

一种免疫诱导型鲤启动子的克隆与功能分析

赵紫霞^{1*}, 张研¹, 曹顶臣², 孙昭宁¹, 许建¹, 徐鹏^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院, 农业部水生动物基因组学重点实验室,

渔业生物技术北京市重点实验室, 北京 100141;

2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

3. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361102)

摘要: 为发掘适用于基因工程抗病育种的鱼类启动子, 通过实时荧光定量PCR实验对鲤 *Rab* GTP酶(*Ras-associated binding-GTPases 1a3*, *Rab1a3*)基因的表达模式进行了分析, 证实该基因在鳃、头肾等与机体免疫防御功能密切相关的组织内转录水平较高, 且免疫激活后转录显著增强, 符合基因工程抗病育种所需的外源免疫基因转录模式。从鲤细菌人工染色体文库中, 使用 *Rab1a3* 基因特异引物筛选获得包含该基因区域的文库克隆, 测序获得该基因完整序列, 以及上下游调控序列。通过生物信息学手段, 预测到长度为1014 bp的鲤 *Rab1a3* 基因启动子序列, 该启动子不具有典型的TATA盒或CpG岛特征, 存在多个免疫相关转录因子结合位点。在草鱼肾组织细胞系内验证该启动子活性, 结果显示, 绿色荧光蛋白基因和萤火虫荧光素酶基因都能够在该启动子驱动下表达, 证实该片段具有启动子活性, 且启动子活性在受到免疫诱导后增强, 双荧光素酶报告基因检测结果显示, 该启动子活性在免疫刺激后增强至免疫刺激前的8.67倍。研究表明, 鲤 *Rab1a3* 基因启动子有望被开发成为免疫诱导型的基因工程元件, 驱动外源免疫基因在鱼体内适时表达, 抵御外界病原感染, 同时避免非必要条件下的过度表达形成生长负担。

关键词: 鲤; *Rab1a3* 基因; 启动子; 免疫诱导

中图分类号: Q 812; S 942.5

文献标志码: A

病害频发已成为当前水产养殖业面临的严峻考验。利用基因工程技术将免疫基因如免疫球蛋白或抗菌肽等转入养殖鱼类体内, 培育疾病抗性品种, 是防控养殖病害的有效途径之一^[1]。

经过30余年的发展, 多种有效的鱼类转基因技术方案已成功确立, 并在大西洋鲑(*Salmo salar*)中实现商品化应用^[2-4]。一些涉及生物伦理和生物安全的转基因科学观念也逐渐形成共识, 例如以商品化生产为目标的转基因鱼类研发宜使用“金鱼”转基因策略^[3-6], 即所有的转基因元件, 包括表达调控序列、转入的外源基因都来源于鱼类, 而非远缘动植物、微生物, 特别是人类。

启动子是所有转基因策略中必备的转基因元件, 转基因载体中负载的外源目的基因必须置于有效的启动子介导之下, 才能够在宿主细胞内成功转录表达。用于基因工程的启动子常根据作用方式及功能分为3类: 组成型启动子(在全部或多数组织中保持持续的转录活性)、特异型启动子(在特定的组织或发育时期具有转录活性)和诱导型启动子(受特定物理或化学信号调控)^[7-8]。

目前, 鱼类免疫相关基因的功能研究已获得广泛关注^[9-12], 但关于免疫诱导型启动子的报道仍较少^[13-14], 本研究旨在克隆和注释具有免疫响应特征的鱼类启动子, 为基因工程抗病育种

收稿日期: 2016-08-26 修回日期: 2017-03-30

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2015C007); 国家科技支撑计划(2015BAD25B01)

通信作者: 赵紫霞, E-mail: zhaozx@cafs.ac.cn

提供有效的转基因元件。

Rab GTP酶(Ras-associated binding-GTPases, Rab)基因属于Ras超家族, 编码单体GTP结合蛋白, 以分子开关的形式参与膜泡转运, 是细胞内的一种信号分子^[15]。Rab家族多数基因转录呈现免疫应答特征, 在病原菌胁迫处理后基因转录水平大幅度上调, 这一现象在多个物种, 包括水产物种中得到实验证实, 如鲤(*Cyprinus carpio*)^[16]、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)^[17]、美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)^[18]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[19]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[20]等。因而Rab基因家族成员适宜作为筛查鱼类免疫诱导型启动子的候选基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼采自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰水产试验站, 为3月龄散鳞镜鲤(*Cyprinus carpio* var. *specularis*), 平均体质量(156±20) g, 其中健康个体5尾, 自然感染水霉菌发病个体5尾。镜鲤细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)文库由中国水产科学研究院生物技术研究中心构建^[21]并保存。草鱼肾组织细胞系(*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK)来自国家水产种质资源平台。

