论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0134-04

人工锌指蛋白真核表达载体的构建及表达

魏 勇,应大君,朱楚洪,侯春丽,崔晓萍 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室,重庆市生物力学与组织工程重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 构建人工锌指蛋白ZFP基因的真核表达载体,检测其在真核细胞的表达情况,从而探讨人工锌指蛋白作为人工转录因子DNA结合域的可能性。方法 全基因合成人工锌指蛋白(putative zinc finger protein, ZFP)的核酸序列并克隆入pEGFP-N1及pIRES2-EGFP真核表达载体中,构建重组质粒pEGFP-N1/ZFP及pIRES2-EGFP/ZFP-Flag,通过酶切、菌落PCR及测序来鉴定重组载体的正确性。脂质体DOTAP体外转染重组质粒于COS-7细胞中,用荧光显微镜、RT-PCR、Western blot方法鉴定ZFP在该细胞中的表达。结果 正确构建了pEGFP-N1/ZFP、pIRES2-EGFP/ZFP-flag重组表达质粒,并且在COS-7细胞中成功进行了人工锌指蛋白ZFP的表达。结论 采用生物信息学手段获得的假定的锌指蛋白基因序列可以在真核细胞内正常表达。

关键词:人工锌指蛋白;真核表达载体;EGFP;COS-7细胞
中图法分类号:R341;R394-33 文献标识码:A

Construction of eukaryotic expressing vector of artificial zinc finger protein gene and its expression

WEI Yong, YING Da-jun, ZHU Chu-hong, HOU Chun-li, CUI Xiao-ping (Department of Anatomy, College of Medicine, Chongqing Key Laboratory of Biomechanics and Tissue Engineering, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant plasmid pEGFP-N1/ZFP and pIRES2-EGFP/ZFP-flag and explore the possibility of engineering zinc finger protein (ZFP) as DNA binding domain of artificial transcription factor (ATF). Methods Full length ZFP gene was synthesized and cloned into pEGFP-N1 and pIRES2-EGFP plasmids to construct the recombinant plasmids pEGFP-N1/ZFP and pIRES2-EGFP/ZFP-flag that were identified by colony PCR and sequencing. Recombinant plasmids were transformed into COS-7 cells by liposome DOTAP. The expressed EGFP was observed under fluorescent microscope and the ZFP expression was detected by RT-PCR and Western blot. Results Recombinant plasmids pEGFP-N1/ZFP and pIRES2-EGFP/ZFP-flag were constructed correctly, which could express ZFP well in the transformed COS-7 cells. Conclusion It is feasible that engineered artificial zinc finger proteins by bioinformatics technique can be expressed in eukaryotic cells.

Key words: artificial zinc finger protein; eukaryotic expression vector; EGFP; COS-7 cells

A20蛋白是一种细胞质内的保护性蛋白,可通过下调NF-κB信号途径抑制机体内的严重炎症反应,同时可抑制由TNF导致的程序性细胞死亡。在严重创伤感染时,A20基因的过表达对血管内皮细胞、平滑肌细胞以及肝细胞具有明显的保护作用。另外实验结果显示A20可显著提高同种、异种移植时的免疫耐受[1,2,3]。基于以上特点,许多实验室通过不同方式对A20的表达调节进行了研究[2,4],其中在转录水平上通过特异性的人工转录因子调节内源性A20基因表达或过表达(而不是转染外源性的A20基因)是一种新的研究途径。

人工转录因子主要是由DNA结合结构域(binding domain)与效应结构域(effector domain)两部分组成[5]。其中,构建特异性的DNA结合域是成功构建特异性人工转录因子的核心工作。锌指结构以其小巧灵活、结构独特常作为DNA结合域的首选结构[6]。我们根据经典的C2H2锌指模型,以A20基因启动子序列作为靶序列,人工构建了包含6个连续C2H2锌指结构的假定的锌指蛋白序列(putative zinc finger protein,

基金项目:国家自然科学基金(30472027)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30472027)
作者简介:魏 勇,男,山东省泰安市人,博士研究生,主要从事血管生物力学方面的研究。电话:(023)68752590
通信作者:应大君,电话:(023)68752226,E-mail: ydj96@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-07-10;修回日期:2007-09-18

