

人工转录因子促进外源基因在 CHO 细胞中的高效表达 Enhancement of Exogenous Gene Expression by Artificial Transcription Factor in CHO Cells

李世崇 叶玲玲 杨 海 刘 红 许 建 吴本传 黄培堂* 陈昭烈*

LI Shi-Chong, YE Ling-Ling, YANG Hai, LIU Hong, XU Jian, WU Ben-Chuan, HUANG Pei-Tang*
and CHEN Zhao-Lie*

军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

摘 要 以酵母转录因子 GAL4 中 1-147 位氨基酸序列为构建人工转录因子的 DNA 结合结构域,单纯疱疹病毒转录激活子 VP16 中 12 肽(DALDDFDLMLG)的 4 个串联重复作为人工转录因子的功能结构域,用 SV40 的核定位序列(NLS)将两部分连接起来,构建了人工转录因子 GVP4 并将其克隆进入表达载体 pcDNA3.1/Hygro(+)中。将不同长度的人工转录因子结合序列构建在外源基因表达载体 pcDNA3.1(+)启动子 CMV 的上游,分别连接外源基因 EGFP 和 tPA。用表达人工转录因子和外源基因的载体共转染 CHO 细胞,EGFP 和 tPA 在含不同数量人工转录因子结合位点表达载体 pcDNA3.1(+)转染的 CHO 细胞中的表达水平呈现不同程度的提高。其中,以引入 10 个人工转录因子结合位点的表达载体的效果最明显,EGFP 和 t-PA 的表达效率均提高 2~3 倍。结果表明,人工转录因子能有效地促进外源基因在哺乳动物细胞中的表达。

关键词 人工转录因子, CHO 细胞, EGFP, t-PA, 高效表达

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0021-06

Abstract Using the amino acids 1-147 of the yeast transcriptional activator GAL4 as the DNA-binding domain and four tandem repeats of the 12-aa peptide (DALDDFDLMLG) of the herpesvirus as the activation domain, an artificial transcription factor, GVP4, was constructed via the linkage of the nuclear localization signal sequence of SV40. And then, GVP4 was cloned into expression vector pcDNA3.1/Hygro(+). Various amounts of targeting sites of artificial transcription factor were linked to the upstream of promoter CMV in exogenous gene expression vector pcDNA3.1(+) that separately harbored EGFP cDNA and t-PA cDNA. The CHO cells were then co-transfected with GVP4 expression vector and EGFP or t-PA expression vector. The effect of GVP4 on exogenous gene expression was evaluated by measuring the fluorescence intensity of EGFP in CHO cells and the concentration of t-PA in the supernatant. GVP4 showed positive effect on the enhancement of exogenous gene expression in CHO cells integrated with targeting sites of artificial transcription factor. And, CHO cells integrated with 10 targeting sites of GVP4 was more favorable to foreign gene expression, which resulted in 2~3-fold increase in both EGFP and t-PA expressions. These results indicated that artificial transcription factor is potent in the enhancement of exogenous gene expression in mammalian cells.

Key words artificial transcription factors, CHO cells, EGFP, t-PA, high level expression

Received: August 17, 2006; Accepted: September 21, 2006.

This work was supported by the grant from Chinese Programs for High Technology Research and Development (863 program No. 2004AA2Z3792).

* Corresponding author. Tel: +86-10-63841526; E-mail: chenzl23@hotmail.com

国家高新技术研究和发展计划(863)项目资助(No. 2004AA2Z3792)

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

人工转录因子是近年来发展起来的在转录水平调控基因表达的一种新技术。它是通过人为设计模拟天然转录因子的 DNA 结合结构域和功能结构域, 或者利用天然转录因子的两种结构域的不同组合, 组建自然界不存在的、具有调控基因表达功能的转录因子^[1]。利用体外随机锌指蛋白噬菌体库筛选得到的人工转录因子在调控细胞内源基因的表达有非常好的效果, 它既能使不同基因的表达水平上调 6 ~ 35 倍不等, 也能够不同程度的抑制部分细胞内源性基因的表达^[2,3]。在调控外源基因的表达方面, 用编码人工转录因子的随机锌指蛋白库转染表达抗体的 CHO 细胞, 从 2000 个克隆中获得的 4 个人工转录因子能够促进抗体表达增加 2 ~ 6 倍, 最高能够促进抗体表达提高近 10 倍^[4]。表达人工转录因子的载体整合进 CHO 细胞, 得到能够组成性表达人工转录因子的细胞, 经过这种改造的 CHO 细胞与不表达人工转录因子的 CHO 细胞比较, 在促进外源基因的高效表达上能够增加表达量 4 倍以上^[5]。

