

庞春英, 陆杏蓉, 朱 鹏, 等. 水牛透明带 3 基因启动子克隆及转录活性检测[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1350-1356.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.024

水牛透明带 3 基因启动子克隆及转录活性检测

庞春英, 陆杏蓉, 朱 鹏, 邓廷贤, 段安琴, 陈明棠, 杨炳壮, 梁贤威
(中国农业科学院广西水牛研究所广西水牛遗传繁育重点实验室, 广西 南宁 530001)

摘要: 为了阐明水牛透明带 3 基因(*ZP3*)表达调控机理, 通过 PCR 技术、载体构建和细胞转染等技术, 对其转录活性进行了研究。结果表明: 成功克隆得到广西本地水牛 *ZP3* 基因 5'侧翼序列及部分编码区序列(CDS)区序列, 共 3 081 bp; 广西本地水牛 *ZP3* 核苷酸序列与河流型水牛、黄牛、绵羊和山羊的相似性分别为 99%、96%、92% 和 92%; 在 *ZP3* 翻译起始位点上游 -147 bp 至 -196 bp 处存在 TATA box, 启动子区存在 *GATAs*、*Foxo3*、*Nobox*、*Stat3*、*Stat4*、*Stat5a*、*Stat5b*、*Stat6* 和 *YY1* 等反式作用因子结合位点, 其中 *Stats* 家族在 *ZP3* 启动子区存在多个结合位点, 且同一位点又存在多个 *Stats* 结合的情况; 水牛 *ZP3* 启动子不能启动绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)在 HEK-293T 细胞中的表达, 但能启动其在 CHO 细胞中的表达, 且启动子活性比 CMV 启动子弱。

关键词: 水牛; *ZP3* 基因; 克隆分析; 转录活性

中图分类号: S823.8⁺3.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)06-1350-07

Cloning and transcriptional activity of promoter of buffalo zone pellucida 3 (*ZP3*) gene

PANG Chun-ying, LU Xing-rong, ZHU Peng, DENG Ting-xian, DUAN An-qin, CHEN Ming-tang, YANG Bing-zhuang, LIANG Xian-wei

(Guangxi Buffalo Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science/Guangxi Key Laboratory of Buffalo Genetics, Breeding and Reproduction, Nanning 530001, China)

Abstract: To identify the expression mechanism of buffalo zone pellucida 3 gene (*ZP3*), PCR, vector construction and cell transfection were applied to clone the gene and study its transcriptional activity. 3 081 bp *ZP3* gene 5' flanking and partial coding region sequence (CDS) of Guangxi local swamp buffalo was successfully cloned and sequenced. The nucleotide sequence of *ZP3* gene shared 99%, 96%, 92% and 92% similarities with those of river type buffalo, cattle, sheep and goat, respectively. There existed a TATA box in the location of -147 bp to -196 bp from the upstream of the translation initiation site and trans-acting factor binding sites for *GATAs*, *Foxo3*, *Nobox*, *Stat3*, *Stat4*, *Stat5a*, *Stat5b*, *Stat6* and *YY1*. Multiple binding sites were presented in the promoter region of *ZP3* gene for *Stats* family genes, and multiple *Stats* were

binding together in the same site of *ZP3* promoter. The promoter of *ZP3* gene could initiate EGFP expression in CHO cell lines rather than in HEK-293T cells, with weaker activity than CMV promoter in CHO cell lines.

Key words: buffalo; *ZP3* (zone pellucida 3) gene; cloning and bio-informatics analysis; transcriptional activity

收稿日期: 2015-03-24

基金项目: 农业部转基因重点项目(2014ZX08010-012B); 国际先进技术引进与合作研究开发项目(14123001-5)

作者简介: 庞春英(1972-), 女, 广西博白人, 本科, 助理研究员, 研究方向为水牛遗传育种与胚胎生物学技术。(Tel) 15277012910; (E-mail) pangcy800@163.com

