

技术与方法

原核和真核双表达载体的构建及功能分析

朱明慧 李晓静 王浩民 乔可欣 朱嘉懿 赵春澎* 王小引*

(新乡医学院基础医学院, 新乡 453003)

摘要 为了构建能驱动重组蛋白在真核及原核表达系统同时表达的双表达载体, 该研究将T7启动子和T7终止子分别克隆到真核表达载体pIRES-EGFP启动子CMV下游和新霉素抗性基因上游, 构建双表达载体pIRES-CMV/T7-EGFP, 并进一步将增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, *eGFP*)基因替换为人转铁蛋白(human transferrin, *HTrf*)基因, 构建得到pIRES-CMV/T7-HTrf载体。将构建成功的重组载体转染中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞和转化大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) BL21, 再利用荧光显微镜、流式细胞术及Western blot分析重组蛋白是否表达及其表达水平。荧光显微镜观察、流式细胞仪分析及Western blot检测显示eGFP和HTrf既能在CHO细胞中成功表达, 也能在大肠杆菌BL21中表达。该研究成功构建了在原核及真核表达系统中均可以表达重组蛋白的双表达载体。

关键词 双表达载体; CHO; 大肠杆菌; 启动子

Construction and Functional Analysis of Prokaryotic and Eukaryotic Dual Expression Vectors

ZHU Minghui, LI Xiaojing, WANG Haomin, QIAO Kexin, ZHU Jiayi, ZHAO Chunpeng*, WANG Xiaoyin*

(School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract This study was to construct a dual expression vector that could simultaneously drive the expression of recombinant protein in eukaryotic and prokaryotic expression system. The *T7* promoter and *T7* terminator gene of prokaryotic were cloned into the downstream of *CMV* promoter and upstream of neomycin resistance gene of eukaryotic expression vector pIRES-EGFP to generate the dual expression vector pIRES-CMV/T7-EGFP, and further the human transferrin gene was replaced with *eGFP* (enhanced green fluorescent protein) gene to generate pIRES-CMV/T7-HTrf vector. Subsequently, the recombination vector was transfected into CHO (Chinese hamster ovary) cells and transformed into *Escherichia coli* BL21. The results showed that the *eGFP* and *HTrf* gene could be successfully expressed in both CHO cells and *E. coli* BL21 by fluorescence microscopy, flow cytometry and Western blot. Taken together, this study has successfully constructed a dual expression vector that can express the recombinant protein in both prokaryotic and eukaryotic expression systems.

Keywords dual expression vectors; CHO; *Escherichia coli*; promoter

收稿日期: 2021-11-05

接受日期: 2022-01-17

河南省高等学校重点科研项目(批准号: 22A310009)和大学生创新创业训练计划(批准号: S202010472016、S202110472014)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0373-3029127, E-mail: 001037@xxmu.edu.cn; E-mail: wxyin@xxmu.edu.cn

Received: November 5, 2021

Accepted: January 17, 2022

This work was supported by the Key Scientific Research Projects in Universities of Henan Province (Grant No.22A310009) and the College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (Grant No.S202010472016, S202110472014)

*Corresponding authors. Tel: +86-373-3029127, E-mail: 001037@xxmu.edu.cn; E-mail: wxyin@xxmu.edu.cn

重组蛋白药物生产的表达系统主要包括真核表达系统如哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞等和原核表达系统如大肠杆菌等。目前批准上市的重组蛋白药物大多是在这两个表达系统中生产的^[1]。用于表达重组蛋白的哺乳动物细胞主要包括中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞、小鼠骨髓瘤细胞Sp2/0和NS0、人胚胎肾细胞HEK293、仓鼠肾细胞BHK-21等,它们具有类似于人源细胞的翻译后修饰、外源基因的稳定整合、能大规模悬浮培养等优点,其中大约有70%的重组蛋白药物是由CHO细胞生产的^[2]。另外,大肠杆菌表达系统遗传背景清楚,相对于CHO细胞,其表达量较高,能在培养基上快速繁殖、成本低,是最常用的原核表达系统^[3],但由于缺乏翻译后修饰(如糖基化),主要用于表达分子量较小、不需要翻译后修饰的重组药物。

