

## 中国明对虾 *FcβGBP-HDL* 基因和启动子的克隆及序列特征分析

赖晓芳<sup>1,2</sup>, 高 焕<sup>1,2</sup>, 孔 杰<sup>2</sup>, 王清印<sup>2\*</sup>, 王伟继<sup>2</sup>

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** *FcβGBP-HDL* 是中国明对虾免疫应答中的一种模式识别受体, 在白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 感染后其表达显著上调。为了探讨 *FcβGBP-HDL* 在免疫应答中的转录调节机制, 实验以 *FcβGBP-HDL* cDNA 为基础设计引物, 采用染色体步移技术对其基因组 DNA 和启动子进行克隆, 构建一系列缺失表达载体进行启动子活性分析。结果显示, *FcβGBP-HDL* 基因全长 6 713 bp, 无内含子; 启动子区域长 1 507 bp, 除了 1 个启动子核心序列、2 个 SRF、2 个 TBP、1 个 CTF 和 1 个 CRE 等典型的启动子特征外, 还有 2 个 GATA-1、3 个 AP-1、1 个 c-Ets-1 和 7 个 Sp1 等参与其它节肢动物免疫基因转录调节的结合位点; 同源比对分析表明, *FcβGBP-HDL* 启动子与 *FcCTL* 启动子相似度最高 (41.4%); 不同长度的启动子片段具有不同的启动荧光素酶报告基因表达的活性, 其中去除 5' 端 2 个 AP-1 后的启动子片段具有最高的启动活性, 去除启动子核心序列的启动子片段启动活性最低。研究表明, *FcβGBP-HDL* 启动子可能在免疫反应中受到调节。

**关键词:** 中国明对虾; *FcβGBP-HDL*; 基因组结构; 启动子

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

无脊椎动物被病原入侵时能开启防卫反应, 并通过差异表达的免疫应答相关基因来调控<sup>[1]</sup>。防卫反应能被称为模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 或模式识别蛋白 (pattern recognition proteins, PRPs) 如脂多糖结合蛋白 (LPS-binding proteins, LBP)、肽聚糖识别蛋白 (peptidoglycans recognition protein, PGRP)<sup>[2-4]</sup>、β-1, 3-葡聚糖结合蛋白 (β-1, 3-glucans binding protein, βGBP)<sup>[5-7]</sup> 及脂多糖葡聚糖结合蛋白 (LGBP)<sup>[8-10]</sup> 等激活。其中 βGBP 于 1988 年首先从骷髅头蟑螂 (*Blaberus craniifer*)<sup>[11]</sup> 和家蚕 (*Bombyx mori*)<sup>[12]</sup> 血浆中部分纯化, 在结合 β-1, 3-D-葡聚糖后具有识别异己分子、激活 proPO 系统、激活凝集级联和诱导血细胞脱粒作用并释放细胞毒素、细胞裂解因子或抗菌因子等

功能。目前已经从很多无脊椎动物中克隆出 *βGBP* 基因, 如烟草天蛾幼虫 (*Manduca sexta*)<sup>[13]</sup>、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)<sup>[14]</sup>、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)<sup>[7,15]</sup>、翡翠贻贝 (*Perna viridis*)<sup>[16]</sup>、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[17]</sup>。

转录环节是基因表达最主要的调控位点, 而启动子的调控在转录环节中又占有十分重要的地位。因此, 启动子是调控基因表达的关键序列区域, 研究启动子的功能序列对于基因表达调控机制的研究具有十分重要的意义。位于转录起始位点上游 50 ~ 5 000 bp 的特异的启动子的功能序列能够结合转录因子 (transcription factor, TF), 将来自细胞表面的信息传递至核内基因, 激活或抑制相关蛋白的转录。中国明对虾在感染 WSSV 后,

收稿日期: 2012-06-11 修回日期: 2012-11-26

资助项目: 淮海工学院博士科研启动基金 (KQ11010); 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2010AA10A401)

通信作者: 王清印, E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

参与氧化磷酸化、蛋白质合成、糖酵解、信号转导等生物过程的蛋白质出现在 mRNA 转录水平上的差异<sup>[18]</sup>。

中国明对虾是我国重要的出口水产品之一,深受国际市场欢迎。但是由于对虾养殖规模的不断扩大随之也带来很多问题,如种质资源的破坏、养殖环境的污染等,导致对虾疾病多发,严重影响了其养殖业的可持续发展。本课题组从中国明对虾中全长克隆了  $\beta$ GBP(命名为 Fc $\beta$ GBP-HDL) cDNA<sup>[17]</sup>,荧光定量分析(qRT-PCR)表明其表达量在感染 WSSV 后显著上调,推测其在中国明对虾抗 WSSV 及相关免疫反应中占有重要位置。本研究在此基础上,采用 PCR 和染色体步移法,克隆了中国明对虾 *Fc $\beta$ GBP-HDL* 基因启动子,并对其基因组结构和启动子特征及启动活性进行了分析,从 DNA 水平上分析 *Fc $\beta$ GBP-HDL* 基因的转录调节机制,为中国明对虾在病原体侵染时的免疫应答机制特别是抗 WSSV 侵染机制的进一步研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用中国明对虾来源于“黄海 2 号”,平均

