

小鼠 Lrp5 基因 5 端调控区域的功能

吕萍, 龚瑶琴*, 李江夏, 周海斌, 陈丙玺

(山东大学医学院医学遗传学研究所, 实验畸形学教育部重点实验室, 济南 250012)

摘要 为研究小鼠低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)基因5端调控序列的功能, PCR扩增小鼠 *Lrp5* 基因翻译起始位点上游3 041 bp (- 2 909 bp ~ + 132 bp) DNA序列。PCR产物定向克隆到 pCL3-basic 载体上, 重组质粒命名为 pCL3-2 909。以 pCL3-2 909 质粒为模板, 以不同的引物扩增出不同长短的DNA片段, 分别定向克隆到含小鼠 *Lrp5* 基因基本启动子并含有荧光素酶报道基因的 pCL3-103 载体上, 构建了 12 种荧光素酶报告基因表达体系:pCL3-267, pCL3-513, pCL3-535, pCL3-560, pCL3-575, pCL3-623, pCL3-645, pCL3-719, pCL3-770, pCL3-1 032, pCL3-1 330, pCL3-1 619。以 pRL-TK 为内参照质粒, 瞬时转染 COS-7 细胞, 48 h 后收集细胞测定荧光素酶相对表达活性, pCL3-575 (- 2 909 bp ~ - 2 334 bp) 活性是 pCL3-513 (- 2 909 bp ~ - 2 396 bp) 的 20%, pCL3-535 (- 2 909 bp ~ - 2 374 bp) 的活性是 pCL3-513 的 44%, pCL3-575 的活性是 pCL3-560 (- 2 909 bp ~ - 2 349 bp) 的 48%, 均有显著性差异。结果表明, 在 - 2 396 bp 与 - 2 374 bp 之间的 22 bp 区域内以及 - 2 349 bp 与 - 2 334 bp 之间的 15 bp 区域内存在负调控元件。软件分析表明, 此区域含有 IK2, L YF1 及 MZF1 调控元件。

关键词 LDL 受体相关蛋白 5, 小鼠, *Lrp5* 基因, 调控序列, 荧光素酶分析

中图分类号 R394, Q78

Functional Analysis of 5 Upstream Control Region of Mouse Lrp5 Gene

吕萍, 龚瑶琴*, 李江夏, 周海斌, 陈丙玺

(Institute of Medical Genetics, Medical School of Shandong University, Key Laboratory
of Experimental Teratology, Ministry of Education, Jinan 250012, China)

Abstract To identify the functional elements of 5 upstream control region of mouse LDL receptor related protein 5 (LRP5) gene, the upstream region 3 041 bp (- 2 909 bp ~ + 132 bp) from the translation initiation codon of mouse *Lrp5* gene was amplified by PCR. The PCR product was cloned into the luciferase reporter vector pCL3-basic, and the recombinant plasmid pCL3-2 909 was constructed. The different upstream regions were amplified using plasmid pCL3-2 909 as a template, thereafter inserted into the pCL3-103 vector which harbored *Lrp5* gene basal promoter and luciferase reporter gene. Twelve luciferase expression vectors containing 5 upstream regions of mouse *Lrp5* gene were constructed, including pCL3-267, pCL3-513, pCL3-535, pCL3-560, pCL3-575, pCL3-623, pCL3-645, pCL3-719, pCL3-770, pCL3-1 032, pCL3-1 330 and pCL3-1 619 individually. All expression vectors were transfected into COS-7, respectively. Relative luciferase activities in each cell lysate were measured after 48 hours. The relative luciferase activity of pCL3-575 (- 2 909 bp ~ - 2 334 bp) was 20% of pCL3-513 (- 2 909 bp ~ - 2 396 bp), the activity of pCL3-535 (- 2 909 bp ~ - 2 374 bp) was 44% of the pCL3-513 and pCL3-575 was 48% of pCL3-560 (- 2 909 bp ~ - 2 349 bp).

收稿日期: 2004-12-27, 接受日期: 2005-03-18

教育部科学技术研究重点项目 (No. 02129) 资助

*联系人: Tel: (0531) 8382043, E-mail: yxg8@sdu.edu.cn

Received: December 27, 2004; Accepted: March 18, 2005

Supported by the State Key Research Project of Ministry of Education (No. 02129)

* Corresponding author Tel: (0531) 8382043, E-mail: yxg8@sdu.edu.cn

- 2 349 bp). The results suggest that the negative control elements existed in the 22 bp region between the - 2 396 bp and - 2 374 bp, as well as the 15 bp region between the - 2 349 bp and - 2 334 bp. IK2, LYF1 and MZF1 consensus sequences were identified using Mat Inspector V2.2 soft ware.

