

研究报告

应用人延伸因子 1 α 亚基启动子和人工转录激活因子提高外源基因在 CHO 细胞中的表达

来大志 翁少洁 于长明 齐连权 付玲 于婷 陈薇*

(北京微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 表达载体的设计对于提高外源基因在哺乳动物细胞中的表达量十分重要。而表达载体中最为重要的元件是启动子。一些常用病毒来源的启动子, 如巨细胞病毒即早期启动子 (P_{CMV-IE}) 仅在 S 期激活, 应用这类启动子表达外源蛋白需要宿主细胞不停增殖, 这对于连续持久大规模培养的宿主细胞不现实。而人延伸因子 1 α 亚基启动子 ($P_{EF-1\alpha}$) 不受细胞周期限制, 且启动子强度高于 P_{CMV-IE} , 对于大规模外源蛋白的生产较为理想。首先构建了基于 $P_{EF-1\alpha}$ 启动子的哺乳动物细胞表达载体 pED5, 在增殖缓慢的 CHO 细胞中, 此载体表达外源蛋白的能力是应用 P_{CMV-IE} 启动子表达载体的 4.1 倍。由于启动子一般仅能决定基因转录的本底水平, 而转录激活因子 (transcription activators) 对基因转录的影响更大, 所以另把两个人工转录激活结构域 AH 和 VP2 接到 λ 噬菌体 cI 蛋白的 C 端, 它们通过 cI 蛋白结合于已插入到 $P_{EF-1\alpha}$ 启动子的 TATA 框上游约 200 bp 的 λ 噬菌体 O_R2-O_R1 序列上, 而被“征募”到 $P_{EF-1\alpha}$ 启动子 TATA 框附近, 从而促进基因的转录。把上述元件均整合进一个表达载体中, 构建了两个新型表达载体 pER-AH 和 pER-VP2。pER-AH 表达外源蛋白的能力比不含转录激活因子的表达载体略高, 而 pER-VP2 表达外源蛋白的能力则比不含转录激活因子的表达载体高 2.7 倍。

关键词 转录激活因子, 启动子, 基因表达, cI 蛋白, CHO 细胞

学科分类号 Q78

外源蛋白在哺乳动物细胞中的表达量一般由以下几个因素决定: 载体在染色体上的整合位置、启动子的强度、转录产物的稳定性、mRNA 的翻译效率、目的蛋白的折叠效率以及目的蛋白的稳定性等。其中前四个因素均与表达载体的设计有关。所以合适的表达载体是决定外源蛋白在哺乳动物细胞中表达量的关键。启动子的强度对于基因的表达起着决定性的作用。在载体设计中, 一般采用巨细胞病毒即早期启动子 (P_{CMV-IE})、人延伸因子 1- α 亚基启动子 ($P_{EF-1\alpha}$) 和 Rous 肉瘤长末端重复序列等强启动子。这些病毒来源的启动子多为 S 期启动子, 意味着只有细胞不停地增殖分裂, 这些启动子才能发挥作用^[1-3]。在大规模细胞培养时, 细胞数量不可能无限制地增加, 因而在细胞培养周期的绝大多数时间内, 细胞处于增殖缓慢的状态, 这种状态有利于延长外源蛋白持续表达的时间。所以 P_{CMV-IE} 等启动子对于大规模培养细胞的表达效果较差。人延伸因子 1 α 亚基启动子 ($P_{EF-1\alpha}$) 不受细胞周期限制, 而且启动子强度甚至高于 P_{CMV-IE} , 对于大规模外源蛋白生产, $P_{EF-1\alpha}$ 可能更为理想。因而本研究我们拟构建以 $P_{EF-1\alpha}$ 作为启动子的表达载体, 并与以 P_{CMV-IE} 作为启动子的表达载体进行比较。

另外, 转录激活因子对于基因的转录也十分重要。真核生物基因转录由三个方面决定: 启动子、RNA 聚合酶以及把启动子和 RNA 聚合酶结合在一起, 以起始基因转录的普通转录因子 (general transcription factors), 包括 TF II A, TF II B, TF II D, TF II E, TF II F 和 TF II H 等。普通转录因子本身可以决定转录的起始点和方向, 但它们仅能起始低水平的本底转录。为了增加基因转录水平, 必需有基因特异的转录因子, 即转录激活因子 (transcription activators) 参与^[4]。转录激活因子由至少两个结构域组成: DNA 结合结构域和转录激活结构域。许多转录激活因子还有二聚化结构域, 使转录激活因子可以形成同二聚体、异二聚体、甚至多聚体, 以稳定其结构, 增强对 DNA 的结合力。转录激活因子被认为以一种“征募” (recruitment) 的方式激活基因转录^[5-8], 即转录激活因子的 DNA 结合结构域通过特定的结构 (锌指结构、亮氨酸拉链、HD 结构、HLH 结构等) 与启动子结合, 其激活结构域通过与普通转录因子直接结合,

