

缩短 5'-UTR 序列可以提高 hGH 基因在昆虫细胞中的表达

耿朝晖 刘 莹 郜 鹏 赵东明 李 澍 俞新大* 张宝珠

(南开大学生物化学与分子生物学系 天津 300071)

关键词 hGH 基因, PCR, 5'-UTR, Bac-to-Bac, 表达效率

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0505-04

人生长激素是一种由大脑基部垂体前叶分泌合成的多肽类激素,其分子量为 21.5kD,由 191 个氨基酸组成。生长激素的功能非常广泛,它能刺激骨和软骨的生长,器官的发育,它还具有维持人体正常代谢,如促进 DNA、RNA 和蛋白质合成,分解脂肪,提高血糖水平,增加基础代谢,改善免疫功能和保护健康组织等功能^[1]。

Bac-to-Bac 系统是最新发展的昆虫细胞-杆状病毒表达系统之一^[2],是利用转移载体 pFastBac1 转化含有杆状病毒穿梭载体 Bacmid 的大肠杆菌 DH10Bac,外源基因通过位点特异性转座作用整合到 Bacmid 中。Bacmid 含有完整的昆虫多角体杆状病毒 AcMNPV 基因组,既能在大肠杆菌中低拷贝复制和稳定分离,又可以直接转染昆虫细胞,得到病毒粒子,经过筛选重组 Bacmid,直接转染昆虫细胞,得到纯的重组病毒,同时高效表达外源基因。该系统具有快速稳定高效等特点,我们采用该系统成功表达了 hGH 基因^[3]。影响昆虫细胞系统中外源基因表达水平的因素有很多,细胞培养条件,载体优化,病毒感染,感染时间等都会影响外源基因的表达^[4-6],而插入的外源基因 cDNA 本身结构对其在该系统中表达影响的研究报道很少,本文利用 Bac-to-Bac 系统操作简便快速的特点,通过 PCR 诱变方法,去除 hGH cDNA 中起始密码子 ATG 前 5'非转译区(5'-Untranslated Region, 5'-UTR)的部分序列,分析比较改造前后 hGH 基因在昆虫细胞中表达水平的变化,为优化 hGH 基因在昆虫细胞中的表达和探讨 5'-UTR 对 hGH 基因在昆虫细胞中表达的调控作用提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒,菌株与试剂:含有 hGH cDNA 的转移载体 pVL1393/hGH,转座质粒 pFastBac1,含有穿梭载体 Bacmid 的 *E. coli* 菌株 DH10Bac 均为本室保存。

1.1.2 病毒和细胞:野生型病毒 AcMNPV、无外源基因的重组病毒 rAcV-Bac、表达 hGH 基因的重组病毒 rAcV-Bac-hGH

和昆虫细胞 Sf9 均由本室保存,细胞培养:Grace's 培养基 + 10% FBS 27℃ 培养,3~4d 换液,传代。

1.1.3 PCR 上、下游引物由上海生工生物工程公司合成。

1.1.4 其它:昆虫细胞培养基 Grace's 及胎牛血清(FBS)均购自 Gibco 公司;所需核酸内切酶购自宝生物工程公司;T4 DNA 连接酶、Taq 酶购自上海生工生物工程公司;所用抗生素、切口平移试剂盒、DAB 显色液购自华美生物工程公司;兔抗人生长激素抗体、酶标二抗购自北京中山生物技术公司;其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 PCR 法去除 hGH cDNA 5'-UTR 的部分序列,利用 PCR 方法,对 hGH cDNA 起始密码子 ATG 前的部分序列作改造。设计上游引物为:5'-CTC GGATCC CTGCAATGGCTACAG-3',引入 BamH I 酶切位点(划线部分),下游引物为转移载体 pVL1393 上原有序列不变,5'-CAACAACGCACAGAATCTAGC-3',以 pVL1393/hGH 为模板,在 94℃,3min;94℃,1min;58℃,1min;72℃,2min,30cycles;72℃,10min 条件下扩增得到目的产物。

