

绿色荧光蛋白表达载体pXS75-GFP的构建及在嗜热四膜虫中的应用

梁海霞 王 伟*

(山西大学生物技术研究所化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要 为获得能够用于构建嗜热四膜虫蛋白定位的载体, 该研究将GFP基因与镉(Cd²⁺)诱导的四膜虫金属硫蛋白基因(MTI)启动子序列和终止子序列融合, 获得表达载体pXS75-GFP。通过同源重组和抗性筛选, pXS75-GFP载体携带的目的基因整合入四膜虫MTI位点, 在Cd²⁺诱导下实现GFP融合蛋白的可控表达。将 α -tubulin基因ATU1克隆入pXS75-GFP中, 重组质粒pXS75-GFP-ATU1通过基因枪转化入四膜虫细胞, 在巴龙霉素筛选下获得稳定的 α -tubulin-GFP过表达细胞株。激光共聚焦显微镜观察 α -tubulin-GFP的定位, 结果显示, α -tubulin-GFP融合蛋白在四膜虫细胞中表达并分布于皮层上, 表明pXS75-GFP载体可用于嗜热四膜虫功能蛋白的定位分析。

关键词 绿色荧光蛋白; 载体构建; 蛋白定位; 嗜热四膜虫

纤毛类原生动物的嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)是一种单细胞真核生物。近年来已发展建立了成熟的四膜虫细胞转化和基因重组等分子遗传学操作手段^[1], 大核全基因组测序的完成(<http://www.ciliate.org>)^[2]以及全基因组转录本、基因表达谱和基因相互作用网络数据平台(<http://tfgd.ihb.ac.cn>)^[3-4]的完善, 进一步推动了嗜热四膜虫的研究并促使其发展成为分子细胞生物学和表观遗传学研究的重要模式体系。利用DNA介导的转化技术, 通过同源重组的方式对目的基因进行敲除和过表达研究, 已成为嗜热四膜虫中研究基因功能的重要方法^[5]。当含有标签蛋白编码序列的融合基因被重组入特定的染色体位点时, 可实现基因表达产物在四膜虫中的亚细胞定位分析, 对探索目的蛋白的生物学功能具有重要意义。目前, 四膜虫中用于定位分析的标签载体大多是针对特定基因设计并改造的^[6], 并不适合广泛使用。常用的标签蛋白有两类, 一类为用于免疫荧光分析的标签蛋白, 如: HA、Flag和V5。这类短肽做为融合表达载体标签, 通常不会影响目标蛋白的生物活性和亚细胞定位, 但需要进行复杂的免疫荧光法才能使这些标签蛋白显色。另一类为荧光蛋白标签, 如: GFP、YFP和RFP。其融合表达目的蛋白后, 直接通过荧光显微镜就能在活细胞中观察到重组蛋白的荧光信号, 能够实时监测目的蛋白的表达和在细胞内的动态分布。

为构建可用于四膜虫中蛋白定位的载体, 本研究在载体pXS75(图1A)中引入GFP基因和特异酶切位点, 获得含有GFP的融合表达载体。为证实该载体的实用性, 构建了重组质粒pXS75-GFP-ATU1, 通过基因枪转化入四膜虫细胞并获得阳性克隆; 在0.5 μ g/mL Cd²⁺诱导下, α -tubulin-GFP融合蛋白规律地分布于四膜虫皮层上, 表明pXS75-GFP载体可用于嗜热四膜虫功能蛋白的定位分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒 嗜热四膜虫CU428、B2086细胞株(由美国康奈尔大学Peter J. Bruns博士惠赠), 质粒pXS75(由罗彻斯特大学Martin A Gorovsky教授惠赠), 质粒pD5H8-HSP702-GFP(由中科院水生所缪伟研究员惠赠), 大肠杆菌DH5 α (由本实验室保存)。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA聚合酶和限制性内切酶购自Fermentas公司; pMD18-T载体、T4 DNA连接酶购自TakaRa公司; PCR胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自BIOMIG公司; 引物合成和测序由华大基因公司完成; anti-GFP抗体购自Cali-Bio公司,

