

HCV p7 下调基因 p7TP2 启动子序列的 克隆及转录活性检测

袁 菊^{1,2},陶明亮^{1,2},靳亚平¹,成 军²,洪 源¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100011)

[摘要] **【目的】**克隆 p7TP2 基因的启动子区域,并检测 HCV p7TP2 启动子的转录活性。**【方法】**通过分析确定 p7TP2 基因翻译起始密码子 ATG 上游 1 203 bp 至下游 147 bp 的基因组 DNA 序列作为启动子,克隆启动子片段并构建载体 pCAT3-p7TP2-p 和 pGLB-p7TP2-p,转染 HepG2 细胞,应用 CAT 表达系统和双荧光素酶系统检测启动子活性。**【结果】**克隆了预测具有启动子活性的片段,成功构建了 pCAT3-p7TP2-p 和 pGLB-p7TP2-p 载体,转染 pCAT3-p7TP2-p 的 HepG2 细胞,CAT 表达活性是转染 pCAT3-Basic 细胞的 5.98 倍;转染 pGLB-p7TP2-p 的 HepG2 细胞,双荧光素酶表达活性是转染 pGLB 细胞的 9.67 倍。**【结论】**克隆的 p7TP2 启动子序列与预测的序列一致,并且具有启动子转录活性。

[关键词] 丙型肝炎病毒 HCV;p7TP2;启动子;转录活性

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)05-0039-04

Promoter sequence cloning and its transcription activation evaluation of p7TP2 down-regulated by HCV p7 protein

YUAN Ju^{1,2},TAO Ming-liang^{1,2},JIN Ya-ping¹,CHENG Jun²,HONG Yuan²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Infections Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China)

Abstract:**【Objective】**The study was to clone the promoter sequence of p7TP2 gene and to evaluate the transcription activation of promoter sequence.**【Method】**The promoter sequence of p7TP2 gene(—1 203—147 bp) was amplified from HepG2 genome by PCR, the promoter sequence was cloned into pCAT3 reporter vector and luciferase reporter which were transfected into HepG2 cell lines to evaluate its transcription activation.**【Result】**The promoter sequence of p7TP2 gene was amplified and cloned into the pCAT3 and pGLB. The CAT reporter system showed that the transcription activation of pCAT3-p7TP2-p was 5.98 times higher than pCAT3-Basic;the luciferase reporter system showed that the transcription activation of pGLB-p7TP2-p was 9.67 times higher than pGLB.**【Conclusion】**The cloning promoter sequence was the same as the predicted sequence. The CAT reporter system and luciferase reporter system all successfully showed that the predicted promoter sequence had high transcription activation.

Key words: HCV;p7TP2;promoter;transcription activation

* [收稿日期] 2007-05-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(C03011402;C30070689)

[作者简介] 袁 菊(1981—),女,河南平顶山人,硕士,主要从事家畜生殖内分泌研究。E-mail:yuanju1108@tom.com

[通讯作者] 靳亚平(1966—),男,陕西宝鸡人,教授,博士生导师,主要从事兽医产科学和家畜生殖内分泌研究。
E-mail:yapingjin@163.com

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属,在大多数感染人群中 HCV 表现为持续性感染,而且与肝脏脂肪变性、糖代谢紊乱有关^[1-2]。HCV p7 是由 HCV 基因组 2 580~2 768 位核苷酸之间基因编码的、由 63 个氨基酸残基组成的一个小疏水性蛋白,其功能与病毒离子孔道蛋白(viroporin)类似^[3-5]。Stephen 等^[6]研究表明,p7 可以定位在线粒体或内质网衍生的微粒体膜结构上,据其在细胞内分布的复杂性推测,p7 在 HCV 生命周期中起着多重作用。研究人员用抑制性消减杂交技术^[7](suppression subtractive hybridization)和基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)^[8-10]等方法,对 HCV p7 的反式调节基因进行研究,结果发现了未知功能的新基因 p7TP2,根据基因起始密码子的 Kozak 规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列,推测该基因的开放读码框架长 495 bp,编码 164 个氨基酸残基。袁菊等^[11]以肝母瘤细胞系 HepG2 cDNA 为模板,克隆了该基因的 cDNA 序列,该序列被美国核苷酸序列数据库 GenBank 收录,收录号码为 AY819648,并预测其为具有不紧密结构的球蛋白,具有两个跨膜结构域及信号肽序列。目前,p7TP2 基因是一个未知功能的新基因,国内外关于此基因启动子以及其结构和功能的研究尚未见报道。为此,本研究采用生物信息学方法,对 p7TP2 基因启动子活性区域进行了预测,并用 CAT 报告基因系统和双荧光素酶报告基因系统,对 p7TP2 基因的启动子活性进行了检测,以期为进一步研究启动子区域内的转录位点提供很好的证据,同时也为研究 p7TP2 基因的生物学功能及 HCV p7 的调节机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 肝母瘤细胞系 HepG2 由北京地坛医院传染病研究所保存,在体积分数 5% CO₂、37 °C 条件下培养,在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中贴壁生长,细胞用含质量浓度 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L EDTA 的消化液消化进行传代。

