论著

文章编号:1000-5404(2010)10-1024-04

含 hITF 启动子的荧光素酶报告质粒的构建及活性检测

王 臻,王 林,万千雪,金 星,梁光萍,彭 曦 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 构建含有人肠三叶因子(intestinal trefoil factor,hITF)启动子的荧光素酶表达载体,并检测启动子活性。**方法** 采用 PCR 技术从 LS-174T 细胞基因组 DNA 中扩增出长约 2.5 kb 的含 hITF 基因启动子片段(-233 1/+53),而后在此基础上构建了 10 个不同长度的启动子序列至 pGL-3 basic 荧光素酶表达载体,然后将这些重组质粒转染 HEK-293 细胞并在 48 h 后检测其荧光素酶活性。**结果** 插入的 hITF 启动子片段测序结果显示正确,-500/+53,-400/+53 和 -300/+53 片段活性介于 0.023 ~ 0.026 之间,-200/+53,-100/+53 和 -50/+53 活性介于 0.003 2 ~ 0.004 2 之间,明确了最小活性功能域位于 -300/+53 区域,-300/-200 区域对 hITF 转录起始起关键性作用。**结论** 成功构建了含 hITF 启动子的萤火虫荧光素酶报告基因质粒,鉴定出人肠三叶因子(hITF)启动子活性位于 -300/-200 区域。

[关键词] 肠三叶因子;启动子;pGL-3 basic;HEK-293 细胞

[中图法分类号] R394-33; R394.3 **[文献标志码]** A

Construction of a luciferase reporter vector containing hITF promoter

Wang Zhen, Wang Lin, Wan Qianxue, Jin Xing, Liang Guangping, Peng Xi (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 a luciferase reporter vector containing human intestinal trefoil factor (hITF) promoter and to evaluate its activity in LS-174T and HEK-293 cells. Methods A 2.5 kb fragment spanning the region -2 331 to +53 of hITF gene was amplified from genomic DNA extracted from LS-174T by PCR. Then 10 fragments containing different region of the promoter were substantially inserted into promoter-less pGL-3 basic luciferase reporter vector, and the obtained vectors were transfected into HEK-293 cells. In 48 h after the transfection, the cells were lysed and the luciferase activity was measured. Results The inserted hITF promoter was verified by DNA sequencing. The promoter activity of -500/+53, -400/+53 and -300/+53 ranged from 0.023 to 0.026, while that of -200/+53, -100/+53 and -50/+53 from 0.003 2 to 0.004 2. The minimal functional promoter was located in the -300/+53, and there were some potential active elements. The promoter region of -300/-200 played a vital role in transcription initiation of hITF. Conclusion The recombinant plasmid containing luciferase reporter gene driven by hITF promoter is constructed successfully. The region spanning -300/-200 plays an important role in facilitating the initiation of transcription.

[Key words] intestinal trefoil factor; promoter; pGL-3 basic; HEK-293 cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670773). Corresponding author: Peng Xi, Tel: 86-23-68754149-8056, E-mail: pxlrmm@163.com

肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是由肠道杯状细胞特异分泌的一种小分子量蛋白,其间的 6 个半胱氨酸残基按 1 ~ 5、2 ~ 4、3 ~ 6 的特定顺序以二硫键两两相连形成具有三叶草状的空间结构[1]。hITF 特殊的空间结构使其能与黏蛋白中的糖链结合,形成稳定的复合物,对维持肠黏液稳定性及增强肠道防御能力具有重要意义[2]。

ITF 的表达受多种因素影响,肠道缺血缺氧、炎症反应及组织损伤等均可导致其表达增加。但 hITF 的基础性表达究竟是如何实现的目前还不是很清楚。我们希望能在 hITF 基因启动子中能找到发挥这一功能的元件或者一种新的调控方式,因此本研究用从 LS-174T 细胞中提取的基因组为模板扩增 hITF 上游约 2 500 bp 的片段(-2 331/+53),亚克隆构建至 pGL-3 basic 荧光素酶表达质粒中,然后通过逐段截短的方法分析各个区域的活性变化,最终明确了 -300/+53 区域是保证 hITF 转录表达的最小功能区域,而介于 -300/-200 区域则对 hITF 转录起始起着决定性作用。

