

# 基于 RNA 复制子 GHRH 基因表达载体的构建及在 293 细胞中的表达

任晓慧<sup>1,3</sup>, 乔继光<sup>5</sup>, 刘松财<sup>1</sup>, 张明军<sup>1</sup>, 章倩倩<sup>1</sup>, 侯峰<sup>1</sup>,  
吕铁钢<sup>1</sup>, 周立光<sup>1</sup>, 吴琼<sup>1</sup>, 欧阳松应<sup>4</sup>, 张永亮<sup>1,2\*</sup>

(1. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642;  
3. 河北农业大学海洋学院, 秦皇岛 066003; 4. 中国协和医科大学, 北京 100730;  
5. 深圳市肉品卫生检验所, 深圳 518004)

**摘要:** 本研究将 GHRH 基因克隆到塞姆利基森林病毒(SFV)复制子质粒型表达载体 pCMV-Rep-lacZ, 构建了真核表达载体 pCMV-Rep-GHRH。采用脂质体介导将表达质粒 pCMV-Rep-GHRH 转染 293 细胞, 经 RT-PCR、IFA、Tricine-SDS-PAGE 和 Western Blot 检测, 证明表达质粒 pCMV-Rep-GHRH 在 293 细胞中正确地表达了 GHRH 多肽分子。本研究还利用放免法检测质粒载体转染细胞培养上清中 GHRH 浓度, 初步比较了 RNA 复制子载体 pCMV-Rep-GHRH 和普通载体(pIRES-GHRH 和 pcDNA3-GHRH)的表达效率, 结果表明, 转染 48 h, RNA 复制子载体表达 GHRH 的含量显著高于普通载体, 分别比 pIRES-GHRH 和 pcDNA3-GHRH 高出 36.12% ( $P < 0.05$ ) 和 67.94% ( $P < 0.05$ )。结论: 构建的真核表达载体 pCMV-Rep-GHRH 能够在真核细胞 293 中表达 GHRH 多肽分子, 且表达水平显著高于普通载体, 为下一步更好地调控动物生长以提高动物生产性能奠定基础。

**关键词:** 生长激素释放激素; 塞姆利基森林病毒; 复制子

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)04-0395-05

## The Construction of GHRH Gene Expression Vector Based on RNA Replicon and Its Expression in 293 Cell

REN Xiao-hui<sup>1,3</sup>, QIAO Ji-guang<sup>5</sup>, LIU Song-cai<sup>1</sup>, ZHANG Ming-jun<sup>1</sup>,  
ZHANG Qian-qian<sup>1</sup>, HOU Feng<sup>1</sup>, LÜ Tie-gang<sup>1</sup>, ZHOU Li-guang<sup>1</sup>,  
WU Qiong<sup>1</sup>, OUYANG Song-ying<sup>4</sup>, ZHANG Yong-liang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;  
2. College of Animal Science, Southern China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;  
3. College of Ocean, Hebei Agricultural University, Qinhuangdao 066003, China;  
4. Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; 5. Shenzhen  
Quarantine Station of Meat Product Health, shenzhen 518004, China)

**Abstract:** In this study, GHRH gene was cloned into pCMV-Rep-lacZ which digested by BamH I in order to replace the LacZ gene with our gene of interest and dephosphorylated by shrimp alkaline phosphatase, to creat pCMV-Rep-GHRH. pCMV-Rep-GHRH was transfected by lipofectin to prepared 293 cells. Results of RT-PCR, Tricine-SDS-PAGE, Western Blot and immunofluorescence antibody assay(IFA) showed that the target gene was expressed efficiently in transfected 293 cell. In order to compare the expressed efficacy between RNA replicon vector(pCMV-Rep-GHRH) and ordinary vector(pIRES-GHRH and pcDNA3-GHRH), we also detected the concen-

收稿日期: 2006-09-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270973)

