

陈 哲,雷明明,于建宁,等. 猪 *RELM β* 基因启动子区克隆及序列分析[J]. 江苏农业学报,2015,31(5):1060-1064.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.018

猪 *RELM β* 基因启动子区克隆及序列分析

陈 哲, 雷明明, 于建宁, 王公金, 施振旦

(江苏省农业科学院畜牧研究所,动物品种改良与繁育重点实验室,江苏 南京 210014)

摘要: 本研究旨在分析猪 *RELM β* 基因启动子结构,初步探索 *RELM β* 基因表达调控机制。通过 PCR 方法扩增 *RELM β* 基因的系列启动子缺失片段并分别克隆到荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-Enhancer 中,经酶切、测序和生物信息学分析,构建包含 *RELM β* 启动子系列截短的荧光素酶报告基因重组质粒,脂质体转染至 HT29 和 293T 细胞,应用双荧光素酶活性检测系统检测启动子活性。试验获得了猪 *RELM β* 基因约 1 kb 的启动子序列,序列比对发现猪和人物种间相似性仅 34.9%,猪和小鼠的同源性是 82.4%。生物信息学分析预测猪 *RELM β* 基因转录起始位点在-556 bp 处,猪和人 *RELM β* 基因启动子存在系列保守的转录因子结合位点,包括 Cdx2、SRY、NFkB、NKX-2、c-Myb、GATA-1、GATA-3、C/EBP、MZF1 等。细胞检测结果显示,pGL-*RELM β* (-574~+215) 活性最强,推测在-574~-182 bp 位点之间存在 *RELM β* 基因启动子的关键顺式调控元件,这一区域发现 SRY、Cdx2、GATA-1 和 MZF1 等关键转录因子结合位点。

关键词: 猪; 抵抗素样 β 基因; 启动子

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)05-1060-05

Cloning and sequence analysis of promoter region of porcine *RELM β* gene

CHEN Zhe, LEI Ming-ming, YU Jian-ning, WANG Gong-jin, SHI Zhen-dan

(Key Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The aim of this study was to identify the promoter structure of porcine *RELM β* gene, and investigate its transcriptional regulation mechanism. The deletion fragments of porcine *RELM β* gene promoter region were amplified by PCR method, cloned into pGL3-Enhancer plasmid by digestion, sequencing and bioinformatics analysis, and transfected into HT29 and 293T cells. The promoter activities were determined by dual-luciferase assay system. An approximate 1 kb promoter sequence was acquired and the homologies were 34.9% and 82.4% to *RELM β* gene of human and mouse, respectively. Bioinformatics analysis found a potential transcription start site located at -556 bp, and the conservative transcription factor binding sites in pig and human *RELM β* gene included Cdx2, SRY, NFkB, NKX-2, c-Myb, GATA-1, GATA-3, C/EBP and MZF1. pGL-*RELM β* (-574~+215) exhibited the maximal promoter activities, suggesting the region of -574~-182 bp contained the key cis-regulatory elements. Further bioinformatics analysis found some key transcription factor binding sites, including SRY, Cdx2, GATA-1 and MZF1.

Key words: swine; *RELM β* ; promoter

收稿日期:2015-02-12

基金项目:江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(12)5010];江苏省自然科学基金项目(BK20140753);转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08006-004)

作者简介:陈 哲(1982-),男,山东泰安人,博士,助理研究员,主要从事动物遗传育种研究。(Tel)025-84390341;(E-mail)chenzzju@163.com

通讯作者:施振旦,(Tel)025-84390956;(E-mail)zdshi@mail.jaas.ac.cn

抵抗素样 β (Resistin-like molecule β , *RELM β*) 是

抵抗素样家族 (Resistin-like molecules, *RELMs*) 一员, *RELMs* 共有 4 个成员, 分别是 *RELMα*、*RELMβ*、*resistin* 和 *RELMγ*, 该家族成员在 C 端信号区内含有独特的 10 到 11 个半保守的半胱氨酸残基, 可通过二硫键形成低聚分子^[1]。*RELMs* 在糖尿病、炎症反应、免疫反应和细胞增殖方面都有相关作用^[2]。*RELMβ* 又称发现于炎症带 2 (Found in inflammatory zone 2, *FIZZ2*), 最初是在啮齿类和人类的胃肠道发现, 在近端和远端结肠表达量最为丰富^[3]。

