

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.002

腺病毒介导的双荧光素酶报告系统的构建及其应用

李振海¹, 吴红平^{2▲}, 徐增辉², 吕赛群², 施军霞², 刘品一¹, 李林芳², 金华君^{2△}, 吴孟超², 钱其军^{1,2} (1. 浙江理工大学生命科学学院 新元医学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310018; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 基因-病毒治疗实验室, 上海 200438)

[摘要] **目的:** 构建腺病毒介导的双荧光素酶报告系统, 并利用其筛选一种广谱高活性启动子。 **方法:** 将待检测启动子控制的萤火虫荧光素酶 (*Fluc*) 基因表达框插入腺病毒 E1 区, CMV 启动子控制的海肾荧光素酶 (*Rluc*) 基因表达框插入 E3 区作为内参, 构建腺病毒介导的双荧光素酶报告系统。检测不同病毒感染量条件下测得的启动子活性数据差异、组内差异, 难转染细胞内的转染情况, 分析该系统的操作简便性、稳定可靠性。应用该系统检测常用启动子 CAG、CASI 及新启动子 CCAU 在一系列细胞内的活性, 从中筛选出一种广谱高活性启动子。 **结果:** 成功构建了腺病毒介导的双荧光素酶报告系统; 不同 MOI 值下测得的各启动子相对活性值无显著差异 ($P > 0.05$); 在所实验的细胞内均能有效且准确地测定各启动子的活性, 且复孔间方差小; CCAU 在所实验的 9 株细胞中的表达活性显著 ($P < 0.05$) 或极显著地 ($P < 0.01$) 高于 CASI 以及 CAG 的表达活性。 **结论:** 构建获得的腺病毒介导双荧光素酶报告系统操作简便、稳定可靠、通用性强, 可作为启动子活性筛选的一种新方法; 利用该系统筛选获得了一种新的广谱高活性启动子 CCAU。

[关键词] 腺病毒; 双荧光素酶报告系统; 启动子; CCAU

[中图分类号] Q939.4; Q782

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)04-0420-07

The construction and application of an adenovirus mediated dual-luciferase reporter system

Li Zhenhai¹, Wu Hongping^{2▲}, Xu Zenghui², Lü Saiqun², Shi Junxia², Liu Pinyi¹, Li Linfang², Jin Huajun^{2△}, Wu Mengchao², Qian Qijun^{1,2} (1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China; 2. Laboratory of Gene-Virology Therapy, Easten Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To construct an adenovirus mediated dual-luciferase reporter system that can be used for screening promoters with high activity in a broad of cells. **Methods:** The testing promoter controlled expression cassette of Firefly luciferase and CMV promoter controlled expression cassette of Renilla luciferase were cloned into the E1 and E3 region of adenoviral vector respectively. The capacity of the system was assessed in the following three aspects: the activities of each promoter detected at different MOI, the variance within the same group, and the availability of the system for examining the promoter activity in cell lines that were hard to be transfected. Finally, the activities of CAG, CASI and a new CCAU promoters were examined by the system in 9 cell lines to find the promoter with high and broad-spectrum activity. **Results:** The adenovirus mediated dual-luciferase reporters system was successfully constructed. The activities of Rluc and Fluc of individual promoter had no significant difference at different MOI conditions ($P > 0.05$), and the variations in each test

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项资助 (No. 2013ZX09102-060), 上海工程技术研究中心专项资助 (No. 12DZ2251600)。Project supported by the Major Science and Technology Special Project for “Significant New Drug Creation” (No. 2013ZX09102-060), and the Shanghai Engineering Technology Research Center Project (No. 12DZ2251600)

[作者简介] 李振海 (1986 -), 男, 山东省菏泽市人, 硕士生, 主要从事肿瘤基因-病毒靶向治疗方面研究, E-mail: zhenhai_li@126.com; 吴红平 (1976 -), 女, 上海市人, 主管技师, 主要从事肿瘤基因-病毒靶向治疗方面研究, E-mail: wwhpp2002@163.com。▲为共同第一作者

[通信作者] 钱其军 (Qian Qijun, corresponding author), E-mail: qianqj@163.com; 金华君 (Jin Huajun, co-corresponding author), E-mail: hj-jin@hotmail.com。△为共同通信作者

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150728.1135.004.html>

group were small. The system worked effectively in K562, Jurkat, and primary skin cells, which are hard to be transfected. We found that the CCAU promoter produced higher luciferase activity than the CAG and CASI promoters in 9 cell lines tested ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively). **Conclusion:** The adenovirus mediated dual-luciferase reporters is an easy-to-use and reliable assay system suitable for assessing promoter activity. The new designed promoter CCAU has broad-spectrum strong activity and can be used in transgenic over-expression.

