



## 东北七鳃鳗 *NF-κB* 基因启动子的构建及活性

周泽斌<sup>1,2,3</sup>, 丁少青<sup>1,2,3</sup>, 程沛茹<sup>1,2,3</sup>, 任建峰<sup>1,2,3</sup>, 李伟明<sup>4</sup>, 张庆华<sup>1,2,3\*</sup>

1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;
4. 密歇根州立大学渔业与野生生物系, 密歇根 东兰辛 48824)

**摘要:** 核转录因子 *NF-κB* (nuclear factor kappa B) 对机体的免疫反应、炎症反应等起重要的调控作用。为了获得 *NF-κB* 基因启动子的活性报告基因, 进一步研究原始脊椎动物免疫应答的机制, 实验根据此前克隆得到的东北七鳃鳗 *NF-κB* 基因的编码序列 (coding sequence, CDS), 以与东北七鳃鳗高度同源的日本七鳃鳗同源基因 5' 上游启动子特征序列为模板设计引物, 克隆获得了东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子序列, 该序列全长 3 169 bp, 提交至 NCBI 数据库 GenBank 获得登录号 MN368861。经 AliBaba 2.1 软件预测该序列包含 CREB (cgtgactca)、Oct-1 (aatatgaatt)、GATA-1 (gaacctatct)、AP-1 (ggttgagtca)、NF-kappa B (ctttctgtt)、IRF-1 (tttctgttc)、Sp-1 (tgtgaggggt)、c-Jun (acgtgacttc) 和 c-Fos (ggttgagtca) 等多个转录因子结合位点, 并包含 TATA box 转录核心元件。通过 MethPrimer 软件预测在序列 1 207~1 402 bp 处存在 CG 含量大于 50%, 长 196 bp 的 CpG 岛。利用双酶切技术构建了 pGL3-*NF-κB*-pro 重组质粒, 并将其转染至人胚肾细胞 (human embryonal kidney, HEK 293T) 和鲤上皮瘤细胞 (Epithelioma papulosum cyprinid, EPC) 中。双荧光素酶报告基因系统检测结果显示, 该片段序列在哺乳动物细胞和鱼类细胞中均具有启动子活性, 同时在 HEK293T 中经过 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 的配体 LPS 刺激后, 启动子活性显著上升。本研究成功构建了东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子报告基因, 并在不同细胞中证实了其活性。LPS 刺激后的检测结果揭示东北七鳃鳗 *NF-κB* 参与了 TLR 信号通路的免疫应答。东北七鳃鳗 *NF-κB* 报告基因的构建为探究原始脊椎动物免疫系统信号传导机制奠定了基础。

**关键词:** 东北七鳃鳗; *NF-κB*; 报告基因; 启动子转录活性

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

核因子 kappa B (*NF-κB*) 是一种在所有细胞中广泛存在的重要转录调节因子, 具体是指包含 Rel 同源结构域 (rel homology domain, RHD) 的二聚体<sup>[1]</sup>。经典意义上的 *NF-κB* 家族由 5 种 *NF-κB*/Rel

蛋白组成, 分别为 *NF-κB1* (p50)、*NF-κB2* (p52)、RelA (p65)、RelB 和 c-Rel<sup>[2]</sup>。其中, *NF-κB1* 和 *NF-κB2* 分别由前体蛋白 p105 和 p100 被蛋白酶水解产生<sup>[3]</sup>。细胞在正常状态下, *NF-κB* 与 *NF-κB* 抑制剂 IκB

收稿日期: 2020-01-02 修回日期: 2020-04-08

资助项目: 教育部留学回国人员科研启动基金 (D-8002-15-0042); 中美海洋研究中心基金 (A1-0209-15-0806); 水产动物疾病与基因编辑育种的平台建设和前沿科学研究 (A1-3201-19-3013)

通信作者: 张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

蛋白结合在细胞质中, 处于非激活状态。当外来病原入侵时, I $\kappa$ B 经上游信号传导后磷酸化和泛素化并降解, 不再与 I $\kappa$ B 结合的 NF- $\kappa$ B 被活化, 并以二聚体的形式进入细胞核中调控各种基因的表达<sup>[4-5]</sup>。先前的研究表明, NF- $\kappa$ B 可以调节多种炎症细胞因子、趋化因子和生长因子, 广泛参与到免疫应答过程中<sup>[6-7]</sup>。