1.1.2 细菌菌株、质粒及主要试剂 pCAT3-Basic、pCAT3-Promoter 系列载体由北京地坛医院传染病研究所保存;pGL4.10-Basic(pGLB)、pGL4.10-Promoter(pGLP)、pRL-TK、双荧光素酶检测试剂盒、pGEM-T 载体试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒及

Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒,均购自 Promega 公司;转染试剂 Lipofectamine 2000,购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶,购自 TaKaRa 公司;CAT-ELISA 检测试剂盒,购自 Roche;玻璃奶 DNA 回收试剂盒,购自博大公司。

1.1.3 引物 根据神经网络启动子预测确定 p7TP2 启动子区域(p7TP2-p),并设计引物,有义链引物 5'-GGTACC CCCCTCAACGCCTGTCACCT-3'(Kpn),反义链引物 5'-AGATCT CCCTGCTT-GCCTTCCAAACTC-3'(Bgl)。引物合成及核苷酸序列测序由上海生工生物工程技术服务公司完成。

1.2 CpG 岛分析(CpGPlot/CpGReport/Isochore)

选取 p7TP2 基因序列的翻译起始位点上游 1 500 bp 至下游 495 bp 的序列,利用 CpG 岛软件(www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/)分析该序列。

1.3 p7TP2 基因启动子活性区域的预测

选取 p7TP2 基因序列的翻译起始位点上游 1 500 bp,应用神经网络启动子预测(neural network promoter prediction)工具预测启动子的位点信息,其网址:www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html。

1.4 预测 p7TP2 基因启动子活性区域的克隆

以提取 HepG2 细胞的基因组 DNA 为模板,PCR 反应体系如下:10 × PCR 缓冲液 2.5 μL,dNTP 混合物(2.5 mmol/L) 2 μL,引物(10 μmol/L)0.5 μL,模板 DNA 1 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,加双蒸水至 25 μL。PCR 参数如下:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,65 °C 变性 1 min,72 °C 延伸 2 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,切胶,用玻璃奶 DNA 回收试剂盒回收。

1.5 双荧光素酶报告基因及 CAT 报告基因表达载体的构建

回收产物与 pGEM-T 载体连接,酶切(*Bgl* II/*Kpn*)鉴定和测序。重组质粒 pGEM-T-p7TP2-p 用 *Bgl* II/*Kpn* 双酶切,用玻璃奶 DNA 回收试剂盒回收酶切产物,定向克隆至 pGLB 及 pCAT3-Basic,构建重组质粒 pGLB-p7TP2-p 及 pCAT3-p7TP2-p,并进行双酶切(*Bgl* II/*Kpn*)及 DNA 测序鉴定。磁珠法提取质粒备用。

1.6 CAT 表达量的检测

在 24 孔板中常规培养 HepG2 细胞,等细胞生长至对数期时,分别将 pCAT3-Basic、pCAT3-p7TP2-p 及 pCAT3-Promoter 利用 Lipofectamine

2000 试剂转染 HepG2 细胞,每种质粒做 3 孔重复,其中 pCAT3-Basic 为阴性对照,pCAT3-Promoter 为阳性对照。转染 24 h 后,收集细胞裂解液,提取上清液,取 200 μ L 在 415 nm 光波下测吸光度 A 值,用于检测 CAT 的表达量。

1.7 双荧光素酶报告基因表达活性的检测

在 24 孔板中常规培养 HepG2 细胞,等细胞生长至对数期时分别将 pGLB(阴性对照)、pGLB-p7TP2-p、pGLP(阳性对照)、pRL-TK(内参照)质粒用 Lipofectamine 2000 试剂转染 HepG2 细胞,每种质粒做 3 个平行试验孔。培养 24 h 后,用 1 $\times$ PBS 清洗 24 孔板中的细胞 2 次,每孔加入 100 μ L 1 $\times$ 细胞裂解液,室温裂解 15 min 后,取上清液备用。双荧光素酶活性(DLR)按照双荧光素酶报告基因分析系统(Promega 公司)操作手册所述方法检测。

