

# Kozak 序列+4G 提高绿色荧光蛋白在 HEK293 细胞中的表达

杜明梅, 叶玲, 刘建伟, 刘静, 杨立娜

中国人民解放军总医院老年医学研究所, 北京 100853

**摘要:** 构建含不同 Kozak 序列的绿色荧光蛋白(GFP)基因真核表达载体, 并检测它们在 HEK293 细胞中的表达差异。通过设计突变的 PCR 引物改变目的基因 GFP 的 Kozak 序列, +4 位碱基分别为 A 和 G, 且不改变氨基酸编码, 将 PCR 扩增的 GFP 片段与载体 pcDNA3.1 进行酶切、连接、转化、鉴定。成功构建的 pHGFP-A, pHGFP-G 质粒采用脂质体法转染 HEK293 细胞, 荧光显微镜下观察绿色荧光表达, 流式细胞术检测目的蛋白 GFP 的荧光表达阳性率, Western blot 检测目的蛋白 GFP 的表达。构建的两质粒均能有效转染 HEK293 细胞, 其中流式细胞术分析显示: pHGFP-A 组 GFP 阳性率约为 15%, pHGFP-G 组 GFP 阳性率约为 45%; Western blot 显示 pHGFP-G 的 GFP 表达量约为 pHGFP-A 的 GFP 表达量 3.87 倍。结果表明, Kozak 序列+4G(-3 位为嘌呤碱基时)在蛋白表达中发挥重要作用, 可以使绿色荧光蛋白 GFP 在 HEK293 细胞中的表达量提高约 4 倍。

**关键词:** Kozak 序列, 绿色荧光蛋白, Western blot

## Enhancement of GFP Expression by Kozak Sequence +4G in HEK293 Cells

Mingmei Du, Ling Ye, Jianwei Liu, Jing Liu, and Lina Yang

*Institute of Geriatrics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China*

**Abstract:** To investigate the effect of Kozak sequence (+4A or +4G) on expression of green fluorescent protein (GFP) gene in HEK293 cells. The eukaryotic expression vectors containing GFP gene with different Kozak sequence (+4A or +4G) were constructed by classic DNA recombination methods, including PCR, enzyme digestion, ligation, transformation, identification, *et al.* Two different Kozak sequences (+4A or +4G) were obtained through PCR with different mutagenic primers. The right recombinant plasmids pHGFP-A and pHGFP-G were transfected into HEK293 cells by liposome-mediated gene transfer method. The expression level of GFP was observed by fluorescent microscope, flow cytometry and Western blot. The flow cytometry revealed that the expression levels of GFP fluorescence in pHGFP-A and pHGFP-G transfected cells were about 15% and 45%, respectively. Western blot showed the specific bands of about 27 kD (GFP) both in pHGFP-G and pHGFP-A sample lanes; and the GFP expression density of pHGFP-G was about 3.87-fold as that of pHGFP-A by ImageJ software analysis. These results indicated that the +4G in Kozak sequence (when -3 site is purine base pair) plays an important role in GFP protein translation, which enhances the GFP expression up to 4-fold in HEK293 cells.

**Keywords:** Kozak sequence, green fluorescent protein, Western blot

**Received:** July 23, 2007; **Accepted:** October 16, 2007

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30472172).

