论著

文章编号:1000-5404(2012)11-1044-04

多基因真核表达载体的构建及其产物的亚细胞定位

靳志平[1,2],谭晓华[1,3] (100700 北京,北京军区总医院中心实验科[1];400038 重庆,第三军医大学研究生管理大队学员2队[2];300142 天津,天津迪艾细胞与分子医学发展有限公司[3])

[摘要] **目的** 构建一种多基因表达载体,实现同一载体单一启动子的调控下表达多个基因以及这些基因在同一细胞不同细胞器中的定位。**方法** 利用存在于某些病毒核酸序列中的不同2A肽,合成1段包括2个2A肽和不同限制性内切酶位点的多肽序列,形成单一的开放读码框,插入真核表达载体pcDNA3.1(-)Myc/His(B)相应的多克隆位点中,然后将带有膜定位的红色荧光蛋白(ERFP)、核定位的绿色荧光蛋白(EGFP)和胞浆定位的黄色荧光蛋白(EYFP)顺序插入2A肽之间的位点中,构建多基因真核表达载体pcDNA3.1 RGY。用脂质体转染小鼠成纤维NIH3T3细胞和人肾胚293细胞,利用流式细胞仪、荧光显微镜和共聚焦显微镜检测各种荧光蛋白的表达和亚细胞定位。**结果** 转染24 h后用流式细胞仪检测,可同时检测到EGFP和ERFP的表达,且两种荧光蛋白的表达率十分接近;荧光显微镜下同时观察到绿色和红色荧光;共聚焦显微镜观察到在单一细胞上同时显示3种荧光,ERFP定位在细胞膜上,EGFP在细胞核中,而EYFP在细胞质中。**结论** 通过串联方式将多个2A肽和基因置于同一个开放读码框中可实现在同一启动子的调控下表达多个基因。此外,在每个基因序列中加入不同的信号肽序列可将相应基因同时靶向不同的细胞器,实现同一细胞中不同的亚细胞定位。

[关键词] 真核表达载体;基因表达;信号肽序列;亚细胞定位;2A肽
[中图法分类号] Q503;Q782 [文献标志码] A

Construction of multi-gene eukaryote expression vector and sub-cellular location of its products

Jin Zhiping[1,2], Tan Xiaohua[1,3] ([1]Central Laboratory, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing, 100700; [2]2nd Postgraduate Team, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Di'ai Cellular and Molecular Medicine Development Co., Ltd, Tianjin, 300142, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a multi-gene eukaryote expression vector in which co-expression of multiple genes was achieved and their products were located in different organelles in a single cell under control of the same promoter. **Methods** Sequences of polypeptide including two different '2A' peptides and several restriction sites were synthesized to form a single open reading frame using the presence of different '2A' peptide sequences and inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(-)Myc/His(B). ERFP with membrane location signal, EGFP with nuclear location signal and cytoplasmic EYFP were respectively inserted into the sites between the '2A' peptides for the construction of eukaryotic expression vector pcDNA3.1 RGY. The vector was transfected to NIH3T3 cells or 293 cells by Liposome, and expression levels of the fluorescent proteins were measured and their sub-cellular locations were detected by flow cytometry, fluorescence and confocal microscopy, respectively. **Results** The expression levels of ERFP and EGFP were measured by flow cytometry in 24 h after the transfection, and the expression rates of the two proteins were quite similar. The green and red fluorescences were observed under fluorescence microscope and green, red and yellow fluorescences in a single cell were observed under confocal fluorescence microscope. ERFP, EGFP and EYFP were located on the cytomembrane, in the nuclei and the cytoplasm, respectively. **Conclusion** Expression of multiple genes can be achieved under control of the single promoter by inserting several 2A peptides and multiple genes into the same open reading frame. In addition, different sub-cellular locations can be observed in a single cell by adding signal peptide into the gene that makes it target the corresponding organelles.

