

# $\gamma$ -干扰素基因 pIRES 改进型黄色荧光蛋白载体的构建

蓝育青, 葛 坚, 卓业鸿, 林明楷, 王金林, 刘海泉, 李艳艳

(中山医科大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

**摘 要:** 【目的】构建携带 $\gamma$ -干扰素基因(*ifn- $\gamma$* )的 pIRES 改进型黄色荧光蛋白载体(pIRES-EYFP-*IFN- $\gamma$* ), 为 $\gamma$ -干扰素基因的体内表达及蛋白定位提供理想的标记。【方法】根据已知 $\gamma$ -干扰素基因序列, 设计在目的片段两端分别带 *EcoRV* 和 *Not I* 酶切位点序列的 2 条引物, 用 PCR 技术从质粒 pcDNA3-*IFN- $\gamma$*  中扩增出 *ifn- $\gamma$*  (499 bp), PCR 产物用 *EcoRV* 和 *Not I* 双酶切后回收纯化, 定向克隆至商品质粒 pIRES-EYFP, 重组质粒 pIRES-EYFP-*IFN- $\gamma$*  用限制性内切酶酶切和 DNA 序列分析鉴定。同时以脂质体为介导, 将 pIRES-EYFP-*IFN- $\gamma$*  转染正常人眼 Tenon 囊成纤维细胞, 48 h 后于荧光倒置显微镜下观察基因的表达。【结果】DNA 序列分析证明 PCR 产物为 *ifn- $\gamma$* , 将重组质粒转染正常人眼 Tenon 囊成纤维细胞, 荧光倒置显微镜下可见黄色荧光蛋白的表达, 转染率约为 43%。【结论】成功构建 pIRES-EYFP-*IFN- $\gamma$*  载体为利用黄色荧光蛋白标记在体内进行 $\gamma$ -干扰素基因表达和蛋白定位奠定基础。

**关键词:** 干扰素 II 型/遗传学; 黄色荧光蛋白; 遗传载体; 克隆; 分子; 序列分析, DNA

中图分类号: R775.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)03-0197-03

**Construction of the Enhanced Yellow Fluorescent Protein Expression Vector Carrying *IFN- $\gamma$*  Gene** LAN Yu-qing, GE Jian, ZHUO Ye-hong, LIN Ming-kai, WANG Jin-lin, LIU Hai-quan, LI Yan-yan. (Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】To construct the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) vector carrying interferon- $\gamma$  gene (*ifn- $\gamma$* ) in order to provide an ideal reporter in the expression of *ifn- $\gamma$*  and identify the location of protein in vitro and in vivo. 【Methods】According to the nucleotide sequence of *ifn- $\gamma$*  gene, a pair of oligonucleotides was designed as primer which contained nucleotide sequence of *EcoRV* and *Not I* restriction endonuclease at the two end respectively. The gene encoding for *ifn- $\gamma$*  (499 bp) was amplified using PCR technique. The PCR product was digested with *EcoRV* and *Not I*, and then cloned into the plasmid pIRES-EYFP. The recombinant plasmid pIRES-EYFP-*IFN- $\gamma$*  was identified by restriction endonuclease enzyme analysis and partial DNA sequence analysis. And the recombinant plasmid pIRES-EYFP-*IFN- $\gamma$*  was transfected into human Tenon's capsule fibroblasts with Lipofectamine, the expression of yellow fluorescent protein was observed after 48 h. 【Results】The *ifn- $\gamma$*  was successfully amplified and verified by partial DNA sequence analysis. The yellow fluorescent protein was expressed after transfection. The transfecting rate was about 43%. 【Conclusion】The EYFP expression vector carrying *ifn- $\gamma$*  gene is successfully established. This research work has formed a base for monitoring the *ifn- $\gamma$*  gene expression and identifying protein position in living cells.