[**Key words**] adenovirus; dual-luciferase reporters assay system; promoters; CCAU

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(4): 420-426]

启动子 (promoter, Pr) 决定基因的转录效率^[1-2], 根据启动子活性的差异, 可分为组织特异性启动子与组成型启动子, 常用的强组成型启动子有 CMV^[3-4]、CAG^[5-6] 和 EF1^[7-8]。在启动子研究中, 为减少实验误差常同时使用萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase, Fluc) 和海肾荧光素酶 (renilla luciferase, Rluc) 构建双荧光素酶报告系统^[9]。常规手段是将两个报告基因分别连接到两个不同的质粒上共转染至目标细胞内, 但受多种因素影响, 误差较大。为克服该问题, 研究者将不同报告系统作为独立的表达框插入同一质粒载体中, 但两个较大的表达框存在于同一质粒中, 会引起互相干扰, 导致系统偏差; 且某些细胞株 (如 Jurkat、K562、原代细胞等) 转染效率低, 测得的荧光素酶活性数值难以达到线性区间, 导致实验重复性差。针对上述问题, 本课题组设计构建了腺病毒介导的双荧光素酶报告系统: 在腺病毒 E1 区包含目的启动子控制的 Rluc 表达框, 在 E3 区包含 CMV 启动子控制的 Fluc 表达框作为内参 (图 1)。两个报告基因表达框插入物理间隔相对较大的同一载体不同区段 (相距 > 20 000 bp), 以期减少不同表达框之间的干扰。

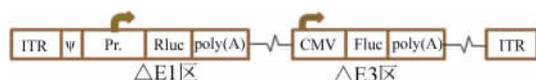


图 1 腺病毒双荧光素酶报告系统结构示意图

Fig. 1 Schematic of adenovirus mediated dual-luciferase reporters assay system

在肿瘤基因治疗中, 维持外源基因的高效稳定表达非常重要。人工嵌合启动子包含了一些顺式调控元件, 主要包括能发挥稳定表达作用的启动子核心序列, 以及能增强表达效率的上游增强子或下游内含子, 代表者是嵌合启动子 CAG (包含人 CMV 增强子-鸡 β -actin 启动子-兔 β -globin 内含子)。但 CAG 序列片段长约 1 700 bp, 过长的片段在某种程度上限制它的应用。因此, 尚需寻找长度适宜的广谱高活性启动子应用于肿瘤基因治疗。本研究设计

了一种长 1 396 bp 的新嵌合性启动子 CCAU, 将其构建至腺病毒双荧光素酶报告基因系统中, 期望筛选出一种广谱高活性启动子, 为肿瘤基因治疗提供基础实验材料。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

腺病毒骨架载体 pPE3-CMV-Fluc 和腺病毒穿梭质粒 pDC315-Rluc、pDC315-CMV、pDC315-CAG、pDC315-EF1a、pDC315-CASI 等质粒及 HEK293、HeLa、Hep3B、Huh7、HepG2、7404、PLC、H460、H1299、Jurkat、K562 等细胞均为本实验室保存, 小鼠原代肌肉细胞从新生小鼠的腿部肌肉制备。Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 试剂盒购自 Promega 公司, 限制性内切酶购自 NEB 公司, Lipofectamine[™] 2 000 购自 Life Technologies 公司, 胶回收试剂盒购自 MN 公司, 质粒大量制备试剂盒购自 Qiagen 公司, Solution I 购自 TaKaRa 公司, GeneRuler DNA Ladder Mix 购自 Fermentas 公司, H-DMEM、RPMI 1640、胎牛血清 (FBS)、胰酶、DMEM/F12 购自 Gibco 公司。引物委托华大基因公司合成 (表 1)。

表 1 PCR 引物

Tab. 1 Primers for PCR

Primer	Sequence
VT001	5'-CTGCCAATACCAACCTTA-3'
VT002	5'-ATATGAGCTCACAATGCTTC-3'
R01	5'-ACCGTTTACGTGGAGACTCG-3'
R02	5'-CCCATTTCATCAGGTGCAT-3'