[**Key words**] eukaryotic expression vector; gene expression; signal peptide sequence; sub-cellular location; 2A peptide

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81172162). Corresponding author: Tan Xiaohua, E-mail: xiaohua_t@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172162)
[通信作者] 谭晓华,E-mail: xiaohua_t@hotmail.com

许多疾病的发生和发展与基因异常相关,包括遗传性疾病、某些神经、内分泌和代谢性疾病以及肿瘤等均是由于某种或某些基因的缺失、突变、异位或重排等导致相关基因的表达异常(无表达、低表达或过度表达)所引起。这些疾病往往缺乏有效的治疗手段,基因治疗为治愈这些疾病带来新希望。基因治疗研究中,不仅要考虑目的基因的表达效率和表达水平,有时还需要考虑基因的细胞定位,对于多基因异常疾病如肿瘤,还需要考虑采用多个基因联合治疗的手段。本研究利用单一载体在同一启动子的调控下实现多个基因的同时表达以及不同的亚细胞定位,为基因治疗的多基因联合表达以及不同的亚细胞定位需求奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 T_4 DNA连接酶、Deep Vent DNA聚合酶购自NEB公司,各种限制性内切酶购自TaKaRa公司;1640培养基购自Gibco公司、胎牛血清购自HyClone公司;DNA片段凝胶回收试剂盒、DNA片段纯化试剂盒和质粒提取试剂盒购自北京三博远志公司;增强型红色荧光蛋白(ERFP)和增强型黄色荧光蛋白(EYFP)真核表达载体pERFP-C1和pEYFP-C1购自ClonTech公司,脂质体Lipofectamine™ 2000和pcDNA3.1(-)Myc-His真核表达载体购自Invitrogen公司,带有3个核定位信号(3×NLS)的增强型绿色荧光蛋白(EGFP-3×NLS)质粒F596由Steve Hobbs教授(Institute of Cancer Research, CRC Centre for Cancer Therapeutics, UK)惠赠,pcDAN3.1 hKDR由本实验室克隆和构建[1]。

1.1.2 细胞 人肾胚293细胞和鼠胚胎成纤维细胞NIH3T3细胞由本科室保存,用1640培养基加10%胎牛血清培养。

1.2 方法

1.2.1 2A肽开放读码框序列和PCR引物设计 分别以口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)和马鼻炎A病毒(equine rhinitis A virus, ERAV)的2A肽(F2A和E2A)为基础[2],F2A肽氨基酸序列如下:APAKQLLNFDLLKLAGDVESNPGP;E2A肽:TNYALLKLAGDVESNPGP。设计一段开放读码框序列,序列中包含几个限制性内切酶位点以及F2A和E2A序列(5′-ATG-*Nhe* Ⅰ-*Kpn* Ⅰ-F2A-*Xho* Ⅰ-E2A-*Eco*R Ⅰ-TAA-*Bam*H Ⅰ-3′),并经真核表达密码子优化(Upgene软件)后送北京三博远志生物技术责任有限公司合成。

本研究涉及PCR引物如下:hKDR信号肽序列:上游引物(FP1):5′-CTAGCTAGCATGGAGAGCAAGGTGCTG-3′[5′端引入*Nhe* Ⅰ位点(下划线示,下同)并含起始密码子ATG],下游引物(RP1):5′-GGAATTCACCCACAGAGGCGGCCCG-3′(*Eco*R Ⅰ);hKDR跨膜段序列:上游引物(FP2):5′-CGGGATCCCTTGGCTGTGCAAAAGTGGA-3′(*Bam*H Ⅰ),下游引物(RP2):5′-GGGGTACCTTAGACGATGGACAAGTAGCC-3′(*Kpn*Ⅰ);ERFP序列:上游引物(FP3):5′-GGAATTCGCCTCCTCCGAGGACGTC-3′(*Eco*R Ⅰ),下游引物(RP3):5′-GAAGATCTGGAGGCGCCGGTGGAGTG-3′(*Bgl* Ⅱ);EGFP-3′×NLS序列(FP4):上游引物:5′-CCGCTCGAGCCACAACCATGGTGAGC-3′(*Xho* Ⅰ),下游引物(RP4):5′-CCGCTCGAGCCACAACCATGGTGAGC-3′(*Xho* Ⅰ);EYFP序列:上游引物(FP5):5′-GGAATTCGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3′(*Eco*R Ⅰ),下游引物(RP5):5′-CGGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3′(5′端引入*Bam*H Ⅰ和终止密码子TAA)。

1.2.2 pcDNA3.1 ERFP-EGFP-EYFP载体的构建 pcDNA3.1 ERFP-EGFP-EYFP载体的构建按照标准的分子克隆方法包括多个亚克隆步骤[3]。

