

人 NRAGE 基因启动子转录活性的初步研究

吴寅子 张 丽 温传俊

(南京师范大学生命科学学院分子细胞生物学研究所,江苏南京 210046)

[摘要] 利用生物信息学软件搜寻 NRAGE 启动子区域的转录因子结合位点,并根据这些位点利用 PCR 技术克隆 NRAGE 启动子不同区域的缺失突变体,分别插入 Luciferase 报告载体 pGL3-Basic 载体中,构成 8 种缺失突变体的报告基因表达载体.通过双荧光素酶体系检测在 HEK-293 细胞中 NRAGE 启动子不同区域的转录活性,从而确定起主要作用的启动子区域.结果发现 NRAGE 基因转录起始位点上游 -300 bp 到 -100 bp 的区域起到主要的转录调控作用.

[关键词] NRAGE 双荧光素酶法 缺失突变 转录活性

[中图分类号] Q78 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2011)03-0090-05

Transcription Activity of Human NRAGE Gene Promoter

Wu Yinzi ,Zhang Li ,Wen Chuanjun

(Institute of Molecular Cell Biology ,School of Life Sciences ,Nanjing Normal University ,Nanjing 210046 ,China)

Abstract: We analyzed human NRAGE promoter region by bioinformatic software and found putative binding sites of transcription factors ,then 8 different fragments were amplified by PCR and the mutant promoters were inserted to upstream of the luciferase gene in luciferase report vector pGL3-Basic and detected the transcription activity by dual-luciferase reporter assay system. At transcription level we detected that transcription enhancer elements may exist in the region -300 bp to -100 bp.

Key words: NRAGE ,dual-luciferase reporter assay ,deletion mutation ,transcription activity

NRAGE(Neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue ,MAGE: melanoma antigen gene) 基因是由 Salhe 在 2000 年通过酵母双杂交的方法筛选到的与 p75NTR 相互作用的蛋白.隶属于恶性黑色素瘤抗原家族成员,又称之为 MAGE-DI^[1].定位于染色体 Xp11.21-11.23 上,含有 13 个外显子和覆盖第二到第十二个外显子的一个开放性阅读框(ORF).编码 778 个氨基酸,构成分子量为 86 kDa 的蛋白^[2].NRAGE 的保守性强,在大鼠和小鼠体内都有该基因的类似物,NRAGE 在发育早期以及成年个体中各个组织中都有表达^[3],这就意味着 NRAGE 可能发挥着重要的作用.在过去的研究中也确实发现 NRAGE 在生长发育、凋亡、分化以及肿瘤的转移过程中都有着调节作用^[4-3].目前关于 NRAGE 在疾病发生发展中的作用研究较多,而对于基因启动子及转录活性调控方面的研究尚未见相关报道.

本研究利用生物信息学技术预测出 NRAGE 基因 5'端上游序列中的潜在启动子序列,并分析 NRAGE 启动子区域发现存在 GATA1 ,SRY ,HIF1- α ,SP1 ,MZF1 等多种转录因子结合位点.我们在试验中以 NRAGE 转录起始位点上游 740 bp 至下游 60 bp 为研究对象,分别构建了 8 个启动子缺失突变体的报告基因质粒,并检测转录活性,发现 -300 bp 到 -100 bp 之间的序列对 NRAGE 的转录活性影响最大,这为进一步研究 NRAGE 表达调控机制提供了基本的实验依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

HEK-293 细胞株、pGL3-Basic 载体、内参照质粒 pRL-TK 为本实验室保存;小提质粒试剂盒(Bio-

收稿日期:2010-12-03.

基金项目:国家自然科学基金(30771066).

