

研究简报

## 携带红色荧光蛋白的 RU486 可诱导真核表达载体的构建及其表达

陈坚<sup>1</sup>, 薛绪潮<sup>2</sup>, 方国恩<sup>2</sup>, 苏长青<sup>3</sup>, 钱其军<sup>3</sup>

1 解放军第 81 医院肿瘤外科, 南京 210002

2 上海第二军医大学附属长海医院, 上海 200433

3 东方肝胆医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438

**摘要:** 在基因治疗中, 实现目的基因的调控表达是非常重要的。然而, 传统基因载体的无调控地持续或不适当的表达会影响治疗效果, 甚至可能带来致命的副作用。在本研究中, 我们构建了一种带有 DsRed 红色荧光蛋白报告基因并可经 RU486 诱导的真核表达载体, 并在体外评估了其调控表达作用。利用分子生物学技术, 将 DsRed 基因和启动子, 以及 RU486 系统构建成单一的质粒载体 PDC-RURED, 为减少 RU486 调控元件和基因表达元件之间的相互干扰, 在两者之间加入 1.6 kb 的绝缘子。经 PCR 检测和限制性酶切分析及序列测定均证实了载体的正确性。在转染 HEK293 细胞后, 运用荧光显微镜和流式细胞技术证实了该载体的调控能力。没有 RU486 时, 几乎没有红色荧光蛋白的表达, 而加入诱导剂 RU486 后, 最高可以实现红色荧光蛋白的 40 余倍的表达。实验结果表明构建的可经 RU486 诱导的新型真核表达载体可以实现对目的基因的表达时间和表达水平的调控, 为进一步的基因调控研究和基因治疗提供了良好的工具。

**关键词:** RU486, 诱导表达, 基因调控, 红色荧光蛋白

## Construction and Expression *in vitro* of an RU486 Inducible Vector Carrying DsRed Protein

Jian Chen<sup>1</sup>, Xuchao Xue<sup>2</sup>, Guoen Fang<sup>2</sup>, Changqing Su<sup>3</sup>, and Qijun Qian<sup>3</sup>

1 Department of Oncological Surgery, the 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

2 Department of General Surgery Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3 Laboratory of Viral and Gene Therapy Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**Abstract:** The regulation of a target gene expression is very important in gene therapy. However, constitutive or inappropriate expression of the genes with traditional expression system may interfere with the effect of the gene therapy, even may lead to lethal side effect. We constructed an RU486 inducible eukaryotic vector carrying DsRed protein and evaluated its regulatable effect *in vitro*. The single vector named PDC-RURED was constructed with molecular biological methods, which contained DsRed gene, promoter and mifepristone-inducible system. To minimize any potential interference, we spaced the two transcriptional elements with a 1.6 kb insulator. The vector was identified by different enzyme restrictions, sequencing analysis and PCR assay. We demonstrated the regulatable expression of this vector after transfection in HEK293 cells by fluorescence microscopy and flow cytometry. In the absence of RU486, no significant DsRed protein activation was observed, whereas in the presence of RU486 up to 40 fold activation

**Received:** December 5, 2007; **Accepted:** January 18, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30571830).

**Corresponding author:** Xuchao Xue. Tel: +86-21-25070573; E-mail: xuexch@163.com

国家自然科学基金 (No. 30571830) 资助。

of the DsRed protein was observed in cultured cells. The data show that the novel eukaryotic expression plasmid vector can be used to regulate the expression level of genes of interest in appropriate time under the control of RU486. This inducible expression vector provides a powerful tool for the research of gene regulation and gene therapy.

