

CD2 相关蛋白剪接异构体启动子区及其缺失体的构建和活性分析

李楠楠,王璐璐,张慧文,金蕊,周国平*

(南京医科大学第一附属医院儿科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:构建 CD2 相关蛋白(CD2-associated protein,CD2AP)剪接异构体启动子区及其缺失体,转染 HEK293 及 HeLa 细胞,评价其启动子活性。方法:取稳定生长的 HeLa 细胞,常规方法提取总 RNA,逆转录为 cDNA 并以此为模板,PCR 扩增 CD2AP 剪接异构体之一 CD2AP002 转录起始位点上游 2 200 bp 的启动子区域片段,亚克隆这些片段至 pGL3 基本载体上的多个克隆位点,构建含 CD2AP002 启动子的重组质粒。CD2AP002 质粒构建成功后,以此质粒为模板重复上述步骤构建一系列 CD2AP002 启动子 5'侧翼区缺失体。重组质粒及其缺失体转染人胚肾 HEK293 细胞及人宫颈癌 HeLa 细胞,双荧光素酶报告基因检测各片段的活性。结果:酶切、核酸序列分析证实,成功构建含 CD2AP002 启动子的重组质粒及其缺失体。经双荧光素酶活性检测证实不同片段大小的 5'侧翼区序列缺失体均具有与片段长度相应的活性。结论:成功构建出在 HEK293 及 HeLa 细胞中具有活性的重组质粒及其缺失体。

[关键词] CD2 相关蛋白;启动子;剪接异构体

[中图分类号] Q813

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-933-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160807

Construction of plasmid containing promoter of splicing isoform of CD2-associated protein and its deletants and an analysis of their promoter activities

Li Nannan, Wang Lulu, Zhang Huiwen, Jin Rui, Zhou Guoping*

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a luciferase reporter plasmid containing the splicing isoform of CD2-associated protein(CD2AP) human gene promoter and its deletants and to evaluate promoter activity in human embryonic kidney(HEK)-293 cells and HeLa cells. **Methods:** Extract total RNA from stable HeLa cells and make it to be cDNA by RT-PCR. The 2 200 bp fragment of CD2AP002(one of the spliceosome of CD2AP)was amplified by PCR with cDNA as a template and was directionally cloned into pGL3-Basic multiple cloning sites to construct a new luciferase reporter plasmid. We repeat the above steps to build a series of 5' deletion promoter plasmids. Transfection of HEK 293 cells and HeLa cells with these new plasmids was performed to induce the relative luciferase activity. **Results:** DNA sequencing and restriction endonuclease analysis verified the successful construction of the plasmid containing CD2AP002 human gene promoter and its deletants. **Conclusion:** The plasmid pGL3-CD2AP002 promoter and its deletants are successfully constructed and have some promoter activities in HEK293 cells and HeLa cells.

[Key words] CD2-associated protein; promoter; splicing isoform

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 933-936, 941]

肾足细胞足突间的裂隙是肾小球滤过屏障的最重要组成部分^[1],近年来与此裂隙相关的蛋白质分子逐渐被阐明^[2],如 podocin、nepherin 和 CD2 相

关蛋白(CD2AP)。其中 CD2AP 也称 CMS(cas ligand with multiple SH3 domains),是 1998 年由 Kisreh 等^[3]首次发现的,是与肾病综合征蛋白尿发生相关的重要分子。可变剪接又称选择性剪接,是指将同一种前体 mRNA 剪接形成多种不同的成熟 mRNA 剪接异构体,最终产生结构、功能均不相同的蛋白质的一系列过程。至少 74%的人类多外显子基因被可变剪接,近 50%的遗传性疾病是由引起异常的变异所

[基金项目] 国家自然科学基金(81170661,81300023);江苏省自然科学基金(BK20131020);南京市科技发展基金(201503003)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:guozhou@126.com