Key words LDL receptor related protein 5, mouse, *Lrp5* gene, control region, luciferase activity

低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (low density lipoprotein receptor related protein 5, LRP5) 是细胞表面的受体蛋白, 属于低密度脂蛋白受体家族, Tolwinski 等^[1]研究发现, LRP5 可作为 Wnt 蛋白的共同受体参与 Wnt 信号传导。2001 年 Geng 等^[2,3]采用定位候选克隆方法证实, *Lrp5* 基因丧失功能突变(包括错义、无义及移码突变)导致骨质疏松-假性神经胶质瘤综合征(osteoporosis-pseudoglioma syndrome, OPS), 表现为低骨密度、骨折和眼失明。*Lrp5* 基因的获得功能突变导致高骨密度症^[4,5]。这些结果表明, *Lrp5* 基因在骨密度调节过程中起重要作用。LRP5 广泛存在于人体许多组织细胞表面, 包括肝、胰、小肠、心、肺、骨骼肌、肾、脾、脑、外周血细胞等, 但 *Lrp5* 基因突变所引起的表型效应仅局限在骨骼和眼, 其它组织器官发育正常。因此研究 *Lrp5* 基因表达的调控机制对于理解该基因的功能是十分重要的。为分析 *Lrp5* 基因表达调控机制, 我们首先采用报告基因分析方法分析了该基因的基本启动子, 证实该基因的基本启动子位于转录起始点 103 bp 区域内^[6]; 在此基础上, 我们又对基本启动子上游的 1 000 bp 区域内的调控元件进行了分析, 并对比分析了在成骨细胞和非成骨细胞中报告基因的表达情况, 证实该区域内不存在组织特异性转录调控序列^[7]; 为进一步分析更上游的调控序列, 本研究对转录起始点上游 1 000 ~ 3 000 bp 区域内的调控元件进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 由本室保存; COS-7 细胞株购自美国 ATCC 公司; 携带小鼠 *Lrp5* 基因上游序列的 BAC 克隆购自美国 RESEARCH GENETICS 公司; 含有小鼠 *Lrp5* 基因基本启动子并含荧光素酶报道基因的 pCL3-103 载体由本室构建; pCL3-basic 质粒及荧光素酶内参照质粒 PRL-Tk 系 Promega 公司产品。

各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, 胶纯化回收试剂盒为大连 TaKaRa 公司产品; DNA 转染试剂 Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品; 双荧光素酶检测试剂盒为 Promega 公司产品; 质粒提取试剂

盒为 Omega 公司产品; DMEM 细胞培养基为 Gibco 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 设计扩增小鼠 *Lrp5* 基因上游调控序列的 PCR 引物

利用 Mat Inspector V2.2 软件分析小鼠 *Lrp5* 基因上游调控序列, 按不中断保守序列的原则设计 PCR 引物, 其中 F1: 5'-CACGGTACCAAGTACCC ACCATCTGA GCCATCTCACTG3', 下划线序列为保护碱基及 *Kpn* 酶切位点; F2: 5'-CCCAAAGCTTGTC GTCCGGCGGCCGGGAGCG3'; 下划线序列为保护碱基及 *Hind* 酶切位点。F1, F2 用以扩增长度为 3 041 bp 片段, P1 ~ P12 均为下游引物, 分别与 F1 组合扩增不同大小片段。

P1: 5'-CCGGACCTCTCTTACCCACTGACCCATCTCA-3
 P2: 5'-CCGGACCTCTGICCTCTCTGGTCAACACTAG-3
 P3: 5'-CCGGACCTCACGTGGAAAGAGGTGGTACAGA-3
 P4: 5'-CCGGACCTCCATGGTGCTCACCCCTTAAT-3
 P5: 5'-CCGGACCTCTCCATCTATGGGCTGCAACTG-3
 P6: 5'-CCGGACCTCATAAGACCACTAGTGTCCCTG-3
 P7: 5'-CCGGACCTCTICAAGCCTCCAAAGGACCA-3
 P8: 5'-CCGGACCTCTCACAACCTCTGTCCC-3
 P9: 5'-CCGGACCTCAAGAATCCCCTGGA GTTCACA-3
 P10: 5'-CCGGACCTCTCGGA CCTGACCTTCCTT-3
 P11: 5'-CCGGACCTCAAGCCCCAGACTGCA GACT-3
 P12: 5'-CCGGACCTCAAACCGGCACCTTCACCTCA-3

