

王文旭, 郁 飞. 红色荧光蛋白融合表达载体的构建和蛋白质细胞内定位研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(8): 52–55.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.08.011

# 红色荧光蛋白融合表达载体的构建和蛋白质细胞内定位研究

王文旭, 郁 飞

(西北农林科技大学生命科学学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100)

**摘要:**为进一步研究目的蛋白质在细胞内的定位, 构建融合了红色荧光蛋白 mCherry 或 mScarlet 的表达载体。选取 *VTI12*、*RabD2a*、*ARA7* 以及 *SYP61* 等 4 个定位基因来构建红色荧光蛋白融合表达载体。根据 TAIR 数据库中相关蛋白质的基因序列设计引物, 通过 PCR 技术扩增序列并将其分别连接到已制备好的红色荧光蛋白融合表达载体上, 制备得到质粒后转化入原生质体进行瞬时表达。结果表明, 成功构建了 pUC18HE-mCherry-VTI12、pUC18HE-mCherry-RabD2a、pUC18-mScarlet NT-ARA7 以及 pUC18-mScarlet NT-SYP61 等 4 个红色荧光蛋白融合表达载体, 并且成功在拟南芥叶肉细胞原生质体中瞬时表达。

**关键词:**红色荧光蛋白; 融合表达载体; 亚细胞定位; 瞬时表达

**中图分类号:** Q943.2; S188+.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)08-0052-04

荧光蛋白作为一种分子标签, 在细胞内蛋白质的定位以及动态示踪等方面有着广泛的应用。相较于其他分子标记, 荧光蛋白更加易于和目的蛋白融合, 对活细胞毒性小, 应用更加便利。绿色荧光蛋白 (GFP) 是最早被发现的荧光蛋白, 由日本著名化学家、海洋生物学家下村修从维多利亚水母中首次发现<sup>[1]</sup>。GFP 通过一系列体外分子进化, 发展出了多种荧光波长不同、发光强度更高的荧光蛋白, 如 EGFP (增强型绿色荧光蛋白)、BFP (蓝色荧光蛋白)、CFP (青色荧光蛋白) 等<sup>[2]</sup>。这些荧光蛋白极大地丰富了相应的试验体系和技术, 但由于这些荧光蛋白的发射波长均在 440~529 nm<sup>[3]</sup>, 容易激发胞内物质产生荧光, 导致成像时背景较高, 限制了这些荧光蛋白的应用。

1999 年 Matz 等报道了第一个红色荧光蛋白 DsRed (drFP583)<sup>[4]</sup>。DsRed 自香菇珊瑚中分离得到, 具有激发和发射波长较长、细胞内成像背景较低等优点, 但在实际应用时常会以二聚体或四聚体形式出现, 对组织、器官和细胞有一定的毒性, 且在空间上限制了一些蛋白质的功能, 从而影响了对目的蛋白的标记<sup>[5-7]</sup>。为解决 DsRed 的上述缺陷, 在随后的研究过程中, Bevis 等应用多种体外分子进化的手段, 对 DsRed 进行了一系列的改造, 最终得到了稳定地以单体形式存在的红色荧光蛋白 mRFP<sup>[8-9]</sup>。mRFP 有波长较长、半成熟时间较短、不易聚合等一系列优点, 大大拓展了红色荧光蛋白的应用领域。Shaner 等在 mRFP 的基础上, 对其发色基团附近的位点进行突变, 经过多轮突变、筛选、加帽加尾等过程得到了 mHoneydew、mBanana、mOrange、mTangerine、mStrawberry 及

mCherry 等一系列波长不同的单体红色荧光蛋白<sup>[10]</sup>。2017 年, Bindels 等以 mCherry 为模板, 经过多轮突变改造得到了一个新的荧光蛋白 mScarlet。这一新的单体红色荧光蛋白在发光强度、波长、荧光寿命等方面均有更优的性能<sup>[11]</sup>。

本研究拟通过构建荧光蛋白融合表达载体, 将其转入原生质体过表达的方式, 运用激光共聚焦显微技术来进行目的蛋白的胞内定位研究。笔者选用 pUC18HE-mCherry 和 pUC18HE-mScarlet NT 2 个不同的红色荧光蛋白表达载体, 选取 *VTI12*、*RabD2a*、*ARA7* 以及 *SYP61*<sup>[12]</sup> 作为定位基因, 来构建 4 个红色荧光蛋白融合表达载体。将构建好的红色荧光蛋白融合表达载体转入野生型拟南芥叶肉细胞原生质体中过表达, 之后观察细胞中融合红色荧光表达蛋白的定位情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间与地点