启动子是结合并识别RNA聚合酶并驱动转录的一段DNA序列,猿猴空泡病毒40(Simian vacuolating virus 40, SV40)启动子、巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子和延伸因子1 α (elongation factors 1 α , EFl α)启动子是哺乳动物细胞的高效启动子^[4],其中CMV启动子是哺乳动物细胞中最常用的驱动异源基因表达的启动子^[5]。而T7启动子被广泛用于大肠杆菌表达系统以高效驱动多种重组蛋白的表达^[6]。由于原核细胞和哺乳动物细胞表达系统需要不同的元件来进行有效的复制、转录和翻译,因此,若想在两个系统中表达相同的蛋白则需要设计不同的表达载体,需要将同一基因克隆到不同质粒中,如在原核表达系统中表达,需将所表达基因克隆到原核表达质粒(如pET-28a)中^[7];如在哺乳动物细胞表达,则需将其克隆至真核表达质粒(如pIRES-neo)中^[8]。克隆过程一般依赖于PCR技术、核酸外切酶及DNA连接酶等,且成功克隆后,还需限制性内切酶酶切、琼脂糖凝胶电泳以及测序鉴定^[9],在不同的表达系统克隆同一目的基因,相同的操作步骤需多次重复,过程耗时繁琐。本研究拟构建一个可以同时在大肠杆菌和CHO细胞中表达目的蛋白的双表达载体,以减少在两种表达系统中表达相同目的蛋白构建不同表达载体所需的复杂步骤和时间,同时可拓宽对表达载体的认识。

1 材料与方 法

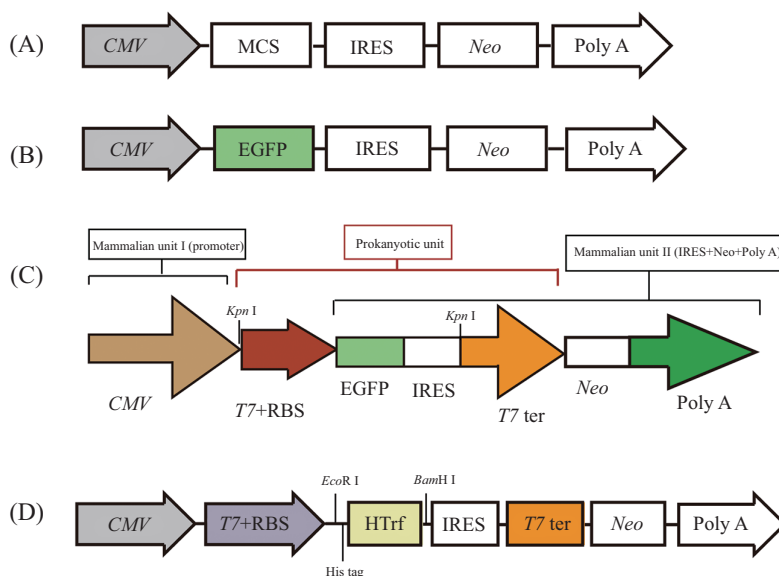
1.1 材 料

质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技

有限公司;DMEM-F12培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;氨苄青霉素购自北京鼎国生物技术有限公司;eGFP抗体(Lot: AG279)购自上海碧云天生物科技有限公司; β -actin(Lot: F180047)抗体购自Abways公司;His标签抗体(Lot: AF7018)购自上海复申生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)二抗(Lot: 56j9958)购自Affinity生物有限公司;Nikon ECLIPSE Ti倒置荧光显微镜购自日本尼康公司;pIRES-neo载体购自美国Clontech公司;Lipo 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司;CHO-S细胞、大肠杆菌BL21感受态均由本实验室保存。

