

小鼠 Daintain/AIF-1 基因启动子的克隆及其荧光素酶报告基因载体的构建*

颜冬菁¹ 盖文丽¹ 赵燕英² 黄欣媛¹ 陈正望¹ 陆 婕^{1△}

(1 华中科技大学生命科学与技术学院分子生物物理教育部重点实验室 湖北 武汉 430074 ;

2 西南民族大学生命科学与技术学院 四川 成都 610041)

摘要 目的 对 Daintain/AIF-1(大炎肽 / 同种异体移植炎症因子 -1)基因启动子进行克隆并构建荧光素酶报告基因载体 ,为进一步研究 Daintain/AIF-1 的转录调控作用提供了质粒资源。方法 提取单核巨噬细胞系 RAW264.7 基因组 DNA ,以其为模板采用 PCR 方法克隆出 Daintain/AIF-1 基因 5' 端 UTR 区 1.6 kb DNA 序列 ,将该序列同源重组到 pGL3-Basic 载体上 ,转化感受态 DH5 α 并酶切鉴定和测序。结果 PCR 产物片段与预期结果一致 ,Daintain/AIF-1 基因 5' 端 UTR 区 1.6 kb DNA 序列连接到 pGL3-Basic 载体上 ,构建成 pGL3-Basic-Daintain/AIF-1 (pGL3-Basic-DT) 载体 ,酶切结果与理论预测值一致 ,经测序证实无碱基突变。结论 : Daintain/AIF-1 基因报告基因载体的构建为进一步研究 Daintain/AIF-1 转录调控作用提供了载体资源。

关键词 Daintain/AIF-1 基因启动子 , 荧光素酶报告基因载体 , 构建

中图分类号 :Q95-3 ,Q75 ,Q78 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)06-1005-04

Molecular Cloning of Daintain/AIF-1 Gene Promoter and Constructing of Luciferase Report Gene Vector In Mice*

YAN Dong-jing¹, GE Wen-li¹, ZHAO Yan-ying², HUANG Xin-yuan¹, CHEN Zheng-wang¹, LU Jie^{1△}

(1 Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430074, China; 2 College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu, 610041, China)

ABSTRACT Objective: To construct luciferase report gene vector for mouse Daintain/AIF-1 gene promoter in order to provide foundation for further study on the transcription regulation of Daintain/AIF-1. **Methods:** The mouse genome was extracted from the macrophage cells RAW264.7, and from which 1.6 kb DNA sequence of Daintain/AIF-1 gene 5' end UTR was amplified by PCR. The PCR product was directly inserted into pGL3-Basic vector by homologous recombination and the vector was transferred into DH5 α . The positive clone was identified by digestion with Nco and sequenced. **Results:** A 1.6 kb DNA sequence of Daintain/AIF-1 gene 5' end UTR was successfully cloned and the luciferase report gene vector of mouse Daintain/AIF-1 gene promoter was well constructed. **Conclusion:** pGL3-Basic-Daintain/AIF-1 (pGL3-Basic-DT) vector was constructed, which lays a foundation for further research on Daintain/AIF-1 gene transcription regulation.

Key words: Daintain/AIF-1 gene promoter; Luciferase report gene vector; Construction

Chinese Library Classification: Q95-3, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID : 1673-6273(2011)06-1005-04

前言

Daintain/AIF-1 是 Chen ZW 首次于 1994 年报道的从猪小肠中分离纯化得到的一个激素样多肽 ,因具有调节胰岛素分泌的功能并且在 1 型糖尿病发病过程中起重要作用被命名为 Daintain(大炎肽)^[1,2]。1995 年 Utans U 等^[3]在研究心脏同种异体移植时 ,从大鼠慢性排斥反应的心脏移植物里克隆出一个新的巨噬细胞因子 ,命名为 AIF-1 (Allograft Inflammatory Factor-1 ,同种异体移植因子 1)。Daintain 和 AIF-1 属于同源基因编码的产物 ,两者之间序列的不同仅仅是源于物种的不同 ,因此本文中将此多肽称为 Daintain/AIF-1。Daintain/AIF-1 为 17kD ,定位

