维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0334-03

Visfatin 转录调控的生物信息学分析

曾建涛,王继红

(重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:分析 Visfatin 基因可能的转录启动子区段及转录因子结合位点。方法:检索网上数据库资料,获得 Visfatin 的转录本信息;运用 CpG/CpGReport/Isochore 和 FirstEF 对 Visfatin 基因进行 CpG 岛分析和第一外显子预测;利用 PromoterScan 等程序对 Visfatin 的启动子进行预测。再用 Matlspector、TFSEARCH 和 Match 预测潜在的调控元件及转录因子结合位点。结果:目前已知的 Visfatin 转录本中,5'UTR 区最长的序列为 NM_005746;Visfatin 基因属于典型的 CpG 岛相关基因,在 NM_005746 的 5'上游 229bp 到 798bp 内很可能存在启动子,在该区域内发现了一些重要的顺式作用元件。结论:NM_005746 的 5'上游 229bp 到 798bp 内存在一些重要的顺式作用元件,通过实验确认这些转录因子结合位点有重要意义。

【关键词】Visfatin;转录调控;生物信息学

【中国图书分类法分类号】Q811.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-13

Bioinformatics analysis of the transcriptional regulation of Visfatin

ZENG Jian-tao, et al

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To map the approximate transcription factors binding site of Visfatin and identify its potential promoter region. *Methods*: All reported transcripts of Visfatin were collected through searching online database. Visfatin gene were analysed by CpG/CpGReport/Isochore and FirstEF to predict the CpG island and possible first exon, respectively. The Visfatin gDNA sequence was also analysed by softwares such as PromoterScan to predict the probable promoter region. Matlspector、TFSEARCH and Match were used to predict potential transcription factors binding sites. *Results*: Among all the reported transcripts of Visfatin, 5'UTR of NM_005746 Was the longest. Visfatin gene Was a typical CpG island associated gene. Promoters were predicted in the NM_005746 5'upstream 229 ~ 798bp region. In this region, a lot of cis-acting element were found. *Conclusion*: The transcription initiation site of Visfatin have been indentified. A lot of transcription factors binding sites were predict in the NM_005746 5' upstream 229 ~ 798bp region. It is important to definite those transcription factors binding sites through experimental methods.

【Key words】Visfatin; Transcriptional regulation; Bioinformatics

Visfatin 是 2005 年 Fukuhara 等从人和小鼠的内脏脂肪中鉴定的一种新的脂肪因子。它可以结合并激活胰岛素受体,从而模拟胰岛素作用[1]。目前研究表明 Visfatin 在 2 型糖尿病、脂肪细胞分化、血管平滑肌细胞的成熟及其他脂肪细胞因子分泌的过程均有重要意义[2],可能是糖尿病治疗的新靶点[3]。而关于其表达研究的结果表明其表达丰度在不同疾病状态下及不同药物干预时存在差异性,因此对 Visfatin 基因进行转录调控研究无疑具有非常重要的意义。随着生物信息学的发展,对基因的转录调控进行分析可以减少实验的盲目性。

作者介绍:曾建涛(1982-),男,硕士,
研究方向:糖尿病和高脂血症。

通讯作者:王继红,女,副教授,E-mail:wjhkyh@163.com。

1 材料和方法

1.1 Visfatin 转录本的获得

利用下列生物信息数据库

PubMed:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/

GenBank:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Ensembl:http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/

1.2 Visfatin 基因 5'末端 CpG 岛及第一外显子的在线预测

利用下列在线软件

CpG/CpGReport/Isochore:http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/

维普资讯 http://www.cqvip.com

FirstEF:http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF/

1.3 Visfatin 基因转录起始位点和启动子区段预测

利用下列在线分析软件

PromoterScan : http : //bimas . dcrt . nih . gov/molbio/proscan/

NeuralNetwork Promoter Prediction(NNPP):

http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html

FirstEF: http ://rulai.csh1.org/tools/FirstEF/

1.4 Visfatin 启动子区域转录因子结合位点预测

利用下列在线分析软件

MatIspector:http://www.genomatix.de/

TFSEARCH:http://www.cbrc.ip/research/db/TFSEAECH.htm

Match:http://www.gene-regulation.com/

2 结 果

2.1 Visfatin 转录本信息和 gDNA 序列

在 GenBank、Emsembl 等数据库检索及核酸序列比对,发现 NM_005746 为该基因目前 5'UTR 最长的 mRNA 序列,比 U02020 的 5'UTR 长 281bp。在 Visfatin 的 gDNA 序列中选取包含 NM_005746 的 5'UTR 上游区域及"第一外显子(94bp)"和"第一内含子(7648bp)"共 15.0kb 序列用于后续的分析。

