

一种基于三顺反子表达载体的生物素诱导表达系统的建立*

叶玲玲 李世崇 刘红 刘兴茂 何文俊 陈昭烈[△]

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 目的:建立一种以无毒的生物素为诱导剂的哺乳动物细胞诱导表达系统。方法:通过基因组 PCR 或重叠延伸 PCR 获得该系统的三个基本构件:大肠杆菌生物素连接酶(BirA)、链亲和素-四环素依赖的抑制因子融合蛋白(SA-TetR)和生物素化信号-VP16 转录激活结构域融合蛋白(Avitag-VP16)。将上述基因连入三顺反子表达载体,与响应载体一起共转染 293f 细胞,以 EGFP 为报告基因,检测 EGFP 荧光强度随培养体系中生物素浓度变化的情况。结果:随着生物素浓度的增加,目的基因表达出现 OFF-ON-OFF 的变化,诱导状态下的 EGFP 荧光强度约为抑制状态下的 3 倍。结论:可通过调节生物素浓度对目的基因的表达进行可逆的调节,该系统是一种有应用前景的诱导表达系统。

关键词 生物素;三顺反子;哺乳动物细胞;诱导表达系统;EGFP

中图分类号:Q813 Q75 Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)08-1404-05

Establishment of a Biotin-inducible Expression System Based on Tricistronic Expression Vector*

YE Ling-ling, LI Shi-chong, LIU Hong, LIU Xing-mao, HE Wen-jun, CHEN Zhao-lie[△]

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

ABSTRACT Objective: To establish a mammalian inducible expression system with the non-toxic biotin as an inducer. **Methods:** This system comprised three key components: E. coli biotin ligase (BirA), streptavidin-tetracyclin repressor (SA-TetR) and biotinylation signal-VP16 transactivation domain (AT-VP16). The three genes were introduced into a tricistronic expression vector, and co-transfected 293f cells together with the response vector. The EGFP taken for a reporter gene, EGFP fluorescent intensities were detected under different biotin concentrations. **Results:** With the increasing of biotin concentrations, EGFP displayed sequential OFF-ON-OFF expression profiles, the fluorescence intensity of EGFP in the induced state was about 3 times that in the inhibited state. **Conclusion:** The expression of the target gene could be reversibly regulated by adjusting the concentration of biotin. This is a promising inducible expression system.

Key words: Biotin; Tricistronic; Mammalian cells; Inducible expression system; EGFP

Chinese Library Classification(CLC):Q813 Q75 Q78 **Document code:**A

Article ID:1673-6273(2011)08-1404-05

前言

通过诱导表达来实现目的基因表达的定量调控现已广泛应用于基础和應用研究中,包括功能基因组研究、组织工程、系统生物学、药物研发、基因治疗、生物药物生产和功能材料的设计等^[1-4]。为实现与宿主细胞代谢具有最大的相容性,第一代哺乳动物细胞兼容的调控系统使用具有药物活性的诱导剂分子,如抗生素、免疫抑制药物或激素及其衍生物^[5-7]。尽管这些条件表达系统于初创阶段在培养体系和转基因动物中表现出了良好的调控效果,但临床副作用和抗生素抗性病原体的出现使得它们在基因治疗和生物药物生产中的应用受到了限制^[8]。新一代的转基因控制系统使用临床上惰性的诱导剂分子,如精氨酸或维生素 H(亦称生物素)^[9,10]。其中,生物素因其绝对无毒、价格低廉,并且是 FDA 批准的用于生物药物生产的生产培养基的组分,是一种可用于哺乳动物细胞条件转基因控制的理想的诱导分子。

本研究采用大肠杆菌生物素连接酶(BirA)、链亲和素-四

环素依赖的抑制因子融合蛋白(SA-TetR)和生物素化信号-VP16 转录激活结构域融合蛋白(Avitag-VP16)为基本构件,借助多顺反子表达载体,建立了一种以生物素为诱导剂的哺乳动物细胞诱导表达系统。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器来源

