

·基础研究·

## tTS/rtTA 系统下调目的基因基础表达的细胞模型研究

张若霜<sup>1</sup>, 帅丽芳<sup>2</sup>, 赵 勇<sup>1</sup>, 陈系古<sup>1</sup>

(1. 中山大学实验动物中心, 广东 广州 510080; 2. 吉林大学生物化学教研室, 吉林 长春 130062)

**摘要:**【目的】构建带有肝脏特异性启动子和 tTS 沉默子的四环素调控系统, 观察其在人 HepG2 细胞内的表达, 建立严密型四环素调控系统的 HepG2 细胞模型。【方法】通过二次分子克隆构建重组真核表达质粒载体 pliv7- rtTA- tTS- Neo, 用脂质体法将质粒 pliv7- rtTA- tTS- Neo 及 pliv7- rtTA- Neo 转染人 HepG2 细胞, 经 G418 筛选后的克隆用有限稀释法进行单克隆化, 克隆扩增后瞬时转染 pTRE- Luc 质粒, 强力霉素 (1 mg/L) 诱导表达后检测荧光素酶活性, 挑选出低背景和高诱导表达的 HepG2 细胞克隆。【结果】带有 tTS 的细胞株其诱导倍数明显高于不带有 tTS 的细胞株 (192 : 21), 其中克隆 9 的诱导倍数最高 (256), 获得 1 株高表达、低背景的 HepG2/pLiv7- rtTA- tTS- Neo 细胞株。【结论】荧光素酶活性检测结果验证了 tTS 对四环素调控系统的内在泄露问题有一定的抑制作用, 使四环素调控系统的开关具有真正意义上的严密性。

关键词: 四环素调控系统; tTS 沉默子; 诱导表达; HepG2 细胞

中图分类号: Q782

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2006)04- 0361- 04

## Reducing Background Expression of Target Gene with tTS/rtTA System in Cell Model

ZHANG Ruo- shuang<sup>1</sup>, SHUAI Li- fang<sup>2</sup>, ZHAO Yong<sup>1</sup>, CHEN Xi- gu<sup>1</sup>

(1. Center of Experimental Animal, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510080; 2. Department of Biochemistry, Jilin University, Changchun, 130062, China)

**Abstract:**【Objective】To construct a tetracycline- controlled expression system with liver- specific promoter and tTS silencer and investigate its expression in the human HepG2 cells; to establish a cell model with tight tetracycline- controlled expression system.【Methods】Recombined eukaryotic plasmic vector, pliv7- rtTA- tTS- Neo, was constructed by subcloning and transfected into HepG2 cells. 14 days following transfection, G418- resistant clones were attained, monocloned and transiently transfected with pTRE- Luc by using lipofectamine. Luciferase reporter assay of HepG2/pLiv7- rtTA- tTS- Neo and HepG2/pLiv7- rtTA- Neo were detected in the presence of doxycycline (1 mg/L) to select one clone with low background and high induction.【Results】The HepG2 cell line with tTS was more inducible than that without tTS (192 : 21). Clone 9, which exhibited high level of induction and high gene expression level, was obtained.【Conclusion】The result of luciferase reporter assay confirms that tTS can restrain the leaky in the tetracycline- controlled expression system. This expression system made the on- off of tetracycline- controlled expression system more efficient.

Key words: tetracycline- controlled expression system; tetracycline- controlled transcriptional silencer (tTS); inducible expression; HepG2 cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):361- 364]

四环素调控系统尤其是 Tet- on 系统中的泄露问题引起人们越来越多的关注。泄露原因可能是启动子活性太强造成基因泄露表达, 或是细胞中存在一些内源性转录激活剂, 诱导了基因的表达, 或由

于目的基因整合到转录活跃的染色体位点, 从而导致了基因的表达。为了解决四环素调控系统中的泄露问题, 工作者们进行了大量的研究。目前能够减弱或者消除目的基因泄露表达的各种严密型四环

收稿日期: 2006-04-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (103055)

