

# 信号肽-FRET 荧光蛋白载体的构建及在 NIH3T3 细胞中的表达

孙学刚袁革袁靖华袁海燕袁李红乐袁鄒飞跃袁张丽华袁姜勇第一军医大学全军休克微循环重点实验室袁广东 广州 510515

**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,为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。方法 采用点突变技术构建了带 TLR4 信号肽的载体,用脂质体瞬时转染 NIH3T3 细胞,观察带信号肽载体和融合蛋白载体在细胞内的表达。结果 DNA 测序证明所构建的带 TLR4 信号肽的载体正确,酶切和 DNA 测序表明融合蛋白载体的构建正确。TLR4 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,并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 R291 文献标识码 B 文章编号 000-2588(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,LIHong-le,XINGFei-yue,ZHANGLi-hua,JIANGYong KeyLaboratoryforShockandMicrocirculationofPLA,FirstMilitaryMedicalUniversity,Guangzhou510515,China

**Abstract:** Objective Toconstructthefluorescenceproteinvectorpairswithtoll-likereceptor4(TLR4)signalpeptide,namely pECFP-C1-SPandpEYFP-C1-SP,thereforetomaketheapplicationoffluorescenceresonanceenergytransfer(FRET)possible inthestudyofthembraneproteininteractionduringlipopolysaccharide (LPS) recognition. Methods pECFP-C1-SPand pEYFP-C1-SP were constructed by means of site-directed mutagenesis, and the constructed plasmids were transiently transfected into NIH3T3cells via lipofectamin to observe their intracellular expressions under a fluorescence microscope. Results DNAsequenceanalysisattestedthevalidityoftheconstructedfluorescencevectorswithsignalpeptideforFRET,and the expression ofthe vectors waslocated principally on the cell membrane as observed under fluorescence microscope. Conclusion TheconstructedvectorsTLR4signalpeptidearevalidandcapableofexpressingonthe cell membrane,therefore theycanbeeffectivelyusedinthestudyoftheinteractionbetweenthe membraneproteins.

**Key words:** signalpeptide;fluorescenceresonanceenergytransfer;membraneproteininteraction

荧光共振能量转移(fluorescenceresonanceenergy 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。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。

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)是一个域型跨膜蛋白,它是脂多糖(LPS)在细胞膜上的主要受体。但到目前为止,PS 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。

收稿日期 2003-01-30

基金项目 73 计划项目 (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 姜勇,电话 020-61648231, e-mail: yjiang@public.guangzhou.gd.cn.

### 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 公司显微镜荧光摄像 / 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 GibcoLifeTechnologies 公司 SPlasmid Miniprep Kit 和 3S DNAGelPurification Kit 为上海博彩生物公司产品 TaKaRaMutanBEST Kit 均购自日本的 TaKaRa 公司

### 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 $\alpha$  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 GCCATGGCCTTCCTCCTCCTGCGTGAGACCA GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTAC-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 50 $^{\circ}$ C 30s 72 $^{\circ}$ C 2min 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 TaKaRaMutanBESTKit 的操作指南在微量离心管中加入回收目的片段 17 $\mu$ l Blunting Kination 缓冲液 2 $\mu$ l Blunting Kination Enzyme Mix 1 $\mu$ l 反应 10min 对反应液进行酚 / 氯仿抽提乙醇沉淀溶解沉淀取 5 $\mu$ l 上述溶液加入等量的连接液反应 1h 全量反应液转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞涂布于那霉素平板筛选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伊 $0^4$  细胞 / 孔将 NIH3T3 细胞铺于 24 孔板上用含 5% 胎牛血清的 DMEM Dulbecco's modified medium 培养基置于 37 $^{\circ}$ 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 $\mu$ g DNA 用 25 $\mu$ l 无血清 OPTI-DMEM 稀释并混匀取 2 $\mu$ l Lipofectamine 用 25 $\mu$ l 无血清 OPTI-DMEM 稀释并混匀室温静置 15min 随后将二者轻轻混匀室温下孵育 15min 用 200 $\mu$ l 无血清的 OPTI-DMEM 培养基替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 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$  中孵育 5h 吸去含转染混合物的培养基加入 0.5ml 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 48h

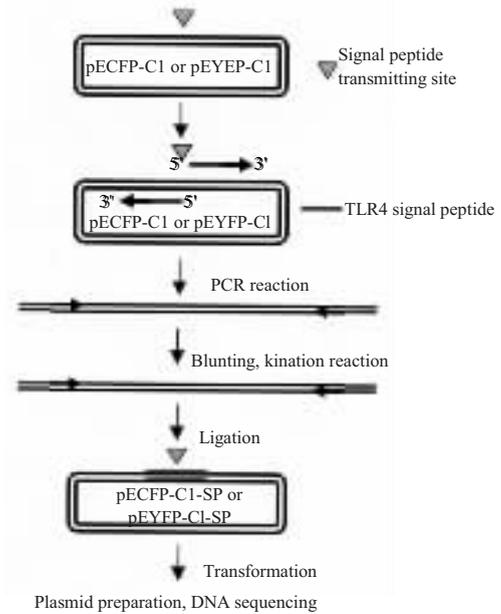


图 1 带 TLR4 信号肽 pECFP-C1 和 pEYFP-C1 载体的制备流程  
Fig.1 Construction process of pECFP-C1 and pEYFP-C1 with TLR4 signal peptide

### 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院 Excitation Filter 435/10 院 MBE34431 院 Dichotic Mirror DM455(MBE34232) 院 Barrier Filter NBA480(MBE34535) 院 观察黄色荧光蛋白的荧光滤色块参数为院 Excitation Filter 540/25 院 MBE34371 院 Dichotic Mirror DM505 院 MBE34270 院 Barrier Filter NBA520 院 MBE34570 院

## 2 结果

### 2.1 PCR 结果

PCR 分别扩增出 4.7kb 大小的条带电泳结果见图 2

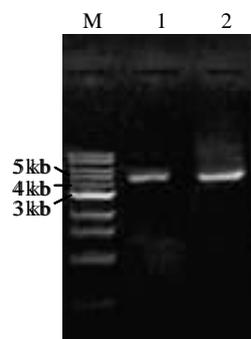


图 2 pECFP-C1 和 pEYFP-C1 加信号肽 PCR 电泳结果  
Fig. 2 PCR results of pECFP-C1 and pEYFP-C1 with TLR4 signal peptide  
M:Marker; Lane 1:ECFP with SP; Lane 2:EYFP with SP

### 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