通讯联系人:吴寅子,硕士研究生,研究方向:NRAGE 在生长发育及疾病发生中的作用. E-mail: wuyinzi_1986@126.com

mega)、割胶回收试剂盒(Promega); *Dpn I* 去甲基化酶(NEB), PCR 试剂、DNA marker、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Kpn I*、*Xho I* 购自大连宝生物 TAKARA 公司; 胎牛血清、DMEM 购自 Gibco 公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司; 荧光化学发光微孔板检测仪购自 Thermo 公司。

1.2 生物信息学分析

应用在线软件 Promoter Proscan Version 1.7 (<http://www.thr.crt.nih.gov/molbio/proscan/>) 分析 NRAGE 转录起始位点上游 1 500 bp, 预测基本启动子区域, 利用 TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 软件分析启动子区域的转录因子结合位点。

1.3 NRAGE 基因系列缺失突变体报告基因质粒的构建

根据生物信息学软件分析的 NRAGE 基因启动子区域及转录因子结合位点, 针对 NRAGE 基因转录起始位点上游的 740 bp 至下游的 60 bp, 利用 primer 5.0 设计 8 对引物, 在上游引物 5' 端添加 *Kpn I* 酶切位点, 在下游引物 5' 端添加 *Xho I* 结合位点, 引物序列如下:

上游引物

NRG-pF1 (-740) 5'-ATCGGGTACCTCAGCTTCCTGATCTGCA-3'
 NRG-pF2 (-510) 5'-ATCGGGTACCGGAGAAATCATGGAGTCAC-3'
 NRG-pF3 (-300) 5'-ATCGGGTACCGGAATAGAGACGCATTGC-3'
 NRG-pF4 (-100) 5'-ATCGGGTACCTCCAGGACGAAGCTTTTGTTC-3'

下游引物

NRG-pR1 (+60) 5'-ATCGCTCGAGTCTCTCCTTGTCCAGGAGA-3'
 NRG-pR2 (+4) 5'-ATCGCTCGAGCGCCTAATATACCACCCA-3'

4 个上游引物分别和 2 个下游引物配对扩增, 合成 8 条启动子缺失突变序列, PCR 扩增程序为: 94℃ 变性 5 min, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物经过纯化后用 *Kpn I*、*Xho I* 双酶切 8 h, 割胶回收后, 用 T4 DNA 连接酶将片段与 pGL3-Basic 载体连接, 16℃ 过夜。取 5 μL 转化 DH5α 感受态。挑取克隆提质粒, 用 *Kpn I*、*Xho I* 双酶切进行鉴定, 最后测序鉴定阳性克隆。

1.4 细胞培养

HEK-293 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 培养基中含有 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素, 置于 5% CO₂, 37℃ 恒温培养, 48 h 传代一次。

1.5 重组报告基因质粒瞬时转染细胞

将 HEK-293 细胞接种于 24 孔板中, 使细胞在接种第二天生长到 30% ~ 50% 融合, 将重组报告基因质粒以及 pGL3-Basic 分别和内参照海肾荧光素酶报告基因质粒 pRL-TK 通过磷酸钙转染法共转入细胞, 每孔转染重组报告基因质粒 500 ng, pRL-TK 50 ng。转染后 8 h 换液, 48 h 进行荧光素酶活性检测。

1.6 荧光素酶活性检测

转染 48 h 后收获细胞, 弃去培养细胞的培养液, PBS 洗细胞 2 ~ 3 次, 完全吸净 PBS, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒进行细胞裂解及荧光素酶活性检测实验。每孔中加入 100 μL 1 × PLB, 放置在摇床上室温摇 15 min 后将裂解液吸入 EP 管, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清进行检测。在荧光化学发光微孔板检测仪中放入专用 96 孔板, 选择检测区域, 每孔加入 100 μL 双荧光素酶报告基因试剂盒中的 Luciferase Assay Buffer II 及 20 μL 细胞裂解液, 混匀并进行检测, 得出萤火虫荧光素酶活性。再加入 100 μL Stop&Glo Buffer, 混匀后检测得到海肾荧光素酶活性。各孔细胞的转染效率用海肾荧光素酶活性校正, 所得数值为萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值。

1.7 统计学处理

实验重复 3 次, 数据采用 SPSS11.0 统计软件分析, 计算标准差。组间差异采用 *t*-检验进行比较。

2 结果

2.1 生物信息学分析 NRAGE 基因转录调控区

Promoter Proscan Version 1.7 分析 NRAGE 基因 5' 端非编码区, 结果表明转录起始位点上游 379 - 130

bp 之间为基本启动子区域. 利用 TFSEARCH 分析转录调控区域的潜在转录因子结合位点, 发现含有 GA-TA1, SRY, HIF1- α , SP1, MZF1 等多种转录因子结合位点. (图 1)