收稿日期: 2012-06-14 接受日期: 2012-07-18

国家自然科学基金(No.30770295, No.31072000)和教育部科学技术研究重点项目(No.201026)资助项目

*通讯作者。Tel: 0351-7011499, E-mail: gene@sxu.edu.cn

HRP标记的二抗购自Zymed Labs公司, SuperSignal化学发光底物显色液购自Pierce公司。

1.2 方法

1.2.1 重叠延伸PCR连接GFP和MTT1 3'端侧翼序列以pD5H8-HSP702-GFP为模板, GFPF和GFPR(表1)为引物, PCR扩增含有GFP序列片段; 以pXS75载体为模板, MTT3F和MTT3R(表1)为引物, PCR扩增MTT1 3'端侧翼序列; 然后以GFP序列和MTT1 3'端侧翼序列PCR扩增片段为模板, NF和NR(表1)为巢式引物, PCR扩增连接两片段, 得到GFP和MTT1 3'端侧翼序列融合基因序列。

1.2.2 pXS75-GFP载体的构建 将GFP和MTT1 3'端侧翼序列融合基因序列的PCR产物经过胶回收纯化后连接pMD18-T载体, 并转化到DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落培养后提取质粒并测序鉴定; 经测序鉴定PCR产物序列正确的此连接载体与pXS75载体进行Asc I和Xho I双酶切反应, 并分别胶回收纯化目的酶切片段; 回收的酶切产物用T4 DNA连接酶连接; 连接产物转化到DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落培养后提取质粒, 并进行BamH I和Xho I双酶切鉴定。

1.2.3 pXS75-GFP-ATU1载体的构建 以四膜虫基因组DNA为模板, ATUF和ATUR为引物PCR扩增四膜虫 α -Tubulin基因序列ATU1。胶回收纯化ATU1的PCR产物后连接pMD18-T载体, 并转化到DH5 α 感受态细

胞, 挑取单菌落培养后提取质粒并测序鉴定; 经测序鉴定PCR产物序列正确的此连接载体与pXS75-GFP载体进行BamH I和Asc I双酶切反应, 并分别胶回收纯化目的酶切片段; 回收的酶切产物用T4 DNA连接酶连接; 连接产物转化到DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落培养后提取质粒, 并进行BamH I和Xho I双酶切鉴定。

1.2.4 四膜虫转化与阳性克隆筛选 Sac I和Xho I双酶切线性化pXS75-GFP-ATU1质粒, 并浓缩酶切产物。将浓缩产物用GJ-1000基因枪(宁波新芝)转入CU428和B2086细胞株中^[7-8]。转化后的细胞在含有100 μ g/mL巴龙霉素的SPP培养基(0.1%肌蛋白, 0.02%葡萄糖, 0.01%酵母提取物, 0.3% EDTA)中培养, 每传一代倍性增加巴龙霉素浓度, 直到细胞无法繁殖时, 挑取多个单细胞到SPP液滴中培养, 在扩大培养后提取基因组DNA, 以MTT1F和MTT1R(表1)为引物, PCR鉴定发生正确同源重组的细胞株。

1.2.5 α -tubulin-GFP融合蛋白的Western blot分析 将PCR鉴定为阳性的四膜虫细胞在含0.5 μ g/mL Cd²⁺的SPP培养基中培养至浓度为(2~3) $\times 10^5$ /mL。每个样品收集 2×10^3 细胞并加入5 \times SDS-PAGE上样缓冲液(5% β -巯基乙醇, 50%甘油, 10% SDS和250 mmol/L Tris-HCl, pH6.8)后沸水浴加热5 min。将每个样品在10% SDS-PAGE凝胶电泳后电转移至PVDF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

表1 PCR扩增使用的引物序列

Table 1 Oligonucleotides used to amplify target sequences

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	退火温度($^{\circ}$ C) Annealing temperature($^{\circ}$ C)
The fragment containing the GFP coding sequence	GFPF: CCA ACA ATT CTA TCA TAT TAT CAG AAA T GFPR: <u>TAA TTA ACA TAT TTA TTT CAT CAT TTG AGT TCA TCC AT</u>	47
3' flanking sequence of MTT1	MTT3F: <u>ATA CAA ATG ATG</u> AAA TAA ATA TGT TAA TTA AAA TTT AAA ATA TGT T MTT3R: CTT ATC AAA TAA ATC TAT TAA GTA AAT ATC C	47
GFP/3' flanking sequence of MTT1 fusion gene	NF: ggc gcg cc <u>A TCT AGG CCT GTT GCT ACT</u> ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT G NR: ctc gag TGT TAA TGT ATG GTG T	45
ATU1	ATUF: gga tcc ATG AGA GAA GTT TAA TTC AC ATUR: ggc gcg ccG TAT TCT TCT TCA CCT T	49
Identification of the correct recombinant	MTT1F: GCT ACG TGA TTC ACG ATT TAT GCA ATG MTT1R: CGA AAC TGA TTT TAT GCA ATT ATG AAT TAC	51