1.2 载体构建

以pEGFP-C1载体(Genebank: U55763)为模板,PCR扩增eGFP编码基因,上游引物:5'-CCG GCT AGC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG-3',下游引物:5'-CTA ACC GGT TAC CAC TCG TTC CCG CTC CTC G-3',通过无缝克隆技术将eGFP克隆到pIRES-neo载体中(图1A)构建pIRES-EGFP载体(图1B),该载体能启动eGFP在真核细胞中表达。为了构建在原核和真核表达系统中均可以表达重组蛋白的双表达载体,在pIRES-EGFP载体CMV启动子下游克隆原核T7启动子和核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS),并在新霉素基因上游插入T7终止子。基因合成T7启动子(Genbank No.MN534900.1,位置4985—5000)和核糖体结合位点序列(AAGGAG),克隆至pIRES-eGFP载体CMV启动子下游,并在Neo上游插入T7终止子(Genbank No.MN882190.1,位置5929—5976),构建pIRES-CMV/T7-EGFP表达载体(图1C)。该表达载体在真核表达系统中,重组蛋白是在CMV启动子驱动下表达的,其表达盒除了CMV启动子外,还包括牛生长激素Poly A,新霉素磷酸转移酶基因被用于G418压力下筛选稳定转染的CHO细胞株。在原核表达系统中,T7噬菌体启动子和核糖体结合位点位于哺乳动物细胞启动子和翻译起始密码子之间,用于驱动重组蛋白在原核表达系统中的表达,另外还包括T7终止子用于转录终止(图1C)。为了进一步研究目的蛋白在双表达载体中的表达,将eGFP基因替换为目的蛋白HTrf(NCBI Reference Sequence: NM_001063.4)基因,构建得到表达载体pIRES-CMV/T7-HTrf(图1D)。



A: pIRES-neo; B: pIRES-EGFP; C: pIRES-CMV/T7-EGFP; D: pIRES-CMV/T7-HTrf.

图1 载体构建示意图

Fig.1 Schematic representation of the vector construction

1.3 细菌培养和转化

重组质粒1 μg 转化到50 μL 大肠杆菌BL21感受态细菌中,加入500 μL LB培养基37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床扩大培养1 h。涂板于含氨苄青霉素的LA固体培养基上于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中过夜培养。次日,挑取阳性克隆加入LA培养基在37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜活化。取60 μL 菌液于6 mL LA液体培养基中扩大培养。在37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床继续培养6 h,收集菌液进行检测。同时将无转化的大肠杆菌作为对照。

1.4 BL21细菌中重组蛋白表达的检测

在LA培养基中培养6 h后,12 000 r/min离心5 min收集菌液,弃上清,加入PBS重悬菌液。置于6孔板中,在倒置荧光显微镜下观察eGFP的表达。以同样的方法取样,加入PBS重悬菌液并进行超声破碎细菌,12 000 r/min离心5 min,收集上清,同时沉淀加入等量的PBS重悬,分别加入蛋白上样缓冲液100 $^{\circ}\text{C}$ 煮样10 min,进行Western blot分析。配置10%的分离胶,20 μg 上样量,120 V电泳1 h;电泳结束后,250 mA的电流进行转膜80 min;转膜结束后,取出PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h;加入1:3 000稀释的eGFP一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜孵育,1:5 000的山羊抗兔二抗室温孵育2 h。最后ECL显影曝光,同时以 β -actin作为内参。

1.5 细胞培养及转染

利用无内质粒提取试剂盒提取无内毒素质粒,CHO-S细胞培养在含体积分数为10%的胎牛血清和1%的青/链霉素的DMEM-F12培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中贴壁培养,细胞贴壁生长密度达到

