论著

文章编号:1000-5404(2007)14-1410-03

人 NaDC1 基因近端启动子生物信息学分析及载体构建

杨聚荣[1],张剑凯[2],何娅妮[1],李新伦[1],梁海君[1],林 静[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解剖学教研室,湛江 524023)

提 要:目的 对人 NaDC1(hNaDC1)基因近端启动子进行生物信息学分析,预测可能的调控区域及顺式元件,并构建相应基因序列萤火虫荧光素酶报告基因表达载体。**方法** 使用 First EF 程序分析并获得 hNaDC1 基因近端启动子序列,使用 MatInspector 5.0 软件对近端启动子序列中的转录因子结合位点进行预测。PCR 法扩增 hNaDC1 基因近端启动子序列,PCR 产物经 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切后定向克隆到 pGL3-Basic 载体。重组质粒行 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切及测序鉴定。**结果** 使用 FirstEF 程序获得长度为 2.4 kb(-2 232/+136)的 hNaDC1 基因近端启动子序列。MatInspector 5.0 程序分析显示该基因序列共含有 152 个 74 种顺式作用元件。*Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切及测序鉴定证实构建的 pGL3-hNaDC1A 质粒插入片段正确无误。**结论** 成功构建 hNaDC1 基因近端启动子转录调控序列萤火虫荧光素酶报告基因表达载体,为利用双荧光素酶报告基因检测系统研究 hNaDC1 基因近端启动子转录调控元件的分布及其性质提供了基本试验条件。

关键词:hNaDC1 基因;转录调控;报告基因

中图法分类号:Q754;Q782 **文献标识码**:A

Bioinformatics analysis of human NaDC1 proximal promoter and construction of firefly report gene vector

YANG Ju-rong[1], ZHANG Jian-kai[2], HE Ya-ni[1], LI Xin-lun[1], LIANG Hai-jun[1], LIN Jing[1] ([1]Department of Nephrology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Department of Atomany, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To bioinformatically analyze the human NaDC1 promoter for predicting possible regulative zone and cis element and construct firefly luciferase report gene vector for 5' flanking regulated elements of hNaDC1 gene. **Methods** The proximal promoter of hNaDC1 was analyzed by using FirstEF online software to obtain its sequence. Meanwhile, the binding sites of transcription factors were predicted by software Matinspector 5.0. The DNA fragment hNaDC1A (-2 232/+136) of 5' flanking of hNaDC1 gene were amplified from the genomic DNAs of human renal proximal tubular cells (HK-2) by PCR, the products of which were cloned into pGL3-Basic after digestion with *Kpn* Ⅰ and *Hind* Ⅲ. The recombinant plasmid pGL3-hNaDC1A was used for restriction endonucleases digestion and DNA sequencing. **Results** The 2.4 kb (-2 232/+136) sequence of hNaDC1 proximal promoter was obtained by FirstEF. Matinspector 5.0 showed 152 cis-acting elements (74 sorts) within the proximal promoter. The expression vector pGL3-hNaDC1A was constructed successfully. **Conclusion** The construction of firefly report gene vector offers experimental basis for studying the distribution of transcriptional regulation elements and their characteristics with the help of dual luciferase report gene assay system.

Key words: hNaDC1 gene; transcriptional regulation; report gene

钠离子依赖性二羧酸转运蛋白(Na$^+$ dependent dicarboxylate transporter, NaDC)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,根据对底物亲和力的差别,NaDCs 被分为低亲和力转运蛋白(NaDC1,Kmsuccinate = 0.5 mmol/L)和高亲和力转运蛋白(NaDC2、NaDC3,Kmsuccinate = 2.5 μmol/L)两类。在肾脏,NaDC1 位于肾近曲小管上皮细胞的刷状缘,NaDC3 则位于肾近曲小管上皮细胞的基底侧。新近研究表明,NaDC1 不仅对维系机体血和尿液中二羧酸的浓度具有重要作用[1-4],而且还与尿石症及肾小球疾病进展密切相关[5,6]。因此,对 NaDC1 基因的深入研究,将有助于进一步了解肾脏疾

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

收稿日期:2006-09-30;修回日期:2006-10-15

病的病理生理机制。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,引起相应的病理生理改变。然而,人 NaDC1(hNaDC1)基因的表达调控机制尚不清楚。本研究初步预测了 hNaDC1 基因近端启动子序列可能的转录调控位点,并以萤火虫荧光素酶报告基因质粒为载体构建了相应基因序列的报告基因质粒,为进一步研究 hNaDC1 基因转录调控机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　质粒与试剂

萤火虫荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic 购自 Promega 公司;*E. coli*. JM109 为本院创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室留存;人近端肾小管上皮细胞株(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。

1.2　hNaDC1 基因序列的获得

以 human NaDC1 为关键词,搜索 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar)核酸数据库,获得 hNaDC1 全长 mRNA 序列。以 hNaDC1 全长 mRNA 序列进行 BLAST 分析,获取人基因组与其同源的基因序列;hNaDC1 基因定位在染色体 17p1.2,包含 12 个外显子,基因全长 23.9 kb。