体长为(4.69 ± 0.55) cm,平均体质量为(2.06 ± 0.72) g。

### 1.2 试剂

UNIQ-10 DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程公司;Ex Taq、dNTPs、pMD18-T 试剂盒购自 TaKaRa 公司;萤火虫荧光素酶报告基因载体、荧光素酶测定试剂盒购自 Promega;PCR 引物合成、测序工作由上海生物工程公司完成。其它试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.3 实验方法

**基因组 DNA 的提取** 参照王伟继<sup>[19]</sup>方法。对虾肌肉组织块约 100 mg,加入 300  $\mu$ L 组织裂解液(10 mmol/L pH 8.0 Tris-Cl,100 mmol/L pH 8.0 EDTA,0.5% SDS),剪刀剪碎;加入 6  $\mu$ L 20 mg/mL 蛋白酶 K,55 ~ 65  $^{\circ}$ C 水浴消化 2 ~ 3 h 至溶液澄清;加入 100  $\mu$ L 7 mol/L 醋酸铵和 300  $\mu$ L -20  $^{\circ}$ C 预冷异丙醇,-20  $^{\circ}$ C 沉淀 2 h;70% 乙醇洗涤 2 次,空气中自然干燥至半透明为止;加入 200  $\mu$ L 无菌水溶解 DNA;-20  $^{\circ}$ C 保存。

**基因组 DNA 序列的扩增** 引物的设计(表 1)参照克隆的 Fc $\beta$ GBP-HDL 全长 cDNA 序列(GenBank 登录号:GU461662)<sup>[17]</sup>,引物对所扩增产物相互部分重叠(图 1)。

表 1 研究中使用的引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence	位置 <sup>1</sup> /nt location	退火温度/ $^{\circ}$ C annealing temperature
P1	F:GAAACTGGATGCTTCTGT R:CTGGAAGATCAATCTTAGC	163 ~ 795	49.2
P2	F:AACTCTCCTTTCAGTGCC R:CTGTAGTTGTCATAGGGAGT	737 ~ 1 365	48.8
P3	F:GAGCCATCAATGAACAGA R:GAATAACCTCCAGCGTAA	1 262 ~ 1 994	48
P4	F:GTATGGCGAGAAACACTT R:GACTACACGTTAGACTTG	1 812 ~ 2 460	47.3
P5	F:GATATTGCCCATGTGGAT R:TTCGGTTTGATGACTAA	2 363 ~ 2 810	50.1
P6	F:TGATTCTATCCACTCC R:CTTGATGTTAGCCTTCC	2 730 ~ 3 551	52.8
P7	F:GTGGAAGGCTAACATCA R:TGCGGTATCTTCGTTCTT	3 510 ~ 4 379	48
P8	F:AAGTGGAGGCAACATTCT R:GGATTGAGCCATAGTGTA	4 175 ~ 5 034	49.2
P9	F:CACATTACACTATGGCTC R:TAGCGGTAACCTTCGGGA	4 989 ~ 5 393	48

续表 1

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence	位置 <sup>1</sup> /nt location	退火温度/°C annealing temperature
P10	F:GAAGTTTCCAAGCCAAGT R:TCTTCTGTAAACCCTTG	5 233 ~ 5 712	49.3
P11	F:AGTGTCTAACTATGGTGG R:TAACGGTTGTGAGGGAGA	5 629 ~ 6 020	50.9
P12	F:GGTTACAAGAAGATGAA R:GATGAGTTTAGGCACAAT	6 007 ~ 6 631	45
DNA-AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGG	423	55
FR1	GCATCAAAGGGAGTCGTCAG		
DNA-AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	278	55
FR2	AGCCCTCAAATGGTGTCTGGAAC		
C1	F:GAGCTCTGTCGACACAAGCTACAG R:CCCGGGGAAAGAGATCTCAGCAG	- 1 316 ~ 16	pGL-FcβGBP 1
C2	F:GAGCTCGACATCAAGACAACGAC R:CCCGGGGAAAGAGATCTCAGCAG	- 1 228 ~ 16	pGL-FcβGBP 2
C3	F:GAGCTCTCTCTGGCTAACAACCTT R:CCCGGGGAAAGAGATCTCAGCAG	- 806 ~ 16	pGL-FcβGBP 3
C4	F:GAGCTCGAAGGCAATAACCAGCAT R:CCCGGGGAAAGAGATCTCAGCAG	- 462 ~ 16	pGL-FcβGBP 4

注:1 指的是在 cDNA 上的位置,将转录起始点定为 +1。

Notes:1 referred to covered regions. The first nucleotide of the transcription was designated +1.