GFPR中下划线部分与MTT3F中3'非下划线部分反向互补, MTT3F中下划线部分与GFPR中3'非下划线部分反向互补。NF中小写字体部分为Asc I酶切位点, 下划线部分为接头(linker)序列, NR中小写字体部分为Xho I酶切位点。ATUF和ATUR中小写字体部分分别为BamH I和Asc I酶切位点。In the oligonucleotides of GFPR and MTT3F, the underlined nucleotides are overlapping fragments. In the oligonucleotides of NF and NR, the lower-case nucleotides are the cleavage site of Asc I and Xho I, respectively; the underlined nucleotides are the linker sequence. In the oligonucleotides of ATUF and ATUR, the lower-case nucleotides are the cleavage site of BamH I and Asc I, respectively.

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。

1.2.6 α -tubulin-GFP的定位分析 在含0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cd^{2+} 的SPP培养基中大量培养阳性四膜虫至细胞浓度为 $(2\sim 3)\times 10^5/\text{mL}$ 。在载玻片上滴7 μL 甘油, 加入3 μL 细胞悬浮液, 加盖22 mm \times 22 mm盖玻片, 使用激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000)观察 α -tubulin-GFP在活体细胞中的定位。

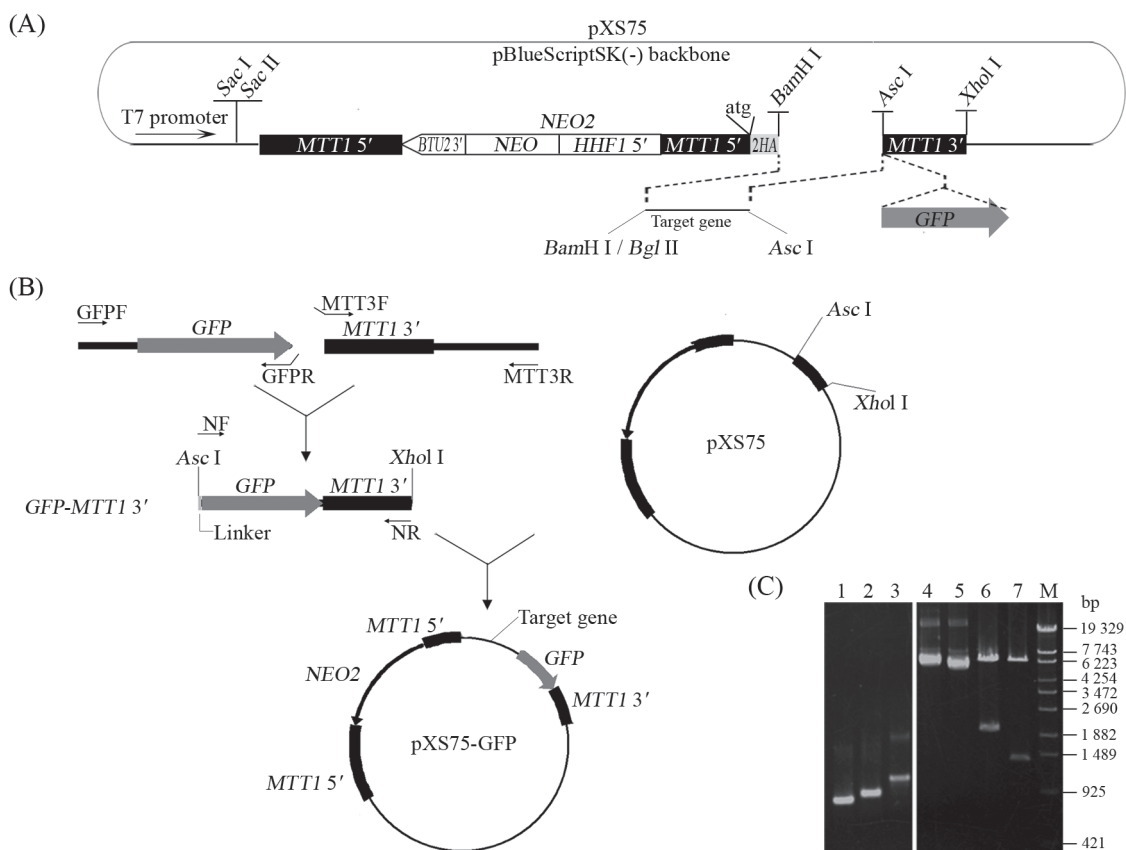
取5 mL细胞, 3 000 r/min离心3 min, 弃上清, 加入5 mL 0.5%多聚甲醛, 混匀后室温固定5 min, PBS洗3次; 含5% TritonX-100的PBS 2 mL室温孵育细胞5 min, PBS洗3次; 2 mL PBS重悬细胞沉淀; 取50 μL 细胞悬浮液到多聚赖氨酸处理过的22 mm \times 22 mm盖玻片上,

