

技术改进

Upgraded Technology

四膜虫 rDNA 表达载体的改造及用于异源基因的高效表达

袁冬霞¹ 冯立芳² 熊杰¹ 缪炜^{1*}

1 中国科学院水生生物研究所,水生生物多样性与保护重点实验室,武汉,430072; 2 浙江工商大学食品与生物工程学院,杭州,310012

* 通讯作者, miaowei@ihb.ac.cn

摘要 基于四膜虫小核 rDNA 改造得到的 pD5H8 载体,在转染进接合生殖时期的四膜虫后能发育成 9 000~10 000 拷贝的大核 rDNA,因此 pD5H8 载体是四膜虫异源基因表达的研究热点,但其载体上匮乏合适的克隆位点和无启动子结构阻碍了该载体的进一步发展。本研究在四膜虫启动子 *HSP70-2* 和终止子 *HSP70-1* 之间,通过稀有酶切位点 *I-Sce* 导入细菌绿色荧光蛋白(HGFP)这一筛选标记,由此组成的 DNA 片段(*HSP70-2* 5' UTR-*I-Sce* -HGFP-*I-Sce* -*HSP70-1* 3' UTR)整合进 pD5H8,将之改造成 pD5H8-HGFP 表达载体。来自真核生物的绿色荧光蛋白(GFP)藉由 *I-Sce* 酶切位点一步导入 pD5H8-HGFP 表达载体后,在四膜虫中大量表达且具有生物学活性。因此,改造后的 pD5H8-HGFP 表达载体拥有一步法引入异源基因,几乎无酶切位点的限制,有效的筛选标记,高效的异源基因表达能力,以及环境友好、便捷可控等诸多优点,这对于深入开展四膜虫基因功能的过表达研究和开发异源基因在四膜虫这一真核表达系统中的应用奠定了技术基础。

关键词 四膜虫, rDNA, pD5H8, pD5H8-HGFP, 异源基因表达

Modification of Tetrahymena rDNA Expression Vector Used for Efficient Expression of Exogenous Gene

Yuan Dongxia¹ Feng Lifang² Xiong Jie¹ Miao Wei^{1*}

1 Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072; 2 College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, 310012

* Corresponding author, miaowei@ihb.ac.cn

DOI: 10.3969/gab.032.000548

Abstract Vector of pD5H8, modified from rDNA of *Tetrahymena* small nuclear, can develop into rDNA of large nuclear with 9 000~10 000 copies after introducing into conjugation cells, which make it to be an ideal expression vector of exogenous genes. However, both insufficient appropriate clone sites and lacking promoter region hinder the further application of pD5H8. In this study, a bacterium green fluorescence protein gene (HGFP) was inserted between the 5' UTR (untranslated regions) of *HSP70-2* gene and the 3' UTR of *HSP70-1* gene, and these three DNA fragment were connected by the rare restriction enzyme site of *I-Sce*. The constructed DNA fragment (*HSP70-2* 5' UTR-*I-Sce* -HGFP-*I-Sce* -*HSP70-1* 3' UTR) was then integrated into the pD5H8 vector, which became an expression vector of pD5H8-HGFP. The HGFP fragment of pD5H8-HGFP vector could be one-step replaced by an eukaryote green fluorescence protein (GFP) gene via restriction enzyme site of *I-Sce*, and the recombinant vector was able to express a large number of products with biological activity in *Tetrahymena*. Therefore, the modified vector of pD5H8-HGFP had many advantages, such as one-step introduction of exogenous gene, unlimited restriction enzyme sites, effective selection marker, efficient expression level of exogenous gene, environment-friendly and convenient controllable, which will facilitate the research of gene over-expression, and pave the way for widely application of exogenous genes expression in *Tetrahymena*.

Keywords *Tetrahymena*, rDNA, pD5H8, pD5H8-HGFP, Exogenous gene expression

基金项目 本研究由中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-G-6-4)和湖北省自然科学基金杰出青年项目(ZRZ0251)共同资助

原生动物四膜虫(*Tetrahymena*)是一种单细胞真核模式生物,隶属于纤毛门(Ciliophora)、寡膜纲(Oligohymenophorea)、膜口目(Hymenostomatida),游离生活在全球各地的淡水环境中,以摄取水中的细菌与其它有机质为生,迄今为止尚未发现其对人类健康造成危害。四膜虫生长快速,在合适条件下 2~3 h 即可繁殖一代,四膜虫作为第一种进行无菌纯培养并且实现细胞同步化的真核细胞,相比其它模式生物或细胞系(如秀丽线虫、鱼类和哺乳动物体细胞),其培养简单、经济,操作精确度高和可控性强,而且可以实现工业化大规模培养,细胞密度最高可到 10^7 个/mL (Collins and Gorovsky, 2005; Lynn and Doerder, 2012)。此外,四膜虫拥有清楚的遗传学背景和完备的基因组数据库,目前嗜热四膜虫 EST 计划(*Tetrahymena* EST project)、嗜热四膜虫大核基因组计划(*Tetrahymena* macronuclear genome project)、嗜热四膜虫全基因组基因表达芯片分析平台(*Tetrahymena* genome-wide microarray analysis),以及嗜热四膜虫全基因组转录组测序等工作均已完成;而且在四膜虫中已建立起一系列成熟的基因重组和细胞转染等分子生物学操作方法和技术,使得在嗜热四膜虫中进行基因敲除/插入、基因沉默和基因过表达等十分方便快捷(Eisen et al., 2006; Xiong et al., 2012)。这些特点使四膜虫成为一种优良的表达系统。