下划线序列为保护碱基及 *Sac* 酶切位点。

1.3 小鼠 *Lrp5* 基因上游调控序列的克隆

以携带小鼠 *Lrp5* 基因上游序列的 BAC 克隆 DNA 为模板, F1、F2 为上下游引物, PCR 扩增 *Lrp5* 基因翻译起始位点上游 3 041 bp (- 2 909 bp ~ + 132 bp) 大片段。PCR 反应条件: 94°预变性 4 min, 94°变性 1 min, 60°退火 1 min, 72°延伸 3 min, 35 个循环, 72°延伸 10 min。PCR 产物胶纯化后用 *Kpn* / *Hind* 双酶切, 定向克隆到 pCL3-basic 载体的 *Kpn* / *Hind* 位点上, 转化 DH5, PCR 和质粒双酶切鉴定阳性克隆, 重组质粒命名为 pCL3-2 909。

1.4 荧光素酶报告基因表达载体的构建

以 pCL3-2 909 质粒为模板, F1 为上游引物, 分

别以 P1、P2、P3、P4、P5、P6 为下游引物,PCR 分别扩增片段长度为 267 bp (- 2 909 bp ~ - 2 642 bp),513 bp (- 2 909 bp ~ - 2 396 bp),770 bp (- 2 909 bp ~ - 2 139 bp),1 032 bp (- 2 909 bp ~ - 1 877 bp),1 330 bp (- 2 909 bp ~ - 1 579 bp),1 619 bp (- 2 909 bp ~ - 1 290 bp);又以 P7、P8、P9、P10、P11、P12 为下游引物,PCR 扩增片段分别为 535 bp (- 2 909 bp ~ - 2 374 bp),560 bp (- 2 909 bp ~ - 2 349 bp),575 bp (- 2 909 bp ~ - 2 334 bp),623 bp (- 2 909 bp ~ - 2 286 bp),645 bp (- 2 909 bp ~ - 2 264 bp),719 bp (- 2 909 bp ~ - 2 190 bp)。PCR 反应条件:94 预变性 4 min,94 变性 40 s,68 退火 40 s,72 延伸 2 min,35 个循环,72 延伸 10 min。PCR 产物胶纯化后用 *Kpn* / *Sac* 双酶切,定向克隆到 pCL3-103 载体的 *Kpn* / *Sac* 位点上。(pCL3-103 载体:由本室构建^[6,7]。小鼠 *Lrp5* 基因基本启动子序列 (- 103 bp ~ + 132 bp) 克隆至 pCL3-basic 的 *Xho* / *Hind* 位点,具有小鼠 *Lrp5* 基因基本启动子活性)。转化 DH5⁺,PCR 和酶切鉴定阳性克隆,分别得到荧光素酶报告基因表达载体 pCL3-267 (- 2 909 bp ~ - 2 642 bp),pCL3-513 (- 2 909 bp ~ - 2 396 bp),pCL3-770 (- 2 909 bp ~ - 2 139 bp),pCL3-1 032 (- 2 909 bp ~ - 1 877 bp),pCL3-1 330 (- 2 909 bp ~ - 1 579 bp),pCL3-1 619 (- 2 909 bp ~ - 1 290 bp);pCL3-535 (- 2 909 bp ~ - 2 374 bp),pCL3-560 (- 2 909 bp ~ - 2 349 bp),pCL3-575 (- 2 909 bp ~ - 2 334 bp),pCL3-623 (- 2 909 bp ~ - 2 286 bp),pCL3-645 (- 2 909 bp ~ - 2 264 bp),pCL3-719 (- 2 909 bp ~ - 2 190 bp)。质粒提取按 Omega 公司试剂盒使用说明书进行。

1.5 细胞培养

高糖 DMEM 培养基加 10% 胎牛血清常规培养 COS-7 细胞,胰酶消化传代,倒置显微镜下观察。

1.6 转染

采用脂质体转染法。将生长状态良好的 COS-7 细胞以 1.5×10^5 接种于 35 mm 培养瓶中,待生长至 80% ~ 90% 融合时开始转染:用无血清 DMEM 洗细胞 2 次,取 3 μ l Lipofectamine 2 000 加入到 500 μ l 无血清 DMEM 培养液中,另取 1 μ g 重组质粒和 0.2 μ g 作为内标的 PRL-TK 质粒加入到 500 μ l 无血清 DMEM 培养液中,两液体混匀,室温放置 20 min,轻轻覆盖细胞表面,37 孵育 6 h 后换正常培养基继续培养。转染 48 h 后收集细胞,进行荧光素酶的活

性检测。

1.7 双荧光素酶活性测定

按 Promega 公司提供的双荧光素酶检测方法进行。弃去培养液,用 1 × PBS 洗涤细胞 2 次,每瓶加入 200 μ l 1 × 细胞裂解液,室温放置 15 min 后收集细胞,冻融后 12 000 r/min 4 离心 5 min,吸取 20 μ l 上清液加入 100 μ l 萤火虫荧光素酶底物(LAR),混合后用化学发光计测定荧光素酶发光值;再加入 100 μ l 反应终止液(Stop & GOR),测定作为内标的 Renilla 荧光素酶发光值,两者比值即为荧光素酶的相对活性 RLA(relative luciferase activity)。RLA 的数值为 3 次重复实验结果平均值 ± 标准差。

