

绿色荧光蛋白基因 *gfp* 真核表达载体 *pcTKGFP* 的构建^①

刘彦文¹ 卢春彬² 林 勇¹ 都同功¹ 黄 冰¹ 陈系古¹

(1 中山医科大学实验动物中心; 广州, 510089 2 暨南大学免疫生殖中心)

摘 要 目的: 构建携带绿色荧光蛋白基因(*gfp*)的真核表达载体 *pcTKGFP*, 为利用绿色荧光蛋白标记在实验动物体内进行自杀性基因治疗的研究和转基因动物打靶载体的构建提供基因材料。方法: 采用 PCR 技术从商品质粒 pEGP-C1 中扩增出 *gfp* (799 bp), PCR 产物用 *Xba*I 和 *Bam*H I 双酶切后定向克隆至真核表达载体 *pcTK*, 重组质粒 *pcTKGFP* 用限制性内切酶和 DNA 序列分析进行鉴定。结果: 部分 DNA 序列分析证明 PCR 产物为 *gfp*, 成功筛选到携带 *gfp* 的真核表达载体 *pcTKGFP*。结论: *pcTKGFP* 真核表达载体的构建, 为利用绿色荧光蛋白标记在实验动物体内进行自杀性基因治疗的研究和转基因动物打靶载体的构建奠定了基础。

主题词 *gfp*; 基因治疗; 小鼠, 转基因; 克隆, 分子

中图分类号 R 375.35

Construction of the Eukaryotic Expression Vector *pcTKGFP* Carrying *gfp*

Liu Yanwen Lu Chunbin Lin Yong Du Tonggong Huang Bing Chen Xigu

(Animal Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

Abstract Objective: To provide the eukaryotic expression vector *pcTKGFP* carrying *gfp* gene for the suicide gene therapy in experimental animal and for the construction of a targeting vector in transgenic mice. **Methods:** According to the published nucleotide sequence of the *gfp* gene, a pair of oligonucleotides was designed as primers. The gene encoding for *gfp* (799 bp) was amplified using PCR technique. The PCR product was digested with *Xba*I and *Bam*H I, and then cloned into the plasmid *pcTK*. The recombinant plasmid *pcTKGFP* was identified by restriction endonuclease enzyme analysis and partial DNA sequence analysis. **Results:** The *gfp* gene was successfully amplified and verified by partial DNA sequence analysis. The recombinant plasmid *pcTKGFP* carrying *gfp* gene was correctly selected. **Conclusion:** The eukaryotic expression vector *pcTKGFP* has been established and verified by partial DNA sequence analysis. This research work has made a base for further investigation of gene therapy in experimental animal and construction of the targeting vector in transgenic mice.

Subject headings *gfp*; gene therapy; mice, transgenic; cloning, molecular

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 是由 238 个氨基酸组成的单肽链蛋白质, 1974 年由 Morie 等从海洋生物水母 (jellyfish) 中分离出来^[1]。1992 年 Prasher 等克隆了水母 *Aequorea victoria* GFP 的 cDNA^[2]。自 1994 年 Chalfie 等在大肠杆菌中表达 GFP, 并在 *Science* 杂志上发表他们的研究成果后^[3], GFP 作为新型的标记分子, 引起了学术界的极大关注。GFP 在各种极端条件下 (热、酸、碱、变

性剂) 都很稳定, 并且无毒性, 不干扰细胞正常的生理状态。尤其重要的是 GFP 本身是一种发光蛋白, 不需要任何底物和辅助因子的参与, 与目前常使用的报道基因 *lacZ*、*cat*、*gus*、*luc* 相比有其特殊的优点。

为了进行自杀型基因治疗和构建转基因动物打靶载体的研究, 我们曾构建了 tk (thymidine kinase gene, tk) 的真核表达载体 *pcTK*。在研究中我们发

现, 胸苷激酶(TK)最大的缺陷是不能对其在细胞和生物活体内进行实时监测, 所以我们利用 GFP 的发光特性, 以 *pcTK* 为出发质粒, 将 *gfp* 与 *tk* 基因融合, 构建 *gfp* 与 *tk* 融合的真核表达载体 *pcTKGFP*, 便于追踪导入外源基因的去向以及计算外源基因的转导率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 克隆载体质粒为 *pcDNA3*, 受体菌株为大肠杆菌 TG1, 基因型: *supEhsdΔ5ThiΔ(lac proAB)F'*[*traD36proAB⁺lacI^qlacZΔM15*], 上述质粒和菌株均为本室保存。商品质粒 *pEGFP-C1* 由本校达安基因诊断中心林正博士提供。

1.1.2 工具酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Xba* I 和 *T₄* DNA 连接酶均为 Promega 公司产品, *Klenow* 片段购自华美基因工程公司。