四膜虫细胞内有两个结构和功能迥异的细胞核,小核是生殖核,其基因组约 120 Mb,在细胞生长期沉默,但接合生殖时期发生转录,在剔除 10%左右的染色体断裂序列(chromosome breakage sequence, Cbs)和内部删除序列(internally eliminated sequence, IES)并经过 45 次倍增后得到营养大核(Cole et al., 1997; Turkewitz et al., 2002)。但例外的是,小核中单一拷贝的 15 kb 长度的 rDNA 在删除 Cbs 和 IES 后,以自身为模板进行全序列的复制而形成中间回文对称的 21 kb 大核 rDNA,每一侧的染色体均由 5.8S、17S、26S 组成,其后再大量倍增至 9 000~10 000 拷贝数,因此,若将异源基因整合进小核 rDNA 而不影响四膜虫的正常生长和 rDNA 高拷贝数的维持,就能实现异源基因在四膜虫体内的高效表达(Yao and Yao, 1989)。已有研究人员对四膜虫 rDNA 进行改造,发现大核 17S rRNA 基因单个碱基 G1707A 的突变,会赋予四膜虫对 paromomycin 的耐药性,而另一个位点 U1711C 的突变亦有相同效果(Spangler and Blackburn, 1985)。基于上述筛选标记,随后从四膜虫 C3 株系中将能够发育成正常大核所必需的小核 rDNA 序列克隆下来,与细菌载体 pIC19 连接,获得环状的穿梭质粒 pD5H8,

该质粒转染进四膜虫(B 株系)接合生殖时期发育大核的原基(anlagen)中,四膜虫 rDNA 会被精确的剪切下来,经复制形成回文对称结构的大核 rDNA。由于供体(donor) C3 株系的 rDNA 复制能力优于宿主 B 株系,这导致在 paromomycin 药物筛选作用下宿主大核 rDNA 被供体 rDNA 替换。进而发现 26S 后面插入 2.3 kb 的异源基因不会影响四膜虫的正常生长和 rDNA 高拷贝数的维持,因此异源基因藉此大量倍增至 9 000~10 000 倍,实现在四膜虫体内的过表达(Sweeney and Yao, 1989)。迄今为止,国外已有成功利用 pD5H8 载体表达异源基因的报道,如多子小瓜虫的 I-抗原基因(Gaertig et al., 1999)、恶性疟原虫的子环孢子蛋白基因(Peterson et al., 2002)、人的 DNase 等(Weide et al., 2007),而国内尚未见相关研究报道。

改造前的 pD5H8 载体上仅仅含有用于异源基因插入的 *Not* 常规酶切位点,应用常因此受限,在实际操作过程中,由于 pD5H8 载体长度达到 13 471 bp,极易在酶切过程中发生自连现象,且无筛选标记,这导致目的基因的克隆效率非常低;此外, pD5H8 载体中不包含用于异源基因完整表达所需的启动子和终止子,因此,不同异源基因在克隆进 pD5H8 载体前,每次都需要重复启动子和终止子的添加步骤。

本研究对基于原始的 rDNA 载体 pD5H8 进行改造,将四膜虫内具有高效表达的 *HSP70-2* 基因启动子和 *HSP70-1* 基因的终止子整合到 pD5H8 载体中;并在启动子和终止子之间插入筛选标记——绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的盒式表达结构,通过观察细菌转化子是否发绿光即可判定载体连接成功与否,同时引入两个反向互补的稀有酶切位点 *I-Sce* 作为克隆位点,有效降低载体的自连现象,使得载体应用范围几乎不受酶切位点的限制。改造后的载体提高了异源基因载体构建效率,缩短了载体构建时间,极大地扩大了载体的应用范围,这为快速实现异源基因在四膜虫内的高效表达奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 四膜虫表达载体 pD5H8-HGFP 的构建

四膜虫表达载体 pD5H8 比较大(13 471 bp),其上含有较多的酶切位点,这给异源基因的导入造成了困难。为将该载体改造成含有绿色荧光蛋白筛选标记的一步法表达载体,我们对本实验室之前报道的 HSP702-GFP 载体进行改造(冯立芳和缪伟, 2009),将该载体中来源于真核生物的 GFP 基因序列替换成 THX-HGFP 载体中(前期研究结果,结果未公开)能在

细菌中表达绿色荧光蛋白 HGFP 序列;以 THX-HGFP 载体为模板,采用 5' 含有稀有酶切位点 *I-Sce* 的引物进行 PCR 扩增,得到 1.5 kb 的 HGFP 序列;以 HSP702-GFP 载体为模板,采用 5' 含有 *I-Sce* 的引物进行 PCR 扩增,所得扩增产物(4.7 kb)与两端含有 *I-Sce* 酶切位点的 HGFP 序列(1.5 kb)进行连接,得到长度为 6.2 kb 的 TH-HGFP 载体(图 1)。TH-HGFP 载体转染进大肠杆菌后,挑选具有绿色荧光的重组子,从中提取的质粒经 *I-Sce* 酶切后得到 4.7 kb 和 1.5 kb 两个片段(图 2),证明该载体构建正确。

TH-HGFP 载体经 PCR 扩增和 *Not*I 酶切,所得 3.1 kb 的 HSP70-2 5' UTR-*I-Sce* -HGFP-*I-Sce* -HSP70-1 3' UTR 酶切片段插入到同样经过 *Not*I 酶切后的 pD5H8 载体(13.8 kb)中,得到 16.9 kb 的 pD5H8-HGFP 载体(图 3)。pD5H8-HGFP 载体转染进大肠杆菌后,挑选具有绿色荧光的重组子,从中提取的质粒经 *I-Sce* 酶切后得到 15.2 kb 和 1.5 kb 两个片段(图 4),证明该载体构建正确。

