文章编号:1000-5404(2009)23-2309-03

论著

# EOLA1基因启动子序列的鉴定

梁自文[1],周广举[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)

**摘 要:目的** 鉴定EOLA1基因启动子序列,为深入研究EOLA1的转录调控机制奠定基础。**方法** 通过PCR反应进一步缺失突变EOLA1基因5′侧翼区-1672~+51(1 723 bp)序列,将产物插入到含荧光素酶报告基因的载体pGL3-Basic中,转染ECV304细胞,瞬时表达后测定荧光素酶活性。采用生物信息学分析该1 723 bp片段可能存在的转录因子结合位点。**结果** 缺失到785 bp片段仍具有启动子活性,进一步缺失到717 bp片段后活性消失,从而确定启动子位于-738~-676 bp序列,其附近含Sp1和Myf顺式作用元件。**结论** 确定了EOLA1启动子范围和转录因子结合位点。

**关键词:** EOLA1;启动子;转录因子;报告基因
**中图法分类号:** R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

# Identification of EOLA1 gene promoter sequence

LIANG Zi-wen[1], ZHOU Guang-ju[1], YANG Zong-cheng[2], CHEN Jian[2], CHEN Yu[2] ([1]Department of Endocrinology, [2]Sate Key Laboratory of Trauma, Bums and Combined Injury, Institute of Bums, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To identify the promoter sequence of endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 (EOLA1) gene and to elucidate the molecular mechanisms controlling EOLA1 expression. **Methods** A DNA fragment containing 1 723 bp 5′ upstream of the EOLA1 gene and the transcription start site was generated by polymerase chain reaction and then cloned into a luciferase reporter gene vector, pGL3-basic. The relative luciferase activities driven by this 5′-upstream fragment and a series of deletion mutants were measured in transiently transfected human ECV304 cells, respectively. At last, the 1 723 bp upstream of the EOLA1 gene was analyzed online with Cluster Buster. **Results** A fragment 785 bp upstream of the EOLA1 coding region was sufficient to promote transcription. Further deletion analysis of the 785 bp fragment indicated that a 68 bp element from -738 to -676 was important for EOLA1 transcription in ECV304 cells. The 1 723 bp sequence contains binding sites for Sp1 and Myf. **Conclusion** We map the EOLA1 promoter by deletion analysis and reveal that the proximal region (-738 to -676 bp), which contains binding sites for Sp1 and Myf, is essential for human EOLA1 promoter activity in ECV304 cells.

**Key words:** endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1; promoter; transcription factor; reporter gene

在筛查人血管内皮细胞受内毒素刺激后基因表达差异的实验中,我们克隆了一个新的基因片段,经基因延伸和特性分析,成功克隆了1个人类新基因内皮细胞高表达脂多糖相关因子1(endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1, EOLA1, GenBank登录号: AY074889)[1-3]。EOLA1基因在人染色体上定位于Xq27.4位点,与鼠类同源蛋白有同源性达70%,功能尚不完全清楚,可能作为一个胞内蛋白在细胞内与金属硫蛋白2A(MT2A)相互作用参与了细胞增殖的影响[4]。为进一步研究EOLA1基因转录调控机制,我们前期利用PCR技术扩增了EOLA1基因5′侧翼区并构建了多个调控荧光素酶报告基因的真核表达载体[5],经转染细胞并检测报告基因活性显示在-1672~+51bp(1 723 bp)序列内存在启动子活性。本实验进一步缺失突变这段序列,以确定核心启动子序列,并用生物信息学的方法分析基本启动子周围可能存在的转录因子结合位点。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

细胞系HUVEC ECV304、大肠杆菌菌株DH5α和pGL3-1723重组质粒由本实验室保存,DMEM培养基、精制胎牛血清为Hyclone公司产品,dNTPs、TaKaRa LA *Taq*为TaKaRa公司产品,限制性内切酶*Kpn* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ,pGEM-Teasy、$T_4$DNA连接酶、空白对照组(pGL3-Basic)、阳性对照组(pGL3-Control)载体为Promega公司产品,DNA回收试剂盒为博大泰克公司产品,胰蛋

基金项目:国家自然科学基金(30200101, 30670838)
Supported by the National Nature Science Foundation of China(30200101, 30670838)
作者简介:梁自文,男,四川省彭州市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事EOLA1基因功能和糖尿病足防治方面的研究。E-mail: liangzw@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2009-06-05;修回日期:2009-07-27

白胨、酵母菌提取粉、细菌琼脂粉、琼脂糖为 Oxoid 产品，质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品，2 × Pfu PCR Master Mix 为 TIANWEI 公司产品。

