

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.17.026

# 重组 CHO 细胞中不同启动子对含 MAR 表达载体转基因表达的影响\*

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>

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

**[摘要]** **目的** 分析在重组 CHO 细胞中不同启动子对含核基质结合区(MAR)表达载体转基因表达的影响。**方法** PCR 扩增 CMV 启动子及  $\beta$ -珠蛋白 MAR, 构建含  $\beta$ -珠蛋白 MAR 表达载体 pCAT1, 随后将 CMV 启动子替代 pCAT1 上 SV40 启动子构建 CMV 启动子驱动的表达载体 pCAT2。pCAT1、pCAT2 不含 MAR 的对照载体同时转染 CHO 细胞, G418 筛选稳定转化的细胞株, 酶联免疫吸附试验(ELISA)分析氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因的表达水平。**结果** 含 MAR 表达载体转染的细胞 CAT 酶表达量比不含 MAR 的 pCATG 和 pCAT3 载体转染的细胞高, 分别提高 2.14 倍和 1.25 倍( $P < 0.05$ ); 而由 SV40 启动子驱动含 MAR 表达载体 pCAT1 转染的细胞 CAT 酶表达水平明显比由 CMV 启动子驱动的 pCAT2 载体高 3.26 倍( $P < 0.05$ )。**结论** 在稳定重组 CHO 细胞中 MAR 能够提高转基因的表达水平, SV40 启动子与 MAR 组合其启动效率优于 CMV 启动子与 MAR 组合。

**[关键词]** MAR; 启动子; 转基因表达; CHO 细胞

**[中图分类号]** Q781

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)17-2386-03

## Influence of different promoters on expression of transgene containing MAR expression vector in recombinant CHO cells\*

Li Qin<sup>1</sup>, Zhao Chunpeng<sup>2</sup>, Wang Xiaoyin<sup>2</sup>, Sun Qiuli<sup>2</sup>, Wang Tianyun<sup>2△</sup>

(1. Analysis & Test Laboratory; 2. Teaching and Researching Section of Biochemistry and Molecular Biology, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of different promoters on the expression level of transgene containing MAR expression vector in recombinant CHO cells. **Methods** The CMV promoter and  $\beta$ -globin MAR were amplified by PCR, then CMV promoter was replaced the SV40 promoter in pCAT1 for constructing the expression vector droved by CMV promoter. The control vectors of pCAT1 and pCAT2 without containing MAR were simultaneously transfected into the CHO cells. Then the stably transfected cell line was screened by G418. The CAT gene expression level was analyzed by ELISA. **Results** The expression level of CAT enzyme in the cells transfected with MAR-containing vectors was increased compared with the cells transfected by pCATG and pCAT3 vectors without containing MAR, which were increased by 1.75 and 1.25 times respectively ( $P < 0.05$ ); but CAT enzyme expression level in the pCAT1 transfected cells droved by SV40 promoter with the MAR-containing expression vectors was 1.4 times higher than that in the pCAT2 vector droved by the CMV promoter ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** MAR can enhance the transgene expression level in stably recombinant CHO cells, and the promoting efficiency of SV40 promoter and MAR combination is superior to that of CMV promoter and MAR combination.

**[Key words]** matrix attachment region; promoter; transgene expression; CHO cell

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。为获得稳定高效的转基因株系,现已经研发许多方法来避免转基因沉默,包括在表达载体中用强启动子或增强子及去甲基化处理<sup>[1-2]</sup>。核基质结合区(MAR)序列是真核细胞染色质中能与核基质特异结合的 DNA 序列。研究表明, MAR 能提高 CHO 表达系统中转基因的表达水平及降低转化株转基因表达水平差异<sup>[3-7]</sup>。与其他调控元件不同, MAR 能促进沉默基因再激活以及提高非沉默细胞的表达水平<sup>[8]</sup>。研究还发现 MAR 可以调控活跃和非活跃表达之间的长期转变,从而减少沉默效应<sup>[9]</sup>。启动子是特异性识别和结合 RNA 聚合酶的 DNA 序列,能够调控下游基因表达,启动子和不同调控元件的组合会影响重组蛋白的表达<sup>[9-11]</sup>。优化 MAR 和启动子等不同调控元件的组合,能提高重组蛋白的表达、阻止启动子的甲基化并增加表达的稳定性。本研究通过构建含 MAR 序列的具有不同启动子的载体,分析