1.8 数据分析

各组试验数据均计算平均值及标准误差,应用

SSPS10.0 for Windows 软件包对各组试验数据之间进行 t 检验。

2 结果与分析

2.1 CpG 岛分析

选取 p7TP2 基因序列的翻译起始位点上游 1 500 bp 至下游 495 bp 的序列(以翻译起始密码子为+1),利用 CpG 岛软件分析,结果发现,在 321~1 083 bp 处有一个 763 bp 左右的 CpG 岛序列(实际值/理论值大于 0.6,且 GC 含量大于 50%)。

2.2 p7TP2 基因启动子活性区域的在线预测

对上游 1 500 bp 至编码终止密码子的序列(−1 500~+495 bp)进行启动子预测,结果发现 3 个可能的启动子,其位置分别为 175~225 bp,706~756 bp,1 000~1 050 bp。3 个启动子的序列见表 1。

表 1 神经网络启动子预测分析结果

Table 1 Analysis result of Neural Network promoter prediction

起始端/bp Start	末端/bp End	启动子序列 Promoter sequence
175	225	5'-ACAACATAACTAAAAAAGGGGTATTCTGACAAAGTTCTCAAAGAGACAT-3'
706	756	5'-TTAATGTATATAAAATCTGGTGAATCATAACAAGGAGTCCAGAGATTTAA-3'
1 000	1 050	5'-ATTCAAAAACATAAAAAATCACCTCTGCCCCAAAGTGGTACAACCGGTCCT-3'

2.3 p7TP2 基因启动子序列的确定及克隆

根据以上 CpG 岛分析及启动子区域的在线分析,确定启动子序列(−1 203~+147 bp)。以 HepG2 细胞基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 p7TP2 启动子序列并测序,结果显示,在 1 350 bp 处有 1 条带与理论片段长度一致(图 1)。

2.4 双荧光素酶报告基因及 CAT 报告基因表达载体的构建

双荧光素酶报告基因表达载体 pGLB-p7TP2-p 经 *Bgl* II/*Kpn* 双酶切,可切出 1 350 bp 的片段(图 2);PCR 重组载体的菌落如图 3 所示。CAT 报告基因表达载体 pCAT3-p7TP2-p 经 *Bgl* II/*Kpn* 双酶切,可切出 1 350 bp 的片段(图 2);PCR 重组载体的菌落如图 3 所示。

2.5 CAT 报告基因的表达活性

试验组转染 pCAT3-p7TP2-p 的 HepG2 细胞 CAT 活性是转染 pCAT3-Basic 细胞的 5.98 倍,阳性对照组转染 pCAT-Promoter 细胞 CAT 活性是转染 pCAT3-Basic 细胞的 11 倍,可见 pCAT3-p7TP2-p 具有启动子活性。

2.6 双荧光素酶报告基因的表达活性

试验组转染 pGLB-p7TP2-p 的 HepG2 细胞双荧光素酶活性,是转染 pGLB 细胞的 9.67 倍,阳性对照组转染 pGLP 细胞双荧光素酶活性,是转染 pGLB 细胞的 468 倍,说明 pGLB-p7TP2-p 具有启动子活性。

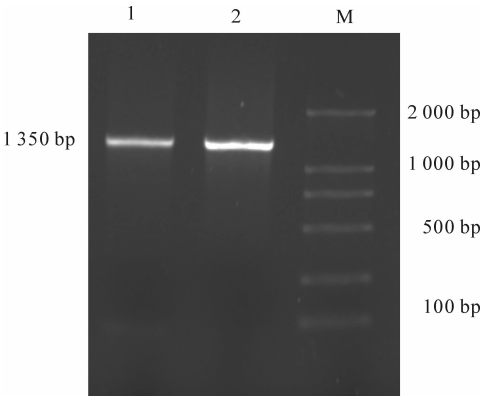


图 1 p7TP2 基因启动子 PCR 扩增产物的电泳结果
1,2. PCR 产物;M. DL2000 Marker
Fig.1 Electrophoresis map of PCR products of
p7TP2 promoter sequence
1,2. PCR product;M. DL2000 Marker

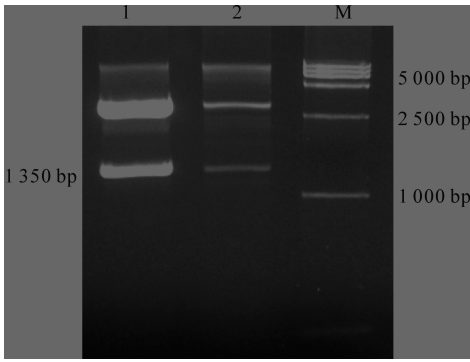


图 2 重组载体 pCAT3-p7TP2-p 和 pGLB-p7TP2-p 的 *Bgl* II /*Kpn* 双酶切结果

1. pCAT3-p7TP2-p 载体; 2. pGLB-p7TP2-p 载体;
M. DL15000 Marker

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pCAT3-p7TP2-p and pGLB-p7TP2-p(*Bgl* II /*Kpn*)