研究发现, *RELMβ* 可由肠道杯状细胞产生, 并作为 Th2 细胞因子诱导的免疫效应因子, 参与胃肠道感染的耐受^[4]。*RELMβ* 可以通过依赖 IL-4 (Interleukin 4) 和 IL-13 的调控途径产生抗寄生虫作用^[5], 同时还可直接与寄生虫的化学感受部位结合, 干扰寄生虫营养供给, 起到蠕虫抑制剂的作用^[6]。此外, *RELMβ* 还可以通过上调肠道先天免疫因子 *MUC2* 的转录水平和蛋白表达水平, 保护肠道粘膜屏障的完整性^[7]。*RELMβ* 作为一个免疫相关的重要候选基因, 对畜禽健康具有重要意义。

目前对 *RELMβ* 的功能有了较为广泛的研究, 但其表达调控机制尚不十分清晰。本研究利用荧光素酶报告基因系统, 对猪 *RELMβ* 基因启动子进行结构和活性分析, 找到 *RELMβ* 基因启动子的核心调控区域, 为进一步研究猪 *RELMβ* 基因表达调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

Premix Taq 酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker、内切酶、琼脂糖回收纯化试剂盒、小提质粒提取试剂盒、中提质粒提取试剂盒购自宝生物(大连)有限公司, 克隆所用菌株 DH5α 为本实验室保存, pGL3-

basic、pGL3-Enhancer、pRL-Tk 载体和双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司, 人胚肾细胞株 293T、人结肠腺癌细胞株 HT29 购自凯基生物(南京), Lipo LTX、Opti-MEM、DMEM 培养基、胎牛血清购自 Invitrogen 公司, 引物合成及 DNA 测序由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 生物信息学分析 使用 GPMiner (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测 *RELMβ* 基因 5' 端转录起始位点 TSS; 使用 TF-SEARCH 在线软件 (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 和 Genomatix MatInspector (<http://www.genomatix.de/cgi-bin>) 对潜在转录因子结合位点进行预测; 使用 NCBI 网站 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 序列分析软件对猪、人 (NCBI 登录号: NT_005612) 和小鼠 (NCBI 登录号: NT_039624) 启动子序列进行多重比对, 比较同源性; 使用 Primer6.0 软件里的 Motif 模块进行 TATA-box (识别序列 TATAWAW, W 代表 A 或 T)、CAAT-box (识别序列 CCAAT) 和 GC-box (识别序列 GGGCGG) 位点预测。

1.2.2 引物设计和 PCR 根据 GenBank 获得的人 *RELMβ* 基因 (登录号: NT_005612) 序列以及猪 *RELMβ* 基因 mRNA 序列 (登录号: NM_001103210), 结合引物设计原则, 采用 Primer 6.0 软件自行设计 6 对 PCR 引物序列 (表 1), 并在上下游引物引入 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切位点。在 0.2 ml PCR 反应管中加入 Premix Taq 12.5 μl, DNA 模板 1 μl, 上下游引物各 1 μl, 无菌去离子水 9.5 μl。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 36 次, 最后产物在 72 °C 延伸 10 min。

表 1 扩增 *RELMβ* 基因启动子片段引物

Table 1 Primers designed for amplifying promoter segments of porcine *RELMβ* gene

引物	序列 (5'→3')	目的片段大小 (bp)
RF1 (-842 ~ +215)	CTAGCTAGCGAAGCTTATGACCATGAGGAC	1 048
RF2 (-793 ~ +215)	CTAGCTAGCGATGAAGAGCCACTGAAC	1 017
RF3 (-574 ~ +215)	CTAGCTAGCAAATATGGCCCTAACTCAAC	798
RF4 (-182 ~ +215)	CTAGCTAGCCTCCCGATTCTCAAAAC	406
RF5 (-147 ~ +215)	CTAGCTAGCGCTCCTCCATTCTGACAC	371
RF6 (-86 ~ +215)	CTAGCTAGCTCTTTCCTTCCAGCAAC	310
RR	CCGCTCGAGATAATCAGACTGCTCAC	

下划线表示酶切位点和保护碱基。

1.2.3 报告基因载体构建 将 PCR 反应获得的不同长度启动子片段纯化,经 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切、凝胶回收、T4 DNA 连接酶连接后,定向克隆到报告基因载体 pGL3-Enhancer 中,利用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切和测序方法,筛选构建正确的重组猪 *RELMβ* 基因启动子荧光素酶报告质粒。

