



信号肽-FRET荧光蛋白载体的构建及在NIH3T3细胞中的表达

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是一项应用能量转移来测量分子内和分子间的距离的技术。当供体发射的荧光与受体发色团分子的吸收光谱重叠, 并且两个探针在几个原子直径范围以内时, 就会发生一种非放射性的能量转移, 这种现象就叫FRET[1]。绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 发现后, 它的许多突变体, 如CFP和黄色荧光蛋白 (yellow fluorescence protein, YFP), 具有不同的光谱特性, 能作为FRET的供体或者受体[2][3]。目前Clontech公司已有公开发售的CFP和YFP的质粒载体, 但这些载体并不适用于研究膜蛋白。Toll样受体4 (TLR4) 是一个II型跨膜蛋白, 是脂多糖 (LPS) 在细胞膜上的主要受体, 但到目前为止, LPS在细胞膜上的识别过程和机制并未得到很好的阐明[4][5]。为研究LPS在细胞膜识别过程中蛋白质的相互作用, 我们构建了带TLR4信号肽[6] (signal peptide, SP) 的增强型青色荧光蛋白 (enhanced cyan fluorescence protein, ECFP) 和增强型黄色荧光蛋白 (enhanced yellow fluorescence protein, EYFP) 的质粒载体——pECFP-C1-SP和pEYFP-C1-SP, 并在哺乳动物细胞中进行了表达。

1 材料和方法

1.1 主要仪器

凝胶图像分析仪 (法国Vilber Lourmat公司); 高速离心机 (美国Beckman公司); ABI 310全自动DNA测序仪 (美国Perkin-Elmer公司); 倒置显微镜 (日本Olympus公司); 显微荧光摄像/照相系统 (日本Nikon公司)。

1.2 主要试剂

DMEM购自Gibco BRL公司产品; 胎牛血清购自HyClone公司; 脂质体转染试剂Lipofectamine Reagent购自Gibco Life Technologies公司; 3S Plasmid Miniprep Kit和3S DNA Gel Purification Kit为上海博彩生物公司产品, TaKaRa MutanBEST Kit均购自日本的TaKaRa公司, 引物由上海申友公司合成。

1.3 质粒载体和细胞株

pECFP-C1、pEYFP-C1由美国Scripps Research Institute的黄爽博士馈赠; DH5 α 菌株、NIH3T3细胞由本室保存。

1.4 方法

1.4.1 带TLR4信号肽pECFP-C1和pEYFP-C1载体的构建 带TLR4信号肽载体的上游引物: 5'-CCA GCC ATG GCC TTC CTC TCC TGC GTG AGA CCA GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC AC-3'; 下游引物: 5'-GAT CAG AGT CCC AGC CAG GCG CGA GGC AGA CAT CAT GGT GGC GAC CGG TAG CGC TAG CGC TAG CG-3' 分别以pECFP-C1和pEYFP-C1质粒为模板, 用Pyrobest高保真聚合酶进行PCR反应 (95 °C、30 S, 53 °C、15 S, 72 °C、5 min), 对PCR反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收目的DNA片段。依照TaKaRa MutanBEST Kit的操作指南, 在微量离心管中加入: 回收目的片段17 μ l, 10 \times Blunting Kination 缓冲液 2 μ l, Blunting Kination Enzyme Mix 1 μ l, 37 °C反应10 min, 对反应液进行酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, TE溶解

沉淀。取5 μl 上述溶液加入等量的连接液 I ，反应1 h，全量反应液转化DH5 α 感受态细胞，卡那霉素平板筛选。挑取阳性克隆，摇菌过夜，提取质粒并进行测序鉴定，测序正确的质粒载体命名为pECFP-C1-SP 和 pEYFP-C1-SP (图1)。

1.4.2 细胞培养及细胞基因转染 按 6×10^4 细胞/孔将NIH3T3细胞铺于24孔板上，用含5%胎牛血清(FBS)的DMEM(Dulbecco's modified medium)培养液，置于37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中培养。待细胞长至50%融合时进行转染。将0.6 μg DNA用25 μl 无血清OPTI-DMEM稀释并混匀，取2 μl Lipofectamine，用25 μl 无血清OPTI-DMEM稀释并混匀，室温静置15 min。随后，将二者轻轻混匀，室温下孵育15 min。用200 μl 无血清的OPTI-DMEM培养基更换原先的培养基后，将DNA/Lipofectamine混合物加入24孔板，轻轻混匀，置于 CO_2 培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)中孵育5 h。吸去含转染混合物的培养基，加入0.5 ml含5%的胎牛血清新鲜DMEM培养基，置于 CO_2 培养箱中继续培养48 h[7]。