PCR 聚合酶 pyrobest 和 LA Taq 以及 T4 DNA 连接酶购自 Takara;各种核酸内切酶和碱性磷酸酶 CIP 购自 NEB;DMEM/F12(1:1)培养基、胰蛋白酶、谷氨酰胺购自 GIBCO;新生牛血清(new bovine serum, NBS)购自兰州民海;G418 购自 Amresco;潮霉素 B(Hygomycin B)购自 Roche;质粒提取和凝胶回收试剂盒购自天根;转染试剂 LipofectamineTM2000、OPT-I-MEM I 培养基和质粒 pcDNA3.1(+)购自 Invitrogen;streptavidin-agarose 购自 Sigma;无生物素的 DF 培养基(DF(Bio-))购自北京钮因华信科技发展有限公司。人胚肾细胞(HEK-293f)购自 Invitrogen。流式细胞仪购自美国 B&D 公司,型号为 FAC-

* 基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项(No. 2009ZX09503-011)

作者简介 叶玲玲(1979-)女,博士,研究方向 动物细胞工程 电话 010-66948820 E-mail: lingling_ye@163.com

[△]通讯作者 陈昭烈 E-mail: chenzz23@sina.com

(收稿日期 2010-11-5 接受日期 2010-12-13)

SCalibur。

1.2 诱导表达系统所需各种元件的获得

大肠杆菌生物素合成酶 BirA 基因通过 PCR 从 E.coli DH5 α 菌株的基因组扩增获得(引物 BirA-5 和 BirA-3, 见表 1, 序列参考 GenBank: CP000948.1) 得到的片段经 XhoI/XbaI 酶切后连入同样酶切的 pcDNA3.1(+)载体, 命名为 pc-BirA。

生物素化信号 Avitag 序列通过两条引物 AT-Nhe 和 AT-KpnI(见表 1)退火得到, 两引物每种 10 nmol, 加入到 1 \times pyrobest buffer 中, 65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 然后将体系在室温下缓慢冷却, 回收后即得到两端分别为 NheI 和 KpnI 粘末端的 Avitag 片段。含四个 VP16 转录激活结构域的片段(VP4)通过 KpnI/HindIII 酶切载体 pc-Hy-GVP4^[11] 获得。以上片段一起连入 NheI/HindIII 酶切的 pcDNA3.1(+)载体, 得到表达 Avitag-VP4 融合基因的载体, 命名为 pc-AV。

链亲和素基因通过重叠延伸 PCR 获得, 引物序列见表 1。具体步骤如下: 引物 SA1-1 与 SA1-2 各 20 pmol 加入到 100 μ l PCR 体系中, 经延伸得到的产物称为 SA1。其他各组引物同样延伸, 得到 SA2、3、4、5、6。取产物 SA1 和 SA2 各 50 μ l 混合, 再加入 0.5 μ l Pyrobest 聚合酶, 延伸得到 SA1+2。同样, 产物 SA3 和 SA4 得到延伸 SA3+4, SA5 和 SA6 得到 SA5+6。然后取产物 SA3+4 和 SA5+6 各 50 μ l 混合, 再加入 0.5 μ l Pyrobest 聚合酶, 延伸得到 SA3-6。最后, 产物 SA3-6 与 SA1+2 各 5 μ l 混合, 用引物 SA-EcoRI、SA6-2 扩增, 即得到全长的链亲和素, 5' 和 3' 末端分别为 EcoRI 和 KpnI 酶切位点。TetR 片段克隆自 pTet-off 载体(引物 TetR-5 和 TetR-3)。EcoRI/KpnI 酶切 SA 片段, KpnI/NotI 酶切 TetR 片段, 二者与 EcoRI/NotI 酶切的 pcDNA3.1 (+) 载体连接, 得到表达 SA-TetR 融合基因的载体, 命名为 pc-ST。

