

Act-1 核心启动子转录的 *EGFP* 基因在秀丽隐杆线虫体内的表达

周前进, 姜小磊, 张红丽, 杜爱芳

浙江大学动物科学学院 农业部动物疫病病原学与免疫控制重点开放实验室, 杭州 310029

摘要: 克隆获得的秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)*Act-1* 基因的核心启动子, 经 *Bgl* II 和 *Hind* III 限制性内切酶消化后, 与用相同酶消化的 pEGFP-4.1 载体连接(由 pEGFP-N1 去掉 CMV 启动子形成), 构建重组表达载体 Pact-EGFP。通过脂质体介导转染 Vero 细胞, 结果发现 EGFP 在 Vero 细胞中有表达, 但表达量很低。通过显微注射将 Pact-EGFP 与 pRF4 共注射到 *C. elegans* 性腺, 结果发现 EGFP 能够在 *C. elegans* 的皮层、副皮层以及咽部表达, 根据表达部位不同, 获得了 2 种转基因线虫株。研究结果显示: EGFP 在 *C. elegans* 体内的表达水平明显高于在 Vero 细胞内的表达, 表明 *C. elegans Act-1* 基因的核心启动子区域可能存在与转录水平密切相关的独特的转录调节元件。该研究为进一步实现寄生性线虫基因在 *C. elegans* 表达提供了参考。

关键词: *Act-1* 核心启动子, EGFP, 秀丽隐杆线虫, 显微注射, 转染

Act-1 core promoter region introduces high-performance transcription of EGFP gene expressed in *Caenorhabditis elegans*

Qianjin Zhou, Xiaolei Jiang, Hongli Zhang, and Aifang Du

Key Laboratory of Animal Epidemic Etiology & Immunological Prevention of Ministry of Agriculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract: To construct the recombinant vector Pact-EGFP, the *Act-1* core promoter region was amplified from the pUCm-T/*Act-1* and subcloned into pEGFP-4.1 vector (derived from pEGFP-N1 with the removal of human cytomegalovirus immediate early promoter), by restriction enzymes *Bgl* II and *Hind* III. Transfection of Pact-EGFP vector into Vero cell by liposome indicated that *Act-1* core promoter regulated the expression of EGFP gene in lower level in Vero cells. After Pact-EGFP microinjection into the gonad of *Caenorhabditis elegans* with pRF4 as a gene marker, green fluorescence was detected in the cortex, vice cortex and the pharyngeal of *C. elegans*. According to the locations, two different transgene lines were separated. The expression level of EGFP expressed in *C. elegans* was more than that in Vero cell. Some unique motifs might exist in *Act-1* core promoter region of *C. elegans*, which was closely related to the expression level of EGFP. These results lay the foundation for the further research on gene function of parasitic nematodes using *C. elegans*.

Received: July 3, 2008; **Accepted:** December 29, 2008

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30571395, 30771618).

Corresponding author: Aifang Du. Tel: +86-571-86971583; E-mail: afdu@zju.edu.cn

国家自然科学基金项目(Nos. 30571395, 30771618)资助。

Keywords: *Act-1* core promoter, *EGFP* gene, *Caenorhabditis elegans*, microinjection, transfection

营自由生活的秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 通体透明, 成虫仅 1 mm 左右, 其培养周期短, 易于在实验室培养, 可在较短的时间内获得大量的虫体材料, 而且可以通过显微注射的方式较方便地实现外源基因在 *C. elegans* 体内的表达^[1], 因此, *C. elegans* 已作为一种模式生物广泛应用于生命科学研究的各个领域。相比而言, 目前为止还没有实现寄生性线虫的体外培养, 寄生性线虫的生长发育还不能脱离寄生生活阶段, 这使得寄生性线虫分子水平的研究举步维艰。*C. elegans* 在进化上与寄生性线虫的关系最近, 将寄生性线虫的某些基因转移到 *C. elegans* 体内进行相关研究发现, 转基因后的这些基因的某些功能仍能够实现, 因此, 许多学者认为 *C. elegans* 可作为一种生物反应器应用于寄生性线虫基因工程疫苗的研制。

肌动蛋白是组成 *C. elegans* 正常体壁肌肉和咽部肌肉的重要组成蛋白, 是维持线虫各种组织运动性所必需的^[2], 能够持续性的表达于线虫的全部生活阶段^[3]。因此, 肌动蛋白的启动子应该具有很强的转录功能。本研究选择 *C. elegans Act-1* 基因的核心启动子区域作为表达外源基因的候选启动子, 利用显微注射技术将构建的真核表达载体转入 *C. elegans* 的性腺, 通过检测报告基因 *EGFP* 的表达情况分析其作为启动子转录外源基因的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

