

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.01029

准噶尔雅罗鱼 β -肌动蛋白基因启动子的克隆及其活性功能初步检测

胡文革¹, 郝凤霞¹, 陈创夫², 王远志³, 任艳²

1. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003;
2. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003;
3. 石河子大学医学院, 新疆石河子 832003

摘要: 以开发利用新疆濒危鱼类准噶尔雅罗鱼(*Leuciscus merzbacheri*)基因资源为研究目的, 利用 PCR 技术克隆准噶尔雅罗鱼的 β -actin 基因, 得到的 β -actin 基因片段 SZ21 包含启动调控区, 大小为 2 398 bp。SZ21 的启动调控区包括 β -actin 基因上游调控序列、第 1、第 2、第 3 和第 4 外显子部分序列。上游调控序列中含有对转录起重要作用的 CAAT 框、TATA 框和 CArG 框等元件。对启动子序列在线分析表明, 获得的启动子含有 E-box、RU49、ZBPf、CEBP、CREB 等多个重要转录因子结合位点。用 AatII 破坏真核表达载体 pEGFP-N1-AFPⅢ中的 CMV 启动子, 将准噶尔雅罗鱼的 SZ21 启动调控区克隆到载体 pEGFP-N1-AFPⅢ(CMV 坏)上, 构建成重组表达载体 β 2 pEGFP-N1-AFPⅢ。脂质体转染 BHK-21 细胞。结果表明, 克隆的准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21 具有启动 EGFP 报告基因在哺乳动物细胞中表达的活性。通过 BHK-21 绿色荧光细胞的传代证实, 克隆的启动子具有持续启动蛋白基因表达的活性, 在细胞传代中可以遗传。PCR 检测传代的 BHK-21 绿色荧光细胞基因组 DNA, 均能检测到 SZ21 目的片段。文章成功分离了具有活性功能的准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子。

关键词: 准噶尔雅罗鱼; β -肌动蛋白启动子; 脂质体转染; BHK-21 细胞; 活性功能

Cloning of the promoter region of *Leuciscus Merzbacheri* β -actin gene and detection of its function

HU Wen-Ge¹, HAO Feng-Xia¹, CHEN Chuang-Fu², WANG Yuan-Zhi³, REN Yan²

1. Life-Science College, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China;
2. Animal Science and Technology College, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China;
3. Medicine College, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China

Abstract: To utilize the gene resources of *Leuciscus merzbacheri*, a 2 398 bp (SZ21) DNA fragment including the 5'-flanking region and partial open reading frame of the β -actin gene was obtained through PCR amplification. SZ21 includes a regulatory sequence which contains the 5'-proximal promoter, the first, the second and the third exons and the partial fourth exon sequence. The 5'-proximal promoter region is critical for transcription activity including the CAAT box, TATA box and CArG box. The analysis of putative transcription binding sites of the promoter by on-line software revealed the

收稿日期: 2009-03-27; 修回日期: 2009-06-08

基金项目: 石河子大学科技发展计划项目(编号: ZRXX200744)资助

作者简介: 胡文革(1966-), 女, 副教授, 研究方向: 动物分子遗传与育种。Tel: 0993-2055038; E-mail: hwg-t@163.com

通讯作者: 陈创夫(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 免疫遗传与抗病机理。Tel: 0993-2058002; E-mail: cc-f-xb@163.com

致谢: 中国科学院遗传与发育生物学研究所陈良标研究员为该实验提供载体 pEGFP-N1-AFP, 特此谢忱!

presence of the critical transcription binding sites (such as E-box, RU49, ZBPF, CEBP and CREB). CMV promoter for eukaryote vector pEGFP-N1-AFP was destroyed by *Aat* II digestion. SZ21 regulatory sequence was inserted into the vector pEGFP-N1-AFP (with destroyed CMV) that can express green fluorescence protein, and β 2 pEGFP-N1-AFPIII recombination vector was constructed. Linearized β 2 pEGFP-N1-AFP was transfected into BHK-21 cell through lipofectin. EGFP expression of the transgenic cell was observed by micro fluoroscope. The results indicated that the cloned *Leuciscus merzbacheri* β -actin gene promoter SZ21 has the activity to switch on the EGFP expression in mammal cell, and has a continued starting expression activity passing on from generation to generation in green fluorescence cell. In addition, the SZ21 target fragment was detected in the BHK-21 green fluorescence cell genomic DNA by PCR. This suggested that the SZ21 promoter of β -actin gene has effective transcription activity and can promote the expression of foreign gene.