表 1 本文中使用的单链寡核苷酸引物序列
Table 1 Primers used in this article

Primers	Nucleotide(5'3')
BirA-5	ATGCCTCGAGATGAAGATAACACCGTGCC
BirA-3	ATGCTCTAGATTATTTTTCTGCACTACGCAGG
AT-NheI	CTAGCATGGGTCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAAGGTAC
AT-KpnI	CTTCGTGCCATTTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTCCAGACCCATG
SA1-1	ATGGACCCGTCGAAGACTCCAAAGCTCAGGTTTCTGCAGCCGAAGCTGGTATCACTGG
SA1-2	GGTCACAATGAAAGTGGACCCAGTTGGTTATACCAGGTGCCAGTGATACCAGCTTCGG
SA2-1	GTCCACTTTCATTGTGACCGCTGGTGCAGGAGCTCTGACTGGCACCTACGAATCTG
SA2-2	CGGCCAGTCAGTACGTAGCGGGATTCTGCGTTACCAACCGCAGATTCGT AGGTGCCAG
SA3-1	CTACGTACTGACTGGCCGTTATGACTCTGCACCTGCCACCGATGGCTCT GGCACCGCTC
SA3-2	GCATTACGATAGTTGTTTTTCCAAGCCACAGTCCAGCCAGAGCGGTGCCAGAGCCATC
SA4-1	GGAAAAACAACACTATCGTAATGCCACAGCGCCACTACGTGGTCTGGCCAATACGTTGGC
SA4-2	GGATGTTAACAGCCACTGAGTGTGATACGAGCCTCAGCACCCGCAACGTATTGGCCAG
SA5-1	CAGTGGCTGTTAACATCCGGCACTACCGAAGCGAATGCATGGAAATCGACACTAGTAGC
SA5-2	GCTCGCAGCAGAAGGCTTAACTTTGGTAAAGGTGTCATGACCTACTAGTGTGATTTCC
SA6-1	GCCTTCTGCTGCGAGCATTGATGCTGCCAAGAAAGCAGGCGTAAACAACGGTAACCC
SA6-2	GATCGGTACCTTGCTGAACAGCGTCCAGAGGGTTACCGTT GTTTACGCC
SA-EcoRI	GATCGAATTCATGGACCCGTCGAAGGACTC
TetR-5	GATCGGTACCTCTCGCCTGGACAAGAGCAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGC
TetR-3	GATCGCGGCCGCTCAGCCGCTTTCGCACTTCAGCTGCTTTTCTAATCCGCATATGATC
CMVstar-5	GATCACGCGTTTTACCACTCCCTATCAGTG
CMVstar-3	GATCGTAGCCCTATAGTGTGATTAGGCTGGATCGGTCCCGGTG
IRES-5	ATGCGCGCCGCGCCCTCTCCCTCCCCCCCC
IRES-3	ATGCCTCGAGTGTGGCCATATTATCATCTGTG

1.3 三顺反子表达载体的构建

从 pIRES2-EGFP 载体上扩增 IRES 序列 (引物 IRES-5 和 IRES-3, 见表 1), 经 NotI/XhoI 酶切后连入同样酶切的 pc-Hy 载体(本课题组构建, 将 pcDNA3.1(+)载体的新霉素抗性基因

neo^r 替换为潮霉素抗性基因 hyg^r), 得到双顺反子表达载体 pc-IRES-Hy。然后, 将上述 IRES 片段补平后连入 BamHI 酶切并补平的 pc-IRES-Hy, 得到三顺反子表达载体 pc-2I-Hy。

1.4 生物素诱导表达系统载体的构建

NheI/KpnI 酶切载体 pc-AV 回收 200 bp 左右的 Avitag-VP4 融合基因,补平后连入 *NheI* 酶切并补平的 pc-2I-Hy 载体,正确连接产物命名为 pc-AV-2I-Hy。*XhoI/XbaI* 酶切 pc-BirA 载体,回收 ~900bp BirA 基因,连入同样酶切的 pc-AV-2I-Hy 载体,正确连接产物命名为 pc-AV-2I-BirA-Hy。*EcoRI/NotI* 酶切 pc-ST 载体,回收 ~1100 bp SA-TetR 融合基因,补平,连入 *EcoRV* 酶切并补平的 pc-AV-2I-BirA-Hy 载体,得到生物素诱导表达系统元件的表达载体 pc-2I-ASB-Hy。

