

# 人*PRR11*核心启动子区域NF-Y结合位点的 定点突变分析

翁华莉<sup>1,2</sup> 张莹<sup>1,2</sup> 艾青<sup>1,2</sup> 龙银江<sup>1,2</sup> 谢濛宇<sup>1,2</sup> 王义涛<sup>1,2</sup>  
蔡伟<sup>1,2</sup> 朱慧芳<sup>1,2\*</sup> 卜友泉<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016;

<sup>2</sup>重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

**摘要** *PRR11*(proline-rich protein 11)是我们最近发现的一个新的肿瘤相关基因, 在细胞周期和肿瘤发生等过程中起重要作用。该研究是在此前对*PRR11*启动子鉴定分析的基础上, 对*PRR11*核心启动子区域中的核因子(nuclear factor Y, NF-Y)结合位点进行进一步的分析以确定其在*PRR11*转录调控中的作用。核苷酸序列同源性分析结果表明, *PRR11*核心启动子区域中的两个NF-Y结合位点在人、牛、大鼠和小鼠四个物种中均高度保守。共转染NF-Y表达质粒后, 发现NF-Y的外源过表达可以明显提高*PRR11*的启动子活性。采用定点突变方法将*PRR11*启动子区域中的两个NF-Y结合位点单独或同时进行有效突变后, *PRR11*启动子活性明显下降, 且NF-Y外源过表达对其启动子活性的激活效应也明显削弱甚至丧失。另外, 对基因定点突变方法做出了改进, 提出了一种更好的基于转录因子结合位点分析的碱基突变方法。这些结果表明, NF-Y结合位点是*PRR11*核心启动子区域中的重要顺式作用元件, NF-Y可能通过调节*PRR11*的转录进而调节细胞周期和肿瘤发生等过程。

**关键词** *PRR11*; 启动子; 定点突变; NF-Y

## Site-directed Mutagenic Analysis of NF-Y-binding Sites in Human *PRR11* Core Promoter

Weng Huali<sup>1,2</sup>, Zhang Ying<sup>1,2</sup>, Ai Qing<sup>1,2</sup>, Long Yinjiang<sup>1,2</sup>, Xie Mengyu<sup>1,2</sup>, Wang Yitao<sup>1,2</sup>,  
Cai Wei<sup>1,2</sup>, Zhu Huifang<sup>1,2\*</sup>, Bu Youquan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

<sup>2</sup>Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** Proline-rich protein 11 (*PRR11*), a novel tumor-associated gene discovered by our group, plays an important role in cell cycle and carcinogenesis, etc. Based on the previous identification and analysis of *PRR11* promoter, the present study focuses on determining the role of nuclear factor Y (NF-Y) binding sites in *PRR11* core promoter region. Nucleotide sequence homology analysis indicated that, the human *PRR11* gene promoter core sequence contains two NF-Y binding sites which are highly conservative in human, cow, rat and mouse. Co-transfection experiment revealed that ectopic over-expression of NF-Y could significantly increase the *PRR11* promoter activity. However, efficient site-directed mutagenesis of each or both NF-Y-binding sites resulted in a significant de-

收稿日期: 2012-10-25 接受日期: 2012-11-14

国家自然科学基金(批准号: 30801356、81171879)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485991, E-mail: zhu\_huifang@126.com; Tel: 023-68485991, E-mail: buyqcn@yahoo.com.cn

Received: October 25, 2012 Accepted: November 14, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30801356, 81171879)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485991, E-mail: zhu\_huifang@126.com; Tel: +86-23-68485991, E-mail: buyqcn@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-2-26 17:04 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130226.1704.005.html

crease of *PRR11* promoter activity and a remarkable attenuation of *PRR11* promoter activation driven by the ectopic NF-Y over-expression. In addition, we also improved the conventional base-changing methods by combining the transcription factor binding prediction. Taken together, our present study strongly suggested that NF-Y binding sites are the important cis-acting elements in *PRR11* core promoter region, and NF-Y might be involved in the cell cycle and carcinogenesis via regulating the transcription of human *PRR11* gene.