**Keywords:** RU486, inducible expression, gene regulation, DsRed

基因的过度表达或不适当的表达不仅影响到对基因功能的研究, 在基因治疗中甚至会对机体产生致命的副作用, 因此实现对目的基因的表达时间和表达水平的精确调控具有重要意义。为此生物学家们构建出了多种诱导调控系统, 其中 RU486 诱导调控系统具有本底表达低, 诱导效率高, 免疫原性小, 诱导剂无毒性等诸多优点, 在国外应用日益广泛<sup>[1]</sup>, 但在国内尚未见应用报导。本研究利用分子生物学技术, 成功构建成了带有 RU486 诱导调控系统的真核表达载体, 携带有红色荧光蛋白报告基因, 并在体外证实了其诱导调控表达效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株和质粒

HEK293 细胞株购自加拿大 Microbix Biosystems 公司; 质粒 pDC313、含有 DsRed 红色荧光蛋白和绝缘子 insulator 的质粒 pB-DsRed 均为东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室保存; 含有 RU486 诱导调控系统的 GLP65 反式作用调控因子和 GAL4 杂合启动子 2 个组件的质粒 pRS-17 由西班牙 Navarra 大学医学院钱程教授惠赠。

#### 1.1.2 试剂和仪器

各种限制性内切酶购自 New England Biolab 公司; 诱导剂 RU486 购自 Sigma 公司; DNA 连接试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; 新生小牛血清购自 Gibco 公司; 真核细胞转染试剂 lipofectamine 2000 购自 Invetrogen 公司; PCR 仪(德国 Biometra 公司); Napc05420 二氧化碳孵箱(法国 Joavn 公司); 6 孔板(丹麦 NUNC 公司); FACS Aria 流式细胞分选仪(美国 BD 公司)。

#### 1.1.3 引物

引物设计采用 OLIGO 分析软件在计算机上进行, 上游引物和下游引物的 5' 端均设计有酶切位点, 且其外侧设有保护性碱基。DsRed 上游引物): 5' TCAGATCCGCTAGCGCTACCGGT3' DsRed 下游引

物): 5' ACGCGTCGACCTACAGGAACAGGTGGT GGCGGC3', 引物由 Invetrogen 公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 载体的构建

利用分子生物学技术, 将 DsRed 基因和启动子, 以及 RU486 调控系统构建成为单一的真核载体 PDC-RURED。载体构建流程如下: 1) pB-DsRed 用 *Nhe* I 和 *Kpn* I 切下的 BGH-Ins-hCMV-DsRed 片段, 插入 pRS-17 质粒 *Nhe* I 和 *Kpn* I 位点, 重组质粒命名为 pRS-RURED。2) *Not* I 单酶切下 pRS-RURED 中的调控表达框和 DsRed 基因表达框部分装入 pDC313 载体的 *Not* I 位点中, 酶切和 PCR 鉴定筛选阳性重组子, 命名为 PDC-RURED。如图 1 所示。

