

脑心肌炎病毒(EMCV)的内部核糖体进入位点活性的研究^{*}

蔡燕飞 朱瑞宇 陈 蕴 金 坚^{**}

(江南大学医药学院药物设计与分子药理学实验室 无锡 214122)

摘要 脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus, EMCV)的内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES)已被广泛运用于蛋白的表达中,如应用于 Clontech 公司推出的 pIRES2 质粒对增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达。但是由于对 EMCV 的 IRES 了解还不够深入而在利用 EMCV 的 IRES 进行基因表达过程中经常会遇到问题,很有必要对其进行更深入的研究。以红绿色荧光蛋白基因作为报告基因,通过分子克隆、荧光显微镜、荧光分光光度计、Western blot 等分子细胞生物学手段,对 EMCV 的 IRES 末端序列与其活性的关系进行了深入研究。研究发现 EMCV 的 IRES 末端序列对其 IRES 的活性影响极大,而人们常用的报告基因 EGFP 本身也可能存在 IRES。

关键词 脑心肌炎病毒 内部核糖体进入位点 增强型绿色荧光蛋白

中图分类号 Q819

真核生物大多数蛋白质合成都是采用依赖 5'端 m⁷GPPP N 帽子结构的翻译起始方式(cap-dependent translation),但是一组缺乏帽子结构的病毒 RNA,如脊髓灰质炎病毒(poliovirus, PV)、丙型肝炎病毒(hepacivirus, HCV)的蛋白质合成则采用不依赖 5'端 m⁷GPPP N 帽子结构的翻译起始方式(cap-independent translation),该翻译方式是依赖其 mRNA 5'端非翻译区(untranslated region, UTR)翻译调控的顺式作用元件——内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES),它们能够在一些反式作用因子的辅助下,招募核糖体小亚基到 mRNA 的翻译起始位点,而无需扫描机制寻找合适的翻译起始密码子^[1-3]。一些真核基因,如成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2, FGF2)^[4]、人转录因子 Sp3^[5]和抑癌基因 p53 mRNA^[6]等的 5'端也发现有 IRES 的存在。复杂而且稳定的二级结构是维持 IRES 元件活性的关键,有研究表明修饰 EMCV 和 PV IRES GNRA (N 代表任意核苷酸, R 代

表嘌呤)基序都能使其翻译活性大大降低^[7]。同时稳定的茎环结构也是 IRES 元件活性所必需的,宿主翻译相关因子与茎环结构的结合促使 IRES 构像发生改变,使其与核糖体复合物能够结合,从而使翻译起始得以顺利进行^[8]。

目前 IRES 在基因治疗和转基因实验中占据了重要地位,其中应用最为广泛的是 EMCV 的 IRES 基因,与其它 IRES 基因相比,它具有表达效率高且能在多种类型细胞中有效发挥其 IRES 活性的优点^[9],但是在利用 EMCV 的 IRES 活性介导的基因表达及一些报告基因的使用中发生了各种各样的问题,如为了更方便地在 IRES 序列下游插入报告基因,在其序列末端做了各种各样的修改,随之发生的是 IRES 活性也有了很大变化^[10]。本文对 EMCV 序列对其 IRES 活性的影响及 EGFP 作为其下游报告基因的表达进行了深入的研究,结果发现 EMCV 末端序列的增添严重影响其 IRES 活性,作为其报告基因的增强型绿色荧光蛋白 EGFP 本身也可能存在 IRES 依赖的翻译途径,该结果为正在运用 IRES 做研究的人们提供了一些依据和参考。

收稿日期:2010-09-25 修回日期:2010-12-28

^{*} 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP20916)、江苏省自然科学基金(BK2009071)资助项目

