

腺病毒介导的含第一内含子 pGH cDNA 在 CHO 细胞中的表达

李秀锦¹ 仲 飞^{1*} 王辛中² 齐顺章³

(¹ 河北职业技术师范学院, 昌黎 066600 ² Harvard University Medical School, Boston 02114, USA;

³ 中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘 要 通过同源重组的方法分别构建了在 CMV 启动子控制下的带有第一内含子和不带内含子的 pGH cDNA 基因的重组腺病毒。通过感染 CHO 细胞表明, 构建的重组腺病毒能够介导 pGH 基因在 CHO 细胞中表达, 加入第一内含子的 pGH cDNA 基因的表达效率比不加内含子的提高了 117%, 这说明 pGH 基因的第一内含子有促进该基因在真核细胞中表达的功能。

关键词 猪生长激素基因, 第一内含子, 腺病毒载体

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0193-05

据报道, 真核生物基因组的内含子, 特别是第一内含子, 存在有 DNA 复制、转录的调控元件^[1-4], 有的调控元件对基因的转录起促进作用, 有的则起抑制作用。猪生长激素(pGH)基因的第一内含子对基因的表达有无调节作用, 目前国内外尚无这方面的研究报道。近年来, 通过体细胞转生长激素基因以达到促进动物快速生长目的的研究受到人们的重视^[5,6], 而生长激素在动物体内的高水平表达是促进动物快速生长的必备条件。为提高 pGH cDNA 在动物体内的表达水平, 我们曾对 pGH cDNA 进行了改造, 将 pGH 基因的第一内含子装入到 pGH cDNA 中, 构建出含第一内含子的 pGH cDNA (pGHcDNA-in)^[7]。为确定加入第一内含子对 pGH cDNA 基因的表达有无调控作用, 本文将以腺病毒为载体, 通过同源重组方法分别构建在 CMV 启动子控制下的 pGH cDNA 和 pGH cDNA-in 两种重组腺病毒。通过感染培养的 CHO 细胞, 分析两种重组腺病毒介导的 pGH 基因在 CHO 细胞中的表达水平, 得出第一内含子对 pGH cDNA 表达影响的确切结果, 以探讨 pGH 基因第一内含子在基因表达调控上的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒 :pWH101、pZFCd-in、pCMV/gfp 质粒均

为本室构建或保存质粒, pΔESPIA(重组腺病毒穿梭质粒) λ pBHGE3、pFG140 质粒均购于加拿大 Microbix Biosystems 公司。

1.1.2 菌种和细胞 :HEK293 细胞由梁国栋教授赠送, CHO 细胞为本室保藏; *E. coli* DH5α 和 *E. coli* P3 菌为本室保藏菌种。

1.1.3 主要试剂 :限制酶 *Hind* III、*Xba* I、*Spe* I、*Eco*R I、*Bam*HI、*Xho*I、*Cla*I、*Sac*I、*Kpn*I、T4 DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、胰蛋白酶、吐温 20(Promega); MEM、DMEM、CHO-S-SFM、小牛血清、胎牛血清、Lipofectamine Reagents(Gibco); pGH 抗血清和 HRP 标记的 IgG 抗 pGH 本室制备。

1.2 主要实验方法

1.2.1 pΔECMV 质粒的构建 :用 *Xba*I 和 *Hind* III 双酶切 pΔE1SPIA 质粒, 回收大片段; 再用 *Spe*I 和 *Hind* III 酶切 pCMV/gfp 质粒, 回收 640bp 的 CMV 启动子小片段, 通过 T4 DNA 连接酶将回收的大、小两个片段连接, 连接液转化感受态 *E. coli* DH5α, 并涂布于含氨苄的琼脂板上, 挑取单菌落, 摇瓶培养细菌, 提取质粒, 酶切鉴定。

1.2.2 pΔECMVCD 和 pΔECMVCD-in 穿梭质粒的构建 :在 pΔECMV 质粒的 CMV 启动子下分别插入 pGH cDNA 和带第一内含子的 pGH cDNA-in。首先用 *Eco*RI 分别单酶切 pWH101(带有 pGH cDNA 基因)

收稿日期 2001-08-20, 修回日期 2001-10-15。

基金项目 河北省自然科学基金资助(No. 300264), 深圳科委资助项目(No. 98023)。

* 通讯作者。 Tel 86-335-2039911; Fax 86-335-2024487; E-mail: j0ZF@263.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

