

Sox2 基因 3'非翻译区保守元件对基因表达的调控作用

马莉¹, 孔清华^{1,2}, 赵树华^{1,2}, 魏云虎^{1,2}, 毛炳宇^{1,*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 转录因子Sox2是脊椎动物早期发育中最早表达的神经系统特异性基因之一, 同时在于细胞的维持中也起着关键作用。通过生物信息学分析, 作者发现在脊椎动物Sox2 mRNA 3'非翻译区中存在4段非常保守的富含AU的区域。将这些片段按照不同的组合克隆到GFP和荧光素酶两种报告基因载体中, 在非洲爪蟾胚胎和培养细胞中检测了这些片段对报告基因表达的影响。结果显示, Sox2的3'UTR可影响报告基因的表达水平, 特别是其中的保守片段2可显著提高报告基因的表达水平, 表明Sox2 3'非翻译区有可能参与Sox2表达的转录后调控。

关键词: Sox2; 3'非翻译区; 转录后调控; 非洲爪蟾

中图分类号: Q344; Q593.4; Q786; Q959.53 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2009)06-0633-06

Potential Regulatory Role of the Conserved Elements in Sox2 3'Untranslated Region

MA Li¹, KONG Qing-hua^{1,2}, ZHAO Shu-hua^{1,2}, WEI Yun-hu^{1,2}, MAO Bing-yu^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The transcription factor Sox2 is one of the earliest determinants of the neural system in vertebrate and plays crucial roles in stem cell maintenance. Through bioinformatical analysis, we found that the 3'untranslated regions (3'UTR) of vertebrate Sox2 mRNAs (especially the 300 bases at the most 3' end) are highly conserved and contain four conserved AU rich fragments. Through reporter gene analysis, we evaluated the effects of the Sox2 full length 3'UTR and the conserved fragments on gene expression in *Xenopus laevis* embryos and cultured cells. The results showed that the conserved fragment 2 from the 3'UTR of *Xenopus laevis* Sox2 was able to increase the reporter gene expression significantly, indicating the possibility that the expression level of Sox2 might be regulated post-transcriptionally through its 3'UTR.

Key words: Sox2; 3'UTR; Post-transcriptional regulation; *Xenopus laevis*

转录后水平的调控在调节胚胎早期发育中具有重要作用。其中最为重要和广泛存在的调节方式是通过目标mRNA 3'非翻译区(3'un-translated region, 3'UTR)的调控, 而且其调节方式也是多种多样的(Graybowska et al, 2001; Kuersten & Goodwin, 2003)。在胚胎发育早期和生殖细胞发生过程中, 转录活动通常很不活跃, 对基因表达的调控很大程度上发生在转录后水平。如在果蝇和线虫早期胚胎极性的确定和图式形成过程中, 转录后水

平的基因表达调控起着关键作用(Kuersten and Goodwin, 2003)。近来的研究表明, 转录后调控对于调节脊椎动物发育过程中的细胞分化、细胞分裂及基因区域特异性表达都具有重要作用, 如在脊椎动物体节形成过程中的基因表达调控(Davis et al, 2001)。已有资料表明转录后调控也参与了脊椎动物神经系统的发育(Graham et al, 2003)。如Otx2是脑部发育中重要的调节基因(Suqiyama et al, 2009), 而翻译水平对于其正常表达与发挥功能是至关重要

收稿日期: 2009-05-15; 接受日期: 2009-08-03

基金项目: 国家杰出青年科学基金(30425011); 国家自然科学基金重点项目(30530380)