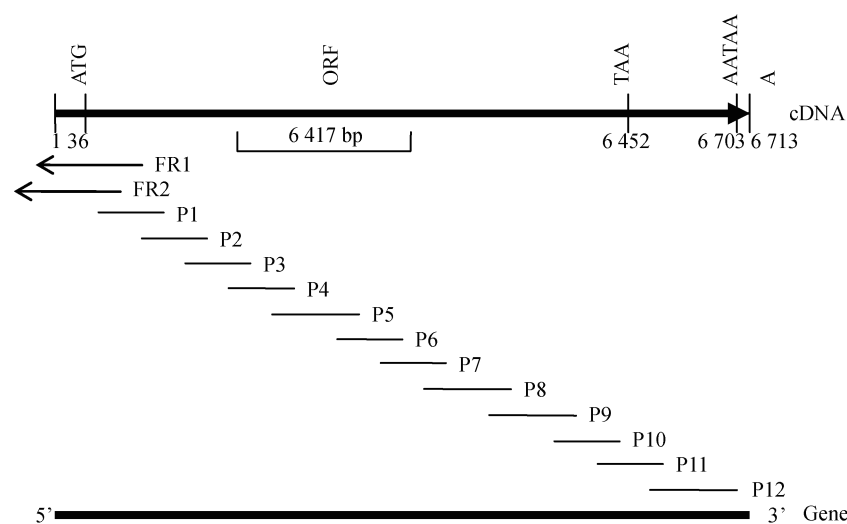


图 1 *FcβGBP-HDL* 基因、cDNA 的基本结构以及引物扩增的范围

Fig. 1 Structure of *FcβGBP-HDL* gene, cDNA, and amplification range of all primers

以基因组 DNA 为模板,分别以设计的 12 对引物进行 PCR 扩增。20  $\mu$ L 反应体系为 1  $\times$  Ex-Taq buffer ( $Mg^{2+}$  Plus); 100 ng 基因组 DNA; dNTPs (2.5 mmol/L each) 1.6  $\mu$ L; 0.2  $\mu$ mol/L 引物 F; 0.2  $\mu$ mol/L 引物 R; 0.5 U Ex-Taq。PCR 反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 52  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10

min; 4  $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,割胶纯化,与 pMD18-T 载体连接后转化大肠杆菌 5H $\alpha$ ,进行蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后进行测序。采用重叠法拼接所测的 DNA 片段序列,获得 *FcβGBP-HDL* 基因组 DNA 序列。

启动子的染色体步移法克隆 根据已克隆

的 *FcβGBP-HDL* 基因组 DNA 序列,设计合成 2 条特异 PCR 引物:FR1 和 FR2。以 DNA-AAP 和 DNA-AP 为锚定引物,参照张殿昌等<sup>[20]</sup>方法克隆启动子。首先,以基因组 DNA 为模板,以 FR1 为引物进行单链 PCR 扩增,反应体系和反应程序同基因组 DNA 序列的扩增,单链 PCR 产物经 UNIQ-10 DNA 纯化试剂盒纯化回收。其次,单链 PCR 产物加尾反应,50 μL 反应体系为 5 × TdT Buffer 10 μL;上述回收单链 PCR 产物 30 μL; dCTP(10 mmol/L)2.5 μL;0.1% BSA 5 μL;TdT 15 U,37 °C 反应 30 min,苯酚/氯仿法回收。再次,以加尾单链 DNA 为模板,以 FR1 和 DNA-AAP 为引物进行第一次 PCR 扩增,反应体系同基因组 DNA 序列的扩增,反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,68 °C (每个循环降 1 °C) 循环 30 s,72 °C 2 min,共 13 个循环;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 2 min,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min;4 °C 保存。最后,第一次 PCR 产物用无菌水稀释 50 倍作为模板,以 FR2 和 DNA-AP 为引物进行第二次 PCR 扩增,反应程序同第一次 PCR 扩增。

第二次 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,UNIQ-10 试剂盒回收 1 000 ~ 2 000 bp 片段,回收产物连接 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌感受态细胞,蓝白斑筛选鉴定阳性转化子并测序。

**序列分析** 基因组 DNA 序列与 cDNA 序列比对确定 *FcβGBP-HDL* 基因的内含子序列。利用软件 PromoterScan (<http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/>) 和 NNPP (Neural Network Promoter Prediction, [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) 预测启动子;使用 TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 和 AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) 分析启动子区域顺式调控元件。应用 Blast 在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 和 DNAMAN 5.2 进行氨基酸序列的同源性比对,并通过软件 MEGA 4.1 构建分子进化树。

**启动子活性分析** 为分析启动子序列反应元件活性,在对克隆所得到的 *FcβGBP-HDL* 启动子进行生物信息学分析的基础上,设计 4 条含 *Sac* I 酶切位点的正向引物和 1 条含 *Xma* I 酶切位点的反向引物(表 1),将 *FcβGBP-HDL* 启动子

片段插入到萤火虫荧光素酶报告基因载体的 *Sac* I/*Xma* I 位点间,构建了 *FcβGBP-HDL* 启动子全长和 3 个缺失表达载体,分别称为 pGL3-*FcβGBP1*、pGL3-*FcβGBP2*、pGL3-*FcβGBP3* 和 pGL3-*FcβGBP4*。*Drosophila* S2 细胞先在添加 10% 胎牛血清的 Schneider's *Drosophila* 培养液中 26 °C 培养,去除上清。细胞用 Schneider's *Drosophila* 培养液洗涤后,每孔加入 200 μL 不含胎牛血清的 Schneider's *Drosophila* 培养液(内含 1 mg 构建载体和 2 mL 细胞转染液)按照说明书转染,每个质粒转染 3 次。转染 20 h 后,加入 200 μL 含 20% 胎牛血清的 Schneider's *Drosophila* 培养液。转染 28 h 后收集细胞,参照荧光素酶测定试剂盒操作手册在荧光检测仪上进行相对荧光素酶活性(relative luciferase activity, RLA)测定,每个孔测定 2 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 *FcβGBP-HDL* 基因的克隆

