研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2017.09.006

利用 *PiggyBac* 转座子系统快速控制 GPI 锚定蛋白的表达

Matabaro Emmanuel， 柳艺石， 张慧杰， 高晓冬， 藤田盛久 *

（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：GPI 锚定蛋白的合成是一个发生在内质网中多步骤、多基因参与的过程。PIGK 是 GPI 锚定蛋白转酰胺酶复合物的一个催化亚基，负责把 GPI 前体转移到蛋白质上。作者在人体胚胎肾细胞(HEK 293)中获得了 *PIGK* 敲除的细胞株，敲除 *PIGK* 的细胞不能表达 GPI 锚定蛋白。利用 *piggyBac*(*PB*)转座子系统，在细胞中重新插入 PIGK 基因，细胞膜表面的 GPI 锚定蛋白恢复表达。实验成功构建了 HEK293pB-PIGK 细胞株并命名为 G36，通过引入 *PB* 转座酶或 FLP 重组酶，可以控制 GPI 锚定蛋白的表达。本系统可以快速调控细胞表面蛋白质的表达并能够用于基础研究和工业应用。

关键词：GPI 锚定蛋白；*PiggyBac* 转座子；PIGK

中图分类号：Q 786　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2017)09—0927—06

Quick Conversion From GPI-Positive to GPI-Negative Cells Using *piggyBac* Transposon System

Matabaro Emmanuel， *LIU Yishi*， *ZHANG Huijie*， *GAO Xiaodong*， *Morihisa Fujita**

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The biosynthesis of GPI is carried out in the endoplasmic reticulum (ER) through multiple steps and many genes are involved in the reactions. PIGK is one of the subunits of the catalytic domain of the GPI transmidase complex, responsible for the transfer of GPI moiety on protein. In this study, we generated a *PIGK*-knockout (KO) HEK 293 cell line, which showed no surface expression of GPI-anchored proteins (GPI-APs). By mediation of *piggyBac* (*PB*) transposon system, we rescued the PIGK gene in PIGK-KO cells, which showed the recovery of the surface expression of GPI-APs. We successfully established a HEK 293 cell line, HEK293pB-PIGK, named G36, which can be converted from GPI-AP positive to negative cells by the introduction of PB transposase or FLP recombinase. Our system is useful to modulate surface proteins quickly and can

收稿日期：2016-03-10

基金项目：国家自然科学基金项目(31400693)；江苏省自然科学基金项目(BK20140141)；中央高校基本科研业务费(JUSRP51508)。

* **通信作者**：藤田盛久(1979—)，男，日本人，理学/农学博士，教授，博士研究生导师，主要从事细胞分子生物学及细胞糖生物学方面的研究。E-mail：fujita@jiangnan.edu.cn

引用本文：Matabaro Emmanuel，柳艺石，张慧杰，等. 利用 *PiggyBac* 转座子系统快速控制 GPI 锚定蛋白的表达[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(09)：927-932.

be applied for both basic and applied researches.

Keywords: GPI-anchor proteins, *piggyBac* (*PB*), PIGK

动物细胞的很多膜蛋白都是通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜表面且GPI锚定蛋白质的生物合成在真核细胞中高度保守[1-3]。在动物细胞中,有超过150种蛋白质属于GPI锚定蛋白,包括细胞表面受体,细胞黏附分子和细胞表面水解酶等[2,4]。GPI在内质网中由22个称作磷脂酰肌醇糖(PIG)的基因参与合成并转移到蛋白质上[5]。C末端含有GPI修饰序列的蛋白质在PIGK、GPAA1、PIGS、PIGT和PIGU组成的GPI转酰胺酶复合物的识别下,被剪切并转移到GPI上[6-7]。在这个复合物中,PIGK是GPI转酰胺酶的催化亚基。GPI蛋白转运过程中,GPI上的脂质和糖链结构会发生重组,该过程对GPI锚定蛋白的转移效率和与细胞膜上脂筏的结合相当重要。GPI合成途径中的基因突变会导致细胞膜表面的GPI锚定蛋白表达水平下降和结构缺陷[5,8]。当把GPI修饰序列加到分泌蛋白的C端时,可以把该蛋白转变成GPI锚定蛋白。所以通过GPI修饰可以把不同的重组蛋白表达到细胞膜表面[9]。和原核生物重组蛋白表达系统相比,真核生物的蛋白修饰更符合药用蛋白质的生产[10]。因此,开发基于真核生物的表达系统具有重要意义。

