

[文章编号] 1000-4718(2006)07-1272-05

# 纤维连结蛋白启动子的克隆及转录活性的研究\*

李奎<sup>1,2</sup>, 唐俊明<sup>1,2△</sup>, 王家宁<sup>1</sup>, 王明江<sup>2</sup>, 黄永章<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 郧阳医学院附属人民医院临床医学研究所, <sup>2</sup> 郧阳医学院生理教研室, 湖北 十堰 442000)

**[摘要]** 目的:克隆纤维连结蛋白(FN)启动子和检测其转录活性,并初步研究增加SV40增强子对其转录活性的影响。**方法:**从正常人gDNA中克隆FN启动子,驱动氯霉素乙酰转移酶报告基因表达,构建含有SV40增强子和无SV40增强子两个重组体报告载体。利用脂质体介导的转染技术导入HT1080细胞,检测各重组体的瞬时表达,确定克隆FN启动子转录活性和SV40增强子对其转录活性的影响。**结果:**克隆的FN启动子在HT1080细胞中活性比SV40启动子稍强,在加入SV40增强子时活性提高了约6倍。**结论:**成功的克隆FN启动子,在HT1080细胞中有活性,通过增加SV40增强子能大大提高其活性,为运用FN启动子和特异性靶细胞治疗各种遗传性疾病提供了一定基础。

**[关键词]** 纤维连结蛋白启动子;克隆,分子;SV40增强子;基因,报告

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Cloning of the fibronectin promoter and observation of its transcriptional activity

LI Kui<sup>1,2</sup>, TANG Jun-ming<sup>1,2</sup>, WANG Jia-ning<sup>1</sup>, WANG Ming-jiang<sup>2</sup>, HUANG Yong-zhang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Clinical Medicine, <sup>2</sup>Department of Physiology, Yunyang Medicine College, Shiyan 442000, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To clone fibronectin (FN) promoter and identify its transcriptional activity combined with SV40 enhancer. **METHODS:** FN promoter was amplified from genomic DNA by PCR and cloned into pCat3-basic and pCat3-enhancer vector to drive CAT expression. They were transferred to HT1080 cells with lipofectin. Then the instant CAT expression of different plasmids was detected and the FN promoter transcriptional activity and its activity when it was combined with SV40 enhancer were evaluated. **RESULTS:** The FN promoter was cloned successfully. Its transcriptional activity was slightly stronger than the activity of SV40 promoter. Combined with SV40 enhancer, its activity was improved by about six times. **CONCLUSION:** The FN promoter cloned by us has transcriptional activity. The activity is increased by adding SV40 enhancer. These will provide useful information for gene therapy for combined FN promoter to cure some heredity diseases.

**[KEY WORDS]** Fibronectin promoter; Cloning, molecular; SV40 enhancer; Genes, reporter

皮肤成纤维细胞具备易于获得、体外能大量增殖和方便移植体内等优点,以及从皮肤成纤维细胞分泌的细胞因子在局部和整体的作用来看,它能作为基因治疗的靶细胞<sup>[1,2]</sup>。在动物模型上用逆转录病毒载体转染皮肤成纤维细胞,已表达了腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)<sup>[2]</sup>凝血因子IX (coagulation factor IX, IX)<sup>[3]</sup>葡糖醛酸糖苷酶( $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -Glu)<sup>[4]</sup>和促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)<sup>[5]</sup>等一些可用于治疗的蛋白。同时也发现基因修饰的皮肤成纤维细胞移植到体内,目的蛋白表达时间是有限的,这涉及到载体所使用的启动子

问题。尽管被转移载体序列长期存在于移植后的细胞中而载体驱动基因表达在3至4周后会慢慢减少,说明有一些不明原因关闭外源性病毒启动子<sup>[6]</sup>。而纤维连结蛋白(Fibronectin, FN)启动子驱动下高效表达 $\gamma$ -干扰素<sup>[7]</sup>。当用基因治疗方法去纠正溶酶体堆积病时,病毒载体启动子驱动下基因表达量在细胞移植后会下降而FN启动子却至少1年不会发生这样的情况<sup>[8]</sup>。在成纤维细胞中, FN启动子能稳定驱动ADA基因表达。为了利用基因修饰成纤维细胞进行基因治疗,我们克隆FN启动子,并为提高其活性而初步研究增加1个SV40增强子对其活

[收稿日期] 2004-10-08 [修回日期] 2005-02-02

\* [基金项目] 湖北省自然科学基金资助项目(2005ABA079)

