



团头鲂*tf*和*tfr1a*基因启动子克隆及转录调控分析

王济秀, 张 锋, 王卫民, 刘 红*

(华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为探索鱼类转铁蛋白基因*tf*和转铁蛋白受体基因*tfr1a*的转录调控机制, 本实验以团头鲂为研究对象, 在其全基因组数据库中获得*tf*和*tfr1a*基因序列, 对2个基因候选启动子区转录因子结合位点及CpG岛进行预测, 通过PCR方法克隆得到*tf*和*tfr1a*基因近端启动子区不同长度片段, 连接至pGL3-Basic/pEGFP-1载体, 瞬时转染入Hela细胞, 并采用双荧光素酶报告基因检测系统进行检测。结果发现, 团头鲂*tf*基因启动子区无CpG岛位点, 而*tfr1a*基因启动子区有2个CpG岛位点。成功构建9个*tf*和10个*tfr1a*不同长度启动子片段的重组质粒, 经双荧光素酶报告基因系统检测发现, *tf*启动子核心区域为-268~+56 bp, 且-1 308~-1 102 bp片段可能存在正调控该基因表达的转录因子结合位点; *tfr1a*启动子核心区域为-224~+48 bp, 且+48~+92 bp可能存在抑制该基因转录的负调控元件, 而-1 229~-1 219 bp区域可能存在促进*tfr1a*基因表达的正调控转录因子结合位点。

关键词: 团头鲂; *tf*基因; *tfr1a*基因; 启动子; 转录调控

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

铁是几乎所有生物体生长和生存必需的微量元素, 然而, 过量的铁对机体是有害的^[1-3]。因此, 维持机体的铁稳态对包括鱼类在内的大多数生物体的健康至关重要。铁稳态的维持是通过一系列蛋白的相互作用来完成的, 这些蛋白主要在肝脏中合成, 其中包括参与铁储存和转运的蛋白, 如转铁蛋白(Tf)和转铁蛋白受体(Tfr1a)^[4]。Tf是一种分子量约80 ku的非血红素铁转运糖蛋白, 存在于从蟑螂(*Blattidae*)到人(*Homo sapiens*)的众多细胞生物中, 将游离的Fe³⁺运送到循环系统、细胞和组织中^[5], 在维持机体铁代谢和铁稳态中起着重要作用^[6]。Tfr1a是一种II型跨膜同源二聚体受体, 是铁进入大多数细胞的主要入口^[7], 当铁—转铁蛋白复合体与细胞表面的Tfr1a结合时, 通过胞饮的方式进入细胞^[8]。已有研究表明, Tf的功能不仅仅是结合和运输Fe³⁺, 还会与Tfr1a结合, 诱导肝杀菌肽的表达, 进而参与铁代谢调控^[9-11]。

启动子的元件构成及其功能对于基因表达及其转录水平的调控至关重要^[12]。核心启动子被称为“转录的门户”, 是转录起始的核心组成部分^[13-14], 其中TATA box的突变可以影响核心启动子活性^[15]。关于*tf*和*tfr1a*基因启动子的研究较少, 尤其在鱼类中。因此, 对*tf*和*tfr1a*启动子转录调控的研究, 可以更好地阐明*tf*和*tfr1a*表达调控机制, 为解析基因调控网络奠定基础。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)自然分布于长江中游以及附属湖泊, 目前已成为我国主要淡水养殖鱼类之一^[16]。本实验拟以团头鲂为研究对象, 从其基因组数据库中获得*tf*和*tfr1a*基因5'端上游序列, 运用生物信息学方法预测其转录因子结合位点和CpG岛位点, 推测其对*tf*和*tfr1a*启动子活性的影响; 对*tf*和*tfr1a*基因启动子进行克隆和转录活性分析, 明确*tf*和*tfr1a*基因核心启动子区域, 为鱼类*tf*和*tfr1a*基因的表达调控提供理论依据。

收稿日期: 2019-03-25 修回日期: 2019-06-02

资助项目: 国家自然科学基金(31572613); 湖北省协同创新中心建设专项资金(2016ZXPY04)

通信作者: 刘红, E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验鱼团头鲂来自湖北百容水产良种有限公司; Hela细胞系为本实验室保存。

1.2 主要试剂

*Taq*酶、dNTP(北京康为生物科技有限公司), DNA Marker、Trans5 α 菌株(北京擎科新业生物技术有限公司), 限制性内切酶(Thermo Scientific), T4 DNA连接酶(北京艾德莱生物技术有限公司), 胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司), Lipofectamine 2000(Invitrogen), 双抗(Penicillin-Streptomycin)、0.25%EDTA胰酶、opli-MEM I 低血清培养基以及MEM培养液(Gibco), 纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒(Axygen), 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega), pBlue-T Easy载体试剂盒(北京艾德莱生物技术有限公司), pGL3-Basic、pRL-TK、pEGFP-1、pEGFP-N1载体由本实验室保存; 合成引物及测序均由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.3 方法

生物信息学分析 从GenBank数据库中获得团头鲂 *tf* (GenBank: KF471069.1)和 *tfr1a* (GenBank: KM225267.1)mRNA序列, 从团头鲂全

基因组数据库^[17]中获得 *tf*和 *tfr1a*的基因组DNA全序列。对团头鲂 *tf*和 *tfr1a*基因候选启动子进行潜在的转录因子结合位点、TATA box (JASPAR, <http://jaspar.binf.ku.dk/>、AliBaba2.1, <http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>和 TFBIND, <http://www.mybiosoftware.com/tfbind-searching-transcription-factor-binding-sites.html>), 和 CpG岛在线预测(MethPrime, <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)。

引物设计 利用Primer premier 5.0软件设计团头鲂 *tf*启动子(表1)和 *tfr1a*启动子(表2)不同长度片段扩增引物, 上下游引物5'端分别有不同的酶切位点(酶切位点序列下划线标出), 酶切位点前添加保护碱基。所有引物均由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