^{**} 通讯作者,电子邮箱:jnjin31@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与载体 293T 细胞引自 ATCC 细胞库;质粒 pCI、pDsRed-N1、pIRES2-EGFP、pEGFP-N1 均购于 Clontech 公司;大肠杆菌宿主菌 *Escherichia coli* JM109 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基购于 Gibco 公司;胎牛血清购于 Hyclone 公司;工具酶 *EcoR* I、*Xba* I、*Not* I 和 Taq DNA polymerase、Pfu DNA polymerase 购于 Fermentas 公司;Lipofectamine™ 2000 购于 Invitrogen 公司;M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent 购于 Thermo 公司;抗体 GFP (B-2): sc-9996 和 DsRed (L-18): sc-33353 购于 Santa Cruz 公司;抗体 HRP Conjugated Goat anti-Mouse IgG 购于 ICL 公司,其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 (1) pCI-DsRed (pR) 以 pDsRed-N1 为模板,以正向引物 5'-GAGAATTCACCATGGTGC GCTCCTC-3',反向引物 5'-GACTCTAGACTACAGGAACA-3'进行 PCR 扩增 DsRed 基因,经 *EcoR*I 和 *Xba*I 酶切后插入载体 pCI 中,获得 pCI-DsRed 质粒,简称为 pR。

(2) pCI-EGFP (pG) 以 pEGFP-N1 为模板,以正向引物 5'-GAGAATTCACCATGGTGAAGCAAGGG-3',反向引物 5'-GACTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTC-3'进行 PCR 扩增 EGFP 基因,经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切后插入表达载体 pCI 中,获得 pCI-EGFP 质粒,简称为 pG。

(3) pCI-EGFP-DsRed (pG-R) 以 pDsRed-N1 为模板,以正向引物 5'-CTATCTAGAACCATGGTGC GCTC CTC-3',反向引物 5'-AATGCGGCCGCTACAGGAACA-3'进行 PCR 扩增 DsRed 基因,经 *Xba* I 和 *Not* I 酶切后插入已行相应酶切的载体 pG 中,获得 pCI-EGFP-DsRed 质粒,简称为 pG-R。

(4) pCI-EGFP-EMCV-DsRed (pG-EMCV-R) 以 pIRES2-EGFP 为模板,以正向引物 5'-ATACTTCTAGAC GCCCCTCTCC CTCCCCC-3',反向引物 5'-TTCTTGAG GAGCGCACCATGGTTGTGGCCATA TTATCAT-3'进行 PCR 扩增 EMCV 5'-UTR 基因;同样以 pDsRed-N1 为模板,以正向引物 5'-ATGATAATATGGCCACAACCATGGT GCGC TCCTCCAAGAA-3',反向引物 5'-AATGCGGCCG CTACAGGAACA-3'进行 PCR 扩增 DsRed 基因。将两者 PCR 产物进行重叠 PCR 拼接,经 *Xba* I 和 *Not* I 酶切

后插入已行相应酶切的载体 pG 中,获得 pCI-EGFP-EMCV-DsRed 质粒,简称为 pG-EMCV-R。

(5) pCI-EGFP-EMCV-* DsRed (pG-EMCV-* R, “*”表示在质粒构建过程中插入的序列“GCTAGA”)

以 pIRES2-EGFP 为模板,以正向引物 5'-ATACTTCTA GACGCCCTCTCCC TCCCCC-3',反向引物 5'-TATCTG CTAGCGTGGCCATATTATCATCG TG-3'进行 PCR 扩增 EMCV 5'-UTR 基因,经 *Xba* I 和 *Nhe* I 酶切后插入已用 *Xba* I 单酶切的载体 pG-R 中,获得 pCI-EGFP-EMCV-* DsRed 质粒,简称为 pG-EMCV-* R。

(6) pCI-DsRed-EGFP (pR-G) 同理以 pEGFP-N1 为模板,以正向引物 5'-CTATCTAGAACCATGGTGAGC AAGG-3',反向引物 5'-AATGCGGCCGCTTACTTGTACA GC-3'进行 PCR 扩增 EGFP 基因,经 *Xba* I 和 *Not* I 酶切后插入已行相应酶切的载体 pR 中,获得 pCI-DsRed-EGFP 质粒,简称为 pR-G。