作者简介: 张若霜 (1976- ), 女, 山东烟台人, 硕士; 陈系古, 教授, 博士生导师. E- mail: xiguchen@163.com

素调控系统已经得到广泛的研究和应用,而且取得了可喜的前景。本实验室采用的是在原来的 Tet-on 基因表达系统上添加四环素转录沉默子(tetracycline controlled transcriptional silencer, tTS), 重组成 rtTA/tTS 系统。rtTA/tTS 系统在无强力霉素(doxycycline, Dox)时,背景表达极低;在加入 Dox 调控下,活性比同条件下的 rtTA 系统表达活性高出数倍,使目的基因的调控在体内和体外都表现得更加严密,克服了诱导哺乳动物基因表达的内在缺陷<sup>[1-3]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、细胞株及主要试剂

质粒 pLiv7-rtTA, pMD18-T (Ap<sup>R</sup>), pLXSN, pTRE-Luc, 宿主菌 E.coli JM-109 由中山大学实验动物中心分子实验室提供。质粒 pTet-tTS 购自 CLONTECH 公司。限制性内切酶 Hpa<sup>I</sup>、Xho<sup>I</sup>、Spe<sup>I</sup>、Xba<sup>I</sup> (Takara 公司), 质粒 DNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司), G418、脂质体(Lipofectamine) (Gibco/BRL 公司), 强力霉素(doxycycline, Dox) (Sigma 公司), 荧光素酶报告基因分析试剂盒(Promega 公司), 总 RNA 提取试剂盒(V-gene 公司), RT-PCR Kit(Promega, USA)。

### 1.2 带有 Neo 抗性筛选基因的 pLiv7-rtTA-Neo 的构建

用上游引物 N1: 5' TAT AAC TAG TCT CGA GGA TCC GGC TGT3 (带有 Spe<sup>I</sup> 酶切位点), 下游引物 N2: 5' CCG TCT AGA TCA GAA GAA CTC GTC AAG 3 (带有 Xba<sup>I</sup> 酶切位点), 以质粒 pLXSN 为模板进行 Neo 片段的 PCR, 96 预变性 4 min, 进行下述循环: 94 30 s, 58 30 s, 72 45 s, 30 个循环, 再 72 延伸 10 min。扩增产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。切下 1 206 bp 条带, 回收、纯化。A-T 克隆法将所得到的 Neo 基因片段插入 pMD18-T 载体, 酶切初步鉴定成功后送大连宝泰克公司测序, 引物序列同上。将测序正确的克隆质粒 DNA 和质粒载体 pLiv7-rtTA 以 Spe<sup>I</sup> 和 Xba<sup>I</sup> 双酶切后按质量比 1:4 连接、转化, 获取阳性克隆菌进行双酶切、PCR 鉴定。正确重组质粒命名为 pLiv7-rtTA-Neo。

### 1.3 载体 pLiv7-rtTA-tTS-Neo 的构建

用上游引物 P1: 5' CCA GTT AAC ATG TCT

AGA TTA AA3 (含 Hpa<sup>I</sup> 酶切位点和起始密码), 下游引物 P2: 5' TA CTC GAG TTA CCA GGG ATC CTC T3' (含 Xho<sup>I</sup> 酶切位点和终止密码), 以质粒 pTet-tTS 为模板进行 tTS 片段的 PCR, 条件同上, 将获取 849 bp 的目的片段插入 pMD18-T 载体后测序。将测序正确的克隆质粒 DNA 和质粒载体 pLiv7-rtTA-Neo 以 Hpa<sup>I</sup> 和 Xho<sup>I</sup> 双酶切后按质量比 1:6 连接、转化, 获取阳性克隆菌进行双酶切、PCR 鉴定。正确重组质粒命名为 pLiv7-rtTA-tTS-Neo。