1.2.4 细胞培养和瞬时转染试验 用含有 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/ml)和链霉素(100 U/ml)的 DMEM 培养基,37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱内培养胚肾 293T 细胞、人结肠腺癌细胞 HT29,0.25% 胰酶消化液消化传代,每 2 d 传代 1 次。

接种 293T、HT29 细胞于 96 孔板,当细胞生长至汇合率 70% ~ 80% 时,将构建的 pGL-*RELMβ*-Enhancer 系列缺失片段荧光素酶报告载体采用脂质体 Lipo LTX 转染到以上细胞内,作为试验组,同时转染 pGL3-basic 为阴性对照组, pRL-TK 为内参质粒,试验重复 3 次,每组 3 个平行试验。基因瞬时转染参照 Lipofectamine LTX 试剂盒说明书进行。

1.2.5 双荧光素酶活性分析 转染 24 h 后,收集细胞,加入 30 μl 细胞裂解缓冲液,室温摇晃 15 min 后,吹打细胞,收集裂解液至 96 孔白板,加入 100 μl 荧光素酶分析剂(LAR II),放置发光检测仪 Glomax (Promega)中,测定 Firefly 荧光素酶活性(*M1*),然后再加入 100 μl Stop & Glo reagent,测定内参质粒中 Renilla 荧光素酶活性(*M2*),计算荧光素酶相对活性(*M1/M2*)。

1.2.6 数据统计分析 不同缺失片段启动子活性值之间的比较在 Excel 中进行,统计方法使用 *t* 检验。

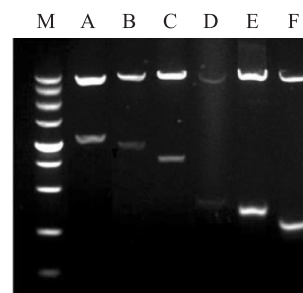
2 结果

2.1 猪 *RELMβ* 基因启动子系列缺失片段的扩增

通过 PCR 分别得到 1 057 bp (-842 ~ +215)、1 008 bp (-793 ~ +215)、789 bp (-574 ~ +215)、397 bp (-182 ~ +215)、362 bp (-147 ~ +215) 和 301 bp (-86 ~ +215) 的启动子片段。PCR 产物经凝胶电泳检测显示扩增长度符合预期,重组报告载体经过 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切和 DNA 测序验证,不同长度 *RELMβ* 启动子报告基因载体构建成功(图 1)。

