

文章编号: 1674-8085(2017)01-0040-05

人 *MTERF3* 基因启动子的克隆及其荧光素酶报告基因载体的构建

张晓娟^{1,2}, 孙美涛¹, 梅 雯¹, 自加吉¹, 杨勇琴¹, *熊 伟^{1,3}

(1. 大理大学基础医学院, 云南, 大理 671000; 2. 大理市第一人民医院呼吸内科, 云南, 大理 671000;

3. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南, 大理 671000)

摘 要: 人 *MTERF3* 基因编码线粒体基因转录和能量代谢的负调控因子。采用 PCR 技术对人 *MTERF3* 基因 5'侧翼上游 1251 bp 启动子序列进行扩增, 并将其克隆至荧光素酶表达载体 pGL6-TA, 构建人 *MTERF3* 基因启动子荧光素酶报告基因质粒。经酶切、测序鉴定后, 将其用脂质体转染体外培养的 HEK293 细胞株, 利用双荧光素酶测定系统检测其表达活性。研究表明, 克隆获得的 1251 bp DNA 序列与 GenBank 报道的一致, 且插入方向正确。含人 *MTERF3* 基因启动子的报告基因荧光素酶的表达活性显著提高 ($P < 0.05$), 约为对照组(空载体 pGL6-TA)的 9.8 倍。本研究通过对人 *MTERF3* 基因启动子的克隆及其荧光素酶表达载体构建与表达活性的测定, 为进一步阐明人 *MTERF3* 基因表达的调控机制奠定实验基础。

关键词: 人 *MTERF3*; 启动子; 报告基因; 荧光素酶; 载体

中图分类号: Q785

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2017.01.008

CLONING OF HUMAN *MTERF3* PROMOTER REGION AND CONSTRUCTION OF THE LUCIFERASE REPORTER GENE VECTORS CONTAINING HUMAN *MTERF3* PROMOTER

ZHANG Xiao-juan^{1,2}, SUN Mei-tao¹, MEI Wen¹, ZI Jia-ji¹, YANG Yong-qin¹, *XIONG Wei^{1,3}

(1. College of Medical Sciences, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China;

2. Dali First People's Hospital, Dali, Yunnan 671000, China;

3. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: Human mitochondrial transcription termination factor 3 (*MTERF3*) protein is a negative regulator of human mitochondrial gene expression and energy metabolism. Human *MTERF3* gene was amplified with the human genome by PCR, the segment was cloned into the eukaryotic expression vector pGL6-TA. The recombinant was detected by endonuclease and sequenced. Plasmid pGL6-*MTERF3*-promoter was transfected into HEK293 cells by lipofectamine 2000. The activity of luciferase was detected, and the effect of the human *MTERF3* promoter was studied. The sequenced segment (1251bp) in the recombinants was identical to that reported in GenBank and the segment was inserted in right direction. The dual-luciferase analysis results showed

收稿日期: 2016-07-20; 修改日期: 2016-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560458, 31601155); 云南省教育厅科学研究基金重点项目(2014Z126); 大理大学博士科研启动基金项目(BSKY2012018); 大理大学大学生创新创业训练计划项目(201628)

作者简介: 张晓娟(1984-), 女, 云南大理人, 护师, 主要从事呼吸科护理研究(E-mail: 791372366@qq.com);

孙美涛(1988-), 女, 山东日照人, 硕士生, 主要从事细胞分子生物学研究(E-mail: smtshandong@126.com);

梅 雯(1989-), 女, 云南昆明人, 硕士生, 主要从事细胞分子生物学研究(E-mail: meiwen1989@126.com);

自加吉(1980-), 男, 云南大理人, 讲师, 硕士生, 主要从事分子病理学研究(E-mail: zjjdxyjxy@163.com);

杨勇琴(1979-), 女, 云南昆明人, 讲师, 硕士, 主要从事细胞生物学研究(E-mail: yyq1979@sina.com);

*熊 伟(1982-), 男, 湖南株洲人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事医学分子生物学和生物信息学研究(E-mail: xwailp@163.com).

that the human *MTERF3* promoter containing 1251bp fragment had the high transcriptional activity in HEK293 cells transfected with the recombinant plasmid, which were about 9.8 times of those in negative control group (empty vector pGL6-TA). The luciferase reporter gene vector with human *MTERF3* promoters of 1251bp has been constructed successfully, which lay a foundation of further study on the regulation of the human *MTERF3* gene expression.