*通讯作者(Corresponding author), 博士生导师, E-mail: mao@mail.kiz.ac.cn

要的。如果去除其3'UTR,会导致小鼠胚胎前脑和中脑的发育异常(Boyl et al, 2001)。

转录因子Sox2是脊椎动物早期神经系统发育的重要调节因子,也是脊椎动物早期发育中最早表达的神经系统特异性基因之一(Mizuseki et al, 1998; Kishi et al, 2000; Sasai, 2001)。最早探测到Sox2基因的表达是在原肠开始时的预定神经外胚层(Mizuseki et al, 1998)。在中枢神经系统早期发育中,Sox2在神经上皮中高度表达并在神经干细胞的发育中具有重要作用(Episkopou, 2005)。Sox2的表达水平对于其正常功能也是至关重要的。Sox2杂合体小鼠虽然可基本正常发育,但脑垂体发育异常,导致个体较小,雄性生殖力下降,说明了其表达水平的重要性(Avilion et al, 2003; Kelberman et al, 2006)。Taranova et al(2006)构建了一系列Sox2基因剂量型等位基因突变小鼠,发现当Sox2的表达量低于正常水平的40%时,会引起视网膜神经前体细胞的分化异常和小眼球症的发生,说明Sox2表达剂量对视网膜神经前体细胞的正常分化是至关重要的。在人类,Sox2的杂合突变与无眼及小眼畸形也是相关的(Kelberman et al, 2006)。除转录水平的调控外,Sox2的表达水平还受到miRNA的调控,但不同于经典的miRNA的作用机制,miRNA可能是通过与Sox2的编码区结合而促进其mRNA的降解(Tay et al, 2008)。

通过生物信息学分析,我们发现在脊椎动物Sox2 mRNA 3'UTR中存在4段非常保守的富含AU的区域,提示Sox2的表达可能受到转录后调控。在本研究中,我们首先克隆了非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) Sox2基因全长序列并测序,然后在非洲爪蟾胚胎和293T细胞中检测了Sox2基因3'非翻译区全长及不同保守片段对报告基因表达的影响。结果显示Sox2 3'UTR可影响报告基因的表达水平,特别是其中的保守片段2可显著提高报告基因的表达水平,表明Sox2的3'UTR可能参与其转录后调控。

1 材料和方法

1.1 EST数据库分析

不同物种Sox2的序列比对分析通过Clustal和BLSAT程序完成。各物种Sox2基因的序列号分别为:热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*), NM_213704; 鸡, NM_205188; 绵羊, X96997; 鼠, NM_011443; 斑马鱼, NM_213118; 人, NM_003106。非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的Sox2 3'端全长序列在GenBank

中还没有,为此我们从非洲爪蟾30期胚胎cDNA文库中克隆了这一基因,进行了全长测序并提交到GenBank,序列号为GQ292559。

1.2 质粒构建

利用PCR技术扩增出3'UTR区不同长度的片段,连有酶切位点的引物序列详见表1。目的片段用QIAquick Gel Purification Kit (Qiagen)胶回收纯化,分别连接至带有绿色荧光蛋白(EGFP)和荧光素酶(luciferase)报告基因的质粒载体中(pCS2-EGFP, pCS2-luc),插入到报告基因读码框之后。RNA通过体外转录合成。

1.3 胚胎体外授精及显微注射

实验动物成体非洲爪蟾购自美国Nasco公司。非洲爪蟾的体外受精和胚胎培养按照Gawantka (1995)描述的方法进行。非洲爪蟾胚胎发育的时期按Nieuwkoop & Faber (1967)所描述的来确定。4细胞期对角线注射报告基因DNA (5 μg/mL),每次注射量为5 nL。显微注射后的胚胎培养至尾芽阶段时,置于Leica MZ16解剖镜下观察绿色荧光蛋白的表达强度并拍照,统一不同实验组的曝光时间。

1.4 荧光素酶报告基因分析

293T细胞的转染在96孔板中进行,每孔转染30 ng连接有Sox2 3'UTR序列的荧光素酶报告基因的质粒,并加入3 ng的pRL-TK质粒作为内参照。每个样品3个重复,转染后36 h用Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)检测转染细胞的双荧光素酶活强度。荧光素酶的活性通过Fluoroscan ascent FL (Thermo Labsystems)荧光分析仪进行。统计数据以平均值±标准差(SD)表示。荧光素酶表达的相对荧光单位的差异使用单因素方差进行检验,各实验组相对荧光单位的均值进行多重t检验,P值采用Bonferroni校正。所有的统计检验均使用R 2.8.1统计。