1.2 基因表达分析

使用Trizol试剂(Life technologies)分别提取脑、皮肤、鳃、血液、头肾、肌肉、肝脏、脾脏、肠、心脏组织总RNA, DNase I (Sigma-Aldrich)处理以避免基因组DNA污染。使用ReverTra Ace- α -RT-PCR cDNA第一链合成试剂盒(TOYOBO)进行mRNA反转录。使用SYBR Green RT-PCR试剂盒(TOYOBO)在Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR系统(Life technologies)上进行实时荧光定量PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR)实验, 分析各组织内Rab1a3基因(GenBank: KF737068)在感染前后的表达量差异。使用 β -actin (GenBank: M24113.1)作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[22]计算Rab1a3基因相对表达量。Rab1a3定量引物Rab1a3-F1: AGAGGAGCACATGGCATTATT; Rab1a3-R1: CAAATTCCTTTGCCGTTGTGT; β -actin扩增引物actin-F: TGCAAAGCCGATTCGCTGG; actin-R: AGTTGGTGACAATACCGTGC。

1.3 启动子测序分析

使用鲤Rab1a3特异性引物, 按照已报道方法^[21-23]在鲤BAC文库中筛选获得包含Rab1a3基因的文库克隆。Rab1a3特异性引物Rab1a3-F2: ACCTGTTGCTGACCCCTTAAT; Rab1a3-R2: AGGAAGCCACAAATGTATGCG。

取目标克隆菌液涂布平板, 挑取单克隆, 接种于含有氯霉素的2XYT培养基内, 37 °C培养过夜。取1.5 mL菌液置离心管中, 12 000 r/min离心5 min, 收集菌体, 碱裂解法提取质粒DNA, 使用引物步移法进行Sanger测序(北京天一辉远生物科技有限公司), 利用CLC Genomics Workbench4.03数据分析平台拼接获得鲤Rab1a3基因所在区域基因组序列(GenBank: KX620052)。

使用Trizol试剂(Life technologies)分别提取脑、皮肤、鳃、血液、头肾、肌肉、肝脏、脾脏、肠、心脏组织总RNA, DNase I (Sigma-Aldrich)处理以避免基因组DNA污染。使用ReverTra Ace- α -RT-PCR cDNA第一链合成试剂盒(TOYOBO)进行mRNA反转录。使用SYBR Green RT-PCR试剂盒(TOYOBO)在Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR系统(Life technologies)上进行qRT-PCR实验, 分析各组织内Rab1a3基因(GenBank: KF737068)在感染前后的表达量差异。 β -actin (GenBank: M24113.1)作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[22]计算Rab1a3基因相对表达量。Rab1a3定量引物Rab1a3-F1: AGAGGAGCACATGGCATTATT; Rab1a3-R1: CAAATTCCTTTGCCGTTGTGT; β -actin扩增引物actin-F: TGCAAAGCCGATTCGCTGG; actin-R: AGTTGGTGACAATACCGTGC。

1.4 载体构建

以CYC041015质粒DNA为模板, 使用Rab1a3启动子引物进行PCR扩增。Rab1a3启动子引物Rab1a3-F3: GGCAAGGGTCTCACGCGTTGCTTTCAAGGGCTCGTCTC; Rab1a3-R3: CTTGCCGGTCTCAAGCTTATCATCTGACCTGCCGAAC。将纯化后的扩增产物利用限制性内切酶MluI, Hind III进行双酶切处理, 获取带有粘性末端的启动子片段。分别将pGL3-EGFP和pGL3-basic载体(Promega)进行Mlu I, Hind III双酶切处理, 获取带有粘性末端的载体质粒。将纯化后的启动子和载体质粒按照物质的量比例3:1混合, T₄ DNA连接酶于16 °C处理12 h, 转化*E. coli*

DH5 α 感受态细菌, 涂布含有氨苄青霉素的平板, 37 °C倒置培养12 h。挑取单克隆, 碱裂解法提取质粒, 测序鉴定, 获得成功插入鲤*Rab1a3*启动子完整序列的pGL3-EGFP-*Rab1a3*和pGL3-basic-*Rab1a3*启动子载体。

1.5 细胞转染和免疫刺激

使用含5%胎牛血清的杜氏改良伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基, 初始接种浓度为每孔 2×10^5 个细胞, 5% CO₂培养箱25 °C培养12 h, 待单层细胞贴壁超过60%后, 用pH 7.4的PBS缓冲液洗涤细胞3次, 每孔加入无血清DMEM培养基900 μ L, 1 h后进行转染。