发现于粉纹夜蛾中的*piggyBac* (*PB*)转座子系统[11-12],是一种由*PB*介导的"剪切,粘贴"型基因转移系统。通过激活*PB*(PBase),*PB*转座子能够精确的从供体DNA上切除,并且不留下任何基因印迹[13-14]。与其他转座子系统相比,PB转座子作为良好的基因筛选和基因插入工具,广泛应用到包括原生生物,植物,昆虫和脊椎动物等很多物种上[15-16]。

作者利用*PB*转座子的优点来研究细胞膜表面的GPI锚定蛋白。首先成功构建了能够控制GPI锚定蛋白表达的系统,该系统不仅可以用来研究GPI的生物合成途径,而且还能够用于重组GPI锚定蛋白的表达生产。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人体胚胎肾细胞HEK 293用含有10%胎牛血清(FCS)的DMEM培养基(Gibco,Life technologies,USA)培养,培养条件为37 ℃、5% CO_2。

1.2 *PIGK*敲除细胞株的构建

利用CRISPR/Cas9系统敲除[17]参与GPI锚定蛋白生物合成过程中的PIGK基因,通过E-CRISP (http://www.e-crisp.org/E-CRISP/)网站设计敲除PIGK的一对目标序列caccGCTCTTGTCCTTCGGCAGCGTGG和aaacCCACGCTGCCGAAGGACAAGAGC,并通过*Bbs* I位点连接到pX330-EGFP质粒上,得到pX330-EGFP-PIGK-KO. 按照Lipofectamine 2000(Invitrogen,USA)的说明书,质粒瞬时转染到培养在6孔板的HEK 293细胞中,3 d后细胞分选仪收集GFP阳性细胞,分选得到的细胞培养8 d后做限制性稀释获得单克隆细胞株。

1.3 PB转座子系统回补质粒的构建

为了构建*PB*转座子介导的PIGK基因回补质粒,以质粒pPB-FRT-PGKp-PurodTK作为骨架质粒,该质粒含有一个PGK启动子,一个多克隆位点,一个牛生长激素(GH)聚腺苷酸信号,SV40启动子和一个purodTK基因,两侧是*PB*末端重复序列和翻转酶识别位点(FRT)。PCR扩增PIGK基因。以限制性内切酶处理并纯化PCR扩增片段,用连接酶(Ligation Mix,Takara,JP)连接到载体pPB-FRT-PGKp-PurodTK的*EcoR* I和*Not* I位点,构建出pPB-FRT-PurodTK-PIGK质粒。质粒pCMV-hyPBase:桑格研究所Kosuke Yusa教授赠送;pCAG-FLPe-IRES-puro:从Addgene上购买。

1.4 流式细胞分析

用胰酶(Sangon,CN)消化处理并收集细胞,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS,Sangon,CN)洗涤。取5×10^5个细胞重悬于流式细胞液FACS(PBS,1% BSA和0.1% NaN_3)中,之后用一抗anti-CD59或anti-Flag(10 μg/mL)冰上孵育25 min。之后用FACS洗涤两次,二抗用带有荧光信号PE共轭结合的山羊抗老鼠免疫球蛋白IGg冰上孵育25 min,然后再用FACS洗涤两次,FACS溶液重悬细胞并用BD Accuri C6(BD,USA)流式细胞分析仪分析。

1.5 巢式 PCR 检测 PB 插入的拷贝数

质粒 pPB-FRT-PurodTK-PIGK 和 pCMV-hyPBase 共转到 *PIGK* 敲除细胞中，转染 2 d 后，用含有嘌呤霉素(puromycin,InvivoGen,USA)的培养基筛选阳性细胞，之后限制性稀释获得单克隆，分析单克隆细胞株的 PB-FRT-PurodTK-PIGK 的插入位点和插入拷贝数。用基因组提取试剂盒(Promega)提取细胞基因组，限制性内切酶 *Hae* III(NEB,#R0108S)酶切降解基因组 DNA,37 ℃酶切反应 12~16 h，通过巢式 PCR 技术以引物 Spl-P1,CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAA 和 3PB-1st,TATACAGACCGATAAAACACATGCGT 做第一轮 PCR 反应,以 Spl-P2 TCGTACGAGAATCGCTGTCC TCTCC 和 3PB-2nd CGCATGATTATCTTTAACGTA CGTCACAA 做第二轮 PCR 反应来扩增被 PB 转座子插入的位点[18]。获得的 PCR 产物,通过 2 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳分析 *PB* 插入的拷贝数,只有一个插入位点的细胞株 G36 用做后续试验的出发细胞株。

