

# 加强型黄色荧光蛋白和 VEGF 双基因载体 在肝细胞共转染表达

王金林<sup>1</sup>, 闵 军<sup>1</sup>, 周晓东<sup>2</sup>, 陈亚进<sup>1</sup>, 陈积圣<sup>1</sup>

(中山大学附属第二医院 1. 普外科, 2. 医学研究中心, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】构建携带加强型黄色荧光蛋白(EYFP)和人类血管内皮生长因子(VEGF)的双基因真核表达载体 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub>, 用 EYFP 作标记基因, 研究外源性 VEGF<sub>121</sub> 基因在大鼠原代培养肝细胞转染表达, 为实时监测 VEGF<sub>121</sub> 基因修饰肝细胞移植后状态提供基础。【方法】将 pcDNA3VEGF<sub>121</sub> 中 VEGF<sub>121</sub> 定向克隆到 pIRES-EYFP, 构建重组质粒 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub>, 经酶切、PCR 扩增和部分 DNA 序列分析证实后, 转染大鼠原代培养肝细胞, 用荧光显微镜等观察转染表达。【结果】酶切、PCR 扩增和部分 DNA 序列分析等证明 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 质粒成功构建, 转染大鼠原代培养肝细胞后, 可以通过荧光显微镜观察到黄绿色荧光。【结论】构建了 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 质粒, 为实时监测外源性 VEGF<sub>121</sub> 基因转染表达和 VEGF 基因修饰肝细胞的基因治疗奠定基础。

**关键词:** 黄色荧光蛋白; 内皮生长因子; 细胞, 培养的; 转染

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)04-0254-03

**Co-transfection and Expression of Enhanced Yellow Fluorescent Protein and Vascular Endothelial Growth Factor Double Gene Vector on Hepatocyte** WANG Jin-lin, MING Jun, ZHOU Xiao-dong, CHEN Ya-jin, CHEN Ji-sheng. (Department of Hepato-biliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To construct double gene eukaryotic expression vector pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub>. By using enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) as a marker gene to study the transfection and expression of VEGF<sub>121</sub> gene. 【Methods】VEGF<sub>121</sub> gene was cloned into plasmid pIRES-EYFP. pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> was constructed and identified by restriction endonuclease enzyme analysis PCR amplification and partial DNA sequence analysis. Then the plasmid was transfected into primary cultured hepatocyte. Expression of exogenous genes were observed through fluorescence microscope. 【Results】pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> plasmid was identified though restriction endonuclease enzyme analysis PCR amplification and partial DNA sequence analysis. After transfected into rat primary cultured hepatocyte yellow-green fluorescence was observed under fluorescence microscope. 【Conclusion】The eukaryotic expression plasmid pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> has been constructed successfully.

**Key words:** yellow fluorescent protein; endothelial growth factor; cell, cultured; transfection

加强型黄色荧光蛋白(enhanced yellow fluorescent protein, EYFP)是一个野生型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)黄绿色变种, 以 EYFP 基因作为报告基因可用荧光显微镜方便快捷观测到基因转染和表达。本研究通过构建携带有 EYFP 和人源性血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)双基因的真核表达载体, 并在体外转染改良胶原酶原位灌注法分离的大鼠原代培养肝细胞, 利用 EYFP 标记用荧光显微镜观察 VEGF<sub>121</sub> 基因在肝细胞转染表达, 为 VEGF<sub>121</sub> 基因转染的肝细胞移植后进行实时监测提供可能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒 pcDNA3VEGF<sub>121</sub> 质粒由本室保存。质粒 pIRES-EYFP 购自 CLONtech 公司, 为含有 IRES 和加强型黄色荧光蛋白基因的载体, 在激发波长为 488 nm 或 513 nm 时发出黄色荧光。

1.1.2 脂质体 阳离子脂质体转染试剂 CLONfectin 购自 CLONtech 公司。

1.1.3 工具酶 BamH I、EcoR I、EcoR V、T<sub>4</sub> DNA 连接酶均为 Boehringer Mannheim 公司产品, Klenow 片段购自华美生物工程公司。

1.1.4 实验动物 同系成年雄性 SD 大鼠, 体质量

收稿日期: 2001-12-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670715); 国家教委博士点基金资助项目(9947)

作者简介: 王金林(1966-), 男, 江西南康人, 博士, 主治医师, 现在广东省东莞市人民医院普外科(511700); 陈积圣, 教授, 博士生导师。

约 200~250 g, 中山大学医学实验动物中心提供。

## 1.2 方法

1.2.1 真核表达载体 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 构建、扩增、纯化和鉴定 将含 121 个氨基酸编码序列的 VEGF<sub>121</sub> cDNA 进行定向克隆插入质粒 pIRES-EYFP 中, 构建 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub>; 将 pcDNA3VEGF<sub>121</sub> 用 *Bam*H I 单酶切后, 进行末端平滑化处理, 再用 *Eco*R I 酶切, 回收 520 bp 插入片段; 将 pIRES-EYFP 质粒用 *Eco*R V 和 *Eco*R I 酶切, 回收载体片段, 用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶将插入片段和载体片段连接后, 转化感受态大肠杆菌 JM 109 中, 从平板中挑选单个菌落, 进行质粒扩增、纯化和酶切鉴定, DNA 测序。