ZFP)。在此基础上,为研究 ZFP 在真核细胞的表达情况,本实验分别构建了重组真核表达载体 pEGFP-N1/ZFP 及 pIRES2-EGFP/ZFP-flag,并转染于 COS-7 细胞中,观察其真核表达情况。以期为进一步设计调节 A20 基因的人工转录因子(artificial transcription factor, ATF)提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

菌株、细胞株及载体:大肠杆菌 TOP10 购自北京天根公司,COS-7 细胞由第三军医大学基础医学部微生物学教研室张俊磊博士惠赠,pEGFP-N1 真核表达载体由本室保存,pIRES2-EGFP 载体由黄刚博士惠赠。

DNA 合成:ZFP 的全基因序列、PCR 反应分子遗传学教研室引物由上海生工合成。

试剂盒:PCR 产物纯化试剂盒购自博大泰克,胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自北京天根公司,RT-PCR 试剂盒购自杭州博日公司。

细胞培养及检测试剂:RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 HyClone 公司;DOTAP 脂质体是 Roche 公司产品;Trizol 购自 Invitrogen 公司;抗 Flag 抗体由中科院上海研究院抗体研究中心提供;HRP 标记的二抗购自 Santa Cruz 公司。

其他试剂: *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 购自 Promega 公司;各种限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶、DNA 标准购自 TaKaRa 公司;预染标准蛋白质标准为 MBI 产品;$ZnCl_2$、硝酸纤维素(NC)膜购自 Sigma 公司。

1.2　方法

1.2.1　pEGFP-N1/ZFP 及 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 真核表达质粒的构建　　把人工合成的 ZFP 全基因序列亚克隆到的 pUC19 克隆载体的 *Sma* Ⅰ位点,构建 pUC19-ZFP 克隆载体,-20 ℃保存备用。用 Primer Premier 5.0 设计 2 对 PCR 引物,第 1 对引物,F1:5′-CCG CTCGAG ATGCTGGAACCGGGTGA-3′(矩形框内为 *Xho* Ⅰ酶切位点);R1:5′-CGG GGTACC GCTGGTCTTTTTTACCGGTAT-3′(矩形框内为 *Kpn* Ⅰ酶切位点)。第 2 对引物,F2:5′-CCG CTCGAG ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCTGGAACCGGGTGA-3′(矩形框内为 *Xho* Ⅰ酶切位点,下划线部分为编码 flag tag 的核苷酸序列);R2:5′-CGG GGATCC GCTGGTCTTTTTACCGGTATGC-3′(矩形框内为 *Bam*H Ⅰ酶切位点)。以 pUC19-ZFP 为模板,采用上述引物扩增 ZFP 基因片段。

PCR 产物纯化试剂盒纯化 2 组 ZFP 的 PCR 产物。限制性内切酶 *Xho* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ双酶切第 1 组 PCR 产物及表达载体 pEGFP-N1;*Xho* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切第 2 组 PCR 产物及表达载体 pIRES2-EGFP,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,酶切产物经胶回收纯化。依照设计方案,用 T_4 DNA 连接酶将两个小片段分别与两个大片段连接,连接产物分别转化为 TOP10 感受态大肠杆菌,用卡那霉素平板筛选。挑选单个阳性菌落接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃震荡过夜,碱裂解法提取质粒。采用菌落 PCR(PCR 引物,F:5′-CCCAGAATGTGGCAAGAGTT-3′,R:5′-TGCGTTGGTGTTCCGTCAGT-3′)及限制性内切酶对重组子进行初步鉴定,将含阳性重组子的菌液送上海生工公司进行测序。鉴定正确的重组子,并分别命名为 pEGFP-N1/ZFP 及 pIRES2-EGFP/ZFP-flag。