1.8 统计分析

统计学分析方法采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 小鼠 *Lrp5* 基因 5 调控序列的软件分析

采用 Mat Inspector V2.2 计算机软件,对小鼠 *Lrp5* 基因 5 调控序列进行分析,结果见 Fig. 1。

2.2 小鼠 *Lrp5* 基因 5 调控序列的克隆

以小鼠 BAC 文库为模板,PCR 扩增出 *Lrp5* 基因翻译起始位点前长度为 3041 bp 的 DNA 序列(Fig. 2),定向克隆到 pCL3-basic 载体上(pCL3-basic 载体含有一个克隆位点,多克隆位点下游含有萤火虫荧光素酶报告基因,不含启动子和增强子,待分析片段插入到多克隆位点,通过检测萤火虫荧光素酶的活性,可直接反映出克隆区域内调控元件的作用情况)。PCR 和酶切鉴定阳性克隆,重组质粒命名为 pCL3-2 909 (Fig. 3)。

2.3 小鼠 *Lrp5* 基因荧光素酶表达载体的构建

以 pCL3-2 909 质粒为模板,以不同的引物扩增出不同长短的 DNA 片段,琼脂糖凝胶电泳分析显示得到了预期片段(Fig. 4)。分别定向克隆到含小鼠 *Lrp5* 基因基本启动子并含有荧光素酶报道基因的 pCL3-103 载体上,经 PCR 和酶切鉴定阳性克隆,分别命名这些质粒为 pCL3-267、pCL3-513、pCL3-770、pCL3-1 032、pCL3-1 330、pCL3-1 619、pCL3-535、pCL3-560、pCL3-575、pCL3-623、pCL3-645、pCL3-719 (Fig. 5)。