1.1.3 主要试剂 PCR 扩增试剂盒、细菌培养基所用的蛋白胨、酵母粉、琼脂粉均购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 Clontech 公司商品质粒 *pEGFP-C1* 提供的 DNA 序列设计一对引物 P1 和 P2, 为便于克隆, P1 引入 *Xba* I 酶切位点, P2 引入 *Bam*H I 酶切位点。引物由生工(Sangon)公司合成, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化。引物序列如下: P1 5'-TCTCTAGAGCTAGCGCTACCGGTCG-3', P2 5'-CCTTAGGATCCCGGCCCGCGG-3'

1.2.2 *pEGFP-C1* 质粒 DNA 提取 参照文献[4]采用小量碱法提取。用双蒸水溶解 DNA 沉淀, 经 751 分光光度计测定浓度并计算纯度后, -20 °C 冻存备用(此为 PCR 扩增模板)。

1.2.3 目的基因片段的 PCR 扩增 在 0.5 mL Eppendorf 管中依次加入下列成份: 10× Buffer 5 μL, dNTP(2 mmol/L) 5 μL, P1 及 P2 各 1 μL(各 25 pmol/L), 模板 DNA 0.1 μg, 双蒸水加至 50 μL, 混匀后, 97 °C 变性 5 min, 加入 Taq 酶 1 μL (2 U/μL), 液体石蜡油 50 μL, 整个反应在 DNA 扩增仪(Hema 480 型)上完成。反应条件: 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 循环 35 次, 最后 1 次 72 °C 延伸 5 min。扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 目的基因的纯化、克隆及鉴定 参照文献

[4]。PCR 产物用 DEAE 膜纯化回收后, 用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切, 质粒 *pcTKBam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 然后用 DEAE 膜分别回收目的基因片段和载体 DNA。目的基因与载体 DNA 按 5:1 混合进行连接, 反应体积为 10 μL, 用 *T₄*DNA 连接酶, 16 °C 连接 4~8 h, 然后用 *Klenow* 酶补平, 再连接 1 次, 取 3 μL 连接产物转化大肠杆菌 TG1, 在含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 平板上随机取 20 个单个菌落, 用快速酚/氯仿抽提和 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳方法进行初筛, 再用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切及 PCR 扩增方法对重组子进行复筛和鉴定。

1.2.5 目的基因的部分 DNA 序列分析 扩增阳性重组质粒 *pcTKGFP*, 用碱法提取的重组质粒 DNA 作为模板, 以 PCR 反应的 5' 端引物为 DNA 测序引物, 用 PERKIN ELMER 公司提供的 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 试剂盒进行反应, 在 ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer 全自动 DNA 序列分析仪上进行 *gfp* 部分 DNA 序列分析。

2 结果

2.1 目的基因 PCR 扩增

用 P1 和 P2 扩增 *pEGFP-C1* DNA 产生的条带位于对照分子的 994 bp 与 697 bp 之间(图 1), 与预期的 779 bp 分子大小相近。用此对引物重复多次进行 PCR 扩增均显示特异性条带, 提示我们设计的引物是合理的。

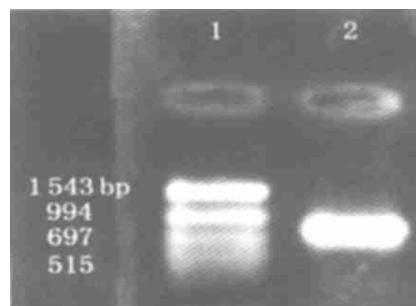


图 1 *gfp* PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 *gfp* PCR product was electrophorised in agarose gel
1: PCR marker; 2: *pEGFP-C1* plasmid DNA as template

2.2 目的基因的克隆与筛选

从氨苄青霉素 LB 平板随机挑取 20 个菌落, 摇菌扩增重组子 DNA, 酚/氯仿抽提及 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳初筛, 有 3 个重组子的 DNA 条带位于空白 *pcTK* 质粒条带后方, 再分别扩增此 3 个重组子 DNA 进一步鉴定。

2.3 重组子的鉴定

将初筛到的 3 个重组子, 摇菌扩增后, 抽提重组子质粒 DNA, 用 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切产生 2 条带, 大小分别约为 7.3 kb 和 799 bp; PCR 扩增也显示出特异性扩增条带 (799 bp), 证明该重组子确为带有 GFP 基因片段的重组克隆(图 2)。