*FcβGBP-HDL* 基因组 DNA 序列全长为 6 713 bp,与其相对应的 cDNA 完全相同,不含任何内含子(图 1)。

### 2.2 *FcβGBP-HDL* 启动子的克隆

采用染色体步移法获得了 *FcβGBP-HDL* 启动子(GenBank 登录号:JX075087)(图 2),转录起始位点 G 由全长 cDNA 序列中获得,在翻译起始密码子 ATG 上游有 35 bp。*FcβGBP-HDL* 启动子区域全长 1 507 bp, PromoterScan 和 NNPP 分析之后发现有 1 个启动子核心序列,位于 -595 ~ -545 bp。TFSEARCH 和 AliBaba 2.1 分析 *FcβGBP* 启动子序列发现,*FcβGBP-HDL* 启动子含有多个转录调控位点,包括 2 个 SRF (CArG motif, -1 263 ~ -1 254 bp 和 -651 ~ -642 bp)、2 个 TBP (TATA-box, -928 ~ -919 bp 和 -590 ~ -581 bp)、1 个 CTF (CAAT box, -847 ~ -838 bp) 和 1 个 CRE (-276 ~ -267 bp) 典型的脊椎动物启动子结构特征,2 个 GATA-1 (-1 295 ~ -1 286 bp 和 -1 053 ~ -1 044 bp)、3 个 AP-1 (-1 198 ~ -1 189 bp, -1 182 ~ -1 173 bp 和 -318 ~ -309 bp)、1 个 c-Ets-1 (-55 ~ -46 bp) 和 7 个 Sp1 等参与其它节肢动物免疫基因转录调节的结合位点,没有典型的 GC box。

```

TATCATTCTCTCCATTTCAGTGGATGGGAAACCCTTAAGGCCTC -1463
      Sp1
ATTCTTCATTCCAGTTCTGCTGTTAAAGCCTTTGTGTCCAGGAATGACCGCAAGATTGAGGTTACAGGAACACTGCACATCAAAA -1377
AAGCCAAGGGAAAGATTAATCTCACCATCAATACTCCATATGTTGGCTATGAGAGCATTCTGTGACACAAGCTACAGCTTACAG -1291
      GATA-1
GGCCAAGTAAAACAGTGGAGTTTGAAGCCAAATTTGGCTCGCAAGAACTCTCCTTGAAGGGAGACATCAAGACAAACGACATTCT -1205
      SRF
AGCTCCTGAGATGACCCTCAATATCATTACTCCGTTTGAAGCCGTAAGAACTCTTGGTGGAGAAGCTCACTGGGACCTGAGAAACC -1119
      AP-1      AP-1
TTGTCAAGACTGCCGAAGTAAAGGCTTACCGAATGATCGCCACTACCACGGCAGCTAGAGACAGCTGCTGATAGTCCATAAAGG -1033
      Sp1      GATA-1
GTTATGCCAACTCCAAGATCACAGCTCCCATTGCTGGATGGACAACGGTCAGTTTGAAGGAAACTTTGATTTCACCTCCATGCCT -947
      Sp1
TACAAAGCACTTTTACTTACAATAAAGAAGGAGTTATCAGCACATTTGAAGTACAAGTCAGGTAGCAGAAAATGCAGTATCTGG -861
      TBP
GGAAATTACAACACCAATCTCTGGGTGGGAGAAGATTGCTTTGAATGGCGACTATTCTCTGGCTAACAACCTTCTGACAAATATCA -775
      CTF      Sp1
TCTCAATGGAGATATTGCTTTTAAATACTCAGAAGCCTAAGTTGAATATTGGCCTCAGGACACCTCTAGCAAATGCTGCTAATATTG -689
      Sp1
AGNTGGATCTTGATGCTAATNTAGTCGATACAGAAAAGAATTTCCACATTACCTTCAAAGGAATGACATTACTTACTCTGCAGAT -603
      SRF
TTCACAAGCCAAATGATCTATAAAGTAGGATTCGTGAAGCTGCAACGCTCCAAATCCAGGTTTTACATCCCTGGATGTTGA -517
      TBP      Sp1
TGCTAAATACGACTTACTGGAGATGTGAAAACCTGCCGAAGCCAACTTATGAAGGAAGGAATAACCAGCATATCTCACTGACTT -431
CCACAGTCAATGACAACACTTCCATGTTGAAGCTGAAACACCATTTGCTGGTTTTGAATCTGTGAAGATGGATGGTGATTACACA -345
TACCTCAATAATAAACACAGTGTCTCAGCTTCATTTGAGAAGAATAGTCAGAAGTATGACTTCCATGCTGAGATTTCACTCAACAC -259
      AP-1      CREB
CAACTCTGTTACCCTGCACTGGCAACCCCAATAGTAGACATTAAGCATGTTGTCATTAATGGCAATTACCAGCCTATTGAGAATG -173
GAATGGAATGCTCCCTTGTGTTGAAAGAAACCAGGATAAGTTTGTGATTTGATGCTCATGGATATTTACACCAAGAAATCAGAC -87
CTCCACCTCTCACTAGAGATGCCTGTTGAAGGCTGGAGGAACTAGAGCTGGATACCCATTATGATGTTATCTCTGACAAGAAGTC -1
Sp1      c-Ets-1
GTCTGAGATCTCTTTCCAAAGAGATTCACTGATG
+1      ORF Start

```

图 2 *FcβGBP-HDL* 的启动子区域结构及特征

阴影部分为启动子核心序列。

Fig. 2 Structure and characterization of *FcβGBP-HDL* promoter region

The promoter core sequence was in shadow.