2 结果

2.1 Sox2 3'UTR的保守性分析及其对报告基因表达的影响

通过对包括非洲爪蟾、热带爪蟾、鸡、山羊、小鼠、斑马鱼和人的Sox2基因的序列进行生物信息学比对后,我们发现脊椎动物Sox2 mRNA的3'UTR非常保守,特别是其3'末端的约300bp。非洲爪蟾和热带爪蟾的Sox2 mRNA的一致性为90%。由于非洲爪蟾为4倍体,可能含有两个Sox2基因拷贝。我们

分析了非洲爪蟾的EST数据,发现的确存在两个同源性很高的Sox2拷贝,但相应序列不完整。在可获得的序列部分其一致性>95%。非洲爪蟾与人的Sox2 mRNA在编码区的一致性为82%,3'端300bp非翻译区的一致性也达到了80%。

为了研究Sox2 3'UTR对Sox2 mRNA稳定性及其翻译效率的影响,我们首先克隆了非洲爪蟾,小

鼠和人的Sox2基因的3'UTR(引物序列见表1)并将其连入含有荧光素酶报告基因pCS-GL3载体,通过转染293T细胞,我们检测了这3个物种的全长3'UTR对报告基因稳定性及翻译效率的影响,单因素方差分析结果表明各组间存在显著差异($F_{3,8}=13.086$, $P=0.002$)。多重t检验结果显示,人与非洲爪蟾和对照组间存在显著差异(图1),说明人的3'UTR

表 1 克隆 Sox2 3'UTR 中不同片段组合所用引物
Tab.1 Primer sequences for cloning Sox 2 3'UTR different fragments

片段名称 Fragment name	引物序列 Primer sequence (5' to 3')	产物长度 Product length (bp)
<i>Xenopus laevis</i> Sox2 3' UTR	F 5'GGGTCCGGATAAAGATCTAATACTGAAGGAACCTTTATATCC 3' R 5'GGGTCTAGACAGATTTCATATTTCAAAAATTTA3'	1018
E1-4	F 5'GGGAGATCTGGGAACCTGTATAGAACGAC3' R 5'GGGTCTAGACAGATTTCATATTTCAAAAATTTA3'	811
E2-4	F 5'GGGAGATCTGGCCACTAGGATCCCAACAT3' R 5'GGGTCTAGACAGATTTCATATTTCAAAAATTTA3'	365
E34	F 5'GGGAGATCTTTCTCTTATCTCATTTTCAGTAG3' R 5'GGGTCTAGACAGATTTCATATTTCAAAAATTTA3'	205
E4	F 5'GGGAGATCTGAACTAATCCAACCCTAATAA3' R 5'GGGTCTAGACAGATTTCATATTTCAAAAATTTA3'	100
E3	F 5'GGGAGATCTTTCTCTTATCTCATTTTCAGTAG3' R 5'GGGTCTAGATTAGGGTTGGATTAGTTCAT3'	123
E2	F 5'GGGAGATCTGGCCACTAGGATTCCAACAT3' R 5'GGGTCTAGATAAGCAGCATAAATTTACAG3'	143
E1	F 5'GGGAGATCTGGGAACCTGTATAGAACGAC3' R 5'GGGTCTAGAGATGTTCCGTTGCTTTCTTGT3'	525
Mouse Sox2 3'UTR	F 5'GGGGGATCCGAACCTGGAGAAGGGGAGAGATT3' R 5'CTCGGCAGCCTGATTCCAATAA3'	960
Human Sox2 3'UTR	F 5'GGGGGATCCTTCACATGTCCCAGCACTAC3' R 5'GGGTCTAGATCAAACCTGTGCATAATGGAG3'	1175