致,研究表明,剪接异常与动脉粥样硬化、地中海贫血、家族性自主神经失调症、神经退化性疾病等人类疾病的发生相关^[4-8]。因此研究选择性剪接的各种功能和机制,对于临床工作中指导有关疾病的诊断和治疗具有积极作用。本研究构建了 CD2AP 剪接异构体启动子区多个片段重组质粒,为全面了解 CD2AP 转录调控机制提供了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK293 细胞、HeLa 细胞、pGL-3 基本载体 (pGL3-Basic)、pGL3-Control 及宿主菌 *E.coli* DH5 α 均为本院国家生殖医学中心实验室保存。DMEM 培养基 (Hyclone 公司,美国);胎牛血清 (杭州四季青生物技术有限公司);限制性内切酶 *Kpn* I、*Bgl* II、T4 DNA 连接酶 (Thermo 公司,美国);DNA Marker 以及高保真酶 PrimeSTAR 系列 (PrimeSTAR GXL DNA Polymerase) (TaKaRa 公司,日本);小量胶回收

试剂盒,小量质粒抽提试剂盒 (Omega 公司,美国);质粒转染试剂 Lipofectamine3000 (Invitrogen 公司,美国);双荧光素酶报告基因分析试剂盒 (Promega 公司,美国);发光光度计 (Turner Biosystems 公司,美国);其他试剂如氯仿、酒精、异丙醇等均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HEK293 及 HeLa 细胞养于含 10% 的胎牛血清 (FBS) 和双抗 (分别为 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素) 的 DMEM 中,培养箱设置为 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ 。

1.2.2 重组报告质粒的构建与鉴定

PCR 引物的设计:据 GenBank 中 CD2AP002 的转录起始位点上游 2 200 bp,用 Primer5.0 设计引物,上下游引物分别引入限制性内切酶 *Kpn* I、*Bgl* II 酶切位点,下游引物为 5'-GGAAGATCTTCTT-TACCATTAAGTTCGCCCTC-3',上游引物详见表 1,引物由上海英俊公司合成。

表 1 CD2AP002 启动子 5'侧翼区缺失截短片段引物
Table 1 Primers of promoter 5' flanking region deletants

质粒	上游引物序列(5'→3')
pGL-2200/+38(P1)	CGGGGTACCTCTAAGTCCTGAAAACTTGGCAGC
pGL-1377/+38(P2)	CGGGGTACCATCTGTCTCATCTCACATAGTTACCTT
pGL-1057/+38(P3)	CGGGGTACCGACTACTACAGTTGCATCCCATTGC
pGL-791/+38(P4)	CGGGGTACCAAATTCATATTCTCCCTCTCCACCT
pGL-437/+38(P5)	CGGGGTACCCTCATTTFATCTTTCTCTTTTTTTC
pGL-170/+38(P6)	CGGGGTACCCACTTGGGAGGCTGAGTTGGGAGA
pGL-100/+38(P7)	CGGGGTACCCTGCACTTCAGCCTGGCCAACAGA
pGL-46/+38(P8)	CGGGGTACCGGTCTATTGTCTTAATTATCTA

PCR 扩增:采用 50 μ L 反应体系,含 5 \times Prime STAR GXL Buffer 10 μ L, 2.5 mmol/L dNTP Mixture 4 μ L,上下游引物各 10 pmol/L,模板 DNA 1 μ L(以常规方法提取 HeLa 细胞总 RNA,逆转录为 cDNA 并以此为模板),PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 1 μ L,灭菌蒸馏水补足至 50 μ L。CD2AP002 启动子 PCR 条件:98 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,68 $^{\circ}$ C 1 min/kb,进行 30 个循环。

质粒构建与鉴定:① 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,小剂量胶回收试剂盒回收。② 限制性内切酶 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切并纯化 pGL3-Basic 载体,双酶切体系:*Kpn* I、*Bgl* II 各 1 μ L,pGL3-Basic 载体 2 μ L,10 \times FastDigest 2 μ L,灭菌蒸馏水补足至 20 μ L;目的片段双酶切体系:*Kpn* I、*Bgl* II 各 1 μ L,目的片段 10 μ L,10 \times FastDigest 3 μ L,灭菌蒸馏水补足至 30 μ L。

