文章编号:1000-5404(2006)10-1001-03

论著

EOLA1 基因 5′侧翼区的克隆及调控功能初步研究

梁自文[1],杨宗城[2],陈 建[2],陈 渝[2] (第三军医大学西南医院:[1]内分泌科,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究内皮细胞高表达脂多糖相关因子 1(endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1, EOLA1)基因 5′侧翼区的调控序列。**方法** 通过基因组步移克隆 EOLA1 基因 5′侧翼区不同长度的片段,插入 β-半乳糖苷酶(β-gal)报告基因载体,分析各片段在 ECV304 细胞中的 β-gal 调节活性。**结果** 含 EOLA1 基因 5′侧翼区 -1 ~ -2 659 bp和 -1 ~ -1 951 bp序列的重组质粒在 ECV304 细胞中能明显表现 β-gal 上调活性,而 -1 ~ -361 bp 序列的重组质粒活性无明显变化。**结论** EOLA1 基因 5′侧翼区 -361 ~ -1 951 bp内存在基因转录启动子元件。

关键词: EOLA1 基因;启动子;报告基因;活性分析
中图法分类号: Q75;Q785 **文献标识码**: A

Cloning and function analysis of 5′ end flanking sequence of EOLA1 gene

LIANG Zi-wen[1], YANG Zhong-cheng[2], CHEN Jian[2], CHEN Yu[2] ([1]Department of Endocrinology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the β-gal reporter genes containing the 5′-end flanking of endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 (EOLA1) gene in different sequence lengths and identify the sequence, which regulates the gene expression of EOLA1 by the β-gal analysis system. **Methods** The target sequences were amplified by the method of genome walker, and were inserted into the upstream of β-gal gene located in the β-gal enhancer vector by the directional clone technique respectively; the regulative sequence was identified by analyzing the β-gal activities of reconstructed plasmid in ECV304 cells. **Results** The regions, containing 2 659 bp and 1 951 bp upstreaming from exon 1, significantly stimulated the reporter gene activity as compared with that of the β-gal control vector in transfected cells. But the region, containing 361 bp upstreaming from exon 1, did not stimulate the reporter gene activity. **Conclusion** There is an up-regulative element of gene transcription in the region of -361 to -1 951 bp in EOLA1 gene upstream.

Key words: endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 gene; promoter; reporter gene; activity assay

内皮细胞高表达脂多糖相关因子 1(endothelial-overexpressed lipopolysaccharide- associated factor 1, EOLA1)是我们实验室在受内毒素刺激的血管内皮细胞中克隆的人类新基因(GenBank No. AY074889)[1,2],对其结构特性和功能的研究已经明确 EOLA1 基因在人染色体上定位于 Xq27.4 位点,其表达产物主要通过在胞内与金属硫蛋白 2A(MT2A)相互作用调控细胞增殖,参与炎症反应时细胞内保护机制[3]。但对其转录调控尚不清楚。基因组步移[4]是通过 PCR 扩增的方法利用一段已知的 DNA 序列去寻找基因组中与其邻近的序列,常用于启动子的寻找、内含子和外显子分界、表达序列标签的双向延伸和基因组图谱间隙的填充等。本研究应用基因组步移方法对 EOLA1 基因 5′侧翼区不同长度片段进行克隆并插入 β-半乳糖苷酶(β-gal)报告基因质粒,利用 β-gal 分析系统对不同长度的重组质粒在 ECV304 细胞中的调节活性进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 基因组步移扩增 EOLA1 基因 5′侧翼区序列

参照 Universal Genome Walker 试剂盒(Clontech)说明书进行操作。首先分别以 4 个平头 6 碱基内切酶 *Aha* Ⅲ、*Sma* Ⅰ、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200101,30371468)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200101 and 30371468)

作者简介:梁自文(1967-),男,四川省彭州市人,博士,副教授,主要从事内皮基因功能和糖尿病足方面的研究。电话:13108985471

收稿日期:2005-08-25;**修回日期**:2006-02-23

*Eco*R Ⅴ和 *Stu* Ⅰ酶切人基因组 DNA(Clontech),纯化后连接接头。根据 EOLA1 基因第 1 个外显子序列设计 2 条下游引物(GSP1:5′-CTCCCGCAGCATGGACCCTGGCACCTG-3′,与 279~305 bp 处碱基互补;GSP2:5′-CAGCGAGCTCTAGCGGTCTATAACTCTT CC-3′,与 1~29 bp 处碱基互补),在 GSP2 引物 5′端引入 *Xho* Ⅰ酶切位点,分别与接头内外侧引物配对进行巢式 PCR 扩增酶切的基因组 DNA,目的是富集第一外显子上游不同长度的片段。反应在 PE9600 仪上进行,参数为:第 1 轮 PCR:94 ℃ 2 s,72 ℃ 3 min,7 个循环后再 94 ℃ 2 s,67 ℃ 3 min,35 个循环,最后 67 ℃ 4 min;第 2 轮 PCR:94 ℃ 2 s,72 ℃ 3 min,5 个循环后再 94 ℃ 2 s,67 ℃ 3 min,24 个循环,最后 67 ℃ 4 min;1.5% 琼脂糖电泳检测结果。本实验所使用的热启动 PCR 聚合酶,具有很好的保真扩增性能,理论扩增长度为 5~6 kb,一般为 3 kb。

