

## 生物技术与方法

# 一种新型的生物素诱导的真核基因表达调控系统的建立

叶玲玲<sup>1</sup>, 刘红<sup>1</sup>, 李世崇<sup>1</sup>, 王启伟<sup>1</sup>, 蓝三春<sup>2</sup>, 陈昭烈<sup>1</sup>

1 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

2 军事医学科学院附属医院, 北京 100071

叶玲玲, 刘红, 李世崇, 等. 一种新型的生物素诱导的真核基因表达调控系统的建立. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1256–1265.  
Ye LL, Liu H, Li SC, et al. Establishment of a novel biotin-inducible eukaryotic gene regulation system. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1256–1265.

**摘要:** 为建立一种适用于生物制药工业和基因治疗领域的基因表达调控系统, 构建枯草芽孢杆菌生物素连接酶 (BS-BirA) 与转录激活结构域的融合蛋白, 以其表达载体为调控载体; 在弱化的 CMV 启动子上游连接 BS-BirA 特异的操纵子序列, 获得响应载体, 从而得到响应于生物素的真核基因表达调控系统 BS-Biotin-On。以增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 为报告基因对该系统进行考察, 结果表明, 与现有的类似调控系统相比, 该系统具有良好的诱导率; 可通过调节培养体系中生物素的浓度, 实现对目的基因表达水平快速、较高效的调节。上述结果表明, BS-Biotin-On 系统可能为外源基因的调控表达提供新的选择。

**关键词:** 生物素, 基因表达调控系统, 诱导率, BirA

## Establishment of a novel biotin-inducible eukaryotic gene regulation system

Lingling Ye<sup>1</sup>, Hong Liu<sup>1</sup>, Shichong Li<sup>1</sup>, Qiwei Wang<sup>1</sup>, Sanchun Lan<sup>2</sup>, and Zhaolie Chen<sup>1</sup>

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

2 Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

**Abstract:** To establish a gene regulation system compatible with biopharmaceutical industry and gene therapy, we

**Received:** September 22, 2013; **Accepted:** October 12, 2013

**Supported by:** National Major Special Program of New Drug Research and Development (No. 2011ZX09401-019), National Natural Science foundation of China (No. 81302689).

**Corresponding author:** Zhaolie Chen. Tel: +86-10-66948818; E-mail: chenlz123@sina.com

“重大新药创制”科技重大专项课题 (No. 2011ZX09401-019), 国家自然科学基金 (No. 81302689) 资助。

constructed a fusion protein of biotin ligase from *Bacillus subtilis* (BS-BirA) and the trans-activation domain, and used its expression vector as the regulatory vector. Meanwhile, BS-BirA-specific operators were ligated upstream of attenuated CMV promoter to obtain the response vector. In this way, a novel eukaryotic gene regulation system responsive to biotin was established and named BS-Biotin-On system. BS-Biotin-On system was further investigated with the enhancing green fluorescent protein (EGFP) as the reporter gene. The results showed that our system was superior to the current similar regulation system in its higher induction ratio, and that the expression of interest gene could be tuned in a rapid and efficient manner by changing the biotin concentrations in the cultures. Our results show that the established system may provide a new alternative for the exogenous gene modulation.

**Keywords:** biotin, gene regulation system, induction rate, BirA

基因表达调控系统能够在时空上控制目的基因的表达, 现已广泛应用于基础研究和应用中, 例如, 功能基因组研究、组织工程、系统生物学、药物研发、基因治疗、生物药物生产和功能材料的设计等<sup>[1-4]</sup>。最初开发的适用于哺乳动物细胞的基因表达调控系统采用的诱导剂分子包括抗生素、免疫抑制剂或激素及其衍生物等, 这些调控系统在培养体系和转基因动物中表现出了良好的调控效果, 但是由于具有生理活性的诱导剂分子具有某些临床副作用, 使得它们在基因治疗和生物药物生产中的应用受到了限制<sup>[5-6]</sup>。新一代的基因表达调控系统使用临床上惰性的诱导剂分子, 如精氨酸、维生素 H (亦称生物素) 以及光等<sup>[7-9]</sup>。

Weber 等于 2007 年和 2009 年分别建立和改造了以生物素为诱导剂的外源基因表达调控系统, 以 SEAP 为报告基因验证了该系统在 HEK293-T、COS-7 和 CHO-K1 细胞中的有效性<sup>[10-11]</sup>。该系统的一个重要组分是来自大肠杆菌 *Escherichia coli* 的生物素连接酶 BirA, BirA 是一种双功能蛋白, 既可在 ATP 存在下激活生物素并将其与特异的蛋白受体相连接, 又可与激活的生物素相结合, 发生构象变化, 进而结合位于生物素合成操作元上游的特异操纵子序列 ( $O_{\text{BirA}}$ ), 抑制该操作元的转录。该系统利用