(7) pCI-DsRed-EMCV-EGFP (pR-EMCV-G) pG-R 质粒经 *Xba*I 和 *Nhe*I 双酶切后回收 pCI-DsRed 片段,该片段自身连接获得 pCI-DsRed 载体,质粒 pIRES2-EGFP 经 *Not*I 酶切后获得 EMCV-EGFP 重叠片段,将该片段插入已行相应酶切的载体 pCI-DsRed 中,获得 pCI-DsRed-EMCV-EGFP 质粒,简称为 pR-EMCV-G。

(8) pCI-DsRed-EMCV-* EGFP (pR-EMCV-* G) 将经 *Xba* I 和 *Nhe* I 双酶切的 EMCV 5'-UTR 片段插入已用 *Xba* I 单酶切的表达载体 pR-G 中获得 pCI-DsRed-EMCV-* EGFP 质粒^[11-12],简称为 pR-EMCV-* G。所有重组质粒均通过酶切和序列分析进行鉴定。

1.2.2 细胞转染及初步检测 将 293 细胞按 2.2×10^5 个/孔铺 6 孔板,24h 后按照脂质体 Lipfection 2000 说明书,每孔 8μg 质粒转染 293T 细胞,4~6h 后更换完全培养液,48h 后于倒置荧光显微镜下进行观察。

1.2.3 荧光分光光度计检测 将转染后 48h 的细胞消化,收集细胞,用 PBS 充分洗涤后制成单细胞悬液,按照荧光分光光度计操作说明,在激发波长 EX490//10、发射波长 EM520/10 下检测绿色荧光的相对荧光值 (Relative Fluorescence Unit, RFU),在激发波长 EX510//10、发射波长 EM590/10 下检测红色荧光的 RFU。

1.2.4 Western blot 分析 收集转染 48h 后的细胞,用 M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent 抽提细胞总蛋白,用 EGFP 和 DsRed 的一抗,按常规 Western 印迹方法检测红绿荧光蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 双顺反子表达载体的构建及鉴定

本实验共构建了 8 种不同的质粒(图 1),构建的重组质粒是能在哺乳动物细胞中表达的通用型表达载体,该载体含有 CMV 启动子、SV40 终止子、氨苄抗性基因,上游报告基因通过 cap-dependent translation 进行翻译,若在上下游报告基因中间插入有 IRES 活性的序列,则下游的报告基因通过 cap-independent translation 进行翻译,但如果在上下游报告基因中间插入没有 IRES 活性的序列或不插入任何序列,则下游的报告基因不能表达。

将构建的重组质粒酶切鉴定,质粒①②③④⑤⑥⑧(图 1)均用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,质粒⑦用 *Not* I 酶切(图 2),酶切产物大小均与理论值相一致。所有质粒经 DNA 测序结果正确。

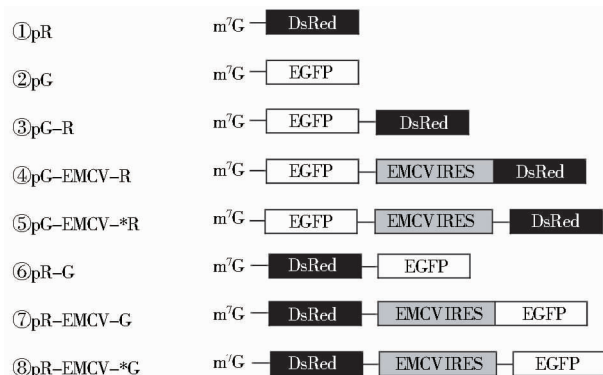


图 1 8 种质粒的示意图

Fig. 1 Schematic map of the eight plasmids

“*” represents the inserted sequence “GCTAGA”; The black box represents the DsRed coding sequence; The blank box represents the EGFP coding sequence; The gray box represents the EMCV IRES sequence; The thin line represents the Restriction Enzyme cutting sites

2.2 EMCV 末端序列的增添严重影响其 IRES 活性

本实验在构建质粒的过程中,插入了多个酶切位点,使得最终 EMCV IRES 序列末端增添了“GCTAGA”这 6 个碱基,这些碱基没有使下游的报告基因产生读码框的改变。同时通过重叠 PCR 将 EMCV IRES 序列与下游报告基因连接,中间不插有别的序列。将构建的这两种重组质粒在 293T 细胞中的表达情况做比较(图 3),荧光显微镜下(图 3A),当 EMCV IRES 序列直接与下游报告基因 DsRed 连接时,有红色荧光发出,但

