

原核表达系统 T7 RNA 聚合酶/启动子在真核细胞中表达目的基因的实验研究

Expression of Target Gene in Eukaryotic Cells Driven by Prokaryotic T7 Promoter and its RNA Polymerase

袁志刚, 张进平, 储以微, 王 纓, 徐 薇, 熊思东*

YUAN Zhi-Gang, ZHANG Jin-Ping, CHU Yi-Wei, WANG Ying, XU Wei and XIONG Si-Dong*

复旦大学上海医学院免疫学系、教育部分子医学重点实验室、上海基因免疫与疫苗研究中心, 上海 200032

Department of Immunology of Shanghai Medical College of Fudan University, Key Laboratory of Molecular Medicine of Ministry of Education, Center for Gene Immunization and Vaccine Research, Shanghai 200032, China

摘 要 将目前高表达水平强大的原核表达系统之一 T7 RNA 聚合酶/启动子表达系统通过一系列改进引入真核细胞。通过转染真核细胞实验表明,采用真核启动子 CMV 调控 T7 RNA 聚合酶的表达和在 T7 启动子下游插入 EMCV IRES 序列两种解决方案能使该原核表达系统在真核细胞高效表达目的基因,且能适应不同的真核细胞环境,是一良好的细胞类型非依赖的表达体系。

关键词 T7 RNA 聚合酶, T7 启动子, 原核表达系统, 真核细胞

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0182-05

Abstract To enhance the efficiency of the expression of target gene in eukaryotic cells, one of the strongest prokaryotic expression systems, the T7 RNA polymerase and T7 promoter, was introduced into eukaryotic cells. A dual-plasmid gene expression system of T7 bacteriophage components was developed; one containing the T7 phage RNA polymerase gene under the control of eukaryotic promoter CMV (pCMV-T7pol) and the other (pT7IRES) containing the T7 promoter and T7 terminator as well as EMCV IRES. To test the feasibility of this plasmid system for eukaryotic expression, hepatitis B virus envelop HBV preS2/S was used to construct pT7IRES-HBs. The target genes were expressed efficiently by the eukaryonized prokaryotic expression system in a variety of the cells indicating C2C12, SP2/0, NIH3T3 and BALB/c 3T3, suggesting the potential applications of the expression system in gene therapy and gene immunization.

Key words T7 RNA polymerase, T7 promoter, prokaryotic expression system, eukaryotic cell

基于 T7 噬菌体 RNA 聚合酶(T7 RNAP)及其启动子之间识别的特异性 and 高效性而建立的表达系统,为目前在大肠杆菌中克隆和表达重组蛋白的最强大表达系统之一^[1]。其中,T7 噬菌体启动子属于

组成型的强启动子,被 T7 RNAP(约 100kD 的单链蛋白质)识别后起始的转录非常活跃,并几乎能完整地转录其下游所有 DNA 序列,甚至出现转录通读现象^[2]。另外,该系统与真核表达质粒相比还具有一

Received: September 28, 2004; Accepted: December 1, 2004.

* Corresponding author. Tel: 86-21-54237749; E-mail: Sdxiong@shmu.edu.cn

This work was supported by Grants from National High Technology Research and Development Program of China (No. 2004AA215242), National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 39925031) and General Program of National Natural Science Foundation of China (No. 30230320, 30170867).

国家“863”高技术研究发展计划 (No. 2004AA215242)、国家杰出青年基金 (No. 39925031) 和国家自然科学基金面上项目 (No. 30230320, 30170867) 资助。

些其它优势³,如 T7 RNAP 不需任何辅助转录因子就能识别其特异性启动子并表现出极高的转录活性,而真核表达质粒必须通过核膜进入细胞核,在转录辅助因子的辅助下由真核细胞的 RNA 聚合酶起始目的基因的转录;真核表达质粒载体中所含的病毒源性的启动子与真核细胞的启动子具有很多共性会相互竞争细胞的转录辅助因子和 RNA 多聚酶,而 T7 启动子含有一段 23bp 长的序列,在哺乳动物细胞中出现同样启动子的机会很少,不会出现与其它启动子相互竞争抑制现象。因此,若能将该表达体系引入真核细胞,将能提高目的基因在真核细胞中的表达水平。