BirA 的上述特性, 将其与单纯疱疹病毒转录激活因子 VP16 的转录激活结构域构建成人工转录激活因子 BirA-VP16, 获得的 BirA-VP16 可在生物素存在下, 结合并激活含有 3 个拷贝  $O_{\text{BirA}}$  的最小 CMV 启动子, 从而激活下游目的基因的转录 (图 1)。受上述研究启发, 本文来自于枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 的生物素连接酶 (BS-BirA) 代替来自大肠杆菌的生物素连接酶 (EC-BirA), 构建了 BS-BirA 与 VP16 核心转录激活结构域的 4 个串联重复 (称 VP4) 的融合转录激活因子, 建立了一种新型的以生物素为诱导剂的基因表达调控系统, 实现了对目的基因表达水平快速、较高效的调节, 为外源基因的调控表达提供了新的选择。

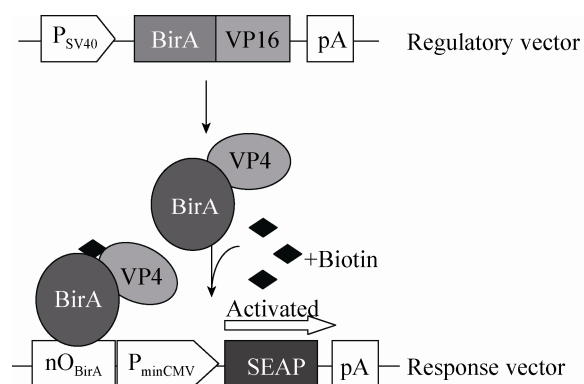


图 1 生物素诱导表达系统示意图<sup>[11]</sup>

Fig. 1 Molecular configuration of the biotin-inducible expression system<sup>[11]</sup>.

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 菌株、质粒和细胞

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株购自盖宁公司 ;TOP10 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司 ;枯草芽胞杆菌 BS168 基因组由本所熊向华惠赠 ;pcDNA3.1(+) 载体购自 Invitrogen 公司 ;pTRE 载体由本所熊福银惠赠 ;人工转录因子 GVP4 表达载体 pc-Hy-GVP4、组成型表达 EGFP 基因的 pc-Hy-E 载体均为本课题组构建 ;HEK293 细胞购自 Gibco 公司。

## 1.2 培养基和试剂

常规 DMEM/F12 (1 : 1) 液体培养基和无生物素 DMEM/F12 (1 : 1) [称为 DF (Bio-)] 液体培养基购自北京钮因华信公司 ;新生牛血清 (NBS) 购自兰州民海生物工程有限公司 ;脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司 ;G418 和潮霉素 B 购自 Merck 公司 ;Streptavidin

agarose 购自 Novagen 公司 ;生物素 (Biotin) 购自 Amresco 公司 ;兔抗 GFP 多抗购自南京碧云天生物技术有限公司 ;DNA 序列全合成由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

## 1.3 细胞培养、转染和筛选

HEK293 细胞正常贴壁培养于添加 5% (V/V) NBS 的 DMEM/F12 (1 : 1) 培养基中 , 37  $^{\circ}\text{C}$  , 5%  $\text{CO}_2$ 。

转染步骤依脂质体说明书、在 24 孔板中进行 , 共转染的两种质粒摩尔比为 1 : 1 , 每孔总计 1  $\mu\text{g}$  , 每种转染重复 2 孔。转染后的细胞用含 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 和 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 的筛选培养基进行筛选。

## 1.4 基于 BS-BirA、以生物素为诱导剂的基因表达调控系统 BS-Biotin-On 的构建

### 1.4.1 BS-Biotin-On 系统调控载体的构建

各引物序列见表 1。从 BS 168 基因组中克

表 1 本文中涉及的核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequences involved in this article

Name	Nucleotides sequence (5'-3')
BS-BirA-5	AGCCTTAAGGCCGCCACCATGCGGTCAACATTAAGAAAAGACC
BS-BirA-3	AGCGCGGCCGCTCAATCTACCTTTCTTCTTTTTTGGGCCCAATTCGATATCGGCAG
VP-3	CTAGACTCGAGCGGCCGCCAC
BSOB-5	AATTGGACTTGTAACCAAATTGAAAAGATTAGGTTTACAAGTCA
BSOB-3	CGCGTGACTTGTAACCTAAATCTTTTCAATTTGGTTTACAAGTCC
minCMV-5	GACACGCGTTAGGCGTGACGGTGGGAGG
minCMV-3	GATCGCTAGCCCCTATAGTGAGTCGTATTAGGCTGGATCGGTCCCGGTG
4BSOB	TCGCGAGACTTGTAACCAAATTGAAAAGATTAGGTTTACAAGTCAGATCTGACTTGTAACCAAATTGAAAAGATTAGGTTTACAAGTCGACTTGTAACCAAATTGAAAAGATTAGGTTTACAAGTCACGCGT
EC-BirA-5	AGCGCTAGCATGAAGGATAACACCGTGCC
EC-BirA-3	AGCGGTACCTTTTTCTGCACTACGCAGG
BSOB-NheI	CTAGCGACTTGTAACCAAATTGAAAAGATTAGGTTTACAAGTCC
BSOB-AflII	TTAAGGACTTGTAACCAAATTGAAAAGATTAGGTTTACAAGTCG

