维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0368－04

顺式串联双拷贝 DuIFN－γ 基因的真核表达

黄爱龙[1],单幼兰[1],Allison Jilbert[2], Ieva Kotlarski[2]

(1.重庆医科大学病毒性肝炎研究所　重庆　400016,2.澳大利亚阿得雷德大学微生物与免疫学系　南澳州　5005)

【摘　要】目的:以鸭 γ－干扰素(DuIFN－γ)基因为目的基因,研究同一启动子调控下,不同拷贝数的目的基因的表达状况。方法:采用基因重组技术构建含 DuIFN－γcDNA 单拷贝和双拷贝重组质粒并转入真核细胞 COS－7 中进行表达。DuIFN－γ活性采用 Griess 试剂检测。结果:双拷贝重组质粒和单拷贝重组质粒 50%最大活性稀释度分别为 1:320 和 1:160。双拷贝重组质粒转染上清稀释 10240 倍后,仍保留 DuIFN－γ活性,而单拷贝重组质粒转染上清经 1280 倍稀释后,即丧失活性。结论:在同一启动子作用下,顺式插入双拷贝目的基因可明显增强目的基因在真核细胞中的表达量。

【关键词】真核表达;γ－干扰素;基因重组;基因调控

【中国图书分类法分类号】R512.6+3;Q344+.13　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2001－02－28

Eukaryotic expression of cis－inserted double copies of DuIFN－γ gene

HUANG Ai－long, et al

(Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: *In this study, duck interferon－gamma(DuIFN－γ) gene has been used as target gene to investigate the effect of copy number of cloned foreign gene on the expression of target protein under control of a single promoter.* ***Methods***: The 1.4kb size of DuIFN－γ cDNA was cleaved from plasmid pGEM－DuIFN－γ with EcoRI and subcloned into the EcoRI site of pcDNA1.1/Amp vector. The copy number and orientation of insert in recombinant plasmids were characterised by restriction enzyme analysis and transfected into COS－7 cells for expression with FuGENE6 transfection reagent. The biological activity of DuIFN－γ in cultured supernatant was assayed with Griess reagent for its capacity of activating chicken macrophage cell line HD11 to secrete nitric oxide. The recombinant plasmids with one or two copies of forward inserts were identified with restriction enzyme analysis. ***Results***: The results of DuIFN－γ biological assay showed that 50% of maximal DuIFN－γ activity was reserved after 1:160 dilution of cultured supernatant transfected by recombinant plasmid with single copy of DuIFN－γ cDNA, the cultured supernatant of transfected COS－7 cells remained half of the maximal activity of DuIFN－γ following 1:320 dilution. In addition, the DuIFN－γ was still active after 10240 fold dilution for plasmid wth double copies of DuIFN－γ genes, but inactive after 1280 fold dilution for plasmid with single copy of DuIFN－γ gene. ***Conclusion***: By sharing the same promoter, the level of target protein (DuIFN－γ) expressed by recombinant plasmid with two copies of forward insert was obviously enhanced in eukaryotic cells.

【Key words】 Eukaryotic expression; Interferon－gamma; Gene recombination; Gene regulation

近年来由 Chisari 领导的研究小组在乙型肝炎病毒(HBV)转基因小鼠模型上的工作表明,γ－干扰素等细胞因子在清除 HBV 感染中可能发挥了重要作用[1~4]。由于 HBV 转基因小鼠作为非感染模型,存在一定的局限性,我们试图在鸭乙型肝炎病毒感染的鸭子模型中证实上述推论。为此我们于最近从鸭脾细胞 cDNA 文库中成功克隆和鉴定了鸭子 γ－干扰素(DuIFN－γ)基因[5]。在进行 DuIFN－γ基因的真核表达时,我们无意中筛选和鉴定了顺式插入的双拷贝 DuIFN－γ 重组质粒,并且发现其表达的 DuIFN－γ 活力较之单拷贝对照质粒明显升