转染试验使用Lipofectamine® 2000(Life technologies)体系进行脂质体转染, 分为6组, 每组各孔分别加入(1) 1900 ng pGL3-EGFP空载体+6 μ L Lipofectamine® 2000转染试剂+994 μ L无血清DMEM培养基; (2) 1900 ng pGL3-EGFP-*Rab1a3*启动子载体+6 μ L Lipofectamine® 2000转染试剂+994 μ L无血清DMEM培养基; (3) 1900 ng pGL3-EGFP-*Rab1a3*启动子载体+6 μ L Lipofectamine® 2000转染试剂+994 μ L无血清DMEM培养基; (4) 1900 ng pGL3-basic空载体+100 ng PRL-CMV海肾荧光素酶内参载体+6 μ L Lipofectamine® 2000转染试剂+994 μ L无血清DMEM培养基; (5) 900 ng pGL3-basic-*Rab1a3*启动子载体+100 ng PRL-CMV海肾荧光素酶内参载体+6 μ L Lipofectamine® 2000转染试剂+994 μ L无血清DMEM培养基; (6) 1900 ng pGL3-basic-*Rab1a3*启动子载体+100 ng PRL-CMV海肾荧光素酶内参载体+6 μ L Lipofectamine® 2000转染试剂+994 μ L无血清DMEM培养基。轻轻摇动平皿混匀, 5% CO₂培养箱25 °C培养。

转染后6 h, 换半液, 换液使用含有5%胎牛血清的DMEM培养基, 继续5% CO₂培养箱25 °C培养。转染后24 h, 向(3)和(5)组各孔中加入1 μ g/ μ L的细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)10 μ L, 轻轻混匀, 继续5% CO₂培养箱25 °C培养6 h。在荧光显微镜下观察(1)~(3)组细胞形态和绿色荧光蛋白荧光信号。

1.6 双荧光素酶报告基因检测

使用Dual-Luciferase® Reporter Assay

System双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega), 按说明书完成检测步骤。将(4)~(6)组各孔内细胞充分裂解后, 分别测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性。使用海肾荧光素酶活性值作为内参, 使萤火虫荧光素酶活性值正态化, 荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性。再以只转染pGL3-basic空载体和PRL-CMV海肾荧光素酶内参载体的第(4)组数值为对照, 将该组荧光素酶活性归一化, 荧光素酶相对活性=实验组荧光素酶活性/对照组荧光素酶活性^[24]。

2 结果

2.1 鲤*Rab1a3*基因表达模式分析

鲤*Rab1a3*基因在未感染的健康个体各组织内均有表达, 其中鳃、头肾组织表达量较高; 在感染个体中, 皮肤、鳃、血液、头肾、肝脏、肠、心脏内*Rab1a3*基因表达量均有上调, 其中鳃、头肾、肝脏中的表达量变化极显著, 头肾表达量上调15倍以上, 呈现出明显的免疫应答特征(图1)。

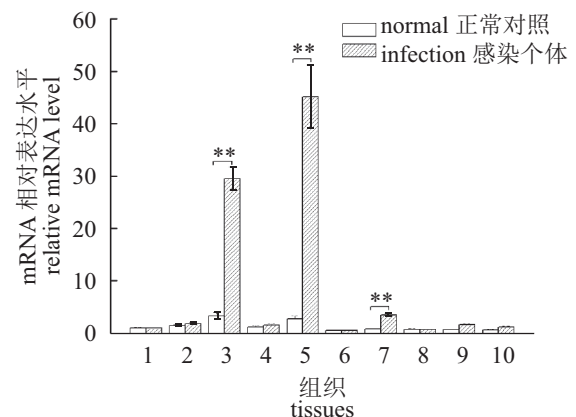


图1 *Rab1a3*基因在鲤10种组织内感染前后mRNA表达量变化

1. 脑, 2. 皮肤, 3. 鳃, 4. 血液, 5. 头肾, 6. 肌肉, 7. 肝脏, 8. 脾脏, 9. 肠, 10. 心脏; 图中实验组相对表达量以未感染对照组脑组织基因表达量为基准计算, 误差棒示相对标准差($n=5$), 星号示 t 检验显著性水平(**, $P < 0.01$), 下同

Fig. 1 Relative *Rab1a3* mRNA level in 10 tissues of *C. carpio* before and after infection

1. brain, 2. skin, 3. gill, 4. blood, 5. head kidney, 6. muscle, 7. liver, 8. spleen, 9. intestine, 10. heart. The relative expression value in each group was calculated by comparing with the value in brain of unaffected controls. Error bars represented standard error of the mean ($n=5$); statistical differences relative to unaffected tissues were calculated by using student's t test (**, $P < 0.01$), the same below

2.2 鲤*Rab1a3*基因启动子序列分析

为排除鲤基因组内多个*Rab*旁系同源基因序列的干扰,使用鲤*Rab1a3*特异性引物,在鲤BAC文库中进行PCR筛选,获得包含*Rab1a3*基因的文库克隆CYC041O15。使用引物步移法测序后拼接,获得鲤*Rab1a3*基因所在区域基因组序列共计8951 bp,其中包含了该基因6个外显子、5个内含子的完整序列,以及基因上下游调控序列,全部序列已提交NCBI数据库(GenBank: KX620052)。

对起始密码子前2549 bp序列区域进行启动子预测,结合鲤和斑马鱼(*Danio rerio*)*Rab1a*基因5' UTR序列比对结果,推测鲤*Rab1a3*基因的转录起始位点位于起始密码子前250 bp附近。起始密码子前1261 bp至248 bp间区域为预测的启动子区,经BLAST比对,该启动子中不存在其他动植物已知的*Rab*基因启动子的同源序列。该启动子不具有典型的TATA盒或CpG岛特征,存在大量的免疫相关转录因子结合位点(附表1)。