2.2 猪 *RELMβ* 基因启动子序列生物信息学分析

对猪 *RELMβ* 基因 5' 端序列进行在线生物信息学分析发现,猪 *RELMβ* 基因启动子区存在 1 处 TA-



M:DL5000; A:1 057 bp; B:1 008 bp; C:789 bp; D:397 bp; E:362 bp; F:301 bp。

图 1 重组 *RELMβ* 基因报告载体双酶切鉴定

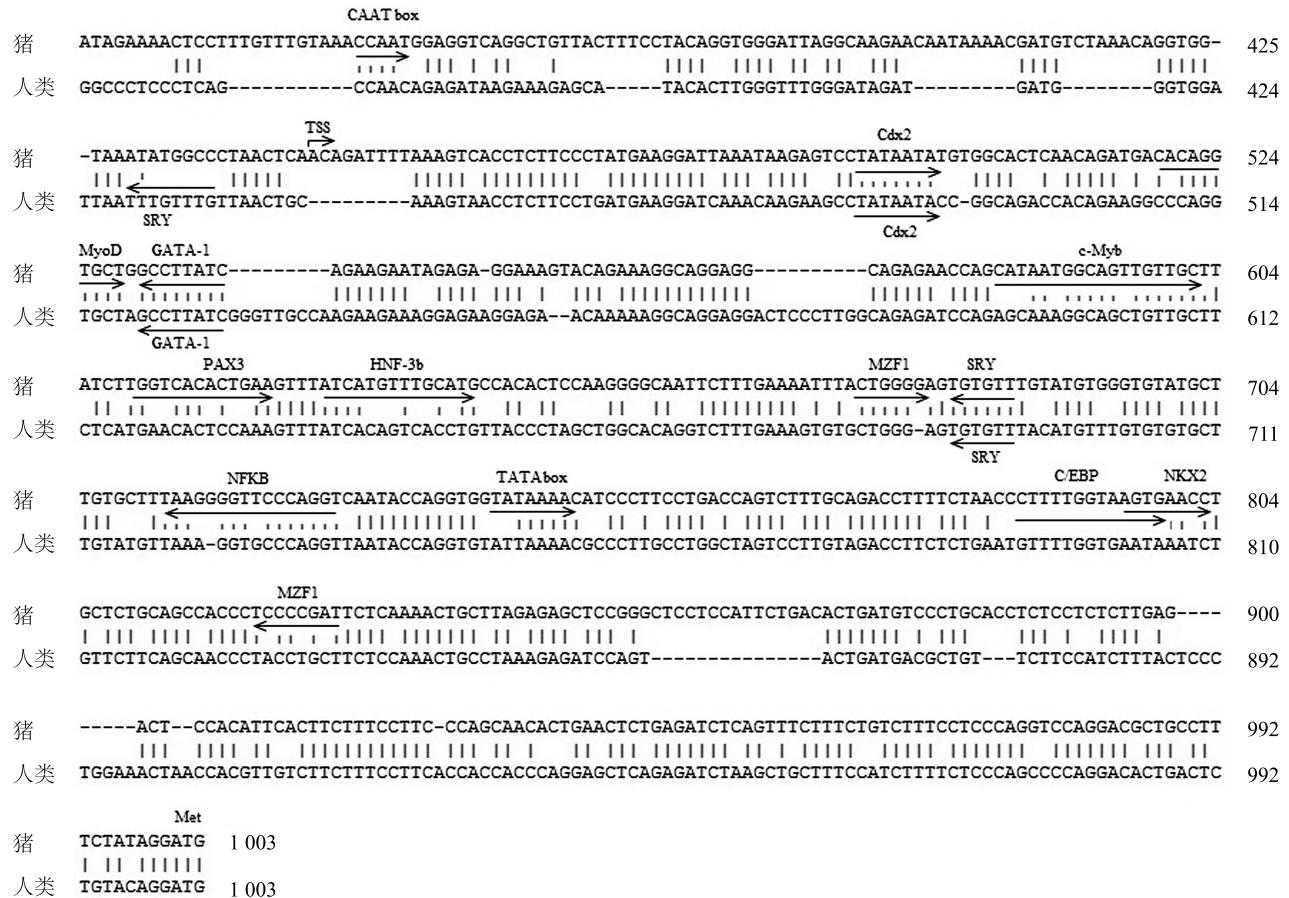
Fig. 1 Identification of recombinant *RELMβ* gene report plasmid by double enzyme digestion

TA box, 1 处 CAAT box, 无 GC box。GPMiner 在线分析预测猪和人 *RELMβ* 基因转录起始位点在 -556 bp 和 -487 bp 处。截取猪、人 (NCBI 登录号: NT_005612)、小鼠 (NCBI 登录号: NT_039624) 的 *RELMβ* 基因起始密码子前 842 bp 启动子序列进行多重比对发现,猪和人的同源性是 34.9%,猪和小鼠的同源性是 82.4%。

尽管猪和人之间 *RELMβ* 基因启动子序列保守性较低,结合 TFSEARCH 和 Genomatix MatInspector 预测猪 *RELMβ* 基因启动子转录因子结合位点,比较发现,猪和人 *RELMβ* 基因启动子区还是存在许多保守的潜在转录因子结合位点,包括 Cdx2, SRY, NFkB, NKX-2, c-Myb, GATA-1, GATA-3, C/EBP, MZF 等(图 2)。

2.3 猪 *RELMβ* 基因启动子活性分析

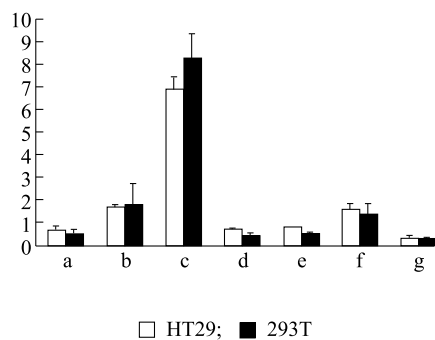
将构建的 pGL-*RELMβ* (-842 ~ +215)、pGL-*RELMβ* (-793 ~ +215)、pGL-*RELMβ* (-574 ~ +215)、pGL-*RELMβ* (-182 ~ +215)、pGL-*RELMβ* (-147 ~ +215) 和 pGL-*RELMβ* (-86 ~ +215) 启动子报告载体分别转染至 HT29 和 293T 细胞,双荧光素酶报告基因检测结果表明:不同长度 *RELMβ* 启动子在 HT29 和 293T 细胞均具有活性,且在 2 个细胞系中, pGL-*RELMβ* (-574 ~ +215) 活性均为最强,显著高于其他报告质粒的活性 ($P < 0.01$)。从 pGL-*RELMβ* (-574 ~ +215) 到 pGL-*RELMβ* (-182 ~ +215) 的相对荧光值下降幅度最大,推测在 -574 ~ -182 位点存在 *RELMβ* 基因启动子的关键顺式调控元件(图 3)。



