

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.23.004

双报告基因真核表达载体的构建及其功能鉴定*

赵智凝¹ 周强² 李艳君¹ 郭振军¹ 何芙蓉¹

(1 解放军第四五一医院 陕西 西安 710054; 2 解放军第四军医大学口腔医院 陕西 西安 710032)

摘要 目的:构建绿色荧光蛋白和海肾荧光素酶共同高效表达的双报告基因真核表达载体。**方法:**将增强型绿色荧光蛋白基因和海肾荧光素酶基因以昆虫病毒 T2A 序列相连接而后克隆进入 pcDNA3.1(-)质粒,构建双报告基因真核表达载体。将该载体转染至 COS-7 细胞,通过荧光显微镜观察、照度计定量分析检测绿色荧光蛋白和海肾荧光素酶生物活性,Western Bolt 检测 T2A 序列自剪切效率。**结果:**双报告基因真核表达载体能够同时表达非融合的绿色荧光蛋白和海肾荧光素酶,与单独表达载体产物具有相似的生物活性和表达效率。**结论:**双报告基因真核表达载体建立成功,为基因表达调控等相关领域研究提供辅助工具。

关键词:报告基因;荧光蛋白;荧光素酶;T2A 序列

中图分类号:Q75,Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)23-4413-04

Constructing and Functional Analysis of the Expression Vector with Double Reporter Genes*

ZHAO Zhi-ning¹, ZHOU Qiang², LI Yan-jun¹, GUO Zhen-jun¹, HE Fu-rong¹

(1 Clinical Laboratory, 451 hospital of Chinese PLA, Xi'an, Shaanxi, 710054, China; 2 Department of General Dentistry and Emergency, College of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To construct an expression vector with double reporter genes of green fluorescent protein and renilla luciferase. **Methods:** Enhanced green fluorescent protein and renilla luciferase gene were linked by T2A sequences of insect virus. Then the sequences were cloned into pcDNA3.1(-) plasmid to obtain the expression vector. The vector was transfected into Cos-7 cell line. The morphological changes of Cos-7 cells were observed under microscope. Illuminometer was used to analyze the bioactivity of green fluorescent protein and renilla luciferase. Western blot assay was used to detect self-shear efficiency. **Results:** The expression vector was constructed successfully which could express unfused green fluorescent protein and renilla luciferase. The bioactivity and expression efficiency of the vector were equal to each single expression vector. **Conclusion:** The constructed eukaryotic expression vector with double reporter genes will provide an alternative and helpful method for gene expression regulation studies.

Key words: Report gene; Fluorescence protein; Luciferase; T2A sequence

Chinese Library Classification: Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)23-4413-04

前言

报告基因是指一组编码可以被检测的蛋白质或酶的基因,其表达产物易于与内源性背景蛋白相区别,并且不会改变宿主细胞的生理功能^[1]。将报告基因序列与基因表达调控序列相融合形成嵌合基因或与其它目的基因相融合,可通过报告基因的产物来指示不同调控序列在基因转录调节时的作用或其他目的基因的表达情况。报告基因主要有荧光蛋白家族、多种荧光素酶(luciferase)、氯霉素乙酰基转移酶^[2](Chloramphenicol acetyltransferase, CAT)、 β 半乳糖苷酶^[3](β -galactosidase, β -gal)、分泌型碱性磷酸酶(secreted alkaline phosphatase, SEAP)等几类,其中荧光蛋白和荧光素酶最为常用^[4]。

增强型绿色荧光蛋白(Enhanced Green Fluorescence Pro-

tein, EGFP)是一种优化的突变型绿色荧光蛋白,具有结构稳定、高效表达、无种系依赖性等特点,是最常用的荧光蛋白类报告基因^[5]。EGFP检测便捷安全无害,被488 nm光源激发即可放射出荧光,无需附加底物或辅助因子即可在活细胞条件下对基因表达调控和目的蛋白定位等进行研究^[6]。但是由于EGFP激发的荧光信号强度相对较弱,且无法通过级联反应进行放大,故不适用于某些对灵敏度要求较高的实验。另外,EGFP荧光信号不易定量检测,也限制了其在某些领域的应用。海肾荧光素酶基因(renilla luciferase, RLuc)是一种新型的荧光素酶报告基因,其表达产物为36 KDa的单体酶,能够氧化其底物腔肠素并发出荧光。RLuc具有低背景、灵敏度高、线性范围广、可用于定量检测等优点^[7]。虽然有报道腔肠素能够穿透细胞膜,可以直接在活细胞中对RLuc进行检测,但为了提高检测的准确性、