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30670773)

[通信作者] 彭 曦,电话:(023)68754149-8056,E-mail:pxlrmm@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

pGL3-basic 萤火虫荧光素酶基因表达载体(Promega)为本校生化教研室缪洪明博士馈赠,pGL3-control 萤火虫荧光素酶基因表达载体(Promega)及 pRL-TK 海肾荧光素酶载体(Promega)为本所彭旭博士馈赠;LS-174T 细胞(ATCC No. CL-188)为本院肿瘤科欧娟娟、刘平硕士馈赠;HEK-293 细胞(ATCC No. CRL-1573)为本课题组保存;转染试剂 jetPEI 为 Polyplus-Transfection 公司产品;双荧光报告系统检测试剂(Dual-Luciferase reporter assay system)购自 Promega 公司;24 孔板购自 CORNING 公司;96 孔板(CAT No. 655077)购自 Greiner Bio-One 公司;空白 DMEM 培养基(CAT No. C11960;无谷氨酰胺,无丙酮酸钠)购自 Invitrogen 公司; 基因组 DNA 抽提试剂盒 E. Z. N. A™ Tissue DNA Kit、质粒提取纯化试剂盒 E. Z. N. A™ Plasmid Miniprep Kit 、以及胶回收纯化试剂盒 E. Z. N. A™ Gel Extraction Kit 均购自 Omega 公司;PCR 产物纯化试剂盒购自 AXYGEN 公司;T_4 DNA 连接酶、*Mlu* Ⅰ、*Xho* Ⅰ核酸内切酶均为 Fermentas 公司产品;PCR 扩增用高保真酶为 KOD-plus(TOYOBO);新生牛血清购自兰州民海生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LS-174T 为人结肠腺癌细胞,具有杯状细胞表型,能特异性表达分泌 hITF 蛋白;HEK-293 为人胚肾细胞。细胞常规培养用 DMEM 培养基加 10% 新生小牛血清(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml),放 37 ℃,5% CO_2 孵箱中生长,每 2 ~ 3 天换液 1 次,每 3 ~ 5 天传代 1 次。

1.2.2 启动子荧光素酶表达质粒构建及活性鉴定

1.2.2.1 引物设计 以 EMBL-Bank 数据库中 ID 为 AB038162 的基因序列为模板,用网上引物设计平台 Primer3.0[3] 分别设计上游引物(加入 *Mlu* Ⅰ酶切位点)及下游引物(加入 *Xho* Ⅰ酶切位点),交由 TaKaRa 大连宝生物公司合成,具体见表 1。

1.2.2.2 启动子区扩增及鉴定 首先用 E. Z. N. A 试剂盒从 LS-174T 细胞中提取基因组 DNA,再以此为模板 PCR 扩增启动子区。PCR 体系(50 μl):KOD-plus:1 U;DNA 模板:1 μg;10 × buffer:5 μl;上下游引物(10 μmol):各 1.5 μl,终浓度 0.3 μmol;2 mmol/L dNTP:5 μl,终浓度 0.2 mmol/L;25 mmol/L $MgSO_4$:2 μl,终浓度 1 mmol/L。反应条件:stage Ⅰ:95 ℃ 3 min;stage Ⅱ:95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 3min,3 个循环;stage Ⅲ:95 ℃ 30 s,68 ℃ 3 min,30 个循环;stage Ⅳ:72 ℃ 10 min。扩增产物用琼脂糖凝胶(0.6%)电泳鉴定。

1.2.2.3 荧光素酶表达质粒构建 pGL-3 basic 及纯化过的 PCR 产物经 *Mlu* Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切后,胶回收试剂盒回收纯化,双酶切后的扩增产物与质粒按 3∶1 比例用 T_4 DNA 连接酶放 4 ℃连接过夜。连接产物转化 DH5α 感受态,涂板过夜,挑取阳性克隆并做 PCR 及双酶切鉴定然后送交 TaKaRa 测序。

