维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0023-03

四环素双表达调控表达载体的构建、鉴定

周　智,倪　艳,雷　宇,王蜀强,陈压西,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:构建在同一载体中可用四环素调控表达目的基因的载体。方法:以 pcDNA4™/TO 为模板,用 PCR 法扩增含四环素调控表达序列的片段 TO(位于 NdeI 和 SacII 之间),插入 pUC118 载体中测序,选择测序正确的序列取代 pVITRO3 载体中相应的片段,构建成 pVITRO3-TO。用相同的方法以 pcDNA6/TR©为模板扩增四环素阻遏蛋白基因(TR),经测序证实后插入 pVITRO3-TO 载体的一个多克隆位点。结果:用 PCR 成功扩增出四环素调控表达序列片段和四环素阻遏蛋白基因片段,亚克隆后各选 2 个克隆测序,均找到了序列正确的克隆,经内切酶双切后插入 pVITRO3 中,完成了目的载体的构建。结论:初步构建了四环素双表达调控表达载体(pVITRO3-TO-TR)。

【关键词】调控表达载体;构建;四环素

【中国图书分类法分类号】R 34　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-07-07

Construction and confirmation of tetracycline-dependent regulatory system in one vector

ZHOU Zhi, et al

(*Department of Diseases Therapy Center, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical Univesity*)

【Abstract】*Objective*: To construct tetracycline-dependent regulatory system in one vector, which contains two multiple cloning sites (MCS) for the convenient cloning of two target genes. *Methods*: The tetracycline (Tet)-dependent regulatory fragment (TO) (between NdeI and SacII sites) was amplified from pcDNA4™/TO vector with PCR, which was inserted into pUC118 vector and sequenced. The counterpart fragment in pVITRO3 was replaced with correct Tet-dependent regulatory fragment, namely pVITRO3-TO vector. The Tet repressor gene (TR) encoding the Tet repressor from pcDNA6/TR© vector was incorporating into the backbone of the pVITRO3-TO. *Result*: The tetracycline (Tet)-dependent regulatory fragment and the Tet repressor gene were amplified successfully with PCR from its template vectors and were subcloned. The clones with correct sequence were selected by sequencing the picked 2 clones. The target vector was constructed successfully by incorporating TO and TR into the backbone of pVITRO3 vector. *Conclusion*: Tetracycline-dependent regulatory double-expressing system in one vector was constructed initially.

【Key words】Regulatory expressing vector; Construction; Tetracycline

实现目的基因的定向、定位和调控表达是基因治疗的难点和热点[1,2],目前常用的调控表达系统主要是四环素依赖的系统[3,4]。本研究采用分子生物学的方法,将四环素调控表达序列和四环素阻遏蛋白基因分别插入双表达载体 pVITRO3 中,构建成在同一载体中可用四环素调控表达目的基因的载体,结果如下。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　质粒和菌株　pcDNA4™/TO(编号 V1020-20)5078bp,在启动子内含有四环素调控表达序列,pcDNA6/TR©(编号 V1025-20)6662bp,能够表达四环素调控表达序列阻遏子,购于美国 Invitrogen 公司。pVITRO3 5335bp,有两个启动子和两个多克隆位点,EF-1α/HTLV 杂交启动子和 hCMV-IA 启动子,可同时高效表达两个目的基因。构建重组载体所用菌株为 E.coli JM109, pUC118 载体本所保存。

1.1.2　各种酶　内切酶 NdeI、SacII、StuI、ClaI 购于大连宝生

作者介绍:周　智(1966-),男,博士,主任医师,
主要研究方向:乙型肝炎的基础和临床研究。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(30100158)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

物有限公司,PCR 试剂 Taq 酶及高保真 Taq 酶 Taq Plus I 及 DNTP 购于上海生工、T4 DNA 连接酶购于 Promega 公司。

1.1.3 琼脂糖 加拿大真达公司,酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)、氨苄青霉素购与上海生工。

1.1.4 快速质粒提取试剂盒 (High Pure™ Plasmid Isolation Kit)、胶回收试剂盒分别购于保灵曼公司和 BIO-RAD 公司、TaKaRa DNA Ligation Kit (Code No. D6022)、PCR Fragment Recovery Kit (Code No. D301)、TaKaRa BKL Kit (Code No. D6127)、TaKaRa LA TaqTM (Code No.DRR002A) 购于大连宝生物有限公司。

