

· 基础论著 ·

NS2TP基因启动子报告基因载体的构建及其活性验证

高学松 杨彪 王琦 李炜 成军

【摘要】 目的 研究丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因(NS2TP)的转录调节机制。**方法** 应用PCR方法扩增NS2TP的启动子,克隆入pGL4.10载体,构建萤火虫素酶报告基因载体,转染HepG2细胞,检测双萤虫素酶活性,验证其转录活性;通过缺失突变法构建系列截短的NS2TP基因启动子报告基因载体。**结果** 成功构建了系列截短的NS2TP基因启动子报告基因载体,分别命名为N1、N2、N3和N4,并确定了N3为NS2TP基因的核心启动子。**结论** 构建NS2TP基因启动子的系列截短报告基因载体,确定了其最小转录活性区域,为进一步研究NS2TP基因的转录活性调节机制奠定理论基础。

【关键词】 NS2TP基因; 报告基因载体; 启动子

Construction of series reporter plasmids with truncated HCV NS2TP gene promoter GAO Xue-song*, YANG Biao, WANG Qi, LI Wei, CHENG Jun. *Department of General Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: CHENG Jun, Email: chengjdt@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct series of reporter plasmids with truncated NS2TP gene promoter. **Methods** Fragments of NS2TP gene promoter was amplified by PCR and cloned into pGL4.10-Basic. Then the luciferase reporter vectors of NS2TP gene was constructed. Dual luciferase assays were performed with lysates of HepG2 cells transfected with NS2TP gene promoter reporter plasmids. **Results** Series of luciferase reporter plasmids with truncated NS2TP gene promoter were successfully constructed and named N1, N2, N3 and N4, respectively. N3 as the minimal promoter was determined. **Conclusions** Series of luciferase reporter plasmids with truncated NS2TP gene promoter were successfully constructed and their promoter activity were verified. These plasmids provide necessary experimental materials for further investigation of regulation of NS2TP gene.

【Key words】 NS2TP gene; Reporter plasmid; Promoter activity

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属黄病毒科,大多数人感染HCV后表现为持续性感染,可引起慢性肝炎、肝硬化及肝癌。HCV基因组为单股正链RNA,其RNA结构中5'-端和3'-端各有一个非编码区,在两个非编码区之间有单一的开放读码框,约9.6 kb的核苷酸编码由3010~3033个氨基酸残基(aa)组成的多肽前体,然后在宿主信号肽酶和NS3蛋白酶的作用下裂解为10个蛋白,从氨基

端到羧基端依次为:结构蛋白Core、E1、E2和非结构蛋白p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B^[1]。

目前对于NS2蛋白的生物学功能知之甚少,本课题组既往研究发现并鉴定了一系列NS2蛋白反式调节的靶基因,其中包括NS2TP基因在内的一些未知功能的新基因^[2-3]。对这些新基因的研究为探讨HCV NS2在丙型肝炎发病机制中的作用提供了新的思路。

材料与方法

一、材料

1. 细胞: 肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞由首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所保存,以含10%胎牛血清的DMEM培养,37℃、5% CO₂条件下培养。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.03.002

基金项目: 国家十二五科技重大专项(No. 2012ZX10002003, No. 2012ZX10004904), 北京市科委重大项目(No. D09050703560908)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院综合科(高学松); 沈阳医学院基础医学院(杨彪); 北京老年医院(李炜); 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(王琦、成军); 新发突发传染病研究北京市重点实验室(王琦、成军)

通讯作者: 成军, Email: chengjdt@ccmu.edu.cn

2. 主要实验材料及试剂: 质粒快速提取试剂盒、DNA快速纯化/回收纯化试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, Dual-Luciferase Reporter Assay System、pGEM-T easy载体购自Promega公司, 限制性内切酶 (*Kpn* I / *Bgl* II) 购自TaKaRa公司, 转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司, DMEM培养基购自GIBCO公司。