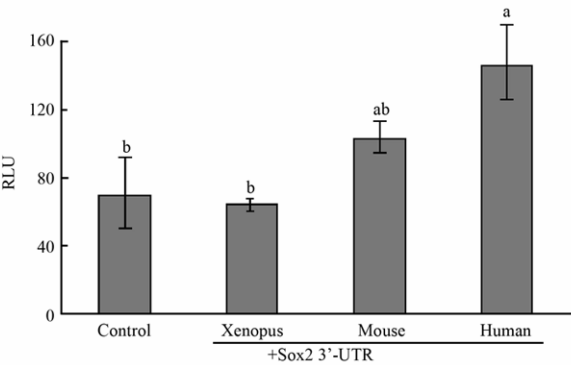


图 1 非洲爪蟾、小鼠和人的 Sox2 全长 3'UTR 对荧光素酶报告基因表达的影响

Fig. 1 The effects of Sox2 3'UTR of *Xenopus laevis*, mouse and human on the expression of the luciferase reporter gene

人的 Sox2 基因全长 3'UTR 可以显著提高报告基因的表达。柱上不同字母的标识,表示不同组之间具有显著性差异($P<0.05$)。
The Sox2 3'UTR of human improves the expression of reporter gene significantly. The different words above bars indicate significance among different groups ($P<0.05$).
RLU: 相对荧光单位(relative light unit)。

序列可以明显提高报告基因的表达。非洲爪蟾的全长3'UTR对报告基因的表达有微弱的降低作用但统计学无显著差异。

2.2 非洲爪蟾Sox2 3'UTR不同片段对报告基因表达的影响

仔细比对了对非洲爪蟾和人的Sox2 3'UTR序列,发现其中有 4 个片段最为保守(图 2),分别命名为片段 1(1476~1555bp)、片段 2(1848~1901bp)、片段 3(1934~1992bp)和片段 4(2046~2120bp),其中片段 2 和 4 最为保守。为了进一步研究这些保守片段对报告基因表达的影响,我们分别克隆了含有不同片段的 3'UTR 序列(图 2),分别包括了片段 1-4,片段 2-4,片段 34 和片段 4(所用引物见表 1),并将克隆的序列连入含有绿色荧光蛋白报告基因和荧光素酶报告基因的载体。然后分别进行胚胎显微注射后观察绿色荧光蛋白的表达强弱和检测荧光素酶的表达水平。通过GFP的表达(图 3A)可以看出,片段 2-4 和片段 4 可明显的提高报告基因的表达。到了尾

芽期之后，片段 34 也可以微弱的提高GFP的表达，而片段 1-4 和全长 3'UTR对报告基因的表达未见明显影响。我们进一步定量检测了不同片段对荧光素酶活性表达水平的影响（图 3B）。单因素方差分析发现各组间存在显著差异($F_{5,12}=9.618, P<0.001$)。多重 t 检验结果显示，全长 3'UTR与不

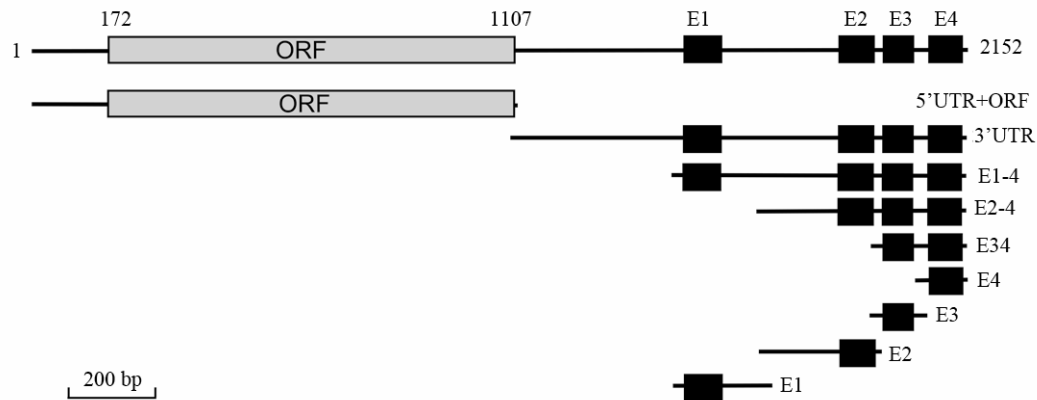


图 2 用于报告基因分析的 Sox2 3'UTR 的不同片段示意图
Fig. 2 Illustration of different fragments of Sox2 3'UTR used in the reporter gene assay