使细胞均匀铺满整个盖玻片, 室温干燥3~4 h; 滴4 μL 甘油到载玻片上, 将盖玻片的细胞面扣在上面, 用指甲油封住各边; 激光共聚焦显微镜观察 α -tubulin-GFP在固定细胞中的定位。

2 结果

2.1 pXS75-GFP载体的构建

重组质粒pXS75-GFP构建过程见图1B, *MTT1*启动子启动目的基因(target gene)和*GFP*基因融合表达, *GFP*基因之前有一段编码接头氨基酸(Linker)的序列。含*GFP*序列片段、含*MTT1* 3'端侧翼序列片段以及*GFP*和*MTT1* 3'端侧翼序列融合基因序列的PCR产物经凝胶电泳证实大小均与预期相符, 分别为899 bp、974 bp和1 149 bp(图1C)。测序结果显示,



A: pXS75载体示意图; B: pXS75-GFP载体构建示意图; C: pXS75-GFP载体的构建及鉴定, 1: 包含*GFP*序列的PCR产物; 2: *MTT1* 3'端PCR产物; 3: *GFP*与*MTT1* 3'端侧翼序列的融合基因序列的PCR产物; 4: pXS75-GFP质粒; 5: pXS75质粒; 6: pXS75-GFP质粒*Bam*H I和*Xho*I双酶切; 7: pXS75质粒*Bam*H I和*Xho*I双酶切; M: λ -*Eco*T14 I digest DNA marker(TaKaRa)。

A: schematic diagram of plasmid pXS75; B: schematic diagrams of construction of vector pXS75-GFP; C: construction and identification of pXS75-GFP, 1: PCR product of *GFP* containing sequence; 2: PCR product of *MTT1* 3' flanking sequence; 3: PCR product of fusion gene sequence of *GFP* and *MTT1* 3' flanking sequence; 4: pXS75-GFP plasmid; 5: pXS75 plasmid; 6: pXS75-GFP was double digested with *Bam*H I and *Xho*I; 7: pXS75 was double digested with *Bam*H I and *Xho*I; M: λ -*Eco*T14 I digest DNA marker(TaKaRa)。

图1 pXS75-GFP载体的构建及鉴定

Fig.1 Construction and identification of plasmid pXS75-GFP

*GFP*和*MTT1* 3'端侧翼序列融合基因序列与GenBank序列一致。将*GFP*与*MTT1* 3'端侧翼序列的融合基因序列与pXS75载体分别进行*Asc* I和*Xho* I双酶切, 并连接酶切产物获得pXS75-GFP。对pXS75-GFP进行*Bam*H I和*Xho* I双酶切, 得到约2 000 bp和6 500 bp的片段(图1C), 均与预期大小一致, 且其中大片段大小与pXS75载体经*Bam*H I和*Xho* I双酶切释放的大片段大小一致, 表明*GFP*序列连接到了pXS75载体上, 成功获得pXS75-GFP重组质粒。