本文报告一种基于酵母转录因子 GAL4 中 1-147 位氨基酸序列为构建人工转录因子的 DNA 结合结构域, 单纯疱疹病毒转录激活子 VP16 中 12 肽 (DALDDFDLMLG) 的 4 个串联重复作为人工转录因子的功能结构域的人工转录因子; 以 EGFP 和 t-PA 为外源表达基因, 对所构建人工转录因子促进外源基因表达效果进行了验证。

表 1 设计引物的核苷酸序列

Table 1 Nucleotids sequence of primers

GAL1	5-ATA GAA TTC GCT AGC GCC GCC ACC ATG AAG CTA ATG TCT TCT ATC GAA C-3
GAL2	5-ATA GGT ACC ATC TAC CTT TCT CTT CTT TTT TGG CGA TAC AGT CAA CTG TCT TTG-3
VP1	5-CGA CGC GCT AGA CGA TTT CGA TCT GGA CAT GTT GGG GGA CGC GCT AGA CGA TTT CGA TCT GGA CAT GTT GGG GG-3
VP2	5-GAT CCC CCC AAC ATG TCC AGA TCG AAA TCG TCT AGC GCG TCC CCC AAC ATG TCC AGA TCG AAA TCG TCT AGC GCG TCG GTA C-3
VP3	5-GAT CC GAC GCG CTA GAC GAT TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GCG CTA GAC GAT TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG TAG A-3
VP4	5-AGC TT CTA CCC CAA CAT GTC CAG ATC GAA ATC ATC GTC TAG CGC GTC CCC CAA CAT GTC CAG ATC GAA ATC GTC TAG CGC GTC G-3
MCS1	5-AAT TAA TTC GAA ACC GGT ATG CAT GTT AAC CGA TGT ACG GGC CAG ATA TAC G-3
MCS2	5-CGA GGC GCG CCT AGG GGC CAT CGA TTT AAT TAA TTC GAA ACC GGT ATG CAT G-3
MCS3	5-AAC GCT AGC CAG CTT GGG TCT C-3
UASPacl	5-GCG TTA ATT AAG AGT TTC TAG ACG GAG TAC TG-3
UASAge11	5-ATA ACC GGT TAG CCC CCC GCT AGC GTC TTC-3
UASAge12	5-ATA ACC GGT GAG TTT CTA GAC GGA GTA CTG-3
UASHpai	5-ATA GTT AAC TAG CCC CCC GCT AGC GTC TTC-3

(2)人工转录因子激活功能结构域的克隆: 根据文献报道 VP16 蛋白的一段 11 肽序列 (DALDDFDLML) 具有 VP16 蛋白的激活功能, 4 个串联重复的 11 肽序列具有较强的激活效果^[7], 此外

1 材料与方法

1.1 材料

核酸内切酶、T4DNA 连接酶和 PCR 聚合酶购自 TaKaRa 和 NEB 公司; 质粒提取和胶回收试剂盒购自天根基因公司; Lipofectamine™ 2000、质粒 pcDNA3.1 (+) pcDNA3.1/Hygro(+) 购自 Invitrogen 公司; 质粒 pBind、PG5luc 购自 Promega 公司; 质粒 pcDNA/FRT/tPA 由本实验室构建^[6]。CHO-K1 细胞购自 ATCC; DMEM/F12 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司; 牛纤维蛋白原和凝血酶购自中国药品和生物制品检定所。

1.2 方法

1.2.1 人工转录因子的构建:

(1)人工转录因子 DNA 结合结构域的克隆: 设计两条引物 GAL1、GAL2 (表 1), 为了方便克隆, 引物 1 的 5' 端设计了 *EcoR* I 和 *Nhe* I 酶切位点, 并设计了 KOZAK 序列 GCC GCC ACC ATG, 引物 2 的 5' 端设计了 *Kpn* I 酶切位点, 为了使人工转录因子能够进入细胞核内发挥功能, 在引物 2 中设计了核定位序列: ATC TAC CTT TCT CTT CTT TTT TGG。用这两条引物从质粒 pBind 上扩增 GAL4 序列。用 TaKaRa 高保真的 Pyrobest 酶, 回收约 450bp 的片段。通过 *EcoR* I 和 *Kpn* I 连接进 pUC19 载体, 测序正确后命名为 GAL4/pUC19 用于以下实验。