1.2 质粒构建

用 *Xba* I + *Eco*R I 分别双酶切腺病毒穿梭质粒载体 pDC315-Rluc、pDC315-CMV、pDC315-CAG、pDC315-EF1a 和 pDC315-CASI, 酶切产物分别进行 DNA 凝胶电泳后回收得到携带 Rluc 基因的通用骨架载体以及 CMV、CAG、EF1a、CASI 等 4 种启动子。

委托上海捷瑞生物公司全基因合成嵌合启动子 CCAU。将 5 种启动子分别连入通用骨架载体,转化 DH5 α 感受态,挑选重组子,并酶切鉴定。将酶切鉴定正确的重组子送样测序,并将测序正确的相应质粒命名为 pDC315-CMV-Rluc、pDC315-CAG-Rluc、pDC315-EF1a-Rluc、pDC315-CASI-Rluc、pDC315-CCAU-Rluc, 分别大量制备以上 5 种质粒。

1.3 腺病毒构建

将腺病毒穿梭质粒 pDC315-CMV-Rluc、pDC315-CAG-Rluc、pDC315-EF1a-Rluc、pDC315-CASI-Rluc、pDC315-CCAU-Rluc 分别与腺病毒骨架载体 pPE3-CMV-Fluc 通过 Lipofectamine™ 2 000 试剂共转染至 HEK293 细胞,共转染 9 ~ 14 d 出现病毒空斑,经过 3 次病毒空斑纯化后分别收获 5 种非增殖型腺病毒。利用引物 VT001 + VT002 用 PCR 方法分别对 5 种病毒基因组进行野毒鉴定,利用引物 R01 + R02 进行启动子 Pr + Rluc 鉴定。将相应的无野毒的阳性克隆根据所含的启动子分别命名为 Ad-CMV-2luc、Ad-CAG-2luc、Ad-EF1a-2luc、Ad-CASI-2luc 和 Ad-CCAU-2luc,并进行扩增、纯化,利用 50% 组织培养感染剂量(TCID₅₀)法测定病毒滴度。

1.4 启动子活性的测定

本实验使用 Promega 的 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 底物试剂盒。实验操作步骤以 HEK293 细胞为例,HeLa、Hep3B、Huh7、HepG2、7404、PLC、H460、H1299、Jurkat、K562 和小鼠原代肌肉细胞细胞株的操作方法类似。

(1)铺板:将生长状态良好的低代数 HEK293 细胞按 1×10^4 /孔铺 96 孔板,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱 24 h;(2)加病毒:不同的孔中加入适量的不同的病毒并做标记,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱 24 h;(3)裂解细胞:加入适量细胞裂解液,摇床轻摇 5 ~ 10 min,将每孔中的液体转移到对应的专用白板中;(4)加底物 I :加入适量底物 I ,混匀,以酶标仪中检测 Fluc 的荧光发光强度,记为 Fluc;(5)加底物 II :加入适量底物 II ,混匀,以酶标仪检测 Rluc 的荧光发光强度,记为 Rluc;(6)数据分析:Rluc/Fluc 即为目的启动子的相对活性强度。

1.5 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析或 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 载体构建

2.1.1 重组质粒的酶切鉴定 选用 *EcoR*I + *Xba*I, *EcoR*I + *Pvu*II 和 *Hind* III + *Pvu*I 三组限制性内切酶对 pDC315-CASI-Rluc 进行酶切鉴定。理论上,pDC315-CASI-Rluc 经 *EcoR*I 和 *Pvu*II 双酶切产生 1 639 bp + 4 019 bp 两个片段,酶切产物的电泳结果图显示结果与预期相符(图 2 A);pDC315-CASI-Rluc 经 *Hind*III 和 *Pvu*I 双酶切产生 2 597 bp + 3 061 bp 两个片段,酶切产物的电泳结果图显示结果与预期相符(图 2 B)。pDC315-CASI-Rluc 经 *EcoR*I 和 *Xba*I 双酶切产生 1 061 bp + 4 597 bp 两个片段,酶切产物的电泳结果图显示结果与预期相符(图 2 C)。

pDC315-CMV-Rluc、pDC315-CAG-Rluc、pDC315-EF1a-Rluc、pDC315-CCAU-Rluc 等质粒载体用同样方法鉴定,鉴定结果均正确,可进行后续实验。

2.1.2 腺病毒中启动子 Pr + Rluc 的鉴定 电泳检测结果显示,各实验组(鉴定的相应无野毒的阳性克隆)和相应阳性对照的 PCR 片段大小相符(图 2 D)。