**Corresponding author:** Ling Ye. Tel: +86-10-66937373; E-mail: lye301@yahoo.com.cn

国家自然科学基金资助 (No. 30472172)。

在应用基因克隆技术对基因功能及其表达调控机理进行研究时,如何使目的蛋白得到高效表达是研究人员关注的重要问题。在真核细胞诸多影响蛋白翻译表达的因素中, Kozak 序列 GCCA/GCCAUGG 的作用尤为重要<sup>[1]</sup>(以起始密码子 AUG 为准, A 为+1, 其上游 C 为-1, 下游 G 为+4, 以此类推)。对大量脊椎动物蛋白 mRNAs 的天然序列分析<sup>[2]</sup>及胰岛素前体蛋白的基因点突变实验<sup>[3]</sup>均已证实了 Kozak 序列中-3 位 A/G(嘌呤碱基)能明显上调蛋白的表达;但对+4G 上调蛋白表达结论不十分明确,尤其在-3 位嘌呤碱基存在时,一般认为+4G 对上调蛋白表达作用甚微或没有上调作用。我们在课题实践中发现所构建的重组质粒 pHGFP-A(Kozak 序列 GCCGCCATGA)瞬时转染 HEK293 细胞,虽多次改变转染条件, GFP 的表达量仍较低。为验证是否是因+4 位碱基为 A 所致,随即又按照 Kozak 序列原则构建了+4 位碱基为 G 的重组质粒 pHGFP-G,并转染 HEK293 细胞,发现 GFP 的表达量明显上升。本文研究了在-3 位为嘌呤碱基 G 时 Kozak 序列+4G 对 GFP 蛋白表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌种

pcDNA3.1 真核表达载体为 Invitrogen 公司产品; *E. coli* DH<sub>5</sub>α 感受态细胞购自博大泰克公司;含有目的蛋白 GFP 的质粒 pGFP 由本实验室保存; HEK293 细胞系由解放军总医院细胞生物学实验室赠送。

#### 1.1.2 试剂

DMEM 培养基由 Gibco 公司生产;胎牛血清购自鼎国生物技术公司; Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; PVDF 膜为 Osmonics 公司产品;兔源抗 GFP 抗体, HRP-羊抗兔 IgG 为碧云天公司产品;鼠源抗 β-Actin 抗体, HRP-羊抗鼠 IgG 为 Santa Cruz 公司产品;引物由 Invitrogen 公司合成;其余试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物合成和 PCR 突变扩增

采用引物设计突变的方法,将 Kozak 序列+4 位分别引入 A(引物 Y65)和 G(引物 Y77),用两对不同的引物 Y65/ Y74, Y77/Y74, (Y65、Y77 引入 *Eco*R I

位点, Y74 引入 *Xba* I 位点,划线部分为 Kozak 序列)以质粒 pGFP 为模板,进行 PCR 扩增,以获取目的基因 GFP 片段。PCR 反应条件均为: 95 变性 5 min; 94 50 s, 57 50 s, 72 50 s, 30 个循环; 72 延伸 7 min。引物序列如下:

Y65 5'-GTGGAATTCGCCGCCATGAGTAAA  
GGAGAAGA-3'

Y74 5'-CCTCTAGAGCCTTTGTATAGTTCAT  
CCATGC-3'

Y77 5'-GTGGAATTCGCCGCCATGGTGAGT  
AAAGGAGAAGA-3'

#### 1.2.2 pHGFP 重组质粒构建

*Xba* I/*Eco*R I 双酶切 GFP 片段和 pcDNA3.1 空载体, T4 连接酶连接后转化 DH<sub>5</sub>α 感受态细胞。PCR 初步鉴定阳性克隆,送 Invitrogen 公司 DNA 序列测定,测序正确的重组质粒命名为 pHGFP-A(Kozak 序列+4A), pHGFP-G(Kozak 序列+4G), Qiagen 质粒提取试剂盒提取质粒。

#### 1.2.3 基因转染

采用脂质体转染法,将重组质粒 pHGFP-A, pHGFP-G 及阴性对照 pcDNA3.1 分别转染 HEK293 细胞,步骤如下:(1)将 4×10<sup>5</sup> 对数生长期细胞接种于六孔板直径为 35 mm 一孔中,至 48 h 细胞生长至平皿底部的 60%~80%为宜。(2)重组质粒 pHGFP-A, pHGFP-G 分别取 5、6.5、8 μg 三个质粒量,空载体 pcDNA3.1 取 6.5 μg, Lipofectamine 2000 各 10 μL,分别对应直径 35 mm 的一孔,按 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明进行操作。(3)5% CO<sub>2</sub>, 37 ℃, 继续培养 48 h。