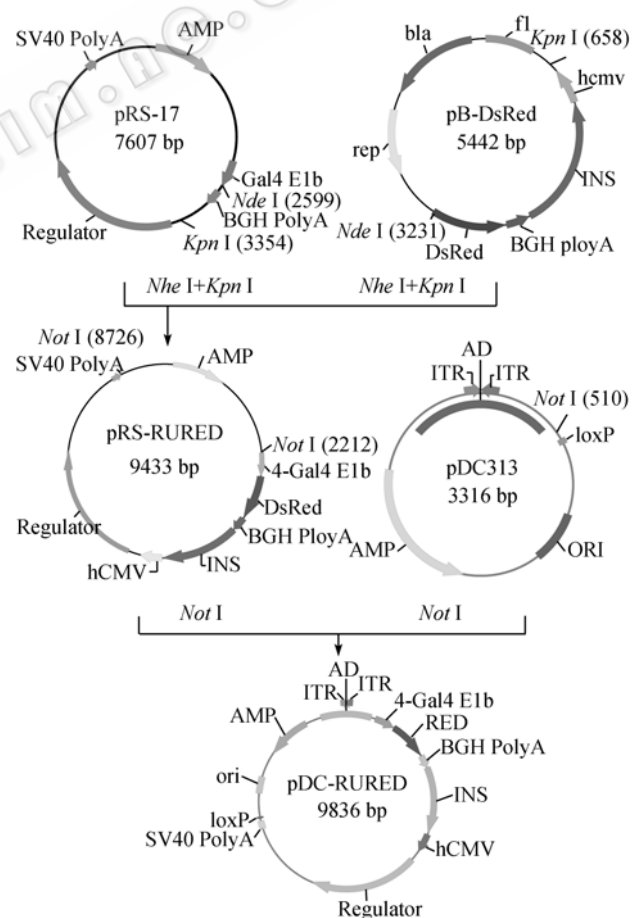


图 1 载体 PDC-RURED 构建流程图

Fig. 1 Process of the constructing PDC-RURED vector

### 1.2.2 载体的鉴定

对载体 PDC-RURED 选择 *Bgl* II, *Xho* I, *Kpn* I 限制性内切酶行酶切鉴定; 用 DsRed 基因特异性引物对重组质粒 PDC-RURED 进行 PCR 扩增鉴定, PCR 扩增参数: 96°C 5 min; 95°C 30 s; 55°C 30 s; 72°C 60 s; 72°C 10 min; 共 30 个循环; 12°C 保存, 扩增产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳。

### 1.2.3 细胞转染及荧光观察

用真核细胞转染试剂将载体 PDC-RURED 转染至 HEK293 细胞中, 然后予不同浓度的 RU486 诱导表达, 观察不同浓度 RU486 诱导后红色荧光蛋白的荧光变化。操作方法如下: 接种 HEK293 细胞于标准 6 孔板中, 细胞数为  $3 \times 10^5$  个细胞/孔, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。用 lipofectamine 2000 试剂盒转染细胞, 按试剂盒说明书操作, 继续细胞培养 24 h 后, 6 个实验组内加入一定量的 RU486, 使培养液的药物浓度分别达到 0、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-10}$  mol/L, 继续孵育 48 h 后于倒置荧光显微镜下观察, 可见阳性细胞发红色荧光, 拍照片。

### 1.2.4 流式细胞仪检测荧光强度变化

用流式细胞仪检测上述各实验组的发红色荧光的阳性细胞比例。具体操作如下: 去除 1640 培养基, 用 5 mL 冷 PBS 液, 轻轻冲洗细胞后去除; 加 2 mL 胰蛋白酶液, 37°C 保温 5 min, 轻轻摇动培养瓶或用滴管吹打数次使细胞最大程度游离; 加 8 mL 含血清的培养基以抑制酶活性, 把细胞悬液移到离心管内, 离心 5 min; 弃上清, 将细胞重新悬于 10 mL 冷 PBS 中, 搅匀; 行流式细胞仪检测, 并计算出表达 DsRed 的阳性细胞比率, 重复 3 次, 取其均值, 并计算标准差。

### 1.2.5 统计学方法

流式细胞仪测得实验数据用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示, SPSS10.0 软件包处理实验数据, 方差检验各组间差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 载体 PDC-RURED 的 PCR 鉴定

用 DsRed 基因特异性引物对重组质粒 PDC-RURED 进行 PCR 扩增鉴定, 以 pB-DsRed 质粒作阳性对照, 并设阴性对照, 扩增后可得 701 bp 的特异性条带, 与阳性对照一致, 阴性对照无特异性条带, 表明红色蛋白荧光蛋白基因片段插入正确,

凝胶电泳结果见图 2。

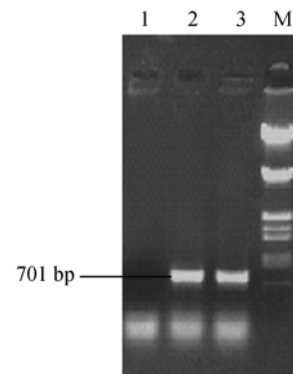


图 2 重组载体 PDC-RURED PCR 扩增鉴定  
Fig. 2 Identification of PDC-RURED vector by PCR amplification  
1: negative control; 2: PCR assay; 3: positive control; M:  $\lambda$  DNA  
*Eco*R I+*Hind* III digest marker

### 2.2 载体 PDC-RURED 的测序鉴定

重组载体的各组件如图 1 所示, 对质粒的主要元件, 包括 GLP65 反式作用调控因子(Regulator)和 GAL4 杂合启动子(GalE1b), 红色蛋白荧光蛋白基因(DsRed), 绝缘子(INS), 均送 Invetrogen 公司完成测序, 结果证实与实验设计一致, 表明 RU486 诱导调控系统和 DsRed 及绝缘子成功克隆入载体。