Ansari 用 VP16 中 8 个氨基酸的短肽 (DFDLMLG) 的 2 个串联重复, 也表现出了较强的转录活性^[8]。我们采用 12 肽 (DALDDFDLMLG) 的 4 个串联重复作为人工转录因子激活功能结构域, 设计 4 条引物

VP1、VP2、VP3、VP4(表1),用作人工合成4个串联重复的12肽。

用50 μ L 1 \times PCR反应缓冲液(pyrobest buffer TaKaRa产品)将VP1与VP2各50pmol溶于0.5mL离心管中,置于一个盛满沸水的烧杯中,使烧杯中的沸水在室温中自然冷却,使寡核苷酸退火成双链,两端分别形成BamHI和KpnI酶切位点;用BamHI和KpnI酶切处理GAL4/PUC19回收后与VP1、VP2形成的Linker连接,测序正确命名为GVP2/pUC19。VP3、VP4同样处理后,与用BamHI、HindIII酶切GVP2/pUC19后的载体连接,测序正确命名为GVP4/PUC19。

1.2.2 具有人工转录因子结合位点的载体构建:

(1)在pcDNA3.1(+)上连入多克隆位点:

为了方便在pcDNA3.1(+)的CMV启动子前连入调控序列,将Age I、Asc III、Bst B I、Cla I、Hpa I、Nar I、Nsi I和Pac I酶切位点的序列连入,合成引物MSC1、MSC2和MSC3;利用PCR的方法,第一轮扩增以MSC1和MSC3为引物,pcDNA3.1(+)为模板,扩增产物回收,用作第二轮PCR的模板,第二轮PCR的产物回收用Nru I和Nhe I酶切,与用同样酶切的pcDNA3.1(+)连接。测序结果表明在pcDNA3.1(+)的Nru I处连入了Age I、Asc I、Bst B I、Cla I、Hpa I、Nar I、Nsi I和Pac I酶切位点的序列,正确质粒命名为pcDNA3.1(+)MCS。

(2)人工转录因子结合位点的克隆:

为了方便克隆,引物UAS_{Pac}I、UAS_{Age}I 5'端分别设计了Pac I、Age I酶切位点,用这两条引物从质粒PG5luc(Promega产品)上扩增人工转录因子结合位点序列,含5个Gal4结合位点。用TaKaRa高保真的Pyrobest酶扩增,回收约150bp的片段。通过Pac I、Age I连接进pcDNA3.1(+)MCS载体,测序正确后命名为pcDNA3.1(+)1UAS。引物UAS_{Age}I 2、UAS_{Hpa}I 5'端分别设计了Age I、Hpa I酶切位点,用这两条引物从质粒PG5luc(Promega产品)上扩增人工转录因子结合位点序列,含5个Gal4结合位点。用TAKARA高保真的Pyrobest酶扩增,回收约150bp的片段,通过Age I、Hpa I连接进pcDNA3.1(+)1UAS,测序正确后命名为pcDNA3.1(+)2UAS。

用Pac I、Hpa I酶切pcDNA3.1(+)2UAS,回收300bp左右的片段,补平回收,载体pcDNA3.1(+)2UAS用Asc I、Pac I酶切补平回收,与300bp左右的片段连接,质粒鉴定正确后命名为pcDNA3.1(+)4UAS,至此含5个、10个、20个Gal4结合位点的载体构建成功。

1.2.3 表达载体的构建:

(1)表达人工转录因子载体的构建:将方法1.2.1中构建的载体GVP4/PUC19用Nhe I、HindIII酶切,回收600bp左右的片段GVP4,同样用Nhe I、HindIII酶切载体pcDNA3.1/Hygro(+)回收载体与GVP4连接。连接正确的命名为pcDNA3.1/Hygro/GVP4。