上述两体系在 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 后纯化。③ 连接:酶切纯化后的目的片段与经过相同酶切纯化处理的载体 pGL3-Basic 经 T4 DNA 连接酶于 22 $^{\circ}$ C 连接 1 h,反应体系:酶切纯化后的 pGL3-Basic 载体 2 μ L,目的片段 6 μ L,10 \times T4 DNA Ligation Buffer 2 μ L,T4 DNA Ligase 1 μ L,灭菌蒸馏水补足至 20 μ L。④ 转化及鉴定:根据说明书将连接产物转化至大肠杆菌 *E.coli* DH5 α ,期间配制 LB 液体培养基,一部分高温高压灭菌,冷却至室温置 4 $^{\circ}$ C 保存备用;另一部分加入琼脂后高温高压灭菌,冷却至 60 $^{\circ}$ C 左右,加入氨苄青霉素均匀混合,倒入灭菌处理的培养皿,待凝固略干燥后 4 $^{\circ}$ C 保存备用。收集转化后菌液,取新鲜 LB 液体培养基重悬,37 $^{\circ}$ C 摇床 50 min,加到含氨苄青霉素的 LB 固体培养板,铺板,37 $^{\circ}$ C 培养箱倒置过夜。第 2 天挑出单个菌落于新鲜 LB 液体培养基(加

氨苄青霉素)37℃摇床 3 h,对菌液进行 PCR(体系同前,量可减半)、琼脂糖凝胶电泳,出现阳性条带的由上海英俊公司测定序列鉴定。

1.2.3 CD2AP002 启动子 5'侧翼区缺失体的构建

PCR 扩增时以 CD2AP002 启动子为模板,上游引物见表 1,共用下游引物及其他方法同上。

1.2.4 瞬时转染

将生长状况良好的 HEK293 以及 HeLa 细胞分别按 17 000 个/孔或 13 000 个/孔接种于 96 孔培养板中,待细胞长至 70%~90%融合时按 Lipofectamine 3000 使用说明,将所有重建新质粒、pGL3-Basic(阴参)、pGL3-Control(阳参)各 100 ng,pRL-TK 质粒 4 ng(内参)和 0.5 μL Lipofectamine3000 转染 HEK293 以及 HeLa 细胞,每种质粒于每种细胞做 3 次独立实验,每次 3 个复孔。转染后置于 37℃,5%CO₂ 的培养箱孕育 24 h 后收集细胞,进行荧光素酶活性检测。

1.2.5 双荧光素酶活性检测

弃去 96 孔培养板中的培养液,PBS 清洗 1~2 遍,加入 30 μL 细胞裂解液,室温下小震荡机震荡 30 min 后将细胞裂解液移入 1.5 mL E_p 管,4℃、12 000 g 离心 3 min,取 20 μL 上清液,按试剂盒使用说明书,用发光光度计检测新构建质粒的荧光素酶活性。

2 结果

2.1 CD2AP002 启动子的 PCR 扩增

PCR 扩增启动子,1%琼脂糖凝胶电泳显示有特异性条带出现,大小为 2 238 bp,与预测目的基因大小相符(图 1)。

2.2 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒经 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切,可见到线性载体片段(4 818 bp)和大小为 2 238 bp 的启动子片

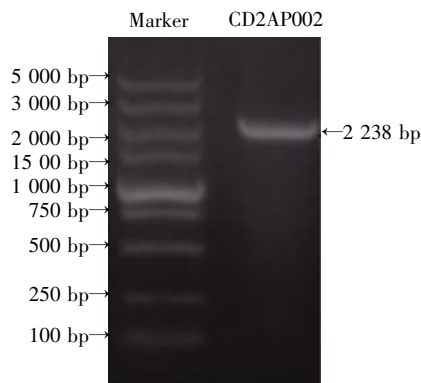
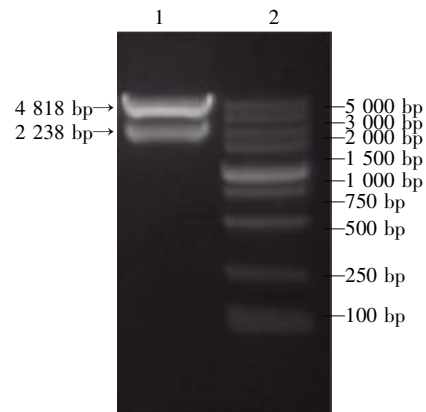


