

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00371

可经米非司酮诱导的真核表达载体的构建与鉴定

陈 坚^{1,2}, 薛绪潮^{2*}, 方国恩², 苏长青³, 钱其军³

1. 解放军第81医院肿瘤外科, 南京 210002
2. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433
3. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438

[摘要] **目的:**构建一种可经米非司酮诱导的真核表达载体,并用荧光素酶报告基因鉴定其调控作用。**方法:**利用分子生物学技术,将萤火虫荧光素酶 LUC 基因和启动子,以及米非司酮调控系统构建成为单一的质粒载体 pDC-RULUC,为减少两个转录单元之间的潜在干扰,加入了 1.2 kb 的绝缘子。通过 PCR 扩增和限制性酶切及测序分析鉴定载体的正确性。利用 Lipofectamine2000 试剂盒转染载体 pDC-RULUC 至体外培养的 SW620 细胞,将载体 pGL3-Control 和 pGL3-Basic 的转染分别设为阳性和阴性对照组,各组均同时转染 pRL-TK 载体作为内参照。实验组细胞在不同浓度 (0 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-10} mol/L) 的米非司酮培养液中孵育 48 h 后,采用双荧光素酶报告基因测试系统检测荧光素酶相对活性。复孔组则予去除培养液中的米非司酮并继续孵育 48 h 后行荧光素酶相对活性检测。**结果:**PCR 和限制性酶切及测序均证实了载体的正确性。加入诱导剂米非司酮后,荧光素酶的相对活性随着培养液中米非司酮的浓度增高而增加,当米非司酮浓度达到 1×10^{-6} mol/L 时,最高可以实现荧光素酶的 50 余倍的表达,而去除诱导剂米非司酮后,几乎检测不到报告基因的表达。**结论:**成功构建了新型的米非司酮诱导调控系统载体,可以在体外实现对目的基因表达的有效调控,为进一步的基因调控研究和基因治疗奠定了基础。

[关键词] 米非司酮;诱导表达;调控;真核表达载体

[中图分类号] Q 78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0371-05

Construction and identification of a mifepristone inducible eukaryotic expression vector

CHEN Jian^{1,2}, XUE Xu-chao^{2*}, FANG Guo-en², SU Chang-qing³, QIAN Qi-jun³

1. Department of Oncosurgery, No. 81 Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, China
2. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433
3. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a mifepristone (an oral nontoxic chemical)-inducible eukaryotic expression vector and to evaluate its regulatory effect *in vitro* using luciferase reporter gene. **Methods:** Vector pDC-RULUC, which contains firefly luciferase reporter gene, promoter and mifepristone-inducible system, was constructed by molecular biological methods. A 1.2 kb insulator was inserted to reduce the interference between two transcription units. The vector was verified by PCR, restriction enzyme digestion, and sequencing. pDC-RULUC was used to transfect SW620 cells using Lipofectamine2000. Cells transfected with pGL3-Control and pGL3-Basic were used as positive and negative controls, respectively. Cotransfectant with pRL-TK renilla luciferase reporter vector was used as internal control. Cells of experimental group were incubated for 48 h in presence of different concentrations of mifepristone after transfection and were harvested for luciferase assay by using the Dual-Luciferase Reporter Assay System. Half of the wells were replaced with fresh medium and were measured after another 48 h. **Results:** The recombinant plasmid vector was identified by digestion with different enzyme restrictions, PCR and sequencing analysis. The relative activity increased with the increase of mifepristone concentration. When the concentration of mifepristone reached 1×10^{-6} mol/L, the relative activity increased to approximately 50 folds of the original. No significant luciferase activity was detected when the mifepristone was removed. **Conclusion:** We have successfully established mifepristone-regulated eukaryotic expression vector.

[收稿日期] 2007-07-10 **[接受日期]** 2008-02-22

[基金项目] 国家自然科学基金(30571830). Supported by National Natural Science Foundation of China(30571830).

[作者简介] 陈 坚, 博士, 主治医师. E-mail: chenbond@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070573, E-mail: xuexch@163.com

which can be used for controllable gene expression *in vitro*, providing a way for gene regulation and gene therapy.