2.1.3 腺病毒滴度测定 腺病毒 Ad-CMV-Rluc、Ad-CAG-Rluc、Ad-EF1a-Rluc、Ad-CASI-Rluc、Ad-CCAU-Rluc 分别经过扩增、纯化后 TCID₅₀ 法测得滴度分别约为 1.9×10^9 、 3.2×10^9 、 1×10^9 、 2.7×10^9 、 3.2×10^9 PFU/ml。

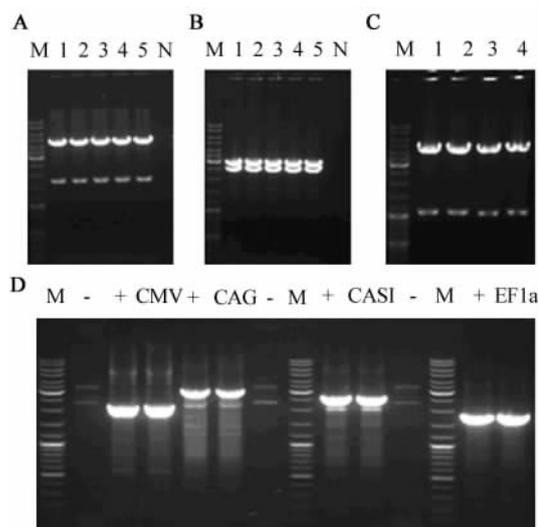


图 2 pDC315-CASI-Rluc 的 *EcoR*I + *Xba*I (A)、*EcoR*I + *Pvu*II (B) 和 *Hind* III + *Pvu*I (C) 酶切鉴定及 4 种腺病毒的目的基因鉴定(D)

Fig. 2 Identification of pDC315-CASI-Rluc plasmid by *EcoR*I + *Xba*I (A), *EcoR*I + *Pvu*II (B) and *Hind*III + *Pvu*I (C) digestion and identification of PCR production and corresponding positive controls (D) M:DNA marker;1-5:5 clones of pDC-CASI-Rluc plasmid;N:None

2.2 腺病毒双荧光素酶报告系统操作简便性、稳定性和通用性分析

2.2.1 不同病毒感染量测得的启动子活性值的差异分析 腺病毒 Ad-CMV-Rluc、Ad-CAG-Rluc、Ad-EF1a-Rluc 分别以 MOI = 5、8、12 感染 HEK293 细胞,以 MOI = 10、15、20 分别感染 HeLa 细胞,感染 24 h 后分别检测 HEK293、HeLa 中各 MOI 值对应的各启动子相对活性。结果(图 3)显示:不同 MOI 值下,同一启动子的相对活性 Rluc/Fluc 均无明显差异($P > 0.05$),表明应用该双荧光素酶报告系统进行测定,所使用的 MOI 值对测得的 Rluc/Fluc 相对值无显著影响,即启动子活性与加入的病毒量无关。

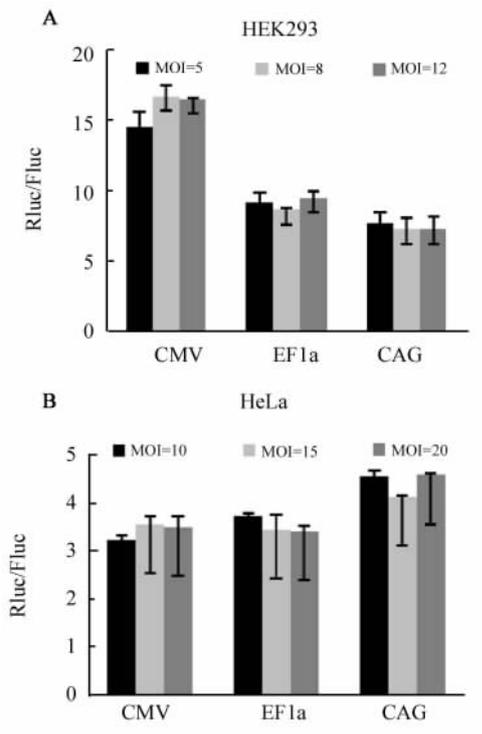


图 3 不同 MOI 值感染时启动子 CMV、EF1a、CAG 的活性
Fig. 3 Activities of CMV, EF1a, CAG at different MOI

A: HEK293 cells were infected respectively by adenovirus at MOI = 5, MOI = 8, MOI = 12, after 24 h the activities of CMV, EF1a, CAG were detected. B: HeLa cells were infected respectively by adenovirus at MOI = 10, MOI = 15, MOI = 20, after 24 h the activities of CMV, EF1a, CAG were detected

