

# 绿色荧光蛋白原核表达载体的构建

赵轶君 董 浩 潘红艳 徐 芳 赵 佳 步怀宇 李红民

(西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室 陕西省生物技术重点实验室,  
西北大学 生命科学院分子生物学课程组 陕西 西安 710069)

**摘要:** 为开发以绿色荧光蛋白(GFP)为基因的原核表达载体,根据NCBI基因序列设计引物,通过PCR扩增获得GFP编码基因,经限制性核酸内切酶消化后将GFP定向克隆至原核表达载体pMAL-c2X中 $malE$ 基因下游的 $EcoR$  I与 $Hind$  III位点之间,与 $malE$ 基因融合为一个表达框。重组产物转化 $E. coli$  TB1感受态细胞,在添加有50 mg/mL AMP、10  $\mu$ mol/L IPTG的LB平板上于37  $^{\circ}$ C培养12~16 h后放置于25~30  $^{\circ}$ C的培养箱中继续培养4~6 h,365 nm UV照射下挑取转化克隆,经扩大培养后用IPTG诱导GFP的表达并用SDS-PAGE检测表达效率。结果表明,融合在麦芽糖结合蛋白下游的GFP编码基因可以在宿主细胞中有效表达,在365 nm UV照射下,可以直接从加有50 mg/mL AMP、10  $\mu$ mol/L IPTG的LB平板上挑取发绿色荧光的重组克隆,SDS-PAGE分析结果显示其扩大培养物经IPTG诱导后可高效表达GFP。该结果为进一步构建以GFP为标记基因取代抗生素筛选标记的原核表达载体提供了切实的试验依据。

**关键词:** 绿色荧光蛋白;原核表达载体;pMAL-c2X;筛选标记

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2013)03-0073-04

## Construction of the Prokaryotic Expression Vector of Green Fluorescent Protein

ZHAO Yi-jun ,DONG Hao ,PAN Hong-yan ,XU Fang ,ZHAO Jia ,BU Huai-yu ,LI Hong-min

(Curriculum Group of Molecular Biology ,College of Life Sciences ,Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology ,Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China ,Ministry of Education ,Northwest University ,Xi'an 710069 ,China)

**Abstract:** The green fluorescent protein(GFP) exhibits bright green fluorescence when exposed to light in the blue to ultraviolet range and has no toxicity on host cells. In cell and molecular biology ,the GFP is extensively used as a reporter or detection. In this paper ,the GFP encoding sequence was proliferated by PCR under the direction of the primers designed according to the sequence obtained from NCBI website. Then the PCR product was inserted downstream the  $malE$ (maltose-binding protein) encoding gene between the  $EcoR$  I and  $Hind$  III sites after restriction endonuclease digestion ,by which the  $gfp$  was fused with  $malE$  into one open reading frame. The recombinant prokaryotic expression vector of GFP was employed to transform the competent cells of  $E. coli$  TB1. The transformation mixture was cultured at 37  $^{\circ}$ C for 12-16 h on the LB plates with 50 mg/mL AMP and 10  $\mu$ mol/L IPTG ,and then cultured at 25-30  $^{\circ}$ C for 4-6 h on the same plate. The expression of GFP in TB1 was analysed by UV detection prior to SDS-PAGE. The GFP encoding gene infused downstream the  $malE$  gene can be expressed with green fluorescent excited by 365 nm UV under which the recombinant TB1 clone can be screened conveniently. Further analysis of SDS-PAGE showed that the GFP encoding gene was over expressed in  $E. coli$  host TB1. This result showed that the prokaryotic expression vector of GFP was successfully constructed and the  $malE$  fusion GFP could be expressed in high-level ,which strongly supported the construction of the prokaryotic fusion expression vector with GFP as reporter and detection marker.