**Key words** *PRR11*; promoter; site-directed mutagenesis; NF-Y

恶性肿瘤的发生发展是一个复杂的生物学过程, 由于基因表达异常所导致的细胞生长失控在肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用<sup>[1-3]</sup>, 因此, 寻找和鉴定新的肿瘤相关基因并对其分子行为机制进行深入研究对于阐明肿瘤发生发展的分子机制、开发新的肿瘤分子诊断方法和治疗策略等均具有重要的理论和现实意义<sup>[4-5]</sup>。

*PRR11*(proline-rich protein 11)是本课题组在恶性肿瘤相关新基因的筛选与鉴定中发现的一个肿瘤相关新基因, 其在多种肿瘤中表达显著上调<sup>[4-5]</sup>。为了阐明*PRR11*在肿瘤中的异常表达调控机制, 我们对*PRR11*的启动子进行了鉴定与分析, 发现其启动子主要定位于转录起始位点附近-563 bp~+341 bp的区域内, 并将其核心启动子区定位于-196 bp~+116 bp的80 bp的区域(命名为*PRR11*-P80)<sup>[4]</sup>。转录因子结合位点分析表明, *PRR11*启动子区域含有多个典型的CCAAT盒且是潜在的核因子Y(nuclear factor Y, NF-Y)结合位点, 提示其在*PRR11*基因的转录调控中具有重要作用。本研究即在上述研究的基础上, 对*PRR11*核心启动子区域中NF-Y结合位点进行了进一步的预测分析, 并采用两种不同的定点突变方案对*PRR11*启动子核心区域中的NF-Y结合位点进行了定点突变分析, 为进一步研究NF-Y在*PRR11*基因转录调控中的作用奠定了坚实的基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人肺癌细胞系H1299为本实验室保存, 采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基, 培养于含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中。RPMI1640培养基和胎牛血清购自Gibco公司; KOD-Plus-Mutagenesis Kit购自TOYOBO公司; 转染试剂Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司; Dual-Luciferase® Reporter Assay System、pGL3-basic vector和pRL-TK vector购自Promega公司; 质粒小抽试剂盒和DNA凝胶回收试剂盒均购自OMIGA公

司; pcDNA3.1质粒为本实验室保存; NF-Y真核表达质粒由第三军医大学生物化学与分子生物学实验室张艳博士惠赠; pGL3-*PRR11*-P80重组质粒由本实验室构建并保存。

### 1.2 方 法

1.2.1 生物信息学分析 采用TF search和TRANS-Match软件, 对*PRR11*启动子核心区域P80进行转录因子结合位点的预测分析。同时, 从GenBank数据库获取相应的大鼠、小鼠等物种的*PRR11*基因的核心启动子序列, 并采用ClustalW软件分析其与上述人的*PRR11*启动子序列的同源性。

1.2.2 碱基定点突变方案 分别采用两种方案对*PRR11*核心启动子区域的NF-Y结合位点进行定点突变: (1)传统的碱基突变方法: 参照文献[6]的方法, 碱基定点突变的指导原则为腺嘌呤(adenine, A)与胞嘧啶(cytosine, C)互换(即A突变为C或C突变为A), 鸟嘌呤(guanine, G)与胸腺嘧啶(thymine, T)互换(即G突变为T或T突变为G)<sup>[6]</sup>; (2)基于转录因子结合位点分析的碱基突变方法: 即在传统定点突变方法的基础上, 参考文献已有的NF-Y结合位点突变方案, 对NF-Y结合位点的重要碱基进行逐个替换突变, 同时运用转录因子结合位点软件对包括NF-Y位点在内的附近核苷酸序列进行分析, 以保证没有新的转录因子结合位点产生。

1.2.3 定点突变重组体的构建 根据上述碱基定点突变方案设计定点突变引物。按照传统的碱基定点突变方案, 第一对NF-Y结合位点突变引物设计并命名为*PRR11*-PF-mNFY1和*PRR11*-PR-mNFY1, 第二对结合位点突变引物设计并命名为*PRR11*-PF-mNFY2和*PRR11*-PR-mNFY2(表1)。按照第二种碱基定点突变方案, 第一对NF-Y结合位点突变引物设计并命名为*PRR11*-PF-mNFY1a和*PRR11*-PR-mNFY1a, 第二对结合位点突变引物设计并命名为*PRR11*-PF-mNFY2a和*PRR11*-PR-mNFY2a(表1)。构建定点突变重组体时, 首先以质粒pGL3-*PRR11*-P80为模板构建单位点突变重组体*PRR11*-P80-mNFY1和*PRR11*-P80-mNFY2, 然