90%时,0.25%胰酶消化并收集细胞,细胞以 6×10^5 /孔的密度接种于6孔板中。24 h后细胞融合度达到70%~80%时,Lipo 2000转染试剂转染pIRES-EGFP、pIRES-CMV/T7-EGFP和pIRES-CMV/T7-HTrf质粒,转染方法按照Lipo 2000基因转染试剂盒说明书进行。转染48 h后,以 5×10^5 个/mL的细胞密度,在125 mL的细胞摇瓶中接种30 mL,悬浮培养7天。

1.6 CHO细胞中重组蛋白表达的检测

细胞转染24 h后,倒置荧光显微镜观察eGFP的表达情况。转染48 h后细胞悬浮培养,悬浮第7天,收集1 mL细胞,PBS清洗后,500 μL PBS重悬细胞,将细胞悬液加入流式管,流式细胞仪检测每个样本中eGFP的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。打开流式分析软件Flowjo software 7.6,选择“联机”,进行设置,散点图的横坐标标为前向散射(forward scattering, FSC),纵坐标标为侧向散射(side scattering, SSC),FSC电压60 V,SSC电压300 V,ITC电压380 V,530 nm波长下采集绿色荧光蛋白信号。

转染pIRES-CMV/T7-HTrf的细胞悬浮培养第7天,离心收集培养上清,Western blot检测HTrf的表达水平,实验步骤同1.4,SDS-PAGE→转膜→封闭→孵育一抗、二抗,曝光,分析HTrf的表达。

1.7 统计分析

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有实验数据采用SPSS 18.0软件进行检验分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 载体构建

通过酶切和琼脂糖凝胶电泳对构建的表达载体进行鉴定, 结果观察到预期条带的出现。对于pIRES-CMV/T7-EGFP载体, *Kpn* I酶切得到包括T7启动子+RBS+EGFP+IRES 1 646 bp大小的片段(图2A), 对于pIRES-CMV/T7-HTrf载体, *Eco*R I/*Bam*H I双酶切得到HTrf大小片段(图2B), 将酶切正确的质粒送公司测序, 再次证明载体构建成功。

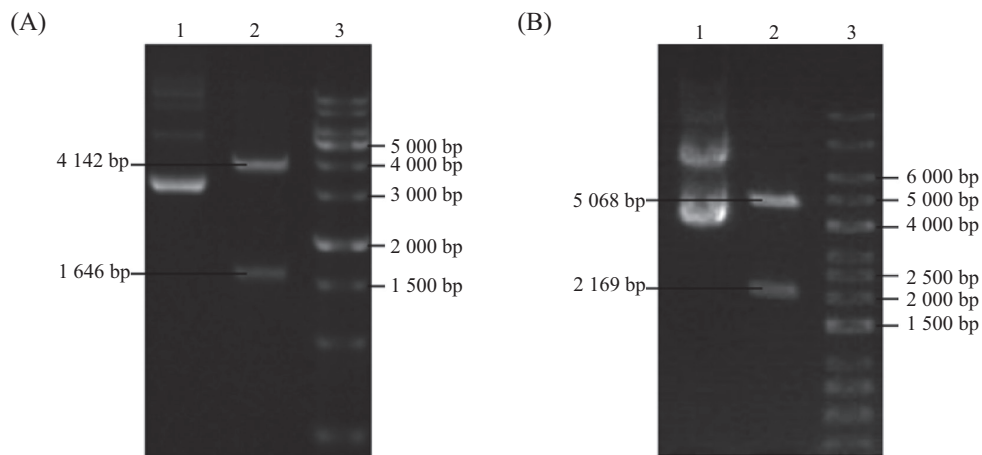
2.2 eGFP在BL21细菌中的表达

细菌经6 h的培养后, 超声破碎, 收集菌液, 荧光显微镜下观察到荧光, 即转化了pIRES-CMV/

T7-EGFP表达载体的BL21细菌表达了目的蛋白eGFP(图3A)。收集细菌进行破碎, Western blot检测eGFP的表达, 结果显示, 转化了pIRES-CMV/T7-EGFP表达载体的实验组中显示出阳性条带(图3B), 即构建的双表达载体pIRES-CMV/T7-EGFP在BL21细菌中可以表达eGFP, 而转染pIRES-EGFP质粒的菌液则检测不到eGFP的表达。