2.3 鲤*Rab1a3*基因启动子活性分析

对预测得到的鲤*Rab1a3*基因启动子区域进行PCR扩增,目标区段长度为1014 bp,在上下游引物分别引入*Mlu* I和*Hind* III酶切位点。通过酶切和连接反应,将该启动子连接进入pGL3-EGFP质粒载体,使鲤*Rab1a3*启动子驱动绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因表达,构建成功pGL3-EGFP-*Rab1a3*质粒载体。

使用pGL3-EGFP-*Rab1a3*质粒转染CIK细胞,转染后细胞生长状况良好,荧光显微镜下可见GFP绿色荧光,表明转入的DNA片段能够成功驱动GFP基因表达,具有启动子活性(图2-a, b)。向细胞培养液中加入LPS,模拟免疫刺激,细胞的荧光强度显著强于无免疫刺激对照组(图2-c, d),表明启动子活性在免疫激活后显著增强,为免疫诱导型启动子。

2.4 双荧光素酶报告基因检测鲤*Rab1a3*基因启动子活性

将鲤*Rab1a3*基因1014 bp启动子序列连接进入pGL3-basic质粒载体,使鲤*Rab1a3*启动子驱动萤火虫荧光素酶基因表达,成功构建pGL3-basic-*Rab1a3*质粒载体。

使用pGL3-basic-*Rab1a3*和PRL-CMV海肾荧

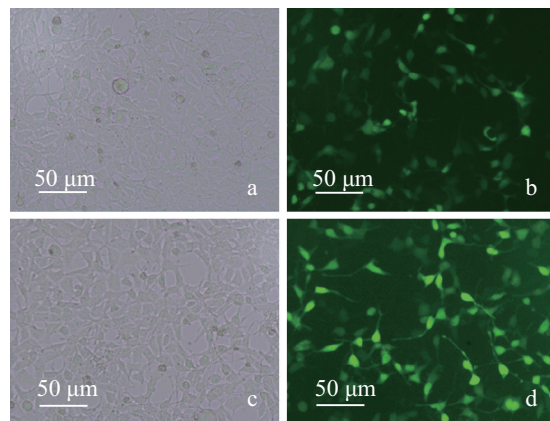


图2 转染pGL3-EGFP-*Rab1a3*质粒的CIK细胞照片

a. 无免疫刺激,明场显微镜照片; b. 无免疫刺激,荧光显微镜照片; c. LPS模拟免疫刺激,明场显微镜照片; d. LPS模拟免疫刺激,荧光显微镜照片

Fig. 2 Microscope pictures of CIK cells transfected by pGL3-EGFP-*Rab1a3* plasmid

a. control cells without immune stimulus, by bright field microscope; b. control cells without immune stimulus, by fluorescence microscope; c. immune stimulated cells with LPS, by bright field microscope; d. immune stimulated cells with LPS, by fluorescence microscope

光素酶内参质粒共转染CIK细胞,定量测定启动子活性,结果显示,*Rab1a3*基因启动子在该体系中具有显著的启动子活性,且启动子活性在免疫刺激后增强至免疫刺激前的8.67倍(图3)。

3 讨论

*Rab*家族是典型的鱼类免疫应答基因,而该基因家族成员间在组织分布、细胞定位、免疫应答强度方面存在一定差异。在前期研究中,基于鲤全基因组精细图谱^[25],对*Rab*家族基因进行了系统筛查,并利用转录组数据对各基因转录模式进行了初步分析,从中筛选鲤*Rab1a3*基因作为免疫诱导型启动子候选基因^[16, 26]。

本研究qRT-PCR实验结果与转录组分析结果相符。在健康鱼体内,*Rab1a3*基因在各组织内广泛转录,但普遍转录水平较低,而鳃、头肾中的表达量显著高于其他组织;当鱼体遭受免疫胁迫时,*Rab1a3*基因转录水平上升,其中鳃、头肾组织*Rab1a3* mRNA水平上调幅度极大。鳃是鱼类的呼吸器官,比表面积大,表面密布毛细血管,随时与外界水流接触,因而易受环境中的病原菌侵袭。头肾是硬骨鱼类特有的淋巴器官,在鱼体内发挥重要的免疫功能。这2个组织