试验于 2017 年 5—8 月在西北农林科技大学生命科学学院郁飞实验室进行。

### 1.2 材料

1.2.1 植株、细菌和载体 野生型拟南芥植株 (*Col-0*), 由西北农林科技大学生命科学学院贾敏博士提供; 大肠杆菌 TOP10、红色荧光蛋白融合表达载体 pUC18HE-mCherry 和 pUC18-mScarlet NT, 由西北农林科技大学生命科学学院植物分子遗传实验室保存。

1.2.2 主要工具酶与试剂 限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶、牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP) 等均购自 TaKaRa 公司; T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 Thermo Fisher 科技 (中国) 有限公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 金牌超量无内毒素质粒大提试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 3 种红色荧光蛋白的同源性比对 在美国国立生物

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31570267)。

作者简介: 王文旭 (1991—), 女, 陕西西安人, 硕士研究生, 主要从事拟南芥内膜系统蛋白质定位研究。E-mail: 375214077@qq.com。

通信作者: 郁 飞, 博士, 教授, 主要从事植物分子遗传与发育生物学研究。E-mail: flyfeiyyu@gmail.com。

技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, 简称 NCBI) 数据库中搜索出 mRFP、mCherry 和 mScarlet 的 DNA 序列。将这 3 条 DNA 序列以 Fasta 格式输入至 NCBI 数据库中的 ORFfinder, 翻译为蛋白序列。将 mRFP、mCherry 和 mScarlet 的蛋白序列以 Fasta 格式输入 EMBL 数据库的程序 Clustal Omega, 之后再使用 ExPasy 上的 Box Shade 工具修饰所得数据, 得到序列对比结果。对比结果中黑色部分代表这 3 个蛋白一级结构的相应位置上完全相同的氨基酸残基, 灰

色部分代表部分相同的氨基酸残基, consensus 中星号 ( \* ) 对应完全相同的氨基酸残基序列, 点号 ( . ) 对应部分相同的氨基酸残基序列。

1.3.2 融合表达载体的选取和构建 选取 *VTII2*、*RabD2a*、*ARA7* 以及 *SYP61* 4 个定位基因来构建红色荧光蛋白融合表达载体。根据 TAIR 网站公布的拟南芥 *VTII2* 基因和 *RabD2a* 基因的序列设计引物扩增这 2 个基因的 CDS (蛋白质编码区) 序列, 引物序列如表 1 所示。

表 1 试验所用引物

基因	引物(5'→3')	备注
<i>VTII2</i> (Atlg26670)	26670 <i>Bam</i> H I F:CATGGATCCATGAGCGACGTATTTGAAGGG	GGATCC 为 <i>Bam</i> H I 酶切位点
	26670 <i>Xho</i> I R:CATCTCGAGTTAATGAGAAAGCTTGATGA	CTCGAG 为 <i>Xho</i> I 酶切位点
<i>RabD2a</i> (Atlg02130)	02130 <i>Bam</i> H I F:CATGGATCCATGAATCCTGAGTACGACTATC	GGATCC 为 <i>Bam</i> H I 酶切位点
	02130 <i>Xho</i> I R:CATCTCGAGTCAAGTTGAGCAGCAGCCGTTT	CTCGAG 为 <i>Xho</i> I 酶切位点

表 1 中引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。以野生型拟南芥 cDNA 为模板, 分别用上述引物进行 PCR 扩增。将 PCR 产物进行回收后与融合红色荧光蛋白表达载体 pUC18HE - mCherry 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切时在载体中加入 1  $\mu$ L CIAP (牛小肠碱性磷酸酶, 用于防止载体自连); *ARA7* 以及 *SYP61* 在笔者所在实验室前期工作中已经合成, 故直接与表达载体 pUC18 - mScarlet NT 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切即可。将酶切后的片段与载体用 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶于 22  $^{\circ}$ C 恒温器中反应 2 h, 将得到的连接产物与大肠杆菌 TOP10 进行转化后涂布于抗性 LB 培养基上进行抗性筛选, 利用碱性裂解法提取质粒进行酶切验证, 将连接正确的质粒送至华大基因生物科技 (深圳) 有限公司进行序列测定。测定序列无误后, 用金牌无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒, 以获得较高浓度的质粒 (>1 mg/ $\mu$ L)。将得到的质粒保存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱内。