1.2.2 肝细胞分离、原代培养 采用改良原位胶原酶灌注法<sup>[1]</sup>分离、收获肝细胞, 离心和过 Percoll 柱, 去除非实质性细胞和死的肝细胞, 用 4 g/L 台盼蓝检查肝细胞活力, 肝细胞重悬浮于 NAIR-1 培养液(日本通商产业省工业技术院产业技术融合领域研究所仿生组配方)中。

1.2.3 VEGF<sub>121</sub> 基因转染大鼠原代培养肝细胞 参照 CLONfectin 使用说明和 Watanabe 方法<sup>[2]</sup>, 用 CLONfectin 将质粒 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 转染到用 6 孔板培养的大鼠原代培养的肝细胞中。质粒 DNA 和 CLONfectin 按 5 μg : 15 μg 混合孵育, 用 NAIR-1 培养基稀释, 将混合液加入 6 孔板大鼠原代培养肝细胞中, 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵育 2 h, 吸去转染液, 加入 NAIR-1 培养基继续进行原代培养。

1.2.4 大鼠原代培养肝细胞 VEGF<sub>121</sub> 基因转染表达观察 转染 48 h 后, 在倒置相差显微镜和荧光显微镜下观察 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 转染肝细胞的形态和外源性基因的转染表达, 并用流式细胞仪进行转染效率检测。

## 2 结果

### 2.1 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 酶切鉴定

经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切、电泳后, 出现约 5.2 kb 和约 500 bp 条带(图 1), 提示我们构建的质粒中含有 520 bp 的 VEGF<sub>121</sub> cDNA。

### 2.2 目的基因 PCR 扩增

以 VEGF 基因 cDNA 的 97~354 bp 共 258 bp 长度序列为模板合成一对引物, 即 S1: 5'-GAGGG-CAGAATCATCACGAAGT-3' 和 S2: 5'-TCCTAT-

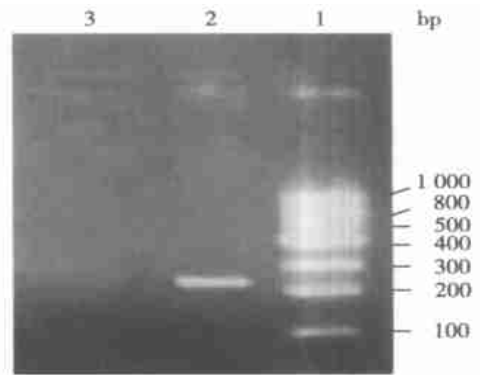


图 1 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 和 pIRES-EYFP 酶切鉴定  
Fig 1 Recombinant plasmid pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> and plasmas pIRES-EYFP

Those was verified with restriction endonuclease enzyme analysis. 1: 1 kb DNA ladder; 2: pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> recombinant plasmid was digested with *Bam*H I and *Eco*R V; 3: plasmid pIRES-EYFP was digested with *Bam*H I and *Eco*R V

GTGCTGGCCTTGGTGA-3'。分别以 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub>、pIRES-EYFP 质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 仅前者的扩增产物在琼脂糖电泳 200~300 bp 之间显示特异性条带, 重复多次均如此, 证明载体 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 正确构建(图 2)。

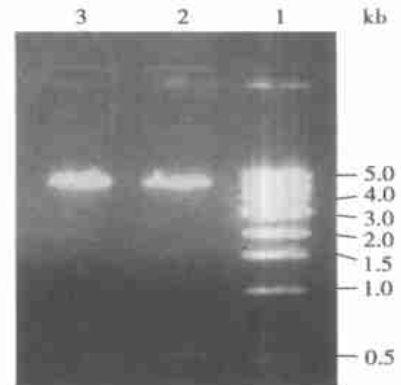


图 2 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 和 pIRES-EYFP PCR 扩增产物  
Fig 2 PCR product of recombinant plasmid pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> and plasmid pIRES-EYFP

Those was electrophorised in agarose gel. 1: 100 bp DNA ladder; 2: pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> plasmid DNA as template; 3: pIRES-EYFP plasmid DNA as template

### 2.3 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 质粒部分 DNA 序列分析

pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 质粒 DNA 测序结果, 与 GenBank 中 VEGF<sub>121</sub> cDNA 序列一致。

