维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)10-1020-03

乙型肝炎病毒 S 基因四环素调控体系的构建及其在真核细胞中的表达

雷 宇,黎 燕,王蜀强,陈压西,周 智,任 红

(重庆医科大学附属第二医院肝病治疗研究中心,重庆 400010)

【摘 要】目的:构建乙型肝炎病毒 S 基因的四环素调控表达载体,并研究在真核细胞中四环素对 S 基因的调控表达,以期用于基因治疗实验。方法:将乙型肝炎病毒 S 基因插入启动子内含有 2 个四环素超纵子(TO)的质粒 pcDNA4,并用脂质体将重组质粒 pcDNA4—S 和含有四环素抑制基因的质粒 pcDNA6 共转染入真核细胞 HepG2 中,用 Zeocin (400μg/ml) 及 Blasticidin (10μg/ml) 进行抗性筛选,约 20 天形成抗性克隆,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(0.5μg/ml,1.0μg/ml,2.0μg/ml,3.0μg/ml)进行诱导,用微粒子酶免疫分析法(MEIA)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 HBsAg 表达量很低,当加入不同浓度的四环素诱导后,HBsAg 表达量明显增加,但所测 HBsAg 的 S/N 值无明显差异。结论:成功构建了乙型肝炎病毒 S 基因四环素调控表达载体,并在真核细胞中进行了四环素的调控表达。

【关键词】乙肝病毒;四环素;调控表达

【中国图书分类法分类号】R34;R512.6+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-08

Construction of the tetracycline regulating expression system of HBV-S gene and its expression in eukaryotic cells

LEI Yu, et al

(*Liver Diseases Therapy Center, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct tetracycline regulating expression system of HBV-S gene, and study its regulating expression of HBVAg by tetracycline in HepG 2 cells. *Methods*: Insert HBs gene into the multiple cloning site of pcDNA4, which contain tetracycline operator in the promoter, and the constructed vector with pcDNA6 was co-transferred into HepG2 by means of lipofectamine, and use 400μg/ml Zeocin and 10μg/ml Blasticidin to kill the untransfected host cell line. After 20 days' select, the cell line which express HBsAg stablely after induced by tetracycline was generated. Then the HBsAg expressing was induced by varying concentration of tetracycline (0.5μg/ml, 1.0μg/ml, 2.0μg/ml, 3.0μg/ml). Amount of HBsAg was detected by means of MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) to determine the appropriate concentration of tetracycline. *Result*: HBsAg had been expressed at low quantity without tetracycline in transfected HepG2. However the S/N of HBsAg were high but not different after induced by varying concentration of tetracycline. *Conclusion*: Tetracycline regulating expression system of HBV-S gene was constructed successfully and HBsAg was highly expressed in the vector induced by tetracycline.

【Key words】 Hepatitis B virus; Tetracycline; Regulating expression

近年来,在研究基因功能、基因治疗的安全性和有效性等问题上,对目的基因表达的时间和水平进行调控是至关重要的[1]。四环素调控系统是一种很重要的调控目的基因表达的载体系统[2]。为研究该载体系统调控表达的有效性,并用于基因治疗实验,我们构建了乙型肝炎病毒 S 基因四环素调控体系,并将该系统的两个质粒共转染进 HepG2 细胞,在不同浓度的四环素诱导下,观察 HBsAg 表达量的变化,结果如下。

1 材料和方法

作者介绍:雷 宇(1979-),女,博士研究生,主要研究方向:乙型肝炎基因免疫和基因治疗研究。

基金项目:国家自然科学基金(30100158),重庆市渝中区科委基金(2007-2009)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材 料

质粒 pcDNA6 和 pcDNA4，抗生素 Zeocin 及 Blasticidin、转染试剂 Lipofectamine2000 购于美国 Invitrogen 公司。pcDNA6 含有四环素抑制基因(TR)，Blasticidin 抗性；pcDNA4 的 CMV 启动子内含有两个四环素超纵子(TO)，Zeocin 抗性。质粒 pBluescript KS⁺-S(简称 pBKS-S)为本所构建保存，含有乙肝病毒 S 基因，Amp 抗性。培养用 HepG2 细胞由本所保存。所用限制性内切酶 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ购于英国新英格兰公司。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。逆转录 PCR 试剂盒够于 ROCHE 公司，HBsAg 检测所用试剂盒购于美国 Abbott 公司。