△ 通讯作者 Tel: 0719-8652119-6577; E-mail: tangjm416@163.com

性的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

**1.1 质粒** T-vector Kit、pCAT3-basic、pCAT3-enhancer、pCAT3-control、pSV- $\beta$ -galactosidase 质粒购自 Promega 公司,  $\beta$ -gal 载体作为内对照。

**1.2 根据文献<sup>[9]</sup>提供的序列设计引物** 上游引物 FN1: 5'-tt **gag ctc** ctg caa ggt cgt gga tat ttt atg g-3' 下游引物 FN2: 5'-tt **aga tct** ggt ccc ctc ttc ccg etc gcg cct g-3' 在引物 FN1 的 5' 端加上限制性内切酶 *Sac* I 识别位点 **gag ctc**; 在 FN2 的 5' 端加上限制性内切酶 *Bgl* II 识别位点 **aga tct**。

**1.3 试剂** TaKaRa LA Taq<sup>TM</sup>、T<sub>4</sub> DNA ligase、各种 DNA 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清 购自 Sigma 公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物公司, QIAprep spin Miniprep Kit 购自 Qiagen 公司;  $\beta$ -Gal 活性检测 Kit、lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自 Invitrogen 公司; low melt point agarose, [<sup>14</sup>C] chloramphenicol (0.05 mCi/ml)、n-butrylCoA 购自 Promega 公司; 液闪仪 LS 6000IC (Beckman 公司)。

**1.4 其它** HT1080 细胞购自 CCTCC 公司; 正常人 gDNA、JM109 大肠杆菌本室提供, 其它试剂为国产分析纯。

### 2 方法

**2.1 PCR 获得正常人 FN 基因启动子和克隆到 T-vector** 采用上游引物 FN1 和下游引物 FN2 分别从 3 个正常人的 gDNA 中扩增 FN 基因启动子片段。PCR 反应体系为: 引物 FN1 50 ng, 引物 FN2 50 ng, 正常人 gDNA 200 ng, 2 × GC1 buffer 10  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 0.8  $\mu$ L, TaKaRa LA Taq 2U, 加去离子无菌水补足到 20  $\mu$ L。PCR 反应程序: 96  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 60  $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 30 个循环后, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 储存。取相应的 PCR 产物采用低熔点琼脂糖回收与 T-vector 进行连接 (按照 T-vector Kit 操作)。命名为: T-pFN。转化感受态 JM109, 小量制备 T-pFN 质粒, 内切酶 *Bgl* II/*Sac* I 双酶切 0.8% 琼脂糖电泳鉴定 (按分子克隆操作)。

**2.2 FN 启动子测序鉴定及 Blast 分析** 将 T-pFN 酶消化鉴定的阳性克隆重新培养, 采用 Spin Kit 抽提质粒进行 DNA 测序, 测序结果采用 DNA Start 软件分析。

**2.3 构建 CAT 报告基因重组体** 将 T-pFN 质粒用 *Sac* I 和 *Bgl* II 酶切消化后, 用低熔点琼脂糖回收 600 bp 大小的片段, 分别与 *Sac* I 和 *Sma* I 消化的 pCAT3-basic、pCAT3-enhancer 进行连接。命名为: pCAT3-BpFN、pCAT3-EpFN。

