

# 内含子方向对 MAR 表达载体重组 CHO 细胞 转基因表达的调控作用\*

李 琴<sup>1</sup>, 赵春澎<sup>2</sup>, 王小引<sup>2</sup>, 孙秋丽<sup>2</sup>, 王天云<sup>2△</sup>

1. 新乡医学院 分析测试实验室(新乡 453003); 2. 新乡医学院 生物化学与分子生物学教研室(新乡 453003)

**【摘要】** 目的 分析内含子方向对核基质结合区(matrix attachment region, MAR)表达载体在重组中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞中对转基因表达水平的影响。方法 PCR 扩增  $\beta$ -珠蛋白 MAR, 克隆至表达载体上, 构建含 MAR 表达载体, 将载体上一段内含子序列酶切正向、反向连接到载体上。酶切和测序鉴定正确后, 转染中国仓鼠卵巢 CHO 细胞, G418 筛选稳定转化的细胞株, ELISA 分析氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)基因的表达水平。结果 具有正向内含子的含 MAR 和不含 MAR 的表达载体 CAT 基因表达水平均高于含反向内含子的表达载体( $P < 0.05$ ), 反向内含子存在情况下, MAR 不能提高转基因表达。结论 在重组 CHO 细胞中, 内含子的方向影响转基因表达水平, 正向内含子和 MAR 能提高转基因表达, 反向内含子不能提高转基因表达水平。

**【关键词】** 核基质结合区 内含子 转基因表达 CHO 细胞

**Effect of Intron Orientation on the Expression of Transgene Imposed by MAR Expression Vector in Stably Recombinant CHO Cells** LI Qin<sup>1</sup>, ZHAO Chun-peng<sup>2</sup>, WANG Xiao-yin<sup>2</sup>, SUN Qiu-li<sup>2</sup>, WANG Tian-yun<sup>2△</sup>. 1. Analysis & Test Laboratory, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

△ Corresponding author, E-mail: wtianyuncn@126.com

**【Abstract】** **Objective** To determine the effect of intron orientation on the transgene expression level imposed by matrix attachment region (MAR) expression vector. **Methods** The MAR of  $\beta$ -globin was amplified by PCR, and then cloned into MAR expression vectors. An intron sequence was digested with restriction enzyme, ligated to the MAR expression vector in reverse orientation, and then transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells. The transfected stable cells were screened by G418. The level of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene expression was analyzed by ELISA method. **Results** The transgene expression levels of CHO cells with the two expression vectors with a positive intron or without MAR were higher than that of CHO cells with an expression vector with reverse intron ( $P < 0.05$ ). MAR did not improve transgene expression with reverse intron presence. **Conclusion** Different orientation of intron can affect transgene expression in recombinant CHO cells. The transgene expression level can be increased using positive intron and MAR.

**【Key words】** Matrix attachment region Intron Transgene expression CHO

核基质结合区(matrix attachment region, MAR)是存在于真核细胞染色质中的与核基质特异结合的一段 DNA 序列。MAR 富含 A/T 的 DNA 序列, 其 A/T 含量超过 70%, 长度为 300 ~ 3 000 bp, 常含有一些特征性基序, 如 A-box (AATAAAYAAA)、T-box (TTWTWTTWTT)、酵母自主复制序列 ARS、果蝇拓扑异构酶 II 识别位点和能形成蛋白质识别位点的松散 DNA (uUllwinding DNA)、富含 AT 区、弯曲 DNA (curved

DNA)等。研究显示, MAR 能提高转基因的表达水平, 并在一定程度上降低不同转化株转基因表达差异<sup>[1-4]</sup>。

研究发现内含子在基因表达调控中有着重要的生物学功能。内含子是阻断基因线性表达的序列, 是真核生物细胞 DNA 中的间插序列或不编码序列, 在人类基因组中非编码序列占到 95% ~ 97%。目前发现许多基因的内含子都对基因的表达具有正调控作用, 这是因为内含子中存在一些类似增强子或其他顺式作用元件, 促进转录的起始或延伸, 内含子增加了 mRNA 在核内的稳定性, 可充当启动子等<sup>[5-7]</sup>, 但在提高基因表达上, 其作用机理不同于增