* 通讯联系人。

Tel: 010-66948565, Fax: 010-63815273

E-mail: cw789661@yahoo.com

收稿日期: 2003-07-09, 接受日期: 2003-08-28

而介导转录起始复合物结合于启动子上,或增强转录起始复合物与启动子结合的强度,因而增强基因的转录。

$P_{EF-1\alpha}$ 和 P_{CMV-IE} 等用于外源基因表达的启动子都是很强的启动子,但它们起始的转录都是本底的转录。为了提高外源基因的表达量,可以通过一些天然或人工转录激活因子提高上述启动子的转录效率。例如, Hippenmeyer 等^[9]在 BHK 细胞中稳定表达单纯疱疹病毒 (HSV) VP16 蛋白 (同时是该病毒即早期启动子的转录激活因子,当病毒感染细胞时,启动即早期基因的表达),构建了一个高表达细胞系。置于 HSV 即早期启动子之后的外源蛋白基因,可以在该细胞系中得到很高水平的表达。但也有报道指出,VP16、NF- κ B 的 p65 亚基等转录激活因子在哺乳动物细胞中表达量较低,可能与对细胞产生较强的毒性有关^[10]。有些研究者致力于设计较小的人工转录激活因子,以利于其本身在细胞中表达;有的甚至足够小,可以穿过细胞膜和核膜,直接作用于被激活基因。如 Mapp 等^[11]设计的小分子人工转录激活因子,分子质量最小仅 4.2 ku。以化学合成的聚酰胺 (polyamide) 链替代 DNA 结合结构域,并通过一段柔软的 Linker 与激活结构域 AH 连接,构成一个完整的人工转录激活因子。聚酰胺链可以结合进 DNA 的小沟,并且可以设计出与特定 DNA 序列特异结合的聚酰胺链,因而对基因的激活具有特异性。AH 是一段人工设计的寡肽链 (PEFPGIELQELQELQALLQQ),当被“拉”近到启动子时,可以激活基因的转录^[12-14]。Ansari 等^[15]进一步用 VP16 中的一段 8 个氨基酸的短肽 VP1 (DFDLMLG) 或 VP1 的重复肽 VP2 (DFDLMLG-DFDLMLG) 替代 AH,构建了更小的人工转录因子,并且也表现出了很强的转录增强活性。Lu 等^[16]将酵母转录激活因子 Gal4 的激活结构域去除,以一个 6 肽库或 8 肽库替代激活结构域,并从肽库中筛选到了一系列人工转录激活因子,有的活性甚至远高于完整的 Gal4。

本研究中,我们通过融合于 λ 噬菌体 cI 蛋白的两个人工转录激活因子对提高载体表达外源基因的水平进行了尝试。

1 材料和方法

1.1 实验材料

二氢叶酸还原酶基因缺陷型中国仓鼠卵巢细胞 CHO-dhfr (DUKX-B11) 购自美国 ATCC (CRL-

9096), 培养于含有 HT (0.1 mmol/L hypoxanthine; 0.016 mmol/L thymidine) 的 IMDM-10% FBS (Invitrogen 公司) 培养基中。

哺乳动物细胞表达载体 pCI-neo 购自 Promega 公司; pEF1/HisA 购自 Invitrogen 公司; 哺乳动物细胞 dhfr 扩增表达载体 pCdhfr1^[17] 和双顺反子表达载体 pCdhfr5^[18] 均由本室构建; λ 噬菌体 DNA 购自 TaKaRa 公司; pBluescript KS (-) 质粒购自 Stratagene 公司; Great EscApe™ 报告基因系统购自 BD 公司, 包括 pSEAP2-Basic 和 pSEAP2-Control 等载体以及化学发光检测试剂。Flp-In™ 定点整合系统购自 Invitrogen 公司, 包括载体 pcDNA5/FRT-pOG44 以及宿主细胞 Flp-In™-CHO。

1.2 基因克隆

小鼠二氢叶酸还原酶基因 (dhfr) 的克隆: 应用引物对 pDHFRsmf/pDHFRsrr (序列见表 1) 从载体 pCdhfr1 中扩增 dhfr 基因。 λ 噬菌体 cI 基因的克隆: 以引物对 pcISmaf/pcIPstr (序列见表 1) 从 λ DNA 中扩增。微小 RNA 病毒内部核糖体进入位点 (IRES) 序列的克隆: 以引物对 pIresEcrif/pIresEcrvr (序列见表 1) 从本室构建的载体 pCdhfr5 中扩增。上述扩增片段均连接入 pGEM-T 载体并测序。人 β -干扰素基因 (hIFN- β) 的克隆: 应用 RNAgents® Total RNA Isolation System (Promega 公司) 和 SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen 公司) 从人外周血淋巴细胞中提取 RNA 并反转录成 cDNA。外引物 pIFNBof/pIFNBor 和内引物 pIFNBif/pIFNBirXbaI 序列见表 1。应用外引物扩增 15 循环, 内引物扩增 30 循环, 退火温度分别是 52℃ 和 56℃。扩增片段连接入 pGEM-T 载体并测序。

1.3 寡核苷酸的拼接

pLinker 的拼接: 化学合成 2 条寡核苷酸 pLinker1 和 pLinker2 (序列见表 1), 各以 50 μ mol/L 的浓度溶于 1 $\times$ PCR 缓冲液 (10 mmol/L Tris pH 9.0 25℃, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100) 中。将 pLinker1 和 pLinker2 在 0.5 ml 离心管中充分混合, 置于一个盛满沸水的烧杯中, 使烧杯中的水在室温中自然冷却, 2 条寡核苷酸退火成双链, 并在两末端分别形成 Pst I 和 EcoR I 的粘性末端。

OR21 的拼接: 合成 3 条寡核苷酸 pOR211、pOR212 和 pOR213 (序列见表 1)。以 pOR212 为模板, pOR211 和 pOR213 为引物, 通过 PCR 扩增

得到全长 OR21 寡核苷酸. PCR 扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 30℃ 40 s, 72℃ 40 s, 5 个循环; 94℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 40 s, 25 个循环. 2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 切下目的片段, 胶回收试剂盒回收 (上海生工公司). 以 Age I 酶切 OR21 片段, 乙醇沉淀回收.