2.2 CpG 岛分析及第一外显子预测

利用 CpG/CpGReport/Isochore 进行 CpG 岛分析,发现1个CpG岛6715~8011bp(图1),NM_005746 的 5'末端及其上游序列完全位于该 CpG 岛内,表明 Visfatin 属于与 CpG 岛关联基因,适合利用 FirstEF 进行第一外显子的分析。FirstEF 结果显示预测的第一外显子区段位于 6 688bp ~ 6 802bp,在 NM_005746 第一外显子上游 298bp,表明在 NM_005746上游还有可能有更长的 5'UTR 序列。

2.3 启动子候选区域的预测结果

PromoterScan 结果 在 NM_5746 上游 146bp ~ 396bp 存在可能的启动子区域。

Neural Network Promoter Prediction 结果 在 NM_005746 上游存在 15 个可能的启动子区域。

FirstEF 结果 在 NM_5746 上游 229 ~ 798bp 有 1 个可能的启动子区域。

2.4 近端启动子的调控元件位点预测结果

结合上述所预测的启动子区域,考虑到 FirstEF 预测结果敏感性和特异性高的特点,Visfatin 的高度候选启动子区段应位于 NM_005746 上游 229 ~ 798bp 内。MatIspector、TFSEARCH 和 Match 分别显示在该区域有 78、44 和 34 个转录因子结合位点。同时被 3 种软件预测的结合位点有 4 个,被 2 种软件预测的结合位点有 6 个,见表 1。

3 讨 论

随着生物数据的海量增长,生物信息学已广泛应用于系统发育预测、基因预测、空间结构预测等方面。基因转录调控的生物信息学分析对基因功能研究有重要意义,可以避免实验不必要的盲目。目前用于确定转录起始位点的实验方法有引物延伸(Primer extension)、5'RACE(Rapid amplification of

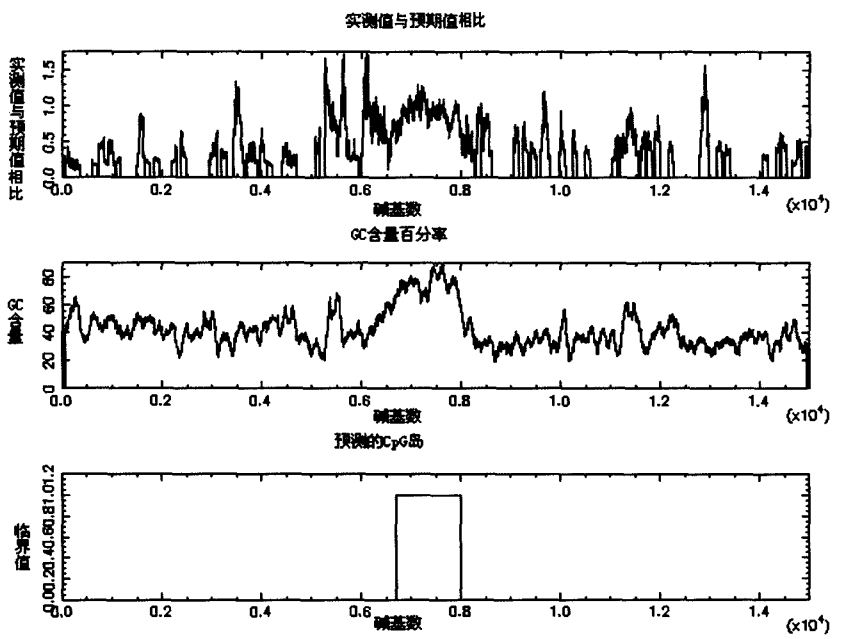


图 1 利用 CpG/CpGReport/Isochore 预测的 CpG 岛信息,中图表示 GC 的含量,下图表示 CpG 岛的范围

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 通过软件预测到的转录因子结合位点

	CREB	GATA-1	v-Myb	Nkx-2	MZF1	S8	SP1	AP-1	HNF-4	CP2
MatIspector	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TFSEARCH	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Match	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+