TetR 响应的启动子 $P_{iCMV^{*1}}$ 克隆自 pTRE2 载体 (引物 CMVstar-5 和 CMVstar-3,见表 1),上述片段经 *MluI/NheI* 酶切后连入同样酶切的 pcDNA3.1(+),得到生物素调控响应载体 pc-Neo-Star。再将 *BstXI/XhoI* 酶切自 pIRES2-EGFP 载体的 EGFP 片段连入同样酶切的上述载体中,得到以 EGFP 为目的基因的生物素诱导响应载体 pc-CMVstar-EGFP。

1.5 细胞培养、转染和筛选

HEK-293f 细胞正常贴壁培养于添加了 5% NBS 的 DMEM/F12 (1:1)培养基中,37°C 5% CO₂。

转染前一天,将处于指数生长期的细胞消化计数,按 2.5×10⁵ cells/ml 的密度接种于 24 孔板中,1 ml/孔。转染时,用 50 μl OPTI-MEM I 培养基稀释 0.58 μg pc-neo-star-EGFP 质粒和 0.87 μg pc-2I-ASB-Hy 质粒,另用 50 μl OPTI-MEM I 培养基稀释 2 μl LIPOFECTAMINE 2000 试剂,二者混合,室温静置 20 min。然后将该混合物加入到已更换 0.5 ml 新鲜生长培养基的 293f 细胞中,摇动培养板,轻轻混匀。转染 4-5 h 后向转染细胞孔中补加 1 ml 生长培养基。

37°C 培养 24 h 后,将转染细胞传代至新的 24 孔板中,每孔细胞分至 6 孔。待细胞贴壁后加入含 400 μg/ml G418 和 300 μg/ml 潮霉素 B 的筛选培养基进行筛选,每 3 天换液。两周后阴性细胞全部死亡,阳性细胞已形成集落。稳定转染的混合克隆称为 293-ASBE。将各孔剩余的阳性细胞消化混合,用于考察不同生物素浓度下目的基因表达的响应情况。

1.6 鉴定不同生物素浓度下目的基因表达的响应情况

向 NBS 中加入 0.5% (v/v) streptavidin-agarose,室温孵育 15min,用 0.22 μm 滤膜过滤除去珠子及除菌,得到去除生物素的 NBS(NBS(Bio))。

293-ASBE 细胞用正常生长培养基重悬,接种于 24 孔板,每孔 5×10⁴ cells。第二天,分别更换含不同浓度生物素的培养基,这些培养基均以添加 5% NBS(Bio-)的 DF(Bio-)的培养基为基础,向其中分别加入 0.01、0.05、0.2、1、5、20 μM 生物素以及 0.2 μM 生物素和 2 μg/ml 强力霉素 (Dox),以培养 3 天后细胞经流式细胞仪检测的 EGFP 平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 为指标,评价以生物素为诱导剂的哺乳动物细胞诱导表达系统。

2 结果

2.1 诱导表达系统所需元件的获得

大肠杆菌生物素合成酶 BirA 基因通过 PCR 从 *E.coli* DH5α 菌株的基因组中扩增获得,片段大小约为 966 bp (图 1),得到的片段经 *XhoI/XbaI* 酶切后连入同样酶切的 pcDNA3.1 (+)载体,命名为 pc-BirA。生物素化信号 Avitag 序列通过两条引物 AT-Nhe 和 AT-KpnI 退火得到,5'和 3'分别为 *NheI* 和 *KpnI* 酶

切位点残基;含四个拷贝 VP16 转录激活结构域的片段 (VP4) 通过 *KpnI/HindIII* 酶切载体 pc-Hy-GVP4 获得 (图 2);以上片段一起连入 *NheI/HindIII* 酶切的 pcDNA3.1(+)(载体,得到表达 Avitag-VP4 融合基因的载体,命名为 pc-AV。

