技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)07-0833-03

HBV-S基因四环素调控双表达载体的构建及其调控表达研究

梁 丽[1],雷 宇[2],倪 艳[2],王蜀强[2],彭凤英[3],周 智[1],陈压西[2],任 红[2]
(1. 重庆医科大学附属第二医院感染病科;2. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010;
3. 重庆医科大学附属第一医院传染科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建在同一载体中含乙肝病毒表面抗原基因(Hepatitis B virus surface gene,HBV-S)和四环素阻抑蛋白基因的双表达载体,研究在真核细胞中四环素对S基因表达的调控。方法:在双表达载体pVITRO3一个启动子后的多克隆位点插入四环素阻抑蛋白基因,用含四环素操纵子的启动子取代另一个启动子,并在其多克隆位点插入S基因,在同一载体中构建成S基因的四环素调控表达系统。用脂质体将重组质粒转染HepG2细胞,潮霉素400 μg/ml进行抗性筛选,20 d形成抗性克隆,建立在四环素诱导下能稳定表达S基因的细胞系。以不同浓度的四环素(0.5、1.0、2.0、3.0 μg/ml)进行诱导,用逆转录PCR和微粒子酶免疫分析法检测S抗原的表达,以确定四环素的最佳浓度。结果:转染了重组质粒的HepG2细胞,在无四环素环境下,表达HBsAg水平极低,72 h时S/N值平均为1.57,在不同浓度的四环素诱导下,HBsAg表达量明显增加,72 h时S/N平均值分别为4.24、4.23、4.18、4.20,未发现与四环素的浓度之间有剂量关系。结论:成功构建了在同一质粒中表达HBV-S基因和四环素阻抑蛋白基因的双表达调控载体,在不同浓度四环素诱导下均有HBsAg表达,并随时间延长而表达量增高,但在同一时间点无明显差异。

【关键词】乙肝病毒;四环素;调控表达
【中国图书分类法分类号】R512.6+2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-24

Construction of the tetracycline regulated expression vector of HBV-S gene and its expression in eukaryotic cells

LIANG Li[1], LEI Yu[1], NI Yan[1], WANG Shu-qiang[1], PENG Feng-ying[2], ZHOU Zhi[1], CHEN Ya-xi[1], REN Hong[1]
(1. Department of Infectious, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;
2. Institute of Hepatiecs Viral, Chongqing Medical University;
3. Department of infectiaus, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To construct a co-expression vector which expresses both HBsAg and Tet Repressor protein and in which the expression of HBsAg can be regulated by tetracycline, and to study the regulating role of tetracycline in the HBV-S expression in HepG 2 cell. *Methods*:Tetracycline repressor (TetR)gene was insert into the first multiple cloning site, which was just after the first promotor in pVITRO3, a co-expression vector, then the second promotor was partly replaced by another one which contained tetracycline operator.Then, HBs gene was inserted into the second multiple cloning site.The constructed vector was transfected into HepG2 by means of lipofectamine.And 400 μg/ml Hygromycin B was used to kill the untransfected host cell line.After 20 days selection, the cell line which expressed HBsAg stably after being induced by tetracycline was generated.Then the HBsAg expression was induced by various concentrations of tetracycline(0.5, 1.0, 2.0, 3.0 μg/ml).And HBsAg was detected by means of RT-PCR and MEIA(Microparticle Enzyme Immunoassay)to determine the appropriate concentration of tetracycline. *Results*:HBsAg was expressed little without tetracycline in transfected HepG2.The average S/N in 72 hour was 1.57.And the S/N of HBsAg was increased remarkably but had no difference after being induced by various concentrations of tetracycline.The average S/N in 72 hour was 4.24, 4.23, 4.18 and 4.20 respectively. *Conclusion*:The basal expression was very low in the tetracycline regulated expression vector of HBV-S gene without inducer.After being induced by various concentrations of tetracycline, HBsAg expression was sharply increased with the incubation time prolongation, but the expression quantity showed no difference at the same time point.