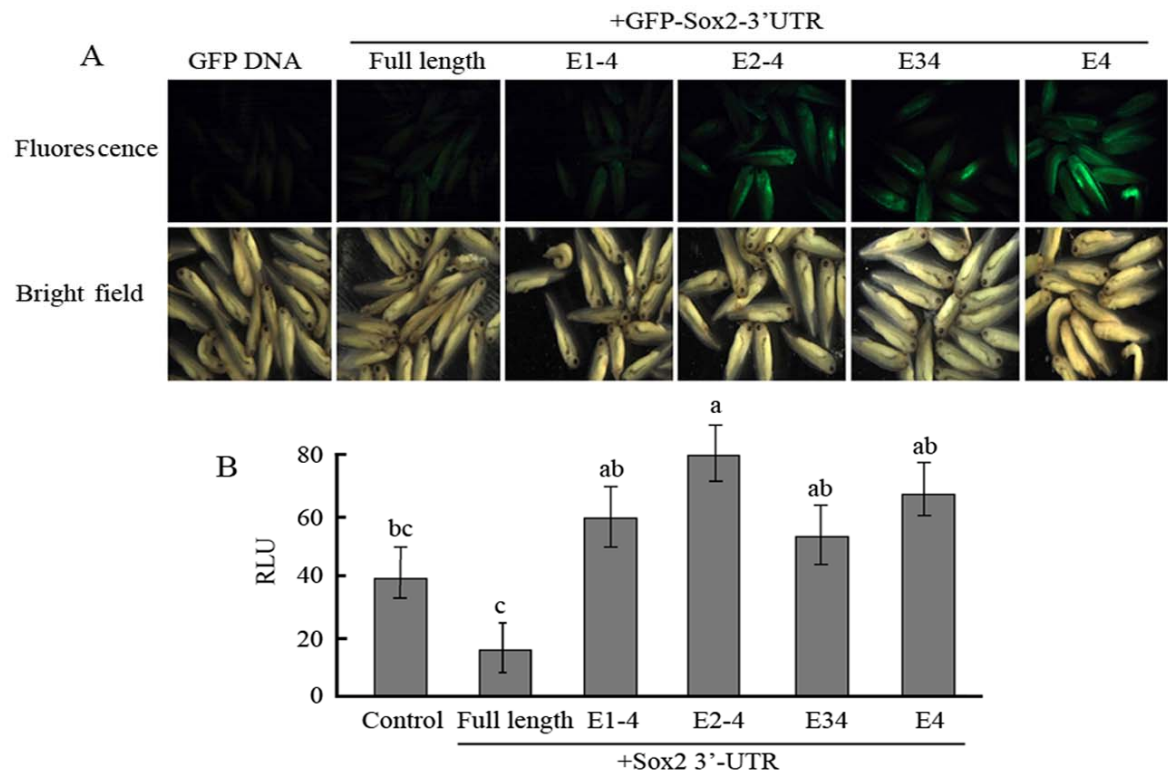


图 3 Sox2 3'UTR 的不同片段对胚胎中报告基因表达的影响
Fig. 3 The effects of different fragments of Sox2 3'UTR to the reporter genes' expression

A: Sox2 3'UTR 的不同片段对显微注射胚胎中 GFP 表达的影响，片段 2~4 和片段 4 可以明显的提高报告基因的表达；B: Sox2 3'UTR 的不同片段对显微注射胚胎荧光素酶活性的影响，片段 2~4 可以明显提高荧光素酶活性的表达。柱上不同字母的标识，表示不同组之间具有显著性差异($P<0.05$)。