表1 构建启动子突变体所使用的突变引物  
Table 1 Primers used for promoter mutation

引物名称 Name of primer	引物序列(5'-3') Sequence of primers(5'-3')	野生型序列 Wild type sites
<i>PRR11</i> -PF-mNFY1	CTC CTC CGT TCC ACC GGC TCC CGC C	
<i>PRR11</i> -PR-mNFY1	<u>AAC</u> CGG AGT GCG AGA TGT TG	CCA AT
<i>PRR11</i> -PF-mNFY2	<u>CGG</u> TTA GAC TGG GTA ACG CCC CTC T	ATT GG
<i>PRR11</i> -PR-mNFY2	GGG CGG GAG CCG GTG GAA CGG AGG A	
<i>PRR11</i> -PF-mNFY1a	CTC CTC CGT TCC ACC GGC TCC CGC C	
<i>PRR11</i> -PR-mNFY1a	<u>TCT</u> AGG AGT GCG AGA TGT TG	CCA AT
<i>PRR11</i> -PF-mNFY2a	<u>TTC</u> AGA GAC TGG GTA ACG CCC CTC T	ATT GG
<i>PRR11</i> -PR-mNFY2a	GGG CGG GAG CCG GTG GAA CGG AGG A	

划线部分为突变位点。

The mutated sites are underlined.

后再以*PRR11*-P80-mNFY1为模板构建双位点突变重组体, 即*PRR11*-P80-mNFY1+2。定点突变参照KOD-Plus-Mutagenesis Kit试剂说明书操作。PCR反应体系中包含50 ng DNA模板和上下游引物各15 pmol。反应条件为94 °C变性2 min, 然后98 °C 10 s, 68 °C 6 min, 完成5个循环。*Dpn* I处理后, 连接、转化并挑取单克隆, 最后均通过DNA测序以确定定点突变成功。

1.2.4 脂质体介导的瞬时转染 质粒转染按照Lipofectamine™ 2000试剂说明书进行操作。转染前24 h, 将细胞以 $1 \times 10^5$ /孔的密度接种至12孔培养板, 当细胞密度达到90%时进行转染。每组设三个重复, 同时转染10 ng pRL-TK海肾荧光素酶报告基因质粒作为内参对照。

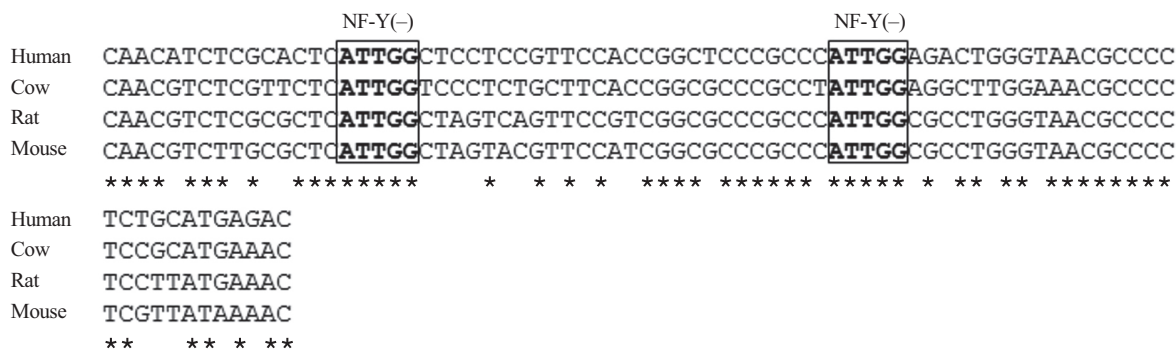
1.2.5 荧光素酶报告基因活性检测 按照Dual-Luciferase® Reporter Assay System试剂说明书进行检测。质粒转染后继续培养48 h, 用1×PBS润洗细胞2次, 弃掉PBS后每孔加入250 μL 1×细胞裂解缓冲

液, 放置于水平摇床上摇动15 min, 然后收集细胞裂解液, 离心去除细胞碎片, 上清液用于荧光素酶报告基因检测。采用化学发光检测仪Luminometer TD-20/20检测。取20 μL细胞裂解液加入100 μL荧光素酶检测试剂II(LARII), 混匀后测定萤火虫荧光素酶活性, 然后加入100 μL Stop&Glo®试剂, 混匀后测定海肾荧光素酶活性。萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性表示基因启动子的活性。