1.2 异源基因 GFP 整合进四膜虫表达载体 pD5H8-HGFP

为检验四膜虫表达载体 pD5H8-HGFP 的一步法

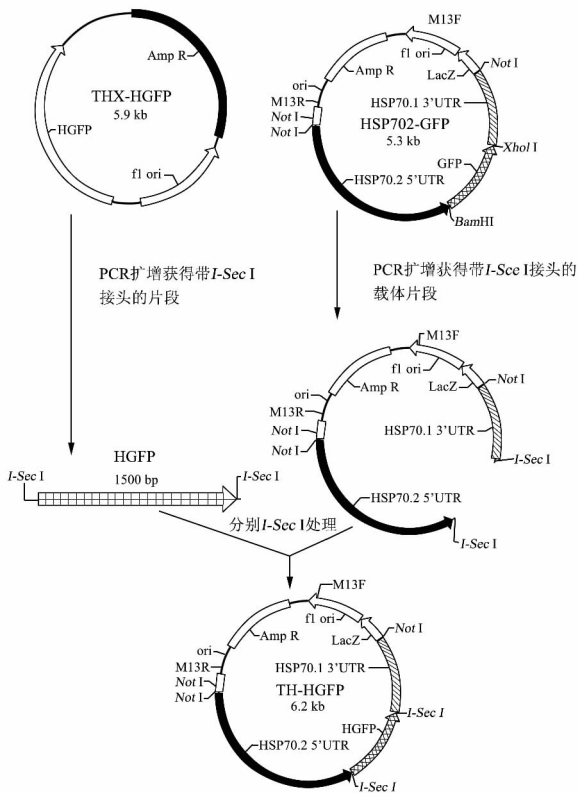


图 1 载体 TH-HGFP 的构建
Figure 1 Construction process of TH-HGFP

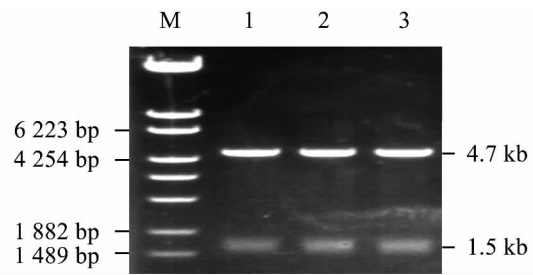


图 2 重组质粒 TH-HGFP 的 *I-Sce* 酶切鉴定
注: M: DNA Marker; 1~3: *I-Sce* 酶切鉴定重组质粒 TH-HGFP
Figure 2 The *I-Sce* restriction mapping of recombinant plasmids TH-HGFP
Note: M: DNA Marker; 1~3: The identification of recombinant plasmids TH-HGFP by the *I-Sce* digestion

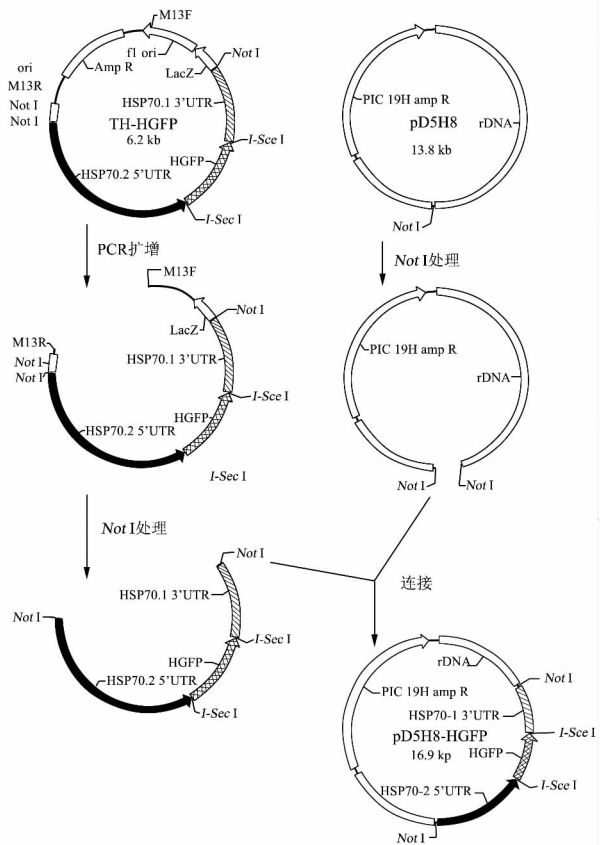


图 3 表达载体 pD5H8-HGFP 的构建
Figure 3 Construction process of pD5H8-HGFP

快速构建和高效表达能力,我们来自真核生物的 GFP 作为异源基因的研究对象(冯立芳和缪炜, 2009)。通过 PCR 扩增得到两端携带 *I-Sce* 酶切位点的 GFP 片段,此片段经 *I-Sce* 酶切后与同样经过 *I-Sce* 酶切而去掉了 HGFP 片段的四膜虫表达载体 pD5H8-HGFP 相连接,得到重组载体 pD5H8-GFP(图 5)。该重组载体 pD5H8-GFP 转染进大肠杆菌后,以绿色荧光蛋白(HGFP 的表达产物)作为筛选标记,挑选不发荧光

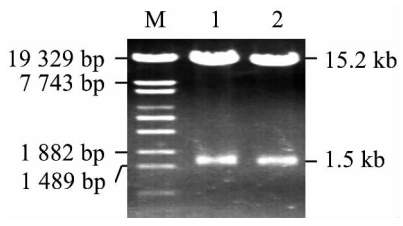


图4 重组质粒 pD5H8-HGFP 的 *I-SceI* 酶切验证
注: M: DNA Marker; 1~2: *I-SceI* 酶切鉴定重组质粒 pD5H8-HGFP
Figure 4 The *I-SceI* restriction mapping of recombinant plasmids pD5H8-HGFP
Note: M: DNA Marker; 1~2: The identification of recombinant plasmids pD5H8-HGFP by the *I-SceI* digestion

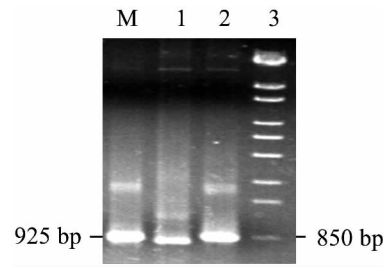


图6 重组质粒 pD5H8-GFP 的 PCR 验证
注: M: DNA Marker; 1~3: 重组质粒 pD5H8-GFP 的 PCR 鉴定产物
Figure 6 PCR confirmation of recombinant plasmids pD5H8-GFP
Note: M: DNA Marker; 1~3: PCR products of recombinant plasmids pD5H8-GFP