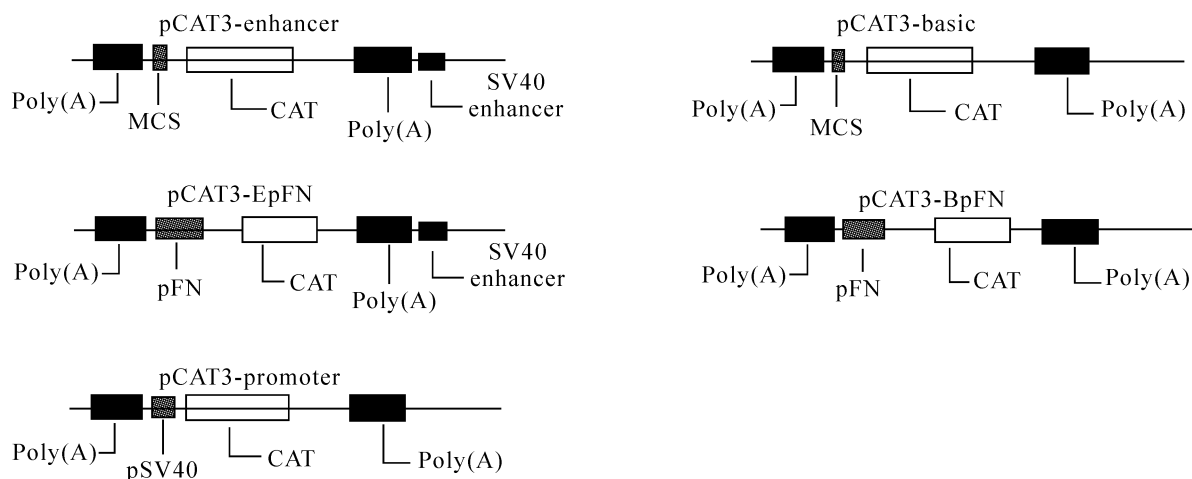


Fig 1 The structure of the different CAT report gene vectors driven by FN promoter.

图 1 FN 启动子驱动 CAT 报告基因几个载体结构

**2.4 细胞的培养和 DNA 的转染<sup>[10]</sup>** 质粒的纯化采用 Vitagene 公司去内毒素质粒纯化试剂盒, 整个操作过程严格按照 KIT 说明书进行, 质粒 DNA 溶于无内毒素水中, 4  $^{\circ}$ C 或 -20  $^{\circ}$ C 保存。转染 HT1080 细胞, 操作按照 Invitrogen 公司提供的参考方法进

行: 在转染前 1 d, 胰酶消化 HT1080 细胞, 计数, 接种到 12 孔板中, 每孔 1 mL, 含  $1.6 \times 10^5$  个细胞。将 DNA 1.6  $\mu$ g (1.3  $\mu$ g 目的 DNA, 0.3  $\mu$ g pSV- $\beta$ -Gal DNA) 稀释到 100  $\mu$ L 不含血清的 DMEM 培养基中, LF2000 脂质体 3  $\mu$ L 稀释到 100  $\mu$ L 不含血清的

DMEM 培养基中。将稀释的 LF2000 与稀释的 DNA 混合,室温下放置 20 min,然后将 DNA - LF2000 混合物加到相应的孔中,轻轻混合。于 37 °C、5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h 后,检测 β - gal、CAT 的活性。每组实验重复 3 次,β - Gal 活性作为内对照校正转染效率。

**2.5 脂质体介导转染细胞的氯霉素乙酰转移酶及 β - 半乳糖酶活性的测定**

① 检测 CAT 活性 按 CAT 活性检测 Kit 说明书操作:转染 48 h 后的细胞,PBS 洗 3 次,每孔中加入 500 μL 的 TEN,室温下 5 min,刮下细胞转入 1.5 mL 的离心管中。4 °C 下,13 000 r/min 离心 1 min,去上清后加 0.25 mol/L Tris - HCl (pH 8.0) 100 μL,重悬细胞。置于液氮中快速冷冻后,于 37 °C 解冻,剧烈振荡 30 s。重复 3 次冻融后,13 000 r/min 离心 2 min,一部分上清用于 β - Gal 检测,取 30 μL 上清液置一个新的离心管中,于 60 °C 作用 10 min,加入 [<sup>14</sup>C] chloramphenicol (0.05 mCi/mL) 1.5 μL, n - butyryl-CoA 2.5 μL, 0.25 mol/L Tris - HCl (pH 8.0) 28.25 μL,混匀后于 37 °C 作用 16 h。加入二甲苯 300 μL,剧烈振荡 30 s,13 000 r/min 离心 3 min,将有机相转入到 1 个新的离心管中,加入 0.25 mol/L Tris - HCl (pH 8.0) 100 μL,剧烈振荡 30 s,13 000 r/min 离心 3 min,再重复上述步骤 1 次,将 200 μL 有机相加入到含 1 mL 闪烁液的液闪杯中,检测。

② 检测 β - Gal 活性 按 β - Gal 活性检测说明书操作。细胞处理同检测 CAT 活性的细胞处理,取一部分上清用于检测 β - Gal 活性(未进行 60 °C 作用的上清)将样品按 5、10、20 μL 加到酶标板中,每孔含 50 μL 1 × cleavage buffer (带有 β - 巯基乙醇)和 17 μL ONPG (邻硝基苯 - β - D 半吡喃糖苷),37 °C 作用 30 min 到 60 min,最后加 125 μL buffer 到反应液中终止反应。置入酶标仪 (Bio - Rad 公司) 中,波长 420 nm 下检测吸光度 (A) 值。