[KEY WORDS] mifepristone; inducible expression; regulation; eukaryotic expression vector

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(4): 371-375]

对目的基因进行有效调控,使其安全有效地表达,一直是基因治疗的难点和热点问题。对目的基因的表达时间和表达水平的精确调控,不仅能提高基因治疗的安全性,而且能使基因表达控制在有效作用浓度范围内,从而避免较大的全身毒性。于是生物学家们开发出了多种新型的人工诱导表达系统^[1],其中,米非司酮诱导调控系统是以人孕酮受体的突变体为核心,以临床常用的小分子药物为诱导剂,具有较多的优势,其应用日益广泛^[2]。

本研究成功构建成了带有米非司酮诱导调控系统的真核表达载体,并用荧光素酶报告基因,验证了其体外的诱导调控表达效果。现将研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 细胞株和质粒 HEK293 细胞株购自加拿大 Microbix Biosystems 公司; pBluescript SK(-)、pClon9-INS-hCMV、质粒均为第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室保存;萤火虫荧光素酶质粒 pGL3-Control、pGL3-Basic,海肾荧光素酶质粒 pRL-TK 购自 Promega 公司;含有反式作用调控因子和 Gal4 杂合启动子两个组件的质粒 pRS 由西班牙 Navarra 大学医学院钱程教授惠赠。

1.2 试剂和仪器 各种限制性内切酶购自 New England Biolab 公司;诱导剂米非司酮购自 Sigma 公司;DNA 连接试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;新生小牛血清购自 Gibco 公司;双荧光素酶报告基因测试系统购自 Promega 公司;真核细胞转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invetrogen 公司;LB-9506 型 Luminometer(Berthold Technologies) PCR 仪(德国 BIOMETRA 公司);Napc05420 二氧化碳孵箱(法国 JOAVN 公司);6 孔板(丹麦 NUNC 公司)。

1.3 引物 PCR 引物设计采用 OLIGO 分析软件在计算机上进行,引物由 Invetrogen 公司合成。萤火虫荧光素酶(LUC)基因上游引物 5'-TTT TCC GTC ATC GTC TTT CC-3',下游引物 5'-ATC CAT CTT GCT CCA ACA CC-3'。

1.4 载体构建流程 利用分子生物学技术,将 LUC 基因和启动子,以及米非司酮调控系统构建成为单一的质粒载体 pDC-RULUC,为减少 2 个转录单

元之间的潜在干扰,加入了 1.2 kb 的绝缘子。载体构建流程如下:(1)pGL3-Basic 含有 LUC 序列,Spe I 和 Sal I 双酶切下 LUC 基因片段,插入 pB-BGH-INS-hCMV 的 Spe I 和 Sal I 位点之间,构成 pB-BGH-INS-hCMV-LUC 载体。(2)pB-BGH-INS-hCMV-LUC 用 Nhe I 和 Kpn I 切下的 BGH-INS-hCMV-LUC 片段,插入 pRS-17 质粒于 Nhe I 和 Kpn I 位点,重组质粒命名为 pRS-RULUC。(3)Not I 单酶切下 pRS-RULUC 中的调控表达框和 LUC 基因表达框部分装入 pDC312 载体的 Not I 位点中,构建成 pDC-RULUC。

1.5 载体鉴定 分别用内切酶 Not I 和 Kpn I + Kpn I 行酶切鉴定,用 BGH PolyA 引物行 PCR 鉴定,pDC-RULUC 测序鉴定由 Invetrogen 公司完成。

1.6 报告载体瞬时转染 将生长状态良好的 SW620 细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板中,待细胞完全贴壁生长至 60%~80%融合时进行质粒转染。将载体 pGL3-Control 和 pGL3-Basic 的转染分别设为阳性和阴性对照组,各组均同时转染 pRL-TK 载体作为内参照。具体方法:在 Lipofectamine2000 的介导下,按等摩尔浓度将 pGL3-Control、pGL3-Basic 和 pDC-RULUC 与内参质粒 pRL-TK 共转染 SW620 细胞,转染程序按 Lipofectamine2000 操作说明书进行。质粒的用量为 $2 \mu\text{g}$ /孔,内参照质粒用量为 $0.1 \mu\text{g}$ /孔,共转染后培养细胞 24 h,予 6 个处理组内加入一定量的米非司酮,使培养液的药物浓度分别达到 0 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-10} mol/L,继续孵育 48 h 后行荧光素酶检测,而所设复孔的第二批实验细胞则予更换新的 RPMI 1640 培养液后继续孵育 48 h 后检测荧光素酶活性。