### 2.3 载体 PDC-RURED 的酶切鉴定

重组质粒载体 PDC-RULUC 予 *Bgl* II 酶切, 可得 6714 bp、1961 bp、1161 bp 三个片段, *Kpn* I 酶切可得 6839 bp 和 2997 bp 片段, *Xho* I 酶切可得 7035 bp 和 2801 bp 片段, 凝胶电泳结果见图 3, 实验结果与设计相符, 进一步证明载体构建正确。

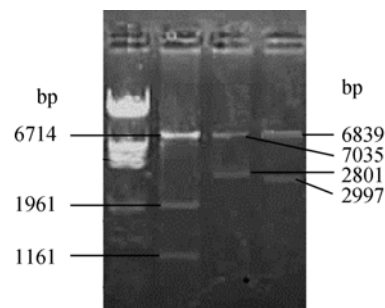


图 3 重组载体 PDC-RURED 酶切鉴定图  
Fig. 3 Identification of PDC-RURED vector by restriction enzyme digestion

M:  $\lambda$  DNA *Eco*R I+*Hind* III digest marker; 1: enzyme digestion with *Bgl* II; 2: enzyme digestion with *Kpn* I; 3: enzyme digestion with *Xho* I

### 2.4 DsRed 红色荧光蛋白报告基因的表达

#### 2.4.1 荧光显微镜观察不同浓度 RU486 诱导后 DsRed 的荧光变化

在没有加入诱导剂 RU486 时, 显微镜下可见

很少量的细胞表达红色荧光蛋白, 并且亮度较低。加入诱导剂 RU486 后, 培养液中的 RU486 为  $1 \times 10^{-10}$  mol/L 浓度时, 即可诱导载体表达红色荧光蛋白, 镜下可见表达红色荧光蛋白的细胞增多, 同时亮度增加, 随着 RU486 浓度的增加, 表达红色荧光蛋白的细胞数量和亮度均相应增加, 存在明显的剂量反应关系。不同浓度组的荧光变化, 如图 4 所示。

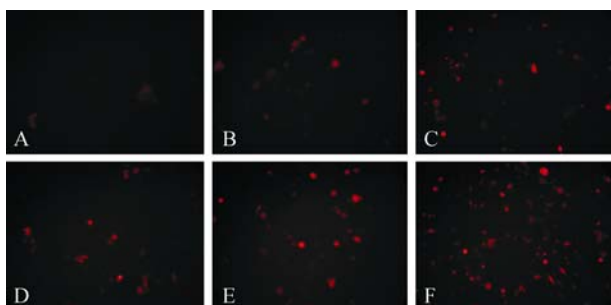


图 4 不同浓度 RU486 诱导后红色荧光蛋白 DsRed 的荧光强度变化

Fig. 4 Variation of the DsRed fluorescence intensity after induced by different RU486 concentration

A: control; B:  $1 \times 10^{-10}$  mol/L; C:  $1 \times 10^{-9}$  mol/L; D:  $1 \times 10^{-8}$  mol/L; E:  $1 \times 10^{-7}$  mol/L; F:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L

## 2.4.2 流式细胞仪检测不同浓度 RU486 诱导后 DsRed 的荧光变化

从流式仪结果可以看出, 在没有加入诱导剂 RU486 时, 红色荧光蛋白 DsRed 只有极少量的表达, 流式细胞图上只显示单峰, 加入 RU486 后, 出现双峰样图形, 右侧的峰值高度与荧光强度呈正比, 如图 5 所示:

根据流式仪所有得结果, 可以得到各组表达 DsRed 的阳性细胞比率, 结果如图 6, 行单因素分差分析显示, 经 RU486 诱导后的各浓度组的 DsRed 的阳性细胞比率之间有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 且红色荧光蛋白表达的比例与诱导剂 RU486 的浓度呈正相关。