Keywords: *Leuciscus merzbacheri*; β -actin gene promoter; lipofectin transfection; BHK-21 cell; activity function

启动子是真核生物转基因制作过程中表达载体构件的重要组分,启动子决定了基因表达的时空以及强度,转录水平的调控是真核生物基因表达调控的重要环节^[1]。启动子是位于结构基因 5 端上游区域参与特定基因转录及其调控的 DNA 序列,具有特异性的序列结构,能够活化 RNA 聚合酶,使之与模板 DNA 特异性结合,保证转录起始的精确性。启动子包含核心启动子区域和调控区域,核心启动子区域产生基础水平的转录,调控区域能够对不同的环境条件作出应答,有些特定基因的转录区内部也存在着转录因子的结合位点。对于启动子的深入研究,有助于优化控制外源基因在转基因生物中的表达。

肌动蛋白(Actin)是所有真核生物细胞内的重要结构蛋白,在肌细胞中和非肌细胞的细胞质及细胞核内均有发现^[2, 3]。 β -actin 是最主要的非肌肉或胞质肌动蛋白异型体,它在真核生物的大多数非肌肉细胞以及未分化的成肌细胞中表达。 β -actin 启动子具有广泛启动表达的功能,具有与 SV40 早期启动子相当甚至更强的启动转录活性^[4]。鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的 β -actin 启动子是鱼类中第 1 个被分离到的 β -actin 启动子,已证明其具有有效的启动作用,可有效地驱动外源报告基因和蛋白编码基因在鱼类中表达^[5, 6]。之后,青鳉、斑马鱼、尼罗罗非鱼、泥鳅、青鱼、唐鱼的 β -actin 启动子也先后被分离并验证了其驱动基因表达的活性^[7-9]。

准噶尔雅罗鱼(*Leuciscus merzbacheri*)又名新疆雅罗鱼,隶属鲤形目、鲤科、雅罗鱼属,是新疆特有土著鱼类,是新疆现有 3 种雅罗鱼属鱼(准噶尔雅罗鱼、贝加尔雅罗鱼和高体雅罗鱼)中较古老的鱼类物

种^[10, 11]。该鱼已被列为新疆濒危鱼类,其基因资源目前尚没有被研究开发利用。已有的研究表明,不同鱼类的 β -actin 基因启动子的活性存在着差异^[12],因此,本研究克隆了准噶尔雅罗鱼的 β -actin 基因启动子,并构建了以增强型绿色荧光蛋白基因(EGFP)作为报告基因的重组真核表达载体。以 BHK-21 细胞作为受试细胞,检测克隆的准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子驱动绿色荧光蛋白基因表达的活性。为下一步利用准噶尔雅罗鱼的基因资源,构建“全鱼”基因表达载体进行转基因鱼研究提供基本材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

准噶尔雅罗鱼是采自新疆赛里木湖的土著野生鱼类。BHK-21 为购买的商品化细胞株。含有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因的质粒载体 pEGFP-N1-AFPIII 为中国科学院遗传与发育研究所陈良标研究员惠赠。*Eco*R I、*Aat* II 和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌 *E. coli* TOP10、pBS-T 载体、long DNA *Taq* 和普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA Marker 购自天根生化科技有限公司。脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司。细胞培养基 DMEM 为 Gibco 公司产品。胎牛血清为杭州四季青公司产品。其他常用试剂为本室自行配制。

1.2 方法

1.2.1 准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子的克隆

参照胡文革等^[13]的方法提取准噶尔雅罗鱼的基

基因组 DNA, 根据已发表的鲤鱼的 β -actin 基因序列^[14]和草鱼的 β -actin 基因序列(GenBank 登录号分别是 M24113 和 M25013)相对保守区, 参照 Hwang 等^[12]使用的扩增鲤鱼 β -actin 基因启动子的引物, 设计合成 2 条简并引物, 上游引物为 β A-P1, 下游引物为 β A-P3, 见表 1。引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。用 long DNA Taq 酶 PCR 扩增准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子。扩增程序为 94 预变性 4 min; 94 变性 50 s, 63 复性 50 s, 72 延伸 1 min 50 s, 30 个循环; 72 延伸 10 min。1%的琼脂糖凝胶检测 PCR 产物, UV 凝胶仪拍照。切胶回收 PCR 产物, 将 PCR 产物连接到克隆载体 pBS-T 上(记为 pBS-SZ21-P)。选取阳性克隆, 经菌落 PCR 和双酶切鉴定正确的, 提取质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.2 克隆的启动子序列转录元件的预测分析

利用在线工具 Matinspector software (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector.pl>)以及 Match program(<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/bin/match.cgi>)的分析软件 TRANSFAC 6.0, 对启动子进行预测分析。根据转录调控因子结合位点核心区的相关度, 选取相关度系数大于 0.9 的结合位点以确保其具有较高的特异性。

1.2.3 准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子目的片段的双酶切与回收

用 DNAMAN 软件对测序结果分析后, 确定两条序列均无 Aat II 和 EcoR I 酶切位点。在上游引物 β A-P1 的 5'端加 Aat II 酶切位点 GACGTC 重新设计上游引物, 记为 SZ1A-U, 见表 1。用引物对 SZ1A-U/ β A-P3 再次从 pBS-SZ21-P 上 PCR 扩增准噶尔雅罗鱼的 β -actin 基因启动子。扩增程序同 1.2.1。切胶回收 PCR 产物, 将 PCR 产物再次连接到克隆载体 pBS-T 上(记为 SZ2AP3)。提取质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将测序结果方向正确的质粒(目的片段 5'端的 Aat II 切点位于 pBS-T 载体的多克隆酶切位点 EcoR I 的相反端)保菌。用 Aat II 和 EcoR I 双酶切质粒 SZ2AP3, 1%琼脂糖电泳检测并切胶回收目的片段。