直角箭头表示猪 *RELMβ* 基因转录起始位点;黑色箭头指示潜在转录因子结合位点和方向。

图2 猪和人 *RELMβ* 基因启动子序列比较分析

Fig. 2 Alignment of *RELMβ* gene promoter sequence of swine and human



a: pGL-*RELMβ* (-842 ~ +215); b: pGL-*RELMβ* (-793 ~ +215);
c: pGL-*RELMβ* (-574 ~ +215); d: pGL-*RELMβ* (-182 ~ +215);
e: pGL-*RELMβ* (-147 ~ +215); f: pGL-*RELMβ* (-86 ~ +215);
g: pGL3-basic。

图3 *RELMβ* 基因启动子不同片段在细胞系内的相对荧光素酶活性

Fig. 3 Activities of different segments of *RELMβ* promoter in HT29 and 293T cells

3 讨论

肠道是能量摄取和营养吸收器官,也是重要的内分泌器官,*RELMβ* 参与肠道内葡萄糖转运、胰岛素抵抗等生理功能。*RELMβ* 通过 GLUT2 表达量和活性的增强提高空肠内葡萄糖的吸收^[8];小鼠试验发现 *RELMβ* 基因可能是营养因素诱导的胰岛素抵抗行为的重要调节因子^[9],进一步的研究结果表明,*RELMβ* 可能通过 P38/MAPK 途径参与胰岛素信号通路^[10]。目前 *RELMβ* 已成为研究肠道疾患和评估肥胖型胰岛素抵抗的新靶标^[10-11]。

为探讨 *RELMβ* 基因转录调控机制,本研究通过 PCR 方法从猪 DNA 获得 *RELMβ* 基因上游 -842 ~ +215 bp 的启动子序列,进而构建了不同长度的 *RELMβ* 启动子重组报告质粒,发现 -574 ~ +215 bp 活性最强,在 -574 ~ -182 bp 区域存在 *RELMβ* 基因启动子的关键顺式调控元件,TFSEARCH 和 Genomatix Mat Inspector

软件分析这一区域(匹配率参数分别设为 90 和 0.9),发现 SRY、Cdx2、GATA-1 和 MZF1 匹配率较高。性别决定转录因子(*SRY*)是一类含有 HMG-box DNA 结合区的转录因子,在睾丸特异性表达,在肠道组织的表达还未发现,因此本研究得到的 *SRY* 结合位点可能是同样含有 HMG-box DNA 结合区的类 *SRY* 基因,又称 *SOX* 基因,Rath 等研究 *SMP30* 基因(在肝细胞和肾小管上皮细胞特异性表达)启动子区活性也发现相似的现象^[12]。*SOX* 基因是一类与发育相关的基因,部分 *SOX* 基因(如 *SOX17*)可以通过 Wnt 信号通路抑制与结肠癌细胞的生长与分裂有关的靶基因表达^[13]。尾型同源盒转录因子 2(*Cdx2*)仅在成体肠道中表达,是肠特异性转录因子,在肠上皮发育以及肠表型分化和维持中起到重要作用^[14],研究还发现,Cdx2 可以特异性结合于黏液蛋白因子 MUC2 的启动子,提高 MUC2 的表达水平^[15]。郑丽端等在人 *RELMβ* 基因启动子区发现核心调控元件 Cdx2 能显著增强启动子活性^[11],进一步证明 Cdx2 在调控哺乳动物 *RELMβ* 基因启动子活性中起到重要作用。髓样锌指蛋白 1(MZF-1)通过调节蛋白激酶 *C-α* 的转录活性参与细胞的增殖、分化、转化和凋亡^[16],Chelbi 等研究发现 MZF-1 是 *SERPINA3* 基因启动子转录激活过程不可缺少的转录因子,MZF-1 结合在 *SERPINA3* 基因启动子区结合位点可以激活其抗菌防御作用^[17]。GATA 家族是一类含锌指结构的转录调节因子,在胚胎发育时期能促进胃肠道的正常发育,并有助于在成年肠上皮细胞的不断更新中调节组织分化,在体内,GATA-1 和 c-Myb 的相互作用会抑制 GATA-1 与 DNA 的结合,转录因子 GATA-1 和 c-Myb 相互抑制各自的转录活性^[18],本研究中猪 *RELMβ* 基因启动子区包含 GATA-1 和 c-Myb 结合位点,说明 GATA-1 和 c-Myb 很有可能参与了 *RELMβ* 基因的转录调控。

