

- scription of the hepatitis B virus gene by nuclear extracts of human hepatoma cells. *Virology*, 1992, **182** (2): 545~552
- 4 Zhang P, McLachlan A. Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus nucleocapsid gene in human hepatoma cell lines. *Virology*, 1994, **202** (1): 430~440
  - 5 刘定燮, 王昌才. 肝细胞核因子 3 参与乙肝病毒基因的转录调控. *生命的化学*, 1996, **16** (6): 28~30
  - 6 Zhang P, Raney K, McLachlan A. Characterization of functional SP1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol*, 1993, **67** (3): 1472~1481
  - 7 刘定燮, 王昌才. 乙肝病毒核衣壳启动子内三链 DNA 的形成. *生物化学杂志*, 1997, **13** (6): 615~621
  - 8 Shea R G, Ng P, Bischofberger N. Thermal denaturation profiles and gel mobility shift analysis of oligonucleotide triplexes. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (16): 4859~4866
  - 9 Yoon K, Hobbs C A, Koch J *et al.* Elucidation of the sequence-specific third-strand recognition of four Watson-Crick base pairs in a pyrimidine triple-helix motif: T•AT, C•GC, T•CG, and G•TA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (10): 3840~3844
  - 10 Maher L J, Dervan P B, Wold B. Analysis of promoter-specific repression by triple-helical DNA complexes in a eukaryotic cell-free transcription system. *Biochemistry*, 1992, **31** (1): 70~81

### Inhibition of DNA Binding Protein Binding to the Core Promoter of Hepatitis B Virus by

**Triplex Formation.** LIU Ding-xie, WANG Chang-cai (*Institute of Molecular Biology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

**Abstract** The triplex formation between a 21nt oligodeoxyribonucleotide G<sub>3</sub>TG<sub>2</sub>TGT<sub>2</sub>G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TGT (CP1) and core promoter (Cp) fragment of hepatitis B virus (HBV) had a good specificity and stability, which was demonstrated by electrophoretic mobility shift analysis and DNase I footprinting experiment. Gel retardation assay showed CP1 could inhibit a specific cellular factor binding to Cp fragment in rat liver nuclear extracts. No inhibition of factor binding was observed by oligodeoxyribonucleotide CP3 (TGTG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub>T<sub>2</sub>GTG<sub>2</sub>TG<sub>3</sub>), which could not form triplex with Cp fragment. These results indicate that specific repression of gene transcription of HBV DNA may be possible by triplex-formation.

**Key words** triplex DNA, antigene strategy, oligodeoxyribonucleotide, hepatitis B virus, DNA binding protein

## 绿色荧光蛋白 cDNA 在腺病毒重组载体转染中的应用\*

张晓伟 王福山 童坦君<sup>1)</sup>

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

**摘要** 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因是目前发现的唯一能在细胞内表达, 且不需要其他外源底物参与的全新报告基因. 将 GFP cDNA 与腺病毒载体 pAdE1CMV 重组, 以 lipofectin 转染 293 细胞 (一种人胚肾细胞), 观察其在真核细胞内的表达情况, 为转基因技术提供了新的监测方法.

\* 国家自然科学基金资助项目 (39670806). <sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1997-04-09, 修回日期: 1997-07-21

**关键词** 绿色荧光蛋白, 报告基因, 腺病毒载体  
**学科分类号** Q785

自从 1992 年 Douglas 等纯化得到绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 后, GFP 独特的发光特性引起人们极大兴趣. GFP 在长波紫外光或  $\text{Ca}^{2+}$  激发下发绿色荧光, 不需要其他外源底物或辅助因子的参与, 没有种属的特异性<sup>[1]</sup>. 目前, 未发现 GFP 对细胞的生理状态有何干扰, 亦未发现其毒性<sup>[2]</sup>. 它的灵敏度和分辨率高于现有免疫组织化学方法. GFP 的发光性能不但可长期保持, 甚至在福尔马林固定情况下, 亦可保持发光强度. 所以其 cDNA 可成为一种非常有效的在活细胞内的报告基因. 我们将 GFP cDNA 与腺病毒载体重组, 并将此重组体转染 293 细胞, 得到了有效表达.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

pGFP10.1: 3.92 kb, 为含有野生型 GFP 基因 cDNA *EcoR* I 片段 (包括 ORF 和 3' 端非编码区) 的 pBS 质粒, 由美国哥伦比亚大学 Chalfie 教授馈赠; pBluescriptIISK: 2.96 kb, 为含有 *EcoR* I 单一酶切位点的原核克隆载体, 本室保存; pAdE1CMV: 7.64 kb, 为含有腺病毒启动子的真核表达载体, 本室保存; 293 细胞: 恶性转化的人胚肾细胞, 本室保存.

### 1.2 试剂

限制性内切酶 *EcoR* I, *Hind* III 为华美公司产品; *Sma* I, *Pvu* II, *Hpa* I 为 Promega 公司产品; T4 连接酶为 Sigma 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯产品.

### 1.3 仪器

Olympus BH 荧光显微镜: 日本 Olympus 公司产品.

### 1.4 方法

**1.4.1 重组:** 将 pGFP10.1 扩增, 用 *EcoR* I 酶切后, 回收 GFP cDNA 片段 (0.9 kb). 同时 pBluescriptIISK 也用 *EcoR* I 酶切, 在

T4 连接酶作用下, 将 GFP cDNA 片段连接在 pBluescriptIISK 上, 用内切酶 *Pvu* II, *Hind* III 鉴定正反向, 切出 2.51, 0.702, 0.47 kb 片段的为正向重组体. 然后用内切酶 *Hind* III, *Sma* I 酶切, 分离出 0.9 kb 片段 (为 GFP cDNA), pAdE1CMV 也用 *Hind* III, *Hpa* I 酶切, 再用 T4 连接酶将 0.9 kb 片段连于 pAdE1CMV 上, 构建成表达质粒 pAdE1CMVGFP (图 1).