**Key words:** GFP; Prokaryotic expression; pMAL-c2X vector; Screening marker

收稿日期:2013-03-15

基金项目:陕西省教育厅2009年度重点实验室科研计划项目(09JS079);陕西省教育厅2011年度重点实验室重点科研计划项目(11JS085);陕西省科技厅2011年度社会发展攻关项目(2011K12-61)

作者简介:赵轶君(1989-),男,陕西西安人,在读硕士,主要从事细胞生物学研究。

通讯作者:李红民(1972-),女,陕西咸阳人,副教授,博士,主要从事基因工程上游技术及天然活性成分作用机理研究。

随着转基因技术的普遍应用以及由于各种抗生素筛选标记的使用而可能导致的多抗生素抗性菌的出现,已经成为社会关注转基因问题的焦点之一。因此,发展安全性高的生物标记作为转基因的筛选标记是基因工程研究的努力方向之一。绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)是一种由 238 个氨基酸残基组成的相对分子质量为 26.9 kDa 的天然蛋白,在蓝光或紫外光激发下可以产生很强的绿色荧光<sup>[1-2]</sup>。虽然已经改造产生了很多绿色荧光蛋白变体,也发现了很多来自其他海洋生物的绿色荧光蛋白,但通常所说的 GFP 来自多利维亚多管发光水母(Jellyfish *Aequorea victoria*)。gfp 已被广泛用于细胞原位检测或基因表达报告基因,其变体已被用于多种传感器的制作<sup>[3-7]</sup>,但少有以 gfp 作为原核细胞转基因标记的报道,商品化或是研究院所自己构建的原核表达载体仍然以抗生素抗性标记为主。因此,本研究尝试构建以 GFP 为报告基因的原核表达载体,为进一步开发人性化的原核表达载体奠定基础,同时也为规避上述环境和生态问题做出积极努力。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 细胞与质粒 野生型 GFP 编码基因携载质粒 pCambia1302 为澳大利亚国际农业分子生物学应用中心(Cambia)惠赠,克隆用大肠杆菌(*Escherichia coli* *E. coli*)菌株 Top10 为陕西省生物技术重点实验室留存,原核表达载体 pMAL-c2X 及其表达宿主 *E. coli* 菌株 TB1 由陕西省生物技术重点实验室赵宇玮副教授惠赠。

1.1.2 试剂 各种限制性核酸内切酶均为 Fermentas 产品,质粒提取与凝胶回收试剂盒为 Axygen 产品,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)均购自西安舟鼎国生物技术有限责任公司;高保真 DNA 聚合酶(PrimeStar)、T4 DNA 连接酶、5 000 bp DNA Ladder、蛋白质分子量 Marker(97.2, 66.4, 44.3, 29, 20.1, 14.3 kDa)为 TaKaRa 产品,购自西安海宁生物工程有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 GFP 编码基因的 PCR 扩增 根据 NCBI 基因序列(AF234298)设计 GFP 扩增上下游引物, P<sub>上</sub>: 5'-GACGAATTCATGCTAGATCTGACTAGTAAAGG-3', 下划线部分为引入的 *EcoR* I 识别位点; P<sub>下</sub>: 5'-GTG AAGCTTTCATTAGCTAGCTTTGTATAG-3', 下划线部分为引入的 *Hind* III 识别位点,母液浓度 10 nmol/μL。PCR 体系为 25 μL,其中 DNA 聚合酶 0.5 μL, 5 × Buffer 5 μL, dNTP 2 μL, P<sub>上</sub>与 P<sub>下</sub>母液各 1 μL,模板

pCambia1302 质粒(10 pmol/μL) DNA 1.0 μL, 无菌双蒸水 15.5 μL; 循环条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 35 °C 30 s, 72 °C 30 s, 3 cycles; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 25 cycles; 72 °C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

1.2.2 GFP 编码基因与 pMAL-c2X 重组 pMAL-c2X 质粒 DNA 先进行 *EcoR* I 与 *Hind* III 单酶切验证以确保 2 个限制性内切酶能够在同一体系中起作用。随后与 GFP 编码基因的 PCR 扩增产物分别进行 6~8 h 的 *EcoR* I 与 *Hind* III 双酶消化, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离目的片段, 切胶回收(按照试剂盒操作说明进行) GFP 基因片段和 pMAL-c2X 线性化载体片段。两片段在 T4 DNA 连接酶作用下于 16 °C 连接过夜。连接混合物转化 Top10 感受态细胞<sup>[8]</sup> 转化混合物涂布添加有 50 mg/mL AMP 的 LB 平板上, 于 37 °C 培养 12~16 h, 随机挑取转化克隆扩大培养后碱法小量抽提质粒(按照试剂盒操作说明进行), 并用限制性内切酶 *EcoR* I 与 *Hind* III 对其进行双酶切, 同时双酶切消化空载体 pMAL-c2X 质粒 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测双酶切结果。gfp 与 pMAL-c2X 的重组质粒经 TaKaRa 公司测序验证后用于 TB1 感受态细胞的转化。

