

# 文昌鱼中一个 2A 肽介导的多基因表达载体构建

华俊豪 李 光 王义权\*

(厦门大学 生命科学学院 细胞应激生物学国家重点实验室 福建 厦门 361102)

**摘要:** 2A 肽(P2A)介导的多基因表达载体具有高裂解活性且上、下游基因等摩尔表达等优点,已广泛应用于动物转基因研究。文昌鱼(amphioxus)作为一种新兴的模式动物,尚无应用这种表达载体的报道,为此在 pXT7 转录系统基础上构建一个 P2A 介导的多基因表达载体。将体外转录的 P2A 介导的 mRNA 注入文昌鱼卵细胞并受精后,经激光共聚焦显微镜和蛋白质免疫印迹(Western blot)检测表明,该 mRNA 在文昌鱼胚胎中能够高效地翻译和剪切,并且在信号肽的作用下 eGFP 蛋白定位于细胞核中,而 mCherry 蛋白定位于细胞膜上,上、下游蛋白间的剪切效率达到 91%;进而构建了由文昌鱼热激蛋白基因启动子(*BbHsp70*)启动,并由 P2A 介导的多基因表达载体,实验证明其在热诱导和上、下游蛋白剪切方面均达到了预期效果。

**关键词:** 多基因表达载体; 2A 肽; 热激启动子; 共表达; 文昌鱼

中图分类号: Q 782

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2018)01-0044-06

多基因表达载体的优势在于可同时表达 2 个或多个基因,但早期常用的多基因表达载体多存在容量小,易出现上、下游基因表达失衡,蛋白活性低或所表达蛋白不能精确定位等缺陷<sup>[1]</sup>,后来研究者在 2 个目的基因间插入一段内部核糖体进入位点(IRESs),用于表达 2 个非偶联的蛋白,成功克服了表达活性低及不能精确定位等问题;然而 IRESs 与核糖体结合的亲合力不易调控,对所表达的下流蛋白活性影响较大<sup>[2]</sup>,这些因素限制了这一策略在构建多基因表达载体上的应用。近年来,一种具有自剪切功能、由 2A 肽(P2A)介导的多基因表达载体得到广泛应用,该策略避开了多基因表达时蛋白活性不高和下游基因表达量低等缺陷,是较为理想的多基因表达方法<sup>[3]</sup>。此方法通过 P2A 改变核糖体的活性,促进 P2A 的甘氨酸残基(Gly)与 tRNA-Gly 之间酯链的水解,从转录复合物上释放上游多肽的同时又推进下游多肽的翻译<sup>[4]</sup>;此外,在目的基因上游或下游插入信号肽编码序列,可使所表达的目的蛋白定位到细胞核、叶绿体、线粒体、细胞膜或胞质微管等特定位置<sup>[5]</sup>。

文昌鱼(amphioxus)隶属于脊索动物门

(Chordata)头索动物亚门(Cephalochordata),是介于无脊椎动物和脊椎动物之间的一个重要过渡类群,也是现存脊索动物门中最古老的一个类群,在研究脊椎动物起源与演化方面有十分重要的作用<sup>[6]</sup>。文昌鱼有个体小、产卵量大、体外受精、体外发育、胚胎及成体都透明而便于观察等优点,随着实验室人工繁育成功<sup>[7]</sup>、诱导产卵技术完善<sup>[8]</sup>和胚胎显微注射技术建立<sup>[9]</sup>等一系列成果的取得,其作为模式动物应用脚步正不断加快。然而现阶段以文昌鱼为材料的研究中,还不像其他模式动物那样已有各种商品化的分子工具可以直接应用,因此大大阻碍了文昌鱼作为模式动物的应用。

Kim 等<sup>[10]</sup>通过 pSYC-97 质粒(pCS2 转录系统)在 HeLa 细胞、斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎、小鼠(*Mus musculus*)肝细胞中验证了 P2A 介导的 eGFP 和 mCherry 基因表达,且上、下游蛋白剪切效率极高。由于 pCS2 转录系统在文昌鱼中表达效率不高,为此本研究基于 pXT7 转录系统合成 NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX 的 mRNA 并注入文昌鱼胚胎,验证在受精后文昌鱼体内 P2A 介导表达的 eGFP 和 mCherry 蛋白剪切效果,进而构建由文昌鱼热激蛋白基因启动子(*BbHsp70*)启动

收稿日期: 2017-02-14 录用日期: 2017-05-03

基金项目: 国家自然科学基金(31372188, 31471986, 31672246)

\* 通信作者: wangyq@xmu.edu.cn

引文格式: 华俊豪, 李光, 王义权. 文昌鱼中一个 2A 肽介导的多基因表达载体构建[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2018, 57(1): 44-49.