隆 BS-BirA 基因, 引物为 BS-BirA-5 和 BS-BirA-3, 将 BS-BirA 与酶切自 pc-Hy-GVP4 载体的 VP4 片段进行重叠 PCR, 引物为 BS-BirA-5 和 VP-3, 获得的融合转录激活因子 BS-BV 连入 pcDNA3.1 (+) 载体, 得到 BS-Biotin-On 系统的调控载体 pc-BS-BV。

#### 1.4.2 含不同拷贝数操纵子的 BS-Biotin-On 系统响应载体的构建

通过引物 BSOB-5 和 BSOB-3 退火获得 BS-BirA 特异的操纵子 (BSOB) 片段, 自 pTRE 质粒克隆最小 CMV 启动子 ( $P_{\min\text{CMV}}$ ), 引物为 minCMV-5 和 minCMV-3, 将 BSOB 和  $P_{\min\text{CMV}}$  依次连入 EGFP 表达载体 pc-Hy-E 野生型 CMV 启动子的位置, 得到含 1 个拷贝 BSOB 的 BS-Biotin-On 系统的响应载体 pc-Hy-BSOB-minE。

通过全合成获得 4 个串联重复的 BSOB 序列 4BSOB (表 1), 经 *Nru* I / *Mlu* I 酶切后连入同样酶切的 pc-Hy-minE 载体, 得到含 4 个拷贝 BSOB 的 BS-Biotin-On 响应载体, 命名为 pc-Hy-4BSOB-minE; 该载体再分别经 *Bgl* II 和 *Mfe* I 酶切后自连, 得到含 3 个和 2 个拷贝 BSOB 的 BS-Biotin-On 响应载体, 分别命名为 pc-Hy-3BSOB-minE 和 pc-Hy-2BSOB-minE。

#### 1.4.3 基于 EC-BirA 的 EC-Biotin-On 系统的构建

从大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中克隆 EC-BirA 基因, 引物为 EC-BirA-5 和 EC-BirA-3, 与酶切自 pc-Hy-GVP4 载体的 VP4 片段一起连入 pcDNA3.1 (+) 载体, 得到融合转录激活因子 EC-BV 的表达载体, 命名为 pc-EC-BV, 此为 EC-Biotin-On 系统的调控载体; EC-BirA 特异的操纵子 (ECOB) 序列为: 5'-CTAATTGTTAACC TTTGAATATAATTGGTTAACAATTTAG-3', 通过

全合成获得 3 个串联重复的 ECOB, 5' 和 3' 末端分别为 *Mfe* I 和 *Mlu* I 酶切位点, 双酶切后连入同样酶切的 pc-Hy-minE 载体, 得到响应于生物素的 EGFP 诱导表达载体 pc-Hy-3ECOB-minE, 此为 EC-Biotin-On 系统的响应载体。

### 1.5 BS-Biotin-On 系统的考察和评价

#### 1.5.1 BS-Biotin-On 系统与 EC-Biotin-On 系统诱导率的比较

向 NBS 中加入 0.5% (V/V) 链亲和素琼脂糖珠, 室温孵育 15 min, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除去珠子及除菌, 得到去除生物素的 NBS [称为 NBS (Bio-)]。

将 pc-BS-BV/pc-Hy-3BSOB-minE 和 pc-EC-BV/pc-Hy-3ECOB-minE 分别共转染 HEK293 细胞, 经抗生素筛选获得稳定转染的细胞混合克隆, 分别称为 HEK-3BSE 和 HEK-3ECE。将这两种细胞分别接种 24 孔细胞培养板, 待细胞贴壁后, 更换为无生物素和含 200  $\mu\text{mol/L}$  生物素两种培养基继续培养 3 d, 借助流式细胞仪检测 EGFP 荧光强度情况。

#### 1.5.2 操纵子数目对 BS-Biotin-On 系统效果的影响

将 pc-BS-BV 和含 1-4 个拷贝 BSOB 的 EGFP 诱导表达载体 pc-Hy-(1-4)BSOB-minE 分别共转染 HEK293 细胞, 经筛选得到混合细胞克隆。以组成型表达 EGFP 的载体 pc-Hy-E 和 pc-Hy-BSOB-minE 载体单转染的细胞分别作为阳性对照和阴性对照, 考察无生物素和 200  $\mu\text{mol/L}$  生物素两种培养条件下培养 3 d 后 EGFP 的相对荧光强度。