1.2.2 质粒构建,纯化,连接,转化及酶切分析方法均按分子克隆实验指南^[7]。

1.2.3 重组 Bacmid 的筛选,昆虫细胞转染及重组病毒制备均按前述方法^[3]。

1.2.4 Southern 杂交:以回收的 pBR322/hGH Hind III 酶切所得的 hGH cDNA 片段作模板,按切口平移试剂盒说明书制备和标记探针,Southern 杂交方法按分子克隆实验指南^[7]。

1.2.5 序列测定:重组转移载体中 hGH 基因 cDNA 序列交由博雅生物工程公司测定。

1.2.6 病毒滴度测定:按 End-point dilution 方法。^[8]

1.2.7 免疫斑点分析:将样品点在硝酸纤维素膜上;TBST (Tris 2.42g, NaCl 29.24g, Tween-20 2.5mL,加水定容至 1000mL)洗 3 次,1%BSA 封闭;TBST 洗 3 次,加入适量兔抗人生长激素抗体,室温反应 2h;TBST 洗 3 次,加入适量酶标二

抗,室温反应 2h, TBST 洗 3 次, DAB 显色。

1.2.8 hGH 定量检测及缩序前后 hGH 表达效率比较 hGH 检测由天津总医院特检中心协助完成,用免疫化学发光法定量检测表达上清中 hGH 表达水平。分别用重组病毒 rAcV-Bac-hGH 和 rAcV-Bac-Δ1hGH 以 MOI = 0.1 和 5 感染密度为 5×10^5 个/mL 的贴壁培养的 Sf9 细胞,感染后不同时间取样,测定 hGH 的表达水平。

2 结果

2.1 重组转移载体 pFastBac-Δ1hGH 的构建及酶切鉴定

以质粒 pVL1393/hGH 为模板,用含引入的 *Bam*H I 位点的诱变引物进行 PCR 扩增,产物回收,经 *Bam*H I + *Eco*R I 双酶切后与相同处理的 pFastBac1 连接,得到含缩序 hGHcDNA 的重组转移载体,并将其命名为 pFastBac-Δ1hGH。构建过程如图 1 所示。

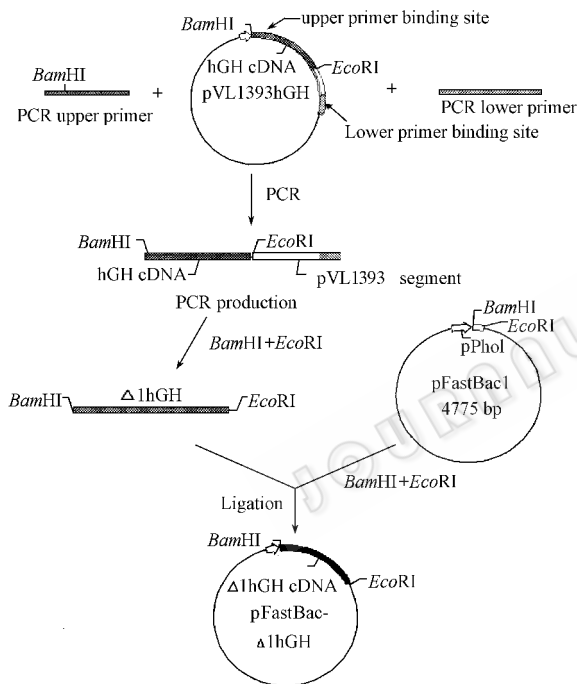


图 1 重组转移载体 pFastBac-Δ1hGH 的构建

Fig.1 Construction of recombinant transfer vector pFastBac-Δ1hGH

2.2 序列测定结果

原重组转移载体 pFastBac-hGH 中 hGH 基因 cDNA 插入序列为: 5'-GGATCC TGTGGACAGCTCACCTAGCTGCA ATG---3'; 经 PCR 缩序改造克隆得到的重组转移载体 pFastBac-Δ1hGH 中 hGH 基因 cDNA 插入序列为: 5'-GGATCC CTGCAATG---3'; 二者 ATG 后序列完全相同,均保存了完整 hGH 编码序列。序列测定结果证明经 PCR 诱变后的 pFastBac-Δ1hGH 中 hGH 基因起始密码子 ATG 前序列缩短了 18bp。