2.2.2 组内差异分析 腺病毒 Ad-CMV-Rluc, Ad-CAG-Rluc、Ad-EF1a-Rluc 感染 HEK293、HeLa 细胞 24 h 后,检测 CMV、EF1a、CAG 启动子的活性。实验结果显示,3 个常用启动子 CMV、EF1a、CAG 的活性与已报道的研究结果基本相一致^[7, 10-18](图 3),同时各自相应复孔间的方差值较小(表 2)。利

用腺病毒双荧光素酶报告系统进行 3 次独立检测实验,3 次检测获得的同种启动子相对活性值之间没有显著性差异($P > 0.05$)。以上实验结果表明:构建的腺病毒介导双荧光素酶报告系统准确有效、重复性较好,适用于检测启动子在普通细胞株中的表达活性。

表 2 CMV、EF1a、CAG 启动子在 HEK293、HeLa 中的相对活性及复孔间方差值

Tab. 2 Activities of CMV, EF1a, CAG promoters in HEK293 and HeLa and variances of repeats

Cell	CMV	EF1a	CAG
HEK293			
Well 1	15.02	8.59	7.38
Well 2	15.14	8.73	7.30
Well 3	15.67	8.63	7.19
Variance	0.346	0.072	0.095
HeLa			
Well 1	3.21	3.51	4.50
Well 2	3.33	3.44	4.57
Well 3	3.24	3.40	4.51
Variance	0.062	0.056	0.038

2.2.3 难转染细胞株中启动子活性的测定 某些悬浮生长的细胞株(如 Jurkat、K562 细胞)与原代细胞,质粒转染效率低,测得的荧光素酶绝对值难以达到线性区间,导致实验重复性差。本研究发现(图 4A),腺病毒 Ad-CMV-Rluc、Ad-CAG-Rluc、Ad-EF1a-Rluc 以 MOI = 20 感染 Jurkat 细胞,测得的 Rluc 值可达 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$,Fluc 值可达 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ (表 3);以 MOI = 15 感染 K562 细胞、MOI = 8 感染小鼠原代肌肉细胞测定的各荧光素酶活性绝对值也介于 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$,表明病毒能克服质粒难转染的障碍和高效感染上述细胞,该系统适合于难转染细胞中启动子的活性测定。

同时,考察 CMV、EF1a、CAG 启动子在 Jurkat、K562 细胞中的持续表达状况。结果(图 4B、4C)显示,在感染 24、48 h 时,双荧光素酶的荧光强度绝对值与相对值均呈递增趋势,在感染 96 h 时双荧光素酶的荧光强度绝对值与相对值维持在 48 h 时间点的水平或者有所降低。

2.3 应用腺病毒双荧光素酶报告系统筛选获得广

谱高活性启动子 CCAU

(1) 在 Hep3B、H1299 以及小鼠原代肌肉细胞中, CASI 启动子的活性强度与 CAG 启动子没有显著性差异 ($P > 0.05$); 在 Huh7、7404、H460 细胞中 CASI 启动子的活性强度极其显著地高于 CAG ($P < 0.01$, 图 5)。表明 CASI 启动子的确是一种广谱高活性嵌合启动子, 实验结果和文献[10]报道相一致。(2) 而对于改造的启动子 CCAU, 其在 Hep3B、Huh7、7404、PLC、H460、H1299、Jurkat 和小鼠原代肌肉细胞中活性强度分别是 CAG 的 6.1、2.6、15.7、1.7、1.8、3.8、1.3、1.1、1.9 倍; 是 CASI 活性强度的 7.7、1.3、1.3、1.7、2.6、1.9、1.3、1.5、1.7 倍(图 5)。

表 3 Jurkat 细胞中 4 种启动子在 24、48、96 h 时的 Rluc/luc 值

Tab.3 Rluc/Fluc of every promoter at 24, 48, 96 h in Jurkat cells

Promotor	24 h	48 h	96 h
CMV	10 135/2 161	182 803/6 821	223 070/7 720
EF1a	415 273/8 316	373 953/8 115	426 297/8 504
CAG	126 962/4 666	359 152/5 371	276 085/5 018