FRT 的拼接: 化学合成两条寡核苷酸 pFRT1 和 pFRT2 (序列见表 1), 并在合成过程中, 于 5' 端加磷酸 (TaKaRa 公司). 两条寡核苷酸退火的方法同 pLinker 的退火. 退火后的双链在两个末端都形成 *Mlu* I 的粘末端.

AH 的拼接: 化学合成两条寡核苷酸 pAH1 和 pAH2 (序列见表 1). 两条寡核苷酸退火的方法同 pLinker 的退火. 退火后的双链在两个末端分别形成 *Cla* I 和 *Spe* I 的粘末端.

VP2 的拼接: 化学合成两条寡核苷酸 pVP1

和 pVP2 (序列见表 1). 两条寡核苷酸退火的方法同 pLinker 的退火. 退火后的双链在两个末端分别形成 *Cla* I 和 *Spe* I 的粘末端.

1.4 质粒 DNA 的细胞转染

应用脂质体 LIPOFECTAMINE™ 2000 Reagent (Invitrogen 公司) 对细胞进行转染, 按说明书操作.

1.5 人 β-干扰素活性测定

参考文献 [19] 的方法.

1.6 分泌型碱性磷酸酶活性检测

根据 BD 公司 Great EscApe™ 报告基因系统的说明书操作. 分泌型碱性磷酸酶 (SEAP) 催化化学发光底物发光, 发光强度在一定范围内正比于 SEAP 的表达量. 本实验应用 X 光片检测 SEAP 的发光强度.

Table 1 Oligonucleotides used in this work

Oligo name	Oligo sequence
pDHFRsmf	GTCCCGGGCCACCATGGTTCGACCGCTGAAC
pDHFRsmr	GTACGGACCGCTATTAGCCTTTCCTCTC
pclSmaf	ATCCCGGGCCACCATGAGCACAAAAAGAAACC
pclPstr	TACTGCAGGCCAAACGTCTCTTCAGGCC
plresEcrif	TCGAATTC AATTCGCGCCCTCTGCCTCC
plresEcvr	CTGATATCTTATCATCGTGTTTTCAAAGG
pIFNBof	TGGCACAACAGGTAGTAGGCGACAC
pIFNBor	GAGGCACAGGCTAGGAGATCTTCAGTTT
pIFNBif	CCACCATGACCAACAAGTGCTC
pIFNBirNot I	GCGCGGCGGCTCAGTTTCGGAGGTAACC
pLinker1	AATTCTTAACTAGTACTACTATCGATAGAACCAACCAGAACCAACCACCACTCTGCA
pLinker2	GAGTGGTGGTGGTTCTGCTGGTGCTTCTATCGATAGTAGTACTAGTTAAG
pOR211	GCGACCGGTTAACACCGTGCGTGTGAC
pOR212	CCGTGCGTGTGACTATTTTACCTCTGGCGG
pOR213	GAGACCGGTTATCACCGCCAGAGGTAAA
pFRT1	CGCGAAGTTCTATTCCGAAGTTCTATTCTCTAGA AAGTATAGGAACTT
pFRT2	CGCGAAGTTCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTT
pAH1	CGATCCTGAGTTCCCTGGCATCGAGCTGCAGGAGCTGCAGGCCCTTGCTGCAGCAGA
pAH2	CTAGTCTGCTGCAGCAAGGCCTGCAGCTCCTGCAGTCTCGATGCCAGGGAATCAGGAT
pVP1	CGATGACTTCGACCTGGACATGCTGGGCGACTTCGACCTGGACATGCTGGGCA
pVP2	CTAGTGCCCAGCATGTCCAGGTCGAAGTCGCCCAGCATGTCCAGGTCGAAGTCAT
pSEAPf	CCACCATGCTGCTGCTGCTG
pSEAPrNot I	GCGCGGCGGCTCATGTCTGCTCGAAGCGGC

In the table: letters underlined mean restriction sites in the oligonucleotides.

2 结 果

2.1 基因克隆

按照 1.2 的方法, 我们克隆了小鼠 *dhfr* 基因、λ 噬菌体 *cI* 基因、微小 RNA 病毒 IRES 序列和人

β-干扰素基因. 序列与 GenBank 一致. GenBank 序列号分别是: L26316、J02459、AJ000155 和 V00546.