图 1 DNA5000 Marker 及 CD2AP002 的 PCR 扩增产物
Figure 1 PCR amplification product of DNA5000 Marker and CD2AP002

段,测序证实启动子序列正确(图 2)。



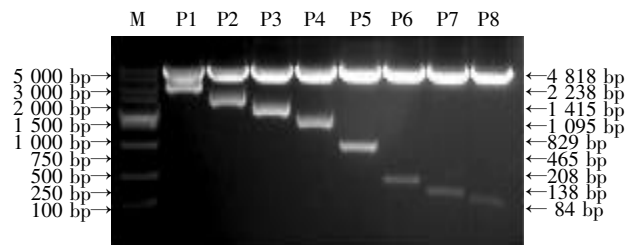
1:含 CD2AP002 重组质粒的双酶切产物; 2:DNA5000 Marker。

图 2 重组质粒的酶切产物

Figure 2 Enzyme-digested product of recombination plasmid

2.3 CD2AP002 启动子 5'侧翼区缺失体的酶切鉴定

缺失体经 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切,可见到线性载体片段和大小分别为 1 415、1 095、829、475、208、138、84 bp 的启动子片段(图 3),测序证实启动子序列正确。



M:DNA5000 Marker;P1:pGL-2200/+38;P2:pGL-1377/+38;P3:pGL-1057/+38;P4:pGL-791/+38;P5:pGL-437/+38;P6:pGL-170/+38;P7:pGL-100/+38;P8:pGL-46/+38。

图 3 重组截短质粒酶切产物

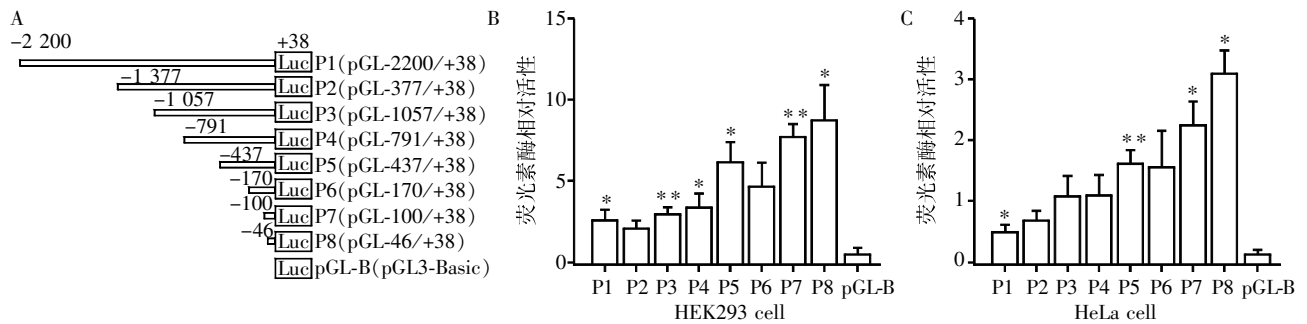
Figure 3 Enzyme-digested product of recombination plasmid

2.4 双荧光素酶活性检测

与 pGL3-Basic 质粒转染组相比,各重组质粒转染组荧光素酶活性均增高,具体如图 4。

3 讨论

人类的 CD2AP 是由人 CD2AP 的基因编码,位于染色体 6p12,编码区有 1 920 bp^[9],18 个外显子,由 639 个氨基酸组成,分子量为 80 kDa 左右的蛋白。美国华盛顿大学 Shaw 课题组在《Science》报道,CD2AP 敲除(CD2AP^{-/-})的小鼠出现蛋白尿和类似人局灶节段性肾小球硬化的病理改变,死于肾衰竭^[10]。



