

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.20.007

人 *Cuedc2* 启动子区的克隆与鉴定*

刘淑娟¹ 王 涛² 刘朵朵¹ 乔谷媛¹ 韩军涛^{3△}

(1 第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710032;

3 第四军医大学西京医院烧伤科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:克隆并鉴定和分析人 *Cuedc2* 启动子,为进一步研究其转录调控机制和功能提供实验基础。**方法:**对 *Cuedc2* 基因翻译起始位点上游约 2000bp 的序列进行在线生物信息学分析,使用 PCR 技术扩增该序列并测序,将扩增获得的该片段定向克隆入 PGL-3basic 载体中,构建荧光素酶报告基因质粒 *Cuedc2-luc*。荧光素酶分析检测启动子的活性。**结果:**本实验成功构建了含有 *Cuedc2* 基因启动子序列的荧光报告系统,经体外验证该报告基因重组载体具有转录活性。**结论:**本实验所构建的 *Cuedc2* 基因启动子报告基因载体,为进一步研究 *Cuedc2* 基因的转录调控及其功能奠定了基础。

关键词: *Cuedc2*; 荧光素酶报告系统; 转录调控

中图分类号: R737.31, Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)20-3828-03

Identification and Analysis of Human *Cuedc2* Promoter*

LIU Shu-juan¹, WANG Tao², LIU Duo-duo¹, QIAO Gu-yuan¹, HAN Jun-tao^{3,△}

(1 Department of Gynecology and Obstetrics, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Departement of Burns, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To clone, identify and analyze human *Cuedc2* promoter region and provide experimental basis for the research on the regulatory mechanism and function of *Cuedc2*. **Methods:** Approximately 2000 bp up from the ATG of gene *Cuedc2* was bioinformatics analyzed online. The fragment was generated by polymerase chain reaction and sequenced for correctness. The *Cuedc2-luc* promoter reporter was constructed by directly cloned this fragment into PGL-3basic vector and the promoter activity was measured by luciferase assay. **Results:** The fragment of 1982bp in upstream of the ATG, was amplified successfully and cloned directly into PGL-3basic vector to make *Cuedc2* promoter reporter. Luciferase reporter assay showed that the fragment of 1956bp in length indeed had strong promoter activity. **Conclusion:** The luciferase reporter system of *Cuedc2* gene promoter was constructed successfully and could be used for further study of the function and transcriptional regulation of *Cuedc2*.

Key words: *Cuedc2*; Promoter reporter; Transcriptional regulation

Chinese Library Classification(CLC): R737.31, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)20-3828-03

前言

近年来,卵巢癌的内分泌治疗越来越多地应用于临床,其中他西莫芬(tamoxifen, TAM)因疗效确切、副作用少而受到广泛关注^[1-4],但长期使用该药导致的继发性耐药限制了其临床应用。*Cuedc2* 是 Cue 家族的新成员^[5],研究发现 *Cuedc2* 可通过下调 ER α 使乳腺癌细胞对 TAM 等内分泌治疗药物产生抵抗^[6]。由于上皮性卵巢癌也是一种激素依赖性肿瘤,其发病、进展和预后与 ER α 密切相关^[7-9]。因此, *Cuedc2* 在卵巢癌内分泌治疗耐药过程中的作用开始受到关注,但 *Cuedc2* 在卵巢癌细胞中转录调控的特点目前并不清楚。为此,我们根据生物信息学分析的结果,从人基因组 DNA 中扩增获得了 *Cuedc2* 基因翻译起始位点上游约 1982bpDNA 序列,利用 *KpnI* 酶切位点及 *Bgl* II

酶切位点将扩增序列导入荧光素酶报告基因载体 PGL3basic 中,然后将构建好的质粒转入 HEK293 细胞中检测其转录活性,为研究该基因的转录调控及功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌菌种 DH5 α 和 HEK293 细胞为第四军医大学西京医院妇产科实验室保存;限制性内切酶、DL2000marker 及 1Kb DNA ladder marker 购自宝生物工程公司;脂质体 Lipofectamine2000 及 DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司;新生牛血清(杭州四季青公司);细胞/组织 DNA 小量提取试剂盒(上海华舜生物工程有限公司);琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根公司);双荧光报告系统及照度计 TD-20/20 检测仪(Promega 公司);寡核