Escherichia coli TOP10 菌种和表达载体 pEGFP-N1 由本实验室保存, 克隆载体 pUCm-T vector 购自上海生工生物工程技术有限公司, pEGFP-4.1 载体由浙江大学动物预防医学研究所褚武英博士惠赠。

1.1.2 线虫和培养基

秀丽隐杆线虫(N2野生型), 尿嘧啶突变体 OP50 均由复旦大学生物发育基地惠赠。由浙江大学动物预防医学研究所寄生虫病研究室于 NGM 培养基中培养传代。

1.1.3 试剂

蛋白酶 K 购自上海鼎国生物技术有限公司。

DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA 凝胶回收试剂盒、质粒回收试剂盒购自 Axygen 公司。

1.1.4 仪器

Olympus IX71 倒置荧光显微镜, IM300 微操作注射器(Narishige)等。

1.2 方法

1.2.1 *Act-1* 核心启动子的扩增

通过对 WormBase 数据库中 *C. elegans Act-1* 基因进行分析, 参考 Files 等^[4]关于 *C. elegans Act-1* 基因启动子的研究, 设计引物, 扩增 *Act-1* 基因 5'端 -247 到+18 序列约 265 bp 区域, 克隆到 pUCm-T 载体, 测序分析获得 *Act-1* 的核心启动子区域。以重组克隆载体 pUCm-T/*Act-1* 为模板进行 PCR 扩增, 引物序列如下: PF: 5'-GAAGATCTCGA AAGTATTCCTTCCTCCAT-3', PR: 5'-CCCAAGCTT AACCTCGTCGTCACACATT-3', 引物两端分别加有限制性内切酶 *Bgl* 和 *Hind* 作用位点及保护性碱基。优化的 PCR 反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 1 min, 60°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 7 min。PCR 扩增产物用 DNA 片段快速纯化回收试剂盒回收, 用于构建 Pact-EGFP 真核表达载体。

1.2.2 *Pact-EGFP* 真核表达载体的构建

Act-1 启动子的 PCR 产物经 *Bgl* 和 *Hind* 限制性内切酶消化, 亚克隆到 pEGFP-4.1 载体的多克隆位点区域, 构建 Pact-EGFP 重组载体, 筛选阳性克隆, 鉴定分析后送生物公司测序。

1.2.3 *EGFP* 基因在 *Vero* 细胞中的表达

Pact-EGFP 质粒的提取利用 TaKaRa 的通用基因组抽提试剂盒完成, 进行 DNA 浓度和纯度测定后 -20°C 备用。

Vero 细胞解冻复苏, 培养条件是 37°C、5% CO₂。待 *Vero* 细胞长势良好后, 将细胞与无抗生素 DMEM 培养基按 1:1 的比例加入 6 孔细胞培养板, 每孔总体积为 2 mL, 使得第 2 天转染时细胞浓度达到 90%。Pact-EGFP 的转染通过脂质体介导, PEGFP-N1 真核表达载体作为对照, DNA 的最终转染浓度为 8 μg/mL, DNA 与脂质体的比例是 1:2.5, 具体操作参考 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)。分别在转染后的

11 h、15 h、21 h、36 h、48 h、59 h、81 h 观察绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.4 EGFP 基因在 *C. elegans* 体内的表达

将 *C. elegans* N2 野生型培养在 NGM 培养基中, 切取小片含有 N2 野生型线虫的 NGM 培养基于新的 NGM 培养基中。待线虫生长至出现大量的四期幼虫 (L4), 挑取近 100 条 L4 幼虫于新的 NGM 培养基中, 12 h 后进行显微注射。质粒的提取利用 TaKaRa 的通用基因组抽提试剂盒完成, 进行 DNA 浓度和纯度测定后 -20°C 备用。

rol-6 作为 DNA 转化的 Marker 基因, 其所在质粒 pRF4 与 Pact-EGFP 共显微注射到线虫的性腺, 质粒的注射浓度均为 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。注射后观察 F1 代和 F2 代以后线虫的表型变化和绿色荧光蛋白的表达情况。