2.2 真核表达载体 pED5 的构建

按照图 1 的路线构建 pED5. 构建过程的每一

步均经过 DNA 序列测定加以确认。该载体以 P_{EF-1α} 为外源基因的启动子，以牛生长激素加尾信号为外源基因的加尾信号，并且在多克隆位点和启动子之

间加入了一个人工内含子以提高转录产物的半衰期。该载体以 P_{SV40} 驱动的小鼠 *dhfr* 基因作为加压和筛选基因。

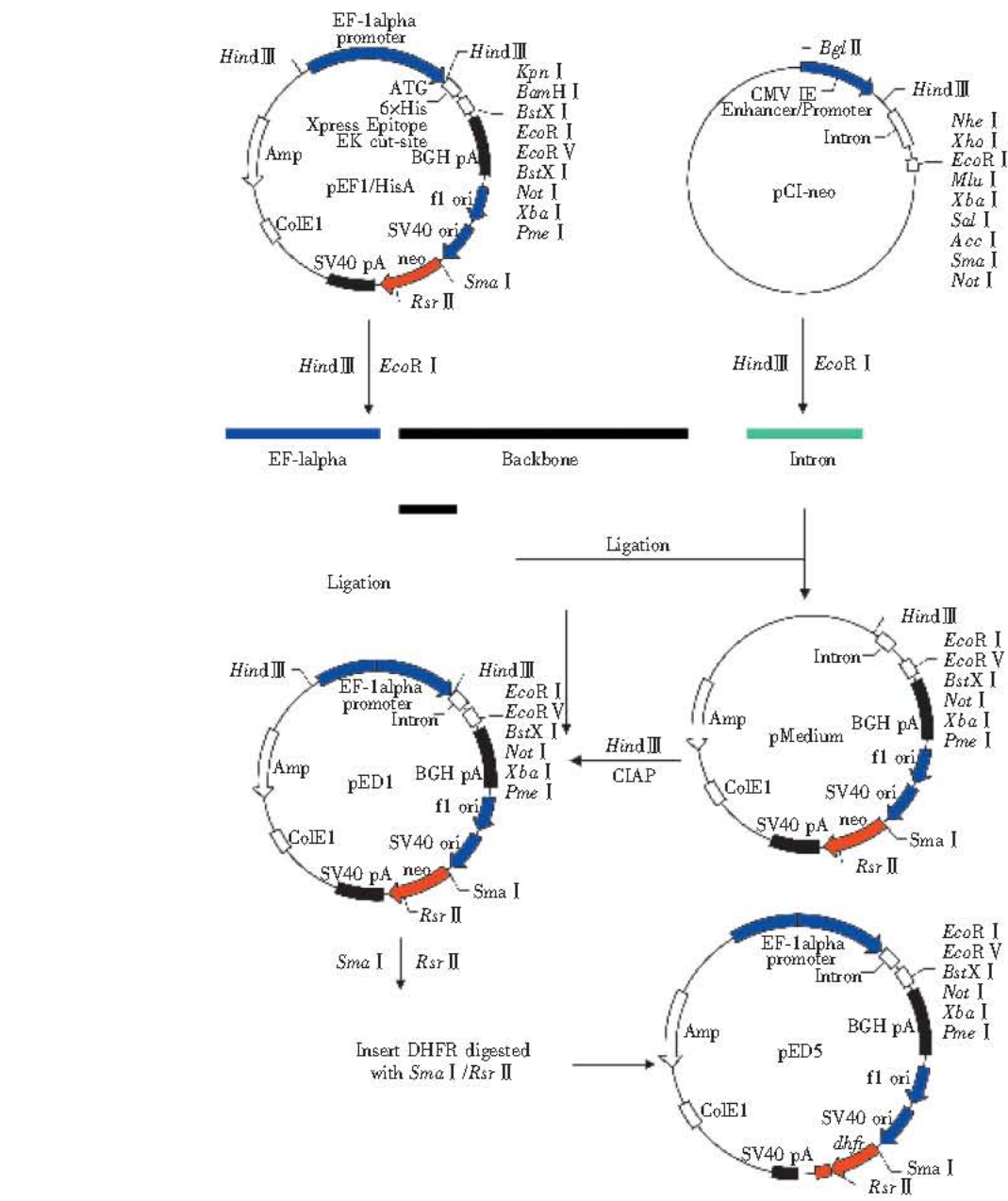


Fig. 1 Flow chart for construction of pED5

2.3 真核表达载体 pED5 的效果检测

通过以小鼠 *dhfr* 基因替换表达载体 pCI-neo 的 *neo* 基因，本室曾构建了哺乳动物细胞表达载体 pCdhfr1 (图 2)，用于外源基因的扩增及高效表达。在表达外源基因方面，我们对 pED5 和 pCdhfr1 进行了对比。利用高保真耐热 DNA 聚合酶

Pyrobest (TaKaRa) 和引物对 pSEAPf/pSEAPrNot I (序列见表 1) 从 Great Escape™ 报告基因系统中的 pSEAP2-Basic 质粒中扩增出 SEAP 基因片段，并以 *Not* I 酶切。另以 Pyrobest 和引物对 pIFNBif/pIFNBirNot I 从已测序正确的 T-载体中扩增出 hIFN-β 基因，并以 *Not* I 酶切。SEAP 片段和 hIFN-

β 片段, 分别连接进已经 *Sma* I / *Not* I 切割过的 pCdhfr1, 和 *Eco* R V / *Not* I 切割过的 pED5 表达载体中, 得 pCdhfr1-SEAP、pCdhfr1-IFN β 、pED5-SEAP 和 pED5-IFN β , 序列测定对重组质粒加以确认. 4 种质粒等摩尔量 (各约 1 μ g) 转染 CHO-dhfr 细胞, 每种转染做 3 次重复, 转染后 48 h 取上清分析 IFN- β 和 SEAP 的瞬时表达量, 结果如图

3a 和图 4a 所示. 图 3a 显示对于 IFN- β 的表达量, pED5-IFN β 比 pCdhfr1-IFN β 高出 26%, 证明 $P_{EF-1\alpha}$ 的强度可能比 P_{CMV-IE} 略高. 这一结论在图 4a 中得到进一步证实. 我们同时应用有限稀释的方法以不含 HT (hypoxanthine and thymidine) 的培养基筛选了多株稳定表达株. 各选取表达量最高的 3 株做放大培养. 仔细计数细胞各取 10^5 个细胞接种六孔