团头鲂 *tf*和 *tfr1a*基因启动子不同长度片段的扩增 提取团头鲂鳍条组织的DNA为模板, 用启动子不同长度片段的扩增引物, 进行普通PCR扩增。PCR反应体系为10 μ L: DNA模板 0.5 μ L, ddH₂O 7.7 μ L, 10 \times *Taq* PCR Buffer 1.0 μ L, 上下游引物各0.3 μ L, *Taq* DNA酶0.2 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸(1 kb/min), 35个循环(表1, 表2); 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。

团头鲂 *tf*和 *tfr1a*基因不同长度片段启动子

表 1 团头鲂 *tf* 基因启动子不同长度片段的扩增引物

Tab. 1 Primers used for fragments amplification of *M. amblycephala tf* promoter

| 引物 primers | 序列(5'→3') sequences | 扩增区域 amplification region | 片段长度/bp length | PCR延伸时间 extension time |
|---------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------|---------------------------|
| TF-Y-F | CGCGGATCCTCCGCTCTCAAACCTAGCATTAT | -1 813~+69 | 1 882 | 1 min 53 s |
| TF-Y-R | CGCGGATCCATTACCAAGGCAGCCAGC | | | |
| TF-1-F | GCAACGCGTTCGCTCTCAAACCTAGCATTAT | -1 813~+69 | 1 882 | 1 min 53 s |
| TF-2-F | GCAACGCGTCACAATACATATCGTTTCAAAGC | -1 308~+69 | 1 377 | 1 min 23 s |
| TF-3-F | GCAACGCGTAAATACAGGATTCGAATCCCAA | -1 102~+69 | 1 171 | 1 min 10 s |
| TF-4-F | GCAACGCGTAACTGGACGTCATCACACTTCTG | -816~+69 | 885 | 53 s |
| TF-5-F | GCAACGCGTGTGAATCCAGACTGCGGCTT | -576~+69 | 645 | 39 s |
| TF-6-F | GCAACGCGTTAATTTTCGAGGTGCATGTAACA | -294~+69 | 363 | 22 s |
| TF-R | CCGCTCGAGATTACCAAGGCAGCCAGC | | | |
| TF-X-F | GCAACGCGTGTGAATCCAGACTGCGGCTT | | | |
| TF-X1-R | CCCAGCTTCCCAGCAATGAGATGAGCAGG | -576~+56 | 632 | 38 s |
| TF-X2-R | CCCAGCTTGCTTGTGCAGGCAGTGAGC | -576~-114 | 462 | 28 s |
| TF-X3-R | CCCAGCTTACTGTTACATGCACCTCGAAA | -576~-268 | 308 | 19 s |

注: 下划线部分表示酶切位点; 下同

Notes: The underline part indicates the restriction site; the same below

表2 团头鲂 *tfr1a* 基因启动子不同长度片段的扩增引物Tab. 2 Primers used for fragments amplification of the *M. amblycephala tfr1a* promoter

| 引物 primers | 序列(5'→3') sequences | 扩增区域 amplification region | 片段长度/bp length | PCR延伸时间 extension time |
|---------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------|---------------------------|
| TFR-Y-F | CGCGGATCCCTGGTTCCACAAGAGAAGATA | -1 911~+48 | 1 959 | 1 min 58 s |
| TFR-Y-R | CGCGGATCCAGCAGATTCACATGCCAA | | | |
| TFR-1-F | GCAACGCGTGGTGACTGTCCCTGTCGTAA | -1 911~+48 | 1 959 | 1 min 58 s |
| TFR-2-F | GCAACGCGTAATAGGCGAATACCACTGATG | -1 534~+48 | 1 582 | 1 min 35 s |
| TFR-3-F | GCAACGCGTCAGACTGAGCCTGGTTCC | -1 219~+48 | 1 267 | 1 min 16 s |
| TFR-4-F | GCAACGCGTAAAGAGACTTGGCTTATTGCTA | -885~+48 | 933 | 56 s |
| TFR-5-F | GCAACGCGTGGCATGTGAATCTGCTGAG | -535~+48 | 583 | 35 s |
| TFR-6-F | GCAACGCGTAATGAGGACGACAATTGGAGAT | -229~+48 | 277 | 17 s |
| TFR-R | CCCAGCTTTAAATCTTACCAATGCTCTCG | | | |
| TFR-X-F | GCAACGCGTCTGGTTCCACAAGAGAAGATA | | | |
| TFR-X1-R | CCCAGCTTGAAATTGCCGGTAGGTAACA | -1 229~+92 | 1 321 | 1 min 20 s |
| TFR-X2-R | CCCAGCTTCTAATCTCCAATTGTCGTCC | -1 229~-224 | 1 005 | 1 min |
| TFR-X3-R | CCCAGCTTCAGCAGATTCACATGCCAA | -1 229~-537 | 692 | 42 s |
| TFR-X4-R | CCCAGCTTTAAATCTTACCAATGCTCTCG | -1 229~+48 | 1 277 | 1 min 17 s |

表达载体的构建 将扩增正确的团头鲂启动子PCR片段与表达载体质粒分别双酶切, 连接构建不同的重组质粒。用 *Mlu* I 和 *Xho* I 双酶切TF-1~6和pGL3-Basic, 连接构建pGL3-TF1~6重组质粒; 用 *Mlu* I 和 *Hind* III 双酶切TFR-1~6和pGL3-Basic, 连接构建pGL3-TFR1~6重组质粒; 用 *Mlu* I 和 *Hind* III 双酶切TF-X1~3、TFR-X1~4和pGL3-Basic, 连接构建pGL3-TFX1~3、pGL3-TFRX1~4重组质粒; 用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切TF-Y、TFR-Y和pEGFP-1, 连接构建pEGFP-TF和pEGFP-TFR重组质粒。