**Key words:** Interferon type II/genetic; yellow fluorescent protein; genetic vectors; cloning, molecular; sequences analysis, DNA

改进型黄色荧光蛋白(enhanced yellow fluorescent protein, EYFP)为绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)衍生物, 含有使蛋白发出黄色荧光的突变, 其在 527 nm 处激发出的荧光比野生型 GFP 强约 35 倍, 由于其编码区选用哺乳动物所偏爱密码子表达量高等特性, 非常适宜于荧光显微镜和流式细胞仪分析<sup>[1,2]</sup>。为研究 $\gamma$ -干扰素对眼部纤维增殖的抑制作用, 我们曾用脂质体介导的方法, 用携带 *IFN- $\gamma$*  基因的真核表达载体 pcDNA3-*IFN- $\gamma$*  转染眼部成纤维细胞<sup>[3]</sup>。但上述方法

的缺点是不能检测 *IFN- $\gamma$*  基因在细胞和生物活体内的表达和蛋白定位, 因此我们利用 EYFP 的发光特性, 构建携带 *IFN- $\gamma$*  基因的 EYFP 载体 pIRES-EYFP-*IFN- $\gamma$* , 以便追踪 *IFN- $\gamma$*  基因的去向, 同时评价基因转移的效率。

## 1 材料和方法

### 1.1 材 料

克隆载体质粒为 pIRES-EYFP (Clontech 公司, 中山医科大学孙逸仙纪念医院王金林博士提

收稿日期: 2001-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39700153); 广东省自然科学基金资助项目(970082)

作者简介: 蓝育青(1968-), 女, 广东和平人, 畲族, 博士, 现在中山大学附属第二医院眼科, 主治医师; 葛坚, 导师, 通讯作者; 王金林, 现在东莞市人民医院外科。

供),受体大肠菌为 DH5 $\alpha$ 。pcDNA3IFN- $\gamma$  由中山医科大学孙逸仙纪念医院闵军博士提供。工具酶 *Eco*RI, *Eco*RV, *Not*I 和 T<sub>4</sub>DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司。脂质体 Lipofectamine 购自 GIBCO/BRL 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计和合成 根据 pcDNA3IFN- $\gamma$  质粒图谱所含 IFN- $\gamma$  DNA 序列,设计 1 对引物,P1 引入 *Eco*RV 酶切位点,P2 引入 *Not*I 酶切位点。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。引物序列如下:

P1 5'-ATCGGATATCATGAAATATACAAGTTATATC-3'; P2 5'-ATAAGAATGCGCCGCTTACTGGGATGCTCTTCGACC-3'

1.2.2 pcDNA3IFN- $\gamma$  质粒的提取 按 QIAGEN Plasmid Midi 质粒提取试剂盒说明扩增提纯上述质粒,用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳测定其浓度并计算纯度后,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 IFN- $\gamma$  目的基因片段的 PCR 扩增 在 0.5 mL Eppendorf 管中依次加入下列成分:pcDNA3IFN-质粒(以此为 PCR 模板)2  $\mu$ L(1 g/L),引物 P1 和 P2 各 2  $\mu$ L(10 pmol/L),dNTP 4  $\mu$ L(2 mmol/L),10 $\times$  buffer 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 29.5  $\mu$ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,加入 *Taq* 酶 0.5  $\mu$ L(1 U),液体石蜡油 30  $\mu$ L,整个反应在 PCR 扩增仪上完成。反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 1 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环。循环结束后取样加入 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 目的基因的回收、纯化和鉴定 按 PCR Fragment Recovery Kit 说明书,回收纯化 PCR 产物。确认测序结果正确后,将上述回收纯化的 PCR 产物用 *Eco*RV 和 *Not*I 双酶切,反应条件为:PCR 产物 1  $\mu$ L(1 g/L),*Eco*RV 和 *Not*I 各 1  $\mu$ L,10 $\times$  H Buffer 2  $\mu$ L,0.1 g/L BSA 2  $\mu$ L,1 g/L Triton X-100 2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 11  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 1 h。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后回收 DNA 片段(Insert DNA)。同样将 pIRES-EYFP 质粒用 *Eco*RI 和 *Not*I 双酶切,再切胶回收 DNA 片段(Vector DNA)。将 Insert DNA 与 Vector DNA 按 4:1 混合进行连接,反应体积 20  $\mu$ L,用 T<sub>4</sub> 连接酶,16 $^{\circ}$ C 连接 12 h。取 3  $\mu$ L 连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* JM 109,在含氨苄西林(50 mg/L)的 LB 平板上随机挑选 4 个菌落提取质粒,用快速酚/氯仿抽提和 10 g/L 琼脂糖凝胶电