1.3.3 原生质体的制备与瞬时转化 首先配制酶解液: 向酶解缓冲液中加入 1% 纤维素酶 R10 和 0.2% 果胶酶 R10, 然后将酶解液于 55  $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 以促进纤维素酶和离析酶的溶解并且抑制蛋白酶的活性; 待水浴后溶液冷却至室温, 加入 1% 的 1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液、0.035% 的  $\beta$ -巯基乙醇和 0.1% 的 BSA (牛血清白蛋白)。将配制好的酶解液用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤以除去溶液中的杂质。用锋利的小剪刀剪取 3~4 周龄的野生型拟南芥叶片, 保留较长的叶柄, 且选取平展嫩绿的叶片。将叶片用清水轻柔冲洗干净后用锋利的刀片切成约 1 mm 宽的细条, 然后将切好的叶片浸没在适量酶解液中。于真空干燥罐中抽气 30 min, 使酶解液充分浸润叶片。随后在黑暗环境中 40 r/min 水平摇晃酶解混合液 90 min, 90 r/min 水平摇晃 1 min 以释放酶解产生的球状原生质体, 此时酶解液呈绿色。向酶解液中加入 10 mL W5 溶液 (含 154 mmol/L NaCl 9.0 g, 125 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  18.38 g, 5 mmol/L KCl 0.372 g, 2 mmol/L MES 0.42 g, 用  $\text{H}_2\text{O}$  定容至 1 L。用 1 mol/L KOH 调 pH 值至 5.7, 121  $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min, 4  $^{\circ}$ C 冷藏保存), 轻柔摇晃后用 35~75  $\mu$ m 的尼龙膜将酶解液过滤到圆底离心管中。4  $^{\circ}$ C 低温 300 r/min 水平离心 5 min, 除去上层清液后用 10 mL 冰预冷的 W5 溶液轻柔重悬管底细胞。如此再次重悬细胞 1 次后将混合液冰浴 40 min。冰浴时可吸取少量细胞镜检, 检查原生质体是否健康完整。冰浴后将细

胞悬浮液于 4  $^{\circ}$ C 低温 300 r/min 水平离心 5 min, 用适量 MMg 溶液 (含 0.4 mol/L 甘露醇 72.86 g, 15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  3.05 g, 4 mmol/L MES [2 - (N - 吗啡咻) 乙磺酸] 0.58 g, 用  $\text{H}_2\text{O}$  定容至 1 L。用 1 mol/L KOH 调 pH 值至 5.7, 121  $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min, 4  $^{\circ}$ C 冷藏保存) 重悬细胞。吸取 200  $\mu$ L 悬浮液于 2 mL 离心管中, 加入约 30  $\mu$ L (质粒浓度 1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 已制备好的质粒和 230  $\mu$ L 的 40% PEG (聚乙二醇) 溶液, 轻柔混匀后室温孵育 25 min。之后加入 800  $\mu$ L W5 溶液, 轻柔混匀后于 4  $^{\circ}$ C 低温 500 r/min 水平离心 5 min, 除去上层 PEG 混合液。加入 1 mL W5 溶液重悬细胞于 6 孔板中, 置于 22  $^{\circ}$ C 恒温培养基中 40 r/min 水平摇床上黑暗孵育 8~16 h。孵育之后在激光共聚焦显微镜下观察红色荧光蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 3 种红色荧光蛋白的同源性比对及空间结构预测

由蛋白序列比对的结果 (图 1) 可以看出 mRFP、mCherry 和 mScarlet 3 种红色荧光蛋白序列的分子体外进化过程, 以及在体外分子进化的过程中, 由 mRFP 到 mCherry 以及到 mScarlet 所进行的加帽、加尾和点突变等改造。

2.2 融合表达载体的构建

2.2.1 PCR 扩增结果与酶切 在 TAIR 网站查找获得拟南芥 *VTII2* 基因和 *RabD2a* 基因的 cDNA 序列, 以野生型拟南芥 *Col-0* cDNA 为模板, 用带有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的引物, 分别扩增出与预期 669 bp 大小吻合的条带以及预期 612 bp 大小吻合的条带 (图 2)。