1.2.2　转染 COS-7 细胞　　复苏冻存的 COS-7 细胞,在含 7% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基(含终浓度为 0.1 mmol/L $ZnCl_2$)、37 ℃、5% CO_2 饱和湿度下培养。选取复苏后第 3 代细胞进行转染。细胞于 24 孔板生长到 60% 汇合时,按照 DOTAP(Roche)说明书进行转染。实验组分别转染重组质粒 pEGFP-N1/ZFP、pIRES2-EGFP/ZFP-flag,阳性对照组转染空 pEGFP-N1、pIRES2-EGFP 质粒,空白对照组只加等量的脂质体,按常规方法培养细胞。选取不同时相点,在荧光倒置显微镜下观察转染细胞的生长情况。

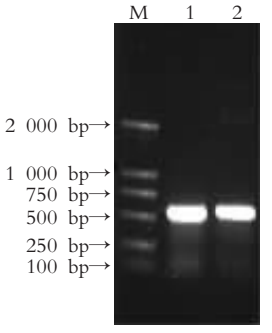
1.2.3　RT-PCR 检测 ZFP mRNA 的表达水平　　转染 24 h 后,收集相应各组细胞,分别加入 1 ml Trizol,常规抽提细胞总 RNA,根据试剂盒说明采用二步法进行 RT-PCR。PCR 扩增所用引物与菌落 PCR 引物相同,扩增片段大小应为 392 bp,1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.4　Western blot 分析 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 实验组的蛋白表达　　转染 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 融合表达质粒 48 h,收集并裂解细胞,收获细胞总蛋白。按操作说明,取 20 μl 处理后的蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白转移至硝酸纤维膜上,在 5% 脱脂奶粉封闭液中封闭 1 h,依次加入 5% 脱脂奶粉稀释 1∶500 的鼠源抗 Flag 单克隆抗体(4 ℃过夜)和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1∶2 000),室温 2 h。于暗室中显影,扫描胶片。空 pIRES2- EGFP 质粒转染组作为对照。

2　结果

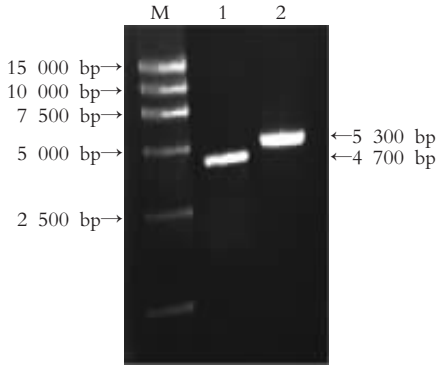
2.1　pEGFP-N1/ZFP 及 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 重组子的构建结果

分别使用 2 对特异性引物进行 PCR,从 pUC19-ZFP 克隆载体上扩增得到 2 条分别为 549、573 bp 的目的基因片段(图 1)。真核表达载体 pEGFP-N1 及 pIRES2-EGFP 分别进行双酶切,电泳结果显示条带符合理论结果(图 2)。构建的 pEGFP-N1/ZFP 及 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 重组子分别经限制性内切酶 *Xho* Ⅰ单酶切,琼脂糖凝胶电泳显示,在 5 200 bp 及 5 800 bp 处有明显的目的条带(图 3)。菌落 PCR 鉴定结果可见在 392 bp 处有明显的条带(图 4)。上海生工测序结果完全符合预期结果。



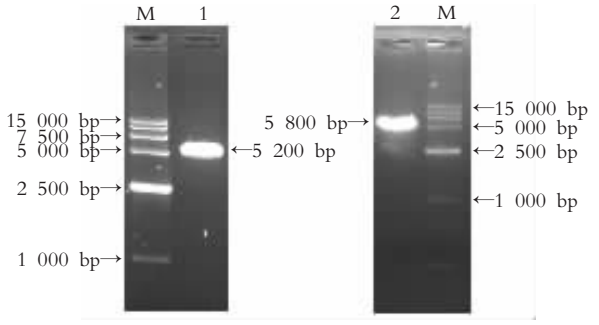
M: DNA 标准(DL 2000);1: 第 1 对引物的 PCR 产物(549 bp);2: 第2 对引物的 PCR 产物(573 bp)