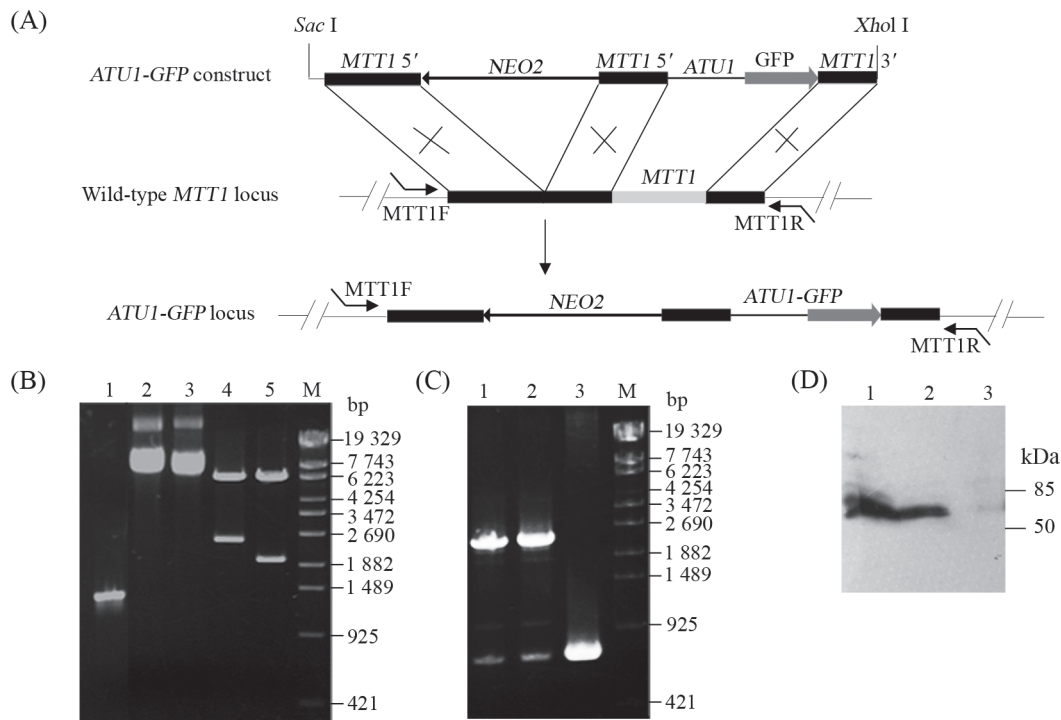
2.2 α -tubulin-GFP融合表达四膜虫细胞株的构建

1 350 bp的*ATU1*基因PCR产物连接到pMD18-T载体后测序, 结果显示其序列与GenBank序列一致。将pMD18-T-*ATU1*与pXS75-GFP载体的*Bam*H I和*Asc* I

双酶切产物回收并连接获得pXS75-GFP-*ATU1*重组质粒。*Bam*H I和*Xho* I双酶切pXS75-GFP-*ATU1*, 释放的片段大小与预期大小一致(图2B)。

酶切、浓缩的pXS75-GFP-*ATU1*转化四膜虫细胞, 经同源重组, *ATU1-GFP*序列替代大核基因组上*MTT1*序列(图2A), 在不断增加的巴龙霉素浓度下, 基因组*MTT1*序列被*ATU1-GFP*逐步替代。挑取在400 μ g/mL巴龙霉素下存活的CU428和B2086细胞株单克隆, 扩大培养后提取基因组DNA进行PCR鉴定, 阳性细胞株有两条扩增产物, 750 bp为四膜虫大核基因组*MTT1*基因序列, 2 400 bp为*ATU1-GFP*基因序列(图2C), 结果表明*ATU1-GFP*基因序列部分替代了大核*MTT1*基因序列。

收集经PCR鉴定为阳性的细胞株并提取总蛋



A: *ATU1-GFP*融合基因与*MTT1*基因同源重组示意图; B: 载体pXS75-GFP-*ATU1*的构建及鉴定, 1: *ATU1*的PCR产物; 2: pXS75-GFP-*ATU1*质粒; 3: pXS75-GFP质粒; 4: pXS75-GFP-*ATU1*质粒*Bam*H I和*Xho* I双酶切; 5: pXS75-GFP质粒*Bam*H I和*Xho* I双酶切; M: λ -*Eco*T14 I digest DNA marker(TaKaRa); C: 四膜虫突变体鉴定, 1: 重组CU428基因组PCR鉴定; 2: 重组B2086基因组PCR鉴定; 3: 野生型细胞株基因组PCR鉴定; M: λ -*Eco*T14 I digest DNA marker(TaKaRa); D: Western blot检测 α -tubulin-GFP融合蛋白的表达, 1: 过表达 α -tubulin-GFP的CU428细胞总蛋白; 2: 过表达 α -tubulin-GFP的B2086细胞总蛋白; 3: 野生型细胞CU428总蛋白。

A: diagram of the *ATU1-GFP* construct at the *MTT1* locus; B: construction and identification of vector pXS75-GFP-*ATU1*, 1: PCR product of *ATU1*; 2: pXS75-GFP-*ATU1* plasmid; 3: pXS75-GFP plasmid; 4: pXS75-GFP-*ATU1* was digested with *Bam*H I and *Xho* I; 5: pXS75-GFP was digested with *Bam*H I and *Xho* I; M: λ -*Eco*T14 I digest DNA marker(TaKaRa); C: PCR identification of mutant strains, 1: PCR identification of mutant CU428 genomic DNA; 2: PCR identification of mutant B2086 genomic DNA; 3: PCR identification of wild type genomic DNA; M: λ -*Eco*T14 I digest DNA marker(TaKaRa); D: Western blot analysis of α -tubulin-GFP fusion protein expression, 1: total protein of α -tubulin-GFP overexpressing CU428 cells; 2: total protein of α -tubulin-GFP overexpressing B2086 cells; 3: total protein of wild type CU428 cells.

