

[文章编号] 1000-2200(2011)07-0684-03

· 基础医学 ·

人 BRD8 启动子系列报告基因的构建和鉴定

王传付, 马 华

[摘要]目的:构建具有相同 3'末端而 5'末端逐渐截短的人 BRD8 启动子系列报告基因,并进行鉴定。方法:聚合酶链反应(PCR)从人基因组中扩增 BRD8 启动子片段并插入荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic;以已构建的 BRD8 报告基因为模板,分别用 PCR 扩增具有相同 3'末端而 5'末端逐渐截短的 BRD8 启动子系列片段,并分别插入 pGL3-Basic 载体。对 BRD8 启动子系列报告基因进行酶切鉴定、测序。结果:通过酶切鉴定、测序,证明构建的 BRD8 启动子系列报告基因序列和方向正确。结论:成功构建了人 BRD8 启动子系列报告基因,为进一步研究调节 BRD8 基因表达的特异性转录因子和(或)沉默子奠定了基础。

[关键词] 基因, BRD8; 启动子; 荧光素酶; 报告基因

[中国图书资料分类法分类号] Q 343.1 [文献标识码] A

Construction and identification of serial human BRD8 reporter genes

WANG Chuan-fu, MA Hua

(Department of Immunology, Bengbu Medical College Key Laboratory of Infection and Immunity in Anhui, Bengbu, Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To construct and identify serial human BRD8 luciferase reporter genes with the identical 3'-end but gradually truncated 5'-end. **Methods:** The BRD8 promoter fragment from human genome was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and inserted into the luciferase reporter gene vector pGL3-Basic. A series of BRD8 promoter fragments with the identical 3'-end but gradually truncated 5'-end were produced by PCR using the above constructed BRD8 reporter gene vector as template and inserted into pGL3-Basic vector, respectively. The series of BRD8 reporter genes were identified by restriction enzyme digestion and sequencing. **Results:** The restriction enzyme digestion and DNA sequencing results showed that the sequences and orientation of the serial BRD8 reporter genes were correct. **Conclusions:** The serial human BRD8 reporter genes had been successfully constructed. These provide an experimental base for further research on the regulation of BRD8 gene transcription by some specific transcription factors and/or silencers.

[Key words] gene, BRD8; promoter; luciferase; reporter gene

BRD8 基因是在筛选文库时首次分离出,其编码蛋白含有 bromodomain 结构域、潜在的磷酸化位点和脯氨酸富集片段^[1]。BRD8 通过 AF-2 结构域和 TR 结合,增强 TR 介导的转录;并且 Northern 印迹分析显示其在人类组织中广泛表达^[2]。在猴肾细胞系 CV-1 中 BRD8 与 PPAR γ /RXR 复合物中的 RXR 相互作用^[3]。BRD8 的另一个研究领域是在直肠癌中的作用。在转移性直肠癌中 BRD8 高表达,并与肿瘤的生长相关,通过特异性 siRNA 抑制 BRD8 的表达能够诱导结肠癌细胞株的死亡和生长延迟^[4]。在直肠癌 SW480 细胞系中,MRGBP 蛋白以转录后方式促进 BRD8 蛋白的表达,而对其 mRNA 水平没有影响^[5]。作为一个广泛表

达的蛋白,其在不同的细胞和(或)时段可能具有不同的功能。目前 BRD8 的研究处于初期阶段,且研究重点是与其它蛋白的相互作用,而其本身的转录调节尚未见报道。本研究构建了 BRD8 基因启动子的系列报告基因,以便研究调节该基因不同时空转录的顺式作用元件和反式调节因子。

1 材料与方法

1.1 材料 大肠埃希菌(DH5 α 菌)(为本室保存);Kpn I 和 Bgl II 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司);pfu 高保真 DNA 聚合酶(Fermentas 公司);血液基因组 DNA 提取试剂盒、质粒纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒(Tiagen 公司);pGL3-Basic 荧光素酶表达质粒(Promega 公司);引物(上海捷瑞生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 BRD8(-896/+82)启动子片段扩增 用基因组提取试剂盒抽提人血细胞基因组 DNA,以