### 2.3 *FcβGBP-HDL* 启动子的同源性分析

通过在 GenBank 的 BLASTP 程序进行多序列比对分析发现(图 3), *FcβGBP-HDL* 启动子与 *FcCTL* 的同源性最高, 相似度为 41.4%。利用 MEGA 4.0 软件对 *FcβGBP-HDL* 启动子及其他来自虾类的免疫相关基因启动子进行了分子系统学分析。结果如图 4 显示, 现已发表的虾类免疫相关基因启动子聚为两分支: 凡纳滨对虾和斑节对虾的启动子首先分别会聚为一亚分支, 再会聚为一分支; 中国明对虾 *FcβGBP-HDL* 启动子则与 *FcCTL*、*FcTR* 会聚为第二分支, 二分支最后会聚。结果暗示免疫相关基因的启动子具有一定的种属特异性。

### 2.4 *FcβGBP-HDL* 启动子的活性分析

为了分析启动子的活性, 实验构建了一系列长度的 *FcβGBP-HDL* 启动子荧光素酶基因载体并转染 *Drosophila* S2 细胞。结果如图 5 所示, 荧光素酶基因在全长载体 (pGL3-*FcβGBP1*) 的相对表达量较高, 是空载体 (pGL3-Basic) 的 85 倍; 在缺失 5' 端 2 个 AP-1 后的载体 (pGL3-*FcβGBP2*) 启动活性上升到最大, 是空载体的 134 倍; 继续缺失 GATA-1 和 Sp1 的载体 (pGL3-*FcβGBP3*) 启动活性出现降低趋势, 是空载体的 112 倍; 当缺失启动子核心序列后的载体 (pGL3-*FcβGBP4*) 启动活性最低, 是空载体的 5 倍。

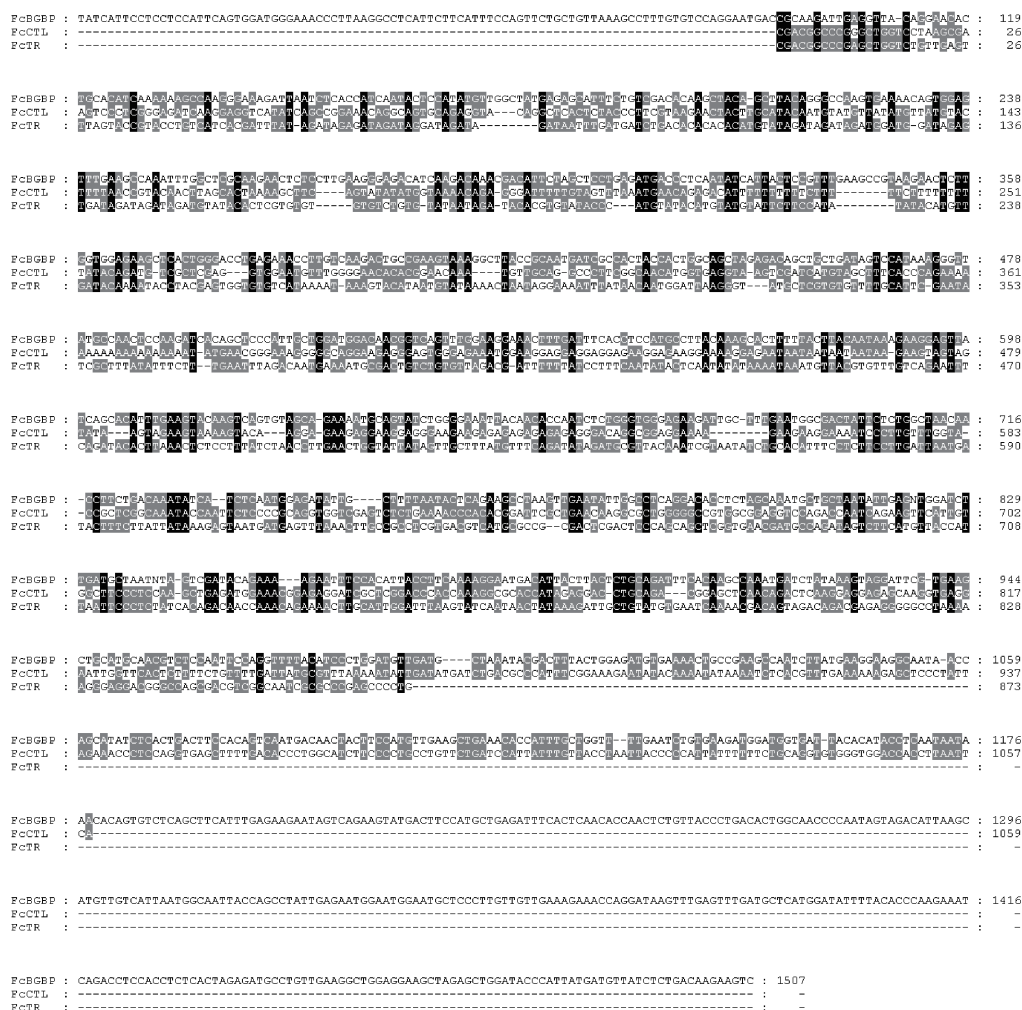


图 3 FcβGBP-HDL、FcCTL 和 FcTR 的同源比对分析

一致序列用黑色表示,相似序列用灰色表示。

Fig. 3 Alignment of promoter sequences among FcβGBP-HDL, FcCTL and FcTR

The consensus sequences are in black shadow, and similar sequences are in grey shadow.