* 基金项目:陕西省科技攻关基金项目(2011K12-10)

作者简介:刘淑娟(1973-),女,博士,副教授,主要研究方向:卵巢癌的诊治研究,

电话:029-84771656, E-mail: hanliu@fmmu.edu.cn

△ 通讯作者:韩军涛, E-mail: hanjt@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-02-28 接受日期:2014-03-25)

苷酸引物合成及测序(上海生物工程有限公司);PGL-3basic vector 和 Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 *Cuedc2* 基因 5' 端上游序列的生物信息学分析 利用 NCBI 基因组数据库查找 *Cuedc2* 基因 5' 端上游序列,使用 Promoter Inspector 软件进行启动子预测。

1.2.2 引物设计与合成 设计引物:上游引物引入 *KpnI* 酶切位点 5'-GGGGTACCGTCGCTGTCACCCACCCCT-3',下游引物引入 *BglII* 酶切位点 5'-GAAGATCTCCCAACAGGGCG-GAGCTC-3'。

1.2.3 基因组 DNA 的提取 提取人卵巢癌组织基因组 DNA,参照试剂盒提供的操作手册进行操作。

1.2.4 PCR 扩增启动子 提取的基因组 DNA 稀释 10 倍后取 1 μ L 作为 PCR 反应模板,反应体系,反应体系为:5 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液,4 μ L 10 mmol/L dNTPs,0.5 μ L Taq 酶(5×10^3 U/L),引物 10 μ mol/L 各 1 μ L,双蒸水补足至 50 μ L。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 完成 35 个循环,最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.5 启动子报告基因重组体的构建 用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化回收扩增产物,测序,再用 *KpnI* 及 *BglII* 双酶切测序正确的片段,克隆入 PGL-3basic vector,构建荧光报告质粒 *Cuedc2-luc*。重组质粒均进行双酶切及测序确认。

1.2.6 瞬时转染 转染试剂采用 Lipofectamine2000,参照使用说明进行转染。转染前 24 h,将细胞接种于 24 孔板,37 $^{\circ}$ C,50 ml/LCO₂ 孵箱培养细胞至次日 80%铺满时进行转染。每孔转入 JN-luc 0.8 μ g,同时共转入 pRL-TK 质粒(包含海肾荧光素酶基因)10ng 作为内参对照。

1.2.7 荧光素酶报告基因活性检测 转染 48 h 后,采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 进行荧光素酶报告基因活性检测,每孔加入 100 μ L 1 $\times$ 细胞裂解液,室温 120 r/min 摇床振摇 20 min 后,收集细胞裂解液,4 $^{\circ}$ C,13.4 $\times$ g,离心 10 min,收集离心后的上清液,用双荧光报告系统及照度计 TD-20/20 检测仪检测荧光素酶活性,取细胞裂解液上清 20 μ L 加入荧光素酶检测试剂 LAR II 100 μ L,测量萤火虫荧光素酶活性,然后加入 SGB buffer 将上述反应淬灭,同时启动海肾荧光素酶反应并测量其活性。

2 结果

2.1 生物信息学分析结果

利用 Promoter Inspector 在线进行启动子预测分析,发现在距离 *Cuedc2* 基因翻译起始位点上游 2000 bp 存在可能的启动子区,而使用 promoter2.0 发现在距 *Cuedc2* 基因翻译起始位点上游 200 bp 处存在可能的转录起始位点,其附近并无传统的 TATA-box 存在。

2.2 *Cuedc2* 基因启动子的扩增

以提取的人卵巢癌组织基因组 DNA 为模板,扩增出 *Cuedc2* 基因上游序列,获得了预期大小为 1982 bp 的目的片段(图 1)。

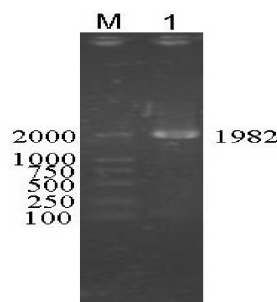


图 1 *Cuedc2* 基因启动子的扩增

M:DL2000 marker;1:目的片段(1982bp)

Fig.1 The PCR amplification for *Cuedc2* promoter

M: DL 2000 DNA marker; 1: target fragment(1982bp)