通讯作者: 梁贤威, (E-mail) liangbri@126.com

水牛具有适应性强、耐高温高湿、耐粗饲、抗病力强、使用年限长、静默发情、繁殖力低和产奶量低等生物学特点,非常适合于中国南方农村饲养^[1-2]。据联合国粮食与农业组织(FAO)2013年统计数据,2011年底中国水牛存栏量达 2.338×10^7 头,仅次于印度的 1.129×10^8 头和巴基斯坦的 3.172×10^7 头,位居世界第3。水牛在中国畜牧业产业中占有重要地位,是重要的肉、乳和役兼用畜种资源,水牛奶更有“奶中之王”之称。但是,当前繁殖力低是制约水牛养殖业发展的瓶颈。水牛性成熟晚,属季节性发情动物,产后卵巢长时间不活动,发情症状不明显,怀孕率低,各地调查的繁殖率为30%~60%;通过超数排卵结合活体采卵技术(Ovum pick up, OPU)每个水牛卵巢可以获得2.25枚卵母细胞^[3-4],而黄牛平均卵母细胞数则高达 30.84 ± 0.88 枚^[5]。因此,深入阐明水牛繁殖调控的机理,了解其卵泡发生模式,尤其是关键基因的表达和作用方式,对于提高水牛的繁殖力具有重要意义,但是当前关于水牛繁殖分子机制的研究较少^[6-10]。

透明带蛋白对于脊椎动物的精卵识别、多精受精的防控以及胚胎的保护起着关键性的调节作用。透明带蛋白家族,由透明带蛋白1(Zona pellucida 1, ZP1)、透明带蛋白2(Zona pellucida 2, ZP2)、透明带蛋白3(Zona pellucida 3, ZP3)和透明带蛋白4(Zona pellucida 4, ZP4)组成。小鼠的透明带由ZP1~ZP3组成,其中ZP3蛋白是小鼠主要的精子受体,能够诱发小鼠精子的顶体反应^[11]。人的透明带由ZP1~ZP4组成,其中ZP1、ZP3和ZP4与精子结合并诱发顶体反应^[12]。猪和牛的透明带由ZP2、ZP3和ZP4组成,其中ZP3与ZP4形成异源二聚体,然后与精子结合^[13]。ZP3基因特异表达于动物的初级卵母细胞中^[14],已被成熟地应用于基因的时空特异性敲除^[15]。但当前关于水牛ZP3基因的表达调控机制研究较少,鉴于此,本研究旨在克隆水牛ZP3基因5'侧翼序列,对其序列特征进行生物信息学分析,并构建pZP3-EGFP-1真核表达载体,转染HEK-293T细胞和CHO细胞,分析ZP3启动子的组织表达特异性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用水牛选自中国农业科学院广西水牛研究所水牛养殖基地。

1.2 主要试剂

水牛血液基因组提取试剂盒 TIANamp Marine Animals DNA Kit、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒和 DH5a 感受态细胞均购自天根生化科技有限公司,去内毒质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司,LA Taq 酶、BamH I 和 EcoR I 限制性内切酶、pMD18-T Vector 均购自大连 TaKaRa 公司, T4 连接酶购自 Fermentas 公司,DMEM 高糖基础液体培养基(GIBCO)、胎牛血清(FBS, Hyclone)、胰酶和脂质体转染试剂盒(Life 3000, Invitrogen)等购自 Life 公司。倒置荧光显微镜(Nikon)、0.22 μm 过滤器(Millipore)、其他试剂无特殊说明的均购自 Sigma 公司。试验所用载体、细胞均为中国农业科学院广西水牛研究所保存。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计 以奶牛 ZP3 基因序列(DQ489319.1)为参考,进行同源比对,根据 In-Fusion 引物设计特点,应用 Oligo 6.0 软件针对 ZP3 的同源保守区域设计了1对引物,扩增 ZP3 基因5'端3081 bp。引物 ZP3-F 序列为 5'-CTCAAGCTTCGAATTCTCTAGACAACCCACCCCTACTCCCAG-3', ZP3-R 序列为 5'-CATGGTGGCGACCGGTCGGTGCCGAAAAGGCTTTTG-3',下划线处为 In-Fusion 引物同源区域,退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.2 水牛血液基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增 按照血液基因组提取试剂盒 TIANamp Marine Animals DNA Kit 操作说明书提取水牛基因组 DNA。PCR 反应体系 20 μl :模板 1 μl ,上、下游引物(各 20 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μl ,PrimeSTAR Max Premix(2 \times) 10 μl ,ddH₂O 补至 20 μl 。PCR 反应条件为:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收并进行 TA 克隆。

