维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0773 - 04

带 GFP 的启动子鉴定质粒的构建及在 HCV 启动子鉴定中的应用

陈维贤,张 君,张 娟,张秉祥,唐 霓,黄爱龙

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所感染性疾病实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:利用已有质粒构建带 GFP 报告基因的启动子鉴定质粒,并用此质粒鉴定丙型肝炎病毒 5 非翻译区(HCV 5′- UTR)启动基因表达的活性。方法:用限制性内切酶将质粒 pEGFP - N1 上的 EGFP 基因片断切下,与用相同酶切去除荧光素酶基因片断的 PGL3 enhancer 质粒大片断连接,得到带 GFP 的启动子鉴定质粒 pEGFP enhancer。HCV 5′- UTR 片断用 PCR 方法获得,插入 pEGFP enhancer 的多克隆区,构建 HCV 5′- UTR 驱动 GFP 表达质粒。应用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞并观察荧光。结果:成功构建带 GFP 报告基因的启动子鉴定质粒,并在此基础上构建了 HCV 5′- UTR 启动 GFP 表达的质粒。前者转染 HepG2 细胞后,几乎无 GFP 表达,而后者观察到较强的绿色荧光。结论:该实验构建的带 GFP 报告基因的启动子鉴定质粒本底表达低,可用于真核启动子的鉴定。HCV 5′- UTR 可以启动报告基因的表达,具有启动子活性。

【关键词】启动子;丙型肝炎病毒;绿色荧光蛋白

【中国图书分类法分类号】R51 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 06 - 24

Construction of the promoter indentifying plasmid with GFP reporter gene and identification of the promoter activity of HCV 5′- UTR

CHEN Weixian, et al

(*Key Laboratory of Infectious Disease, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective: To construct a promoter identifying plasmid with GFP as reporter gene, and then identify the promoter activity of HCV 5′- UTR with this construct. Methods: In order to construct the promoter identifying plasmid with GFP as reporter gene, the fragment of EGFP was obtained from the plasmid pEGFP - N1 by restrict enzymes digestion. And this fragment was combined with the larger fragment of plasmid PGL3 enhancer digested by the same enzymes. The fragment of HCV 5′- UTR was obtained by PCR amplification and inserted into the promoter identifying plasmid. The structure of constructed plasmid was confirmed by electrophoresis analysis and DNA sequencing. The function of construct was confirmed by lipofectamine - mediated transient expression in HepG2 cells. Results: DNA sequencing showed that the inserted fragment of the constructed plasmid was the same as the template HCV genome. The HepG2 cells transfected with promoter indentifying plasmid nearly didn't express the reporter gene of GFP while the plasmid with HCV 5′- UTR could express the GFP gene. Conclusions: The results showed that the author successfully constructed the promoter identifying plasmid with GFP as reporter gene. The fragment of HCV 5′- UTR could behaviour as an eurakocyte promoter in HepG2 cells.

【Key words】Promoter; Hepatitis C virus; Green fluorescence protein

丙型肝炎是严重威胁人类健康的重要传染病,丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)为一线性单股正链的 RNA 病毒,其基因组全长约 9.6kbp,基本结构为 5' - UTR - C - E1 - E2/NS1 - NS2 - NS3 - NS4 - NS5 - 3' UTR。HCV 复制、转录与翻译的分子机制目前尚无明确的认识[1~3]。为深入了解 HCV 的启动子序列及其功能,我们构建了以绿色荧光蛋白(Green fluorescence protein, GFP)为报告基因的启动子鉴定质粒,并用此质粒鉴定了 HCV 5 非翻译区(5 untranslating region, 5′- UTR)启动下游基因表达的功能。

1 材料与方法

作者介绍:陈维贤(1975 -),男,博士,
主要研究方向:HCV 致病机制及基因治疗。

基金项目:国家自然科学基金(30400373)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

质粒 pEGFP－N1，pCDNA3.1(＋)，PGL3 enhancer 为重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存并提供。含 HCV1a 型全长 cDNA 质粒 HF/L 由美国 rocofeller university 的 Rice 教授赠送。限制性内切酶 Hind Ⅲ，Xho Ⅰ，Xba Ⅰ 和 Nco Ⅰ，碱性磷酸酶(CIAP)，连接酶及 JM109 菌株为 promega 公司提供。PCR 反应试剂均为 Takara 公司产品。质粒小量抽提试剂盒，PCR 产物纯化及胶回收试剂盒为 Omega 产品。细胞转染用脂质体 Lipofectamine 为 Invitrogen 公司产品。HepG2 细胞株为重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存并提供。细胞培养用新生牛血清为世纪清产品。其他常用试剂为本室自行配制。