【Key words】hepatitis B virus; tetracycline; regulated expression

作者介绍:梁 丽(1981-),女,硕士,
研究方向:病毒性肝炎基础和临床。
通信作者:周 智,男,教授,Email:zhouzhi2300@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30100158);重庆市渝中区科委基金资助项目(编号:2007-2009);重庆市科委自然科学基金计划资助项目(编号:CATC.2009BB5063);重庆市教委基金资助项目(编号:KJ070317)。

对目的基因的调控表达是基因治疗研究的热点之一[1]，我们用基因重组的方法在本所构建的四环素调控表达载体 pVITRO3-TOTR 中插入乙肝病毒 S 基因，将其构建成乙肝病毒 S 基因的四环素调控表达载体，并用脂质体转染 HepG2 细胞。在不同浓度四环素的诱导下，用 PT-PCR 和微粒子酶免疫分析法（Micropartical enzyme immunoassay，MEIA）检测 S 抗原的表达，观察在体外四环素对该载体的调控作用，现将结果报道如下。

1　材料和方法

1.1　材料

质粒、菌株及细胞。四环素调控表达载体 pVITRO3-TOTR 为本所构建的、含四环素抑制基因 TR、四环素操纵子基因TO 的重组质粒，潮霉素抗性。重组质粒 pBluescript KS^+-（简称 pBKS-S）为本所构建保存，含有乙肝病毒 S 基因，Amp 抗性。几种质粒保存菌 JM109，细胞 HepG2，为本所保存。

1.2　试剂

质粒提取，基因分离按照 Omega 公司的胶回收试剂盒和 QiaGen 公司的质粒抽提试剂盒进行操作。钝端酶连接试剂盒（BKL Kit）、DNA 连接试剂盒、工具酶 *BamH* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ、*Xba* Ⅰ均购于 TAKARA 公司，T4DNA 连接酶购于 Invitrogen 公司。小牛血清购于杭州四季青公司。转染试剂脂质体Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司。逆转录 PCR 试剂盒购于保灵曼公司，HBsAg 检测所用试剂盒购于美国 Abbott 公司。1640 培养基、LB 液体培养基、LB 固体培养基由本所供应室配制。

1.3　方法

1.3.1　S 基因的四环素调控表达重组载体（pVITRO3-TOTR-S）的构建及鉴定

1.3.2　用 *BamH* Ⅰ/*EcoR* Ⅰ对　PBKS-S 进行双酶切，所得短片断经胶回收纯化后，用 TAKARA 公司的 BKL Kit 处理（操作按试剂说明书进行），再经乙醇沉淀所得的片段即为平滑末端的 S 基因片断。

1.3.3　用 *Xba* Ⅰ酶切 pVITRO3-TOTR，胶回收后用 TaKaRa 公司的 BKL　Kit 处理，再经乙醇沉淀所得的片段即为平滑末端的载体片断。

1.3.4　按 TaKaRa 公司的 DNA 连接试剂盒（DNA Ligation Kit）操作步骤将载体和 S 基因片断平端连接，转化入 JM109，挑单菌落小量提质粒，用 *Xba* Ⅰ酶切鉴定插入方向（图 1）。

1.4　重组质粒 pVITRO3-TOTR-S 在 HepG2 中的表达

1.4.1　重组质粒提取　用 QiaGen 公司的去内毒素质粒大量抽提试剂盒抽提保存在 JM109 中的重组质粒 pVITRO3-TOTR-S。用紫外分光光度仪定量，每 100 ml JM109 转化菌株的菌液可获得高纯度去内毒素质粒 500 μg。

1.4.2　细胞复苏及培养　从液氮中取出冻存的 HepG2 细胞，迅速放入 37°C 蒸馏水中震摇，待细胞融化后加入 1640 培养基中，离心去上清。培养于含 10%小牛血清的 1640 培养基，加入双抗，置 37°C，5%CO_2 的培养箱中，2~3 d 传代 1 次。

1.4.3　质粒转染　HepG2 细胞以 2×10^5 细胞/孔接种于 6 孔细胞培养板中，用不含抗生素的培养基孵育 24 h，待 90%细胞融合。将含重组质粒 4 μg 的脂质体-质粒混合物加入每孔，使其均匀分布于细胞表面，操作参照 Invitrogen 公司的 Lipofectamine2000 试剂盒说明书，置培养箱中培养 6 h 后每孔加入无抗生素的培养基 2 ml。

