

· 基础研究 ·

人 EFTUD2 启动子的鉴定及初步分析

徐瑞瑞¹, 李毓雯², 胡平平¹, 田安然¹, 李 军¹, 朱传龙^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院感染病科, ²儿科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 鉴定并分析 EFTUD2 (elongation factor Tu GTP-binding domain-containing 2) 基因的启动子区域。方法: 应用生物信息技术对 EFTUD2 基因结构及潜在启动子区域进行分析, 预测 4 个 EFTUD2 启动子序列。使用全基因合成技术以及高保真 PCR 扩增得到目的启动子序列, 通过 *Bgl* II 和 *Nhe* I 双酶切, 将目的条带克隆到双荧光素酶报告基因载体 psiCHECK-2 中, 得到 4 个长度不同并覆盖 EFTUD2 基因转录起始位点附近约 2 kb 的 EFTUD2 基因启动子双荧光素酶报告基因重组体。荧光素酶分析检测启动子活性。结果: 经酶切、测序鉴定, 成功构建了人 EFTUD2 启动子荧光素酶报告基因重组质粒。通过荧光素酶活性检测, 重组体 EFTUD2-0.5 的相对荧光素酶活性增加 ($P < 0.05$), 提示 EFTUD2 基因核心启动子序列位于转录起始位点附近约 500 bp 的区域内。结论: EFTUD2 基因转录起始位点上游 500 bp 具有启动子活性, 初步判定其核心启动子位于该区域。

[关键词] EFTUD2; 剪接体; 启动子

[中图分类号] Q527

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)04-489-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20200406

Structural and functional analysis of the human EFTUD2 promoter

XU Ruirui¹, LI Yuwen², HU Pingping¹, TIAN Anran¹, LI Jun¹, ZHU Chuanlong^{1*}

¹Department of Infectious Disease, ²Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To identify and analyze the elongation factor Tu GTP-binding domain-containing 2 (EFTUD2) promoter region for the further study of the gene in transcriptional control and expression. **Methods:** The EFTUD2 gene structure and potential promoter regions were analyzed by bioinformatics methods, and based on which four EFTUD2 promoter sequences were predicted. Whole-genome synthesis technology and high-fidelity PCR amplification were used to obtain the target promoter sequence. The target band was cloned into the dual luciferase reporter vector psiCHECK-2 by *Bgl* II and *Nhe* I double digestion, and four different EFTUD2 gene promoter luciferase reporter recombinants covering about 2 kb upstream of the EFTUD2 gene transcription initiation site were obtained. Luciferase assay was used to detect promoter activity. **Results:** Luciferase reporter assays demonstrated that, compared with the control group, the relative luciferase activity of the EFTUD2-0.5 recombinant increased ($P < 0.05$), suggesting that the EFTUD2 core promoter may be located in a region of 500 bp near the transcription initiation site. **Conclusion:** It was identified that the 500 bp upstream of the EFTUD2 gene transcription initiation site has promoter activity, and it is speculated that its core promoter is located in this region.

[Key words] EFTUD2; spliceosome; promoter

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(04): 489-495]

EFTUD2 (elongation factor Tu GTP-binding do-

main-containing 2) 基因编码 GTP 酶。GTP 酶是 U5 小核核糖核蛋白 (small nuclear ribonucleoprotein, snRNP) 即剪接体复合物的一个组成部分, 与剪接体的其余部分一起发挥作用, 可剪接前体 mRNA (precursor messenger RNA, pre-mRNA) 以产生成熟 mRNA。

[基金项目] 国家自然科学基金 (81770591, 81800778); 江苏省医学重点人才 (ZDRCA2016007)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhucl@njmu.edu.cn

在剪接过程中,EFTUD2既可以直接参与剪接加工也可以参与剪接体 snRNP 的再循环过程。EFTUD2 作为 GTP 水解酶的一种,作用类似于剪接体易位酶,既能介导 RNA 或蛋白质的构象变化,促进 U1 与前 RNA 的 5' 剪接位点碱基配对,又能促进 U4 与 U6 碱基配对的分离,从而构成 5' 剪接位点、U6 及 U2 催化核心结构,而这一结构能避免剪接复合体过早活化。因此,EFTUD2 是成熟剪接体组装生物过程中不可缺少的成分。