1.2.2.1 pcDNA3.1 2A的构建 人工合成的2A序列包括2个2A肽F2A和E2A以及多个选择性内切酶位点,整个序列组成为5′-ATG-*Nhe* Ⅰ-*Kpn* Ⅰ-F2A-*Xho* Ⅰ-E2A-*Eco*R Ⅰ-TAA-*Bam*H Ⅰ-3′,分别含起始密码子ATG、限制性内切酶*Nhe* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ、F2A,*Xho* Ⅰ、E2A肽、*Eco*R Ⅰ、终止密码子TAA以及*Bam*H Ⅰ位点,整个序列长度为168 bp,合成序列用*Nhe* Ⅰ和*Bam*H Ⅰ酶切后插入pcDNA3.1(-)Myc/His B真核表达载体中即构建成功pcDNA3.1 2A。

1.2.2.2 pcDNA3.1 Sig-ERFP-TM载体构建 利用人血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR-2或KDR)的信号肽和跨膜段与ERFP形成人工基因,分别用FP1/RP1、FP3/RP3和FP2/RP2引物将KDR信号肽、ERFP和KDR跨膜段序列扩增,并用引物设计时掺入的内切酶酶切后,顺序地插入pcDNA3.1(-)Myc/His B真核表达载体相应的酶切位点中,形成Sig-ERFP-TM融合基因。

1.2.2.3 pcDNA3.1 EYFP 用EYFP引物(FP5/RP5)利用高保真Deep Vent DNA聚合酶从pEYFP-C1质粒中扩增EYFP,用*Eco*R Ⅰ和*Bam*H Ⅰ双酶切后插入同样用*Eco*R Ⅰ和*Bam*H Ⅰ双酶切的pcDNA3.1 2A质粒中,构建成pcDNA3.1 EYFP的构建。

1.2.2.4 pcDNA3.1 ERFP-EYFP 用Sig-ERFP-TM引物(FP1/RP2)从pcDNA3.1 Sig-ERFP-TM质粒中扩增Sig-ERFP-TM,用*Nhe* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ双酶切后插入同样用*Nhe* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ双酶切的pcDNA3.1 EYFP质粒中,构建成pcDNA3.1 ERFP-EYFP的构建。

1.2.2.5 pcDNA3.1 ERFP-EGFP-EYFP的构建 用EGFP-3×NLS引物(FP4/RP4)从F596质粒中扩增EGFP-3×NLS,用*Xho* Ⅰ酶切,而pcDNA3.1 ERFP-EYFP用*Xho* Ⅰ酶切后去磷酸化,将EGFP-3×NLS插入其中,鉴定正反向,正向者即为pcDNA3.1 ERFP-EGFP-EYFP(简写为pcDNA3.1 RGY)。

1.2.3 流式细胞仪检测各种荧光蛋白的表达 取对数生长期的NIH3T3或293细胞,按5×10^5/ml传代至6孔板中,24 h后用Lipofectamine™ 2000转染pcDNA3.1 ERFP-EGFP-EYFP,方法参照试剂盒说明书。转染24~48 h后,收集细胞行流式细胞仪检测。

1.2.4 荧光显微镜观察 上述流式细胞仪检测后的标本用1%的多聚甲醛固定后在荧光显微镜下观察荧光情况。

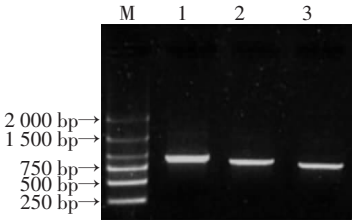
1.2.5 激光扫描共聚焦显微镜检测 在6孔板中放入1张酸处理后的盖玻片,将NIH3T3细胞传代至放有盖玻片的6孔

板中,24 h后按1.2.3方法转染质粒,转染后24~48 h吸出培养液,用PBS洗2次,吸尽PBS后,用1%多聚甲醛固定,取出盖玻片,在有细胞面滴上封片剂后盖至1张载玻片上,用激光扫描共聚焦显微镜检测荧光情况。绿色荧光蛋白用488 nm激发光、黄色荧光蛋白用515 nm激发光、红色荧光蛋白用559 nm激发光,进行激光共聚焦显微镜单细胞扫描。