1.6 *PB* 转座子的移除

为了从 G36 细胞株中移除转座子，当细胞在 6 孔板中长到 90% 时分别转染 4 μg 的 pCMV-hyPBase 或 pCAG-FLPe-IRES-puro 质粒。转染后 2 d 加入 1 μmol/L 核苷类似物 1-(2-deoxy-2-fluoro-1-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil(FIAU)，之后每天更换培养基,持续 7 d[19]。之后流式分析 *PB* 元件是否移除,巢式 PCR 再次确认 *PB* 转座子被成功切除。

2 结果与分析

2.1 GPI 锚定蛋白突变细胞的构建

目前研究蛋白质表达的热点就是找到一株能够用来研究感兴趣的生物合成途径的稳定细胞株。为此,作者开发了一个新的系统,该系统能够很容易的控制 GPI 锚定蛋白的表达。首先,利用 CRISPR/Cas9 系统在 HEK 293 细胞中敲除 *PIGK* 基因，PIGK 是 GPI 转酰胺酶复合物的催化亚基，在内质网中负责 GPI 的转移[20-21]。在 *PIGK* 突变的细胞中，蛋白质不能够被 GPI 修饰,直接通过内质网介导的蛋白质降解途径(ERAD)降解[5]。

和预期的结果一样,*PIGK* 敲除的 HEK 293 细胞，流式细胞分析检测不到细胞表面大量表达的 GPI 锚定蛋白 CD59,见图 1。通过扩增敲除区域的 DNA 片段并测序分析,在第一个外显子的切除位点插入了一个核苷酸碱基。插入的碱基导致基因发生移码突变,同时使基因失去活性,见图 2。在整个培养过程中,*PIGK* 敲除细胞没有表现任何生长和形态上的缺陷。

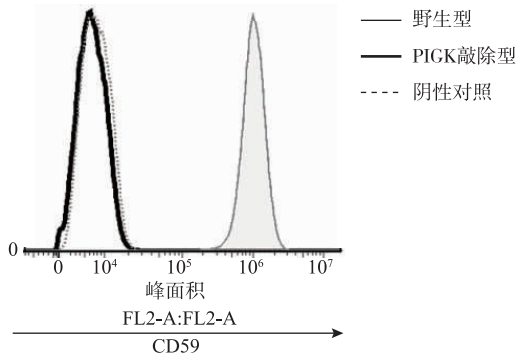
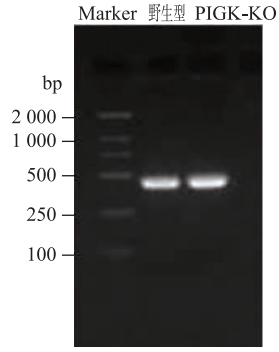


图 1 利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 *PIGK* 基因

Fig. 1 *PIGK* KO by CRISPR/Cas9



(a)*PIGK*敲除的基因电泳结果



*PIGK*敲除细胞中插入了一个碱基a

(b)野生型和*PIGK*敲除基因测序结果

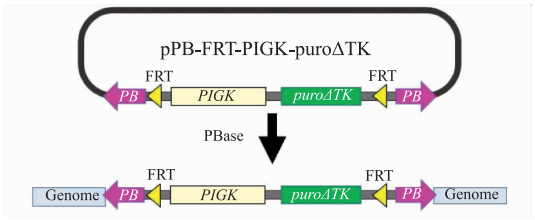
图 2 *PIGK* 敲除细胞的性状

Fig. 2 Genotype of *PIGK*-KO cells

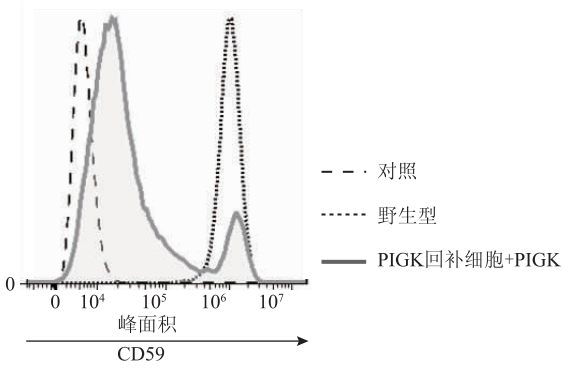
2.2 通过 *PB* 转座子控制 GPI 锚定蛋白的表达

PIGK 基因的回补通过携带 *PB* 转座子的质粒实现。质粒 pPB-FRT-PurodTK-PIGK 由 *PB* 和 FRT 序列包含的 *PIGK* 基因和 purodTK 筛选标签构成，见图 3 (a)。细胞共转染表达 *PB* 转座酶的质粒 pCMV-hyPBase 和 pPB-FRT-PurodTK-PIGK，将 *PIGK* 插入基因组中,2 d 后流式分析转染效率,见图 3(b)。随后,嘌呤霉素培养基筛选 8 d 获得 *PIGK*