### 1.2 引物设计

以已知 pGL3 - 1723 重组质粒为模板设计了下列 5 对引物（表 1），从 5′端对 EOLA1 基因上游调控区 1 723 bp 片段进行进一步缺失突变。在各上游引物的 5′端引入 *Kpn* Ⅰ酶切位点，在下游引物 5′端引入 *Bgl* Ⅱ酶切位点。将引物交由上海英骏生物技术有限公司合成。

**表 1 根据 EOLA1 基因 -1672 ~ +51 bp（1 723 bp）序列设计的引物序列及其位置**

| 扩增位置(bp) | 引物 |
|---|---|
| 1 406( -1355 ~ +51) | 上游:5′-CACGGTACCTCTTTCCTCAGCTCTGCAC-3′<br>下游:5′-GGAAGATCTCTCCGGGAAACCAGTGGC-3′ |
| 1 145( -1094 ~ +51) | 上游:5′-CACGGTACCCTAAGCTGGTTCTCAGGAGTC-3′<br>下游:5′-GGAAGATCTCTCCGGGAAACCAGTGGC-3′ |
| 785( -734 ~ +51) | 上游:5′-CCAGGTACCCCCTACTTCTCACGCAGC-3′<br>下游:5′-GGAAGATCTCTCCGGGAAACCAGTGGC-3′ |
| 717( -666 ~ +51) | 上游:5′-CACGGTACCTCCCTCCTTCTCTCAGCGG-3′<br>下游:5′-GGAAGATCTCTCCGGGAAACCAGTGGC-3′ |
| 423( -372 ~ +51) | 上游:5′-CCAGGTACCGCAGCTCTGGGCCCCAA-3′<br>下游:5′-GGAAGATCTCTCCGGGAAACCAGTGGC-3′ |

### 1.3 构建荧光素酶重组表达质粒

通过 PCR 法，以 pGL3 - 1723 重组质粒为模板，分别加入合成的上下游引物，在超高保真 DNA 聚合酶 Pfu 作用下扩增得到不同长度的片段。反应条件如下：94 ℃预变性 2 min；94 ℃ 1 min，60 ℃ 1 min，72 ℃ 90 s，30 循环；72 ℃延伸 10 min. PCR 条件根据不同引物稍作调整。将 PCR 产物进行胶回收后，然后进行加 A 反应后再与载体 pGEMT 连接，将连接后产物 $CaCl_2$ 法常规转化感受态大肠杆菌 DH5a，筛选阳性克隆，送出测序确认后提取质粒，经 *Kpn* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ双酶切后，用 $T_4$DNA 连接酶连接插入 pGL3-Basic 的相应多克隆位点，$CaCl_2$ 法常规转化大肠杆菌 DH5α，筛选阳性克隆，经酶切鉴定后测序确认。

### 1.4 细胞培养和转染

人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 培养于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中。计数后分装培养于含 $2.73 \times 10^5$/ml 细胞的 24 孔板中，各取 1 ml 稀释后的细胞悬液放于 24 孔板中的 15 孔，再向每孔中加入 DMEM 培养基各 2 ml。将 24 孔板盖好置于 37℃、5% $CO_2$、饱和湿度细胞培养箱中进行培养。24h 观察细胞长满瓶底 60% ~80% 时即可用来作转染。以脂质体 DOTAP 为载体，将空白对照组（pGL3-Basic）、阳性对照组（pGL3-Control）和实验组（pGL3-1406、pGL3-1145、pGL3-785、pGL3-717、pGL3-423）分别转染入细胞内，每组中每个转染质粒重复 3 孔。继续培养 48 h 后收集细胞裂解液，并作好相应标记，放于 -80 ℃冰箱待检测。

### 1.5 荧光素酶活性测定

将细胞裂解液从 -80℃冰箱中取出，直到温度上升到室温为止。萤火虫荧光素酶和海葵荧光素酶的活性测定在同一反应管中先后进行。以荧光光度计分别测定每个样本中萤火虫荧光素酶活性值（M1）和海葵荧光素酶活性值（M2）；计算各样本的相对活性（M1/ M2）。以 3 孔的平均值作为荧光素酶相对活性的最终实验结果。

### 1.6 统计学处理

测得的荧光素酶相对活性以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 12.0 软件进行单因素方差分析。