七鳃鳗 (*Lampetra* spp.) 作为圆口纲 (Cyclostomata) 动物, 是最古老的脊椎动物类群之一。研究表明, 现存七鳃鳗与 3 亿 6 千万年前其祖先相比变化并不大, 故有活化石之称<sup>[8]</sup>。研究七鳃鳗的免疫系统对探究早期脊椎动物中免疫系统的起源及进化具有重要意义。在先前的研究中, 已在斑马鱼 (*Danio rerio*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 等与七鳃鳗同源性较高的硬骨鱼类中鉴定得到多个 NF- $\kappa$ B 家族成员, 并初步探索了 NF- $\kappa$ B 信号通路的传导机制<sup>[9-11]</sup>。东北七鳃鳗 (*L. morii*) 产自中国辽宁省鸭绿江、辽河流域, 属于七鳃鳗的一种。先前已从东北七鳃鳗中克隆并鉴定得到了含有 Rel 同源结构域的 NF- $\kappa$ B 家族蛋白 CDS 序列 (NCBI 数据库 GenBank 登录号: AYP27512.1)。为探究东北七鳃鳗 NF- $\kappa$ B 信号通路的调控机制, 探索原始脊椎动物免疫系统功能, 实验在 *NF- $\kappa$ B* CDS 序列鉴定前得到了启动子特征序列, 构建了相应的报告基因并验证了启动子活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用东北七鳃鳗取自中国辽宁省丹东市鸭绿江支流, 并暂养于 8 °C 的水环境中, 按照上海海洋大学动物伦理委员会的相关规定 (SHOU-DW-2016-003) 进行。海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、无内毒素质粒小提中量试剂盒、DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根生化科技 (北京) 有限公司。克隆启动子特征序列所用引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。序列扩增所用 TaKaRa LA *Taq*<sup>®</sup> 聚合酶、pMD<sup>™</sup>19-T Vector Cloning Kit 克隆载体试剂盒购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。构建报告基因所用限制性内切酶、T<sub>4</sub> 连接酶购自 NEB (北京) 有限公司。Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 报告基因活性检测试剂盒、Fugene<sup>®</sup> HD 转染试剂购自普洛麦格 (Promega) 公

司。免疫激活剂 Lipopolysaccharide (LPS) 购自上海碧云天生物技术有限公司。配制转染复合物用简单培养基 Opti-MEM 购自 Gibco Life Technologies 公司。实验用鲤上皮瘤细胞 (epithelioma papulosum cyprinid, EPC) 为中国水产科学研究院长江水产研究所惠赠。实验用人胚肾细胞 (human embryonal kidney, HEK293T)、pGL3-Enhancer 报告基因载体及内参质粒 phRL-TK 均由海军军医大学医学免疫学国家重点实验室惠赠。

### 1.2 实验方法

**东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子特征序列分析及引物设计** 根据与东北七鳃鳗高度同源并已完整测序的日本七鳃鳗 (*L. japonica*) 基因组和实验室先前克隆得到的具有 Rel 同源结构域的东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* CDS 序列, 在日本七鳃鳗基因组中, 利用在线软件分析了日本七鳃鳗基因组中同源基因 5' 侧翼序列 ATG 前约 3 200 bp 的启动子特征区域, 其中利用 AliBaba 2.1 软件 (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) 预测转录结合位点。利用 Promoter-2.0 软件 (services.healthtech.dtu.dk/service.php?Promoter-2.0) 预测转录起始位点 (transcription start sites, TSS)。利用 MethPrimer 软件 (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 预测 CpG 岛结构。利用 Primer premier 5.0 软件, 以该启动子特征序列为模板设计引物。利用上述在线软件对以东北七鳃鳗基因组 DNA 为模板克隆得到的 3 169 bp 序列进行启动子特征序列的预测分析。

**东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子克隆** 使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒, 按照试剂盒说明书提取东北七鳃鳗基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 用特异引物 (表 1) 扩增东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子特征序列。扩增体系: TaKaRa LA *Taq* 0.25  $\mu$ L; 10 $\times$ LA *Taq* Buffer II 2.5  $\mu$ L; 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5  $\mu$ L; dNTP Mixture 4  $\mu$ L; 上游引物 NF- $\kappa$ B-Pro-F 1  $\mu$ L; 下游引物 NF- $\kappa$ B-Pro-R 1  $\mu$ L; 模板 DNA 1  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 12.75  $\mu$ L。扩增条件: 预变性 98 °C 3 min; 变性 98 °C 10 s, 退火 58 °C 30 s, 延伸 72 °C 3 min, 循环 35 次; 延伸 72 °C 10 min。将克隆得到的片段按照 pMD<sup>™</sup>19-T Vector Cloning Kit 试剂盒说明书连接到 pMD-19T 载体上。将连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 并筛选阳性克隆及进一步测序。