回收目的条带并将目的片段与融合红色荧光蛋白表达载体 pUC18HE - mCherry 均用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切后产生约 669 bp 大小的 *VTII2* 的目的条带、约 612 bp 大小的 *RabD2a* 的目的条带以及 4.7 kb 大小的载体条带 (图 3), 回收酶切片段。

将笔者所在实验室前期工作中已经合成的 *ARA7* 以及 *SYP61* 与融合红色荧光蛋白表达载体 pUC18 - mScarlet NT 均用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切后产生约 603 bp 大小的 *ARA7* 的目的条带、约 738 bp 大小的 *SYP61* 的目的条带以及 4.5 kb 大小的载体条带 (图 4), 回收酶切片段。

2.2.2 红色荧光蛋白融合表达载体的鉴定 将带黏性末端的目的片段与载体相连, 取阳性克隆提取质粒, 得到质粒后进

图1 mRFP、mCherry 和 mScarlet 的蛋白质序列比对

M—DNA 分子质量标准; 1~2—PCR 得到的 *VtII2* (669 bp) cDNA 片段; 3~4—PCR 得到的 *RabD2a* (612 bp) cDNA 片段

图2 *VTI12* 基因和 *RabD2a* 基因的 PCR 扩增

M—DNA 分子质量标准; 1~2—酶切得到的 *VtH2* (669 bp) cDNA 片段; 3~4—酶切得到的 *RabD2a* (612 bp) cDNA 片段; 5~6—酶切得到的 pUC18HE-mCherry 载体片段

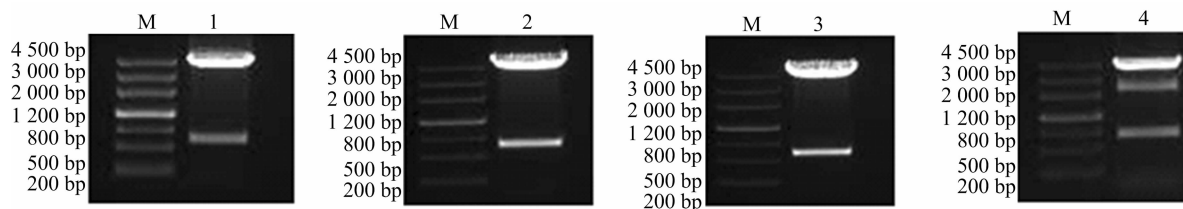
图3 VT12和*RabD2a*以及 pUC18HE-mCherry 的*Bam*H I 和*Xho*I 双酶切结果

M—DNA 分子质量标准; 1~2—酶切得到的*ARA7* (603 bp) cDNA 片段; 3~4—酶切得到的*SYP61* (738 bp) cDNA 片段; 5~6—酶切得到的 pUC18-mScarlet NT 载体片段

图4 *ARA7*和*SYP61*以及 pUC18-mScarlet NT的*Bam* H | 和*Xho* | 双酶切结果

### 2.3 原生质体细胞瞬时表达红色荧光蛋白的结果

将上述构建好的 4 个红色荧光蛋白融合表达载体瞬时转化入已制备好的拟南芥叶肉细胞原生质体中进行过表达,之后进行共聚焦照相,得到的结果如图 8 所示。由图 8 可知, pUC18 HE - NmCherry - VTI12、pUC18 HE - NmCherry -



M—DNA 分子质量标准；1—pUC18HE-NmCherry-VTI12 质粒的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果；2—pUC18HE-NmCherry-RabD2a 质粒的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果；3—pUC18-mScarlet NT-ARA7 质粒的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果；4—pUC18-mScarlet NT-SYP61 质粒的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果

图5 本研究构建质粒的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定结果

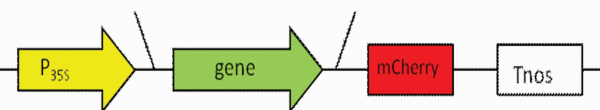
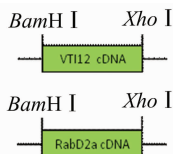