1.7 双荧光素酶报告基因检测 采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定报告基因的表达水平。实验步骤简述如下:弃去 6 孔细胞培养板中的培养液,用 PBS 洗涤细胞 2 次,向每一孔中加入 $500 \mu\text{l}$ 的被动裂解液在室温轻轻震荡 15 min 后,收集细胞裂解液。取 $20 \mu\text{l}$ 的细胞裂解液至荧光测定管中,加入 $100 \mu\text{l}$ 萤火虫检测试剂 II (LAR II),混匀后用 Luminometer 荧光计量仪测定 LUC 的活性,最后加入 $100 \mu\text{l}$ 的 Stop&Glo 试剂,同样检测海肾荧光素酶的活性,每一裂解样品经 3 次检测后取其平均值,

计算 LUC 的表达值与内对照海肾荧光素酶表达值的比值,并以每批中的阴性对照组为基数,计算其归一的活性变化倍数。具体操作步骤参见 Promega 公司的双荧光素酶报告基因测试系统检测试剂盒说明书。

1.8 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 10.0 软件包处理实验数据,行方差检验各组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒测序鉴定 重组质粒的各元件如图 1 所示,对质粒的主要元件,包括反式作用调控因子(Regulator)和 Gal4 杂合启动子(Gal4E1b)、LUC、绝缘子(INS)、hCMV 启动子,均送 Invetrogen 公司完成测序,结果证实与 GenBank 报道完全符合(测序图略)。