2 结果

2.1 PCR鉴定结果

为鉴定ERFP、EGFP和EYFP是否插入pcDNA3.1载体中,以构建成功的pcDNA3.1 ERFP-EGFP-EYFP为模板,分别用Sig-ERFP-TM(FP1/RP2)、EGFP-3×NLS(FP4/RP4)和EYFP(FP5/RP5)引物PCR扩增相应的荧光蛋白片段,结果如图1所示,分别获得特异性的Sig-ERFP-TM(957 bp)、EGFP-3×NLS(885 bp)和EYFP(726 bp)片段。



M:DNA标准;1:Sig-ERFP-TM PCR片段;2:EGFP-3×NLS PCR片段;3:EYFP PCR片段

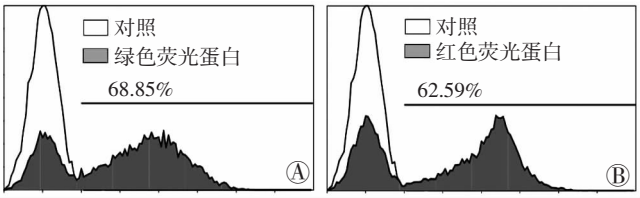
图1 pcDNA3.1 ERFP-EGFP-EYFP PCR鉴定结果

2.2 流式细胞仪检测

pcDNA3.1 ERFP-EGFP-EYFP用Lipofectamine™ 2000转染小鼠NIH3T3细胞或人肾胚293细胞24 h后收集细胞用流式细胞仪FITC和PE通道检测,可见转染的NIH3T3细胞同时表达绿色和红色荧光蛋白(图2),转染效率分别为68.85%和62.59%,表达率基本一致,提示绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白为等拷贝表达。黄色荧光蛋白由于激发光光谱不在流式检测范围,故未能检出。

2.3 荧光显微镜观察

用流式细胞仪检测剩余的细胞制备成细胞涂片,在同一视野观察荧光表达情况,用不同的激光在同一视野中可观察到绿色和红色荧光蛋白(图3),黄色荧光蛋白由于激发波长与绿色荧光蛋白接近,故未能显示。



A:绿色荧光蛋白24 h;B:红色荧光蛋白24 h

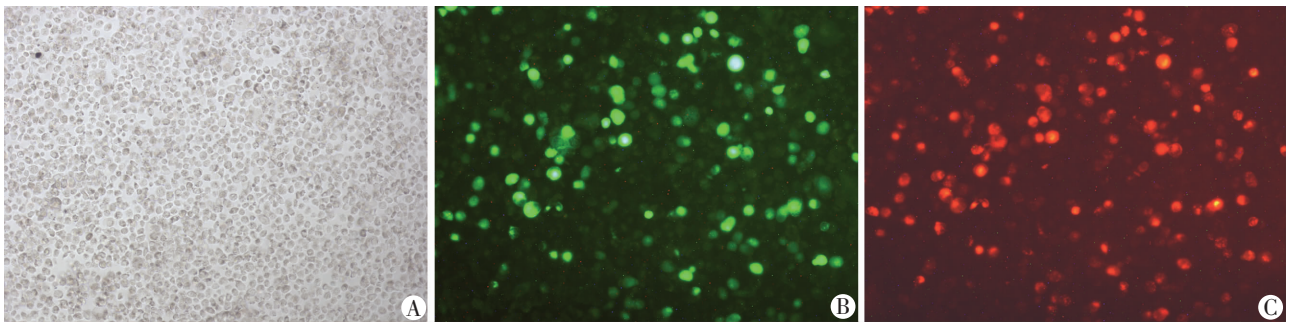
图2 流式细胞仪检测NIH3T3细胞转染

2.4 激光扫描共聚焦显微镜检测

为了检测质粒转染后能否在同一细胞中观察到3种荧光蛋白的表达,并且如期望的那样观察到亚细胞定位。Lipofectamine™ 2000将pcDNA3.1 ERFP-EGFP-EYFP转染至小鼠NIH3T3细胞24 h和48 h后,进行激光扫描共聚焦显微镜检测。结果显示,转染24 h可在同一细胞中观察到3种荧光蛋白,其中EGFP主要定位在核内,EYFP定位在细胞核和细胞质中,而ERFP则出现在核周(图4A~D);转染48 h后再观察,EGFP仍然以细胞核表达为主,EYFP则以细胞质表达为主,而ERFP则成功定位于细胞膜(图4E~H),表明不同荧光蛋白在转染细胞后,带有不同定位信号的蛋白定位至特定的细胞器所需要的时间不一致,转染后24 h即可明显地核定位,而细胞膜定位则在转染24 h后不明显,在转染后48 h才开始定位至细胞膜上。