但是,原核细胞和真核细胞蛋白质合成所利用的转录和翻译机制存在较大差别⁴,因此要将该高效原核表达系统引入真核细胞,首先需解决两个关键问题:1)如何将 T7 RNA 聚合酶导入真核细胞?本研究拟以含有 T7 RNAP 编码基因的真核表达质粒 pCMV-T7pol 作为其供应源。2)如何改善该原核表达系统转录出的“非帽化”mRNA⁵在真核细胞中的翻译效率?研究表明⁶脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditis Virus, EMCV)的 mRNA 5'端为天然的“非帽化”结构,其 5'端含一很长的非翻译区(UTR),其中含一内部核糖体进入位点(Internal Ribosome Entry Site, IRES),该位点允许“非帽化”mRNA 进行“帽化”非依赖性翻译(Capping-independent translation)。因此,通过在目的基因的上游插入 EMCV 5'-UTR 中的 IRES 序列,将能改善 T7RNAP/启动子原核表达系统在真核细胞中的翻译效率。

根据上述分析,本研究拟构建一含 T7 噬菌体转录相关调控元件 T7 强启动子 $\Phi 10$ 和 T7 特异性终止子及 EMCV IRES 序列的原核质粒表达载体 pT7IRES。然后与 pCMV-T7pol 真核表达质粒(该质粒以巨细胞病毒启动子 CMV 来调控下游 T7 RNA 多聚酶基因的表达)组成共表达体系引入真核细胞,实现原核表达系统的真核化,以提高目的基因在真核细胞中的表达水平。并以 HBV 表面抗原 M 蛋白的编码基因 preS2/S 为靶基因,具体观察该表达体系在真核环境中的表达效果。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种:质粒 pCMV-T7pol 由英国伦敦大学 Dr. Eagles 惠赠;质粒 pVAX1 由美国 FDA Dr. Zhongming Li 惠赠;质粒 pTM1 由 NIH Dr. Moss 惠赠;

质粒 pVAX1 Δ , pET-15b, PEHH, pCMV-HBs 由本室保存;宿主菌 DH5 α (Gibco BRL 公司)。

1.1.2 引物:T7 ter 特异性引物:T7 terU:5'GC TCT AGA GTC GAC GAT CCG GCTG 3',含 Xba I 酶切位点;T7 terD:5'TT GGG CCC TTG ATCTCG ATC CGG 3',含 Apa I 酶切位点。T7 pro-IRES 特异性引物:T7 proU:5'CC CTT AAG TAA TAC GAC TCA CTA TAG 3',含 Afl II 酶切位点;T7 proD:5'CG GGA TCC CCA TGG TAT TAT CGT G 3',含 BamH I 酶切位点。HBV preS2/S 特异性引物:pres2-sU:5'CCG GAA TTC TGC AGT GGA ACT CCA C 3',含 EcoR I 酶切位点;pres2-sD:5'CG CTG CAG TTA AAT GTA TAC CCA AA 3',含 Pst I 酶切位点。

1.1.3 分子生物学工具酶和试剂:限制酶 EcoR I (MBI 公司)、Xba I、Apa I、Afl II、BamH I、Pst I (TaKaRa 公司);T4 DNA 连接酶(MBI 公司);Taq DNA 多聚酶(Biostar 公司);dNTP(Biostar 公司);Ladder DNA marker(MBI 公司);PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒(华舜生物公司)。

1.1.4 细胞株:C2C12(C3H 小鼠成肌细胞,ATCC 编号:CRL-1772)、SP2/0(BALB/c 小鼠骨髓瘤细胞,ATCC 编号:CRL-1646)、BALB/c3T3(BALB/c 小鼠胚胎来源的纤维母细胞样细胞,ATCC 编号:CCL-163)和 NIH3T3(NIH/Swiss 小鼠胚胎来源的纤维母细胞样细胞,ATCC 编号:CRL-1658)均由本室保存。