A: 不同片段大小的 5'侧翼区序列缺失体克隆至 pGL3-Basic 荧光素酶报告基因质粒, 数字代表相对于转录起始位点的位置; B、C: CD2AP002 基因启动子报告基因质粒转入 HEK293、HeLa 细胞 24 h 后的荧光素酶活性, 与 pGL3-Basic 质粒相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 CD2AP002 启动子重组报告质粒在不同细胞系中的启动子活性

Figure 4 The relative luciferase activity of plasmid pGL3-CD2AP002 promoter and its deletant

2003 年该课题组再次在该杂志发表另一研究报告, CD2AP^{+/-}小鼠的细胞内降解相关的信号通路有缺陷, 对肾毒性抗体承受力下降, 出现持续而严重的蛋白尿甚至动物死亡^[11]。赵非等^[12]发现, CD2AP 是判断肾小球足细胞损伤的一个早期重要指标。此外, 研究已证实, CD2AP 可经各方面的转录调控, 广泛参与多种信号转导通路, 如表皮生长因子 (EGF)/EGFR、PI3/Akt 信号、TGF- β /p38 MAPK 等。同时还参与调节骨架重构、胞质分裂、细胞凋亡、内吞作用、细胞存活和足细胞的黏附和伸展等作用。可见, CD2AP 在肾脏疾病的发生发展中起着重要的作用。

基因的转录受到启动子的精确调控, 要明确基因的转录调控机制, 启动子的活性分析是前提。最近, 有报道初步分析了人 CD2AP 启动子在 HEK293 细胞中的功能特点及有关转录因子调节 CD2AP 启动子的研究如 Sp1/SP3^[13]、E2F1^[14]等, 而有关其剪接异构体的探讨尚未见到。

1977 年, Gilbert^[15]在研究 Adenovirus hexon 基因时发现及提出可变剪接 (alternative splicing, AS) 概念。1980 年, 第一个可变剪接体被 Baltimore 发现。在所有真核细胞中, 基因表达分 3 步, 分别由 RNA 聚合酶、剪接体和核糖体执行。第二步剪接即由多个内含子和外显子间隔形成的前体信使 RNA 通过剪接体的作用去除内含子、连接外显子, 转变为成熟的信使 RNA。有研究报道第一次在近原子分辨率看到剪接体的细节并阐述剪接反应进行的分子机制^[16-17]。人类许多疾病均由基因的剪接差错导致。故研究 CD2AP 启动子剪接异构体对全面了解其转录机制、阐明有关疾病的发病机制并作相应诊断和治疗有极重要的意义。

本研究克隆了 CD2AP002 的转录起始位点上游 2 200 bp 启动子序列及其缺失体, 并通过体外报告基因转染实验, 证明该启动子及其缺失体在 HEK293 及 HeLa 细胞中是有一定活性的。对 CD2AP002 启动子区功能分析表明其启动子含有多个潜在转录因子结合序列 GATA3、CREB 和 Sp1 等。CREB 作为细胞内的第三信使, 定位于胞核内, 以二聚体形式与真核基因启动子区“TGACGTAG”模序结合, 激活相关基因的转录, 参与包括细胞周期调控、信号转导、物质代谢、神经发育等多种生命活动过程和退行性疾病的发生。Sp1 是最早被发现的转录因子之一, 是众多基因的基本转录因子, 参与多种基因的转录调控及大部分的细胞生命过程, 如细胞增殖、分化、凋亡和肿瘤形成等^[18]。

总之, 本研究成功构建了 CD2AP002 启动子区的报告质粒及其缺失体, 预测了启动子区域含有的多个潜在推测转录因子结合序列。研究十分浅显, 接下来有大量相关内容需要进一步研究, 但本研究为以后全面研究 CD2AP 的转录调控奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Tryggvason K, Wartiovaara J. How does the kidney filter plasma? [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2005, 20: 96-101
- [2] Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(13): 1387-1401
- [3] Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P, et al. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays [J]. *Science*, 2003, 302(5653): 2141-2144
- [4] Radmilovic M, Zukic B, Stankovic B, et al. Thalassemia syndromes in Serbia; an update [J]. *Hemoglobin*, 2010, 34 (下转第 941 页)