于胞浆 ,具有钙离子结合 EF 手型域的炎症支架蛋白。该多肽的基因定位组织相容复合体 II 区 (major histocompatibility complex class II, MHC II)^[4] ,MHC II 区包含了多种与免疫相关的蛋白^[5] ,如肿瘤坏死因子 ,热休克蛋白等 ,基因的定位表明 Daintain/AIF-1 具有调节免疫反应的功能。

Daintain/AIF-1 组成性的表达在单核巨噬细胞中 ,参与巨噬细胞的活化过程。研究发现 ,Daintain/AIF-1 在多种炎症病变过程中过表达 ,并参与到病理过程 ,如心脏移植排斥^[6] ,胶质瘤的发生发展^[7]以及自身免疫疾病^[2,8,9]等。由于 Daintain/AIF-1 生物学功能的重要性 ,研究该肽的转录调控具有重大意义。笔者所在研究小组发现 ,雌激素在体外剂量依赖性地上调 Dain-

* 基金项目 湖北省自然科学基金(2009CDB076) ,华中科技大学自主创新研究基金(2010MS009)

作者简介 颜冬菁(1984-) ,女 ,博士研究生 ,主要研究方向 :分子免疫学 ,E-mail: ydjhust@yahoo.com.cn

△通讯作者 陆婕 ,电话 / 传真 :027-87792027 ,E-mail: lujie.jane@163.com

(收稿日期 2010-11-18 接受日期 2010-12-13)

tain/AIF-1 的表达^[10],而已有研究表明调控 Daintain/AIF-1 本底表达与干扰素 γ 诱导表达的顺式作用元件位于该多肽基因转录起始位点上游 -902 bp 至 -789 bp 之间^[11]。为进一步研究该基因的转录调控及其生物学作用的前期工作,我们克隆了 Daintain/AIF-1 基因启动子区域 -1572 bp 至 +59 bp,并构建了荧光素酶报告基因重组子。

1 材料与方法

1.1 工具酶及主要试剂

质粒提取试剂盒、基因组提取试剂盒和 PCR 产物纯化回收试剂盒购自 Omega 公司。NcoI 和 Hind III 内切酶购自 TaKaRa 公司。pGL3-Basic 报告基因载体购自 Promega 公司。引物和 CloneEZ² 重组克隆试剂盒(货号: L00339)由南京金斯瑞生物科技有限公司提供。Blend 酶购自东洋纺生物科技有限公司。DNA 分子量 Marker 购自广州东盛生物科技有限公司。测序由北京奥科生物公司完成。胎牛血清购自杭州四季青公司,DMEM 培养液购自 Gibco 公司。DH5 α 大肠杆菌工程菌,RAW264.7 细胞株由本实验室保存。其他试剂均为进口或国产分析纯级试剂。

1.2 基因组提取

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 在含有 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液中培养,取处于对数生长期的细胞参照 Omega 公司基因组提取试剂盒说明提取基因组 DNA。

1.3 PCR 克隆

1.3.1 引物设计 在 NCBI 上查找到小鼠 Daintain/AIF-1 的基因信息 (Gene ID: 11629, Ensemble: ENSMUSG00000024397),从 Ensemble 中调出 Daintain/AIF-1 基因启动子区,标记转录起点为 0,克隆转录起点上游 -1572 bp 至起点后 +59 bp,全长 1631 bp,标记为 -1572_+59 bp。引物设计思路如下:和模板相匹配的部分有 20 bp,在引物 5' 端各添加与线性化 pGL3-Basic 相同的序列 15 bp(下划线标出),则两条引物均是 35 bp。其序列如下:引物 1 5'-TCTGCGATCTAAGTATTTCCACCAGGAAGT-GAGGT-3';引物 2 5'-AGTACCGGAATGCCAGTCTTAG-GCTGGCAGTCTGT-3'。下划线标出的 15 bp 序列是根据将载体线性化的酶切位点来确定的,本实验选择用 Hind III 内切酶将 pGL3-Basic 载体线性化,见图 1 所示。理论上 PCR 产物中 Daintain/AIF-1 启动子区有 1631 bp,加上与两条引物的 5' 端引入的与线性化载体两端一致的 15 bp,PCR 产物应该是 1661 bp。而 pGL3-Basic 载体线性化产生的粘性末端中间不配对的四个碱基将在同源重组过程中丢失,所以最后重组子的质粒大小应该是 4818+1631-4=6445 bp。