1.2.3 GFP 原核表达载体 pMAL-c2X-GFP 在 TB1 中的表达 经限制性内切酶消化和测序验证的 pMAL-c2X-GFP 及空载体 pMAL-c2X 质粒 DNA 转化 TB1 感受态细胞<sup>[8]</sup>, 转化混合物经稀释后涂布添加有 10 μmol/L IPTG 的 LB 平板, 于 37 °C 培养 12~16 h, 之后置于 25~30 °C 继续培养 4~6 h(用以诱导 GFP 的表达)。在 365 nm UV 照射下挑取发绿色荧光的重组克隆, 与 pMAL-c2X 的转化克隆一起分别接种于 5 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 于 37 °C, 180 r/min 培养过夜, 其过夜培养物以 20% 的接种量转接至新鲜 LB 液体培养基中, 于 37 °C, 180 r/min 培养至 OD<sub>260</sub> 达到 0.6~0.7 时添加使用浓度为 10 μmol/L 的 IPTG, 于 30 °C, 230 r/min 诱导表达 3 h。收集诱导后的菌体, 按照文献[8]进行 SDS-PAGE 检测 GFP 表达效率。

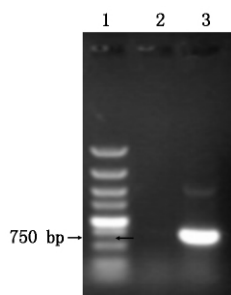
1.2.4 GFP 原核表达载体在宿主细胞中的稳定性

接种重组有 GFP 原核表达载体的大肠杆菌于不含任何抗生素的 LB 液体培养基中, 每 12 h 以 0.1% 接种量转接至不含任何抗生素的新鲜 LB 液体培养基中, 于 37 °C, 180 r/min 培养, 每转接一次, 以 10<sup>-3</sup> 细胞/mL 的菌液涂布不含任何抗生素的 LB 平板, 365 nm UV 激发下检测菌落绿色荧光。

## 2 结果与分析

### 2.1 GFP 编码基因的 PCR 扩增

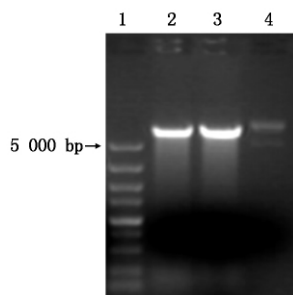
在设计引物及 PCR 循环条件下, 试验获得了 PCR 扩增产物, 产物单一、特异性好, 其大小接近 750 bp(图 1), 与理论值相符。



1. 5 000 bp DNA Ladder; 2. 阴性对照; 3. *gfp* 基因片段。  
1. 5 000 bp DNA Ladder; 2. Negative control; 3. *gfp* fragment.

图 1 GFP 基因片段的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Fragment of GFP-coding gene proliferated by PCR



1. 5 000 bp DNA 分子量标记; 2. *EcoR* I 酶切;  
3. *Hind* III 酶切; 4. pMAL-c2X。  
1. 5 000 bp DNA Ladder; 2. *EcoR* I digestion;  
3. *Hind* III digestion; 4. Plasmid DNA of pMAL-c2X.