1.1.5 细胞生物学试剂:Lipotransfectamine 脂质体(Gibco BRL 公司);1640 完全培养液、DMEM 培养液均按常规方法配制。

1.1.6 免疫学试剂和材料:小鼠抗人 HBsAg 单克隆抗体(ELISA 效价 1:1000)(Chemicon 公司);羊抗小鼠 IgG-HRP(Southern Biotechnology 公司)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的体外转染:依照 Lipotransfectamine 转染试剂说明进行。

1.2.2 斑点酶免疫试验(DOT-EIA):将转染细胞上清以负压装置抽滤于硝酸纤维素滤膜上,37℃湿盒收干 1h,以 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液(0.05% Tween, pH 7.4)漂洗 10min,以阻断液(0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液,0.3% BSA)37℃阻断 60min,Tris-HCl 缓冲液漂洗 5min,3 次,加一抗,室温过夜,Tris-HCl 缓冲液漂洗 5min,3 次,加二抗,37℃湿盒孵育 60min,Tris-HCl 缓冲液漂洗 5min,3 次,浸于 DAB 底物液中显色。用 DOTs 点杂交图像分析系统对点膜样品进行灰度扫描统计分析处理。

1.2.3 统计学方法: 采用 SPSS 统计分析软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 质粒的构建

2.1.1 T7 噬菌体特异性终止子序列的获取: 利用 PCR 方法, 以特异性引物 (T7terU/T7terD) 从质粒 pET-15b 中扩增得到 T7 终止子序列 (T7 ter) (图 1)。

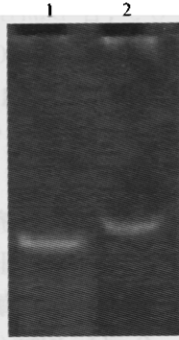


图 1 T7 ter PCR 产物的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of PCR of T7 terminator

1: DNA marker (125bp); 2: T7 ter PCR products (149bp).

2.1.2 T7 启动子及 IRES 序列的获取: 利用 PCR 方法, 以特异性引物 (T7proU/T7proD) 从质粒 pTM1 中扩增得到 T7 启动子及 IRES 序列 (T7pro-IRES) (图 2)。

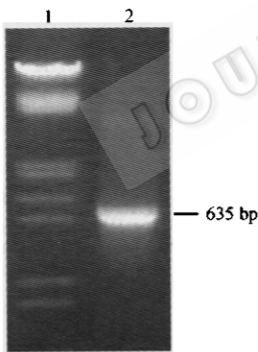


图 2 PCR 扩增 T7pro-IRES 序列的电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of PCR of T7pro-IRES sequences

1. DNA marker (2 800bp, 2 400bp, 1 200bp, 1 000bp, 800bp, 700bp, 300bp, 180bp); 2: products of T7pro-IRES (635bp).

2.1.3 质粒 pT7IRES 的构建: 将 T7 启动子、IRES 序列及 T7 终止子插入质粒 pVAX1Δ 骨架中获得质粒载体 pT7IRES (图 3), 并经 PCR 及测序鉴定正确。

2.1.4 质粒 pT7IRES-HBs 的构建: 从质粒 pEHH 中获得目的基因 HBv-preS2/S, 经限制酶 *Eco*R I、*Pst* I 双酶切克隆入 pT7IRES 载体中, 获得重组表达质粒 pT7IRES-HBs, 并经测序鉴定正确。并进一步经酶切获一不含 IRES 序列的对照质粒 pT7-HBs。

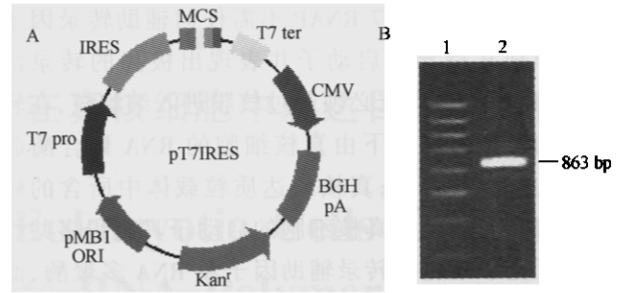


图 3 质粒 pT7IRES 的鉴定

Fig. 3 Verification of plasmid pT7IRES

A: pT7IRES plasmid diagram; B: PCR products of pT7IRES

1: DNA marker (2 000bp, 1 600bp, 1 200bp, 980bp, 800bp, 500bp, 300bp, 100bp); 2: pT7IRES PCR products.