表 1 本实验所用引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	用途 usage
NF- $\kappa$ B-Pro-F	ACGACTACCATCACCTCTTACACCG	启动子序列扩增 promoter sequence amplification
NF- $\kappa$ B-Pro-R	CTTCGCACTCGTAGCGGAAGCGCAT	启动子序列扩增 promoter sequence amplification
pGL3-NF- $\kappa$ B-Pro-F	CGACGCGTACGACTACCATCACCTCTTACACCG	载体构建 vector construction
pGL3-NF- $\kappa$ B-Pro-R	CCGCTCGAGGCCGCGCAGCTTGGGCTGCTCGTAC	载体构建 vector construction

东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子报告基因构建以测序结果比对正确的启动子特征序列为模板, 按照 pGL3-Enhancer 载体上的多克隆位点设计含 *Mlu* I 和 *Xho* I 限制性内切酶切位点引物(表 1)。用 *Mlu* I 和 *Xho* I 分别对含酶切位点的目的片段和 pGL3-Enhancer 载体双酶切。得到的酶切产物用 T<sub>4</sub> 连接酶, 转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞后筛选阳性克隆, 并进行测序和双酶切鉴定, 得到 pGL3-NF- $\kappa$ B-Pro 报告基因重组质粒。

东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子报告基因活性检测 将成功构建的 pGL3-NF- $\kappa$ B-Pro 报告基因分别转染至汇合度达到 80% 的 24 孔板 HEK293T 和 EPC 细胞中, 以 pRL-TK 质粒作为内参。具体转染体系: 对照组中加入 pGL3-Enhancer 200 ng, pRL-TK 10 ng; 实验组中加入 pGL3-NF- $\kappa$ B-Pro 200 ng, pRL-TK 10 ng。将 Fugene<sup>®</sup> HD 转染试剂以 DNA: 转染试剂=1:3 的比例与转染质粒一起加入 Opti-MEM 配置转染复合物。室温孵育 15 min 后转染至细胞中, 转染 24 h 后用 Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 报告基因活性检测试剂盒配合酶标仪(BioTek, Synergy2) 检测荧光素酶活性。

同时设立 LPS 刺激 HEK293T 细胞的实验组, 将 pGL3-NF- $\kappa$ B-Pro 报告基因转染至汇合度达到 80% 的 24 孔板 HEK293T 细胞中, 以 pRL-TK 质粒为内参, 设计转染体系, 在转染 24 h 后加入 LPS (500 ng/mL) 刺激, 同时对照组加入等量磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 作为对照, 6 h 后检测荧光素酶活性(表 2)。

## 2 结果

### 2.1 东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子特征序列分析

克隆得到的东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子序列全长 3 169 bp, 提交至 NCBI 数据库 GenBank 获

<https://www.china-fishery.cn>

表 2 LPS 刺激下东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子报告基因活性检测转染体系Tab. 2 *L. morii* *NF- $\kappa$ B* promoter reporter gene

transfection system under LPS stimulation ng

转染体系 transfection system	pGL3-Enhancer	pGL3-NF- $\kappa$ B Pro	pRL-TK
1	200	0	10
2 (LPS: 500 ng/mL)	200	0	10
3	0	200	10
4 (LPS: 500 ng/mL)	0	200	10

得登录号 MN368861。经 AliBaba 2.1 软件预测该序列包含 CREB (cgtgactca)、Oct-1 (aatatgaatt)、GATA-1 (gaacctatct)、AP-1 (ggttgagca)、NF-kappa B (ctttcctgtt)、IRF-1 (tttctgttc)、Sp-1 (tgtgagggt)、c-Jun (acgtgacttc) 和 c-Fos (ggttgagca) 等多个转录因子结合位点(图 1), 并包含 TATA box 转录核心元件。通过 MethPrimer 软件预测, 在序列 1 207~1 402 bp 处存在 CG 含量大于 50%, 长 196 bp 的 CpG 岛(图 2)。