[收稿日期] 2011-03-11

[基金项目] 安徽省高校省级自然科学基金资助项目(KJ2007B354ZC)

[作者单位] 蚌埠医学院 免疫学教研室 感染与免疫安徽省重点实验室 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 王传付(1975-)男,讲师。

该基因组 DNA 为模板行 PCR 扩增 BRD8(-896/ +82 相对于 BRD8 基因组序列的转录起始点 +1 ,其报告基因结构见图 1 ,下同) 启动子片段。上游引物 FP-896: 5'-GTG TCC CGC TTC CTA CTT C -3' 在 5' 端引入 *Kpn* I 酶切位点; 下游共同引物 RP +82: 5'-ATA CTC ACT GCC CGT TCC -3' 在 5' 端引入 *Bgl* II 酶切位点。循环条件: 95 °C 预变性 5 min ,95 °C 变性 30 s ,53 °C 退火 30 s ,72 °C 延伸 1 min ,共 35 个循环 ,最后 72 °C 延伸 5 min。将 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳。

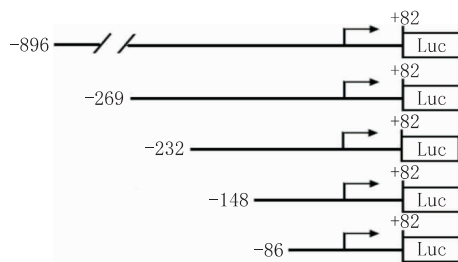


图 1 BRD8 启动子 5' 端序列递减突变体的结构

1.2.2 重组 pGL3-BRD8(-896/ +82) -Luc 报告质粒的构建和鉴定 启动子片段 BRD8(-896/ +82) 的基因组 PCR 产物经凝胶回收纯化后与 pGL3-Basic 载体分别用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切 ,再次行琼脂糖凝胶电泳纯化并回收酶切产物。将酶切后的启动子片段和载体经 T4 DNA 连接酶在 16 °C 过夜连接 ,转化 DH5a 感受态细菌。挑取阳性克隆小量提取质粒 ,以 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切初步鉴定 ,酶切鉴定符合的克隆进一步测序鉴定。

1.2.3 重组 pGL3-BRD8(-269/ +82) -Luc、pGL3-BRD8(-232/ +82) -Luc、pGL3-BRD8(-148/ +82) -Luc 和 pGL3-BRD8(-86/ +82) -Luc 系列报告质粒的构建和鉴定 以已构建的 pGL3-BRD8(-896/ +82) -Luc 为模板 ,PCR 扩增具有相同 3' 末端而 5' 末端逐渐截短的 BRD8 系列启动子片段。共同的下游引物如前所述; 上游引物的 5' 端分别引入 *Kpn* I 酶切位点。上游引物: FP-269: 5'-CGG GTT ACC AAC TGT CGT -3' ,53 °C 退火 ,共 35 个循环; FP-232: 5'-CTG GGA TTC TTC CAA CTT -3' ,51 °C 退火 ,共 35 个循环; FP-148: 5'-AGC CAA CTC CTG TCC TTC -3' ,52 °C 退火 ,共 35 个循环; FP-86: 5'-GGT GCT TGC TTT GTC TTA -3' ,50 °C 退火 ,共 35 个循环。PCR 产物凝胶回收后与 pGL3-Basic 载体分别用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切 ,再次凝胶回收后 ,分别行 T4 DNA 连接酶连接。转化并分别挑取阳性克隆小量提取 ,双酶切初步鉴定 ,然后进一步测序鉴定。

2 结果

2.1 PCR 扩增人 BRD8(-896/ +82) 启动子片段

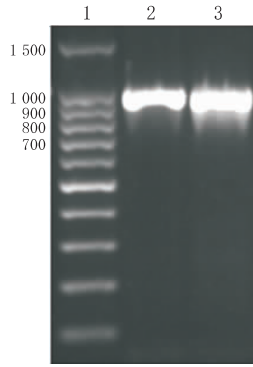
以人基因组 DNA 为模板 ,用 FP-896/ RP +82 特异性引物对 PCR 扩增 BRD8 启动子片段 BRD8(-896/ +82) ,产物经琼脂糖凝胶电泳显示 ,在预期的位置出现一条约 978 bp 的条带(见图 2)。