作者介绍:黄爱龙(1964－　),男,重庆人,教授,硕士。主要研究方向:病毒性肝炎发病机理与治疗。

基金项目:由澳大利亚国家医学卫生研究基金(NH&MRC)资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

高。现将有关结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和受体菌 真核表达载体 pcDNA1.1/Amp 购自 Stratagene 公司。重组质粒 pGEM－DuIFN－γ 由黄爱龙等构建。包含完整 1.4kb DuIFN－γ cDNA 序列。插入片段可经 EcoRI 单酶切回收。对照质粒 pcDNA－ChIFN－γ 由 Dr Lowenthal 赠送[6]，包含完整 ChIFN－γcDNA 片段。受体菌为 Top10F，由本室自备。

1.1.2 细胞 HD11 为体外传代的鸡巨噬细胞株，由 Dr Lowenthal 提供[7]。培养基为含 10% 小牛血清的 DMEM。COS－7 细胞株由本室自备。培养基为含 10% 小牛血清的 RPMI1640。

1.1.3 其它主要化学与分子生物学试剂 酚、氯仿等化学试剂主要购自 Sigma 公司。质粒提取试剂盒为 Bresatec 公司产品。DNA 回收试剂盒为 Qiagen 公司的 QIAquick Gel Extraction Kit。转染试剂为德国 Boehringer Manheim 公司生产的 FuGENE6。所有限制性内切酶及蛋白酶 K 均为 Pharmacia 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒构建 重组质粒 pGEM－DuIFN－γ 经 EcoRI 酶切后，采用琼脂糖胶回收含目的基因 DuIFN－γ 的 1.4kb 小片段。真核表达载体 pcDNA1.1/Amp 则经 EcoRI 酶切和 CIAP 去磷酸化后，与上述目的基因连接。连接产物脱盐后电转化至受体菌 Top10F，氨苄青抗性筛选转化子。