## 2.4 肝细胞分离、原代培养

本组平均每只 SD 大鼠可获得肝细胞数为  $0.6 \times 10^9$ , 肝细胞活力为 95%, 按  $0.1 \times 10^6/\text{cm}^2$  接种在 6 孔板上用 NAIR-1 培养基进行原代培养。

## 2.5 VEGF<sub>121</sub> 基因转染原代培养肝细胞形态学观察及转染效率检测

转染 48 h 后, VEGF<sub>121</sub> 基因转染后肝细胞活力用 4 g/L 台盼蓝染色法检测为 93%, 相差显微镜见 VEGF 基因转染肝细胞形态正常呈现多边形, 呈双核, 核浆比较高。荧光显微镜观察质粒 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 转染肝细胞发出黄绿色荧光。转染效率平均约为 17.5%。Western blot 检测培养基上清液中 VEGF<sub>121</sub> 蛋白的质量浓度为 10 ~ 20 mg/L。

## 3 讨论

以肝细胞为基因治疗受体细胞进行肝基因治疗成为基因治疗的热点之一, 是一条比较有希望的应用途径。但目前的研究表明, 在大鼠原代培养肝细胞中外源基因的转染表达存在一定困难。目前常用报道基因 *lacZ*、*cat*、*gut* 和 *luc* 等对导入的外源性基因的去向和转染表达进行观察, 这些方法涉及: 细胞固定, 染色, 孵化, 摄影; 计数染色细胞或细胞溶解; 可溶性蛋白质的提纯; 分光光度计检测等。这些方法通过分析转染的细胞提取物中的蛋白活力而间接检测基因的表达, 并且难于同时检测转染效率和表达水平。如何方便、快捷地对导入的外源性基因转染表达及去向进行观察和实时监测在肝基因治疗的研究中显得特别重要。

以 GFP 为报道基因可以在不进行细胞固定和标本准备的情况下进行外源性基因转染表达的分析, 成为一种基因转移分析的常用方法, 可用于活体示踪、细胞内定位和实时检测等<sup>[3, 4]</sup>。相对于 GFP, EYFP 在哺乳类细胞有更亮的荧光、更有效的转录和更高的表达。在转染后大约 48 ~ 60 h, 以加强型黄色荧光素蛋白质作为报告蛋白质用荧光显微镜观测到转染细胞在激发波长为 488 nm 或 513 nm 时能发出黄绿色荧光, 是一种方便快捷检测基因转染表达、示踪、细胞内定位和实时监测的方法。

pIRES-EYFP 是含有内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, 简称 IRES) 的可携带双基因高效真核表达载体, 在多克隆位点 (multiple cloning site, 简称 MCS) 和 EYFP 编码序列之间存在脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, 简称 ECMV) 的 IRES 片段, 允许插入 MCS 的目的基因和 EYFP 标志基因由同一个双顺反子转录, 适用于对瞬间转染表达 EYFP 和目的蛋白的哺乳类细胞进行有效筛选。

近年研究表明, VEGF 对体内外肝细胞增殖、肝再生起重要作用<sup>[5]</sup>。我们曾就 VEGF<sub>121</sub> 基因修饰对脾内移植肝细胞增殖的影响进行了研究<sup>[6]</sup>, 难于在大鼠原代培养肝细胞对 VEGF 基因的转染表达及移植后肝细胞的状态进行观察和实时监测。本研究将人源化 VEGF<sub>121</sub> 基因定向克隆到 pIRES-EYFP 质粒, 构建具有 EYFP 和 VEGF<sub>121</sub> 双基因真核表达载体 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub>, 通过荧光显微镜、流式细胞仪等观察标记基因 EYFP 的荧光及其强度, 可方便、快捷地观察外源性基因在大鼠原代培养肝细胞转染表达, 进行示踪、定位等实时监测, 为外源性基因修饰肝细胞移植和肝基因治疗的研究打下基础。

### 参考文献:

- [1] Zhou X D, Tokiwa T, Kano J, *et al*. Isolation and primary culture of adult pig hepatocyte[J]. *Methods Cell Sci*, 1998, 19(4): 277.
- [2] Watanabe Y, Nomoto H, Takezawa R, *et al*. Highly efficient transfection into primary cultured mouse hepatocytes by use of cation-liposome: an application for immunization[J]. *J Bio Chem*, 1994, 116(6): 1220.
- [3] Chalfie M, Tu Y, Eukivchen G, *et al*. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263(5184): 802.
- [4] 刘彦文, 卢春彬, 林 勇, 等. 绿色荧光蛋白基因 *gfp* 真核表达载体 pTKGFP 的构建[J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20 增刊: 8.
- [5] Assy N, Spira G, Paizi M, *et al*. Effect of vascular endothelial growth factor on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats[J]. *J Hep*, 1999, 30(5): 911.
- [6] 王金林, 周晓东, 闵 军, 等. 血管内皮生长因子基因转染对肝细胞移植的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2001, 9(3): 175.

(编辑 张敏瑞)