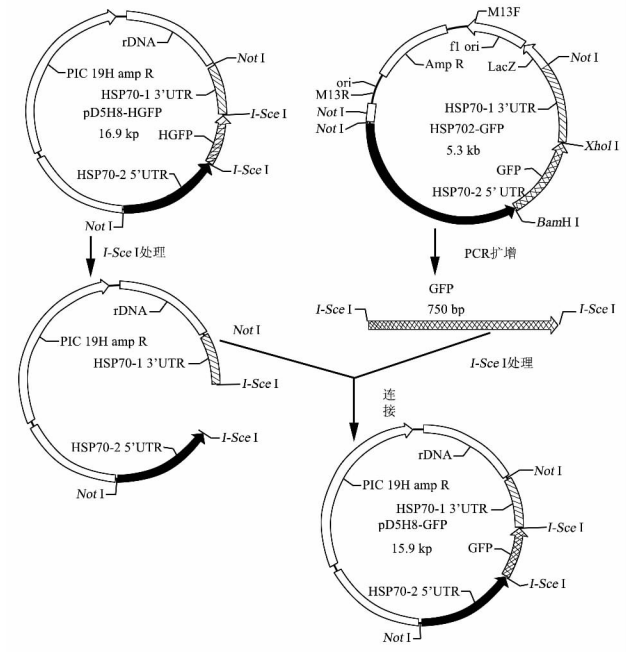


图5 GFP 蛋白的四膜虫表达载体 pD5H8-GFP 的构建过程
Figure 5 Construction process of pD5H8-GFP in *Tetrahymena* with GFP protein

的重组子即为携带表达载体 pD5H8-GFP 的重组菌。从该重组菌中提取质粒,经 PCR 扩增(选用 Y63_F/TH_R 引物)得到 850 bp 大小的产物(图 6),而进一步的测序结果也表明序列正确,GFP 为正向插入,这说明异源基因可以通过一步法快速整合到四膜虫表达载体 pD5H8-HGFP 中。

1.3 异源基因 GFP 在四膜虫中的高效表达

从结果 1.2 中得到的表达载体 pD5H8-GFP 通过电穿孔技术转染进入接合生殖时期的嗜热四膜虫大核原基中,接着在 paromomycin 药物作用下筛选得到单克隆转化子,进而采用 GFP 基因的特异性引物(Y-63_F/Y-64_R)对所得转化子进行 PCR 扩增,所得

产物与 GFP 基因一致(约 780 bp)(图 7),这说明表达载体已成功转染进入四膜虫中。

将上述四膜虫转化子和转染了质粒 pD5H8 空载的嗜热四膜虫在热激处理后,经由免疫印迹法检测发现,用 GFP 一抗可从转染了质粒 pD5H8-GFP 的四膜虫表达株中检测到相应大小的蛋白条带,对照组四膜虫中无相应条带(图 8),这说明克隆到表达载体 pD5H8-HGFP 中的异源基因 GFP 能够在四膜虫内成功且高效地表达相应的 GFP 蛋白。

进而采用荧光显微镜观察上述 2 组热激后的四膜虫细胞株,发现仅转染了质粒 pD5H8-GFP 的四膜虫发出绿色荧光,而对照组则不发光;在非热激条件下,二者均不发光(图 9)。这说明整合进表达载体

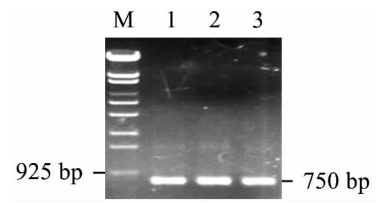


图7 Whole Cell PCR 鉴定含有表达载体 pD5H8-GFP 的四膜虫细胞株
注: M: DNA Marker; 1~3: 转染了质粒 pD5H8-GFP 的四膜虫株的 Whole Cell PCR PCR 鉴定产物
Figure 7 Whole Cell PCR confirmation of transfection *Tetrahymena* containing plasmids pD5H8-GFP
Note: M: DNA Marker; 1~3: Whole Cell PCR PCR products of transfection *Tetrahymena* containing plasmids pD5H8-GFP

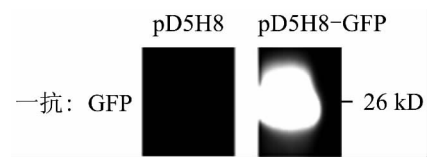


图8 表达产物 GFP 蛋白的免疫印迹鉴定
Figure 8 Western-blot detection of expression products GFP

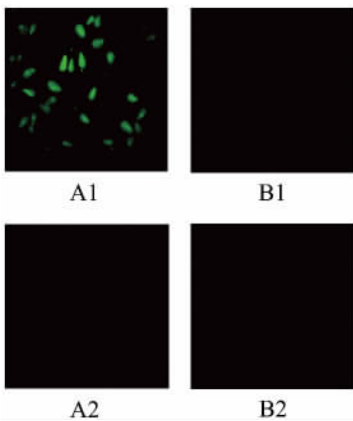


图9 表达产物 GFP 蛋白的荧光显微镜观察

注: A1 和 A2 均是转染质粒 pD5H8-GFP 的四膜虫细胞株, B1 和 B2 均是转染质粒 pD5H8 的对照组; A1 和 B1 为 39℃ 热激处理 1 h 后的细胞株; A2 和 B2 为未经热激处理的细胞株

Figure 9 Expression products of GFP in *Tetrahymena* were visualized by fluorescence microscope