2.3 eGFP在CHO细胞中的表达

转染24 h后, 转染pIRES-CMV/T7-EGFP和pIRES-EGFP质粒的CHO细胞在倒置荧光显微镜下我们可以观察到大量绿色荧光(图4A)。经流式细胞仪检测, 转染pIRES-CMV/T7-EGFP载体的eGFP平

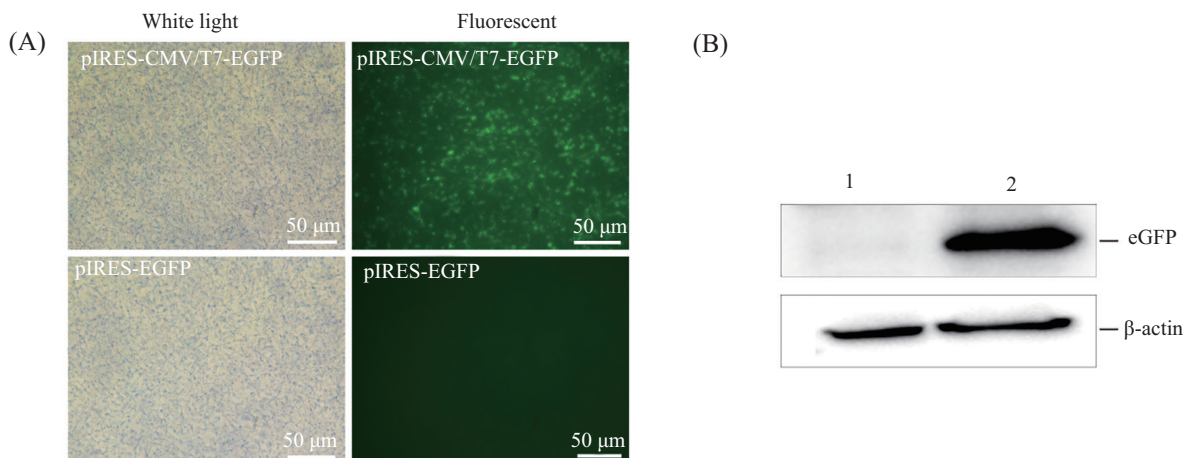


1: 原质粒; 2: pIRES-CMV/T7-EGFP质粒*Kpn* I酶切(A)和pIRES-CMV/T7-HTrf质粒*Eco*R I/*Bam*H I双酶切(B); 3: 1 Kb DNA Marker。

Lane 1: plasmid; Lane 2: pIRES-CMV/T7-EGFP plasmid digested with *Kpn* I (A) and pIRES-CMV/T7-HTrf plasmid digested with *Eco*R I/*Bam*H I (B); Lane 3: 1 Kb DNA marker.