目前,关于 EFTUD2 基因突变体的研究已有相当多的报道。已经发现 Treacher-Collins 综合征、Nager 综合征、CHARGE 综合征或 Feingold 综合征患者存在 EFTUD2 突变^[1-4],并有研究表明 EFTUD2 基因突变可导致 MFDGA 型(mandibulofacial dysostosis Guion-Almeida, OMIM 610536)畸形^[3-5],而某些基因突变导致的表型差异都证实了有剪接体的参与。另有研究证实宿主基因转录后调控即前体 mRNA 剪接所导致的固有免疫相关蛋白差异性表达,在机体抵抗外来病毒感染入侵时起到了至关重要的作用^[6-7]。因此,有理由认为 EFTUD2 基因在遗传畸形以及调节固有免疫方面扮演着重要角色。值得注意的是,现有的研究鲜有涉及该基因自身的表达和调节机制。基于以上事实,研究并阐明 EFTUD2 基因的表达调控机制具有重要的生物学意义。本研究拟对其启动子区域进行了预测、克隆、鉴定和初步分析,以期为进一步深入研究其调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞 HepG2 为本实验室保存,常规培养使用含 10% 胎牛血清(Gibco 公司,美国)的 DMEM 培养基(Gibco 公司,美国),培养基添加了 1.5 mmol/L 谷氨酰胺,100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素(Sigma 公司,美国),于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。10 cm 培养皿、96 孔板(Corning 公司,美国),PBS(Amersco 公司,美国),Trypsin-EDTA Solution (0.25% Trypsin+0.53 mmol/L EDTA, Hyclone 公司,美国),GP-transfect-Mate 转染试剂、质粒 pUC57、psi-CHECK-2(Genepharma 公司,美国),DNA 内切酶、DNA 连接酶、DNA marker(Fermentas 公司,美国),琼脂糖、DNA 凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司),中量抽提试剂盒(杭州爱思进生物技术有限公司),酵母提取物、胰蛋白胨(OXOID 公司,美国),卡那霉素(Sigma 公司,美国),氨基青霉素(Sig-

ma 公司,美国),无乙水醇、异丙醇、丙三醇、氯化钠、无水氯化钙、氢氧化钠(北京国药集团化学试剂有限公司),ClonExpress® Entry One Step Cloning Kit (南京诺唯赞生物科技公司),引物由上海吉玛制药技术有限公司合成,Dual-Luciferase 报告基因检测系统试剂盒(Promega 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

从 UCSC 数据库获取 EFTUD2 的 cDNA 和基因组序列,用在线 BLAST 程序进行序列比对,得出 EFTUD2 基因外显子和内含子的组成。通过 EPD 真核启动子数据库在线软件预测目的基因启动子区域,利用 Sequence Retrieval Tool 得到 EFTUD2 启动子序列,并分别选取 0.5、1.0、1.5、2.0 kb 序列片段(EFTUD2 pro-0.5 kb、EFTUD2 pro-1.0 kb、EFTUD2 pro-1.5 kb、EFTUD2 pro-2.0 kb)。

1.2.2 引物的设计与合成

根据生物信息学分析得到的 EFTUD2 pro-2.0 kb 启动子序列,设计覆盖目的基因全长的寡核苷酸引物,并根据预测的 EFTUD2 pro-0.5 kb、EFTUD2 pro-1.0 kb、EFTUD2 pro-1.5 kb 启动子序列分别设计 3 对扩增引物(引物序列见表 1)。目的基因上下游引物分别加有 psiCHECK-2 载体上 *Bgl* II 和 *Nhe* I 限制性酶切位点两侧同源序列,用于载体亚克隆。引物序列由上海吉玛公司设计和合成。

1.2.3 全基因合成与 PCR 扩增获取目的序列

采用多重 PCR 合成目的序列 EFTUD2 pro-2.0 kb,并以 EFTUD2 pro-2.0 kb 序列为模板,PCR 扩增目的序列 EFTUD2 pro-0.5 kb、EFTUD2 pro-1.0 kb、EFTUD2 pro-1.5 kb。全基因合成 PCR 反应:第 1 轮 PCR 反应体系:oligo mix (E2.0-1~E2.0-24) 6 μL,10×Pfu Buffer (+Mg²⁺) 5 μL,dNTP、上下游引物 E2.0-1 和 E2.0-24 各 1 μL,ddH₂O 36 μL,Pfu DNA polymerase 0.3 μL。循环条件:95 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 30 次后 72 °C 延伸 5 min。第 2 轮 PCR 反应体系:第 1 轮 PCR 反应产物 1 μL,10×Pfu Buffer (+Mg²⁺) 5 μL,dNTP、上下游引物 E2.0-1 和 E2.0-24 各 1 μL,ddH₂O 41 μL,Pfu DNA polymerase 0.3 μL。循环条件同第 1 轮 PCR。第 1 轮 PCR 可得到混有目的基因条带的非单一条带 PCR 混合产物,再以第 1 轮的 PCR 产物为模板,通过第 2 轮 PCR 获得单一的目的基因条带 E2.0-A。同样,以 oligo mix (E2.0-23~E2.0-46) 为合成模板,以 E2.0-23 和 E2.0-46 为上下游引物,经相同的 2 轮 PCR 反应得到