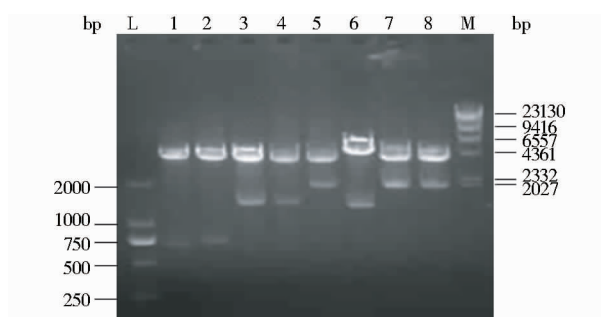


图 2 质粒酶切鉴定的电泳结果

Fig. 2 The result of electrophoretic identification for the digested plasmids

L: DNA marker D; 1 ~ 8: the plasmids ①②③⑥④⑦⑤⑧ described in fig1 digested by *EcoR* I and *Not* I except plasmid ⑦, which is digested by *Not* I; M: Lambda DNA/*Hind* III marker

在 IRES 序列末端增添碱基后,没有观察到红色荧光;荧光分光光度计检测(图 3B)结果与荧光显微镜下观察相一致;通过 Western blot 检测(图 3C)也可以看出,EMCV IRES 序列末端增添碱基后,其下游报告基因不表达。

本实验结果表明,EMCV 的 IRES 序列末端碱基的增添严重影响其 IRES 活性,说明 IRES 活性部位对其结构、序列等要求严格,同样也警示人们在构建类似质粒的过程中要多加注意。

2.3 EGFP 本身可能存在依赖 IRES 的翻译途径

由于 EGFP mRNA 翻译的高效性,对宿主细胞无毒性,稳定性好,易于观察等优点而被广泛应用,在类似的研究中,EGFP 常被用来作为 IRES 序列下游的报告基因,从而监测上游基因的表达情况或用于检测某段序列是否存在 IRES 活性等。

但 EGFP 本身是否会存在依赖 IRES 的翻译途径的研究鲜见报道。本实验对 IRES 依赖的 EGFP 做了更深入的研究:将红绿荧光蛋白作为 EMCV IRES 序列两端的报告基因,通过两种基因上下游位置的互换构建两组不同的质粒,将两组质粒在 293T 细胞中的表达情况作比较(图 4),荧光显微镜下(图 4A),当两报告基因间插入末端未经修饰过的 EMCV IRES 序列时,其下游报告基因均有表达,而插入末端被修饰的 EMCV IRES 序列或不插入 EMCV IRES 序列的情况下,当 DsRed 作为下游报告基因时,无红色荧光发出,而当 EGFP 作为下游报告基因时,却有绿色荧光发出;通过荧光分光光度计(图 4B)和 Western blot 检测(图 4C),结果与荧光显微镜下观察到的结果相一致。