2.3 启动子报告基因重组体的构建

将所获得的 1982 bp 的目的片段回收后用 *KpnI* 及 *BglII* 双酶切,克隆入 PGL-3basic vector,构建 JN-luc 荧光素酶报告基因重组体,重组质粒酶切结果见图 2。所有克隆均经测序确认序列无误。

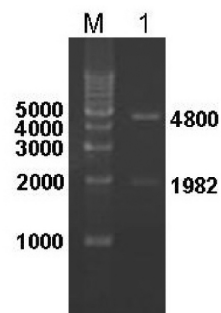


图 2 重组质粒 *Cuedc2-luc* 的双酶切鉴定

M:1Kb DNA ladder marker;1:重组质粒 *Cuedc2-luc* *KpnI* 和 *BglII* 双酶切产物

Fig.2 The identification of restriction enzyme digestion for *Cuedc2-luc*

M: 1Kb DNA ladder marker; 1: Double enzyme product of recombinant plasmid by *KpnI* and *BglII*

2.4 荧光报告系统检测转录活性

将构建好的 *Cuedc2-luc* 启动子报告基因重组质粒转染 HEK293 细胞,以空转 PGL-3basic vector 为对照,同时共转 pRL-TK 质粒作为内参,通过检测萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶活性的比值检测启动子的活性。结果表明:与转染空载体 PGL-3basic vector 相比,*Cuedc2-luc* 具有很高的启动子活性(图 3)。

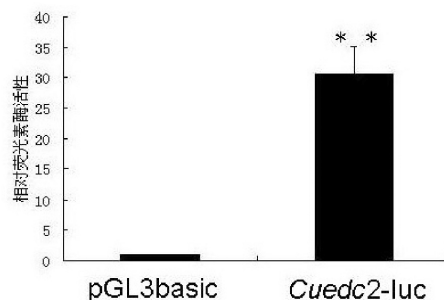


图 3 *Cuedc2-luc* 的启动子活性分析(**P<0.05)

Fig.3 Relative luciferase activity analysis of *Cuedc2-luc*(**P<0.05)

3 讨论

卵巢癌是妇科肿瘤最常见的死因之一^[10],尽管临床上多采用手术加化疗及内分泌治疗等综合措施,患者5年生存率依然不理想^[11]。目前研究认为,化疗药物中,铂类耐药是卵巢癌化疗失败、术后复发及高死亡率的重要原因^[12]。此外,卵巢癌的组织发生、卵巢癌肿瘤干细胞的存在等也被证实与卵巢癌的发生、发展及预后相关^[13]。因此,卵巢癌的演变进程中具体的病因及相关分子机制十分复杂。

*Cuedc2*是一种包含 Cue 结构域的蛋白,能够与孕酮受体相互作用,并促进孕酮诱导的受体的泛素化及降解^[6]。Cue 结构域本身是一种泛素化结合基序,具有单泛素化与多泛素化识别功能,故而 *Cuedc2* 与泛素化关系密切^[14]。*Cuedc2* 在人体组织中广泛表达,其所执行的功能也多种多样,如在细胞有丝分裂中,*Cuedc2* 可被 CDK1 磷酸化,进而通过释放 APC/C 复合体促进纺锤体检查点的失活;还能与 I κ B 激酶直接相互作用,抑制其活性,从而参与 TNF 信号途径及 NF κ B 的核转位等^[15]。值得注意的是,*Cuedc2* 与肿瘤的密切关系,最新研究指出 *Cuedc2* 在乳腺癌的发展和在治疗中起关键作用,其机制可能与 *Cuedc2* 和 ER α 相互作用并使之下调有关。由于 *Cuedc2* 在卵巢癌中高表达,其在卵巢癌的发生、发展及治疗中的作用开始受到关注。因此,研究 *Cuedc2* 的转录调控,对于我们进一步认识该分子的表达特征、表达水平及其与其它分子相互作用的机制具有十分重要的意义。

