

信号肽 -FRET 荧光蛋白载体的构建及在 NIH3T3 细胞中的表达

孙学刚^{袁东} 革^袁靖华^袁安海燕^袁李红乐^袁郭飞跃^袁张丽华^袁 勇^袁第一军医大学全军休克微循环重点实验室^袁 广州 510515^袁

摘要 目的 构建带 TLR4 信号肽的增强型青色荧光蛋白(pECFP-C1-SP)和增强型黄色荧光蛋白(pEYFP-C1-SP)的质粒载体。方法 使用荧光共振能量转移(FRET)技术研究 LPS 在细胞膜上的受体识别机制提供依据。采用点突变技术构建了带 TLR4 信号肽的载体。结果 DNA 测序证明所构建的带 TLR4 信号肽的载体正确。结论 和 DNA 测序表明融合蛋白载体的构建正确。TIR4 信号肽可以使蛋白主要表达在膜上。结论 所构建的带信号肽的荧光蛋白载体是正确的。pECFP-C1-SP 和 pEYFP-C1-SP 能够表达在细胞膜上。可有效地应用于膜蛋白相互作用的研究。

关键词 信号肽 荧光共振能量转移 膜蛋白相互作用

中图分类号 Q291 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2003)04-0310-03

Construction of signal peptide-FRET fusion expression vectors and their expressions in NIH3T3 cells

SUNXue-gang, SONGGe, LIUJing-hua, ANHai-yan, LIGHong-le, XINGFei-yue, ZHANGLi-hua, JIANGYong
Key Laboratory for Shock and Microcirculation of PLA, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To construct the fluorescence protein pairs with toll-like receptor 4 (TLR4) signal peptide, namely pECFP-C1-SP and pEYFP-C1-SP, therefore to make the application of fluorescence resonance energy transfer (FRET) possible in the study of the membrane protein interaction during lipopolysaccharide (LPS) recognition. Methods pECFP-C1-SP and pEYFP-C1-SP were constructed by means of site-directed mutagenesis, and the constructed plasmids were transiently transfected into NIH3T3 cells via lipofectamin to observe their intracellular expressions under a fluorescence microscope. Results DNA sequence analysis attested the validity of the constructed fluorescence vectors with signal peptide for FRET, and the expression of the vectors was located principally on the cell membrane as observed under fluorescence microscope. Conclusion The constructed vectors TLR4 signal peptide are valid and capable of expressing on the cell membrane, therefore they can be effectively used in the study of the interaction between the membrane proteins.

Key words: signal peptide; fluorescence resonance energy transfer; membrane protein interaction

荧光共振能量转移(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。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, 可以作为 FRET 的供体或者受体。

收稿日期 2003-01-30

基金项目 国家自然科学基金(2002CB513005)、国家自然科学基金(0030060)

Supported by National "973" Development Project in High-Tech Research (2002CB513005); Supported by National Natural Science Foundation of China (0030060)

作者简介 孙学刚 男, 山东人, 博士研究生, 主要从事细胞信号转导的研究

通讯作者 勇, 男, 电话 20-61648231, E-mail: yjiang@public.guangzhou.gd.cn

目前 Clontech 公司已有公开发售的 CFP 和 YFP 的质粒载体。但是这些载体并不适用于研究膜蛋白。Toll 样受体 4 (TLR4) 是一个域型跨膜蛋白。是脂多糖(LPS) 在细胞膜上的主要受体。但是到目前为止 LPS 在细胞膜上的识别过程和机制并未得到很好的阐明。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 信号肽的信号肽(pECFP-C1-SP)的增强型青色荧光蛋白(pEnhanced cyan fluorescence protein, pECFP)和增强型黄色荧光蛋白(pEnhanced yellow fluorescence protein, pEYFP)的质粒载体。pECFP-C1-SP 和 pEYFP-C1-SP 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(美国 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
本 Nikon 公司显微

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 GibcoLifeTechnologies 公司。SPlasmid Miniprep Kit 和 3S DNA Gel Purification Kit 为上海博彩生物公司产品。aKaRaMutanBEST 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 和 pEYFP-C1 由美国 Scripps Research Institute 的黄爽博士馈赠。DH5⁺ 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 GCCATGGCCTTCCTCTCCTGCGTGAGACCA GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAC-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。扩增后，将 PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳，切胶回收目的 DNA 片段。依照 TaKaRaMutanBESTKit 的操作指南，在微量离心管中加入酶切胶回收目的片段 17 μl，加入 2 μl Blunting Kination 缓冲液，2 μl Blunting Kination Enzyme Mix，1 μl 反应 10 min。对反应液进行酚 / 氯仿抽提，乙醇沉淀，乙醇溶解沉淀，上述溶液加入等量的连接液，反应 1 h。将全量反应液转化 DH5⁺ 感受态细胞，用氨苄青霉素平板筛选，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。

1.4.2 细胞培养及细胞基因转染 按 6 孔/孔板，将 NIH3T3 细胞铺于 24 孔板上。用含 5% 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modified medium) 培养液置于 37℃、5% CO₂ 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。将 DNA/Lipofectamine 混合物加入 24 孔板，轻轻混匀，置于 CO₂ 培养箱中，5% CO₂ 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 CO₂ 培养箱中继续培养 48 h。

