文章编号:1000-5404(2007)18-1787-03

论著

人 NaDC1 基因启动子序列转录调控元件的初步分析

杨聚荣[1],何娅妮[1],张剑凯[2],李新伦[1],梁海君[1],林 静[1],吴小玮[1],王惠明[1],李开龙[1] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042;[2]广东医学院基础学院人体解剖学教研室,湛江 524023)

提 要:目的 对hNaDC1基因启动子序列转录调控元件进行初步分析。**方法** 构建hNaDC1基因5′侧翼序列系列缺失质粒,以双荧光素酶报告基因检测系统检测hNaDC1基因5′侧翼区(-2 232/+136)的转录调控元件与转录调控蛋白之间的相互作用。**结果** pGL3-hNaDC1A质粒的转录活性最高,为(2.98±0.45);pGL3-hNaDC1D的转录活性最低,为(0.45±0.14)。以pGL3-hNaDC1A质粒的转录活性为基准(100%),其他4种质粒相应的转录活性分别为:pGL3-hNaDC1B 86.7%,pGL3-hNaDC1C 89.4%,pGL3-hNaDC1D 15.8%,pGL3-hNaDC1E 61.2%。MatInspector 5.0软件预测结果显示hNaDC1基因5′侧翼启动子序列共含有22个14种转录因子结合位点。**结论** hNaDC1基因5′侧翼区-1 084/-254和-12/+136区域可能存在有正性作用转录因子的结合位点。

关键词: hNaDC1基因;双荧光素酶报告系统;转录调控
中图法分类号: R394-33;R394.2 **文献标识码:** A

Positional identification of transcription regulation elements in human NaDC1 promoter

YANG Ju-rong[1], HE Ya-ni[1], ZHANG Jian-kai[2], LI Xin-lun[1], LIANG Hai-jun[1], LIN Jing[1], WU Xiao-wei[1], WANG Hui-ming[1], Li Kai-long[1] ([1]Department of Nephrology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Department of Anatomy, College of Basic Medicine, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To determine the positions of transcription regulation elements in 5' flanking region of human Na^+ dependent dicarboxylate transporter 1 (hNaDC1) gene. **Methods** The DNA fragments hNaDC1 A-E(-2 232/+136) of its 5' flanking were amplified from the genomic DNAs of HK-2 cells by using PCR. The PCR products were directionally subcloned into pGL3-basic vector. The recombined clones were identified by agarose gel electrophoresis after restriction endonuclease digesting and DNA sequencing. The recombined vectors as well as pGL3-basic vector were respectively transfected into HK-2 cells with Lipofectamine 2000. To normalize transfection efficiencies, 0.4 μg of a Renilla luciferase positive control vector (pRL-CMV plasmid) was used for co-transfection. The interaction between transcription regulation elements and transcription regulation proteins in 5' flanking region of hNaDC1 gene(-2 232/+136) was measured by analyzing relative light unit (RLU) with the help of Dual Luciferase Report Gene Assay System (DLR). **Results** The RLU was significantly lowered in HK-2 cells transfected with pGl3-basic when compared with the cells harboring pGL3-hNaDC1 A-E ($P<0.05$ or $P<0.001$). Compared with pGL3-hNaDC1 A group, RLU was significantly lowered in pGL3-hNaDC1 D group ($P<0.01$) and pGL3-hNaDC1 E group ($P<0.05$). MatInspector 5.0 system indicated that there were 22 binding sites of 14 trans-acting factors(Sore >90) in the regions -1 084/-254 and -12/+136. **Conclusion** Transcription enhancer elements, which have interacted with transcription activation proteins, exist in both region -1 084/-254 and -12/+136. These results may offer an approach for further study on the enhancers of hNaDC1 gene.

Key words: human Na^+ dependent dicarboxylate transporter 1 gene; report gene; regulation of gene expression

随着人类基因组计划(human genome project, HGP)的不断深入,以功能鉴定为目标的功能基因组学(functional genomics)已成为基因组研究的一大重点,基因表达调控分析是基因功能研究最重要的组成部分[1]。不同条件下基因表达谱的变化是基因组调控的结果,基因的调控因子通过调控基因的时空表达从而对生命的发生、发育及衰老起着重要的调控作用;而基因的异常调控常常导致基因在疾病相关细胞中的表达异常,引起特定的病变。因此,阐明基因选择性表达