## 3 讨论

对目的基因进行有效调控, 使其安全有效地表达, 一直是基因研究和基因治疗的难点和热点问题<sup>[2]</sup>。对目的基因的表达时间和表达水平的精确调控, 不仅能提高基因治疗的安全性, 而且能使基因表达控制在有效作用浓度范围内, 从而避免较大的全身毒性。在已开发成功的基因诱导表达调控系统

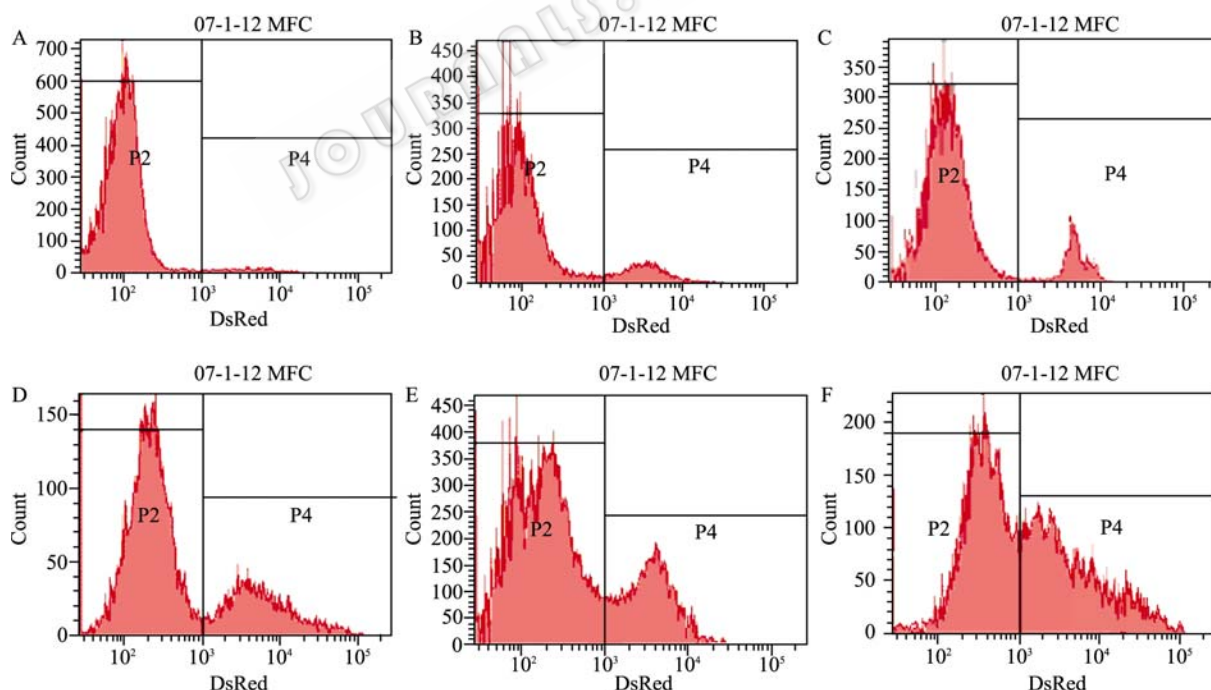


图 5 流式细胞仪检测不同浓度 RU486 诱导后 DsRed 的荧光强度变化

Fig. 5 FCM detection of the DsRed fluorescence intensity after induced by different RU486 concentration

A: control; B:  $1 \times 10^{-10}$  mol/L; C:  $1 \times 10^{-9}$  mol/L; D:  $1 \times 10^{-8}$  mol/L; E:  $1 \times 10^{-7}$  mol/L; F:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L

