

研究报告

通用真核质粒表达载体的构建

龙建银 张宏权 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 利用真核基因表达调控的原理, 以 pSV2-dhfr 为起始材料, 构建了两个通用的真核质粒表达载体 pMAML1-dhfr 和 pMAML2-dhfr, 它们包含人巨细胞病毒立即早期启动子/增强子调控元件, 由两个转录方向相同或相反的表达单元组成. 以萤火虫荧光素酶基因为报道基因, β -半乳糖苷酶基因为内对照, 借助 COS-7 短暂表达系统, 研究了它们对荧光素酶表达的影响, 并比较了它们与出发载体 pSV2-dhfr 的相对强弱.

关键词 真核表达载体, 报道基因, 基因表达调控

外源基因在哺乳动物细胞中的表达影响因素很多, 层次非常广泛, 涉及基因水平、转录水平、转录后水平、翻译水平和翻译后水平, 但基因表达的调节最主要发生在转录水平. 转录水平的调控可以概括为顺式调控元件和反式作用因子的相互作用, 它们分别由表达载体和宿主细胞提供. 特定宿主细胞中的表达主要取决于所用的表达载体. 借助真核基因表达调控的理论, 能将较强的顺式作用元件集中到一个载体中, 使其能方便高效地用于目的基因的表达. 我们构建了两个通用的真核质粒表达载体, 并在 COS-7 短暂表达系统中研究了它们对报道基因的表达调节作用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒: pSV2-dhfr^[1]是真核高效表达载体, pUC-HCMV 含人巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子/增强子调控序列^[2], 均为本室保存. pGEM-luc 含萤火虫荧光素酶 cDNA, pSV- β gal 含 β -半乳糖苷酶 cDNA, 均为 Promega 产品.

1.1.2 菌种和细胞: 大肠杆菌 RR I、JM109

菌种、猴肾 COS-7 细胞^[3], 均为本室保存.

1.1.3 酶类和试剂: 限制性内切酶和修饰酶分别购自 Promega 公司或华美生物工程公司. 细胞培养基 DMEM 为 GIBCO BRL 公司产品, [α -³²P] dATP 为北京福瑞公司产品.

1.1.4 试剂盒与仪器: 荧光素酶测定试剂盒、 β -半乳糖苷酶测定试剂盒均购自 Promega 公司, T7 测序试剂盒购自 Pharmacia-LKB 公司, 发光仪为 LKB 产品.

1.2 方法

1.2.1 基因操作 均按文献 [4] 相应章节进行.

1.2.2 基因转染 采用电击法, 对于 COS-7 细胞^[5], 电击条件为: 210V, 1080 μ F, 放电 1000ms; COS-7 细胞用常规 DMEM 培养, 添加 10% 小牛血清.

1.2.3 报道基因的检测, 均按试剂盒说明书进行. 简述如下:

a. 细胞裂解液的制备: COS-7 细胞转染后 48h 弃去培养液, 用适量报道基因通用的细胞裂解液于室温充分裂解细胞 (10~15min). 随后用细胞刮刀将细胞从瓶壁刮下来, 将细胞裂解液尽可能全部转移到 1.5ml 离心管中,

室温稍加离心去除细胞碎片, 上清即为细胞裂解液。

b. 荧光素酶的检测: 取 20 μ l 荧光素酶检测试剂(含底物荧光素)与 100 μ l 细胞裂解液混合, 立即测定发光的强度, 每 10 s 记录一次, 连续记录 1 min, 以 1 min 内的平均值作为光强度计算值。

c. β -半乳糖苷酶的检测: 在 96 孔板上进行。将 50 μ l 样品(细胞裂解液或 β -半乳糖苷酶标准品)加入孔(平行三复孔)中, 每孔再加入 50 μ l 测活缓冲液, 混合后于 37 $^{\circ}$ C 温育 30min。最后加入 150 μ l 1mol/L 的碳酸氢钠中止反应, 在酶联仪上测定 420nm 的吸收。先作标准曲线, 再求得各个细胞裂解液的酶浓度。

2 结果与讨论

2.1 通用真核表达载体的构建过程

我们获取的 CMV 调控元件克隆于 pUC19 的 HincII 位点, 因此可用 pUC/M13 的引物系统对其进行序列分析。核酸序列测定的结果(未给出)表明, 我们所获的 CMV 调控元件的序列与文献 [2] 报道的一致。