### 2.2 东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子报告基因构建

以测序结果比对成功的 *NF- $\kappa$ B* 启动子序列为模板, 用含 *Mlu* I、*Xho* I 限制性内切酶切位点的引物扩增片段。扩增成功后用 *Mlu* I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切目的片段和 pGL3-Enhancer 载体, 并连接(图 3)。将菌液 PCR 初步筛选得到的阳性克隆进行精确测序。最后将测序结果比对一致的阳性质粒用 *Mlu* I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切验证, 双酶切结果显示东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子报告基因构建成功(图 4)。

### 2.3 东北七鳃鳗 *NF- $\kappa$ B* 启动子报告基因活性检测

经双荧光素酶报告基因系统检测, 在 HEK



图 1 在线软件预测到的东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子序列特征

转录因子结合位点用蓝色框与黑色下划线标注; TATA-box 用黑色框标注; 转录起始位点用红色下划线标注

Fig. 1 Predicted transcription factor sequence features in *L. morii* *NF-κB* promoter using online software

Transcription factor binding sites are marked with blue boxes and black underlines; TATA-box is marked with black boxes; transcription start site is marked with red underline



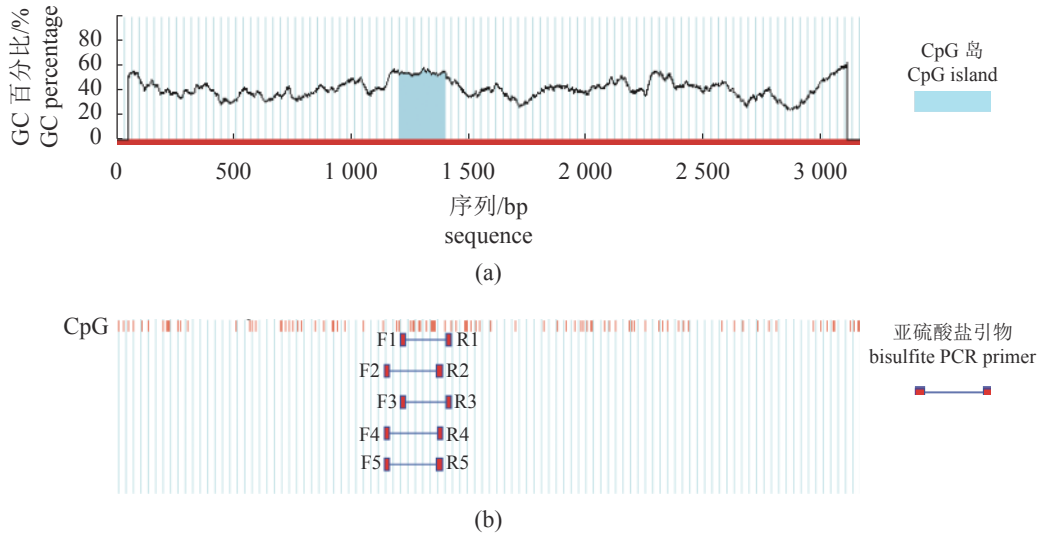


图 2 东北七鳃鳗 NF-κB 启动子 CpG 岛分析

(a) 根据东北七鳃鳗 NF-κB 启动子序列预测得到的 CpG 岛, (b) 根据东北七鳃鳗 NF-κB 启动子序列中的 CpG 区域设计的亚硫酸盐引物

Fig. 2 *L. morii* NF-κB promoter CpG island analysis

(a) CpG island predicted from *L. morii* NF-κB promoter sequence, (b) bisulfite PCR primer designed based on the CpG region in *L. morii* NF-κB promoter sequence