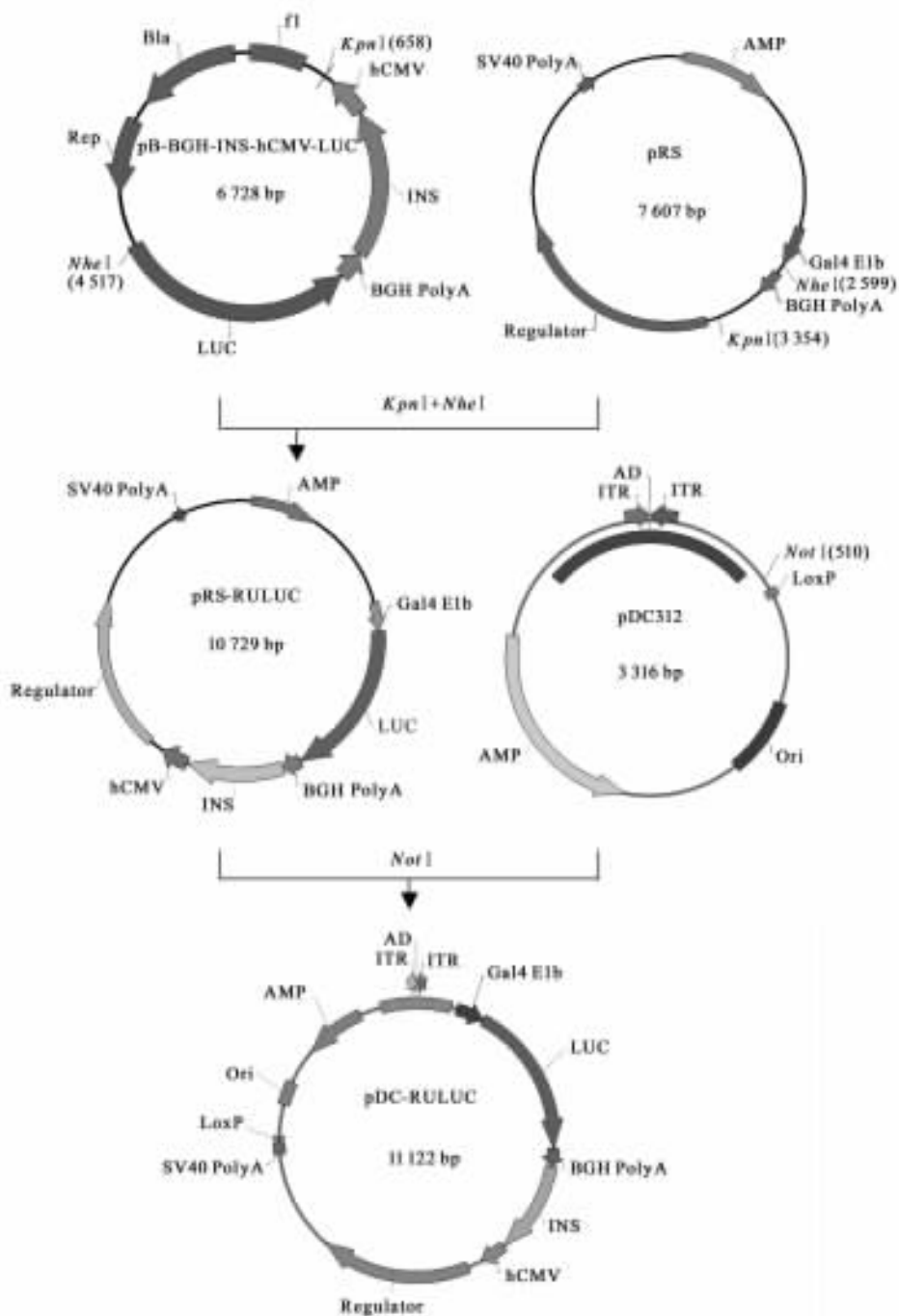


图 1 质粒 pDC-RULUC 构建主要流程图

Fig 1 Route for construction of pDC-RULUC vector

2.2 重组载体 pDC-RULUC 的酶切鉴定 重组质粒 pDC-RULUC 予 *Bgl* II 酶切可得 3 697、3 440、2 824、1 161 bp 4 个片段,其中 3 697 bp、3 440 bp 两个片段重合,*Kpn* I 酶切可得 7 545 bp、3 577 bp 片段,*Spe* I 酶切可得 11 122 bp 片段,凝胶电泳结果见图 2,实验结果与设计相符,证明载体构建正确。

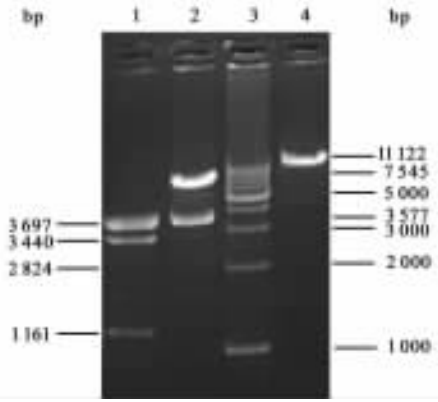


图 2 重组载体 pDC-RULUC 酶切鉴定图
Fig 2 Identification of pDC-RULUC vector by restriction enzyme digestion

1: Enzyme digestion with *Bgl* II; 2: Enzyme digestion with *Kpn* I; 3: D1000 ladder marker; 4: Enzyme digestion with *Spe* I

2.3 PCR 鉴定 用 LUC 基因引物扩增鉴定重组质粒 pDC-RULUC,扩增后可得 416 bp 的特异性条带,与阳性对照一致,阴性对照无特异性条带,进一步证实 LUC 基因片段插入正确,凝胶电泳结果见图 3。

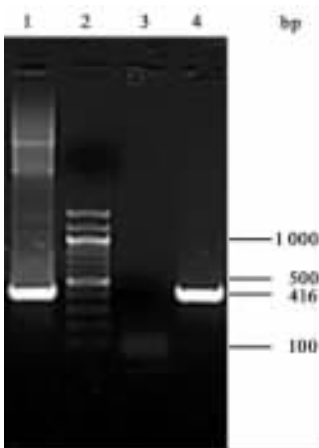


图 3 重组载体 pDC-RULUC PCR 扩增鉴定
Fig 3 Identification of pDC-RULUC vector by PCR amplification

1: Positive control; 2: 1 kb marker; 3: Negative control; 4: PCR assay

2.4 报告基因的表达 测定阳性和阴性对照及重组质粒 pDC-RULUC 经米非司酮诱导后的各组 LUC 的表达值 F,同时测定各组内对照海肾荧光素酶表达值 R,并计算 F : R 比率,并以每批中的阴性