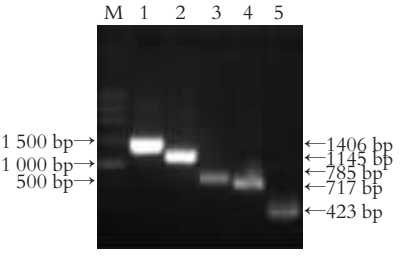
### 1.7 生物信息学分析

应用在线软件：（Cluster Buster http://zlab.bu.edu/-mfrith/cister.shtml.）对 EOLA1 基因 5′-侧翼区 1 723 bp 的 DNA 序列进行生物信息学分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR 反应获得目的片段

分析 EOLA1 基因上游调控区 -1 672 bp ~ +51 bp（1 723 bp）序列并设计 5 对引物，从 5′端进一步缺失突变这段序列。以前期获得的 pGL3 - 1 723 bp 为模板，进行 PCR 扩增，获得 5 条长度不同的目的片段，长度分别为 1406、1145、785 、717 和 432 bp（图 1）。将目的片段亚克隆入 pGL3-basic 质粒，获得 5 个重组质粒（pGL3 - 1406、pGL3 - 1145、pGL3 - 785、pGL3 - 717、pGL3 - 423），测序确认后转染培养 ECV304 细胞。

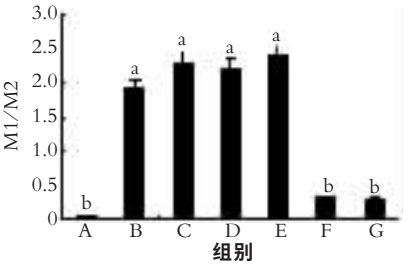



1：-1355 ~ +51 片段；2：-1094 ~ +51 片段；3：-784 ~ +51 片段；4：-666 ~ +51 片段；5：-372 ~ +51 片段；M：DNA 标准

**图 1 PCR 扩增获得的缺失突变片段**

### 2.2 重组质粒转染细胞后测定报告基因荧光素酶活性

转染细胞后瞬时表达，测定各组报告基因活性（图 2）。结果显示 pGL3 - 1406、pGL3 - 1145、pGL3 - 785 均具有明显的启动子活性，其启动子相对活性与阳性对照相当，而 pGL3 - 717 活性急剧下降，仅略高于阴性对照，pGL3 - 423 活性仍然处于低水平，表明在目标片段 -734 ~ -666 bp 区域存在启动子活性，其碱基组成为：CCCTACTTCTCACGCAGCTGCTTTAAAAACCCCGCCCCCAGCCCCTCCCAGTGATTTCTTTCTCCCCC。




A：pGL3 - Basic；B：pGL3 - Control；C：pGL3 - 1406；D：pGL3 - 1145；E：pGL3 - 785；F：pGL3 - 717；G：pGL3 - 423

a：$P < 0.05$，与 A 组比较；b：$P < 0.05$，与 B 组比较

**图 2 重组质粒荧光素酶相对活性检测**

### 2.3 分析启动子区域转录因子结合位点

利用生物信息学软件分析启动子周围区域，结果显示在其附近存在多个转录因子结合位点，特别是在发现的核心启动子区域内存在 Sp1（ - 706 bp ~ - 694 bp 位置，序列为

TGGGGCGGGGTT)和 Myf( －722 bp ～ －711 bp 位置,序列为 AAGCAGCTGCGT)结合位点。

## 3　讨论

EOLA1 基因是我们在筛查人血管内皮细胞受内毒素刺激后差异表达基因中克隆到的一个功能未明基因,其表达量的多少与内皮细胞的活化程度相关。前期研究证明 EOLA1 表达蛋白是一个胞内蛋白,在细胞内与 MT2A 相互作用后调控了与细胞增殖和炎症反应相关的基因表达。表明 EOLA1 与内皮细胞活化和正常功能维持密切相关[6]。总的说来,目前对 EOLA1 基因功能知之甚少,对 EOLA1 基因的转录调控研究更是空白,因此,深入研究 EOLA1 基因的转录调控机制为进一步理解其功能打下良好的基础。

基因转录调控主要受启动子和顺式作用元件影响,启动子是决定转录活性的主要因素,而顺式作用元件与反式作用因子(即转录因子)的结合影响着转录活性的大小。因此,分析基因的转录调控机制主要是确定启动子和顺式作用元件。真核生物的启动子和顺式作用元件主要位于转录序列上游即 5′-侧翼区 2 kb 范围内[7-9],因此,我们前期克隆了 EOLA1 基因 5′-侧翼区 2.35 kb 的片段,经缺失突变成不同长度的片段,插入无启动子的报告基因表达质粒 pGL3-Basic 中,转染细胞后瞬时表达,测定报告基因的活性,若插入片段中含启动子,则报告基因表达,由此确定插入片段中有无启动子序列。目前基因报告系统已广泛应用于研究真核细胞基因的表达核调控。利用报告系统研究 EOLA1 启动子的调控作用可以最大限度的避免下游基因表达产物对启动子的反馈干扰,能真实的反映外周因素对调控序列的影响。荧光素酶报告系统是广泛应用于哺乳动物的第一个非同位素遗传报告系统,与常用的 CAT 报告基因相比更加适合对基因瞬时表达的研究,从而使其成为研究可诱导系统一种理想的报告分子[10]。