\* 国家自然科学基金(No. 31371332)资助

△ 通讯作者, E-mail: wtianyuncn@126.com

强子,内含子在基因表达中具有位置效应和方向依赖性<sup>[8]</sup>。内含子在基因表达调控中也存在负调控<sup>[9]</sup>。本研究通过构建含 MAR 序列的具有相反方向的内含子的载体,分析探讨 MAR 与内含子对转基因表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

各种限制性内切酶、DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、质粒提取试剂盒、dNTP、凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司。梭华-sofast 基因转染试剂盒购自厦门太阳马生物工程有限公司,氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)-ELISA 检测试剂盒购自美国 Roche 公司;DMEM 高糖培养基、G418(美国 Gibco 公司),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),含 CAT 报告基因及 G418 筛选标记的 *pCATG* 质粒载体为本课题组保存;中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞购于北京协和医学院;其他常用试剂均购自上海生物工程有限公司,引物合成及测序也由该公司完成。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 MAR 序列的扩增** 根据 GenBank 公布的人的  $\beta$ -珠蛋白 MAR(No: L22754)设计如下引物: P1: 5'-TTAGTAAGACATCACCTTGCATTT-3'; P2: 5'-AGCCATAGTTTGAGTTACCCTTT-3'。P1、P2 引物 5'端分别引入 *Bgl* II/*Kpn* I 酶切位点(AGATCT;GGTACC)。PCR 条件采用改进的降落 PCR 程序:95 °C 3 min,94 °C 40 s,60~56 °C 30 s,72 °C 40 s,每个退火温度 4 个循环,最后 55 °C 30 个循环,72 °C 3 min。片段长度为 600 bp。PCR 扩增电泳正确后,连接到 *pMD18-T* 载体。

**1.2.2 载体构建** 将连有 MAR 片段的 T-vector 及 *pCATG* 质粒分别用 *Kpn* I/*Bgl* II 酶切,T4 连接酶将回收的 MAR 连接至相应内切酶的 *pCATG* 质粒上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,质粒提取并命名为 *pCATC1*。

质粒 *pCATC1*(图 1A)用 *Hind* III 酶切,琼脂糖凝胶回收 *Hind* III 酶切的内含子序列(长 219 bp),反向重新连接在 *pCATC1* 上,构建载体 *pCATC2*(图 1B)。*Kpn* I/*Bgl* II 双酶切质粒 *pCATC1*,琼脂糖凝胶回收去除 MAR 的片段,回收片段命名为 *pCATC3*(图 1C)。

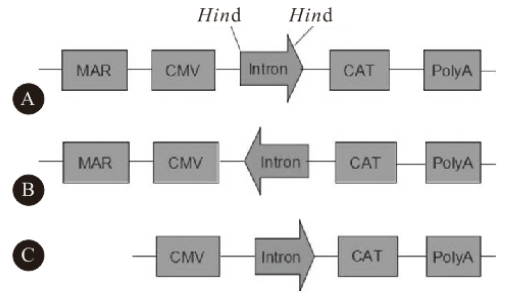


图 1 载体构建示意图

Fig 1 Schematic illustration of expression vectors

A: *pCATC1* vector contains  $\beta$ -globin MAR sequence, CMV promoter, positive intron and CAT reporter gene; B: *pCATC2* vector contains  $\beta$ -globin MAR sequence, CMV promoter, reverse intron and CAT reporter gene; C: *pCATC3* vector contains SV40 promoter, positive intron and CAT reporter gene

**1.2.3 细胞培养及转染** 参考文献<sup>[10]</sup>,在 24 孔板内以  $2 \times 10^6$ /孔接种 CHO 细胞,次日转染 *pCATC1*、*pCATC2* 及 *pCATC3* 载体。转染方法按照梭华-sofast 基因转染试剂盒说明书进行。转染 48 h 后,用终浓度为 800  $\mu$ g/mL 的 G418 培养液加压筛选 1 周后,G418 培养液浓度改为 400  $\mu$ g/mL 持续筛选 1 周,大约 14 d 后待稳定转化的细胞集落形成,用 0.25% 胰酶消化,对每组转染细胞有限稀释并单克隆化,转入 96 孔板内继续培养,待细胞密度为 80%~90% 时,收集细胞。