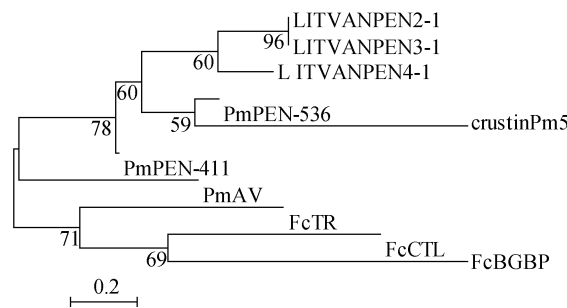


图 4 FcβGBP-HDL 启动子及其他来自虾类的免疫相关基因启动子分子系统学分析

来源于凡纳滨对虾的免疫相关基因启动子: LITVANPEN2-1: DQ206401; LITVANPEN3-1: DQ206403; LITVANPEN4-1: DQ206402; 来源于斑节对虾的免疫相关基因启动子: PmPEN-536: FJ418753; PmPEN-411: FJ418752; PmAV: DQ641258; CrustinPm5: FJ380049; 来源于中国明对虾的免疫相关基因启动子 FcβGBP: JX075087; FcTR: JX075092; FcCTL: JQ993445。

Fig. 4 Phylogenetic tree of promoter sequences of FcβGBP-HDL and other immune related genes from shrimps

The promoter sequences of immune related genes from *L. vannamei*: LITVANPEN2-1: DQ206401; LITVANPEN3-1: DQ206403; LITVANPEN4-1: DQ206402; The promoter sequences of immune related genes from *P. monodon*: PmPEN-536: FJ418753; PmPEN-411: FJ418752; PmAV: DQ641258; CrustinPm5: FJ380049; The promoter sequences of immune related genes from *F. chinensis*: FcβGBP: JX075087; FcTR: JX075092; FcCTL: JQ993445.

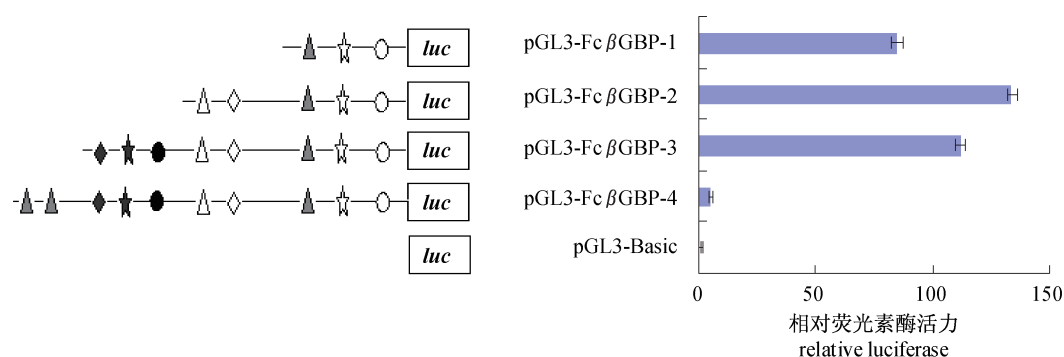


图5 *FcβGBP-HDL* 启动子构建载体转化 *D. melanogaster* S2 细胞后的表达

左图是启动子-荧光素酶报告基因构建载体方案:▲、◆、★、●、△、◇、☆和○分别代表 AP-1、GATA-1、CTF、Sp1、SRF、启动子核心序列、CREB 和 c-Ets-1。右图是每一个构建载体相对空载体在转化 *Drosophila* S2 细胞后的启动活性:数据是相对于空载体 (pGL3-basic) 的诱导倍数和 3 次重复的标准方差。

Fig. 5 Expression of *FcβGBP-HDL* promoter constructs in transiently transfected *D. melanogaster* S2 cells

A schematic illustration of the promoter-luciferase reporter constructs is shown on left. AP-1 is indicated with ▲. GATA-1 is indicated with ◆. CTF is indicated with ★. Sp1 is indicated with ●. SRF is indicated with △. The putative core promoter sequence is indicated with ◇. CREB is indicated with ☆. c-Ets-1 is indicated with ○. The activity of each construct relative to empty vector (pGL3-basic) in transiently transfected *Drosophila* S2 cells is shown on right. Data expressed as fold induction relative to empty vector (pGL3-basic) and error bars represent the ± S. D. of replicate trials.