我们前期研究已经确定在片段 －1672 ～ ＋51bp 的启动子活性最强,极有可能含基本启动子序列,因此,本研究进一步缺失突变这个 1723bp 片段,分别构建了 pGL3 －1406、pGL3 －1145、pGL3 －785、pGL3 －717、pGL3 －423 重组质粒,采用脂质体法分别转染 ECV-304 细胞,用 pGL3-Basic 作阴性对照,pGL3-Control 作阳性对照,每种质粒转染 3 孔。瞬时表达后收集细胞裂解液进行双荧光素酶活性检测,结果显示 pGL3 －1406、pGL3 －1145、pGL3 －785 均具有明显的启动子活性,但 pGL3 －717 和 pGL3 －423 活性急剧下降,表明在 －734 ～ －666 区域存在启动子序列,深入分析这 68 个碱基序列,未发现典型的 TATA 盒结构。鉴于大多数真核细胞启动子区均具有 TATA 盒,如奢侈基因,而有些类型的启动子不具有 TATA 盒,这类基因包括两种:一种是参与机体生化和生理过程的“看家基因”,如维持细胞生命活动所必需的二氢叶酸还原酶;另一种是发育调节基因,如脱氧核糖核酸还原酶[11]。由此可见,EOLA1 可能属看家基因或发育调节基因,参与了细胞的基本代谢和增殖。

对启动子区的顺式作用元件分析显示,EOLA1 基因基本启动子周围存在经典的转录因子 Sp1 和 Myf 的结合位点,Sp1 顺式作用元件常位于基本启动子周围,与其相应反式作用因子结合后激活基因转录[12]。Myf 属肌蛋白调节因子家族,其成员包括 MyoD、Myogenin、Myfs 和 MKF4 4 个,常与 E2A 基因编码的 E12/E47 形成异二聚体再与 E-box 顺式作用元件结合,增强基因转录[13]。我们正在实验验证 EOLA1 的转录活性是否受这些转录因子结合的影响。

## 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 的发现及初步研究[J]. 解放军医学杂志,2003,28(5):422 －424.

[3] 苏踊跃,梁光萍,罗向东,等. 小干扰 RNA 表达载体介导的 EOLA1 基因表达抑制研究[J]. 第三军医大学学报,2005,27(3):200 －202.

[4] 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.

[5] 周广举,梁自文,陈　渝,等. 人内皮细胞高表达脂多糖相关因子 1 启动子荧光素酶报告基因重组体的构建[J]. 新乡医学院学报,2008,25(3):217 －219.

[6] Ran C F, Dou K, Liang Z, *et al*. Changes in the expression of endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 in grafts during acute rejection following liver transplantation in rats[J]. J Int Med Res, 2008, 36(3): 460 －466.

[7] Segal R, Berk A J. Promoter activity and distance constraints of one versus two Sp1 binding sites[J]. J Biol Chem, 1991, 266(30): 20406 －20411.

[8] Wu L, Berk A. Constraints on spacing between transcription factor binding sites in a simple adenovirus promoter[J]. Genes Dev, 1988, 2(4): 403 －411.

[9] 梁自文,杨宗城,陈　建,等. EOLA1 基因 5′侧翼区的克隆及调控功能初步研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(10):1001 －1003.

[10] Potter E, Braun S, Lehmann U, *et al*. Molecular cloning of a functional promoter of the human plakoglobin gene[J]. Eur J Endocrinol, 2001,145(2): 625 －633.

[11] 卢学春,楼方定,韩为东,等. LRP16 基因启动子顺式调控元件分析[J]. 生物信息学,2009,7(1):5 －8.

[12] Lin H, Xiao J, Luo X, *et al*. Transcriptional control of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 by Sp1 and implications in re-expression of these genes in hypertrophied myocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2009, 23(4 －6): 317 －326.

[13] Shklover J, Etzioni S, Weisman-Shomer P, *et al*. MyoD uses overlapping but distinct elements to bind E-box and tetraplex structures of regulatory sequences of muscle-specific genes[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(21): 7087 －7095.


（编辑　龙　亮）