1.4.4　抗性筛选　转染 24 h 后将细胞以 10 倍稀释转入培养瓶中继续培养。转染 48 h 后，在培养基中加入潮霉素（400 μg/ml）进行筛选，每 3~4 d 换液 1 次，约 20 d 后抗性克隆形成，将细胞消化传代，在培养基中加潮霉素至终浓度为 200 μg/ml 以维持。

1.4.5　RT-PCR 检测 HBsAg 表达　诱导后 72 h 用胰酶消化，离心收集细胞，提取总 RNA，用于逆转录合成 cDNA 第一链（按试剂盒说明书进行），上游引物：5'GTG AAG CTT ATG GAG AAC ATC GCA TCA G，3'Tm=69°C，下游引物：5'GTT TAA

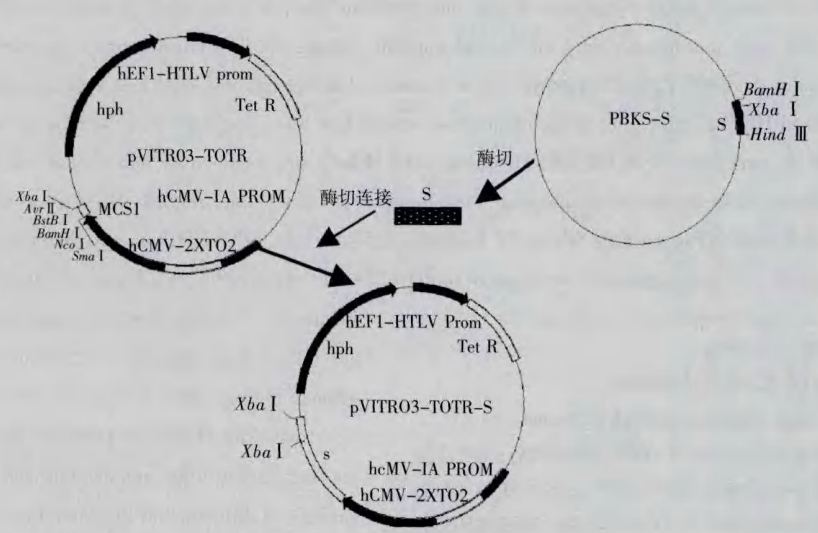


图 1　构建 pVITRO3－TOTR－S

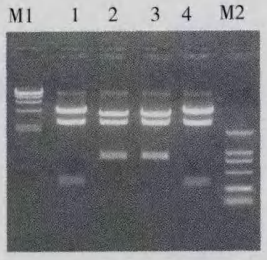
ATG TAT ACC CAA AG 3'，Tm=58℃。反应条件：94°预变性 5 min，94°1 min，58°1 min，72° 3 min，35 个循环，最后 72°延伸 10 min，电泳检测产物。

1.4.6 四环素的诱导 HBsAg 表达 在诱导前 1 d，消化细胞，以 1×10^6 细胞/瓶（不含潮霉素）接种于培养瓶中，24 h 后收集细胞上清后，在各瓶中加入四环素进行诱导，使其终浓度分别为 0.5、1、2、3 μg/ml，分别于诱导后 24、48、72 h 时收集上清，用 Abbott 的 AXSYM 自动免疫分析仪及其配套的 MEIA 诊断试剂盒测定各份细胞上清中的 HBsAg。

2 结 果

2.1 重组质粒的鉴定

根据酶切位点分析，正向插入后酶切片段大小为：3 635、2 536、800，反向插入后酶切片段大小为：4 135、2 536、280，如图 2 所示第 2、3 均为正向阳性克隆，1、4 均为反向阳性克隆。将正向重组质粒送宝生物公司测序，鉴定证实克隆片断正确，所得重组质粒即为 pVITRO3-TOTR-S。



M1. λ -*Hind* Ⅲ DNA Marker；M2. DNA Marker DL2 000（片段大小自上而下分别为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp）