2.2 pGL3-BRD8(-896/ +82) -Luc 报告质粒的构建和鉴定 纯化的 BRD8(-896/ +82) 启动子片段经 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切后 ,克隆到同样经 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切的报告质粒载体 pGL3-Basic 中 ,转化 DH5a 感受态后筛选出对氨苄西林抗性的阳性克隆。小量提取质粒后用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切初步鉴定 ,可以切出约 978 bp 和 4.8 kbp 的片段(见图 3)。测序结果表明启动子插入方向正确 ,经 BLAST 比对与 GenBank 登录的对应序列完全一致 ,说明 BRD8(-896/ +82) 启动子片段已定向克隆至 pGL3-Basic 载体中(见图 4)。

2.3 具有共同 3' 末端而 5' 末端逐渐截短的 BRD8 系列启动子报告基因的构建和鉴定 以构建的 pGL3-BRD8(-896/ +82) -Luc 为模板 ,用具有共同 3' 末端引物的另几对引物 PCR 扩增具有相同 3' 末端而 5' 末端逐渐截短的 BRD8 启动子系列片段 ,产物经琼脂糖电泳 ,在预期的相应位置分别出现 351、314、230、和 168 bp 的四条带(见图 5)。分别纯化此 4 条带 ,经 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切后克隆到 pGL3-Basic 载体中 ,构建成 pGL3-BRD8(-269/ +82) -Luc、pGL3-BRD8(-232/ +82) -Luc、pGL3-BRD8(-148/ +82) -Luc 和 pGL3-BRD8(-86/ +82) -Luc 载体。每个报告基因序列经测序、比对证实序列和方向均正确。

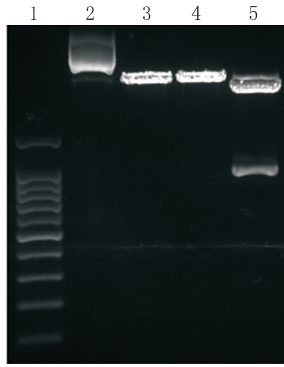
3 讨论

报告基因系统用于检测基因启动子的活化及其与相应反式作用因子的相互作用^[6-7]。本文在该方法基础上通过构建相同 3' 末端而 5' 末端逐渐截短的系列启动子 ,然后将报告基因分别转染入适当处理的细胞中 ,并测定报告基因活化水平。根据报告基因活性突然变化的 2 个突变体序列来定位启动子上调控该基因表达的时空特异性顺式作用元件存在的区域; 在该锁定的狭小区域内用软件预测可能调节其活性的少数几个转录因子 ,再分别对转录因子结合序列定点突变构建含特异突变位点的报告基因 ,测其活性变化以确定该特异性顺式作用元件是



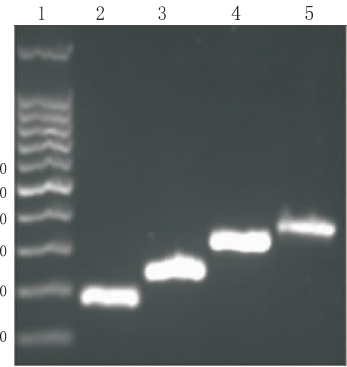
1: DNA Marker (bp);
2、3: BRD8(-896/+82);