2 结果与分析

2.1 Pact-EGFP 真核表达载体的鉴定

先前的研究表明, *Act-1* 基因 5'端-247 到+18 序列即为该基因的核心启动子区域^[5]。利用引物 PF 和 PR 扩增获得的 *Act-1* 启动子序列经限制性内切酶 *Bgl* 和 *Hind* 消化后, 与经过相同酶处理的 pEGFP-4.1 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选后, 随机挑选转化子。抽提质粒后, 发现利用 PCR 可扩增出约 300 bp 的 DNA 片段; 利用 *Bgl* 和 *Hind* 消化后也获得了约 300 bp 的 DNA 片段(图 1)。

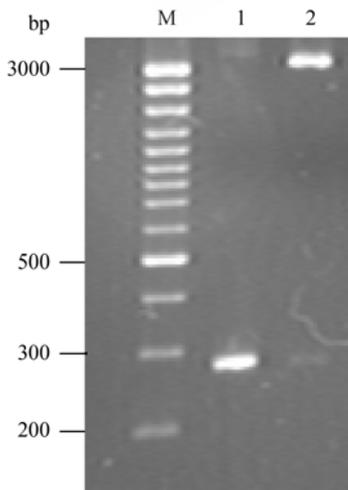


图 1 重组质粒 Pact-EGFP 的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant Pact-EGFP. M: DNA marker; 1: PCR product amplified from Pact-EGFP; 2: result of digestion using *Bgl* II and *Hind* III.

2.2 *Act-1* 核心启动子转录的 EGFP 基因在 Vero 细胞中的表达

利用脂质体介导的细胞转染方式验证 *Act-1* 核心启动子区域的转录活性。利用荧光显微镜观察 Vero 细胞转染后 11 h、15 h、21 h、36 h、48 h、59 h、81 h 的 EGFP 的表达情况: *Act-1* 核心启动子转录的 EGFP 基因在转染后的 15 h 开始出现表达; 而且发现与同时期观察的 pEGFP-N1 对照孔相比, *Act-1* 核心启动子的转录活性明显降低很多(图 2)。

2.3 *Act-1* 核心启动子转录的 EGFP 基因在 *C. elegans* 体内中的表达

将 rol-6 质粒通过显微注射的方法注射到 *C. elegans* N2 的性腺, 得到了具有 roll 表型的 *C. elegans*, 并能形成稳定的虫系(图 3)。

将 Pact-GFP 与 pRF4 共显微注射到线虫的性腺, 获得了具有 roll 表型的 *C. elegans* 转基因株。根据绿色荧光蛋白的表达部位不同, 本研究获得了 2 个转基因株的 F2 代: 一种转基因株, 其绿色荧光蛋白主要表达在线虫的皮层和副皮层; 另一种转基因株的绿色荧光蛋白主要表达在线虫的咽部(图 4)。

3 讨论

C. elegans 与大肠杆菌、酵母、杆状病毒以及哺乳动物细胞系等表达系统相比, 在进化上与寄生性线虫的关系最近, 具有线虫保守的一些分子生物学特性^[6]。研究表明, 寄生性线虫的某些基因转入 *C. elegans* 体内后, 仍保留有原来的某些生物学功能, 因而 *C. elegans* 可能成为研究寄生性线虫基因功能以及表达疫苗候选抗原的理想生物材料。例如, 组织蛋白酶 L 是 *C. elegans* 的胚胎发生过程所必需的, 该基因的缺失能够导致卵黄蛋白的异常加工和错误的构象变化, Britton 利用捻转血矛线虫的组织蛋白酶基因能成功拯救 *C. elegans cpl-1* 突变体引起的胚胎死亡^[7]。Redmond^[8]成功实现了捻转血矛线虫的胃蛋白酶原基因在 *C. elegans* 体内的表达, 但是由于蛋白的表达水平很低, 仅能通过 RT-PCR 和免疫组织化学的方法检测, 难以利用。尽管 *C. elegans* 有潜力成为表达寄生性线虫功能蛋白或疫苗抗原的生物反应器。然而, 在利用 *C. elegans* 表达外源物种基因的有限研究中, 始终没有发现通用的启动子可以利用^[7-10]。如何对相关启动子进行优化或者寻找通用

