

大肠杆菌中重组多肽 Tat-PFKMVV 的分离、表达和纯化

张爽, 张宇, 朱东亚*

(南京医科大学药学院药理教研室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 构建重组表达载体 pED-Tat-PFKMVV, 在大肠杆菌中表达并通过纯化以获得重组多肽 Tat-PFKMVV。方法: 用 PCR 的方法扩增出 Tat-PFKMVV 基因, 插入含 T7 启动子的 pED 表达载体, 构建重组表达载体 pED-Tat-PFKMVV, 重组表达载体转化至大肠杆菌并表达, 表达产物经洗涤、乙醇沉淀, 酸水解和等电点沉淀纯化目的多肽。结果: 克隆的 Tat-PFKMVV 基因与 Genbank 对比, 二者同源性为 100%, 酸水解位点正确。大肠杆菌表达的融合蛋白产物 AnsB-C-Tat-PFKMVV 经 SDS-PAGE 电泳显示相对分子量为 17 000, 质谱显示最终纯化产物 Tat-PFKMVV 蛋白相对分子量为 2 659。通过 GST-pull down 实验证明 Tat-PFKMVV 蛋白能在体外解开神经元型一氧化氮合酶与肌内型磷酸果糖激酶的偶联。结论: 成功构建了表达 AnsB-C-Tat-PFKMVV 融合蛋白的原核表达体系, 纯化得到了较高纯度的目的多肽 Tat-PFKMVV。通过此过程建立了一套简单可行且高效的融合蛋白表达、水解、分离与纯化的方法。

[关键词] Tat-PFKMVV; 基因表达; 蛋白纯化

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-598-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130507

Cloning, expression and purification of a recombinant Tat-PFKMVV peptide in *Escherichia coli*

Zhang Shuang, Zhang Yu, Zhu Dongya*

(Department of Pharmacology, Pharmacy College of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** We sought to construct the recombinant expression vector pED-Tat-PFKMVV to express and purify the recombinant peptide Tat-PFKMVV. **Methods:** The gene fragment encoding a recombinant peptide Tat-PFKMVV was constructed by PCR and ligated into expression vector for recombinant expression in a T7 RNA polymerase-based expression system. The recombinant plasmid vector was transduced into *E.coli*. The expressed recombinant peptide was partially purified by the wash solution of Tris-Cl/TritonX-100, alcohol precipitation, acid hydrolysis and isoelectric point precipitation. **Results:** The correct recombinant DNA coding fragment was validated by DNA sequencing. The 17 000 AsnB-C-Tat-PFKMVV fusion protein was highly expressed in *E.coli* BL21 transduced by pED-Tat-PFKMVV. The analysis of the purified Tat-PFKMVV by mass spectrometry indicated that its molecular weight was 2 659. GST-pull down experiments showed that Tat-PFKMVV *in vitro* disturbed the coupling of nNOS and PFK-M. **Conclusion:** The experiment constructed the recombinant expression vector of AnsB-C-Tat-PFKMVV, and expressed and purified the peptide Tat-PFKMVV. The novel preparation method is a potentially useful strategy for the large-scale preparations of bioactive peptides due to its high yield and simple steps.

[Key words] Tat-PFKMM; gene expression; purification

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 598-603]

作为神经系统重要的信号分子和神经递质, 一氧化氮(nitric oxide, NO)参与脑的许多生理过程, 如突触可塑性, 神经元的发育以及学习记忆^[1]。NO由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精

氨酸合成, 其中 NOS 包括诱导型 (iNOS)、神经元型 (nNOS) 和内皮型 (eNOS) 3 种亚型^[2]。研究表明, nNOS 是神经系统中生成 NO 的关键酶^[3-4]。nNOS 在神经元内以颗粒状或可溶性两种形式存在, 当与膜蛋白结合时呈颗粒状, 当游离或与其他可溶性胞浆蛋白形成复合物时则成可溶性。脑缺血时, 神经元内可溶性 nNOS 减少, 颗粒状 nNOS 增加。磷酸果糖激

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金项目(11KJB180007)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: dyzhu@njmu.edu.cn