1.2.2 重组质粒鉴定 采用限制性内切酶 EcoRI、XbaI、HindⅢ鉴定插入片段的方向和拷贝数。

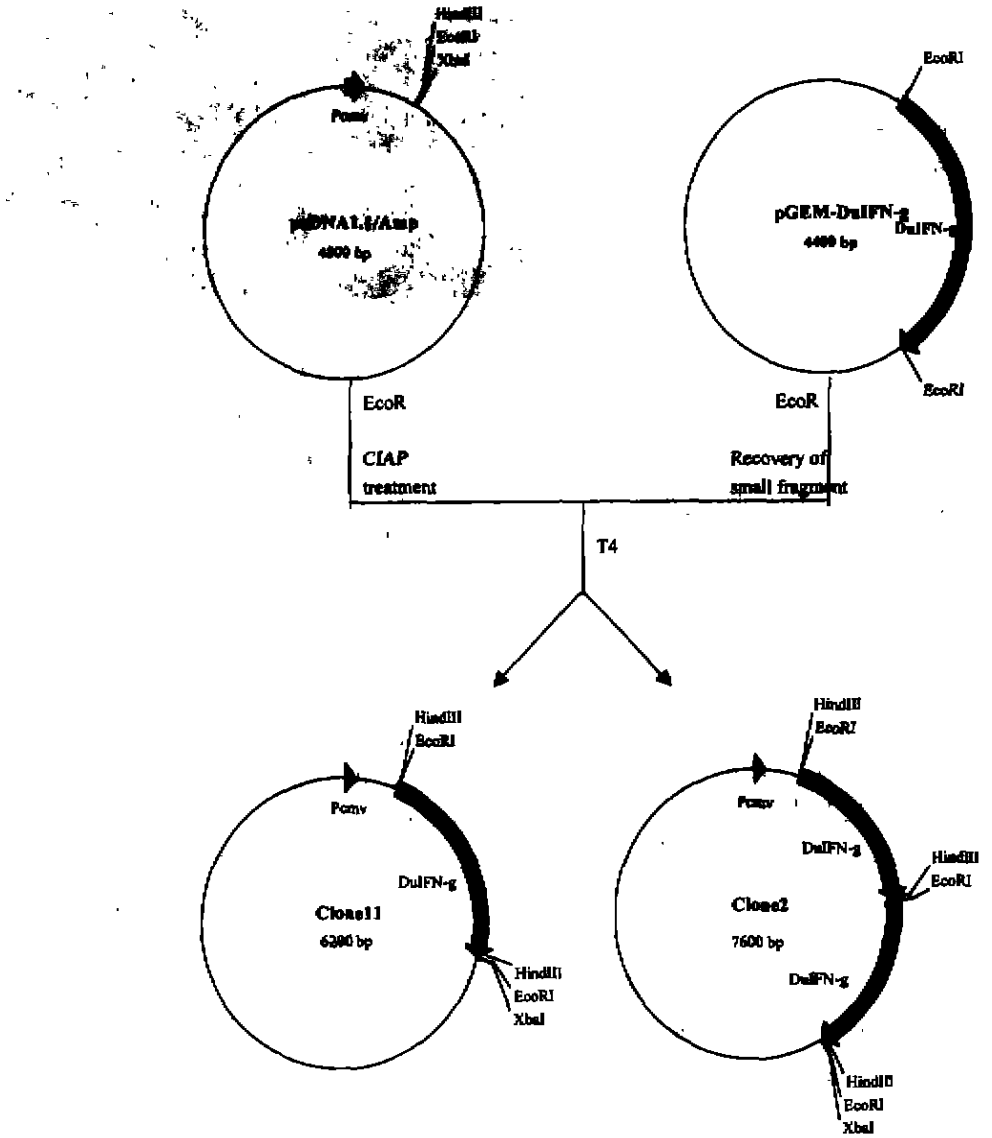


图 1 重组质粒构建技术路线

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.3 瞬时转染 COS－7 细胞 COS－7 细胞的转染采用 FuGENE6 转染试剂。主要步骤简述如下：取 1μg 重组质粒(浓度不低于 100ng/μl)小心滴加至 100μl 稀释的转染试剂中(6μlFuGENE6 + 94μl 培养基)。混匀，室温 15min 备用。COS－7 细胞临用前一天接种至 6 孔板中，加入 2ml 培养基，37℃培养至细胞密度为 50%～80%备用。将上述制备的转染混合物小心滴加至 COS－7 细胞培养液中，小心摇匀后，37℃培养，24h 后收集上清，测定 DuIFN－γ活性。

1.2.4 DuIFN－γ活性测定 由于鸡和鸭 γ－干扰素活性具有交叉性[5]。我们利用 DuIFN－γ刺激鸡巨噬细胞株 HD11 产生 NO 的浓度高低反映 DuIFN－γ活力大小。具体方法如下：于 96 孔板中，2 倍系列稀释上述 COS－7 细胞培养上清，每孔体积为 100μl，同时于每样品孔中加入 100μl 2×10^5 个 HD11 细胞。37℃培养 24h 后，收集上清，测定 NO 含量。

1.2.5 NO 含量测定 利用对氨基苯磺酸将 NO 氧化成亚硝酸盐或硝酸盐，后者能与 N－1－奈基乙二胺形成紫红色水溶液[8]。具体方法如下：于 96 孔板中，分别加入 100μl PECs 培养上清、100μl Griess 试剂(0.1% N－1－奈基乙二胺和 1% 对氨基苯磺酸等体积混合物)，混匀后，室温放置 10min，于 540nm 比色，以亚硝酸钠作为标准品绘制标准曲线。