Note: A1 and A2: Transfection *Tetrahymena* cells containing plasmids pD5H8-GFP; B1 and B2: Transfection *Tetrahymena* cells containing plasmids pD5H8 as the control group; A1 and B1: Cells were treated with heat shock of 39℃; B1 and B2: Cells were not treated with heat shock as the control group

pD5H8-HGFP 中的异源基因 *GFP* 在四膜虫内所表达的 GFP 蛋白是具有生物学活性的。

2 讨论

由于四膜虫拥有培养简单、经济、操作精确度高和可控性强等诸多优点,许多研究学者致力于将四膜虫开发成一个新型的真核表达系统,而这其中最为重要的环节是构建一个优秀的表达载体,因此,四膜虫体内高达 9 000~10 000 个拷贝的 rDNA 顺理成章地成为表达载体的研究热点。前人将 rDNA 改造成的环状穿梭质粒——pD5H8,已成功用于多种真核生物的异源基因在四膜虫体内的表达(Gaertig et al., 1999; Peterson et al., 2002; Weide et al., 2007)。然而该质粒仍存在 3 个显著的缺陷: (1) 缺乏异源基因表达所需的通用启动子和终止子,这导致不同的异源基因在克隆进 pD5H8 载体前,每次都需要重复启动子和终止子的添加步骤; (2) 缺乏足够多的合适的克隆位点来引入异源基因,其上能用于异源基因插入的稀有酶切位点仅为 *Not*, 这极易导致 pD5H8 载体在整合异源基因的过程中发生自连现象; (3) 无合适的筛选标记,重组子的筛选效率低。本文以 pD5H8 载体为模板,改造后的四膜虫表达载体 pD5H8-HGFP 不仅克服了上述缺陷,还拥有多个优点。

第一,异源基因只需一步法即可整合进四膜虫表达

载体 pD5H8-HGFP。构建的四膜虫表达载体 pD5H8-HGFP 含有来源于四膜虫热休克蛋白的 *HSP70-2* 启动子和 *HSP70-1* 终止子(冯立芳等, 2011; 冯立芳和缪炜, 2009); 异源基因只需要通过一个 *I-Sce* 的酶切和连接步骤即可整合进表达载体 pD5H8-HGFP 中,省去了每个异源基因都重复一次启动子和终止子的添加步骤,这极大地缩短了载体构建周期,省时、省力、省钱。

第二,表达载体 pD5H8-HGFP 几乎无酶切位点的限制。表达载体 pD5H8 中用于异源基因插入的单酶切位点为 *Not*, 这在载体构建过程中非常容易发生自连现象,因此需要增加磷酸化处理步骤以降低载体的自连背景。本文构建的表达载体 pD5H8-HGFP 中,在 HGFP 两侧引入了两个反向的识别序列长达 18 bp 的归位酶 *I-Sce* 酶切位点,这不仅降低了载体的自连背景,而且这种稀有的酶切位点在许多生物的基因组几乎没有,从而使得表达载体 pD5H8-HGFP 的应用几乎不受酶切位点的限制。

第三,表达载体 pD5H8-HGFP 中位于 *I-Sce* 酶切位点之间有一段可替换的 HGFP 片段,该 DNA 片段是 *GFP* 基因的盒式表达结构,它能在细菌内转录并拥有可视化的筛选标记,后者可作为克隆异源基因的筛选标记,这大大提高了重组子的筛选效率,降低研究人员的工作量。

第四,表达载体 pD5H8-HGFP 拥有高效的异源表达能力。四膜虫热休克蛋白 *HSP70-2* 基因对热激非常敏感,在 39℃ 热激处理 30 min 后,该基因的表达水平即可调高 82 倍(冯立芳等, 2011)。四膜虫 rDNA 在发育成熟的四膜虫体内有极高的拷贝数(9 000~10 000 个),这促使改造自 rDNA 的表达载体 pD5H8 在 paromomycin 药物筛选作用下的拷贝数也高达约 8 450 个(冯立芳和缪炜, 2009); 高效的热休克蛋白 *HSP70-2* 启动子联合大量的载体拷贝数,使得表达载体 pD5H8-HGFP 拥有极高的异源表达能力(图 8)。

第五,表达载体 pD5H8-HGFP 具有环境友好、便捷可控的特征。目前在四膜虫体内用于异源基因表达的另一载体是对其常染色体上的 β -tubulin 基因 (*BTU*) 进行改造, *BTU* 基因所编码的氨基酸序列上 K350M 突变赋予了四膜虫对 oryzalin 和 vinblastine 药物的耐受,藉此作为筛选标记得到四膜虫异源基因表达载体 pH4T2 (Gaertig et al., 1994)。在需要表达的异源基因上游添加金属硫蛋白 *MTT2* 或 *MTT5* 基因启动子,由此组成的表达盒(expression cassette)转染进 pH4T2 后得到重组子,在铜或镉存在条件下诱导异源基因的大量表达(Boldrin et al., 2008; Formigari et al., 2010)。

但该诱导条件——重金属会污染表达产物和环境,而本文构建的表达载体 pD5H8-HGFP 只需热激处理即可实现异源基因的表达;此外,相对于重金属的添加和去除,温度条件的改变更为便捷可控;因此 pD5H8-HGFP 是一个环境友好、便捷可控的表达载体。

综上所述,本文对四膜虫 rDNA 载体(pD5H8)改造后得到表达载体 pD5H8-HGFP,该载体拥有一步法引物异源基因,几乎无酶切位点的限制,有效的筛选标记,高效的异源基因表达能力,以及环境友好、便捷可控等诸多优点,这对于深入开展四膜虫基因功能的过表达研究和开发异源基因在四膜虫这一真核表达系统中的应用奠定了技术基础。

3 材料与方法

3.1 供试材料

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 购买自天根生化公司,本文中不同交配型的野生型嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*) B2086 与 CU428 株系、质粒 pD5H8 均由罗彻斯特大学 Martin A. Gorovsky 教授赠予,质粒 THX-HGFP 和 HSP702-GFP 由本实验室构建。

3.2 主要试剂及培养基配方

所用限制性内切酶均购买自 New England Biolabs 公司和大连宝生物工程有限公司,胶回收试剂盒购买自 Axygen 公司,普通质粒 DNA 小量提取试剂盒购买自 BioFlux 公司,去内毒素质粒试剂盒购买自 Omega 公司, pGEM-T 载体购买自 Promega 公司, DNA 聚合酶购买自大连宝生物工程有限公司, T4 连接酶购买自 New England Biolabs 公司, DNA 分子量标记 Marker 均购买自天根生化公司及大连宝生物工程有限公司,琼脂糖购买自 Biowest 公司,抗体购买自碧云天生物技术研究所, NC 膜购买自 GE 公司,化学发光试剂盒购买自 Thermo Scientific 公司,所用引物及测序均由上海英骏生物技术有限公司完成。