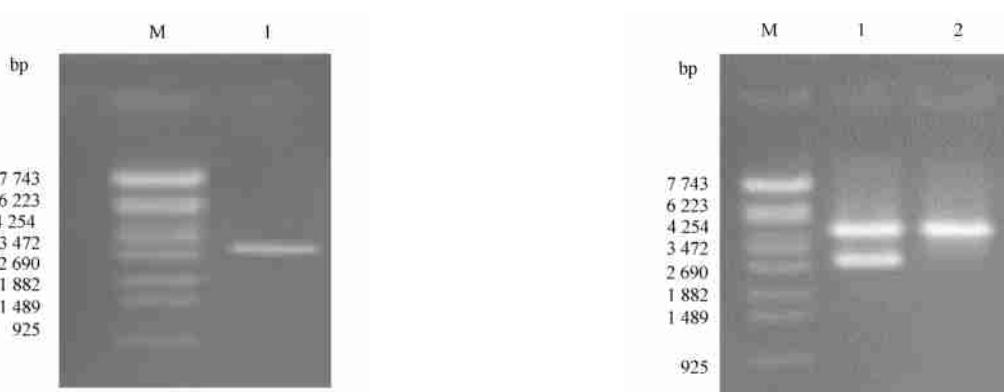
2.4 小鼠 *Lrp5* 基因 5 调控序列的活性分析

将上述构建的 12 种表达载体分别瞬时转染 COS-7 细胞,以 PRL-TK 为内参照质粒,48 h 后收集细胞,测定荧光素酶相对表达活性(Fig. 6)。

-2950 GTCTTCTCCCTACTACAGGTCACTCATCAGGCCCTGGTGGCAAGTACCCACCATCTGAGCCATCTCACTGGTATGCCATTTCAAATTGGAACCCAGC
 F1
 -2850 TATGAACTATGAAGCACCCCAGTGTCCCCCTCTGTTCTATAGCTAGCCTCCCATCTAGGGCTCCCCACCTGCACCTCAGATGCCCTGCTGACATC
 -2750 CTAGAGACCTGCATCCTCGTGTCTAGAGACTTGCAAGTCTGTTGGTCAGAACATGGACAGAAAATAGGGCAAGGGCTGGTGGAGATGGCTCAG
 -2650 TGGGTAAGGACACCCGACTGCTTCCGAAGGTCAGGGTCAAATCCCAGCAACCACATGGTGGCTCAACACATCTGAAACAGATCTGACTCCCTC
 P1
 -2550 TCTGGTGTCTGAGGACAGCTACAGTGTACTTACATATAATAATAAATCTTAAAAAAAAGAAAATAGGGCAAGTGTGTGGTGC
 -2450 CAGGCTGGGCTTAATGTGACTTCTGTCAGGGCTAGTGCACCCAGAGAGGACAGGCTGGCCTGGGACCTGAAGCACCGGGTGGGACAGAGGCTG
 P2 P7 IK2 LYF1 P8
 -2350 GAACCTCCAGGGGATCTGCTGGTGTCTGAGTACAAGATGGAATGGAAGGAAAGGTCAGCTCGAGGGACTGCAAGTCTGGCGCTGGGCTGGAGGTA
 P9 MZF1 IK2 P10 PII
 -2250 GGATGGGAGACTGACCCAAGGTTAGAGCAGCTCAGCCCAGGGTGAGGTGAAGGTGCGTTCCCATCTGTCAGTAACTAACGACCTGAC
 P12
 -2150 CTCTCCACAGTGGGCCAGCATTCCTCCCTTACAGTCTCAGCCCTGTCAGCACTCAGGGTCTCTCTTAATGAAAGAAACAGATCTTAC
 P3
 -2050 TGTGCTCATTAACAAATTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGAGACAGGCTCTGCTGCTGCTGCTGAACTCACTTGTAGACC
 -1950 AGGTGGCCCTGCAACTCAGAAATCTGCCCTGCTCTGCTGAGTGTGGAGTAAGGCGTGAGCCACCATGCCCCCTAATTTTTTTTTTTT
 P4
 -1850 AATGGGGCACCCTACTATGCTGGGTCTCAGCTAGAACAGAAAACAGACAATCTGGCATTTCTGTAATGGAAGAAAAGAAACAAAC
 -1750 ATACACCCCTGCTAGGTGAGACACTGTCAGTAGGGCGCTTAGAGAGTGGAGAGGAGCTATGGTTTCAAGAAACTAAGTGGATAAGGTCCAGCAA
 -1650 TCAGGCCCTCCCCACGCAAGACAGTGCCTCATCTGCAAGGGGCCATTACAGTGCAGCCCATAAGATGGAGTTGAGAAGTAACGGAGGTGTTGCTAGG
 P5
 -1550 CCAGGCCGTGTAGCCCAAGGCTTCAGCTCTCTGACCGGTGGAGGAGTGGTAGGCTGGCTTATTAACAGCTCCCTGGCTGCAGGGAGAGGA
 -1450 GGCCTCAGAAAATCAAGGCTAAAGAGGAAGGCCCTGGGGATGGGTGAGAGTGGGCTAGAGAAGGGGTTGTCCTGGCTCTGTTGAAGGTGG
 -1350 AGGGGGGATGGGGTTGGGCTGGGTGAGAAGGAACCAGCAAGGACACTAGCTGCTCTAGTCCCTGACTGCCCTGAGACCTCCTGACTCCT
 P6
 -1250 CTTCCGGTCAGAGACTGGATACAGGCCACCCAGGAGACTGCTTCTGACCAACTGGCTCTCCGCTTGGGAATCTCTGCCCTGACCCCTGGAAACCC
 -1150 TGGTGTGGTCCCCTCCCCCTACTAGCTGGCCCTGGCTCTGATGTTCTTCTATTAGAAGACAAGTTGGGAGTCAGTCTCTTCTCGCATCCT
 -1050 AGGGTGAACCTAGGTCAACGGGAGCCATCTGCTGGCCAGCCTGACCTGCCCTTGCTCTGTTATCAGGTGGCTTATGCAAGCCTGGGAGAGA
 -950 GCTGTGACACTAGGGAACCAAGGGCTCTAACTCCTTTAACACAGGGTCTCGCAGGTAGCCAGGGCTGGCTCAAACACTCATGGCAAGCCTGGCCT
 -850 CAATCTCCGAGGCTGGACACCATGTCAGACTATAAGTAAAGTCATACACACTGAGCGCCATGTCACCTCCCGCTACTCACTCTTGTGGGCT
 -750 CTTATTGTCCTCTCTAGATAAACACACAGGAGGGCAGAGGACCCCTCTGACCACCTCAGCTCTGCTCTCTCTACCTGCAAGGTGGACAC
 -650 TGCCATTAGCTTAATTCTAAGGACATGAAATGATTCACCTACACCTGCCCTGCCAGGGTGTAGGTTCTAGAAAGCACTGCCAGAGAGAAGGCTCA
 -550 GCAGTTAGAACACTACTGCTTTAGAGACCTGGGTTGGCTCGCAGTCACCTGGCTCACACCTCTAACCTCAACTCCAGTCCAGGGGACCCAC
 -450 ACCCTATTCTGGTTCTCTCCGCATGTGGTCACATACATGCGTCAAACACTCATACACATAACACAAAAGTAAATCTAAAGTAAAGCCCCAGT
 -350 TCCCTCAGCAGTATCCGCTTTCGCCTGTCAGTCCAGGGCTGATGTTGGGTGAGTGTGGGCTACAGTTGTTGAAAGAGGCCA
 -250 AAGCTGGCTCGGAGACCTGGCTCCAGGCTGAGGGCTCTGACTGTGTGGGCTAGCTGTTCTACCTGCAAGTACAGAGA
 -150 CTTGGCAGGTGACCCACCTGCTTGGCCGGCTCTCTGTCGCCGGCCGGAGAGACCCGCCCTGCCGGCTCCGGCGCCGCCAGGGCGCGCTGGC
 -50 GGGGGCGCGGGCGGCCCGGGAGACCCGCTGGCTTCCGCTCCTCTCCCGCTGCTTGGCCGGCGCCGAGCGGGAGCAAGAGGCC
 +1
 +50 GGGAGCCCGAGGATCCACCCGCCGCCGCCATGGAGCCCGAGTGAGGCGCGCGCGCGCGACATGGAAACGGCGCCGACCCGG
 F2