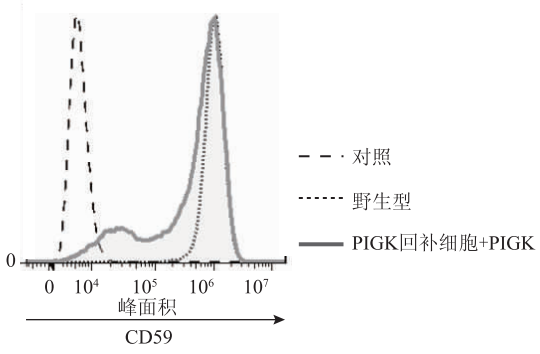
回补细胞株。流式分析经过筛选后的细胞，流式峰图明显的从左侧移到右侧，说明很多细胞的 GPI 锚定蛋白 CD59 表达得以恢复，见图 3(c)。



(a)*PB*系统介导的*PIGK*回补示意图



(b)转染*PB*质粒后流式分析转染效率



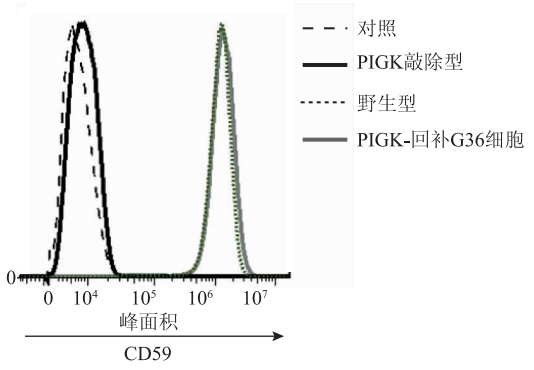
(c)流式分析经过嘌呤霉素筛选转染*PB*后的细胞

图 3　*PB* 系统介导的 *PIGK* 回补

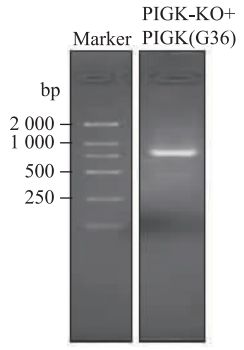
Fig. 3　*PIGK* rescued by *PB* system

2.3　确定 *PB* 的拷贝数和插入位点

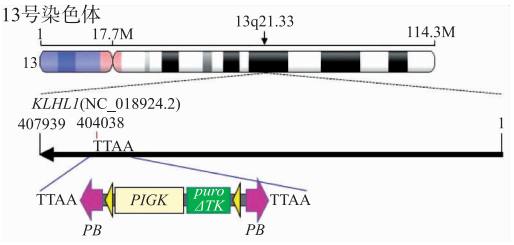
作者试图获得一株像野生型 HEK293 表达 GPI 锚定蛋白的回补细胞株，为此，经过嘌呤霉素筛选，限制性稀释获得一些单克隆细胞。在这些细胞中，CD59 表达水平与野生型相似。然而，当 *PB* 转座子插入时，同一克隆细胞有可能有多个插入基因[22-23]。为了后续实验，需要获得只有一个 *PB* 插入位点的细胞。巢式 PCR 确定插入拷贝数和插入基因[18]，在这些细胞株中，成功找到一株能够正常表达 CD59 且只有一个 PB 拷贝的细胞株，并命名为 HEK293pB-PIGK-G36，见图 4。测序结果显示，含有 PIGK 的 *PB* 元件插入位于 13 号染色体上的 kelch 类似(KLHL1)基因的内含子 TTAA 序列中。



