

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00630

## 正向和反向 SV40 poly(A) 信号序列对上游基因表达的影响

侯 兵<sup>1,2</sup>, 金华君<sup>3</sup>, 刘文超<sup>1\*</sup>, 钱其军<sup>3</sup>, 吕赛群<sup>3</sup>

1. 第四军医大学西京医院肿瘤科, 西安 710032
2. 第二军医大学长海医院预防保健科, 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** 研究正向和反向 SV40 poly(A) 信号在 3 种常用细胞株中对上游基因表达的调控作用, 为基因表达研究中载体 poly(A) 信号的选择提供依据。 **方法** 将 F-Luc 与 R-Luc 两种荧光素酶基因插入同一质粒, 构建带有双荧光素酶报告基因的载体 Dual-Luc。在 F-Luc 基因后分别插入正向和反向互补的 SV40 poly(A) 信号序列, 得到 2 个带有不同 SV40 poly(A) 信号的载体 Dual-Luc2、Dual-Luc3。将其分别转染常用的 3 类细胞株 293、L-02 和 HeLa 细胞, 应用双荧光素酶标仪和反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法测定报告基因(F-Luc)的表达量, 以 R-Luc 基因的表达量作对照。 **结果** 成功构建携带正向和反向互补 SV40 poly(A) 序列的双荧光素酶载体 Dual-Luc2、Dual-Luc3; 双荧光素酶标仪检测表明, 在 293 细胞中, Dual-Luc2、Dual-Luc3 的 F-Luc/R-Luc 比值分别为  $3.25 \pm 0.43$ 、 $3.03 \pm 0.14$ , 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 在 L-02 细胞中, Dual-Luc2、Dual-Luc3 的 F-Luc/R-Luc 比值分别为  $6.16 \pm 0.39$ 、 $3.83 \pm 0.39$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在 HeLa 细胞中, Dual-Luc2、Dual-Luc3 的 F-Luc/R-Luc 比值分别为  $1.21 \pm 0.10$ 、 $0.66 \pm 0.02$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。RT-PCR 检测与荧光素酶检测结果一致。 **结论** 不同细胞中 poly(A) 信号序列对上游基因的调控作用存在差异; poly(A) 信号对上游基因的调控作用主要发生于转录水平。

**[关键词]** SV40 poly(A) 加尾信号序列; 基因表达; 双荧光素酶报告系统

**[中图分类号]** Q 782; Q 786 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0630-04

### Influence of two kinds of SV40 poly(A) signals on upstream gene expression

HOU Bing<sup>1,2</sup>, JIN Hua-jun<sup>3</sup>, LIU Wen-chao<sup>1\*</sup>, QIAN Qi-jun<sup>3</sup>, LÜ Sai-qun<sup>3</sup>

1. Department of Oncology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China
2. Department of Preventive Health Care, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Laboratory of Gene and Viral Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the regulatory effects of two kinds of SV40 poly(A) signals on the upstream gene expression in three cell lines, so as to provide theoretical evidence for selection of poly(A) of vectors. **Methods** A dual luciferase reporter vector Dual-Luc was constructed, and two SV40 poly(A) signal sequences were inserted in the downstream of the R-Luc gene separately. Then the two diverse dual luciferase reporter gene vectors Dual-Luc2 and Dual-Luc3 were transfected into 293, L-02, and HeLa cells. The relative quantities of the target gene (F-Luc) to control gene (R-Luc) were measured by Dual-Glo™ Luciferase Assay System and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **Results** The two Dual-Luciferase vectors (Dual-Luc2 and Dual-Luc3) were successfully constructed. Dual-Glo™ Luciferase Assay showed that the mean F-Luc/R-Luc values were  $3.25 \pm 0.43$  and  $3.03 \pm 0.14$  in Dual-Luc2 and Dual-Luc3 transfected 293 cells ( $P > 0.05$ ),  $6.16 \pm 0.39$  and  $3.83 \pm 0.39$  in L-02 cells ( $P < 0.05$ ), and  $1.21 \pm 0.10$  and  $0.66 \pm 0.02$  in HeLa cells ( $P < 0.05$ ), respectively. The results of RT-PCR were consistent with those of luciferase assay. **Conclusion** The two kinds of SV40 poly(A) signals have different regulatory effects on the upstream gene expression in different cell lines. SV40 poly(A) signals regulate the upstream gene expression at the transcriptional stage.