图2 双表达载体酶切结果

Fig.2 Results of restriction digestion of the dual expression vector

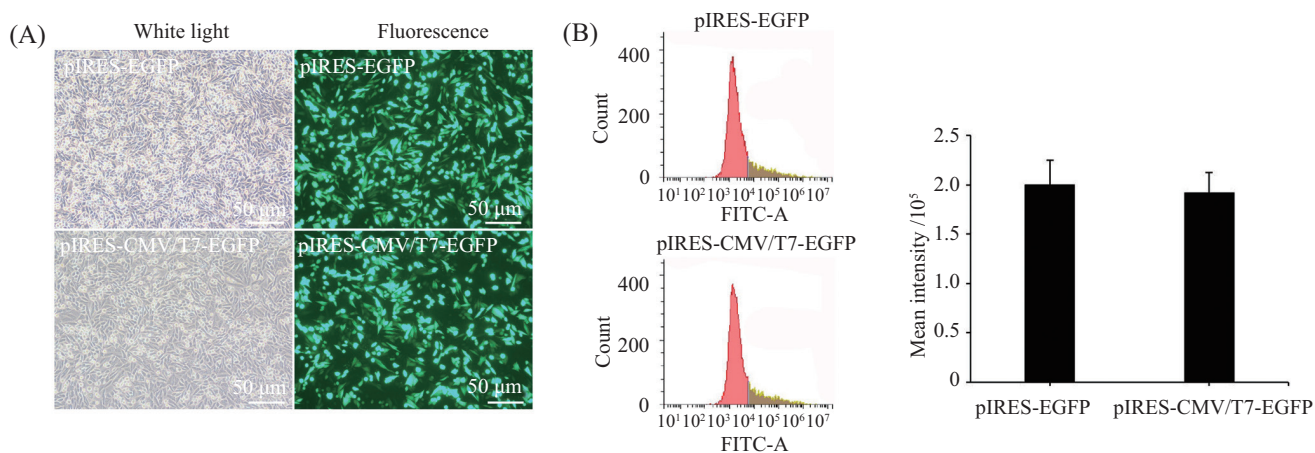


A: 荧光显微镜下eGFP的表达; B: Western blot检测eGFP的表达, 1: pIRES-EGFP; 2: pIRES-CMV/T7-EGFP。

A: expression of eGFP was observed by fluorescent microscope; B: Western blot results of eGFP expression. Line 1: pIRES-EGFP; Line 2: pIRES-CMV/T7-EGFP.

图3 大肠杆菌BL21中eGFP的表达

Fig.3 Expression of eGFP in *E. coli* BL21

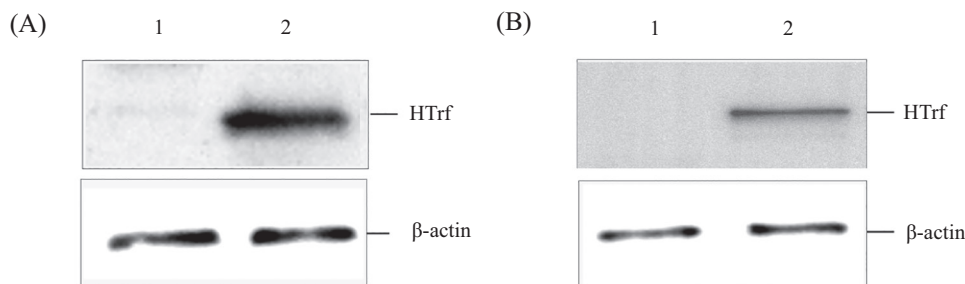


A: 荧光显微镜下eGFP的表达; B: 流式细胞术检测eGFP的表达。

A: the eGFP expression was observed by fluorescent microscope; B: eGFP expression was determined by flow cytometry.

图4 CHO细胞中eGFP的表达

Fig.4 Expression of eGFP in CHO cells



A: 大肠杆菌中HTrf的表达; B: CHO细胞中HTrf的表达。1: 对照组(未转染组); 2: pIRES-CMV/T7-EGFP组。

A: expression of HTrf in *E. coli*; B: expression of HTrf in CHO cells. Line 1: control (untransfected group); Line 2: pIRES-CMV/T7-EGFP group.