#### 1.5.3 Western blotting 检测 EGFP 蛋白表达

Western blotting 实验由北京康为世纪生物科

技有限公司完成。GFP 抗体稀释度为 1 5 000 ,  
β-actin 抗体稀释度为 1 5 000。

## 2 结果与分析

### 2.1 BS-Biotin-On 系统的构建

#### 2.1.1 BS-Biotin-On 系统调控载体的构建

枯草芽胞杆菌生物素连接酶 (BS-BirA) 基因全长 978 bp ,克隆自枯草芽胞杆菌 BS168 基因组 (图 2A)。BS-BirA 与 VP4 (单纯疱疹病毒 VP16 蛋白核心转录激活结构域的 4 个串联重复,长度约 150 bp ,图 2B) 经重叠 PCR 获得融合转录激

活因子 BS-BV (图 2C) ,BS-BV 连入 pcDNA3.1(+) 载体 ,得到 BS-BV 的组成型表达载体 pc-BS-BV ,为 BS-Biotin-On 系统的调控载体 (图 3A)。

#### 2.1.2 含不同拷贝数 BSOB 的 BS-Biotin-On 响应载体的构建

将 BS-BirA 特异的操纵子 BSOB 片段 (184 bp ,全合成获得) 和最小 CMV 启动子 ( $P_{\min CMV}$  ,约 120 bp ,图 4) 依次连入 EGFP 组成型表达载体 pc-Hy-E ,代替其野生型 CMV 启动子的位置 ,得到含 1 个拷贝操纵子的 BS-Biotin-On 系统响应载体 pc-Hy-BSOB-minE (图 3B)。

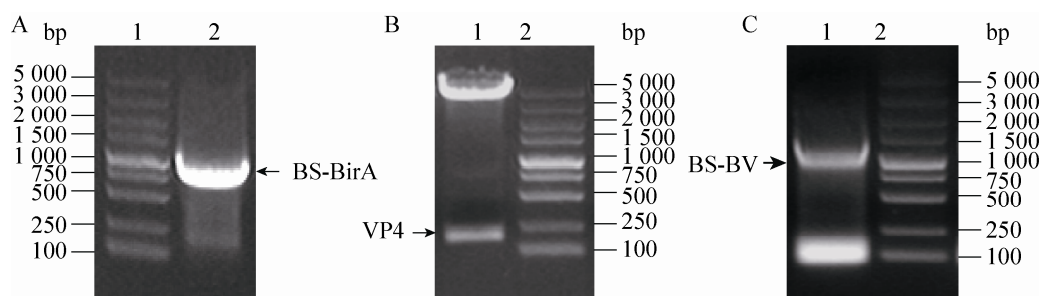


图 2 BS-BV 融合基因的获得

Fig. 2 Procedure to obtain BS-BV fuse-gene. (A) PCR amplification of BS-BirA. 1: DNA marker; 2: PCR product of BS-BirA. (B) Enzyme digestion to obtain VP4 fragment. 1: digestion of pc-Hy-GVP4; 2: DNA marker. (C) Overlapping PCR to obtain BS-BV fuse-gene. 1: PCR product of BS-BV; 2: DNA marker.

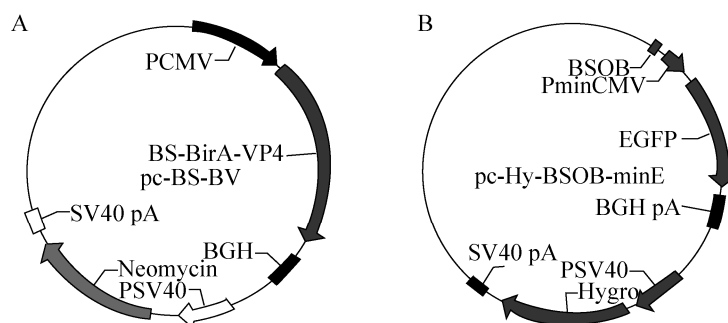


图 3 BS-Biotin-On 系统质粒示意图

Fig. 3 Diagrams of plasmids comprised of BS-Biotin-On systems. (A) Regulatory vector. (B) Response vector.

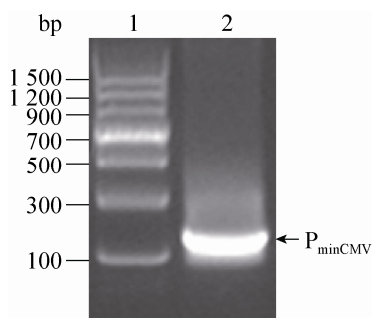


图4 PCR 扩增最小 CMV 启动子

Fig. 4 PCR amplification of minimal CMV promoter. 1: DNA marker; 2: PCR product of  $P_{\min CMV}$ .