**[Key words]** SV40 poly(A) signal; gene expression; dual luciferase reporter system

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(6):630-633]

**[收稿日期]** 2009-12-10 **[接受日期]** 2010-04-12

**[基金项目]** 国家高技术研究发展计划重点项目(“863 计划”, 2007AA021108). Supported by National High Technology Research and Development Program of China(“863” Program, 2007AA021108).

**[作者简介]** 侯 兵, 硕士生. E-mail: liuqianhan@msn.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 029-84775407, E-mail: xjccancer@fmmu.edu.cn

真核生物 mRNA 转录完成后有一个加尾过程,即在 3'末端分裂处[poly(A)位点]加入一串腺嘌呤尾巴<sup>[1]</sup>,称为多聚腺苷酸化[poly(A) denylation]。除了哺乳动物组蛋白 mRNA 外<sup>[2]</sup>,几乎所有真核生物的 mRNA 分子中都带有 poly(A)尾<sup>[3]</sup>。Poly(A)尾对 mRNA 从核到细胞质的运输、后续翻译以及增强 mRNA 的稳定性都发挥重要作用,是基因表达调控的一个重要元件<sup>[4-7]</sup>。加尾过程由 poly(A)聚合酶催化完成,但 poly(A)添加部位并不直接位于转录终止位点,而是转录产物 3'末端一个特异性酶切除后的序列。该酶识别位点常位于加尾位点上游 13~20 碱基处,由切点上游 AAUAAA 及切点下游的 GUGUGUG 组成(单细胞真核生物除外)<sup>[7]</sup>,也称为 poly(A)加尾信号[poly(A) denylation signal, PAS]。

目前最常用的 PAS 是猴巨细胞病毒早期蛋白多聚腺苷酸加尾信号[simian virus 40 late poly(A) denylation signal, SV40 PAS],位于 SV40 病毒 T 抗原后,是 SV40 基因组中一段 2.37 kb *Bam*H I-*Bcl* I 的酶切片段<sup>[8]</sup>。经过比较,我们发现常用的表达载体中存在两种类型的 SV40 PAS 信号序列,其大部分序列完全反向互补。鉴于此,我们分别构建正反向 SV40 PAS 序列调控下的双荧光素酶载体,转染 3 类常用细胞株,通过双荧光素酶以及反转录 PCR 方法,检测报告基因 F-Luc 在蛋白及 RNA 水平的相对表达量,研究正反向 SV40 PAS 对上游报告基因表达的影响,为基因表达研究中载体 poly(A)信号的选择提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料及试剂

pGL3-Promoter 及 pRL-TK 质粒均购自 Promega 公司, pDC315 质粒购自北京本元正阳公司。人胚肾细胞株 293 购自加拿大 Microbix Biosystem 公司,人肝脏正常细胞株 L-02 及子宫颈癌细胞株 HeLa 均购自中国科学院上海生物化学与细胞研究所。质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司,实验用限制性内切酶及连接酶均购自 NEB 公司,回收试剂盒 Nucleospin Extract II 购自 MACH-EREY-NAGEL 公司,高保真 PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司,双荧光素酶检测系统购自 Promega 公司,反转录试剂盒及反转录 RT-PCR 试剂盒均购自 Toyobo 公司。细胞培养基购自 Gibco 公司,孔径为 3.5 cm 的 6 孔板细胞培养皿购自美国 Cloning 公司,转染试剂盒 Polyfect Transfection Reagent 购自 Qiagen 公司。核酸蛋白质测定仪购自 Eppendorf 公司,PCR 仪购自 Biometra 公司,荧光素酶检测仪