3. PCR引物: 上游引物N1 (−1817~+93 bp): 5′ -GGTACCTTTTGGGGGAACAGGTGGT-3′; N2 (−1691~+93 bp): 5′ -GGTACCACCCACCTAGCACATCCC-3′; N3 (−257~+93 bp): 5′ -GGTACCGTTGACCGCGAAGGACGAG-3′; N4 (−157~+93 bp): 5′ -GGTACCTGGTTGGTTGCGCGTTGAG-3′。下游引物: 5′ -AGATCTCGGCCTCCCTCTGCGTCAT-3′。以上引物均由上海生物工程有限公司合成。

二、方法

1. NS2TP基因启动子的分析: 利用生物信息学工具进行分析, 即经NCBI Gene数据库 (<http://www.ensembl.org/>) 寻找NS2TP基因的基因组序列, 经Promoter Scan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) 和TFSEARCH Search (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 分析后, 选取转录起始位点上游片段进行启动子活性鉴定。

2. pGL4.10-N1的构建及鉴定: 提取HepG2细胞全基因组DNA为模板, PCR扩增NS2TP基因的启动子区域。PCR条件: 95℃预变性5 min, 94℃、50 s, 54℃、75 s, 72℃、2 min, 共30个循环, 再72℃延伸10 min。扩增产物用T4 DNA连接酶接入pGEM-T easy载体。经测序证实后用*Kpn* I / *Bgl* II双酶切, 切胶回收目的片段, 连接到同样经*Kpn* I 和*Bgl* II双酶切制备好的pGL-4.10载体上, 构建成pGL-4.10 N1载体。挑选阳性重组克隆, *Kpn* I / *Bgl* II进行双酶切鉴定并测序。

3. NS2TP基因启动子活性的验证: 将HepG2细胞接种于48孔培养板中, 当细胞生长至90%融合度时, 采用Lipofectamine 2000脂质体转染试剂, 将pGL-4.10 N1与phRL-TK共转染。转染24 h后收获细胞, 按照Dual-Luciferase Reporter Assay System说明书进行报告基因活性检测。每次实验均设立2个复孔, 同一转染实验重复3次。系列截短的启动子报告基因载体的构建与活性检测均与pGL-4.10 N1相同。

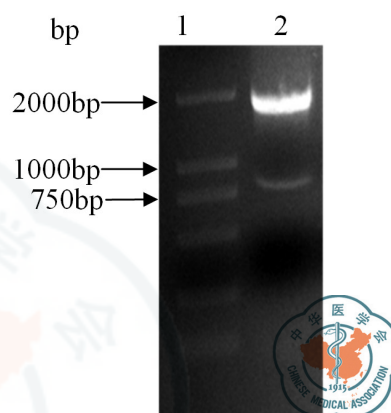
三、统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件分析数据结果, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、NS2TP基因启动子区并扩增的预测

以转录起始位点为+1, 根据在线软件Promoter Scan和TFSEARCH Search, 根据预测结果, 本研究设计引物应用PCR方法扩增NS2TP基因−1871~+93 bp的启动子活性区域。PCR产物为1910 bp, 与理论片段大小相符 (图1)。

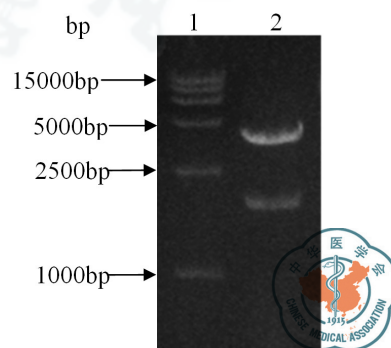


注: 1: DNA标准DL2000 2: NS2TP基因启动子扩增片段

图1 NS2TP基因启动子PCR扩增产物电泳

二、NS2TP基因启动子报告基因载体pGL4.10-N1的构建

将NS2TP基因启动子PCR扩增产物, 回收纯化后克隆入pGEM-T easy载体, 经*Kpn* I / *Bgl* II双酶切, 连接到经同样双酶切制备好的pGL4.10线性化载体上, 构建成双萤虫素酶报告基因载体, 并命名为pGL4.10-N1。双酶切和测序结果均证实载体构建成功 (图2)。