泳方法初筛,再用 *Eco*RV 和 *Not*I 双酶切和 PCR 扩增对重组子进行复筛和鉴定。最后对阳性的重组质粒,以 P2 为引物,行目的基因的部分 DNA 序列分析(样本送宝生物工程(大连)有限公司)。

1.2.5 基因转染 根据 Lipofectamine 转染说明书,在 6 孔板上每孔接种  $1 \times 10^5$  个正常人眼 Tenon 囊成纤维细胞,37 $^{\circ}$ C,体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,至细胞 80% 融合。配置溶液 A:2  $\mu$ g 质粒 pIRES-EYFP/IFN- $\gamma$  加入 100  $\mu$ L 无血清无双抗的 DMEM/F12 培养液中;溶液 B:10  $\mu$ L 脂质体 Lipofectamine 加入 90  $\mu$ L 无血清无双抗的 DMEM/F12 培养液中;轻柔混合溶液 A 和 B 形成转染液,室温放置 15 min 后,加入 0.8  $\mu$ L 无血清无双抗的 DMEM/F12 培养液。在经无血清培养液漂洗的细胞中加入上述转染液,培养箱中孵育 5 h,吸出转染液,加入含 100 mL/L 胎牛血清完全培养液,培养箱中继续培养 72 h 后进行传代,于转染 48 h 在荧光倒置显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 目的基因 PCR 扩增

用 P1 和 P2 扩增 pcDNA3IFN- $\gamma$  产生的条带位于 500 bp DNA 附近,与预期的 499 bp 相近。用此引物多次重复 PCR 扩增均显示特异性条带,提示引物的设计是合理的(图 1)。

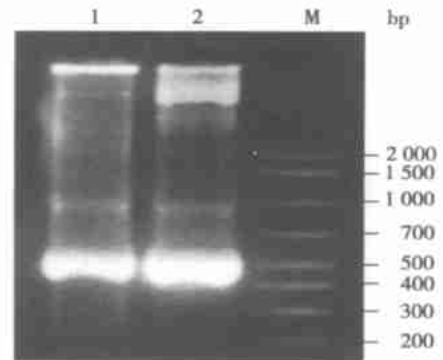


图 1 pcDNA3IFN- $\gamma$  PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Analysis of the PCR product of pcDNA3IFN- $\gamma$  by gel electrophoresis

1, 2: pcDNA3IFN- $\gamma$  plasmid DNA as temple; M: PCR marker (Bio-Rad 50~2 000 bp DNA marker)

### 2.2 目的基因的克隆和筛选

从氨苄西林 LB 平板随机挑选的 4 个菌落,摇菌扩增重组质粒,经酚/氯仿抽提和 10 g/L 琼脂糖

凝胶电泳初筛,有2个重组子位于空白 pIRES-EYFP 质粒条带的后方。将初筛到的这2个重组质粒用 *EcoRV* 和 *Not I* 双酶切后产生2条带,分别为 5.2 kb 和 527 bp; pCR 扩增也显示出特异性条带(约 527 bp),提示重组质粒含有目的基因 IFN- $\gamma$ (图2)。

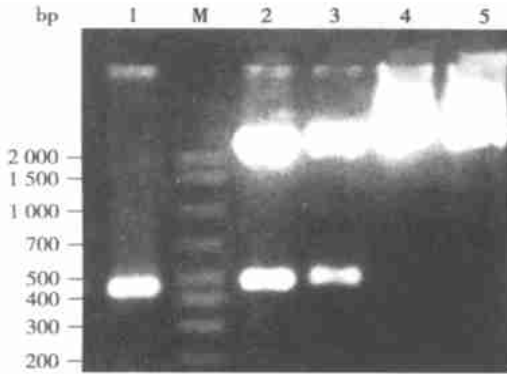


图2 重组子 pIRES EYFP-IFN- $\gamma$  的双酶切和 PCR 鉴定

Fig 2 Identification of recombinant pIRES EYFP-IFN- $\gamma$  by restriction endonuclease digestion and PCR