图 1　ZFP PCR 扩增结果



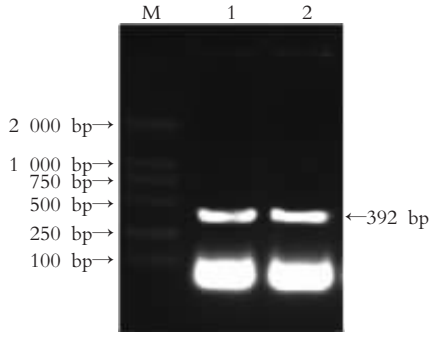
M：DNA 标准(DL 15000)；1：pEGFP-N1；2：pIRES2-EGFP

图2 真核表达载体双酶切结果



M：DNA 标准(DL 15000)；1：pEGFP-N1/ZFP；2：pIRES2-EGFP/ZFP-flag

图3 重组质粒的 *Xho* I 单酶切鉴定结果



M：DNA 标准(DL 2000)；1：pEGFP-N1/ZFP；2：pIRES2-EGFP/ZFP-flag

图4 菌落 PCR 对扩增产物的分析

2.2 COS-7 细胞内绿色荧光蛋白的表达

2.2.1 pEGFP-N1/ZFP 及 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 实验组 转染 12 h 两实验组镜下可见发绿色荧光的细胞，荧光主要存在胞核内。转染 24 h 实验组阳性细胞明显增多，每个视野可见数个至数十个细胞，多为明亮的绿色荧光，细胞质和细胞核中均有荧光表达，但细胞核的荧光强度高于细胞质。转染 48 h 发光细胞的荧光强度最强，细胞多成堆或成对出现，细胞核与细胞质的荧光强度无明显差别(图 5)。随细胞培养时间延长阳性细胞数量逐渐减少，荧光强度逐渐减弱。整个培养过程中显示，pIRES2-EGFP/ ZFP-flag 组阳性细胞的数量及荧光强度始终强于 pEGFP-N1/ZFP 组，原因可能是 pIRES2-EGFP/ ZFP-flag 系双顺反子表达载体，EGFP 上游存在独立的内部核糖体进入位点(IRES)，使 EGFP 可独立表达而不受目的蛋白 ZFP 表达的影响。而 pEGFP-N1/ZFP 表达载体中，EGFP 蛋白是以融合蛋白形式表达，蛋白翻译速度及效率受其上游 ZFP 蛋白翻译的影响。转染效率的测定：转染 36 h 两实验组分别在荧光显微镜下计数 10 个视野的细胞，结果显示，pEGFP-N1/ZFP 组共计数 470 个细胞，其中 42 个细胞发绿色荧光，阳性细胞比例约为 8.9%。pIRES2-EGFP/ZFP-flag 组共计数 535 个细胞，其中 74 个细胞发绿色荧光，阳性细胞比例为 13.6%。

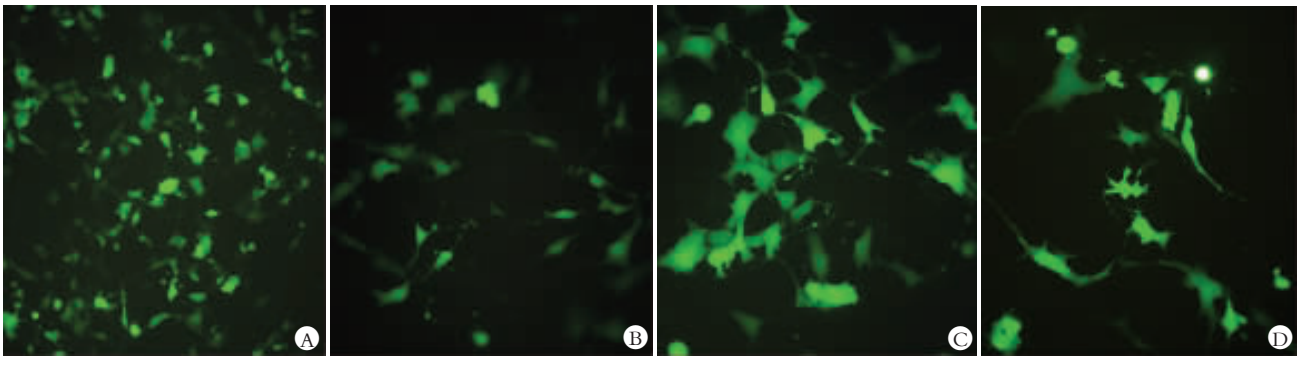
2.2.2 pEGFP-N1 及 pIRES2-EGFP 对照组 转染 8 h 即可见阳性发光细胞，而且细胞培养的不同时相点阳性细胞的数量及强度均强于实验组。空白对照组无绿色荧光。