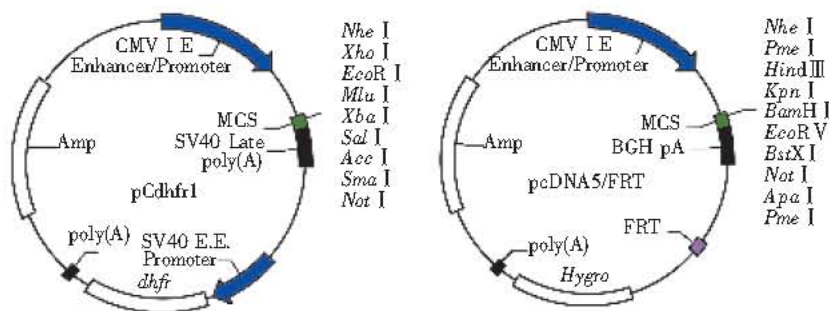


Fig. 2 Illustration of two plasmids used in this work

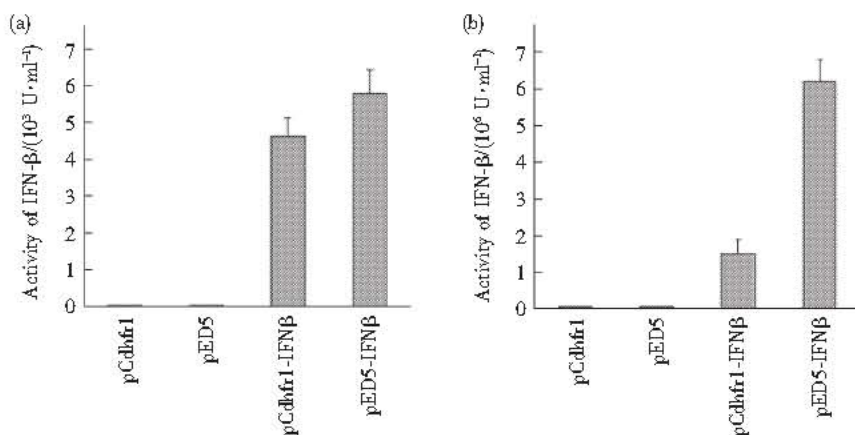


Fig. 3 Comparison of interferon- β expression in pCdhfr1 and pED5

Mammalian expression vector pCdhfr1 uses P_{CMV-IE} , while pED5 uses $P_{EF-1\alpha}$. The interferon- β reporter gene was cloned into the two vectors respectively and transfected into CHO cells at equal moles. Blank vectors were also transfected into CHO cells as controls. (a) Transient expression. The figure showed that pED5 expressed 26% more interferon- β than pCdhfr1, which meant that $P_{EF-1\alpha}$ was a little stronger than P_{CMV-IE} . (b) Stable expression. Stable clones were screened out by withdrawal of HT. The clones that expressed highest level of interferon- β respectively were cultured in medium with serum reduced to 0.5% for down regulation of cell cycle progression. Interferon- β expression was tested 4 d later. The figure showed that pED5 produced 3.1 times more interferon- β than pCdhfr1, proving that $P_{EF-1\alpha}$ was stronger than

P_{CMV-IE} when cell cycle was arrested. The bars represent the standard deviations calculated from three repeated experiments.

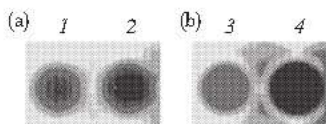


Fig. 4 Comparison of SEAP expression in pCdhfr1 and pED5

Expression of SEAP, another reporter gene, in pCdhfr1 and pED5 was tested again. 1 and 3 were for pCdhfr1-SEAP, 2 and 4 were for pED5-SEAP. Both transient expression (a) and stable expression (b) results were consistent to those showed in Figure 3.

板, 24 h 后将血清浓度降至 0.5%, 使细胞减缓增殖. 继续培养 4 天, 取上清测量 IFN- β 和 SEAP 的表达量. 图 3b 显示, pED5IFN β 的表达量比 pCdhfr1-IFN β 高出 3.1 倍. 对于 SEAP 的表达量, 图 4b 显示出类似结果. 证明在细胞周期进展缓慢的时候, $P_{EF-1\alpha}$ 表达外源蛋白的能力显著高于 P_{CMV-IE} .