不同启动子与 MAR 对转基因表达效率的影响并筛选出最佳组合,为阐明 MAR 提高 CHO 细胞转基因表达水平的机制提供理论依据。

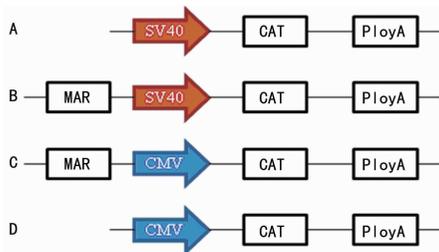
### 1 材料与方法

**1.1 材料** 菌株 E. coli、DH5 $\alpha$ 、T-vector 购自大连 TaKaRa 公司,含氯霉素乙酰转移酶(CAT)报告基因及 G418 筛选标记的 pCATG 质粒载体为本课题组保存。CHO 细胞购于北京协和医学院;DNA Taq 聚合酶,限制性内切酶, T4 DNA 连接酶,凝胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒, DMEM 高糖培养基, G418 均购自美国 Gibco 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,胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司, CAT-酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自美国 Roche 公司,引物合成及测序由上海生物工程有限公司完成,其他常用试剂均购自该公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 MAR 及启动子的扩增** 利用 Primer5.0 软件,根据 GenBank 公布的人  $\beta$ -珠蛋白 MAR(No:L22754)设计 P1、P2 引物:5'-TTA GTA AGA CAT CAC CTT GCA TTT-3';5'-AGC CAT AGT TTG AGT TAC CCT TT-3'。根据 pEGFP-C1 载体上的人巨细胞病毒立早(CMV)启动子序列设计 P3、P4 引物:5'-TAA AGA TCT TAG TTA TTA ATA-3';5'-TAA AAG CTT GAT CTG ACG GTT-3'。P1、P2 引物 5'端分别引入 Bgl II /Kpn I 酶切位点(AGATCT;GGTACC);P3、P4 引物的 5'端分别引入 Bgl II /Hind III 酶切位点(AGATCT;AAGCTT)。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,引物由上海生物工程有限公司合成。

**1.2.2 载体构建** PCR 完成电泳鉴定正确后,连接到 T-vector 上测序。将测序正确的含 MAR T-vector 用 Kpn I / Bgl II 酶切,回收 MAR 片段,T4 连接酶连接至 Kpn I / Bgl II 酶切 pCATG 质粒上,转化 E. coli DH5 $\alpha$ ,提取质粒,酶切鉴定,鉴定正确的质粒命名为 pCAT1。将连有 CMV 片段的 T-vector 以及 pCAT1 质粒分别用 Bgl II /Hind III 酶切,T4 连接酶将回收的 CMV 连接到相应内切酶的 pCAT1 上,替代 pCAT1 质粒上原有的猿猴病毒(SV40)启动子,转化 E. coli DH5 $\alpha$ ,质粒提取并命名为 pCAT2。质粒 pCAT2 用 Kpn I /Bgl II 双酶切,琼脂糖凝胶回收去除 MAR 的片段,回收片段命名为 pCAT3 (图 1)。



A:pCATG 载体:含有 SV40 启动子和 CAT 报告基因;B:pCAT1 载体:含有  $\beta$  珠蛋白 MAR、SV40 启动子及 CAT 报告基因;C:pCAT2 载体:含有  $\beta$  珠蛋白 MAR、CMV 启动子及 CAT 报告基因;D:pCAT3 载体:CMV 启动子及 CAT 报告基因。Poly A:多聚腺苷酸 A 尾。

图 1 不同启动子含 MAR 载体示意图

**1.2.3 细胞培养及转染** 以  $21 \times 10^6$ /孔的密度在 24 孔板接种 CHO 细胞,第 2 天将含构建的载体 pCAT1、pCAT2 和 pCAT3 载体进行转染,pCATG 作为对照。方法根据梭华-sofast 基因转染试剂盒说明书进行。转染 48 h 后,加入终浓度为 800  $\mu$ g/mL 的 G418,筛选 1 周后,不转染的对照细胞全部死亡,G418 培养液降低至 400  $\mu$ g/mL,持续筛选 1 周,大约 14 d 待细胞集落形成后,用 0.25%胰酶消化,对每组转染细胞转入 96 孔板内继续培养,待细胞密度到 80%~90%时,收集细胞,进行下一步分析。