(2)表达EGFP载体的构建:用Nhe I和Bcl I酶切pEGFP-C1, Klenow补平,回收约800bp的片段。pcDNA3.1(+) pcDNA3.1(+)1UAS、pcDNA3.1(+)2UAS、pcDNA3.1(+)4UAS用EcoRV酶切、脱磷,回收载体与800bp的EGFP连接,连接正确的载体命名为pcDNA3.1(+)0UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)1UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)2UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)4UAS/EGFP。

(3)表达t-PA载体的构建:

用Nhe I和BamHI酶切pcDNA/FRT/tPA,回收约1700bp的tPA片段。pcDNA3.1(+) pcDNA3.1(+)2UAS,同样用Nhe I和BamHI酶切回收载体与1700bp的tPA片段连接,连接正确的载体命名为pcDNA3.1(+)0UAS/tPA、pcDNA3.1(+)2UAS/tPA。

1.2.4 细胞转染及筛选:转染前一天,CHO-K1细胞以 7.5×10^5 细胞铺板6孔板,细胞过夜培养,将表达载体pcDNA3.1/Hygro/GVP4与pcDNA3.1(+)0UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)1UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)2UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)4UAS/EGFP;pcDNA3.1(+)0UAS/tPA、pcDNA3.1(+)2UAS/tPA按摩尔比1:1的比例共转染进CHO-K1中,转染试剂用Lipofectamine™2000操作方法按试剂说明书进行。

转染后24h,用胰酶消化细胞,一板6孔板接种至一板24孔板,4~5h后待细胞贴壁后,培养基换为含抗生素G418 0.6mg/mL、Hygro 0.4mg/mL。3~4d换一次液。直到2周后待阳性克隆长出。胰酶消化,扩大培养,用作测定外源基因的表达;或再做单克隆化,用作定量比较外源基因的表达。

1.2.5 阳性细胞的单克隆化和扩大培养:抗生素筛选得到的阳性细胞,胰酶消化后,用有限稀释法,按2个细胞/每孔接种于96孔培养板中,2周后细胞克隆长出来,挑选单克隆细胞扩大培养。

1.2.6 细胞计数:胰酶消化细胞后,将细胞悬浮混匀,取1mL细胞悬浮液,用全自动细胞计数仪cedex AS20计数。

1.2.7 流式细胞仪测定EGFP荧光强度:抗生素筛选得到的阳性细胞,胰酶消化后,2000r/min离心

5min,用 PBS 悬浮细胞,用非转染的 CHO-K1 细胞作空白对照,用 BD 公司流式细胞仪测定 EGFP 荧光强度,细胞总数设定为 30000。

1.2.8 t-PA 活性测定:采用体外纤维蛋白琼脂板溶圈法检测 t-PA 体外纤维蛋白溶解活性^[9]。t-PA 标准品(86/670),由英国国立生物标准和控制研究所(NIBSC)提供。

2 结果

2.1 人工转录因子及含人工转录因子结合位点的载体构建

人工转录因子的 DNA 结合结构域和转录激活结构域在核定位序列的连接下,分别经 *Nhe* I 和 *Kpn* I、*Nhe* I 和 *Bam* H I、*Nhe* I 和 *Hind* III 酶切处理,切下大小分别为 440、520、600bp 的片段。鉴定正确(如图 1 所示),测序表明所构建的人工转录因子正确。

含人工转录因子结合位点的载体 pcDNA3.1(+)1UAS、pcDNA3.1(+)2UAS、pcDNA3.1(+)4UAS 经测序表明连接正确。

2.2 表达载体的构建

将外源基因 EGFP 连入 pcDNA3.1(+)1UAS、pcDNA3.1(+)2UAS 和 pcDNA3.1(+)4UAS 中,分别命名为:pcDNA3.1(+)1UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)2UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)4UAS/EGFP(如图 2 所示);外源基因 t-PA 连入 pcDNA3.1(+)1UAS、pcDNA3.1(+)2UAS 中,分别命名为:pcDNA3.1(+)1UAS/tPA、pcDNA3.1(+)2UAS/tPA(如图 2 所示),酶切鉴定正确。