和 pZFCd-in(带有内含子的 pGH cDNA 基因)。酶切结束后,在 75℃ 10min 灭活内切酶。取上述酶切液 15 μ L, 10 \times Klenow Buffer 2 μ L, BSA(10mg/mL) 0.5 μ L, Klenow 酶(4 u/ μ L) 1 μ L, 1mol/L dNTP 1 μ L, 在室温下补平, 10min。75℃ 处理 10min 使 Klenow 酶灭活。用酚:酚:氯仿抽提,乙醇沉淀,将 DNA 片段溶于 10 μ L TE 中。后用 *Hind* III 分别酶切,用低熔点胶分别回收 830bp 和 1040bp 的 pGH 基因片段,电泳估计 DNA 片段含量。用 *Bgl* II 单酶切 p Δ ECMV 质粒,以与上述相同的方法补平,后用 *Hind* III 酶切,用低熔点胶回收载体 DNA,估计含量后分别与上述两个小片段进行连接,取连接液转化感受态 DH5 α 菌。通过涂布含氨苄琼脂板,挑取单菌落,摇瓶培养细菌,提取质粒及酶切鉴定过程进行阳性克隆的筛选。

1.2.3 重组腺病毒的构建 准备传代后约 36h, 满度为 70%~80% 的 293 细胞,将 10 μ g p Δ ECMVCD(或 p Δ ECMVCD-in 10 μ g) λ 10 μ g pBHGE3 和 40 μ L Lipofectamine Reagent 稀释在 200 μ L DMEM 中,混匀,在室温下放置 45~50min。再加入 0.8mL DMEM,将其覆盖在已用 DMEM 洗过的 293 细胞上,将细胞于 37℃、5% CO₂ 培养 6h 进行转染。向细胞生长液中加入含 2 倍量血清的生长培养基,18h 后换新的生长培养基。转染 48h 后换维持培养基,以后每 3d 换 1 次维持培养基。连续培养 14~18d,隔天在显微镜下观察一次细胞形态。待 293 细胞局部出现细胞病变(CPE),即出现细胞圆缩、脱落、裂解、形成空斑(噬斑)时,继续培养 3~4d,待大部分细胞脱落后,收集细胞和培养基,反复冻融 3 次,离心取上清(病毒液),-20℃ 保存,待下一步克隆和鉴定。

1.2.4 重组腺病毒的克隆与鉴定 重组腺病毒的克隆采用噬斑法^[8],重组腺病毒的鉴定采用:①感染性鉴定:用待鉴定的病毒液感染 293 细胞(90% 满度),如果在感染后 3~4d 左右出现典型的 CPE 现象,如细胞圆缩、脱落、形成空斑等病理现象,可初步判断为腺病毒。②病毒形态鉴定:通过磷钨酸法对待检病毒进行负染,在电镜下直接观察病毒形态。在电镜下腺病毒颗粒为典型的正六边形^[9]。③PCR 扩增外源基因片段的鉴定:首先在重组外源 pGH cDNA 中设计和合成 1 对引物。

上游引物 5'-TTCAAGCTTAGCTCCCCAGACCACTCAG-3'
下游引物 5'-GAAGCAGGAGAGCAGCCCGTAGTCTT-3'

以 *Hirt* 法^[10]提取的腺病毒 DNA 作为模板,通过 PCR 方法(94℃ 7min \rightarrow 94℃ 1min \rightarrow 55℃ 50s \rightarrow 72℃

1min 30s)循环 30 次 \rightarrow 72℃ 10min \rightarrow 4℃ 维持)扩增特异片段。

1.2.5 重组腺病毒的扩增和滴度测定 重组腺病毒的扩增采用 Graham 等人的方法^[11];病毒滴度测定采用 TCID₅₀ 法^[8]。

1.2.6 细胞培养基中 pGH 的含量测定 培养基中 pGH 的含量测定采用夹心 ELISA 测定法。

2 结 果

2.1 p Δ ECMVCD 和 p Δ ECMVCD-in 穿梭质粒的构建

在 p Δ ESPIA 质粒的 *Xba*I 和 *Hind* III 位点上插入由 *Spe*I 和 *Hind* III 双酶切 pCMV/gfp 得到的 CMV 启动子,构建成 p Δ ECMV 质粒;然后在 p Δ ECMV 质粒的 CMV 启动子下分别插入 pGHcDNA 和 pGHcDNA-in,分别构建出 p Δ ECMVCD 和 p Δ ECMVCD-in 穿梭质粒,见图 1。构建的质粒经酶切鉴定证明结构正确。