1.3.3 生物信息学分析 应用 NCBI 数据 BLAST 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对沼泽型水牛 ZP3 测序结果进行同源序列比对,用 MEGA5.0 软件进行分子进化树构建,用 Promoter(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)、Softberry(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fprom&group=programs&subgroup=promoter>)预测启动子,用 Gpminer(<http://gpminer.mbc.nctu>。

edu.tw/index.php) 预测启动子和转录因子,用 Jaspar (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?rm=browse&db=core&tax_group=vertebrates) 预测转录因子,用 Methprimer (<http://www.uogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 预测 CpG 岛。

1.3.4 载体构建 应用 *Bgl* II 和 *Age* I 双酶切骨架载体 pEGFP-1,酶切体系及方法参照试剂说明书。酶切 3 h 后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和胶回收,并于 4 °C 保存用于后续 In-Fusion 连接。In-Fusion 连接体系:5×In-Fusion HD Enzyme Premix 2 μl,PCR 胶回收产物 6 μl,线性化骨架载体 2 μl。反应条件为:50 °C 15 min,之后 4 °C 保存。转化、质粒提取、去内毒质粒提取等严格按照试剂盒的操作说明书进行。重组质

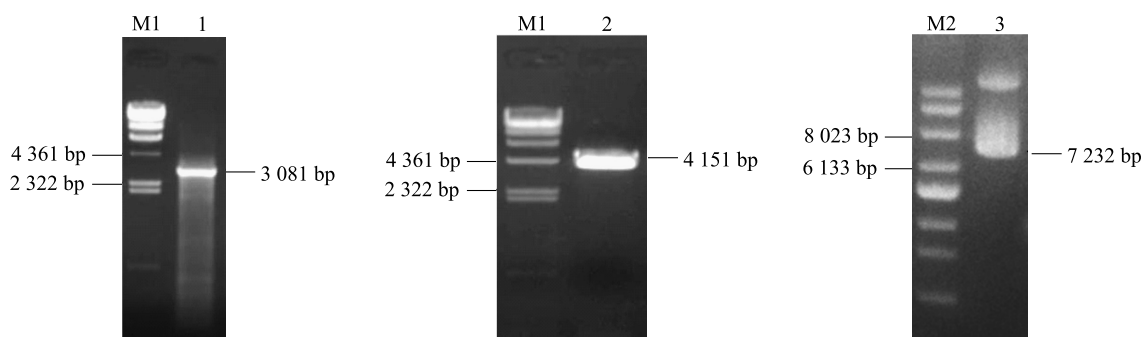
粒送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.3.5 细胞培养及转染 HEK-293T 和 CHO 细胞系用含有 10% 进口胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 浓度下培养,隔天传代。转染按照 Life 3000 转染试剂盒的操作说明书进行。48 h 后在倒置荧光显微镜下检测绿色荧光蛋白(EGFP)的表达情况。

2 结果与分析

2.1 水牛 *ZP3* 基因的克隆与鉴定

以水牛血液基因组为模板,应用设计的特异性引物扩增 *ZP3* 基因,经 PCR 成功扩增获得 3 081 bp 的特异性条带(图 1),与预期结果一致。



M1:λ-Hind III digest DNA Marker;1:样品 *ZP3* 基因 PCR 扩增产物;2:样品 pEGFP-1 的 *Age* I 和 *Bgl* II 酶切产物;M2:Supercoiled DNA Ladder;3:重组质粒 p*ZP3*-EGFP-1。

图 1 水牛 *ZP3* 基因的扩增与亚克隆

Fig.1 Amplification and subcloning of buffalo *ZP3* gene

2.2 水牛 *ZP3* 基因序列分析

对获得的阳性重组质粒进行测序分析,获得水牛 *ZP3* 基因序列。应用 NCBI 的 BLAST 软件进行相似性比对分析,结果显示,广西本地水牛 *ZP3* 核酸序列与河流型水牛、黄牛、绵羊和山羊的相似性分别为 99%、96%、92% 和 92%,表明 *ZP3* 基因在不同哺乳动物中具有较高的序列保守性。