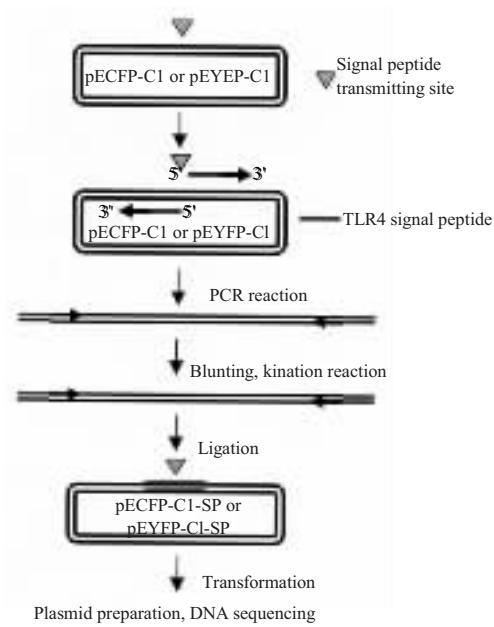


图 1 带 TLR4 信号肽 pECFP-C1 和 pEYFP-C1 载体的制备流程

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，Dichroic Mirror DM455(MBE34232)，Barrier Filter NBA480(MBE34535)；观察黄色荧光蛋白的荧光滤色块参数为：Excitation Filter 540/25，Dichroic Mirror DM505，Barrier Filter NBA520(MBE34570)。

2 结果

2.1 PCR 结果

PCR 分别扩增出 4.7 kb 大小的条带，见图 2。

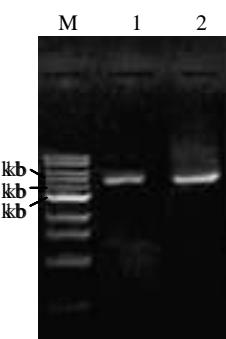


图 2 pECFP-C1 和 pEYFP-C1 加信号肽 PCR 电泳结果

Fig.2 PCR results of pECFP-C1 and pEYFP-C1 with TLR4 signal peptide

M:Marker; Lane 1:pECFP with SP;
Lane 2:pEYFP with SP

2.2 测序鉴定

用人巨细胞病毒立即启动子 (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。这是一个同义突变，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

胞质及细胞膜及细胞核上。图 3A 表示 TLR4 信号肽的 pECFP-C1-SP 和 pEYFP-C1-SP 则主要表达在细胞膜上。图 3B 表示符合预期的结果。

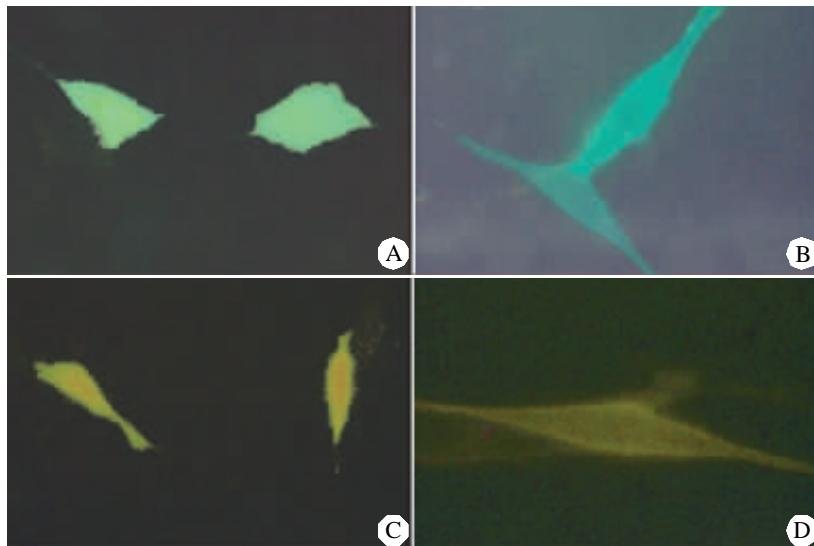


图 3 FRET 质粒载体在 NIH3T3 细胞中的表达
Fig. 3 Expression of FRET vectors in NIH3T3 cells (伊00)
A:pECFP-C1; B:pECFP-C1-SP;
C:pEYFP-C1; D:pEYFP-C1-SP;

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时，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，从而产生 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。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 Genebank 中获得其相应的 DNA 序列。

我们采用了一种巧妙的策略，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，高保真聚合酶的 3' 端外切活性能够保证 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。这样的一个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。

参考文献院

- 1 Paul RS. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *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*. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11:573-8.
- 3 Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *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. *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 the Tlr4 gene. *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*. *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. *第一军医大学学报*, 2002, 22(2):171-3.
- 8 Gong XW, Qin QH, Wang JZ, et al. Construction and expression of red fluorescent protein fusion vector incorporating p38 mitogen-activated protein kinase. *First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(2):171-3.
- 9 Andreas DB, BF Francis, Ouillette. 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. 北京: 清华大学出版社, 2000. 244-6.
- 10 Vocero AA, Heyden NV, Lissy NA, et al. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med*, 1999, 5(1):29-33.