细胞培养及瞬时转染 将Hela细胞培养在含1%双抗和10%血清的MEM完全培养液中, 37 °C、5%CO₂条件下培养。待细胞生长状态良好时进行瞬时转染试验。具体操作步骤: 取生长状态良好的Hela细胞接入24孔板中, 37 °C培养过夜。当pEGFP-TF与pEGFP-TFR转染细胞时, 以pEGFP-1作为阴性对照质粒, pEGFP-N1作为阳性对照质粒, 每个样品重复3个孔, 转染24 h后在激光共聚焦显微镜下观察EGFP荧光表达情况。启动子分析试验, 以每孔对照质粒pGL3-Basic或重组质粒与内参质粒pRL-TK以20:1的比例共转染细胞, 每个样品重复3个孔; 37 °C培养24 h后, 收集细胞用于荧光素酶活性检测。

<http://www.sxuebao.cn>

双荧光素酶报告基因检测系统检测 待细胞转染24 h后, 吸除细胞培养液, 用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗细胞1~2次, 吸净PBS, 每孔加入100 μL细胞裂解液PLB, 室温轻轻摇动培养板约15 min; 随后用微型细胞刮使细胞完全脱壁, 将细胞裂解物转移至新的1.5 mL EP管中; 静置10 min, 取上述10 μL细胞裂解上清液加入到96孔检测板中, 然后加入50 μL荧光素酶检测试剂LAR II, 上机检测, 显示的结果为萤火虫荧光素酶的值, 并记录结果; 迅速加入50 μL Stop & Glo®试剂, 第二次读数显示的结果为海肾荧光素酶的值, 并记录结果。

统计分析 启动子的相对活性用萤火虫荧光素酶的值/海肾荧光素酶的值表示。实验数据用SPSS 16.0软件中的LSD多重比较法对每个片段的启动子活性作两两比较分析, 利用GraphPad Prism 7软件进行统计学分析及绘图。统计学上的显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 团头鲂 *tf* 和 *tfr1a* 基因启动子的生物信息学分析

将团头鲂 *tf* 和 *tfr1a* 基因的 mRNA 序列与

DNA序列分别进行BLAST比对,获取*tf*和*tfr1a*基因起始密码子上游约2 000 bp序列作为启动子候选区,选取的启动子片段均包括*tf*和*tfr1a*基因第一外显子序列。通过在线软件AliBaba 2.1、JASPAR和TFBIND分别对*tf*和*tfr1a*基因启动子候选区进行转录因子结合位点预测,结果显示,有许多潜在的转录因子结合位点,包括GATA-1、Sp1、Oct-1、AP-1、NF-kappaB和C/EBP等(图1)。用在线软件MehPrimer预测启动子CpG岛(预测标准: Island size > 100、GC Percent > 50.0、Obs/Exp > 0.6),结果显示,*tf*基因启动子中无CpG岛位点,而*tfr1a*基因启动子有2个CpG岛位点,分别位于-1 796~-1 691 bp和-79~+33 bp(图2)。

2.2 团头鲂*tf*和*tfr1a*基因启动子区不同长度片段的扩增

以团头鲂基因组DNA为模板,用引物TF-Y-F与TF-Y-R扩增片段TF-Y,引物TF-1-F~TF-6-F分别与TF-R扩增出6个不同长度的启动子片段TF-1~6,引物TF-X1-F~TF-X3-F分别与TF-X-R扩增出3个不同长度的片段TF-X1~X3;引物TFRY-F与TFR-Y-R扩增片段TFR-Y,引物TFR-1-F~TFR-6-F分别与TFR-R扩增出6个不同长度的启动子片段TFR-1~6,引物TFR-X1-F~TFR-X4-F分别与TFR-X-R扩增出4个不同长度的片段TFR-X1~X4(表1,表2)。团头鲂*tf*和*tfr1a*基因启动子区不同长度片段的扩增PCR产物大小分别与设计的长度一致(图3),表明已成功获取启动子目的片段。

2.3 团头鲂*tf*和*tfr1a*基因启动子表达载体构建

将构建成功的pGL3-TF1~6、pGL3-TFX1~3、pGL3-TFR1~6、pGL3-TFRX1~4以及pEGFP-TF和pEGFP-TFR重组质粒电泳检测发现,目的条带与PCR产物条带一致(图4),表明重组质粒可用于后续实验。

2.4 荧光蛋白报告系统验证团头鲂*tf*和*tfr1a*基因启动子候选区活性

将构建成功的pEGFP-TF和pEGFP-TFR重组质粒、pEGFP-1阴性对照质粒、pEGFP-N1阳性对照质粒分别同时转染Hela细胞。结果显示,pEGFP-TF和pEGFP-TFR均能驱动绿色荧光蛋白EGFP的表达(图版),证明*tf*和*tfr1a*启动子候选区片段均有一定转录活性。

2.5 双荧光素酶报告基因系统检测团头鲂*tf*和*tfr1a*基因启动子不同片段的活性

将构建的双荧光素酶报告基因重组质粒和pGL3-Basic对照质粒分别与内参质粒pRL-TK共转染Hela细胞,转染24 h后收集细胞,检测各重组质粒和对照质粒的荧光值。结果显示,重组质粒pGL3-TF1~6、pGL3-TFX1~2荧光活性与对照质粒pGL3-Basic均有显著性差异($P < 0.05$),其中pGL3-TF2的相对荧光活性最高,其后依次为pGL3-TFX1、pGL3-TF4、pGL3-TF3、pGL3-TF1、pGL3-TF5、pGL3-TF6和pGL3-TFX2(图5)。重组质粒pGL3-TFR1~6、pGL3-TFRX4荧光活性与对照质粒pGL3-Basic均有显著性差异($P < 0.05$),其中pGL3-TFR3的相对荧光活性最高,其后依次为pGL3-TFR4、pGL3-TFR1、pGL3-TFR2、pGL3-TFR5、pGL3-TFR6和pGL3-TFRX4(图6)。