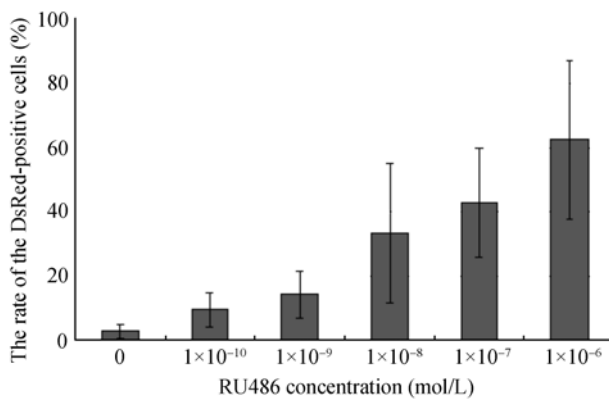


图6 各组表达DsRed阳性细胞的比率

Fig. 6 the rate of the DsRed-positive cells in all groups

中, 由于 RU486 诱导调控系统功能最为完善, 被认为是基因调控研究中的重要进展<sup>[3]</sup>。

RU486 调控系统由 Wang 等<sup>[4]</sup>于 1994 年最先构建成功。该系统由反式作用调控区和目的基因区以及诱导剂 RU486 三个部分组成<sup>[5]</sup>。反式作用调控区包括任意启动子和嵌合式反式激活因子 GLVP, 其中 GLVP 由酵母的半乳糖苷酶基因的转录激活因子 GAL4 的 DNA 结合域(Gal4DBD)、单纯疱疹病毒蛋白 VP16 激活区(VP16AD)和孕酮受体突变体改良后的 C 末端配体结合区(PRLBD-891) 3 个部分组成<sup>[6]</sup>。在 GLVP 中, 由于 PRLBD-891 的转活能力较差, 而 VP16AD, 即 VP16 的 C 末端为酸性, 可以直接与转录起始复合物中的转录因子 TFIIB、TATA 结合蛋白(TBP)和 TBP 辅助因子 TAFII<sub>40</sub> 相互作用, 具有很强的转活功能。目的基因区是指 4 个 Gal4 上游激活序列串联体(UAS)和最小启动子调控下的目的基因<sup>[7]</sup>, 其中常用的最小启动子为腺病毒 E1b 基因中的 TATA 盒或胸腺嘧啶脱氧核苷激酶启动子 TK, UAS 串联体由 4 个相同的 17 bp 序列构成, 每个序列都呈两侧对称, 当其与一个 GAL4 二聚体结合, 那么转录激活是低水平的, 若 4 个序列都和 GAL4 二聚体结合, 则表达达到最高水平, 因而 Gal4 上游激活序列的 4 个串联体可在这一系统中提供最大的转录效能。调控系统中诱导剂为 RU486, 又名米非司酮 mifepristone(MFP)<sup>[8]</sup>, 是一种孕酮拮抗剂, 是在受体水平抗孕激素和糖皮质激素的一种人工合成类固醇。RU486 进入组织细胞的能力较强, 可以快速激活系统, 并在体内可以被较快地代谢, 半衰期较短, 该系统中作为诱导剂所需 RU486 的剂量

(0.1~0.5 mg/kg), 远较其在医疗中用做抗孕酮药物的剂量(10 mg/kg)低。即使是调控系统达到最大效应时的剂量也远低于临床使用剂量, 对人体来说是十分安全的<sup>[9]</sup>。

目前常用的报告基因有氯霉素乙酰基转移酶、 $\beta$  半乳糖苷酶、分泌型碱性磷酸酶、 $\beta$  葡萄糖醛酸酶、荧光素酶、人生长激素及绿色荧光蛋白等<sup>[10]</sup>。而红色荧光蛋白(RFP)是新近被克隆的一种报告基因, 是从珊瑚虫中发现的一种与绿色荧光蛋白(GFP) 同源的荧光蛋白, 是至今报道的具有最长波长的野生型荧光蛋白<sup>[11]</sup>。而香菇珊瑚红色荧光蛋白 DsRed (*Discosoma* sp. Red) 是经 Clontech 公司商业化的一种低毒、低寡聚化及成熟快的红色荧光蛋白突变体<sup>[12]</sup>。其在紫外线的照射下可发射红色荧光, 其最大吸收波长为 558 nm, 最大发射波长为 583 nm。作报告基因, 红色荧光蛋白有多种优点: 1) 荧光亮度高, 可与最好的 GFPs 相媲美<sup>[13]</sup>; 2) 较强的抵御光漂白的能力; 3) 可忽视的 pH 敏感性, pH 范围 4.5~12, 而所有明亮的 GFP 突变体比 RFP 更容易在酸性条件下猝灭; 4) 另外, 除了具有 GFP 非侵犯性、不需牺牲样本且可连续观察的优点外, DsRed 因其发射波长较长, 较少受到外来荧光干扰, 灵敏度与信噪比均比 GFP 高<sup>[14]</sup>。因此, 本研究选用了 DsRed 作为报告基因, 而且在其基因序列后保留了多克隆位点, 便于外源基因插入, 使基因的调控表达研究更加方便快捷。