Fig.1 5' Upstream control region of mouse *Lip5* gene

The underlined sequences indicate the PCR primers. The black sequences indicate the cis-acting elements

**Fig.2** Electrophoretic analysis of mouse *Lip5* gene upstream region by PCR

M: EcoT14 I digest marker; 1: 3041 bp fragment

Fig.3 Enzymatic map of recombinant plasmidM: EcoT14 I digest marker; 1: pCL3-2 909 (*Kpn* / *Hind*) ;
2: pCL3-basic (*Kpn* / *Hind*)

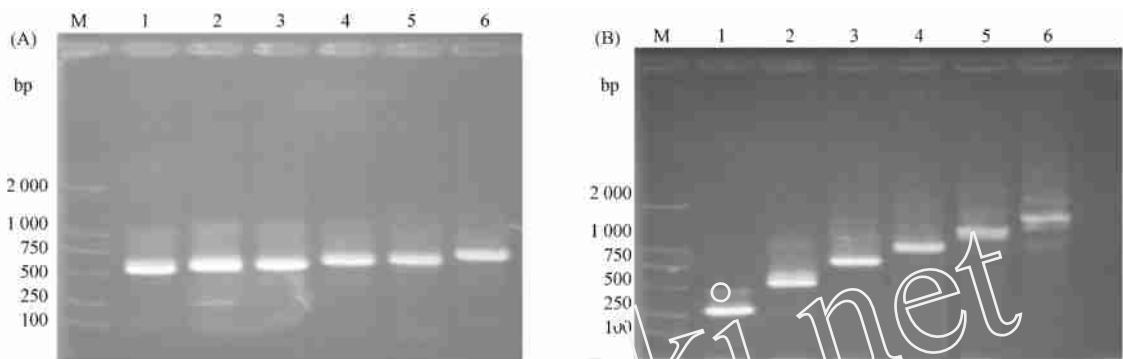


Fig. 4 PCR products identification

(A) M: DL2000 DNA marker; 1: 535 bp fragment; 2: 560 bp fragment; 3: 575 bp fragment; 4: 623 bp fragment; 5: 645 bp fragment; 6: 719 bp fragment
 (B) M: DL2000 DNA marker; 1: 267 bp fragment; 2: 513 bp fragment; 3: 770 bp fragment; 4: 1 032 bp fragment; 5: 1 330 bp fragment; 6: 1 620 bp fragment