作者简介: 任晓慧(1970-), 女, 山西天镇人, 副教授, 博士生, 主要从事基因工程研究, E-mail: renxiaohui710409@sina.com

\* 通讯作者: 张永亮, E-mail: zhangyl@scau.edu.cn

tration of GHRH from transfected cell supernatant by RIA in this study. The results showed that the concentration of GHRH from pCMV-Rep-GHRH transfected cell supernatant was higher ( $P < 0.05$ ) significantly than that of GHRH from pIRES-GHRH and pcDNA3-GHRH transfected cell supernatant respectively. We conclude that GHRH can be expressed efficiently in eukaryotic expression vector pCMV-Rep-GHRH transfected 293 cell. We can also draw another conclusion that the express level of RNA replicon vector was superior to ordinary vector. It may be a potential way to increase animal productivity.

**Key words:** growth hormone-releasing hormone; Semliki forest virus; RNA replicon

生长激素释放激素(Growth hormone releasing factor, GHRH)是生长激素的正调控因子,在畜牧业和医学领域具有重要的应用价值。但 GHRH 在体内的半衰期非常短,只有 10~20 min。张永亮对 GHRH 基因进行了改造,人工合成了全长 186 个碱基(包括信号肽)的 GHRH 基因,并构建了 pcDNA3-GHRH 真核表达载体,实现了在 CHO 细胞中的表达。用基因转染技术可以将 GHRH 质粒导入动物体内表达,具有促进生长的作用<sup>[1~5]</sup>。RNA 复制子载体源自能够自主复制的 RNA 病毒,外源基因取代病毒的结构蛋白基因,保留了其非结构蛋白(包括 RNA 复制酶)基因,复制酶可使 RNA 载体在细胞质中高水平复制,并实现外源基因的高水平表达。为探索此种新型载体用于 GHRH 外源蛋白高效表达研究的可能性,本研究构建了 RNA 复制子的 GHRH 真核表达载体(命名为 pCMV-Rep-GHRH),将其转染 293 细胞,从 RNA 水平和蛋白质水平对表达产物进行了检测,为寻求高效的基因表达系统以提高动物生产性能提供有价值的试验资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*E. coli* DH10B, *E. coli* DH5 $\alpha$  为本室保存; pIRES-GHRH 由本实验室刘松财博士构建, pcDNA3-GHRH 表达载体由本室张永亮教授构建<sup>[6]</sup>; pCMV-Rep-lacZ 表达载体为美国 Wolfgang Leitner 教授惠赠; pGEM-T 克隆载体、T4DNA 连接酶、脂质体为 Promega 公司产品; SAP 碱性磷酸酶购自宝泰克公司; 山羊抗人生长激素释放激素(GHRH)多克隆抗体, Santa Cruz 公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗山羊 IgG 购自北京鼎国生物制品有限公司。GHRH 神经肽放免药盒购自第二军医大学神经生物学教研室,在长春市中日联谊医院核医学实验室进行测定。

### 1.2 GHRH 基因的扩增和克隆

根据张永亮改造后 GHRH 基因序列和 pCMV-Rep-LacZ 的特点,选择 LacZ 基因两端的 *Bam*H I 作为外源基因插入位点,设计并合成两条 5'和 3'端含 *Bam*H I 酶切位点和保护碱基的引物,分别为: P1, 5'-CGGGATCCATGCTGCTCTGGGTGTTTC-3'; P2, 5'-CGGGATCCTTATTACCCCTGCTGCTGCTGAG-3'。以 pcDNA3-GHRH 为模板,PCR 扩增 GHRH 基因。反应条件:94 °C 预变性 2 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物与 pGEM-T 连接,连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态菌,挑取阳性重组子进行 PCR 和 *Bam*H I 酶切鉴定,将阳性质粒送大连宝生物公司进行序列测定。