2.2 原核表达系统的真核化

2.2.1 pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs: 双质粒共转染真核细胞株 C2C12: 以 pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒组成共表达体系, 用脂质体共转染真核细胞株 C2C12; 以仅转染 pT7IRES-HBs 质粒及共转染 pCMV-T7pol/pT7-HBs 双质粒作为对照 (图 4)。分别在 24h、48h、72h 收集 1 次细胞培养上清, 以 DOT-EIA 方法检测目的基因 HBsAg 的表达情况, 并用 Dots 图像分析系统进行灰度扫描统计处理 (图 5)。结果发现: pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒组成的共表达体系转染的细胞上清中能检测到明显的目的基因的表达产物, 而仅转染 pT7IRES-HBs 质粒的细胞上清中无 HBsAg 的表达, 共转染 pCMV-T7pol/pT7-HBs 双质粒的细胞上清中几乎检测不到或只有微量目的基因的表达产物。这表明通过联合应用以真核启动子 CMV 调控 T7 RNA 聚合酶的表达和在 T7 启动子下游插入 EMCV IRES 序列这两种方案能够成功实现原核表达系统的真核化。

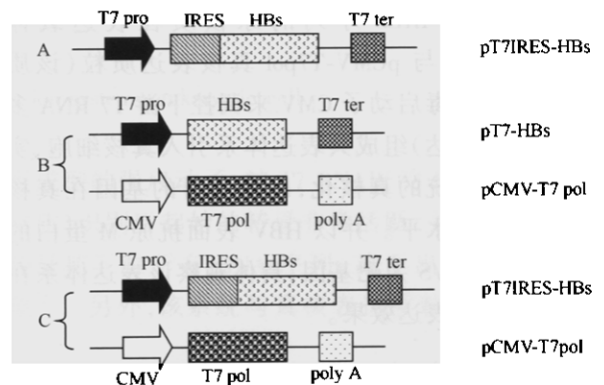


图 4 质粒转染真核细胞株 C2C12 分组示意图

Fig. 4 Strategies for *in vitro* transfection of the plasmids

A: C2C12 transfected with pT7IRES-HBs only; B: C2C12 co-transfected with pT7-HBs plus pCMV-pT7pol; C: C2C12 co-transfected with pT7IRES-HBs plus pCMV-T7pol.

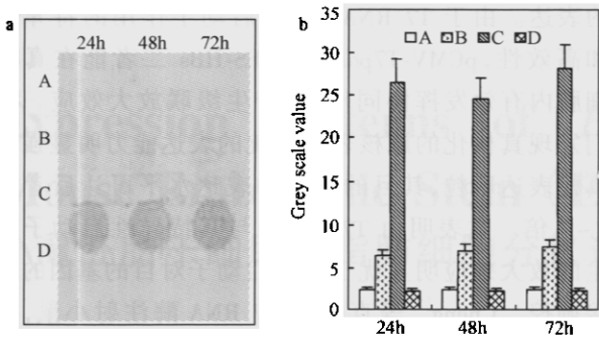


图5 不同质粒在 C2C12 细胞中 HBsAg 的表达

Fig.5 Expression of HBsAg in the myoblast cell line C2C12

after transfection with different plasmids combinations

a: Detection of HBsAg in the supernatant of the transfected cells (100 μ L per dot) by dot blot analysis; b: The value of grayscale of the corresponding dots. A: pT7IRES-HBs, B: pCMV-T7pol/pT7-HBs, C: pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs, D: non-transfected cells.