### 1.4 质粒 pLiv7-rtTA-tTS-Neo 及 pLiv7-rtTA-Neo 转染 HepG2 细胞

用含 100 mL/L FBS 的 DMEM 培养基 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 HepG2 细胞株, 2 d 传代 1 次。转染前 24 h, 将细胞转于 6 孔板中, 1 × 10<sup>5</sup> /孔。待细胞长至 70%~80% 融合时, 更换无血清、无抗生素的 DMEM 培养基, 将已构建的 pLiv7-rtTA-tTS-Neo 及 pLiv7-rtTA-Neo 真核表达质粒以脂质体法转染细胞, 具体操作按说明书进行。转染 5 h 后, 弃去转染液, 完全培养基继续培养 24~48 h。48 h 后用含 800 mg/L 的 G418 全培养基筛选阳性细胞, 2 d 换液 1 次。当空白对照组(未转染质粒的细胞)大量死亡时, G418 浓度降至 400 mg/L, 继续筛选, 直至克隆出现。1 周后维持在含 200 mg/L 的 G418 培养液里培养。

### 1.5 HepG2/pLiv7-rtTA-tTS-Neo 细胞及 HepG2/pLiv7-rtTA-Neo 细胞的鉴定

用提取试剂盒分别提取 HepG2/pLiv7-rtTA-tTS-Neo 细胞及 HepG2/pLiv7-rtTA-Neo 细胞的基因组 DNA 和 mRNA, 进行 PCR 和 RT-PCR 鉴定, 具体操作详见提取试剂盒操作手册, 引物同上。

### 1.6 质粒 pTRE-Luc 转染 HepG2/pLiv7-rtTA-tTS-Neo 细胞及 HepG2/pLiv7-rtTA-Neo 细胞

用有限稀释法将稳定转染 pLiv7-rtTA-tTS-Neo 及 pLiv7-rtTA-Neo 的 HepG2 克隆单克隆化。用 2.5 g/L 胰酶消化 HepG2/pLiv7-rtTA-tTS-Neo 细胞克隆, 制成 30 个/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔接种 0.1 L 细胞悬液。2 周后挑选生长状态良好的单克隆(克隆编号 1-30), 从 96 孔板逐步扩增到 6 孔板, 细胞融合达 90% 时, 将每孔消化后平均接种到 2 个直径 35 mm 的培养皿(A、B)。A 皿细胞保种; 用脂质体法将质粒 pTRE-Luc 转染 B 皿细胞。48 h 后将 B 皿的细胞平均接种在 B1、B2

2个培养皿, B1 细胞培养在含有 1 mg/L Dox 的全培养基中, B2 细胞不加 Dox 作对照, 48 h 后检测荧光素酶活性。对 HepG2/pLiv7- rtTA- Neo 细胞克隆进行同样的操作, 亦挑选 30 个单克隆 (克隆编号 31- 60)。

### 1.7 荧光素酶活性检测

用 200  $\mu$ L 细胞裂解液充分裂解细胞, 室温放置 30 min。取 20  $\mu$ L 细胞裂解产物与 100  $\mu$ L 荧光素酶反应底物混合, 光度计检测荧光素酶活性。诱导倍数按下述公式计算: 诱导倍数 = + Dox RLU / - Dox RLU, 经对比得到高表达、低背景的 HepG2/pLiv7- rtTA- tTS- Neo 细胞株。

### 1.8 统计学分析

应用 SPSS10.0 统计软件对数据进行成组 t 检验, 设定  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 质粒 pLiv7- rtTA- Neo 的构建

PCR 检测及 Spe 和 Xba 双酶切鉴定显示 Neo (1 206 bp) 片段已克隆入载体 pLiv7- rtTA (图 1)。

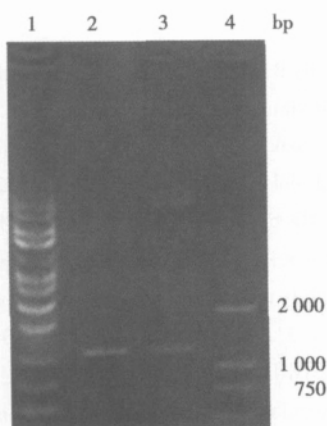


图 1 质粒 pLiv7- rtTA- Neo 的构建

Fig. 1 Establishment of the vector pLiv7- rtTA- Neo

1: 1 kb DNA ladder marker (100 ~10 000 bp); 2: PCR amplification of Neo; 3: double enzyme digestion of vector pLiv7- rtTA- Neo; 4: DL 2000 marker (100 ~2 000 bp)