**结 果**

**1 PCR 扩增产物和报告基因重组体的酶切鉴定结果**

从正常人 gDNA 中扩增的人 FN 启动子大小为 580 bp (见图 2 中泳道 3)。将 T - pFN, pCAT3 - BpFN, pCAT3 - EpFN 质粒用 *Sac* I 和 *Bgl* II 消化产生 580 bp 的目的条带和相应的载体条带 (见图 2 中的 2,3)。

**2 纤维连结蛋白启动子测序结果**

采用 pGEM - T 载体上的 T7 和 SP6 引物及 FN1、2 引物对人 FN 启动子序列进行全长测序,测序结果表明:共有 5 处与已报道的人 FN 启动子序列存在不同 (图 3), 分别对应测序图中 22 位多 1 个 C, 134、135 位多 1 个 G 和 A, 153 位多 1 个 C, 161 位多 1 个 G, 168 位 C → G。为了验证并非 PCR 扩增过程中所引起的突变,采用 FN3 和 FN2 引物,对 3 个正常人 gDNA 进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经纯化后,进行 DNA 测序,测序结果与最初的结果一致,同时获得 GenBank 登录 (AF550582)。

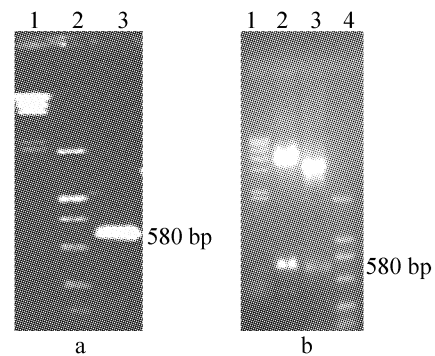


Fig 2 a: Electrophoresis of FN promoter amplified by PCR. Lane 1: DNA marker DL 22000; Lane 2: DNA marker DL - 2000; Lane 3: product of PCR; b: Result of pCAT3 - BpFN, pCAT3 - EpFN digested completely by *Sac* I / *Bgl* II. Lane 1: DNA marker DL 22000; Lane 2: The digested product of the pCAT3 - EpFN plasmid; Lane 3: The digested product of the pCAT3 - BpFN plasmid; Lane 4: DNA marker DL - 2000.

图 2 a: PCR 扩增 FN 启动子的电泳图; b: pCAT3 - BpFN, pCAT3 - EpFN 用 *Sac* I 和 *Bgl* II 双酶切图

**3 不同报告基因载体的相对活性**

将报告基因载体转染细胞后,测定 CAT 活性,测定 β - Gal 的活性校对转染效率,实验重复 3 次。以 pCAT3 - promoter 的 CAT 活性设为 100,其它报告基因载体的 CAT 活性与 pCAT3 - promoter 的 CAT 活性的比值为相对活性 (见表 1 和图 4)。

表 1 不同报告基因载体驱动 CAT 在 HT1080 细胞中表达的相对活性

Tab 1 CAT relative activity of different reporter gene recombinants in the HT1080 cells

Plasmid	Promoter	Enhancer	Cell	CAT relative activity
pCAT3 - promoter	SV40	—	HT1080	100
pCAT3 - BpFN	fibronectin	—	HT1080	110
pCAT3 - EpFN	fibronectin	SV40	HT1080	620

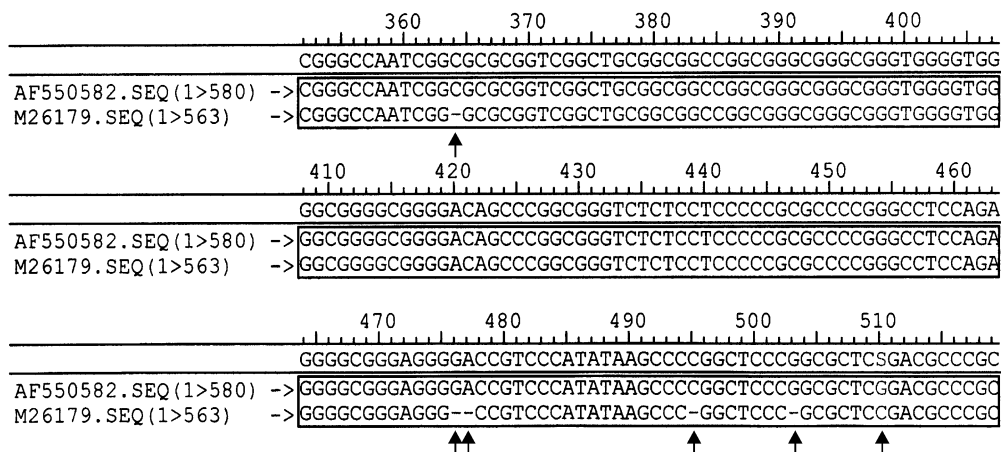


Fig 3 Result of the cloned FN promoter sequence blasted with the reported sequence.