1.2 扩增产物的测序鉴定

将第 2 轮 PCR 反应产物直接插入 T/A 质粒(Promga),热休克法转入感受态大肠杆菌 DH5α,摇菌扩增后取部分菌液测序(上海基康公司代理)。

1.3 构建报告基因质粒

参照 Luminescent β-gal 试剂盒(Clontech)说明书进行操作。首先以 *Sma* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切纯化的 PCR 产物和 pβgal-Basic 质粒,利用连接试剂盒(TaKaRa)将酶切 PCR 产物插入质粒,转化大肠杆菌 DH5α,摇菌扩增后进行酶切鉴定。pβgal-Basic 质粒中含 LacZ 报告基因序列,其上游无启动子和增强子,因此,在正常情况下不表达报告基因。当插入多克隆位点序列中含启动子时,可以表达报告基因,并通过表达报告基因的多少反映启动子的强弱。

1.4 培养细胞及转染

将 ECV304 细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 M199 培养基中,于转染前 1 d 用胰蛋白酶及 EDTA 消化培养细胞,计数,接种于 6 孔板中,接种密度为 4×10^5/ml,继续培养过夜。次日,以脂质体 LF2000(Gibco BRL)分别转染空 pβgal-Basic 质粒(阴性对照组)、插入 PCR 产物的 pβgal-Basic 质粒(实验组)及 pβgal-control 质粒(阳性对照组),每组同时转染 pGL3-control(荧光素)表达质粒作为内对照,每组各转染 3 孔,继续培养 48 h,以便转染质粒在细胞中进行瞬时表达。

1.5 检测报告基因活性

收集细胞,参照 Luminescent β-gal 试剂盒说明书裂解细胞,用移液器将裂解物迅速移入预冷的离心管中,4 ℃ 离心 12 000 r/min,将上清移入另一预冷的洁净离心管中,-70 ℃ 冻存备用。

荧光素酶活性按如下方法检测:取细胞裂解上清 50 μl 加入 96 孔黑色聚苯乙烯玻璃底平板中,分别加入荧光素酶反应底物混合液 50 μl,置冰上孵育 5 min,在激发波长 430 nm,发射波长 550 nm 设置下,使用 HTS7000 Bio 酵标仪检测荧光素酶活性。

β-gal 活性检测方法如下:取 50 μl 配制加入 96 孔黑色聚苯乙烯玻璃底平板中,分别加入 β-gal 反应底物混合液 50 μl,混匀后置 37 ℃ 孵箱中孵育,当溶液由无色变为浅黄色时,加中止液中止反应。在吸收波长为 405 nm 处使用酶标仪检测各孔吸光值。β-gal 强度值/荧光素酶值,得到相对半乳糖苷酶活性,即相对发光值(RLU)。

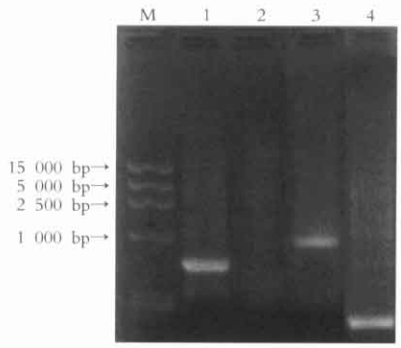
1.6 统计学处理

利用 SPSS 10.0 软件对数据作单因素方差分析,组间比较用 LSD 检验。

2 结果

2.1 基因组步移

人基因组 DNA 经酶切后扩增,获得了 EOLA1 基因上游不同长度的 3 条片段,*Eco*RⅤ酶切后未获得扩增产物。将 3 个扩增产物经测序后与人类基因组进行比对后明确为 EOLA1 基因上游 -1~-2 659 bp、-1~-1 951 bp 和 -1~-361 bp(图 1)。