#### 1.2.4 荧光观察及 HEK293 细胞蛋白收集

转染后 48 h, 荧光显微镜下观察 HEK293 细胞的绿色荧光表达,采用流式细胞仪检测 GFP 的表达阳性率<sup>[4]</sup>。收集细胞,采用液氮冻融法提取总蛋白:液氮 3 min, 37 ℃ 3 min, 如此重复 3 次, 10 000 r/min 离心 4 min, 取上清即为所提取细胞总蛋白,置于-20 ℃ 保存备用。

#### 1.2.5 Western blot 检测

采用 Western blot(BIO-RAD 电泳系统),对目的蛋白 GFP 进行检测:经 Bradford 法蛋白定量,调节各泳道总蛋白上样量均为 12 μg,按常规方法进行 SDS-PAGE 变性电泳、湿式电转膜法将蛋白印迹在

PVDF 膜上。依次经 5%脱脂牛奶封闭,加 1:1000 兔源抗 GFP 抗体(一抗)及 1:500 HRP-羊抗兔 IgG(二抗),暗室操作曝光 X 线底片。以同样方法对内参照  $\beta$ -Actin 进行检测(鼠源抗  $\beta$ -Actin 一抗 1:1000 稀释,HRP-羊抗鼠二抗 1:5000 稀释)。

## 2 结果

### 2.1 不同 Kozak 序列的重组质粒构建

以转化后的克隆菌落为模板,引物为 Y65/Y74, Y77/Y74 分别对 pHGFP-A 转化子, pHGFP-G 转化子进行 PCR 鉴定,扩增出大小约 740 bp 条带(图 1),与预期大小一致。

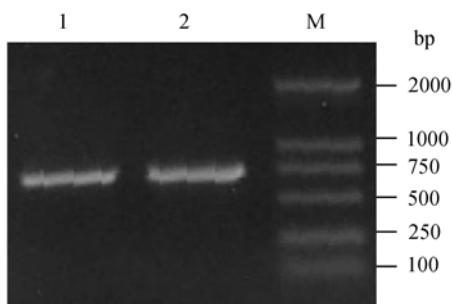


图 1 重组质粒 pHGFP-A, pHGFP-G 的 PCR 鉴定  
Fig. 1 Identification of recombinant plasmids pHGFP-A and pHGFP-G by PCR  
1: pHGFP-A; 2: pHGFP-G; M: DNA marker(DL-2000)

### 2.2 DNA 序列测定

重组质粒 pHGFP-A 和 pHGFP-G DNA 序列测定结果与理论预期一致: pHGFP-A 的 Kozak 序列为 GCCGCCATGA; pHGFP-G 的 Kozak 序列为 GCCGCCATGG, 证实 Kozak 序列改建成功; 登录 GenBank 进行序列比对。

### 2.3 HEK293 细胞中 GFP 表达阳性率的检测

转染 HEK293 细胞后 48 h, 荧光显微镜下观察: 阴性对照 pcDNA3.1 转染的细胞未见绿色荧光, pHGFP-A, pHGFP-G 转染的 GFP 绿色荧光表达差别较大, 目测估计后者绿色荧光阳性细胞数约为前者的 4 倍(如图 2)。流式细胞术检测结果显示: 质粒 pHGFP-A 5  $\mu$ g、6.5  $\mu$ g、8  $\mu$ g GFP 阳性率分别为 13.87%、14.15%、14.37%; 质粒 pHGFP-G 5  $\mu$ g、6.5  $\mu$ g、8  $\mu$ g GFP 阳性率分别为 40.32%、43.58%、43.69%。常规的实验中, 通过荧光显微镜和流式细胞术检测 GFP 绿色荧光表达阳性率来间接反映质粒转染效率, 因本实验目的蛋白即为 GFP, 实验的数

