文章编号：1674-8085(2019)03-0031-04

人 *WDR79* 基因启动子表达载体的构建及鉴定

杨　潮，何小杨，莫淑芳，戴　京，张欣宇，*陈　慧

(赣南师范大学生命科学学院，江西，赣州 341000)

摘　要：人 *WDR79* 是一种重要的支架蛋白，在端粒酶组装、卡哈尔体（Cahar body）形成和 DNA 损伤修复等过程中发挥着重要作用。采用 PCR 扩增技术获得人 WDR79 基因启动子上游 DNA 序列，构建人 *WDR79* 基因启动子荧光素酶报告基因载体 pGL3-*WDR79*-promoter；通过双酶切、琼脂糖凝胶电泳、DNA 测序和荧光素酶活性测定等实验手段，验证质粒 pGL3-*WDR79*-promoter 构建的正确性及其表达活性。本研究结果为进一步探讨人 *WDR79* 基因表达的调控机制奠定实验基础。

关键词：*WDR79*；启动子克隆；荧光素酶活性检测

中图分类号：　　**文献标识码**：A　　DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2019.03.006

CONSTRUCTION AND IDENTIFICATION OF THE EXPRESSION VECTOR CONTAINING THE HUMAN *WDR79* GENE PROMOTER

YANG Chao, HE Xiao-yang, MO Shu-fang, DAI Jing, ZHANG Xin-yu, *CHEN Hui

（College of Life Sciences, Gannan Normal University, Ganzhou, Jiangxi 34100, China）

Abstract: *WDR79*, a scaffold protein, plays an critical role in telomerase assembly, Cahar body formation, and DNA damage repair. The upstream DNA sequence of human *WDR79* promoter was obtained by PCR amplification to construct the recombination vector pGL3-*WDR79*- promoter. The correctness and activity of the plasmid pGL3-*WDR79*-promoter were verified by double enzyme cutting, agarose gel electrophoresis, DNA sequencing and luciferase assasies. The results of this study provide experimental basis for elucidating the mechanism of *WDR79* gene expression.

Key words: *WDR79*; promoter cloning; activity assay of luciferase

WDR79（WD repeat-containing protein 79）蛋白，又被称为 WRAP53 或 TCAB1，隶属于 WD 重复蛋白家族，编码该蛋白的基因定位于人染色体 17p13.1，与人抑癌基因 *p53* 以“头对头”的方式重叠。*WDR79* 基因由 13 个外显子组成，其中包含了 3 个可选的起始外显子 1-α，1-β 和 1-γ，编码的蛋白产物由 548 个氨基酸构成，分子量约为 59 kD [1]。作为卡哈尔体重要组成成分的 *WDR79* 蛋白在细胞核和细胞质中均有表达，可为蛋白质和 RNA 复合物的装配提供平台，在蛋白质运输、RNA 加工及转录以及 DNA 损伤修复等生理过程中发挥着重要功能[2-3]。近年来，有研究发现 *WDR79* 在头颈癌、直肠癌、乳腺癌和肺癌等多种癌症中高表达，且其表达水平与癌症病人的预后相关[4-5]，然而迄今对

收稿日期：2019-01-11；修改日期：2019-03-16
基金项目：国家自然科学基金项目(81660491,81402304)；江西省自然科学基金项目(20161BAB215221)；赣南师范大学大学生创新创业训练计划项目(15zb08)
作者简介：杨　潮(1984-)，男，安徽巢湖人，讲师，博士，硕士生导师，主要从事肿瘤病因学研究(Email：yac508@126.com);
何小杨(1995-)，男，江西赣州人，赣南师范大学生命科学学院生物科学专业 2015 级本科生(E-mail:342064335@qq.com);
莫淑芳(1996-)，女，湖南怀化人，赣南师范大学生命科学学院生物科学专业 2018 级本科生(E-mail:3038123801@qq.com);
戴　京(1994-)，男，江西抚州人，赣南师范大学生命科学学院生物科学专业 2015 级本科生(E-mail:3286380144@qq.com);
张欣宇(1996-)，女，内蒙古赤峰人，赣南师范大学生命科学学院生物科学 2015 级本科生(E-mail:1796188233@qq.com);
*陈　慧(1985-)，女，江西赣州人，讲师，博士，硕士生导师，主要从事肿瘤病因学研究(E-mail:chenhui0910102@163.com).