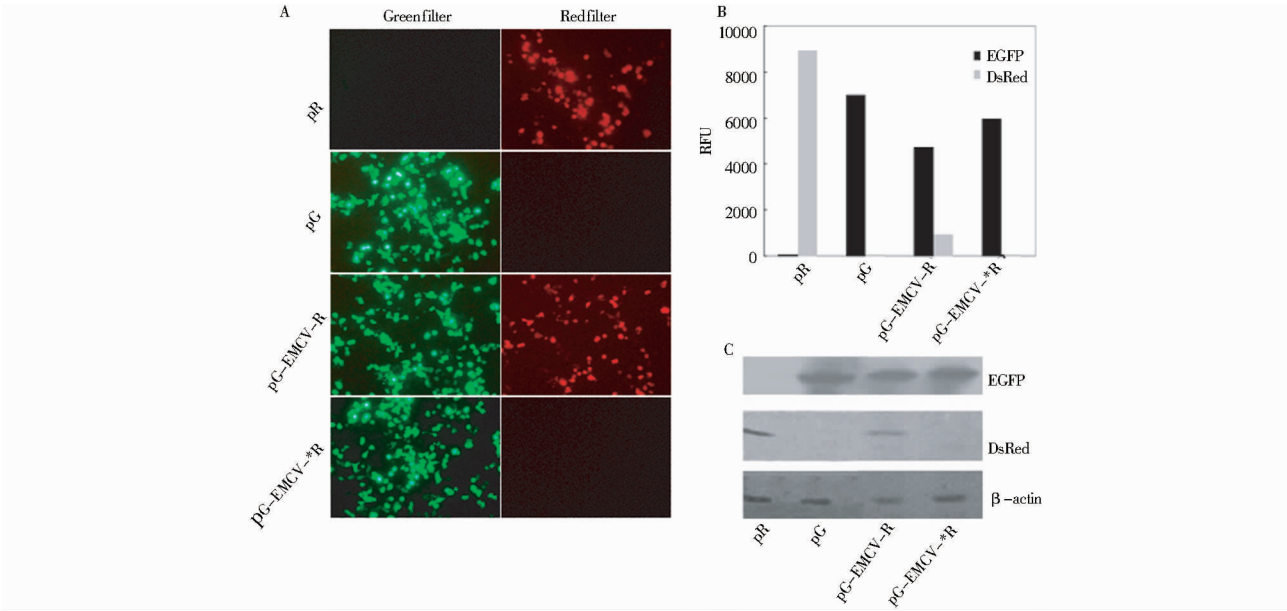


图3 EMCV 末端序列的增添对其 IRES 活性的影响

A: 荧光显微镜下观察红绿荧光蛋白的表达情况,EMCV IRES 序列直接与下游报告基因 DsRed 连接时,有红色荧光发出,但在 IRES 序列末端增添碱基后,没有观察到红色荧光;B: 荧光分光光度计检测两报告基因的表达情况;C: Western blot 分析两报告基因的表达情况