2.3 pEGFP-N1/ZFP、pIRES2-EGFP/ZFP-flag 重组子中 ZFP mRNA 的表达水平

RT-PCR 结果显示，转染 pEGFP-N1/ZFP 及 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 24 h 后，均可看到 ZFP mRNA 的表达。琼脂糖凝胶电泳显示在 392 bp 处有明显的特异性扩增条带，与预期结果相符(图 6)。而且，转染 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 表达质粒的 COS-7 细胞内 ZFP mRNA 的表达水平高于转染 pEGFP-N1/ZFP 的表达。对照组无 ZFP mRNA 的表达。

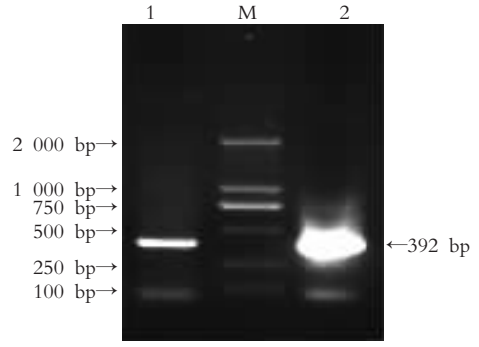
2.4 带 Flag 标签的 ZFP 蛋白在 COS-7 细胞内的表达情况

转染 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 重组质粒 48 h COS-7 细胞内有明显的 ZFP 蛋白的表达，Western blot 检测结果可见明显的蛋白印迹。而转染 pIRES2-EGFP 的对照组未见蛋白表达(图 7)。说明 ZFP 融合 Flag 标签的表达是成功的。



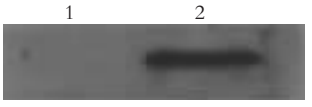
A：pIRES2-EGFP/ZFP-flag 转染 24 h(×100)；B：pEGFP-N1/ZFP 转染 24 h(×100)；C：pIRES2-EGFP/ZFP-flag 转染 48 h(×400)；D：pEGFP-N1/ZFP 转染 48 h(×400)