Citation: HUA J H, LI G, WANG Y Q. Construction of a 2A peptide-linked multicistronic expression vector for amphioxus[J]. J Xiamen Univ Nat Sci, 2018, 57(1): 44-49. (in Chinese)



<http://jxmu.xmu.edu.cn>

的 P2A 介导的多基因表达载体,为文昌鱼未来的转基因研究和基因功能分析提供有效的分子工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验中所用佛罗里达文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) 引种自游智凯博士实验室 (Institute of Cellular and Organismic Biology, Taiwan, China), 采用本实验室已建立的方法<sup>[7]</sup> 饲养,按照已报道的方法<sup>[11]</sup> 诱导产卵;实验中所用引物由厦门铂瑞生物科技有限公司合成; pSYC-97 质粒由 Kim 博士 (Chonnam National University Medical School, Republic of Korea) 提供<sup>[10]</sup>; pXT7 和 *BbHsp70*-pCAG 载体为本实验室自存; Primer Star 高保真 DNA 聚合酶、*rTaq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Kph* I 和 *Spe* I 购自 TaKaRa 公司; D2000 DNA 分子量标准购自天根生化科技 (北京) 有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和质粒纯化试剂盒购自 Omega 公司; Trans5 $\alpha$  感受态细胞购自 TransGen 公司; mMESSAGE mMACHINE T7 mRNA 合成试剂盒购自 Ambion 公司; 荧光染料 4,6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 购自 Roche 公司; RIPA 裂解液购自碧云天公司; anti-eGFP 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 羊抗鼠肌动蛋白 (actin) 单克隆抗体购自 Proteintech 公司; 辣根过氧化物酶-增强型化学发光法 (HRP-ECL) 显色底物购自 Advansta 公司。

### 1.2 质粒构建与 mRNA 合成

以含有目的片段 NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX 的质粒 pSYC-97 为 DNA 模板,按目的片段上、下游序列设计引物 eGFP-P2A-mCherry-F1 (5'-GGGG-TACCATGGCTCCAAAGAAGAAGCGT-3') 和 eGFP-P2A-mCherry-R1 (5'-GGACTAGTTCAGGAGAGCACACACTTGCA-3'), 引物设计时分别在 5'-端与 3'-端引入 *Kph* I 和 *Spe* I 黏性末端酶切位点 (下划线), 用 Primer Star 高保真 DNA 聚合酶扩增目的片段。PCR 产物经酶切后连接到 pXT7 载体上,转化 Trans5 $\alpha$  感受态细胞,菌落 PCR 筛选阳性克隆,测序验证,获得重组的 eGFP-P2A-mCherry-pXT7 质粒。类似地,将 NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX 与本实验室已有的 *BbHsp70*-pCAG 载体重组,获得 *BbHsp70*: eGFP-P2A-mCherry-pCAG 质粒。

用 *Sma* I 线性化 eGFP-P2A-mCherry-pXT7 质粒,再用 mMESSAGE mMACHINE T7 试剂盒体外转录合

成 mRNA,1.5% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳定量后分装,置于 -80 °C 冰箱中备用。

### 1.3 显微注射与胚胎培养

显微注射参照 Liu 等<sup>[8]</sup> 的方法:用 200  $\mu$ L 移液枪将文昌鱼未受精卵细胞均匀铺在涂抹多聚赖氨酸的载玻片上使其成 2~3 条平行直线,将 NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX mRNA (约 300 ng/ $\mu$ L) 和丙三醇按 7:3 (体积比) 混合后灌入注射器中,灌针完毕后用金属片开针使其达到注射要求。注射气泵充气完毕后 (注射压强 350~450 hPa) 通过操作柄将注射针调至卵细胞赤道面下方 7~8  $\mu$ m 进行显微注射 (注射时间为 0.1~0.2 s)。注射结束后立即向培养皿中滴加 5~10  $\mu$ L 精液受精,同时在另一培养皿中对同一雌性个体所产的卵细胞用同样的方法受精作为对照<sup>[8]</sup>。体视显微镜 (SZX7 型, Olympus 公司) 下观察到受精膜举起后即刻更换新鲜海水,以彻底去除过量的精液和溶解在海水中的多聚赖氨酸,同时清除显微注射时损坏的卵,然后将受精卵置于 25 °C 湿度饱和的培养箱中培养。在胚胎发育期间,荧光体视显微镜 (SZX10 型, Olympus 公司) 下观察胚胎发光情况。