Minilumat LB9506 购自德国 Berthold 公司,RT-PCR 仪 StepOne 购自 ABI 公司。

### 1.2 引物设计与合成

根据引物设计原则,应用 Vector NTI 软件中的 Primer 设计程序,获得引物序列,并且分别在引物 GT248、GT249 的 5'端引入酶切位点 *Bgl* II 和多克隆位点 *Kpn* I、*Sal* I、*Spe* I、*Sac* I,GT251 引入酶切位点 *Bgl* II;在 GT866 和 GT867 的 5'端分别引入酶切位点 *Sac* I 和 *Cla* I。具体序列如下,GT248:5'-GGA AGA TCT GCG ATC TGC ATC TCA ATT AGT CAG CAA CCA TAG TCC C-3';GT249:5'-GAG CTC ACT AGT GGG TCG ACG GTA CCA TTA CAC GGC GAT CTT T-3';GT250:5'-GGT ACC GTC GAC CCA CTA GTG AGC TCG TCG GGG CGG CCG GC-3';GT251:5'-GGA AGA TCT TTA TCG ATT TTA CCA CAT TTG TAG AGG TTT TAC TT-3';GT866:5'-GTG AGC TCT TCG AGC AAC TT-3';GT867:5'-GCA TCG ATG GAT CTT CGA TG-3';GT721:5'-TCA AAG AGG CGA ACT GTG TG-3';GT722:5'-GCC ATC CAT CCT TGT CAA TC-3';GT723:5'-TTT ATG GCG ACA TGT TGT GC-3';GT724:5'-ACC AGA TTT GCC TGA TTT GC-3';引物均由 Invitrogen 公司合成,并在使用前配制成 10 μmol/L 备用。

### 1.3 双荧光素酶载体的构建

以 pGL3-Promoter 质粒为模板,以 GT248、GT249 为引物,扩增 SV40 启动子至 F-Luc 终止密码子间的片段,以 GT250、GT251 为引物扩增 SV40 加尾信号序列。两者的扩增产物合并后作为模板,以 GT248、GT251 为引物,扩增后获得 pGL3-Promoter 载体从 SV40 启动子至 SV40 加尾信号序列间的片段,并突变原有的 *Xba* I 酶切位点,换以 *Kpn* I、*Sal* I、*Spe* I、*Sac* I 多克隆位点。PCR 片段经 *Bgl* II 单酶切,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,切胶回收目的片段,与 pRL-TK2 载体[由 pRL-TK 改造而来,删除原有 R-Luc 基因后的 SV40 PAS,换以 1 段人工合成的 poly(A)信号序列]*Bgl* II 单切后的线性片段相连,转化并挑选反向插入的阳性克隆,酶切鉴定并测序验证正确,获得包含萤火虫荧光素酶 (*photinus pyralis*, F-Luc) 和海肾荧光素酶 (*renilla luciferase reniformis*, R-Luc) 报告基因的载体 Dual-Luc2 (F-Luc 基因后为正向 SV40 PAS)。以 pDC315 质粒为模板,GT866、GT867 为引物,扩增该载体中的反向 SV40 PAS 序列,经 *Sac* I 和 *Cla* I 双酶切、电泳、回收,替换 Dual-Luc2 载体的正向 SV40 PAS 序列,获得另一双荧光素酶载体 Dual-Luc3 (F-Luc 基因后为反向 SV40 PAS)。

1.4 双荧光素酶的检测 取对数生长期 293、L-02 及 HeLa 细胞铺 6 孔板,设 3 个复孔,37°C CO<sub>2</sub> 培养箱 孵育 24 h 后,用 Qiagen 公司的 Polyfect 转染试剂分别 转染 Dual-Luc2 与 Dual-Luc3 质粒各 2 μg,37°C CO<sub>2</sub> 培 养箱内转染 48 h 后,吸去培养液,生理盐水清洗 2 次, 加入 500 μl 的 1×PLB 液裂解细胞,摇床振摇 15 min 后吸至 1.5 ml 的 EP 管内离心,取上清,根据 Progema 双荧光素酶检测试剂盒的说明,在 Minilumat LB9506 仪上检测 F-Luc/R-Luc 的比值。

1.5 RT-PCR 检测 分别用 Dual-Luc2 和 Dual-Luc3 质粒转染 293、L-02、HeLa 细胞,各设 3 个复孔。转染 48 h 后,吸去培养液,生理盐水清洗 2 次, 每孔中加入 1 ml TRIzol 裂解细胞,震荡混匀,室温 静置 5 min。每管加入氯仿 200 μl,剧烈震荡 15 s 混 匀,4°C 24 664×g 离心 15 min,吸取上层水相,加入 2 倍体积的无水乙醇混匀,4°C 24 664×g 离心 30 min,倒上清,加入 1 ml 75% 的乙醇洗涤沉淀,4°C 24 664×g 离心 3 min,倒上清,室温放置 3 min 晾 干,加入 40 μl 无 RNA 酶的 DEPC 水,溶解 RNA,应 用无 RNA 酶的 DNA 酶处理 1 h,纯化后重新溶解, 应用核酸蛋白质测定仪检测 RNA 浓度与纯度。取 上述 RNA 1 μg,应用 Quantscript RT Kit(cDNA 第

