维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)03-0337-03

LAPTM4B 启动子荧光素酶报告基因重组体的构建

彭方毅[1], 张青云[2], 周柔丽[3], 邵根泽[3], 涂植光[1]

(1.重庆医科大学医学检验系,重庆 400016;2.北京大学临床肿瘤学院,北京肿瘤医院检验科,
北京市肿瘤防治研究所免疫研究室,北京 100036;3.北京大学基础医学院细胞生物学与遗传学系,北京 100083)

【摘 要】目的:LAPTM4B 基因是肝癌中高度表达的新基因。为下一步 LAPTM4B 启动子的活性分性,本文构建了 LAPTM4B 基因启动子调控的报告基因重组表达质粒。方法:以 LAPTM4B 基因组 cDNA 为模板扩增翻译起始位点上游 DNA 序列。PCR 产物定向克隆到含荧光素酶报告基因的载体 pGL3-Basic 中,并经限制性内切酶消化鉴定。结果:通过酶切鉴定和基因测序,证明成功地构建了三种不同长度的 pGL3-LAPTM4B-Luc 荧光素酶表达质粒,形成了系列的 LAPTM4B 启动子重组体。结论:充分利用生物信息学资源,利用已知基因的启动子序列,可快速,准确地克隆已知基因启动子序列并构建启动子载体。LAPTM4B 启动子荧光素酶报告基因重组体的构建为 LAPTM4B 启动子的活性分析奠定了基础。

【关键词】LAPTM4B;基因表达;启动子
【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-02-17

Construction of LAPTM4B promoter-luciferase reporter recombinants

PENG Fangyi, et al

(*Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: LAPTM4B is a novel gene which is over expressed in HCC. To evaluate LAPTM4B gene promoter on gene transcription, we construct luciferase reporter plasmid pGL3-LAPTM4B-Luc. *Methods*: The LAPTM4B cDNA was used as a template in the polymerase chain reaction to amplify its upstream regions from the translation initiation codon. The PCR product was directly cloned into the luciferase reporter vector pGL3-Basic. *Results*: Restriction enzymes digestion and nucleotide sequencing confirmed that the recombinant plasmids were correct without base mutation and deletion. *Conclusion*: A known gene promoter sequence could be freely obtained from Genbank database. This is very useful for the gene promoter cloning and promoter vector constructing. The construction of LAPTM4B recombinant plasmid lay a foundation of the analysis of promoter activities.

【Key words】LAPTM4B (lysosome associate protein transmembrane 4 beta); Gene expression; Promoter

LAPTM4B 基因是通过荧光差异显示技术筛选出可在成人正常肝中低表达而在绝大多数癌组织表达高度上调的未知 cDNA 片段(LC27-DD),测序结果表明这是一个位于 8q22.1 的新基因,具有 7 个外显子,6 个内含子[1]。基于其含有 4 个跨膜区、典型的溶酶体定位信号及与 LAPTM4A 同源 46% 这样一些结构特性,这一新基因编码的蛋白质被 HUGO 命名为溶酶体相关 4 次跨膜蛋白质 B(lysosome-associated protein transmembrane 4 beta),缩写为 LAPTM4B[1-4]。众多研究表明,染色体 8q22.1 区域在肝癌、食管癌等多种肿瘤存在染色体扩增[5,6]。LAPTM4B 基因在大部分肝癌高表达,而这个基因恰好位于染色体 8q22.1。但对一些 LAPTM4B 基因高表达肝癌标本的 Southern blot 研究,并未发现该基因在 DNA 水平的明显扩增,因而推测 LAPTM4B 在肝癌高表达的原因是否为转录调节的失控。作为进一步研究 LAPTM4B 基因表达调控、活性及其生物学作用的前期工作,利用 PCR 技术扩增了 LAPTM4B 基因并构建了多个调控荧光素酶报告基因的真核表达载体。

1 材料与方法

1.1 试剂

大肠杆菌菌株 JM109 由北京市肿瘤研究所免疫 208 室

作者介绍:彭方毅(1970-),男,博士,
主要研究方向:肝癌相关基因 LAPTM4B 的表达调控。

基金项目:北京市自然科学基金重点项目(编号:7041003)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

保存;dNTPs、Taq DNA Polymerase、限制性内切酶 *Xho* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、pGEM - Teasy、pGL3 - Basic、pGL3 - Promoter 载体为 Promega 公司产品;DNA 回收试剂为天为时代公司产品;胰蛋白胨、酵母菌提取粉、细菌琼脂粉、琼脂糖为 Oxoid 公司产品;质粒提取试剂盒为 Qiagen 公司产品;Platinum Pfx DNA Polymerase 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 引物设计

利用邵根泽博士所获 LAPTM4B 基因 cDNA 序列[4],用 Primer 软件包设计 3 个上游引物和 1 个下游引物(上海申友生物技术公司合成)。引物序列见表 1,其中引物 1,2,3 的下游引物为引物 4。启动子重组体 pGL3 - 1498bp,pGL3 - 1038bp,pGL3 - 715bp,pGL3 - 195bp 由邵根泽博士提供。