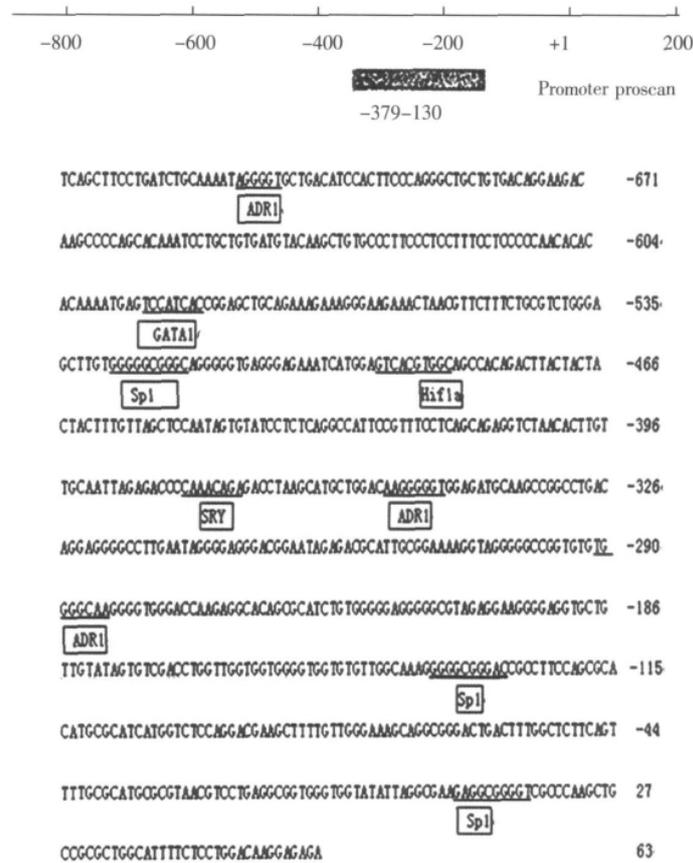


图 1 生物信息学分析 NRAGE 基因基本启动子区域及转录因子结合位点

Fig.1 Bioinformatic analysis of promoter region and putative binding sites of transcription factors of NRAGE

2.2 报告基因重组质粒的构建

分别将 4 条上游引物与 2 条下游引物配对进行 PCR 扩增出 8 条 NRAGE 转录调控区域的序列缺失片段, 分别命名为 pF1-R1(-740 ~ +60), pF2-R1(-510 ~ +60), pF3-R1(-300 ~ +60), pF4-R1(-100 ~ +60), pF1-R2(-740 ~ +4), pF2-R2(-510 ~ +4), pF3-R2(-300 ~ +4), pF4-R2(-100 ~ +4). PCR 产物经纯化后利用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切片段连接到同样用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切的 pGL3-Basic 载体上, 构建成荧光素酶表达质粒. 挑选阳性克隆并通过 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定是否有释放片段, 并测序鉴定阳性克隆, 证明构建成功(图 2).

2.3 系列缺失突变体的转录活性的鉴定

以海肾荧光素酶表达载体 pRL-TK 为内参照, 以 pGL3-Basic 为阴性对照, 将克隆得到的 8 个 NRAGE 转录调控区域缺失突变体报告基因质粒转入 HEK-293 细胞中, 48 h 后检测荧光素酶表达活性, 所得结果如图 3.

试验结果表明, 与 pGL3-Basic 相比, 插入 NRAGE 启动子区片段的报告基因质粒的转录活性均有不同程度的增加, 其中 pGL3-NRG-pF1-R1 的转录活性最强, 而缺失了 -300 到 -100 之间的序列后, 转录活性明显下降, 可见 -300 到 -100 之间可能存在起主要调控作用的转录增强子元件, 这与软件分析的结果相吻合. 缺失 -740 到 -510 之间的序列后转录活性稍有下降, 但差异不大, -510 到 -300 之间的序列基本对转录活性没有影响. R2 组与 R1 组相比分别缺失的是转录起始位点后 4 到 60 之间的序列, 转录活性变化不大, 可见这些区域并不是主要调控区域. 本实验选用 HEK-293 细胞, 因其具有永生化、转染效率高、培养条件低、增殖周期短等诸多优点, 初步证明了 NRAGE 基因启动子 -300 到 -100 区域起到主要的转录调控作用.