Fig. 3 Influence of increasing terminal subsequence of EMCV on its IRES activity

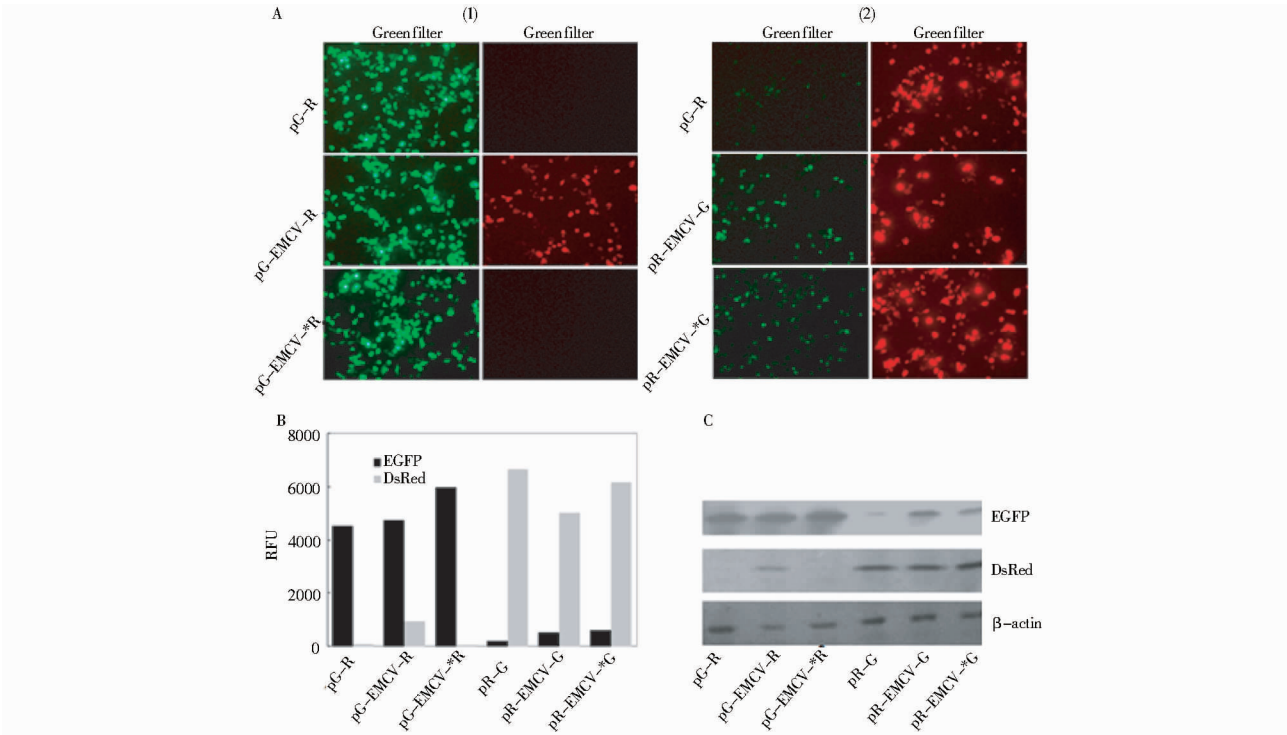


图4 EGFP 本身可能存在依赖 IRES 的翻译途径

A: 荧光显微镜下观察红绿荧光蛋白的表达情况,EMCV IRES 未经修饰时下游报告基因均有表达,而经末端修饰或不插入 IRES 序列时,EGFP 作为下游报告基因时均有绿色荧光,而 DsRed 作为下游报告基因时无红色荧光;B: 荧光分光光度计检测两基因表达情况;C: Western blot 分析两报告基因的表达情况

Fig. 4 EGFP may contain IRES-dependent translation itself

本实验结果表明,EGFP 作为 IRES 序列的下游报告基因,其表达一方面是通过依赖该 IRES 的翻译途径,另一方面其本身也可能存在类似 IRES 依赖的翻译途径,因此,将 EGFP 作为 IRES 序列的下游报告基因并不合适。

3 讨论

随着后基因组时代的来临,对 IRES 元件的研究正在逐年深入,很多新的发现为运用该元件的人们提供了很多意见和思路。有研究发现体内外或在不同的哺乳动物细胞株中,IRES 下游基因表达均低于上游基因的表达^[13-14];有的研究表明 IRES 下游基因的有效表达依赖于特定的 IRES 序列^[5]。由此说明,完整的基因序列对保持高效的 IRES 活性至关重要^[15]。

那么目前人们在使用 IRES 序列的过程中遇到的种种问题^[16-17],或许也能由此得到解释,本实验通过在 EMCV IRES 序列末端添加一个酶切位点,检测增添碱基前后其两端报告基因的表达情况,结果发现其末端碱基的增添严重影响了 IRES 活性,该结果也提示人们在构建类似质粒的过程中要注意 IRES 序列的完整性及其与下游序列的连接方式。

在使用 IRES 序列的过程中,选择合适的下游报告基因也至关重要,其中 EGFP 的应用最为广泛,但对于 EGFP 本身基因序列的研究鲜见报道。通过本实验初步研究发现,即使在上下游报告基因间插入无 IRES 活性的基因序列,EGFP 仍有少量表达,说明 EGFP 本身可能存在依赖 IRES 的翻译途径,当然该研究结果还需要更多更严密的实验来论证,但该结果依然警示人们 EGFP 并不适合作为 IRES 元件的下游报告基因,DsRed 较合适。