表 1 构建系列报告基因重组体所用 PCR 引物

引物名称	位 置	序 列
引物1	-899~-926	5'AAACTCGAGAACAAATTAGCCAGGCGT3'
引物2	-538~-565	5'AAACTCGAGTGATAGGAGCTGTATCGA3'
引物3	-361~-388	5'AAACTCGAGATTAGCCGGGTGTGGTGG3'
下游引物4	+105~+132	5'AAAAAGCTTCCGAGTCCGTGACGTCAT3'

1.3 PGL3 - Basic 载体的酶切产物及回收

用 Xho Ⅰ和 Hind Ⅲ内切酶将 pGL3 - Basic 载体进行双酶切后,琼脂糖凝胶电泳,用回收试剂盒回收纯化分子量大的酶切产物。

1.4 PCR 扩增

通过 PCR 法,以 pGL3 - 1498 重组体 DNA 为模板,用超高保真 DNA 聚合酶 Pfx 扩增得到 LAPTM4B 基因第一外显子的部分序列及其上游不同长度序列。为了方便克隆,在各上游引物 1、2、3 的 5'端引入 Xho Ⅰ酶切位点,在下游引物 4 的 5'端引入 Hind Ⅲ酶切位点。首先用上游引物 1,下游引物 4 扩增,条件如下:96℃ 预变性 5min;94℃ 30s,65℃ 30s,72℃ 2min,35 循环;72℃ 延伸 5min。PCR 产物经 Xho Ⅰ、Hind Ⅲ酶切后,用 T_4DNA 连接酶连接插入 pGL3 - Basic 相应的多克隆位点,$CaCl_2$ 法常规转化大肠杆菌 JM109,筛选阳性克隆,构建得到 pGL3 - 926bp,测序鉴定。以 pGL3 - 1498bp 为模板,用引物 2、3 分别与引物 4 扩增不同长度片段启动子,PCR 条件根据不同引物稍作调整。

1.5 重组体构建

上述 PCR 产物用试剂盒回收,Xho Ⅰ,Hind Ⅲ酶切回收纯化,用 T_4DNA 连接酶与 PGL3 连接,$CaCl_2$ 法转化大肠杆菌 JM109,筛选阳性克隆,构建得到不同长度片段启动子—荧光酶载体 pGL3 - 926bp、pGL3 - 565bp、pGl3 - 388bp。并与 pGL3 - 1498bp,pGL3 - 1038bp、pGL3 - 715bp、pGL3 - 195bp 构成一系列启动子重组体。

1.6 重组体鉴定

以上各质粒用 *Xho* Ⅰ,*Hind* Ⅲ酶切鉴定并经 DNA 序列分析证实。用 Qiagen 质粒提取试剂盒制备纯化 DNA。利用紫外分光光度计检测纯度和定量。

2 结 果

LAPTM4B 基因启动子及亚克隆启动子 PCR 的电泳结果见图 1。

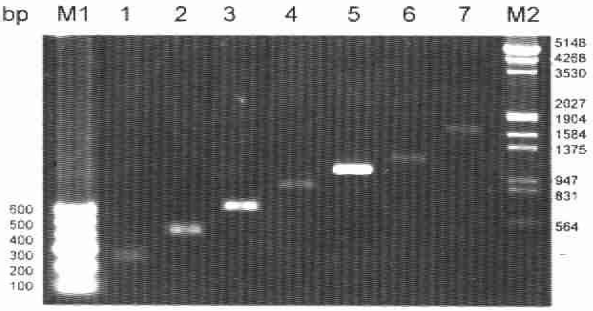


图 1 LAPTM4B 启动子 PCR 产物的电泳结果

M1:DNA 分子量标准(100 - 600bp) M2:Lambda DNA/Eeor Ⅰ + Hind Ⅲ

1:pGL3 - 195bp;2:pGL3 - 388bp;3:pGL3 - 565bp;4:pGL3 - 715bp;5:pGL3 - 926bp;6:pGL3 - 1038bp;7:pGL3 - 1498bp

上述 PCR 产物用 Xho Ⅰ,*Hind* Ⅲ内切酶消化后,经纯化、连接、大肠杆菌转化、筛选、提取等所制备的质粒 DNA,经 Xho Ⅰ,*Hind* Ⅲ酶切,电泳结果可见预期条带(图 2)。

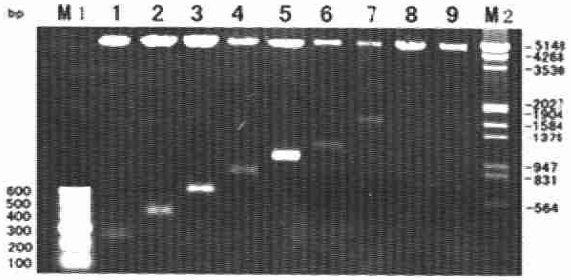


图 2 LAPTM4B 基因启动子及亚克隆启动子 Xho Ⅰ/Hind Ⅲ双酶切鉴定结果

1:pGL3 - 195bp;2:pGL3 - 388bp;3:pGL3 - 565bp;4:pGL3 - 715bp;5:pGL3 - 926bp;6:pGL3 - 195bp;7:pGL3 - 1498bp;8:pGL3 - basic;9:pGL3 - promoter