图5 大肠杆菌BL21和CHO细胞中HTrf的表达

Fig.5 Expression of HTrf in *E. coli* BL21 and CHO cells

均荧光强度为 $(1.92 \pm 0.40) \times 10^5$, 转染pIRES-EGFP载体的平均荧光强度为 $(2.00 \pm 0.60) \times 10^5$ (图4B)。表明双表达载体pIRES-CMV/T7-EGFP在CHO细胞中能驱动eGFP的表达, 且表达水平与对照载体比较并无明显下降, 载体的改造并未明显影响其表达水平。

2.4 HTrf在BL21细菌和CHO细胞中的表达

细胞经无血清悬浮培养基悬浮培养7天后, 13 000 r/min离心10 min收集上清, 细菌培养6 h, 超声破碎后, 收集上清液。经Western blot检测, 结果显示, 在细胞培养上清及细菌破碎上清液中, 均检测到重组蛋白HTrf的表达(图5)。即构建的双表达载体pIRES-CMV/T7-HTrf能同时在哺乳动物细胞及BL21细菌中表达HTrf, 实验同时以未转染质粒组作为对照组。

3 讨论

在原核和真核系统中表达相同的重组蛋白, 通常需要设计不同的表达载体, 然后将含目的基因的

表达质粒分别转染或转化不同的宿主细胞, 载体的构建及鉴定过程既费时又费力, 为蛋白质的表达增添了复杂性。本研究构建的双表达载体pIRES-CMV/T7-EGFP既含有原核表达系统常用的T7启动子、核糖体结合位点和T7终止子, 又含有真核表达系统中重组蛋白表达的基本元件, 因此可以同时原核和真核表达系统中表达同种重组蛋白。其中T7启动子来源于T7噬菌体, 可以特异性结合T7 RNA聚合酶, 是大肠杆菌系统中使用最广泛的强启动子。而CMV启动子是哺乳动物细胞中常用的一种高效的驱动重组蛋白表达的启动子, 另外pIRES-CMV/T7-EGFP表达载体还包括脑心肌炎病毒的内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES)元件, IRES是可以在mRNA内部招募核糖体的一种RNA元件或一段序列, 介导不依赖帽子结构的翻译, 它允许来自一个mRNA的两个开放阅读框的翻译, 将其引入双顺反子之间, 可以介导下游顺反子不依赖帽子

结构的翻译,因此在真核表达系统中,该载体还可以介导下游顺反子新霉素磷酸转移酶基因的表达,用于筛选稳定细胞株。

将pIRES-CMV/T7-EGFP载体转染CHO细胞和转化大肠杆菌BL21,荧光显微镜下均观察到绿色荧光,表明pIRES-CMV/T7-EGFP载体在CHO细胞和大肠杆菌中均可以表达eGFP。流式细胞术分析发现,转染pIRES-EGFP和pIRES-CMV/T7-EGFP重组质粒的CHO细胞中eGFP平均荧光强度无明显差异,表明插入真核表达载体中的原核元件不影响哺乳动物细胞中重组蛋白的表达。为了进一步验证和应用该双表达载体,将报告基因eGFP替换为目的蛋白HTrf基因,转铁蛋白具有抗菌活性、营养细胞、促进生长分化等功能^[10],被广泛用于铁代谢相关疾病的诊断,与肝脏的病理生理状态也有着密切的关系。将pIRES-CMV/T7-HTrf载体分别转染CHO细胞和转化大肠杆菌BL21,通过Western blot分析发现它们均可以表达HTrf,表明构建的pIRES-CMV/T7-HTrf载体能同时在真核和原核细胞中表达HTrf蛋白。

据我们所知,关于原核真核双表达载体的报道很少,SINAH等^[11]设计的双表达载体主要用于在酵母和大肠杆菌中表达重组蛋白。MURAKAMI等^[12]设计的在大肠杆菌和哺乳动物细胞的双表达载体,其载体骨架为pIRES-puro3,只表达了报告基因eGFP和DsRed2,并无进行目的蛋白的验证,另外,此载体在哺乳动物细胞HEK293中表达时需将原核系统的表达盒酶切去除。国内研究者构建的原核真核双表达加强型绿色荧光蛋白质粒pVAXD-EGFP^[13],也是只表达了报告基因eGFP,且其使用的载体骨架pVAX1和原核启动子P_{trc}也不同于本研究的pIRES-neo载体和T7启动子。