SPP 培养基配方参考 Orias 等(2000),四膜虫的饥饿培养基配方为:10 mmol/L Tris-HCl (pH=7.5)和 10 mmol/L Hepes (pH=7.5)。

3.3 四膜虫表达载体 pD5H8-HGFP 的构建

3.3.1 HGFP 片段的扩增

设计用于 HGFP 片段扩增的引物 Y-41_F 5'-GCCAGTAGGGATAACAGGGTAATTCTCTGGAA AATAAAAAGCTGGATCC-3' (下划线为 *I-Sce* 酶

切位点), Y-42_R:5'-GAGCTCTAGGGATAACAGG GTAATAGATAAAATTTTATATCAACTCGAGTCAG AAT-3' (下划线为 *I-Sce* 酶切位点)。以质粒 THX-HGFP 为模版 PCR 扩增两端带有稀有酶切位点 *I-Sce* 的 HGFP 片段 PCR 反应体系:10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L, 10 μ mol/L dNTP 0.5 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.5 μ L, LA *Taq* 1 unit, 模板 0.5 μ L, 补 ddH₂O 至 25 μ L; PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min, 中间 35 个循环的 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,对目的扩增条带切胶回收后经胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段,该片段长约 1.5 kb。

3.3.2 HSP702-GFP 载体片段的扩增

设计用于 HSP702-GFP 片段扩增的引物 Y-61_F 5'-CCGGTCATTACCCTGTTATCCCTATGACTC GAGTTGATATAAAAATTTATAAAAAT-3' (下划线为 *I-Sce* 酶切位点), Y-62_R 5'-GGCCAGATTACCC TGTTATCCCTACATTTTTGTAAACTTTTTTAA TT ATTTGTT-3' (下划线为 *I-Sce* 酶切位点)。以质粒 HSP702-GFP 为模版,通过 PCR 反向扩增,以去掉 HSP702-GFP 载体中的 *GFP* 基因序列。PCR 反应体系:10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L, 10 μ mol/L dNTP 0.5 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.5 μ L, LA *Taq* 1 unit, 模板 0.5 μ L, 补 ddH₂O 至 25 μ L, PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min, 中间 35 个循环的 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 5 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,对目的扩增条带切胶回收后经胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段,该片段长约 4.7 kb。

3.3.3 TH-HGFP 载体的构建

从步骤 3.3.1 中得到的 HGFP 片段和步骤 3.3.2 中得到的 HSP702-GFP 片段分别采用 *I-Sce* 限制性内切酶进行消化,接着对酶切后的 HGFP 片段与 HSP702-GFP 片段按照 3:1 的摩尔比进行连接,然后将连接产物用电转染技术转化至大肠杆菌 DH5 α 体内,在含有 100 g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上铺平板,37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。由于 HGFP 片段含有细菌密码子偏好性组成的 *GFP* 基因,因此挑取具有绿色荧光的菌落即为含有 TH-HGFP 载体的重组子。从该重组子中提取质粒,并用 *I-Sce* 限制性内切酶进行消化,得到 1.5 kb 和 4.7 kb 这 2 个目的大小的酶切产物(图 2)。

3.3.4 pD5H8-HGFP 载体的构建

TH-HGFP 载体经 *Not* 酶切后,得到的 pGEM-T 载体骨架片段与 HSP70-2 5'UTR-HGFP-HSP70-1 3'UTR 片段大小接近,在琼脂糖凝胶电泳时无法有效地将两者区分开来。由此先采用 T 载体上的通用引物 M13_F 和 M13_R 对 TH-HGFP 载体进行 PCR 扩增,PCR 反应体系:10×PCR Buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL,10 μmol/L dNTP 0.5 μL,10 μmol/L 引物各 0.5 μL,LA *Taq* 1 unit,模板 0.5 μL,补 ddH₂O 至 25 μL;PCR 反应条件:94°C 2 min,中间 35 个循环的 94°C 30 s,50°C 3.5 min,72°C 5 min,最后 72°C 10 min 延伸。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,对目的扩增条带切胶回收后经胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段,该片段长约 3.5 kb。接着用 *Not* 限制性内切酶对上述回收 DNA 片段进行消化,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测,对目的条带切胶回收后经胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段(HSP70-2 5'UTR-I-Sce⁻-HGFP-I-Sce⁻-HSP70-1 3'UTR),该片段长约 3 kb,其两端携带 *Not* 酶切位点。

载体 pD5H8 用 *Not* 单酶切处理,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测,对目的条带切胶回收后经胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段,该片段长约 13.8 kb。由于该长片段两端的粘性末端极易发生自连,因此用小牛碱性磷酸酶(CIAP)对回收后 DNA 片段的 5' 末端进行去磷酸化处理,以降低其自连背景。去磷酸化反应体系:10×CIAP Buffer 5 μL,*Not* 酶切后的 pD5H8 片段 20 μL,CIAP 1 μL,补 ddH₂O 至 50 μL,去磷酸化反应条件:37°C 水浴 1 h。

将上述 HSP70-2 5'UTR-I-Sce⁻-HGFP-I-Sce⁻-HSP70-1 3'UTR 片段与磷酸化处理后的 pD5H8 片段按照 10:1 的摩尔比进行连接,然后将连接产物用电转染技术转化至大肠杆菌 DH5α 体内,在含有 100 μg/mL 的 LB 固体培养基上铺平板,37°C 培养 16 h 后挑取具有绿色荧光的菌落即为含有 pD5H8-HGFP 载体的重组子。从该重组子中提取质粒,并用 *I-Sce* 限制性内切酶进行消化,得到 1.5 kb 和 15.2 kb 这 2 个目的大小的酶切产物(图 4)。

3.4 含有异源基因 GFP 的四膜虫表达载体 pD5H8-GFP 构建

设计用于 GFP 片段扩增的引物,Y-63_F 5'-CTGGCCTAGGGATAACAGGGTAATATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC-3'(下划线为 *I-Sce* 酶切位点),Y-64_R 5'-CTCGAGTAGGGATAACAGGGT