表1 EFTUD2启动子报告基因的引物序列

Table 1 The primer sequences to construct the EFTUD2 promoter reporter

引物名称	引物序列(5'→3')
E2.0-1	<u>CTCACATGGCTCGACAGATCTCCTCACCTACCGGGGAGATTT</u>
E2.0-2	AACTGTCACACTATTCAGGGAAGGACCTTCCAGGATGTGGCCACTGAAATCTCCCGGTAGGTGA
E2.0-3	TTCCCTGAATAGTGTGACAGTTCCAGGGCAGATTCCTTTCTCCCATCTTATCCTTCCGCTCC
E2.0-4	CTTTGCCTACAGGGGTATTGTCCTTTCATCACATCTGAAGCCACTGGAGCGGAAGGATAAGATGG
E2.0-5	ACAATACCCCTGTAGGCAAAGGACAGAAATTAGGCAATGGACTTAATGCTGTGTCTGTGGGTGTG
E2.0-6	TTGGTCCGTAACAGGTTTATCCTATACCATGCAAAGTCTAGCTGCCTCACACCCACAGACACAGC
E2.0-7	GGATAAACCTGTTACGGACCAATATGACCATAATAATAACAACAGCGATAGCTGACTGCTTTCAA
E2.0-8	TTCTTGACATAAGACTGAGCAAGTGTCTGACACATGTGAGGTGCTTGAAGCAGTCAGCTATCG
E2.0-9	TGCTCAGTCTTATGTGCAAGAACTCATTTAATTATAACAGTTACTGTTCTACAGATAAATAATTG
E2.0-10	TTGATCTTATGCAATTTCTTAACTTCTCTGAGTCTCAATTAATTTATCTGTAGAACAGTAACTGT
E2.0-11	GAAGTTAAGGAAATTGCATAAGATCAAACAGTAGACCGTGGGGCCAGGACTGAAGCCCAGAATGG
E2.0-12	GGCCCTCCTGTTATGTTGATTATAGTAGTTAACTCTGAAATCAAACCATTCTGGGCTTCAGTCC
E2.0-13	CACCATAACAGGAGGGCCTGAGAAAAATGGCAGTGAGCCAACCTGAACCTCATAGGAGCCAC
E2.0-14	ACAAAACGGGAGAATGCTGCCAAGTTACGGGACGTGGAACAGAGGGTGGCTTCTATGAGGATTC
E2.0-15	GCAGCATTCTCCCGTTTGTACTTCTCATCAGCAGTGCAGCTGCAGCCTTTTCTCCAAAGC
E2.0-16	TCCCAGGCACAGGCCATGGAAGGAAATGACATCATCAACTTCAAGGCTTTGGAGAAAGAGCTGCA
E2.0-17	GGCCTGTGCCTGGGAAGGCAAAGGAAATACATGTCTAGTGGACAGTCAATATCAGGGGAAAGAGGG
E2.0-18	GTGCTTTGGGGTCATTTTGTGTTCTGTTGTAATAATTCAGAGGTACCCTCTTTCCCTGATATTGA
E2.0-19	CACAAAATGACCCCAAAGCACTCTGGACATCATGTCACTCAGATTGGGAGGTGTTACAAAAATCT
E2.0-20	CTCACTGTGAAATTCAACTTGTCTTTGTAATAATAGAAAACCAGATTTTGTAAACACCTCCCAATC
E2.0-21	AGACAAGTTGAATTTACAGTGAAGACTTACACAAGACTTGTCCCTGAAAATAGAATACAGAGTC
E2.0-22	AAAGAGCAAAATTAAGACAGAACTCCAAATGAAAAGTCAGGACTCTGTATTCTATTTTCAGGGAC
E2.0-23	GAGTTCTGTCTTAATTTTGTCTTTGCTCTTAAATAATTTTAAATTTTGGTGTTCAGTCCGAGG
E2.0-24	CTATGGGGGAAGAGTGAAGAACTGAATTCTGAGATCCCAATGCCTCCTCGACTGAAGCACAAA
E2.0-25	TTTCTTACTCTTCCCCATAGGATTGTTCTACAGCAAGTCGTTTCGACAGGGGACCTCACACAA
E2.0-26	TGAAACTTTATCCCCGAGCTCAAGGGTAACATAACAAGATTCTGCCTTTGTGTGAGGTCCCTGT
E2.0-27	GAGCTCGGGGATAAAGTTTCATTCCTCATGAAATGTCCTTAAATGAGGAAGGAGACTTTCACCCAA
E2.0-28	CTTTGCCCTTCTACTTGTATTTCTGCTCAGTCATTGCATCTGGTTTGGGTGAAAGTCTCCTTCC
E2.0-29	GAAATCAAGTAGAAGGGGCAAAGGAAGGAGCTCAATGACCCCATCCCCAAATCCCTCTGTCCAGC
E2.0-30	CTAAAGGCATTGCCAGGTACCTAGGGACCTCTGTTCCAGCCCTGGGCTGGACAGAGGGATTTGG
E2.0-31	TACCTGGGCAATGCCTTTAGTTCTATCACTGTACTTCTGTAGTTTCTGCATATCTGAGGCTGACT
E2.0-32	CCAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAATATCTCTGTAGAAATGATCAGTCAGCCTCAGATATGCAGA
E2.0-33	AGATATTCTTTCTTTTTTTTTTTTCTGGCTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATC
E2.0-34	AGGATCGAAAAATTGCTTGAACCCCGGAGGCAGAGGTTGCAATGAGCCAAGATCGCGCCACTGCAC
E2.0-35	GGTTCAAGCAATTTTCGATCCTGACCTCAAAGTAATCCGCGCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGTGGG
E2.0-36	CTAGAACCACGTAGAGAATCTCTCTGCAGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGC
E2.0-37	GAGATTCTCTACGTGGGTTCTAGTCTGGCTCTGGCATTTACTTGTGGGACCTCTCTGAACTGCA
E2.0-38	TTGGTGTATGACCCCGCCACAAAATCTAGCTCAACTCACTAGGAGTTTGCAGTTCAGAGAGGTCCC
E2.0-39	GGCGGGTCTACCAACAGCCCTAGCGCAAGGAAGCAGGAAGTCCCCAACCAATCCCATAGCCA
E2.0-40	ACCCAGCCCCCTTCTTGGCGTTTCTAGATTCCCTACGTTGGGGTAGGGTGGCTATGGGATTTGGTGG
E2.0-41	CAAGAAGGGGCTGGGGTGGCCAGTAACCGAAATCAGGTGTCCAGTTCTCAGCCCTCCCAGGCAT
E2.0-42	GGTCCGGGAGGCTGAGTAAGGGGACGGAAGGGTTAGTTCTATGTATTAATGCCTGGGGAGGGCT
E2.0-43	CTCAGCCTCCCGACCTTACCCCCAGCAGTCCCGGCTTGGTCCCCTTGTCTTTTGGGGATCC
E2.0-44	GGGCGTGGTCTGCGCGGGGTTGCCCTCCTGTTCTGGTTTATCAGGGGATCCCCAAAGAAAGCAAG
E2.0-45	GCGCAGACCACGCCCGCAGCTGTGGTTGCCTAGCAACTGCGCTAACAGCCTGACCACGTGATCTG
E2.0-46	<u>CTTGAAGCCATGGTGGCTAGCAATGGGGGAGGGCCTTCGGGCAGATCACGTGGTCAGGC</u>
E1.5F	<u>CTCACATGGCTCGACAGATCTGAAAAATGGCAGTGAGCCAACCTGA</u>
E1.5R	<u>CTTGAAGCCATGGTGGCTAGCAATGGGGGAGGGCCTTCGGGCAGAT</u>
E1.0F	<u>CTCACATGGCTCGACAGATCTGAAAAATGGCAGTGAGCCAACCTGA</u>
E1.0R	<u>CTCACATGGCTCGACAGATCTCAGTTTCTTCACTCTTCCCCAT</u>
E0.5F	<u>CTCACATGGCTCGACAGATCTGAAAAATGGCAGTGAGCCAACCTGA</u>
E0.5R	<u>CTCACATGGCTCGACAGATCTGTGCTGGGATTACAGGCGTGAG</u>