2.4 真核表达载体 pER-AH 和 pER-VP2 的构建

pER-AH 和 pER-VP2 按照图 5 的路线完成构

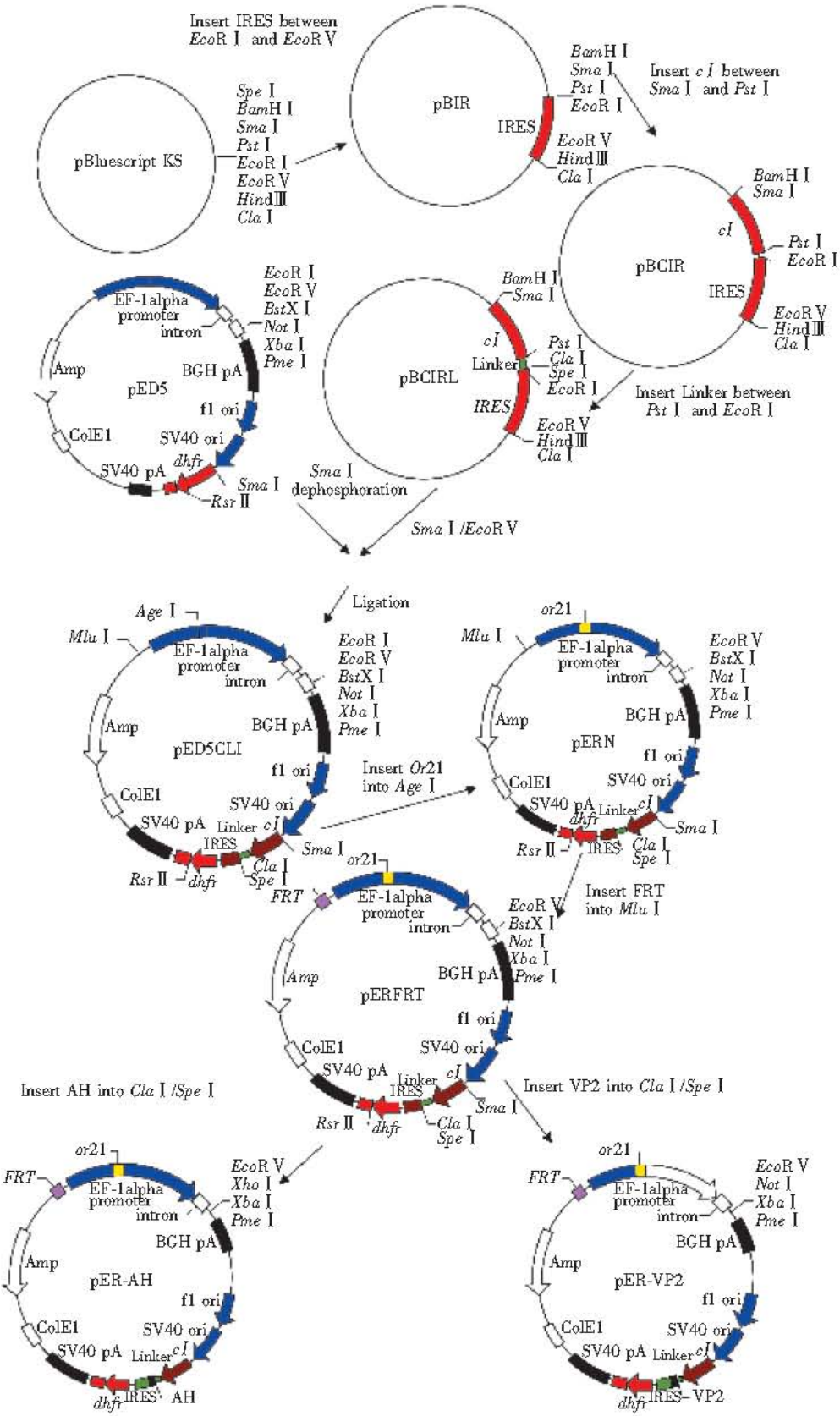


Fig. 5 Construction of expression vectors pER-AH and pER-VP2

建. 构建过程的每一步均经过 DNA 序列测定加以确认. 以上两个载体和 pERFRT 都含有 FRT 位点, 在 Flp 整合酶的作用下, 可以定点整合进含有 FRT

位点的 CHO 宿主细胞中. 图 6 显示了 pER-AH 或 pER-VP2 的作用机理.

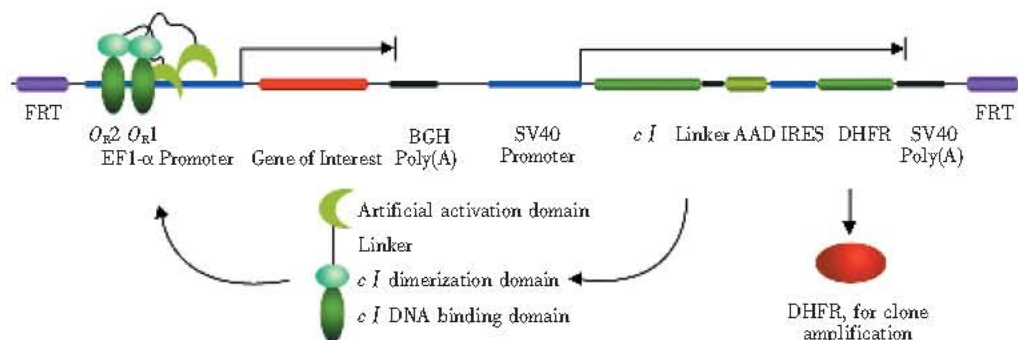


Fig. 6 Illustration of expression enhancement by artificial transcription activators

When co-transfected with Flp recombinase-generating plasmid pOG44, pER-AH or pER-VP2 can integrated into FRT site of host chromosome. P_{SV40} will initiate transcription of a di-cistronic mRNA. The cistron after IRES will translate into DHFR for clonal selection and gene amplification. And the cistron before IRES can translate into cI protein, which is fused to an artificial transcription activation domain (AAD), i.e. AH or VP2, by a soft linker. The N terminal domain of cI can bind to O_{R2}O_{R1} site about 200 bp upstream to TATA box of P_{EF-1 α} , and "conscript" AAD near to TATA box. The AAD in turn activate gene transcription.