1: PCR fragment(about 500 bp); M: Bio-Rad 50 ~ 2 000 bp DNA marker; 2, 3: pIRES-EYFP-IFN- $\gamma$  cut by *EcoRV*/*Not I*; 4, 5: pIRES-EYFP-IFN- $\gamma$  plasmid

### 2.3 ifn- $\gamma$ 部分序列分析

PCR 产物的序列分析与文献报道[8]的 ifn- $\gamma$  DNA 完全一致。

### 2.4 基因转染

以脂质体 Lipofectamine 为介导,将 pIRES-EYFP-IFN- $\gamma$  转染正常人眼 Tenon 囊成纤维细胞,转染后 48 h,于荧光倒置显微镜下可见部分细胞发出黄绿色荧光,3 个高倍镜视野下计数,转染率约 43%(图3)。



图3 pIRES EYFP-IFN- $\gamma$  转染人眼 Tenon 囊成纤维细胞后 48 h

Fig 3 Expressed yellow fluorescent protein after pIRES EYFP-IFN- $\gamma$  was transfected to human Tenon's capsule fibroblasts 48 h later (200 $\times$ )

## 3 讨论

为研究  $\gamma$ -干扰素基因在活细胞的表达和蛋白

定位,我们选择 EYFP 构建携带 ifn- $\gamma$  的 EYFP 载体。质粒 pIRES-EYFP 为哺乳动物表达载体,在其多克隆位点与 EYFP 之间含有心内膜炎病毒(encephalomyocarditis virus, ECMV)的核糖体内部切入位点(Internal Ribosome Entry, IRES),这一结构保证了从同一条 mRNA 翻译 2 个开放性阅读框架(Open reading frame, ORF),即目的基因和标记基因的稳定表达<sup>[4-5]</sup>。

根据质粒 pIRES-EYFP 和 pcDNA3IFN- $\gamma$  的有关资料,参考有关文献<sup>[6]</sup>,我们设计了分别含有 *EcoRV* 和 *Not I* 酶切位点的一对 ifn- $\gamma$  引物,扩增出来的 PCR 片段长约 500 bp,与资料提供的 ifn- $\gamma$  mRNA 长度相当。将 PCR 产物回收纯化后,酶切定向连接到 pIRES-EYFP 载体上,挑选出阳性克隆。DNA 序列分析测序结果与已知 ifn- $\gamma$  序列完全一致<sup>[7]</sup>。以脂质体为介导,将 pIRES-EYFP-IFN- $\gamma$  转染正常人眼 Tenon 囊成纤维细胞,结果可见黄色荧光蛋白的表达,提示 pIRES-EYFP-IFN- $\gamma$  载体构建成功。本研究为利用黄色荧光蛋白标记在体内实时监测  $\gamma$ -干扰素基因表达和蛋白定位奠定基础,同时也为我们今后将绿色或黄色荧光蛋白转染胚胎干(ES)细胞,非侵入地示踪活体 ES 细胞的诱导分化过程创造条件。

### 参考文献:

- [1] 刘默芳,王恩多. 绿色荧光蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(3): 238.
- [2] Ormo M, Cubitt A B, Kallio K, *et al.* Crystal structure of the *Aequorea Victoria* green fluorescent protein[J]. *Science* 1996, 273(5280): 1392.
- [3] Lan Y Q, Ge J, Lin M K, *et al.* The preliminary study of interferon- $\gamma$  gene transfection to human Tenon's capsule fibroblasts *in vitro* [J]. *Eye Science*, 2000, 16(3): 153.
- [4] Rees S, Coote J, Stables J, *et al.* Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein[J]. *Biotechniques* 1996, 20(1): 102.
- [5] Stull R A, Hyun W C, Pallavicini M G. Simultaneous flow cytometric analyses of enhanced green and yellow fluorescent proteins and cell surface antigens in doubly transduced immature hematopoietic cell populations [J]. *Cytometry*, 2000, 40(2): 126.
- [6] 刘彦文,卢春彬,林勇,等. 绿色荧光蛋白基因 gfp 真核表达载体 pcTKGFP 的构建[J]. 中山医科大学学报, 1999, 20 增刊: 8.
- [7] Devos R, Cheroutre H, Taya Y, *et al.* Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells [J]. *Nucleic Acids Res* 1982, 108(8): 2487.

(编辑 刘清海)