WDR79 的表达调控机制尚未明确。为此，本研究通过克隆人 *WDR79* 基因启动子，构建人 *WDR79* 启动子荧光素酶表达载体，并对其活性进行验证，为进一步探讨人 *WDR79* 基因表达的调控机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

人胚肾细胞293T细胞购自中科院典藏细胞库，质粒 pGL3-Basic 和 pRL-TK 为本实验室保存。

1.1.2 试剂

Marker C 和 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒等购自于上海生工生物工程股份有限公司；质粒小量抽提试剂盒、基因组DNA小量抽提试剂盒和PCR纯化试剂盒/DNA 纯化试剂盒等均购自于上海碧云天生物技术有限公司；PrimeSTAR Max DNA Polymerase（2×）、限制性内切酶 *Kpn I* 和 *Sma I*、T_4 DNA 连接酶、感受态细胞 *DH*5α 购自大连宝生物工程有限公司；Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司；DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司；引物合成和质粒测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.1.3 实验仪器

5430R 型冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；HH-2 型水浴锅（上海梅香仪器有限公司）；pro Flex 型 PCR 扩增仪（美国 Applied Biosystems 公司）；微波炉（广东美的厨房电器制造有限公司）；DYY-6C 型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）；高压蒸汽灭菌锅（上海博讯实业有限公司）；恒温振荡摇床（常州中捷实验仪器制造有限公司）；琼脂糖凝胶电泳系统（南京驰顺专业凝胶电泳仪制造商）；SW-CJ-2G 型双人单面净化工作台（苏州净化设备有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 人基因组 DNA 提取

收集对数生长期的人胚肾细胞 293T，用基因组 DNA 小量抽提试剂盒提取基因组总 DNA，作为 PCR 扩增反应的模板。该实验步骤严格按照上海碧云天生物技术有限公司的基因组 DNA 小量抽提试剂盒说明书进行。

1.2.2 人 *WDR79* 基因启动子表达载体 pGL3-*WDR79*-promoter 构建及鉴定

针对 *WDR79* 的启动子序列和质粒 pGL3-Basic 的酶切位点，设计并合成 PCR 扩增引物（如表 1）。以人基因组 DNA 模板， 以表 1 中引物扩增人 *WDR79* 基因 5'侧翼启动子区 650 bp 的 DNA 序列，扩增 PCR 片段经酶切、纯化后，与质粒 pGL3-Basic 按照 1:5 的摩尔比例在 T_4 连接酶的作用下进行连接，连接产物经转化、细菌培养和质粒小提后，进行限制性内切酶 *Kpn I* 和 *Sma I* 双酶切鉴定，同时将重组后的质粒进行测序分析（上海生工），以证实其正确性。

表 1 人 *WDR79* 启动子扩增引物序列

Table 1 Primer sequence for human promoter nucleic acid amplification

引物名称	引物序列（5′-3′）
WDR79 kpn I	GGG GTA CCC CTT CGG AAT GGA GCC CCA GTT TT
WDR79 Sma I	TCC CCC GGG GGA AGG GTA CAC GAG TTC GAC GC

1.2.3 细胞培养与质粒转染

人胚肾细胞株 293T 细胞放置于 5% CO_2 和 37℃条件下的细胞培养箱中培养，培养基为含有 10% FBS 的 DMEM。当细胞培养至对数生长期，进行分盘，以每孔 2×10^5 个细胞分入六孔板中，然后进行质粒转染实验。依照脂质体使用说明书将对照质粒 pGL3-Basic 和重组质粒 pGL3-*WDR79*-promoter 分别与内参质粒 pRT-TK、脂质体按比例孵育后，转染 293T 细胞，待细胞培养 48 h 后进行荧光素酶实验。

1.2.4 荧光素酶实验

在两组不同处理的细胞中分别加入 250 μL 裂解液，于摇床上剧烈摇荡 20 min，待细胞裂解成丝状物移入 EP 管中收集，12, 000 rpm 离心 30 s，取上清转入新的 EP 管中，置冰上按照荧光素酶试剂盒说明进行检测。记录样本中实验质粒携带的萤火虫荧光素酶激发底物释放荧光的数值即为(M1)和内参照质粒 pRL-TK 携带的水母荧光素酶激发底物

释放荧光的数值(M2)。以 Ml/M2 比值表征重组质粒相对的表达活性，每组实验设置 3 个复孔，重复实验 3 次。将所获得的数据输入 Excel 表格中进行分析，然后用统计学方法计算各组样本的差异，做成柱状图。