A: The effects of different fragments of Sox2 3'UTR on the GFP expression in microinjected embryos. The fragment 2-4 and fragment 4 can improve the GFP expression significantly; B: The effects of different fragments of Sox2 3'UTR on the luciferase expression in microinjected embryos. The fragment 2-4 can improve the luciferase expression significantly. The different words above bars indicate significance among different groups ($P<0.05$).

同片段实验组间均存在显著差异, 对照组与片段 2~4 组有显著差异, 但与其他各组没有差异(图 3B)。可见片段 2~4 可显著提高荧光素酶的表达。荧光素酶定量检测的结果与 GFP 中的结果大体一致。

为了检测这 4 个片段精确的调控作用, 找出 Sox2 3'UTR 中的核心调控元件, 我们又分别克隆了片段 1, 片段 2 和片段 3 (引物序列见表 1) 并将它们连入带有 GFP 和荧光素酶报告基因的载体, 然后通过胚胎注射和细胞转染观察 GFP 的表达情况及定量检测荧光素酶活的强度。结果显示, 当注射 5 ng/ μ L 连有 GFP 报告基因的 DNA 后在尾芽期观察荧光强度 (图 4A), 全长 Sox2 3'UTR 组荧光表达相对于对照组有微弱降低, 但并不明显。而连有片段 2 和片段 4 的两组胚胎荧光有明显的提高。另外, 连有片段 1 和片段 3 的两组 GFP 表达也有微弱提高但

是并不明显。荧光素酶定量检测的结果经单因素方差分析发现各实验组间存在显著差异($F_{5,12}=10.154$, $P<0.001$)。多重 t 检验结果显示, 片段 2 除了与片段 4 无显著差异外, 与其他各组均存在显著差异 (图 4B)。可见片段 2 可显著提高荧光素酶报告基因的表达, 而片段 4 也可提高报告基因的表达但较对照组无显著差异, 这与 GFP 表达的结果基本一致。为了进一步验证这 4 个片段的调控作用, 又进行了 293T 细胞的转染试验。结果经单因素方差分析发现各实验组间存在显著差异($F_{5,12}=5.211$, $P=0.009$)。多重 t 检验结果显示片段 2 与片段 3 及全长 3'UTR 存在显著差异 (图 4C) 综上所述, 通过对 GFP 和荧光素酶两种报告基因在胚胎和转染细胞中的表达分析, 证明片段 2 可显著的提高报告基因的表达水平, 而片段 4 也可提高报告