图 2 pMAL-c2X 的 *EcoR* I 与 *Hind* III 单酶切分析

Fig. 2 *EcoR* I and *Hind* III digestion analysis of pMAL-c2X

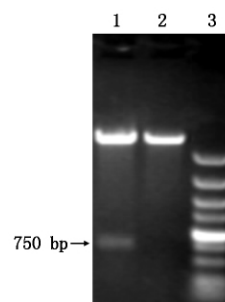
### 2.2 GFP 编码基因与 pMAL-c2X 连接重组

pMAL-c2X 的 *EcoR* I 与 *Hind* III 单酶切验证结果显示, *EcoR* I 或 *Hind* III 在同一种酶切体系中都能够完全消化 pMAL-c2X 质粒 DNA(图 2)。其 *EcoR* I 和 *Hind* III 线性化片段与 GFP 编码基因的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切片段经 T4 DNA 连接酶作用后, 来自其 Top10 转化克隆的质粒 DNA 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 来自 Top10 转化克隆的质粒 DNA 能够被酶切产生 pMAL-c2X 载体大片段和 GFP 基因片段, 而空载体 pMAL-c2X 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后仅产生载体大片段(图 3), 说明 GFP 编码基因已经与原核表达载体 pMAL-c2X 成功重组在一起。随后委托 TaKaRa 公司对重组的 pMAL-c2X-GFP 进行测序, DNAssist V2.2 序列分析结果显示, GFP 编码基因的序列与 pMAL-c2X *malE* 基因正确融合在一个开放读码框中, 其序列与 pCambia1302 中的序列完全

一致。结果表明, pMAL-c2X-GFP 可以用于随后的外源蛋白表达试验。

### 2.3 GFP 编码基因在 TB1 中诱导表达

经酶切及测序验证的 pMAL-c2X-GFP 转化 TB1 感受态细胞后其转化克隆在添加有 10  $\mu$ mol/L IPTG 的平板上诱导 4 ~ 6 h, 即可在普通紫外检测仪上观察到 GFP 编码基因在宿主细胞 TB1 中的表达(图 4)。利用 SDS-PAGE 进一步分析 GFP 编码基因在宿主 TB1 中的表达水平, 结果表明, 融合在 *E. coli malE* 下游的 GFP 编码基因可以在 TB1 中高效表达(图 5)。



1. pMAL-c2X-GFP 双酶切结果; 2. pMAL-c2X 双酶切结果; 3. 5 000 bp DNA 分子量标记。  
1. pMAL-c2X-GFP digested by *EcoR* I and *Hind* III; 2. pMAL-c2X digested by *EcoR* I and *Hind* III 3.5 000 bp DNA Ladder.

图 3 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切检测 pMAL-c2X-GFP

Fig. 3 Analysis of pMAL-c2X-GFP by *EcoR* I and *Hind* III digestion

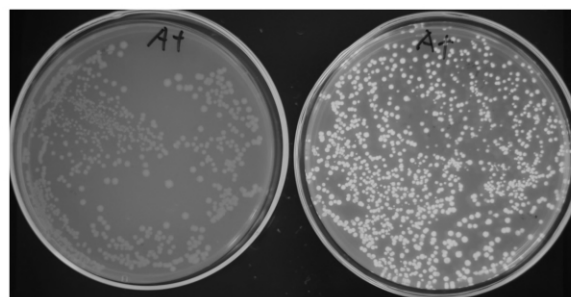
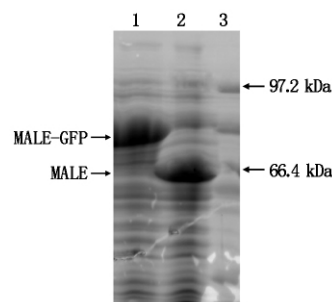


图 4 365 nm UV 检测 TB1 中 GFP 的表达

Fig. 4 Detection of GFP expressed in TB1 under 365 nm UV



1. pMAL-c2X-GFP 在 TB1 中的表达结果; 2. pMAL-c2X 在 TB1 中的表达结果; 3. 蛋白质分子标记。

1. pMAL-c2X-GFP expressed in TB1; 2. pMAL-c2X expressed in TB1; 3. Protein Marker.