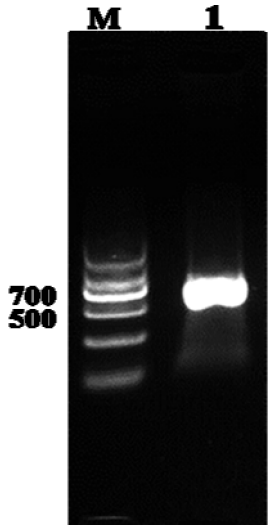
1.2.5 数据统计分析

使用 Microsoft Excel 软件计算标准偏差，统计不同样本间的差别。图中的星号表示用函数 TTEST 算出来的 *P* 值。*$P<0.05$，**$P\leq 0.01$，***$P\leq 0.001$。*P* 值小于 0.05 被认为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增人 *WDR79* 基因启动子

以人基因组 DNA 为模板，利用 PCR 技术扩增人 *WDR79* 基因 5'侧翼启动子区 650 bp 的 DNA 序列，加上引物上的保护碱基和酶切位点，PCR 产物的全长为 672 bp，1.5%琼脂糖凝胶电泳结果显示，扩增得到的 PCR 产物的片段大小与预期值相符(图 1)。



M：Marker C 1: PCR 产物

图 1 人 *WDR79* 启动子 PCR 结果

Fig.1 PCR amplification of the human *WDR79* promoter

2.2 重组质粒 pGL3-*WDR79*-promoter 的构建

经 PCR 扩增得到的 *WDR79* 基因启动子的 DNA 片段与质粒 pGL3-Basic 按照浓度比为 5：1 的比例在 T4 DNA 连接酶作用下相连，成功构建质粒 pGL3-*WDR79*-promoter（如图 2）。

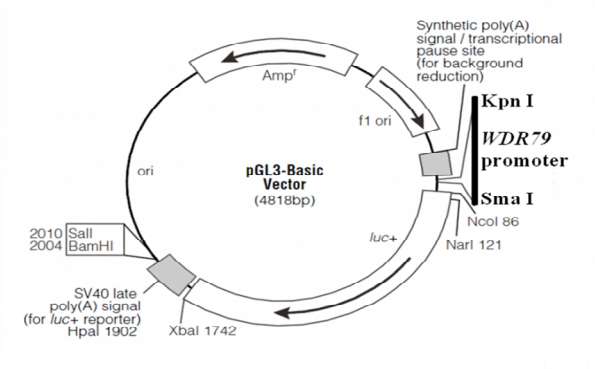
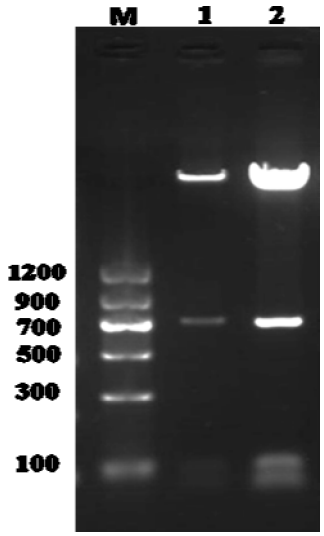


图 2 pGL3-*WDR79*-promoter 重组质粒图谱

Fig.2 The plasmid profile of pGL3-*WDR79*-promoter

2.3 重组质粒 pGL3-*WDR79*-promoter 双酶切鉴定

重组质粒 pGL3-*WDR79*-promoter 经限制性内切酶 *Kpn I* 和 *Sma I* 双酶切鉴定，被切割成 672 bp 和 4.8 kb 两个 DNA 片段，酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果与预期相符（图 3）。DNA 测序结果显示扩增的外源 DNA 片段已正确插入 pGL3-Basic 载体，碱基序列与 GenBank 报道序列一致。



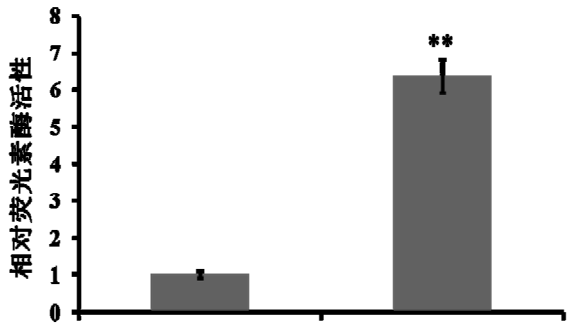
M：Marker C 1：低浓度的 pGL3-WDR79-promoter 酶切片段 2: 高浓度的 pGL3-WDR79-promoter 酶切片段