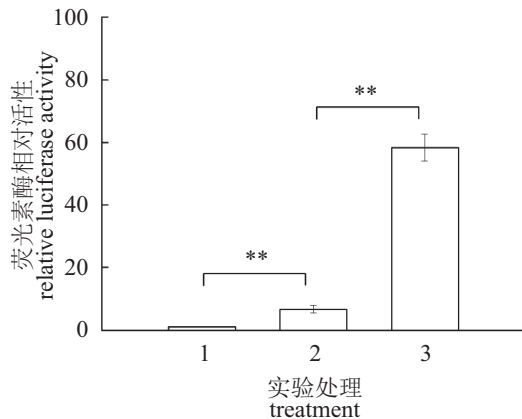


图3 双荧光素酶报告基因实验测定鲤*Rab1a3*基因启动子活性

1. 空载体对照, 2. 免疫刺激前, 3. 免疫刺激后使用pGL3-basic-*Rab1a3*质粒和PRL-CMV质粒共转染CIK细胞, 在细胞培养液中加入LPS模拟免疫刺激, 使用未负载启动子的pGL3-basic和PRL-CMV质粒共转染CIK细胞作为对照。误差棒示相对标准差($n=4$)

Fig. 3 Promoter activity of *C. carpio Rab1a3* gene, determined by dual luciferase reporter gene assay

1. blank vector, 2. before immune stimulus, 3. after immune stimulus CIK cells were transfected by pGL3-basic-*Rab1a3* and PRL-CMV plasmids, and then stimulated by LPS. CIK cells transfected by blank vector pGL3-basic and PRL-CMV plasmids were set as control. Error bars represented standard error of the mean ($n=4$)

都在鱼类免疫防御中发挥着重要作用。

目前已报道的用作转基因元件的鱼类启动子多为组成型, 如鲤 β -肌动蛋白、美洲大绵鳊(*Zoarcetes americanus*)抗冻蛋白启动子等^[2-6]。但对抗病转基因鱼而言, 使用组成型启动子, 将使未接触病原的鱼体内长期大量表达外源免疫基因, 不仅没有必要, 还可能因消耗能量而造成生长负担。如果使用免疫诱导型启动子, 则可介导外源基因仅在鱼体遭受免疫胁迫时出现高表达, 合理利用能量并抵御病害, 而鲤*Rab1a3*基因这一表达模式则较好地符合了抗病转基因鱼对外源免疫基因转录特征的需求。

为进一步解析鲤*Rab1a3*基因转录调控机制, 本研究对该基因上游调控序列进行了分析, 通过基因组文库筛查、测序和生物信息学预测, 成功获得了长度为1014 bp的鲤*Rab1a3*基因启动子候选序列。关于*Rab*基因转录调控的研究仅在少数物种中有报道, 包括人(*Homo sapiens*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)、溶组织内阿米巴虫(*Entamoeba histolytica*)和一些植物。BLAST比对结果显示, 鲤*Rab1a3*启动子与其他动植物已知的*Rab*基因启动子序列相似性较

低, 但也有一些共同的特征, 例如不具备典型的TATA盒或CpG岛, 而存在多个免疫相关转录因子结合位点, 这与人*Rab6*^[27]、*Rab7*^[28]、*Rab20*^[29]、*Rab27a*^[30], 大鼠*Rab3*、*Rab27*^[31], 小鼠*Rab11a*^[32]、*Rab27a*^[30]、*Rab27b*^[33], 溶组织内阿米巴虫EhrabB^[34-35]启动子的研究结果相类似。

与鲤*Rab1a3*启动子区结合的免疫相关转录因子主要包括3类: (1)直接参与免疫应答的免疫响应型转录因子, 如AIRE、CEBP、CREB等; (2)参与免疫信号通路的转录因子, 如MAPK、cAMP、NF κ B、BMP、Notch等信号通路中的成员, 包括BRNF、GATA、FKHD等; (3)参与T细胞或B细胞活化的转录因子, 如HAML、NKX1、NKX6、PDX1等。这些密集存在的免疫相关转录因子结合位点, 提示了该启动子转录活性具有免疫应答特征, 可能用作免疫诱导型的转基因元件。

为验证该启动子在鱼类转基因体系中的活性, 将启动子连入pGL3质粒载体, 转染草鱼CIK细胞系, 结果显示*GFP*基因和萤火虫荧光素酶基因都能够在该启动子驱动下表达, 向培养液中加入LPS模拟免疫刺激, 基因表达显著增强, 证实该1014 bp片段具有启动子活性, 且启动子活性受到免疫诱导而增强。

LPS是格兰氏阴性菌细胞壁的特征性成分, 是由疏水性的类脂A和多糖组成的生物大分子, 能够有效刺激B淋巴细胞活化, 并诱导多种细胞因子的分泌和合成, 包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukins, ILs)、AP1F、NF κ B等, 经常用于体外构建炎症模型^[36-39]。结合启动子区转录因子结合位点推测, 本研究中LPS对*Rab1a3*启动子的激活作用, 可能是多个免疫相关转录因子共同作用的结果, 包括NF κ B、BRNF、AP1F, 以及多种参与B细胞活化的转录因子, 如HAND、NKX1、NKX6、PDX1。