猪和人 *RELMβ* 基因启动子区都存在 CdxA, SRY, NFκB, NKX-2, c-Myb, GATA-1, GATA-3, C/EBP, MZF1 等转录因子结合位点,说明抵抗素样家族的转录调控模式在进化上有保守性。下一步工作将通过定点突变和缺失等方法进一步探究 *RELMβ* 基因的核心启动子及其转录活性受哪些转录因子影响。

参考文献:

- [1] BANERJEE R R, LAZAR M A. Resistin: molecular history and prognosis [J]. J Mol Med, 2003, 81(4): 218-226.
- [2] 蔡嘉斌,郑丽端,童强松. *RELMs* 家族及其生物学功能研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2008(10): 2068-2071.
- [3] STEPPAN C M, BAILEY S T, BHAT S, et al. The hormone resistin links obesity and diabetes [J]. Nature, 2001, 409(6818): 307-312.
- [4] ARTIS D, WANG M L, KEILBAUGH S A, et al. RELMβ/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract [J]. PNAS, 2004, 101(37): 13596-13600.
- [5] HEBERT D R, YANG J Q, HOGAN S P, et al. Intestinal epithelial cell secretion of RELM-β protects against gastrointestinal worm infection [J]. J Exp Med, 2009, 206(13): 2947-2957.
- [6] DANN S M, ECKMANN L. Innate immune defenses in the intestinal tract [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2007, 23(2): 115-120.
- [7] KRIMI R B, KOTELEVETS L, DUBUQUOY L, et al. Resistin-like β molecule regulates intestinal mucous secretion and curtails TNBS-induced colitis in mice [J]. Inflamm Bowel Dis, 2008, 14(7): 931-941.
- [8] KRIMI R B, LETTERON P, CHEDID P, et al. Resistin-like molecule-β inhibits SGLT-1 activity and enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport [J]. Diabetes, 2009, 58(9): 2032-2038.
- [9] FUJIO J, KUSHIYAMA A, SAKODA H, et al. Regulation of gut-derived resistin-like molecule β expression by nutrients [J]. Diabetes Res Clin Pr, 2008, 79: 2-10.
- [10] KUSHIYAMA A, SHOJIMA N, OGIHARA T, et al. Resistin-like molecule β activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes, and induces diabetes, hyperlipidemia, and fatty liver in transgenic mice on a high fat diet [J]. J Biol Chem, 2005, 280(51): 42016-25.
- [11] 郑丽端,童强松,杨渝珍,等. 人类 *RELM-β* 基因启动子的结构与功能分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(7): 548-553.
- [12] RATH B, PANDEY R S, DEBATA P, et al. Molecular characterization of senescence marker protein-30 gene promoter: Identification of repressor elements and functional nuclear factor binding sites [J]. BMC Mol Biol, 2008, 9: 43.
- [13] KATO H. Expression of human *SOX7* in normal tissues and tumors [J]. Int J Mol Med, 2002, 9: 363-368.
- [14] COLLEYPRIEST B J, FARRANT J M, SLACK J M, et al. The role of Cdx2 in barrett's metaplasia [J]. Biochem Soc Trans, 2010, 38: 364-369.
- [15] YAMAMOTO H, BAI Y Q, YUASA Y. Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 300(4): 813-818.
- [16] HSIEH Y H, LIU J Y. Suppression of tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cells by antisense oligonucleotide MZF-1 [J]. Chin J Physiol, 2007, 50(1): 217-225.
- [17] CHELBI S T, WILSON M, VEILLARD A C, et al. Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control *SERPINA3* expression and its association with placental diseases [J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(9): 1968-1978.
- [18] ANDERSON M K. At the crossroads: diverse roles of early thymocyte transcriptional regulators [J]. Immunol Rev, 2006, 209(1): 191-211.

(责任编辑:陈海霞)