对照组为基数,计算其归一的活性变化倍数。结果如图 4 所示。从图 4 可见,没有加入诱导剂米非司酮时,质粒 pDC-RULUC 有少量的本底表达。加入米非司酮时,萤火虫荧光素酶的相对活性(F : R)在一定范围内诱导剂的浓度增加而升高,存在明显的剂量反应关系,当米非司酮浓度达到 1×10^{-6} mol/L 时,质粒的表达效能达到最大,萤火虫荧光素酶的相对活性是其基础表达的约 50 倍,此时继续增加米非司酮浓度而 F : R 值不再升高。经方差分析显示米非司酮诱导后荧光素酶基因的表达与阴性对照组的差异具有显著性($P < 0.01$)。第二批实验组(96 h)的结果显示,各剂量组的相对荧光素活性与阴性对照组无显著差异($P > 0.05$),表明去除诱导剂后调控系统关闭,荧光素酶基因的表达停止。

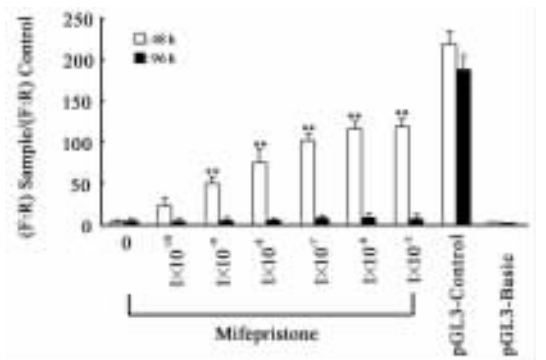


图 4 米非司酮诱导重组质粒 pDC-RULUC 的表达
Fig 4 Expression of pDC-RULUC vector induced by mifepristone

** $P < 0.01$ vs pGL3-Basic group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

为了更好地研究基因的功能和更安全地进行基因治疗,国内外学者对生物基因的调控作了大量的研究,并开发出基因诱导表达调控系统,实现了准确地控制基因定时定量的转录和表达。早期可诱导基因表达系统有重金属离子、金属硫蛋白、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷酶(ITPG)等,这些方案中存在基础表达差、背景表达很高、诱导剂的毒性、具有多重效应、诱导的效能不足等诸多缺点^[3]。为了解决这些问题,又构建出了多种新型的可诱导表达系统,提高了对目标基因调控的特异性和安全性,米非司酮诱导调控系统是目前比较成熟的诱导表达系统之一,它以反式作用调控因子 GLVP 为核心,以小分子药物米非司酮作诱导剂,通过诱导剂的加入的时间和剂量,实现对目的基因的精确调控。

米非司酮诱导调控系统是基于酵母中 Gal4-UAS 系统调节半乳糖代谢相关基因的表达的原理,

于1994年由Wang等^[4]最先构建成功。该调控系统由反式作用调控区和目的基因区以及诱导剂米非司酮3个部分组成(如图1所示)。反式作用调控区包括任意启动子和嵌合式反式激活因子GLVP,其中GLVP由酵母的半乳糖苷酶基因的转录激活因子Gal4的DNA结合域(Gal4DBD)、单纯疱疹病毒蛋白VP16激活区(VP16AD)和孕酮受体突变体改良后的C末端配体结合区组成^[5]。目的基因区是指4个Gal4上游激活序列串联体(UAS)和最小启动子调控下的目的基因,其中常用的最小启动子为腺病毒E1b基因中的TATA盒或胸腺嘧啶脱氧核苷激酶启动子TK,UAS串联体由4个相同的17bp序列构成,每个序列都呈两侧对称,当其和一个Gal4二聚体结合,那么转录激活是低水平的,若4个序列都和Gal4二聚体结合,则表达达到最高水平,因而Gal4上游激活序列的4个串联体可在这一系统中提供最大的转录效能。调控系统中诱导剂米非司酮是一种孕酮拮抗剂,是在受体水平抗孕激素和糖皮质激素的一种人工合成类固醇^[6]。米非司酮进入组织细胞的能力较强,可以快速激活系统,并在体内可以被较快地代谢,半衰期较短,该系统中作为诱导剂所需的剂量(0.1~0.5 mg/kg),远较其在医疗中用做抗孕酮药物的剂量(10 mg/kg)低。即使是调控系统达到最大效应时的剂量也远低于临床使用剂量,对人体来说是十分安全的^[7]。