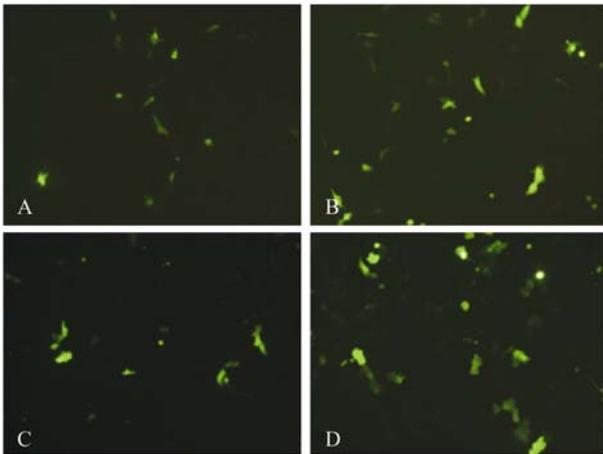


图2 *Act-1* 核心启动子转录的 *EGFP* 基因在 Vero 细胞中的表达

Fig. 2 *EGFP* expression in Vero transcribed by *Act-1* core promoter region. Transgene expression of *EGFP* in Vero cells that had been transfected 48 h previously with Pact-EGFP (A), PEGFP-N1(transfection positive control) (B) and 59 h previously with Pact-EGFP (C), PEGFP-N1(transfection positive control) (D).

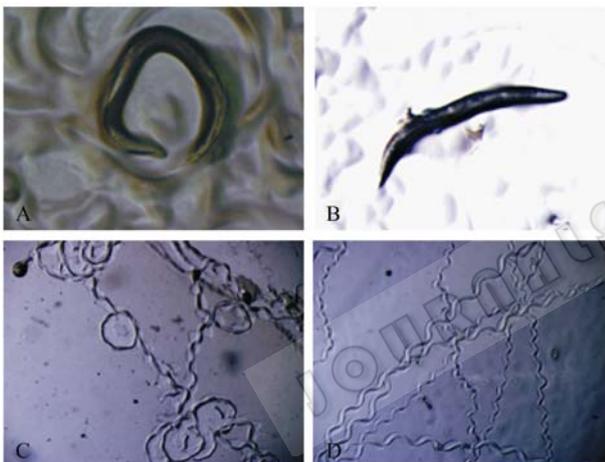


图3 秀丽隐杆线虫 roller 转基因株行为观察和轨迹跟踪
Fig. 3 Behavior and trail comparison of roller mutant of *C. elegans*. (A) Roller mutant of *C. elegans* ($\times 100$). (B) Wild type of *C. elegans* ($\times 100$). (C) The trail of roller mutant of *C. elegans* ($\times 50$). (D) The trail of N2 of *C. elegans* ($\times 50$).

的表达外源物种基因的启动子已成为研究中亟待解决的问题。

先前分析表明, *Act-1* 基因的核心启动子区域具有典型的转录调控元件^[5], 例如 TATA box, GATA box, CAAT box 等。pEGFP-4.1 载体是利用限制性内切酶 *Ase I* 和 *Nhe I* 消化的方式去掉 pEGFP-N1 载体上的 CMV 启动子得来, 消除 CMV 启动子后, 载体上原有的 *EGFP* 基因仍具有完整的开放阅读框, 因此可专门用于鉴定和分析基因启动子的转录活性^[11]。在

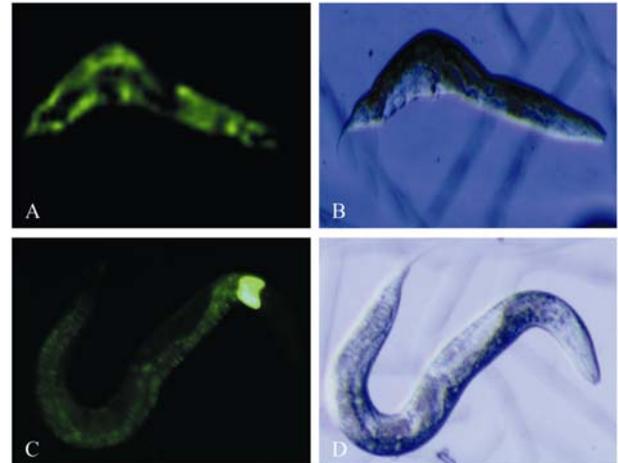


图4 绿色荧光蛋白在秀丽隐杆线虫体内的表达与定位
Fig. 4 Expression of *EGFP* in roller mutant microinjected with Pact-EGFP and pRF4. Expression of green fluorescence was detected respectively in the cortex, vice cortex (A, B) and the pharyngeal (C, D) of adults of *C. elegans* ($\times 100$).