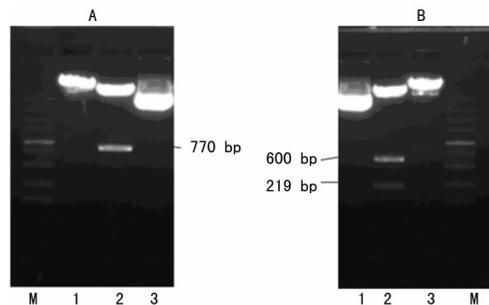
**1.2.4 CAT 基因表达分析** 参考文献[3,6]方法,收集稳定转化细胞,调整每组细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,根据 CAT 试剂盒说明进行检测。用预冷的 PBS 液洗涤 3 遍,加入 1 mL 裂解液(5 倍稀释)轻轻晃动,室温放置 30 min,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min,吸出上清液,每个标本吸出 200  $\mu$ L 加入 Ep 管中,并设阳性和阴性对照,其他参照试剂盒说明书检测 CAT 含量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 软件包进行统计分析,计

量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,不同组间比较采用单因素方差分析,各组间两两比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  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 pCAT1 载体分别用 Kpn I / Bgl II 酶切,琼脂糖凝胶电泳鉴定结果显示有 770 bp 片段切出,与预期片段的大小正好相符,表明成功构建了含 MAR(770 bp)片段的表达载体 pCAT1,由 SV40 启动子驱动。同样的将构建的 pCAT2 载体经 Bgl II /Hind III 双酶切后有 600 bp 和 219 bp 片段切出,其中 600 bp 片段是 CMV 启动子片段,219 bp 是 2 个 Hind III 酶切位点之间的内含子片段。



A:pCAT1 酶切消化。1:BglII 酶切;2:KpnI/BglIII 双酶切;3:未酶切;B:pCAT2 酶切消化。1:未酶切;2:Bgl II /Hind III 双酶切;3:Bgl II 酶切;M:DL5000 DNA marker。

图 2 pCAT1 和 pCAT2 酶切鉴定图

**2.2 不同表达载体的 CAT 含量分析** 将构建好的含不同启动子的表达载体 pCAT1、pCAT2、pCAT3 和 pCATG 转染 CHO 细胞,形成稳定表达株后,收集细胞并对 CAT 含量进行分析。结果显示:含 MAR 的 pCAT1 和 pCAT2 载体转染的细胞 CAT 含量比不含 MAR 的 pCATG 和 pCAT3 载体转染的细胞高,分别提高 2.14 倍和 1.25 倍;而由 SV40 启动子驱动含 MAR 表达载体 pCAT1 转染的细胞 CAT 含量明显比由 CMV 启动子驱动的 pCAT2 高 3.26 倍(图 3),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

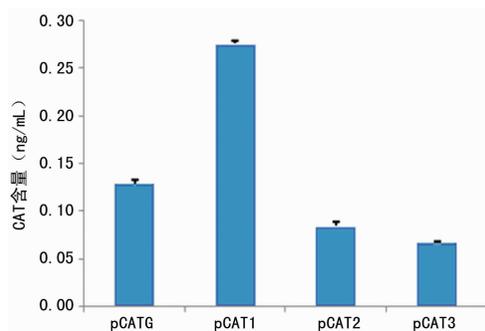


图 3 不同载体转化的细胞平均 CAT 含量

**3 讨 论**

外源基因在哺乳动物细胞中的表达与许多因素相关,如转录和翻译调控元件、RNA 剪接过程、mRNA 稳定性、基因在染色体上的整合位点、重组蛋白对细胞的毒性作用以及宿主细胞的遗传特性等。目前提高外源基因表达水平的研究主要集中在<sup>[12-14]</sup>:(1)启动子的改造;(2)适合的增强子;(3)选择载体-宿主的最优组合等。MAR 作为基因表达调控的重要顺式作用元件,不编码任何蛋白,它是存在于真核生物染色体上富含 A/T(>60%) 的 DNA 序列,长度为 300~3 000 bp,并含几个短的“共有序列”,如 A-box(AATAAAYAAA)、T-box(TTWT-

WTTWTT)、DNA 链解旋序列(AATATATTT 或 AATATT)和拓扑异构酶 II 结合位点(GTNWAYATTNATNN)等。MAR 参与 DNA 复制调控和转录调控等多种核生化过程, 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表达水平和稳定性<sup>[3-6]</sup>。