图 3 克隆的 FN 启动子测序结果与已知报道的序列 Blast 比较结果

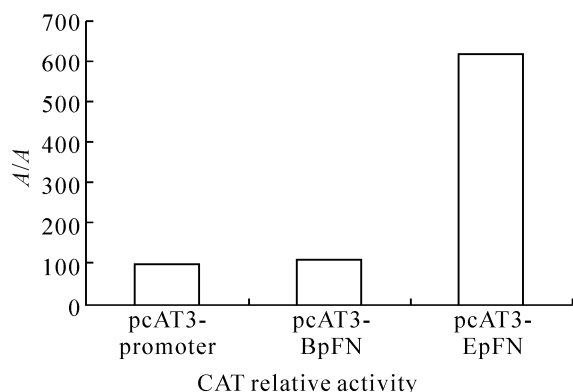


Fig 4 CAT relative activity of different reporter gene recombinants in the HT1080 cells.

图 4 不同驱动 CAT 在 HT1080 细胞中表达的相对活性

### 讨论

人巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 启动子是一公认的强启动子,能驱动外源基因在各种细胞或组织中表达。但有文献报道 CMV 启动子在体内表达有可能失活<sup>[11,12]</sup>,对于一些需要长期表达外源基因的基因治疗来说,显然是不行的。由于看家基因能在体内稳定表达,因此它们的启动子序列常被用于驱动外源基因在体内的表达研究;增强子可以通过增强基因的转录水平而提高基因的表达<sup>[13,14]</sup>。最早发现的增强子是位于 SV40 病毒早期启动子的 5' 上游,有两个 72 bp 的重复序列,可使其它基因的表

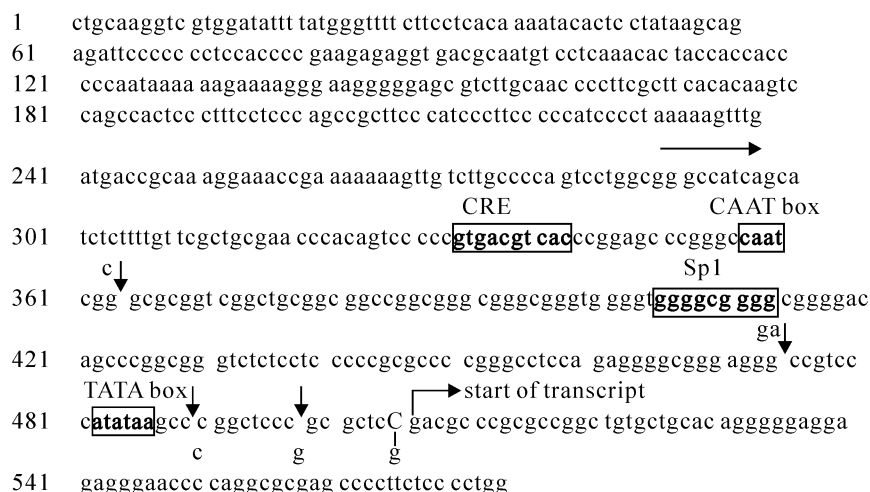


Fig 5 Site correlation of between the differentiation of the cloned FN promoter sequence compared with the reported sequence and its promoter elements.

图 5 克隆的 FN 启动子与已知报道的差异和启动子调控元件的位置关系

达增加。由于增强子对异源基因的作用明显,常常用于提高外源基因的表达。FN 基因主要在成纤维细胞和肝细胞中大量表达,而成纤维细胞是良好的

基因治疗靶细胞,肝细胞也分泌很多人体必需的因子。考虑到以上因素,我们首次通过 PCR 从正常人的基因组 DNA 中克隆中国人 FN 启动子,得到约 580

bp 左右的片段与已知报道相一致,测序结果与已报道的序列进行 Blast 比较,有 4 处增加了碱基,分别为转录起始位点前 9 位多 1 个 g,16 位多 1 个 c,33 位多 1 个 g 和 a,144 位多 1 个 c。此外,在转录起始位点前 2 位 c 改变为 g(见图 5)。我们从 3 个正常人 gDNA 中克隆所获得的人 FN 启动子序列测序分析也得到同样结果。人 FN 启动子序列与小鼠 FN 启动子序列<sup>[15]</sup>进行比较表明,在 4 处增加的碱基(与以前报道的人 FN 序列相比较有 4 处增加了碱基)与小鼠的序列完全一致,可能是多态性。而这些差异的作用尚不清楚,也许是群体差异,它们并非在启动子的调控元件中,可能对调控的影响不大(图 5)。