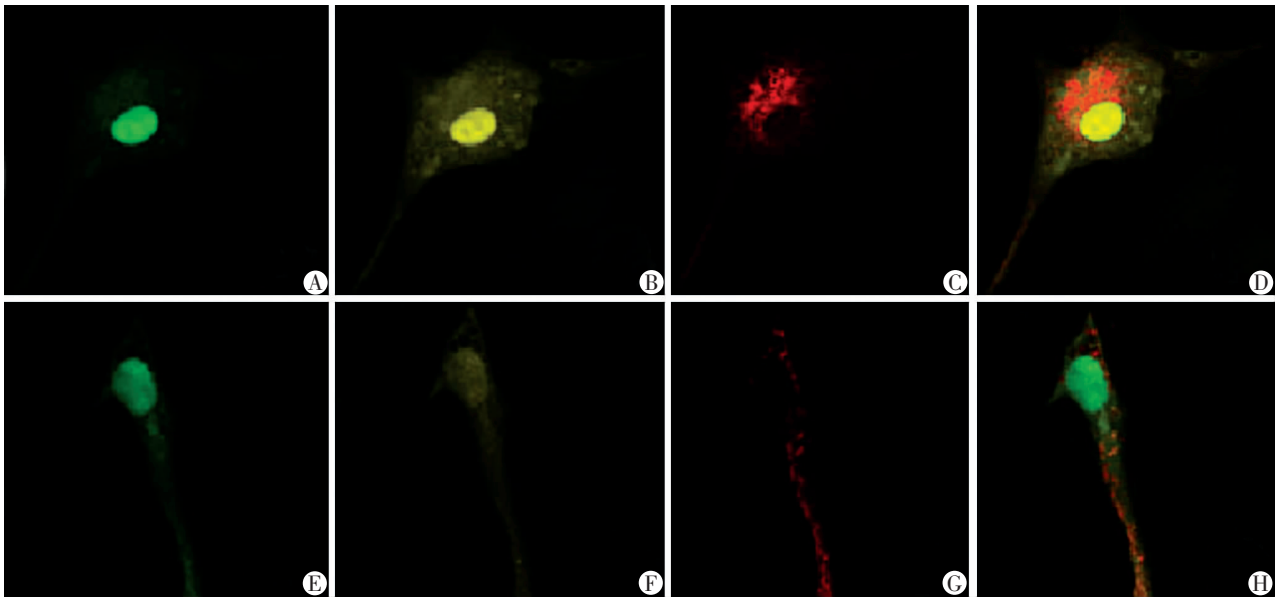
3 讨论

目前多基因载体的构建策略主要有多启动子表达载体、IRES连接载体、表达融合基因、2A连接载体等[4-6]。多启动子表达载体是单载体内含两个独立转录单元,各自含启动子和开放读码框。但由于各基因是独立转录,基因在载体中的位置顺序会影响其表达水平[4]。表达融合基因最常用于目的基因与报告基因的连接,但翻译后目的蛋白活性常降低[7],甚至有蛋白功能改变的风险。IRES连接载体是目前常用的多基因载体构建策略,但仍然存在一些限制性因素如基因大小限制和表达变异等,并且其下游基因表达水平远低于上游基因[8]。近来,2A肽已经成为基因治疗和体细胞重建中调节多顺反子表达的IRES的替代物。这个结构来源于小RNA病毒,大约有19个氨基酸的长度,包含有高度保守的共有模体,也叫做"自我断裂肽"



A:无激发光时;B:用488 nm激发光观察到绿色荧光蛋白;C:用559 nm激发光观察到红色荧光蛋白

图3 倒置荧光显微镜下观察流式细胞仪检测后的样品制备成的细胞涂片 (×20)



A、E:绿色荧光蛋白 24、48 h;B、F: 黄色荧光蛋白 24、48 h;C、G:红色荧光蛋白 24、48 h;D、H:绿/黄/红色荧光蛋白 24、48 h

图 4 共聚焦显微镜下观察 NIH3T3 细胞转染 pcDNA3.1RGY 后 24 、48 h 的变化 (×100)