注射 *BbHsp70*: eGFP-P2A-mCherry-pCAG 质粒 (约 340 ng/ $\mu$ L) 的方法同上,注射组和对照组的卵细胞在同样的条件下受精、培养,胚胎发育至原肠胚早期时 35 °C 热激 0.5 h,以诱导 *BbHsp70* 启动下游基因表达<sup>[12]</sup>,然后在胚胎发育不同时期,荧光体视显微镜下观察胚胎发光情况。

### 1.4 激光共聚焦显微观察

选取有荧光蛋白表达的胚胎在 4% (质量分数) 多聚甲醛-吗啉丙磺酸溶液 (PFA-MOPS, pH=7.4) 中室温固定 0.5 h 后,转至丙三醇中终止固定;观察前将胚胎用含 0.1% (体积分数) 吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST, pH=7.4) 洗净,再用 1  $\mu$ g/mL DAPI 染液进行细胞核染色 15 min 以勾勒胚胎轮廓;然后于 80% (体积分数) 丙三醇中,激光共聚焦显微镜 (LSM780 型, Zeiss 公司) 观察、拍照,其中观察 eGFP 的波长为 488 nm,观察 mCherry 的波长为 543 nm,观察 DAPI 的波长为 358 nm。

### 1.5 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 实验

分别收集注射组和对照组的 8 体节时期神经胚各 200 枚,经 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解液裂解,12 000 r/min 离心取上清,获得可溶性总蛋白;BCA (bicinchoninic acid) 法测定蛋白浓度,取 50 ng 总蛋白经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

移至硝酸纤维素膜,5%(质量分数)脱脂牛奶封闭;一抗杂交(anti-eGFP按1:1 000稀释),洗膜,二抗杂交(羊抗鼠 actin 按1:5 000稀释),洗膜,加 HRP-ECL 显色底物,暗室内显色.

## 2 结果与分析

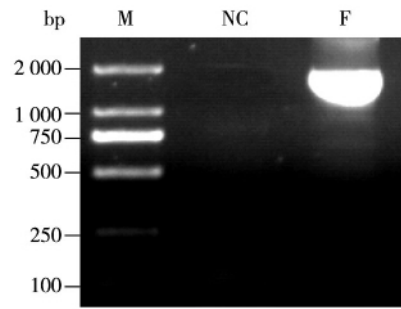
### 2.1 目的片段 PCR 扩增与质粒构建

以 pSYC-97 质粒为模板,扩增 NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX 目的片段,大小为 1 665 bp,1.5%(质量分数)琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物符合预期大小,无杂带(图 1).

目的片段经双酶切后连入 pXT7 载体中,转化感受态细胞后取阳性单克隆测序,结果证实目的片段正确插入 pXT7 载体中.用同样的方法构建 *BbHsp70:eGFP-P2A-mCherry-pCAG* 重组表达载体并经测序验证.2 个重组质粒图谱见附录图 S1(<http://jxmu.xmu.edu.cn/upload/html/20180107.html>).