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81201777)

作者简介:赵智凝(1975-),女,博士,主治医师,主要研究方向:肿瘤的基因治疗,

电话:008629-84734531, E-mail: zzn_shirley@yahoo.com

(收稿日期:2014-01-25 接受日期:2014-02-23)

避免底物渗透效率差异和光稳定性较差所引起的误差,将细胞裂解后再对 RLuc 酶活力进行测定的应用方式更为广泛^[8]。上述两种报告基因各有优劣,如果构建一个能够同时表达 EGFP 和 RLuc 的双报告基因真核表达载体,将会整合荧光蛋白和荧光素酶两类报告基因的优势、互相弥补不足。

T2A 是来源于昆虫病毒(*Thosea asigna*)的基因序列,编码产生一种具有自我加工能力的 23aa 短肽。将两个基因克隆到 T2A 序列的两侧,构建融合基因,翻译出的多聚蛋白会在编码 T2A 区域的 C 末端断裂为两个蛋白,产生 C 端融合了 T2A 的上游蛋白和完整的下游蛋白^[9]。

本实验拟构建一个双报告基因真核表达载体,利用 T2A 序列的自剪切作用,实现绿色荧光蛋白和海肾荧光素酶的共同高效表达,应用荧光显微镜和照度计两种技术手段对报告基因的表达进行实时监测和定量分析,可望为基因表达调控等相关领域研究提供辅助工具。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞 大肠杆菌 DH5 α 菌株(本实验室保存);质粒 pcDNA3.1-EGFP、pcDNA3.1-RLuc、pcDNA3.1(-)(本实验室保存);质粒 pMCS-T2A 是本实验室构建的中间克隆载体,以 pMD18T 载体为骨架,其中插入部分常用酶切位点和 T2A 碱基序列;非洲绿猴肾细胞 COS-7(本实验室保存)。

1.1.2 主要的试剂和仪器 DMEM(美国 HyClone 公司);PCR 试剂、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶(大连宝生物工程有限公司);质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒(安徽优品生物工程有限公司);LipofectamineTM 2000(美国 Invitrogen 公司);荧光素酶活力测定试剂盒(美国 Promega 公司);BX50 正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);蛋白电泳装置(美国 Bio-Rad 公司);Odyssey 红外成像系统(美国 LI-COR 公司);照度计(美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 构建双报告基因真核表达载体 设计引物,EGFP-*Xho*I-P5:5'-tttctcgagcgccaccatggtgagcaaggcgagga-3' 含 *Xho*I 酶切位点,EGFP-*Eco*RI-P3:5'-gccgaattcctgtacagctcgtccatgc-3' 含 *Eco*RI 酶切位点,EGFP-*Bam*HI-P3:5'-gccggtaccctgtacagctcgtccatgc-3' 含 *Bam*HI 酶切位点,RLuc-*Bam*HI-P5:5'-ataggatccatgacttcgaaagtttatga-3' 含 *Bam*HI 酶切位点,RLuc-*Eco*RV-P3:5'-cccgatattcttattgtcattttgagaa-3' 含 *Eco*RV 酶切位点;以 pcDNA3.1-EGFP 质粒为模板,EGFP-*Xho*I-P5 和 EGFP-*Eco*RI-P3 为上下游引物,扩增带有 *Xho*I 和 *Eco*RI 酶切位点的 EGFP 基因;以 pcDNA3.1-RLuc 质粒为模板,RLuc-*Bam*HI-P5 和 RLuc-*Eco*RV-P3 为上下游引物,扩增带有 *Bam*HI 和 *Eco*RV 酶切位点的 RLuc 基因;上述 PCR 产物经相应酶切后,连接入 pMCS-T2A 克隆载体中,转化 DH5 α ,挑取阳性克隆,提取质粒,送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序,测序正确后命名为 pEGFP-T2A-RLuc。以 pcDNA3.1-EGFP 质粒为模板,EGFP-*Xho*I-P5 和 EGFP-*Bam*HI-P3 为上下游引物,扩增带有 *Xho*I 和 *Bam*HI 酶切位点的 EGFP 基因,PCR 产物经相应酶切后,连接入 pEGFP-T2A-RLuc,构建 pEGFP-RLuc 质粒。将构