1.1.5 各种引物:BcaBEST Primer M13-47/BcaBEST Primer RV-M 引物,为 pUC118 载体多克隆位点目的基因测序引物。扩增 pcDNA/TO 中四环素调控表达序列(TO),P1 5′ AGT GTA

NdeI *SacII*

T CAT ATG CCA AGT ACG C 3′,P2 5′ TAG TC CCG CGG AGG CTG GAT CGG TC 3′。扩增四环素调控表达序列阻遏

StuI

子(TetR) P3 5′ TGAT AGG CCT ATC TCT AGA TTA GAT

ClaI

AAA AG 3′ P4 5′ CTG CT ATC GAT TAA TAA GAT CGG AAT TCC CG 3′ 由上海生工合成。

1.2 方法

技术路线见图 1。

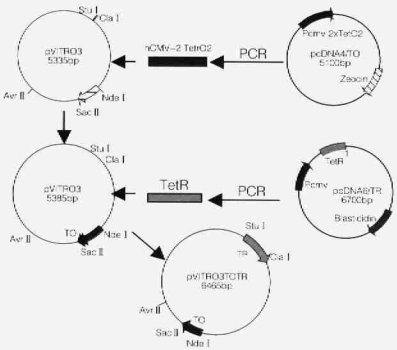


图 1 技术路线图

1.2.1 扩增 pcDNA4™/TO 中带有四环素调控表达序列的启动子部分 (TO) 和 pcDNA6/TR 中四环素阻遏蛋白基因 (TR),按常规 PCR 方法操作,用高保真 Taq 酶 Taq Plus I。

1.2.2 将基因片段 TO 和 TR 分别经 TaKaRa BKL Kit 处理补平粘端。

1.2.3 使用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的 Solution Ⅰ,将 pUC118/Hinc II/BAP 载体分别和 TO、TR 连接后,热转化至 E.coli 感受态 JM109 Cell 中,涂布含氨苄青霉素的平板过夜培养菌体。挑选单菌落,以 BcaBEST Primer M13-47/BcaBEST Primer RV-M 为引物,使用 TaKaRa LA Taq™ 进行 PCR 筛菌。

1.2.4 测序 将 PCR 扩增出片段大小与 TO 和 TR 基因片段大小相似的连接子测序,测序正确的克隆分别命名为 TO/pUC118-1,TR/pUC118-2。

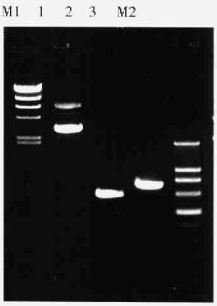
1.2.5 亚克隆

1.2.5.1 将 TO/pUC118-1 及 pVITRO3 质粒用 Nde I /Sac II 双酶切后,使用 TaKaRa PCR Fragment Recovery Kit 切胶回收目的片段和载体。使用 DNA 连接试剂盒中的溶液 I,将 pVITRO3 Nde I /Sac II Vector 和 TO/pUC118-1 Nde I/Sac II 片段连接,热转化进感受态 E.coil JM109 中,涂布平板(溯霉素)过夜培养。挑选单菌落植菌,提取质粒后取 1ml 进行 Bgl II 酶切鉴定、琼脂糖凝胶电泳,插入成功的质粒命名为 pVITRO3-TO。

1.2.5.2 用 Stu I /Cla I 分别双酶切 TR/pUC118-2 和 pVITRO3-TO,回收目的片段和载体,按 1.251 的方法构建 pVITRO3-TO-TR。

2 结 果

电泳初步鉴定 pVITRO3 载体和 PCR 扩增的 TO(480bp)、TR(660bp)片段,各取 2ml 进行琼脂糖凝胶电泳如图 2。



M1:λ-Hind Ⅲ DNA Marker
1:pVITRO3
2:TO
3:TR
M2:DNA Marker DL2,000 (片段大小自上而下分别为 2000,1000,750,500,250,100bp)