1.2.2.4 转染细胞 转染前 1 天接种细胞至 24 孔板(COSTAR),密度为 70% 左右,用含 10% 新生小牛血清的高糖型 DMEM(GIBCO)培养基加双抗(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)放 37 ℃,5% CO_2 孵箱贴壁 12 ~ 16 h。转染当天细胞换液为"Modified 空白 DMEM 培养基"(无谷氨酰胺,无牛血清,添加丙酮酸钠:110 mg/L),用 jetPEI TM(有效成分为聚乙烯亚胺)分别转染等摩尔(0.12 pmol)的目的质粒与 pGL-3 control(maximum control,峰值对照)和 pGL-3 basic(minimum control,基线对照),每种质粒做 3 个复孔,内参质粒为 pRL-TK(15 ng 每孔),转染 HEK-293 细胞;转染后 6 h 后换液为 Modified 空白 DMEM 加双抗(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml),转染后 48 h 收获细胞表达的荧光素酶,并测取活性,近似实验条件下共重复至少 3 次。

1.2.2.5 检测荧光素酶活性 弃去细胞培养基,加 1ml PBS 冲洗细胞 1 次,每孔加入 1 × PLB(passive lysis buffer)100 μl,室温下放摇床上轻轻摇荡 45 ~ 60 min,然后每孔取 20 μl 细胞裂解液转移至 96 孔板,按照 Dual-Luciferase reporter assay system 推荐的标准用量及流程用 VarioskanFlash(Thermo)测取荧光素酶活性值。

1.2.2.6 数据分析 每孔所测得的萤火虫荧光素酶活性值除以相应的海肾荧光素酶活性值所得比例记为其真实活性值,所得数据用 SPSS 13.0 统计软件处理,经单因素方差分析(Dunnett T3 法)法分析后得出结论。

表 1 各片段对应引物

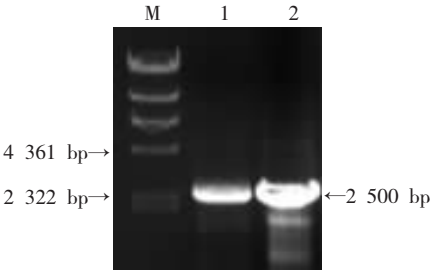
名称	位置	序列 5′→3′
-2 500 F	-2 331/-2 318	TTTACGCGTTCCCCAGCCCTAAA
-2 000 F	-1 992/-1 971	TCTACGCGTGAGCAGTGGGAAGGCAGGGAGA
-1 500 F	-1 486/-1 467	TCTACGCGTGGGCCAGTGGGGGTCATCAA
-1 000 F	-1 000/-981	TCTACGCGTTGGCCAACATGGCGACACCT
-500 F	-491/-470	TCTACGCGTGAGCCGCAGGGTCCTGACTCAC
-400 F	-400/-381	TCTACGCGTGGTGTTCTGAGGGCTTCTGG
-300 F	-300/-279	TCTACGCGTTAGGAGGGCAATTGACACACAT
-200 F	-200/-181	TCTACGCGTTGACCTCTCCCCTTTGGGAG
-100 F	-100/-80	TCTACGCGTAGCAAACAATCCAGAGCAGCT
-50 F	-50/-31	TCTACGCGTCCTGGACCATGAAGCGAGTC
+53 R	+31/+53	AGCTCGAGGAGGACAGCAAGGCCAGGACCAG