氯霉素乙酰转移酶报告载体继续证明克隆的 FN 启动子有转录活性,在 HT1080 细胞中比 SV40 启动子稍强,当加上 1 个 SV40 增强子,其活性约提高了 6 倍。这说明 FN 启动子的活性能通过增加一些增强子样元件而得到大大提高,这种重组调控元件有望能用于一些遗传病的治疗,可能在人体内治疗应用中,最终需加入人源增强子。实验证明成纤维细胞能分泌具有酶活性功能的凝血因子,但是用病毒启动子驱动凝血因子的表达,在体内易失活,不能用于血友病的长期治疗<sup>[2]</sup>。而用 FN 启动子和 SV40 增强子重组调控元件,替代病毒类启动子,可能从表达量和表达时间上解决血友病基因治疗问题。同样也可以用于一些与激素和细胞因子相关的遗传疾病的治疗:它们在体内需要量都比较少,只需持续和小量的表达产物,就能达到很大治疗作用。希望 FN 启动子驱动治疗蛋白基因在成纤维细胞和肝细胞中持续的高效表达给基因治疗带来新的前景。

#### [参 考 文 献]

[1] 何东华,何祥梁. 肺癌基因治疗研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(11): 1147 - 1150.

[2] Ramesh N, Lau S, Palmer TD, et al. High - level human adenosine deaminase expression in dog skin fibroblasts is not sustained following transplantation[J]. Human Gene Ther, 1993, 4(1): 3 - 7.

[3] Xu L, Gao C, Sands MS, et al. Neonatal or hepatocyte growth factor - potentiated adult gene therapy with a retroviral vector results in therapeutic levels of canine factor IX for hemophilia B[J]. Blood, 2003, 101(10): 3924 -

3932.

[4] Moullier P, Bohl D, Cardoso J, et al. Long - term delivery of a lysosomal enzyme by genetically modified fibroblasts in dogs[J]. Nature Med, 1995, 1(4): 353 - 357.

[5] Baek SC, Lin Q, Robbins PB, et al. Sustainable systemic delivery via a single injection of lentivirus into human skin tissue[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(12): 1551 - 1558.

[6] Palmer TD, Rosman GJ, Osborne WR, et al. Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(4): 1330 - 1334.

[7] Nakajima T, Nakamura T, Tsunoda S, et al. E1A - responsive elements for repression of rat fibronectin gene transcription[J]. Mol Cell Biol, 1992, 12(6): 2837 - 2846.

[8] Taylor RM, Wolfe JH. Decreased lysosomal storage in the adult MPS VII mouse brain in the vicinity of graft of retroviral vector - corrected fibroblasts secreting high levels of  $\beta$  - glucuronidase[J]. Nature Med, 1997, 3(7): 771 - 774.

[9] Dean DC, Bowlus CL, Bourgeois S, et al. Cloning and analysis of the promoter region of the human fibronectin gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(7): 1876 - 1880.

[10] 段山,方小武,陈路明,等. 人  $\beta$  地中海贫血 IVS II 654(C $\rightarrow$ T) 突变基因的克隆和真核表达体系的构建[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(1): 22 - 26.

[11] Armentano D, Zabner J, Sacks C, et al. Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors[J]. J Virol, 1997, 71(3): 2408 - 2416.

[12] Guo ZS, Wang LH, Eisensmith RC, et al. Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression *in vivo* following adenovirus - mediated gene transfer[J]. Gene Ther, 1996, 3(9): 802 - 810.

[13] Tai M, Lin T, Hibio H, et al. Transduction of Lac - Z gene into leukemia cells using viral vectors of adenovirus and retrovirus[J]. Leukemia, 1995, 9(suppl1): 64 - 69.

[14] Gill DR, Smyth SE, Goddard CA, et al. Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing ubiquitin C or elongation factor 1 alpha promoter[J]. Gene Ther, 2001, 8(20): 1539 - 1546.

[15] Polly P, Nicholson RC. Sequence of the mouse fibronectin - encoding gene promoter region[J]. Gene, 1993, 137(2): 353 - 354.