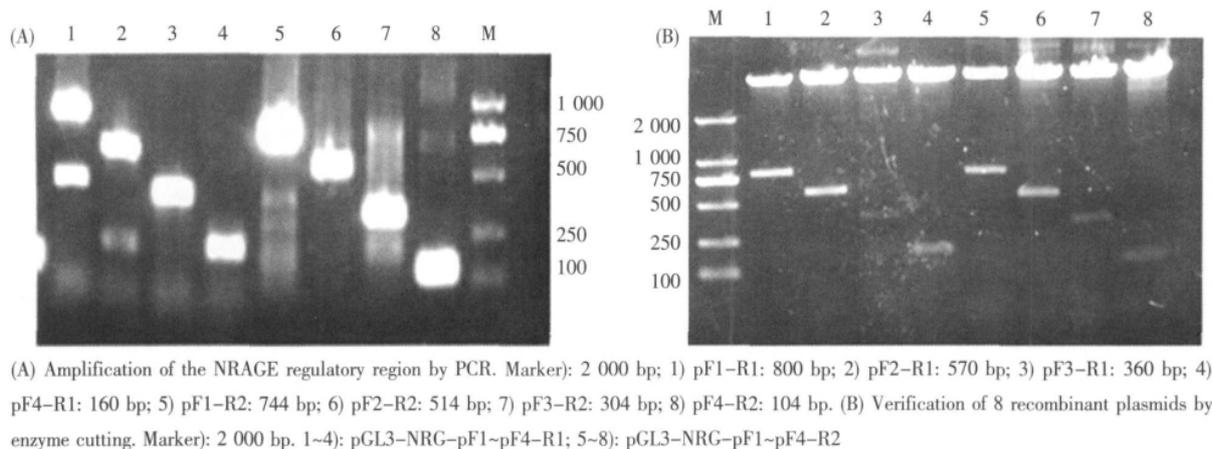


图2 重组质粒的构建及酶切检测
 Fig.2 Plasmid constructs and verification by enzyme cutting

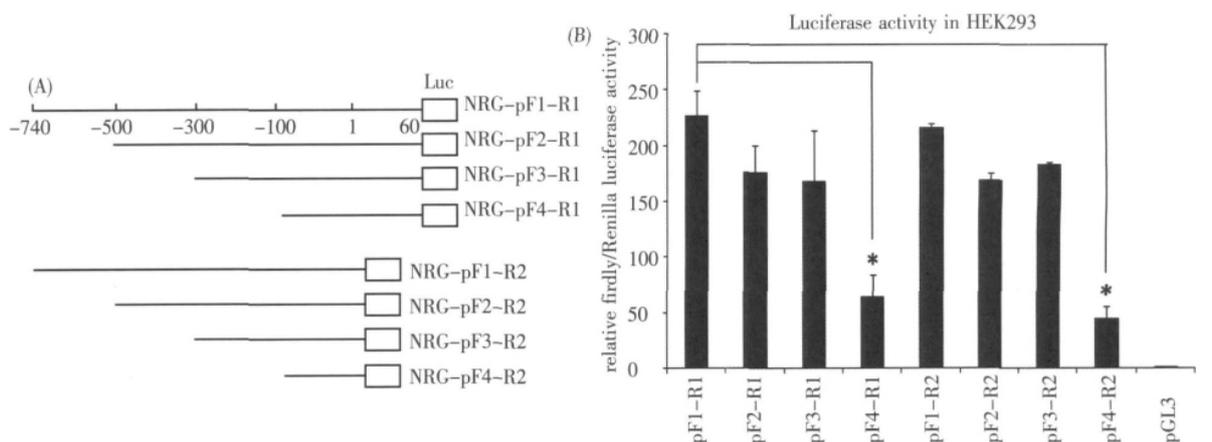


图3 NRAGE 启动子转录调控区域 8 个缺失突变体的转录活性检测
 Fig.3 Identification of the 8 deleted mutants activity of the NRAGE gene regulatory region

3 讨论

NRAGE 基因在细胞存活、凋亡以及细胞周期和分化、肿瘤的发生和转移中都发挥着重要调节功能。而且在很多肿瘤细胞中, NRAGE 的蛋白表达量都会发生异常^[14]。这些可能与 NRAGE 基因的转录调控有关, 然而目前国内外对于 NRAGE 的研究多在其功能方面, 对于 NRAGE 的具体转录调控机制还没有涉及。