图6 pUC18HE-NmCherry-VTI12 和 pUC18HE-NmCherry-RabD2a 融合表达载体

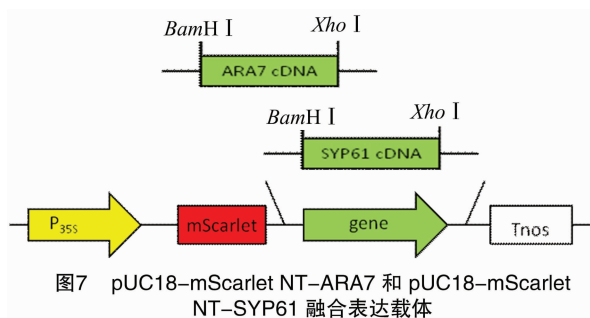


图7 pUC18-mScarlet NT-ARA7 和 pUC18-mScarlet NT-SYP61 融合表达载体

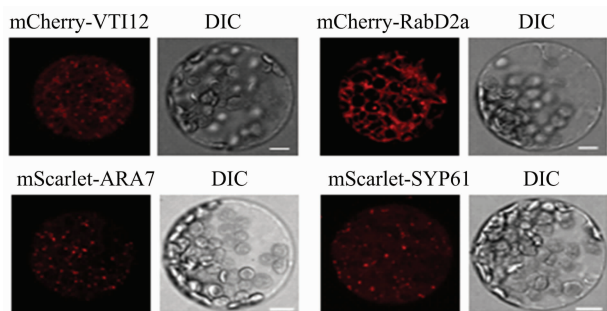


图8 原生质体细胞瞬时表达红色荧光蛋白的结果

RabD2a、pUC18-mScarlet NT-ARA7 以及 pUC18-mScarlet NT-SYP61 均可在原生质体叶肉细胞中很好地表达。

### 3 讨论

红色荧光蛋白作为一种分子标签,在蛋白质的细胞内定位等方面有着广阔的应用前景。与其他胞内蛋白质定位的方法<sup>[13]</sup>相比,构建红色荧光蛋白融合表达载体具有耗时短、易于观察目的蛋白、操作简便、不影响细胞活性等优点。本试验构建了 4 个红色荧光蛋白融合表达载体并在原生质体中瞬时表达,结果表明,pUC18HE-NmCherry-VTI12、pUC18HE-

NmCherry-RabD2a、pUC18-mScarlet NT-ARA7 以及 pUC18-mScarlet NT-SYP61 等 4 个红色荧光蛋白融合表达载体都可以在拟南芥叶肉细胞原生质体中很好的表达,从而指示目的蛋白在细胞中的定位和分布。

### 参考文献:

- [1] Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein [J]. *Gene*, 1992, 111 (2): 229-233.
- [2] Ehrenberg M, 罗文新, 夏宇邵. 绿色荧光蛋白——发现、表达和发展 [J]. *生物物理学报*, 2008, 24 (6): 422-429.
- [3] 吴 瑞, 张树珍. 绿色荧光蛋白及其在植物分子生物学中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2005, 3 (2): 240-244.
- [4] Matz M V, Fradkov A F, Labas Y A, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17 (10): 969-973.
- [5] Baird G S, Zacharias D A, Tsien R Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral [J]. *PNAS*, 2000, 97 (22): 11984-11989.
- [6] Yarbrough D, Wachter R M, Kallio K, et al. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0 Å resolution [J]. *PNAS*, 2001, 98 (2): 462-467.
- [7] Wall M A, Socolich M, Ranganathan R. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed [J]. *Nature Structural Biology*, 2000, 7 (12): 1133-1138.
- [8] Bevis B J, Glick B S. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed) [J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20 (1): 83-87.
- [9] Campbell R E, Tour O, Palmer A E, et al. A monomeric red fluorescent protein [J]. *PNAS*, 2002, 99 (12): 7877-7882.
- [10] Shaner N C, Campbell R E, Steinbach P A, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein [J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22 (12): 1567-1572.
- [11] Bindels D S, Haarbosch L, van Weeren L, et al. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging [J]. *Nature Methods*, 2017, 14 (1): 53-56.
- [12] Geldner N, Denervaud-Tendon V, Hyman D L, et al. Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set [J]. *Plant Journal*, 2009, 59 (1): 169-178.
- [13] 范小燕, 杨 柳, 季英华, 等. 黄瓜绿斑花叶病毒 CP 基因克隆及亚细胞定位 [J]. *江苏农业学报*, 2018, 34 (2): 281-287.