## 2 结果

### 2.1 *PRR11*核心启动子区域的NF-Y结合位点分析

用TF search等软件对人的*PRR11*核心启动子区域进行转录因子结合位点分析, 并从GenBank数据库中获取牛、小鼠、大鼠三个物种的*PRR11*的启动子相关序列并同样进行转录因子结合位点分析。同时, 还用ClustalW软件对上述四个物种的*PRR11*启动子序列进行同源性比对(图1)。结果表明, 人的



方框标注的序列为CCAAT盒, 转录因子用粗体标注, 四个物种的*PRR11*的启动子序列进行同源性比对, 相同序列用\*标注。

The box dimension of the sequence is classic CCAAT box and transcription factor are showed in bold. Four species of *PRR11* promoter sequences are tested by ClustalW and the same sequences are marked with \*.

图1 *PRR11*核心启动子序列同源性分析

Fig.1 Homology analysis of *PRR11* core promoter sequences

*PRR11*核心启动子区域含有两个典型的NF-Y结合位点,且这两个NF-Y结合位点在上述四个物种中高度保守,强烈提示NF-Y在*PRR11*的转录调控中起重要作用<sup>[7-8]</sup>。

## 2.2 传统碱基定点突变方法进行NF-Y定点突变分析

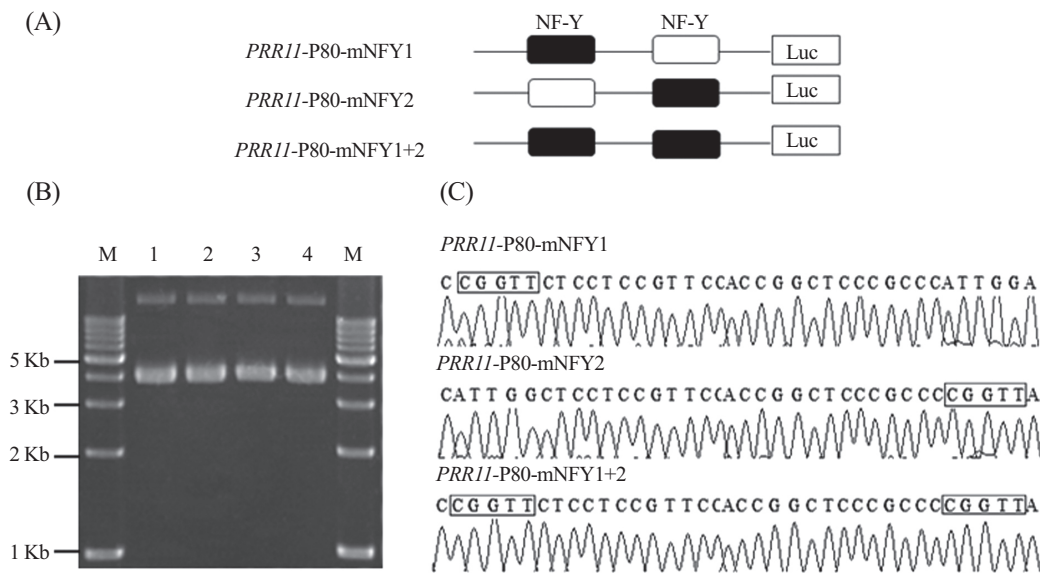
为了进一步分析*PRR11*核心启动子区域中NF-Y结合位点的作用,我们首先采用传统的碱基定点突变方法对*PRR11*核心启动子区域中的NF-Y结合位点进行了定点突变分析。分别将*PRR11*核心启动子区域包含的两个NF-Y结合位点进行单独和联合双位点定点突变,获得的定点突变重组体分别命名为*PRR11*-P80-mNFY1、*PRR11*-P80-mNFY2和*PRR11*-P80-mNFY1+2(图2A)。经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定,克隆的突变体和pGL3-*PRR11*-P80质粒的大小一致(图2B),DNA测序结果也表明各定点突变体均构建成功(图2C)。

为了检测NF-Y结合位点的突变是否影响*PRR11*-P80启动子的活性,我们将上述各NF-Y结合位点突变体分别单独转染或与NF-Y表达质粒共转染H1299细胞。启动子活性检测结果表明,NF-Y过表达能