E2.0为EFTUD2 pro-2.0 kb启动子序列;E1.5为EFTUD2 pro-1.5 kb启动子序列;E1.0为EFTUD2 pro-1.0 kb启动子序列;E0.5为EFTUD2 pro-0.5 kb启动子序列。下划线标示处为与psiCHECK-2载体上*Bgl* II和*Nhe* I限制性酶切位点两侧同源的序列。

基因条带E2.0-B。将得到的2个片段E2.0-A和E2.0-B利用EcoRV单酶切分别克隆到pUC57载体中,挑出阳性克隆并进行测序验证。测序正确的序列经PCR扩增得到大量目的产物E2.0-A和E2.0-B。E2.0-A和E2.0-B具有同源序列(即引物E2.0-23和E2.0-24扩增出的序列),同源重组后,可整合成完整的EFTUD2 pro-2.0 kb片段。EFTUD2 pro-0.5 kb、EFTUD2 pro-1.0 kb、EFTUD2 pro-1.5 kb目的序列的获取是以EFTUD2 pro-2.0 kb序列为模板进行高保真PCR扩增。PCR反应体系:EFTUD2 pro-2.0 kb模板1 μL , 10 \times Pfu Buffer (+Mg²⁺) 5 μL , dNTP、目的基因上下游引物各1 μL , ddH₂O 41 μL , Pfu DNA polymerase 0.3 μL 。循环条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 循环30次后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。获得的PCR产物经凝胶电泳观察成像并切胶回收。