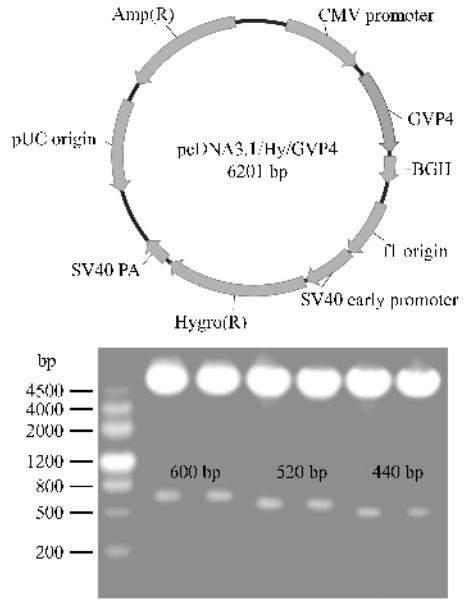


图 1 表达人工转录因子的载体结构和酶切鉴定图

Fig.1 Vector of expression artificial transcription factor and its restriction analysis

pcDNA3.1(+)0UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)1UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)2UAS/EGFP、pcDNA3.1(+)4UAS/EGFP(如图 2 所示);外源基因 t-PA 连入 pcDNA3.1(+)1UAS、pcDNA3.1(+)2UAS 中,分别命名为:pcDNA3.1(+)0UAS/tPA、pcDNA3.1(+)2UAS/tPA(如图 2 所示),酶切鉴定正确。