### 2.2 质粒 pLiv7- rtTA- tTS- Neo 的构建

经 PCR 检测及 Hpa /Xho 双酶切鉴定显示 tTS (849 bp) 片段已克隆入载体 pLiv7- rtTA - Neo (图 2)。

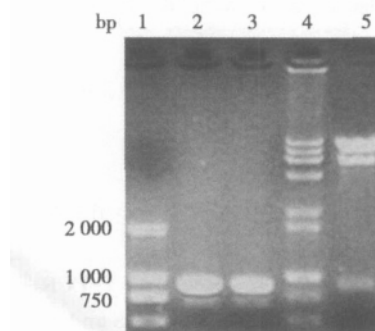


图 2 质粒 pLiv7- rtTA- tTS- Neo 的构建

Fig. 2 Establishment of the vector pLiv7- rtTA- tTS- Neo

1: DL2 000 Marker (100 ~2 000 bp); 2,3: PCR amplification of tTS; 4: 1 kb DNA Ladder Marker (100 ~10 000 bp); 5: double enzyme digestion of vector pLiv7- rtTA- tTS- Neo

### 2.3 HepG2/pLiv7- rtTA - tTS - Neo 细胞及 HepG2/pLiv7- rtTA- Neo 细胞的鉴定

经鉴定 pLiv7- rtTA- tTS- Neo 及 pLiv7- rtTA- Neo 已稳定转染 HepG2 细胞 (图 3, 4, 5)

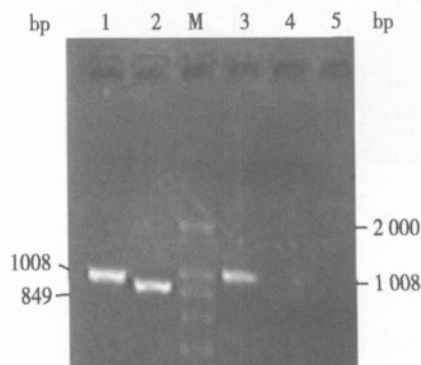


图 3 tTS 和 rtTA 基因的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of tTS and rtTA of transfected cells by PCR

1: PCR amplification of rtTA in HepG2/pApoE- rtTA- tTS- Neo cells; 2: PCR amplification of tTS in HepG2/pApoE- rtTA- tTS- Neo cells; M: DL 2 000 marker (100 ~2 000 bp); 3: PCR amplification of rtTA in HepG2/pApoE- rtTA - Neo cells; 4: PCR amplification of tTS in HepG2/pApoE- rtTA - Neo cells; 5: negative control

### 2.4 HepG2/pLiv7- rtTA - tTS - Neo 细胞株和 HepG2/pLiv7- rtTA- Neo 细胞株荧光素酶活性检测

应用强力霉素活性检测系统 (Promega 公司, Cat.No.E1500) 检测 HepG2/pLiv7- rtTA- tTS- Neo 细胞株荧光素酶活性, 诱导倍数最高值 256 (9 号克隆), 最低值 128, 平均值为 192 ( $s=42$ ); HepG2/pLiv7- rtTA- Neo 细胞株荧光素酶活性, 诱导倍数最高值 32, 最低值 15, 平均值为 21 ( $s=7$ ),  $t=12.14$ ,  $P < 0.001$ 。

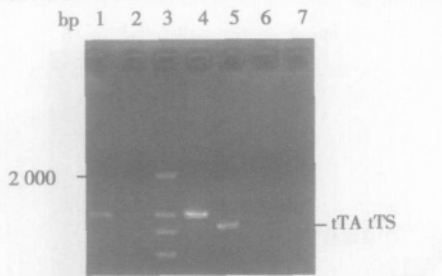


图 4 tTS 和 rtTA 的 mRNA 的 RT-PCR 鉴定

Fig.4 Identification of the mRNA of tTS and rtTA by RT-PCR

1: RT-PCR amplification of rtTA in HepG2/pApoE-rtTA-Neo cells; 2: RT-PCR amplification of tTS in HepG2/pApoE-rtTA-Neo cells; 3: DL 2000 marker (100~2000 bp); 4: RT-PCR amplification of rtTA in HepG2/pApoE-rtTA-tTS-Neo cells; 5: RT-PCR amplification of tTS in HepG2/pApoE-rtTA-tTS-Neo cells; 6,7: RT-PCR amplification of rtTA/tTS in HepG2 cells