表 1 用于准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子克隆及 PCR 检测的引物

引物	序列(5' → 3')
β A-P1 (Upper)	GTGT/AGTGACGCT/CGGACCAATC
β A-P3 (Down)	CCAGAGTCCATCACGATACCACT
SZ1A-U (Upper)	CGGACGTCGTGAGTGACGCTGGACCAATC

1.2.4 pEGFP-N1-AFP III 载体中 CMV 启动子的破坏与载体的酶切回收

用 Aat II 酶切真核表达载体 pEGFP-N1-AFP III, 破坏其 CMV 启动子, 用 T4 DNA 连接酶自连后, 载体记为 pEGFP-N1-AFP III (CMV 坏)。用 Aat II 和 EcoR I 双酶切载体 pEGFP-N1-AFP III (CMV 坏), 1%琼脂糖电泳检测并切胶回收目的片段。

1.2.5 真核表达载体 β 2 pEGFP-N1-AFP III 的构建及鉴定

将 1.2.3 和 1.2.4 经 Aat II 和 EcoR I 双酶切并回收的 PCR 产物和破坏启动子的载体 pEGFP-N1-AFP III (CMV 坏), 在 T4 DNA 连接酶作用下 16 h 连接过夜, 连接产物记为 β 2 pEGFP-N1-AFP III。转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 用含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 抗性培养基筛选转化子。次日挑选数个单菌落, 摇床培养, 用碱裂解法提取质粒 DNA, 通过 Aat II 和 EcoR I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定阳性质粒 β 2 pEGFP-N1-AFP III, 将检测正确的转化子质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。序列确定无误后, 大量扩增保菌。

1.2.6 细胞培养及筛选试剂 G418 浓度梯度的确定

采用 DMEM 培养液, 添加 10%胎牛血清及青霉素和链霉素(双抗)各 100 μ g/mL, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下进行 BHK-21 细胞培养及传代。G418 筛选试剂设置 5 个浓度梯度 300 μ g/mL、350 μ g/mL、400 μ g/mL、450 μ g/mL 和 500 μ g/mL。以筛选 10 d 仅有少数细胞存活做为筛选用浓度。

1.2.7 β 2 pEGFP-N1-AFP III 真核表达载体转染 BHK-21 细胞

BHK-21 细胞培养方法同 1.2.6。用 Aat II 线性化质粒 pEGFP-N1-AFP III (CMV 坏)和重组质粒 β 2 pEGFP-N1-AFP III, 分别记为 CMV 坏、 β 2。转染前

1 d, 胰蛋白酶消化 BHK-21 细胞, 计数, 按 5×10^5 cell/mL 的密度传代于 12 孔细胞培养板内, 待细胞生长至 75%~80% 融合时进行转染, 转染前用 PBS 液洗一次。转染设置 3 组, 分别为 2 个实验组(CMV 环、 $\beta 2$)和一个空白对照组, 每组 3 个重复。实验组每个重复的转染过程是: 取 2 支 1.5 mL 离心管, 1 支加 5 μ g(约 6~10 μ L)线性化质粒 DNA, 用无血清无双抗的 DMEM 稀释至 150 μ L, 另一支加入 8 μ L 脂质体, 用无血清无双抗的 DMEM 稀释至 150 μ L; 将质粒 DNA 稀释液和脂质体稀释液轻轻混匀, 室温下放置 30 min 后加入 BHK-21 细胞培养孔中, 置于 CO_2 培养箱(37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2)中孵育, 每隔 30 min 轻轻摇动 1 次。空白对照组的细胞用 PBS 洗 1 次后, 只加 300 μ L 无血清无双抗的 DMEM 液和 8 μ L 脂质体, 不加质粒。转染 4~6 h 后终止反应, 换成新鲜的含 10% FBS、有双抗的 DMEM 培养液, 置于 CO_2 培养箱继续培养。

1.2.8 G418 筛选表达绿色荧光的 BHK-21 细胞

转染 24 h 后, 将转染的 BHK-21 细胞放置于荧光显微镜下, 观察细胞中绿色荧光的表达。待观察到有表达绿色荧光的细胞后, 用 400 μ g/mL 浓度的 G418 筛选表达绿色荧光蛋白的 BHK-21 细胞。直至出现表达绿色荧光的细胞克隆群。为了获得较多的表达绿色荧光的 BHK-21 细胞, 我们用 400 μ g/mL 浓度的 G418 筛选出现较大范围的绿色荧光细胞克隆群后, 在无菌操作的环境中, 非常小心仔细地尽量剔除绿色荧光细胞克隆群周围的非绿色荧光细胞, 然后再继续培养, 传代, 这样反复多次以后, 收集绿色荧光细胞。拍照记录结果。