2.3 水牛 *ZP3* 基因系统进化树

选择所克隆得到的广西本地水牛 *ZP3* 基因序列与黄牛、小鼠和人相关序列进行多重序列比较,结果表明广西本地水牛 *ZP3* 基因序列与黄牛具有较高的相似性,与小鼠和人的序列差别较大。进一步应用 MEGA5.0 软件,用 NJ 法构建系统进化树(图 2)。由图 2 可知,水牛与黄牛的相应序列聚为一支,与绵羊的遗传距离相对较近,进化树的形态与分

类学具有较高的一致性,进一步说明克隆的序列为水牛 *ZP3* 基因。

2.4 水牛 *ZP3* 基因启动子和转录因子的生物信息分析

选取广西本地水牛 *ZP3* 基因 5' 侧翼 2 000 bp 序列,进行启动子及转录因子反式作用元件等分析。Gpminer 在线网站预测结果显示,在 -147 bp 至 -196 bp 区域存在启动子特征序列(TATA box),序列为 TCATCAGGGGTATAAGACGGTGGGTGGTGCCTG-CCCAGGAGTCACAGTGG。经 Jaspar 和 Gpminer 软件预测发现本地水牛 *ZP3* 基因 5' 侧翼序列 2 000 bp 内存在 2 个潜在核心启动子区,其中一处为 -50 bp 至 -409 bp 区域,此区域存在 *TBP* (-187 bp……-173 bp)、*SP1* (-60 bp……-50 bp)、*CEBPA* (-409 bp……-399 bp) 和 *USF1*, 2 (-126 bp……-116 bp)

等结合位点,分别结合 TATA box、GC box、CAAT box 和 E box;另一处为-1 031 bp 至-1 248 bp 处,此区域存在 *TBP* (-1 069 bp …… -1 031 bp)、*SP1* (-1 248 bp …… -1 226 bp)、*CEBPA* (-1 122 bp …… -1 112 bp) 和 *USF1*,2 (-1 105 bp …… -1 095 bp) 等转录因子结合位点。此外在广西本地水牛 *ZP3* 基因 5' 侧翼序列 2 000 bp 内,也存在 *Foxo3*、*Nobox*、

Stat3、*Stat5a*、*Stat5b*、*Stat6*、*YY1* 和 *Gata* 家族等反式作用元件结合位点,其中 *Stat* 家族基因在 *ZP3* 基因启动子区存在多个结合位点,且 *ZP3* 同一位点处存在多个 *Stat* 家族基因结合的情况(图 3、图 4、图 5)。通过 Methprimer 预测发现在 *ZP3* 基因翻译起始位点上游不存在 CpG 岛。

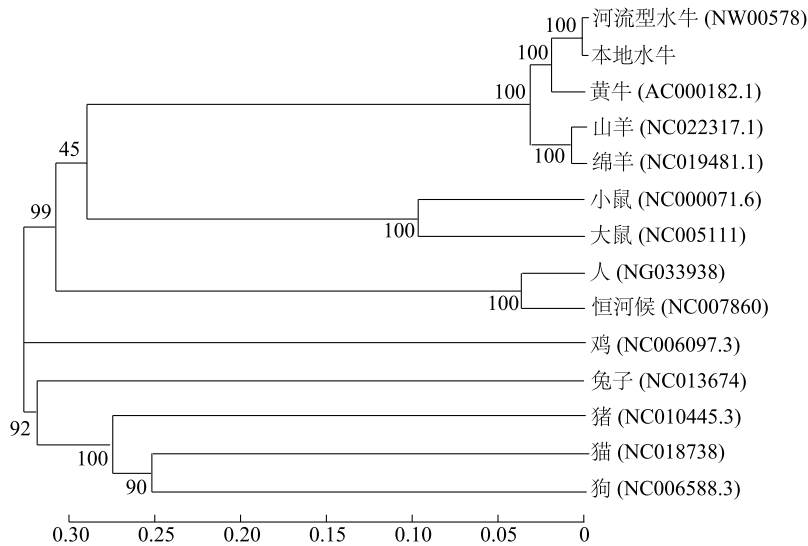


图 2 水牛与其他物种 *ZP3* 基因核苷酸序列的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of *ZP3* gene among buffalo and other species based on nucleotide sequence