3 讨论

基因转录调控区的顺式作用元件包括增强子、沉默子、近端启动子区、核心启动子和边界/绝缘体元件^[18]。真核生物启动子位于基因5'端上游,是基因时空表达调控的重要顺式作用元件,能与RNA聚合酶II特异结合,决定转录起始位置^[19],控制基因表达水平。Tf和Tfr1a参与铁转运和铁代谢的调控,除了在维持铁稳态中发挥重要作用^[20-21],前期研究已证明团头鲂Tf和Tfr1a参与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染引起的免疫应答反应^[4]。目前,有关*tf*和*tfr1a*基因转录调控的研究比较缺乏,本实验主要对团头鲂*tf*和*tfr1a*基因近端启动子活性进行分析,进而为硬骨鱼类*tf*和*tfr1a*基因转录调控机制研究提供理论依据。

转录起始位点通常位于第一外显子起始位点上游,真核生物核心启动子一般位于转录起始位点-40~+40 bp之间^[22],对团头鲂*tf*和*tfr1a*基因候选启动子的生物信息分析显示,TATA box位于第一外显子起始位点上游60 bp内,推测本实验中启动子片段选择正确。CpG岛在基因表达调控中起着重要作用,人类基因约60%启动子包含CpG岛,它们通常跨越转录起始位点(TSSs),CpG岛区域内的DNA甲基化可以影响基因表达^[23-24]。本研究预测的团头鲂*tf*基因启动子候选区不存在CpG岛;*tfr1a*基因启动子候选区存在

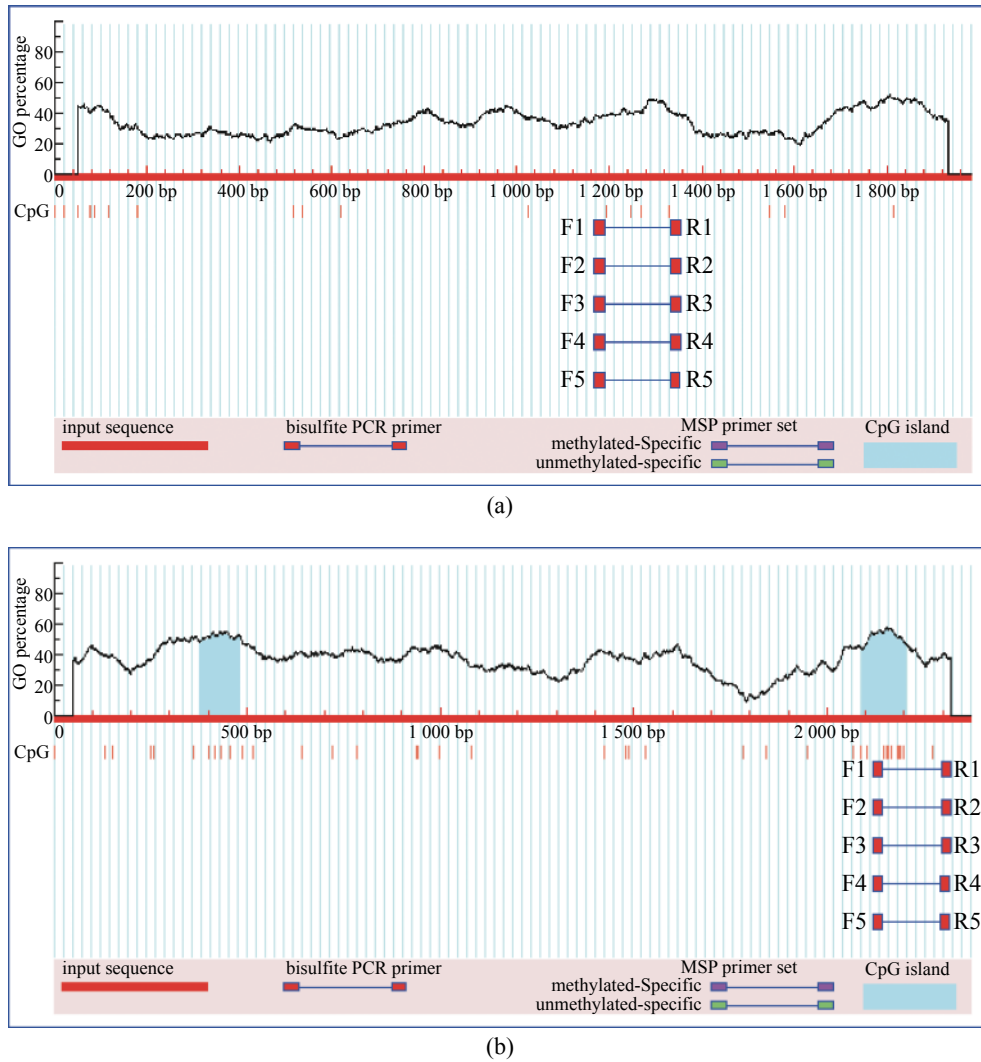


图 2 团头鲂 *tf*(a) 和 *tfr1a*(b) 基因启动子 CpG 岛的预测

Fig. 2 Prediction of CpG islands of the *tf* (a) and *tfr1a* (b) gene promoters in *M. amblycephala*

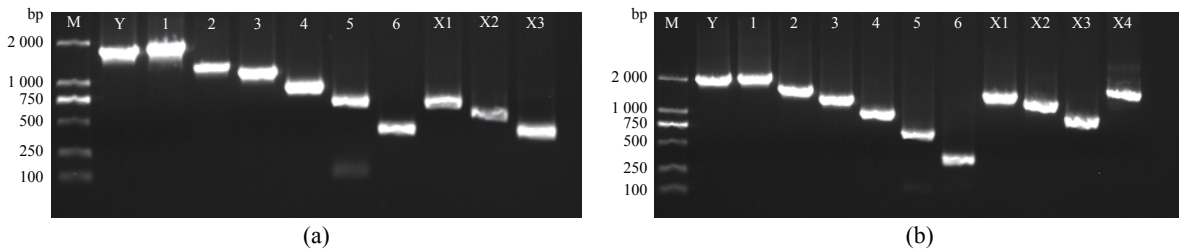


图 3 团头鲂 *tf*(a) 和 *tfr1a*(b) 基因启动子不同长度片段电泳图

(a) Y 表示片段 TF-Y, 1~6 表示片段 TF-1~TF-6, X1、X2、X3 分别表示 TF-X1、TF-X2、TF-X3; (b) Y 表示片段 TFR-Y, 1~6 表示片段 TFR-1~TFR-6, X1、X2、X3 和 X4 分别表示 TFR-X1、TFR-X2、TFR-X3、TFR-X4; M. DL2000 DNA Marker