建成功的 pEGFP-T2A-RLuc 和 pEGFP-RLuc 质粒经 *Xho*I 和 *Eco*RV 双酶切,连入 pcDNA3.1(-)载体中,构建具有 T2A 序列的双报告基因真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-T2A-RLuc,以及不具有 T2A 序列的对照载体 pcDNA3.1-EGFP-RLuc。

1.2.2 COS-7 细胞的转染 取对数生长期细胞 COS-7 接种至 6 孔板中,待细胞汇合率达到 80%后,将 4 μ g 质粒(pcDNA3.1-EGFP、pcDNA3.1-RLuc、pcDNA3.1-EGFP-RLuc 或 pcDNA3.1-EGFP-T2A-RLuc)与 10 μ L Lipofectamine 2000 分别加入 250 μ L 无血清培养液中充分混匀后静置 5 min,然后再将二者混匀,室温静置 20 min;将混合液加入经无血清培养液漂洗的细胞中,孵育 6 h 后撤液,以含血清培养液继续培养 40 h 后进行相关检测。

1.2.3 转染细胞表达绿色荧光蛋白检测 将细胞培养孔板置于荧光显微镜上,观察转染细胞绿色荧光蛋白表达情况并拍照。

1.2.4 转染细胞荧光素酶活性 取 2×10^5 个转染细胞,以 PBS 清洗两遍,加入 150 μ L 细胞裂解液,振荡裂解 10 min;将裂解液以 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 10 min;取 10 μ L 裂解上清,与 10 μ L 荧光素溶液混匀,照度计检测 5 s 内荧光素酶催化底物产生光强,表示荧光素酶活力的高低。

1.2.5 Western Blot 将转染细胞以 RIPA 裂解液裂解后,用 SDS-PAGE 分离蛋白样品,电转移至硝酸纤维素膜上,经 5%脱脂奶粉封闭后,以免抗 EGFP 多克隆抗体(1:500)室温孵育 1 h,再以羊抗兔 IgG 荧光二抗(1:15000)室温孵育 30 min,Odyssey 红外激光成像系统扫膜。

2 结果

2.1 绿色荧光蛋白表达情况鉴定

将绿色荧光蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1-EGFP、构建成功的双报告基因真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-T2A-RLuc 及对照质粒 pcDNA3.1-EGFP-RLuc(图 1)瞬时转染入 COS-7 细胞,撤液 40 h 后荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况。图 2 显示,COS-7 细胞瞬时转染 pcDNA3.1-EGFP 后,绿色荧光蛋白表达水平较高;在转染双报告基因真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-T2A-RLuc 的 COS-7 细胞中,绿色荧光蛋白在包浆弥漫分布,荧光强度与 pcDNA3.1-EGFP 组无显著差异;转染对照质粒 pcDNA3.1-EGFP-RLuc 后,虽然能够在细胞中观察到绿色荧光分布,但荧光强度显著低于 pcDNA3.1-EGFP 组。