作者简介:杨聚荣(1974-),男,山西省五台县人,硕士,主治医师,主要从事肾小管间质病变方面的研究。电话:(023)68757446
通讯作者:何娅妮,电话:(023)68757476,E-mail:heynmail@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-03-20;修回日期:2007-04-15

所依赖的调控信息及其相互作用的分子机制，对揭示生命现象本质具有非常重要的意义。钠离子依赖性二羧酸转运蛋白1（Na^+ dependent dicarboxylate transporter 1，NaDC1）是负责三羧酸循环中间代谢产物跨细胞膜转运的一种有机阴离子转运蛋白[2]，对维系血和尿液中二羧酸的浓度具有重要作用，而且还与尿石症及肾小球疾病进展密切相关[3,4]。NaDC1主要在肾脏表达，另外在肝、肺、脑、胎盘、肠等组织也有不同程度的表达。研究表明酸中毒等可诱导肾组织NaDC1 mRNA表达显著上调[5]，但其具体机制尚不明确。因此，本研究以人NaDC1基因为目标，初步研究其转录调控区域，为进一步明确该基因组织特异性及诱导性高表达的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

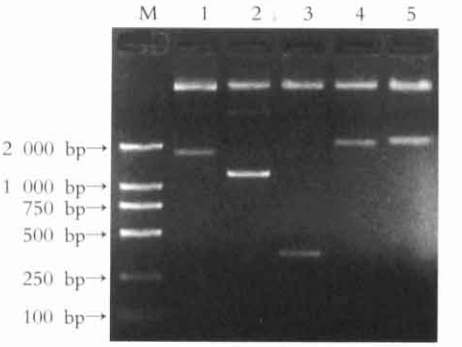
萤火虫荧光素酶报告基因载体pGL3-Basic、海肾荧光素酶对照报告基因载体pRL-CMV均购自Promega公司；*E. coli.* JM109为本院所创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室留存；人近曲小管上皮细胞株（HK-2）购自ATCC公司；pfu高保真DNA聚合酶及相关PCR试剂购自Stratagene公司；DNA提取试剂盒、DNA连接试剂盒购自TaKaRa公司；限制性内切酶*Kpn* Ⅰ和*Hind*Ⅲ购自Promega公司；DNA纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒购自Omega公司；脂质体转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司；Dual-Luciferase Reporter Assay Systems购自Promega公司。

1.2 hNaDC1基因系列缺失质粒的构建

根据GenBank公布的hNaDC1基因转录起始位点5′侧翼DNA序列，设计5对扩增不同长度5′侧翼序列的PCR引物[5]（图1）。按常规方法提取HK-2细胞基因组DNA，以此为模板，采用pfu高保真DNA聚合酶扩增相应DNA片段。*Kpn* Ⅰ和*Hind*Ⅲ双酶切经纯化的PCR产物及载体pGL3-Basic，回收纯化后，将PCR产物与载体大片段进行连接反应，得到5种含不同长度hNaDC1基因序列的系列缺失载体。5种质粒命名及其对应的插入序列位点如下：pGL3-hNaDC1A（－2 232/＋136）、pGL3-hNaDC1B（－1 640/＋136）、pGL3-hNaDC1C（－1 084/＋136）、pGL3-hNaDC1D（－253/＋136）、pGL3-hNaDC1E（－2 232/－12）。所构建质粒采用*Kpn* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切及测序进行鉴定。

1.3 转染实验

用Omega公司质粒抽提试剂盒提取构建的5种质粒、pGL3-Basic以及内参照质粒pRL-CMV，测定其浓度及纯度。转染前1 d将对数生长期HK-2细胞计数后传代于6孔板，以含10% FBS的DMEM培养液培养过夜，至细胞汇片70%～90%时进行转染。用无血清不含抗生素的DMEM培养液稀释待转染质粒，其中pGL3系列质粒与内参质粒pRL-CMV摩尔比均为50∶1。将待转染质粒与脂质体Lipofectamine 2000混匀，室温静置20 min后加入相应各孔细胞，37 ℃，5% CO_2孵箱保温5 h，更换含血清DMEM继续培养36 h后收获细胞。实验分为7组：空白对照组（未转染质粒）、阴性对照组（pGL3-Basic＋pRL-CMV）、实验组1（pGL3-hNaDC1A＋pRL-CMV）、实验组2（pGL3-hNaDC1B＋pRL-CMV）、实验组3（pGL3-hNaDC1C＋pRL-CMV）、实验组4（pGL3-hNaDC1D＋pRL-CMV）、实验组5（pGL3-hNaDC1E＋pRL-CMV）。每组样品3孔，进行2次重复实验。