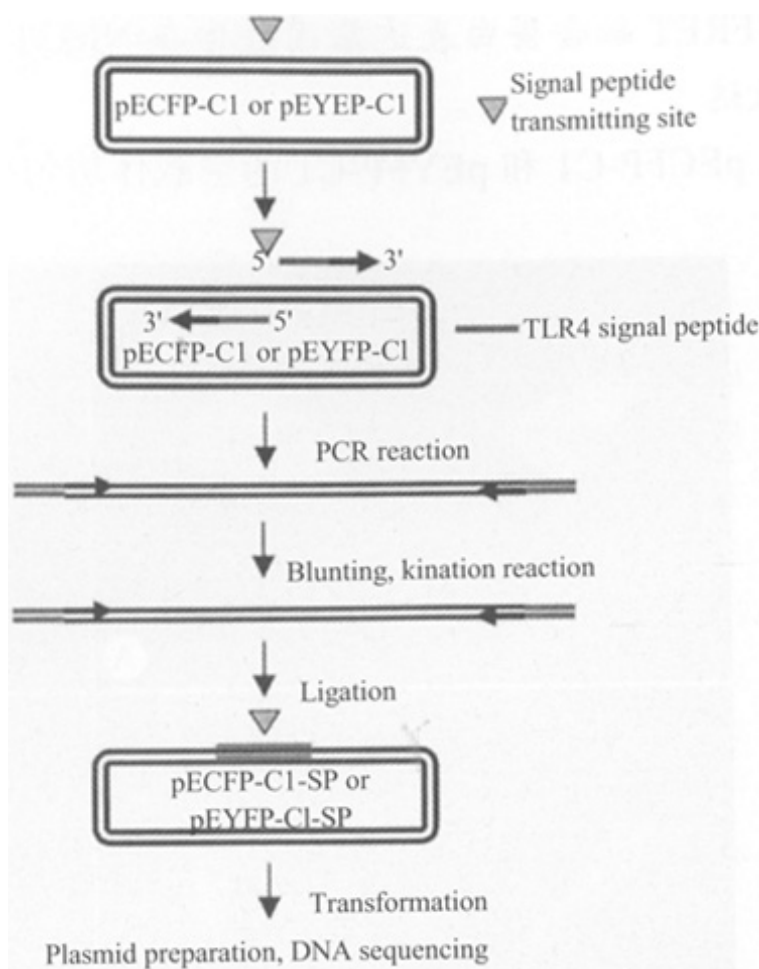


图1 带TLR4信号肽pECFP-C1和pEYFP-C1载体的制备流程

Fig.1 Construction process of pECFP-C1 and pEYFP-C1 with TLR4 signal peptide

1.5 荧光显微镜下观察和照相

观察青色荧光蛋白的荧光滤色块参数为：Excitation Filter 435/10(MBE34431)，Dichotic Mirror DM455(MBE34232)，Barrier Filter N BA480(MBE34535)；观察黄色荧光蛋白的荧光滤色块参数为：Excitation Filter 540/25(MBE34371)，Dichotic Mirror DM505 (MBE34270)，Barrier Filter N BA520(MBE34570)。

2 结果

2.1 PCR结果

PCR分别扩增出4.7 kb大小的条带，电泳结果见图2。

2.2 测序鉴定

用人巨细胞病毒立早启动子(immediate early promoter)测序引物测序，结果信号肽分别克隆到ECFP和EYFP的起始密码子后面，其中ECFP载体上信号肽第6位的碱基由T突变为G，但突变后仍然编码丝氨酸，是一个同义突变，证实载体构建成功。

2.3 FRET融合蛋白表达基因载体在NIH3T3细胞中的表达

pECFP-C1和pEYFP-C1的空载体均匀表达在细胞质、细胞膜及细胞核上(图3A, C)；带TLR4信号肽的pECFP-C1-SP和pEYFP-C1-SP则主要表达在细胞膜上(图3B, D)，符合预期的结果。

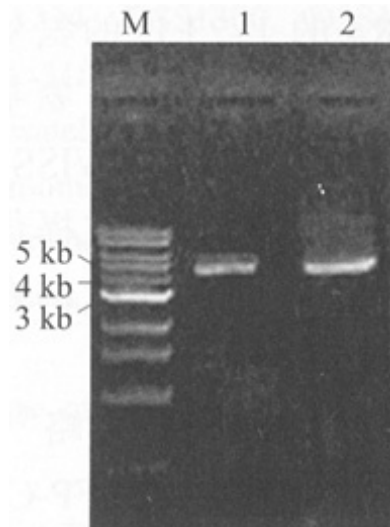


图2 pECFP-C1和pEYFP-C1加信号肽PCR电泳结果

Fig. 2 PCR results of pECFP-C1 and pEYFP-C1 with TLR4 signal peptide
M: Marker; Lane 1: ECFP with SP; Lane 2: EYFP with SP