2.5 表达载体 pER-AH 和 pER-VP2 的效果评价

将 IFN- β 和 SEAP 片段 (见 2.3) 分别克隆入经 EcoR V/Not I 切割过的 pcDNA5/FRT (图 2)、pERFRT、pER-AH 和 pER-VP2 (图 5) 中, 得 8 个重组载体: pcDNA5/FRT-IFN β 、pERFRT-IFN β 、pER-AH-IFN β 、pER-VP2-IFN β 、pcDNA5/FRT-SEAP、pERFRT-SEAP、pER-AH-SEAP 和 pER-VP2-SEAP. 以上提及的各个表达载体都含有 FRT 位点, 与 pOG44 共转染 Flp-InTM-CHO 细胞, 可以定点整合进宿主细胞染色体的 FRT 位点中. pcDNA5/FRT 以 P_{CMV-IE} 为启动子, 另 3 个载体均以 P_{EF-1 α} 为启动子. pER-AH 和 pER-VP2 另外分别含有人工转录激活因子 AH 和 VP2. 这 2 个人工小肽已被证明具有很强的转录增强活性^[7~9]. 以上构建的 8 个重组载体均以等摩尔量 (各约 1 μ g) 分别按 1:9 的比例与 pOG44 共转染 Flp-InTM-CHO 细胞, 48 h 后分析 IFN- β 和 SEAP 的瞬时表达量. 图 7 和图 8 显示, pERFRT 表达外源蛋白的能力略高于 pcDNA5/FRT, 说明 P_{EF-1 α} 的强度比 P_{CMV-IE} 略高, 与 2.3 的结果相一致. pER-AH 外源蛋白的表达量略高于 pED5FRT, 而 pER-VP2 表达外源蛋白的能力则比 pED5FRT 高出 2.7 倍. 因而在本研究系统中, VP2 具有更强的转录增强能力, 可以用于增强外源基因在 CHO 细胞中的表达.

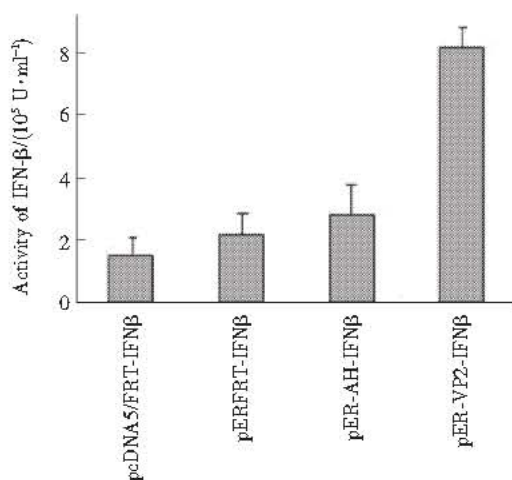


Fig. 7 Comparison of interferon- β expression in 4 vectors

Interferon- β was used as reporter gene for test of foreign gene productivity of pcDNA5/FRT, pERFRT, pER-AH and pER-VP2. Interferon- β gene was cloned into the above mentioned four vectors, and was co-transfected into Flp-InTM-CHO cells with pOG44 at molar ration of 1:9. Interferon- β activity was assayed 48 h after transfection. The figure showed that pERFRT expressed a little more interferon- β than pcDNA5/FRT, and pER-AH a little more than pERFRT, while pER-VP2 expressed 2.7 times more interferon- β than pERFRT. The bars represent the standard deviations calculated from three repeated experiments.

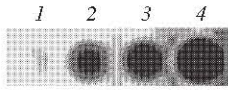


Fig. 8 Comparison of SEAP expression in 4 vectors

Here SEAP was used as reporter gene for test of foreign gene productivity of pcDNA5/FRT (1), pERFRT (2), pER-AH (3), pER-VP2 (4). The results were consistent with Figure 7.

3 讨 论

在本研究中, 我们首先构建了以 $P_{EF-1\alpha}$ 为启动子的表达载体 pED5, 由于 $P_{EF-1\alpha}$ 的强度与细胞周期时相无关, 因而在细胞增殖缓慢时, 其表达外源蛋白的能力远远高于以 P_{CMV-IE} 为启动子的表达载体 pCdhfr1, 证实了我们先前的设想. 这一表达载体对于外源蛋白在哺乳动物细胞中的大规模生产具有十分重要意义.

为了进一步增强 pED5 载体表达外源蛋白的能

Linker:

CTG CAG ACT GGT GGT GGT TCT GGT GGT TCT ATC GAT AGT AGT ACT AGT TAA GAA TTC
Leu Gln Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Asp RANDOM Thr Ser Stop
Pst I Cla I Spe I EcoR I