了解 NRAGE 基因的启动子区域是研究其表达调控的前提。要进行 NRAGE 启动子活性的研究, 首先必须对上游调控序列进行克隆。本实验通过构建含不同长度 NRAGE 启动子片段的荧光素酶报告基因缺失质粒, 瞬时转染细胞, 检测荧光素酶相对活性, 确定 NRAGE 基因启动子所在区域及主要调控区域。结果表明: 与空载体相比, pGL3-NRG-pF1-R1 的启动子活性最强, 说明 NRAGE 的核心启动子存在于 -740 到 60 之间, 而通过荧光素酶相对活性分析显示, -300 到 -100 之间可能存在转录增强子元件, 缺失此区域后, NRAGE 启动子的转录活性明显降低。通过软件分析此区域的转录因子结合位点发现, -300 到 -100 之间含有一个 ADR1 和一个 SP1 结合位点。下一步的工作将主要针对这 2 个转录因子, 确定具体是何转录因子在 NRAGE 的转录过程中起到主要调控作用。

综上所述, 本研究初步探索了 NRAGE 基因 5' 端上游序列不同区域在 HEK293 细胞中转录活性的差异, 确定了 NRAGE 基因的核心启动子所在区域, 对于研究 NRAGE 基因转录调控元件及阐明该基因的表

达调控机制奠定了基础. 进一步分析与 NRAGE 转录调控相关的转录因子将有利于深入探讨癌症的发生与转移机理, 有利于寻找更好的干预治疗靶点.

[参考文献]

- [1] Imai Y, Shichijo S, Yamada A, et al. Sequence analysis of the MAGE gene family encoding human tumor-rejection antigens [J]. *Gene*, 1995, 60(2): 287-290.
- [2] Zhang C G, Xin G C, Wei H D, et al. A new melanoma antigen-encoding gene subfamily in human chromosome X [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(3): 197-203.
- [3] Kendall S E, Goldhawk D E, Kubu C, et al. Expression analysis of a novel p75NTR signaling protein, which regulates cell cycle progression and apoptosis [J]. *Mech Dev*, 2002, 117(1/2): 187-200.
- [4] Salehi A H, Roux P P, Kubu C J, et al. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor dependent apoptosis [J]. *Neuron*, 2000, 27(2): 279-288.
- [5] Wen C J, Xue B, Qin W X, et al. hNRAGE, A human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation [J]. *FEBS Lett*, 2004, 564(1/2): 171-176.
- [6] Salehi A H, Xanthoudakis S, Barker P A. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK dependent mitochondrial pathway [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48 043-48 050.
- [7] Williams M E, Strickland P, Watanabe K, et al. UNC5H1 induces apoptosis via its Juxtamembrane region through an interaction with NRAGE [J]. *Biol Chem*, 2002, 278(19): 17 483-17 490.
- [8] Masuda Y, Sasaki A, Shibuya H, et al. Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function [J]. *Biol Chem*, 2001, 276(7): 5 331-5 338.
- [9] Bertrand M J M, Kenchappa R S, Andrieu D, et al. NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(12): 1 921-1 929.
- [10] Matluk N, Rochira J A, Karaczyn A, et al. A role for NRAGE in NF-kappaB activation through the non-canonical BMP pathway [J]. *BMC Biology*, 2010, 8: 7-16.
- [11] Chu C S, Xue B, Tu C, et al. NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer in vitro and in vivo [J]. *Cancer Lett*, 2007, 250(2): 268-275.
- [12] Du Q, Zang Y, Tian X X, et al. MAGE-D1 inhibits proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(3): 659-665.
- [13] Xue B, Wen C J, Shi Y, et al. Human NRAGE disrupts E-cadherin/b-catenin regulated homotypic cell-cell adhesion, *Biochem. Biophys [J]. Res Commun*, 2005, 336(1): 247-251
- [14] 张成岗, 贺福初. 黑色素瘤抗原编码基因家族新成员 MAGED1 的组织表达谱研究 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18(2): 165-171.

[责任编辑: 黄 敏]