随着基因工程的发展, 构建高表达载体的需求也越来越多, 启动子的强度对于基因的表达起着决定性的作用, 是基因工程表达载体重要元件。启动子是位于结构基因 5'端上游的 DNA 序列, 能活化 RNA 聚合酶, 使之与模板 DNA 准确的结合并具有转录起始的特异性。启动子本身并不控制基因活动, 而是通过与转录因子结合来控制基因活动的。MAR 序列提高转基因表达的机制虽然不很清楚, 但也与转录因子有关。启动子和不同调控元件的组合会影响重组蛋白的表达, 启动子与 MAR 不同组合是否能够影响外源基因表达效率是值得探讨的问题。本研究发现在 CHO 细胞中含有 MAR 序列的载体表达效率均显著高于不含 MAR 序列的载体, 这与前期的研究一致<sup>[5-6]</sup>。此外, 本研究还发现, 由 SV40 启动子驱动的含有 MAR 序列的表达载体的基因表达水平优于 CMV 启动子驱动的含有 MAR 序列的表达载体。有学者对含 MAR 表达载体进行了研究, 发现 MAR 提高转基因表达与启动子的种类有关, 在所使用的 SV40 启动子、CMV 启动子、EF-1 $\alpha$  启动子、cMAR 和 iMAR 启动子中, SV40 启动子无论是提高转基因表达还是稳定性方面都优于其他启动子<sup>[11]</sup>。这表明在 CHO 细胞中, SV40 启动子与 MAR 组合能使外源基因获得稳定的高水平表达, MAR 对转基因的影响可能依赖于启动子。

本课题组前期研究已证明 MAR 介导的质粒表达载体在哺乳动物细胞中表达水平有不同程度的提高, 但载体中各调控元件的适配性及机制需进一步研究。本研究主要对 MAR 介导的质粒表达载体的启动子、宿主细胞的适配性及其机制进行研究, 主要采用分子生物学技术分别克隆不同的启动子, 分析不同启动子与载体的适配性, 探讨载体适配的通用高效启动子, 分析高效启动子结构及作用机制。本研究比较了 2 种不同的启动子和 MAR 对转基因表达的影响, 研究结果与 Ho 等<sup>[15]</sup>的一致, 在哺乳动物基因工程中, 常用的启动子还有很多, 如 EF-1 启动子、RSV 启动子、Ubc 启动子等, 这些启动子是否具有同样效应, 有待于进一步研究。此外, 本研究仅做了 CAT 报告基因, 其他的基因也需要进一步的研究。

## 参考文献

[1] Finn TE, Wang L, Smolilo D, et al. Transgene expression and transgene-induced silencing in diploid and autotetraploid Arabidopsis[J]. *Genetics*, 2011, 187(2):409-423.

[2] Pfaff N, Lachmann N, Ackermann M, et al. A ubiquitous chromatin opening element prevents transgene silencing in pluripotent stem cells and their differentiated progeny [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(3):488-499.

[3] 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[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25

(9):839-843.

[4] 张俊河, 张艳芳, 王芳, 等. 转基因下游 MAR 在稳定转化的 CHO 细胞中对基因表达的调控作用[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(18):8359-8361.

[5] 咎玉玺, 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[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(29):5623-5626.

[6] 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[J]. *基础医学与临床*, 2008, 28(11):1125-1128.

[7] Zhang JH, Wang XY, Wang TY, et al. Distance effect of matrix attachment regions on transgene expression in stably transfected Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(10):1937-1943.

[8] Majocchi S, Arironovska E, Mermod N. Epigenetic regulatory elements associate with specific histone modifications to prevent silencing of telomeric genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(1):193-204.

[9] Galbete JL, Buceta M, Mermod N. MAR elements regulate the probability of epigenetic switching between active and inactive gene expression[J]. *Mol Biosyst*, 2009, 5(2):143-150.

[10] Sakaguchi M, Watanabe M, Kinoshita R, et al. Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene[J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(7):621-630.

[11] Brown AJ, Sweeney B, Mainwaring DO, et al. Synthetic promoters for CHO cell engineering[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(8):1638-1647.

[12] Mariati, Ng YK, Chao SH, et al. Evaluating regulatory elements of human cytomegalovirus major immediate early gene for enhancing transgene expression levels in CHO K1 and HEK293 cells[J]. *J Biotechnol*, 2010, 147(3/4):160-163.

[13] Iwai R, Kumagai Y, Fujiwara M, et al. Combination of cytomegalovirus enhancer with human cellular promoters for gene-induced chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 110(5):593-596.

[14] Mays LE, Wilson JM. The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(1):16-27.

[15] Ho SC, Mariati, Yeo JH, et al. Impact of using different promoters and matrix attachment regions on recombinant protein expression level and stability in stably transfected CHO cells[J]. *Mol Biotechnol*, 2015, 57(2):138-144.

(收稿日期:2017-03-03 修回日期:2017-05-07)