1.2.4 载体构建

用于构建重组载体的psiCHECK-2质粒含有海肾荧光素酶报告基因、萤火虫荧光素酶报告基因、T7启动子和SV40增强启动子。重组载体的启动子是通过双酶切替换掉T7启动子和SV40增强启动子的目的基因片段。首先,用Bgl II和Nhe I对psiCHECK-2载体进行双酶切,电泳后用DNA凝胶回收试剂盒回收双酶切的psiCHECK-2载体条带。利用ClonExpress[®] Entry One Step Cloning Kit,将扩增回收好的目的序列,重组克隆到线性化的psiCHECK-2载体中,构建含EFTUD2启动子序列和双荧光素酶报告基因的重组质粒。利用氯化钙法制备感受态细胞,将连接产物转化感受态细胞,涂布于含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素LB平板上,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养。挑取4个单独的克隆菌落,置于含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的LB液体培养基中,于细菌摇床上培养,37 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min,培养16 h后小抽提质粒并做酶切鉴定挑出阳性克隆,取阳性克隆的对应菌液送测序,将测序结果与目的基因序列进行比对,正确无误后,进行大量质粒抽提,得到足够的重组质粒,分别命名为EFTUD2-0.5、EFTUD2-1.0、EFTUD2-1.5、EFTUD2-2.0。

1.2.5 瞬时转染

HepG2细胞在10 cm培养皿中培养至80%~90%融合时,按 5×10^5 个/孔的浓度接种12孔板,于37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂培养24 h后进行质粒瞬时转染,转染使用GP-transfect-Mate转染试剂,每孔质粒用量为1.6 μg , GP-transfect-Mate用量为4 μL 。实验设立7

个组,分别为①空白细胞组;②P check2.0-NC组;③P check2.0-positive组;④EFTUD2-0.5组;⑤EFTUD2-1.0组;⑥EFTUD2-1.5组;⑦EFTUD2-2.0组。分别收集转染后48 h的细胞,进行双荧光素酶系统检测。

1.2.6 双荧光素酶报告基因活性检测

采用Dual-Luciferase报告基因检测系统试剂盒对收集的细胞样品进行荧光素酶报告基因活性检测。参照试剂说明书,每孔细胞先用1 \times PBS洗涤2次,加入预先制备好的裂解液PLB 300 μL 。在室温下轻缓晃动培养板15 min,把裂解液转移到检测试板中,每孔100 μL ,实验设计3个复孔。打开TecanM1000酶标仪,选择双荧光素酶检测系统进行检测。每孔加入10 μL 的荧光素酶检测试剂II(LA-RII),于酶标仪上检测萤火虫荧光素酶活性。随后取出测试板,继续每孔加入10 μL Stop&Glo[®]试剂,将上述反应淬灭,并同时启动海肾荧光素酶反应,检测海肾荧光素酶活性。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8统计软件进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有实验结果重复3次。采用 t 检验进行两组间比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