1. pCAT3-p7TP2-p; 2. pGLB-p7TP2-p; M. DL15000 Marker

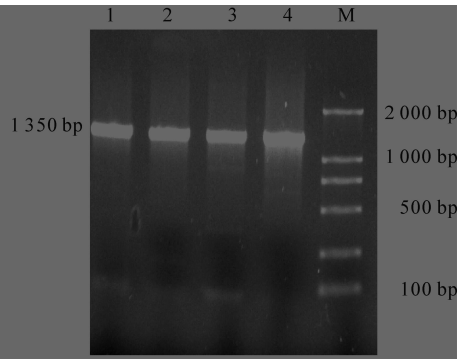


图 3 重组载体 pCAT3-p7TP2-p 和 pGLB-p7TP2-p 的 PCR 结果

1, 2. 转染 pCAT3-p7TP2-p 的菌落; 3, 4. 转染
pGLB-p7TP2-p 的菌落; M. DL2000 Marker

Fig. 3 PCR p7TP2 promoter sequence from colony

1, 2. Colony transfected pCAT3-p7TP2-p; 3, 4. Colony transfected
pGLB-p7TP2-p; M. DL2000 M arker

3 结论与讨论

p7TP2 基因是利用基因芯片筛选的可下调 HCV p7 表达的新基因, 因此研究 p7TP2 基因的表达调控, 对探讨 HCV p7 蛋白的作用机制有重要意义。生物信息学预测软件的应用, 为研究基因表达调控提供了一个很好的切入点。CpG 岛, 也称 HTF 岛, 是一些富含 GC 的小区域, 经常出现在脊椎动物基因的 5' 侧翼区。人类 80% 基因的转录起始位点前存在 CpG 岛^[12-13]。因此, CpG 岛分析是确认新基因的重要线索。本研究将 p7TP2 基因序列用 www. ncbi. nlm. nih. gov/Blastn 分析, 找到前端 1 500 bp 序列, 利用 CpG 岛软件分析该序列, 发现一个 763 bp 左右的 CpG 岛, 该 CpG 岛的存在为寻找启动子活性区域提供了前提条件。

软件预测 p7TP2 基因启动子区域与调控区内存在的 CpG 岛区域有大部分重叠, 则设计引物扩增 -1 203 bp~+147 bp 的 p7TP2 基因调控区段。同时, 以 HepG2 细胞的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增这一片段并构建 CAT 表达载体和双荧光素酶表达载体, 两种系统检测结果表明, 在 HepG2 细胞系中, 预测的启动子片段均具有启动子转录活性。

p7TP2 新基因启动子活性序列的发现, 对于验证 p7TP2 基因的存在及其转录位点的进一步研究提供了很好的证据, 也为进一步利用噬菌体展示技术筛选转录位点的反式调节因子奠定了基础, 同时也为研究 HCV p7 的信号传导途径及调节机制提供了新的理论依据。

[参考文献]

- [1] Moriguchi H, Kobayashi M, Chung R T, et al. Optimal IFN therapy for 40-year-old patients with severe HCV-1b infection [J]. Gastroenterology, 2003, 124: 1166-1167.
- [2] Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, et al. Hepatitis C virus infection in the general population; A community-based study in West Bengal [J]. India Hepatology, 2003, 37: 802-809.
- [3] Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication [J]. J Virol, 2002, 76: 5326-5338.
- [4] Griffin S D, Harvey R, Clarke D S, et al. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for mantadine-sensitive ion hannel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria [J]. J Gen Virol, 2004, 85: 451-461.
- [5] Branza-Nichita N, Durantel D, Carrouee-Durantel S, et al. Anti-viral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhoea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers [J]. J Virol, 2001, 75: 3527-3536.
- [6] Stephen G, Dean C, Christopher M, et al. Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes [J]. J Virol, 2005, 79(24): 15525-15536.
- [7] 郭江, 成军, 纪冬, 等. 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选 HCVp7 蛋白的反式调节基因[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(11): 2590-2593.

Guo J, Cheng J, Ji D, et al. Screening and cloning oof target genes transactivated by hepatitis C virus p7 protein [J]. World Chin J Digestol, 2004, 12(11): 2590-2593. (in Chinese)

(下转第 47 页)