+ 表示利用该在线软件预测到的转录因子结合位点；− 表示利用该在线软件未预测到的转录因子结合位点

cDNA ends)等[4,5],但均需要大量的实验工作。如果充分利用网上数据库资源寻找尽可能长的 5'端 cDNA 序列,将大大缩减确定转录起始位点的实验工作量。

通过在线软件进行第一外显子预测可以初步确定所获得的某一基因的 cDNA 序列 5' 端是否已基本接近其真正的转录起始位点。FirstEF 由于其敏感性与特异性均高达 90%以上而备受青睐。但由于 FirstEF 预测的高准确率主要适用于 CpG 相关基因[6],所以在使用 FirstEF 进行预测分析前,一般需对目的基因的 gDNA 序列进行 CpG 岛预测分析,确定其是否为 CpG 岛相关基因。MethPrimer 最大只能处理 5 000bp,因此本文用 CpG/CpGReport/Isochore 和 FirstEF 对包含 Visfatin 上游的 gDNA 片段序列进行 CpG 岛分析和第一外显子预测。

本文利用 PromoterScan、Neural Network Promoter Prediction 以及 FirstEF 3 种在线软件对 Visfatin 基因 5'UTR 上游的 15kb 的 gDNA 片段序列进行分析,考虑到 FirstEF 预测结果特异性高的特点,Visfatin 的高度候选启动子区段应位于 NM_005746 的 5'上游 229～798bp 内。在这个区域内搜索到大量转录因子结合部位,其中部分结合位点的意义已经被实验证明。如 NF-κB、AP1、PPAR-α、PPAR-γ 等。Choi[7]研究表明 PPAR-α,PPAR-γ 激动剂促进 Visfatin mRNA 的表达。同样 Kendal 等[8]研究发现在羊膜上皮细胞中,Visfatin 的表达受 NF-κB 和 AP1 的调节。表 1 中所示的转录因子除 AP1 外,其他的转录因子对 Visfatin 表达的调节尚未见实验报道。但这些转录因子对其他与脂代谢相关基因的转录调节的意义已经得到实验证实,这些因子很可能对 Visfatin 的转录调控也有重要意义。

由于 Matlspector、TFSEARCH 和 Match 都是基于权重矩阵数据库搜索的,使搜索比较敏感,但它最大的弊端在于假阳性率过高,在预测的结果中有很多结合部位并不真正具有生物学功能[9],所以对预测到的位点有必要通过实验来验证。

总之,Visfatin 是脂肪细胞分泌的又一新的细胞因子,在糖尿病和其他代谢性疾病的发生发展中有重要意义[10]。现有的实验结果表明 Visfatin 启动子区域的转录因子结合位点对该基因的表达有重要作用,通过对 Visfatin 的生物信息学分析,预测到的转录因子结合部位将为进一步研究该基因的转录调控机制提供支持。

参 考 文 献

[1] Fukuhara A,Matsuda M,Nishizawa M,et al. Visfatin:a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin[J]. Science, 2005;307(5708):426-430.

[2] Van der Veer E,Nong Z,O'Neil C,et al. Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD+ -dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation[J]. Circ Res,2005;97(1):25-34.

[3] Kloting N,Kloting I.Visfatin:gene expression in isolated adipocytes and sequence analysis in obese WOKW rats compared with lean control rats[J]. Biochem Biophys Res Commun,2005;332(4):1070-1072.

[4] J.萨姆布鲁克,DW.拉塞尔,著,黄培堂,译.分子克隆实验指南[M]. 第 3 版.北京:科学出版社,2002.644.

[5] 卢圣栋.现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版.北京:中国协和医科大学出版社,2004.553.

[6] Davuluri R V,Gmsse I,Zhang MQ. Computational identification of promoters and first exons in the human genome[J]. Nat Genet, 2001;29(4):412-417.

[7] Choi KC,Ryu OH,Lee KW,et al. Effect of PPAR-α and-γ agonist on the expression of visfatin,adiponectin,and TNF-α in visceral fat of OLETF rats[J]. BBCR,2005;336(3):747-753.

[8] Kendal CE,Bryant-Greenwood GD.Pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF/Visfatin) gene expression is modulated by NF-kappaB and AP-1 in human amniotic epithelial cells[J]. Placenta,2007;28(4):305-314.

[9] 刘天婵,余应年.生物信息学在基因转录调控研究中的应用[J]. 中国病理生理杂志,2004;20(4):668-667.

[10] Hug C,Lodish HF.Visfatin:a new adipokine[J]. Science,2005;307(5708):366-367.

(责任编辑:谭乐勤)