**1.2.4 CAT 基因表达产物 CAT 酶的测量分析** 参考文献方法<sup>[10]</sup>,收集细胞,通过细胞计数调整每组细胞为相同浓度( $1 \times 10^6$ /mL),用预冷的 PBS 液洗涤 3 遍,加入 1 mL 裂解液(5 倍稀释)轻轻晃动,室温放置 30 min,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min,吸出上清,每个样本吸出 200  $\mu$ L 加入 EP 管中,并设阳性和阴性对照,其他参照试剂盒说明书检测 CAT 酶含量。

### 1.3 统计学方法

服从正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 载体构建及鉴定

构建好的载体 *pCATC1*、*pCATC2* 分别经 *Bgl* II、*Kpn* I/*Bgl* II 及 *Hind* III/*Bgl* II 酶切,琼脂糖凝胶电泳鉴定结果显示有 770 bp、600 bp 和 219 bp 片段切出,与预期片段的大小正好相符,载体 *pCATC2* 经测序鉴定 219 bp 内含子方向相反,表明

成功构建了含 MAR (770 bp) 序列的表达载体 *pCATC1* 及 *pCATC2*, 219 bp 是 2 个 *Hind* III 酶切位点之间的内含子片段 (图 2)。同时将构建好的 *pCATC1* 经 *Kpn* I / *Bgl* II 酶切去除 MAR 序列, 成为不含有 MAR 片段的线性载体 *pCATC3*。

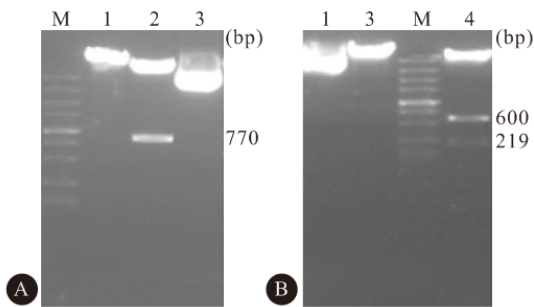


图 2 *pCATC1*(A) 和 *pCATC2*(B) 载体酶切鉴定图

Fig 2 Identification of *pCATC1* (A) and *pCATC2* (B) using restriction enzymes

1: *Bgl* II digestion; 2: *Kpn* I / *Bgl* II digestion; 3: No digestion; 4: *Hind* III / *Bgl* II digestion; M: DL5 000 DNA ladder

## 2.2 不同表达载体的 CAT 酶含量分析

分别将构建好的不同表达载体 *pCATC1*、*pCATC2* 及 *pCATC3* 转染 CHO 细胞, 经过 G418 筛选, 对照细胞全部死亡, 形成稳定表达株后, 通过细胞计数调整每组细胞为相同浓度 ( $1 \times 10^6$  / mL), 收集细胞并对 CAT 酶含量进行分析, 结果显示: 含 MAR 和不含 MAR 的正向内含子的表达载体 (*pCATC1* 和 *pCATC3*) 转基因表达水平都高于反向内含子的表达载体 (*pCATC2*) ( $P < 0.05$ )。见图 3。