Fig. 3 Electrophoresis of *tf* (a) and *tfr1a* (b) genes promoter different length fragments of the *M. amblycephala*

(a) Y represents fragment TF-Y, 1-6 represents fragment TF-1 to TF-6, X1, X2 and X3 represent TF-X1, TF-X2 and TF-X3 respectively; (b) Y represents fragment TFR-Y, 1-6 represents fragment TFR-1 to TFR-6, X1, X2, X3 and X4 represent TFR-X1, TFR-X2, TFR-X3 and TFR-X4, respectively; M. DL2000 DNA Marker

2 个 CpG 岛预测位点, 且其中 -79~+33 bp 处的 CpG 岛位点在核心启动子区域, 推测该 CpG 岛位

点甲基化可能影响基因表达。然而, *tfr1a* 基因的 CpG 岛甲基化与其表达之间的关系尚未被研究,

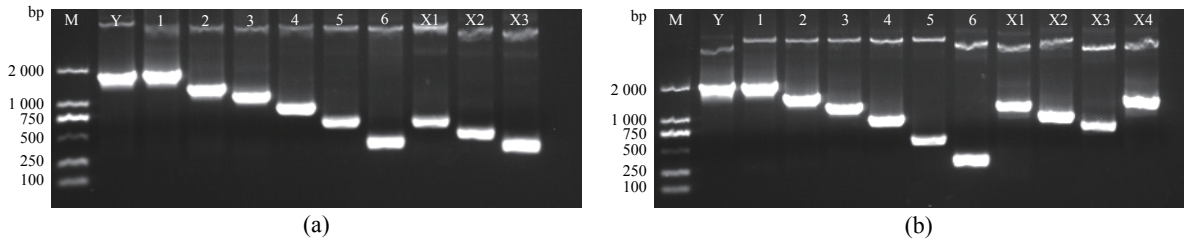


图4 团头鲂*tf*(a)和*tfr1a*(b)基因启动子重组质粒PCR电泳图

(a) Y表示pEGFP-TF, 1~6表示pGL3-TF1~TF6, X1、X2、X3分别表示pGL3-TFX1、pGL3-TFX2、pGL3-TFX3; (b) Y表示pEGFP-TFR, 1~6表示pGL3-TFR1~TFR6, X1、X2、X3、X4分别表示pGL3-TFRX1、pGL3-TFRX2、pGL3-TFRX3、pGL3-TFRX4; M. DL2000 DNA Marker

Fig. 4 Electrophoresis of *tf*(a) and *tfr1a*(b) genes promoter recombinant plasmids of the *M. amblycephala*

(a) Y represent pEGFP-TF, 1-6 represents pGL3-TF1 to TF6, and X1, X2 and X3 represent pGL3-TFX1, pGL3-TFX2 and pGL3-TFX3, respectively; (b) Y represent pEGFP-TFR, 1-6 represents pGL3-TFR1 to TFR6, and X1, X2, X3, and X4 represent pGL3-TFRX1, pGL3-TFRX2, pGL3-TFRX3 and pGL3-TFRX4, respectively; M. DL2000 DNA Marker

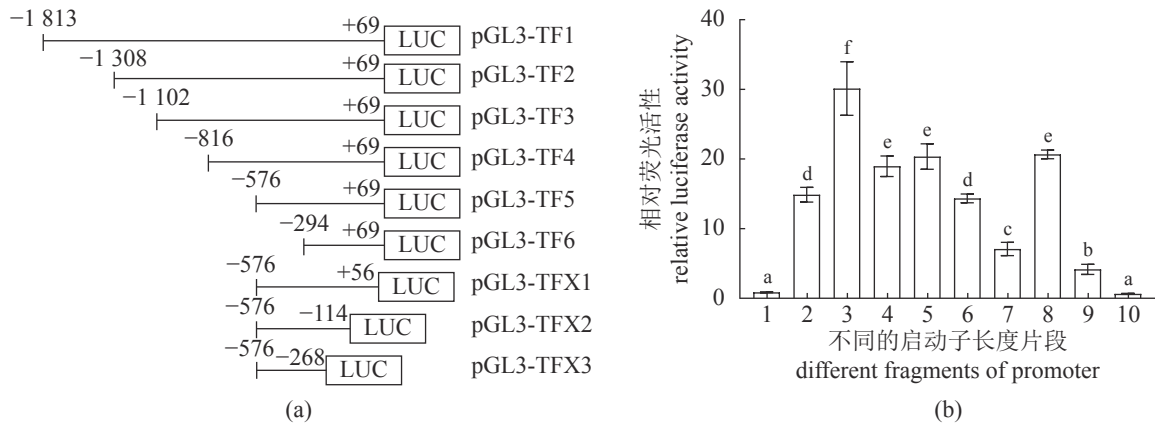


图5 团头鲂*tf*基因启动子不同长度片段示意图(a)及活性分析(b)

1. pGL3-Basic, 2. pGL3-TF1, 3. pGL3-TF2, 4. pGL3-TF3, 5. pGL3-TF4, 6. pGL3-TF5, 7. pGL3-TF6, 8. pGL3-TFX1, 9. pGL3-TFX2, 10. pGL3-TFX3; 数据以平均值±标准误差表示(每个样品3个重复); 不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Fig. 5 Diagrammatic drawing (a) and activity analysis (b) of different length fragments of the *M. amblycephala tf* promoter