图 5 SDS-PAGE 分析 GFP 在 TB1 中的表达  
Fig. 5 Analysis of pMAL-c2X-GFP expression level by SDS-PAGE

## 2.4 GFP 原核表达载体在宿主细胞中的稳定性

重组有 GFP 原核表达载体的 *E. coli* 细胞在不含有任何抗生素的 LB 培养基上已经转接培养 20 次。通常情况下 *E. coli* 细胞适应新鲜培养基的时间 2 ~ 5 h 不等,之后会进入对数分裂期,如果按照每小时细胞分裂一次(*E. coli* 细胞在最佳培养条件下每 20 min 分裂一次)计,GFP 原核表达载体所在的 *E. coli* 细胞已传代 100 次以上,根据 UV 检测的结果,表明重组质粒在非选择压力下能够在宿主细胞中稳定存在相当长的时间,足以保证大规模生产重组蛋白生产周期对菌株稳定性的要求。

## 3 结论与讨论

GFP 性质稳定、荧光强度高,对多数宿主细胞没有明显毒害作用,已经被广泛用作载体报告基因,特别是哺乳动物细胞转基因或其他生理生化研究。研究将 GFP 编码基因与 *E. coli malE* 融合并在 *E. coli* TB1 中成功表达,该结果初步显示以绿色荧光蛋白作为报告基因会具有以下几方面的优势:①可经绿色荧光检测一步筛出重组子。由于 *E. coli* 极易生长,过夜培养就可以在固体培养基上形成肉眼可见的单克隆。通过在其培养基中添加 IPTG,在 25 ~ 30 °C 条件下经 4 ~ 6 h 培养就可以诱导 GFP 的表达,在紫外检测器上观察,可直接挑选出能够表达目的蛋白的重组子,降低筛选克隆的假阳性率。②将目的蛋白融合在绿色荧光蛋白编码基因上游,可以 GFP 作为筛选重组子的标记。试验将 *gfp* 融合在 *malE* 下游,表达后仍然具有很强的荧光活性作为检测指标,充分说明将其他目的基因融合在 GFP 上游进行表达具有很强的可操作性。常用的原核表达载体的启动子在几种常用的大肠杆菌克隆菌如 DH5 $\alpha$ 、JM109、Top10 等菌株中都能够被宿主转录系统识别并表达,虽然表达效率不如在匹配表达用宿主菌中高,但是足以满足荧光检测的需要。只要在构建载体时,在培养基中添加 IPTG,就可以在低温下诱导目的蛋白的表达,因为目的基因是融合在 GFP 的上游,所以只要在 UV 照射下能够检测到绿色荧光就说明目的基因也得到正确表达。③检测更加简便。与哺乳动物细胞的绿色荧光观察相比,无需昂贵的荧光显微镜,大肠杆菌中表达的绿色荧光蛋白只需在普通紫外检测器上即可观察,使检测更加简便。

从稳定性上来看,虽然很多学者认为在非选择压力下质粒在 *E. coli* 细胞中的稳定性会降低,而且由于宿主细胞本身的代谢压力会在细胞传代的过程中使质粒 DNA 的拷贝数降低<sup>[9]</sup>,但是本研究结果表明,非选择压力下,*E. coli* 细胞中质粒 DNA 并未表现出明显的快速丢失。而且,一旦构建成功可用于生产的工程菌,可以通过定期复壮和筛选不断获得用于生产的菌株,从而避免抗生素的频繁使用以及抗生素抗性基因向环境逃逸。

## 参考文献:

- [1] Prendergast F, Mann K. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forsk lea* [J]. *Biochemistry*, 1978, 17 ( 17 ): 3448 - 3453.
- [2] Tsien R. The green fluorescent protein [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509 - 544.
- [3] Pakhomov A A, Martynov V I. GFP Family: Structural Insights into Spectral Tuning [J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15: 755 - 764.
- [4] Gómez E, Pérez-Pascual D, Fernánd L, et al. Construction and validation of a GFP-based vector for promoter expression analysis in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* [J]. *Gene*, 2012, 497: 263 - 268.
- [5] Jones J J, Bridges A M, Fosberry A P, et al. Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 109: 201 - 211.
- [6] Priyadarshi H, Alam A, Gireesh-Babu P, et al. A GFP-based bacterial biosensor with chromosomally integrated sensing cassette for quantitative Detection of Hg( II) in environment [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24 ( 5 ): 963 - 968.
- [7] Warwick S I, Beckie H J, Hall L M. Gene flow, invasiveness and ecological impact of genetically modified crops [J]. *Year Evol Biol*, 2009, 1168: 72 - 99.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆试验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Silva F, Queiroz J A, Doming ues F C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30: 691 - 708.