### 2.2 外源 mRNA 在文昌鱼胚胎内翻译表达 eGFP 和 mCherry 蛋白

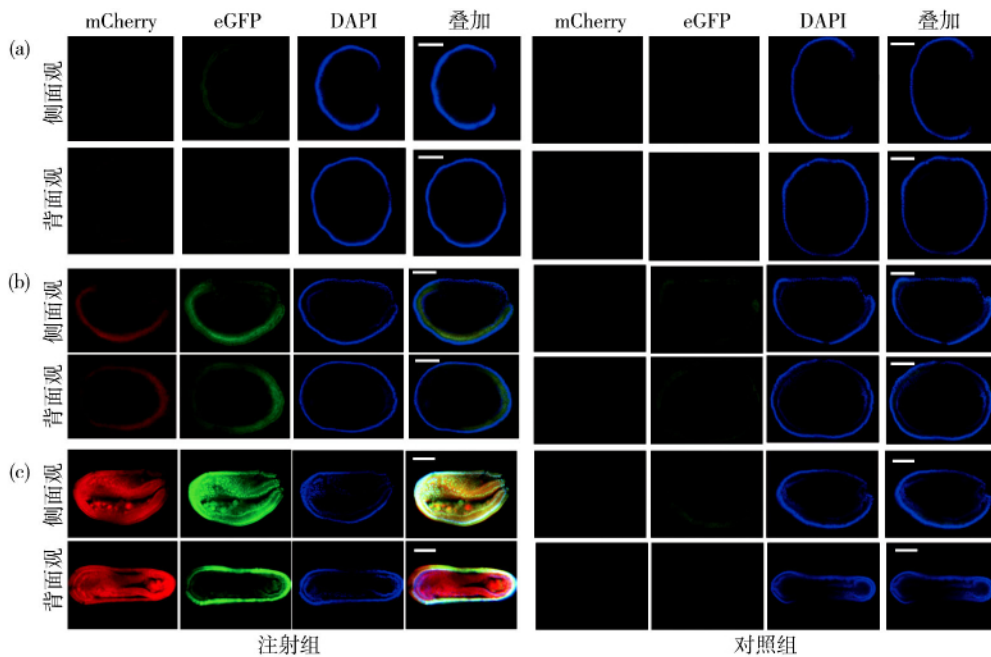
将由体外转录所得的 NLS-eGFP-P2A-mCherry-



M.D2000 DNA 分子质量标准; NC.阴性对照; F.目的片段.

图 1 PCR 扩增 NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX 目的片段  
Fig. 1 PCR amplification of NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX

CAAX mRNA 注入文昌鱼未受精卵细胞,受精后于培养箱中培养,至胚胎发育不同时期,荧光体视显微镜下选取有荧光的原肠胚中期、神经板时期和 5 体节时期的胚胎,于激光共聚焦显微镜下观察拍照,结果如图 2 所示.当胚胎发育至原肠胚中期时即可观察到 eGFP 发出的绿色荧光和 mCherry 发出的红色荧光,此时 2 种荧光均较微弱,随着胚胎发育时间的推移,2 种荧光的亮度都不断增加;而未注射的对照组中只能观察到极其微弱的绿色荧光,这是文昌鱼自身发出的本底荧光<sup>[12]</sup>,对外源 GFP 发出的绿色荧光观察影响不大.

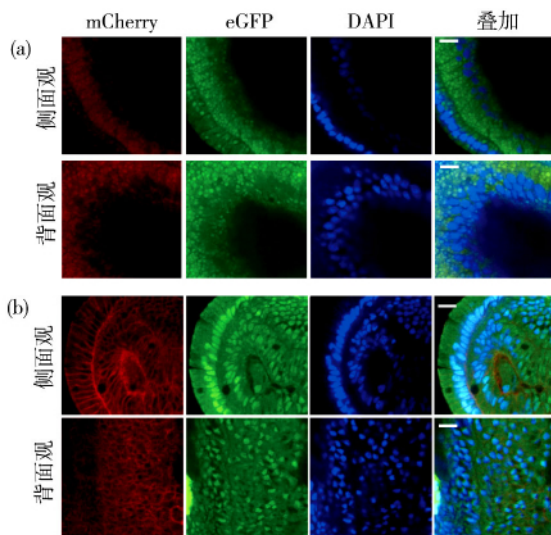


(a) 原肠胚中期; (b) 神经板时期; (c) 5 体节时期.图中标尺均为 100 μm.

图 2 NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX mRNA 注射后在文昌鱼胚胎中的表达  
Fig. 2 NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX mRNA expression in amphioxus embryos after injection

### 2.3 重组 eGFP 和 mCherry 蛋白在胚胎中的定位

如图 3 所示: 当注射 NLS-eGFP-P2A-mCherry-CAAX mRNA 的文昌鱼胚胎发育至神经板时期时, 可见较强的绿色和红色荧光(图 3(a)), 表明外源 mRNA 已翻译所编码的蛋白, 但此时这 2 种荧光在细胞中均主要分布在细胞质内, 没有明显差异; 当胚胎发育至 5 体节时期时, 可以观察到绿色荧光主要集中到细胞核内, 而红色荧光则主要集中到细胞膜上(图 3(b)), 说明该时期的胚胎中重组 eGFP 和 mCherry 蛋白已被剪切, 在各自连接的信号肽作用下分别定位到细胞核内和细胞膜上。