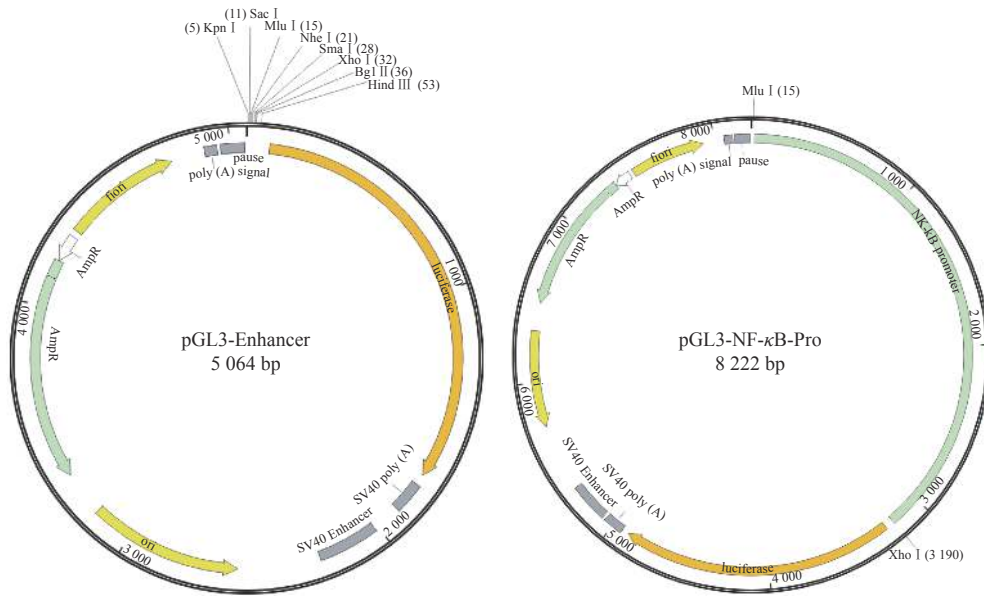


图 3 pGL3-Enhancer(a) 与 pGL3-NF-κB-Pro(b) 重组质粒示意图

Fig. 3 Schematic diagram of pGL3-Enhancer (a) and pGL3-NF-κB-Pro (b) recombinant plasmids

293T 和 EPC 细胞中, pGL3-NF-κB-Pro 转染 24 h 后的荧光素酶活性较对照组 (pGL3-Enhancer) 均有极显著上升 ( $P < 0.001$ ) (图 5)。在 LPS (200 ng/mL) 刺激 HEK293T 细胞后, pGL3-NF-κB-Pro 实验组转染后检测得到的荧光素酶活性较未经 LPS 刺激组有极显著上升 ( $P < 0.001$ )。然而, pGL3-Enhancer

对照组经 LPS (500 ng/mL) 刺激后的荧光素酶活性与不经 LPS 刺激的对照组相比无显著差异 (图 6)。

### 3 讨论

NF-κB 家族蛋白一直是研究高等真核动物细胞中调控基因表达的焦点。在哺乳动物中, 有

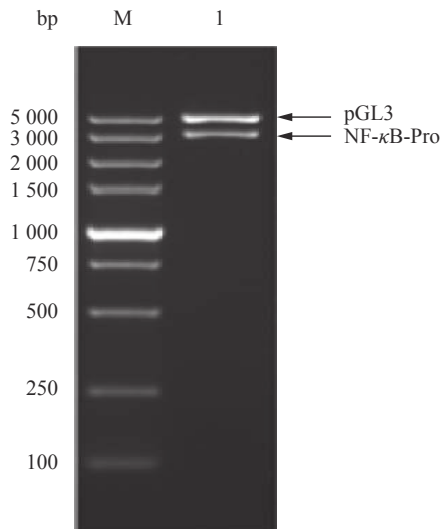


图 4 pGL3-NF-κB-Pro 重组质粒双酶切鉴定

M. DL5000 DNA Marker; 1. 双酶切得到 pGL3 与 NF-κB-Pro 片段

**Fig. 4 pGL3-NF-κB-Pro recombinant plasmid double digestion identification**

M. DL5000 DNA Marker; 1. double digestion of pGL3 and NF-κB-Pro fragment

多个上游信号通路使 IκB 磷酸化并激活 NF-κB 入核表达<sup>[12]</sup>。先前的研究证实 CREB 是 NF-κB 的激活因子<sup>[13]</sup>。AP-1 是 c-Fos 和 c-Jun 的异二聚体。C-Jun 的 N 端蛋白激酶 (JNK) 介导的信号通路主要调控细胞的凋亡过程, NF-κB 信号通路与 JNK 信号通路关系密切。NF-κB 通过延长 JNK 的活化抑制该信号通路中 TNF-α 介导的细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>。此外, AP-1 和 NF-κB 可以同时激活多种抗病诱导剂, 且 NF-κB 调控 AP-1 和 c-Fos 的活性表达<sup>[16]</sup>。Sp1 是体内重要的刺激因子, Sp1 与 NF-κB 的结合是 NF-κB 活化的关键, 失去 Sp1 的结合活性会影响 NF-κB 近端区域和远端区域的装配<sup>[17]</sup>。Oct-1 属于 POU 结构域家族基因, 其蛋白产物能与启动子八聚体基序结合并调控基因表达<sup>[18-19]</sup>。干扰素调控因子-1 (IRF-1) 与 NF-κB 存在一定联系, 研究表明 IRF-1 会抑制 TNF-α 介导的 NF-κB 活性<sup>[20]</sup>。本实验克隆得到的东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子特征序列经预测, 包含以上影响 NF-κB 信号通路的重要分子转录因子结合位点, 揭示了东北七鳃鳗 *NF-κB* 可能存在与经典 NF-κB 相类似的功能。