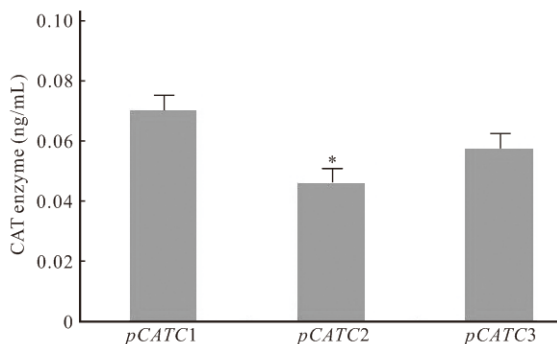


图 3 不同载体转化的细胞平均 CAT 酶含量

Fig 3 CAT contents in cells transfected with different vectors

\*  $P < 0.05$ , vs. *pCATC1* and *pCATC3*

## 3 讨论

随着基因工程技术的发展及应用, 目的基因发生基因沉默现象已成为其研究和应用的主要障碍。

MAR 能有效克服外源基因沉默, 提高外源基因在真核生物细胞中的表达水平和稳定性<sup>[1-4]</sup>。本课题组前期研究发现  $\beta$ -珠蛋白 MAR 及  $\beta$ -干扰素 MAR 均能够提高转基因在 CHO 细胞中的表达, 且  $\beta$ -珠蛋白 MAR 促转基因作用优于  $\beta$ -干扰素 MAR<sup>[4]</sup>。此外, MAR 的表达调控作用与在载体上的插入位置有关, 具备“位置效应”<sup>[10]</sup>“叠加效应”<sup>[11]</sup>和“距离效应”<sup>[12]</sup>。但内含子对 MAR-表达载体转基因表达的影响尚不清楚。

外源蛋白在 CHO 细胞中的表达水平受许多因素影响, 其中表达载体是重要影响因素之一。研究 MAR 与启动子、内含子、遍在染色体开放元件、PolyA、绝缘子等调控元件的分子组装, 优化筛选高效稳定 CHO 重组表达载体, 对重组蛋白产业化生产具有重要意义。本实验构建了内含子方向相反的含 MAR 的两种质粒转染重组 CHO 细胞来研究内含子方向及 MAR 对转基因表达水平的影响, 结果表明不论是否含有 MAR 序列, 正向内含子的表达载体转基因表达水平都高于反向内含子的表达载体。这说明在重组 CHO 细胞中, 反向内含子对转基因表达不起作用。在 DNA 水平上, 内含子以 2 种方式影响转录。一种方式是通过内含子序列本身含有的转录增强元件或抑制元件, 另一种方式是通过调节核小体的位置来控制 DNA 的可接近性<sup>[13]</sup>。内含子在基因表达中起着重要的调控作用, 尽管在基因表达的各个水平都报道了内含子有功能, 但对于内含子的具体作用机制还不甚清楚, 人们对内含子功能的研究还处于不断探索中。

本研究主要分析了内含子方向对转基因表达的影响, 但对内含子的具体作用机制没有进行深入的探讨, 此外本文只是对报告基因进行了分析, 对目的基因的影响未进行研究。

## 参 考 文 献

- Girod PA, Nguyen DQ, Calabrese D, et al. Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells. *Nat Methods*, 2007; 4(9): 747-753.
- Harraghy N, Regamey A, Girod PA, et al. Identification of a potent MAR element from the mouse genome and assessment of its activity in stable and transient transfections. *J Biotechnol*, 2011; 154(1): 11-20.
- 胥玉玺, 王天云, 张俊河等. 人  $\beta$ -干扰素核基质附着区在 CHO 细胞中对转基因表达的调控. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008; 12(29): 5623-5626. (下转第 243 页)

不突出,但近年来有增长的趋势。凉山州按人口配置的医师和床位较为合理,护士较差。其他地区按人口配置的护士和床位的绝对公平性差。而凉山州和其他地区的护士资源公平性问题突出可能与这两类地区的人口密度较大,且护士资源数量相对较少有关。护士资源在3种卫生资源中缺口最大,在护士数量有限的情况下,人口密度越大护士资源缺乏越明显,公平性越差。因此,培养卫生人才,尤其是专业护理人员,是提高凉山州和其他地区卫生资源配置公平性的首要任务。