3 讨论

FRET是在体检测生物分子纳米级距离和纳米级距离变化的少数几个工具之一。当供体发射的荧光与受体发色团分子的吸收光谱重叠，并且两个探针的距离在几个原子直径范围以内时，就会发生一种非放射性的能量转移，就产生FRET现象。具有长波长的GFP突变体——CFP和YFP经常用来作为FRET的一对荧光染料，因为我们研究的蛋白都是膜蛋白，我们首先应用点突变方法构建了带TLR4信号肽的ECFP和EYFP的质粒载体。

我们首先应用Technical University of Denmark生物序列分析中心开发的SignalP——一个强大的信号肽及其剪切位点检测工具对人TLR4的氨基酸序列进行了分析[8]，结果表明TLR4的1~23位的氨基酸可能是其信号肽，其最可能的可能位于TLR4氨基酸序列的23位的P和24位的E之间。登陆SWISS-PROT数据库(<http://www.expasy.org/sprot/>)，它提供的有效注释与我们的预测结果一致。随后我们在Genbank中获得其相应的DNA序列。

我们采用了一种巧妙的“特洛伊木马”的策略[9]，将这段信号肽序列插入到pECFP-C1和pEYFP-C1载体ECFP和EYFP编码序列的起始密码子的后面：利用ECFP和EYFP的起始密码子作为信号肽的第一个氨基酸，将编码其余22个氨基酸的66个碱基平均分为两段，反向引物携带前33个碱基，正向引物携带后33个碱基，应用TaKaRa MutanBEST Kit做PCR反应，Pyrobest高保真聚合酶的3'端外切活性能保证PCR产物末端不出现突出的A，平端连接后引物携带的信号肽就导入到ECFP和EYFP的起始密码子的后面，测序和转染结果证明我们的工作是对的，这样的载体对于研究膜蛋白之间的相互作用提供了一个有力的工具。