2 结 果

2.1 DuIFN－γ真核表达重组质粒构建

重组质粒构建如图 1 所示。连接产物经转化受体菌 Top10F 后，得到两种大小明显不同的重组质粒，如图 2。经限制性内切酶进一步酶切鉴定，发现 Clone11 经 XbaI 酶切后，产生一大小为 6.2kb 的线性片段，经 EcoRI 和 HindIII 酶切后，均释放出约 1.4kb 的插入片段，如图 3。由于 DuIFN－γcDNA3′端带有一 HindIII 酶切位点，所以 HindIII 酶切后，释放出 1.4kb 插入片段，证明是顺式插入。结合线性化质粒的大小，Clone11 应为顺式插入的单拷贝 DuIFN－γ重组质粒。Clone2 经上述酶作用后，其酶切图谱基本与 Clone11 一致。只是 XbaI 线性化后，重组质粒的大小为 7.6kb，因此 Clone2 中应该插入有双拷贝的 DuIFN－γcDNA 片段。另外，EcoRI 和 HindIII 酶切后，只释放出一种大小的插入片段(1.4kb)，并且带的强度比 Clone11 释放的略强，进一步证实双拷贝 DuIFN－γcDNA 插入方向为顺式头尾串联。



图 2 重组质粒大小比较

1. PstI－digested Lambda DNA Marker
2. Vector(pcDNA1.1/amp)
3. Clone13　　4. CLone14
5. Clone11　　6. Clone2

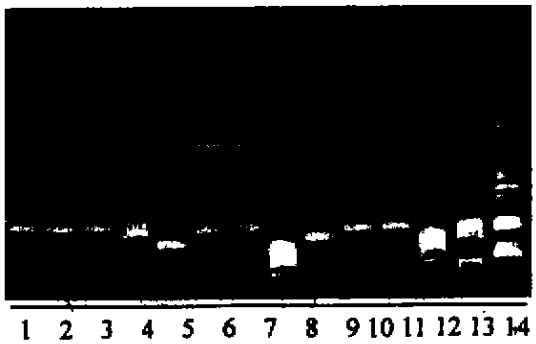


图 3 重组质粒限制性酶切分析

1. PstI－digested Lambda DNA marker
2. Control plasmid (plasmid 107)
3. Clone11
4. HindIII－digested clone11
5. EcoRI－digested clone11
6. XbaI－digested clone 11
7. Clone 2
8. HindIII－digested clone 2
9. EcoRI－digested clone 2
10. XbaI－digested clone 2
11. pcDNA1.1/amp
12. HindIII－digested pcDNA1.1
13. EcoRI－digested pcDNA1.1
14. XbaI－digested pcDNA1.1

2.2 重组质粒表达 DuIFN－γ活力比较

克隆的 DuIFN－γcDNA 大小为 1392bp，包含一完整的 ORF 区段(position 108－602nt，495bp)，编码由 164 个氨基酸组成的 DuIFN－γ蛋白。经信号肽预测软件分析，其 N－端带有由 24 个氨基酸组成的信号肽分子。因此重组质粒转染 COS－7 细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

后,表达的 DuIFN－γ蛋白分泌至细胞培养上清。由于鸡和鸭γ－干扰素具有高度同源性,其肽链氨基酸同源性为 67%,基因核苷酸同源性为 80%,因此尝试用鸡体外传代的巨噬细胞 HD11 作为靶细胞测定 DuIFN－γ活性。其测定结果如图 4 所示。可以看出,DuIFN－γ对 HD11 细胞具有明显的刺激作用。同作为阳性对照的鸡γ－干扰素(ChIFN－γ)比较,对 HD11 细胞的刺激作用相对偏低,可能与 ChIFN－γ受体跟 DuIFN－γ分子的亲和力相对较弱有关,而并不一定就代表 DuIFN－γ的真核表达比 DuIFN－γ差。有趣的是顺式插入的双拷贝重组质粒 Clone2 表达的 DuIFN－γ活力明显高于单拷贝对照质粒 Clone11。两者 50%最大活性稀释度分别为 1∶320 和 1∶160。其中 Clone2 稀释 10240 倍后,仍保留 DuIFN－γ活性,而 Clone11 经 1280 倍稀释后,即丧失活性。说明处于同一启动下的双拷贝 DuIFN－γcDNA,可同时进行表达。表达量明显高于单拷贝质粒。