将鲤*Rab1a3*基因启动子用作抗病转基因载体构建的启动子元件, 可能驱动外源免疫基因保持类似的表达模式, 在鳃和头肾组织高表达, 并呈现出免疫诱导型表达特征, 有利于转基因鱼在受到免疫刺激时, 大量表达转入的免疫基因, 及时抵御外界病原感染, 同时避免在不必要的组织和健康状态下过多表达外源基因, 形生长负担, 在鱼类基因工程抗病育种

领域具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 叶鼎, 朱作言, 孙永华. 鱼类基因组操作与定向育种[J]. *中国科学: 生命科学*, 2015, 58(2): 170-177.
Ye D, Zhu Z Y, Sun Y H. Fish genome manipulation and directional breeding[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 170-177(in Chinese).
- [2] Ledford H. Salmon approval heralds rethink of transgenic animals[J]. *Nature*, 2015, 527(7579): 417-418.
- [3] 叶星, 田园园, 高风英. 转基因鱼的研究进展与商业化前景[J]. *遗传*, 2011, 33(5): 494-503.
Ye X, Tian Y Y, Gao F Y. Progress in transgenic fish techniques and application[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(5): 494-503(in Chinese).
- [4] 汪亚平, 何利波. 我国转基因鱼研制的历史回顾与展望[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(7): 851-860.
Wang Y P, He L B. Retrospect and prospect of transgenic fish breeding in China[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(7): 851-860(in Chinese).
- [5] 王大元. 美国转基因三文鱼商业化的启示[J]. *科学通报*, 2016, 61(3): 289-295.
Wang D Y. Implications of US GMO salmon approved for commercial food use[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2016, 61(3): 289-295(in Chinese).
- [6] 胡炜, 朱作言. 美国转基因大西洋鲑产业化对我国的启示[J]. *中国工程科学*, 2016, 18(3): 105-109.
Hu W, Zhu Z Y. Enlightenments for China from the industrialization of the transgenic Atlantic salmon in the US[J]. *Engineering Sciences*, 2016, 18(3): 105-109(in Chinese).
- [7] 张春晓, 王文棋, 蒋湘宁, 等. 植物基因启动子研究进展[J]. *遗传学报*, 2004, 31(12): 1455-1464.
Zhang C X, Wang W Q, Jiang X N, *et al.* Review on plant gene promoters[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(12): 1455-1464(in Chinese).
- [8] 李圣彦, 郎志宏, 黄大昉. 真核生物启动子研究概述[J]. *生物技术进展*, 2014, 4(3): 158-164.
Li S Y, Lang Z H, Huang D F. Research progress on eukaryotic promoter[J]. *Current Biotechnology*, 2014, 4(3): 158-164(in Chinese).
- [9] Zou J, Secombes C J. The function of fish cytokines[J]. *Biology (Basel)*, 2016, 5(2): 23.
- [10] 甘楨, 王蓓, 鲁义善, 等. 罗非鱼免疫学研究进展[J]. *生物技术通报*, 2014(11): 32-39.
Gan Z, Wang B, Lu Y S, *et al.* Research progress on tilapia immunology[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(11): 32-39(in Chinese).
- [11] 毛明光, 刘宗柱, 张培军. 鱼类干扰素功能及信号转导研究[J]. *海洋科学*, 2008, 32(2): 85-90.
Mao M G, Liu Z Z, Zhang P J. Function and signal transmission of fish interferon[J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(2): 85-90(in Chinese).
- [12] 吕翠, 安利国, 杨桂文. 硬骨鱼新型免疫球蛋白的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(8): 905-913.
Lv C, An L G, Yang G W. Progress in the study of novel immunoglobulin in teleost fish[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2011, 33(8): 905-913(in Chinese).
- [13] 杜小溪, 高祥刚, 陈潘海, 等. 鱼类基因启动子的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2013(8): 12-16.
Du X X, Gao X G, Chen P H, *et al.* Research on gene promoter of fish[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(8): 12-16(in Chinese).
- [14] Fu X Q, Ding Z J, Fan J, *et al.* Characterization, promoter analysis and expression of the interleukin-6 gene in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(6): 1527-1540.
- [15] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(8): 513-525.
- [16] Zhao Z X, Cao D C, Xu J, *et al.* Diversification of the duplicated *Rab1a* genes in a hypoxia-tolerant fish, common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 188: 54-62.
- [17] Wang R J, Zhang Y, Liu S K, *et al.* Analysis of 52 Rab GTPases from channel catfish and their involvement in immune responses after bacterial infections[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 45(1): 21-34.
- [18] Hu Y H, Deng T, Sun L. The Rab1 GTPase of *Sciaenops ocellatus* modulates intracellular bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 1005-1012.
- [19] Wang L L, Li L, Wang L L, *et al.* Two Rab GTPases, EsRab-1 and EsRab-3, involved in anti-bacterial response of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J].

- Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 1007-1015.
- [20] Wang L, Wang X R, Liu J, *et al.* Rab from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and its regulation upon environmental stress[J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24(7-8): 1765-1774.
- [21] Li Y, Xu P, Zhao Z X, *et al.* Construction and characterization of the BAC library for common carp *Cyprinus carpio* L. and establishment of microsynteny with zebrafish *Danio rerio*[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(4): 706-712.
- [22] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [23] Zhao Z X, Xu P, Cao D C, *et al.* Duplication and differentiation of common carp (*Cyprinus carpio*) myoglobin genes revealed by BAC analysis[J]. *Gene*, 2014, 548(2): 210-216.
- [24] Pannier A K, Ariazi E A, Bellis A D, *et al.* Bioluminescence imaging for assessment and normalization in transfected cell arrays[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(2): 486-497.
- [25] Xu P, Zhang X F, Wang X M, *et al.* Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(11): 1212-1219.
- [26] Ji P F, Liu G M, Xu J, *et al.* Characterization of common carp transcriptome: sequencing, *de novo* assembly, annotation and comparative genomics[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35152.
- [27] Tian K G, Jurukovski V, Yuan L M, *et al.* *WTH3*, which encodes a small G protein, is differentially regulated in multidrug-resistant and sensitive MCF7 cells[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(16): 7421-7428.
- [28] Gan-Or Z, Bar-Shira A, Dahary D, *et al.* Association of sequence alterations in the putative promoter of *RAB7L1* with a reduced Parkinson disease risk[J]. *Archives of Neurology*, 2012, 69(1): 105-110.
- [29] Hackenbeck T, Huber R, Schietke R, *et al.* The GTPase RAB20 is a HIF target with mitochondrial localization mediating apoptosis in hypoxia[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2011, 1813(1): 1-13.
- [30] Chiaverini C, Beuret L, Flori E, *et al.* Microphthalmia-associated transcription factor regulates *RAB27A* gene expression and controls melanosome transport[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(18): 12635-12642.
- [31] Abderrahmani A, Cheviet S, Ferdaoussi M, *et al.* ICER induced by hyperglycemia represses the expression of genes essential for insulin exocytosis[J]. *The EMBO Journal*, 2006, 25(5): 977-986.
- [32] Gebhardt C, Breitenbach U, Richter K H, *et al.* c-Fos-dependent induction of the small ras-related GTPase Rab11a in skin carcinogenesis[J]. *The American Journal of Pathology*, 2005, 167(1): 243-253.
- [33] Tiwari S, Italiano Jr J E, Barral D C, *et al.* A role for *Rab27b* in NF-E2-dependent pathways of platelet formation[J]. *Blood*, 2003, 102(12): 3970-3979.
- [34] Romero-Díaz M, Gómez C, López-Reyes I, *et al.* Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica EhrabB* gene promoter[J]. *BMC Molecular Biology*, 2007, 8: 82.
- [35] Hernandez-Alejandro M, Calixto-Gálvez M, López-Reyes I, *et al.* The small GTPase EhRabB of *Entamoeba histolytica* is differentially expressed during phagocytosis[J]. *Parasitology Research*, 2013, 112(4): 1631-1640.
- [36] Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, *et al.* CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein[J]. *Science*, 1990, 249(4975): 1431-1433.
- [37] Dauphinee S M, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells[J]. *Laboratory Investigation*, 2006, 86(1): 9-22.
- [38] Meng Z, Zhang X Y, Guo J, *et al.* Scavenger receptor in fish is a lipopolysaccharide recognition molecule involved in negative regulation of NF- κ B activation by competing with TNF receptor-associated factor 2 recruitment into the TNF- α signaling pathway[J]. *The Journal of Immunology*, 2012, 189(8): 4024-4039.
- [39] Winkler C, Ferdous F, Dimmick M, *et al.* Lipopolysaccharide induced Interleukin-6 production is mediated through activation of ERK 1/2, p38 MAPK, MEK, and NF κ B in chicken thrombocytes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 73: 124-130.

Cloning and functional analysis of an immune-induced promoter in common carp (*Cyprinus carpio*)

ZHAO Zixia^{1*}, ZHANG Yan¹, CAO Dingchen², SUN Zhaoning¹, XU Jian¹, XU Peng^{1,3}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture,

Beijing Key Laboratory of Fishery Biotechnology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

3. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: The study aimed to explore a teleost promoter applicable to genetic engineering breeding for disease resistance. The expression pattern of Ras-associated binding-GTPases 1a3 (*Rab1a3*) gene in common carp (*Cyprinus carpio*) was analyzed by quantitative real time PCR experiments. The transcription level of *Rab1a3* gene was high in tissues closely related to immune defense, including gill and head kidney, while the transcription was enhanced after immune stimulation. This transcription pattern well fitted the conceived perfect expression pattern of heterologous immune gene in transgenic fish. Bacterial Artificial Chromosome (BAC) library of common carp was screened by PCR, using *Rab1a3* specific primers. A BAC clone containing *Rab1a3* gene was found and then sequenced, to obtain the complete genomic sequence of *Rab1a3* gene, including its upstream and downstream regulatory sequences. A putative 1014 bp promoter of *Rab1a3* gene, with multiple binding sites of immune related transcription factors, was predicted using several bioinformatics tools, while TATA box and CpG islands of typical promoters were absent. The promoter activity was verified in *Ctenopharyngodon idella* kidney cell lines, indicating that transcription of both green fluorescent protein (GFP) and firefly luciferase genes was able to be initiated by the 1014 bp fragment. After immune stimulation, the promoter activity reached 8.67 times as compared with before, determined by dual luciferase reporter assay. These results suggested that *C. carpio Rab1a3* promoter could be a potential transgenic element with immune inducible characteristics, which initiates transcription of heterologous immune gene against exogenous infection in proper expression pattern, avoiding excessive transcription in unnecessary conditions.