1.2.9 表达绿色荧光的 BHK-21 细胞中准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子的 PCR 鉴定

将表达绿色荧光的 BHK-21 细胞群传代 2 次, 对每次传代的细胞仍然用 400 μ g/mL 浓度的 G418 筛选, 以获得较大量表达绿色荧光的 BHK-21 细胞。收集细胞于 1.5 mL 离心管中, 用 DNase I 处理收集的细胞后, 再提取细胞基因组 DNA(方法参照胡文革等^[13]稍作修改), 目的是去除转染时所用载体 $\beta 2$ pEGFP-N1-AFPⅢ对 PCR 结果的影响。用引物 β A-P1/ β A-P3 对细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增程序同

1.2.1, 检测目的条带的存在。

2 结果与分析

2.1 准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子的克隆

对提取的准噶尔雅罗鱼基因组 DNA 利用引物 β A-P1/ β A-P3 经 PCR 扩增, 电泳检测, 得到一条准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子片段(记为 SZ21), 大小约为 2 400 bp。切胶回收纯化后, 克隆到 pBS-T 载体上。选取阳性克隆经 PCR 和双酶切鉴定正确后, 提取质粒送上海生工生物工程技术有限公司测序。序列分析表明克隆的 SZ21 启动子大小为 2 398 bp。通过与 Liu 等^[14]发表的和已登陆(M24113)的鲤鱼同源序列进行比较, 序列相似性为 58.72%。说明克隆得到的准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子序列 SZ21 与鲤鱼的相似序列相比差异很大。其 5'侧翼序列含有近端启动子转录元件: CAAT Box、CArG Box 和 TATA Box, 其位置分别在转录起始位点(+1)上游的 -89、-59、-26 处(图 1)。

2.2 准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子序列转录元件的在线预测

在线软件预测表明, 全长 2 398 bp 的启动子 SZ21 序列含有 1 个 CAATbox、2 个 CC(A/T)₆GG box、12 个 TATA box、2 个 E-box、1 个 RU49、2 个 ZBPf、3 个 CREB、1 个 Enhance region、7 个 CEBP 位点等多种转录因子结合位点(相关度系数>0.9)(表 2)。

2.3 真核表达载体 $\beta 2$ pEGFP-N1-AFPⅢ的构建及鉴定

再次用引物 SZ1A-U/ β A-P3 PCR 扩增准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21, 将含有 AatⅡ切点的 SZ21 目的片段克隆到 pBS-T 载体上, 构建含有 AatⅡ切点的质粒记为 SZ2AP3。用 AatⅡ酶切破坏载体 pEGFP-N1-AFPⅢ上 CMV 启动子部分, 自连成 pEGFP-N1-AFPⅢ(CMV 环)。利用引物中的 AatⅡ酶切位点和 pBS-T 载体多克隆位点上的 EcoRⅠ切点, 将启动子 SZ21 序列从质粒 SZ2AP3 上双酶切下来, 克隆入同样经过 AatⅡ/EcoRⅠ作用后的 pEGFP-N1-AFPⅢ(CMV 环)载体上。构建的载体命名为 $\beta 2$ pEGFP-N1-AFPⅢ。载体 $\beta 2$ pEGFP-N1-AFPⅢ经

Aat II/*Eco*R I 双酶切鉴定(图 2)和上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 构建正确。SZ21 启动子序列长度为 2 398 bp, pEGFP-N1- AFP III(CMV 环)载体部分长度为 4 573 bp。