图 2 PCR 扩增 TO、TR 片段

挑选单菌落,以 BcaBEST Primer M13-47/BcaBEST Primer RV-M 为引物,使用 TaKaRa LA Taq™ 进行 PCR 筛菌。取 5ml PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果见图 3、图 4。

TO、TR 各选取 2 个阳性菌落植菌,用 BcaBEST Primer M13-47 为引物进行测序反应,质粒若一个反应未测通则用 BcaBEST Primer RV-M 为引物从质粒另一端进行测序,TO、TR 各测两个克隆。测序正确

维普资讯 http://www.cqvip.com

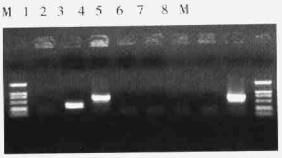


图 3 PCR TO 筛菌产物



图 4 PCR TR 筛菌产物

的克隆分别命名为 TO/pUC 118-1，TR/pUC118-2。

pVITRO3-TO 用 Bgl II 鉴定，如果插入成功，有两条带，如果未成功，只有一条带，见图 5，所选的 6 个质粒都成功插入了 TO 片段。



图 5 pVITRO3-TO 用 Bgl II 酶切鉴定

M1：λ-Hind Ⅲ DNA Marker，1.pVITRO3 质粒，2.pVITRO3 质粒 /Bgl II 酶切 3、5、7、9、11、13 为 pVITRO3-TO 重组质粒未酶切，4、6、8、10、12、14 为 pVITRO3-TO 重组质粒 /Bgl II 酶切，M2：DNA Marker DL2,000

将 TR/pUC118-2 及 pVITRO3-TO 质粒用 Stu I /Cla I 双酶切后使用 TaKaRa PCR 片段胶回收试剂盒切胶回收目的片段和载体，取 1ml 进行琼脂糖凝胶电泳，结果见图 6。

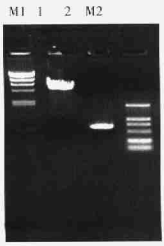


图 6 pVITRO3-TO 和 TR/pUC118-2 酶切回收

pVITRO3-TO-TR 用 Stu Ⅰ /Cla Ⅰ双酶切后鉴定，如果插入成功，有两条带，如果未成功，只有一条带，见图 7，所选 3 个克隆均为所需重组体。



图 7 pVITRO3-TO-TR 重组体用 StuI/ClaI 双酶切后鉴定

M1：λ-Hind Ⅲ DNA Marker，1：pVITRO3 质粒，2：pVITRO3 Stu I/Cla I 双酶切，3、5、7 为 pVITRO3-TO-TR 重组质粒未酶切，4、6、8 为 pVITRO3-TO-TR 重组质粒 Stu I/Cla I 酶切，M2：DNA Marker DL2,000

3 讨 论

四环素调控表达系统其基本原理如图 8，无四环素时，四环素阻抑蛋白与启动子中两个四环素操纵子结合，阻止目的基因转录(A)。在四环素存在时，四环素与阻抑蛋白结合，即可解除阻抑蛋白对启动子的抑制，从而启动目的基因转录(B)。四环素浓度不同，解阻抑的程度各异，从而实现对目的基因的调控表达。四环素系统由两部分组成，一个质粒表达四环素阻抑蛋白，一个表达目的基因，要进行调控表达，两个质粒需要同时转染同一细胞，由于质粒转染的不均匀性，要精确调控很困难。pVITRO3 为双表达质粒（图 9），有两个启动子，两个多克隆位点，可以同时克隆两个目的基因，彼此表达互不干扰。如把其中一个启动子用含四环素操纵子的启动子替换，在一个多克隆位点插入四环素阻抑蛋白基因，另一个插入目的基因，即可在同一载体中实