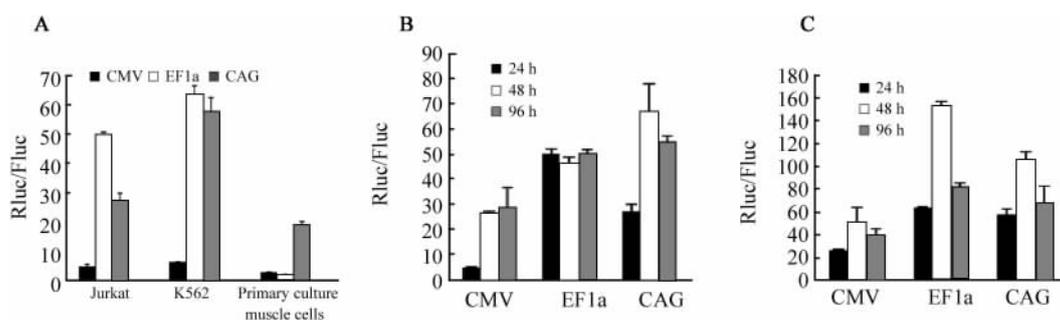


图 4 CMV、EF1a、CAG 在 Jurkat、K562 及小鼠原代肌肉细胞中的表达活性

Fig. 4 Activities of CMV, EF1a, CAG in Jurkat, K562 and primary culture muscle cells of mice

A: Activities of CMV, EF1a, CAG in Jurkat, K562 and primary culture muscle cells of mice 24 h;
 B: Activities of CMV, EF1a, CAG in Jurkat at 24, 48, 96 h; C: Activities of CMV, EF1a, CAG in K562 at 24, 48, 96 h; Rluc/Fluc: The relative activity of promoter

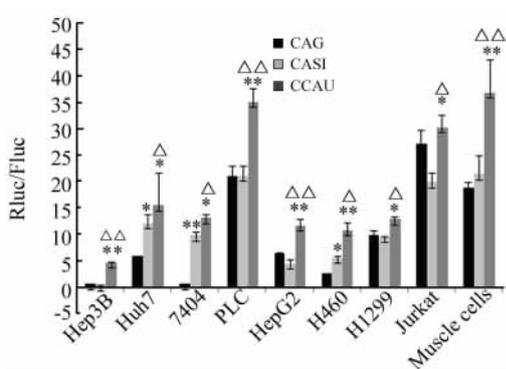


图 5 CAG, CASI, CCAU 启动子在待检测细胞中的表达活性

Fig. 5 Activities in assayed cells of promoter CAG, CASI and CCAU

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CAG

Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$ vs CASI

与 CASI 相比, CCAU 的长度虽然增加了 341 bp, 但是活性却得到了显著提高 ($P < 0.05$); 与 CAG 相比, CCAU 长度不仅缩短了 310 bp, 同时活性也得到了显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。因此, 利用腺病毒双荧光素酶报告系统筛选获得了一种新的广谱高活性启动子 CCAU。

3 讨论

本研究构建的腺病毒介导的双荧光素酶报告系统在理论上和实际应用中均具有先进性。

首先, 该系统以腺病毒感染代替了常规的质粒转染。腺病毒具有感染宿主细胞广、介导外源基因高效表达的优势, 成功克服了某些悬浮细胞与原代细胞转染效率低、难以测定启动子活性的障碍。且相对于质粒转染, 腺病毒能在更长时间内介导外源基因表达, 因而有利于在更长的时间段内监测启动子活性, 反映启动子动态变化规律。本研究应用该

系统检测了启动子 CMV、EF1a、CAG 在 Jurkat、K562、小鼠肌肉原代细胞中的活性,获得了理想的预期结果。

其次,分别将两个报告基因表达框插入物理间隔相对较大的同一载体中(目的启动子控制的 Rluc 表达框位于腺病毒 E1 区,作为内参的 CMV 启动子控制的 Fluc 表达框在腺病毒 E3 区,两者相距 20 kb 以上),既避免了双质粒共转染的系统性误差,又有效降低同一载体相距较近的表达框之间的干扰。本研究测定了启动子 CMV、EF1a、CAG 在一系列常用细胞中的活性,结果与预期基本相符,且组内方差较小。同时发现,在一定感染量范围内,Rluc/Fluc 相对活性不受病毒 MOI 值的影响,因而病毒无需通过繁杂的纯化与滴度测定步骤,有效地减少操作环节,在提高实验结果精确性的同时,节省了时间、精力和经济成本。并且,随培养时间延长,各启动子的强度增强趋势固定(但在特定细胞中的表达强度决定于启动子的特性),表明该系统能在较长的时间段内检测启动子活性的动态变化。