### 1.3 pCMV-Rep-GHRH 表达载体的构建

将测序正确的重组质粒用 *Bam*H I 酶切,电泳后回收 GHRH 片段。同时用 *Bam*H I 酶切 pCMV-Rep-LacZ 载体,电泳后回收载体大片段,回收产物用碱性磷酸酶去磷酸化后,与目的片段用 T4 连接酶连接,电击法转化至大肠杆菌 DH10B 感受态菌,蓝白斑筛选重组质粒,酶切、PCR 鉴定正确后,需进行基因插入方向的鉴定。根据载体上靠近 LacZ 基因上下游的序列设计两条引物(P3:5'端载体引物; P4:3'端载体引物),分别如下: P3, GTGTCTTAAGACTAATATCGCG; P4, TTTGCTTTCTCTCCACAGT。用基因的 5'端和 3'端引物都分别和载体引物之一进行 PCR 扩增,2.5%琼脂糖上电泳 30 min,紫外灯下观察结果。

### 1.4 pCMV-Rep-GHRH 转染 293 细胞和 RNA 水平检测

采用脂质体介导将表达质粒转染 293 细胞,同时以不转染的 293 细胞作阴性对照。转染后 24、48、72、96 h 收集细胞培养上清,-70 °C 保存备用。转染后 48 h, Trizol 法提取细胞总 RNA,以 Oligo-

dT 为引物按常规法用 AMV 反转录酶进行反转录, 然后 PCR 扩增 GHRH 基因, 同时以  $\beta$ -actin 做内参。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

### 1.5 间接免疫荧光抗体检测(IFA)

培养 48 h 后, 弃去转染细胞的培养基, 用 pH 7.4 的 PBS 洗涤细胞 3 次。用预冷丙酮固定细胞, -20 °C 作用 30 min; PBS 洗 3 次后分别加入一抗, 37 °C 作用 2 h; PBS 洗 3 次后分别加入荧光二抗, 避光作用 1.5 h, 吸弃荧光二抗, 重新用 PBS 洗 3 次, 每孔加少量 50% 甘油, 荧光显微镜下观察。

### 1.6 Tricine-SDS-PAGE、Western Blot 分析

参考文献 [7] 进行细胞培养上清的 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析; 取培养上清进行 SDS-PAGE, 半干转移电泳槽转移至硝酸纤维素膜, 常规法进行 Western Blot 分析。

### 1.7 RNA 复制子载体和普通载体表达水平的比较

采用脂质体介导分别将两种普通真核表达质粒 pIRES-GHRH 和 pcDNA3-GHRH, 以及复制子载体 pCMV-Rep-GHRH 转染 293 细胞, 每种质粒转 6 个孔。转染后 48h 收集细胞培养上清, -70 °C 保存备用。放免法检测细胞培养上清中 GHRH 浓度, 具体步骤按试剂盒说明进行。采用 SPSS12.0 软件对数据进行平均值和方差分析, LSD 多重比较, 数据用  $mean \pm SE$  表示。

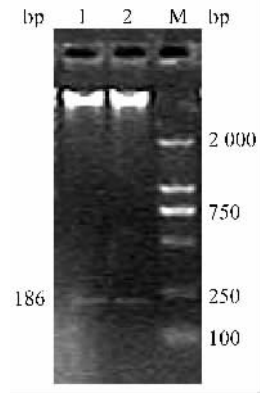
## 2 结 果

### 2.1 pCMV-Rep-GHRH 表达载体的构建

PCR 扩增得到大小与理论相符的 GHRH 片段, 序列测定结果与理论相符, 同源性 100%。构建的 pCMV-Rep-GHRH 用 *Bam*H I 酶切鉴定, 在 250 bp 附近有目的带(186 bp)出现(图 1); 用 P2 和 P3 引物、P1 和 P4 引物分别都扩增出目的带, 则判定为正向插入, 反之, 为反向插入(图 2)。构建的表达载体 pCMV-Rep-GHRH 如图 3 所示。