启动子是转录起始所需的保守序列, 通常在启动子区含有调控转录水平的关键元件。因此, 启动子是调节对应基因表达的关键区域<sup>[21]</sup>。通常情况下, 转录因子通过与启动子上的特定序

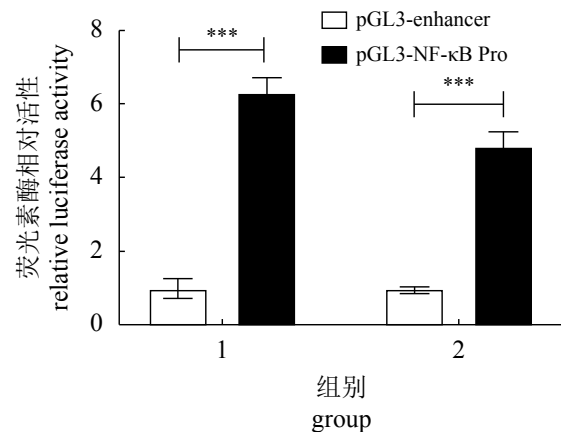


图 5 在 HEK293T 和 EPC 细胞中东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子报告基因活性检测

1. HEK293T 细胞, 2. EPC 细胞; 实验重复 3 次, 误差用 mean±SE 表示; \*\*\*. 差异极显著 ( $P<0.001$ ), 下同

**Fig. 5 *L. morii* NF-κB promoter reporter gene activity in HEK293T cell and EPC cell**

1. HEK293T cell, 2. EPC cell; data were presented as mean ± SE. \*\*\*. extremely significant difference ( $n=3$ ,  $P<0.001$ ), the same below

列 (即转录因子结合位点) 相结合来调控基因的表达。在此基础上, 构建了东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子报告基因重组质粒。pGL3-Enhancer 作为一种报告基因载体, 含有荧光素酶表达序列。实验将东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子目的片段插入到荧光素酶表达序列的前端。双荧光素酶报告基因检测系统即是通过测定荧光素酶与底物反应所产生的荧光强度来检测目的启动子片段的活性<sup>[22]</sup>。经检测, 本实验构建的东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子报告基因在哺乳动物细胞和鱼类细胞中较空载的报告基因载体均具有显著的启动子活性。在之前的研究报告中, 病原刺激物 LPS 能激活 NF-κB 并启动免疫应答<sup>[23]</sup>。同样, 在经过 LPS 刺激后, 东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子报告基因活性显著上升, 这与典型的 NF-κB 的特性相一致。

NF-κB 作为关键转录因子, 可广泛调控细胞凋亡、免疫应答等重要过程。但是 NF-κB 在原始脊椎动物中的功能及其相关的信号传导机制仍有待探究。近几年, 已在日本七鳃鳗中鉴定了经典的 NF-κB 结合蛋白 IκB 及其信号通路上游衔接蛋白 MyD88, 在东北七鳃鳗中也已鉴定出 NF-κB 信号传导通路上游关键接头蛋白 TRAF6, 表明在圆口纲中可能存在保守的 NF-κB 信号传导机制<sup>[24-26]</sup>。本实验构建的东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子报告基因可作为重要工具以探究东北七鳃

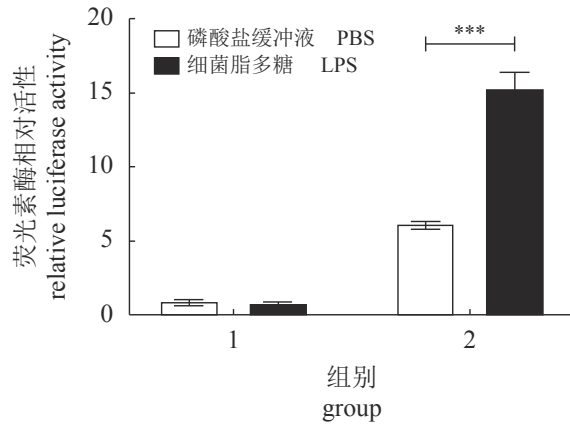


图 6 LPS 刺激 HEK293T 细胞后东北七鳃鳗 *NF-κB* 启动子报告基因活性变化

Fig. 6 Activity change of *L. morii* *NF-κB* promoter reporter gene after LPS stimulation in HEK293T cell