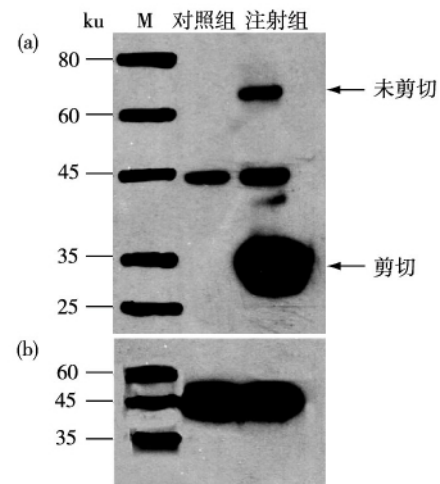
(a) 神经板时期; (b) 5 体节时期. 图中标尺均为 20  $\mu\text{m}$ .

图 3 重组 eGFP 和 mCherry 蛋白在文昌鱼胚胎细胞中的分布

Fig. 3 Distribution of recombinant eGFP and mCherry proteins in amphioxus embryonic cells

### 2.4 文昌鱼胚胎中 P2A 介导的 2 种荧光蛋白剪切效率

鉴于胚胎在 5 体节时期即可观察到上、下游蛋白被剪切开的现象, 为进一步检测 P2A 介导的上、下游蛋白在文昌鱼胚胎中的剪切效率, 收集了 mRNA 注射组和对照组 8 体节时期的胚胎各 200 枚, 提取总蛋白后用 Western blot 方法检测胚胎中 eGFP 和 mCherry 蛋白的剪切效率. 结果如图 4 所示: 在注射组 35 ku 处有已剪切的 eGFP, 70 ku 处有少量未剪切的 eGFP; 45 ku 处条带为文昌鱼内源 GFP 蛋白<sup>[12]</sup>, 相对于外源的 eGFP 少很多. 经 Image J 软件分析比较条带灰度值, P2A 剪切效率达到 91%, 略小于其在斑马鱼中 100%



(a) GFP; (b) actin. M. 蛋白质分子质量标准.

图 4 文昌鱼胚胎 8 体节时期 P2A 剪切效率  
Fig. 4 The efficiency of P2A cleavage in the 8-somite-stage embryos

的剪切效率<sup>[10]</sup>.

### 2.5 *BbHsp70*: eGFP-P2A-mCherry-pCAG 在文昌鱼胚胎中的表达

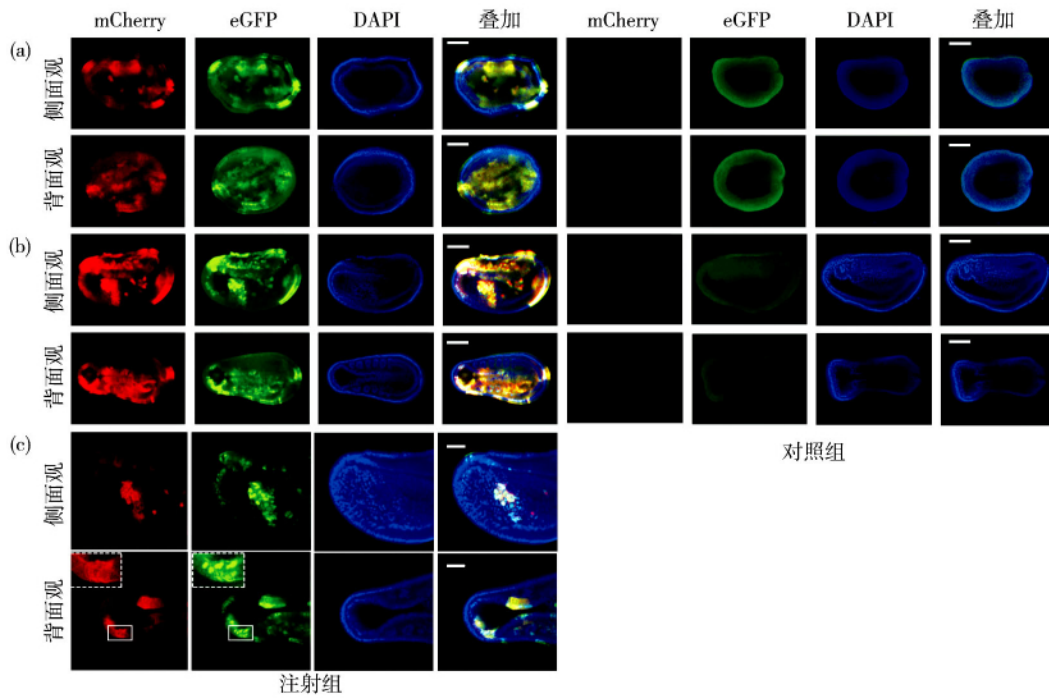
检测 *BbHsp70* 与 P2A 结合构建的表达载体 *BbHsp70*: eGFP-P2A-mCherry-pCAG 在文昌鱼胚胎中的表达效果. 结果如图 5 所示: 当胚胎发育至神经板时期, *BbHsp70* 即可很好地启动下游 P2A 连接的融合蛋白表达; 待胚胎发育至 5 体节时期, eGFP 和 mCherry 蛋白已分别定位到细胞核内和细胞膜上。