CASI 启动子长 1 055 bp,是一种类似于 CAG 的广谱高活性嵌合启动子^[10],包括鼠 CMV 增强子-鸡 β -actin 启动子-泛素增强子(图 6)。本研究构建的这一嵌合性新启动子 CCAU(图 6),长 1 396 bp,包含鼠 CMV 增强子-人 CMV 增强子-鸡 β -actin 启动子-泛素增强子。将 CCAU 启动子构建至腺病毒双荧光素酶报告基因系统中,利用双荧光素酶报告基因系统检测 CAG、CASI、CCAU 在所有实验的 9 株细胞中的活性,证实 CCAU 是广谱高活性启动子。

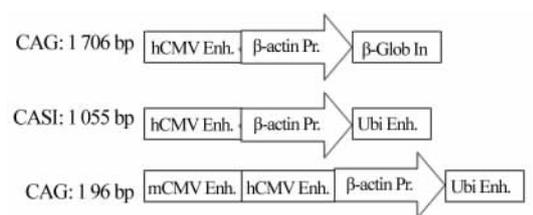


图 6 CAG, CASI, CCAU 启动子的结构

Fig. 6 Structure of CAG, CASI, CCAU

CAG promoter is composed of human CMV enhancer and chicken β -actin promoter and rabbit β -globin intron;

CASI is composed of mouse CMV enhancer and chicken β -actin promoter and ubiquitin enhancer; CCAU is composed of mouse CMV enhancer and human CMV enhancer and chicken β -actin promoter and ubiquitin enhancer

本研究构建的腺病毒双荧光素酶报告系统相对传统的质粒荧光素酶报告系统,前者是病毒,后者是

质粒,不能做到在同一实验中直接进行优劣性比较。但是我们可以从操作的简便性、结果的稳定性、可靠性以及准确性、通用性等方面进行间接比较、评价。本研究成功构建的腺病毒介导的双荧光素酶报告系统操作简便、稳定可靠、通用性强,可作为启动子活性测定的一种新方法。应用该腺病毒介导双荧光素酶报告系统筛选获得了一种新的广谱高活性启动子 CCAU。

[参考文献]

- [1] Orphanides G, Reinberg D. RNA polymerase II elongation through chromatin [J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 471-476.
- [2] Hampsey M. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(2): 465-503.
- [3] Boshart M, Weber F, Jahn G, et al. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus [J]. *Cell*, 1985, 41(2): 521-530.
- [4] Löser P, Jennings GS, Strauss M, et al. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: Involvement of NF κ B [J]. *J Virol*, 1998, 72(1): 180-190.
- [5] Okabe M, Ikawa M, Kominami K, et al. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells [J]. *FEBS Lett*, 1997, 407(3): 313-319.
- [6] Alexopoulou A, Couchman J, Whiteford J. The CMV early enhancer/chicken β actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors [J]. *BMC Cell Biol*, 2008, 9(1): 2.
- [7] Qin J Y, Zhang L, Clift KL, et al. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(5): e10611.
- [8] Guo Z, Wang L, Eisensmith R, et al. Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer [J]. *Gene Ther*, 1996, 3(9): 802-810.
- [9] Sherf BA, Navarro SL, Hannah RR, et al. Dual-luciferase reporter assay: An advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays [J]. *Promega Notes*, 1996, 57(2): 2-8.
- [10] Balazs AB, Chen J, Hong CM, et al. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis [J]. *Nature*, 2011, 481(7379): 81-84.
- [11] Weber EL, Cannon PM. Promoter choice for retroviral vectors: Transcriptional strength versus trans-activation potential [J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(9): 849-860.
- [12] Teschendorf C, Warrington Jr K, Siemann DW, et al. Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(6A): 3325-3330.
- [13] Bella Kim BK, Seongsoo Hwang SH, Suna Ock SO, et al. Com-

- parative assessment of activities of promoters in various porcine-derived cells [J]. Rep Dev Biol, 2012, 36(2): 157.
- [14] Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells [J]. Mol Ther, 2000, 2(5): 458-469.
- [15] Sutherland LC, Williams GT. Viral promoter expression in CEM-C7 and Jurkat human T-lymphoid cell lines [J]. J Immunol Methods, 1997, 207(2): 179-183.
- [16] Hofmann C, Sandig V, Jennings G, et al. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(22): 10099-10103.
- [17] Pearson AS, Koch PE, Atkinson N, et al. Factors limiting adenovirus-mediated gene transfer into human lung and pancreatic cancer cell lines [J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(12): 4208-4213.
- [18] Zhou CC, Chang J, Mi T, et al. Targeted expression of Cre recombinase provokes placental-specific DNA recombination in transgenic mice [J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e29236.
- [收稿日期] 2015 - 05 - 30 [修回日期] 2015 - 06 - 25
[本文编辑] 黄静怡