酶(phosphofructokinase, PFK)是糖酵解的关键酶,包括肌肉型(PFK-M)、肝脏型(PFK-L)和血小板型(PFK-P)3种亚型^[5],其中 PFK-M 可以与 nNOS 的 PDZ 结构域结合,并将 nNOS 定位在细胞质中^[6]。糖酵解过程中 PFK 的催化产物 1,6-二磷酸果糖被发现具有神经保护作用^[7-8],若形成 PFK-M-nNOS 复合物,可能导致 1,6-二磷酸果糖生成的减少,从而在脑缺血时不能起到有效的神经保护作用^[9]。文献报道 PFK-M 与 nNOS 的相互作用可以被肽段 VSPDFGDAV 阻断^[6]。因此本研究通过基因工程手段,通过原核表达系统表达 HIV-Tat 蛋白的转导结构域与肽段 VSPDFGDAV 组成的重组多肽(命名为 Tat-PFKMVV),这种重组多肽为进一步研究 nNOS 与 PFK-M 的相互作用以及这种相互作用在神经功能及疾病损伤中的地位奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌种大肠杆菌 *E.coli* BL21 及载体 pED 质粒均由中国药科大学微基因实验室惠赠,质粒 pED-Tat-HA-NR2B9c 由本实验保存,GST-nNO_{S1-133} 蛋白由本实验室纯化。硫酸卡那霉素购自上海生工生物工程公司。限制性 DNA 内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I、T4-DNA 连接酶、DNA Marker(DL2000)购自日本 TaKaRa 公司,DNA 胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒均购自上海生工生物工程公司。PCR 引物 P1:5'-CGCGGATCCGGGTTACGG-3' (含 *Bam*HI 酶切位点)、P2:5'-CCAAAATCCGGGCT-CACGCGCGCGCT-3' 和 P3:5'-CCGAAGCTTACACCGCATCGCCAAAATC-3' (含 *Hind* III 酶切位点)由上海英骏生物技术有限公司合成。透析袋(截留分子量 3 000)购自上海生工生物工程公司。超滤管(截留分子量 3 000)购自美国 Millipore 公司。GST Resin 购自南京金斯瑞生物科技公司。小鼠抗 PFKM 单抗购自美国 Abcam 公司,HRP 标记山羊抗小鼠抗体购自杭州联科生物。其他试剂分别为国产及进口分析纯或以上级别试剂。

1.2 方 法

1.2.1 目的基因的合成

以含 Tat 的质粒 pED-Tat-HA-NR2B9c 为模板,P1、P2 为引物,进行加尾 PCR。反应体系中 P1、P2 各 1 μ l,PCR Mix 10 μ l,模板 0.2 μ l,加水补足 20 μ l。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,60 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。所

获 PCR 产物进行 1%琼脂糖电泳,在紫外透射分析仪上将目的条带切下,按照 PCR 产物纯化试剂盒说明书的操作,回收目的基因片段。以得到的 PCR 产物为模板,PCR 反应体系同前,P1、P3 为引物扩增获得全长的目的基因。

1.2.2 原核表达质粒的构建及鉴定

将得到的 DNA 片段和 pED 载体同时经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,得到的目的基因和 pED 载体进行连接反应,将连接产物转化入 BL21 感受态细菌,涂布于含 50 μ g/L 卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。次日挑取单克隆至含卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养 8 h,提取质粒,进行 PCR 鉴定和限制性内切酶酶切鉴定,将阳性克隆送往南京金斯瑞生物科技公司测序,测序结果与目的基因序列做比对,将完全正确的克隆保存于 30%的甘油中,存放于-80 $^{\circ}$ C。