米非司酮调控系统的核心部件是人孕酮受体突变体,是将人野生型孕酮受体在891位点平头切断而获得的,突变体比野生型受体少42个氨基酸。由于孕酮结合位点属于缺失的下游,米非司酮结合区位于上游位置,失去了与孕酮及其他内源激素结合的能力,但仍可与孕酮拮抗物米非司酮结合^[5]。在体内没有诱导剂分子的情况下,GLVP是单体形式,没有活性;在有非内源性的药物米非司酮诱导下,调控蛋白产生构象改变,从而使反式作用调控因子GLVP发生构象变化形成有活性的二聚体,并与最小启动子上游的UAS四聚体结合,激活启动子从而开启下游基因转录,而内源激素因无法与突变的配体结合区结合而不能开启转录^[8]。

Promega公司的双荧光素酶报告基因测试系统是一种给合实验萤火虫荧光素酶报告基因与内对照海肾荧光素酶报告基因检测的双报告基因技术,试剂盒提供的被动裂解液,可快速、高效地将培养在多孔板中的细胞裂解并定量溶解2种荧光素酶,在同一管内即可完成操作,检测快速、简便^[9]。内对照海肾荧光素酶的共转染使可使实验值正态化,可以把

培养细胞的数目和活力的差别、细胞转染和裂解效率的不同等这些可能削弱实验准确性的内在因素降到最小,还可以通过计算各批次荧光素酶的归一活性倍数,消除各批次检测所致的误差^[10]。

本研究以萤火虫荧光素酶作报告基因,用DLR检测系统证实了这一诱导调控系统的诸多优势:(1)系统本底表达低,在没有诱导剂米非司酮时,调控系统只有极少量的LUC基因表达。(2)系统安全性好,系统表达的调控蛋白和调控系统达到最大效应时的米非司酮用量对机体无明显毒性,在体外未发现导致实验细胞的死亡。(3)诱导效率高,调控系统激活后,最大效应时可达基础表达的约50倍。(4)良好的剂量相关性,调控系统中目的基因的表达在一定范围内与诱导剂的浓度成正相关。(5)系统具有可逆性,去除诱导剂后,调控系统恢复至关闭状态,基因的表达停止。

研究表明,本实验成功构建了米非司酮诱导调控表达的真核载体,可以通过给予不同剂量的米非司酮实现目的基因的不同水平的表达,具有本底表达低、诱导效率高、毒性小等诸多优点,为基因调控研究和基因治疗提供了一个良好的工具。

[参考文献]

- [1] Weber W, Fussenegger M. Pharmacologic transgene control systems for gene therapy[J]. *J Gene Med*, 2006, 8: 535-556.
- [2] Qian C, Liu X Y, Prieto J. Therapy of cancer by cytokines mediated by gene therapy approach[J]. *Cell Res*, 2006, 16: 182-188.
- [3] Vilaboa N, Voellmy R. Regulatable gene expression systems for gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*, 2006, 6: 421-438.
- [4] Wang Y, O'Malley B W Jr, Tsai S Y, O'Malley B W. A regulatory system for use in gene transfer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 8180-8184.
- [5] Tsai S Y, O'Malley B W, DeMayo F J, Wang Y, Chua S S. A novel RU486 inducible system for the activation and repression of genes[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 30(1-3): 23-31.
- [6] Leonhardt S A, Edwards D P. Mechanism of action of progesterone antagonists[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2002, 227: 969-980.
- [7] Kyrkanides S, Miller J H, Bowers W J, Federoff H J. Transcriptional and posttranslational regulation of Cre recombinase by RU486 as the basis for an enhanced inducible expression system[J]. *Mol Ther*, 2003, 8: 790-795.
- [8] Wang Y, Xu J, Pierson T, O'Malley B W, Tsai S Y. Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator[J]. *Gene Ther*, 1997, 4: 432-441.
- [9] Yin W, Xiang P, Li Q. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system[J]. *Anal Biochem*, 2005, 346: 289-294.
- [10] McNabb D S, Reed R, Marciniak R A. Dual luciferase assay system for rapid assessment of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Eukaryot Cell*, 2005, 4: 1539-1549.