1.2 方法

1.2.1 带 GFP 报告基因的启动子鉴定质粒 pEGFP enhancer 的构建 如图 1，将 pEGFP－N1 和 pCDNA 3.1(＋)用 Hind Ⅲ 和 Xho Ⅰ 双酶切，分别回收小片断和大片断，以 T4 DNA 连接酶连接后得质粒 pCDNA 3.1(＋)－EGFP，再将此质粒和 PCL3 enhancer 用 Hind Ⅲ 和 Xba Ⅰ 双酶切，分别回收小片断及大片断，以连接酶连接后得质粒 pEGFP enhancer.

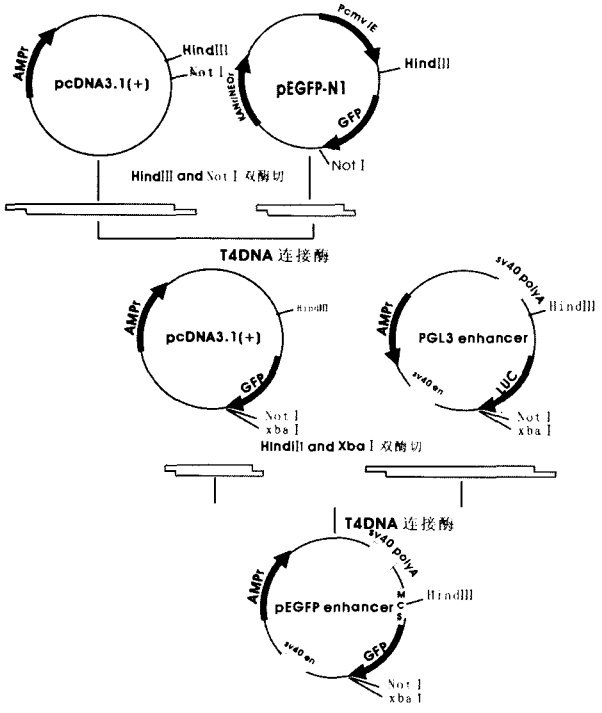


图 1 质粒 pEGFP enhancer 的构建技术路线图

1.2.2 含 HCV5′－UTR 的表达质粒的构建

1.2.2.1 引物设计与合成 根据 HCV 1a 型基因组序列，设计合成一对扩增引物。上游引物为 5′－CTAAAGCTTGCCAGCCCCCTGATGG－3′，含有 Hind Ⅲ 酶切位点；下游引物为 5′－AACAAGCTTGGTGCACGGTCTACGAGACC－3′，亦含有 Hind Ⅲ 酶切位点。扩增产物为 HCV1－341bp 片断(5′－UTR)。引物由上海博亚申友公司合成。

1.2.2.2 PCR 扩增 反应体系：25μl，10×PCR buffer(含 Mg^{2+}) 2.5μl，dNTP (2.5mmol/L each) 2μl，上下游引物(10pmol/μl)各 1μl，HF/L 质粒模板(20ng/μl) 1μl，pyrobest 高保真酶 1U，DH_2O 补足 25μl。反应条件为：94℃ 预变性 5min；94℃ 变性 30s，58℃ 退火 30s，72℃ 延伸 30s，循环 30 次后 72℃ 延伸 10min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，观察并成像。

1.2.2.3 质粒构建 PCR 产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化。纯化产物用 Hind Ⅲ 消化，再次用 PCR 产物纯化试剂盒纯化并进行紫外定量。载体 pEGFP enhancer 用 Hind Ⅲ 消化，胶回收试剂盒纯化后用碱性磷酸酶处理，使其 5′端去磷酸化，再次纯化后与酶切处理的 PCR 产物连接。连接产物转化感受态 JM109 细菌，接种至 LA 平板，37℃ 孵箱过夜培养。

1.2.2.4 克隆鉴定 挑取 LA 平板上生长的单个菌落至 LA 液体培养基，37℃，300r/min 震摇培养 16h，取 1ml 细菌作快速筛选，10000r/min 离心 30s，弃上清，加入 30μl 酚：氯仿：异戊醇(25：24：1)，重悬后离心 2min，取 10μl 上清液电泳，并以空载体作对照。取初筛阳性的菌株小量提取质粒，并将质粒用 Nco Ⅰ 酶切，以鉴定插入片断及插入方向。