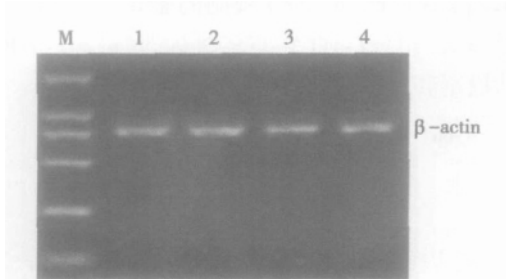


图 5  $\beta$ -actin 作为对照

Fig.5  $\beta$ -actin as internal control

本实验共挑选 60 个单克隆, 瞬时转染 pTRE-Luc, 通过荧光素酶活性检测筛选出高表达、低背景的细胞克隆, 荧光素酶活性检测结果显示带有 tTS 的细胞株其诱导倍数明显高于不带有 tTS 的细胞株 (192:21), 其中克隆 1、9、28 当培养基中加入 Dox 时荧光素酶活性高, 培养基中不加 Dox 时荧光素酶活性低, 尤以 9 号克隆最明显, 因此挑选克隆 9 号作为高表达、低背景的 HepG2/pLiv7-rtTA-tTS-Neo 细胞株, 用于以后试验。

### 3 讨论

为了解决四环素调控系统中的泄漏问题, 构建了四环素控制的转录沉默子 tTS<sup>[4]</sup>, 可以抑制对四环素调控的反式激活因子 rtTA 响应的启动子活性。这些四环素控制的转录沉默子 tTS 是一些嵌合蛋白, 由经过修饰的 Tet 抑制子 (tet repressor protein, tetR) 融合哺乳动物 kox-1 或 kid-1 等蛋

白的抑制子结构域构成。RtTA 与强力霉素的亲和力比它与 tTS 的亲和力低大约 100 倍, 低浓度的强力霉素可以允许 tTS 结合到操纵基因 (tet operator, TetO) 序列, 但不允许 rtTA 结合。相反, 高浓度的强力霉素可以允许 rtTA 结合到 TetO 序列, 但不允许 tTS 结合。因此当 tTS 存在时, 它不仅能够有效地阻断基因泄露表达, 而且对四环素的诱导效力没有抑制作用<sup>[1]</sup>, 可以成功地应用在细胞培养和转基因动物上, 使四环素调控系统的开关具有真正意义上的严密性。

本实验室成功构建了构建带有肝脏特异性启动子和 tTS 沉默子的四环素调控系统, 并且成功构建了一株受 Dox 调控的高表达低背景的 HepG2 细胞株。经过对比, 进一步验证了 tTS 对四环素调控系统的内在泄露问题有一定的抑制作用, 使四环素调控系统可以对基因表达进行时间和水平上的有效调控, 使该系统不仅能用于培养细胞的基因表达的研究, 还可以用于转基因动物, 作为基因功能及基因调控的主要工具。另外本调控系统带有肝脏特异性启动子, 能使外源基因在肝脏定点表达, 对某些肝脏疾病的发病机理以及药物治疗的研究有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] ZHU Z, MA B, HOMER R J, et al. Use of the tetracycline controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible over-expression transgenic mice [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 25222-25229.
- [2] RUBINCHIK S, WORARATANADHARM J, YU H, et al. New complex Ad vectors incorporating both rtTA and tTS deliver tightly regulated transgene expression both in vitro and in vivo [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(6): 504-511.
- [3] MIZUGUCHI H, XU Z L, SAKURAI F, et al. Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions [J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(13): 1265-1277.
- [4] FORSTER K, HELBL V, LEDERER T, et al. Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(2): 708-710.

(编辑 王晓鹰)