Key words: *Cyprinus carpio*; *Rab1a3*; promoter; immune-induced

Corresponding author: ZHAO Zixia. E-mail: zhaozx@cafs.ac.cn

Funding projects: Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes(2015C007); National Science and Technology Pillar Program (2015BAD25B01)

附表 1 鲤 *Rab1a3* 基因预测启动子区免疫相关转录因子结合位点统计表
 Supplemental Tab. 1 Summary of candidate transcription factor binding sites in the predicted promoter region of *C. carpio Rab1a3* gene

转录因子 transcription factors	预测结合位点数 number of predicted binding sites	描述 description	参与免疫应激方式 way of being involved in immune responses
AIRE	2	自身免疫调节元件结合因子 autoimmune regulatory element binding factor	免疫响应型转录因子 direct immune response
AP1F	6	激活蛋白1转录因子 activating protein 1 factor	参与SMAD信号通路 involved in SMAD pathway
AP1R	10	MAF和AP1相关转录因子 MAF and AP1 related factors	免疫响应型转录因子 direct immune response
BRNF	32	POU结构域Brn转录因子 Brn POU domain factors	参与MAPK信号通路 involved in MAPK pathway
CART	27	软骨同源蛋白1 cartilage homeoprotein 1	参与Wnt、BMP信号通路 involved in Wnt, BMP pathways
CEBP	12	Ccaat增强子结合蛋白 Ccaat /Enhancer Binding Protein	免疫响应型转录因子, 并参与Notch信号通路 direct immune response, and involved in Notch pathway
CREB	18	cAMP应答元件结合蛋白 cAMP-responsive element binding proteins	免疫响应型转录因子, 并参与PERK、SMAD、cAMP信号通路 direct immune response, and involved in PERK, SMAD, cAMP pathways
FKHD	13	叉头结构域转录因子 fork head domain factors	参与Notch信号通路, 并参与T细胞活化 involved in Notch pathway, and involved in T cell activation
GATA	8	GATA结合转录因子 GATA binding factors	参与BMP、SMAD信号通路, 并参与T细胞活化 involved in BMP, SMAD pathways, and involved in T cell activation
HAML	2	人急性髓细胞白血病因子 human acute myelogenous leukemia factors	参与T细胞活化 involved in T cell activation
HAND	4	B类bHLH转录因子Twist亚家族 twist subfamily of class B bHLH transcription factors	参与Notch信号通路, 并参与B细胞活化 involved in Notch pathway, and involved in B cell activation
HNF1	22	肝细胞核因子1 hepatocyte Nuclear Factor 1	参与Notch信号通路 involved in Notch pathway
HNF6	7	肝细胞核因子6 hepatocyte nuclear factor 6	参与Notch、SMAD信号通路 involved in Notch, SMAD pathways
HOMF	36	同源结构转录因子 homeodomain transcription factors	参与Notch、BMP信号通路 involved in Notch, BMP pathways
LEFF	12	LEF1/TCF转录因子 LEF1/TCF transcription factors	参与BMP、Wnt信号通路, 并参与T细胞活化 involved in BMP, Wnt pathways, and involved in T cell activation
NFKB	3	核因子κB nuclear factor kappa B	参与NFκB信号通路 involved in NFκB pathway
NKX1	9	NK1同源框转录因子 NK1 homeobox transcription factors	参与B细胞活化 involved in B cell activation
NKX6	19	NK6同源框转录因子 NK6 homeobox transcription factors	参与B细胞活化 involved in B cell activation
NKXH	11	NKX同源结构域转录因子 NKX homeodomain factors	参与BMP、Wnt信号通路 involved in BMP, Wnt pathways
OCT1	19	八聚体结合蛋白1 octamer binding protein 1	免疫响应型转录因子 direct immune response
PDX1	9	PDX1同源框转录因子 PDX1 homeodomain transcription factor	参与B细胞活化 involved in B cell activation
SMAD	1	脊椎动物SMAD家族转录因子 vertebrate SMAD family of transcription factors	参与BMP、SMAD信号通路 involved in BMP, SMAD pathways
SORY	49	SOX/SRY性别和睾丸决定HMG框转录因子 SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	参与Notch、Wnt、cAMP信号通路 involved in Notch, Wnt, cAMP pathways