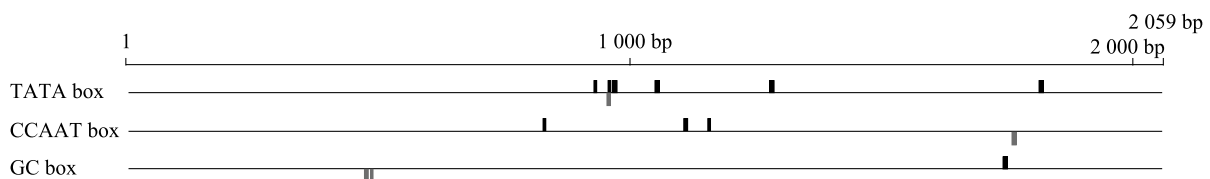


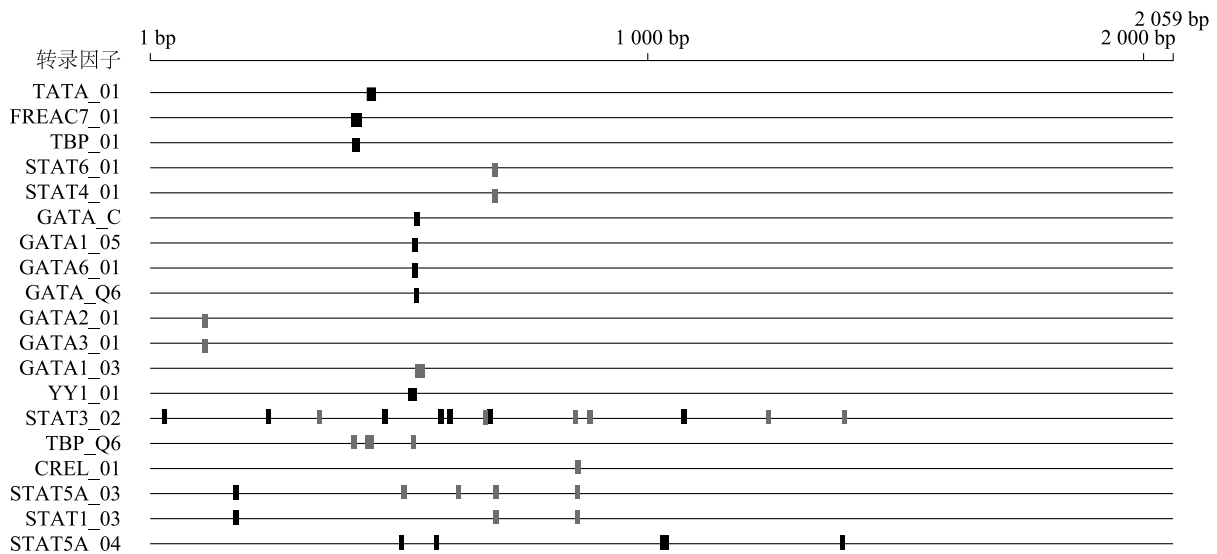
图 3 水牛 *ZP3* 基因启动子的预测

Fig.3 Prediction of the promoter of buffalo *ZP3* gene

2.5 *pZP3*-EGFP-1 真核表达载体构建及转录活性检验

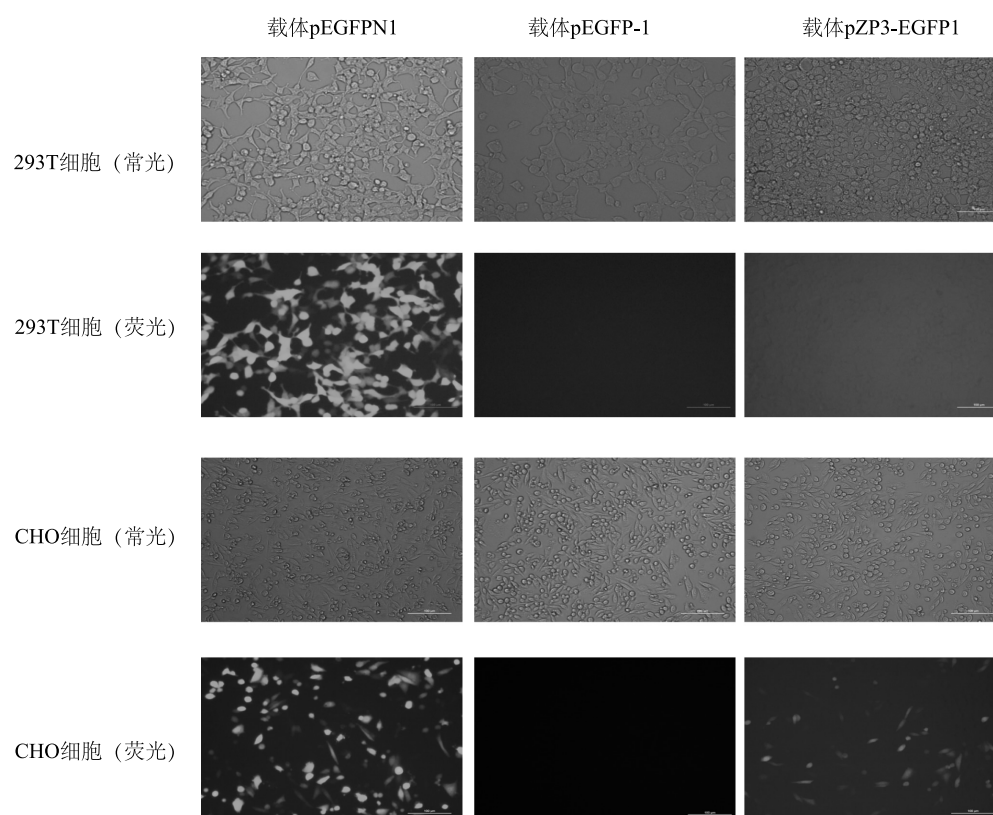
应用 In-Fusion 技术构建 *pZP3*-EGFP-1 真核表达载体,电泳及测序结果表明所构建载体正确(图 1)。应用脂质体 Life 3000,将阳性对照质粒 pEGFPN1 转染 HEK-293T 和 CHO 细胞系,阴性对照质粒 pEGFP-1 转染 HEK-293T 和 CHO 细胞系,所构建的 *pZP3*-EGFP-1 质粒转染 HEK-293T 和 CHO 细

胞系,48 h 后进行荧光观察。结果表明:阳性对照载体 pEGFPN1 在 HEK-293T 和 CHO 细胞系中有 EGFP 蛋白表达,且在 HEK-293T 中荧光信号显著强于 CHO 细胞系;阴性对照载体 pEGFP-1 在 HEK-293T 和 CHO 细胞系中均无 EGFP 蛋白表达;试验载体 *pZP3*-EGFP-1 在 HEK-293T 细胞系中无 EGFP 蛋白表达,在 CHO 细胞系中有 EGFP 蛋白表达(图 6)。

图 4 水牛 *ZP3* 基因启动子区转录因子的预测Fig.4 The prediction of transcription factor of buffalo *ZP3* promoter