1.3.2 PCR 反应体系 总体系 30 μ l,基因组 0.5 μ g,引物各 0.5 μ M,Blend 酶 0.3 μ l,10 $\times$ buffer 3 μ l,dNTPs 200 μ M,去离子水 20 μ l。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min 变性后,94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 pGL3-Basic 载体线性化

用 Hind III 内切酶将 pGL3-Basic 载体酶切成线性质粒,选择 20 μ l 体系内含 2 μ g 质粒,在 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h。

1.5 pGL3-Basic-Daintain/AIF-1 (pGL3-Basic-DT)的构建

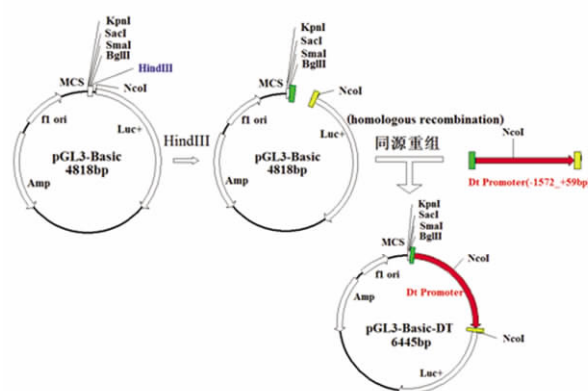


图 1 Daintain/AIF-1 荧光素酶报告基因(pGL3-Basic-DT)的构建 绿色部分序列为 5'-TCTGCGATCTAAGTA-3',黄色部分序列为 5'-AGTACCGGAATGCCA-3'

Fig. 1 Construction of luciferase report gene vector for Daintain/AIF-1 gene promoter: the sequence for the green section is: 5'-TCTGCGATCTAAGTA-3'; the the sequence for the yellow section is: 5'-AGTACCGGAATGCCA-3'

1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 克隆产物与线性化 pGL3-Basic 载体,在紫外灯下切出含有目的片段的凝胶,用胶回收纯化试剂盒回收并纯化目的基因片段。如图 1 所示,按照 CloneEZ 重组克隆试剂盒说明,20 μ l 体系中将回收后的 PCR 产物与线性化载体 1:1 混合后在 2 μ l 重组酶作用下,25 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后转化 DH5 α 感受态。16 h 后挑选单克隆震荡培养,收集菌体用 Tris 饱和酚氯仿平衡液提取核酸后电泳,初步分析重组子质粒大小,再进一步抽取质粒酶切鉴定,送酶切正确的菌液测序。

2 结果

2.1 RAW264.7 细胞基因组提取结果

图 2 是 1%琼脂糖凝胶电泳结果,泳道 1 箭头所指为小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 基因组,表明完整度较好,无拖尾条带。

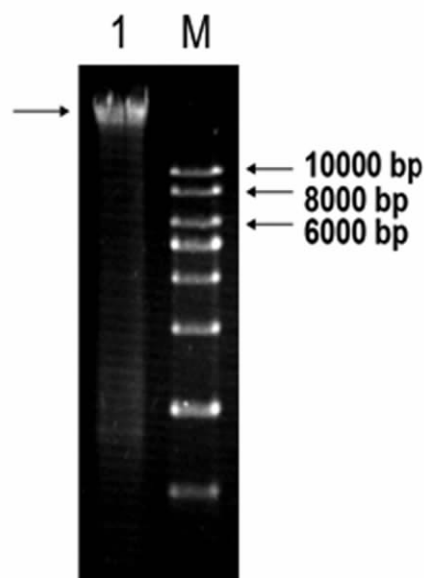


图 2 RAW264.7 细胞基因组电泳 M: DNA 分子量标准;1: RAW264.7 基因组

Fig. 2 Electrophoresis of DNA genome of RAW264.7 cells: M: DNA Marker; 1: DNA genome of RAW264.7 cells