据是不同 GFP 的阳性表达率的真实反映, 而不等同于质粒转染效率。

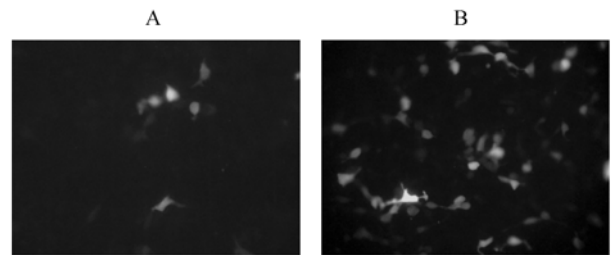


图 2 重组质粒 pHGFP-A、pHGFP-G 转染 HEK293 细胞 ( $\times 200$ )

Fig. 2 HEK293 cells transfected with the pHGFP-A and pHGFP-G recombinant plasmids ( $\times 200$ )  
A: HEK293 cells transfected with 6.5  $\mu$ g pHGFP-A; B: HEK293 cells transfected with 6.5  $\mu$ g pHGFP-G

### 2.4 Western blot 检测结果

内参照  $\beta$ -actin 的印迹结果为: 各泳道的条带灰度质基本一致(ImageJ 图像分析软件分析), 大小约为 43 kD。目的蛋白 GFP 的印迹结果显示: 阴性对照 pcDNA3.1 无 GFP 蛋白表达, 重组质粒 pHGFP-A, pHGFP-G 各转染浓度的蛋白大小均约为 27 kD; X 线片经 ImageJ 图像分析软件分析结果显示: pHGFP-A 三个转染浓度的 GFP 条带灰度质基本相等, pHGFP-G 三个转染浓度的 GFP 条带灰度质也基本相等, 而 pHGFP-G/pHGFP-A 灰度质比值为 3.87(图 3)。

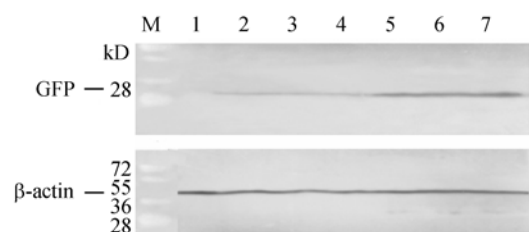


图 3 Hek293 细胞中蛋白 GFP 和  $\beta$ -Actin 的表达结果  
Fig. 3 Expression of GFP and  $\beta$ -Actin proteins in HEK293 cells

M: protein marker; 1: negative control; 2,3,4: GFP expression transfected with 5  $\mu$ g, 6.5  $\mu$ g, 8  $\mu$ g pHGFP-A, respectively; 5,6,7: GFP expression transfected with 5  $\mu$ g, 6.5  $\mu$ g, 8  $\mu$ g pHGFP-G, respectively

## 3 讨论

外源基因在真核细胞中的表达主要受到转录、翻译两个水平的调控。由于商品化构建的真核细胞表达载体一般都采用较强的启动子, 其转录水平受到较强的调控, 因此表达外源基因时如何增强翻

译水平表达显得更加重要。在对真核细胞蛋白翻译调控的诸多因素中,起始密码子周边序列(Kozak 序列)起到重要作用,大量哺乳动物的多数 mRNAs 偏爱于 Kozak 序列 GCCA/GCCAUGG,其中-3A/G,+4G 的作用尤为关键。Kozak 的点突变实验<sup>[3]</sup>表明 Kozak 序列-3A/G(嘌呤碱基)可以使胰岛素前体蛋白表达提高约 20 倍,证实-3A/G 碱基最为重要不可缺少;+4G 能使胰岛素前体蛋白表达提高 1.5 倍,Kozak 认为+4G 上调蛋白表达的作用并不十分明显。而 Xuhua X 认为只有在-3 位嘌呤缺失的情况下+4G 才发挥轻微上调蛋白表达的作用;-3 位嘌呤碱基存在时,+4G 无上调蛋白表达的作用<sup>[5]</sup>。本研究重组质粒 pHGFP-A 和 pHGFP-G DNA 的 Kozak 序列-3 位为碱基 G,满足为嘌呤的要求,同时改变+4 位碱基为 A 或 G;以探讨+4G 在-3 位为嘌呤碱基时,上调蛋白表达的作用中的单独贡献。