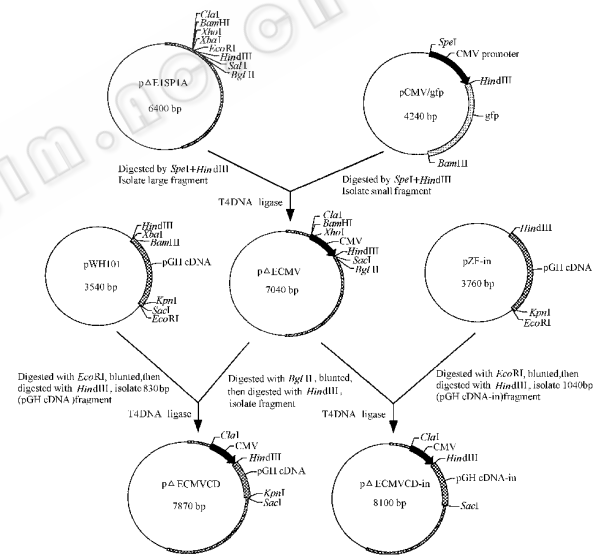


图 1 p Δ ECMVCD 和 p Δ ECMVCD-in 穿梭质粒的构建策略

Fig. 1 Construction of p Δ ECMVCD and p Δ ECMVCD-in shuttle plasmids

2.2 重组腺病毒的构建及鉴定

用 p Δ ECMVCD 和 p Δ ECMVCD-in 穿梭质粒分别与腺病毒重组质粒 pBHGE3 共转染 293 细胞,通过二者在 293 细胞中的同源基因重组(构建策略见图 2),分别构建出含 pGH cDNA 基因的重组腺病毒 CMVCD-reAd 和含 pGHcDNA-in 基因的重组腺病毒 CMVCD-in-reAd。

图 3 为共转染 16d 后 293 细胞部分区域出现的病变现象(CPE)。分别用两种重组腺病毒感染满度为 85% 以上的 293 细胞 Ad 后就可见到类似于图 3 典型的 CPE 现象。通过负染方法在电镜下观察两

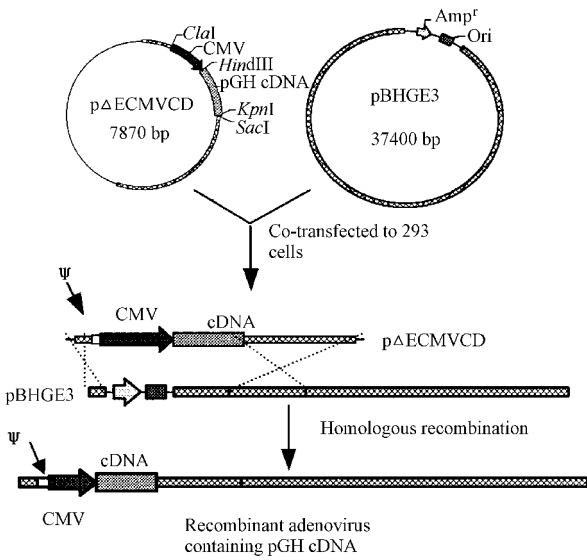


图 2 重组腺病毒构建策略

Fig.2 Construction of recombinant adenovirus

种重组病毒的形态均呈正六边形(图 4),为典型的腺病毒形态。所以认为获得了重组腺病毒。

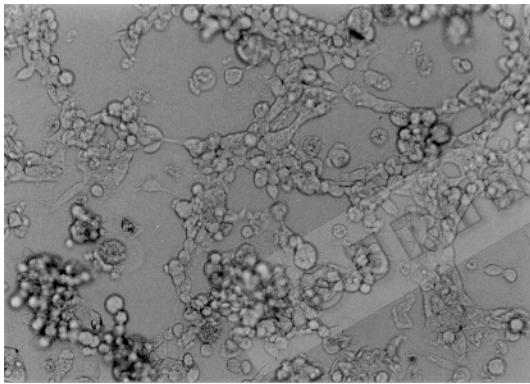


图 3 重组腺病毒引起的 293 细胞病变

Fig.3 CPE in 293 cells infected by the recombinant adenovirus

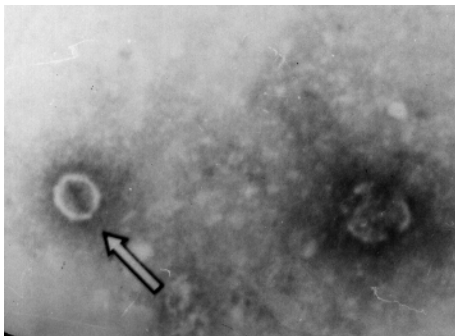


图 4 电镜下重组腺病毒颗粒的形态(×350,000)