Fig. 9 The linker sequence

参 考 文 献

- Banik G G, Todd P W, Kompala D S. Foreign protein expression from S phase specific promoters in continuous cultures of recombinant CHO cells. *Cytotechnol*, 1996, **22** (2): 179 ~ 184
- Leelavatcharamas V, Emery A N, Al-Rubeai M. Use of cell cycle analysis to characterize growth and interferon- γ production in perfusion culture of CHO cells. *Cytotechnol*, 1999, **30** (1): 59 ~ 69
- Lloyd D R, Leelavatcharamas V, Emery A N, *et al.* The role of the cell cycle in determining gene expression and productivity in CHO cells. *Cytotechnol*, 1999, **30** (1): 49 ~ 57
- Weaver R F. *Transcription Activators in Eucaryotes*. New York: McGraw-Hill, 1999, 341 ~ 374
- Ptashne M, Gann A. Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 1997, **386** (6625): 569 ~ 577
- Ptashne M. Control of gene transcription: an outline. *Nat Med*, 1997, **3** (10): 1069 ~ 1072
- Nevado J, Gaudreau L, Adam M, *et al.* Transcriptional activation by artificial recruitment in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (6): 2674 ~ 2677
- Farrell S, Sinkovich N, Wu Y, *et al.* Gene activation by recruitment of the RNA polymerase II holoenzyme. *Gene Dev*, 1996, **10** (18): 2359 ~ 2367
- Hippenmeyer P, Highkin M. High level, stable production of recombinant proteins in mammalian cell culture using the herpesvirus VP16 transactivator. *Biotechnol*, 1993, **11** (9): 1037 ~ 1041
- Natesan S, Molinari E, Rivera V M, *et al.* A general strategy to enhance the potency of chimeric transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (24): 13898 ~ 13903
- Mapp A K, Ansari A Z, Ptashne M, *et al.* Activation of gene expression by small molecule transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (8): 3930 ~ 39335
- Giniger E, Ptashne M. Transcription in yeast activated by a putative amphipathic α helix linked to a DNA binding unit. *Nature*, 1987, **330** (6149): 670 ~ 672
- Ma J, Ptashne M. A new class of yeast transcriptional activators. *Cell*, 1987, **51** (1): 113 ~ 119
- Gerber H P, Seipel K, Georgiev O, *et al.* Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science*, 1994, **263** (5148): 808 ~ 811
- Ansari A Z, Mapp A K, Nguyen D H, *et al.* Towards a minimal motif for artificial transcriptional activators. *Chem Biol*, 2001, **8** (583): 583 ~ 592
- Lu X, Ansari A Z, Ptashne M. An artificial transcriptional activating region with unusual properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (5): 1988 ~ 1992
- 刘国奇, 陈小密, 徐 静, 等. 携带共扩增基因的 CHO 细胞表达载体的构建. *细胞与分子免疫学杂志*, 2000, **16** (1): 17 ~ 19
- Liu G Q, Chen X M, Xu J, *et al.* *J Cell Mol Immunol*, 2000, **16** (1): 17 ~ 19
- 刘国奇, 陈小密, 徐 静, 等. 用 IRES 及 dhfr 构建哺乳动物细胞双表达载体. *军事医学科学院院刊*, 2000, **24** (1): 9 ~ 15

Liu G Q, Chen X M, Xu J, *et al.* Bull Acad Mil Med Sci, 2000, 24 (1): 9 ~ 15

19 刘长暖, 张 翊, 饶春明, 等. 重组人干扰素- β 制品的质量标

准研究. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2000, 7 (3): 212 ~ 215

Liu C N, Zhang Y, Rao C M, *et al.* Chin J Cancer Biother, 2000, 7 (3): 212 ~ 215

Enhancement of Foreign Gene Expression in CHO Cells by Human Elongation Factor 1 α Subunit Promoter and Artificial Transcription Activator Factors

LAI Da-Zhi, WENG Shao-Jie, YU Chang-Ming, Qi Lian-Quan, FU Ling, YU Ting, CHEN Wei *

(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract Expression vectors are critical to high efficiency expression of foreign proteins. Thus a vector containing human elongation factor 1 α subunit promoter ($P_{EF-1\alpha}$) for transcription of genes of interests, and mouse dihydrofolate reductase (*dhfr*) gene under control of SV40 promoter (P_{SV40}) for clonal selection and amplification was first constructed. The vector was named pED5. The expression efficiency difference between pED5 and pCdhfr1, a vector utilizing CMV enhancer/promoter (P_{CMV-IE}) for foreign protein production, was analyzed using human interferon- β (IFN- β) gene and human secreted alkaline phosphatase (SEAP) gene as reporters. When analyzed in transient expression, pED5 showed a little more protein production than pCdhfr1. However, in continuous expression, when serum concentration was lessened to slow down cell proliferation, pED5 expressed 3.1 times more reporter proteins than pCdhfr1, which implied that $P_{EF-1\alpha}$ was less affected by cell cycle status in contrast to P_{CMV-IE} , making pED5 a good expression vector for foreign protein production. To further enhance protein productivity of expression vectors, two artificial transcription activating domains, AH and VP2, were linked to cI repressor protein of phage λ through a soft linker, respectively, and thus two artificial transcription activators were created. The O_R2 - O_R1 sequence of phage λ was inserted into $P_{EF-1\alpha}$ about 200 bp before TATA box. The artificial transcription activators can bind to O_R2 - O_R1 sequence, and are thus conscripted near to the TATA box of P_{CMV-IE} , activating gene transcription with artificial activating domain AH or VP2. All the components mentioned above were integrated into pED5, producing two vectors: pER-AH and pER-VP2. The two vectors were tested for their efficiency of expressing IFN- β and SEAP reporter genes in comparison with pERFRT, a vector similar to pER-AH and pER-VP2 except for lacking of artificial transcription activators. To abolish transcription efficiency affected by copy number or integration site in chromosome, all the vectors were integrated into FRT site by co-transfecting with an Flp recombinase producing plasmid. The FRT site was pre-inserted into CHO cell chromosome by Invitrogen Corporation. It was showed that pER-AH was only a little more efficient than pERFRT, however, pER-VP2 was 2.7 times more efficient than pERFRT in expressing reporter genes.

Key words transcription activator, promoter, gene expression, cI protein, CHO cells

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948692, Fax: 86-10-63815273, E-mail: cw789661@yahoo.com

Received: July 9, 2003 Accepted: August 28, 2003