图2 α -tubulin-GFP过表达四膜虫细胞株的构建及鉴定

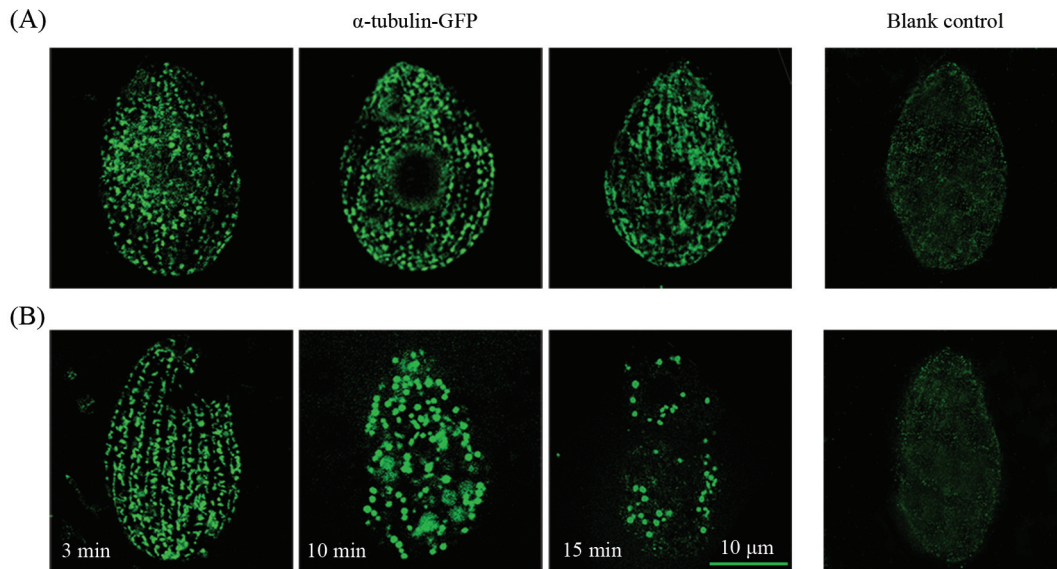
Fig.2 Construction and identification of *Tetrahymena* strains expressing α -tubulin-GFP

白, Western blot检测 α -tubulin-GFP融合蛋白的表达, 结果显示, α -tubulin-GFP融合蛋白分子量大小约为76.5 kDa, 与软件预测分子量大小相符, 而在野生型细胞中未见任何特异性条带(图2D), 表明 α -tubulin-GFP融合蛋白在四膜虫细胞内表达。

2.3 α -tubulin-GFP定位于四膜虫细胞皮质结构

在488 nm激发光激发下, 未转染的固定细胞(图

3A)和活体细胞(图3B)都没有自发荧光, 而阳性转染的固定细胞(图3A)和活体细胞(图3B)中都可观察到细胞皮层上有绿色荧光, 且荧光信号规则排列, 表明pXS75-GFP可用于四膜虫基因的亚细胞定位分析。活体细胞中, 随着时间的推移, 细胞在甘油中逐渐死亡, 荧光也随之消失, 表明活细胞中GFP融合蛋白应在制片后及时观察。



A: α -tubulin-GFP在固定四膜虫细胞中的定位, 未转染质粒的固定细胞作为空白对照; B: α -tubulin-GFP在活体四膜虫细胞中不同时间的定位, 未转染质粒的活细胞作为空白对照。

A: localization of α -tubulin-GFP in fixed *Tetrahymena* cells, non-transfected fixed cell is blank control; B: localization of α -tubulin-GFP in live *Tetrahymena* cells at different time points, non-transfected live cell is blank control.