1.2 方 法

1.2.1 真核表达载体 pcDNA4-S 的构建 将重组质粒 pBKS-S 用 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切后电泳，胶回收约 900bp 的片段，用相同的酶双酶切 pcDNA4，胶回收载体片段，用 T4 连接酶将插入片段和载体片段连接。转化入 JM109，挑单菌落小量提质粒，用 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切鉴定。

1.2.2 重组质粒 pcDNA4-S 和 pcDNA6 共转染 HepG2 细胞

1.2.2.1 重组质粒提取 用 QiaGen 公司的去内毒素质粒大量抽提试剂盒，按说明书操作。

1.2.2.2 细胞复苏及培养 从液氮中取出冻存的 HepG2 细胞复苏。培养于含 10%小牛血清的 1640 培养基，加入双抗，置 37℃，5%CO_2 的培养箱中，2～3 天传代 1 次。

1.2.2.3 质粒转染 HepG2 细胞以 2×10^5 细胞/孔接种于六孔细胞培养板中，用不含抗生素的培养基孵育 24h，待 90%细胞融合，将重组质粒 pcDNA4—S 和 pcDNA6 以质量比 6:1(参照文献和本质粒操作说明)用脂质体包裹后，加入每孔内，使其均匀分布于细胞表面。置培养箱中培养 6h 后每孔加入无抗生素的培养基 2ml。

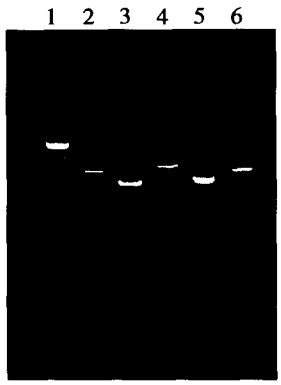
1.2.2.4 抗性筛选 转染 24h 后将细胞以 10 倍稀释转入培养瓶中继续培养。转染 48h 后，在培养基中加入抗生素 Zeocin (400μg/ml)及 Blasticidin(10μg/ml)进行筛选，每 3～4 天换液 1 次，约 3 周后抗性克隆形成，将细胞消化传代，在培养基中加 Zeocin 至终浓度为 200μg/ml，Blasticidin 为 10μg/ml 以维持。

1.2.3 四环素的诱导表达 在诱导前 1 天，消化细胞，以 1×10^6 细胞/瓶(不含抗生素)接种于培养瓶中，24h 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 0.5μg/ml、1μg/ml、2μg/ml、3μg/ml，于诱导后 24h、48h、72h，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)，同时收集上清，用 Abbott 的 AXSYM 自动免疫分析仪及其配套的微粒子酶免疫分析法(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

重组质粒 pcDNA4-S 用 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切，切下一约 900bp 的小片段和一约 5000bp 的大片段，与预期切下的片段大小相符(见图 1)。



1.Maker λ-EcoT14
2.pcDNA4 未酶酶切
3.pcDNA4 用 *Hind*III 酶切
4.pcDNA4-S 用 *Hind*III 酶切
5.pcDNA4-S 未酶切
6.pcDNA4-S 用 *Hind*III 和 *BamH*I 双酶切