3 讨 论

LAPTM4B 的基因片段由周柔丽教授实验室通过差异荧光显示法发现,首先从肝癌组织中完成了大部分序列的克隆,用狭缝杂交予以证实[1,2]。并通过 RACE、RT - PCR 等方法对以前克隆序列的

维普资讯 http://www.cqvip.com

5'端进行了修正,得到了准确的全长 cDNA 序列。Northern 杂交表明,这个基因在肝癌组织,尤其是低分化肝癌高度表达,在中分化肝癌组织和正常胎肝组织中度表达,而在高分化肝癌组织、癌旁组织(非癌组织)和正常成人肝组织低水平表达。在大部分肝癌细胞系和正常肝来源的永生化细胞系 LAPTM4B 基因也较高表达[4]。以上结果强烈提示,LAPTM4B 可能对细胞的生长、增殖和分化起重要作用,它的高表达可能是肝癌进展到一定阶段(后期)的一个重要分子遗传学标志。周柔丽教授以前和近期的研究也都证明 LAPTM4B 与细胞的生长和增殖有一定的关系[7],由含全长 LAPTM4B cDNA 真核表达载体转染的 HLE 细胞克隆形成率比对照高;生长速度、DNA 合成及细胞周期运行加快;尤其是对生长因子的依赖性降低,并具有较强的软琼脂糖凝胶集落形成能力;细胞迁移及侵袭人工基膜的能力也显著增强[8,9]。这些结果提示 LAPTM4B 的过表达与肝细胞的癌变和进展可能有关系。可见 LAPTM4B 基因可能是一个与肝癌密切相关的一个重要基因,因此,有必要对 LAPTM4B 基因的表达调控进行深入研究。基因的表达调控可以在不同水平及多个阶段进行,但在转录水平调控基因表达是最经济和有效的。对 LAPTM4B 基因启动子的结构、功能及其在癌细胞中的表达调控机理进行研究,将有助于阐明癌细胞生长、分化、恶变的分子机理。

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和调控。利用报告系统研究 LAPTM4B 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 1 个非同位素遗传报告系统。与目前常用的 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道分子。作为 LAPTM4B 基因启动子调控进一步研究的前期工作,本文扩增了该基因 5'端上游一系列不同长度的 DNA 序列,并克隆到质粒 pGL3 - Basic 中,成功构建了 LAPTM4B 表达调控载体。为体外研究 LAPTM4B 启动子转录调节提供了新的手段。目前 LAPTM4B 基因启动子的结构和功能的研究尚处于起始阶段,上述工作将为进一步研究该基因启动子区重要的顺式调控元件和相关的反式作用因子以及核基因对于诱导信号的应答机制,发现调控该基因表达的重要的靶标打下基础。

(通讯作者:张青云,男,研究员,主要从事分子免疫学及肿瘤标志物的研究)

参 考 文 献

[1] 刘军建,张 杰,周柔丽,等.用荧光差异显示法分离新的肝细胞癌相关基因[J].北京医科大学学报,2000;32:411 - 414.

[2] 刘军建,张 杰,周柔丽,等.LHS cDNA 的部分克隆及其表达对肝癌细胞行为的影响[J].北京医科大学学报,2000;32:526 - 529.

[3] Liu JJ, Zhou RL, Zhang N, et al. Biological function of a novel gene over expressed in human hepatocellular carcinoma [J]. Chinese Medical J, 2000;113:881 - 885.

[4] Shao GZ, Zhou RL, Zhang QY, et al. Molecular cloning and characterization of LAPTM4B, a novel gene upregulatively expressed in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2003;22: 5060 - 5069.

[5] Adra, CN, Zhu, S, Ko, JL. LAPTM5: a novel lysosomal - associated multispanning membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells[J]. Genomics, 1996; 35: 328 - 337.

[6] Origasa, M; Tanaka, S; Suzuki, K; Activation of a novel microglial gene encoding a lysosomal membrane protein in response to neuronal apoptosis[J]. Brain - Res - Mol - Brain - Res, 2001;88(1 - 2):1 - 13.

[7] 何 静,邵根泽,周柔丽.肝癌中高表达的新基因 LAPTM4B 对细胞增殖及成瘤性的影响[J].北京大学学报(医学版),2003;35:348 - 352.

[8] 刘歆荣,周柔丽,张青云,等.人肝癌相关新基因编码产物,LAPTM4B 的鉴定及其生物学特性[J].北京大学学报(医学版),2003;35:340 - 347.

[9] Xin - rong Liu, Rou - li Zhou, Qing - yun Zhang, et al. Structure analysis and expression of a novel tetratransmembrane protein, LAPTM4B associated with hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterology, 2004;10(11):1555 - 1559.