M：DL2000 DNA标准；1：*Kpn* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切pGL3-hNaDC1B；2：*Kpn* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切pGL3-hNaDC1C；3：*Kpn* Ⅰ和*Hind*Ⅲ双酶切pGL3-hNaDC1D；4：*Kpn* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切pGL3-hNaDC1E；5：*Kpn* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切pGL3-hNaDC1A

图1 hNaDC1基因5′侧翼系列缺失质粒酶切鉴定

1.4 双荧光素酶活性检测

双荧光素酶活性检测按照双荧光素酶报告基因分析系统（Promega公司）操作手册进行。在转染36 h后，消化HK-2细胞，再以1×PBS液洗涤细胞1次。加入1×PLB裂解液500 μl，超声破碎仪裂解细胞。取20 μl裂解上清加入96孔白板，然后加入LAR Ⅱ 100 μl，混匀后立即在Luminoskan Ascent Luminometer（Thermo Labsystems，芬兰）下检测Firefly荧光素酶活性（F值）；再加入1×Stop&Glo溶液100 μl检测Renilla荧光素酶活性（R值）。重复以上步骤，完成对所有实验组F值与R值的检测。以Firefly活性与Renilla活性的比值即相对光强度（RLU）表示各组转录活性。计算各组F/R值。

1.5 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析。

1.6 生物信息学分析

应用在线转录因子预测软件MatInspector5.0（http://www.genomatix.de/software_services/software/MatInspector/matinspector.html）对hNaDC1基因转录起始位点5′侧翼序列可能存在的顺式作用元件进行预测，设定Score值>90分。

2 结果

2.1 hNaDC1基因5′侧翼系列缺失质粒构建及鉴定

以HK-2细胞基因组DNA为模板，hNaDC1A、hNaDC1B、hNaDC1C、hNaDC1D、hNaDC1E 5对引物相应扩增出长度为2 368、1 776、1 221、389、2 244 bp的DNA片段，分别插入pGL3-Basic载体构建成5种缺失质粒。用*Kpn* Ⅰ和*Hind*Ⅲ双酶切以上质粒得到与插入序列大小一致的片段。测序结果显示各插入片段与GenBank公布的序列完全一致。

2.2 hNaDC1基因5′侧翼系列缺失质粒转录活性测定

将pGL3-hNaDC1A～E重组质粒分别与内参照质粒pRL-

CMV 共转染 HK-2 细胞，报告基因相对荧光活性结果显示，与 pGL3-Basic 空载体相比，5 种构建的缺失质粒（pGL3-hNaDC1A ~ E）荧光活性均明显增强（$P<0.05$，$P<0.01$），提示相应的基因序列均具有启动报告基因转录的能力。其中 pGL3-hNaDC1A 质粒的转录活性最高，为（2.98 ± 0.45）；pGL3-hNaDC1D 的转录活性最低，为（0.45 ± 0.14）。以 pGL3-hNaDC1A 质粒的转录活性为基准（100%），其他 4 种质粒相应的转录活性分别为：pGL3-hNaDC1B 86.7%，pGL3-hNaDC1C 89.4%，pGL3-hNaDC1D 15.8%，pGL3-hNaDC1E 61.2%，见表 1。统计分析结果显示，pGL3-hNaDC1A、pGL3-hNaDC1B、pGL3-hNaDC1C 三者之间的相对荧光强度无显著差异（$P>0.05$）；pGL3-hNaDC1D、pGL3-hNaDC1E 荧光强度较 pGL3-hNaDC1A 显著降低（$P<0.01$，$P<0.05$）。提示 −1 084/ −254 和 −12/ +136 区域可能有正性作用的转录因子结合位点。

表 1　hNaDC1 基因 5′侧翼系列缺失质粒荧光活性

组别	F/R 值	与 pGL3-hNaDC1A 荧光活性比（%）
pGL3-hNaDC1A	2.98 ± 0.45[b]	100.0
pGL3-hNaDC1B	2.56 ± 0.37[b]	86.7
pGL3-hNaDC1C	2.65 ± 0.42[b]	89.4
pGL3-hNaDC1D	0.45 ± 0.14[ad]	15.8
pGL3-hNaDC1E	1.82 ± 0.22[bc]	61.2
pGL3-Basic	0.12 ± 0.07	4.15