图 1 pcDNA4-S 酶切鉴定图谱

2.2 转染和抗性筛选

经过抗性筛选，建立了共转染重组质粒 pcDNA4-S 和 pcDNA6 的 HepG2 细胞株。

2.3 四环素诱导后转染细胞 HBsAg 的表达

2.3.1 逆转录 PCR 检测 S 基因表达 RT-PCR 检测结果表明 S 基因在 HePG2 中能够转录，图 2 示为逆转录的 S 基因片段。

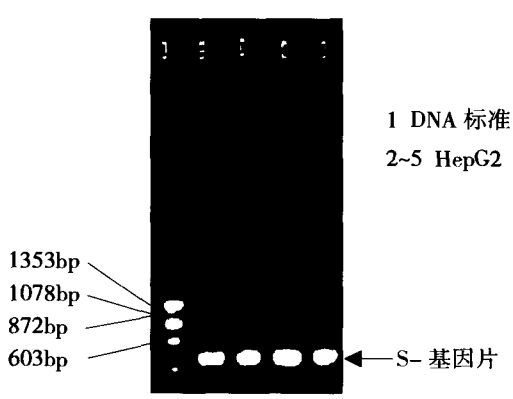


图 2 逆转录 S 基因片段

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 均有少量表达；在加入四环素诱导后 24h，细胞上清中可检出 HBsAg，在 48～72h 内呈上升趋势，但是同一时间点不同浓度四环素组间 HBsAg 表达量无明显差异($P>0.05$)(表 1)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

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

诱导后时间(h)	四环素浓度(μg /ul)				
	0	0.5*	1*	2*	3*
24	2.26 ± 0.04	7.51 ± 0.02	7.48 ± 0.04	7.41 ± 0.09	7.44 ± 0.07
48	3.51 ± 0.03	25.57 ± 0.24	25.38 ± 0.15	25.63 ± 0.46	25.25 ± 0.49
72	4.09 ± 0.03	42.51 ± 0.52	42.83 ± 0.22	42.37 ± 0.39	42.49 ± 0.70

注:表中数值为 3 次结果的平均值;* 指同一时间不同浓度四环素诱导下的 HBsAg 间比较 P >0.05,与无四环素诱导组比较 P<0.01

3 讨 论

对目的基因的调控表达是基因治疗研究的热点之一[3,4],在真核细胞的调控表达系统中,四环素调控载体是应用最广泛的一种。本实验所用的质粒 pcDNA4 中,CMV 启动子内插入了两个拷贝的四环素操纵子序列($TetO_2$),可以使四环素调控的目的基因得以在真核细胞中表达[5]。质粒 pcDNA6 能在大多数真核细胞中表达高浓度四环素抑制阻抑蛋白,$TetO_2$ 序列与四环素抑制蛋白有高度亲和力[6],故作为结合位点与 4 个阻抑蛋白分子结合,从而能够建立起对目的基因的调控。

将重组质粒 pcDNA4-S 和 pcDNA6 按一定比例共转染到真核细胞中,无四环素时,pcDNA6 的四环素抑制基因(TR)表达的四环素阻抑蛋白与 pcDNA4-S 中启动子的两个四环素操纵子结合,阻止其下游 HBsAg 基因的转录。有四环素存在时,四环素与阻抑蛋白结合,便解除了阻抑蛋白对四环素操纵子的抑制,从而启动子下游的目的基因 S 得以表达。为了有足够量的四环素抑制蛋白表达,本研究将 pcDNA6 和 pcDNA4-S 按一定比例(6:1)转染细胞,以期在无四环素诱导下能完全抑制目的基因表达。但是从结果看,还是有少量 HBsAg 表达,可能是阻抑蛋白对操纵子的抑制作用不完全,存在一定的"漏"(leakiness)表达,即在无四环素存在下,目的基因也可能会有少量的基础表达,与文献报道一致[1]。

本研究的根本目的是想实现四环素对目的基因的精细调控表达,即四环素的浓度不同,目的基因表达量也随之而变化。在本实验中当加入不同浓度的四环素后,HBsAg 的表达量均明显增加,并且随时间的延长表达量逐渐增高,但是同一时间点不同浓度四环素诱导组间的 HBsAg 表达量似乎没有太大差别。从这一点分析,实验没有达到预期的结果,但可以看到四环素加入后确实启动了目的基因的表达。要实现对目的基因的精细调控,可能需要构建新一代的载体[1]。

(通讯作者:周 智,男,40 岁,教授、博士,硕士生导师,主要研究方向:病毒性肝炎的基础和临床。E-mail:zhouzhi2300@126.com)

参 考 文 献

[1] 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.

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

[3] Clackson T. Regulated gene expression system[J]. Gene Therapy,2000;7:120-125.

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

[5] 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;9:1939-1950.

[6] Hillen W,Berens C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance[J]. Annu Rev Microbiol,1994;48:345-369.