2.4 准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21 在 BHK-21 细胞中的活性功能鉴定

用 *Aat* 线性化质粒 pEGFP-N1-AFP (CMV 环)和重组质粒 β 2 pEGFP-N1-AFP 后, 脂质体转染

5'-GTGAGTGACG CTGGA[CCAAT]CAGAGAGCAG AGCTTCGAAA GTTTA[CCTTT TATGG]CTAGA GCCGGGCATA CACTGCCA[TA]-25
 (CAAT 框) +1 [CC(A/T)₆GG 框]
 [TAA]AAGAGCT CGCCAGCTT TTCA[TCCTCA CTTTGAGCTC CTCCACACGC AGCTAGTGCG GAATATCATC AGCTTGTAAC]+56
 (TATA 框) intron 1
 [CAATTCTCTT AAGTCGACAA ACCCCCCCTA ACCTAAG]GTG AGTTAATTTT TCAGCTTTTA AAGCCTTTTT ATTGTATTTT +136
 TAGTTCATTA ATATTAATTT AAATGTTTAA CTAGAATGAA TAAACAAAAC TGTATAAAGT CGTTTGAACA AGTTACCGGT +216
 CTTTTTGCTG TTAAATATTA ACTTCTGCTT AAAAACAGCA GTTATTCTTT AGTATGTGGT TATTTTATGT AAATTATTGC +296
 TGTATTATCA TAACTTAATG TACTGACATG TCAGTCGGAA GTGAGGGTAA CCGCTGTAGA CACGACATTG AATGGGCCCG +376
 TGTGAAATAA GCGTTTAAAGT TACGTCTCTC AACATTAAGA TGCCTCTGG TTAACCGTGT TTAAACAGCT ATTAACGTGT +456
 CTTTATAGTT TTAAGGGTAT TCGTGAGGCA TGATGTATAC TTGATGGATA GCCGGCATGG GAAGTTCTTT GTGCAGCAGG +536
 CAGTGCTGCA GCAGGGGTG ACCTACTTTA GCTAACGTTA GCCGGCTAAC CAGCTTTCAC CTCCGGTGAA TCTGACATT +616
 GCTTAAAGTT ATTCGATCTC TAAATAATCA AATGCTACTA ATTATTTCGC TTTCATCACA ACCAACCGTT TTAGTGAATA +696
 TTGACGCTTT AAATCGTAGT ATGCAGCCCC TCAGTCTTTC ATTAAGACTG AAGATTAGTG AAGCACATCA TATTCACGTT +776
 TCGAAATATA AGGTGTGGTC AATTTTAAACA GTTGGTGTA ATTTTGTTCT GGTGGCAATT AAAGTTTAT AATTGTGTCG +856
 AACACTAACT TCGCTTAAAT CTTATTGATA AGATTAGAAT ATAAACCGAA TCGGCTGATG ATGGTGCTTT GATGTGAAGT +936
 CTGCTCTATG GAGTCATTGA ATTGACTGCA GATCTGTGAC GCAGTAATGT TGGGCAGACA CCCGTCGAAA TTCGGTTGTG +1016
 TAATTGATAC CAGGCGAGAA TGGAAGAGGA TGAAAACTT AATTCTTGTA GAATTAGGG AGTGTCCTG GCGTGATGAA +1096
 TTTCGAAATC TGTTCTTTT TACTGAACTC TGAATCTGGC TGAGTGCCAC ACCGCCGCA GCCGCAAAGC GGCTCAATCC +1176
 ATTGCCTTTT ATGTAATAA CTAGAGAATG CAGAGGGACT TCCTTTGTCT GGCATATCTG AGGCGCGTAT TGTACTCTA +1256
 GCACCCGCTA GCGGTCAGAC TGTAGAATGC AGCACGAAAC AGGAAGTTGA CTCCACATGG TCACATGCTC ACTGACACTT +1336
 TCTTCATGG CAGCAGTGCA CTCTAAAAC GTTTTCTCTC TCTTTACAG TTTAGCC[ATG GATGATGAAA TTGCCGCACT] +1416
 exon2
 [GGTTGTTGAC AACGGATCCG GTATGTGCAA AGCCGGATTC GCTGGAGATG ATGCTCCCCG TGCTGTCTTC CCATCCATCG] +1496
 intron 2
 [TGGGTCGCC CAGACATCAG]GTGAGAGGCA GAGGATAAAT AGATTGGGC TGACCTGTAA TGAGAATTAT TTTCATAATT +1576
 TAAAAGTGAA TTAACCTCCA GTTACTAAAC ATTTTACAAA AATTAACATT GCTTTCTTTG TTACAG[GGTG TCATGGTTGG] +1656
 [TATGGGACAG AAGGACAGCT ATGTTGGTGA TGAGGCTCAG AGCAAGAGAG GTATCCTGAC TCTGAAGTAC CCCATTGAGC] +1736
 exon3
 [ACGGTATTGT CACCAACTGG GACGACATGG AGAAGATCTG GCATCACACC TTCTACAATG AGCTGCGTGT TGCCCCAGAG] +1816
 [GAGACCCCCG TCCTGCTCAC AGAGGCCCCC CTGAACCCCA AGGCCAACAG GGAAAAGATG ACACAG]GTTG GTTTTTTGCT +1896
 intron 3
 AGCAATGGT GCATTGAAGT TTCTGTTTG TCCTGTCTG TCATTTTAAG TTCTCCTTTT CATTATTCA CTTCCTCCAG +1976
 GCTTTGTTTC CTCTGAGCTC CTGAGTTTCT CATCTTTTGC TGGAAGCAGC AGGTTATCTA TACTTTTGCC TGCTGTGTTT +2056
 GCAGTCTCCT GCACCTTAT ACTTTGTGCA CTTTGTGTTT TTAAGTCTGG ATTTCCAAT AACCCTGCA TGATGTGTG +2136
 GATGGTGTGC TGTAATATT TGAGCATCAG TTAACCTATC CTCTCTCTT TCAG[ATCATG TCGAGACCC TCAACACCCD] +2216
 exon4 partial sequence
 [CGCCATGTAC GTTGCCATCC AGGCTGTGTT GTCCCTGTAT GCCTCTGGTC GTACCACTGG TATCGTGATG GACTCTGG] -3 +2294

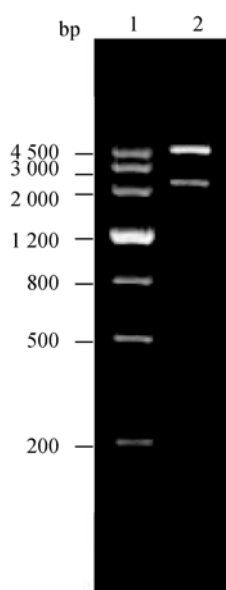
图 1 准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21 序列结构示意图