2.2 PCR 产物与线性化 pGL3-Basic 载体的电泳

以提取的基因组为模板,按照前述反应条件进行 PCR 反应,产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳如图 3 所示,泳道 1 扩增条带位于 1500 bp-2000 bp 之间,与预期片段大小 1661 bp 一致。

pGL3-Basic 载体经 Hind^{III} 内切酶线性化后进行 1%琼脂糖凝胶电泳,图 3 泳道 2 显示条带位于 4000 bp-5000 bp 之间,与质粒大小 4818 bp 一致。

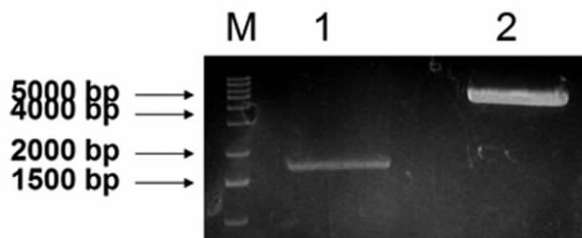


图 3 Daintain/AIF-1 基因启动子 PCR 产物与线性化 pGL3-Basic 载体的电泳结果 M: DNA 分子量标准; 1: PCR 产物; 2: 线性化 pGL3-Basic 载体

Fig.3 Result of PCR amplification of Daintain/AIF-1 gene promoter and linearization of the vector: M: DNA Marker; 1: PCR product; 2: the linearized pGL3-Basic vector

2.3 重组载体 pGL3-Basic-DT 的筛选

PCR 产物与线性化载体重组后转化 DH5 α 感受态,16 h 后长出了 21 个单克隆。全部挑取震荡培养,收集菌体用 Tris 饱和酚氯仿平衡液提取核酸进行 1%琼脂糖凝胶电泳。如图 4 所示,前沿是 RNA,最后面是基因组 DNA,中间部分是超螺旋的质粒。其中泳道 1 是阴性对照,即含有 pGL3-Basic 质粒的菌体,2-22 号泳道分别对应 21 个重组子。比 pGL3-Basic 大的质粒可能是重组了新片段的质粒,图 4 显示挑选的 21 个单克隆菌落里有三种不同大小的质粒,即泳道 3、5 和 13 对应的菌(箭头所示),其余的重组子则是含有与泳道 3 一样大小的质粒或者是无质粒的菌。所以我们挑选 3、5 和 13 号菌来提取质粒酶切鉴定。

2.4 重组载体 pGL3-Basic-DT 的酶切鉴定

如图 1 所示 pGL3-Basic 载体上有一个 Nco I 酶切位点,而 Daintain/AIF-1 启动子区域内也有一个 Nco I 酶切位点,所以 Nco I 单切重组载体 pGL3-Basic-DT 将产生两条带 989 bp 和 5456 bp。将 2.3 中初步筛选的 3、5 和 13 号菌提取质粒用 Nco I 酶单切,1%琼脂糖凝胶电泳结果如图 5 所示,只有 13 号菌的质粒酶切结果是与预期片段大小一致。

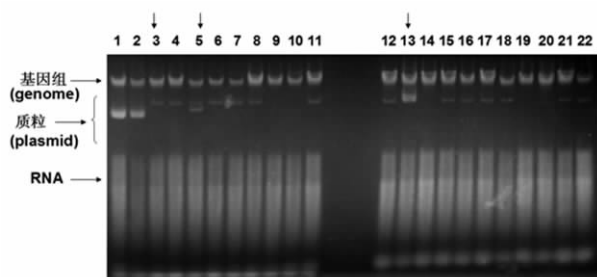


图 4 重组子 pGL3-Basic-DT 的筛选 1: 阴性对照,含 pGL3-Basic 质粒的菌体; 2-22: 重组子

Fig. 4 Screen of the recombinants for pGL3-Basic-DT 1: the negative clone that contains pGL3-Basic vector; 2-22: the recombinants