本研究应用生物信息学手段,对 *Cuedc2* 翻译起始位点上游约 2000bp 进行了分析,结果显示其中含有可能的启动子区域,进一步预测其转录起始位点,发现在其附近缺乏经典的 TATA 盒及 GC 盒,但含有 c-myc、GATA-3 等与肿瘤发生相关的转录因子结合位点,提示这些因子可能与 *Cuedc2* 的表达存在密切联系。我们从人卵巢癌基因组 DNA 中成功地扩增出了位于 *Cuedc2* 翻译起始位点上游 1982bp 的序列,经测序验证正确后将之克隆入荧光素酶报告基因载体 PGL-3basic,然后在 HEK293 细胞系中验证其转录活性,实验结果表明 *Cuedc2*-luc 具有较高的启动子活性,至于该序列是否受到相关转录因子的特异性调控还有待进一步的实验。总之,*Cuedc2* 启动子的克隆与鉴定为我们深入了解 *Cuedc2* 的基因表达调控机制及其功能奠定了良好的基础。

参考文献(References)

[1] M. van Hezewijk, E. Bastiaannet, H. Putter, A.N. et al. Effect of local therapy on locoregional recurrence in postmenopausal women with breast cancer in the Tamoxifen Exemestane Adjuvant Multinational (TEAM) trial[J]. *Radiother Oncol*, 2013, 108(2): 190-196

[2] C.L. Tsai, H.M. Wu, C.Y. Lin, et al. Estradiol and Tamoxifen Induce Cell Migration through GPR30 and Activation of Focal Adhesion Kinase (FAK) in Endometrial Cancers with Low or without Nuclear Estrogen Receptor alpha (ERalpha)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72999

[3] H. Brauch, M. Schwab. Prediction of tamoxifen outcome by genetic variation of CYP2D6 in postmenopausal women with early breast cancer[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, [Epub ahead of Print]

[4] T. Kalampokas, C. Sofoudis, C. Anastasopoulos, et al. Effect of tamoxifen on postmenopausal endometrium[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2013, 34(4): 325-328

[5] P.J. Zhang, J. Zhao, H.Y. Li, et al. CUE domain containing 2 regulates degradation of progesterone receptor by ubiquitin-proteasome[J]. *EMBO J*, 2007, 26(7): 1831-1842

[6] X. Pan, T. Zhou, Y.H. Tai, et al. Elevated expression of CUEDC2 protein confers endocrine resistance in breast cancer [J]. *Nat Med*, 2011, 17(6): 708-714

[7] E.H. Shinn, D.J. Lenihan, D.L. Urbauer, et al. Impact of cardiovascular comorbidity on ovarian cancer mortality[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013

[8] A. Docquier, A. Garcia, J. Savatier, et al. Negative Regulation of Estrogen Signaling by ERbeta and RIP140 in Ovarian Cancer Cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(9): 1429-1441

[9] N.H. Kang, K.A. Hwang, H.R. Lee, et al. Resveratrol regulates the cell viability promoted by 17beta-estradiol or bisphenol A via down-regulation of the cross-talk between estrogen receptor alpha and insulin growth factor-1 receptor in BG-1 ovarian cancer cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 373-379

[10] L. Farrand, J.Y. Kim, A. Im-Aram, et al. An improved quantitative approach for the assessment of mitochondrial fragmentation in chemoresistant ovarian cancer cells[J]. *PLoSOne*, 2013, 8(9): e74008

[11] U.K. Scarlett, J.R. Conejo-Garcia. Modulating the tumor immune microenvironment as an ovarian cancer treatment strategy [J]. *Expert Rev Obstet Gynecol*, 2012, 7(5): 413-419

[12] A. Maciejczyk, P. Surowiak. Quercetin inhibits proliferation and increases sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel[J]. *Ginek Pol*, 2013, 84(7): 590-595

[13] K. Yasuda, T. Torigoe, R. Morita, et al. Ovarian cancer stem cells are enriched in side population and aldehyde dehydrogenase bright overlapping population[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e68187

[14] C. Thomas, J.A. Gustafsson. A CUE hints at tumor resistance[J]. *Nat Med*, 2011, 17(6): 658-660

[15] W.N. Zhang, L. Wang, Q. Wang, et al. CUEDC2 (CUE domain-containing 2) and SOCS3 (suppressors of cytokine signaling 3) cooperate to negatively regulate Janus kinase 1/signal transducers and activators of transcription 3 signaling[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(1): 382-392