图5 荧光倒置显微镜观察转染 COS-7 细胞的生长情况



M：DNA 标准(DL 2000)；1：pEGFP-N1/ZFP 转染组；2：pIRES2-EGFP/ZFP-flag 转染组

图 6　RT-PCR 鉴定 ZFP mRNA 的表达



1：空 pIRES2-EGFP 转染组；2：pIRES2-EGFP/ZFP-flag 转染组

图 7　Western blot 鉴定 ZFP-flag 融合蛋白的表达

3　讨论

以 pEGFP-N1 为基础构建的重组质粒转染真核细胞后可表达含增强型绿色荧光蛋白的融合蛋白,由此可直接观察目标蛋白是否表达,以及在细胞内的分布与定位。通常认为目标蛋白与 EGFP 融合后,并不影响前者的正确折叠、运输和胞内定位[7]。实验初期,我们把携带 flag 标签的 ZFP 克隆到 pEGFP-N1 载体中,构建 pEGFP-N1/ZFP-flag 融合表达载体,荧光显微镜下可见明显的绿色荧光,RT-PCR 结果也显示 ZFP mRNA 表达,但 Western blot 实验结果不明显,只能检测到 ZFP-flag 的弱阳性表达。分析原因我们认为,锌指蛋白 ZFP 是由 6 个连续的锌指结构串联而成,在活细胞内每一个锌指结构都需要 Zn 离子来维持其特有的 ββα 结构,进行 SDS-PAGE 时,融合蛋白变性使 ZFP 的空间构型破坏,而且 ZFP 与 EGFP 之间的连接区(Linker)没有足够的长度及柔性,flag 位点或许不能很好的暴露,从而无法形成良好的抗原抗体反应。结合荧光显微镜观察及 RT-PCR 结果,我们认为目标蛋白 ZFP 在细胞可以正常表达,Western blot 实验结果是由于蛋白构型改变导致的弱阳性结果。为了验证这一假想,我们构建了 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 重组表达载体。pIRES2-EGFP 为双顺反子真核表达载体,在其多克隆位点和 EGFP 编码区之间设计有内部核糖体进入位点(IRES),此位点可以确保克隆入多克隆位点的 ZFP 基因与 EGFP 编码基因共同转录,而翻译出来的 EGFP 与 ZFP 蛋白各具独立的空间结构和生理活性,而不是融合蛋白[8]。Western blot 实验结果可显示明显的印迹反应,显示 pIRES2-EGFP/ZFP-flag 重组质粒成功进行了 ZFP 蛋白的表达。

在序列特异性转录因子的 DNA 结合结构域中,锌指结构是最丰富的结构模块。锌指一般成串联排列,许多转录因子含 3 个或更多的锌指来识别特异的 DNA 序列,并调控基因的表达[9,10]。通过生物信息学手段,我们选取了 A20 基因启动子区一段 18 bp 的序列作为目标靶序列,并设计了可与此靶序列特异性结合的含 6 个连续锌指结构的人工锌指蛋白 ZFP。由于 ZFP 是采用生物信息学手段构建的人工锌指蛋白,其基因序列是依据生物学软件及数据库资料人工优化的结果。在序列优化过程中,我们尽量选择在真核及原核细胞内均可有效表达的密码子,以使其在真核及原核细胞内均能表达。并且利用密码子的兼并性,尽量减少整个序列中局部重复序列的产生,以利于全基因合成及后期基因克隆操作。通过对 pEGFP-N1/ZFP、pIRES2-EGFP/ZFP-flag 重组表达载体的成功构建及表达,提示利用生物信息学手段,人工设计特异性的锌指蛋白并进行体外真核细胞表达是可行的,为进一步设计完整的人工转录因子,进而干预 A20 基因的表达奠定了基础。

参考文献:

[1] Lee E G, Boone D L, Chai S, *et al*. Failure to regulate TNF-induced NF-kappa-B and cell death responses in A20-deficient mice[J]. Science, 2000, 289(5488): 2350 – 2354.

[2] Wolfrum S, Teupser D, Tan M, *et al*. The protective effect of A20 on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is associated with reduced expression of NF-kappaB target genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(47): 18601 – 18606.

[3] Komander D, Barford D. Structure of the A20 OTU domain and mechanistic insights into deubiquitination[J]. Biochem J, 2008, 409(1): 77 – 85.

[4] Sass G, Shembade N D, Haimerl F, *et al*. TNF pretreatment interferes with mitochondrial apoptosis in the mouse liver by A20-mediated down-regulation of Bax[J]. J Immunol, 2007, 179(10): 7042 – 7049.

[5] Quon D V, Delgadillo M G, Khachi A, *et al*. Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(10): 4579 – 4583.

[6] Nagaoka M, Sugiura Y. Artificial zinc finger peptides: creation, DNA recognition, and gene regulation[J]. J Inorg Biochem, 2000, 82(1 – 4): 57 – 63.

[7] Kain S R, Adams M, Kondepudi A, *et al*. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization[J]. J Biotechniques, 1995, 19: 650 – 655.

[8] Sachs A B. Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail[J]. Cell, 2000, 10: 243 – 245.

[9] Miller J, Mclachlan A D, Klug A, *et al*. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus cocytes[J]. EMBO J, 1985, 4(6): 1609 – 1614.

[10] Nishida M, Kato M, Kato Y, *et al*. Identification of ZNF200 as a novel binding partner of histone H3 methyltransferase G9a[J]. Genes Cells, 2007, 12(7): 877 – 88.

(编辑　薛国文)