通过全合成获得 4 个串联重复的 BSOB 序列, 连入 pc-Hy-minE 载体的  $P_{\min CMV}$  启动子上游 (图 5A), 得到含 4 个拷贝 BSOB 的 BS-Biotin-On 响应载体 pc-Hy-4BSOB-minE; 该载体再分别经 *Bgl* II 和 *Mfe* I 酶切后 (图 5B) 自连, 得到含 3 个和 2 个拷贝 BSOB 的 BS-Biotin-On 响应载体 pc-Hy-3BSOB-minE 和 pc-Hy-2BSOB-minE。

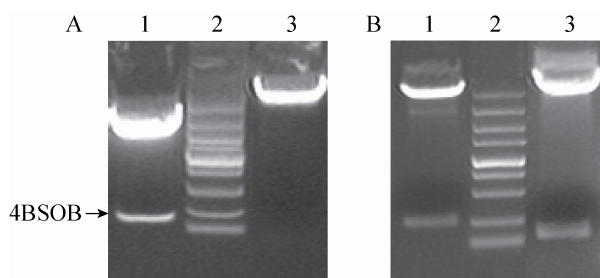


图5 含不同数目 BSOB 的响应载体的构建

Fig. 5 Construction of response vectors with different copies of BSOBs. (A) Construction of response vector with four BSOBs. 1: enzyme digestion to obtain 4BSOB fragment; 2: DNA marker DL5 000; 3: enzyme digestion of pc-minE vector. (B) Construction of response vectors with two and three copies of BSOBs. 1: enzyme digestion to remove two copies of BSOBs; 2: DNA marker DL5 000; 3: enzyme digestion to remove one copy of BSOB.

### 2.1.3 EC-Biotin-On 系统的构建

大肠杆菌生物素连接酶 (EC-BirA) 基因全长 966 bp, 克隆自大肠杆菌 DH5 $\alpha$  基因组 (图 6)。EC-BirA 与 VP4 片段一起, 连入 *Nhe* I /*Not* I 酶切的 pcDNA3.1(+) 载体, 得到融合基因 EC-BV 的表达载体 pc-EC-BV, 为 EC-Biotin-On 系统的调控载体。EC-Biotin-On 系统的响应载体与 BS-Biotin-On 系统类似, 为了便于比较, 本研究构建了含 3 个拷贝 ECOB 的响应载体, 3ECOB 片段由全合成获得, 连入 pc-Hy-minE 载体的  $P_{\min CMV}$  上游, 得到的载体命名为 pc-Hy-3ECOB-minE。

## 2.2 BS-Biotin-On 系统的考察和评价

### 2.2.1 BS-Biotin-On 系统与 EC-Biotin-On 系统效果的比较

将 pc-BS-BV/pc-Hy-3BSOB-minE 和 pc-EC-BV/pc-Hy-3ECOB-minE 分别共转染 HEK293 细胞, 经抗生素筛选获得稳定转染的细胞混合克隆, 分别称为 HEK-3BSE 和 HEK-3ECE。将这两种细胞分别接种 24 孔细胞培养板, 待细胞贴壁后, 更换为无生物素和含 200  $\mu\text{mol/L}$  生物素

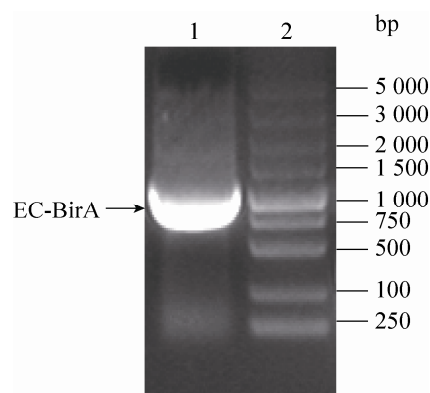


图6 PCR 扩增 EC-BirA 基因

Fig. 6 PCR amplification of EC-BirA gene. 1: PCR product of EC-BirA; 2: DNA marker.

两种培养基继续培养 3 d, 借助流式细胞仪检测 EGFP 荧光强度情况 (图 7)。结果表明, 含 3 个拷贝 BSOB 的 BS-Biotin-On 系统的诱导率 (诱导后目的基因表达与本底表达的比率) 为 3.8, 显著高于含 3 个拷贝 ECOB 的 EC-Biotin-On 系统 (诱导率为 2.8)。

### 2.2.2 操纵子数目对 BS-Biotin-On 系统效果的影响

将 pc-BS-BV 和含 1-4 个拷贝 BSOB 的 EGFP 诱导表达载体 pc-Hy-(1-4)BSOB-minE 分别共转染 HEK293 细胞, 经筛选得到混合细胞克隆。以组成型表达 EGFP 的载体 pc-Hy-E 和 pc-Hy-BSOB-minE 载体单转染的细胞分别作为阳性对照和阴性对照, 考察无生物素和 200  $\mu\text{mol/L}$  生物素两种培养条件下培养 3 d 后 EGFP 的相对荧光强度 (图 8)。结果表明, 含 1-4 个拷贝 BSOB 的 BS-Biotin-On 系统的诱导率逐渐升高, 依次为 1.5、2.1、4.1 和 6.2; 同时, 随着 BSOB 拷贝数的增加, 无生物素时的 EGFP 背景表达略有升高, 相对荧光强度由 93.69 升高至 128.95, 但均与 pc-Hy-BSOB-minE 单转染情况下的 EGFP 表达无明显差别。含 4 个拷贝 BSOB 的响应载体经诱导后的 EGFP 相对荧光强度与野生型 CMV 启动子驱动的 EGFP (pc-Hy-E) 表达强度接近。另外, pc-Hy-E 转染的细胞在不同的生物素浓度条件下的 EGFP 相对荧光强度接近, 表明生物素存在与否对 EGFP 的表达水平无显著影响。