AATTTTGTATAGTTCATCCATGCCAT-3'(下划线为 *I-Sce* 酶切位点)。以质粒 HSP702-GFP 为模板,扩增两端带 *I-Sce* 酶切位点的 GFP 片段,PCR 反应体系:10×PCR Buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL,10 μmol/L dNTP 0.5 μL,10 μmol/L 引物各 0.5 μL,LA *Taq* 1 unit,补 ddH₂O 至 25 μL,PCR 反应条件:94°C 2 min,中间 35 个循环的 94°C 30 s,50°C 1 min,72°C 1 min,最后 72°C 10 min 延伸。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,对目的扩增条带切胶回收后经胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段,该片段长约 750 bp。接着用 *I-Sce* 限制性内切酶对上述回收 DNA 片段进行消化,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测,对目的条带切胶回收后经胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段(GFP),其两端携带 *I-Sce* 酶切位点。从步骤 3.3 得到的 pD5H8-HGFP 载体用 *I-Sce* 单酶切处理,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测,对目的条带切胶回收后经胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段,该片段长约 15.4 kb。将上述携带 *I-Sce* 酶切位点的 GFP 片段与之按照 20:1 的摩尔比进行连接,然后将连接产物用电转染技术转化至大肠杆菌 DH5α 体内,在含有 100 g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上铺平板,37°C 培养 16 h 后挑取具有绿色荧光的菌落即为含有 pD5H8-HGFP 载体的重组子。从该重组子中提取质粒,用引物 Y-63_F 和位于 pD5H8-HGFP 载体上 HSP70-1 终止子位置的引物 TH_R:5'-CTTGCCAATTAATCAGCTTCA-3' 进行 PCR 扩增,以验证 GFP 基因插入的方向,PCR 反应体系:10×PCR Buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL,10 μmol/L dNTP 0.5 μL,10 μmol/L 引物各 0.5 μL,模板 0.5 μL,LA *Taq* 1 unit,补 ddH₂O 至 25 μL,PCR 反应条件:94°C 2 min,中间 35 个循环的 94°C 30 s,50°C 1 min,72°C 1 min,最后 72°C 10 min 延伸,PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 6)。

3.5 含有 pD5H8-GFP 载体的四膜虫表达株构建

3.5.1 四膜虫的接合与电击转化

四膜虫 B2086、CU428 株分别于 30°C、150 r/min SPP 培养基培养至对数生长期,1 500 r/min 离心 3 min 回收虫体,分别用温浴(30°C)的饥饿培养基洗涤 3 次。将四膜虫在饥饿培养基中 30°C 静止饥饿,密度调整至 2×10⁵ cells/mL,饥饿 18~24 h 后,再将两株细胞等量混合到一起,30°C 接合 10 h。然后用 10 mmol/L HEPES (pH 7.5)清洗一次,吸取 200 μL 与 50 μg 环状质粒 DNA (OMEGA 去内毒素试剂盒所抽)混合,在 0.2 cm

点击杯中,用 Bio-Rad 电穿孔仪进行电击,电击参数为 300 V,25 μ F,50 Ω 。原始的 rDNA 载体 PD5H8 的电转条件同上。

3.5.2 抗性虫株的筛选

电击后室温静置 1 min,然后分别将每次电击的产物加入 SPP 培养基中,30 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h,然后加入巴龙霉素至终浓度 100 μ g/mL。2~3 d 后,观察四膜虫培养物,确定其是否成功转入了 GFP 的四膜虫表达载体。

3.5.3 抗性虫株的 Whole Cell PCR 鉴定

将四膜虫培养至对数生长期,收集 150~200 μ L 转染四膜虫细胞,倒掉上清,使细胞悬浮在 80~100 μ L 1 \times Buffer K (2 mmol/L Mg²⁺)中,使用 PCR 仪在 55 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,99 $^{\circ}$ C 变性 20 min,裂解,将上述裂解物置于冰上,做 PCR。每 25 μ L 的体系中:上述裂解物 20 μ L,10 \times PCR Buffer 0.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) (终浓度为 3 mmol/L) 1.4 μ L, dNTP (10 μ mol/L) 0.5 μ L, Y-63_F (10 μ mol/L) 0.5 μ L, Y-64_R (10 μ mol/L) 0.5 μ L, Taq 0.5 μ L, 加 ddH₂O 补至 25 μ L。PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,25~35 cycles,78 $^{\circ}$ C 10 min。

3.6 GFP 蛋白的检测

3.6.1 免疫印迹法

为了使 GFP 蛋白的四膜虫表达株更加稳定,对 PCR 鉴定正确的抗性虫株将挑单克隆至巴龙霉素终浓度为 200 μ g/mL 的 SPP 培养基中培养,培养至对数期后,每天转接一次,每次巴龙霉素终浓度提高 200 μ g/mL,直到巴龙霉素终浓度达到 1 000 μ g/mL。将巴龙霉素终浓度达到 1 000 μ g/mL 的单克隆培养至对数期,39 $^{\circ}$ C 热激,处理 1 h 后, PBS 清洗 1 次,浓缩至 5 \times 10⁷ 个/mL,按比例加入 5 \times 蛋白电泳缓冲液,在沸水中煮 3 min,离心,取上清进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。蛋白质电泳完成后,电转移至 NC 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,1:1 000 稀释的 anti-GFP 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,1:5 000 稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h。经 SuperSignal 化学发光底物显色液显色 10 min 后检测。

3.6.2 荧光显微镜法

将 Whole Cell PCR 方法鉴定正确的 GFP 蛋白的四膜虫表达株的单克隆培养至对数期,一份 39 $^{\circ}$ C 热激,处理 1 h,另一份不做处理,转染了 pD5H8 的四膜虫也做同样的两份样品,作对照组。各取未热激处理和 39 $^{\circ}$ C 热激处理后的 1 mL 四膜虫富集至 50 μ L,离心条件为:1 500 r/min、30 $^{\circ}$ C、2 min,然后用 ZEISS 显

微镜在蓝色激发光下(滤光片 FITC)对诱导的四膜虫进行荧光观察,并用 ZEISS 显微镜配套的数码成像系统拍照记录。

作者贡献

缪炜和袁冬霞设计了实验,袁冬霞承担了主要的实验工作,冯立芳、熊杰参与部分实验工作和论文的修改,缪炜和袁冬霞撰写了论文。

致谢

感谢罗彻斯特大学 Martin A. Gorovsky 教授为本研究提供了四膜虫(*Tetrahymena thermophila*) B2086 与 CU428 株系、质粒 pD5H8,感谢湖北大学马立新教授、钟星博士、陈亮博士、朱德武博士给予的指导和帮助;感谢对本研究成稿给予帮助的所有老师和同学!