够明显提高野生型*PRR11*-P80的启动子活性,提示NF-Y参与了*PRR11*的转录调控(图3)。然而,结果还表明,突变体*PRR11*-P80-mNFY1、*PRR11*-P80-mNFY2和*PRR11*-P80-mNFY1+2的启动子活性均明显高于野生型*PRR11*-P80的启动子活性,且NF-Y过表达也能够上调3个突变体的启动子活性,提示NF-Y结合位点并没有得到有效突变,并且NF-Y结合位点经突变后可能又造成了新的潜在转录因子结合位点的出现(图3)。事实上,通过TRANS-Match软件分析发现,将第一个NF-Y结合位点的ATTGG突变为CGGTT后,造成了Myb结合位点的出现(结果未显示)。

## 2.3 基于转录因子结合位点分析的碱基突变方法进行NF-Y定点突变分析

为克服上述传统碱基突变方法的缺陷,我们又设计并采用了基于转录因子结合位点分析的碱基突变方法,对*PRR11*核心启动子区域中NF-Y结合位点进行了定点突变分析。我们参考部分相关文献中的NF-Y结合位点的碱基突变序列,并结合转录因子预测分析,经不断尝试,发现将第一个NF-Y结合位点ATTGG突变为CTAGA和第二个NF-Y结合位点ATTGG突变为TTCAG后,均没有新的转录因子结合

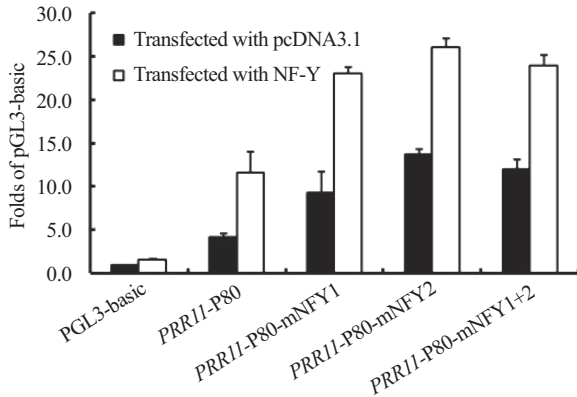


A: NF-Y结合位点突变体构建示意图:野生型的CCAAT盒为白色,突变型的CCAAT盒为黑色;B:质粒的琼脂糖凝胶电泳图。M:1 Kb DNA ladder;1: *PRR11*-P80;2: *PRR11*-P80-mNFY1;3: *PRR11*-P80-mNFY2;4: *PRR11*-P80-mNFY1+2;C:常规突变方法构建的3个突变体的测序图,方框中的碱基为突变位点。

A: schematic diagram of the NF-Y binding sites mutant: the wild type CCAAT boxes are indicated in white, and the mutated CCAAT boxes are shown in black; B: agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmids: M: 1 Kb DNA ladder; 1: *PRR11*-P80; 2: *PRR11*-P80-mNFY1; 3: *PRR11*-P80-mNFY2; 4: *PRR11*-P80-mNFY1+2; C: sequencing analysis for three mutation constructed by conventional method: the base sequences in the box are mutated.

图2 传统碱基突变方法构建的NF-Y结合位点突变重组体

Fig.2 Site-directed mutagenesis of *PRR11* promoter reporter constructed by conventional method



各报告基因重组体与pRL-TK瞬时转染入H1299细胞系, 且分别设置NF-Y共转染组或pcDNA3.1共转染组, 每组3个重复。荧光素酶活性检测参见“材料与方法”部分。启动子活性表示为各重组体与pGL3-basic的倍数比。结果显示为3个重复实验的平均值与标准差。

H1299 cells were transiently co-transfected in triplicate in 12-well plates with the indicated luciferase reporter constructs, the Renilla luciferase reporter plasmid (pRL-TK), and NF-Y plasmid or pcDNA3.1 plasmid. The luciferase activities were measured as described in “Materials and Methods”. Promoter activities are shown as folds induction compared with the activity of cells transfected with the pGL3-basic vector. The results are presented as the mean±S.D. of triplicates from a representative experiment.