图 3 *Kpn I* 和 *Sma I* 双酶切质粒 pGL3-WDR79-promoter

Fig.3 pGL3-WDR79-promoter digested by *Kpn I* and *Sma I*

2.4 质粒 pGL3-*WDR79*-promoter 活性鉴定

重组质粒 pGL3-*WDR79*-promoter 和 pGL3-Basic 分别与内参质粒 pRL-TK 共转染进 293T 细胞后，采用荧光素酶实验分析启动子活性。结果显示，pGL3-*WDR79*-promoter 组的荧光活性高于 pGL3-Basic 组约 6.4 倍，组间差异具有统计学意义（$P<0.01$）（图 4）。



（** $P<0.01$）

图 4 质粒 pGL3-*WDR79*-promoter 荧光素酶活性测定

Fig.4 The luciferase activities of pGL3-*WDR79*-promoter

3 讨论

WDR79 是 WD 重复蛋白家族成员之一，包含有六个 WD 基元，在进化中高度保守，是细胞核内卡哈尔体形成必不可少的成份[6]。 *WDR79* 与人原发癌存在关联性， 在乳腺癌和卵巢癌中都存在相同的 *WDR79* 单核苷酸多态位置[7-8]。*WDR79* 还被发现在多种人肿瘤细胞株中明显高表达，在小鼠成纤维细胞 NIH3T3 中过表达 *WDR79* 促进细胞的恶性转化，而抑制 *WDR79* 的表达能通过线粒体途径诱导肿瘤细胞发生凋亡，并且 *WDR79* 过表达与头颈部肿瘤预后差密切相关[9]。在临床多种癌症组织中研究者发现 *WDR79* 存在有高表达并与预后相关，被认为是癌症诊断的生物标志物[10]。在非小细胞肺癌中抑制 *WDR79* 表达发现癌细胞通过线粒体信号途径发生凋亡，癌细胞增殖和移植瘤的生长也能够被有效抑制[11-12]。这些研究都表明 *WDR79* 参与癌症的发生发展，它是癌症一个潜在的诊断标志物和治疗靶点。然而，*WDR79* 自身被转录调控的分子机制尚不清楚。

本研究选取了人 *WDR79* 基因上游 5′非翻译区 -2000 bp~100 bp 的 DNA 序列作为分析对象，利用 JASPAR 网站分析该段序列上的潜在转录因子结合位点，克隆了人 *WDR79* 基因上游 5′非翻译区上游 650 bp 的 DNA 序列作为 *WDR79* 启动子，构建了人 *WDR79* 启动子荧光素酶报告基因表达质粒[13]。经双酶切和测序发现插入的 DNA 片段大小和序列顺序与 GeneBank 序列一致，且插入方向无误。为了验证质粒 pGL3-*WDR79*-promoter 活性，研究采用了荧光素酶实验，结果发现转染了 pGL3-*WDR79*-promoter 的细胞裂解液中荧光素酶信号比 pGL3-Basic 组高约 6.4 倍。综上所述，本研究成功构建了含人 *WDR79* 基因启动子的荧光素酶报告基因表达载体，为后续研究人 *WDR79* 基因启动子表达调控机制奠定了基础。

参考文献：

[1] Farnebo M. WRAP53 (WD repeat containing, antisense to TP53)[J]. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haema-tology, 2011, 15(7): 596-597.

[2] Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, et al. Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage[J]. Molecular Cell, 2009, 33(4): 462-471.

[3] Stirnimann C U, Petsalaki E, Russell R B, et al. *WD40* proteins propel cellular networks[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2010, 35(10): 565-574.

[4] Boscolorizzo P, Mosto M C D, Rampazzo E, et al. Telomeres and telomerase in head and neck squamous cell carcinoma: from pathogenesis to clinical implications[J]. Cancer Metastasis Reviews, 2016, 35(3): 457-474.

[5] Zhao T, Hu F, Qiao B, et al. Telomerase reverse transcriptase potentially promotes the progression of oral squamous cell carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition[J]. International Journal of Oncology, 2015, 46(5): 2205-2215.

[6] Mahmoudi S, Henriksson S, Weibrecht I, et al. WRAP53 is essential for Cajal body formation and for targeting the survival of motor neuron complex to Cajal bodies [J]. PLoS biology, 2012, 8(11): 1000521.

[7] Garcia-Closas M, Kristensen V, Langerod A, et al. Common genetic variation in TP53 and its flanking genes, *WDR79* and ATP1B2, and susceptibility to breast cancer [J]. International journal of cancer Journal international du cancer, 2007, 121(11): 2532-2538.

[8] Schildkraut J M, Goode E L, Clyde M A, et al. Single nucleotide polymorphisms in the TP53 region and susceptibility to invasive epithelial ovarian cancer [J]. Cancer research, 2009, 69(6): 2349-2357.