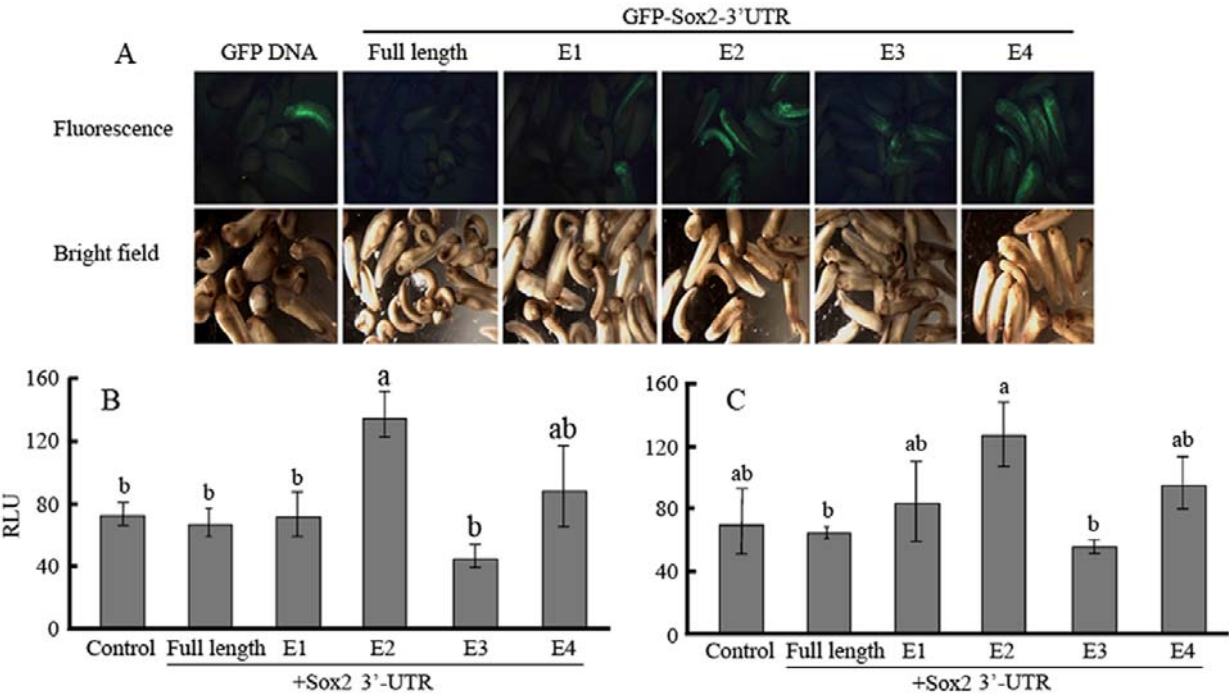


图 4 Sox2 3'UTR 的不同片段对报告基因表达的影响

Fig. 4 The effects of different fragments of Sox2 3'UTR to the reporter genes' expression

A: Sox2 3'UTR 的不同片段对显微注射胚胎中 GFP 报告基因表达的影响, 片段 2 和片段 4 可以明显的提高报告基因的表达; B: Sox2 3'UTR 的不同片段对显微注射胚胎荧光素酶报告基因的影响, 片段 2 可以明显提高胚胎中荧光素酶的活性; C: Sox2 3'UTR 的不同片段在 293T 细胞中对荧光素酶报告基因表达的影响, 片段 2 和片段 4 可提高报告基因表达, 但统计学检验不显著($P>0.05$)。柱上不同字母的标识, 表示不同组之间具有显著性差异($P<0.05$)。

A: The effects of different fragments of Sox2 3'UTR on the GFP reporter expression in *Xenopus laevis* embryos. The fragment 2 and fragment 4 can improve the GFP expression significantly; B: The effects of different fragments of Sox2 3'UTR on the luciferase reporter expression in *X. laevis* embryos. The fragment 2 can improve the luciferase activity significantly at injected embryos; C: The effects of different fragments of Sox2 3'UTR on the luciferase reporter expression in 293T cell. Fragments 2 and 4 can improve the expression of the reporter gene, but not significant statistically ($P>0.05$). The different words above bars indicate significance among different groups ($P<0.05$).

基因的表达但统计学上并不显著。

3 讨论

我们发现,在脊椎动物Sox2 mRNA 3'UTR中存在4段非常保守的富含AU的区域,提示Sox2的表达可能受到转录后调控。我们将这些片段按照不同的组合克隆到GFP和荧光素酶两种报告基因载体中,在非洲爪蟾胚胎和培养的293T细胞中检测了这些片段对报告基因表达的影响。在培养细胞中,非洲爪蟾Sox2基因的3'UTR全长序列对报告基因的表达并没有显著的影响,而小鼠和人的全长3'UTR序列却具有显著的提高作用。我们进一步在非洲爪蟾胚胎中研究了Sox2基因 3'UTR各个片段的作用,发现片段2-4和片段4可以显著的提高报告基因的表达,片段34也具有一定的提高作用。进而我们分别分析了这4个保守片段各自的作用,发现片段2对报告基