Key words: human *MTERF3* gene; promoter; reporter gene; luciferase; vector

人线粒体转录终止因子 3 (*mitochondrial transcription termination factor 3*, *MTERF3*) 基因属于线粒体转录终止因子基因超家族的成员, 定位于人类染色体 8q22.1, 由 11 个外显子和 10 个内含子组成^[1]。人 *MTERF3* 基因编码的蛋白质产物由 417 个氨基酸残基构成, N 端 1-68 个氨基酸为进入线粒体的导肽, 其后 349 个氨基酸为成熟的 *MTERF3* 蛋白^[2]。已有研究证实, 人 *MTERF3* 是线粒体基因转录和能量代谢的负调控因子^[3], 但其自身表达调控的机制目前仍不明确。基因表达的启动、RNA 水平的修饰、蛋白水平的调节等环节是影响基因的表达水平的主要因素, 其中最为关键的一环是基因转录水平的起始^[4]。启动子对转录激活起着重要的作用, 所以启动子的克隆是研究启动子活性的基础。目前, 国内外尚未见有关于人 *MTERF3* 基因启动子克隆的研究报道。因此, 本研究用 PCR 技术扩增人 *MTERF3* 基因启动子区 1251 bp 的 DNA 序列, 克隆至荧光素酶报告基因载体 pGL6-TA, 并对其转录活性进行初步分析, 为进一步研究人 *MTERF3* 基因表达调控的分子机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

人胚肾 HEK293 细胞株和感受态大肠杆菌 JM109 细胞株由本实验室保存。

1.1.2 试剂

荧光素酶报告基因载体 pGL6-TA、海肾荧光素酶报告基因载体 pRL-TK 载体、RIPA 细胞裂解液、双荧光素酶检测试剂盒 (dual luciferase reporter Kit)、PBS 缓冲液 (pH7.4) 购自上海碧云天生物技术有限公司, 全血基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物技术有限公司, PCR 产物纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、小量质粒 DNA 提取试剂盒、

Hot-Start Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶、DL2000 DNA Marker 等购自大连宝生物工程有限公司, 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, 其他化学试剂均为国产分析纯。引物合成和 DNA 测序由昆明硕擎生物技术公司完成。

1.1.3 仪器

2720 Thermal Cycler 型 PCR 扩增仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 9507 Lumat LB 光度计 (德国 Berthold Technologies GmbH & Co.KG); 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 恒温振荡器 (江苏太仓实验厂); 高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司); UV-2000 切胶仪 (上海天能科技有限公司); DYY-6C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); SW-CJ-1FD 超净工作台 (苏州净化有限公司); 生物安全柜 (苏州安泰空气技术有限公司); 全自动灭菌锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 3111 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); HH-4 恒温水浴锅 (上海国华电器有限公司); 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 UCSC 基因组数据库中的人 *MTERF3* 基因序列, 提取该基因 5'侧翼启动子区 3000 bp 的序列, 用软件 TFSEARCH ver 1.3 对该基因启动子区进行预分析^[5]。再根据生物信息学分析结果及人 *MTERF3* 基因启动子区包含 CpG 岛的 1251 bpDNA 序列, 采用 Primer premier 5.0 软件包设计一对特异性引物, 上游引物 5'端加入 *Kpn* I 酶切位点, 下游引物 5'端加入 *Hind* III 酶切位点, 上游引物为 *MTERF3*-promoter-F: GGCGGTACCAGCGGTGTG TGCTGAA, 下游引物为 *MTERF3*- promoter-R: GGCAAGCTTTCTACTGGGCGGCG AAA。

1.2.2 基因组 DNA 的提取

抽取健康人静脉血 3 mL, 分离外周血单个核细胞, 用基因组 DNA 提取试剂盒提取外周血基因组 DNA, 作为 PCR 扩增的模板, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 PCR 扩增

利用合成的一对特异性引物 (*MTERF3*-promoter-F 和 *MTERF3*-promoter-R), PCR 扩增人 *MTERF3* 基因启动子序列, PCR 反应体系为: 基因组 DNA 模板 1 μ L, 10 $\times$ Taq 酶缓冲液 5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L, dNTP 2 μ L, 补充双蒸馏水至总体积为 50 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。取所有 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 再用 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化。