或“蛋白酶位点”。因为它能在蛋白翻译时通过核糖体跳跃从自身最后两个氨基酸 C 末端断裂。简言之,在甘氨酸和脯氨酸之间的肽链结合群在 2A 位点是受损的,能引发核糖体跳跃而从第二个密码子开始翻译,从而使一个转录单元里两个蛋白独立表达[9]。2A 连接载体同其他策略相比,主要优势在于其序列短,能够有效的实现连接基因之间的共表达。同 IRES 相比,它的优势还有位于 2A 下游的基因同样可以获得很高的表达水平[10]。

本实验通过以 FMDV 和 ERAV 的 2A 为基础,构建了一个 2×2A 的开放读码框,2A 之间设计不同的酶切位点,再将不同的荧光蛋白(包含不同的定位信号)插入各 2A 之间,通过细胞转染成功实现了 3 种荧光蛋白在同一细胞系中的同时表达。实验结果表明了通过 2 个 2A 肽的连接可以成功实现单载体上表达 3 种目的基因,因而如果再增加 2A 肽,便可实现 4 种甚至更多基因在单载体上的同时表达,为实现基因治疗的多基因表达奠定了结构基础。在设计多基因表达载体时,不仅要考虑目的基因的表达效率和表达水平,有时还需要考虑基因的细胞定位,因为某些蛋白的亚细胞定位,是其能否发挥作用的重要因素。本实验通过引入定位信号,成功将 3 种不同的荧光蛋白分别定位于细胞膜、细胞核和细胞质,结果证实了通过引入定位信号,2A 结构不仅可以实现蛋白的表达,而且还能实现蛋白的亚细胞定位,从而拓宽了该方法应用的范围。并且实验通过 24 h 和 48 h 的对比,发现了蛋白膜定位需要更长时间的表达才能实现,为未来的应用提供了重要的基础。

综上所述,该载体系统提供了一个操作简易的多基因克隆系统,可以实现多达 3 种不同基因的共表达及不同亚细胞定位的需求。该载体对深入研究基因治疗的多基因联合表达以及不同的亚细胞定位需求奠定了实验基础,具有广泛的应用前景。

参考文献:

[1] 谭晓华, 吴彬, 刘兵, 等. 腺病毒载体介导人血管内皮细胞生长因子受体-2 诱导抗小鼠肝癌免疫[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(4): 289-293.

[2] Donnelly M L, Hughes L E, Luke G, *et al*. The ‘cleavage’ activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring ‘2A-like’ sequences[J]. J Gen Virol, 2001, 82(Pt 5): 1027-1041.

[3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1-137.

[4] Semple-Rowland S L, Coggin W E, Geesey M, *et al*. Expression characteristics of dual-promoter lentiviral vectors targeting retinal photoreceptors and Müller cells[J]. Mol Vis, 2010, 16: 916-934.

[5] Woo P C, Lau S K, Choi G K, *et al*. Natural occurrence and characterization of two internal ribosome entry site elements in a novel virus, canine picodicistrovirus, in the picornavirus-like superfamily[J]. J Virol, 2012, 86(5): 2797-2808.

[6] Wieckiewicz J, Mytar B, Szatanek R, *et al*. Induction of monocyte antitumor response by human cancer cells transduced with TNF-GFP fusion gene: possible implications for immunotherapy of cancer[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2011, 49(3): 512-520.

[7] Norman K R, Maricq A V. Innexin function: minding the gap junction[J]. Curr Biol, 2007, 17(18): R812-R814.

[8] Chan H Y, V S, Xing X, *et al*. Comparison of IRES and F2A-based locus-specific multicistronic expression in stable mouse lines[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28885.

[9] Sharma P, Yan F, Doronina V A, *et al*. 2A peptides provide distinct solutions to driving stop-carry on translational recoding[J]. Nucleic Acids Res, 2011, [Epub ahead of print].

[10] 刘必胜, 刘新垣, 钱程. 构建多顺反子表达载体的有效工具——FMDV 2A[J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 765-769.

(**收稿**:2012-01-07;**修回**:2012-02-20)

(编辑 汪勤俭)