本研究成功构建了能够同时在CHO细胞和大肠杆菌BL21中表达重组蛋白的双表达载体,减少了在两种不同表达系统中表达相同目的蛋白时载体构建所需的复杂步骤和时间。该表达载体的研发不仅拓宽了对表达载体的认识,也为研究人员提供了可用的工具和新思路。

参考文献 (References)

[1] WELLS E, ROBINSON A S. Cellular engineering for therapeutic

- protein production: product quality, host modification, and process improvement [J]. *Biotechnol J*, 2017, 12: 105.
- [2] BUDGE J D, KNIGHT T J, POVEY J, et al. Engineering of Chinese hamster ovary cell lipid metabolism results in an expanded ER and enhanced recombinant biotherapeutic protein production [J]. *Metab Eng*, 2020, 57: 203-16.
- [3] NARAYAN G, AGRAWAL A, JOSHI N, et al. Protein production and purification of a codon-optimized human NGN3 transcription factor from *E. coli* [J]. *Protein J*, 2021, 40(6): 891-906.
- [4] EBADAT S, AHMADI S, AHMADI M, et al. Evaluating the efficiency of CHEF and CMV promoter with IRES and Furin/2A linker sequences for monoclonal antibody expression in CHO cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185967.
- [5] 王稳, 王天云. CHO细胞表达系统启动子[J]. 中国生物化学与分子生物学报(WANG W, WANG T Y. Promoters used in the CHO cell expression system [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2019, 35(11): 1175-82.
- [6] ZHANG Y, GAO H, QI X, et al. Efficient molecular biological manipulations with improved strategies based on novel *Escherichia coli* vectors [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(17): 5086-95.
- [7] 汪自然, 马凡, 王杨燕, 等. 原核表达载体pET28a-3×flag-LukS-PV的构建与表达鉴定[J]. 山西医科大学学报(WANG Z R, MA F, WANG Y Y, et al. Construction and identification of prokaryotic expression vector pET28a-3×flag-LukS-PV [J]. *Journal of Shanxi Medical University*), 2020, 51(1): 5.
- [8] XU D H, WANG X Y, JIA Y L, et al. SV40 intron, a potent strong intron element that effectively increases transgene expression in transfected Chinese hamster ovary cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 4.
- [9] 赫聪慧, 李春亮, 李雪燕, 等. 解脲脲原体UPA3-0382基因原核表达载体的构建与表达分析[J]. 中国细胞生物学学报(HE C H, LI C L, LI X Y, et al. Construction and expression analysis of prokaryotic expression vector of UPA3-0382 gene [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2018, 40(8): 1376-3.
- [10] 彭健, 张耀婷, 陈杰, 等. 转铁蛋白的结构功能和潜在临床应用价值[J]. 中国现代医学杂志(PENG J, ZHANG Y T, CHEN J, et al. Structural function and potential clinical value of transferrin [J]. *China Journal of Modern Medicine*), 2017, 27(26): 56-60.
- [11] SINAH N, WILLIAMS C A, PIPER R C, et al. A set of dual promoter vectors for high throughput cloning, screening, and protein expression in eukaryotic and prokaryotic systems from a single plasmid [J]. *BMC Biotechnol*, 2012, 12: 54.
- [12] MURAKAMI M, OHBA T, MURAKAMI A M, et al. A simple and dual expression plasmid system in prokaryotic (*E. coli*) and mammalian cells [J]. *PLoS One*, 2019, 14: e0216169.
- [13] 张晓明, 焦新安, 潘志明, 等. 原核真核双表达加强型绿色荧光蛋白质粒的构建[J]. 扬州大学学报(ZHANG X M, JIAO X A, PAN Z M, et al. Characterization of a prokaryotic-eukaryotic double expression plasmid expressing enhanced green fluorescence protein [J]. *Journal of Yangzhou University*), 2003(1): 1-4,9.