(a)流式分析*PB*回补细胞G36的GPI锚定蛋白质表达水平



(b)G36细胞中*PIGK*的电泳条带



(c)G36细胞中*PB*插入的染色体位点

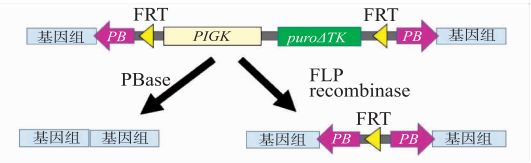
图 4　G36 细胞株中 *PB* 转座子的插入位点

Fig. 4　*PB* transposon insertion site in G36 cells

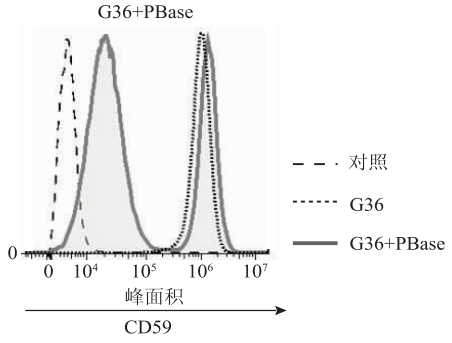
2.4　G36 细胞株 *PB* 的移除恢复细胞 *PIGK* 突变性状

PB 转座子系统的在基因工程中的优点就是可以通过表达 *PB* 转座酶很容易的将 *PB* 转座子移除，因此把插入位点恢复到起始状态并不留任何痕迹。一开始插入基因组的 PIGK 两侧的包含了 FRT 和 *PB* 转座子序列，所以 PIGK 可以被 FLP 重组酶和 *PB* 转座酶再次切除，见图 5(a)。除此之外，puroΔTK 可以用来作为基因插入或移除的筛选标签。PIGK 和 puroΔTK 移除的细胞对核苷类似物 1-(2-deoxy-2-fluoro-1-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil(FIAU)具有抗性。当 FLP 重组酶或 *PB* 转座酶转染 G36 细

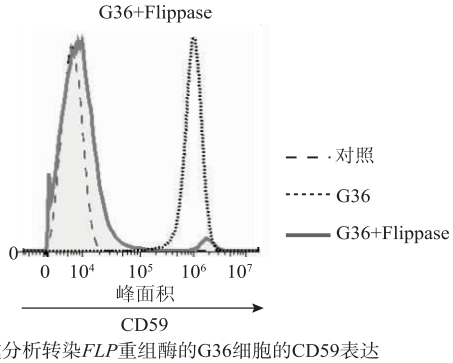
胞，紧接着用 FIAU 处理，流式分析细胞表面的 CD59，结果显示处理后的细胞又恢复到 PIGK 敲除状态，说明 PIGK 被准确的切除，见图 5(b)。这些数据表明，G36 细胞可以很容易的从 GPI 锚定蛋白表达状态转化到 GPI 锚定蛋白非表达的状态，见图 6。



(a)PB转座酶和FLP重组酶移除PIGK



(b)流式分析转染*PB*转座酶的G36细胞的CD59表达



(c)流式分析转染*FLP*重组酶的G36细胞的CD59表达

图 5　*PB* 转座酶或 FLP 重组酶调控 GPI 锚定蛋白的表达或不表达

Fig. 5　Conversion of GPI–positive to GPI–negative cells by induction of PBase or FLP recombinase

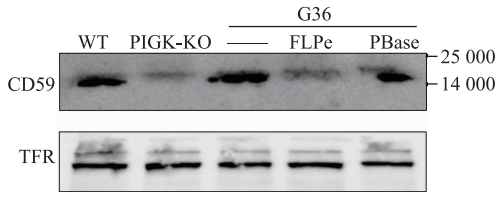


图 6　GPI 锚定蛋白的免疫印迹结果

Fig. 6　Western –blot results of GPI –anchored protein CD59

3 结　语

作者开发了一个基于 *PB* 转座子系统调控细胞膜表面 GPI 锚定蛋白表达的系统。利用 CRISPR / Cas9，成功获得 *PIGK* 敲除细胞。由于 PIGK 负责在内质网中把 GPI 转移到新生蛋白质上面[21]，所以 *PIGK* 敲除细胞表面不能表达 GPI 锚定蛋白。通过 PB 转座子系统，PIGK 恢复表达。获得了一株 *PB* 回补的 PIGK 突变细胞株 HEK293pB–PIGK–G36，该细胞株可以很容易的从 GPI 锚定蛋白表达细胞到不表达的转化。在这个细胞株中，过表达 *PB* 转座酶和 FLP 重组酶可以再次把 PIGK 移除。当细胞表达 *PB* 转座酶时，整个 *PB* 转座子都能够被移除，然而表达 FLP 重组酶时，来自于质粒上的部分片段仍会残留[24]。本研究构建的细胞株可以调控 GPI 锚定蛋白的表达，该系统可以用来研究 GPI 锚定蛋白的生理功能，如结合并响应病原微生物、毒素的感染。通常情况下细胞就是通过细胞膜表面的 GPI 锚定蛋白识别一些细菌和毒素。除此之外，该系统还可以通过依赖于 PIGK 基因，将感兴趣的蛋白以 GPI 锚定蛋白的形式表达到细胞膜表面，也可以再次从细胞膜表面移除。该系统将会有很高的应用价值。

参考文献：

[1] EISENHABER B，BORK P，EISENHABER F. Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life：analysis of protein sequence data from complete genomes[J]. **Protein Engineering**，2001，14(1)：17-25.

