

pGL3-Claudin-1 promoter 荧光素酶报告基因质粒的构建及其功能鉴定^{*☆}

王洪波, 王鹏远, 刘玉村, 万远廉

Construction and characterization of pGL3-Claudin-1 promoter luciferase reporter plasmid

Wang Hong-bo, Wang Peng-yuan, Liu Yu-cun, Wan Yuan-lian

文章亮点:

重组质粒 DNA 测序结果采用 NCBI blast 比对与 GenBank(gi|62750811)中大鼠 Claudin-1 基因启动子序列完全匹配。重组荧光素酶报告基因转录活性检测与 pGL3-Basic 质粒相比, 重组 pGL3 质粒转录活性明显增强。经过测序和转染结果证实有效地 pGL3-Claudin-1 启动子质粒构建成功。

Abstract

BACKGROUND: Claudin-1 is a multi-functional protein; besides, construction of tight junction strand to seal paracellular space, which expression disorder in transcriptional level may be also involved in malignant cancer for invasion, metastasis and prognosis as a molecular marker.

OBJECTIVE: To construct recombinant rat Claudin-1 luciferase reporter plasmid.

METHODS: Oligonucleotide containing about 2 000 bp in 5'-UTR of rat Claudin-1 genome DNA was designed and synthesized, which was inserted into pGL3-Basic vector after double digestion by restriction enzyme *Kpn* I and *Mlu* I; competent *E.coli* DH5 α and pMD18-T-simple vector were used for screening of positive sample. Positive clones were identified by PCR and sequencing. There were four groups in the experiment: Control group, positive control group (transfected by pGL3-promoter plasmid), negative group (transfected by pGL3-Basic plasmid) and experimental group (transfected by pGL3-Claudin-1 promoter plasmid). Claudin-1 promoter activity was detected in the 293T cell transiently transfected.

RESULTS AND CONCLUSION: The result of recombinant pGL3 plasmid from DNA sequencing was fully consistent with promoter sequence of rat Claudin-1 gene in GenBank (gi|62750811) by NCBI blast assay. Compared with pGL3-basic plasmid, the transcriptional activity of recombinant luciferase report gene in recombinant pGL3 plasmid was obviously increased ($P < 0.001$). Gene sequencing and transfection results confirmed that effective pGL3-Claudin-1 promoter plasmid had been constructed successfully.

Wang HB, Wang PY, Liu YC, Wan YL. Construction and characterization of pGL3-Claudin-1 promoter luciferase reporter plasmid. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(28): 5251-5254. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: Claudin-1 是一种多功能蛋白, 除了组成紧密连接封闭细胞间隙, 它在转录水平的表达失调可能作为一种分子标志反映到恶性肿瘤的侵袭转移和预后中。

目的: 构建重组大鼠重组 Claudin-1 荧光素酶报告基因质粒。

方法: 设计和合成包含 5'非转录区的约 2 000 bp 的脱氧核糖核酸链, 经过限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Mlu* I 酶切后插入到 pGL3-Basic 载体中, 并用感受态 *E.coli* DH5 α 和 Pmd18-T-simple 载体筛选阳性样品。阳性克隆通过测序和 PCR 证实。实验分为 4 组: 对照组, 阳性对照组(pGL3-promoter 质粒转染), 阴性对照组(转染 pGL3-Basic 质粒), 实验组(转染 pGL3-Claudin-1 promoter 质粒)。将质粒转染 293T 细胞检测 Claudin-1 启动子活性。

结果与结论: 重组质粒 DNA 测序结果采用 NCBI blast 比对与 GenBank(gi|62750811)中大鼠 Claudin-1 基因启动子序列完全匹配。重组荧光素酶报告基因转录活性检测与 pGL3-Basic 质粒相比, 重组 pGL3 质粒转录活性明显增强 ($P < 0.001$)。经过测序和转染结果证实有效的 pGL3-Claudin-1 启动子质粒构建成功。

关键词: 转录因子; Claudin-1; 重组质粒; 基因; 组织工程

王洪波, 王鹏远, 刘玉村, 万远廉. pGL3-Claudin-1 promoter 荧光素酶报告基因质粒的构建及其功能鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(28): 5251-5254. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

Department of General Surgery, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Wang Hong-bo[☆], Doctor, Department of General Surgery, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Wang12hong3bo@126.com

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No.31040041*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.28.025

Received: 2011-12-11
Accepted: 2011-12-31

北京大学第一医院普外科, 北京市 100034

王洪波[☆], 男, 1981 年生, 山东省潍坊市人, 汉族, 2012 年北京中医药大学毕业, 博士, 主要从事胃肠疾病研究。
Wang12hong3bo@126.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344 (2012)28-05251-04

收稿日期: 2011-12-11
修回日期: 2011-12-31
(20111011017W · T)

0 引言

Claudins基因家族是细胞连接的重要组成部分, 目前发现的家族成员至少有24种, 它们在氨基酸序列同源性、空间结构和核内定位都有一定的差异性和共同性^[1-2], 其中Claudin-1能维持正常细胞和组织间的极性^[3], 区分基底面与顶面, 在不同组织中调节吸收、分泌和阻止致病因素的入侵, 发挥防御功能^[4]。Claudin-1基因的过表达研究证实这种Claudins基因亚型能增加跨细胞电阻^[5], 而Claudin-1敲除的小鼠因为经皮脱水严重而迅速死亡, 当然这不能完全模拟人体状态, 但是显示出对上皮连接紧密性的重要作用^[6]。同时Claudin-1的表达还与肿瘤的良恶性、侵袭转移和预后相关^[7-9]。所以, 作者构建了含有大鼠Claudin-1基因启动子区的荧光素酶报告基因质粒, 并检测转录调控活性, 以期了解其启动子区对基因转录活性的调控机制。

1 材料和方法

设计: 分子生物学水平的体外观察实验。

时间及地点: 于2011-05/07在北京大学医学部生理实验室完成。

材料: *E. coli* DH5α感受态细菌购自上海生工公司制备, -70 °C保存。

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
pGL3-Basic、pGL3-promoter 荧光素酶报告基因质粒, β-galactosidase (β-gal)质粒	美国 Promega 公司
PCR 引物	北京三博远志公司
<i>E. coli</i> DH5α 感受态细菌	上海生工公司
DNA 纯化试剂盒、质粒提取及切胶回收试剂盒	美国 Omega 公司
高保真 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase with GC Buffer、pMD18-T simple vector、T ₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 <i>Mlu</i> I 和 <i>Kpn</i> I	日本 Takara 公司
转染试剂 Jetpei	美国 Polyplus 公司
DMEM 高糖培养基	美国 Gibco 公司
细胞系 293T(按照文献要求 ^[10] , 培养于含体积分数 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基)	美国 Atcc 公司

实验方法:

大鼠基因组DNA的提取: 通过饱和氯化钠法提取全细胞中基因组DNA^[11]。

Claudin-1启动子序列扩增和纯化: 根据大鼠Claudin-1

启动子区设计上下游引物, 包含Claudin-1启动子核心区域的DNA片段, 其中上游引物(5'-GGG TAC CTC CTC TGA GGC TAG GGA CA-3', 含有*Kpn* I 酶切位点), 下游引物(5'-GAC GCG TTC AGT GGC AGG TGC AGA AAG-3', 具有*Mlu* I 酶切位点)。扩增片段长度约2 000 bp, 包括转录起始点后+170 bp。反应以大鼠细胞基因组DNA为模板, 5×PrimeSTAR® Buffer(Mg²⁺ plus)10 μL, dNTP Mixture(各2.5 mmol/L)4 μL, Primer 1(10 μmol/L)1 μL, Primer 2(10 μmol/L)1 μL, 模板DNA<200 ng, Prime STAR® HS DNA Polymerase (2.5 U/μL)0.5 μL, 灭菌蒸馏水补充到50 μL。反应条件为94 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 共计40个cycle, 将PCR产物行琼脂糖电泳, 胶体浓度为0.8%, 在紫外灯照射下对目的条带切胶回收。

目的片断与TA载体连接并行蓝白斑筛选: 按照Takara公司说明书步骤, TA载体与插入序列0.3 pmol于10 μL体系中16 °C连接过夜, 次日将产物转化细菌, 转化1 h后取100 μL均匀涂布有氨苄西林(100 mg/L), 18 μL IPTG(24 g/L), 36 μL X-gal(20 g/L)的LB平板, 37 °C培养8~16 h后, 挑取单克隆白斑溶于20 μL双蒸水中并作标记, 取5 μL菌液作为模板行PCR初步鉴定, 阳性者取500 μL菌液, 使用TA载体通用引物测序。阳性结果者按照说明行质粒小提。

质粒酶切、切胶回收纯化和重组质粒连接与鉴定: 将连于TA载体质粒、pGL3-Basic质粒以内切酶*Mlu* I 和*Kpn* I 37 °C作双酶切3 h, 酶切产物使用试剂盒提取纯化。提取的目的片断与开环的pGL3-Basic序列于16 °C反应过夜, 次日转化细菌, 8~16 h挑取单克隆行PCR鉴定, 阳性者顺序经过质粒小提, 质粒中提。

胞转染及荧光素酶活性鉴定: 将2×10⁵个细胞接种于24孔培养板中, 在37°C、体积分数5%CO₂ 培养箱中培养。细胞处理分为4组: 对照组, 阳性对照组(pGL3-promoter质粒转染), 阴性对照组(转染pGL3-Basic质粒), 实验组(转染pGL3-Claudin-1 promoter质粒)。当细胞达到40%~50%融合后, 参照Jetpei转染试剂说明, 以每孔中pGL3质粒0.9 μg, 相应0.1 μg β-gal质粒作为参照共转染细胞。细胞转染24 h后裂解细胞, 收集上清并按照文献[12]说明使用Turner Designs Luminometer TD20/20 (Promega)测定荧光素酶活性并经过β-gal结果校正。

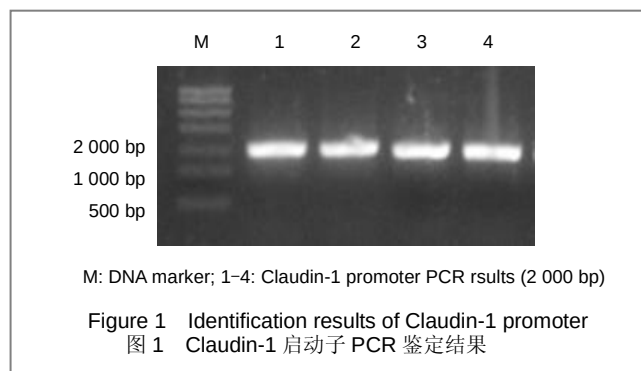
主要观察指标: 葡聚糖电泳观察不同大小的DNA片段; 重组质粒荧光素酶活性检测。

统计学分析: 荧光素酶活性实验中每组样品处理至

少3次, 结果通过Prism 5软件分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差分析处理。以 $P < 0.05$ 差异有显著性意义。

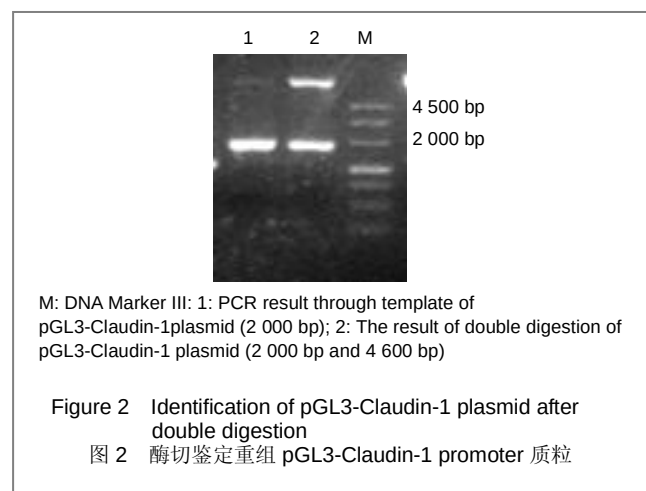
2 结果

2.1 Claudin-1基因启动子体外扩增 见图 1。



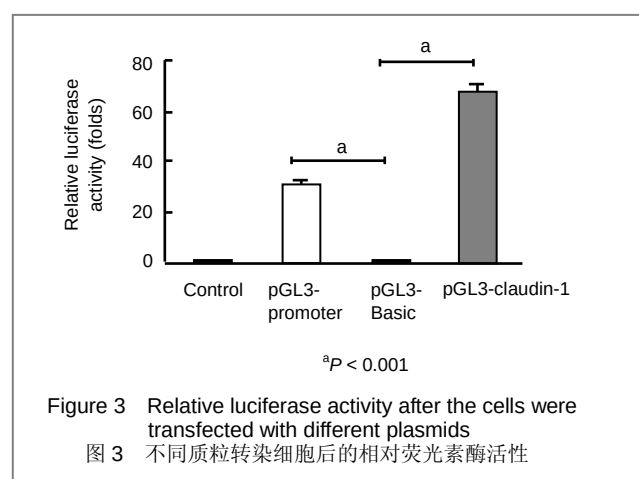
Claudin-1启动子序列扩增和纯化以基因组DNA为模板扩增的PCR产物经过0.8%琼脂糖电泳后, 在紫外灯下可见清晰、惟一的条带, 与Marker中相应大小的条带相匹配。

2.2 重组质粒酶切鉴定 酶切产物与线形pGL3-Basic质粒的连接和鉴定重组质粒DNA测序由北京三博远志公司完成, 测序结果采用NCBI blast比对与GenBank (gi|62750811)中大鼠Claudin-1基因启动子序列完全匹配。从转化后的细菌中挑取单克隆行PCR扩增, 同样能得到约2 000 bp的单一条带。提取pGL3-Claudin-1 promoter质粒行Mlu I 和Kpn I 双酶切, 得到约4.6 kb的线形pGL3-Basic和2 kb的目的片段, 见图2。



2.3 重组质粒荧光素酶活性检测 重组荧光素酶报告基因转录活性检测与pGL3-Basic质粒相比, 重组pGL3质粒转录活性明显增强, 差异有非常显著性意义($P <$

0.001), 见图3。



3 讨论

Claudin-1基因是紧密连接跨膜蛋白Claudins家族成员之一, 它4次跨过细胞膜, 它们的相对分子质量在22 000~27 000之间, 蛋白羧基端和氨基端均位于胞浆面, 其形成的细胞外的两个外环, 通过与自身或其他跨膜蛋白联系调节紧密连接间的通透性, 影响溶质或带电离子的通过^[13]。在生物体中, 体内环境必须与体外环境分开, Claudins等成分共同构成的紧密连接可以封闭细胞间隙, 保持上皮和内皮等的完整性和连续性。

紧密连接在肠道上皮、血管内皮和表皮中作为免疫屏障, 保护机体免受致病因素的伤害, 在慢性实验性自身免疫性脑脊髓炎中, Claudin-1通过封闭血脑屏障减轻炎症反应^[14], 在DSS造成的肠病模型中, Claudin-1的表达明显下降^[15], 但有的实验结果并不一致^[16], 这可能是肠道组织有癌肿分化倾向的标志之一或者是对损伤的代偿性修复作用, 这说明Claudin-1在感染及炎症反应中的作用也不是完全一致的, 有时候甚至是相反的^[17]。在肿瘤细胞中Claudin-1作为诊断和预后的指标, 越来越受到重视。Clear cell RCC和临床参数中, 老年人、肿瘤尺寸大、T期或者M期, Fuhman核分期的患者Claudin-1表达量相对更高, 也更容易发生术后远处转移^[18]。有趣的是, Claudin-1的这种作用具有组织特异性, 在结肠癌症中Claudin-1的表达是与肿瘤的形成、进展、侵袭和转移呈负相关^[19], 而Claudin-1则能直接抑制胃癌^[20]。在研究癌症的通路中, 癌症的发生多与癌症相关基因的表达失控相关, 因此, 在表达水平特别是转录水平研究Claudin-1基因的表达调控对于正常组织和/或癌症的发生进展有重要意义^[21-22]。

在Claudin-1基因转录调控过程中, 多种转录因子参

与其中。在大鼠Claudin-1基因中, TATA盒使基因具有最基本的转录活性, 多个SP1结合位点分布在启动子区^[23]。另外多种转录因子, 例如RUNX3, Smad4和Snail等也与Claudin-1基因的转录表达相关^[20, 24-25]。

本实验成功构建Claudin-1基因荧光素酶报告质粒, 克隆了Claudin-1基因启动子区约2 000 bp序列, 使用转染试剂Jetpei成功转染293T工具细胞。经过荧光素酶活性鉴定发现, pGL3-Basic和阴性对照组几乎无荧光素酶报告基因转录活性; pGL3-Claudin-1和pGL3-promoter质粒均有明显转录活性, 且前者的转录活性明显高于后者。表明claudin-1基因启动子区2 000 bp碱基启动了荧光素酶的表达, 证实了这段序列良好的启动活性。