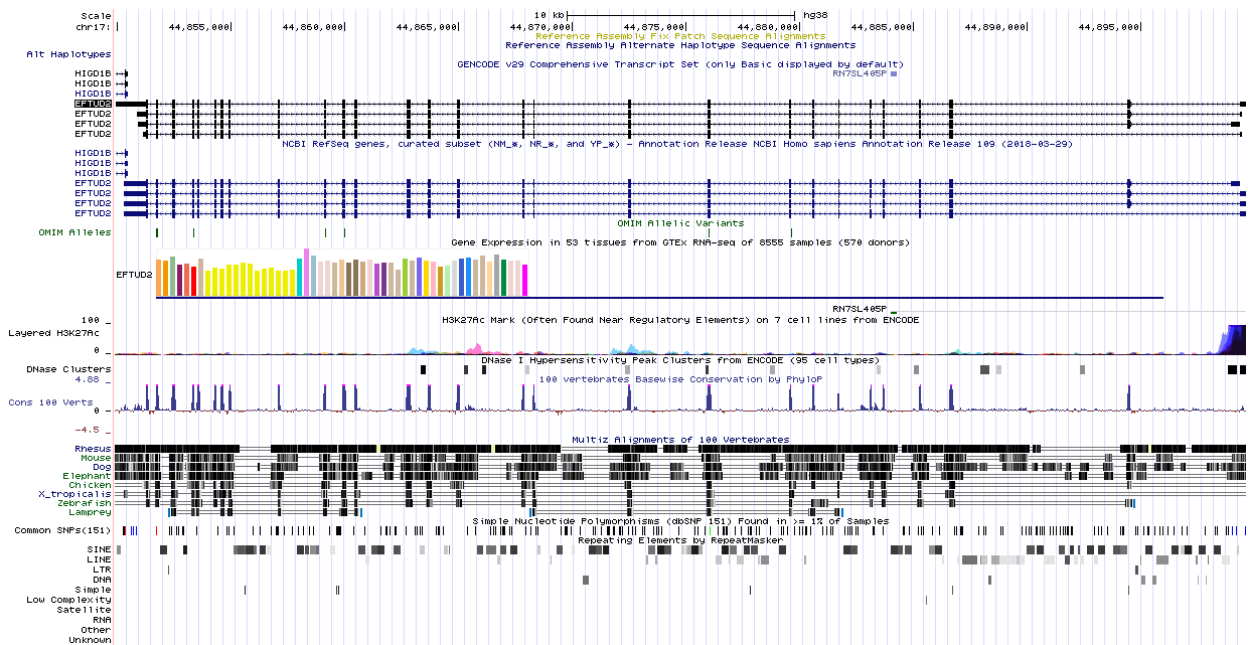
2 结果

2.1 EFTUD2的基因结构

本文通过UCSC在线数据库(<http://genome.ucsc.edu/>)分析了人EFTUD2的基因结构。如图1所示,EFTUD2基因位于第17号染色体(17q21.31),该基因目前有4个转录本,转录本ENST00000426333.6、ENST00000592576.5、ENST00000591382.5包含28个外显子和27个内含子,转录本ENST00000402521.7包含27个外显子和26个内含子。根据ENCODE数据显示的组蛋白修饰数据,转录活性增强标志H3K27Ac以及DNase敏感位点(DHS)在第1外显子附近区域显著富集,由此可初步推测,EFTUD2基因启动子区域应该位于其第1外显子区域附近。

2.2 EFTUD2启动子报告基因重组载体的构建

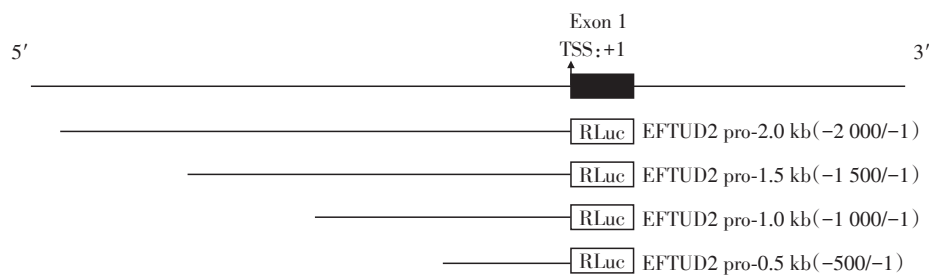
对转录起始位点上游的序列用启动子预测软件进行分析,显示该部分区域确实是一个潜在的启动子区域。提取转录起始位点上游-2 000~-1 bp的序列,分别选取500、1 000、1 500、2 000 bp 4个序列片段,设计相应引物,采用多重PCR全基因合成2 000 bp片段,并以该片段为模板,采用高保真PCR



采用UCSC(<http://genome.ucsc.edu/>)数据库检索人EFTUD2的基因组区域(chr17:44 849 943~44 899 662,GRCh38/hg38),根据轨迹指示,H3K27Ac以及DNase敏感位点(DHS)富集区位于第1外显子附近区域。

图1 人EFTUD2基因的染色质状态

Figure 1 Chromatin state annotation of the human EFTUD2 gene locus



EFTUD2基因启动子相对于EFTUD2基因转录起始位点(+1)的位置。EFTUD2的第一个外显子用实心黑框显示。启动子片段以EFTUD2 pro-length命名。海肾荧光素酶基因位于目的序列下游。

图2 人EFTUD2基因启动子报告重组载体构建示意图

Figure 2 Schematic diagram of EFTUD2 gene promoter reporter recombinants

扩增另外500、1 000、1 500 bp 3个片段(图2)。通过Bgl II和Nhe I双酶切,将获得的片段克隆到psiCHECK-2载体中,构建EFTUD2启动子报告基因重组质粒,重组质粒酶切鉴定结果见图3。所有克隆均经测序验证正确无误。

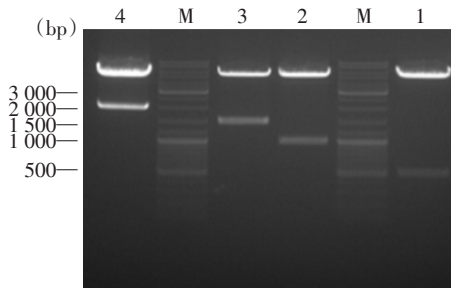
2.3 EFTUD2启动子活性分析

将构建好的各EFTUD2启动子报告基因重组质粒分别转染HepG2细胞,以含有能在细胞中正常启动RLUC表达的SV40增强启动子的P check2.0-positive质粒作为阳性对照,通过检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性的比值,分析不同启动子片段的活性。从转染后48 h的荧光比值可以看出,4个启动子片段中,以EFTUD2 pro-0.5 kb的活性最高,约

为空白对照组的3倍以上,而EFTUD2 pro-1.0 kb、EFTUD2 pro-1.5 kb、EFTUD2 pro-2.0 kb的活性相对较低(图4)。因此可以初步判断,EFTUD2的核心启动子区域位于EFTUD2 pro-0.5 kb对应的基因组区域。

3 讨论

基因转录产生的pre-mRNA需要通过剪接作用去除内含子,拼接外显子产生成熟的mRNA才能进行下一步的翻译表达。在进行剪接的过程中形成的剪接复合物称为剪接体,它是由5个不同的小核糖核酸(snRNA)U1、U2、U5、U4/U6以及超过170种蛋白质所组成的大型核糖核酸蛋白质复合物,称