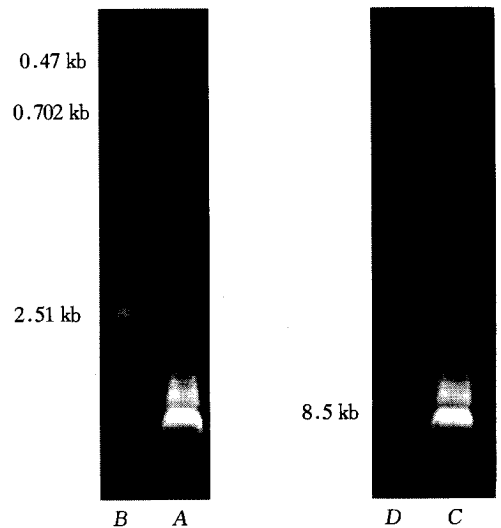


图 1 琼脂糖凝胶电泳照片

A, C:  $\lambda$ DNA/*Hind* III 分子质量标准; B: pBluescriptII GFP SK 用内切酶 *Pvu* II, *Hind* III 酶切后; D: pAdE1CMVGFP 用内切酶 *Hind* III 酶切后.

**1.4.2 转染:** 培养 293 细胞, 待细胞铺满瓶底约 70% ~ 80% 时, 准备转染 pAdE1CMVGFP. 取 2 支 1.5 ml eppendorf 管, 于一管中加入 10  $\mu\text{g}$  pAdE1CMVGFP, 500  $\mu\text{l}$  无血清、无抗生素的 DMEM 培养液; 另一管加 20  $\mu\text{g}$  lipofectin, 500  $\mu\text{l}$  无血清、无抗生素的 DMEM 培养液. 两管混合后, 室温放置 30 min, 再加 1 ml DMEM 培养液, 混匀. 弃去细胞培养瓶中的旧培养液, 用无血清、无抗生素的 DMEM 培养液洗一遍, 然后

加入已混匀的 lipofectin-pAdE1CMVGFP. 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 3~5 h 后, 倒掉 2 ml lipofectin-pAdE1CMVGFP 混合物. 换 5% 血清的 DMEM 培养液 5 ml, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 48 h 后检测.

1.4.3 荧光显微观察: 收集转染细胞, 涂片置荧光显微镜下观察.

## 2 结 果

对转染细胞的荧光显微观察表明, 表达的蛋白发出强烈的绿色荧光, 将细胞核及细胞轮廓显现得非常清晰, 说明表达的蛋白存在于细胞质中. 最后做荧光照相 (图 2).

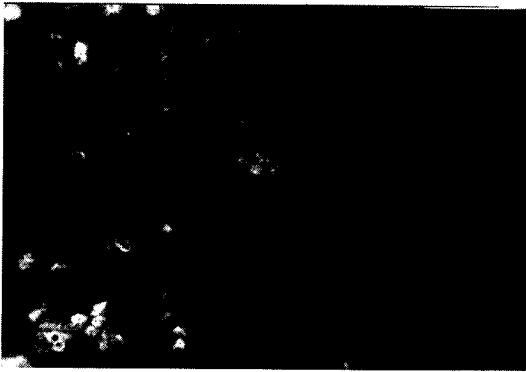


图 2 荧光显微照片

## 3 讨 论

GFP 是目前唯一能在异源细胞内表达后自发产生荧光的蛋白质, 这种异源表达产物在长波紫外光或蓝光激发下能发出强烈的绿色荧光, 因此 GFP 作为一种新型的报告基因引起人们的极大兴趣<sup>[3]</sup>. GFP 是一种稳定的、可溶性蛋白, 能持续发出绿色荧光, 对光稳定, 能耐受剧烈条件, 如用强酸或强碱处理, 一旦

其恢复中性 pH, 荧光即可恢复. 作为一种新型报告基因, 其基因产物 GFP 有许多优越性: 该蛋白质分子质量较小, 为 238 个氨基酸残基构成的多肽单链; 无细胞毒性, 不干扰标记蛋白的功能和定位; 在异源细胞内表达不需要辅助因子的参与. 因而可直接用于活体. 本实验将 GFP cDNA 与腺病毒载体 pAdE1CMV 重组, 转染 293 细胞, 在紫外光下即可筛选鉴定, 对 GFP 作为报告基因在转基因技术方面的应用做了初步的探索.

## 参 考 文 献

- 1 黄涛. 绿色荧光蛋白——一种新的基因表达标记物. 生命的化学, 1995, 15 (2): 38~39
- 2 Martin C, Yuan T, Ghia Euskirchen *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 1994, 263 (11): 802~805
- 3 Douglas C P, Virginia K, William W W *et al.* Primary structure of the *aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene, 1992, 111 (2): 229~233

**Application of GFP cDNA in Transfection Carried by Adenovirus Vector.** ZHANG Xiao-wei, WANG Fu-shan, TONG Tan-jun (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing 100083, China*).

**Abstract** Green fluorescent protein (GFP) gene is the only new reporter gene which can express in living cells without other external substrate so far. The GFP cDNA was recombined into an adenovirus vector, then transfected into 293 cells to observe its expression. This may provide a newly monitoring method of transgenic technique.

**Key words** green fluorescent protein, reporter gene, adenovirus vector