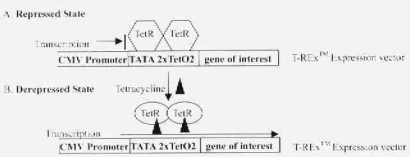


Figure 8 Transcriptional Regulation in the T-REx™ System

（下转第 94 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

压幅度，SBP 坐位（27.52 ± 11.90 ）/（20.72 ± 9.27）mm Hg；立位（24.59 ± 11.87）/（15.90 ± 16.22）mm Hg 与厄贝沙坦相比较，有显著性差异 $P<0.05$，DBP 相似。提示对收缩压控制较好，可能由于与其中坎地沙坦为二苯四咪唑类血管紧张素Ⅱ AT1 亚型受体拮抗剂，特点是能够快速有效地阻断血管紧张素受体，从而起到降压用，特别是可较好的控制收缩压有关[4]。治疗 2w 时坎地沙坦酯组、厄贝沙坦组降压有效率分别为 75.86%和 37.93%，两组比较有显著性差异（$P<0.01$）；治疗 4w 时的有效率分别为 89.66%和 79.31%，两组相似，提示治疗 4w 后两组药物均具有较好降压效果。与 Ogihara 等[5]的报道相同。ARB 类药物的不良反应发生率低而轻微，且不随剂量的增加而增加。本试验中坎地沙坦酯的不良反应发生率低，仅有 1 例头昏、1 例头痛，均为轻度不良反应，1 例尿路感染与药物无关，患者均能够耐受。

总之，本实验结果表明，坎地沙坦酯治疗轻中度高血压疗效确切，与厄贝沙坦比较降压疗效相似，两药不良反应少。药物不受年龄、性别和饮食的影响，患者耐受性好，特别是坎地沙坦酯对收缩压控制较好。

参 考 文 献

[1] Gradman AH. ATl-receptor blockers: differences that matter [J]. J Hum Hypertens, 2002;16: S9-S16.

[2] Easthope SE, Jarvis B. Candesartan cilexetil: an update of its use in essential hypertension[J]. Drugs, 2002;62: 1253-1287.

[3] Unger Pharmacology of ATl-receptor blockers Blood Press, 2001;10(Suppl 3): 1-6.

[4] 魏小丽，苏瑞斌. 降压药坎地沙坦酯、依那普利和氢氯噻嗪对女性高血压患者降压效果的比较[J].国外医学：药学分册, 2001；28(1): 53-53

[5] Ogihara T, Arakawa K. Clinical efficacy and tolerability of candesartan cihxetil. Candesartan study Groups in Japan[J]. J Hum Hypertens, 1999;13(S1): S27-S31

（上接第 25 页）

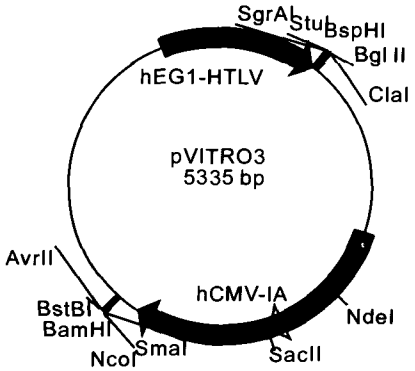


图 9 pVITRO3 简图

现调控表达。

pcDNA4™/TO 和 pVITRO3 载体中的一个启动子均为人巨细胞病毒启动子的一部分，经序列和酶切位点分析，pcDNA4™/TO 启动子在 NdeI 和 SacII 之间插入了四环素调控序列。我们用 PCR 法扩增 pcDNA4™/TO 位于 NdeI 和 SacII 之间的序列，亚克隆到 pUC118 载体中，经测序证实后，经 NdeI 和 SacII 位点插入 pVITRO3 载体中，完成了 pVITRO3-TO 载体的构建。用相同的方法，将四环素阻抑蛋白基因插入 pVITRO3-TO，构建成在同一载体中可用四环素调控表达目的基因的载体（pVITRO3-TO-TR）。

本研究采用分子生物学方法，经多次亚克隆成功构建了在同一载体中可用四环素调控表达目的基因的载体，虽然经内切酶酶切和测序分析重组载体与实验前设计完全相同，但插入目的基因后是否能表达，表达的效率如何，能否实现调控表达均需在我们进一步实验中证实。

参 考 文 献

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

[2] Ohkawa J, Taira K. Control of the Functional Activity of an Antisense RNA by a Tetatracycline-Responsive Derivative of the Human U6 snRNA Promoter[J]. Human Gene Therapy, 2000;11: 577-585.

[3] Agha-Mohammadi S, O'Malley M, Etemad A, et al. 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):817-28.

[4] Vogel R, Amar L, Thi AD, et al. A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain[J]. Hum Gene Ther, 2004;15(2):157-65.