鳗 *NF-κB* 涉及的信号传导机制, 为研究原始脊椎动物免疫应答过程奠定了基础。

本研究实验用鲤上皮瘤细胞为中国水产科学研究院长江水产研究所曾令兵研究员惠赠; 实验用人胚肾细胞、pGL3-Enhancer 报告基因载体及内参质粒 phRL-TK 均由海军军医大学医学免疫学国家重点实验室曹雪涛教授惠赠。特此致谢!

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] O'Dea E, Hoffmann A. The regulatory logic of the *NF-κB* signaling system[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(1): a000216.
- [ 2 ] Finco T S, Baldwin A S. Mechanistic aspects of *NF-κB* regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis[J]. *Immunity*, 1995, 3(3): 263-272.
- [ 3 ] May M J, Ghosh S. Signal transduction through *NF-κB*[J]. *Immunity Today*, 1998, 19(2): 80-88.
- [ 4 ] Hayden M S, Ghosh S. Shared principles in *NF-κB* signaling[J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344-362.
- [ 5 ] Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor *κB* signaling[J]. *Immunological Reviews*, 2006, 210(1): 171-186.
- [ 6 ] Gilmore T D, Wolenski F S. *NF-κB*: where did it come from and why?[J]. *Immunological Reviews*, 2012, 246(1): 14-35.
- [ 7 ] Hayden M S, Ghosh S. *NF-κB* in immunobiology[J]. *Cell Research*, 2011, 21(2): 223-244.
- [ 8 ] Janvier P. Palaeontology: modern look for ancient lamprey[J]. *Nature*, 2006, 443(7114): 921-924.
- [ 9 ] Correa R G, Tergaonkar V, Ng J K, et al. Characterization of *NF-κB/IκB* proteins in zebra fish and their involvement in notochord development[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(12): 5257-5268.
- [10] Kong H J, Moon J H, Moon J Y, et al. Cloning and functional characterization of the p65 subunit of *NF-κB* from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 406-411.
- [11] Wang H Z, Zhu Y L, Xu X W, et al. *Ctenopharyngodon idella* *NF-κB* subunit p65 modulates the transcription of *IκBa* in CIK cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 564-572.
- [12] Thanos D, Maniatis T. *NF-κB*: a lesson in family values[J]. *Cell*, 1995, 80(4): 529-532.
- [13] Gerritsen M E, Williams A J, Neish A S, et al. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(7): 2927-2932.
- [14] Karin M, Lin A N. *NF-κB* at the crossroads of life and death[J]. *Nature Immunology*, 2002, 3(3): 221-227.
- [15] De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, et al. Induction of *gadd45β* by *NF-κB* downregulates pro-apoptotic JNK signalling[J]. *Nature*, 2001, 414(6861): 308-313.
- [16] Fujioka S, Niu J G, Schmidt C, et al. *NF-κB* and AP-1 connection: mechanism of *NF-κB*-dependent regulation of AP-1 activity[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(17): 7806-7809.
- [17] Ping D S, Boekhoudt G, Zhang F P, et al. Sp1 binding is critical for promoter assembly and activation of the *MCP-1* gene by tumor necrosis factor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(3): 1708-1714.
- [18] Rosenfeld M G. POU-domain transcription factors: powerful developmental regulators[J]. *Genes & Development*, 1991, 5(6): 897-907.
- [19] Verrijzer C P, Van Der Vliet P C. POU domain transcription factors[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1993, 1173(1): 1-