1.2.2.6 序列分析 分别取正反向插入的阳性克隆进行 DNA 序列分析，由上海博亚申友公司完成。

1.2.3 质粒在细胞中的表达

1.2.3.1 细胞培养 HepG2 肝癌细胞株由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存并提供。采用 1640 培养基，加入 10% 小牛血清，青霉素 100U/ml，链霉素 100U/ml，在 37℃，5% CO_2 条件下进行培养及传代。

1.2.3.2 质粒转染 HepG2 肝癌细胞接种于 24 孔板，0.5×10^5/孔，待 90% 细胞融合后，采用脂质体 Lipofectamine 试剂盒进行转染，按说明书操作。每孔细胞脂质体用量为 2μl，质粒为 1μg。

1.2.3.3 GFP 活性观察 转染后继续培养 24h，48h，72h，以荧光显微镜观察细胞荧光。

2 结 果

2.1 带 GFP 报告基因的启动子鉴定质粒

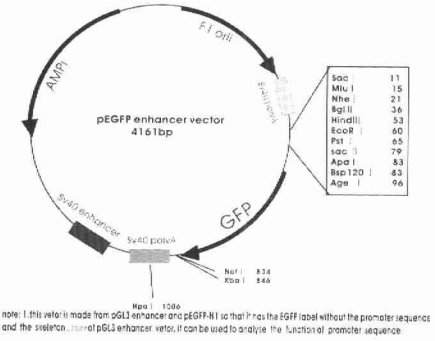
见图 2。该质粒拥有 PGL3 enhancer 的骨架和质粒 pEGFP－N1 的 GFP 报告基因。GfP 基因前为多克隆位区，无启动子序列，其前带 SV40 polyA，后有 SV40 enhancer 结构。

2.2 含 HCV 启动子片断的表达质粒的构建

2.2.1 HCV5′－UTR 片断 PCR 扩增结果 根据引物的设计，PCR 应扩增出 359bp 的产物(包括两端的酶切位点及保护碱基)，为完整的 HCV 5′非翻译区。如图 3 所见，PCR 产物位置与设计一致。

2.2.2 阳性克隆酶切鉴定：挑取 10 个克隆做质粒

维普资讯 http://www.cqvip.com



note: I, this vetor is made from pGL3 enhancer and pEGFP-N1 so that it has the EGFP label without the promoter sequence and the skeleton. Four of pGL3 enhancer vetor, it can be used to analyse the function of promoter sequence

图 2 质粒 pEGFP enhacer 结构示意图

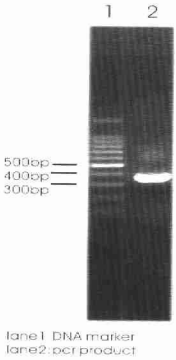


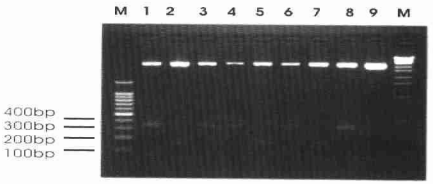
图 3 HCV 启动子片断 PCR 产物电泳图

初筛实验，其中 9 个克隆质粒泳动速度比空载体 pEGFP enhancer 慢，小量提取质粒以 Nco Ⅰ酶切鉴定。由于空载体 pEGFP enhancer 117bp 位置有一个 Nco Ⅰ酶切位点，而插入片断 83bp 位置有一 Nco Ⅰ酶切位点。故用克隆质粒用 Nco Ⅰ单酶切后可产生两个片断，正向插入时为 4190bp + 312bp，反向插入时为 4365bp + 137bp，pEGFP enhancer 为 4161bp。如图 4 所见，克隆 1,3,4,6,8 均为正向插入，而 2,5,7 则为反向插入。

2.2.3 序列测定结果 挑取克隆 1 和 2 进行序列分析，插入片断与模板 DNA 完全一致。分别命名为 HCV HCV 5′- UTR - GFP enhancer(+) 和 HCV HCV 5′- UTR - GFP enhancer(-)

3.3 质粒在细胞中的表达

质粒 pEGFP - N1, pEGFP enhancer, HCV HCV 5′- UTR - GFP enhancer(+), HCV HCV 5′- UTR -



M: DNA marker
Lane 1-8 : plasmid1-8 digested by Nco I
Lane 9: pEGFP enhancer digested by Nco I