参考文献

- Boldrin F., Santovito G., Formigari A., Bisharyan Y., Cassidy-Hanley D., Clark T.G., and Piccini E., 2008, *MTT2*, a copper-inducible metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila*, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 147(2): 232-240
- Cole E.S., Cassidy-Hanley D., Hemish J., Tuan J., and Bruns P.J., 1997, A mutational analysis of conjugation in *Tetrahymena thermophila* 1. Phenotypes affecting early development: Meiosis to nuclear selection, *Dev. Biol.*, 189(2): 215-232
- Collins K., and Gorovsky M.A., 2005, *Tetrahymena thermophila*, *Curr. Biol.*, 15(9): R317-318
- Eisen J.A., Coyne R.S., Wu M., Wu D., Thiagarajan M., Wortman J.R., Badger J.H., Ren Q., Amedeo P., Jones K.M., Tallon L.J., Delcher A.L., Salzberg S.L., Silva J.C., Haas B.J., Majoros W. H., Farzad M., Carlton J.M., Smith R.K., Jr. Garg J., Pearlman R.E., Karrer K.M., Sun L., Manning G., Elde N.C., Turkewitz A.P., Asai D.J., Wilkes D.E., Wang Y., Cai H., Collins K., Stewart B.A., Lee S.R., Wilamowska K., Weinberg Z., Ruzzo W.L., Wloga D., Gaertig J., Frankel J., Tsao C.C., Gorovsky M.A., Keeling P.J., Waller R.F., Patron N.J., Cherry J.M., Stover N.A., Krieger C.J., del Toro C., Ryder H.F., Williamson S.C., Barbeau R.A., Hamilton E.P., and Orias E., 2006, Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote, *PLoS Biol.*, 4(9): e286
- Feng L.F., Chang Y., Yuan D.X., and Miao W., 2011, Expression analysis of 5 *hsp70* genes in *Tetrahymena thermophila*, *Dongwuxue Yanjiu (Zoological Research)*, 32(3): 267-276 (冯立芳, 畅悦, 袁冬霞, 缪炜, 2011, 嗜热四膜虫五个 *hsp70* 基因的表达分析, *动物学研究*, 32(3): 267-276)
- Feng L.F., and Miao W., 2009, Construction and application of *Tetrahymena transgenic* vector with HSP70 promoter and GFP, China Patent, ZL200910062093.X (冯立芳, 缪炜, 2009, 含

- HSP70 启动子和 GFP 的四膜虫转基因载体及制备方法和应用, 中国专利, ZL200910062093.X)
- Formigari A., Boldrin F., Santovito G., Cassidy-Hanley D., Clark T.G., and Piccinni E., 2010, Functional characterization of the 5'-upstream region of *MTT5* metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila*, *Protist*, 161(1): 71-77
- Gaertig J., Gao Y., Tishgarten T., Clark T.G., and Dickerson H. W., 1999, Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*, *Nat. Biotechnol.*, 17(5): 462-465
- Gaertig J., Gu L., Hai B., and Gorovsky M.A., 1994, High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*, *Nucleic Acids Res.*, 22(24): 5391-5398
- Lynn D.H., and Doerder F.P., 2012, The life and times of *Tetrahymena*, *Methods Cell Biol.*, 109: 9-27
- Orias E., Hamilton E.P., and Orias J.D., 2002, *Tetrahymena* as a laboratory organism: Useful strains, cell culture, and cell line maintenance, *Method Cell Biol.*, 62: 194
- Peterson D.S., Gao Y., Asokan K., and Gaertig J., 2002, The circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* is expressed and localized to cell surface in the free-living ciliate *Tetrahymena thermophila*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 122(2): 119-126
- Spangler E.A., and Blackburn E.H., 1985, The nucleotide sequence of the 17S ribosomal RNA gene of *Tetrahymena thermophila* and the identification of point mutations resulting in resistance to the antibiotics paromomycin and hygromycin, *J. Biol. Chem.*, 260(10): 6334-6340
- Sweeney R., and Yao M.C., 1989, Identifying functional regions of rRNA by insertion mutagenesis and complete gene replacement in *Tetrahymena thermophila*, *EMBO J.*, 8(3): 933-938
- Turkewitz A.P., Orias E., and Kapler G., 2002, Functional genomics: The coming of age for *Tetrahymena thermophila*, *Trends Genet.*, 18(1): 35-40
- Weide T., Bockau U., Rave A., Herrmann L., and Hartmann M. W., 2007, A recombinase system facilitates cloning of expression cassettes in the ciliate *Tetrahymena thermophila*, *BMC Microbiol.*, 7: 12
- Xiong J., Lu X., Zhou Z.M., Chang Y., Yuan D.X., Tian M., Wang L., Fu C.J., Orias E., and Miao W., 2012, Transcriptome analysis of the model protozoan, *Tetrahymena thermophila*, using Deep RNA sequencing, *PLoS One*, 7(2): e30630
- Yao M.C., and Yao C.H., 1989, Accurate processing and amplification of cloned germ line copies of ribosomal DNA injected into developing nuclei of *Tetrahymena thermophila*, *Mol. Cell Biol.*, 9(3): 1092-1099