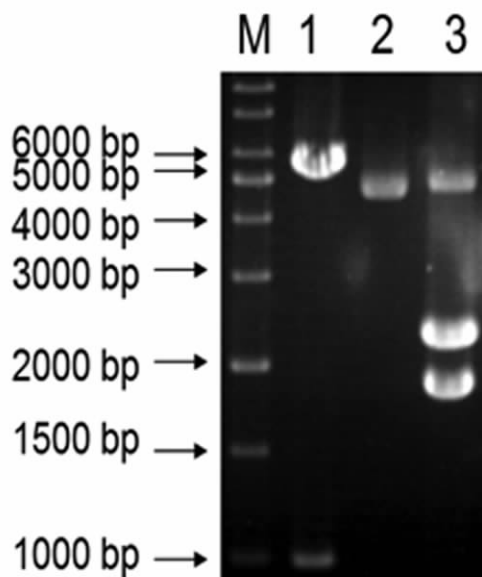


图 5 Nco I 酶切鉴定重组载体 pGL3-Basic-DT M: DNA 分子量标准; 1: 13 号菌; 2: 3 号菌; 3: 5 号菌

Fig. 5 Digestion of recombinants by Nco I: M: DNA Marker; 1: the 13rd clone; 2: the 3rd clone; 3: the 5th clone)

2.5 测序

将 13 号菌液送北京奥科公司测序,结果表明 pGL3-Basic 中插入片段为 1631 bp,所得碱基与 Ensemble 中小鼠 Daintain/AIF-1 基因 5' 端 -1572_+59bp 一致。

3 讨论

MHC 区是器官同种异体移植时比较供体与受体是否相容的重要参考对象,同时也是机体对自身免疫疾病易感性的一个内在因素^[5]。Daintain/AIF-1 基因定位于 MHC 区^[4],暗示该肽在器官移植与自身免疫疾病中发挥重要作用。Daintain/AIF-1 是一个结构非常保守的多肽^[12],从低等动物海绵到高等生物人类,其功能区 EF 手型域是相当保守的,说明该肽的功能非常重要。研究表明,在心脏同种异体移植后 Daintain/AIF-1 的表达量与移植排斥反应强度呈正相关,可以作为移植排斥的一个标记物^[6]。Chen ZW 等研究发现,型糖尿病模型鼠 BB 大鼠在发病前期发生胰腺炎时,胰岛中浸润的单核巨噬细胞大量表达 Daintain/AIF-1,同时发现不同浓度 Daintain/AIF-1 对大鼠血糖表现出不同调节作用,推测 Daintain/AIF-1 参与到型糖尿病的发生过程^[2]。此外,Daintain/AIF-1 参与类风湿关节炎病理过程,发现该肽在滑膜组织中浸润的单核细胞和滑膜成纤维细胞中过表达,且体外实验表明该肽能以剂量依赖性地诱导滑膜细胞增殖^[8]。病理研究发现 Daintain/AIF-1 在系统性硬化症病人的多种组织器官中过表达,如肺的血管及皮肤等,显示 Daintain/AIF-1 参与系统性硬化症病理过程^[9]。

因此,Daintain/AIF-1 是一个与多种疾病密切相关的炎症因子,研究其转录调控具有重要意义。目前已有研究报道,在巨噬细胞系 RAW264.7 中,反式作用因子 Pu.1 是细胞本底表达和干扰素 γ 诱导表达 Daintain/AIF-1 所必须的,Pu.1 通过结合 Daintain/AIF-1 基因启动子 -902 bp 至 -789 bp 之间的 Ets 区来