2.3 重组 Bacmid 和重组病毒的制备

按前述方法将重组转移载体 pFastBac-Δ1hGH 转化进含有穿梭载体 Bacmid 的大肠杆菌 DH10Bac 中,获得重组 Bacmid,直接提取 DNA,转染培养的昆虫细胞 Sf9,得到重组病

毒,命名为 rAcV-Bac-Δ1hGH,经扩增后,病毒滴度达 10^8 PFU/mL,可用于扩增病毒和表达目的产物 hGH。

2.4 重组病毒的 Southern 杂交鉴定

为了证明 hGH 基因在杆状病毒基因组中的整合,用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对 rAcV-Bac-Δ1hGH 及 rAcVBac 进行消化,酶切电泳如图 2(A),rAcV-Bac-Δ1hGH 有一条约 800bp 的片段,包含 hGH 基因,而未插入 hGH cDNA 的重组病毒 rAcVBac 没有此大小的片段。同时作 Southern 杂交鉴定,结果如图 2(B)所示,重组病毒 rAcV-Bac-Δ1hGH 和转移载体 pFastBac-Δ1hGH 的 800bp 位置带均显示出杂交信号,而不含 hGH 基因的重组病毒 rAcVBac 不与探针杂交,无杂交信号,表明生长激素 hGH 基因稳定地整合进了重组病毒基因组中。

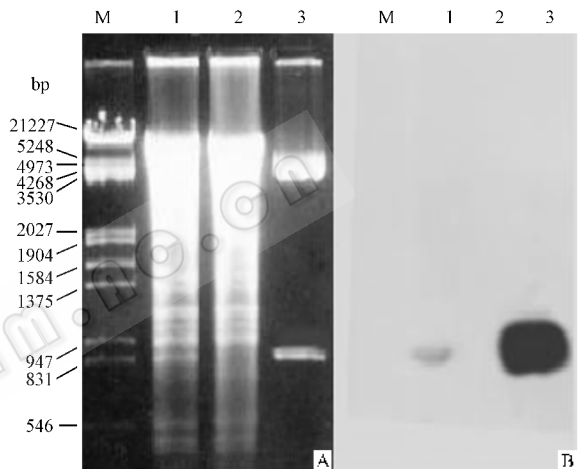


图 2 重组病毒酶切电泳图 (A) 及 Southern 杂交 (B)

Fig.2 Restriction assay of recombinant virus (A) and Southern Blot (B) M-Marker. λDNA/HindIII + *Eco*R I; 1-rAcV-Bac-Δ1hGH; 2-rAcV-Bac; 3-pFastBac-Δ1hGH

2.5 免疫斑点法检测缩序后 hGH 免疫活性

如图 3 所示,与 rAcV-Bac-hGH 相比,用缩序改造后的重组病毒 rAcV-Bac-Δ1hGH 感染昆虫细胞表达的 hGH 免疫活性没有改变。

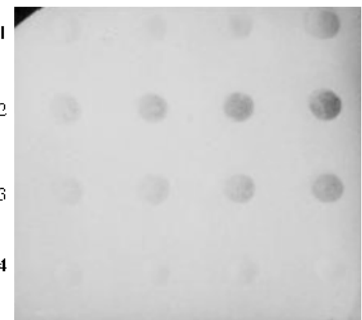


图 3 感染上清中 hGH 的免疫斑点分析

Fig.3 Immuno-blot assay of Sf9 culture supernatant

1. Positive hGH control (1 μg, 2 μg, 4 μg, 10 μg); 2. Supernatant of Sf9 cells infected by rAcV-Bac-hGH (100 μL, 200 μL, 400 μL, 800 μL); 3. Supernatant of Sf9 cells infected by rAcV-Bac-Δ1hGH (25 μL, 50 μL, 75 μL, 100 μL); 4. Supernatant of normal cultured Sf9 cells