### 参 考 文 献

- 冯毅,罗娅.卫生资源配置与利用研究概述.社区医学杂志,2008;6(3):60-62.
- 中共四川省委办公厅四川省人民政府办公厅关于印发《四川省民族地区优惠政策汇集》的通知.四川政报,1997;26:12-17.
- 应桂英,陈文,段占祺等.四川省卫生统计数据采集与决策支持系统设计与实现.中国卫生信息管理杂志,2012;9(1):89-92.
- Gakidou E, King G. Measuring total health inequality: adding individual variation to group-level differences. *Int J Equity Health*, 2002;1(1):3.
- Gakidou EE, Murray CJ, Frenk J. Defining and measuring health inequality: an approach based on the distribution of health expectancy. *Bull World Health Organ*, 2000;78(1):42-54.
- Yang M, Eldridge S, Merlo J. Multilevel survival analysis of health inequalities in life expectancy. *Int J Equity Health*, 2009;8:31. doi: 10.1186/1475-9276-8-31.
- 周清华.基尼系数的基本算法总结.统计教育,2002;1:12-13.
- 何军,杨建,孟玲等.基于洛伦兹曲线和基尼系数的四川卫生资源配置公平性评价.西北人口,2015;36(1):44-47.
- 张彦琦,唐贵立,王文昌等.基尼系数和泰尔指数在卫生资源配置公平性研究中的应用.中国卫生统计,2008;25(3):243-246.
- 四川省统计局.四川统计年鉴2014年. <http://www.sc.stats.gov.cn/tjcbw/tjnj/2014/index.htm>.
- 张子武,陈文,潘惊萍等.四川省卫生资源公平性研究.中国社会医学杂志,2014;31(5):357-359.
- 张程山,左强,白红丽等.云南边疆少数民族地区卫生专业技术人员现状分析与对策建议.江苏卫生事业管理,2010;21(1):39-41.
- 任光祥,刘岚,余福强等.贵州少数民族地区卫生人力资源现状及卫生服务质量、效率分析.中国卫生经济,2013;32(6):40-43.
- 张大凯.四川民族地区基层卫生人才培养研究.成都:电子科技大学,2010.
- 王玲,张翔.2004~2008年上海市卫生资源公平性研究.中国卫生事业管理,2010;27(2):85-87.
- 王玉华,桑舒平.利用基尼系数和洛伦兹曲线评价云南省2011年卫生资源配置的公平性.卫生软科学,2013;27(9):536-538.
- 郑小华,冯凌. HRDI在四川民族地区卫生资源评价中的应用.中国卫生事业管理,1996;12(12):665-667.
- 国务院办公厅.全国医疗卫生服务体系规划纲要(2015—2020年). [http://www.gov.cn/zhengce/content/2015-03/30/content\\_9560.htm](http://www.gov.cn/zhengce/content/2015-03/30/content_9560.htm).
- 唐彦东,于汐,刘春平.汶川地震对阿坝州经济增长影响理论与实证研究.自然灾害学报,2014;23(5):90-97.

(2015-05-18收稿,2015-09-02修回)

编辑 余琳

(上接第191页)

- 王天云,韩忠敏,杨献军等. MAR提高稳定转化的CHO细胞转基因表达.基础医学与临床,2008;28(11):1125-1128.
- 陈俊,王宗阳.水稻OsBP-73基因表达需要其内含子参与.植物生理与分子生物学学报,2004;30(1):81-86.
- 谢先芝,吴乃虎.番茄蛋白酶抑制剂II基因的分离及其内含子功能.科学通报,2001;46(11):934-938.
- Chang KC. Critical regulatory domains in intron 2 of a porcine sarcomeric myosin heavy chain gene. *J Muscle Res Cell Motil*, 2000;21(5):451-461.
- 张开慧.内含子的功能及应用.中国畜牧兽医,2012;39(7):80-82.
- 丁红梅,邵根宝,徐银学.内含子与基因表达调控.畜牧与兽医,2006;38(3):50-53.
- 张俊河,咎玉玺,王天云.核基质结合区的位置对转基因表达的影响.中国生物化学与分子生物学报,2009;25(9):839-843.
- Wang F, Wang TY, Tang YY, *et al.* Different matrix attachment regions flanking a transgene effectively enhance gene expression in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *Gene*, 2012;500(1):59-62.
- Zhang JH, Wang XY, Wang TY, *et al.* Distance effect of matrix attachment region on transgene expression in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Lett*, 2014;36(10):1937-1943.
- 王悦冰,郎志宏,黄大昉.内含子对真核基因表达调控的影响.生物技术通报,2008;(4):1-5.

(2015-08-16收稿,2015-12-03修回)

编辑 沈进