2.2.2 真核化的原核表达系统可在不同的真核细胞中有效表达目的基因:为进一步探讨真核化的原核表达系统——pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒共表达体系在不同真核细胞中的表达情况,本研究选择 C2C12、SP2/O、NIH3T3、BALB/c3T3 四种不同来源的真核细胞株为对象进行了研究。将 pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒用脂质体分别共转染各真核细胞株,并设共转染 pCMV-T7pol/pT7IRES 空质粒组和未转染组为对照,分别在 24h、48h、72h 收集一次细胞培养上清,以 DOT-EIA 方法检测目的基因在各不同细胞株的表达。结果发现:共转染 pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒的所有细胞株的上清中都能检测到明显的目的基因的表达产物,而对照组均无 HBsAg 的表达(图 6)。这表明真核化的原核表达系统 pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒共表达体系能够适应不同的真核细胞环境,是一良好的细胞类型非依赖性的表达系统。

3 讨论

本研究中,我们构建了一含 T7 噬菌体转录相关调控元件(T7 强启动子 Φ 10 和 T7 特异性终止子)及 EMCV IRES 序列的质粒表达载体 pT7IRES。然后与 pCMV-T7pol 真核表达质粒组成 T7 RNAP/启动子共表达体系,通过由质粒 pCMV-T7pol 提供 T7 RNA 聚合酶及由 EMCV IRES 来改善非“帽子”化 mRNA 在真核细胞中的翻译效率这两种方法,将 T7 RNAP/启动子原核表达系统引入了真核细胞中。经过一系列的体外实验证明,pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒组成的共表达体系能够很好地适应真核细胞环境,

有效表达目的基因,且是一良好的细胞类型非依赖的表达体系,在多株不同品系小鼠来源(如 BALB/c、C3H、NIH/Swiss 小鼠)的真核细胞株(SP2/O、C2C12、NIH3T3)及同一品系小鼠的不同组织来源的真核细胞株(SP2/O、BALB/c3T3)中均能有效发挥作用。

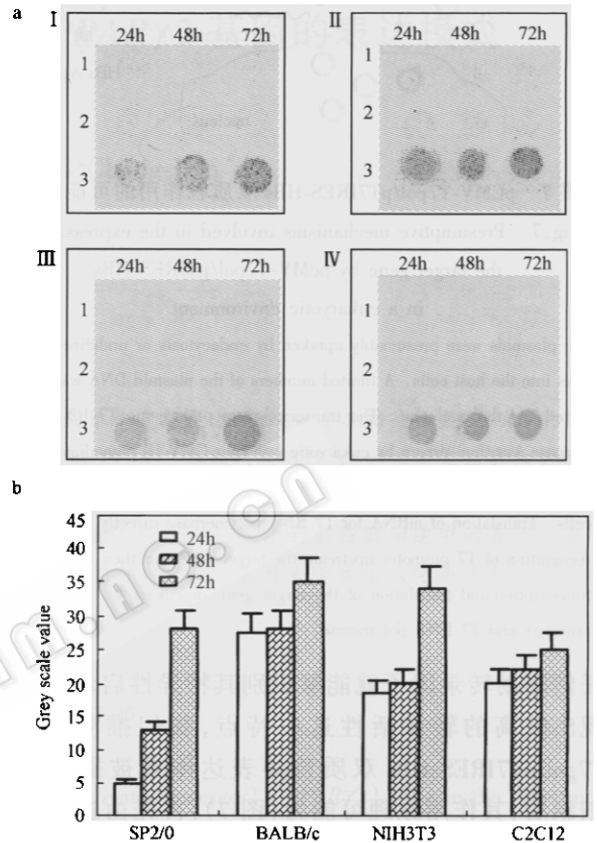


图6 pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒共转染多种真核细胞后 HBsAg 的表达

Fig.6 Expression of HBsAg in various cell lines after

co-transfection with pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs

a: detection of HBsAg in the supernatant of the transfected cell lines (100 μ L per dot) by dot blot analysis; I: SP2/O cell line, II: BALB/c3T3 cell line, III: NIH3T3 cell lines, IV: C2C12 cell lines; 1: non-transfected medium, 2: pCMV-T7pol/pT7IRES, 3: pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs; b: the value of grayscale of the corresponding dots.