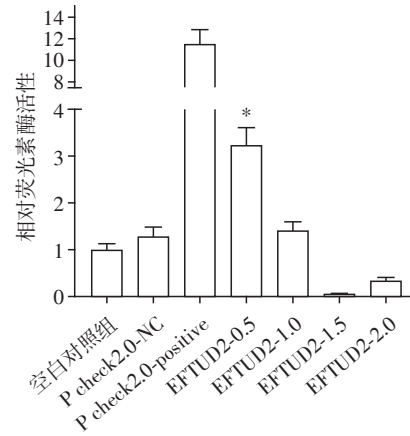


4个EFTUD2启动子重组载体经Bgl II和Nhe I双酶切后,通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。M:GeneRuler DNA Ladder Mix;1:EFTUD2 pro-0.5 kb重组质粒双酶切产物;2:EFTUD2 pro-1.0 kb重组质粒双酶切产物;3:EFTUD2 pro-1.5 kb重组质粒双酶切产物;4:EFTUD2 pro-2.0 kb重组质粒双酶切产物。

图3 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组体

Figure 3 Identification of recombinants by agarose gel electrophoresis

为snRNP^[8-9]。剪切作用是真核细胞将mRNA翻译成蛋白质的先决条件,剪接体在这一过程中起到了关键作用,其参与的pre-mRNA剪接过程是一个动态变化的加工过程,通过将U1 snRNP、U2 snRNP和U4/U6-U5 tri-snRNP以及许多其他蛋白质募集到pre-mRNA来逐步形成剪接体。最初,U1和U2 snRNP分别与pre-mRNA的5'剪接位点(SS)和分支位点(BS)相互作用,随后,招募预组装的U4/U6-U5 tri-snRNP,然后取代U1和U4。在激活时,U4/U6双链体被破坏,U6和U2 snRNA彼此碱基配对,并分别与pre-mRNA 5'和3'剪接位点结合,U5 snRNA碱基与pre-mRNA 5'剪接位点上游的外显子序列配对,从而形成高度结构化的RNA相互作用网络,产生剪接体的催化RNA核心^[10-11]。催化剪接过程分两步进行:首先,内含子的5'末端被切割并连接到分支位点以产生套索结构,接着是内含子的3'末端被切割,使外显子5'和3'相连接。U5 snRNP的3个大蛋白Prp8(precursor RNA processing 8)、RNA解旋酶Brr2(bad response to refrigeration 2)和鸟苷三磷酸酶(GTPase)即EFTUD2在催化活化过程中起关键作用^[12-13]。EFTUD2是剪接体中U5 snRNP的核心成分,它与前mRNA加工因子8(pre-mRNA processing factor 8,PRPF8)一起控制小核核糖核蛋白200(SN-RNP200)活性^[14-18],并通过影响U4/U6双链体解旋直接需要的剪接因子参与向剪接体活性形式的转变^[19]。同时,EFTUD2也参与调节剪接后剪接体亚基的解体。EFTUD2突变可导致遗传畸形,其差异性剪接在调节固有免疫中起到重要作用。已证实EFTUD2可通过转录后调控髓样分化因子88(my-



使用GP-transfect-Mate转染试剂将EFTUD2启动子报告基因重组载体瞬时转染HepG2细胞,转染后48 h,通过双荧光素酶测定系统测量萤火虫和海肾荧光素酶活性。与空白对照组比较,*P < 0.05(n=3)。

图4 EFTUD2启动子报告重组载体的荧光素酶测定

Figure 4 Luciferase assays of the EFTUD2 promoter reporter recombinants

eloid differentiation primary response gene 88, MyD88)的表达,进而影响NF-κB信号通路的活化^[20-21]。EFTUD2过表达可以激活RIG-I通路,促进黏病毒抗性蛋白A(myxovirus resistance protein A, MxA)、2-5-寡腺苷酸合成酶1(2-5-oligoadenylate synthetase 1, OAS1)等抗病毒蛋白表达,从而抑制丙型肝炎病毒(HCV)感染^[22],因此,EFTUD2在抵抗外来病毒入侵中扮演着重要角色。综上,阐明EFTUD2表达调控机制对于全面精确解析其功能具有重要意义。

现有研究大多集中于EFTUD2基因表达和突变引起的细胞生物学以及临床表型改变及其机制方面,而关于EFTUD2基因的详细分子表达调控机制尚无报道。一般来说,转录因子对靶基因的表达调控都是通过与其启动子区域结合来启动的。因此,本文对EFTUD2的启动子区域进行了鉴定与初步分析。结果发现,EFTUD2的启动子区域EFTUD2 pro-0.5 kb(-500/-1)具有较强的转录活性,初步判断EFTUD2的核心启动子序列位于该区域内。值得注意的是,EFTUD2 pro-1.0 kb(-1 000/-1)和EFTUD2 pro-1.5 kb(-1 500/-1)的活性相比EFTUD2 pro-0.5kb连续降低,提示EFTUD2基因转录起始位点上游-1 000~-500 bp以及-1 500~1 000 bp范围内存在连续的沉默子元件,而EFTUD2 pro-2.0 kb(-2 000/-1)的活性又比EFTUD2 pro-1.5 kb略微升高,提示在该基因转录起始位点上游的-2 000~-1 500 bp范围内可能存在较弱的顺式作用元件,该顺式作用元件对EFTUD2核心启动子的上调作用不足以抵消其下游沉默子元件的下调作用。