1. pGL3-Basic, 2. pGL3-TF1, 3. pGL3-TF2, 4. pGL3-TF3, 5. pGL3-TF4, 6. pGL3-TF5, 7. pGL3-TF6, 8. pGL3-TFX1, 9. pGL3-TFX2, 10. pGL3-TFX3; data are described as mean±SE (n=3); different small letters above the bars indicate significant differences at $P < 0.05$

其分子机制还有待进一步确定。

有研究表明, 人类*tf*基因启动子-125~+1 bp片段为核心启动子区域^[25], 转基因小鼠的肝脏中*tf*启动子-139~+50 bp片段足以使基因表达^[26], 人的*tfr*启动子5'端70 bp即可保证基因的转录^[27]。实验发现, 团头鲂*tf*基因启动子最小片段TF-6 (-294~+69 bp)仍具有一定的转录活性, 而且片段TF-X1(-576~+56 bp)、TF-X2(-576~-114 bp)荧光活性显著高于对照($P < 0.05$), 但是片段TF-X3 (-576~-268 bp)与对照无明显差异, 综上结果可认为, 片段-268~+56 bp能维持*tf*基因启动子基本转录活性, 为核心启动子区域。与*tf*基因相似, 团头鲂*tfr1a*基因启动子最小片段TFR-6(-229~+48

bp)也具有一定的转录活性, 但是TFR-X2(-1 229~-224 bp)无转录活性, 表明-224~+48 bp能维持*tfr1a*基因启动子基本转录活性, 为该基因核心启动子区域。

转录因子Sp-1是一种普遍的反式激活蛋白, 激活RNA聚合酶II的转录^[28]。研究表明, Sp-1的过表达可以促进NF- κ B表达并转移到细胞核绑定到*tfr1*启动子区域, 促使*tfr1*的表达增加^[29]。同时中华蜜蜂 (*Apis cerana*) *tf*基因启动子顺式元件预测发现关于氧化应激和炎症反应的转录结合位点HSF、AP-1、CREB及NF κ B等, 推测*tf*不仅参与环境应激的响应, 同时参与阻止病原微生物的侵袭^[30]。在肝癌细胞中, C/EBP结合位点突

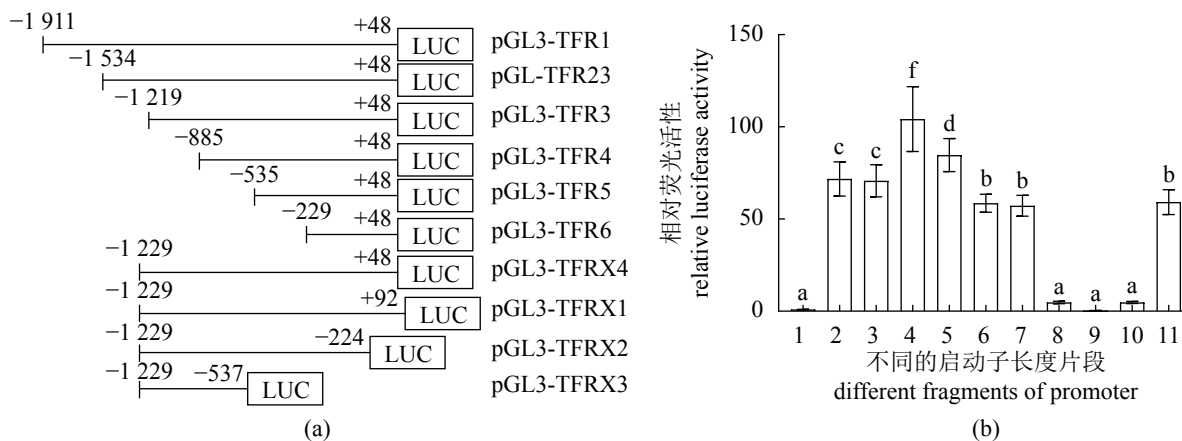


图6 团头鲂 *tfr1a* 基因启动子不同长度片段示意图(a)及活性分析(b)

1. pGL3-Basic, 2. pGL3-TFR1, 3. pGL3-TFR2, 4. pGL3-TFR3, 5. pGL3-TFR4, 6. pGL3-TFR5, 7. pGL3-TFR6, 8. pGL3-TFRX1, 9. pGL3-TFRX2, 10. pGL3-TFRX3, 11. pGL3-TFRX4; 数据以平均值±标准误表示(每个样品3个重复); 不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Fig. 6 Activity analysis of different length fragments of the *M. amblycephala tfr1a* promoter

1. pGL3-Basic, 2. pGL3-TFR1, 3. pGL3-TFR2, 4. pGL3-TFR3, 5. pGL3-TFR4, 6. pGL3-TFR5, 7. pGL3-TFR6, 8. pGL3-TFRX1, 9. pGL3-TFRX2, 10. pGL3-TFRX3, 11. pGL3-TFRX4; data are described as mean±SE (n=3); different small letters above the bars indicate significant differences at $P < 0.05$

变可抑制因子结合并终止人 *tf* 基因转录^[31]。本研究发现, 片段TF-2(-1 308~+69 bp)的相对荧光活性最高, 且与TF-3(-1 102~+69 bp)的荧光活性有显著性差异($P < 0.05$), 而且在二者差异的区域-1 308~-1 102 bp内发现较密集的Sp-1、C/EBP转录因子结合位点, 推测此片段中的转录因子正调控 *tf* 基因表达; 片段TFR-3(-1 219~+48 bp)的相对荧光活性最高, 明显高于TFR-X4(-1 229~+48 bp), 而在二者差异片段-1 229~-1 219 bp区域内预测到Sp-1转录因子结合位点, 推测Sp-1正调控 *tfr1a* 基因表达。进一步分析发现, TFR-XI(-1 229~+92 bp)相较阴性对照无显著差异, 但TFR-X4(-1 229~+48 bp)具有较高的转录活性, 说明+48~+92 bp可能存在抑制该基因转录的负调控元件。关于转录因子如何调控团头鲂 *tf* 和 *tfr1a* 启动子转录活性还有待进一步研究。