## 3 讨论

头索动物文昌鱼是研究脊椎动物起源进化和发育的一种重要模式动物. 虽然文昌鱼的分子生物学研究中已有胚胎显微注射技术<sup>[9]</sup>、*BbHsp70* 介导的过表达技术<sup>[13]</sup>、Talen 介导的基因敲除技术<sup>[14]</sup>及 Tol2 转座酶系统介导的基因敲入技术<sup>[15]</sup>, 但分子生物学研究的技术手段依然缺乏, 从而大大阻碍了文昌鱼作为模式动物的应用。

在转基因动物的构建过程中, 为方便目标基因的检测, 常需要以 GFP、RFP 和 YFP 等示踪荧光蛋白与目标基因所编码的蛋白同时表达, 这就依赖于一个介导多基因同时表达的载体. 目前构建多顺反子载体的方法主要包括: 构建多启动子 (multiple promoters) 表达载体、构建剪切 (splicing) 载体、表达融合基因 (fusion gene) 以及基因之间以 IRESs 或自剪切 P2A 连

<http://jxmu.xmu.edu.cn>



(a) 神经板时期 标尺为 100 μm; (b) 5 体节时期 标尺为 100 μm; (c) 5 体节时期 标尺为 50 μm.

图 5 共聚焦显微镜观察 *BbHsp70* 启动的下游荧光蛋白表达

Fig. 5 Observation of the fluorescent protein expression initiated by *BbHsp70* under a confocal microscope

接等<sup>[16]</sup>.其中 P2A 具有序列短,高裂解活性,上、下游基因表达量相同的优点<sup>[3]</sup>;并且已经证实如果需要 3 个以上基因同时表达时,可以选择不同属的 P2A 打破序列同源性以协助维持外源基因插入的稳定性<sup>[17]</sup>.

在将前人报道的 P2A 介导的多基因表达载体<sup>[10]</sup>引入文昌鱼转基因实验研究时,发现该载体在文昌鱼中的工作效率极低,故本研究用该系统中的 P2A 与本实验室此前已构建的 *BbHsp70*-pCAG 载体重组,重构了一个由源于文昌鱼热激启动子启动的新载体 *BbHsp70*: eGFP-P2A-mCherry-pCAG.结果显示:由 P2A 连接的上、下游蛋白在文昌鱼体内的剪切效率达到 91%,并可分别定位于细胞核内和细胞膜上;此外,通过热诱导方式启动基因表达,不但表达效率高,而且可实现在特定时间启动基因表达.由此,本研究成功构建了一个 P2A 介导的多基因表达载体,为文昌鱼研究提供了一种高效、可控并能同时平衡表达 2 个蛋白的应用体系.

参考文献:

[1] CHINNASAMY D ,MILSOM M D ,SHAFFER J ,et al. Multi-cistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at lim-