F:上游;R:下游

2 结果

2.1 PCR 扩增得到 hITF 启动子区片段

PCR 扩增 hITF 启动子区片段经琼脂糖凝胶电泳鉴定表明目的条带特异性良好,条带大小正确:约 2.5 kb,如图 1 所示。

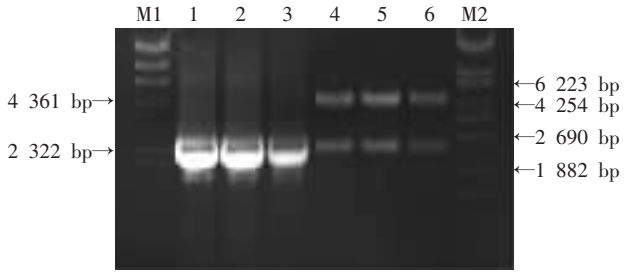


M:λ-*Hind* Ⅲ酶切;1、2:PCR 扩增片段

图 1 PCR 扩增得到约 2.5 kb 的 hITF 启动子区片段

2.2 启动子区片段正确构建至 pGL-3 basic 载体

构建质粒转化并挑取克隆经 PCR 及双酶切鉴定,双酶切结果显示得到 2 条片段大小与理论值符合:4.8 kb 片段为 pGL-3 basic,2.5 kb 片段为插入的 hITF 启动子区片段,如图 2 所示。测序结果与 EMBL-Bank 数据库中提交的 AB038162 基因序列比对完全吻合,构建好的质粒命名为:pGL-3 hITF Pro-2500。

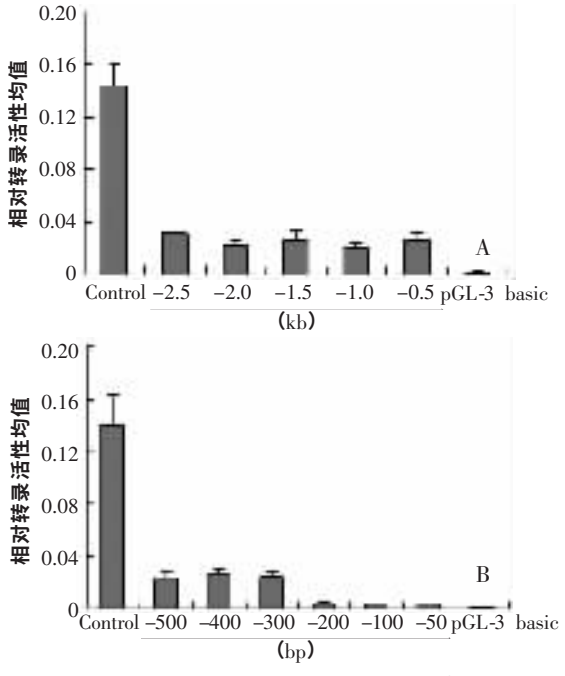


M1：λ-*Hind*Ⅲ酶切；1－3：PCR结果；4－6：pGL-3 hITF pro-2500双酶切（*Mlu*Ⅰ/*Xho*Ⅰ）结果；M2：λ-*Eco*T14酶切

图2 双酶切鉴定含有正确插入片段的阳性克隆

2.3 启动子活性分析结果

构建好的不同长度片段荧光素酶载体在HEK-293细胞中的活性，如图3所示。经过单因素方差分析，多重比对均为$P<0.01$，各组间差异显著。－2.5 kb/－0.5 kb与pGL-3 basic相比具有较高的活性（$P<0.01$），各个片段之间差异不明显。提示最小活性功能域在－0.5 kb以内；－500 bp进一步截短片段活性显示在－300与－200 bp之间活性值突然降低，－500/＋53，－400/＋53，－300/＋53片段活性介于0.023～0.026之间（$P>0.05$），－200/＋53，－100/＋53和－50/＋53活性介于0.003 2～0.004 2之间（组间差异不显著），最小活性功能域在－300/＋53 bp之间，－300/－200区域对hITF转录起始起关键作用。



A：－2.5 kb/－0.5 kb片段在HEK-293细胞中所表现出的活性，$P<0.01$，－2.5 kb/－0.5 kb与pGL-3 basic比较；B：－500/－50 bp片段在HEK-293细胞中的活性，$P<0.01$，－500/－300 bp与－200/－50 bp及pGL-3 basic比较（样本量$n=12$，Mean：95% *CI*）。