### 2.2 pCMV-Rep-GHRH 表达载体在 293 细胞中的表达

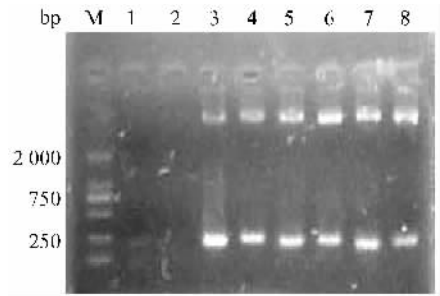
未转染细胞 RT-PCR 结果在 500 bp 处出现与理论相符的  $\beta$ -actin 条带(428 bp), 说明所提取的 RNA 合成了完整的 cDNA。转染细胞除了出现 428 bp 条带, 在 250 bp 附近还出现与理论相符的 GHRH 条带(196 bp), 表明表达质粒成功转染细胞, 并转录正确(图 4); 间接免疫荧光抗体试验结



1, 2. pCMV-Rep-GHRH; M. DL2000 marker

图 1 pCMV-Rep-GHRH 酶切鉴定

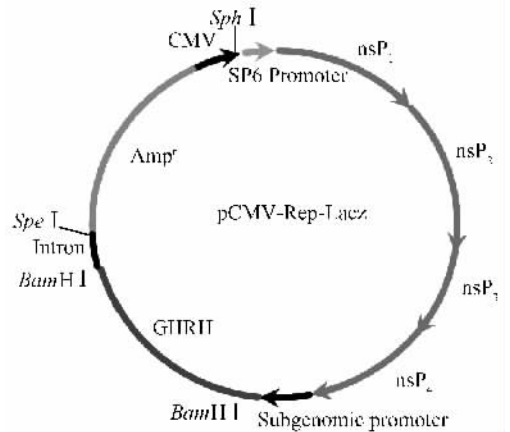
Fig. 1 Identification of pCMV-Rep-GHRH by digestion



M. DL2000 marker; 1, 2. Negative control; 3-8. pCMV-Rep-GHRH

图 2 pCMV-Rep-GHRH 方向鉴定

Fig. 2 Identification of insert orientation of pCMV-Rep-GHRH

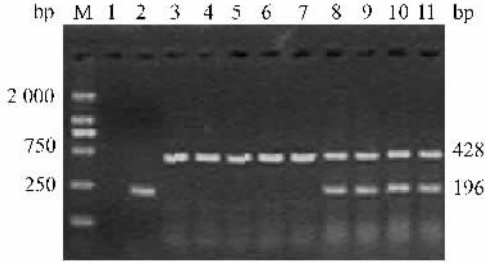


nsP1-4. SFV non-structural protein; SP6. SP6 RNA polymerase promoter; CMV. Cytomegalovirus immediately early promoter; GHRH. Growth hormone releasing hormone gene

图 3 pCMV-Rep-GHRH 质粒图谱

Fig. 3 The schematic map of pCMV-Rep-GHRH plasmid

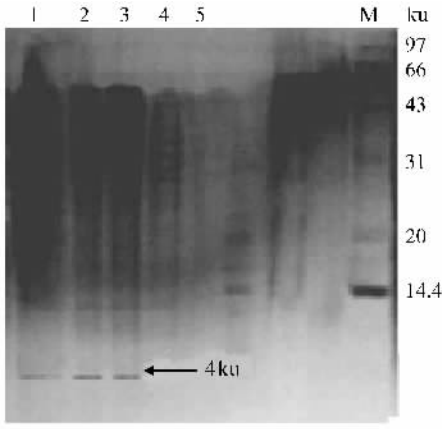
果,在转染 GHRH 质粒细胞观察到了特异的荧光,而阴性对照无特异性荧光出现,说明细胞中已成功表达了 GHRH 多肽分子;经 Tricine-SDS-PAGE (图 5)和 Western Blot(图 6)检测证实表达的目的蛋白分子量 4 ku,与理论相符。