“+1”表示转录起始位点; “[]”表示转录起点上游近端启动子的 CAAT 框、CC(A/T)₆GG 框、TATA 框; “_”表示内含子部分; “[]”表示外显子部分。

表 2 准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21 序列可能存在的重要转录结合因子和启动元件预测

名称	序列位点(5' - 3', bp)	Core 分值	Matrix 分值
CAAT box	-89~-85	1.000	1.000
CC(A/T) ₆ GG box	-59~-50	1.000	1.000
	//1176~1194 ^a	1.000	> 0.9
TATA box	-26~-22	1.000	1.000
	//105~121 ^a //116~132 ^a //186~202//		
	450~466 ^a //453~467 ^a //834~850 ^a //		
	893~909//1176~1192 ^a //1372~1388 ^a	1.000	> 0.9
E-box	1306~1318//1467~1481	> 0.9	> 0.9
RU49	1721~1727	1.000	1.000
ZBPF	73~85//2206~2228	1.000	> 0.9
CREB	275~295//443~463//967~987	1.000	> 0.9
Enhance region	1175~1225	1.000	0.941
CEBP	771~785//1008~1022//1093~1107//		
	1094~1108 ^a //1395~1409//1564~1578 ^a //		
	2140~2154	9	> 0.9

注: ^a表示反义序列; RU49 表示锌指转录因子 RU49; ZBPF 表示锌结合蛋白因子; CREB 表示 cAMP 效应元件结合蛋白; CEBP 表示 Ccaat/增强子结合蛋白。

图 2 构建的真核表达载体 β 2 pEGFP-N1-AFPⅢ AatⅡ/*Eco*RⅠ 双酶切鉴定图

1: DNA MarkerⅢ; 2: β 2 pEGFP-N1-AFPⅢ双酶切。

BHK-21 细胞。转染 24 h 后, 用荧光显微镜观察, β 2 pEGFP-N1-AFP 组均可观察到发绿色荧光的细胞零星分散在视野里, 而 pEGFP-N1-AFP (CMV 坏) 组的 3 个重复孔中均未见绿色荧光细胞出现。继续培养 48 h, pEGFP-N1-AFP (CMV 坏) 组仍未出现荧光细胞, 而 β 2 pEGFP-N1-AFP 组发荧光的细胞有

增加的趋势。用 400 μ g/mL 浓度的 G418 筛选, 第 5 d, β 2 pEGFP-N1-AFP 组的每个培养孔中都有多个绿色荧光细胞克隆群出现, 继续筛选至第 10 d, 克隆群范围增大很多。见图 3。

2.5 表达绿色荧光的 BHK-21 细胞中准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子的 PCR 鉴定

对 2 个实验组细胞和 1 个对照组细胞传代 2 次, 收集对照组、pEGFP-N1-AFPⅢ(CMV 坏)组细胞和 β 2 pEGFP-N1-AFPⅢ组绿色荧光细胞, 用 DNase I 处理后, 提取细胞基因组 DNA, 用 β A-P1/ β A-P3 引物 PCR 扩增, β 2 pEGFP-N1-AFPⅢ组细胞出现目标条带, 大小为 2 398 bp(图 4)。说明我们构建的含有准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21 的真核表达载体 β 2 pEGFP-N1-AFPⅢ存在于 BHK-21 的转染细胞和传代细胞中, 并且可以遗传。

3 讨 论

肌动蛋白基因是一个持家基因, 在所有的真核生物细胞中高度保守。鱼类的 β -actin 基因调控序列被广泛应用于鱼类的转基因研究。与该基因转录下调相关的元件位于 3' 非翻译区, 不带此 3' 非翻译区下调相关元件的 β -actin 基因启动子, 在所有研究过的细胞类型包括肌肉细胞中组成性表达^[9,15]。 β -actin