因的表达有明显的提高作用。而这个片段在不同物种的保守性最高,提示这个片段可能具有一定的功能意义。由此我们认为Sox2 3'UTR有可能参与内源Sox2表达的转录后调控。同时我们发现Sox2 3'UTR的片段2对报告基因表达有显著提高作用,这一点可以利用来改造基因表达载体,以提高外源基因在细胞或胚胎中的表达水平。

关于 Sox2 3'UTR 调控基因表达的机制还有待于进一步的研究。我们发现在非洲爪蟾 Sox2 3'UTR 区域富含 AU 元件 (AU-rich element, ARE)。ARE 在许多哺乳动物 mRNA 3'UTR 中都存在,在已知的多数情况下参与 mRNA 降解的调控(Di Noia et al, 2000; Anderson et al, 2008)。我们对于非洲爪蟾 Sox2 3'UTR 序列相关保守元件的分析及其富含 AU 的发现将有助于进一步研究转录后调控的机理。

参考文献:

- Anderson P. 2008. Post-transcriptional control of cytokine production [J]. *Nat Immunol*, **9**: 353-359.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function [J]. *Genes Dev*, **17**: 126-140.
- Boyl PP, Signore M, Acampora D, Martinez-Barbera JP, Ilengo C, Annino A, Corte G, Simeone A. 2001. Forebrain and midbrain development requires epiblast-restricted Otx2 translational control mediated by its 3' UTR [J]. *Development*, **128**: 2989-3000.
- Davis RL, Turner DL, Evans LM, Kirschner MW. 2001. Molecular targets of vertebrate segmentation: Two mechanisms control segmental expression of *Xenopus* hairy2 during somite formation [J]. *Dev Cell*, **1**: 553-565.
- Di Noia JM, D'Orso I, Sánchez DO, Frasch ACC. 2000. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency [J]. *J Biol Chem*, **275**: 10218-10227.
- Episkopou V. 2005. Sox2 functions in adult neural stem cells [J]. *Trends Neurosci*, **28**: 219-221.
- Gawantka V, Delius H, Hirschfeld K, Blumenstock C, Niehrs C. 1995. Antagonizing the Spemann organizer: Role of the homeobox gene *Xvent-1* [J]. *EMBO J*, **14**: 6268-6279.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. 2003. Sox2 functions to maintain neural progenitor identity [J]. *Neuron*, **39**: 749-765.
- Graybowska EA, Wilczynska A, Siedlecki JA. 2001. Breakthroughs and views: regulatory functions of 3' UTR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**: 291-295.
- Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, Chong WK, Kirk JM, Achermann JC, Ross R. 2006. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans [J]. *J Clin Invest*, **116**: 2442-2455.
- Kishi M, Mizuseki K, Sasai N, Yamazaki H, Shiota K, Nakanishi S, Sasai Y. 2000. Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm [J]. *Development*, **127**: 791-800.
- Kuersten S, Goodwin EB. 2003. The power of the 3' UTR: Translational control and development [J]. *Nat Rev Genet*, **4**: 626-637.
- Mizuseki K, Kishi M, Matsui M, Nakanishi S, Sasai Y. 1998. *Xenopus* Zic-related-1 and Sox2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction [J]. *Development*, **125**: 579-587.
- Nieuwkoop PD, Faber J. 1967. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin) [M]. Amsterdam: North-Holland Publishing Co.
- Sasai Y. 2001. Roles of Sox factors in neural determination: conserved signaling in evolution [J]. *Int J Dev Biol*, **45**: 321-326.
- Suqiyama S, Prochiantz A, Hensch TK. 2009. From brain formation to plasticity: Insights of Otx2 homeoprotein [J]. *Dev Growth Differ*, **51**: 369-377.
- Taranova OV, Magness ST, Fagan BM, Wu Y, Surzenko N, Hutton S, Pevny L. 2006. Sox2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence [J]. *Genes Dev*, **20**: 1187-1202.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. 2008. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation [J]. *Nature*, **455**: 1124-1128.