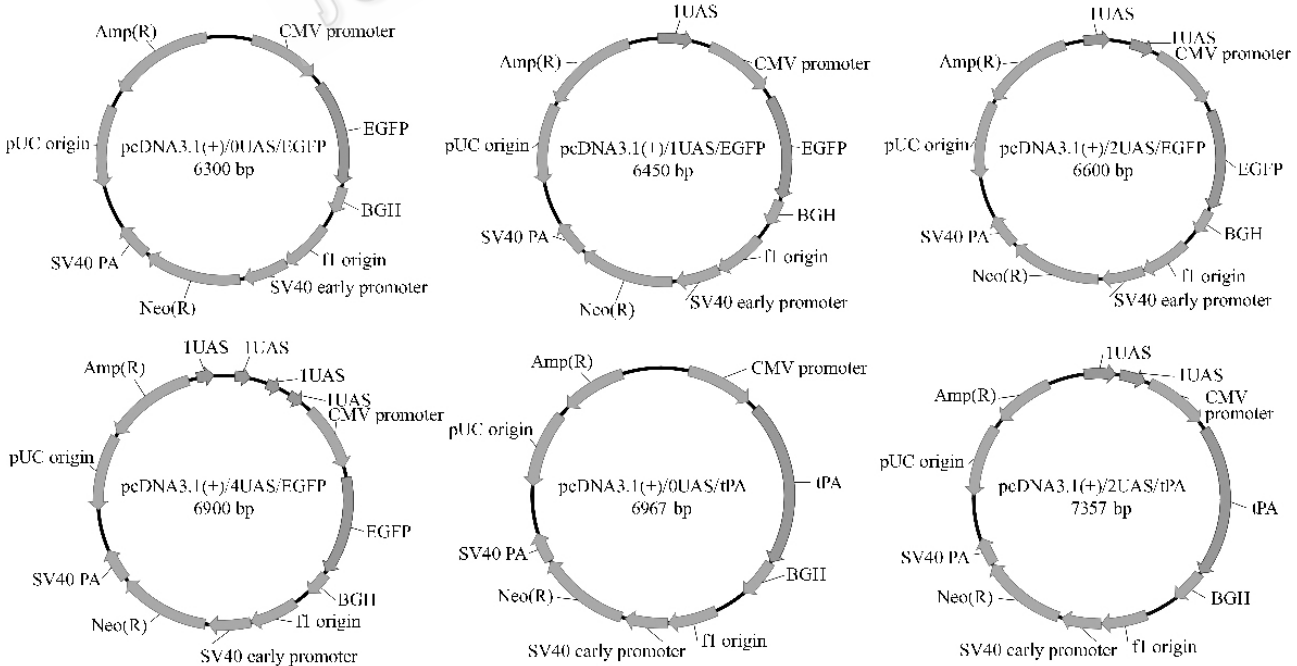


图 2 表达 EGFP 和 t-PA 的载体结构图

Fig.2 Vectors for the expression of EGFP and t-PA

2.3 人工转录因子对 EGFP 表达的影响

将载体 pcDNA3.1/Hy/GVP4 分别与 pcDNA3.1 (+)0UAS/EGFP、pcDNA3.1 (+)1UAS /EGFP、pcDNA3.1 (+)2UAS/EGFP 和 pcDNA3.1 (+)4UAS/EGFP 共转染 CHO-K1 细胞,抗生素筛选后,将阳性细胞收集起来,用流式细胞仪测定 EGFP 荧光强度,结果如图 3 所示。与没有人工转录因子结合位点的实验对照即 pcDNA3.1 (+)0UAS/EGFP 的载体比较,人工转录因子促进 EGFP 的表达增加 2~3 倍。含不同人工转录因子结合位点数量的载体外源基因表达的促进效果不同。其中,含 5 个和 20 个结合位点的载体人工转录因子对外源基因表达的促进效果基本相同,平均荧光强度分别为 955、911 单位;10 个结合位点的载体人工转录因子对外源基因表达的促进效果最明显,平均荧光强度为 1168 单位,且高强度荧光的细胞数比例相对较高(M4 部分占 30%)。

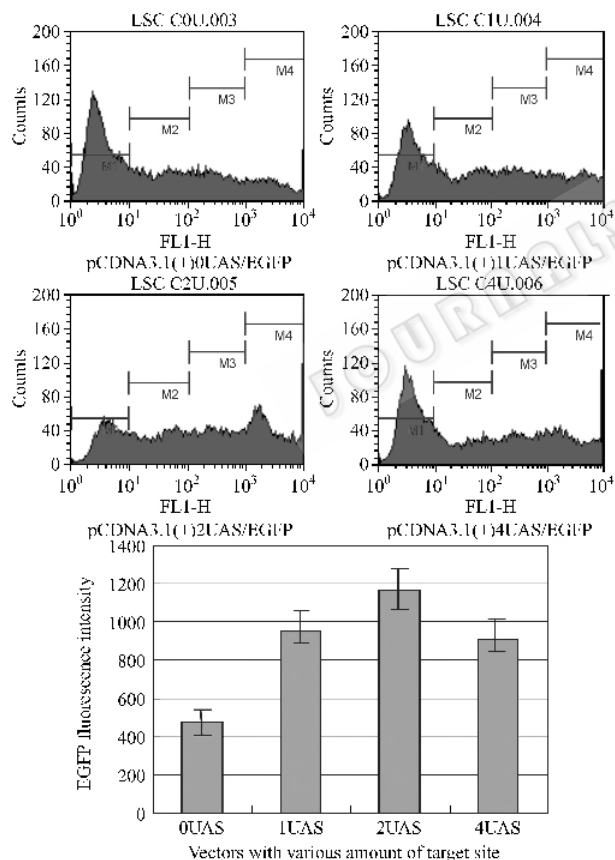


图 3 人工转录因子对具有不同结合位点数量载体表达 EGFP 的影响

Fig.3 Effect of artificial transcription factor on EGFP expression in CHO cells integrated with various amount of target site

2.4 人工转录因子对 t-PA 表达的影响

根据人工转录因子对 EGFP 表达的影响,初步

选定载体 pcDNA3.1(+)2UAS 为人工转录因子 GVP4 促进外源基因表达的优选载体。为了进一步验证该载体在 GVP4 作用下的外源基因表达促进作用,选用 t-PA 作为报告基因,将载体分别与 pcDNA3.1/Hy/GVP4 与 pcDNA3.1 (+)0UAS/tPA、pcDNA3.1 (+)2UAS/tPA 共转染的 CHO-K1 细胞,将抗生素筛选得到的阳性细胞单克隆细胞,用 T100 方瓶培养,待细胞长满后,测定 24h 每 100 万细胞表达 t-PA 的活性单位。结果如图 4 所示,与对照载体比较,人工转录因子对 t-PA 表达增加了 2~3 倍。

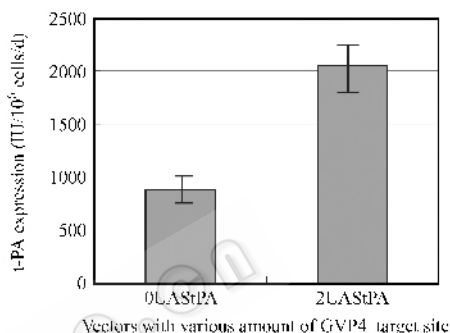


图 4 人工转录因子对含 10 个结合位点载体表达 t-PA 的影响

Fig.4 Effect of artificial transcription factor on t-PA expression in CHO cells integrated with 10 GVP4 target site