实验中两重组质粒 pHGFP-A 和 pHGFP-G 瞬时转染 HEK293 细胞后,通过荧光显微镜形态学观察 GFP 绿色荧光的表达差别;流式细胞术检测 GFP 的表达阳性率;及 Western blot 对 GFP 的半定量分析。3 种检测方法结果均表明:与+4A 相比,Kozak 序列+4G 在-3 位嘌呤存在时,仍可以使蛋白 GFP 在 HEK293 细胞中表达量提高约 4 倍。实验中重组质粒 pHGFP-A 和 pHGFP-G 在载体构建,质粒提纯,细胞转染,蛋白 GFP 鉴定等方面实验条件均控制二者相一致:两质粒的超螺旋均约 80%, $OD_{260}/OD_{280}$  在 1.75~1.85 之间,纯度高无蛋白质污染,两质粒浓度均约为 0.8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ;转染细胞的生长状态,培养条件均一致;瞬时转染时,我们反复摸索质粒与 Lipofectamine 2000 量的配比,无论如何改变实验条件 pHGFP-A 转染后 GFP 的表达阳性率始终在 15% 以下;而 pHGFP-G 转染后 GFP 的表达阳性率很容易达到 45%。以上实验结果表明,GFP 在 2 种质粒中的表达差异是由于 Kozak 序列+4G 上调蛋白表达所引起。

杨等<sup>[6]</sup>的报道强调+4 位碱基为天然序列不能改变。但我们认为,设计目的基因片段克隆到真核表

达载体时,为使得该基因蛋白在翻译水平上表达得到提高,起始密码子周边序列要尽量遵循 Kozak 序列 GCCA/GCCATGG:不仅要保证-3 位的嘌呤碱基,同样要尽可能保证+4 位碱基 G,这样才更可能产生高的蛋白表达量以满足后续实验需求。我们的实验证实:+4 位碱基虽是蛋白基因天然构成序列,必要时可以通过 PCR 方法(设计突变引物)将+4 位碱基改为 G,这并没有改变目的蛋白 GFP 的性质,但提高了蛋白表达量。这与张等<sup>[7]</sup>报道的改变脂肪酸脱氢酶基因的起始密码子周边序列符合 Kozak 序列,使目的蛋白表达量得到提高相一致。

## REFERENCES

- [1] Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*, 1991, **266**(30): 19867-19870.
- [2] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, 1987, **15**(20): 8125-8148.
- [3] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986, **31**, 44(2): 283-292.
- [4] Liu RY, Lu HL, Feng HL, et al. A method to detect gene transfection efficacy by flow cytometry. *Chinese Journal of Cancer*, 2002, **21**(3): 267-271.  
刘然义, 罗慧玲, 冯海林, 等. 一种用流式细胞术检测基因转移效率的新方法. *癌症*, 2002, **21**(3): 267-271.
- [5] Xuhua X. The +4G site in Kozak consensus is not related to the efficiency of translation initiation. *PLoS ONE*, 2007, **2**(2): e188. www.plosone.org.
- [6] Yang JW, Zhu HM. Study on recombination of sequence of apoptin gene and construction of a eukaryon vector for expression of apopt. *Journal of Wenzhou Medical College*, 2005, **35**(6): 468-470.  
杨俊文, 朱惠明. 凋亡素基因序列重组及其真核表达载体的构建. *温州医学院学报*, 2005, **35**(6): 468-470.
- [7] Zhang Q, Li MC, Sun Y, et al. Heteroexpression of *Rhizopus arrhizus*  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(6): 871-877.  
张琦, 李明春, 孙颖, 等. 少根根霉  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中的表达. *生物工程学报*, 2005, **21**(6): 871-877.