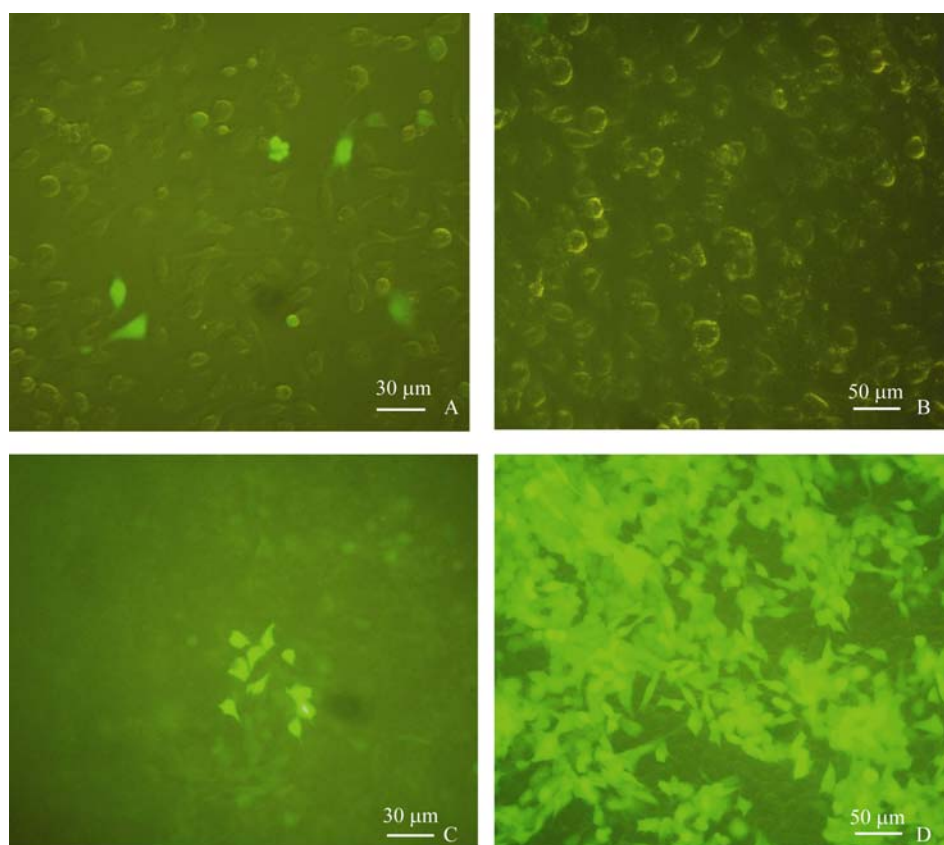


图 3 用线性化质粒 β 2pEGFP-N1-AFPⅢ和 pEGFP-N1-AFPⅢ(CMV 坏)转染 BHK-21 细胞表达绿色荧光蛋白的照片

A: 线性化质粒 β 2pEGFP-N1-AFP 转染 BHK-21 细胞 24 h 后出现表达绿色荧光的细胞; B: 线性化质粒 pEGFP-N1-AFP (CMV 坏)转染 BHK-21 细胞后未出现表达绿色荧光的细胞; C: 用 G418 筛选第 5d, 线性化质粒 β 2pEGFP-N1-AFP 组出现表达绿色荧光蛋白的细胞群; D: 用 G418 筛选后, 剔除非绿色荧光细胞, 后经多次传代后的线性化质粒 β 2pEGFP-N1-AFP 组绿色荧光细胞克隆群。

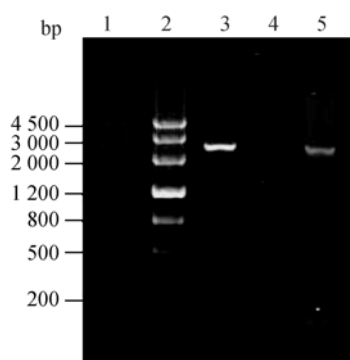


图 4 表达绿色荧光的 BHK-21 细胞中准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21 的 PCR 鉴定图

1:阴性对照组; 2: DNA MarkerⅢ; 3: 阳性对照; 4: pEGFP-N1-AFPⅢ (CMV 坏)组; 5: β 2 pEGFP-N1-AFPⅢ组。

启动子包含典型的 CAAT 框、TATA 框及 CArG 基序, 即 CC(A/T)₆GG 序列。 β -actin 启动子的活性除了与上述 5 侧翼区调控元件密切相关外, 也与 5 非翻译区有关。已证实 β -actin 基因的第一个内含子

中含有增强子^[15]。研究显示在人的 β -actin 基因中, 含有 5 侧翼序列以及第一个内含子的 β -actin 启动子具有与 SV40 早期启动子相当的或更强的启动转录活性^[4]。参照 Liu 等^[14]对鲤鱼 β -actin 基因启动子分析的结果和比对鲤鱼 β -actin 基因序列(NCBI 登录号 M24113), 并结合在线预测分析, 本实验克隆的准噶尔雅罗鱼的 β -actin 基因启动子 SZ21, 具有近端启动元件 CCAAT 框、CC(A/T)₆GG 框、TATA 框和包含在 β -actin 基因第一个内含子中的增强子序列, 不包含 3 非翻译区下调序列; 近端启动元件 CC(A/T)₆GG 序列除了在转录起点上游-59~-50 处含有一个以外, 在第一个内含子的反义序列中也有一个(1176~1194^a), TATA box 除了在转录起点上游-26~-22 处含有一个以外, 在第一个内含子的正义和反义序列中还含有多个位点, 这是否也预示着准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因的第一个内含子作为 β -actin 基因启动子的一部分在起始转录表达中的重要性。

除了位于转录起始位点上游 100 bp 左右的 CAAT、TATA 框等基本调控元件外, β -actin 基因可能还有更多的正调控或负调控元件^[9], 对于有些特定基因, 其转录区内部也存在着转录因子的结合位点, 能够对不同的环境条件作出应答。在对启动子 SZ21 重要转录结合因子预测分析时, 发现 E-box、RU49、ZBPf、CEBP、CREB 等分布在准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因的第 1、第 2、第 3 内含子和第 1、第 2、第 3、第 4 外显子中。