M, DL2000 marker; 1. Negative control; 2. Positive control; 3-7. Untransfected 293 cell; 8-11. Transfected 293 cell

图 4 293 细胞总 RNA 的 RT-PCR

Fig. 4 RT-PCR of total RNA from transfected 293 cell



1-4. Transfected 293 cell supernatant after 96, 72, 48, 24 hours' transfection; 5. Untransfected 293 cell supernatant; M. Protein marker

图 5 转染细胞培养上清的 Tricine-SDS PAGE

Fig. 5 Tricine-SDS PAGE of transfected 293 cell supernatant

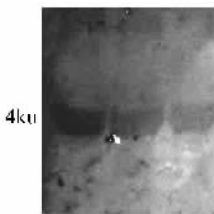


图 6 转染细胞上清的 Western Blot

Fig. 6 Western Blot of transfected 293 cell supernatant

### 2.3 RNA 复制子载体和普通载体表达水平的比较

放免法检测转染后 48 h 细胞培养上清中 GH-RH 浓度,结果表明(图 7):RNA 复制子载体表达的 GHRH 显著高于两个非复制子载体,分别比 pIRES-GHRH 和 pcDNA3-GHRH 高出 36. 12% ( $P<0.05$ )和 67. 94% ( $P<0.05$ )。

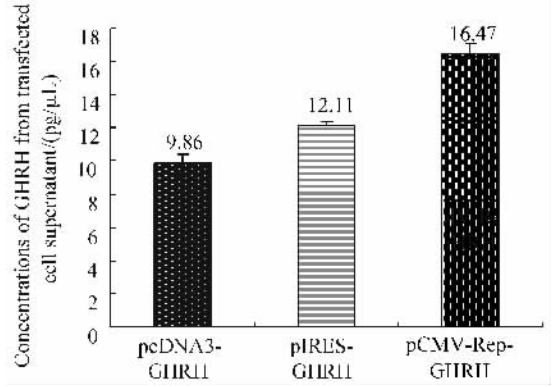


图 7 转染细胞培养上清中 GHRH 的浓度

Fig. 7 Concentrations of GHRH from transfected cell supernatant

### 3 讨论

用真核表达系统表达克隆基因是研究蛋白质功能和生产重组蛋白的有用工具。杆状病毒表达系统被广泛用于生产真核细胞表达的蛋白质,但只适用于昆虫细胞,有些蛋白质由于不正确转录后修饰而不适于在昆虫细胞中生产;痘苗病毒系统是一种高效的哺乳动物细胞表达载体,但需要制备重组病毒;酵母表达系统操作简单方便,但对外源基因的序列组成要求比较严格<sup>[8]</sup>。

近年来,由甲病毒(如 Sindbis 病毒及 SFV)衍生的 DNA/RNA 载体被用于外源基因的表达<sup>[9-11]</sup>。甲病毒基因组可以分为 2 个不同的区段,靠近基因组 5'末端的前 2/3 部分编码非结构蛋白,称为非结构区,该区共编码 4 种非结构蛋白;而 3'末端的后 1/3 称为结构区,编码数种结构蛋白,如衣壳蛋白 C 和膜糖蛋白 E1、E2 等。在感染的细胞中,4 种非结构蛋白起 RNA 复制酶的作用,可使 RNA 实现自我复制。非结构蛋白由基因组 RNA 转录并翻译得到;而结构蛋白由亚基因组 mRNA 翻译得到,亚基因组 mRNA 沉降系数为 26S,与基因组 RNA 结构区相同。基因组 RNA 复制得到负链 RNA 后,由亚基因组启动子启动亚基因组 mRNA 的转录。RNA 复制酶可以使 RNA 在胞浆中高水平复制,从