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 pGL3-basic 比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与 pGL3-hNaDC1A 比较

2.3　hNaDC1 基因 5′侧翼区转录调控位点分析

MatInspector 5.0 软件分析显示在 hNaDC1 基因 5′侧翼区 −1 084/ −254 共有 17 个转录因子结合位点，包括 NF-κB、AP-2、JCV_repeated 等多种顺式作用元件，其位点及相应转录因子如表 2。−12/ +136 区共有 5 个转录因子结合位点，其位点及相应转录因子如表 3。

表 2　hNaDC1 基因 5′侧翼区 −1 084/ −254 区段内的转录因子结合位点

转录因子	相对位置
NF-kB	−263/ −244；
AP-2	−289/ −270；−404/ −386；−708/ −690
GCF	−330/ −313
γ-IRE	−383/ −365；−879/ −859；−1 076/ −1 058
JCV_repeated	−399/ −379
NF-IL6	−474/ −458；−598/ −579
p53	−476/ −459
Sp1	−483/ −467；−675/ −658
TATA-box	−637/ −618
c-Myc	−730/ −712
TFIIIA	−858/ −836

表 3　hNaDC1 基因 5′侧翼区 −12/ +136 区段内的转录因子结合位点

转录因子	相对位置
γ-IRE	+23/ +41
CP2-γ-FB	+36/ +53
E-box	+71/ +89
AP-2	+81/ +99
NF-GMb	+107/ +114

3　讨论

在特定的条件下，特定基因表达的启动或停止，增强或抑制，是细胞完成基本生命活动以及对外界刺激作出应答的分子基础。真核生物的基因表达涉及从转录水平到翻译后水平多层次的调控，其中对转录水平的调控是最为经济有效的方式，是许多基因表达最重要的调控模式。在对代谢性酸中毒大鼠的研究中发现，代谢性酸中毒可诱导肾小管上皮细胞两侧枸橼酸转运蛋白（NaDC1 和 NaDC3）mRNA 表达量显著增加，膜蛋白表达量也相应增加，其增加量与酸中毒程度呈正相关[6]。提示转录水平的调控是机体对 NaDC1 基因表达调控的重要模式之一。

本研究构建了 hNaDC1 基因 5′侧翼序列系列缺失质粒，对 −2 232/ +136 序列可能的转录调控区域进行粗筛，结果显示 −1 084/ −254 和 −12/ +136 区域的缺失可导致 hNaDC1 基因转录活性分别下降 84.2% 和 38.8%，提示上述区域可能存在有正性作用转录因子的结合位点。已知代谢性酸中毒可诱导 AP-2 的表达增加，进一步诱导酸敏感性基因的表达增加[7]。应用 MatInspector 5.0 软件分析结果也显示上述基因区域存在 AP-2 元件等正性作用的转录因子结合位点。因此，进一步针对上述转录因子结合位点进行点突变及 EMSA 等研究，将可能找到特异性地调控 hNaDC1 基因转录的反式作用因子，为揭示该基因组织特异性表达及诱导性高表达的分子机制奠定基础。

参考文献：

[1] Yamashita T, Honda M, Takatori H, *et al*. Genome-wide transcriptome mapping analysis identifies organ-specific gene expression patterns along human chromosomes[J]. Genomics, 2004, 84(5): 867 − 875.

[2] Pajor A M. Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human kidney[J]. Am J Physiol, 1996, 270(4 Pt 2): F642 − F648.

[3] He Y, Chen X, Yu Z, *et al*. Sodium dicarboxylate cotransporter-1 expression in renal tissues and its role in rat experimental nephrolithiasis [J]. J Nephrol, 2004, 17(1): 34 − 42.

[4] 师锁柱，陈香美，张雪光，等. 钠依赖二羧酸转运蛋白在 IgA 肾病患者肾组织表达的研究[J]. 中华肾脏病杂志，2003，19(5)：297 −300.

[5] 杨聚荣，张剑凯，何娅妮，等. 人 NaDC1 基因近端启动子生物信息分析及载体构建[J]. 第三军医大学学报，2007，29(14)：1410 − 1412.

[6] Aruga S, Wehrli S, Kaissling B, *et al*. Chronic metabolic acidosis increases NaDC-1 mRNA and protein abundance in rat kidney[J]. Kidney Int, 2000, 58(1): 206 − 215.

[7] Curthoys N P, Gstraunthaler G. Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 281(3): F381 − F390.

（编辑　王小寒）