1.3　hNaDC1 基因近端启动子序列的预测

登陆 http://rulai.cshl.org/tool/FirstEF/,使用第一外显子和启动子在线分析程序 FirstEF 对 hNaDC1 基因近端启动子序列进行预测,获得长度为 2.4 kb(−2 232/+136)的近端启动子序列。

1.4　hNaDC1 基因近端启动子序列顺式作用元件的预测

使用在线基因转录调控分析程序 MatInspector 5.0(http://www.genomatix.de/)对 hNaDC1 基因 5′侧翼非翻译区(5′ untranslated regions,5′-UTR) 2.4 kb 基因序列的转录因子结合位点进行预测。

1.5　引物设计与合成

根据 GenBank 公布的 hNaDC1 基因 −2 232/+136 区域的核苷酸序列,设计扩增该序列的 PCR 引物,上游引物引入一 *Kpn* Ⅰ酶切位点:5′-GGGTACCAGAGGGTCTCAGTAAAACAT-3′,下游引物引入一 *Hind* Ⅲ酶切位点:5′-GAAAGCTTGCACGAAGAACACGATC-3′。引物由上海生工生物公司合成。

1.6　hNaDC1 基因近端启动子序列质粒的构建

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。PCR 条件为:模板 DNA 95 ℃变性 5 min 后进行循环,94 ℃变性 45 s,60 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 240 s,30 个循环后于 72 ℃延伸 8 min。以 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,并胶回收 PCR 产物。*Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切 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,得到的质粒命名为 pGL3-hNaDC1A。所构建质粒采用 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切及测序进行鉴定。

2　结果

2.1　hNaDC1 近端启动子序列的转录因子结合位点

MatInspector 5.0 分析结果(设定 score > 90)显示在 hNaDC1 基因 −2 232/+136 区域共有 152 个 74 种转录因子结合位点,其中 score = 100 的转录因子结合位点如表 1。

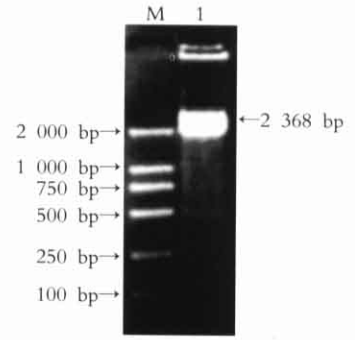
2.2　重组质粒的克隆与鉴定

以 HK-2 细胞基因组 DNA 为模板,PCR 扩增获得长度为 2 368 bp 的 hNaDC1 基因 −2 232/+136 序列,与设计长度一致,结果见图 1。将 PCR 扩增基因片段插入 pGL3-Basic 载体得到重组质粒 pGL3-hNaDC1A,用 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切质粒得到 2 368 bp 大小的 DNA 片段,与设计的插入序列大小一致(图 2)。测序结果显示各插入片段与 GenBank 公布的序列完全一致。

表 1　hNaDC1 基因 −2 232/+136 区域转录因子结合位点

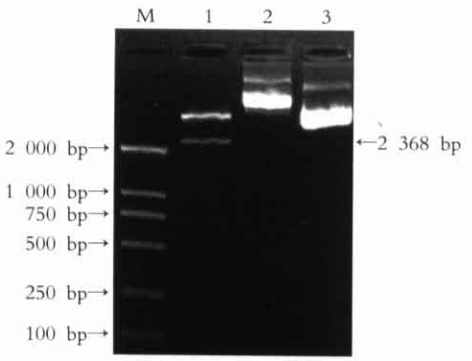
基因位置	转录因子	描述	基因序列*	预测位点
−2 232/−1 500	GKLF/GKLF.02	Gut-enriched Krueppel-like factor	atcAAAGgagacc	−2 185/−2 169
	MOKF/MOK2.02	Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	aaagcaccaggggCCTTctc	−1 659/−1 641
−1 499/−1 000	MZF1/MZF1.01	Myeloid zinc finger protein MZF1	gtGGGGacg	−1 499/−1 491
	RORA/NBRE.01	Monomers of the nur subfamily of nuclear receptors (nur77, nurr1, nor−1)	agttgAAGGtcaatgcatg	−1 412/−1 394
	GATA/GATA2.01	GATA-binding factor 2	cagaGATAagacc	−1 310/−1 298
	MZF1/MZF1.02	Myeloid zinc finger protein MZF1	taGGGGaag	−1 208/−1 200
−999/−200	TALE/TGIF.01	TG-interacting factor belonging to TALE class of homeodomain factors	aaatGTCAgtc	−934/−924
	HOMF/S8.01	Binding site for S8 type homeodomains	atacaTAATtggt	−861/−849
	TALE/TGIF.01	TG-interacting factor belonging to TALE class of homeodomain factors	tactGTCAatc	−466/−456
	HOXF/OTX2.01	Homeodomain transcription factor Otx2 (homolog of Drosophila orthodenticle)	aagtTAATcccagcgtt	−216/−200
−199/−1	HOXF/OTX2.01	Homeodomain transcription factor Otx2 (homolog of Drosophila orthodenticle)	tttTAATccttgttct	−181/−165
	NFAT/NFAT.01	Nuclear factor of activated T-cells	ggaGGAAagaacaaggatt	−176/−158
	TATA-box	TATA-box binding protein	ggcttTATATAAgcctg	−172/−156
	ETSF/ELF2.01	Ets - family member ELF-2 (NERF1a)	aaagatcaGGAAgggagaggg	−149/−129
	PURA/PURALPHA.01	Purine-rich element binding protein A	ggAGGCagtggct	−30/−17
+1/+136	XBBF/RFX1.01	X-box binding protein RFX1	caggagctggGTAAcagaa	+12/+30
	MYOD/E47.01	MyoD/E47 and MyoD/E12 dimers	gccaGCAGgtggccatg	+67/+83

