

转译优化对 EPO 基因在 COS7 细胞中表达的影响

童涌 周向军 曹韞旭 温肇荣 陆德如

(第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所, 上海 200433)

摘要 利用 COS7 细胞暂时表达系统, 研究转译起始序列对 EPO-cDNA 表达的影响。通过 DNA 重组技术, 构建了原 EPO-cDNA 表达载体 pCSV-EPO (1), 其转译起始序列为 5' AATTCATGG3'。同时通过定点突变技术, 将起始序列改变成 5' CCACCATGG3', 而构建了另一表达载体 pCSV-EPO (2)。后者经序列分析证明无误后和前者均通过 DEAE-dextran 法转染 COS7 细胞, 用 ELISA 法定量测量 EPO 表达水平, 转染后 48 小时及 72 小时收集含 pCSV-EPO (1) 的 COS7 细胞上清, 测定结果为 1580pg/ml 及 954pg/ml, 而含 pCSV-EPO (2) 的上清则为 25 300pg/ml 和 17 450pg/ml。这表明经优化起始序列的基因表达远高于未经优化的。

关键词 促红细胞生成素 (EPO), 定点突变, 转译起始, 序列分析, COS7 细胞

真核基因表达量的高低主要取决于载体结构和宿主细胞, 其中载体上的启动子、增强子的强弱, 以及有无剪接信号都是影响真核基因转录的主要因素^[1]。在翻译方面, 真核基因虽然不存在原核基因中的 SD 序列, 但 mRNA 起始密码子 AUG 周围一段序列是保守性, 它直接影响真核基因的翻译, 从而影响到表达水平。我们通过对 cDNA ATG 周围序列的定点突变, 获得转译优化的基因载体, 它和没有进行转译优化的基因载体分别转染 COS7 细胞, 结果发现前者的表达水平高于后者, 这样为 EPO 基因在 CHO 细胞中永久性表达的研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: pUC19-EPO 复旦大学遗传所赠, pCSV 军事医学科学院王嘉玺同志赠, *E. coli* HB101 为本所保存菌株。

1.1.2 细胞系: 表达 SV40 病毒 T 抗原的猴细胞系 COS7 为军事医学科学院王嘉玺同志转赠。

1.1.3 酶和试剂: 限制酶 Kpn I、Hind III、T4 DNA 连接酶为德国 Biochemica 公司产品; PCR 试剂盒为 Cetus 公司产品; DNA 序列分析试剂盒为 Promage 公司产品; DEAE-dextran 为 Sigma 公司产品; 氯喹为本所潘卫庆同志赠, 其余试剂、药品均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组子构建: 见结果部分。

1.2.2 DNA 序列分析操作及有关技术: 见文献 [2] 有关章节。

1.2.3 转染 COS7 细胞的培养及 DEAE-dextran 转染程序: 见文献 [3]。

1.2.4 表达产物的 ELISA 检测: 德国 Biochemica 公司生产人 EPO 定量 ELISA 试剂盒, 用来测定组织培养上清中重组 EPO 含量, 对 EPO 有特异性, 可快速完成对 EPO 的定量测定^[4]。

2 结 果

2.1 重组子 pCSV-EPO (1) 的构建^[5]

Kpn I、Hind III 双酶切 pUC19-EPO 质粒 DNA, 回收 0.6kb 的 EPO-cDNA 全长编码区片段, 用 T4 DNA 连接酶将此片段与同样双酶切的质粒载体 pCSV 连接, 转化 *E. coli*. HB101 感受态细胞, 从 A₂ 转化子中经酶切, 筛选出阳性重组克隆 pCSV-EPO (1)。

2.2 重组子 pCSV-EPO (2) 的构建^[5]

利用定点突变, 将起始密码子 ATG 周围序列由 5' AATTCATGG 3' 变成 5' CCAC-CAT GG3'。后突变的 EPO-cDNA 经 PCR 扩增以后, 定向组入载体 pSCV, 转化 *E. coli*. HB101 感受态细胞, 得 A₂ 转化子, 经酶切筛选得阳性重组克隆 pCSV-EPO (2) (见图 1)。

2.3 定点突变后插入片段的序列分析

我们利用 pUC19 通用引物测定 EPO-cDNA 插入片段 ATG 周围序列, 序列分析结果表明, ATG 周围序列定点突变是成功的, 达到了预期目的 (见图 2)。