载体 pEGFP-N1-AFP^{III}中的 CMV 启动子位于 1~589 bp 位置, 在该区域内有 4 个 Aat II 酶切位点。我们用 Aat II 酶切破坏 pEGFP-N1-AFP^{III}, 除去了 CMV 启动子区域 121~443 bp 区域的核苷酸, 载体自连后, CMV 成为不完整的启动子。BHK-21 细胞转染实验证实, 破坏了 CMV 启动子的 pEGFP-N1-AFP^{III}载体(即 pEGFP-N1-AFP^{III}(CMV 坏))不表达绿色荧光蛋白。

重组载体 β 2pEGFP-N1-AFP^{III}是在载体 pEGFP-N1-AFP^{III} (CMV 坏)的基础上构建的。用 Aat II/EcoR 双酶切载体 pEGFP-N1-AFP^{III}(CMV 坏), 用同样的两个酶处理 SZ21 启动子, 然后将二者连接构建成真核表达载体 β 2 pEGFP-N1-AFP^{III}。转染 BHK-21 细胞时, 用 Aat II 线性化该载体, 这样在线性化的 β 2 pEGFP-N1-AFP^{III}载体中 CMV 的序列完全除去, 指导绿色荧光蛋白表达的启动子只能是准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21。实验证实, 用这个载体转染 BHK-21 细胞, 可以使之表达绿色荧光, 并且表达绿色荧光的 BHK-21 细胞经传代后仍然具有绿色荧光表达活性。在对表达绿色荧光的 BHK-21 细胞基因组 DNA PCR 扩增中, 可以检测到准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21, 初步确定, 我们克隆的准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因启动子 SZ21 具有起始绿色荧光蛋白基因在真核细胞中转录表达的活性。

参考文献(References):

- [1] Pabo CO, Sauer RT. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem*, 1992, 61: 1053-1095.
- [2] Pederson T. Half a century of "the nuclear matrix". *Mol Biol Cell*, 2000, 11(3): 799-805.
- [3] Pederson T, Aebi U. Actin in the nucleus: what form and what for. *Struct Biol*, 2002, 140(1/2/3): 3-9.
- [4] Robert MF, Monette RM, Aikichi I, Neil GM. 5' flanking and first intron sequences of the human β -actin gene required for efficient promoter activity. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(1): 254-270.
- [5] Liu ZJ, Moav B, Faras AJ, Guise KS, Kapuscinski AR, Hackett PB. Functional analysis of elements affecting expression of the β -actin gene of carp. *Mol Cell Biol*, 1990a, 10(7): 3432-3440.
- [6] Williams DW, Muller F, Lavender FL, Orban L, Maclean N. High transgene activity in the yolk syncytial layer affects quantitative transient expression assays in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Transgenic Res*, 1996, 5(6): 433-442.
- [7] Feng H, Cheng J, Luo J, Liu SJ, Liu Y. Cloning of black carp β -actin gene and primarily detecting the function of its promoter region. *Acta Genet Sin*, 2006, 33(2): 133-140.
- [8] 郁二蒙, 叶星, 王海英, 白俊杰, 夏仕玲, 劳海华, 卢迈新. 罗非鱼 β -肌动蛋白基因启动子的分离及其启动子活性的初步检测. *农业生物技术学报*, 2008, 16(2): 242-247.
- [9] 王海英, 叶星, 劳海华, 夏仕玲, 白俊杰, 简清. 唐鱼 β -actin 基因近端和远端启动子的鉴定及其启动活性分析. *生物工程学报*, 2008, 24(10): 1768-1775.
- [10] 胡文革, 段子渊, 王金富, 盛金良, 马润林. 新疆 3 种雅罗鱼线粒体 DNA 控制区序列的差异和系统进化关系. *遗传学报*, 2004, 31(9): 970-975.
- [11] 胡文革, 王金富, 盛金良, 段子渊, 马润林. 新疆三种雅罗鱼属鱼类 mtDNA D-loop 多态性及起源分化分析. *遗传*, 2003, 25(4): 414-418.
- [12] Hwang GL, Rahman MA, Razak SA, Sohm F, Farahmand H, Smith A, Brooks C, Maclean N. Isolation and characterisation of tilapia β -actin promoter and comparison of its activity with carp β -actin promoter. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1625(1): 11-18.
- [13] 胡文革, 王金富. 两种获取鱼类线粒体 DNA 的方法比较. *生物学通报*, 2005, 40(5): 42-43.
- [14] Liu ZJ, Zhu Z, Roberg K, Faras AJ, Guise KS, Kapuscinski AR, Hackett PB. The β -actin gene of carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(4): 5850.
- [15] Liliana DZ, Anne ST, Bruce MP. A 40-base-pair sequence in the 3' end of the β -actin gene regulates beta-actin mRNA transcription during myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(5): 1389-1393.