图 2 *Xba* Ⅰ酶切鉴定重组质粒 pVITRO3－TOTR－S

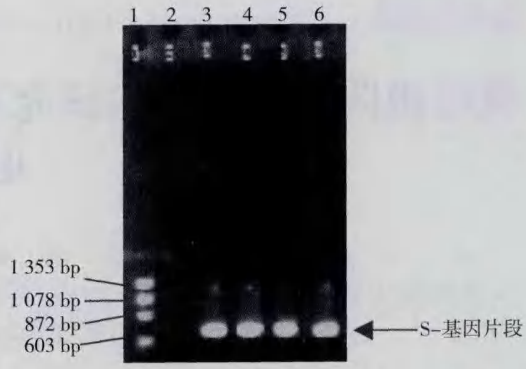
2.2 转染和抗性筛选

经脂质体转染和抗性筛选后，建立了含重组质粒 pVITRO3-TOTR-S 的 HepG2 细胞株。

2.3 四环素诱导后转染细胞上清液 HBsAg 的表达

2.3.1 逆转录 PCR 检测 S 基因表达 经不同浓度四环素诱导 72 h 后，可检测到在转录水平 S 基因在 HepG2 中的表达，如图 3 示 S 基因片段。

2.3.2 检测 HepG2 细胞上清中 HBsAg 表达 经不同浓度四环素诱导后，在各个时间点 HBsAg 表达结果如表 1。用实验孔 A 值/对照孔 A 值（S/N 值）表示，HBsAg S/N 值≥2.0 为阳性。在无四环素诱导组中，各时间点检测 HBsAg 有极少量表达；在加入四环素诱导后 24 h，细胞上清中可检出 HBsAg，在 48~72 h 内呈上升趋势（表 1）。



1. DNA 标准；2. 72 h 无四环素诱导组；3~6. 72 h 四环素浓度分别为 0.5、1.0、2.0、3.0 μg/ml 的诱导组

图 3 逆转录 S 基因片段

3 讨 论

近年来，在乙肝病毒抗感染方面虽然有一些进展，但难以取得持久的疗效，随着分子生物学的飞速发展，乙型肝炎基因疫苗、基因治疗的研究，给乙肝的防治开辟了新途径，在这些研究中，有 2 个至关重要的问题：①选择能高效安全的激发机体产生强有力的抗病毒免疫反应的载体系统；②对目的基因表达的时间和水平进行有效的调控[2]。四环素调控系统在控制基因表达中是最有价值的工具之一[3]。本实验采用的四环素调控系统为 2 个质粒：pcDNA4 含四环素操纵子基因（TO），pcDNA6 含四环素抑制基因（TR）；TR 基因表达的四环素阻抑蛋白与 TO 有高度的亲和力，结合后可以抑制 TO后续目的基因的表达。在四环素存在时，阻抑蛋白与四环素结合，解除其对 TO 的抑制，从而下游的目的基因得以表达。由于质粒转染的不均匀性，要达到四环素对目的基因表达的精确调控很困难，我们设想将四环素调控系统改建到同一载体中，以期克服这一缺点。

以双表达载体 pVITRO3 为基本骨架，在其一个启动子内引入四环素操纵子基因（TO），下游的多克隆位点可插入目的基因，另一个启动子下游的多克隆位点插入四环素抑制基因 TR，构建成四环素调控表达载体 pVITRO3-TOTR。为验证所构建的重组载体能够在四环素的调控下表达目的基因，我们将 HBV 的 S 基因插入，构建成了重组质粒 pVITRO3-TOTR-S。重组质粒转染入真核细胞后，TR 表达生成阻抑蛋白，在无四环素条件下，阻抑蛋白与在同一载体中的 TO 结合，使其下游的 S 基因表达受抑；当在加入四环素后，四环素竞争抑制阻抑蛋白与 TO 的结合，使 S 基因得以表达，起到了锁和钥匙

表 1 不同浓度四环素诱导下在不同时间细胞上清中 HBsAg 的 S/N 值（ng/μl）

诱导后时间（h）	0	0.5	1	2	3
24	0.96 ± 0.07	1.14 ± 0.06	1.12 ± 0.06	1.11 ± 0.07	1.13 ± 0.05
48	1.53 ± 0.09	2.66 ± 0.07	2.65 ± 0.06	2.64 ± 0.08	2.69 ± 0.02
72	1.57 ± 0.05	4.24 ± 0.07	4.23 ± 0.05	4.18 ± 0.18	4.20 ± 0.14

注：表中数值为 3 次结果的平均值

技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)07-0836-06

微电极阵列芯片技术研究不同发育阶段 C57 小鼠心肌细胞的电生理特性

张 玲[1],孙 娟[2],时 利[3],侯月梅[1]