调节该多肽表达^[11]。本课题组研究发现雌激素对 Daintain/AIF-1 蛋白和 mRNA 具有正向调节作用^[10]。雌激素通过免疫系统各器官与组织上表达的雌激素受体起作用,对炎症具有双重调节作用:一方面雌激素具有抗炎作用,表现为同样受脓毒感染条件下,雌性比雄性更具有耐受力和较低的致死率;另一方面,雌激素具有促炎作用,表现为雌性比雄性具有更高的自身免疫疾病易感性^[13]。Daintain/AIF-1 是一个组成性表达在单核巨噬细胞的细胞因子,在病理条件下还被诱导过表达于效应组织。雌激素对 Daintain/AIF-1 具有调节作用也是雌激素调节免疫系统的反映。通过对 Daintain/AIF-1 启动子区域的顺式作用元件分析,发现在转录起点上游 1500 bp 内存在多种雌激素受体结合的元件,如 AP-1 和 Sp1 等^[14]。本实验成功构建 Daintain/AIF-1 启动子 -1572 bp 至 +59 bp 的荧光素酶报告基因载体,为进一步研究雌激素对 Daintain/AIF-1 的转录调控奠定基础。Sibinga NE 等^[11]将 Daintain/AIF-1 基因 5' 端不同长度的启动子区构建到 pGL3-Basic 载体上研究干扰素 γ 诱导 Daintain/AIF-1 表达的机制:4082 bp 至 +75 bp, -1876 bp 至 +76 bp, -1286 bp 至 +75 bp 和 -569 bp 至 +75 bp。本实验构建 Daintain/AIF-1 启动子 -1572 bp 至 +59 bp 的报告基因载体,是基于采用生物信息方法预测雌激素受体可能作用于该启动子顺式作用元件的位置。相比 Sibinga NE 等^[11]将 PCR 产物酶切连接通用载体的传统克隆方法,本实验所选用的同源重组克隆方法方便快捷,只需要在引物设计时在引物 5' 端特异性引入与线性化后载体两端一样的 15 bp 序列(具体见图 1),无需酶切连接就可以直接将 PCR 产物定向克隆入目的载体。由于插入片段 1.6 kb 比较大,在筛选转化重组子时,本研究选择用酚氯仿抽提核酸的方法,通过比较闭环质粒的大小来初步确定可能正确的重组子,随后再进一步酶切鉴定,这样对比直接将所有重组菌落抽质粒酶切鉴定要大大减少工作量。

pGL3-Basic 是一个研究启动子活性的常用载体,通过检测质粒表达的荧光素酶蛋白的酶活来检测启动子的活性。由于荧光素酶敏感性高和操作简单而广泛使用。Daintain/AIF-1 基因启动子克隆及其荧光素酶报告基因载体的成功构建为该多肽的转录调控提供了实验基础。

参考文献(References)

- [1] Chen ZW, Ostenson CG, Bergman T, et al. Purification and characterization of a novel porcine gut regulatory peptide, daintain, with effects on insulin release [J]. *Eur J Endocrinol* (abstr), 1994, 130(Suppl 2):32
- [2] Chen ZW, Ahren B, Ostenson CG, et al. Identification, isolation, and characterization of daintain (allograft inflammatory factor 1), a macrophage polypeptide with effects on insulin secretion and abundantly present in the pancreas of prediabetic BB rats [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(25):13879-13884
- [3] Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, et al. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in Rat Cardiac Allografts with Chronic Rejection [J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(6):2954-2962
- [4] Neville MJ, Campbell RD. A new member of the Ig superfamily and a V-ATPase α subunit are among the predicted products of novel genes close to the TNF locus in the human MHC [J]. *J Immunol*, 1999, 162: 4745-4754
- [5] Gruen JR, Weissman SM. Evolving view of the major histocompatibility complex [J]. *Blood*, 1997, 90(11):4252-4265
- [6] Autieri MV, Kelemen S, Thomas BA, et al. Allograft inflammatory factor-1 expression correlates with cardiac rejection and development of cardiac allograft vasculopathy [J]. *Circulation*, 2002, 106 (17): 2218-2223
- [7] Deininger MH, Seid K, Engel S, et al. Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas [J]. *Acta Neuropathol*, 2000, 100(6):673-680
- [8] Kimura M, Kawahito Y, Obayashi H, et al. A critical role for allograft inflammatory factor-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol*, 2007, 178(5):3316-3322
- [9] Galdo FD, Maul GG, Jimenez SA, et al. Expression of allograft inflammatory factor 1 in tissues from patients with systemic sclerosis and in vitro differential expression of its isoforms in response to transforming growth factor β [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(8): 2616-2625
- [10] Yan DJ, Chen ZW. 17β -Estradiol Increased the Expression of Daintain/AIF-1 in RAW264.7 Macrophages [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(10): 2103-2105
- [11] Sibinga NE, Feinberg MW, Yang H, et al. Macrophage-restricted and interferon gamma-inducible expression of the allograft inflammatory factor-1 gene requires Pu.1 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (18): 16202-16210
- [12] Watano K, Iwabuchi K, Fujii S, et al. Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line [J]. *Immunology*, 2001, 104: 307-316
- [13] Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation [J]. *Endocrine Reviews*, 2007, 28(5):521-574
- [14] Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription [J]. *Current Genomics*, 2006, 7 (8): 497-508