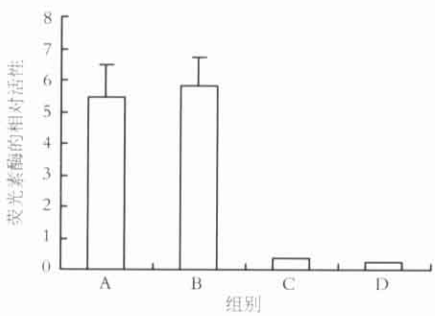


M:DNA 标准;1:*Sma* Ⅰ酶切扩增后产物;2:*Eco*RⅤ酶切扩增后产物;3:*Aha* Ⅲ酶切扩增后产物;4:*Stu* Ⅰ酶切扩增后产物

图 1 基因组步移第 2 轮 PCR 结果

2.2 报告基因活性检测

分别将构建的 3 个不同长度插入片段 β-gal 报告基因质粒和荧光素酶报告基因质粒共转染 ECV304 细胞,每组分别转染 3 个孔,每组重复 3 次,转染 24 h 后,提取细胞反应液,在酵标仪上分别检测 β-gal 和荧光素酶活性,以 β-gal 强度值/荧光素酶值得到 RLU,阴性对照组 RLU 设为 1,实验组的 RLU 分别除以对照组 RLU,得到相对光密度值。从图 2 可以看到,插入 *Sma* Ⅰ酶切片段组和插入 *Aha* Ⅲ酶切片段组能显著提高 ECV304 细胞 β-gal 的表达($P<0.01$),但两组间无显著差异($P>0.05$)。插入 *Stu* Ⅰ酶切片段组不能提高 β-gal 的表达。



A:*Sma* Ⅰ酶切扩增后产物;B:*Aha* Ⅲ酶切扩增后产物;C:*Stu* Ⅰ酶切扩增后产物;D:β-gal 空质粒组

图 2 重组质粒 β-gal 分析结果

3　讨论

基因外显子的 5′侧翼区的3 000 bp左右的区段为基因的调控元件所在部位，常包含基因转录启动子、增强子、沉默子和转录因子结合位点。通过基因报告技术可以把待确定的顺式调控序列剪接到报告基因上来控制基因的活性，这些反应元件可以对宿主细胞中基因调控和表达的变化起反应，从而可以直观地反映细胞内与基因表达有关的信号变化[5]。我们采用基因组步移的方法扩增 EOLA1 基因 5′侧翼区不同长度的片段，首先用 4 个 6 碱基平头内切酶酶切人基因组 DNA，使用平头内切酶的目的是便于在片段末端连接特异的接头，以获得通用引物结合位点，可以与序列特异引物配对进行 PCR 扩增目的序列。本实验中将酶切基因组片段连接上接头后与 EOLA1 基因特异引物配对进行2 轮 PCR 扩增目的片段，但电泳显示 *Eco*R V 酶切后未扩增酶切片段，原因可能与该区域附近无相应酶切位点，以致最后进行的 PCR 反应太长而不能完成所致。

将扩增出的产物测序确认后再亚克隆入 β-gal 报告质粒，转染 ECV304 细胞，同时转染荧光素酶表达质粒作为内对照，进行瞬时表达，提取反应液分别测定 β-gal 和荧光素酶的活性，以 β-gal/荧光素酶活性值后得到 β-gal 的相对活性值，从而反映出目的片段中是否含有促进转录的启动子活性。结果显示，在 EOLA1 基因 5′侧翼区的 -1 ~ -2 659 bp、-1 ~ -1 951 bp均有较强的 β-gal 上调活性，且活性差异不明显，在 -1 ~ -361 bp 无 β-gal 上调活性，表明在 5′侧翼区的 -361 ~ -1 951 bp内存在启动子序列，生物信息学分析（http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu/）显示此区域内存在 2 个可能的启动子位点，分别是 -1 793 ~ -1 843 bp的 GCCTACATCCCATAAAGAGGGACCCTCTCCTCCTCACCTCATCTCCAGCA和 -1 964 ~ -2 014 bp处的CAGAAATGAGTAAAACACCGGCCTTGCCTTCAAGGAACTCAAGAGACCCT，但无典型 TATA 盒结构，因此具体启动子位点尚需经过缺失突变和点突变的实验来确定。

参考文献：

[1] LIANG Z W, LUO X D, YANG Z C. Cloning of differentially expressed genes following lipopolysaccharide stimulation in human umbilical vein endothelial cells[J]. Chin J Traumatol, 2003, 6(2): 107 - 113.

[2] 梁自文，杨宗城，罗向东，等. 人类内皮活化相关新基因 EOLA1 的发现与初步研究[J]. 解放军医学杂志，2003，28(5)：422 -424.

[3] LIANG Z, YANG Z. Identification and characterization of a novel gene EOLA1 stimulating ECV304 cell proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325(3): 798 - 802.

[4] SIEBERT P D, CHENCHIK A, KELLOGG D E, *et al*. An improved method for walking in uncloned genomic DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(6): 1087 - 1088.

[5] ARENAL A, PIMENTEL R, GARCIA C, *et al*. The SV40 T antigen nuclear localization sequence enhances nuclear import of vector DNA in embryos of a crustacean (litopenaeus schmitti)[J]. Gene, 2004, 337: 71 - 77.

（编辑　薛国文）

关于计量单位的使用

本刊编辑部