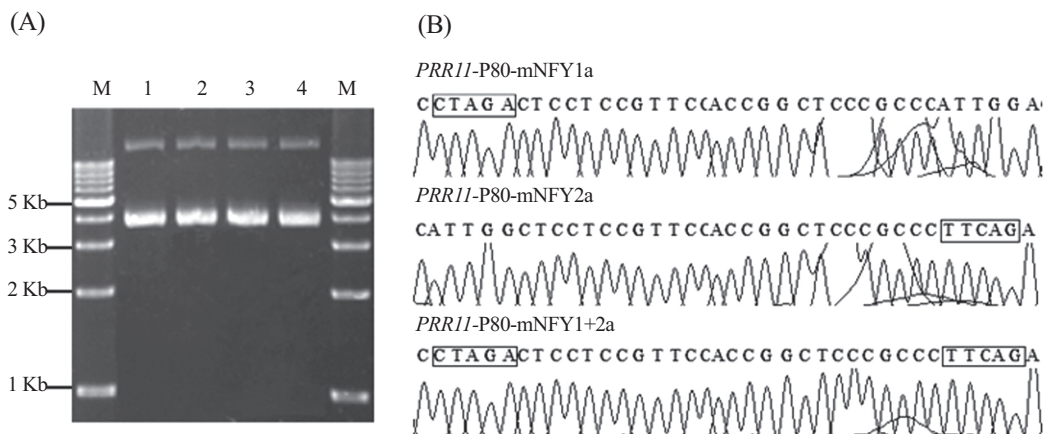
图3 传统碱基突变方法构建的突变体的启动子活性分析

Fig.3 Luciferase assay of the mutants activity constructed by conventional method

位点的产生<sup>[9-10]</sup>。我们据此设计引物并构建相应的突变体, 分别命名为PRR11-P80-mNFY1a、PRR11-

P80-mNFY2a和PRR11-P80-mNFY1+2a。琼脂糖凝胶电泳初步鉴定, 各突变体和PRR11-P80质粒的大小一致(图4A), DNA测序结果也表明各定点突变体均构建成功(图4B)。

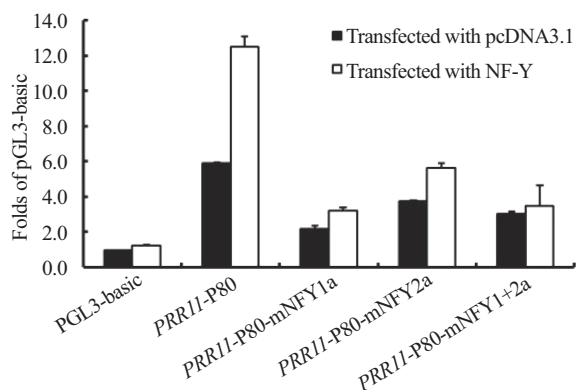
进一步将上述各NF-Y结合位点突变体分别单独转染或与NF-Y表达质粒共转染H1299细胞。启动子活性检测结果表明, 三个突变体的启动子活性均显著低于野生型(图5)。与野生型重组体PRR11-P80相比, 三个突变体分别下降了63%(PRR11-P80-mNFY1a)、36%(PRR11-P80-mNFY2a)和48%(PRR11-P80-mNFY1+2a)。有趣的是, 双位点突变体(PRR11-P80-mNFY1+2a)启动子活性的下降幅度还略低于第一个位点的单位点突变体(PRR11-P80-mNFY1a)的下降幅度。我们推测, 这有可能是两个NF-Y结合位点同时被破坏后反而造成了PRR11核心启动子区域其它转录因子如Sp1等的结合量相应升高所致。另外, 与前述结果(图3)一致, NF-Y的外源过表达能够显著增强野生型重组体PRR11-P80的启动子活性(约为转染空载体的2.1倍)。但外源过表达NF-Y后, 3个突变体的启动子活性的增强幅度均显著削弱, 其启动子活性分别仅为转染空载体的1.46、1.50和1.14倍(图5)。这不仅说明NF-Y结合位点经该方法得到有效突变, 也强烈提示NF-Y对PRR11-P80启动子活性的激活效应是通过这两个NF-Y结合位点发挥作用的。



A: 质粒的琼脂糖凝胶电泳图; M: 1 Kb DNA ladder; 1: PRR11-P80; 2: PRR11-P80-mNFY1a; 3: PRR11-P80-mNFY2a; 4: PRR11-P80-mNFY1+2a; B: 改良的突变方法构建的3个突变体的测序图, 方框中的碱基为突变位点。

A: agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmids: M: 1 Kb DNA ladder; 1: PRR11-P80; 2: PRR11-P80-mNFY1a; 3: PRR11-P80-mNFY2a; 4: PRR11-P80-mNFY1+2a; B: sequencing analysis for three mutation constructed by improved method: the base sequence in the box are mutated.