Fig.4 Electron micrograph of CMVCD-reAd recombinant adenovirus

为鉴定是否为含 pGHcDNA 或含 pGHcDNA-in 的重组腺病毒,又通过 PCR 方法对其做进一步鉴定(从含 pGHcDNA 重组腺病毒 DNA 中应该扩增出

620bp 的片段;从含 pGHcDNA-in 重组腺病毒 DNA 中应该扩增出 860bp 的片段)。首先采用 Hirt 法提取两种重组腺病毒 DNA,以此 DNA 作模板,通过设计的引物进行 PCR 扩增,结果在 CMVCD-reAd 的 DNA 中扩增出 620bp 的 DNA 片段;在 CMVCD-in-reAd 的 DNA 中扩增出 860bp 的 DNA 片段(见图 5)。说明本文已得到了相应的两种重组腺病毒。经过多次传代,CMVCD-reAd 重组腺病毒的滴度(TCID₅₀)达 10^{-9.75},CMVCD-in-reAd 重组腺病毒的滴度达 10⁻¹⁰。

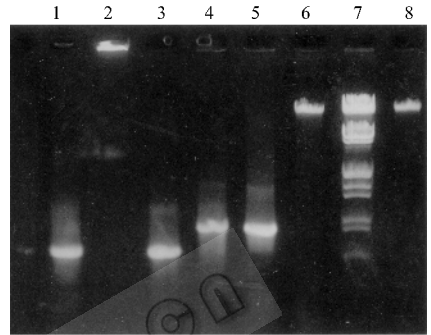


图 5 从重组腺病毒 DNA 中扩增的特异片段

Fig.5 PCR products amplified from recombinant adenovirus DNA

- 1. PCR products from CMVCDreAd ;
- 2. PCR amplifying result from Control Ad ;
- 3. PCR products from CMVCDinreAd ;
- 4. PCR amplifying result from Control Ad ;
- 5. λ DNA/ Hind III + EcoR I Marker ;
- 6. CMVCD-reAd DNA ;
- 7. CMVCD-in-reAd DNA ;
- 8. CMVCD-in-reAd DNA

2.3 腺病毒介导 pGH 基因在 CHO 细胞中的表达

2.3.1 不同感染时期 pGH 基因在 CHO 细胞中的表达水平:用 CMVCD-reAd 重组腺病毒感染满度为 90% 的 CHO 细胞,平行感染 3 瓶;用相同滴度的空腺病毒感染 CHO 细胞作对照。感染 12h 后换 CHO 无血清培养基(CHO-S-SFM),分别在感染后 24、48、72、96、144、168、192h 取样(细胞培养基)用夹心 ELISA 方法测定样品中 pGH 的含量。结果见图 6。

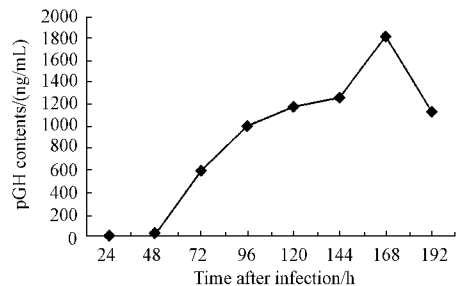


图 6 不同时期 CHO 细胞培养基 pGH 的含量变化

Fig.6 pGH contents in the medium of CHO cells in different periods

由图 6 可见,感染后 48h 内,生长激素的表达量很低,从 48h 开始表达量急剧上升,特别是在 48~168h 期间,表达量达到峰值。192h 时,表达量有所下降。

96h 期间,上升的幅度较大,到 168h 表达量达到最高值。168h 后 pGH 趋于下降。下降的原因可能是由于病毒对 CHO 细胞的损伤作用及细胞后期发生裂解,使表达出的 pGH 发生降解所致。这一结果说明由腺病毒介导 pGH 基因可以在真核细胞中进行分泌性表达。