*:大写字母代表转录因子的核心位点



M：DNA 标准(DL 2000)；1：hNaDC1A PCR 产物

图1 hNaDC1 基因近端启动子序列 PCR 扩增产物电泳图



M：DNA 标准(DL 2000)；1：*Kpn* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切 pGL3-hNaDC1A；2：pGL3-hNaDC1A；3：pGL3-Basic

图2 hNaDC1 基因近端启动子全长序列质粒酶切鉴定

3 讨论

基因表达调控是功能基因组学研究的主要内容之一，阐明真核基因组表达的调控网络，已经成为功能基因组学领域内国际竞争的焦点[7]。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的细胞中特异性表达，引起特定的病变。

目前已证实，NaDC1 在肾脏能量代谢、机体酸碱平衡调节等生命活动中起着重要的作用[1]。此外，近年研究表明该基因可能参与肾小球疾病的进展及尿石症等多种病变过程。因此，揭示该基因表达的调控模式对解析 NaDC1 蛋白的正常功能及病理状态下蛋白表达变化的机制具有重要意义。近年来生物信息学技术不断完善和发展，利用计算机软件分析基因序列功能特性的准确性不断提高，通过预测发现与已知调控元件同源的可能调控元件，进而对预测结果进行验证，在很大程度上避免了传统研究方法的盲目性。本研究通过 FirstEF 分析工具对 hNaDC1 基因 5′UTR 序列进行启动子预测，获取长度为 2.4 kb(－2 232/＋136)的近端启动子序列，并应用 MatInspector 5.0 软件对 hNaDC1 基因 5′UTR 不同区段(－2 232/－1 500，－1 499/－1 000，－999/－200，－199/－1，＋1/＋136)可能的转录因子进行了预测，为指导 hNaDC1 基因转录调控序列载体的构建提供依据。

双荧光素酶报告系统是专门研究基因转录活性的系统，使用萤火虫荧光素酶，结合氯霉素乙酰转移酶(CAT)，β-半乳糖苷酶(β-Gal)，或葡萄醛酸糖苷酶(GUS)的双报告基因，近几年已普遍使用。然而，由于这些辅助报告基因在定量前需要长时间的温育，而荧光素酶的检测和定量则在几秒钟内进行，因此上述组合削弱了荧光素酶的性能优势。理想的双报告基因方法应该是使用者能够以检测萤火虫荧光素酶的速度，灵敏度和线性范围，对同一样品中的两个报告基因进行检测。由 pGL3 系列质粒及内参质粒 pRL-CMV 组成的双荧光素酶报告基因检测(DLR)系统即能够对来自转染细胞裂解液或无细胞转录/翻译反应中共同表达的两个报告基因快速地提供定量结果，其实验原理是在完成萤火虫荧光素酶活性("实验"报告基因)的测量后，萤火虫荧光被快速淬灭的同时激活海肾荧光素酶的荧光反应("对照"报告基因的活性)，实现了"同步检测"[8]。本研究成功克隆了 hNaDC1 基因近端启动子全长序列(－2 232/＋136)萤火虫荧光素酶报告基因表达载体(pGL3-hNaDC1A)，为进一步利用双荧光素酶报告基因检测系统研究 hNaDC1 基因转录调控元件的分布及其性质提供了基本试验条件。

参考文献：

[1] Markovich D, Murer H. The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters[J]. Pflugers Arch, 2004, 447(5): 594－602.

[2] Pajor A M. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters[J]. Pflugers Arch, 2006, 451(5): 597－605.

[3] Unwin R J, Capasso G, Shirley D G. An overview of divalent cation and citrate handling by the kidney[J]. Nephron Physiol, 2004, 98(2): 15－20.

[4] Aruga S, Pajor A M, Nakamura K, *et al*. OKP cells express the Na-dicarboxylate cotransporter NaDC-1[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(1): C64－C72.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 刘 华，马春红，刘素侠，等. 两种端粒酶逆转录酶启动子真核表达载体的构建[J]. 中国现代普通外科进展，2005，8(4)：212－215.

(编辑 薛国文)