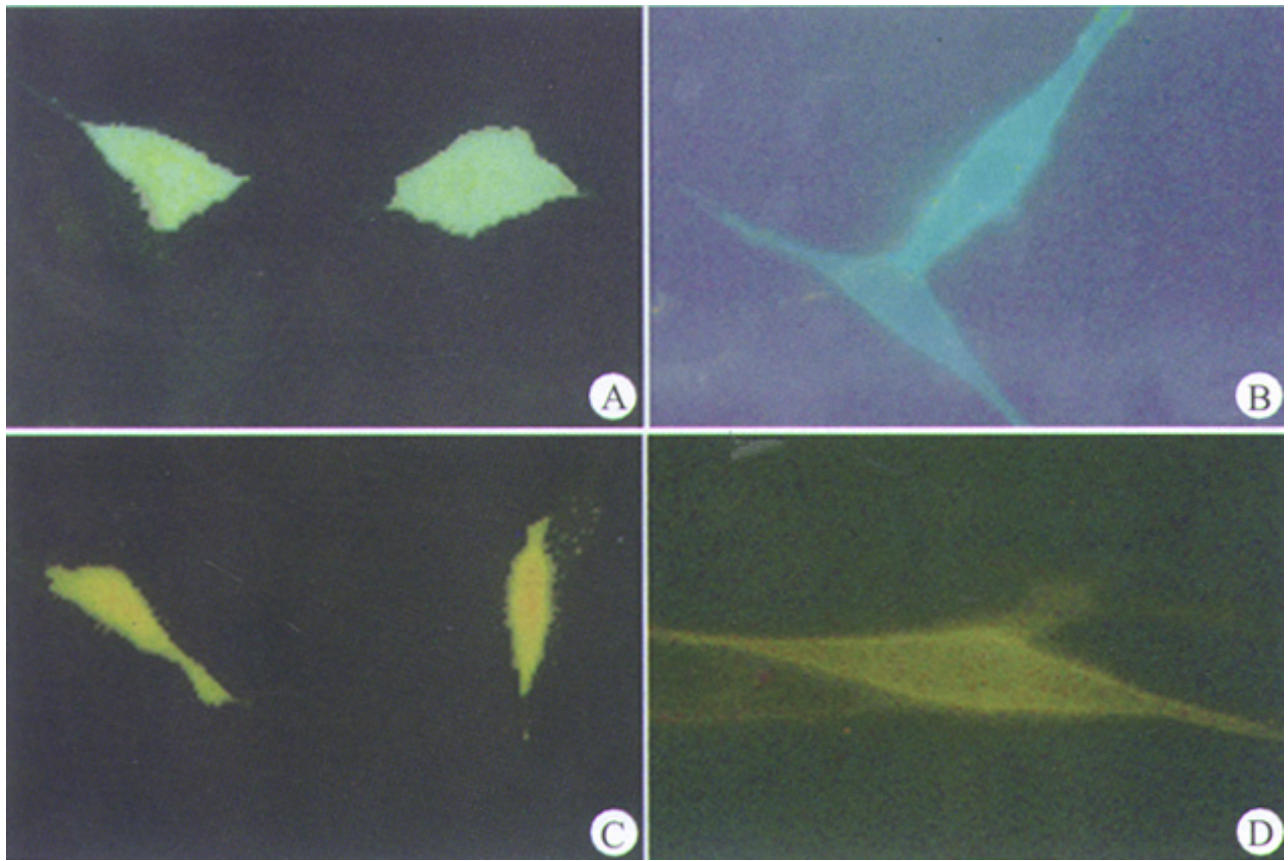


图3 FRET质粒载体在NIH3T3细胞中的表达($\times 100$)
 Fig. 3 Expression of FRET vectors in NIH3T3 cells ($\times 100$)
 A: pECFP-C1; B: pECFP-C1-SP; C: pEYFP-C1; D: pEYFP-C1-SP;

参考文献:

- [1] Paul RS. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer[J]. Nature Struct Biol, 2000, 7(9): 730-4.
 - [2] Kevin T, Mitsuhiro I. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo[J]. Curr Opin Struct Biol, 2001, 11: 573-8.
 - [3] Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 12501-4.
 - [4] Poltorak A, Smirnova I, He X, et al. Genetic and physical mapping of the Lps locus-identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region[J]. Blood Cells Mol Dis, 1998, 24(3): 340-55.
 - [5] Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene[J]. Science, 1998, 282(5396): 2085-8.
 - [6] Kazuo K, Naoki M, Yusuke O, et al. A pair of fluorescent resonance energy transfer-based probes for tyrosine phosphorylation of the crkII adaptor protein in vivo [J]. J Biol Chem, 2001, 276(33): 31305-10.
 - [7] 龚小卫, 秦清和, 王静珍, 等. p38MAPK红色荧光蛋白融合载体的构建及表达[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 171-3.
- Gong XW, Qin QH, Wang JZ, et al. Construction and expression of red fluorescent protein fusion vector incorporating p38 mitogen-activated protein kinase[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 171-3.

[8] Andreas DB, BF Francis Ouellette. 李衍达, 孙之荣, 等译. 生物信息学——基因和蛋白质分析的实用指南[M]. 北京: 清华大学出版社, 2000. 244-6.

[9] Vocero AA, Heyden NV, Lissy NA, et al. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein[J]. Nat Med, 1999, 5(1): 29-33.

参考文献:

[1] Paul RS. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer[J]. Nature Struct Biol, 2000, 7(9): 730-4.

[2] Kevin T, Mitsuhiko I. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo[J]. Curr Opin Struct Biol, 2001, 11: 573-8.

[3] Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 12501-4.

[4] Poltorak A, Smirnova I, He X, et al. Genetic and physical mapping of the Lps locus-identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region[J]. Blood Cells Mol Dis, 1998, 24(3): 340-55.

[5] Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene[J]. Science, 1998, 282(5396): 2085-8.

[6] Kazuo K, Naoki M, Yusuke O, et al. A pair of fluorescent resonance energy transfer-based probes for tyrosine phosphorylation of the crkII adaptor protein in vivo[J]. J Biol Chem, 2001, 276(33): 31305-10.

[7] 龚小卫, 秦清和, 王静珍, 等. p38MAPK红色荧光蛋白融合载体的构建及表达[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 171-3.

Gong XW, Qin QH, Wang JZ, et al. Construction and expression of red fluorescent protein fusion vector incorporating p38 mitogen-activated protein kinase[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(2): 171-3.

[8] Andreas DB, BF Francis Ouellette. 李衍达, 孙之荣, 等译. 生物信息学——基因和蛋白质分析的实用指南[M]. 北京: 清华大学出版社, 2000. 244-6.

[9] Vocero AA, Heyden NV, Lissy NA, et al. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein[J]. Nat Med, 1999, 5(1): 29-33.