图4 基于转录因子结合位点分析的碱基突变方法构建的突变体  
Fig.4 Site-directed mutagenesis of PRR11 promoter reporter by improved method



各报告基因重组体与pRL-TK瞬时转染入H1299细胞系,且分别设置NF-Y共转染或pcDNA3.1共转染,每组3个重复。荧光素酶活性检测参见“材料与方法”部分。启动子活性表示为各重组体与pGL3-basic的倍数比。结果显示为3个重复实验的平均值与标准差。

H1299 cells were transiently co-transfected in triplicate in 12-well plates with the indicated luciferase reporter constructs, the Renilla luciferase reporter plasmid (pRL-TK), and NF-Y plasmid or pcDNA3.1 plasmid. The luciferase activities were measured by as described in Materials and Methods. Promoter activities are shown as fold induction compared to the activity of cells transfected with the pGL3-basic vector. The results are presented as the mean±S.D. of triplicates from a representative experiment.

图5 改良的突变方法构建的突变体的启动子活性分析

Fig.5 Luciferase assay of the mutant activity constructed by improved method

### 3 讨论

在本研究中,我们在前期*PRR11*启动子鉴定研究的基础上,进一步综合利用生物信息学分析、定点突变分析和启动子活性分析等技术,对*PRR11*核心启动子区域中的NF-Y结合位点进行了定点突变分析。结果表明,NF-Y结合位点是*PRR11*核心启动子区域中的重要顺式作用元件;同时,我们也对基因定点突变分析的碱基突变方法进行了改进。

*PRR11*基因是我们实验室最近克隆的一个新的肿瘤相关基因,我们初步的研究结果表明,*PRR11*在细胞周期进程、肿瘤发生发展等过程中均具有重要的作用。我们的初步实验结果也表明:*PRR11*基因呈现细胞周期依赖性的规律性表达特点,且在肺癌、乳腺癌等多种肿瘤中表达显著异常上调(待发表数据),但其表达调控机制仍不清楚,因此,阐明其表达调控机制对于全面精确解析其功能具有重要意义。我们已经对*PRR11*的启动子区域进行了初步鉴定与分析,发现*PRR11*的核心启动子区域含有典型的

NF-Y等转录因子结合位点<sup>[4]</sup>。目前,已经有大量研究结果表明,NF-Y参与了细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期进程以及癌变过程相关基因的表达调控,在大量的细胞周期、细胞凋亡和肿瘤相关基因的启动子区域也均发现有典型的NF-Y结合位点<sup>[11-15]</sup>。NF-Y通过募集组蛋白去乙酰化酶至靶基因的启动子区域,维持一些肿瘤相关基因的转录活化状态,从而调节细胞周期进程和促进细胞增殖以及肿瘤的发生<sup>[11-15]</sup>。本研究的结果表明:*PRR11*核心启动子区域中的两个NF-Y结合位点在人、牛、大鼠和小鼠四个物种中均高度保守(图1);NF-Y的外源过表达可以提高*PRR11*的启动子活性(图3和图5);采用定点突变方法将*PRR11*启动子区域中的两个NF-Y结合位点单独或同时进行有效突变后,*PRR11*的启动子活性明显下降,且NF-Y外源过表达对其启动子活性的激活效应也明显削弱甚至丧失(图5)。这些数据表明,NF-Y结合位点是*PRR11*核心启动子区域中的重要顺式作用元件,NF-Y很可能通过与该位点结合并参与*PRR11*的转录调控。然而,NF-Y是否与该位点直接结合仍有待证实。因此,在下一步的研究工作中,很有必要通过凝胶阻滞迁移率分析、染色质免疫共沉淀和RNA干扰等实验确认NF-Y在*PRR11*基因转录调控以及其在细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期进程和肿瘤发生发展中的作用。