1.2.4 重组荧光素酶报告基因载体的构建及鉴定

PCR 扩增人 *MTERF3* 基因 5'侧翼启动子中 1251 bp 的 DNA 片段, 经过电泳和胶回收纯化后用 *Kpn* I 和 *Hind* III 限制性核酸内切酶消化, 连接至 pGL6-TA 质粒荧光素酶 (Luciferase) 基因上游。重组质粒转化到感受态大肠杆菌 JM109, 经双酶切和 PCR 鉴定后, 送昆明硕擎生物技术有限公司进行 DNA 测序, 测序引物为 RVprimer3-F: CTAGCAAAA TAGGCTGTCCC, RVprimer3-R: CTGAGCGTCA GACCCCGTAG。将成功构建的质粒命名为 pGL6-*MTERF3*-promoter。

1.2.5 细胞培养与转染

用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 HEK293 细胞, 传代后以 2×10^4 个/孔接种至 24 孔细胞培养板中, 待细胞生长至约 80%~90% 融合时, 利用脂质体 Lipofectamine 2000 将上述构建的重组质粒与内参对照质粒 pRL-TK 共转染 HEK293 细胞, 内参对照与重组表达质粒的比值为 1:20, 以转染 pGL6-TA 空载体为对照物。质粒转染操作严格按试剂盒说明书进行。每组设 3 个复孔, 独立重复实验 3 次。

1.2.6 荧光素酶表达活性的检测

重组荧光素酶报告基因质粒通过脂质体介导转染 HEK293 细胞 48 h 后, 离心收集细胞, 用灭菌的 PBS 洗涤细胞 2~3 次, 分别加入 RIPA 细胞裂解液, 待细胞完全裂解后离心收集上清液, 检测荧光素酶活性, 严格按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书操作, 取样本 20~100 μ L, 加入 100 μ L 萤

火虫荧光素酶检测试剂, 混匀后, 以报告基因细胞裂解液为空白对照, 测定萤火虫荧光素酶相对光单位 (RLU, relative light unit), 然后再加入 100 μ L 海肾荧光素酶检测工作液, 混匀后测定海肾荧光素酶相对光单位。分别记录萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase) 激发底物释放荧光的数值 (RLU1), 样本中内参对照质粒携带的海肾荧光素酶 (Renilla luciferase) 激发底物释放荧光的数值 (RLU2)。以 RLU1/RLU2 比值表示重组质粒荧光素酶相对表达活性。每组设 3 个复孔, 独立重复实验 3 次。

1.2.7 pGL6-*MTERF3*-promoter 启动活性的测定

在重组质粒中萤火虫荧光素酶的表达受上游启动子序列的调节。细胞转染后, 萤火虫荧光素酶活性的高低直接反映了启动子的强度。用相同量的 pGL6-TA、pGL6-control、pGL6-*MTERF3*-promoter 分别和 pRL-TK 共转染 HEK293 细胞, 继续培养 48 h 后测定荧光素酶活性。

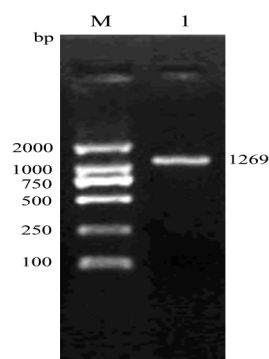
1.2.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。实验数据以均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 各组均数比较采用独立样本 *t*-test, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 人 *MTERF3* 基因启动子 PCR 产物的扩增

以人基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增人 *MTERF3* 基因 5'侧翼启动子区 1251 bp 的 DNA 序列, 加上引物上的保护碱基和酶切位点, PCR 产物的全长为 1269 bp, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 扩增得到的 PCR 产物的片段大小与预期值相符 (图 1)。



M: DL2000 DNA marker 1: PCR 产物

图 1 人 *MTERF3* 基因 5'启动子区 1269 bp PCR 扩增结果
Fig.1 PCR amplification of the human *MTERF3* 5'-flanking promoter

影响人 *MTERF3* 基因自身表达调控的机制迄今仍不清楚。

转录水平的调控是基因表达调控中尤为重要的一个环节,转录起始是基因表达的基本控制点,而靶基因启动子的重组报告基因表达质粒则是研究转录调控机制的基础。我们在前期研究中,通过生物信息学方法对人 *MTERF3* 基因的启动子区的序列特征、转录因子及其结合位点进行了分析。为进一步探讨人 *MTERF3* 基因的表达调控机制,本研究进行了人 *MTERF3* 基因启动子的克隆及其荧光素酶报告基因表达载体的构建。荧光素酶报告基因法是目前用于基因转录调控研究的一种常用方法,广泛应用于启动子转录活性的分析,它通过将目的基因特定的启动子、增强子等调控元件克隆至不含启动子的荧光素酶报告基因表达载体中,通过质粒转染细胞,下游的荧光素酶的表达水平能直接反映上游的启动子的转录活性^[9]。康鲁东等构建了人 *PSMA* 基因启动子表达载体^[9],周雯等构建了人 *claudin-10* 基因启动子荧光素酶基因质粒^[10],陈衍等构建了人脂肪酸合成酶 *FAS* 基因启动子表达载体^[11],以上研究中构建的载体均成功的应用于人类基因启动子活性的研究。