综上, 本研究成功克隆了团头鲂 *tf* 和 *tfr1a* 基因不同长度启动子片段, 分别构建重组质粒, 并瞬时转染至Hela细胞中, 重组质粒pEGFP-TF和pEGFP-TFR可以驱动EGFP蛋白表达, 验证了选取的启动子片段有一定的转录活性。双荧光素酶报告基因检测系统检测表明, *tf* 启动子核心区域为-268~+56 bp, 且-1 102~+69 bp片段可能存在正调控该基因表达的转录因子结合位点; *tfr1a* 启动子核心区域为-224~+48 bp, 且+48~+92 bp可能存在抑制该基因转录的负调控元件, -1 229~-1 219 bp区域可能存在促进 *tfr1a* 基因表达的正调

控转录因子结合位点。

参考文献:

- [1] Crichton R R, Wilmet S, Legssyer R, *et al.* Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, 91(1): 9-18.
- [2] Neves J V, Wilson J M, Rodrigues P N S. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, 33(7): 848-857.
- [3] Van Campenhout A, Van Campenhout C M, Lagrou A R, *et al.* Transferrin modifications and lipid peroxidation: implications in diabetes mellitus[J]. *Free Radical Research*, 2003, 37(10): 1069-1077.
- [4] Ding Z J, Zhao X H, Su L N, *et al.* The *Megalobrama amblycephala* transferrin and transferrin receptor genes: molecular cloning, characterization and expression during early development and after *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 49(2): 290-297.
- [5] Qian Z M, Li H Y, Sun H Z, *et al.* Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway[J]. *Pharmacological Reviews*, 2002, 54(4): 561-587.
- [6] Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1980, 49:

- 357-393.
- [7] 文雪. 转铁蛋白受体的结构[J]. 科技视界, 2018(25): 107, 92.
Wen X. Structure of the TFR[J]. Science & Technology Vision, 2018(25): 107, 92(in Chinese).
- [8] Hentze M W, Muckenthaler M U, Andrews N C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism[J]. *Cell*, 2004, 117(3): 285-297.
- [9] Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism[J]. *Annual Review of Medicine*, 2011, 62: 347-360.
- [10] Park C H, Valore E V, Waring A J, *et al.* Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(11): 7806-7810.
- [11] Donovan A, Lima C A, Pinkus J L, *et al.* The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis[J]. *Cell Metabolism*, 2005, 1(3): 191-200.
- [12] 孙晓红, 陈明杰, 潘迎捷. 启动子克隆概述[J]. *食用菌学报*, 2002, 9(3): 57-62.
Sun X H, Chen M J, Pan Y J. A brief account of promoter cloning[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2002, 9(3): 57-62(in Chinese).
- [13] Heintzman N D, Ren B. The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64(4): 386-400.
- [14] Juven-Gershon T, Hsu J Y, Theisen J W M, *et al.* The RNA polymerase II core promoter — the gateway to transcription[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2008, 20(3): 253-259.
- [15] Savinkova L, Drachkova I, Arshinova T, *et al.* An experimental verification of the predicted effects of promoter TATA-box polymorphisms associated with human diseases on interactions between the TATA boxes and TATA-binding protein[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e54626.
- [16] 李思发, 蔡完其. 团头鲂双向选育效应研究[J]. *水产学报*, 2000, 24(3): 201-205.
Li S F, Cai W Q. Two-way selective response of *Megalobrama amblycephala*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(3): 201-205(in Chinese).
- [17] Liu H, Chen C H, Gao Z X, *et al.* The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet[J]. *GigaScience*, 2017, 6(7): gix039.
- [18] Kadonaga J T. The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2002, 34(4): 259-264.
- [19] Nolis I K, McKay D J, Mantouvalou E, *et al.* Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(48): 20222-20227.
- [20] Brummett L M, Kanost M R, Gorman M J. The immune properties of *Manduca sexta* transferrin[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 81: 1-9.
- [21] Gammella E, Buratti P, Cairo G, *et al.* The transferrin receptor: the cellular iron gate[J]. *Metallomics*, 2017, 9(10): 1367-1375.
- [22] Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, *et al.* Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution[J]. *Nature Genetics*, 2006, 38(6): 626-635.
- [23] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(10): 1057-1068.
- [24] Yao W, Li Y X, Li B J, *et al.* Epigenetic regulation of bovine spermatogenic cell-specific gene *Boule*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128250.
- [25] Sawaya B E, Aunis D, Schaeffer E. Distinct positive and negative regulatory elements control neuronal and hepatic transcription of the human transferrin gene[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 1996, 43(3): 261-272.
- [26] Idzerda R L, Behringer R R, Theisen M, *et al.* Expression from the transferrin gene promoter in transgenic mice[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1989, 9(11): 5154-5162.
- [27] Casey J L, Di Jeso B D, Rao K K, *et al.* Deletional analysis of the promoter region of the human transferrin receptor gene[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(2): 629-646.
- [28] Van Wijnen A J, Bidwell J P, Fey E G, *et al.* Nuclear matrix association of multiple sequence-specific DNA binding activities related to SP-1, ATF, CCAAT, C/EBP, OCT-1, and AP-1[J]. *Biochemistry*, 1993, 32(33): 8397-8402.
- [29] Chen S J, Kuo C C, Pan H Y, *et al.* Desferal regulates hCtrl and transferrin receptor expression through Sp1

- and exhibits synergistic cytotoxicity with platinum drugs in oxaliplatin-resistant human cervical cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 49310-49321.
- [30] 刘锋. 中华蜜蜂铁代谢相关蛋白及蛋氨酸甲基亚砷还原酶B基因的生物学功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- Liu F. Biological analysis of iron-metabolism protein and methionine sulfoxide reductase B genes in *Apis cerana cerana*[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2015(in Chinese).
- [31] Theisen M, Behringer R R, Cadd G G, *et al*. A C/EBP-binding site in the transferrin promoter is essential for expression in the liver but not the brain of transgenic mice[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(12): 7666-7676.