iting MOI[J].Virology Journal 2006 3( 1) : 1-16.  
 [2] KOMAR A A ,HATZOGLOU M.Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: the mystery of their existence [J]. Journal of Biological Chemistry 2005 280( 5) : 23425.  
 [3] SZYMCZAKWORKMAN A L ,VIGNALI K M ,VIGNALI D A. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors [J]. Cold Spring Harbor Protocols , 2012 2012( 2) : 199-204.  
 [4] DONNELLY M L L ,LUKE G ,MEHROTRA A ,et al. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein " cleavage" mechanism indicates not a proteolytic reaction ,but a novel translational effect: a putative ribosomal " skip" [J].Journal of General Virology 2001 82( 5) : 1013-1025.  
 [5] YAN J ,WANG H ,XU Q ,et al.Signal sequence is still required in genes downstream of " autocleaving" 2A peptide for secretory or membrane-anchored expression [ J]. Analytical Biochemistry 2010 399( 1) : 144-146.  
 [6] BERTRAND S ,ESCRIVA H.Evolutionary crossroads in developmental biology: amphioxus [J].Development 2011 ,138 ( 22) : 4819-4830.  
 [7] ZHANG Q J ,SUN Y ,ZHONG J ,et al.Continuous culture of two lancelets and production of the second filial generations in the laboratory [J].J Exp Zool B Mol Dev Evol 2007 308 ( 4) : 464-472.

- [8] LI G ,YANG X ,SHU Z H ,et al. Consecutive spawnings of Chinese amphioxus *Branchiostoma belcheri* in captivity [J]. PLoS One 2012 ,7( 12) : e50838.
- [9] LIU X ,LI G ,FENG J ,et al. An efficient microinjection method for unfertilized eggs of Asian amphioxus *Branchiostoma belcheri* [J]. Development Genes and Evolution ,2013 , 223( 4) : 269-278.
- [10] KIM J H ,LEE S R ,LI L H ,et al. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines zebrafish and mice [J]. PLoS One 2011 6 ( 4) : e18556.
- [11] LI G ,SHU Z ,WANG Y. Year-round reproduction and induced spawning of Chinese amphioxus , *Branchiostoma belcheri* in laboratory [J]. PLoS One 2013 8( 8) : e75461.
- [12] LI G ,ZHANG Q J ,ZHONG J ,et al. Evolutionary and functional diversity of green fluorescent proteins in cephalochordates [J]. Gene 2009 446( 1) : 41-49.
- [13] LI D ,LI G ,WANG K ,et al. Isolation and functional analysis of the promoter of the amphioxus *Hsp70a* gene [J]. Gene , 2012 510( 1) : 39-46.
- [14] 王慧 ,李光 ,王义权.文昌鱼 *Hedgehog* 基因敲除和突变体表型分析 [J]. 遗传 2015 37( 10) : 1036-1043.
- [15] KOZMIKOVA I ,KOZMIK Z. Gene regulation in amphioxus: an insight from transgenic studies in amphioxus and vertebrates [J]. Marine Genomics 2015 24: 159-166.
- [16] KERRIGAN J J ,XIE Q ,AMES R S ,et al. Production of protein complexes via co-expression [J]. Protein Expression and Purification 2011 75( 1) : 1-14.
- [17] TIAN Y ,LI W ,WANG L ,et al. Expression of 2A peptide mediated tri-fluorescent protein genes were re-gulated by epigenetics in transgenic sheep [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications , 2013 , 434 ( 3) : 681-687.

## Construction of a 2A Peptide-linked Multicistronic Expression Vector for Amphioxus

HUA Junhao ,LI Guang ,WANG Yiquan \*

( State Key Laboratory of Cellular Stress Biology ,School of Life Sciences ,Xiamen University ,Xiamen 361102 ,China)

**Abstract:** The multicistronic expression vector mediated by 2A peptide ( P2A) possesses advantages such as high cleavage efficiency ,equimolar amounts of upstream and downstream gene expression ,so that it has been widely applied to animal transgenic research. However up to date ,no multicistronic expression vector is available for the application in amphioxus ,a promising new model animal for evolutionary development study ,therefore we constructed a multicistronic expression vector harboring P2A based on pXT7 transcription system. After microinjecting mRNA transcribed *in vitro* into amphioxus eggs and fertilization ,we observed the embryos under a laser confocal microscope and analyzed protein expression using Western blot assay. The results showed that the mRNA was translated and the P2A mediated protein was cleaved effectively in amphioxus embryos. Moreover ,the eGFP protein was targeted to nucleus and mCherry protein to cell membrane under the role of corresponding signal peptides. The separation efficiency of the two proteins was about 91%. Furthermore ,we constructed a heat-shock protein gene promoter ( *BbHsp70*) mediated P2A multicistronic expression vector ,and the experiments showed the efficiency of gene expression and protein separation achieved the desired results.

**Key words:** multicistronic expression vector; 2A peptide; heat-shock promoter; co-expression; amphioxus