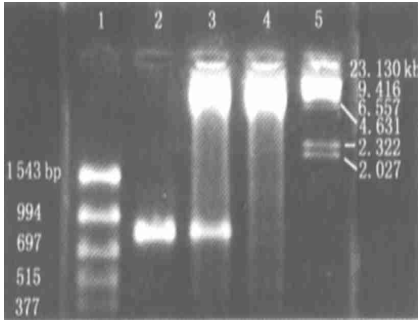


图 2 重组子 pcTKGFP 的双酶切鉴定和 PCR 验证

Fig 2 Recombinant plasmid pcTKGFP was verified with restriction endonuclease enzyme analysis and PCR technique

1: PCR marker; 2: pcTKGFP plasmid DNA as template; 3: Recombinant plasmid pcTKGFP was digested with *Hind* III and *Bam*HI; 4: pcTK was digested with *Bam*HI and *Hind* III; 5: λ DNA/ *Hind* III as DNA marker

2.4 gfp 的部分 DNA 序列分析

PCR 产物的序列分析结果见表 1, 与文献报道的 gfp DNA 序列完全一致。

表 1 PCR 产物的部分 DNA 序列分析结果

Table 1 Partial DNA sequence analysis of the gfp PCR product

1	CGA CCA TGG TGA GCA AGG GGG AGG AGC TGT TCA CCG GGG TGG TGC
46	CCA TCC TGG TCG AGC TGG ACG GCG ACG TAA ACG GCC ACA AGT TCA
91	GCG TGT CCG GCG AGG GGG AGG GCG ATG CCA CCT ACG GCA AGC TGA
136	CCC TGA AGT TCA TCT GCA GCA CCG GCA AGC TGC CCG TGC CCT GGC
181	CCA CCC TGG TGA CCA CCG TGA CCT ACG GCG TGC AGT GCT TCA GCC
226	GCT ACC CCG ACC ACA TGA AGC AGC AGC ACT TCT TCA AGT CCG CCA
271	TGC CCG AAG GCT AGT TCC AGG AGC GCA CCA TCT TCT TCA AGG ACG
316	ACG GCA ACT ACA AGA CCC GCG CCG AGG TGA AGT TGG AGG GCG ACA
361	CCC TGG TGA ACC GCA TCG AGC TGA AGG GCA TGG ACT TCA AGG AGG
406	ACG GCA ACA TCC TGG GCG ACA AGC TGG AGT ACA ACT ACA ACA GCC
451	ACA AGG TCT ATA TCA TGG CCG ACA AGC AGA AGA ACG GCA TCA AGG
496	TGA ACT TCA AGA TCC GCC ACA ACA TGG AGG AGG GCA GCG TGC AGC
541	TGG CCG ACC ACT ACC AGC AGA ACA CCC CCA TGG GCG ACG GCC CCG
586	TGC TGC TGC CCG ACA ACC ACT ACC TGA GCA CCG AGT CCG CCC TGA
631	GCA AAG ACC GCA AGG AGA AGC GCG ATC ACA TGG TCC TGC TGG AGT
676	TGG TG

3 讨论

自 1994 年 Chalfie 在大肠杆菌中表达 GFP^[3]后, GFP 因其诸多优点得到了广泛的应用。目前, GFP 已应用于活体示踪、细胞内定位、实时检测等诸多方面, 取得了丰硕的研究成果, 如在线虫、酵母、果蝇、HeLa 细胞、昆虫细胞中的研究等。

质粒 pEGFP-C1 携带有 gfp, 我们根据 pEGFP-C1 资料提供的 DNA 序列设计 1 对引物, 将 gfp 扩增出来, 两端加上酶切位点, 并将其 5' 端和 3' 端的非编码序列除去, 目的为该基因在基因治疗和转基因动物研究工作中的应用提供便利。扩增出的 DNA 片段大小在 994 bp 和 697 bp 之间, 与预期的 799 bp 大小相当。然后将该 PCR 产物定向连接到真核表达载体 pcTK, 挑选出阳性克隆。为进一步验证该 PCR 产物是否正确, 我们以阳性质粒 pcTKGFP DNA 为模板, 以 PCR 反应的 5' 端引物为测序引物进行部分 DNA 序列分析, 测序结果与 gfp 的已知序列进行比较, 结果显示二者完全相符, 表明进行 PCR 反应时未发生由于错配引起的点突变, 结果证明我们克隆的 gfp 完全正确。这样可以弥补过去无法对 TK 进行肉眼观察的缺陷, 便于对细胞进行实时检测。

参 考 文 献

- 1 Monie J.G. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea. *Biochemistry*, 1974, 17(3): 2656
- 2 Prasher D.C., Eckenrode B.K., Ward W.W., *et al.* Primary structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Gene*, 1992, 111(2): 229
- 3 Chalfie M., Tu Y., Eukivchen G., *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263: 802
- 4 Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis F. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. 16~56

(1999-08-06 收稿 1998-08-19 修回)