注: 1: DNA标准DL15000 2: pGL4.10-N1双酶切

图2 pGL4.10-N1双酶切鉴定电泳

三、NS2TP基因启动子活性的验证

pGL4.10-N1与内参pRL-TK共转染HepG2细胞, 双萤虫素酶报告基因检测系统显示, 与对照

pGL4.10Basic相比, NS2TP基因启动子活性显著升高(约27倍), 提示其具有转录活性(图3)。

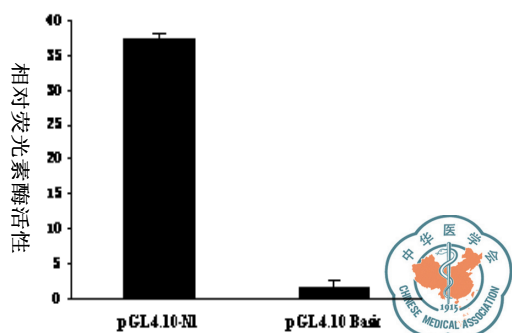


图3 pGL4.10-N1的转录活性分析

四、系列截短的NS2TP基因启动子片段的获得与报告基因载体的构建

以pGL4.10-N1为模板, 根据启动子在线软件分析的不同活性区域, 利用针对不同长度启动子片段的引物, PCR扩增截短的NS2TP基因启动子片段。目的片段长度分别为1784 bp、350 bp和250 bp。经过纯化、回收、双酶切和连接等过程, 构建不同的报告基因载体, 分别命名为pGL4.10-N1、pGL4.10-N2、pGL4.10-N3和pGL4.10-N4(图4)。

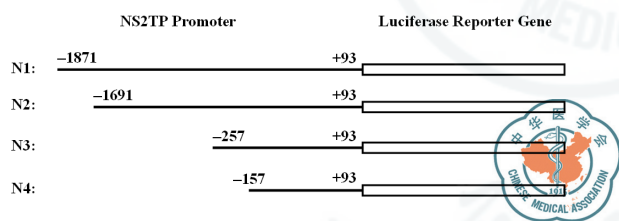


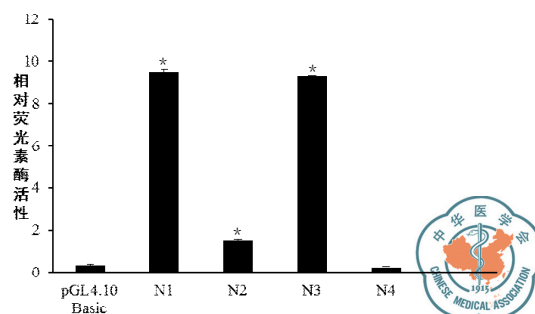
图4 NS2TP基因启动子系列截短子报告基因载体示意图

五、系列截短启动子活性的验证

pGL4.10-N2、N3、N4分别与内参pRL-TK共转染HepG2细胞, 检测双萤虫素酶报告基因, 提示N2、N3均具有转录活性($P < 0.05$), 其中N1截短后, N2转录活性有所下降, N4则丧失转录活性, 提示在NS2TP基因转录起始位点上游-257~+93 bp为转录核心区域, 为基因转录所必需, 见图5。

讨 论

丙型肝炎病毒非结构蛋白2(HCV NS2)位于HCV多肽前体810~1026 aa, 编码216个氨基酸残基。NS2蛋白是一种疏水蛋白质, 从NS2/3聚合体分裂而来, 而且在氨基末端包含有数个跨膜区域^[4]。