### 3 讨论

#### 3.1 *FcβGBP-HDL* 相应的基因组 DNA 结构

在对 *FcβGBP-HDL* 相应的基因组 DNA 结构的研究中发现,在长达 6 713 bp 的 DNA 中没有内含子的存在。由于没有其它物种  $\beta$ GBP 基因组 DNA 结构的报道,因而无从比较。但研究表明内含子存在于绝大多数真核生物基因中(甚至超过 99%)。比较同源基因的进化过程发现,内含子的异化大于外显子,特定的内含子还可能在进化过程中丢失,这是生物遗传多样性的一种表现<sup>[21]</sup>。*FcβGBP-HDL* 相应的 cDNA 所编码的蛋白质跟 *Litopenaeus vannamei*  $\beta$ GBP-HDL、*Pacifastacus leniusculus*  $\beta$ GBP 和 *Pontastacus leptodactylus*  $\beta$ GBP 的相似度分别为 88%、54% 和 53%,在感染 WSSV 后 *FcβGBP-HDL* 在转录水平呈现显著上调后回复至对照水平<sup>[17]</sup>。这意味着 *FcβGBP-HDL* 遗传多样性较低,可能在对虾先天免疫中发挥重要且保守的作用。

#### 3.2 *FcβGBP-HDL* 相应的启动子分析

对 *FcβGBP-HDL* 启动子序列的研究表明,*FcβGBP-HDL* 启动子序列包含 1 个 RNA 聚合酶识别并结合的启动子核心序列、TBP 结合的 TATA box、SRF 结合的 CArG 和 CTF 结合的 CCAAT box 3 个典型的转录调控区域。不存在

典型的 GC box,结果与斑节对虾 *PmAV* 的启动子类似<sup>[22]</sup>。TATA box 是启动子序列关键的调控元件,是 RNA 聚合酶 II 识别的位点,也是一些反式作用因子与 DNA 相互作用的位点之一。TATA box 指导 RNA 聚合酶结合到启动子上,使其在正确的位置开始转录,对于基因的正确启动表达具有重要的意义;CCAAT box 具有调控转录起始频率的作用。这些序列的缺失会导致转录频率严重下降。

*FcβGBP-HDL* 启动子区域还发现了参与其它节肢动物免疫基因转录调节的 AP-1、GATA-1、c-Ets-1 和 Sp1 等结合位点。AP-1、GATA-1 在 *L. vannamei* PEN4<sup>[23]</sup>、*P. monodon* Type536 及 Type411<sup>[24]</sup> 中发现。构建一系列长度的 *FcβGBP-HDL* 启动子荧光素酶基因载体并转染 *Drosophila* S2 细胞的结果与 *L. vannamei* PEN4 的类似<sup>[23]</sup>,AP-1 的去除会激活荧光报告基因的转录,表现为负调控活性;而 GATA-1 的去除将会下调荧光报告基因的转录,表现为正调控活性。进一步的研究表明,GATA-1 的转录激活与协同表达的 Sp1 具有增效作用,并且二者结合位点的距离会显著影响增效,当二者相距大约 300 bp 时且 GATA-1 与 Sp1 协同表达时,效果最好<sup>[25]</sup>。*FcβGBP-HDL* 基因启动子中存在两个转录因子结合位点:GATA-1 (-1 046 ~ -1 037 bp) 和 Sp1 (-750 ~

-741 bp)之间的距离正好是 300 bp,二者缺失之后的载体启动活性下降。

本次实验成功克隆了 Fc $\beta$ GBP-HDL 启动子序列,通过分析软件预测了其启动子核心序列及其调控元件,并通过构建一系列缺失表达载体分析了启动子各片段的启动活性,为 Fc $\beta$ GBP-HDL 转录调节机制的研究工作奠定了基础,也为对虾免疫应答机制的研究提供了进一步的资料。有关 Fc $\beta$ GBP-HDL 基因启动子在病原侵染过程中参与转录调节的结合蛋白因子活性有待于进一步通过体内和体外的 DNA-蛋白质结合活性检测来确定。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Smith V J, Chisholm J R S. Non-cellular immunity in crustaceans [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 1992, 2(1) : 1 - 31.
- [ 2 ] Mellroth P, Karlsson J, Steiner H. A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein [ J ]. The Journal of Biology Chemistry, 2003, 278(48) : 7059 - 7064.
- [ 3 ] Takehana A, Katsuyama T, Yano T, et al. Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae [ J ]. Procedure National Academic Sciences USA, 2002, 99(21) : 13705 - 13710.
- [ 4 ] Ramet M, Manfrulli P, Pearson A, et al. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli* [ J ]. Nature, 2002, 416 : 644 - 648.
- [ 5 ] Zhang R, Cho H Y, Kim H S, et al. Characterization and properties of a 1, 3- $\beta$ -D-glucan pattern recognition protein of *Tenebrio molitor* larvae that is specifically degraded by serine protease during prophenoloxidase activation [ J ]. The Journal of Biology Chemistry, 2003, 278(43) : 42072 - 42079.
- [ 6 ] Duvic B, Soderhall K.  $\beta$ -1, 3-Glucan-binding proteins from plasma of the freshwater crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkia* [ J ]. Journal of Crustacean Biology, 1993, 13(3) : 403 - 408.
- [ 7 ] Romeo-Figueroa M G, Vargas-Requena C, Sotelo-Mundo R R, et al. Molecular cloning of a  $\beta$ -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus ( Litopenaeus ) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure [ J ]. Development & Comparative Immunology, 2004, 28 ( 7 - 8 ) : 713 - 726.
- [ 8 ] Roux M M, Pain A, Klimper K R, et al. The lipopolysaccharide and  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp ( *Penaeus stylirostris* ) [ J ]. Journal of Virology, 2002, 76(14) : 7140 - 7149.
- [ 9 ] Cheng W, Liu C H, Tsai C H, et al. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide-and  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein ( LGBP ) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18(4) : 297 - 310.
- [ 10 ] Liu F S, Li F H, Dong B. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition protein, lipopolysaccharide and  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein ( LGBP ) from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [ J ]. Molecular Biology Reports, 2009, 36 ( 3 ) : 471 - 477.
- [ 11 ] Soderhall K, Rogener W, Soderhall I, et al. The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a  $\beta$ -1, 3-glucan [ J ]. Insect Biochemistry, 1988, 18(4) : 323 - 330.
- [ 12 ] Ochiai M, Ashida M. Purification of a  $\beta$ -1, 3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* [ J ]. Journal Biology Chemistry, 1988, 263 ( 24 ) : 12056 - 12062.
- [ 13 ] Ma C, Kanost M R. A  $\beta$ -1, 3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade [ J ]. The Journal of Biology Chemistry, 2000, 275 : 7505 - 7514.
- [ 14 ] Sritunyalucksana K, Lee S Y, Soderhall K. A  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [ J ]. Development & Comparative Immunology, 2002, 26(3) : 237 - 245.
- [ 15 ] Jiménez-Vega F, Sotelo-Mundo R R, Ascencio F, et al. 1, 3- $\beta$ -D glucan binding protein ( BGBP ) from the white shrimp, *Penaeus vannamei*, is also a heparin binding protein [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 13(3) : 171 - 181.
- [ 16 ] Jayaraj S S, Thiagarajan R, Arumugam M, et al. Isolation, purification and characterization of  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein from the plasma of marine