(1. 新疆医科大学第一附属医院心律失常实验室,乌鲁木齐 830054;2. 新疆自治区人民医院神经内科,乌鲁木齐 830001;3. 中国人民解放军总医院肿瘤科,北京 100853)

【摘 要】目的:微电极阵列芯片技术研究不同发育阶段 C57 小鼠心肌细胞的电生理特性。方法:分离 13.5~19.5 d 胎鼠和 2 d 乳鼠的心室肌细胞并培养于微电极阵列(Microelectrode arrays,MEA)电极盘中 48 h,通过倒置相差显微镜,透射电镜、扫描电镜观察其形态,免疫组化鉴定并用 MEA 技术研究其电生理特性。并对生后 1、7、14、21、28、35、>60 d 的意识清醒未麻醉的小鼠行心电图(Electrocardiogram,ECG)和心率变异性(Heart rate variability,HRV)记录。结果:胎鼠心室肌细胞场电位时程(Field potential duration,FPd)随发育而增加($P<0.01$),乳鼠的突然明显缩短($P<0.01$)。胎鼠心室肌细胞的搏动频率随发育而减慢。出生后小鼠的心律是窦性心律,平均 PR、RR、QRS、QT、JT 间期随发育逐渐缩短,7 d 组比 1 d 组减少的差异有统计学意义($P<0.01$),而 14、21、28、35 和>60 d 之间差异无统计学意义。J-S-T 段在 1 d 小鼠明显抬高,7 d 组和 14 d 组逐渐降低,到 35 d 则基本回到基线。HRV 随发育逐渐增加。结论:C57 小鼠胎鼠心肌细胞 FP 电生理特性的变化和生后小鼠 ECG 间期和形态随发育的变化可能为小鼠心脏随发育的电生理特性提供有用的信息。

【关键词】微电极阵列;小鼠;发育;电生理特性

【中国图书分类法分类号】R329 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-05-06

作者介绍:张 玲(1982-),女,博士,研究方向:心律失常的诊断、治疗和机制研究。

通信作者:侯月梅,女,教授,Email:houyuemei@sina.com。

基金项目:新疆高新技术发展资助项目(编号:201010105);新疆维吾尔自治区心血管病研究重点实验室开放课题资助项目(编号:XJDX0903-2009-03)。

的作用,并且期望能通过调节四环素的浓度,调控阻抑蛋白对四环素操纵子下游的 S 基因表达的的调控。结果表明,转染后未加四环素诱导的细胞上清中,表达 HBsAg水平极低,其 S/N 值未达到阳性标准;而加不同量四环素进行诱导后,细胞上清中 HBsAg 表达量随着时间的延长逐渐增加,以 72 h 后最明显,但在同一时间点表达量与四环素的浓度似乎关系不大。

本实验构建了 S 基因的四环素调控表达载体,在体外的研究中,该重组载体实现了四环素对 HBsAg 表达的调控作用,即加入四环素后启动了目的基因的表达,但没有实现不同浓度四环素对目的基因表达量的精确调控。这方面还需要进行深入的研究,比如开发新的调控表达载体,改变 TO/TR 的比例,实现目的基因最佳的调控表达,以期用于临床进行基因治疗。

参 考 文 献

[1] Clackson T.Regulated gene expression system gene therapy[J].2000,7(2):120-125.

[2] Agha-Mohammadi S,O'Malley M,Etemad A.Second-generation tetracycline-regulatable promoter:repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness[J].J Gene Med,2004,6(7):817-828.

[3] Gossen M,Bujard H.Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoter[J].Proc Natl Acad Sci USA,1992,89(12):5547-5551.

[4] Yao F,Svensjox T,Winkler T.Tetracycline repressor,-tetR,rather than the tetR-*mammalian cell transcription factor fusion derivatives*,regulates inducible gene expression in mammalian cells[J].Hum Gene Ther,1998,9(13):1939-1950.

[5] Xu Z L,Mizuguzhi H,Mayumi T.Regulated gene expression from adenovirus vector:a systematic comparison of various inducible system Gene[J].2003,309(2):145-151.

[6] 周 智,倪 艳.四环素双表达调控表达载体的构建、鉴定[J].重庆医科大学学报,2006,31(1):23-25.

(责任编辑:张学颖)