一链合成试剂盒)合成单链 cDNA,其操作步骤及方 法参考试剂盒说明书。应用 Toyobo 公司 RT-PCR 试剂盒,分别以 GT721 与 GT722、GT723 与 GT724 为引物,扩增 F-Luc、R-Luc 基因,以 R-Luc 表达量为 内参,定量检测 F-Luc/R-Luc 比值,具体操作参照试 剂盒说明书。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,检验 水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 2 种 SV40 PAS 的比较 SV40 PAS 是真核表 达载体中常用的加尾信号序列。然而,在载体构建 中我们发现,在常见通用载体中存在 2 种不同的 SV40 PAS, SV40 早期 PAS(SV40 early PAS)与 SV40 晚期 PAS(SV40 late PAS)。比较发现,这 2 种 SV40 PAS 大部分序列完全反向互补(图 1),我们 将其分别命名为 SV40 PAS(+)与 SV40 PAS(-)。 经 NCBI 数据库查找比对显示,Promega 公司开发 的 pGL、pRL 等系列载体采用 SV40 PAS(+),而 Invitrogen 公司开发的 pcDNA3.1、pENTR™系列载 体均采用 SV40 PAS(-)。结果暗示这 2 种 SV40 PAS 对上游基因的表达具有不同的调控特性。



图 1 SV40 PAS(+)与 SV40 PAS(-) 比对结果

Fig 1 Results of SV40 PAS(+) and SV40 PAS(-) by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

2.2 双荧光素酶载体的构建与改造 为研究 SV40 PAS(+)与 SV40 PAS(-)两种加尾信号序列对 上游基因表达调控的影响,我们构建了双荧光素酶 载体,将两个不同的荧光素酶 F-Luc 与 R-Luc 基因装 载到同一载体,以期互为参照,减少系统误差,定量 检测调控元件的作用差异。

按上述方法,本研究分别构建两个双荧光素酶 载体 Dual-Luc2、Dual-Luc3,R-Luc 基因后插入同一 人工 poly(A)信号序列,而在 F-Luc 基因后分别插 入 SV40 PAS(+)与 SV40 PAS(-)序列。构建的 载体具体图谱见图 2。

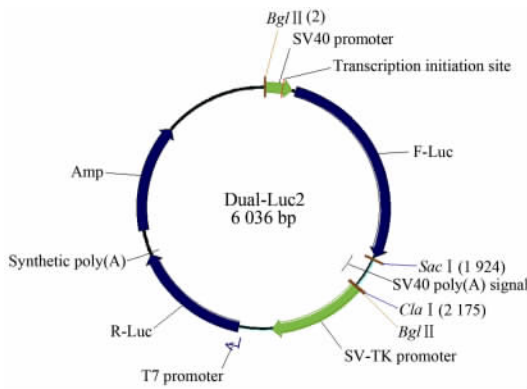


图 2 Dual-Luc2 载体图谱

Fig 2 Map of Dual-Luc2 vector

2.3 双荧光素酶的检测分析 Dual-Luc2 与 Dual-Luc3 的 F-Luc/R-Luc 比值,在 293 细胞中分别为  $(3.25 \pm 0.43)$  与  $(3.03 \pm 0.14)$ , 差异无统计学意义; L-02 细胞中分别为  $(6.16 \pm 0.39)$  与  $(3.83 \pm 0.39)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); HeLa 细胞中分别为  $(1.21 \pm 0.10)$  与  $(0.66 \pm 0.02)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.4 RT-PCR 检测分析 以 R-Luc 为内参,采用 RT-PCR 分别检测 293、L-02 和 HeLa 细胞中 F-Luc 和 R-Luc 基因。结果 Dual-Luc2 与 Dual-Luc3 的 F-Luc/R-Luc 比值,在 293 细胞中分别为  $(0.744 \pm 0.08)$  与  $(0.691 \pm 0.09)$ , 差异无统计学意义; L-02 细胞中分别为  $(1.231 \pm 0.08)$  与  $(0.481 \pm 0.05)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在 HeLa 细胞中分别为  $(1.214 \pm 0.09)$  与  $(0.720 \pm 0.06)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