真核表达载体构建过程中, 本研究选择 pEGFP-4.1 作为基本的载体骨架, 将 *Act-1* 的核心启动子插入 *EGFP* 基因上游的多克隆位点区域, 同时消除载体 CMV 启动子的影响。

为鉴定 *Act-1* 核心启动子区域的转录活性, 本研究首先将 Pact-EGFP 通过脂质体介导的方式转染到 Vero 细胞。约在转染后的 15 h, 转染 Pact-EGFP 的 Vero 细胞开始检测到绿色荧光, 转染 24 h 后可明显观察到, 出现的时间较晚于转染 pEGFP-N1 的 Vero 细胞(转染后约 11 h)。在转染 48~59 h 后, 绿色荧光蛋白的表达强度达到最大, 但是仍明显低于 PEGFP-N1 转染的 Vero 细胞, 表明 *Act-1* 能够实现 *EGFP* 基因在哺乳动物细胞内的转录, 但是由于 *Act-1* 核心启动子上游存在着对转录水平有较大影响的其他调控元件, 或者线虫体内存在着某些独特的转录调控元件, 因而 Pact-EGFP 转染的 Vero 细胞中 *EGFP* 的表达量比较低。在 Pact-EGFP 转染 81 h 后仍可以检测到 *EGFP* 的表达, 表明 *Act-1* 启动子的转录能够长时间的维持, 这与先前的报道是一致的。

Pact-EGFP 在 *C. elegans* 体内的表达通过显微注射的方式实现。rol-6 作为一种 Marker 基因, 常与目的基因进行共显微注射, 注射 rol-6 基因后的线虫出现 roll 的表型, 可以直观的判断显微注射的操作成功与否。将 Pact-EGFP 和 pRF4 以 50 ng/ μ L 等浓度注射后, 成功得到了具有 roll 表型的转基因线虫株

的 F1 代。单虫培养后, 得到了 2 种不同的转基因线虫株的 F2 代, 一种 *EGFP* 主要表达在线虫的皮层和副皮层; 另一种 *EGFP* 主要在线虫的咽部得到了高强度的表达(图 4)。结果显示, *EGFP* 在 *C. elegans* 体内的表达强度明显强于在 Vero 细胞的表达, 说明 *C. elegans* 体内的 *Act-1* 启动子存在着独特的转录调控元件, 这些元件能够明显的影响 *Act-1* 的转录水平。

本研究表明, *Act-1* 基因的核心启动子能够启动外源基因在 *C. elegans* 体内的正常转录, 构建的 *Pact-EGFP* 或许可作为线虫转基因的载体使用, 用来表达某些组织特异性(在线虫的肌肉组织表达)的蛋白或者疫苗候选抗原, 这为后续工作奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, *et al.* Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequence. *EMBO J*, 1991, **10**: 3959–3970.
- [2] Willis JH, Munro E, Lyczak R, *et al.* Conditional dominant mutations in the *C. elegans* gene *act-2* identify cytoplasmic and muscle roles for a redundant actin isoform. *Mol Biol Cell*, 2006, **17**: 1051–1064.
- [3] Sasagawa Y. *Caenorhabditis elegans* RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis. *Genes to Cell*, 2003, **8**: 857–872.
- [4] Files JG, Carr S, Hirsh D. Actin gene family of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol*, 1983, **164**: 355–375.
- [5] Zhou QJ, Pang LH, Zhang HL, *et al.* Expression of green fluorescent protein gene in *Caenorhabditis elegans*. *Chin J Vet Sci*, 2008, **28**(8): 909–913.
- [6] Han CL, Wang M. The application of *Caenorhabditis elegans* on study the antigen of parasitological nematodes. *Chin J Vet Para*, 2004, **12**(1): 33–36.
- [7] Britton C, Murray L. A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasit*, 2002, **122**: 21–33.
- [8] Redmond DL, Clucas C, Johnstone IL, *et al.* Expression of *Haemonchus contortus* pepsinogen in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasit*, 2001, **112**: 125–131.
- [9] Liu J, Dent JA, Beech RN, *et al.* Genomic organization of an avermectin receptor subunit from *Haemonchus contortus* and expression of its putative promoter region in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasit*, 2004, **134**: 167–274.
- [10] Krause S, Sommer A, Fischer P, *et al.* Gene structure of the extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* and its overexpression and promoter analysis in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasit*, 2001, **117**: 145–154.
- [11] Chu WY, Wei YW, Qian RH, *et al.* Characterization of the 5'-to-5'linked adult α - and β -globin genes from three sciaenid fish species(*Pseudosciaena crocea*, *Sciaenops ocellatus*, *Nibea miichthioides*). *Comp Biochem Physiol*, 2006, **1**(3): 319–327.