而极大地提高基因的表达水平。单细胞中 4 h 内有近  $2 \times 10^5$  RNA 产生。而且 RNA 在细胞浆内复制,排除了核的参与,由于宿主细胞缺乏内源性的反转录酶,不存在常规 DNA 质粒的整合宿主基因组的可能性,因此具有安全性好的特点。RNA 复制子载体包含病毒基因组 5' 和 3' 末端的非编码区,非结构蛋白基因编码区(编码复制酶的基因),其结构区被外源基因所取代,外源基因由亚基因组 mRNA 启动子控制表达。

本研究中 pCMV-Rep-lacZ 是由 pSFV3-LacZ 改造而来。pSFV3-LacZ 包含 SP6 启动子、SFV 编码 RNA 复制酶基因和亚基因组启动子。pCMV-Rep-lacZ 是在 pSFV3-LacZ 插入包含 *Sph* I 位点的 CMV 启动子,这可以达到两个目的:第一,使这一载体可用于真核细胞表达外源蛋白和抗原的研究<sup>[12]</sup>;第二,引入 *Sph* I 位点后,用 *Spe* I 和 *Sph* I 酶切载体,可以获得只包含编码复制酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶的序列,而不包含青霉素抗性基因序列,这可用作体外转录 RNA 的模板。RNA 复制子可由三种方式递送:体外转录的裸 RNA;构建成质粒 DNA 由细胞 RNA 聚合酶 II 体内转录成复制子 RNA(基于 DNA);将复制子 RNA 包装入病毒样颗粒。由于体外转录裸 RNA 很不稳定,难以操作;RNA 包装病毒颗粒,程序复杂。因此笔者选择以质粒 DNA 形式转染真核细胞,试验结果说明构建的 pCMV-Rep-GHRH 能够在细胞中表达目的多肽分子,且表达水平显著高于普通载体。笔者正在用小鼠和猪作为实验动物,考察该基因表达系统对动物生长调控的影响,为下一步筛选最佳的促生长表达系统,建立趋于实用化的高效提高动物生产性能的新技术提供有价值的试验资料。

#### 参考文献:

[1] 张永亮,连继勤,刘松财,等. 生长激素释放因子在动物肌肉组织的表达[J]. 中国兽医学报,2000,20(3):

245~247.

- [2] Zhang Y L. Gene endocrine gland; expression of growth hormone releasing factor in animal muscle [A]. Young Scientist Travel Fellowship Symposium. 18th international congress of biochemistry and molecularbiology[C]. Birminham,UK,2000.
- [3] 张永亮,连继勤,刘松财,等. 家兔肌肉组织表达外源生长激素释放因子对增重的影响[J]. 中国兽医学报,2003,23(1):56~59.
- [4] 张永亮,田保磊,白忠彬,等. 生长激素释放因子在家兔肝脏的定向表达[J]. 中国兽医学报,2003,23(4):358~360.
- [5] 白忠彬,张永亮,田保磊,等. 原生质体介导的外源 GRF 基因在家兔体内的表达[J]. 华中农业大学学报,2002,21(6):509~511.
- [6] 冯立文,张永亮,张玉静,等. 生长激素释放因子(GRF)的基因改造及化学合成[J]. 中国兽医学报,1998,18(6):538~540.
- [7] 王旭,何冰芳,李霜,等. Tricine-SDS-PAGE 电泳分析小分子多肽[J]. 南京工业大学学报,2003,25(2):79~81.
- [8] 吴丹,仇华吉,童光志,等. 几种表达系统的比较[J]. 生物技术通报,2002,2:30~34.
- [9] Wolfgang W, Han Ying, David A, *et al.* Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors[J]. Cancer Research, 2000, 60(1):51~55.
- [10] Elke S, Wolfgang W. Danger, death and DNA vaccines [J]. Microbes and Infection, 2004, (6):319~327.
- [11] Mangala J, David A, Kay T, *et al.* DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a sindbis virus-based vector[J]. Journal of Virology, 1998, 72(2):950~958.
- [12] Han Ying, Tal Z, Wang R, *et al.* Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine [J]. Nature Medicine, 1999, 7(5):823~827.