通过质粒转染的方式将 T7 RNA 聚合酶导入真核细胞,其表达依赖于宿主细胞的遗传表达机制,即由真核启动子 CMV 调控 T7 RNA 聚合酶的合成,进而启动 T7 启动子下游目的基因的表达。我们知道 T7 RNA 聚合酶为原核生物 RNA 聚合酶,并不含有核定位信号肽序列,因此 T7 RNA 聚合酶由质粒 pCMV-T7 pol 转录并表达后,几乎全部停留在胞浆中。另外,大量研究表明^[7]质粒 DNA 被真核细胞有效摄入细胞后,也主要分布在胞浆中,只有一小部分能通过核膜进入细胞核。再结合 T7 RNA 聚合酶不需要

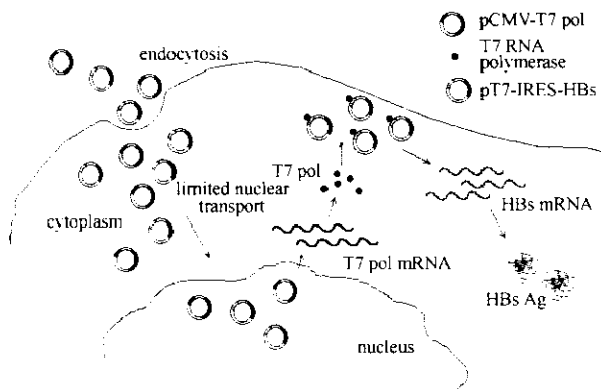


图7 pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒作用的可能机制
Fig.7 Presumptive mechanisms involved in the expression of the target gene by pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs in a eukaryotic environment

The plasmids were presumably uptaken by endocytosis or undefined pathways into the host cells. A limited numbers of the plasmid DNA was transported into the nucleolus. The transcription of prokaryotic T7 RNA polymerase was then driven by eukaryotic promoter CMV IE immediately after binding with endogenous RNA polymerase provided by eukaryotic host cells. Translation of mRNA for T7 RNA polymerase directly leads to the recognition of T7 promoter upstream the target gene and then initiates the transcription and translation of the target gene in eukaryotic cells by T7 promoter and T7 RNA polymerase.

任何辅助转录因子就能够识别其特异性启动子并表现出极高的转录活性这一特点,我们推测 pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒共表达体系被摄入真核细胞后,其作用原理可能为(图7):首先由进入细胞核的真核表达质粒 pCMV-T7pol 所含的真核启动子元件——CMV 启动子调控 T7 RNAP 的表达,然后产生的 T7 RNAP 再作用于存在胞浆中的 pT7IRES-HBs 中的原核启动子元件——T7 启动子,调控下游目的基因

的表达。由于 T7 RNAP 与其启动子作用的特异性和高效性, pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 二者能在真核细胞内有效发挥协同作用,产生级联放大效应。我们发现真核化的原核表达系统的表达能力明显强于真核表达质粒,其目的基因的表达水平可达后者的 2~3 倍。这表明由 T7 RNAP 与其特异性启动子产生的放大效应明显优于真核启动子对目的基因的直接调控。Cheng^[7]等直接将 T7 RNA 酶注射小鼠,发现在小鼠血清内检测不到抗 T7 RNA 聚合酶的抗体。因此应用此真核化的原核表达系统对基因疫苗的研制和基因治疗的发展可能会带来较大的推动作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Landick R. Active-site dynamics in RNA polymerases. *Cell*, 2004, **116**(3): 351 - 353
- [2] Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 1986, **189**(1): 113 - 130
- [3] Tabor S, Richardson CC. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Biotechnology*, 1992, **24**: 280 - 284
- [4] Lodish H, Berk A, Zipursky SL *et al*. *Molecular cell biology*. 4th, New York: WH Freeman and Company, 1999.
- [5] Delarue M, Poch O, Tordo N *et al*. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng*, 1990, **3**(6): 461 - 467
- [6] Attal J, Theron MC, Houdebine LM. The optimal use of IRES (internal ribosome entry site) in expression vectors. *Genet Anal*, 1999, **15**(3-5): 161 - 165
- [7] Cheng X, Li Y, Xiong K *et al*. A novel nonviral cytoplasmic gene expression system and its implications in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 1995, **2**(4): 281 - 289