图3 不同区域转录启动活性分析

3 讨论

ITF在肠道黏膜损伤修复方面具有重要作用，对ITF表达调控研究已成为消化生理和消化系统疾病领域关注的焦点。像其他基因一样，ITF基因的表达同时受正性及负性调控[4－6]，而转录水平的调控则是首要环节。IL-3、IL-4[7,8]及HIF-1[9]等对ITF启动子区域相应的元件进行调控从而实现上调ITF的表达。相反，TNF-α及短链脂肪酸[10－13]等却能以类似的机制下调ITF的表达。但这两种调控都是在ITF特异性高表达的基础上实现相对的增强或减弱表达，目前为止少见到关于对hITF启动子基础表达调控的报道[12,13]，本研究希望通过对hITF启动子的研究找到能有效促进其转录表达的元件，因此我们对hITF基因上游－233 1/＋53区域分段进行了分析。在hITF分析发现其上游区域－2.5 kb/－0.5 kb区域活性无明显差别，说明保证转录能够有效进行的区域位于－500 bp以内，随后对－500 bp以内区域以每100 bp为单位进行逐级截短，我们发现其最小功能活性域在－300/＋53之间；－300/－200之间的活性值的突然变化表明了在此区域对hITF转录起始起关键作用，对此区域我们用TRANSFAC（http://www.gene-regulation.com/cgibin/pub/programs/pmatch/bin/p-match.cgi）中的P-Match软件进行了预测，发现了多个C-Rel结合位点；C-Rel为NF-κB家族的成员，具有潜在的激活转录活性可以有选择性的激活某些基因转录，推测在炎症状况下NF-κB信号通路的激活能以某种形式作用于ITF启动子－300/－200区域中的C-Rel位点，从而促进ITF mRNA的转录表达，这与我们此前观察到的在肠道炎症状态下ITF表达增高是相一致的，因此可能与－300/－200活性的下降有着较为密切的关系[14,15]，这也将是我们下一步的研究方向

志谢 感谢本院高压氧研究中心单佑安博士和本校基础部生化教研室黄刚博士在启动子构建时给予了技术层面的建议

参考文献：

[1] Kjellev S. The trefoil factor family-small peptides with multiple functionalities[J]. Cell Mol Life Scie, 2009, 66(8): 1350－1369.

[2] Otto W R, Thim L. Trefoil factor family-interacting proteins[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(24): 2939－2946.

[3] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers[J]. Methods Mol Biol, 2000, 132: 365－386.

[4] 陈勇，江军，张尧，等. 含rPB-DR启动子和TK基因的重组腺病毒的构建和鉴定[J]. 第三军医大学学报，2006，28(10)：1043－1045.

[5] 张艳，陈彬，李渝萍，等. 乳腺癌细胞中PNRC基因启动子区CpG岛甲基化状态的研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(4)：299－302.

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

[7] Baus-Loncar M, Lubka M, Pusch C M, *et al*. Cytokine regulation of the trefoil factor family binding protein GKN2 (GDDR/TFIZ1/blottin) in human gastrointestinal epithelial cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2007, 20(1/4): 193－204.

[8] Blanchard C, Durual S, Estienne M, *et al*. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis[J]. J Immunol, 2004, 172(6): 3775 - 3783.
[9] Furuta G T, Turner J R, Taylor C T, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia[J]. J Exp Med, 2001, 193(9): 1027 - 1034.
[10] Loncar M B, Al-azzeh E, Sommer P S, *et al*. Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide[J]. Gut, 2003, 52(9): 1297 - 1303.
[11] Miki K, Unno N, Nagata T, *et al*. Butyrate suppresses hypoxia-inducible factor-1 activity in intestinal epithelial cells under hypoxic conditions[J]. Shock, 2004, 22(5): 446 - 452.
[12] Seib T, Dooley S, Welter C. Characterization of the genomic structure and the promoter region of the human intestinal trefoil factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 214(1): 195 - 199.
[13] Seib T, Blin N, Hilgert K, *et al*. The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22. 3[J]. Genomics, 1997, 40(1): 200 - 202.
[14] Sanjabi S, Williams K J, Saccani S, *et al*. A c-Rel subdomain responsible for enhanced DNA-binding affinity and selective gene activation[J]. Genes Dev, 2005, 19(18): 2138 - 2151.
[15] Wang J, Wang X, Hussain S, *et al*. Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells[J]. J Immunol, 2007, 178(11): 6777 - 6788.