- mussel Perna viridis* [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(6): 715 - 725.
- [17] Lai X F, Kong J, Wang Q Y, *et al.* Cloning and characterization of a  $\beta$ -1, 3-glucan-binding protein from shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [ J ]. Molecular Biology Reports, 2011, 38 ( 7 ): 4527 - 4535.
- [18] 赖晓芳,孔杰,王清印,等. 中国对虾抗 WSSV 相关基因表达特征的 DDRT-PCR 分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 193 - 200.
- [19] 王伟继. I 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性的 QTL 定位研究 II 蓝鳃太阳鱼 (*Lepomis macrochirus*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建及性别决定机制初探 [ D ]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [20] 张殿昌,邵艳卿,苏天凤,等. 鲮  $\beta$ -肌动蛋白基因和启动子的克隆及序列特征分析 [ J ]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 345 - 351.
- [21] 朱玉贤,李毅. 现代分子生物学 [ M ]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [22] Luo T, Li F, Lei K, *et al.* Genomic organization, promoter characterization and expression profiles of an antiviral gene PmAV from the shrimp *Penaeus monodon* [ J ]. Molecular Immunology, 2007, 44 ( 7 ): 1516 - 1523.
- [23] O'Leary N A, Gross P S. Genomic structure and transcriptional regulation of the penaeid in gene family from *Litopenaeus vannamei* [ J ]. Gene, 2006, 371(1): 75 - 83.
- [24] Ho S, Song Y. Cloning of penaeidin gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(1): 73 - 77.
- [25] Leu J H, Lee M S, Chen K T, *et al.* Genomic structure of carp mitogen-activated protein kinase kinase 1 gene [ J ]. Biochimica et Biophysica Acta ( BBA ) - Gene Structure and Expression, 1996, 1306 ( 2 - 3 ): 133 - 136.

## Analysis of genomic structure and the promoter characterization of *FcβGBP-HDL* from *Fenneropenaeus chinensis*

LAI Xiaofang<sup>1,2</sup>, GAO Huan<sup>1,2</sup>, KONG Jie<sup>2</sup>, WANG Qingyin<sup>2\*</sup>, WANG Weiji<sup>2</sup>

(1. Ocean and Fisheries College, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** *FcβGBP-HDL* was a pattern recognition receptor (PRR) which was up-regulated post WSSV (white spot syndrome virus) challenge. To investigate the mechanism of transcription regulation, primers were designed based on the *FcβGBP-HDL* cDNA obtained, the gene and 5'-flanking sequences were isolated from the Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by genome walking, and the activity of promoter was analyzed by voter construction. The results showed that this gene was composed of only one exon spanning 6 713 bp. The 5'-flanking sequence (1 507 bp) of *FcβGBP-HDL* gene contained several typical transcription regulation elements, such as one promoter core sequence, two SRF, two TBP, one CTF and one CRE, and several transcription regulation elements of immune-gene in other arthropods, such as two GATA-1, three AP-1 and seven Sp1. The upstream sequence of *FcβGBP-HDL* gene had highest level similarity with *FcCTL* (similarity 41.4%). The transcription levels of luciferase reporter gene were up-regulated in all construction voters, highest in pGL3-*FcβGBP2* with the deletion of two AP-1, and lowest in pGL3-*FcβGBP4* with the deletion of promoter core sequence. The results indicated that promoter of *FcβGBP-HDL* might be regulated in immune reaction.

**Key words:** *Fenneropenaeus chinensis*; *FcβGBP-HDL*; genomic structure; promoter

**Corresponding author:** WANG Qingyin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn