

刺五加法尼基焦磷酸合酶、鲨烯合酶、鲨烯环氧酶基因启动子 CpG 岛的预测与功能验证

龙月红, 宋 菊, 林丽梅, 尹 峰, 邢朝斌*

华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210

摘 要: 目的 获得刺五加法尼基焦磷酸合酶(FPS)、鲨烯合酶(SS)、鲨烯环氧酶(SE)基因启动子的 CpG 岛分布情况和功能活性。方法 针对已克隆的 FPS、SS、SE 基因启动子序列, 使用 EMBOSS 和 Li Lab 进行 CpG 岛预测, 同时利用 GUS 基因作为报告基因, pCAMBIA1301 质粒作为表达载体, 利用根癌农杆菌转化拟南芥进行功能验证。结果 发现刺五加 FPS、SS 启动子含有 2 个 CpG 岛, 长度分别是 520、218 bp 和 108、103 bp, SE 启动子含有 3 个 CpG 岛, 长度为 290、119、149 bp。FPS、SS、SE 基因启动子均具有启动活性, 但强度不一, SS 启动子活性最强。结论 研究首次获得刺五加 FPS、SS、SE 基因启动子区域的 CpG 岛分布情况, 以及其功能活性, 为后续进一步 FPS、SS、SE 甲基化分析及其在刺五加中的表达调控研究奠定了基础。

关键词: 刺五加; 启动子; CpG 岛; 法尼基焦磷酸合酶; 鲨烯合酶; 鲨烯环氧酶; 功能活性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)24-5076-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.003

Prediction of CpG islands and functional verification on promoters of FPS, SS, SE in *Eleutherococcus senticosus*

LONG Yue-hong, SONG Ju, LIN Li-mei, YIN Feng, XING Zhao-bin

College of Life Science, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective To obtain the distribution and functional activity of CpG islands in promoters of FPS, SS, and SE from *Eleutherococcus Senticosus*. **Methods** Based on the promoter sequence of FPS, SS and SE, CpG islands were predicted by using EMBOSS and Li Lab. The functional verification of transformed *Arabidopsis thaliana* was mediated by *Agrobacterium tumefaciens* by using GUS and pCAMBIA1301 plasmid as the reporter gene and expression vector respectively. **Results** Two CpG islands were found in FPS and SS promoter with the lengths of 520 bp, 218 bp and 108 bp, 103 bp, and three CpG islands in SE promoter in 290 bp, 119 bp and 149bp. The promoters of FPS, SS and SE all had promoter activities at different level, in which SS promoter was the highest one. **Conclusion** The functional verification and distributions of CpG islands in the promoters area of FPS, SS, and SE were reported in this research at first time, which established the foundation for the methylation analysis of FPS, SS, and SE and the further studying of the mechanism expression regulation in *E. Senticosus*. **Key words:** *Eleutherococcus senticosus* (Ruper. et Maxim.) Maxim.; promoter; CpG islands; farnesyl diphosphate synthase; squalene synthase; squalene epoxidase; functional activity

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Ruper. et Maxim.) Maxim. 是我国的珍贵药用植物, 具有增强免疫力、抗衰老等多种生物活性, 三萜皂苷是其主要活性成分之一^[1]。而在三萜皂苷的生物合成途径^[2]中, 需要法尼基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)、鲨烯合酶(squalene synthase, SS)和鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)等多种关键酶的催化作用。

CpG 岛(CpG Islands)是一段富含 CpG 二核苷酸且 GC 量高的 DNA 序列^[3], 主要存在于基因上游的调控区域。在高等生物中, CpG 二核苷酸序列中的胞嘧啶通常是呈甲基化状态, 尤其是启动子区域中的 CpG 岛^[4]。启动子甲基化可抑制转录因子与启动子的结合, 从而降低转录水平或停止转录^[5]。

本课题组前期已克隆得到刺五加的 FPS^[6]、SS^[7]、

收稿日期: 2017-09-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570683); 华北理工大学培育基金资助项目(SP201508); 华北理工大学研究生创新项目(2017S12)

作者简介: 龙月红(1974—), 女, 实验师, 研究方向为分子生物学。

*通信作者 邢朝斌(1975—), 男, 教授, 研究方向为分子生物学、药用植物细胞工程。

Tel: (0315)3725859 Fax: (0315)3726341 E-mail: xzbheuu@126.com

SE 基因的启动子序列,在此使用在线生物软件预测其的 CpG 岛分布情况,并进一步使用 pCambia1301 质粒作为表达载体, GUS 作为报告基因构建载体, 转导根癌农杆菌转化拟南芥进行功能验证。为深入探明这 3 个关键酶对刺五加三萜皂苷合成的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 Top10 感受态细胞和 pCambia1301 质粒购自天根生化科技(北京)有限公司, 根癌农杆菌、T₄ DNA 连接酶、PstI 酶、NcoI 酶、DL 2000 Marker 等均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司, 其他生化试剂为国产或进口分析纯。拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 由华北理工大学邢朝斌教授鉴定。

1.2 启动子 CpG 岛的预测

利用 EMBOSS (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>)^[8]

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

名称	序列 (5'-3')	名称	序列 (5'-3')
FPSF	TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGATTTTATCAAACCCGAG	FPSR	TTACCCTCAGATCTACCATGGTCTGGCTGGTTATGTGTG
SSF	TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGAACCTCCCTCTAACAATAAG	SSR	TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGAACCTCCCTCTAACAATAAG
SEF	TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGTAGGTTCTATCGGCCACC	SER	TTACCCTCAGATCTACCATGGGAAGTTAGTTGGACGTTTAC
FPSF'	TTCTCTTGTCGCCCTGGAT	FPSR'	TTCTCTTGTCGCCCTGGAT
SSF'	CCCTCCGTGGGTCTCTCTG	SSR'	ACTGGTTGGACGCTTGATT
SEF'	GTCTATCCTGTGTCTGCCTTC	SER'	GACCCATTTTACCATTGTG

1.3.2 功能验证 选取花蕾期的拟南芥, 将其在 3 种重组质粒的重悬液中浸泡数秒, 再于黑暗条件下保湿培养 1 d; 之后种植于人工气候室, 保持土壤湿润, 温度在 22~24 °C, 光照时间为 16 h, 强度为 200 μmol/(m²·s); 当拟南芥长出果荚时, 减少浇水量至果荚成熟变为褐色, 分别收取 3 种拟南芥的种子。

对种子进行消毒, 均匀铺于含有潮霉素的 MS 培养基 (25.0 mg/L 潮霉素、1.0%蔗糖、0.8%琼脂, pH 值 5.8) 上, 风干表面多于水分, 然后加盖密封于 4 °C 冰箱 2 d, 使其纯化。之后转入人工气候室培养, 待植株长成, 采取新鲜嫩叶, 提取 DNA, 利用 FPSF'-FPSR'、SSF'-SSR' 和 SEF'-SER' (表 1) 进行 PCR 筛选转基因抗性植株, 针对筛选出的拟南芥进一步进行 GUS 染色^[11]验证。

2 结果与分析

2.1 启动子区 CpG 岛预测结果

EMBOSS (图 1) 和 Li Lab (图 2) 两者的预测结果完全一致, FPS 和 SS 基因的启动子均含有

和 Li Lab (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/Methprimer.cgi>)^[9]在线软件对克隆测序得到的 FPS、SS、SE 基因启动子序列进行 CpG 岛预测。

1.3 启动子功能验证

1.3.1 表达载体构建 针对已克隆得到的 FPS、SS、SE 基因序列, 分别使用特异性引物 FPSF-FPSR、SSF-SSR、SEF-SER (表 1) 进行扩增, 扩增出含有 PstI (5'-CTGCACG-3') 酶切位点和 NcoI (5'-CCATGG-3') 酶切位点的启动子序列。利用 PstI 和 NcoI 对启动子序列与载体 pCambia1301 进行酶切, 然后使用 T₄ DNA 连接酶连接到 pCambia1301 载体的 GUS 基因上游, 形成重组质粒 (pCambia1301-FPS、pCambia1301-SE 和 pCambia1301-SS), 转化 Top10。采用氨苄青霉素培养基进行培养之后, 选取阳性转化子进行测序确认。随后使用冻融法^[10]将重组质粒转入根癌农杆菌中, 获取阳性转化子。

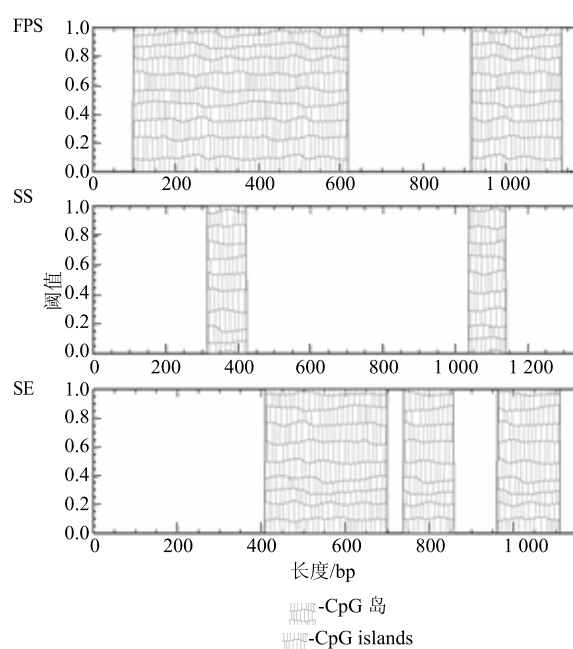


图 1 EMBOSS 预测结果

Fig. 1 Prediction results of EMBOSS

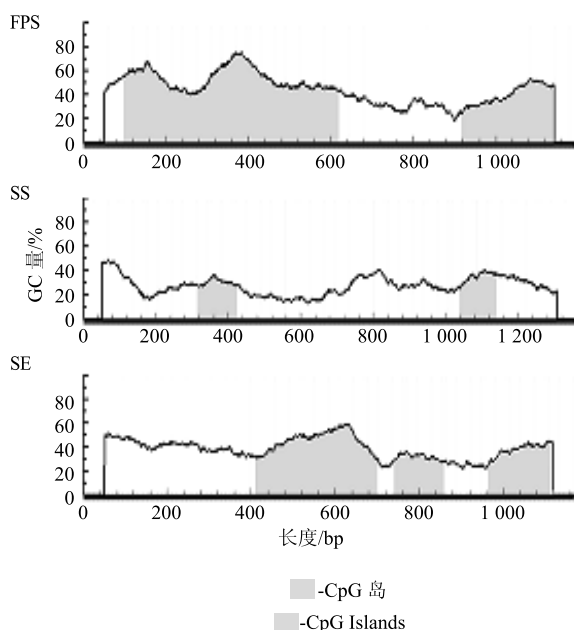


图 2 Li Lab 预测结果

Fig. 2 Prediction result of Li Lab

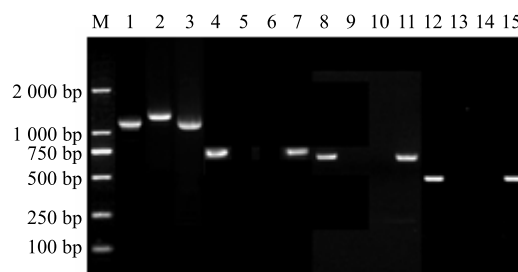
2 个 CpG 岛, 其中, FPS 启动子的 CpG 岛分别位于 98~671 bp 和 918~1 135 bp 处, 长度为 520 bp 和 128 bp, 总长 738 bp; SS 基因启动子在 280~440 bp 和 1 000~1 160 bp 区域富含 CG, 其 CpG 岛分别长 108 (316~423) bp 和 103 (1 038~1 140) bp。SE 基因的启动子在 400~1 120 bp 富含 CG, 具有 3 个 CpG 岛: 290 (410~699) bp、119 (740~858) bp 和 149 (963~1 111) bp。

2.2 启动子片段表达载体的构建

通过使用 3 对特异性引物进行 PCR 扩增, 得到 3 条含 PstI 和 NcoI 双酶切位点的启动子序列 (图 3)。利用 PstI 和 NcoI 的消化与内切, 去除 pCambia1301 表达载体的 35S 启动子, 并分别与 3 条启动子序列连接, 得到重组质粒。经冻融法转化, 获得阳性农杆菌。

2.3 转基因拟南芥筛选与 GUS 染色

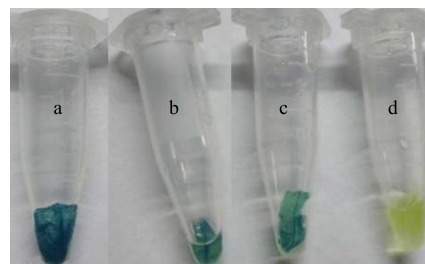
将含有重组质粒的农杆菌转化拟南芥, 通过潮霉素培养基筛选, 得到转基因拟南芥。培养后, 利用 PCR 检测转基因拟南芥植株 (图 3), 结果发现, 分别随机抽取的 1 株 3 种转基因拟南芥 PCR 产物与重组质粒的 PCR 产物长度一致, 证明收集的植株均呈阳性。紧接着对其叶片进行 GUS 染色 (图 4), 结果表明, 3 种重组质粒转化的拟南芥叶片均显现蓝色, 说明 FPS、SS、SE 的启动子均能启动 GUS 基因的表达, 具有启动子活性; 3 叶片染色程度不



M-Marker 1-FPS 启动子 2-SS 启动子 3-SE 启动子 4-转 FPS 拟南芥 8-转 SS 拟南芥 12-转 SE 拟南芥 5、9、13-野生型拟南芥 6、10、14-阴性对照 (纯水) 7、11、15-阳性对照 (重组质粒: pCambia1301-FPS、pCambia1301-SE、pCambia1301-SS)

M-Marker 1-FPS promoter 2-SS promoter 3-SE promoter 4-Arabidopsis transformed with FPS 8-Arabidopsis transformed with SS 12-Arabidopsis transformed with SE 5, 9, 13-wild type 6, 10, 14-negative control (pure water) 7, 11, 15-positive control (recombinant plasmids: pCambia1301-FPS, pCambia1301-SE, pCambia1301-SS)

图 3 SS、FPS、SE 启动子克隆与转基因抗性植株 PCR 验证
Fig. 3 Cloning promoter of SS, FPS, and SE and validation of PCR in transgenic and antibiotic plants



a-转 SS 拟南芥 b-转 SE 拟南芥 c-转 FPS 拟南芥 d-未转基因拟南芥

a-Arabidopsis transformed with SS b-Arabidopsis transformed with SE c-Arabidopsis transformed with FPS d-non-transgenic Arabidopsis

图 4 SS、SE 及 FPS 转基因拟南芥叶片 GUS 染色

Fig. 4 GUS staining of leaves transformed with SS, SE, and FPS

一, 证明它们的启动活性强度不同。

3 讨论

启动子是基因上一段具有特异功能的 DNA 序列, 它被 RNA 聚合酶识别并结合, 起始转录, 控制基因的表达强度^[12]。本研究使用 pCambia1301 质粒构建 GUS 植物表达载体, 转化拟南芥, 对刺五加 3 个关键酶基因 FPS、SS 和 SE 的启动子进行功能验证, 发现三者均能启动 GUS 基因的表达, 具有启动子活性, 但启动活性强度不同。

通过生物信息学在线软件 EMBOSS 和 Li Lab 分析 FPS、SS 和 SE 的启动子 CpG 岛分布情况,两者的预测结果完全一致。FPS 和 SS 基因的启动子存在 2 个 CpG 岛,总长度分别是 738 bp 和 211 bp, SE 启动子存在 3 个 CpG 岛,总长度为 558 bp。Jian 等^[4]发现启动子序列中的 CpG 岛胞嘧啶通常是呈甲基化状态。因此,三者启动活性不一,可能与启动子甲基化有关。因为基因的转录与基因的甲基化是紧密交织在一起,基因启动子区域发生甲基化,导致 DNA 构象变化,影响蛋白质与 DNA 的相互作用,使 RNA 聚合酶对启动子的识别率降低,或者无法识别,从而抑制了转录因子与启动子区域 DNA 的结合,降低了基因的表达,甚至使基因沉默^[13-14]。Ziberman 等^[15]已针对拟南芥全基因组进行甲基化分析,以及 Li 等^[16]对 GGH 基因启动子 CpG 岛甲基化研究,证实了这一观点。本研究的结果提示 FPS、SS 和 SE 在刺五加中的表达可能受到甲基化的调控,为进一步研究其调控机制奠定基础。

参考文献

- [1] 涂正伟,周渭渭,单 淇,等. 刺五加的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [2] 邢朝斌,王一曼,陈正恒,等. 三萜皂苷的生物合成 [J]. 生命化学, 2005, 25(5): 420-422.
- [3] 许登高,周 扬,潘庆杰,等. 哺乳动物 CpG 岛甲基化研究进展 [J]. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2012, 29(4): 252-260.
- [4] Jian F, Guo P F. The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2009, 89: 67-84.
- [5] Heng J, Guo X, Wu W, *et al.* Integrated analysis of promoter mutation, methylation and expression of *AKT1* gene in Chinese breast cancer patients [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174022.
- [6] 宋 菊,林丽梅,尤鹏升,等. 刺五加 FPS 基因 DNA 序列及启动子的克隆与分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(7): 2584-2589.
- [7] 国红玉,劳凤云,李志栋,等. 刺五加鲨烯合酶基因 DNA 和启动子的克隆及分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(4): 1289-1294.
- [8] Liu H, Zhang L, Niu Z, *et al.* Promoter methylation inhibits BRD7 expression in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 253.
- [9] Li L C, Dahiya R. Methprimer: designing primers for methylation PCRs [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(11): 1427-1431.
- [10] 余云舟,杜 娟,王 罡,等. 重组质粒导入根癌农杆菌冻融法的研究 [J]. 吉林农业学报, 2003, 25(3): 257-259.
- [11] Li Y, Liu S, Wang H, *et al.* Methylation level of CpG islands in *GGH* gene promoter in pediatric acute leukemia [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173472.
- [12] 杨晓娜,赵昶灵,李 云,等. 启动子序列克隆和功能分析方法的研究进展 [J]. 云南农业大学学报, 2010, 25(2): 283-290.
- [13] Madan Babu M, Teichmann S A, Aravind L. Evolutionary dynamics of prokaryotic transcriptional regulatory networks [J]. *JMB*, 2006, 358(2): 614-633.
- [14] Juven-Gershon T, Hsu J Y, Theisen J W, *et al.* The RNA polymerase II core promoter -the gateway to transcription [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(3): 253-259.
- [15] Ziberman D, Gehring M, Tran R K, *et al.* Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(1): 61-69.
- [16] Li S X, Cong Y H, Liu Y P, *et al.* Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in Soybean [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 246-260.