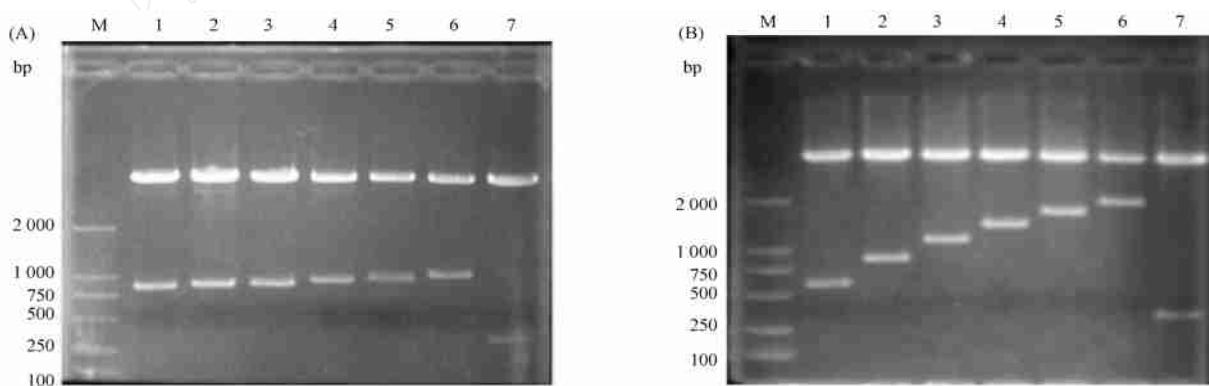


Fig. 5 Enzymatic map (*Kpn*I / *Hind*III) of luciferase expression plasmids

(A) M: DL2000 DNA marker; 1: pGL3-535; 2: pGL3-560; 3: pGL3-575; 4: pGL3-623; 5: pGL3-645; 6: pGL3-719; 7: pGL3-103
 (B) M: DL2000 DNA marker; 1: pGL3-267; 2: pGL3-513; 3: pGL3-770; 4: pGL3-1 032; 5: pGL3-1 330; 6: pGL3-1 619; 7: pGL3-103

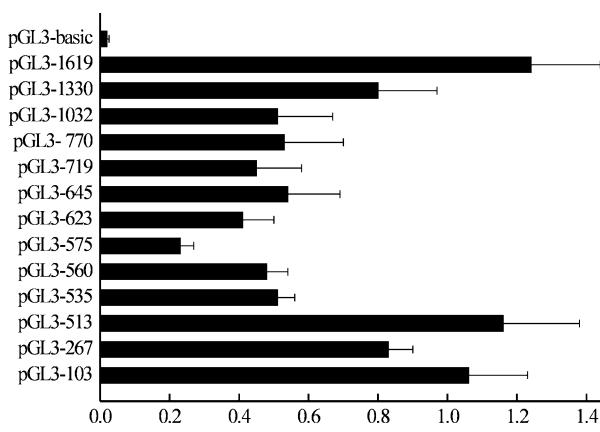


Fig. 6 Relative luciferase activity of different constructs in COS-7

3 讨论

Lip5 基因全长 cDNA 是 1998 年分别由 Merck 实验室和 Bayer 研究中心克隆的^[8,9]。Merck 实验室在建立胰岛素依赖性糖尿病基因候选区域物理图和转

录图时,从肝脏的 cDNA 文库中分离得到 *Lip5* 基因。Bayer 实验室在分离成骨细胞发育相关基因时从成骨细胞 cDNA 文库中分离到该基因的。蛋白质序列和结构分析表明,该基因所编码的蛋白质属于低密度脂蛋白受体相关蛋白家族,由胞外区、跨膜区和胞浆区组成,胞外区部分由表皮生长因子前体同源区、配体结合区和糖区组成^[10]。*Lip5* 基因丧失功能突变导致骨质疏松-假性神经胶质瘤综合征(OPS),该综合征的主要临床表现为幼年型骨质疏松和假性神经胶质瘤,并发现携带 *Lip5* 基因突变的杂合子骨密度显著低于对照组。另一方面,*Lip5* 基因敲除小鼠分析表明,纯合子小鼠表现为类似于人类 OPS 表型,杂合子小鼠表现为明显骨质疏松。尽管 *Lip5* 基因在多种组织中表达,但 *Lip5* 基因突变的病理效应只表现为骨质疏松和假性神经胶质瘤。目前关于 *Lip5* 基因的其它方面功能、表达调控机制以及其在骨密度调节过程中的作用机制尚不清楚,阐明该基因表达

的调控机制将有助于理解 *Lrp5* 基因的功能。

研究 DNA 调控区域常采用的策略有两种:一是对被测 DNA 片段进行缺失突变分析,寻找参与调控的功能性区域;另一种是通过计算机数据库(如 TRANSFAC 等)分析,检测 DNA 片段内含有的潜在的已知 DNA 结合蛋白的结合序列。前者最常用,后者可作为辅助。缺失突变分析是研究 DNA 片段中功能性调控元件的常用方法,利用缺失突变技术可产生 DNA 片段的一系列 5' 缺失体或 3' 缺失体或内缺失体,分析缺失片段对启动子活性的影响,从而鉴定 DNA 调控元件。为分析 DNA 调控元件的活性,常采用报告基因(report gene)的方法,构建报告基因表达载体,通过检测报告基因的表达反映 DNA 调控元件的活性。本文构建了 12 种含有小鼠 *Lrp5* 基因上游不同区段的荧光素酶报告基因表达载体,以 PRL-TK 为内参质粒,瞬时转染 COS-7 细胞,48h 后收集细胞分析荧光素酶相对表达活性。本研究用作内参质粒的 PRL-TK 含有 Renilla 荧光素酶报告基因,共转染细胞,以两种荧光素酶活性的比值作为调控序列活性的指标,以消除细胞数目和活力,转染方法,裂解效率等对测定的影响。为消除实验误差,每个表达载体分别做 3 次分析,每次转染和测定都做重复管,取其平均值。由 Fig. 6 可见,pCL3-575 (-2909 bp ~ -2334 bp) 质粒的相对荧光素酶活性最低,仅占 pCL3-513 (-2909 bp ~ -2396 bp) 的 20%。为缩小范围,在 pCL3-575 和 pCL3-513 质粒之间,又构建了 pCL3-535 和 pCL3-560 两种质粒。其相对荧光素酶活性分析表明,pCL3-535 (-2909 bp ~ -2374 bp) 质粒的活性是 pCL3-513 的 44%;pCL3-575 的活性是 pCL3-560 (-2909 bp ~ -2349 bp) 的 48%,均有显著性差异。结果分析表明:在 -2396 bp 与 -2374 bp 之间的 22 bp 区域内,以及 -2349 bp 与 -2334 bp 之间的 15 bp 区域内存在负调控元件,软件分析表明此区域含有 IK2, LYF1 及 MZF1 调控元件。