从背景表达和诱导强度两方面综合考虑, 在目前考察的 BSOB 拷贝数中, 认为含 4 个拷贝 BSOB 的响应载体效果最好。

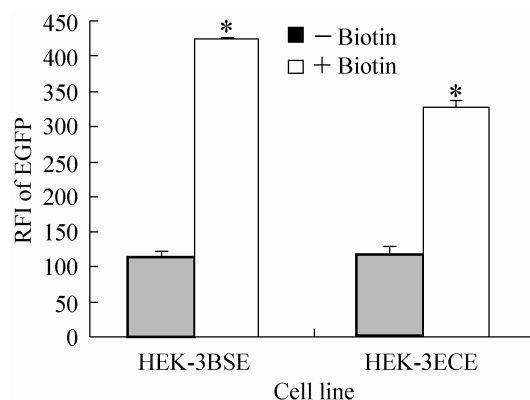


图 7 BS-Biotin-On 系统和 EC-Biotin-On 系统诱导率的比较

Fig. 7 Comparison of induction ratio between BS-Biotin-On and EC-Biotin-On systems. \*statistically different with the control.

### 2.2.3 BS-Biotin-On 系统的诱导动力学

选取调控质粒和含 4 个拷贝 BSOB 的 EGFP 诱导表达载体共转染的 HEK293 细胞 (称为 HEK-4BSE) 为研究对象, 进一步考察在不同浓度的生物素存在下 BS-Biotin-On 系统的响应情况, 以及 EGFP 荧光强度随诱导剂存在时间的变化情况。将 HEK-4BSE 培养于含不同浓度生物素的培养体系中, 3 d 后检测 EGFP 荧光强度 (图 9A) 结果显示, 随着生物素浓度的增加, EGFP 表达显著升高, 在生物素浓度为 10-100  $\mu\text{mol/L}$  时达到最高, 当生物素浓度高于 500  $\mu\text{mol/L}$  后, 进一步增加生物素浓度, EGFP 表达略有降低。在 200  $\mu\text{mol/L}$  生物素存在时, HEK-4BSE 细胞 EGFP 诱导表达随时间变化的动力学曲线 (图 9B) 显示, 诱导后 EGFP 表达水平迅速升高, 至 48-72 h 达到最高并趋于稳定。Western blotting 检测诱导后不同时间 EGFP 蛋白表达情况显示了类似的结果 (图 9C)。

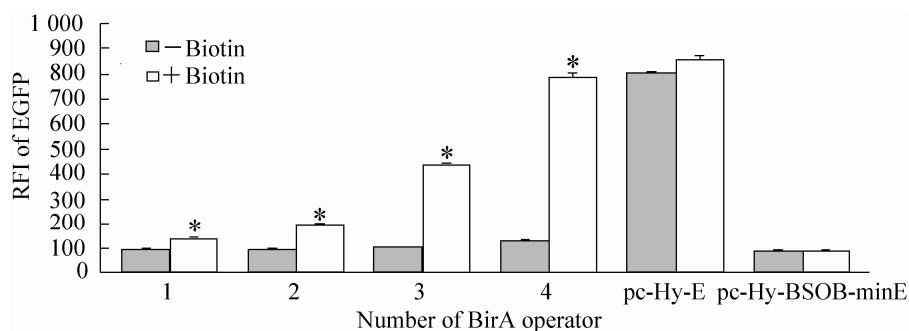


图 8 不同操纵子数目对 BS-Biotin-On 系统效果的影响

Fig. 8 Effect of operator number on the efficiency of BS-Biotin-On systems.