2.6 两种重组病毒对 hGH 表达差异的比较

分别以 MOI 值 0.1 和 5 感染 5mL 贴壁培养的 Sf9 细胞, 比较缩序前后两种重组病毒感染细胞中 hGH 的表达量, 结果如图 4 所示, 当 MOI = 0.1 时, 感染 2、4、6d (图 4A), 重组病毒 rAcV-Bac- Δ hGH 感染 Sf9 细胞, 感染上清中 hGH 的表达量分别为 1.3、4.7、14.6 mg/L, 用 rAcV-Bac-hGH 感染, 培养上清中 hGH 的表达量分别为 0.4、1.6、3.4 mg/L; 当 MOI = 5 时 (图 4B), 感染 2、4、6、8d, rAcV-Bac- Δ hGH 感染 Sf9 细胞上清中 hGH 的表达量分别为 17.2、24.2、35.8、38.4 mg/L, rAcV-Bac-hGH 感染上清中 hGH 的表达量分别为 3.8、7.7、8.8、9.0 mg/L。

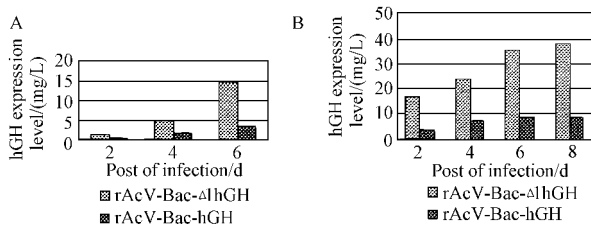


图 4 两种重组病毒感染 Sf9 细胞培养上清中 hGH 表达水平的比较 (A: MOI = 0.1; B: MOI = 5)

Fig. 4 Comparison of hGH expression levels in cultured Sf9 supernatant infected by different recombinant viruses (A: MOI = 0.1; B: MOI = 5)

a. 5'---GGATCC TGTGGAC—GCA ATG---3'

A—T

G---C

C---G

T---A

C T

C

b. 5'---GGATCC CTGCA ATG---3'

图 5 重组转移载体中 hGH cDNA 5'-UTR 序列比较

pFast-Bac-hGH (a), pFast-Bac- Δ hGH (b)

Fig. 5 Comparison of the sequences of hGH cDNA 5'-UTR in pFast-Bac-hGH (a) and pFast-Bac- Δ hGH (b)

3 讨论

昆虫细胞-杆状病毒表达系统是近年发展起来的高效真核表达系统, 其表达能力强, 安全性好, 操作方便, 在基因工程生产真核基因蛋白的研究与应用方面都有着巨大的潜力, 至今已有几百种蛋白在该系统中得到表达。但利用该系统表达外源基因时, 外源蛋白的表达水平与原杆状病毒中核多角体蛋白表达水平相差很多, 不同的外源基因之间的表达水平也存在较大差异, 表达水平从 1 ~ 600 mg/L 细胞培养物不等^[6]。除细胞种类、培养条件、感染复数等因素的影响外, 外源蛋白是否为融合蛋白以及外源基因本身的结构也可能直接影响其在该系统中的表达。有实验表明, 在杆状病毒表达载体系统中, 由多角体蛋白启动子驱动的外源基因稳态 mRNA 转录水平几乎与野生型病毒多角体转录水平相当^[9], 说明表达水平的差异有可能发生在转录后水平上。本文中

对 hGH 基因 cDNA 起始密码子 ATG 前的 5'-UTR 进行缩序改造, 利用 PCR 方法去除其中的部分序列, 在 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统中表达 hGH 基因, 结果缩短起始密码子 ATG 前 5'-UTR 序列后, 在得到的重组病毒滴度基本相同的情况下, hGH 基因的表达水平明显提高, 如图 4 所示, 说明缩序改造后的重组病毒的增殖能力没有改变, 而是克隆于多角体启动子下的 hGH 基因表达得到了提高。

在基因转录水平的调控中, 5'-UTR 的结构起着重要作用^[10-12], 其过长的序列, 高 GC 含量, 存在复杂二级结构如茎环结构等因素均会引起核糖体-mRNA 复合体形成的困难, 从而降低翻译效率。本文中原有重组转移载体 pFast-Bac-hGH, hGH 基因起始密码子 ATG 前 5'-UTR 中存在明显的茎环结构 (如图 5 所示), 经 PCR 诱变改造去除其中的部分序列并破坏茎环结构后, hGH 基因在昆虫细胞中的表达明显提高 (图 4), 其是否为 hGH 基因中存在的茎环结构对基因的翻译表达有阻抑作用, 以及转移载体 pFast-Bac1 中其多克隆位点与多角体启动子之间尚存在的约 90bp 长的序列, 是否同时影响 hGH 基因的表达效率正处于研究之中。