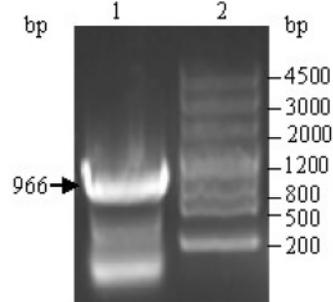


图 1 PCR 扩增大肠杆菌生物素连接酶 BirA :1: PCR 扩增产物; 2: DNA 分子量标准

Fig.1 PCR amplification of *E. coli* biotin ligase BirA: 1: PCR product; 2: DNA Marker

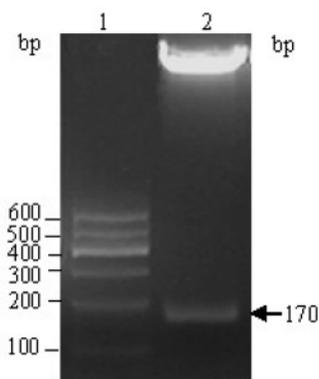


图 2 *KpnI/HindIII* 双酶切 pc-Hy-GVP4 质粒 :1: DNA 分子量标准; 2:双酶切 pc-Hy-GVP4 质粒

Fig.2 *KpnI-HindIII* double restriction enzyme digestion of plasmid pc-Hy-GVP4: 1: DNA Marker; 2: Double restriction enzyme digestion of plasmid pc-Hy-GVP4

链亲和素 (Streptavidin, SA) 基因通过多步重叠延伸 PCR 获得,图 3 所示为最后一步 PCR 的电泳结果,目的片段大小约为 480 bp;TetR 片段克隆自 pTet-off 载体,大小约为 620 bp (图 4);*EcoRI/KpnI* 酶切 SA 片段,*KpnI/NotI* 酶切 TetR 片段,二者与 *EcoRI/NotI* 酶切的 pcDNA3.1(+)(载体连接,得到表达 SA-TetR 融合基因的载体,命名为 pc-ST。

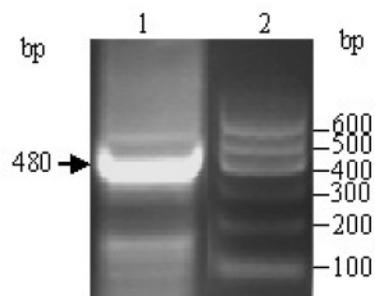


图 3 重叠延伸 PCR 获得链霉亲和素基因 :

1: 重叠延伸 PCR 最后一步产物; 2: DNA 分子量标准

Fig.3 Overlapping extension PCR to obtain streptavidin gene: 1: The Last step of the overlapping extension PCR; 2: DNA Marker

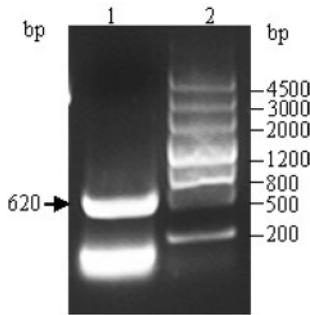


图4 PCR扩增TetR基因:1: PCR产物; 2: DNA分子量标准
Fig. 4 PCR amplification of TetR gene: 1: PCR product; 2: DNA Marker

2.2 三顺反子表达载体的构建

从pIRES2-EGFP载体上扩增IRES序列(图5),经NotI/XhoI酶切后连入同样酶切的pc-Hy载体,得到双顺反子表达载体pc-IRES-Hy。然后,将上述IRES片段补平后连入BamHI酶切并补平的pc-IRES-Hy,得到三顺反子表达载体pc-2I-Hy。