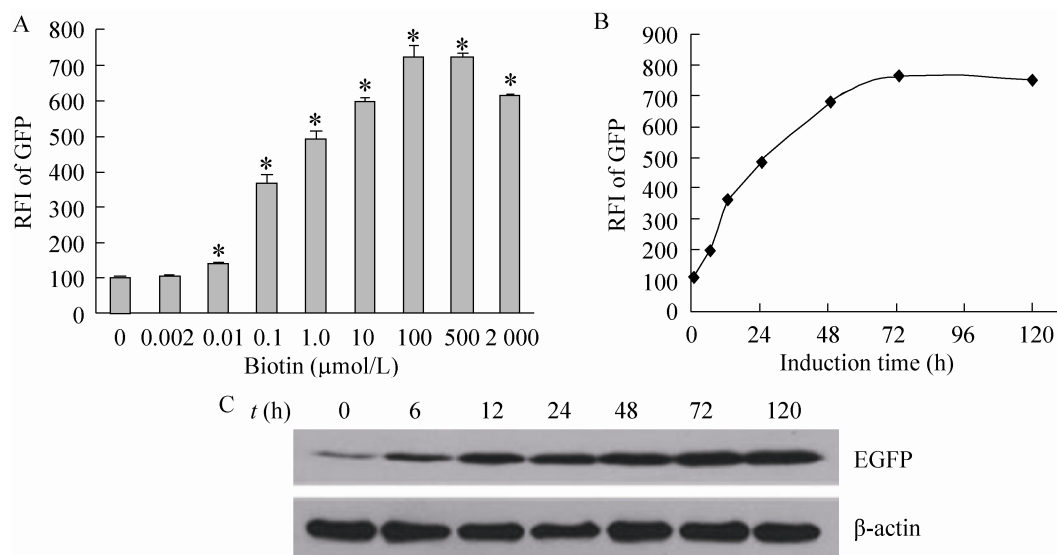


图 9 BS-Biotin-On 系统的诱导动力学

Fig. 9 Inductive kinetics of BS-Biotin-On system. (A) Response of BS-Biotin-On system to different concentrations of biotin. (B) Time course of induced EGFP intensity. (C) EGFP expression at different time points identified by Western blotting.

### 3 讨论

大肠杆菌生物素连接酶 BirA 是发现最早、研究得最清楚的生物素连接酶，含 321 Aas，分子量 33.5 kDa<sup>[12]</sup>。EC-BirA 能够结合位于生物素合成操纵元启动子上游的特异操纵子序列，抑制生物素合成操纵元的转录<sup>[13-14]</sup>。突变实验表明，EC-BirA 的 DNA 结合结构域位于 N-末端，而酶活性和生物素结合位点位于中间结构域，

BirA 以两个单体的形式结合于一个 40 bp 不完全对称的回文序列上<sup>[15]</sup>。另一个研究得较多的生物素连接酶来自革兰氏阳性细菌枯草芽胞杆菌，BS-BirA 含 325 Aas，分子量为 36.2 kDa。该蛋白具有与 EC-BirA 类似的双功能特性，是枯草芽胞杆菌生物素操作元的抑制因子，并且具有生物素连接酶活性，能够补偿大肠杆菌的条件致死 birA 突变<sup>[16]</sup>。但是，BS-BirA 的氨基酸序列与 EC-BirA 仅有 27% 的同源性，在与该



蛋白的转录抑制因子功能有关的 3 个关键位点中, DNA 结合结构域与 EC-BirA 同源性较低, 这与二者相应的操纵子序列不同有关; 生物素结合位点二者一致; ATP 结合位点有所不同 (BS-BirA 中为 GRGRMS, EC-BirA 中为 GRGRRG)<sup>[17]</sup>。以上差异可能会造成 BS-BirA 与 EC-BirA 在操纵子序列结合的特异性及对生物素响应的灵敏性等方面的不同。

在上述理论的基础上, 本研究以 BS-BirA 与单纯疱疹病毒转录激活结构域核心序列的 4 个串联重复的融合蛋白 (BS-BirA-VP4) 为转录激活因子, 建立了一种响应于生物素的诱导表达系统——BS-Biotin-On, 并比较了其文献报道的基于 EC-BirA 的生物素诱导表达系统在目的基因诱导率方面的差异, 结果表明, 同样在 3 个拷贝操纵子存在下, BS-Biotin-On 系统的诱导率 (3.8) 显著高于 EC-Biotin-On 系统 (2.8), 且二者 EGFP 本底表达强度接近。本研究进一步考察了 BS-Biotin-On 系统中操纵子数目对诱导效果的影响, 在考察的 1–4 个 BSOB 数目范围内, 随着操纵子数目的增加, 诱导率显著增加, 同时, EGFP 背景表达强度也有所升高, 但均与单转染 pc-Hy-BSOB-minE 的阴性对照无显著差别。对含 4 个 BSOB 的 BS-Biotin-On 系统的进一步研究表明, 该系统对生物素响应灵敏, 诱导后 6 h EGFP 表达即升高 1 倍, 至 48–72 h 达到最高, 并且在较低的生物素浓度下 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 即可达到较高的诱导率。

与其他类似的研究不同的是, 本研究采用 EGFP, 而不是通常使用的 SEAP 作为考察诱导表达效果的报告基因, 其优势在于: 1) 可以通过流式细胞仪来检测其表达强度, 操作方便快捷, 结果可靠, 而 SEAP 的表达水平则需较繁

琐的 ELISA 方法来测定; 2) 可通过流式细胞分选技术从混合细胞克隆中挑选不同诱导强度的单细胞, 节省时间和精力, 极大地提高建立细胞系的效率<sup>[18-19]</sup>。对于 EGFP 荧光强度与其蛋白表达水平的关系, 目前还没有定量的报道, 但从 Hicham 等<sup>[20]</sup>的报道来看, 二者应不是简单的正比关系, 本研究中流式细胞仪检测的荧光强度与 Western blotting 获得的 EGFP 蛋白水平的对应关系也显示了类似的结果, 故本研究得到的诱导率与以 SEAP 为报告基因的系统的对比还需进一步实验的验证。