我们选取 pSV2-dhfr 作为构建载体的起始原材料, 是因为其背景非常清楚, 各个调控元件的作用研究得都比较透彻。我们首先用 EcoR I 和 BamH I 双酶切 pSV2-dhfr, Klenow 补平后回收 4.3kb 的载体片段, 并在 T4 连接酶作用下使其自身环化形成质粒, 命名为 pSV2'-dhfr。这一步主要是去掉了表达所必需的 SV40 晚期基因区域, 减小了载体的大小并同时消除了 EcoR I 和 BamH I 两个单酶切点。另外, 采用 BamH I 和 Bgl II 双酶切 pSV2-dhfr, Klenow 补平后回收 0.85 kb 的小片段, 它包含 SV40 早期基因的小 t 抗原内含子和 polyA 加尾信号, 用于初始转录产物的剪切和加尾。通过反复查阅文献, 我们核实这段信号中含有一个 Hpa I 单酶切点。

上述 pSV2'-dhfr 载体经 pVU II 线性化后, 用 CIP 去除 5' -末端磷酸, 并与 EcoR I, Hind III 双酶切补平的 0.7 kb 的 CMV 调控元

件片段等摩尔数混合, 连接得到两种取向相反的重组子, 其中 CMV 立即早期启动子分别与 SV40 早期启动子的转录方向相同(命名为 pCSV1-dhfr)或相反(命名为 pCSV2-dhfr), 两者可采用 Pst I 酶切加以区别。由于 EcoR I 切点完全补平后能与 Pvu II 切点连接重新形成一个 EcoR I 位点, 上述两个载体又都含有一个 EcoR I 单酶切点。从 EcoR I 处切开完全补平后再加入含小 t 抗原内含子的片段, 经连接形成四种可能的重组子。其中由 pCSV1-dhfr 中间载体产生的重组子可用 Hpa I 鉴定方向(正插为 1.93kb 和 3.92kb, 反插为 2.51kb 和 3.34kb); 由 pCSV2-dhfr 中间载体产生的重组子可用 Hpa I 和 Hind III 双酶切鉴定方向(正插产生 1.46kb、1.75kb 和 2.66kb 三个片段, 反插产生 1.46kb、1.15kb 和 3.24kb 三个片段)。

最后分别将两种情况下的正向重组子分别称为 pMAML1-dhfr 和 pMAML2-dhfr, 它们的构建结果见图 1。上述两个载体的正确性都得到了酶切鉴定(图略)的充分支持。

这两个载体具有以下特点:

a. 整个载体由两个独立的表达单元组成, 其中外源基因由 CMV 立即早期启动子/增强子控制转录, 由 SV40 早期小 t 抗原内含子和 polyA 提供转录剪切和加尾信号; 小鼠二氢叶酸还原酶标志基因 dhfr 由 SV40 早期启动子控制转录, 亦由 SV40 小 t 抗原内含子和 polyA 提供转录剪切和加尾信号;

b. 含有小鼠 dhfr 标志基因, 因而通过采用氨甲蝶呤加压选择, 可使外源基因随 dhfr 基因一起共扩增;

c. 原核序列提供在大肠杆菌中繁殖的复制起点和氨苄青霉素抗性基因, 但并不含有在真核细胞中表达的“有毒”序列;

d. 含有四个多克隆位点 Xba I、Kpn I、BamH I 和 Sma I, 可使外源基因方便地插入; 还有 Pvu I 单酶切点用于线性化质粒, 便于以电击法将质粒导入宿主细胞;

e. 特别地对于 pMAML2-dhfr, 由于两个

表达单元转录方向相反, 转录时不会发生“通读”现象, 而且 SV40 增强子可为两个启动子同

时提供增强作用. 这使得 pMAML2-dhfr 的表达水平将要明显高于 pMAML1-dhfr.