CTACATGCTTGTGGGCAGCACACCCACAATCTTGATAATCGTTAACTCTCCACCTGGAGGGGCTTTCAGTATCTGCAAAATAGCTCAAAGATATTGTTGTGTGTACCCAT
-2 000 bp GATA2-1977 ...-1964 Nobox-1820 ...-1813
TCATGGGGAAAGGGCAGCTTGCCTCAAGGCTGCTCTTCTCCCTGGTCTCAAATCCCTCCCTCCCTAATTAACAAGTGCTGAATCTGCCACTGGAACCCAGG
STAT3-1756 ...-1746
GAAGGGGATGGGGGCTGAATGAAGGCTGCTCTCTGAAATCAAGAAATGGGGACACAAAGCCTTCTGTCCAGGAGCCCAAGCGCCCTGCTGGTATCACTTCTG
Gata1,2-1643 ...-1630
CCCCTAGGAATTAACGCCGTGACTATTTTGAGTTCTTCTCTCTCTTGAAGGAATCTCACCCAGGCTGGCAAGGAGTAGGCCGTGAGGAAGGGCTCACGCTGTCTGTCA
SMAD2,3,4-1516 ...-1509
GTCCTTCTCCACCTCCAACAGGACCGGCGCAGTAGCCGCTGACTCTTGTCTTCAGACCTACCCCTCCCACTAGAGCTGGCCAGATCACTCATCTTCCCAACCTGCCT
-1 500 bp
CTCCCCACCAAGAGCAAAGTCCAGCATCTCAGCCAGCACCTTCAGGATCTGCCCCCTCAGCCCCCTAACTATCACTCTGGCCCCTAGGGACCTGAGGGTCCAGCAACTC
FOXLI-1283 ...-1273 SP1-1248 ...-1226
TGAGTTCCTGAGATTTCCCTCGGGTCTACCCAGTGTCTGTCTACACCTCTGTTTCAACAGATCCCTCTGCCTGAAGTCCCTGTTACCTCTATGCAAGTTGAGCAGT
CEBPA-1122 ...-1112
AAGGACTTCTGGTGGTCCAGTGGCTAAGACGCCATGCTACCAATACAGGGGGCCAGGTTGATCCCTGGTCCAGGAACTAGATCCTGTATGGCACAACCTAAAGATCCC
USF1,2-1105 ...-1095
ATGTGCCACAACCAAGACCTGGTGCAGCCAAATAAATAATATCGAAAATGCAATCTTATAAAAAATAAAGTTGGGCAACATCCCAACATTCCTGGTCTCCTAATG
-1 000 bp
GATA3-959 ...-952 SP1-911 ...-901
ATACCATGGTTTCTGCTTGGAAAGAGCTTCCATCTCTGATAAAATTTCTCTCATCTTAATCAATCCTTAGTCAAGGGCTTCTCTCTGCTTCCCAATGATCCAGGCTCC
CAGGTGGCAGAGTAGGAAAGAATACGCATCCAATGCAGGAGATGTGAGAGATGTGGGTTCAATCCCTGAGTCGGGAAGATTCCCTGGAGAAGGAAATGGCAACCCACCC
Stat5a,5b-726 ...-716
CAGTATTCTTGCCTGGAGAAGCCATGGACAGAGGAGACTGGTGGGCTATAGTCCATGGAGTGAAAAGAGTCAGACACGACTGAGCAACCAACACACACCTAAGGA
SMAD2,3,4-578 ...-566
TCCAGGGTAGCTCTAGCTCCCTCTAGGTGATGAGGGAAGGCCAGCAAAGGGTGAAGGAGGGGAAGGGGTGAGAAGCTGACTGACCAAGGCTACCAAGCTGATG
Nobox-493 ...-486 STAT2,1-472 ...-458
CTTCTCAAAGCTTAATGTGAATACAGATCACTTGGGAGAGAGAGGGAGACCAGGTCTGACTTAGTTGGCTGGGCTGTGTCAGAGAGTCTGAGTTTCTTCTTTTGG
SP1-438 ...-428 CEBPA-409 ...-399 -500 bp
GCCTGCCACAGTGCTTGCAGGATCTTAGTCCCATCTGGGGTGAACCCATGCCCTTGCAGTGGAAGTGCACCTTCTAACCCTGGGCCACAGAGAAGTCCAGA
STAT5a,5b-319 ...-309 USF1,2-250 ...-240
GTCTGCCCTTTGAACAAGCTCCAGGTGAGGCCGATGCTGCAGGCTGGGGGGCCACCTTAAGCATCGGGGCTGGCCCATGATTGGCTGGGGAACAGAGGCACTTG
TBP-187 ...-173 USF1,2-126 ...-116
GGGTCCAGGTGTGAGTGCCATCATCAGGGGTATAAGACGGTGGGTGGTGCCTGCCAGGAGTCACAGTGGGTGGGAGTGGCTTGTGGGCACCATGGGGCCACGCTC
STAT1,6-88 ...-78 SP1-60 ...-50 Stat1,
TAGGCTCTTCTCTGCTTCTGCTCTGGGGAAGCGCAGAGCTCTGCAGCCCCAGCCCTTCTGGGATGATGAACTGAGCGCTTCAGGCCATCGAAGCCACCCACAGTG
CDS
ATGGTGGAGTGTGAGGAGCCAAGCTGGTGGTACGGTGCACAAAGACCTTTTCGGCAC -1 bp