(参考文献[9]– [13]转第 55 页)

4 结束语

考虑到当前常见的静态网络检测机制存在链路抖动检出频率较低、数据传输性能差、传输带宽水平难以提高等难题，提出了一种基于时空二向度定型机制的静态网络检测算法；本文算法主要由两个部分构成：基于移序方式的超参数捕捉流程，能够实现对信道噪声的定向频率擦除，实现对链路抖动现象的有效抑制；基于链路相干协方差方式的链路抖动二向度误差消除，能够实现对特地频率噪声的二次擦除，大大提高算法的数据传输能力。仿真实验亦证明了本文算法的有效性。

下一步，将针对本文算法在纯LTE-5G网络中存在的链路抖动性能不佳的难题，通过引入超球体拓扑链路稳定机制，稳定高流动性状态下的网络异常问题捕捉，提高网络的数据传输能力，促进本文算法在实践中广泛应用。

参考文献：

[1] 吕敬祥,廖海红. 分区大规模无线传感网络多跳LEACH协议[J]. 井冈山大学学报:自然科学版, 2017, 38(6): 38-42.

[2] Hung S M, Givigy S N. A Q-learning Approach to FlocKing with UAVs in a Stochastic Environment[J]. IEEE Tra-nsactions on Cybernetics, 2016, 47(1): 186-197.

[3] Yan J, He H, Zhong X. Q-learning-Based Vulnerability anAlysis of Smart Grid Against Sequential Topology Attacks[J]. IEEE Transactions on Information Forensics & Security, 2017,12(1):200-210.

[4] Hu H, Zhang H, Liu Y. Quantitative Method for Network Security Situation Based on Attack Prediction[J]. Security & Communication Networks, 2017(4):1-19.

[5] Niu B A. Cooperation Stimulation Strategy in Clouds Networks [J]. Signal Processing, IEEE Transactions on, 2017, 59(5): 2355-2369.

[6] Liu J, Zhang H Q, Liu Y. Research on Optimal Selection of Moving Target Defense Policy Based on Dynamic Game with Incomplete Information[J]. Acta Electronica Sinica, 2018, 46(1): 82-89.

[7] 陈艳,王子健,赵泽. 传感器网络环境检测时间序列数据的高斯过程建模与多步预测[J]. 通信学报, 2015, 36(10): 252-262.

[8] Weng L N, Zhang P, Feng Z Y. Short-Term Link Quality Prediction Using non Parametric Time Series Analysis[J]. Science China Information Sciences, 2015,58(8): 1-15.

[9] 舒坚,汤津,刘琳岚. 基于模糊支持向量回归机的WSNs 链路质量预测[J]. 计算机研究与发展, 2015, 52(8): 1842-1851.

[10] 李振刚. 基于高斯过程回归的网络流量预测模型[J]. 计算机应用,2014, 34(5): 1251-1254.

[11] 李军,张友鹏. 基于高斯过程的混沌时间序列单步与多步预测[J].物理学报, 2011, 60(7): 143-152.

[12] Prachi S. Intelligent Query-Based Data Aggregation Model and Optimized Query Ordering for Efficient Wireless Sensor Network[J]. Wireless Personal Communications, 2018, 100(4): 1405-1425.

[13] Shu J, liu S. Link Quality Prediction for WSNs Based on Dynamic Bayesian Networks[J]. Advanced Engineering Sciences,2017, 49(2): 152-159.

(上接第 34 页)

[9] Mahmoudi S, Henriksson S, Farnebo L, et al. WRAP53 promotes cancer cell survival and is a potential target for cancer therapy [J]. Cell death & disease, 2011, 2(1): 114.

[10] Wang M J, Ping J, Li Y, et al. The prognostic factors and multiple biomarkers in young patients with colorectal cancer [J]. Scientific reports, 2015, 5(10645).

[11] Sun Y, Yang C, Chen J, et al. Overexpression of WDR79 in non-small cell lung cancer is linked to tumour progression [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2016, 20(4): 698-709.

[12] Hu Jian Yuan Ping, Wang Zhitian，et al. The Inhibitory Effect of *WDR79* RNAi on the Proliferation of Human Lung Cancer A549 Cells [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2014, 36(10): 1382–1388.

[13] 熊伟,张晓娟,孙美涛,等. 人线粒体转录终止因子2基因启动子区的生物信息学分析[J]. 井冈山大学学报:自然科学版, 2016 , 37 (1) :51-56.