- 21.
- [20] Suk K, Chang I, Kim YH, *et al.* Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and tumor necrosis factor  $\alpha$  synergism in ME-180 cervical cancer cell apoptosis and necrosis IFN $\gamma$  inhibits cytoprotective NF- $\kappa$ B through STAT1/IRF-1 pathways[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(16): 13153-13159.
- [21] Das G, Hinkley C S, Herr W. Basal promoter elements as a selective determinant of transcriptional activator function[J]. *Nature*, 1995, 374(6523): 657-660.
- [22] Grentzmann G, Ingram J A, Kelly P J, *et al.* A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals[J]. *RNA (New York, N. Y.)*, 1998, 4(4): 479-486.
- [23] Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes[J]. *Cellular Signalling*, 2001, 13(2): 85-94.
- [24] Su P, Liu X, Han Y L, Zheng Z, *et al.* Identification and characterization of a novel *IκB-ε-like* gene from Lamprey (*Lampetra japonica*) with a role in immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(4): 1146-1154.
- [25] 赵春晖, 赵培哲, 刘欣, 等. 七鳃鳗 *myd88* 基因的生物学特性及其下游分子的表达模式分析[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(4): 690-697.
- Zhao C H, Zhao P Z, Liu X, *et al.* The cloning and biological characteristics of *myd88* in lamprey and the expression pattern of its downstream proteins[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(4): 690-697(in Chinese).
- [26] 丁少青, 周泽斌, 王雅倩, 等. 东北七鳃鳗 *TRAF6* 基因克隆、表达分析及亚细胞定位[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(1): 9-16.
- Ding S Q, Zhou Z B, Wang Y Q, *et al.* Molecular cloning, expression analysis and subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in Korean Lamprey, *Lethenteron morii*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(1): 9-16(in Chinese).



## Construction and activity of *NF- $\kappa$ B* promoter reporter in *Lampetra morii*

ZHOU Zebin<sup>1,2,3</sup>, DING Shaoqing<sup>1,2,3</sup>, CHENG Peiru<sup>1,2,3</sup>, REN Jianfeng<sup>1,2,3</sup>,  
LI Weiming<sup>4</sup>, ZHANG Qinghua<sup>1,2,3\*</sup>

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, East Lansing 48824, USA)

**Abstract:** Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) plays an important role in regulating immune response and inflammation. In order to obtain the *NF- $\kappa$ B* promoter reporter gene and further study the mechanism of the immune response in primitive vertebrates, based on the CDS sequence of the *NF- $\kappa$ B* gene previously cloned from *Lampetra morii*, we obtained the *L. morii* *NF- $\kappa$ B* promoter sequence by using the 5' upstream promoter characteristic sequence of the *NF- $\kappa$ B* from *L. japonica*, which is highly homologous to *L. morii*, as a template to design primers. The cloned *NF- $\kappa$ B* promoter sequence from *L. morii* was 3 169 bp, which was submitted to NCBI Genbank to obtain accession number MN368861. The sequence is predicted by AliBaba2.1 software to include CREB (cgtgactca), Oct-1 (aatatgaatt), GATA-1 (gaacctatct), AP-1 (ggttgagtca), NF-kappa B (ctttctctgtt), IRF-1 (tttctctgttc), Sp-1 (tgtgaggggt), c-Jun (acgtgacttc), c-Fos (ggttgagtca) and many other transcription factor binding sites, and contains TATA box transcription core elements. The MethPrimer software predicts that there are CpG islands with a CG content greater than 50% and a length of 196 bp at the 1 207-1 402 bp sequence. pGL3-NF- $\kappa$ B-pro recombinant plasmid was constructed by double digestion technology and transfected into human embryonal kidney (HEK293T) cell and epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cell. The results of double luciferase reporter gene system assay showed that the fragment sequence had promoter activity in both mammalian cell lines and fish cell lines, while the promoter activity increased significantly after Toll-like receptors (TLR) ligands LPS stimulation in HEK293T cell. In this study, the *NF- $\kappa$ B* reporter gene of *L. morii* was successfully constructed, and its activity was confirmed in different cell lines. The results showed that NF- $\kappa$ B is involved in the immune response of TLR signaling pathway after LPS stimulation in *L. morii*. The construction of the *NF- $\kappa$ B* reporter gene of *L. morii* laid a foundation for exploring the signaling mechanism of the primitive vertebrate immune system.

**Key words:** *Lampetra morii*; *NF- $\kappa$ B*; reporter gene; promoter activity

**Corresponding author:** ZHANG Qinghua. E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

**Funding projects:** Ministry of Education Overseas Returnees Research Fund (D-8002-15-0042); China-US Ocean Research Center Fund (A1-0209-15-0806); Construction Platform of Aquatic Animal Diseases and Gene Editing Breeding and Cutting-Edge Scientific Research (A1-3201-19-3013)