2.4 转染 COS7 细胞

用 pCSV-EPO (1) 和 pCSV-EPO (2) 质粒 DNA 分别转染 COS7 细胞。正常 COS7 细胞呈多角形, 暴露于 DNA 半小时之后呈圆形, 48、72 小时后仍基本保持圆形, 胞浆内出现粗大颗粒, 而至 144 小时后则基本恢复正常形态。

2.5 表达产物的 ELISA 检测

用德国 Biochemica 公司出品的人 EPO 定量 ELISA 试剂盒, 按使用说明出进行检测, 结果见表 1。从表 1 可以看出 pCSV-EPO (2) 的表达水平明显高于 pSCV-EPO (1), 转染后 48 小时前者是后者的 16.0 倍, 72 小时则为 18.3 倍, 阴性对照未转染的 COS7 细胞无 EPO 表达。

表 1 EPO 表达水平检测

Table 1 The levels of EPO production.

	The levels of EPO production (pg/ml)		
	Culture time (h)		
	48	72	144
pCSV-EPO (1)	1580	954	—
pCSV-EPO (2)	25300	17450	—
COS7	—	—	—

3 讨 论

我们利用一个能在哺乳动物细胞中高效表达外源基因的载体 pCSV, 构建了能表达 EPO 的重组载体。在对 COS7 细胞进行暂时性表达研究中, 我们发现重组质粒以 pCSV-