· 科技动态 ·

DNA 损伤通过 STING 致敏 I 型干扰素系统促进固有免疫反应

DNA 储存着生物体赖以生存和繁衍的遗传信息,因此维护 DNA 分子的完整性是至关重要的。外界环境和生物体内部的一些因素会导致 DNA 分子的损伤或改变,如损伤不能被及时修复,则会以不同的 DNA 形式释放到细胞质中而被模式识别受体或一些 DNA sensor 识别,进而触发 I 型干扰素(interferon, IFN)的产生或其他炎症因子的释放,清除细胞质中的 DNA 同时引起炎症反应。如果不能被及时有效的清除,则会迁延成为慢性炎症、自身免疫性疾病甚至肿瘤。2015 年 2 月 *Immunity* 刊登了来自瑞典分子感染医学实验室的 Nelson Gekara 实验小组关于 DNA 损伤促进固有免疫反应的研究工作。

文章围绕共济失调毛细血管扩张症(ataxia-telangiectasia, AT)展开研究。AT 是一种常染色体隐性遗传的原发性免疫缺陷病,患者会出现脑组织损伤导致共济失调,并累及神经、血管、皮肤等多种组织器官。同时 AT 患者的免疫功能下降,对呼吸道细菌感染敏感,然而却很少发生严重的病毒感染,这其中的免疫学机制还不清楚。AT 患者会有 ATM(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)基因的缺失,ATM 蛋白是一种蛋白丝苏氨酸磷酸激酶,在 DNA 双链断裂损伤修复的过程中发挥重要作用。AT 患者由于 ATM 的缺失导致 DNA 损伤不能够被及时有效的修复,从而有较高的发生自身免疫病和肿瘤的风险。作者围绕 ATM 缺失后 DNA 损伤不能被修复来研究 ATM 与固有免疫反应的关系。

作者首先发现 ATM 缺失的 AT 患者血清孵育培养过的 HEK293 细胞抗病毒感染的能力增强,并发现 ATM 缺失的 AT 患者处于一种自发的炎症状态。ATM 缺失的 AT 患者成纤维细胞在静息状态下 I 型 IFN 产生增多,并在病毒感染后产生更多的 IFN 来抵御感染。作者通过 ATM 基因敲除小鼠体内、体外实验,得到了与 AT 患者样本体外实验同样的结果。作者又在体外建立了 DNA 损伤模型,发现 DNA 损伤同样能够在静息状态下引发 I 型 IFN 的产生,并在感染时活化更强的固有免疫反应来抵御病原微生物感染。作者把这种现象归结为 DNA 损伤对 I 型 IFN 系统的致敏作用。致敏(prime),是指在静息状态下会有低水平的 IFN 产生,IFN 被受体识别后能够促进一系列干扰素刺激基因的转录活化,从而使细胞对于外界感染或危险刺激更加敏感,能够快速启动更强的固有免疫反应。

作者进一步研究发现,ATM 缺失相关 DNA 损伤后,会有大量单链 DNA 和少量双链 DNA 释放到细胞质中,被 cGAS 和 IFI16 这两个 DNA sensor 识别,从而活化 STING 相关信号通路,促进静息状态下 I 型 IFN 的产生,进一步致敏 I 型 IFN 系统,促进多种模式识别受体和相关接头分子的表达。那么在后续病毒和李斯特菌感染时,能够更强的激活 TBK1-IRF3、MAPK 以及 NF- κ B 信号通路,促进固有免疫反应,产生更强地抵御外界感染的能力。

Nelson 小组的研究揭示了 ATM 缺失后对 I 型 IFN 的致敏作用,并对相关机制进行了较为明确的阐述,从而为 AT 患者发病机制的研究提供了新的线索;并且也使人们对固有免疫识别 DNA 损伤的作用机制有了新的认识。在实验过程中作者采用了人类疾病样本和人类原代成纤维细胞,使研究具有更大的临床意义。

[孟君 摘译,刘星光 审阅. Härtlova A, Erttmann SF, Raffi FA, et al. *Immunity*, 2015, 42(2): 332-343]