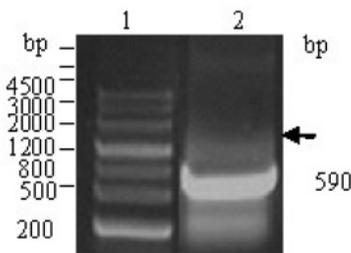


图5 PCR扩增IRES序列:1: PCR产物; 2: DNA分子量标准
Fig. 5 PCR amplification of IRES sequence: 1: PCR product; 2: DNA Marker

2.3 生物素诱导表达系统载体的构建

将酶切自pc-AV载体的Avitag-VP4融合基因连入三顺反子表达载体pc-2I-Hy的CMV启动子下游,正确连接产物命名为pc-AV-2I-Hy;酶切自pc-BirA载体的BirA基因连入pc-AV-2I-Hy载体BGH poly(A)上游,正确连接产物命名为pc-AV-2I-BirA-Hy;酶切自pc-ST载体的SA-TetR融合基因连入pc-AV-2I-BirA-Hy载体的两个IRES之间,最终得到生物素诱导表达系统元件的表达载体pc-2I-ASB-Hy(图6a)。

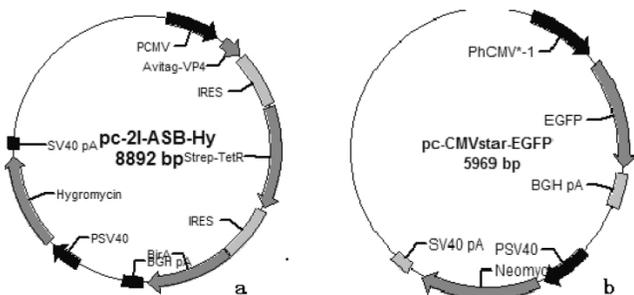


图6 生物素诱导表达系统载体示意图:(a): 生物素诱导表达元件载体;(b): 生物素诱导响应载体

Fig.6 Diagrams of vectors for biotin-inducible expression system:
(a): Elements-expressing vector for biotin-inducible expression system;
(b): Response vector for biotin-inducible expression system

TetR响应的启动子 P_{hCMV^*-1} 克隆自pTRE2载体,经MluI/NheI酶切后连入同样酶切的pcDNA3.1(+)中,得到生物素调控响应载体pc-Neo-Star;再将用BstXI/XhoI酶切自pIRES2-EGFP载体的EGFP片段连入同样酶切的上述载体中,得到以EGFP为目的基因的生物素诱导响应载体pc-CMVstar-EGFP(图6b)。

2.4 生物素诱导表达系统效果的验证

如上所述的两种生物素诱导表达系统载体共转染293f细胞后,经筛选得到的混合克隆接种至24孔板,贴壁后更换含不同浓度生物素的培养基,继续培养3天后检测EGFP荧光强度(图7)。结果表明,随着生物素浓度的升高,荧光强度逐渐增强,至生物素浓度为 $0.2 \sim 1 \mu M$ 左右时达到最高(为未诱导状态的3倍左右),此后又出现逐渐下降的趋势,最终降低至接近未诱导状态的水平。而在诱导浓度($0.2 \mu M$)的生物素存在时,添加强力霉素(四环素类似物)可有效将EGFP的表达抑制在本底水平。