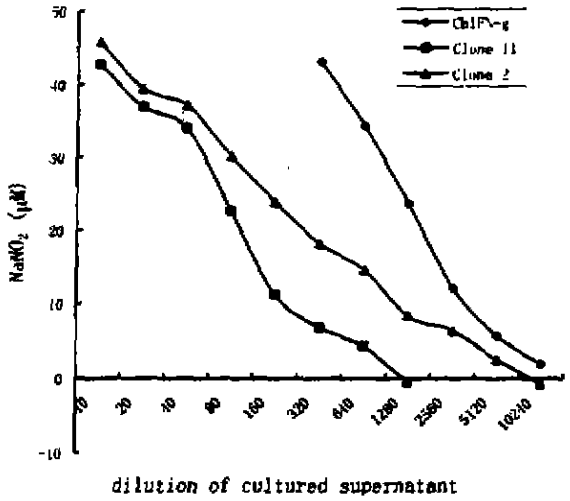


图 4 DuIFN－γ活性检测

3 讨 论

采用同一质粒表达多个不同的外源基因一直是基因表达研究的热点。目前常用的方法包括:(1)将多个目的基因(一般为两个)采用人工或天然接头嵌和在一起,克隆至相应的载体进行表达;(2)将不同的目的基因分别克隆至位于同一载体的两个表达单元中,由各自的启动子表达相应的目的基因。采用上述方法不仅成功地构建 IL－3/GM－CSF 等细胞因子的嵌合分子[9],而且设计和研制了各种多价重组疫苗,从而为更加经济、合理地使用疫苗开辟了广阔的前景[10]。一般认为,启动子与起始密码之间的距离在真核表达时并不十分重要,因此,理论上同一启动子可启动表达下游不同的读码框架,但距离启动子越远,读码框架表达效率越低。我们在进行 DuIFN－γ真核表达时,无意中筛选和鉴定了顺式插入的双拷贝 DuIFN－γ真核表达质粒,并发现其 DuIFN－γ活性明显高于单拷贝质粒对照,提示插入双拷贝外源基因,不失为一种简便地提高目的基因真核表达的方法。

参 考 文 献

[1] Guidotti, LG., Rochford, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection [J]. Science, 1999;284:825－831.

[2] Guidotti, LG., Ishikawa, et al. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes [J]. Immunity, 1996;4:25－36.

[3] Gilles, PN., Fey, et al. Tumor necrosis factor alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice [J]. J. Virol, 1992;66:3955－3960.

[4] Guilhot, S., Guidotti, et al. Interleukin－2 downregulates hepatitis B virus genes expression in transgenic mice by a post-transcriptional mechanism [J]. J. Virol, 1993;67:7444－7449.

[5] Ailong, H., Allison, et al. Structural and functional homology between duck and chicken interferon－gamma [J]. Develop. And Comp. Immuno, 2001;25(1):55－68.

[6] Digby, MR., Lowenthal, et al. Cloning and expression of the chicken interferon－γ gene [J]. J. Interferon Cytokine Res, 1995;15:939－947.

[7] Beug, H., Von Kirchenbach, et al. Chicken hemopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation [J]. Cell, 1979;18:375－390.

[8] Gree, LC, Wagner, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrite in biological fluids [J]. Anal. Biochem, 1982;126:131－138.

[9] Curtis, BM., Williams, et al. Enhanced hematopoietic activity of a human granulocytemacrophage colony－stimulating factor－interleukin 3 fusion protein [J]. Proc. Natl. Acad. Sci, 1991;88:5809－5817.

[10] 马海伦,孙朝晖,陆柔剑,等.同时表达多种外源基因的非复制型重组痘苗病毒的构建[J].病毒学报,1999;15:21－25.