2.2 荧光素酶活性分析

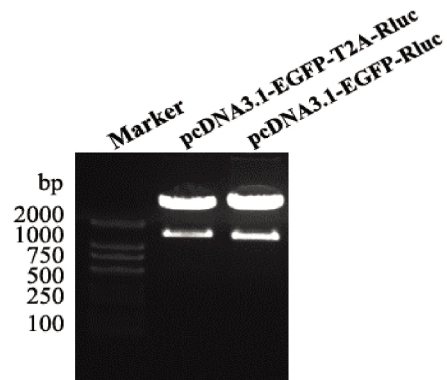


图 1 双报告基因真核表达载体酶切鉴定图谱

Fig. 1 Restriction endonuclease map of the double reporter vector

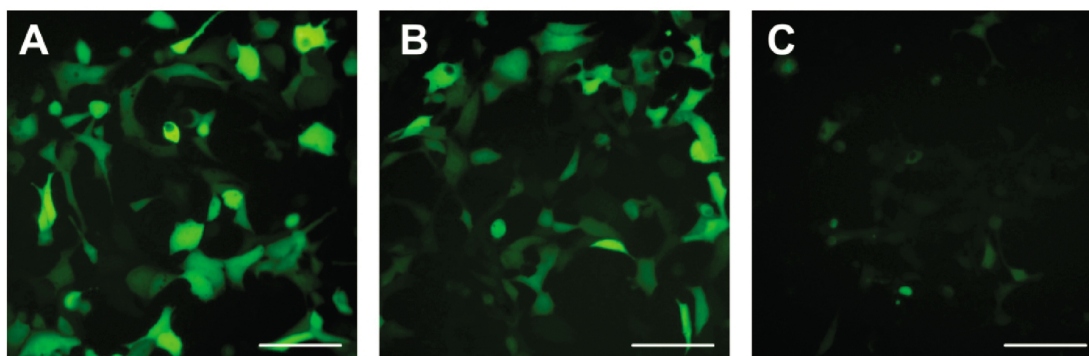


图2 瞬时转染后绿色荧光蛋白表达情况鉴定

Fig. 2 The expression of green fluorescent protein after transient transfection

A pcDNA3.1-EGFP; B pcDNA3.1-EGFP-T2A-RLuc; C pcDNA3.1-EGFP-RLuc; Scale bar = 100 μm

将海肾荧光素酶真核表达质粒 pcDNA3.1-RLuc、双报告基因真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-T2A-RLuc 及对照质粒瞬时转染入 COS-7 细胞, 撤液 40 h 后裂解细胞, 通过照度计检测荧光素酶表达情况。转染海肾荧光素酶真核表达质粒 pcDNA3.1-RLuc 后, COS-7 细胞裂解液具有较高的荧光素酶活力; 双报告基因真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-T2A-RLuc 转染组, 荧光素酶活力 ($91.1 \pm 8.4\%$) 与 pcDNA3.1-RLuc 转染组无显著差异; 对照质粒 pcDNA3.1-EGFP-RLuc 转染组荧光素酶活力仅为 pcDNA3.1-RLuc 转染组酶活力的 $19.2 \pm 2.7\%$, 差异极显著 (图 3)。

2.3 T2A 序列自剪切效率测定

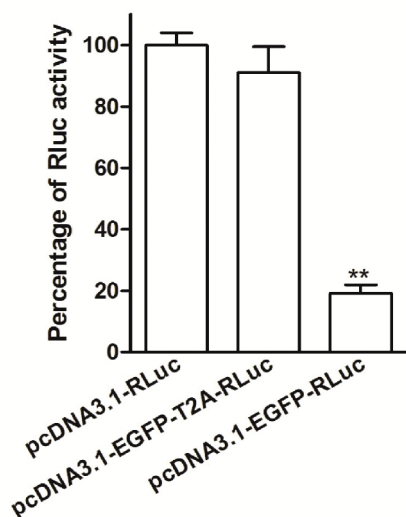


图3 瞬时转染后海肾荧光素酶活性分析

Fig. 3 The activity of renilla luciferase after transient transfection

将绿色荧光蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1-EGFP、双报告基因真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-T2A-RLuc 及对照质粒 pcDNA3.1-EGFP-RLuc 瞬时转染入 COS-7 细胞, 裂解细胞获取蛋白样品, 通过 Western Blot 检测 EGFP 阳性条带位置反映 T2A 序列自剪切效率 (图 4)。转染 pcDNA3.1-EGFP 后, EGFP 阳性条带位置为 26.9KDa, 与理论大小一致; 双报告基因真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-T2A-RLuc 转染组, 由于 2A 序列的自剪切作用发生在该序列的 C 末端, 表达产物为 EGFP-T2A