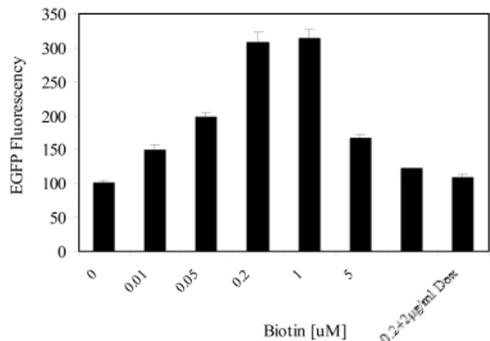


图7 不同生物素浓度下EGFP的表达情况

Fig.7 Expression of EGFP under different biotin concentrations

3 讨论

传统的哺乳动物细胞外源基因转录调控系统采用的是具有药物活性的诱导剂分子,如抗生素、免疫抑制药物或激素及其衍生物等。尽管这些条件表达系统在培养中和转基因动物中表现出了良好的调控效果,但对于这些诱导剂的临床副作用的担忧和抗生素抗性病原体的出现使其在基因治疗和生物药物生产中的应用始终未获批准^[12-15]。2007年,Weber等建立了一种以生物素为诱导剂的外源基因转录调控系统,在CHO-K1细胞和小鼠中均实现了报告基因SEAP的OFF-ON-OFF形式的表达,其诱导率(诱导后目的基因表达与本底表达的比率)达到了10倍左右^[16]。此后,同一个研究小组又报道了这种生物素诱导表达系统的一种变异形式,随着生物素浓度的增加,报告基因SEAP的表达谱为ON-OFF-ON的形式,诱导率仍为10倍左右^[10]。该生物素诱导表达系统包括三个基本构件:大肠杆菌生物素连接酶(BirA)、链亲和素-四环素依赖的抑制因子融合蛋白(Streptavidin-TetR, SA-TetR)和生物素化信号-VP16转录激活结构域融合蛋白(Avitag-VP16, AT-VP),在不同浓度的生物素存在时,上述三个构件表现为不同的相互作用形式,从而抑制或激活靶启动子驱动的转录:在中等生物素浓度下,BirA催化Avitag的生物素化,生物素再与链亲和素(SA)发生高亲和力的非共价结合^[17],产生嵌合的转录激活因子,该转录因子的TetR

部分可与特异的四环素响应启动子结合,从而激活下游基因的转录(图 8b) 在无生物素或低生物素浓度下 AT-VP 不能被生物素化,SA-TetR 与靶启动子结合,阻断目的基因的转录(图 8a) 在高生物素浓度下 游离的生物素饱和了所有的 SA 结合位点,从而竞争性抑制其与生物素化的 AT-VP 的结合,导致转录沉默(图 8c) ;四环素或其类似物强力霉素(Dox)可与 TetR 结合,使其发生构象变化,不能结合于靶启动子,去除增强子的启动子 P_{hCMV-1} 不能转录或仅有极低的转录(图 8d)。

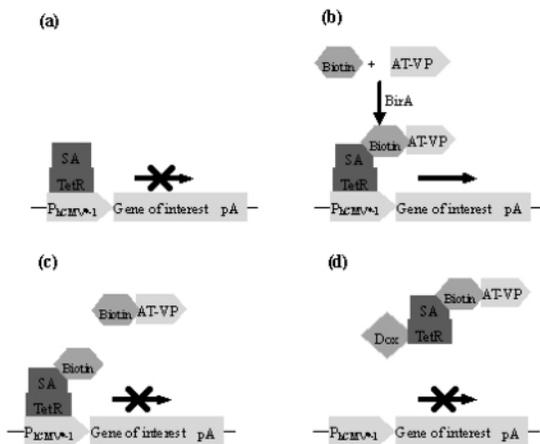


图 8 生物素诱导表达系统原理示意图 (a)低生物素浓度 (b)中等生物素浓度 (c)高生物素浓度 (d)四环素或强力霉素存在时

Fig.8 Schematic of biotin-inducible expression system (a) Low biotin concentration; (b) Intermediate biotin concentration;(c) High biotin concentration; (d) With tetracycline or doxycycline

本研究是建立在上述文献报道之上的,为方便三个元件的表达,构建了三顺反子表达载体,第一个基因的表达由野生型CMV启动子驱动,后两个基因的表达则由来自脑心肌炎病毒(ECMV)的IRES介导。将上述三顺反子表达载体与响应载体共转染293f细胞,以EGFP为报告基因验证了该系统对生物素及强力霉素的响应情况。结果表明,EGFP荧光的诱导率为3倍左右。这里,采用EGFP作为报告基因的优势在于:1)可以通过流式细胞仪来检测其表达强度,操作方便,结果可靠,而SEAP的表达水平则需较繁琐的ELISA方法来测定;2)可通过流式细胞分选技术从混合细胞克隆中挑选不同诱导强度的单细胞,节省时间和精力,极大的提高建立细胞系的效率^[18,19]。对于EGFP荧光强度与其蛋白表达水平的关系,目前还没有定量的报道,但从Hicham等^[20]的报道来看,二者应不是简单的正比关系,故本研究所建立的系统的诱导率与以SEAP为报告基因的系统的对比还需进一步实验的验证。