本研究选用人 *MTERF3* 基因 5'侧翼 3000 bp 长度的 DNA 序列作为目标序列,通过软件 TFSEARCH 分析转录因子结合位点进行初步预测,克隆了人 *MTERF3* 基因启动子区 1251 bp 的序列,构建了人 *MTERF3* 荧光素酶报告基因表达质粒。为检测其启动子活性,研究中选择了快速、简便、灵敏的双荧光素酶报告基因系统进行人 *MTERF3* 基因启动子活性的检测,该系统是先以荧光素(luciferin)为底物来检测萤火虫荧光素酶,后以肠腔素(coelenterazine)为底物来检测海肾荧光素酶,并且在后续加入海肾荧光素酶底物时,同时加入抑制萤火虫荧光素酶催化 luciferin 发光的物质,使后续检测仅仅检测到海肾荧光素酶的活性,从而实现双荧光素酶报告基因检测^[12]。用等量的 pGL6-TA、pGL6-control、pGL6-*MTERF3*-promoter 分别和 RL-TK 共转染 HEK293 细胞,培养 48 h 后检测荧光素酶活性,发现 pGL6-*MTERF3*-promoter 的荧光素酶的表达显著的提高,荧光活性比 pGL6-TA 高约

9.8 倍。总之,本研究成功构建了含人 *MTERF3* 基因启动子的荧光素酶报告基因表达载体,为后续研究人 *MTERF3* 基因启动子的组织特异性和表达调控机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 伍立夫,林春龙. 线粒体转录终止因子家族的研究现状及进展[J]. 医学综述,2015, 21(21): 3870-3873.
- [2] 熊伟,张晓娟,张海洋,等. 基于生物信息学方法预测人线粒体转录终止因子 3 蛋白的结构与功能[J]. 生物技术通讯,2015, 26(3): 367-373.
- [3] Park C B, Asin-Cayuela J, Cámara Y, et al. *MTERF3* is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription[J]. Cell, 2007,130(2): 273-285.
- [4] 朱建冬,梁庄严,王森,等. IL-37 基因启动子的克隆及其荧光素酶报告基因载体的构建[J]. 生物技术, 2015, 25(6): 520-523.
- [5] 杨波,卢学春,王冠军,等. 基于生物信息学分析的人 ID4 基因启动子表达载体的构建及鉴定[J]. 军事医学科学院院刊,2007,31(1): 32-35.
- [6] Werdenberg A, Lagouge M, Bratic A, et al. *MTERF3* regulates mitochondrial ribosome biogenesis in invertebrates and mammals[J]. PLoS Genet, 2013, 9(1): e1003178.
- [7] 熊伟,余敏,左绍远. 线粒体转录终止因子蛋白家族在线粒体基因表达中的调节作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2015, 31(3): 223-231.
- [8] 马娟,刘庆华,王蓓蓓,等. 胃癌 Pdx1 启动子载体构建及其受 DNA 甲基化的调节[J]. 世界华人消化杂志,2011, 19(31):3222-3228.
- [9] 康鲁东,崔福爱,吴伟芳,等. 人 *PSMA* 基因启动子表达载体 pGL3-PSMP 的构建[J]. 山东大学学报:医学版, 2005,43(7): 567-569.
- [10] 周雯,王青松. 人 *claudin-10* 基因启动子转录调控的初步分析[J]. 生物技术,2015,25(3): 205-211.
- [11] 陈衍,刘文超,贾军,等. 人脂肪酸合成酶 *FAS* 启动子的克隆及其在几种肿瘤细胞中的转录活性分析[J]. 现代肿瘤医学,2006,14(12): 1485-1488.
- [12] Xu Y Z, Kannagaratham C, Jancik S, et al. Promoter deletion analysis using a dual-luciferase reporter system[J]. Methods Mol Biol,2013,977(1):79-93.