和 RLuc, EGFP 阳性条带位置为 29.5KDa, 与理论值相符; 除在 29.5KDa 处出现阳性条带外, 未在其他位置检测到 EGFP 阳性条带, 表明 T2A 序列自剪切效率较高, 荧光蛋白和荧光素酶得到了有效分离, 二者的生物作用能够独立发挥; 对照质粒 pcDNA3.1-EGFP-RLuc 转染组, 绿色荧光蛋白 (26.9KDa) 和海肾荧光素酶蛋白 (36.1KDa) 融合表达为一个蛋白分子, EGFP 阳性条带出现在二者分子量大小之和处。

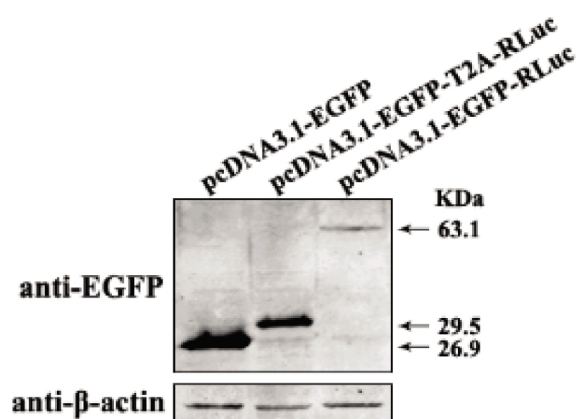


图4 Western Blot 检测 T2A 序列自剪切效率

Fig. 4 Self-cleaving efficiency of T2A sequence by western blot

3 讨论

目前, 实现多基因在一个载体上同时表达主要有构建多启动子表达载体或剪切载体、将不同基因融合表达、在基因间插入内部核糖体进入位点 (IRES) 序列和不同基因间以 2A 序列连接等方法^[10,11]。多启动子表达载体和剪切载体需要加入较长的调控序列, 由于载体容量的限制, 这类策略往往较难实施。将不同基因融合表达的方法往往对蛋白生物活性或表达效率造成较大影响。插入 IRES 序列的方法虽然能够产生非融合蛋白, 但是处于 IRES 上下游的蛋白表达水平极不平衡, 且 IRES 自身活性不易调节, 限制了其广泛应用。不同基因间以 2A 序列连接的策略, 在能够产生非融合蛋白的同时避免了上下游蛋白表达水平的差异, 是较为理想的多基因表达策略^[12,13]。

最早被发现的具有自剪切功能的 2A 肽源于口蹄疫病毒,

该肽段能够在其 C 末端 Gly Pro 残基之间介导多聚蛋白的自剪切^[14,16]。在昆虫病毒、C 型轮状病毒和猪捷申病毒等病毒中都发现了具有与 2A 肽功能相似的基因序列^[17,18]。研究表明,不同来源的自剪切肽切割效率有较大差异,源自昆虫病毒的 2A 序列剪切效率最高,几乎能够实现完全剪切^[19]。

本研究将 EGFP 基因和 RLuc 基因以 2A 序列连接,构建了双报告基因真核表达载体,通过瞬时转染的方法,鉴定该表达载体能够在 COS-7 细胞中实现荧光蛋白和荧光素酶两类报告基因的同时表达。荧光显微镜观察和照度计定量分析表明,双报告基因真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-2A-RLuc 编码产生的 EGFP 和 RLuc 与单独表达载体(pcDNA3.1-EGFP、pcDNA3.1-RLuc)产生的荧光蛋白或荧光素酶具有相似的生物活性和表达效率(图 2、图 3)。Western Blot 证实,双报告基因真核表达载体具有极高的自剪切效率,能够实现 EGFP 和 RLuc 的非融合表达(图 4)。而对照质粒 pcDNA3.1-EGFP-RLuc 将两种报告基因进行融合表达,不仅蛋白表达效率大幅下降(图 4),并且由于 EGFP 和 RLuc 的相互干扰,二者的生物活性也显著降低(图 2、图 3)。

