间的存活素蛋白具有高度同源性。既然存活素功能在进化上具有保守性,那么小鼠的存活素突变体能否作为人存活素分子的拮抗剂诱导人类肿瘤细胞的凋亡是值得研究对。比较众多研究所采用的策略,发现存活素“显性性状缺失的突变体”这一策略具有快速、高效、安全、经济等优点。本研究表达纯化的TAT与存活素T34A融合蛋白正是将蛋白质转导技术与存活素显性性状缺失的突变体两者的优点结合起来,为进一步以存活素为靶点进行抗肿瘤研究提供了材料。

基因工程利用大肠杆菌表达的外源蛋白常以包涵体形式存在,以包涵体形式表达的重组蛋白容易获得较高表达量,且易于纯化,但对于要求复性的蛋白质来说,复性工作非常复杂和困难。TAT-msvT34A融合蛋白同样主要存在于包涵体内,预实验中我们将纯化的融合蛋白进行透析复性,利用FITC标记后转导HepG2细胞,但结果显示,融合蛋白质在50 nmol/L和100 nmol/L对HepG2细胞的转导效率分别仅为11.91%和24.20%(结果未列出)。因而,我们尝试将纯化的非复性蛋白标记后直接用于HepG2细胞转导实验,结果发现同浓度的非复性蛋白的转导效能高于复性蛋白的转导效能。我们将TAT-msvT34A融合蛋白在非复性条件下转导HepG、TC-1、B16和HEK293细胞,较低浓度(100 nmol/L)转导效率即可达60%以上。Dowdy博士等<sup>[24]</sup>的研究表明,多数TAT融合蛋白在非复性条件下对细胞的转导效能要高于其正确折叠的复性蛋白,本实验结果与之吻合。但融合蛋白进入细胞进而发挥其拮抗野生型存活素的功能还有赖于其正确折叠的复性结构。有研究<sup>[25-26]</sup>显示,进入细胞的非复性蛋白可以依赖细胞质内的热激蛋白Hsp90等分子伴侣自动复性,进而发挥生物学效应。但我们表达纯化的融合蛋白进入细胞后能否自动复性,进而干扰细胞内源性存活素的功能及其诱导细胞凋亡的效果还有待后续试验研究进一步证实。

虽然本研究中构建的融合蛋白分为TAT与存活素两部分,但已发表的研究成果采用类似策略构建的融合蛋白的研究显示,具有蛋白转导功能的融合蛋白进入细胞主要依赖TAT细胞穿透肽的功能<sup>[27]</sup>。目前,TAT细胞穿透肽进入细胞的机制还未完全明确,有学者认为细胞穿透肽本身所带的正电荷与细胞膜所带负电荷产生的电荷引力和细胞的巨胞饮作用是其穿膜的主要机制<sup>[1]</sup>。研究证明,TAT的融合蛋白在体内外均能高效的进入细胞<sup>[28]</sup>。本研究提示,TAT-msvT34A融合蛋白在体外具有较高的细胞转导效能,其在体内的细胞转导效果还有待进一步研究。本研究中表达纯化的融合蛋白对HepG2、TC-1、B16和HEK293等四株细胞株均具有较高的转导效能,但不同种类细胞的转导效能略有差异。同时,本实验结果提示,提高细胞培养液中重组蛋白的浓度可提高其细胞转导效能。融合蛋白TAT-msvT34A在非复性的条件下能高效转导细胞,为后续该融合蛋白诱导肿瘤细胞凋亡实验研究奠定了基础。

### 参考文献(References)

- 1 Gump JM, Dowdy SF. TAT transduction: The molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med* 2007; 13(10): 443-8.
- 2 Wadia JS, Dowdy SF. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(4): 579-96.
- 3 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3(8): 917-21.
- 4 Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: What is the significance? *Int J Cancer* 2005; 114(4): 509-12.
- 5 Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S, Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(6): 529-34.
- 6 Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, *et al.* High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000; 19(5): 617-23.
- 7 Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett* 2001; 169(2): 155-64.
- 8 Li F, Altieri DC. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: Characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res* 1999; 59(13):

- 3143-51.
- 9 Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40(4): 1117-23.
- 10 Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22(53): 8581-9.
- 11 Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998; 273(18): 11177-82.
- 12 Harfouche R, Hassessian HM, Guo Y, Faivre V, Srikant CB, Yancopoulos GD, *et al.* Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiotensin-1 on endothelial cells. *Microvasc Res* 2002; 64(1): 135-47.
- 13 Schlette EJ, Medeiros LJ, Goy A, Lai R, Rassidakis GZ. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2004; 22(9): 1682-8.
- 14 Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, *et al.* An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(33): 34087-90.
- 15 Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001; 7(12): 542-7.
- 16 Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; 113(6): 1076-81.
- 17 Pennati M, Binda M, De Cesare M, Pratesi G, Folini M, Citti L, *et al.* Ribozyme-mediated down-regulation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to topotecan *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 2004; 25(7): 1129-36.
- 18 Kappler M, Taubert H, Bartel F, Blumke K, Panian M, Schmidt H, *et al.* Radiosensitization, after a combined treatment of survivin siRNA and irradiation, is correlated with the activation of caspases 3 and 7 in a wt-p53 sarcoma cell line, but not in a mt-p53 sarcoma cell line. *Oncol Rep* 2005; 13(1): 167-72.
- 19 O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, *et al.* Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(24): 13103-7.
- 20 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): 310-5.
- 21 Bouard D, Alazard-Dany D, Cosset FL. Viral vectors: From virology to transgene expression. *Br J pharmacol* 2009; 157(2): 153-65.
- 22 Pathak A, Patnaik S, Gupta KC. Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnol J* 2009; 4(11): 1559-72.
- 23 Flotte TR. Gene therapy: The first two decades and the current state-of-the-art. *J Cell Physiol* 2007; 213(2): 301-5.
- 24 Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* 2001; 24(3): 247-56.
- 25 Gottesman S, Wickner S, Maurizi MR. Protein quality control: Triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* 1997; 11(7): 815-23.
- 26 Schneider C, Sepp-Lorenzino L, Nimmesgern E, Ouerfelli O, Danishefsky S, Rosen N, *et al.* Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(25): 14536-41.
- 27 Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: Unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol* 2000; 10(7): 290-5.
- 28 Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, *et al.* Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* 1998; 4(12): 1449-52.

## Prokaryotic Expression and Purification of the Recombination Protein Containing Cell-penetrating TAT Peptide and Mouse SurvivinT34A Mutant: Investigation of Its Transduction Efficiency in Cells

Yu Haitao<sup>1,2</sup>, Chen Keda<sup>2</sup>, Ni Ya<sup>1,2</sup>, Yan Hui<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Medical Lab Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China;

<sup>2</sup>Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

**Abstract** The expression and purification of the recombination protein TAT-msvT34A consisting of mice survivinT34A mutant fused with cell-penetrating TAT peptide and its transduction efficiency in several tumor and non-tumor cell lines were investigated. In this study, the prokaryotic expression vector pTAT-msvT34A was transformed into expression strain of *E.coli* BL21-DE3 and subsequently the transformed bacteria were induced by IPTG for expression of the recombinant protein. It was shown that the recombinant fusion protein was accumulated mainly in inclusion body and was purified up to a purity of 98% by the sequential application of affinity, ion exchange, and size-exclusion chromatographies. The transduction efficiency of the fusion protein labeled with FITC (FITC-TAT-msvT34A) in HepG2, TC-1, B16 and HEK293 cells was assayed by flow cytometry. It was shown that up to 60% of cells could be transduced at as low as the concentration 100 nmol/L of the protein. In contrast, the transduction efficiency of control BSA labeled with FITC was nearly neglectable, and it is statistically significant ( $P < 0.01$ ). On the other hand, the observation under fluorescence microscopy demonstrated that the transduction efficiency of TAT-msvT34A to HepG2 cell could reach up to 50% as well at the concentration 50 nmol/L and 100 nmol/L, while almost no transduction was observed in the cells treated with the control of FITC-labeled BSA. Therefore, we concluded that the prokaryotic expression fusion protein TAT-msvT34A could transduce HepG2, TC-1, B16 and HEK293 lines with high efficiency, which offered the potential for its application as an anti-tumor reagent in the future.

**Key words** survivin; TAT cell-penetrating peptide; prokaryotic expression; apoptosis; tumor

---

Received: December 30, 2010 Accepted: April 9, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30873024) and the Key Science and Technology Project of Zhejiang Province (No.2008C13031-1)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-88215439, E-mail: yanh98@yahoo.com