该生物素诱导表达系统与传统的调控表达系统相比,具有如下的优势:1)诱导剂生物素是细胞培养基的组分之一,目前未发现有任何的副作用,应用不需额外的批准程序;2)可通过逐步增加生物素浓度,实现目的基因由OFF-ON-OFF的变化,而无需繁琐的更换培养基的操作。以上的独特性质使得该系统在基因治疗、具有细胞毒性的药物生产等方面具有无法比拟的优势。

参考文献(References)

[1] Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, et al. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors[J].

Nat Genet, 2002, 32, 128-134

[2] Greber D, Fussenegger M. Mammalian synthetic biology: engineering of sophisticated gene networks[J]. J Biotechnol, 2007, 130: 329-345

[3] Weber W, Schoenmakers R, Keller B, et al. A synthetic tie-de lay circuit in mammalian cells and mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008,104: 2643-2648

[4] Yung CW, Barbari TA, Bentley WE. Counteracting apoptosis and necrosis with hypoxia responsive expression of Bcl-2Delta [J]. Metab Eng, 2002, 8: 483-490

[5] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells[J]. Science, 1995, 268: 1766-1769

[6] Rivera VM, Clackson T, Natesan S, et al. A humanized system for pharmacologic control of mammalian cells cultivated as mono layers and microtissues[J]. Biotechnol Bioeng 1996, 93: 169-180

[7] Wang Y, O'Malley Jr. BW, Tsai SY, et al. A regulatory system for use in gene transfer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 8180-8184

[8] Aarestrup FM. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2005, 96: 271-281

[9] Hartenbach S, Daoud-EI BM, Weber W,et al. An engineered L-arginine sensor of Chlamydia pneumonia enables arginine-adjusta - ble transcription control in mammalian cells and mice [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35: e136

[10] Weber W, Bacchus W, Daoud-EI BM, et al. Vitamin-H regulated transgene expression in mammalian cells[J]. Nucleic Acid Res, 2007, 35: e116

[11] Li SC, Ye LL, Yang H, et al. Enhancement of Exogenous Gene Expression by the Artificial Transcription Factor in Chinese Hamster Ovary Cells[J]. Chinese J Biotechnol, 2007, 23(1): 21-26

[12] Mansuy IM, Bujard H. Tetracycline-regulated gene expression in the brain. Curr Opin Neurobiol, 2000, 10: 593-596

[13] Aarestrup FM. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2005, 96: 271-281

[14] Hardman JG and Limbierd LE. The Pharmacological Basis of Therapeutics[M]. Edn 9. New York: McGraw-Hill. 1996: 1123-1153

[15] Weber W and Fussenegger M. Pharmacologic transgene control systems for gene therapy. J Gene Med, 2006, 8: 535-556

[16] Weber W, Stelling J, Rimann M, et al. A synthetic time-delay circuit in mammalian cells and mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 2643-2648

[17] Kohanski RA and Lane MD. Monovalent avidin affinity columns. Methods Enzymol, 1990,184: 194-200

[18] Borth N, Zeyda M, Kunert R, et al. Efficient selection of high-produ - cing subclones during gene amplication of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting. Biotechnol Bioeng. 2000, 71(4): 266-273

[19] Robert JS, Peter PG, Martin NM, et al. Accelerated cell line development usingtwo-color fluorescence activated cell sorting to select highly expressing antibody-producing clones. 2008, 99 (3): 578-587

[20] Hicham B, Reinhard F and Jurgen H. Improvement of reporter activity by IRES-mediated polycistronic reporter system. Nucleic Acid Res, 2008, 36(5): 28-34