图3 α -tubulin-GFP融合蛋白在四膜虫中的定位

Fig.3 Localization of α -tubulin-GFP fusion protein in *Tetrahymena* cells

3 讨论

细胞中蛋白定位分析为揭示细胞生命活动的分子机制提供了重要的技术手段, 其中利用GFP来示踪目的蛋白的技术已发展成熟并得到广泛应用。目前, 四膜虫中将GFP融合表达用于研究蛋白定位的方法有两种: 第一, 将目的基因克隆到含有GFP序列的rDNA载体pIGF-GTW中, 该方法已实现多种重要功能蛋白的定位分析^[9-10]。rDNA载体导入四膜虫使用的是接合期电转化法(conjugative electroporation, CET)^[7,11], 即在接合后约10 h时进行电转化, 使得rDNA载体进入发育大核的原基(anlagen)中。该方法的操作过程相比营养生殖期基因枪转化法繁琐, 需要通过饥饿处理诱导不同交配型的四膜虫细胞进行接合配对, 并在大核原基形成期时进行基因

转化。第二, 通过重叠延伸PCR将目的基因和GFP基因连接, 并克隆入特定载体中, 转化细胞, 用于目的蛋白在四膜虫细胞中的定位分析^[12]。不论被哪种质粒携带而转染入四膜虫中, GFP蛋白本身在四膜虫中呈点状并非特异地均匀分布于胞质中, 而当GFP融合目的蛋白共同表达时, 所呈现的都是目的蛋白的特异性定位^[10,13]。

本研究在pXS75基础上构建的pXS75-GFP载体, 可简化重组质粒的构建过程, 只需在PCR扩增目的基因时通过引物引入BamH I(或Bgl II)和Asc I酶切位点, 然后直接克隆入pXS75-GFP载体中即可, 省去了上述方法2中将目的基因与GFP基因连接的过程。另外, pXS75-GFP重组质粒是通过基因枪转化法导入营养生殖期四膜虫细胞的, 该方法比接合期电转

化法操作简单。除了载体构建及基因转化过程简单外, pXS75-GFP重组质粒还有以下几个优点: 第一, 由于MTTI为非必需基因, 因此融合GFP基因的基因替代四膜虫大核MTTI后不会影响四膜虫生长, 通过巴龙霉素筛选可以得到GFP稳定表达的细胞株, 便于在生理条件下研究目的基因的定位和功能; 第二, MTTI启动子在Cd²⁺诱导下可高效启动目的基因和GFP的表达, 其表达量随着Cd²⁺浓度的升高而增加, 因此目的基因和GFP为可控表达, 并且在四膜虫营养期、饥饿期和接合期都可被诱导表达; 第三, GFP作为报告分子应用时操作简单, 不需任何底物和辅助因子参与, 并可用于活细胞内蛋白质分布与变化的研究。目的蛋白和GFP之间有一段蛋白接头序列, 该段序列是由低疏水性、低电荷效应的氨基酸PSRPVAT组成的, 能够充分伸展以分开目的蛋白和GFP两种组分, 使之能在互不干扰的情况下充分折叠成各自的天然构象^[14]。本研究中 α -tubulin-GFP的定位结果与已报道的 α -tubulin在四膜虫中的定位情况^[15-16]一致, 表明pXS75-GFP载体可用于分析四膜虫中的蛋白定位。因此, 表达载体pXS75-GFP的成功构建为分析嗜热四膜虫中目的蛋白的功能定位提供了一个快速、有效的工具。

在观察固定细胞中GFP融合蛋白分布时, 本研究采用了0.5%多聚甲醛短时、低温的细胞固定方式, 以最大限度保持GFP的发光特性。这是因为GFP的荧光强度会随着固定剂作用时间的延长和作用温度的升高而降低^[17]。为了抑制四膜虫的游动速度以便于拍照观察, 在观察活体细胞GFP融合蛋白时将四膜虫滴在了甘油上。实验结果表明, 3~5 min时四膜虫荧光信号较强, 是观察的最佳时间; 随着时间的延长, 细胞死亡, 虫体解体, 荧光信号就逐渐减弱。因此, 制好片后应及时观察活细胞中GFP融合蛋白的定位。显然, 这些限制了对功能蛋白的动态分析, 因而进一步完善活细胞显微观察体系, 对发展荧光融合蛋白在四膜虫细胞中的动态观察技术具有重要意义。

参考文献 (References)

- 1 Turkewitz AP, Orias E, Kapler G. Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. Trends Genet 2002; 18(1): 35-40.
- 2 Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR,