图2 BRD8基因启动子PCR产物琼脂糖电泳结果



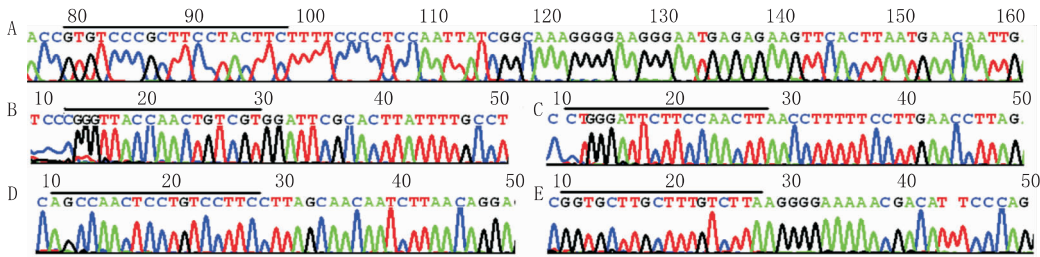
1: DNA Marker (bp); 2: pGL3-BRD8(-896/+82)-Luc;
3: pGL3-BRD8(-896/+82)-Luc + Kpn I;
4: pGL3-BRD8(-896/+82)-Luc + Bgl II;
5: pGL3-BRD8(-896/+82)-Luc + Kpn I + Bgl II

图3 pGL3-BRD8(-896/+82)-Luc重组质粒限制性酶切结果



1: DNA Marker (bp); 2: BRD8(-86/+82);
3: BRD8(-148/+82); 4: BRD8(-232/+82);
5: BRD8(-269/+82);

图5 BRD8启动子不同上游引物和共同下游引物组合的PCR结果



A: pGL3-BRD8(-896/+82)-Luc; B: pGL3-BRD8(-269/+82)-Luc; C: pGL3-BRD8(-232/+82)-Luc;
D: pGL3-BRD8(-148/+82)-Luc; E: pGL3-BRD8(-86/+82)-Luc

图4 重组BRD8系列报告基因5'端序列部分测序结果(上划线位置为对应上游引物位置)

否调节该基因表达,从而定位出顺式调节元件和反式作用因子。若是未曾报道过的未知顺式作用元件,也可用定点突变的方法发现并确定新的DNA调控元件,再进一步结合其它方法还可以确定与其相互作用的新的反式作用因子。

中性粒细胞是机体防御细菌感染的重要的非特异性细胞屏障。Zhang等^[8]用实时定量RT-PCR方法显示BRD8基因在中性粒细胞中转录活化,用大肠埃希菌或LPS与中性粒细胞共孵育后,用基因芯片方法显示BRD8转录下调。这意味着可能有抑制因子或沉默子下调BRD8基因转录。在高等真核细胞绝大多数基因转录以激活为主,抑制基因表达的沉默子较少,且其顺式作用元件一般距离核心启动子较远^[9]。我们期望在中性粒细胞中用BRD8启动子系列报告基因来研究调控BRD8基因表达的特异性顺式作用元件及对应的转录因子,以及用BRD8系列报告基因发现提示该沉默子及其特异性顺式作用元件存在的现象。

本文成功构建了BRD8系列荧光素酶报告基因,为进一步研究BRD8基因的转录调控奠定了实验基础。

[参考文献]

[1] Nielsen MS, Petersen CM, Gliemann J, et al. Cloning and

sequencing of a human cDNA encoding a putative transcription factor containing a bromodomain [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1306(1): 14-16.

[2] Monden T, Wondisford FE, Hollenberg AN. Isolation and characterization of a novel ligand-dependent thyroid hormone receptor-coactivating protein [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(47): 29834-29841.

[3] Monden T, Kishi M, Hosoyu T, et al. p120 acts as a specific coactivator for 9-cis-retinoic acid receptor (RXR) on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/RXR heterodimers [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(10): 1695-1703.

[4] Yamada HY, Rao CV. BRD8 is a potential chemosensitizing target for spindle poisons in colorectal cancer therapy [J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(5): 1101-1109.

[5] Yamaguchi K, Sakai M, Shimokawa T, et al. C20 or f20 (MRG-binding protein) as a potential therapeutic target for colorectal cancer [J]. *Br J Cancer* 2010, 102(2): 325-331.

[6] Alam J, Cook JL. Reporter gene: application to the study of mammalian gene transcription [J]. *Anal Biochem*, 1990, 188(2): 245-254.

[7] Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(5): 749-757.

[8] Zhang X, Kluger Y, Nakayama Y, et al. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli [J]. *J Leukoc Biol* 2004, 75(2): 358-372.

[9] 查锡良,周春燕. 生物化学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 334-337.

(本文编辑 刘璐)