REFERENCES (参考文献)

- [1] SUN X (孙逊), ZHU S (朱尚权) *et al.* The structure and function of growth hormone. *Foreign Medical Sciences Section of Pathophysiology and Clinical Medicine* (国外医学生理、病理科学与临床分册), 1999, 19(1): 6~9
- [2] Luckow V A, Lee S C *et al.* Efficient generation of insecticidal recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1993, 67: 4566~4579
- [3] GENG Z H (耿朝晖), GAO P (郜鹏) *et al.* Expression of human growth hormone gene in Bac-to-Bac Baculovirus system. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报), 2002, 18(1): 59~63
- [4] LU H S (吕鸿声). *Molecular Biology of insect Viruses* (昆虫病毒分子生物学), Chinese Agriculture Science and Technology Press, 1998, pp. 552~554
- [5] David A Lindsay, Michael J Betenbaugh. Quantification of Cell Culture Factors Affecting Recombinant Protein Yields in Baculovirus-Infected Insect Cells. *Biotech and Bioeng*, 1992, 39: 614~618
- [6] Page M J *et al.* An improved baculovirus expression vector for producing high levels of mature recombinant proteins. *Nucleic Acid Research*, 1989, 17: 454
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992
- [8] Max D Summers, Gale E Smith. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Texas Agricultural Experiment station Bulletin No. 1555, 1988, pp. 14~16
- [9] Verne A Luckow *et al.* Signal important for high-level expression of foreign genes in autographa californica nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*, 1988, 167: 56~71

- two biological kingdoms. *Gene*, 1998, **222** :91 ~ 97
- [11] Wei Tang *et al.* A GC-rich sequence within the 5' untranslated region of human basonuclin mRNA inhibits its translation. *Gene*, 1999, **237** : 35 ~ 44
- [12] Raja Mokdad-Gargouri *et al.* Translational of human p53 expression in yeast meditized by 5'-UTR-ORF structural interaction. *Nucleic Acid Research*, 2001, **29** :1222 ~ 1227

Enhancing hGH Expression Level in Insect Cells by Shortening the 5'-UTR of hGH cDNA

GENG Zhao-Hui LIU Ying GAO Peng ZHAO Dong-Ming LI Shu YU Xin-Da* ZHANG Bao-Zhu

(Department of Biochemistry & Molecular Biology , Nankai University , Tianjin 300071 , China)

Abstract The regulation of foreign gene expression in Insect-Baculovirus Expression System is very complex. In this report , the effect of 5'-UTR in the expression of hGH gene in cultured Sf9 cells was examined. A 18 bp length in the end of 5'-UTR of hGH (human Growth Hormone , hGH) cDNA including a stem-loop structure was deleted by PCR. The truncated hGH cDNA , Δ 1hGH was cloned in pFastBac1 , named pFast-Bac- Δ 1hGH. After transforming into *E. coli* . DH10Bac , which have a shuttle vector-Bacmid , the Δ 1hGH was integrated into Bacmid by site-specific transposition , and an expression vector , rBacmid- Δ 1hGH DNA was acquired. By transfecting the cultured Sf9 cells with the recombinant expression vector DNA , pure recombinant virus , rAcV-Bac- Δ 1hGH was obtained , and hGH gene was expressed. Immuno-blot and Chemiluminescent assay revealed that the expressed hGH had normal immunological activity , the ammount of hGH expression level in Sf9 cell supernatant infected with rAcV-Bac- Δ 1hGH containing the truncated 5'UTR was four to five times higher than that infected with rAcV-Bac-hGH.

Key words hGH gene , PCR , 5'-UTR , Bac-to-Bac , expression

Received : 01-15-2002

This work was supported by Grant from the National 9th Five Years Plan Special Research Programs of China (No. 96-120-46-01).

* Corresponding author. Tel : 86-22-23505275 ; Fax : 86-22-23508800 ; E-mail : yund@eyou.com

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