该发现为阐明EFTUD2基因的表达调控机制奠定了坚实的基础,也有助于进一步研究EFTUD2表达水平与固有免疫的关系以及差异性剪接的具体机制。

[参考文献]

- [1] WIECZOREK D, GENER B, GONZALEZ M J, et al. Microcephaly, microtia, preauricular tags, choanal atresia and developmental delay in three unrelated patients: a mandibulofacial dysostosis distinct from Treacher Collins syndrome[J]. *Am J Med Genet A*, 2009, 149a(5):837-843
- [2] BERNIER F P, CALUSERIU O, NG S, et al. Haploinsufficiency of SF3B4, a component of the pre-mRNA spliceosomal complex, causes Nager syndrome [J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(5):925-933
- [3] GORDON C T, PETIT F, OUFADAM M, et al. EFTUD2 haploinsufficiency leads to syndromic oesophageal atresia [J]. *J Med Genet*, 2012, 49(12):737-746
- [4] LUQUETTI D V, HING A V, RIEDER M J, et al. "Mandibulofacial dysostosis with microcephaly" caused by EFTUD2 mutations: expanding the phenotype[J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161a(1):108-113
- [5] LINES M A, HUANG L, SCHWARTZENTRUBER J, et al. Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(2):369-377
- [6] CARPENTER S, RICCI E P, MERCIER B C, et al. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(6):361-376
- [7] LIN W, ZHU C, HONG J, et al. The spliceosome factor SART1 exerts its anti-HCV action through mRNA splicing [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(5):1024-1032
- [8] WILL C L, LUHRMANN R. Spliceosome structure and function[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(7):a003707
- [9] MATERA A G, WANG Z. A day in the life of the spliceosome[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2):108-121
- [10] SONTHEIMER E J, STEITZ J A. The U5 and U6 small nuclear RNAs as active site components of the spliceosome [J]. *Science*, 1993, 262(5142):1989-1996
- [11] FICA S M, MEFFORD M A, PICCIRILLI J A, et al. Evidence for a group II intron-like catalytic triplex in the spliceosome[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(5):464-471
- [12] GRAINGER R J, BEGGS J D. Prp8 protein: at the heart of the spliceosome[J]. *Rna*, 2005, 11(5):533-557
- [13] GALEJ W P, NGUYEN T H, NEWMAN A J, et al. Structural studies of the spliceosome: zooming into the heart of the machine[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2014, 25:57-66
- [14] SMALL E C, LEGGETT S R, WINANS A A, et al. The EF-G-like GTPase Snu114p regulates spliceosome dynamics mediated by Brr2p, a DEXD/H box ATPase[J]. *Mol Cell*, 2006, 23(3):389-399
- [15] MOZAFFARI-JOVIN S, SANTOS K F, HSIAO H H, et al. The Prp8 RNase H-like domain inhibits Brr2-mediated U4/U6 snRNA unwinding by blocking Brr2 loading onto the U4 snRNA[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(21):2422-2434
- [16] MOZAFFARI-JOVIN S, WANDERSLEBEN T, SANTOS K F, et al. Inhibition of RNA helicase Brr2 by the C-terminal tail of the spliceosomal protein Prp8 [J]. *Science*, 2013, 341(6141):80-84
- [17] NGUYEN T H, LI J, GALEJ W P, et al. Structural basis of Brr2-Prp8 interactions and implications for U5 snRNP biogenesis and the spliceosome active site[J]. *Structure*, 2013, 21(6):910-919
- [18] MOZAFFARI-JOVIN S, WANDERSLEBEN T, SANTOS K F, et al. Novel regulatory principles of the spliceosomal Brr2 RNA helicase and links to retinal disease in humans [J]. *RNA Biol*, 2014, 11(4):298-312
- [19] BARTELS C, KLATT C, LUHRMANN R, et al. The ribosomal translocase homologue Snu114p is involved in unwinding U4/U6 RNA during activation of the spliceosome [J]. *EMBO Rep*, 2002, 3(9):875-880
- [20] 姚欣,戴山林,黄茂,等. 早期T细胞激活过程中NF- κ B活化的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2006, 26(11):1015-1017
- [21] DE ARRAS L, LAWS R, LEACH S M, et al. Comparative genomics RNAi screen identifies Eftud2 as a novel regulator of innate immunity[J]. *Genetics*, 2014, 197(2):485-496
- [22] ZHU C, XIAO F, HONG J, et al. EFTUD2 is a novel innate immune regulator restricting hepatitis C virus infection through the RIG-I/MDA5 pathway[J]. *J Virol*, 2015, 89(13):6608-6618

[收稿日期] 2019-07-08