此外,在对*PRR11*启动子区域中的NF-Y结合位点进行定点突变分析时,我们也对传统的碱基突变引物设计方法进行了改进,提出了更为合理的启动子顺式作用元件定点突变引物设计方法。在进行启动子顺式作用元件定点突变分析时,传统的碱基突变方法是A/C和G/T互换,这样可使DNA的结构发生较大或较为根本性的改变(因A和G属于嘌呤碱基,为双环结构;而C和T属于嘧啶碱基,为单环结构)。然而,在本研究中,我们发现该方法具有明显的缺陷,即很可能造成新的转录因子结合位点的出现。譬如,*PRR11*启动子的NF-Y结合位点按照这种方法进行定点突变后,突变体的活性反而出现了升高,说明NF-Y结合位点并没有得到真正有效的突变(图3)。在此基础上,我们提出了基于转录因子结合位点预测分析的碱基突变方法,即在进行碱基突变时必须联合转录因子结合位点预测分析以确保碱基的突变不会造成新的潜在转录因子结合位点的出现。事实上,我们采用该方法成功地构建了NF-Y结合位点的

突变体, 也由此证实了NF-Y结合位点在*PRR11*核心启动子区域中的重要作用(图5)。在下一步工作中, 我们拟根据上述思路设计一款专门用于定点突变体构建的软件, 使之更为合理和自动化。

总之, 本研究初步明确了NF-Y结合位点是*PRR11*核心启动子区域中的重要顺式作用元件, NF-Y可能通过参与了*PRR11*的转录调控而调节细胞增殖与肿瘤发生发展。这将为进一步深入研究并阐明*PRR11*在细胞周期进程以及肿瘤的发生发展过程中的表达调控及分子行为机制奠定坚实的基础。

### 参考文献 (References)

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
- 2 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
- 3 Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10(8): 789-99.
- 4 艾青, 卜友泉, 刘竹, 兰欢, 吉颖, 杜刚, 等. 人*PRR11*启动子的结构与功能初步分析. *中国生物化学与分子生物学报*(Ai Qing, Bu Youquan, Liu Zhu, Lan Huan, Ji Ying, Du Gang, *et al.* Structural and functional analysis of human *PRR11* promoter. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2011; 27(4): 356-63.
- 5 崔涛, 兰欢, 杜刚, 刘革力, 易发平, 卜友泉, 等. 新基因*PRR11*的克隆、原核表达及鉴定. *生物技术通报*(Cui Tao, Lan Huan, Du Gang, Liu Geli, Yi Faping, Bu Youquan, *et al.* Cloning, prokaryotic expression and identification of novel human gene *PRR11*. *Biotechnology Bulletin*) 2009; 3: 98-105.
- 6 Carey MF. *Transcriptional regulation in eukaryotes: Concepts, strategies, and techniques*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2000, 213-38.
- 7 Maity SN, de Crombrughe B. Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem Sci* 1998; 23(5): 174-8.
- 8 Dolfini D, Gatta R, Mantovani R. NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2012; 47(1): 29-49.
- 9 Lok CN, Lang AJ, Mirski SE, Cole SP. Characterization of the human topoisomerase IIbeta (TOP2B) promoter activity: Essential roles of the nuclear factor-Y (NF-Y) and specificity protein-1 (Sp1)-binding sites. *Biochem J* 2002; 368(Pt 3): 741-51.
- 10 Pallai R, Simpkins H, Chen J, Parekh HK. The CCAAT box binding transcription factor, nuclear factor-Y (NF-Y) regulates transcription of human aldo-keto reductase 1C1 (AKR1C1) gene. *Gene* 2010; 459(1/2): 11-23.
- 11 Bolognese F, Pitarque-Marti M, Lo Cicero V, Mantovani R, Maier JA. Characterization of the human EDF-1 minimal promoter: Involvement of NFY and Sp1 in the regulation of basal transcription. *Gene* 2006; 374: 87-95.
- 12 Hewetson A, Chilton BS. An Sp1-NF-Y/progesterone receptor DNA binding-dependent mechanism regulates progesterone-induced transcriptional activation of the rabbit RUSH/SMA-RCA3 gene. *J Biol Chem* 2003; 278(41): 40177-85.
- 13 Lutzner N, de Castro Arce J, Rosl F. Gene expression of the tumour suppressor LKB1 is mediated by Sp1, NF-Y and FOXO transcription factors. *PLoS One* 2012; 7(3): e32590.
- 14 Zhou D, Masri S, Ye JJ, Chen S. Transcriptional regulation of the mouse PNRC2 promoter by the nuclear factor Y (NFY) and E2F1. *Gene* 2005; 361: 89-100.
- 15 Dalvai M, Mondesert O, Bourdon JC, Ducommun B, Dozier C. Cdc25B is negatively regulated by p53 through Sp1 and NF-Y transcription factors. *Oncogene* 2011; 30(19): 2282-8.