Cloning and transcriptional regulation of *tf* and *tfr1a* promoters in *Megalobrama amblycephala*

WANG Jixiu, ZHANG Feng, WANG Weimin, LIU Hong*

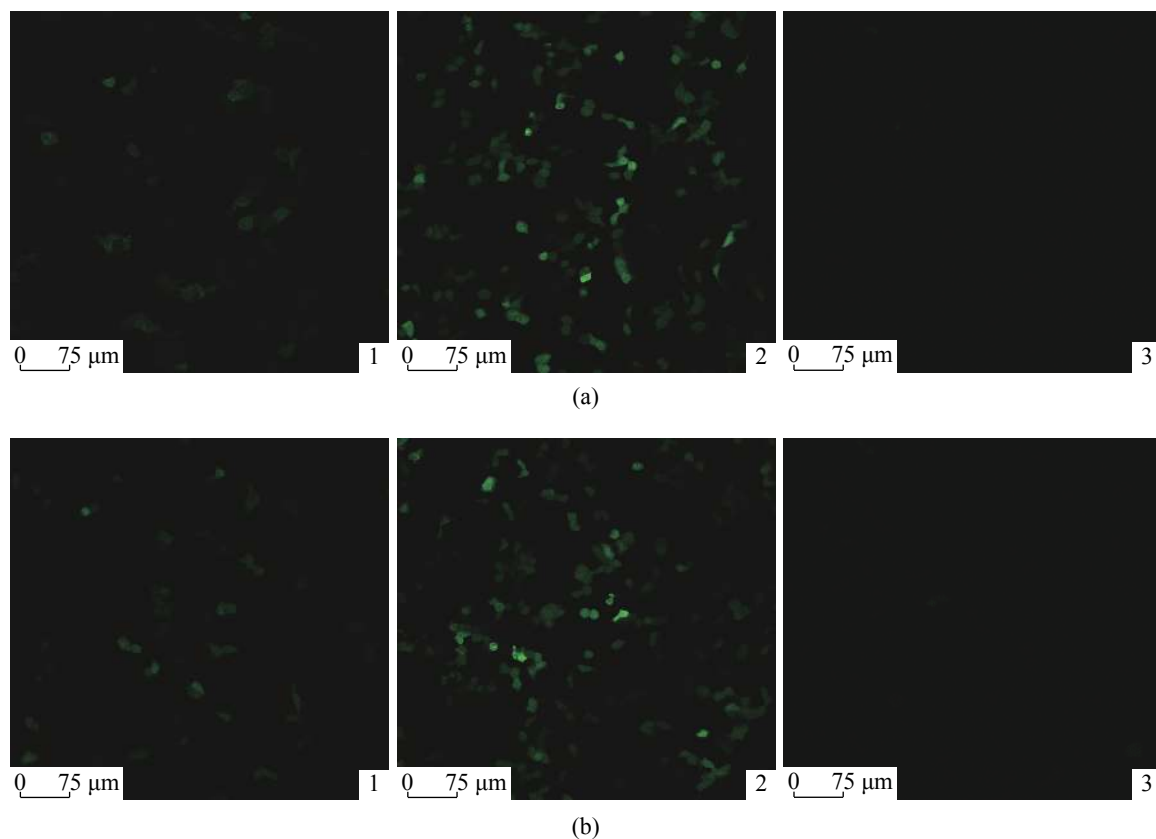
(Key Lab of Freshwater Animal Breeding, College of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to explore the transcriptional regulation mechanism of the *tf* and *tfr1a* genes in *Megalobrama amblycephala*, the genomic sequences of *tf* and *tfr1a* were obtained from whole genome sequence database. Transcription factor binding sites and CpG islands in the promoter regions of *tf* and *tfr1a* genes were predicted by bioinformatics methods. Fragments of different length of the predicted promoter region of *tf* and *tfr1a* were cloned by PCR amplification. The amplified different fragments were ligated to the pGL3-Basic/pEGFP-1 vector. Subsequently, the recombinant plasmids were transiently transfected into Hela cells for fluorescence detection by the Dual-Luciferase Reporter System. Bioinformatics analysis showed that there was no CpG island site in the *tf* promoter, and there were two CpG island sites in the *tfr1a* promoter. A total of 9 *tf* and 10 *tfr1a* recombinant plasmids containing promoter fragments of different lengths were successfully constructed. The detection of Dual-Luciferase Reporter System showed that the core region of the *tf* promoter was -268—+56 bp, and the -1 308—-1 102 bp fragment may have a transcription factor binding site that positively regulates the gene expression. The core region of the *tfr1a* promoter was -224—+48 bp, and the +48—+92 bp region may contain negative regulatory elements that inhibit the transcription of this gene, while the -1 229—-1 219 bp region might contain positive regulatory transcription factor binding sites that promote the *tfr1a* gene expression.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; *tf*; *tfr1a*; promoter; transcriptional regulation

Corresponding author: LIU Hong. E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31572613); Fundamental Research Funds for Innovation Center of Hubei Province (2016ZXPY04)



图版 绿色荧光蛋白EGFP检测 *tf(a)*、*tf1a(b)*在Hela细胞中的表达情况

(a) 1. 实验组pEGFP-TF, 2. 阳性对照pEGFP-N1, 3. 阴性对照pEGFP-1; (b) 1. 实验组pEGFP-TFR, 2. 阳性对照pEGFP-N1, 3. 阴性对照pEGFP-1

Plate Expression of *tf(a)*, *tf1a(b)* with green fluorescent protein EGFP in HeLa cells

(a) 1. target pEGFP-TF vector, 2. pEGFP-N1 vector served as a positive control, 3. pEGFP-1 vector used as a negative control; (b) 1. target pEGFP-TFR vector, 2. pEGFP-N1 vector served as a positive control, 3. pEGFP-1 vector used as a negative control