1.2.3 蛋白诱导表达与纯化

将测序正确的阳性克隆菌活化,1:100 接种至含 50 μ g/L 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 160 r/min 摇菌 4 h,加入乳糖至终浓度为 2.5 g/L,诱导 6 h,5 000 r/min 离心收集菌体,通过 SDS-PAGE 检测融合蛋白表达水平。按每 24 g 菌体加入 100 ml 裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,pH8.0,0.5 g/L 溶菌酶,1% Triton X-100)混悬,-20 $^{\circ}$ C 冻融 1 次。加入 10 U/ml DNA 酶室温搅拌至不再黏稠,12 000 r/min 离心 15 min 取沉淀,用包涵体洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl,pH8.0,0.5% Triton X-100,每 10 g 沉淀加入 50 ml)洗涤 2 次,12 000 r/min 离心 15 min。得到的包涵体用包涵体裂解液(50 mmol/L Tris-HCl,pH8.0,8 mmol/L 尿素,每 10 g 包涵体加入 50 ml)混悬,4 $^{\circ}$ C 搅拌过夜,12 000 r/min 离心 15 min 弃沉淀,上清在搅拌的情况下缓慢加入 2 倍体积的冰乙醇,4 $^{\circ}$ C 放置 2 h 后,12 000 r/min 离心 15 min 保留沉淀。每 6 g 蛋白加入 100 ml 100 mmol/L HCl,48 $^{\circ}$ C 水浴 72 h。水解后的溶液用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 值至 4.68,12 000 r/min 离心 15 min。将含目的蛋白的上清 4 $^{\circ}$ C 透析除盐,然后用截留分子量 3 000 的超滤管 5 000 g 离心进行浓缩。浓缩后的样品冻干,收集蛋白粉末并称重,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 重组多肽的质谱鉴定

将重组多肽送至南京医科大学分析测试中心进行质谱鉴定。

1.2.5 重组多肽的体外实验

将 GST Resin 树脂装柱,用洗涤液 1 (0.1 mol/L

Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH8.5) 洗涤 2 个柱床体积, 再用洗涤液 2 (0.1 mol/L CH₃COONa, 0.5 mol/L NaCl, pH4.5) 洗涤 2 个柱床体积, 最后用 PBS 平衡。将 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 蛋白溶于 PBS 中通过 GST 柱, 反复上样 2 次。PBS 溶液洗涤树脂柱 20 个柱床体积, 将树脂与 0.5 倍柱床体积的 PBS 混匀, 吸取 500 μl 至 1.5 ml 的 EP 管中。取约 100 mg 小鼠海马组织置于 1.5 ml 的 EP 管中, 每管加入 300 μl 中效裂解液, 匀浆, 冰上放置 30 min 后 10 000 g 离心 10 min, 取上清用 PBS 稀释 20 倍。将 1 ml 稀释后的海马匀浆液与 GST Resin 树脂 (500 μl, 预先已结合 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 蛋白) 混合, 4℃混悬过夜。次日 5 000 g 离心 10 min 弃上清, PBS 反复洗涤 6 次, 5 000 g 离心 10 min 弃上清, 分别加入浓度为 0、5、10、20 μmol/L 的 Tat-PFKMVV 多肽溶液 (PBS 配制) 200 μl, 4℃混悬过夜, 次日 5 000 g 离心 10 min, 上清进行 SDS-PAGE 后, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 用小鼠抗 PFK-M 抗体 (1:500) 4℃孵育过夜, PBST 缓冲液洗膜 5 次, 加入 HRP 标记山羊抗小鼠抗体 (1:1 500) 37℃孵育 2 h, PBST 缓冲液洗膜 5 次, ECL 化学发光法显影。

2 结果

2.1 Tat-PFKMVV 基因编码序列的扩增

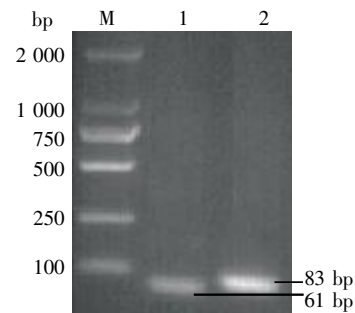
以含 Tat 的质粒 pED-Tat-HA-NR2B9c 为模板, P1、P2 为引物进行 PCR, 扩增产物经电泳, 在约 61 bp 处可见单一扩增条带, 为 Tat (PDPGYGRKKRRQR-RR) 以及 PFKMVV 的部分序列 (VSPDF)。以得到的 PCR 产物为模板, P1、P3 为引物扩增得到全长的目的基因, 在约 83 bp 处可见单一扩增条带 (图 1)。

扩增出的 Tat 转导肽的 DNA 编码序列为 5'-CCGGATCCGGTTACGGTCGTA AAAAACGCCGCC-AGCGCCGCCG-3', 氨基酸序列为 PDPGYGRKKRRQR-RR。扩增出的重组多肽功能域 Tat 的 DNA 编码序列为 5'-GTGAGCCCGGATTTTGCCGATGCG-GTG-3', 氨基酸序列为 VSPDFGDAV (图 2)。

2.2 原核表达质粒的构建及鉴定

将得到的重组质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 结果表明目的 DNA 已经克隆到质粒上, 插入片段的 DNA 序列为: 5'-GGATCCGGTTACGGTCG-TAAAAACGCCGCCAGCGCCGCCGCTGAGCCCG-GATTTTGCCGATGCGGTGTAAGCTT-3', 重组质粒的测序结果与 Genbank 进行比对, 插入片段完全正确 (图 3)。

2.3 融合蛋白的诱导表达及多肽的纯化



M: DNA Marker (DL2000); 1: P1 和 P2 PCR 扩增结果; 2: P1 和 P3 PCR 扩增结果。

图 1 2 次连续加尾 PCR 获得目的基因片段 Tat-PFKMVV
Figure 1 Results of Tat-PFKMVV amplification by two step PCR

AnsB-C-Tat-PFKMVV 经诱导表达后, SDS-PAGE 电泳, 凝胶经考马斯亮蓝 R250 染色, 发现分子量约在 17 000 左右, 加入乳糖 6 h 后表达量达到稳定并以包涵体形式存在 (图 4)。包涵体经洗涤、裂解和乙醇分级沉淀获得了较高纯度的融合蛋白粗品 (图 5)。

酸水解后, 融合蛋白中的蛋白融合伴侣天冬酰胺酶 C (AnsB-C) 经等电点沉淀与融合蛋白中的重组肽 Tat-PFKMVV 分离, 经 Tricine-SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝 R250 染色, 显示目的多肽已与蛋白融合伴侣分离, 通过透析和冻干获得的多肽有较高的纯度 (图 6)。由于目的多肽中的 Tat 主要由带正电氨基酸的精氨酸和赖氨酸组成, 减少了整个蛋白所带的负电荷, 迁移速度降低, 所以电泳中所示的目的条带分子量大于蛋白 Marker 所标分子量。最终获得 63 mg 重组多肽。质谱显示, 纯化获得的重组多肽分子量与理论分子量 2 650 相近 (图 7)。

2.4 重组多肽的体外实验

将洗涤过的含 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 的树脂进行 SDS-PAGE 电泳, 凝胶染色后发现在分子量约 46 000 处有一明显蛋白条, 表示 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 能与 GST Resin 结合 (图 8A), 并且 Western blot 实验显示结合了 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 的树脂柱上不含有 PFK-M (图 8B)。将加入海马匀浆液孵育过夜的含 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 的树脂洗涤 6 次后吸取少量树脂进行 Western blot 实验, 结果显示树脂上结合了 PFK-M (Input), 小鼠骨骼肌组织提取的 PFK 作为阳参显示 PFK-M 所在的位置 (图 8B)。将不同浓度重组多肽 Tat-PFKMVV 与树脂孵育后离心, 通过 Western blot 实验, 结果显示 Tat-PFKMVV 能解开 PFK-M 与 nNOS 的偶联, 作用呈浓度依赖性 (图 8C)。

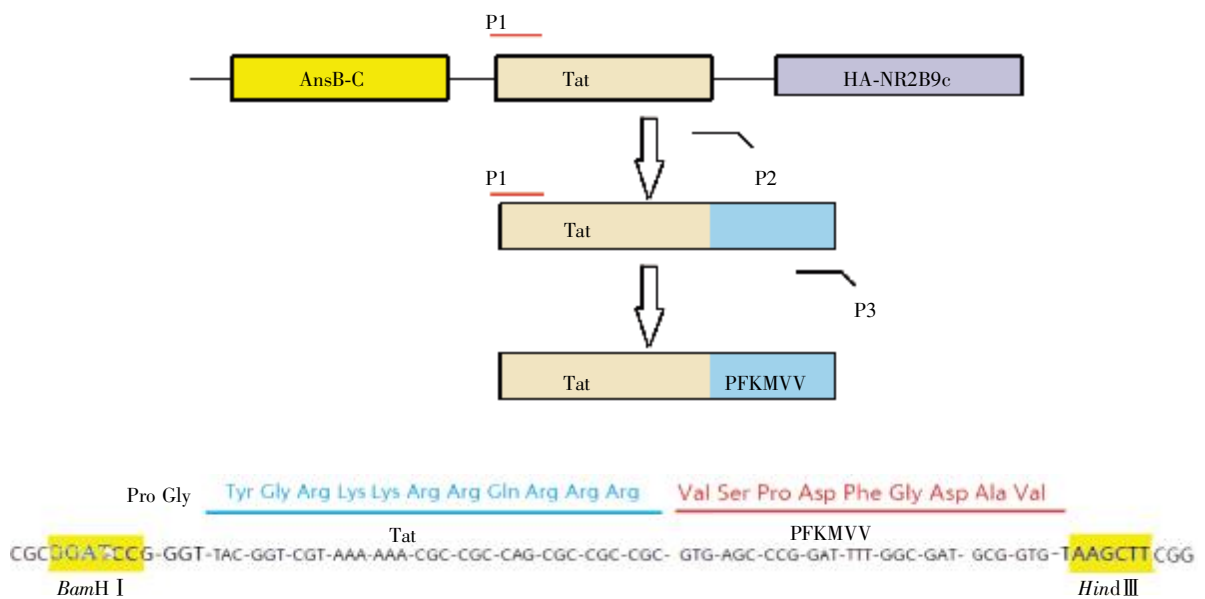


图 2 2 次加尾 PCR 反应获得目的基因片段 Tat-PFKMVV 示意图以及 Tat-PFKMVV 氨基酸以及编码 DNA 组成示意图
Figure 2 PCR schematic diagram of the Tat-PFKMVV gene ,amino acid and coding of DNA diagram of Tat-PFKMVV

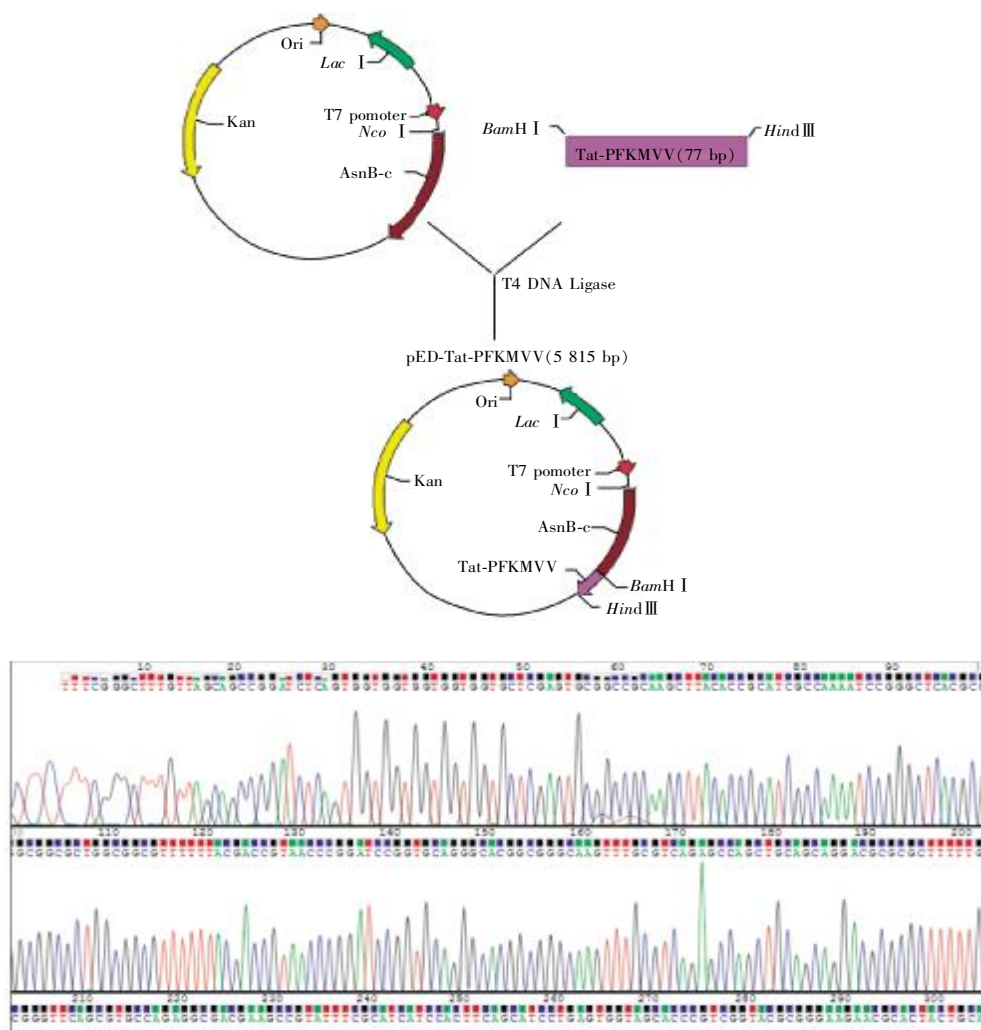
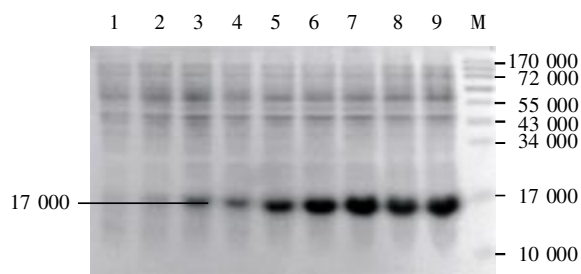


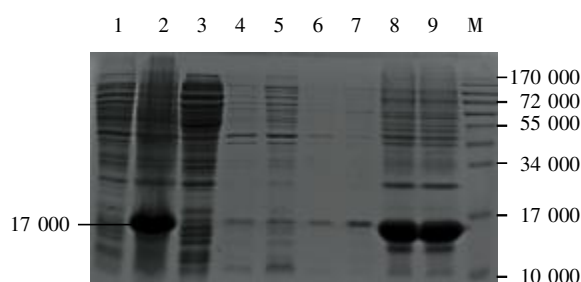
图 3 重组表达质粒 pED-Tat-PFKMVV 模式图与测序图谱
Figure 3 Sequencing diagram of the constructed pED-Tat-PFKMVV expression vector



1: AnsB-C-Tat-PFKMVV 诱导前; 2~9: AnsB-C-Tat-PFKMVV 诱导后 1~8h; M: 蛋白 Marker。

图4 AnsB-C-Tat-PFKMVV 诱导表达电泳图

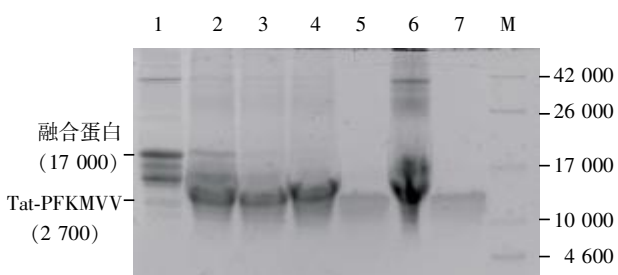
Figure 4 The expression of the fusion protein AnsB-C-Tat-PFKMVV



1: AnsB-C-Tat-PFKMVV 诱导前; 2: AnsB-C-Tat-PFKMVV 诱导后 6 h; 3: 菌体裂解后上清; 4~5: Tris-Cl 洗涤包涵体(上清); 6~7: Tris-Cl/TritonX-100 洗涤包涵体(上清); 8: 1 倍体积乙醇沉淀; 9: 2 倍体积乙醇沉淀; M: 蛋白 Marker。

图5 AnsB-C-Tat-PFKMVV 洗涤纯化电泳图

Figure 5 The fusion protein AnsB-C-Tat-PFKMVV purified by alcohol precipitation



1: AnsB-C-Tat-PFKMVV 水解前; 2~4: AnsB-C-Tat-PFKMVV 水解 24、48、72 h; 5: 等电点上清(目的多肽 Tat-PFKMVV); 6: 等电点沉淀(融合伙伴); 7: 冻干后目的多肽 Tat-PFKMVV; M: 低分子量蛋白 Marker。

图6 AnsB-C-Tat-PFKMVV 酸水解纯化电泳图

Figure 6 The recombinant peptide AnsB-C-Tat-PFKMVV purified by acid hydrolysis and isoelectric point precipitation

3 讨论

通过重组 DNA 技术进行生物合成, 为制备重组多肽提供了一种经济的手段。大肠杆菌具有易于培养、产量高、生产费用低等众多优势, 可以极大满

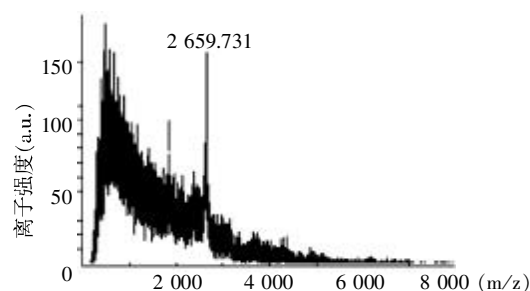
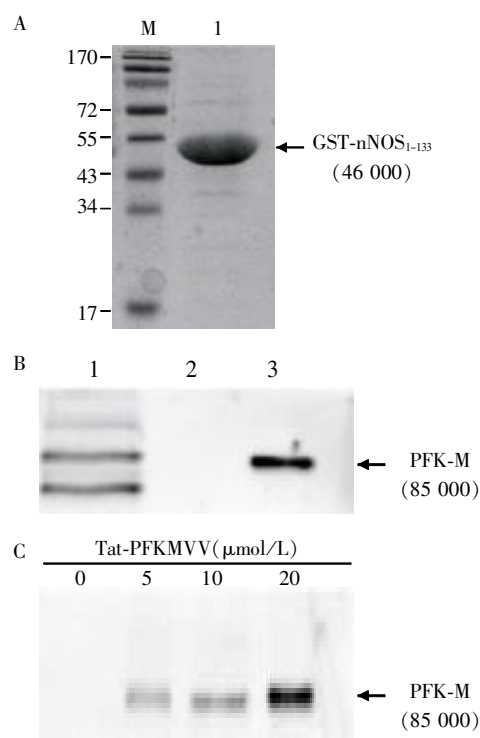


图7 Tat-PFKMVV 的质谱分析

Figure 7 Mass spectrometry analysis of Tat-PFKMVV



A: GST-nNOS₁₋₁₃₃ 能与 GST Resin 结合。M: 蛋白 Marker; 1: GST Resin 树脂柱上结合的 GST-nNOS₁₋₁₃₃。B: Western blot 证实 GST-nNOS₁₋₁₃₃ 结合 PFK-M。1: Input (含有 PFK-M); 2: GST Resin; 3: 阳参(为小鼠骨骼肌组织中提取的 PFK)。C: Western blot 证实 Tat-PFKMVV 能解开 PFK-M 与 nNOS 的偶联。

图8 Tat-PFKMVV 解开 PFK-M 与 nNOS 偶联

Figure 8 Tat-PFKMVV disturb PFK-M and nNOS coupling

足从实验室到工业化的一系列需要^[10]。本研究将构建的 pED-Tat-PFKMVV 质粒转入大肠杆菌 BL21, 经乳糖诱导表达, 融合蛋白的表达量占全菌蛋白的 30% 左右, 重组多肽的表达量可达到全菌蛋白的 6% 左右。表明这一新的融合表达载体能以较高水平表达活性多肽。

Tat 蛋白是 HIV-1 基因编码的调控蛋白, Tat 序列中的 47~57 这 11 个碱性氨基酸富集区的核心肽段(YGRKKRRQRRR)在外源生物大分子的跨膜转导过程中具有重要作用, Tat 跨膜结构域能够携带

蛋白质等外源生物大分子通过活体细胞的各种生物膜性结构(如细胞膜和血脑屏障等)并发挥生理功能,介导的转运不依赖于细胞膜、受体和转运蛋白本身,呈浓度依赖性^[11-12]。利用这一性质,本研究设计了含有 Tat 跨膜结构域序列的重组多肽 Tat-PFKMVV,与 Tat 跨膜结构域融合表达的肽段 PFKMVV (VSPDFGDAV)可随 Tat 转运到细胞内,发挥生物学作用。将多肽与 AnsB-C 端融合表达可以增加表达量并使多肽免受蛋白酶的降解,从而使重组多肽的产率显著升高。因此本试验设计并构建了 Tat-PFKMVV 与 AnsB-C 端的融合表达系统(AnsB-C-Tat-PFKMVV),并在 AnsB-C 端预留酸水解位点 Asp-Pro,融合蛋白可在弱酸性条件下水解出目的多肽 Tat-PFKMVV,融合伙伴 AnsB-C 和目的多肽 Tat-PFKMVV 的等电点分别为 4.68 和 11.82,采用等电点沉淀的方法可以将两者很容易分离。经冻干后得到的多肽干粉具有良好的水溶性、稳定性和可用性。

本研究建立了一套简单可行的分离纯化 Tat 融合多肽的方法,该方法的建立也为 Tat 融合多肽表达载体的构建和分离纯化提供了新的思路。通过该方法获得一定量的 Tat-PFKMVV 多肽,为本实验室研究 nNOS 与 PFK-M 相互作用,以及研究 PFK 在神经保护中的作用提供了实验基础。研究表明,在脑中 nNOS 与 PFK-M 都存在于突触小体部位,特别是突触囊泡部位,并且 PFK-M 在表达 nNOS 的神经元中富集^[6,13],nNOS 与 PFK-M 相互作用可能参与了递质的传递。另外,糖酵解中 PFK 的催化产物 1,6-二磷酸果糖具有神经保护作用,所以解开 nNOS 与 PFK-M 的偶联可能会对神经元起到保护作用^[14-15],这些都是需要进一步研究的问题。

[参考文献]

[1] Zhou L,Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase:structure,subcellular localization,regulation,and clinical implications[J]. Nitric Oxide,2009,20(4):223-230
[2] Calabrese V,Mancuso C,Calvani M,et al. Nitric oxide in the central nervous system:neuroprotection versus neurotoxicity[J]. Nat Rev Neurosci,2007,8(10):766-775
[3] 邬丹莲,胡 瑶,朱明媚,等. 17 β -estradiol 通过促进 PSD95/nNOS 耦联抑制皮层海马神经元的存活[J]. 南

京医科大学学报:自然科学版,2011,31(5):702-705
[4] Luo CX,Zhu DY. Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase[J]. J Neurosci Bull,2011,27(1):23-35
[5] Zeitschel U,Bigl M,Eschrich K,et al. Cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase isoenzymes in rat brain[J]. J Neurochem,1996,67(6):2573-2580
[6] Bonnie LF,David SB. Interaction of neuronal nitric-oxide synthase and phosphofructokinase-M[J]. J Biological Chemistry,1999,274(15):10545-10550
[7] Bolaños JP,Delgado-Esteban M,Herrero-Mendez A,et al. Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide:impact on neuronal survival[J]. Biochim Biophys Acta,2008,1777(7-8):789-793
[8] Almeida A,Bolaños JP,Moncada S. E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation[J]. Proc Natl Acad Sci,2010,107(2):738-741
[9] Lin LF,Xue XY,Liao MJ,et al. Neurotrophic effects of magnesium fructose 1,6-diphosphate on cortical neurons [J]. Int J Neurosci,2012,122(5):248-254
[10] 苗永昌,朱 毅,张静静,等. 巢蛋白样结构域蛋白的表达纯化与鉴定[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(12):1748-1751
[11] Zhang X,Zhang X,Wang F. Intracellular transduction and potential of Tat PTD and its analogs:from basic drug delivery mechanism to application[J]. Expert Opin Drug Deliv,2012,9(4):457-472
[12] Chauhan A,Tikoo A,Kapur AK,et al. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat:myths and realities[J]. J Control Release,2007,117(2):148-162
[13] Wehling-Henricks M,Oltmann M,Rinaldi C,et al. Loss of positive allosteric interactions between neuronal nitric oxide synthase and phosphofructokinase contributes to defects in glycolysis and increased fatigability in muscular dystrophy[J]. Hum Mol Genet,2009,15(18):3439-3451
[14] Rodriguez-Rodriguez P,Fernandez E,Almeida A,et al. Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration[J]. Cell Death Differ,2012,19(10):1582-1589
[15] Almeida A. Regulation of APC/C-Cdh1 and its function in neuronal survival[J]. Mol Neurobiol,2012,46(3):547-554

[收稿日期] 2012-12-21