[2] FUJITA M，KINOSHITA T. Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins[J]. **FEBS Letters**，2010，584(9)：1670-1677.

[3] PALADINO S，LEBRETON S，ZURZOLO C. Trafficking and membrane organization of GPI-Anchored proteins in health and diseases[J]. **Current Topics in Membranes**，2015，75(269.

[4] ZURZOLO C，SIMONS K. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins：Membrane organization and transport [J]. **Bba – Biomembranes**，2016，1858(4)：632-639.

[5] KINOSHITA T. Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol[J]. **P Jpn Acad B–Phys**，2014，90(4)：130-143.

[6] MENON A K. Glycosylphosphatidylinositol Anchors[J]. **Encyclopedia of Biological Chemistry**,2013,476-478.

[7] MAEDA Y,KINOSHITA T. Structural remodeling,trafficking and functions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins [J]. **Prog Lipid Res**,2011,50(4):411-424.

[8] NG B G,FREEZE H H. Human genetic disorders involving glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors and glycosphingolipids (GSL)[J]. **Journal of Inherited Metabolic Disease**,2015,38(1):171-178.

[9] FENG H,ZHANG H,DENG J S,et al. Incorporation of a GPI-anchored engineered cytokine as a molecular adjuvant enhances the immunogenicity of HIV VLPs[J]. **Scientific Reports**,2015,5:17-21.

[10] HE Bingfang,MI Lan,CHEN Wenhua. Research advances in mechanisms of protein secretion and secretory expression of recombinant protein in *E.coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(6):561-569.(in Chinese)

[11] ELICK T A,BAUSER C A,FRASER M J. Excision of the piggyBac transposable element in vitro is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase[J]. **Genetica**,1996,98(1):33-41.

[12] FRASER M J,COSZCZON T,ELICK T,et al. Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera[J]. **Insect Mol Biol**,1996,5(2):141-151.

[13] LI X H,BURNIGHT E R,COONEY A L,et al. piggyBac transposase tools for genome engineering[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2013,110(25):2279-2287.

[14] YUSA K. piggyBac Transposon[J]. **Microbiology Spectrum**,2015,3(2):MDNA3.

[15] WOODARD,LAUREN E,WILSON,et al. piggyBac-ing models and new therapeutic strategies[J]. **Trends in Biotechnology**,2015,33(9):525.

[16] DING S,WU X,LI G,et al. Efficient transposition of the piggyBac(PB) transposon in mammalian cells and mice[J]. **Cell**,2005,122(3):473.

[17] MALI P,ESVELT K M,CHURCH G M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology[J]. **Nature Methods**,2013,10(10):957-963.

[18] POTTER C J,LUO L. Splinkerette PCR for mapping transposable elements in Drosophila[J]. **PloS One**,2012,5(4):e10168.

[19] XIE F,YE L,CHANG J C,et al. Seamless gene correction of β-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac[J]. **Genome Research**,2014,24(9):1526-1533.

[20] CHEN R,UDENFRIEND S,PRINCE G M,et al. A defect in glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase activity in mutant K cells is responsible for their inability to display GPI surface proteins[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,1996,93(6):2280.

[21] YU J,NAGARAJAN S,KNEZ J J,et al. The affected gene underlying the class K glycosylphosphatidylinositol (GPI) surface protein defect codes for the GPI transamidase[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,1997,94(23):12580.

[22] WANG W,BRADLEY A,HUANG Y. A piggyBac transposon-based genome-wide library of insertionally mutated Blm-deficient murine ES cells[J]. **Genome Research**,2009,19(4):667-673.

[23] LI X,BURNIGHT E R,COONEY A L,et al. piggyBac transposase tools for genome engineering[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2013,110(25):E2279.

[24] TAKEUCHI T,NOMURA T,TSUJITA M,et al. Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting[J]. **Biochemical & Biophysical Research Communications**,2002,293(3):953-957.