本研究通过红色荧光蛋白的镜下观察和流式细胞仪检测, 证实了所构建的携带有红色荧光蛋白的可调控真核载体的诸多优势: 1) 系统特异性高, 本底表达很低, 在没有诱导物 RU486 时只有极少量的 DsRed 基因表达。2) 安全性高: 在体外未发现导致实验细胞的死亡。3) 诱导效率高: 调控系统达到最大效应时可达到基础表达的 40 倍。4) 观察研究方便: DsRed 荧光亮度高, 可用荧光显微镜直接观察基因表达情况。5) 基因表达与诱导剂的浓度成正比, 报告基因的表达与诱导剂浓度有着良好的相关性。

研究表明, 构建成功了 RU486 诱导调控表达的新型真核表达载体, 可以通过给予不同剂量的 RU486 实现目的基因的不同水平的表达, 具有本底表达低, 诱导效率高, 诱导剂无毒性, 便于观察等诸多优点, 为基因调控研究和基因治疗提供了一个良好的工具。

## REFERENCES

- [1] Weber W, Fussenegger M. Pharmacologic transgene control systems for gene therapy. *J Gene Med*, 2006, **8**(5): 535–556.
- [2] Weber W, Fussenegger M. Novel gene switches. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, **178**: 73–105.
- [3] Vilaboa N, Voellmy R. Regulatable gene expression systems for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2006, **6**(4): 421–438.
- [4] Wang Y, O'Malley BW Jr, Tsai SY, *et al.* A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(17): 8180–8184.
- [5] Bo J, Yu W, Zhang YM, *et al.* Cardiac-specific and ligand-inducible target gene expression in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, **38**(4): 685–691.
- [6] Li B, Fan J, Liu X, *et al.* Suppression of colorectal tumor growth by regulated survivin targeting. *J Mol Med*, 2006, **84**(12): 1077–1086.
- [7] Qian C, Liu XY, Prieto J. Therapy of cancer by cytokines mediated by gene therapy approach. *Cell Res*, 2006, **16**(2): 182–188.
- [8] Leonhardt SA, Edwards DP. Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2002, **227**(11): 969–980.
- [9] Kyrkanides S, Miller JH, Bowers WJ, *et al.* Transcriptional and posttranslational regulation of Cre recombinase by RU486 as the basis for an enhanced inducible expression system. *Mol Ther*, 2003, **8**(5): 790–795.
- [10] Swanson CI, Hinrichs T, Johnson LA, *et al.* A directional recombination cloning system for restriction- and ligation-free construction of GFP, DsRed, and *lacZ* transgenic *Drosophila* reporters. *Gene*, 2008, **408**(1-2): 180–186.
- [11] Helber N, Requena N. Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol*, 2008, **177**(2): 537–548.
- [12] Sumner JP, Westerberg NM, Stoddard AK, *et al.* DsRed as a highly sensitive, selective, and reversible fluorescence-based biosensor for both Cu(+) and Cu(2+) ions. *Biosens Bioelectron*, 2006, **21**(7): 1302–1308.
- [13] Janus D, Hoff B, Hofmann E, *et al.* An Efficient fungal RNA-silencing system using the DsRed reporter gene. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(3): 962–970.
- [14] Dmitrienko DV, Vrzheshech EP, Drutsa VL, *et al.* Red fluorescent protein DsRed: parametrization of its chromophore as an amino acid residue for computer modeling in the OPLS-AA force field. *Biochemistry (Mosc)*, 2006, **71**(10): 1133–1152.

## 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。