对于最适合生物制药应用的外源基因表达调控系统目前有公认的标准<sup>[21-22]</sup>: 1) 抑制条件下产物基因的泄漏表达不应影响培养过程; 2) 在充分诱导条件下的最高表达水平可与标准组成型启动子的情况相比; 3) 简洁的基因设计, 便于改造和筛选生产细胞系; 4) 诱导剂分子应是生理上惰性的, 是获批的生产培养基的成分或宿主细胞代谢的组成部分; 5) 系统对诱导剂分子的响应足够迅速。我们的实验结果证明, 本研究建立的 BS-Biotin-On 系统能够符合上述标准, 可以初步用于工程细胞系的增殖控制等需要对基因表达进行调控的工艺。

## 4 小结

本研究建立了一种基于枯草芽胞杆菌生物素连接酶、响应于生物素的外源基因表达调控系统, 该系统设计简洁、应用方便、背景表达较低、诱导率较高、响应迅速, 使用的诱导剂生物素为用于生物制药的生产用培养基的组分之一, 绝对无毒, 价格低廉, 并且对细胞生长和产物表达无明显影响, 基于以上优点, 该系统在基础研究、生物制药、基因治疗和组织工

程等领域具有潜在的应用价值。

## REFERENCES

- [1] Malleret G, Haditsch U, Genoux D, et al. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell*, 2001, 104(5): 675–686.
- [2] Deans TL, Cantor CR, Collins JJ. A tunable genetic switch based on RNAi and repressor proteins for regulating gene expression in mammalian cells. *Cell*, 2007, 130(2): 363–372.
- [3] Weber W, Fussenegger M. Inducible product gene expression technology tailored to bioprocess engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(5): 399–410.
- [4] Horner M, Weber W. Molecular switches in animal cells. *FEBS Lett*, 2012, 586(15): 2084–2096.
- [5] Weber W, Fux C, Daoud-El Baba M, et al. Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(9): 901–907.
- [6] Aarestrup FM. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2005, 96(4): 271–281.
- [7] Hartenbach S, Daoud-El Baba M, Weber W, et al. An engineered L-arginine sensor of *Chlamydia pneumoniae* enables arginine-adjustable transcription control in mammalian cells and mice. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(20): e136.
- [8] Weber W, Bacchus W, Gruber F, et al. A novel vector platform for vitamin H-inducible transgene expression in mammalian cells. *J Biotechnol*, 2007, 131(2): 150–158.
- [9] Polstein LR, Gerbach CA. Light-inducible spatiotemporal control of gene activation by customizable zinc finger transcription factors. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(40): 16480–16483.
- [10] Weber W, Stelling J, Rimann M, et al. A synthetic time-delay circuit in mammalian cells and mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(8): 2643–2648.
- [11] Weber W, Lienhart C, Daoud-El Baba M, et al. A biotin-triggered genetic switch in mammalian cells and mice. *Metab Eng*, 2009, 11(2): 117–124.
- [12] Barker DF, Campbell AM. Genetic and biochemical characterization of the *birA* gene and its product: evidence for a direct role of biotin holoenzyme synthetase in repression of the biotin operon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1981, 146(4): 469–492.
- [13] Chapman-Smith A, Mulhern TD, Whelan F, et al. The C-terminal domain of biotin protein ligase from *E. coli* is required for catalytic activity. *Protein Sci*, 2001, 10(12): 2608–2617.
- [14] Chakravartty V, Cronan JE. Altered regulation of *Escherichia coli* biotin biosynthesis in BirA superrepressor mutant strains. *J Bacteriol*, 2012, 194(5): 1113–1126.
- [15] Streit WR, Entcheva P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(1): 21–31.
- [16] Bower S, Perkins J, Yocum RR, et al. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis birA* gene encoding a repressor of the biotin operon. *J Bacteriol*, 1995, 177(9): 2572–2575.
- [17] Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS. Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in eubacteria and archaea. *Genome Res*, 2002, 12(10): 1507–1516.
- [18] Robert JS, Peter PG, Martin NM, et al. Accelerated cell line development using two-color fluorescence activated cell sorting to select highly expressing antibody-producing clones. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(3): 578–587.
- [19] Oberbek A, Matasci M, Hacker DL, et al. Generation of stable, high-producing CHO cell lines by lentiviral vector-mediated gene transfer in serum-free suspension culture. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(3): 600–610.
- [20] Hicham B, Reinhard F, Jurgen H. Improvement of reporter activity by IRES-mediated polycistronic reporter system. *Nucleic Acid Res*, 2008, 36(5): e28.
- [21] Weber W, Fussenegger M. Inducible product gene expression technology tailored to bioprocess engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(5): 399–410.
- [22] Auslander S, Fussenegger M. From gene switches to mammalian designer cells: present and future prospects. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(3): 155–168.

(本文责编 陈宏宇)