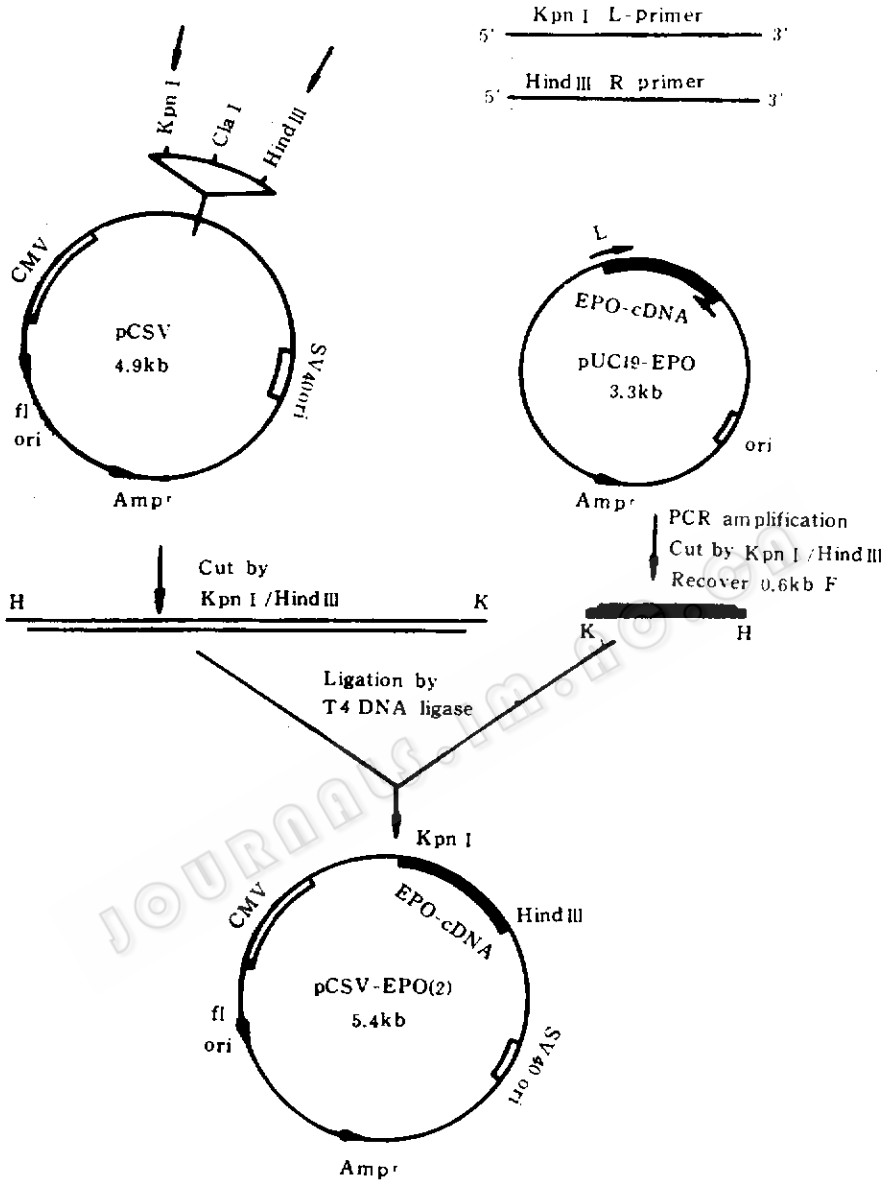


图 1 pCSV-EPO (2) 的构建

Fig. 1 Scheme of construction of pCSV-EPO (2)

EPO (2) 转染的 COS7 细胞表达水平为高。pCSV 是一个含有 CMV 强启动子、转译增强子、多克隆位点、转录终止及 polyA 信号的真核表达载体。我们比较了 pCSV-EPO (1) 和 pCSV-EPO (2) 的表达量, 发现起始序列优化后的 pCSV-EPO (2) 表达水平远远高于 pCSV-EPO (1), 这主要是因为 pCSV-EPO (2) 的 EPO 片段按预先设计合成的引物, 经 PCR 扩增进行定点突变, 使起始密码子周围序列处于最佳状态。真核生物核糖体小亚基是结合在 mRNA 5' 端帽结构上的, 并由此开始向 3' 端扫描, 直至达到第一个起始密码子^[6]。如果 AUG 周围序列不是最适合的, 小亚基将跃过这个位点和远离这个位



图 2 pCSV-EPO (2) ATG 周围序列分析

Fig. 2 The DNA sequencing around the ATG of pCSV-EPO (2)

点一段下游序列结合, 这将直接影响转译效率。根据 Kozak^[6]研究, AUG 上游-3 位点和下游+4 位点是核糖体小亚基重要的识别位点。-3 位点上和嘌呤碱基有着最显著效应, 如果被嘧啶碱基代替, 它对转译的影响远远超过-1, -2, 及+4 位点的替换, 而正常 mRNA-3 位上的碱基有 75% 以上是腺嘌呤, 我们将 5' AATTCATGG 3' 改变成 5' CCACCATGG 3', 其中-3 位点上的 T 我们换成了 A, 这对提高 EPO 基因在 COS7 细胞中的表达效果显然是有作用的。

致谢: 序列分析是由我室陆惠萍老师完成的, 姜永华老师在整个实验中给予了大力协助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Randal J K *et al.* Methods Enzymology, Academic Press. 1990, 185: 487-511.
- [2] Sambrook J *et al.* Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, 13. 3-13. 104.
- [3] Ausubel FM. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publish Associate and Wily-Interscience. New York, 1987, p. 921-923.
- [4] EPO-ELISA, Photometric Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of Erythropoietin (EPO), Cat No 1216473.
- [5] 王嘉玺等. 中国免疫学杂志, 1991, 7: 337-342.
- [6] 吴乃虎. 基因工程原理, 北京: 高等教育出版社, 1989, pp. 246-250.
- [7] Kozak M. Cell, 1986, 44: 282-292.

Effect of Optimized Translational Initiation on EPO cDNA Expression in COS7 Cells

Tong Yong Zhou Xiangjun Cao Yunxu Wen Zhaorong Lu Deru

(Institute of Medical Biotechnology and Molecular Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Using DNA recombination technique, we constructed a EPO-cDNA expression vector pCSV-EPO (1), its sequence around the ATG initiator codon was 5' AATTCATGG 3'. By applying site-directed mutagenesis to the EPO-cDNA, another EPO-cDNA expression vector was constructed, mutations were created near the ATG initiator codon, its sequence was changed to 5' CCACCATGG 3'. It was demonstrated by DNA sequencing. After that, the two expression vectors were introduced into COS7 cells by DEAE-dextran-mediated transfection. The EPO concentration in culture was determined by EPO-ELISA kit. The results showed that the pCSV-EPO (2) had a higher EPO expression level than the pCSV-EPO (1) had.

Key words Erythropoietin (EPO), site-directed mutagenesis, translational initiation, DNA sequencing, COS7 cell