- 3 *et al.* Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. PLoS Biol 2006; 4(9): e286.
- 4 Miao W, Xiong J, Bowen J, Wang W, Liu Y, Braguinets O, *et al.* Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle. PLoS One 2009; 4(2): e4429.
- 5 Xiong J, Yuan D, Fillingham JS, Garg J, Lu X, Chang Y, *et al.* Gene network landscape of the ciliate *Tetrahymena thermophila*. PLoS One 2011; 6(5): e20124.
- 6 Mochizuki K. High efficiency transformation of *Tetrahymena* using a codon-optimized neomycin resistance gene. Gene 2008; 425(1/2): 79-83.
- 7 Kataoka K, Schoeberl UE, Mochizuki K. Modules for C-terminal epitope tagging of *Tetrahymena* genes. J Microbiol Methods 2010; 82(3): 342-6.
- 8 Gaertig J, Gu L, Hai B, Gorovsky MA. High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*. Nucleic Acids Res 1994; 22(24): 5391-8.
- 9 Gaertig J, Kapler G. Transient and stable DNA transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation. Methods Cell Biol 2000; 62: 485-500.
- 10 Bright LJ, Kambesis N, Nelson SB, Jeong B, Turkewitz AP. Comprehensive analysis reveals dynamic and evolutionary plasticity of Rab GTPases and membrane traffic in *Tetrahymena thermophila*. PLoS Genet 2010; 6 (10): e1001155.
- 11 Malone CD, Falkowska KA, Li AY, Galanti SE, Kanuru RC, LaMont EG, *et al.* Nucleus-specific importin alpha proteins and nucleoporins regulate protein import and nuclear division in the binucleate *Tetrahymena thermophila*. Eukaryot Cell 2008; 7(9): 1487-99.
- 12 Cassidy-Hanley D, Bowen J, Lee JH, Cole E, VerPlank LA, Gaertig J, *et al.* Germline and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardment. Genetics 1997; 146(1): 135-47.
- 13 Cui B, Gorovsky MA. Centromeric histone H3 is essential for vegetative cell division and for DNA elimination during conjugation in *Tetrahymena thermophila*. Mol Cell Biol 2006; 26 (12): 4499-510.
- 14 Slade KM, Freggiaro S, Cottrell KA, Smith JJ, Wiley EA. Sir-tuin-mediated nuclear differentiation and programmed degradation in *Tetrahymena*. BMC Cell Biol 2011; 12: 40.
- 15 韩小艳, 赵娜, 王永祥. 接头序列及其在融合蛋白构建中的应用. 河北医科大学学报(Han Xiaoyan, Zhao Na, Wang Yongxiang. Journal of Hebei Medical University) 2007; 28(3): 224-7.
- 16 Cervantes MD, Coyne RS, Xi X, Yao MC. The condensin complex is essential for amitotic segregation of bulk chromosomes, but not nucleoli, in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. Mol Cell Biol 2006; 26(12): 4690-700.
- 17 Seixas C, Cruto T, Tavares A, Gaertig J, Soares H. CCTalpha and CCTdelta chaperonin subunits are essential and required for cilia assembly and maintenance in *Tetrahymena*. PLoS One 2010; 5(5): e10704.
- 18 张广峰, 陈祥贵, 帅培强, 林琳. 细胞固定剂对GFP发光特性影响的研究. 化学与生物工程(Zhang Guangfeng, Chen Xianggui, Shuai Peiqiang, Lin Lin. Effect of cell fixative on GFP luminous characteristics. Chemistry & Bioengineering) 2010; 27(12): 38-40.

Construction of Green Fluorescent Protein Expression Vector pXS75-GFP and Application in *Tetrahymena thermophila*

Liang Haixia, Wang Wei*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract To construct a vector for studying the localization of protein in *Tetrahymena thermophila*, GFP expression vector pXS75-GFP was constructed by ligating GFP with Cd²⁺-inducible metallothionein (*MTT1*) promoter and terminator sequences. The target gene—GFP fusion gene can integrate into the *MTT1* locus through homologous recombination and resistance screening. Expression of the target protein in-fusion with the C-terminal GFP tag was controllable by Cd²⁺. The recombinant plasmid pXS75-GFP-ATU1 was constructed and biolistically transformed into *Tetrahymena*. The expression of α -tubulin-GFP was analyzed by Western blot. Confocal microscopy showed that α -tubulin-GFP localized at cortex in living and fixed *Tetrahymena* cells. The results revealed that pXS75-GFP can be used for studying the subcellular localization of proteins in *Tetrahymena thermophila*.

Key words green fluorescent protein; construction of vectors; protein localization; *Tetrahymena thermophila*

Received: June 14, 2012 Accepted: July 18, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30770295, No.31072000) and the Key Project of Chinese Ministry of Education (No.201026)

*Corresponding author. Tel: 86-351-7011499, E-mail: gene@sxu.edu.cn