Poly(A)加尾信号(PAS)参与真核 mRNA 3'端形成的重要过程,而 SV40 PAS 序列包含 3 个重要基序(2 个 U-rich 区和 1 个 G-rich 区),可以加强多聚腺苷酸化作用,是一种高效 poly(A)加尾信号,在各种真核表达载体中起着重要作用<sup>[9]</sup>。SV40 PAS 有两种,SV40 早期 PAS 与 SV40 晚期 PAS,这两种加尾信号序列都包含 AAUAAA,但大部分序列完全反向互补,存在于著名生物公司开发的多种系列表达载体中,暗示它们具有各自的优点。

为研究这 2 种 SV40 PAS 在不同细胞中对上游基因表达量的调控作用,我们构建了双荧光素酶报告基因载体系统。在该系统中,2 种荧光素酶基因(来源于萤火虫的 F-Luc 基因与来源于海肾的 R-Luc 基因)被装载在同一质粒。在分析过程中,可替换 F-Luc 基因的调控元件,而 R-Luc 基因的调控元件保持不变作为内参。相对于将 2 个荧光素酶基因插入 2 个不同的载体,共转染细胞的双荧光素酶检测系统,该系统可以消除转染质粒量的差异、转染过程的差异、转染细胞状态的差异等,大幅减少系统误差,准确量化调控元件的调控作用,因而是载体元件筛选的一种理想工具。

通过双荧光素酶与 RT-PCR 检测分析,本研究发现 293 细胞中正反向 SV40 poly(A)信号对上游

基因的调控无差异;L-02、HeLa 细胞中正反向 SV40 poly(A)信号对上游基因的调控作用差异显著,且正向 SV40 poly(A)序列优于 SV40 poly(A)序列,表明正反向 SV40 PAS 在不同细胞中对上游基因的表达量具有不同的调控作用,与我们的推测相符。有意思的是,在表达抗体的研究中发现,携带反向 SV40 PAS 的腺病毒在 L-02 细胞中的抗体表达量高于携带正向 SV40 PAS 的腺病毒,与此研究中的结果相反,暗示在质粒表达系统、病毒表达系统中,SV40 PAS 的调控作用可能并不一致,其具体机制有待于进一步探讨。在杆状病毒表达系统中,SV40 PAS 对上游基因的转录水平起促进作用,但对上游基因的翻译水平起抑制作用,表明 SV40 PAS 对上游基因表达量的调控作用具有两面性。因而,综合来讲在实际应用中,为获得所需基因的最大表达量,应注重 poly(A)加尾信号的筛选。

### [参考文献]

- [1] Natalizio B J, Muniz L C, Arhin G K, Wilusz J, Lutz C S. Upstream elements present in the 3'-untranslated region of collagen genes influence the processing efficiency of overlapping polyadenylation signals[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 42733-42740.
- [2] Dávila-López M, Samuelsson T. Early evolution of histone mRNA 3' end processing[J]. *RNA*, 2008, 14: 1-10.
- [3] Hunt A G, Xu R, Addepalli B, Rao S, Forbes K P, Meeks L R, et al. Arabidopsis mRNA polyadenylation machinery: comprehensive analysis of protein-protein interactions and gene expression profiling[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 220-235.
- [4] Zarudnaya M I, Kolomiets I M, Potyahaylo A L, Hovorun D M. Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 1375-1386.
- [5] Andreassi C, Riccio A. To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends[J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19: 465-474.
- [6] Régnier P, Hajnsdorf E. Poly(A)-assisted RNA decay and modulators of RNA stability[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2009, 85: 137-185.
- [7] Wickens M. How the messenger got its tail: addition of poly (A) in the nucleus[J]. *Trends Biochem Sci*, 1990, 15: 277-281.
- [8] Schek N, Cooke C, Alwine J C. Definition of the upstream efficiency element of the simian virus 40 late polyadenylation signal by using *in vitro* analyses[J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12: 5386-5393.
- [9] Hans H, Alwine J C. Functionally significant secondary structure of the simian virus 40 late polyadenylation signal[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 2926-2932.