2.3.2 第一内含子对 pGH 基因表达的影响 用 CMVCD-reAd 和 CMVCD-in-reAd 重组腺病毒分别感染满度为 90% 的 6 孔板 CHO 细胞,每种重组腺病毒同时感染 8 孔。感染后 24h 换 CHO 细胞专用无血清培养基,取感染后 120h 的细胞培养液,分别测定培养液中 pGH 的含量。测定结果见表 1。

表 1 带内含子和不带内含子的 pGH cDNA 在 CHO 细胞中的表达结果

Table 1 Expression results of pGHcDNA and pGHcDNA with first intron

No.	pGH contents(ng/mL)	
	CMVCDinrAd	CMVCDrAd
1	1166.7	618.0
2	1143.0	480.0
3	1348.2	512.4
4	968.1	501.6
5	1078.2	704.4
6	1209.9	391.2
7	987.6	523.2
8	1400.0	561.9
Means	1162.7 ± 155.39	536.6 ± 93.93
t Test	$P < 0.01$	

由表 1 的数据可以看出,由 CMVCD-reAd 介导的 pGH 基因在 CHO 细胞 pGH 表达量为 $536.6 \pm 93.93\text{ng/mL}$;由 CMVCD-in-reAd 介导的表达量为 $1162.7 \pm 155.39\text{ng/mL}$;后者明显 ($P < 0.01$) 高于前者,这说明加入第一内含子可明显提高 pGH 在培养细胞中的表达量,比不加内含子的提高了 117%。由此可见猪生长激素基因第一内含子可明显促进该基因在真核细胞中的表达。

3 讨 论

人类腺病毒载体是体细胞转基因常用的病毒载体。由于人类腺病毒具有理化性质稳定、宿主范围广、遗传毒性小、包装容量大等优点,因而被广泛应用于人类基因治疗的研究中^[12,13]。通过同源重组方法将外源基因整合在腺病毒 DNA 中,可使外源基因

在感染的细胞中得到充分表达。本文之所以利用腺病毒载体在 CHO 细胞中研究 pGH 基因的第一内含子对 pGH 基因表达的影响,是因为我们过去曾以脂质体介导在 COS7 细胞中进行过 pGH 基因的瞬时表达,但由于瞬时表达水平低,再加上测定方法不够灵敏,没有比较出加内含子和不加内含子 pGH 基因在表达上的区别。本文选用腺病毒作载体不仅使 pGH 基因在细胞中的表达水平大幅度升高,以利于分析 pGH 基因第一内含子在基因表达中的作用,同时为下一步动物体细胞转 pGH 基因的研究提供方便。在动物体细胞转基因研究中,特别是在人类基因治疗的体细胞转基因研究中,如何提高外源基因的表达水平是关系到能否通过体细胞转基因获得生物学效应的关键。影响外源基因的表达水平的因素很多,除与启动子的强弱及其组织特异性、宿主细胞的类型、载体介导的转基因效率有关外,还与基因本身的结构有关。同一外源基因的基因组基因和 cDNA 基因在真核细胞中的表达效率往往有很大的差别。近年来,人们就基因本身的结构对基因表达的影响进行了多方面的研究,特别是对内含子的研究,证明真核生物基因的内含子存在有对基因表达起调控作用的位点或元件。这些元件往往是某些转录因子或调控蛋白结合位点。有些元件对基因表达起促进作用,如大鼠 prothymosin α 基因内含子中的 Myc 蛋白质结合位点(CACGTG)^[14];胆碱脂酶基因第一内含子中的 499bp 片段^[15];线粒体 NADH 氧化酶基因第一内含子中的 SP1 结合位点等^[16]。但有些元件对基因的表达则起抑制作用,如血小板衍生生长因子(PDGF)A 链基因第一内含子中的负调控成分^[17]。所以在用真核细胞表达外源基因时,应根据具体情况选定是用基因组基因还是 cDNA 基因。

本文实验证明,猪生长激素基因的第一内含子对该基因的表达有明显的促进作用。因此为提高 pGHcDNA 在真核细胞或动物体内的表达水平,通过加入第一内含子可获得满意的效果。经分析表明,pGH 基因第一内含子存在有通用转录因子 ATF 结合位点(GTGACGT)^[7],推测表达水平的提高可能与该位点有关。有关此内含子乃至其它内含子对 pGH 基因表达的调节机制有待于进一步研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Oshima R G, Abrams L, Kulesh D. Activation of an intron enhancer within the 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated

~ 848

- [2] Hsu C ,Janicki S ,Monteiro M J. The first intron of the mouse neurofilament light gene (NF-L) increases gene expression. *Molecular Brain Research* ,1995 ,**32**(2) 241 ~ 251
- [3] MeEwen D G and Ornitz D M. Regulation of the fibroblast growth factor receptor 3 promoter and intron 1 enhancer by Sp1 family transcription factor. *Journal of Biological Chemistry* , 1998 ,**273**(7):5349 ~ 5357
- [4] Wang Z Y ,Masaharu N ,Qiu O *et al.* An S1 nuclease-sensitive region in the first intron of human platelet-derived growth factor A-chain gene contains a negatively acting cell type-specific regulatory element. *Nucl Acids Res* , 1994 ,**22**(3) 457 ~ 464
- [5] Chen B F ,Chang W C ,Chen S T *et al.* Long-term expression of the biologically active growth hormone in genetically modified fibroblasts after implantation into a hypophysectomized rat. *Hum Gene Ther (UNITED STATES)* ,1995 ,**6**(7) 917 ~ 926
- [6] LU D H(路丹红) ,ZHU B L(朱宝利) ,ZHOU S W(周顺伍) *et al.* Study on expression of pGH cDNA mediated by *vaccinia virus* . *Chinese Journal of Biochemistry(生物化学杂志)* ,1995 ,**11**(5) 504 ~ 509
- [7] ZHONG F(仲飞) ,LIU W(刘维全) ,SUN L(孙丽翠) *et al.* Construction of porcine growth hormone cDNA with first intron. *Chinese Journal of Veterinary Medicine(中国兽医学报)* ,2000 ,**20**(4) : 347 ~ 351
- [8] HOU Y D(侯云德) . *Molecular Virology* ,Beijing :Xueyuan Press(学苑出版社) ,1999 ,pp. 151 ~ 180
- [9] YIN X(殷震) ,LIU J H(刘景华) . *Animal Virology* ,Beijing Science Press(科学出版社) ,1997 ,pp. 1104 ~ 1111
- [10] Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* ,1967 ,**26** 365 ~ 369
- [11] Graham F L ,Prevec L. Gene transfer and expression protocols methods in molecular biology. *The Humane Press Inc. Clifton* ,NJ. 1991
- [12] Chroboczek J ,Bieber F ,Jacrot B. The sequence of the genome of adenovirus type 5its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* ,1992 ,**186** 280 ~ 286
- [13] Barr D ,Carroll A M ,Kalynych S K *et al.* Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication-defective adenovirus. *Gene Ther* ,1995 ,**2** :151 ~ 155
- [14] Mol P C ,Wang R H ,Batey D W *et al.* Do products of the myc proto-oncogene play a role in transcriptional regulation of the prothymosin alpha gene ? *Molecular and Cellular Biology* ,1995 ,**15**(12) :6999 ~ 7009
- [15] Chan R Y ,Boudreau L C ,Angus L M *et al.* An Intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse-and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1999 ,**96**(8) 4027 ~ 4032
- [16] Sury R ,Martinez D P ,Procaccio V *et al.* Genomic structure of the human NDUFS8 gene coding for the iron-sulfur TYKY subunit of the mitochondrial NADH :ubiquinone oxidoreductase. *Gene* ,1998 ,**215** (1) :1 ~ 10

Expression of Adenovirus-mediated pGH cDNA with First Intron in CHO Cells

LI Xiu-Jin¹ ZHONG Fei^{1*} WANG Xin-Zhong² QI Shun-Zhang³

(¹ Hebei Vocational and Technical Teachers College ,Changli 066600 ,China)

(² Harvard University Medical School ,Boston 02114 ,USA)

(³ College of Biological Sciences ,China Agricultural University ,Beijing 100094 ,China)

Abstract The recombinant adenoviruses containing pGH cDNA and pGH cDNA with the first intron under the control of CMV promoter were constructed respectively by homogenous recombination method. The results showed that the recombinant adenoviruses could mediate pGH cDNA expression in CHO cells infected with the recombinant adenoviruses. The expression level of pGH cDNA with the first intron increased by 117% compared with pGH cDNA without intron. This indicate that the first intron of pGH gene have the function of improving the expression of the pGH gene.

Key words porcine growth hormone , first intron , adenovirus vector

Received 08-20-2001

This work was supported by a grant from Hebei Natural Science Fund and Shenzhen Scientific Committee(No. 98023) .

* Corresponding author. Tel 86-335-2039911 ;Fax 86-335-2024487 ;E-mail :l0zf@263. net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals. im. ac. cn>