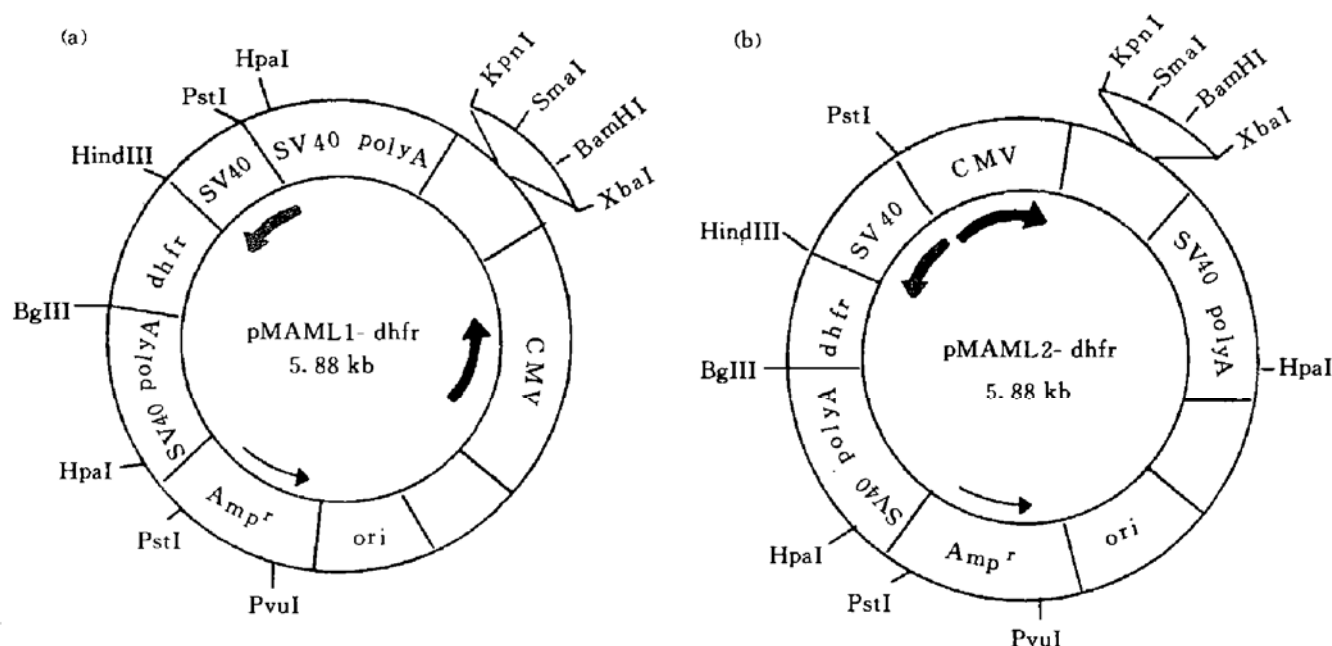


图1 真核表达载体 pMAML1-dhfr (a) 和 pMAML2-dhfr (b) 的构建结果

2.2 通用表达载体对报道基因 (荧光素酶基因) 的表达

在研究真核基因表达调控的顺式作用元件时, 通常采用报道基因作为靶基因, 如 cat、 β -gal、luc. 为了定量比较各调控元件的相对强弱, 大多采用内对照法: 即除由要研究的元件和报道基因组成的质粒外, 同时还转染一个含其他报道基因 (如 β -gal) 的质粒^[4]. 假定这种作为对照的报道基因在各个样品中的表达是完全一致的, 依此来校正各样品中的待测报道基因的表达水平. 为了验证我们构建的两个表达载体 pMAML1-dhfr 和 pMAML2-dhfr 的表达调控作用, 我们用 BamH I, Stu I 双酶切 pGEM-luc, 将回收的 1.7 kb 的荧光素酶基因分别克隆到两个载体的 BamH I, Kpn I (削平) 位点之间, 获得了两个重组的荧光素酶表达质粒 pMAML1-luc 和 pMAML2-luc. 与此同时, 我们用 HindIII, Stu I 双酶切 pGEM-luc, 将回收的 1.7 kb 的荧光素酶基因克隆到载体 pSV2-dhfr 的 Hind III、Bgl II (补平) 位点之间, 获得了 luc 的表达质粒 pSV2-luc.

上述三个 luc 的表达质粒都得到了酶切的

证实. 它们和阴性对照 pBR322 质粒经大量提纯后, 紫外测定浓度和吸光比值 (260nm、280nm 的光吸收比值均大于 1.7), 分别与 pSV- β gal 对照质粒以等摩尔数混合, 乙醇沉淀, 经无菌吹干后用电击法导入 COS-7 细胞中. 转染后 48h 弃去培养液, 制备细胞裂解液, 分别测定荧光素酶和半乳糖苷酶的表达水平.