(**收稿**:2009-12-31;**修回**:2010-02-04)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2010)10-1027-01

个案与短篇

冷冻胚胎复苏后体外培养时间对妊娠的影响

马 博[1],许丽萍[2],张 红[1] (518029 广东 深圳,广东公安边防总队医院生殖科[1];253000 山东 德州,山东省德州市德城区妇幼保健院妇产科[2])

[关键词] 冷冻胚胎;冷冻胚胎复苏移植;优质胚胎;妊娠
[中图法分类号] R711.6;R321.1 **[文献标志码]** B

胚胎冷冻保存增加了体外受精-胚胎移植的成功率,降低了多胎妊娠的可能,也使得有剩余胚胎的患者在助孕失败后减少了反复控制性超促排卵产生的痛苦及经济压力,并为临床医生在面对有可能发生卵巢过度刺激综合征的患者时提供了一种有效解决办法,还为接受放疗或化疗的患者保留了生育后代的可能[1-3]。现在如何提高冷冻胚胎复苏移植的妊娠率,又成为一个生殖领域工作者必须面对的问题,现就我科对冷冻胚胎移植前 18 h 复苏与冷冻胚胎移植前 2 h 复苏对妊娠结局的影响报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

对本科 2009 年 3 月至 2010 年 2 月行冷冻胚胎复苏移植的 219 个周期进行回顾分析,患者年龄 24 ~ 38(31.2 ± 5.8)岁,不孕 2 ~ 15(4.3 ± 3.6)年。根据复苏时间不同分为提前 18、2 h 复苏组,再将每个组细分为非优胚(复苏后所有存活胚胎均为非优质胚胎)和优胚(复苏后存活胚胎至少有 1 枚为优质胚胎[1])两个亚组。提前 18 h 复苏 103 个周期,其中优胚组 71 个周期,非优胚组 32 个周期;提前 2 h 复苏 116 个周期,其中优胚组 75 个周期,非优胚组 41 个周期。

1.2 胚胎冷冻及解冻

取卵后第 3 天在移植后剩余胚胎中选择细胞数≥4,碎片率≤20% 的胚胎行玻璃化冷冻,并在复苏时行快速解冻法。

1.2.1 冷冻方法 保护剂为乙二醇、二甲基亚砜和蔗糖。在 37 ℃ 的热台上将胚胎移至含 5% SPS 的 HEPES-HTF(SAGE,美国)溶液中平衡 5 min,然后将胚胎移至含 7.5% 二甲基亚砜、7.5% 乙二醇和 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中平衡 2 min,后将胚胎转移至含 15% 二甲基亚砜、15% 乙二醇、0.65 mol/L 蔗糖和 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中反复洗涤并在 30 s 内将胚胎装入载体中,直接放入液氮,最后将胚胎移入储存罐中保存。

1.2.2 解冻方法 将胚胎载体从液氮中取出后直接浸入置于 37 ℃ 的热台上含有 0.35 mol/L 蔗糖和 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中平衡 2 min,然后转入含 0.2 mol/L 蔗糖和 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中平衡 3 min,后将胚胎转移至仅含 5% SPS 的 HEPES-HTF 溶液中平衡 5 min,最后将胚胎移入卵裂液(SAGE,美国)中并放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。

1.3 子宫内膜准备

1.3.1 自然周期法 用于月经周期规律,排卵正常的患者,即于月经第 12 天开始用阴道 B 超和尿黄体生成素(luteinizing hormone,LH)试纸监测卵泡发育及排卵,于排卵当天开始每日肌肉注射黄体酮针剂(浙江仙居)20 ~ 60 mg。在排卵后第 3 天解冻胚胎,选择 2 ~ 3 枚优质胚胎移植。

1.3.2 激素替代法 用于排卵异常的患者,即于月经第 3 天起以递增法口服戊酸雌二醇片(先灵广州),B 超监测子宫内膜,子宫内膜厚度达 9 ~ 12 mm 时,开始每日肌肉注射黄体酮 20 ~ 60 mg。注射黄体酮第 3 天解冻胚胎,选择 2 ~ 3 枚优质胚胎移植。胚胎移植均在 B 超引导下进行。

1.4 观察指标

胚胎移植后 14 d 测晨尿 HCG,阳性为生化妊娠,移植后 35 d B 超见孕囊为临床妊娠。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 12.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

(下转 1037 页)

[通信作者] 马 博,电话:(0755)82267770,E-mail:mb235000@yahoo.com