鉴于Claudin-1的表达失调与多种生物效应显著相关, 特别是与癌症的发生、发展和转归具有明显相关性, 可以通过它来了解癌肿进程中基因的表达失调, 为今后肿瘤的诊断和治疗提供一定理论依据。

4 参考文献

- [1] Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci.* 2004;117 (Pt 12): 2435-2447.
- [2] Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biol.* 2009; 10(8): 235.
- [3] Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10(6): 1337-1345.
- [4] Andras IE, Pu H, Deli MA, et al. HIV-1 Tat protein alters tight junction protein expression and distribution in cultured brain endothelial cells. *J Neurosci Res.* 2003; 74(2):255-265.
- [5] Inai T, Kobayashi J, Shibata Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol.* 1999; 78:849-855.
- [6] Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002; 156: 1099-1111.
- [7] Riski M, Santala M, Soini Y, et al. Claudins 1, 3M, 3S, 4, 5 and 7 in vulvar neoplasms compared with vulvar squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2011.[Epub ahead of print].
- [8] Ouban A, Hamdan H, Hakam A, et al. Claudin-1 Expression in Squamous Cell Carcinomas of Different Organs: Comparative Study of Cancerous Tissues and Normal Controls. *Int J Surg Pathol.* 2011.[Epub ahead of print].
- [9] Yoshida T, Kinugasa T, Akagi Y, et al. Decreased expression of claudin-1 in rectal cancer: a factor for recurrence and poor prognosis. *Anticancer Res.* 2011; 31(7):2517-2525.
- [10] Karyala P, Namsa ND, Chilakalapudi DR. Translational up-regulation and high-level protein expression from plasmid vectors by mTOR activation via different pathways in PC3 and 293T cells. *PLoS One.* 2010; 5(12):e14408.
- [11] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:1215.
- [12] Zhang K, Yao HP, Wang MH. Activation of RON differentially regulates claudin expression and localization: role of claudin-1 in RON-mediated epithelial cell motility. *Carcinogenesis.* 2008; 29(3):552-559.
- [13] Will C, Fromm M, Müller D. Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. *Perit Dial Int.* 2008; 28(6):577-584.
- [14] Pfeiffer F, Schäfer J, Lyck R, et al. Claudin-1 induced sealing of blood-brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 2011; 122(5):601-614.
- [15] Xia XM, Wang FY, Zhou J, et al. CXCR4 antagonist AMD3100 modulates claudin expression and intestinal barrier function in experimental colitis. *PLoS One.* 2011; 6(11):e27282.
- [16] Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, et al. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest.* 2008; 88(10):1110-1120.
- [17] Tong Y, Zhu Y, Xia X, et al. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2011; 85(6):2793-2802.
- [18] Shin HI, Kim BH, Chang HS, et al. Expression of claudin-1 and -7 in clear cell renal cell carcinoma and its clinical significance. *Korean J Urol.* 2011; 52(5):317-322.
- [19] Ersoz S, Mungan S, Cobanoglu U, et al. Prognostic importance of Claudin-1 and Claudin-4 expression in colon carcinomas. *Pathol Res Pract.* 2011; 207(5):285-289.
- [20] Chang TL, Ito K, Ko TK, et al. Claudin-1 has tumor suppressive activity and is a direct target of RUNX3 in gastric epithelial cells. *Gastroenterology.* 2010; 138(1):255-265.
- [21] Dos Reis PP, Bharadwaj RR, Machado J, et al. Claudin-1-overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2008; 113(11):3169-3180.
- [22] Harten SK, Shukla D, Barod R, et al. Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(3):1089-1101.
- [23] Dufresne J, Cyr DG. Activation of an SP binding site is crucial for the expression of claudin 1 in rat epididymal principal cells. *Biol Reprod.* 2007; 76(5):825-832.
- [24] Shiou SR, Singh AB, Moorthy K, et al. Smad4 regulates claudin-1 expression in a transforming growth factor-beta-independent manner in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67(4):1571-1579.
- [25] Ohkubo T, Ozawa M. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 9):1675-1685.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金(31040041)资助。

作者贡献: 设计者为第二、三作者, 实施、评估者分别为第一作者。盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 未涉及与相关伦理道德冲突的内容。