图 4 阳性质粒的酶切鉴定

GFP enhancer(-)分别转染 HepG2 细胞，荧光观察结果见图 5。

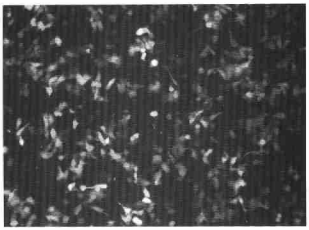
3 讨 论

HCV 为一线性单股正链的 RNA 病毒，其分子病原学机制尚未彻底清楚。一般认为其复制过程是 RNA 到 RNA，而无 DNA 中间阶段。其 5′- UTR 和 3′- UTR 对病毒的复制和翻译的调控有着重要意义[4,5]。研究发现其 5′- UTR 中存在着一个内部核糖体进入部位，控制着其翻译起始和效率。同时 5′- UTR 在病毒复制中有重要意义[6]。有研究证实 5′- UTR 在体外可以结合病毒的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶，后者是病毒复制关键性必需成分[7-10]。本实验中将 5′- UTR 克隆到带有 GFP 报告基因的启动子鉴定质粒，结果该片断能够驱动下游报告基因的表达，而作为对照的反向插入片断则不能，证实 5′- UTR 片断有启动子活性，但其反向序列则无启动子活性。

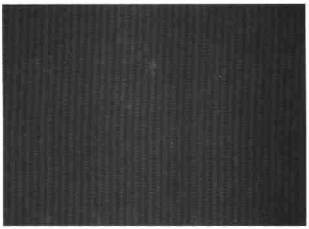
相同条件下转染 pEGFP - N1 和 pHCV 5' - UTR - GFP enhancer，发现后者较前者表达荧光的细胞数量较少，荧光也较弱，证明 HCV5' - UTR 启动基因表达的活性较 CMV 启动子(pEGFP - N1 上 GFP 前的启动子为 CMV 启动子)弱。可能 HCV5' - UTR 启动因表达的较低活性亦是其在体内复制效率较低的原因之一[8]。我们在研究中还初步发现 5' - UTR 的第一结构域对其启动活性有抑制作用，下一步的研究还在进行中。

本研究中利用已有的质粒成功构建了带有 GFP 报告基因的启动子鉴定质粒，该质粒 GFP 报告基因前无启动子，且有 SV40 的 poly A 结构，故 GFP 报告基因不能转录和表达，因此空载体转染 HepG2 细胞时只有极微弱的荧光背景。当克隆进的片断具有启

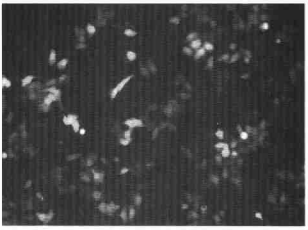
维普资讯 http://www.cqvip.com



A



B



C



D

A:pEGFP - N1
B:pEGFP - enhancer
C:HCV 5′- UTR - GFP enhancer(+)
D:HCV 5′- UTR - GFP enhancer(-)

图 5 4 种真核表达质粒转染 HepG2 细胞 48h 荧光观察情况

动活性时,就能够启动该基因的转录进而表达出 GFP,在荧光显微镜下可见到绿色荧光。该鉴定质粒优点是非常直观、简单,可以广泛地用于其它真核启动子研究。

参 考 文 献

[1] Major M E, Feinstone S. The molecular virology of hepatitis C[J]. hepatology, 1997; 25: 1527 - 1538.

[2] 周卫平,张大志,张定凤等。重组丙型肝炎病毒基因载体的构建与表达[J]. 重庆医科大学学报,1998;23(2):133 - 136.

[3] Choo QL. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 2451 - 2455.

[4] Edwin AB, Hangchun Zhang, Huaping Li, et al. Secondary structure of the 5′nontranslated region of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs[J]. Nucleic Acids Research. 1992;20(19): 5041 - 5045.

[5] Lohmann V, Korner F, Koch, JO. Et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line[J]. Science, 1999;285:110 - 113.

[6] Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture[J]. Science, 2000; 290:1972 - 1974.

[7] Friebe P, Lohmann V, Krieger N, et al. Sequences in the 5′nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. J virol., 2001;75: 12047 - 12057.

[8] ZT Qi, Kalkeri G, Hanible J, et al. Stem - loop structures Ⅱ - Ⅳ of the 5′nontranslated sequences are required for the expression of the full - length hepatitis C virus genome[J]. Arch Virol, 2003; 148:449 - 46.

[9] Takahito K, Koyu H, Michinori K, et al. Promoter/Origin structureof the Complementary structure of hepatitis C virus genome. [J]J. Biol. Chem. 2002; 277(32): 28700 - 28705.

[10] Estelle D, Cathy S, Marie C, et al. A promoter activity is present in the DNA sequence corresponding to the hepatitis C virus 5′UTR[J]. Nucleic Acids Research, 2003; 31(4): 1275 - 1281.