注: * $P < 0.05$

图5 NS2TP基因启动子系列截短子转录活性分析

E2/p7-NS2之间的切割由宿主信号肽酶介导, NS2/NS3位点的切割由病毒蛋白酶介导。位于NS2蛋白C'-端和NS3蛋白N'-端之间的区域, 对应于849~1237氨基酸序列, 是一个具有蛋白酶活性的结构域, 尤其是His-952和Cys-993对于保持酶活性至关重要^[5-6]。有研究发现, EDTA能抑制NS2/NS3蛋白酶活性, 而 $ZnCl_2$ 对酶活性有激活作用, 因此一般认为NS2/NS3蛋白酶是 Zn^{2+} 依赖性金属蛋白酶^[7]。另外作为一种蛋白酶, NS2虽未融入HCV病毒颗粒, 却是HCV病毒颗粒组装过程中必不可少的部分^[8]。在感染的细胞中, 调节细胞基因表达和参与脂类代谢, NS2同样起到了重要作用^[9-10]。近期研究发现, NS2TP是一种多功能蛋白质, 可促进细胞的迁移^[11], 参与氧化磷酸化作用和重组DNA断裂双链的修复^[12], 以及参与转录调节功能的预测^[13]。

HCV NS2是一种重要的多功能蛋白, 本课题组长期以来围绕NS2与肝细胞相互作用的分子生物学机制进行了系列研究。通过抑制性消减杂交筛选出了HCV NS2反式激活基因(NS2TP), 编码序列有456个碱基, 编码151个氨基酸, 并对其功能进行了初步研究。为进一步了解其功能, 本研究对NS2TP基因的转录调节机制进行了探讨。首先根据生物信息学工具克隆NS2TP基因的启动子, 并证实了其转录活性, 通过构建系列截短子, 确定了NS2TP基因启动子的转录核心区域。研究发现, NS2TP基因启动子N1截短为N2后, 既去除-1871~-1691 bp区后, 启动子转录活性显著下降, 考虑该区域内含有重要的转录因子, 增强基因的转录活性。而N2截短为N3后, 启动子转录活性恢复, 分析该区域即-1691~-257 bp存在负性调节因子, 抑制转录活性。通过系列截短启动子研究, 确定了N3即-257~+93 bp区域为NS2TP基因的核心转录区域, 为基因转录所必需。研究发现, 在基因表达过程中, 转录因子发挥了重要作用, 而本研究NS2TP基因启动

子在截短过程中转录活性的变化也诠释了此问题。但目前对于NS2TP基因转录的确切调节机制尚不十分清楚,有待于进一步探讨。

总之, NS2TP基因的研究对进一步了解HCV NS2蛋白的生物学功能具有重要的意义,也为完善HCV致病机制提供了新的研究思路。

参 考 文 献

- 1 Grakoui A, Wychowski C, Lin C, et al. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol*,1993,67(3):1385-1395.
- 2 张黎颖, 成军, 刘妍, 等. 应用抑制性消减杂交技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因. *中西医结合肝病杂志*,2005,15(3):156-161.
- 3 张黎颖, 成军, 邓红, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化. *世界华人消化杂志*,2005,13(14):1700-1704.
- 4 Welbourn S, Pause A. The hepatitis C virus NS2/3 protease. *Curr Issues Mol Biol*,2007,9(1):63-69.
- 5 Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, et al. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol*,1995,69(12):7461-7471.
- 6 Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, et al. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol*,1993,67(8):4665-4675.
- 7 Pieroni L, Santolini E, Fipaldini C, et al. In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. *J Virol*,1997,71(9):6373-6380.
- 8 Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, et al. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol*,2008,82(10):4731-4741.
- 9 Dentzer TG, Lorenz LC, Evans MJ, et al. Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J Virol*,2009,83(24):12702-12713.
- 10 Oem JK, Jackel-Cram C, Li YP, et al. Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2. *J Gen Virol*,2008,89(5):1225-1230.
- 11 Seo M, Lee WH, Suk K. Identification of novel cell migration-promoting genes by a functional genetic screen. *FASEB J*,2010,24(2):464-478.
- 12 Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, et al. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*,2003,115(5):629-640.
- 13 Nayak RR, Kearns M, Spielman RS, et al. Coexpression network based on natural variation in human gene expression reveals gene interactions and functions. *Genome Res*,2009,19(11):1953-1962.

(收稿日期: 2012-12-18)

(本文编辑: 孙荣华)

高学松, 杨彪, 王琦, 等. NS2TP基因启动子报告基因载体的构建及其活性验证[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7 (3): 332-335.

中华医学会