参考文献

- [1] 郑海学,郭慧琛,靳野,等. 基于 FMDV IRES 的双顺反子载体的构建及体外表达分析. 中国生物工程杂志, 2007, 27(8):29-33.
Zhen H Y, Guo H C, Jin Y. China Biotechnology, 2007, 27(8): 29-33.
- [2] 卢杰,张珈敏,林美娟,等. RNA 病毒翻译调控元件—内部核糖体进入位点(IRES). 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(7):513-518.
Lu J, Zhang J M, Lin M J. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 23(7): 513-518.
- [3] 王传铭,尚喜雨. mRNA 5' 端发卡结构与翻译的起始调控. 生物信息学, 2007, 3(6): 135-137.
Wang C M, Shang X Y. China Journal of Bioinformatics, 2007, 3(6)135-137.
- [4] Gonzalez-Herrera I G, Prado-Lourenco L, Teshima-Kondo S, et al. IRES-dependent regulation of FGF-2 mRNA translation in pathophysiological conditions in the mouse. Biochem Soc Trans, 2006, 34(1): 17-21.
- [5] Hernandez E M, Chan C H, Xu B, et al. Role of an internal ribosome entry site in the translational control of the human transcription factor Sp3. Int J Oncol, 2004, 24(3): 719-724.
- [6] Yang D Q, Halaby M J, Zhang Y. The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. Oncogene, 2006, 25(33): 4613-4616.
- [7] Encarnación Martínez-Salas, Sonia López de Quinto, Ricardo Ramos, et al. IRES elements: features of the RNA structure contributing to the iractivity. Biochimie, 2002, 84: 755-763.
- [8] Christopher U T Hellen. IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. Biochimica Biophysica Acta, 2009, 1789: 558-570.
- [9] 严飞,赵新宇,邓洪新,等. 一种新的双元表达质粒 pCMV-Myc-IRES-EGFP 的构建及其表达. 生物工程学报, 2007, 23(3): 423-428.
Yan F, Zhao X Y, Deng H X, et al. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(3): 423-428.
- [10] Yury A, Bochkov, Ann C. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. Short Technical Reports, 2006, 41(3): 283-290.
- [11] Stephane Pyronnet, Lucien Pradayrol, Nahum Sonenberg. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. Molecular Cell, 2000, 5: 607-616.
- [12] Kyle W Sherrill, Marshall P Byrd, Marc E Van Eden, et al. BCL-2 translation is mediated via internal ribosome entry during cell stress. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(28): 29066-29074.
- [13] Hiroyuki Mizuguchi, Zhili Xu, Akiko Ishii-Watabe, et al. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. Molecular Therapy, 2000, 1(4): 376-382.
- [14] Wang Y, Iyer M. Noninvasive monitoring of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals using improved bicistronic vectors. J Nucl Med, 2005, 46: 667-674.
- [15] Qiao J, Roy V. High translation efficiency is mediated by the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry sites if the natural sequence surrounding the eleventh AUG is retained. Hum

- Gene Ther, 2002, 13: 881-887.
- [16] Wong E T, Ngoi S M. Improved co-expression of multiple genes in vectors containing internal ribosome entry sites (IRESes) from human genes. Gene Ther, 2002, 9: 337-344.
- [17] Hennecke M, Kwissa M. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. Nucleic Acids Res, 2001, 29: 3327-3334.

Study on the Activity of EMCV IRES

CAI Yan-fei ZHU Rui-yu CHEN Yun JIN Jian

(School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract The internal ribosomal entry site (IRES) from encephalomyocarditis virus (EMCV) was a popular element widely used in the plasmid to express proteins in eukaryotic cells or cell-free extracts, such as the pIRES2 plasmid developed by clontech. Although it had already been widely used, researchers often encountered in headache problems when manipulating it. Normally, the translation efficiency driving by the modified EMCV IRES was difficult to control. It's necessary to study EMCV IRES mediated translation in detail. The relationship between the end sequence of EMCV IRES and its activity was determined. The red and green fluorescent protein genes were used as reporter genes, and "GCTAGA" bases were inserted at the end of EMCV IRES by molecular cloning. The expression efficiency was analyzed with fluorescence microscopy, fluorescence spectrophotometer, Western blot and other methods of molecular biology. As a result, it was found that additional bases at the end of EMCV IRES severely affected the IRES activity of EMCV, and the frequently used EGFP reporter gene may contain IRES element itself. These results indicate that investigators should pay more attention to the integrity of IRES sequences and their connection forms with the downstream sequence.

Key words EMCV IRES EGFP

补充说明

本刊2011年第31卷第1期第86-95页文章《转基因植物核酸成分检测技术研究进展》受国家科技支撑计划(28-1001KJZD-1)、国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08001-023B)和国家“973”计划(2007CB109201)三项基金项目资助。