在实验中, 我们发现 luc 的表达水平, 除了受顺式作用元件 (即所采用的启动子、增强子、转录剪切和 polyA 信号等) 的组成型影响外, 还直接与收获时的细胞数目有关. 因此, 其他因素如转染时的细胞数、基因导入方法、收获细胞时的裂解程度及裂解液的贮存等, 都将影响到最后测定的发光强度. 为了降低甚至排除这种系统误差, 我们采取了以下措施: a. 采用重现性很好的电击法来导入外源基因; b. 使各个样品中的细胞平行地充分裂解, 将细胞碎片混合物尽可能全部转移; c. 采用 pSV- β gal 作为内对照质粒, 将每个样品中的 luc 与 gal 的活性比值作为比较标准. 经过这些处理, 我们所获结论的可靠性大大增强了.

将 luc/gal 作为 luc 表达水平的指标, 各个

载体的表达水平可用图 2 来表示:

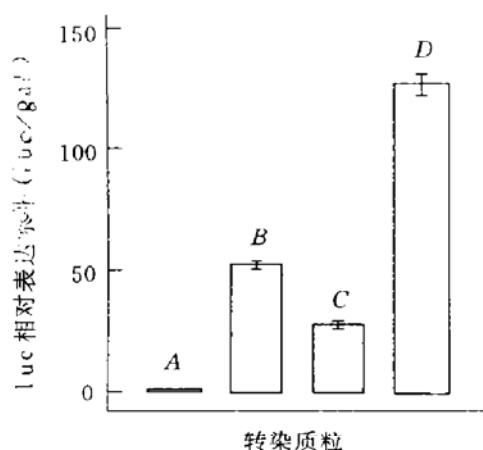


图 2 不同 luc 表达质粒的相对表达水平

A: pBR 322; B: pMAML 1-luc; C: pSV2-luc; D: pMAML2-luc.

不难看出,与出发载体 pSV2-luc 相比,我们构建的两个表达载体 pMAML1-dhfr 和 pMAML2-dhfr 都能有效地启动荧光素酶基因在 COS-7 细胞中的表达,而且构建的结果使得荧光素酶的表达增强了 2~5 倍.这是由它们各自不同的启动子/增强子调控元件决定的.另外与预期的一样, pMAML2-dhfr 的表达水平要比 pMAML1-dhfr 高 (约 3 倍).这是因为前者的两个转录单元方向相反, SV40 增强子可同时为两个启动子提供增强作用.

我们构建的 pMAML2-dhfr 表达载体具有较强的转录起始和终止作用,这已从表达调控的理论方面得到了较好的解释,在实践中又得到了进一步的证实.目前我们正试图对其作进一步的改进,期望能取得更好的结果,以满足高效表达外源基因的实践需要.

参 考 文 献

- 1 Subramani S P J. Anal Biochem, 1983; **135** (1): 1
- 2 Thomsen D R, Stenberg R M, Goins W F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984; **81** (3): 659
- 3 Gluzman Y. Cell, 1981; **23** (1): 175
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989
- 5 程度胜, 张宏权. 军事医学科学院院刊, 1991; **5** (6): 320

Construction of Versatile Eukaryotic Plasmid Expression Vectors. Long Jianyin, Zhang Hongquan, Wang Huixin (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract According to the rules of eukaryotic gene expression and regulation, two versatile eukaryotic expression vectors (pMAML1-dhfr and pMAML2-dhfr) originated from pSV2-dhfr were constructed. They both have a CMV immediate early promoter/enhancer and consist of two expression units of parallel or opposite orientation. Using firefly luciferase gene as reporter gene and β -galactosidase gene as internal control, their effects on luciferase expression were studied in COS-7 transient expression system. The relative strength of their *cis*-elements were compared with those in pSV2-dhfr.

Key words eukaryotic expression vector, reporter gene, gene expression and regulation

多药抗药基因 Mdr1 探针的克隆及初步应用

胡美茹 汲言山 舒翠玲 陈立军 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 多药抗药基因 Mdr1 的表达水平与细胞的耐药性直接相关, 检测 Mdr1 的表达水平可预测化疗的