参考文献(References)

- Tolwinski N S, Wehrli M, Rives A, Erdeniz N, DiNardo S, Wieschaus E. Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow *Lrp5*, 6 and Axin independently of Zw3/Gsk3 beta activity. *Dev Cell*, 2003, 4(3): 407 ~ 418
- Gong Y, Vakkula M, Boon L, Liu J, Beighton P, Ramesar R, Peltonen L, Somer H, Hirose T, Dallapiccola B, De Paepe A, Swoboda W, Zabel B, Superti-Furga A, Steinmann B, Brunner H G, Jans A, Boles R G, Adkins W, van den Boogaard M J, Olsen B R, Warman M L. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am J Hum Genet*, 1996, 59: 146 ~ 151
- Gong Y, Slee R B, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato A M, Wang H, Cundy T, Glorieux F H, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apté S, Adkins W N, Allgrove J, Arslan Kirchner M, Batch J A, Beighton P, Black G C, Boles R G, Boon L M, Borrone C, Brunner H G, Carle G F, Dallapiccola B, De Paep A, Floege B, Halfhide M L, Hall B, Hennekam R C, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim C A, Keppler-Noreuil K, Kohlschutter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar R S, Romanengo M, Somer H, Steicherr Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard M J, Van Hul W, Vakkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen B R, Warman M L. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome collaborative group. LDL receptor-related protein 5 (*Lrp5*) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 2001, 107 (4): 513 ~ 523
- Little R D, Carulli J P, Del Mastro R G, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning S P, Swain P M, Zhao S C, Eustace B, Lappe M M, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald M G, Tulig C, Caruso A, Tzelas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales A J, Lomedico P T, Recker S M, Van Erdewegh P, Recker R R, Johnson M L. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high bone mass trait. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(1): 11 ~ 19
- Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, Reddy P S, Bodine P V, Robinson J A, Bhat B, Marzolf J, Moran R A, Bex F. High bone mass in mice expressing a mutant *Lrp5* gene. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(6): 960 ~ 974
- 吕萍,龚瑶琴,李江夏,周海斌,陈丙玺.小鼠 *Lrp5* 基因基本启动子分析.山东大学学报(Lü Ping, Gong Yao-Qin, Li Jiang-Xia, Zhou Hai-Bin, Chen Bing-Xi). Analysis of the basal promoter of mouse *Lrp5* gene. *J Shandong Univ*, 2004, 42(4): 390 ~ 394
- 吕萍,龚瑶琴,李江夏,周海斌,陈丙玺.小鼠 *Lrp5* 基因启动子的克隆及功能分析.中国生物化学与分子生物学报(Lü Ping, Gong Yao-Qin, Li Jiang-Xia, Zhou Hai-Bin, Chen Bing-Xi). Identification of mouse *Lrp5* gene promoter. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2005, 21(1): 72 ~ 77
- Hey P J, Twells R C J, Phillips M S, Yusuke Nakagawa, Brown S D, Kawaguchi Y, Cox R, Xie G C, Dugan V, Hammond H, Metzker M L, Todd J A, Hess J F. Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene*, 1998, 216 (1): 103 ~ 111
- Dong Y, Lathrop W, Weaver D, Qiu Q, Ciri J, Bertolini D, Chen D. Molecular cloning and characterization of LR3, a novel LDL receptor family protein with mitogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251 (3): 784 ~ 790
- Chen D, Lathrop W, Dong Y. Molecular cloning of mouse Lip7 (Lip3) cDNA and chromosomal mapping of orthologous genes in mouse and human. *Genomics*, 1999, 55(3): 314 ~ 321