3 讨论

在基因结构、表达调控元件已经确定的情况下,外源基因在 CHO 细胞中的高效表达,很大程度上取决于表达载体整合在 CHO 细胞基因组的位置和拷贝数。外源基因整合在 CHO 细胞基因组转录活跃区,能够增加外源基因的转录水平,在该位置基因启动子能够招募更多的转录因子促使外源基因有更强的转录,导致外源基因有较高的表达。但是外源基因整合到基因组转录活跃区的几率很低,细胞内源性转录因子数量也是有限的,它不足以使外源基因的启动子招募到足够的转录因子,所以人为增加细胞的转录因子,并使它结合到外源基因的上游,对增加外源基因的转录是有利的,从而提高外源基因的表达量(图 5 所示)。

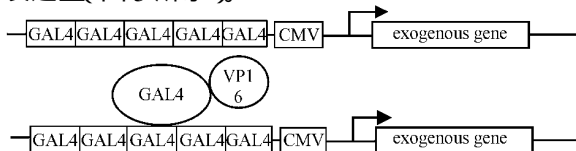


图 5 人工转录因子对促进外源基因表达机制示意图

Fig.5 Mechanism of artificial transcription

我们构建的人工转录因子 GVP4, 选用 SV40 的核定位信号序列将酵母转录因子 GAL4 的 DNA 结合结构域和由 4 个 VP16 的最小活性中心串联而成的转录激活结构域组成, 有利于人工转录因子 GVP4 进入核内发挥功能。

人工转录因子对外源基因表达的调控效应在较大程度上受外源基因上游的转录因子结合位点数量的影响。我们通过比较外源基因在整合了 5、10、20 个 GVP4 结合位点的 CHO 细胞中的表达效果, 确定含 10 个 GVP4 结合位点的载体为 GVP4 促进外源基因表达的优选载体。这一实验结果提示: GVP4 结合位点过少, 所招募的人工转录因子数目不足以增强其启动子转录活性的充分发挥; 相反, GVP4 结合位点过多, 可能影响到人工转录因子作用的协同性, 也不利于 GVP4 增强启动子转录活性的发挥。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Li SC (李世崇), Zhu XD (朱旭东), Chen ZL (陈昭烈), *et al.*, Recent progress in study on artificial transcription factors. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences (军事医学科学院院刊)* 2005, **29**(5): 474 - 479.
- [2] Pei-qiliu, Magda FM, Andreas R. Cell lines for drug discovery: elevating target-protein levels using engineered transcription factors. *The Society for Biomolecular Screening* 2004, **9**(1): 44 - 51.
- [3] Zh XH (赵兴卉), Zhu XD (朱旭东), Liu J (刘娟), *et al.* Construction of a SV40 promoter specific artificial transcription factor. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)* 2003, **19**(5): 607 - 612.
- [4] Kwon RJ, Kim SK, Lee SI. Artificial transcription factors increase production of recombinant antibodies in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Letters* 2006, **28**(1): 9 - 15.
- [5] <http://www.sangamo.com>.
- [6] Wu BC (吴本传), Chen ZL (陈昭烈), Liu H (刘红), *et al.* Development of recombinant CHO cell lines expressing t-PA via site-specific integration expression system. *Pharmaceutical Biotechnology (药物生物技术)* 2004, **11**(4): 221 - 224.
- [7] Yaghamai R, Cutting GR. Optimized regulation of gene expression using artificial transcription factors. *Molecular Therapy*, 2002, **5**(6): 685 - 694.
- [8] Ansari AZ, Mapp AK, Nguyen DH, *et al.* Towards a minimal motif for artificial transcriptional activator. *Chem Biol*, 2001, **8**(6): 583 - 592.
- [9] Gao LH (高丽华), Yu F (于芳), Xiao CZ (肖成祖). Modification of assay for measuring prourokinase and observation of stability of prourokinase expression by genetically-engineered cell line CL-11G. *Biotechnology (生物技术)*, 1999, **9**(4): 42 - 46.