实验结果表明,双报告基因真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-2A-RLuc 能够在真核生物中实现 EGFP 和 RLuc 的高效非融合表达,表达产物的生物活性与单独表达载体接近。该载体的建立,能够将荧光蛋白和荧光素酶两类报告基因的优势互补,实现对基因表达情况的实时监测和定量分析,为基因表达调控等相关领域研究提供辅助工具。

参考文献(References)

- [1] Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58: 749-757
- [2] Fray MD, Mann GE, Charleston B. Validation of an Mx/CAT reporter gene assay for the quantification of bovine type-I interferon [J]. *Immunol Methods*, 2001, 249: 235-244
- [3] 刘昌春,于慧敏,马玉超,等.红球菌启动子识别及 β -半乳糖苷酶报告基因表达[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1360-1365
Liu Chang-chun, Yu Hui-min, Ma Yu-chao, et al. Promoter recognition and β -galactosidase reporter gene expression in *Rhodococcus* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(9): 1360-1365
- [4] 刘广文,苏旭,丁建清,等.分子生物学中报告基因的主要类型及应用现状[J]. *环境与健康杂志*, 2011, 28: 460-462
Liu Guang-wen, Su Xu, Ding Jian-qing, et al. Types and Application of Reporter Gene in Molecular Biology [J]. *Journal of Environment and Health*, 2011, 28: 460-462
- [5] Cody CW, Prasher DC, Westler WM, et al. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein [J]. *Journal of Biochemistry*, 1993, 32: 1212-1218
- [6] Tavaré J, Fletcher L, Welsh G. Using green fluorescent protein to study intracellular signalling[J]. *Journal of Endocrinology*, 2001, 170: 297-306
- [7] Woo J, Howell MH, von Arnim AG. Structure-function studies on the active site of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*[J]. *Protein Sci*, 2008, 17: 725-735
- [8] Hawkins Erika, Unch James, Murphy Nancy, et al. Measuring rinilla luciferase luminescence in living cells [J]. *Promega Notes*, 2005, 90: 10-14
- [9] Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector[J]. *Nat Biotech*, 2004, 22: 589-594
- [10] 何彰华,王洋,赵璐,等.一种多基因串联共表达载体的构建 [J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(1): 40-45
He Zhang-hua, Wang Yang, Zhao Jun, et al. Construction of a vector suitable for the tandem coexpression of multiple genes by a single plasmid[J]. *China Biotechnology*, 2011, 31(1): 40-45
- [11] 靳志平,谭晓华.多基因真核表达载体的构建及其产物的亚细胞定位[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(11): 1044-1047
Jin Zhi-ping, Tan Xiao-hua. Construction of multi-gene eukaryote expression vector and sub-cellular location of its products [J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2012, 34(11): 1044-1047
- [12] Szymczak-Workman AL, Vignali KM, Vignali DA. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2012, 2012: 199-204
- [13] 张欢,黄思超,蔡绍晖.基于 2A 肽策略构建多基因表达载体的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33: 104-108
Zhang Huan, Huang Si-chao, Cai Shao-hui. Development of 2A peptide-based strategies for constructing multicistronic expression vectors[J]. *China Biotechnology*, 2013, 33(1): 104-108
- [14] Ryan MD, Drew J. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein[J]. *EMBO J*, 1994, 13: 928-933
- [15] Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, et al. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein cleavage mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal skip[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 5): 1013-1025
- [16] Sharma P, Yan F, Doronina VA, et al. 2A peptides provide distinct solutions to driving stop-carry on translational recoding [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): 3143-3151
- [17] Provost E, Rhee J, Leach SD. Viral 2A peptides allow expression of multiple proteins from a single ORF in transgenic zebrafish embryos [J]. *Genesis*, 2007, 45(10): 625-629
- [18] Yang S, Cohen CJ, Peng PD, et al. Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition[J]. *Gene Ther*, 2008, 15(21): 1411-1423
- [19] Kim JH, Lee SR, Li LH, et al. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e18556