图 5 水牛 *ZP3* 启动子区转录因子结合位点分布图Fig.5 The distribution of transcription factor binding sites in buffalo *ZP3* promoter region

图6 水牛 *ZP3* 基因启动子的转录活性Fig.6 The transcriptional activity of promoter of buffalo *ZP3* gene

3 讨论

小鼠透明带由 *ZP1*、*ZP2* 和 *ZP3* 3 种糖蛋白组成,三者的含量比值为 1 : 4 : 4^[16]。其中 *ZP3* 基因特异表达于初级卵泡阶段及其之后的卵母细胞中^[17]。*ZP3* 的缺失,一方面致使透明带不能形成,另一方面致使胚胎发育不能跃过 2 细胞期^[18]。人的 *ZP3* 基因位于 7 号染色体上,含有 7 个可变剪切体,其中 4 个可以编码蛋白质,分别编码 373 aa、424 aa、248 aa 和 258 aa。编码区最长的可变剪切体含有 8 个外显子和 7 个内含子。小鼠的 *ZP3* 基因位于 5 号染色体上,含有 2 个可变剪切体,仅有 1 个可以编码蛋白质,含有 5 个外显子和 4 个内含子。黄牛的 *ZP3* 基因位于 25 号染色体上,编码 421 aa。对透明带基因表达调控研究发现,位于透明带蛋白质翻译起始位点上游 200 bp 处存在 E-box (CANNTG),能够与反式作用因子 Figla 和 USF1 等结合,从而促进透明带蛋白质基因的表达^[19]。Shi

等^[20]研究发现,鲫鱼的 *ZP1*、*ZP2* 和 *ZP3* 基因聚集在一起,其跨度为 10 855 bp,其中 *ZP2* 和 *ZP3* 间的 1 097 bp 具有双向启动子的特性,能够同时调节 *ZP2* 和 *ZP3* 基因的表达。本研究成功克隆获得沼泽型水牛 *ZP3* 5'侧翼序列及部分外显子序列,共 3 081 bp,同源性分析结果表明其与河流型水牛和黄牛的序列相似性较高。

本研究通过信息学分析发现,在水牛 *ZP3* 启动子区内存在 2 个潜在核心启动子区,其中一处为 -50 bp 至 -409 bp 区域,此区域存在 *TBP*、*SP1*、*CEBPA* 和 *USF1,2* 等结合位点,与文献[21]报道的一致;另一处为 -1 031 bp 至 -1 248 bp 处,此区域存在 *TBP*、*SP1*、*CEBPA* 和 *USF1,2* 等转录因子结合位点。此外还存在 *GATAs*、*Foxo1*、*Foxo3*、*Stats* 和 *YY1* 等反式作用元件结合位点,且存在 *Stat3*、*Stat4*、*Stat5a*、*Stat5b* 以及 *Stat6* 同时结合的位点,提示 *Stats* 可能通过形成二聚体的形式调控 *ZP3* 的表达。通过构建 *pZP3-EGFP-1* 表达载体转染 HEK-293T 和

CHO 细胞,发现 *ZP3* 5'侧翼序列能够启动绿色荧光蛋白表达于 CHO 细胞中,但不能启动其表达于 HEK-293T 细胞中,表明所克隆获得的沼泽型水牛 *ZP3* 5'侧翼序列具有组织表达特异性。总之,本研究成功克隆了广西本地水牛 *ZP3* 5'侧翼区域,并验证了其转录活性,但对其转录调节机制还需进行进一步研究。

参考文献:

- [1] NANDI S, RAGHU H M, RAVINDRANATHA B M, et al. Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in vitro: premises and promises[J]. Reprod Domest Anim, 2002, 37(2): 65-74.
- [2] ZICARELLI L, ESPOSITO L, CAMPANILE G, et al. Effects of using vasectomized bulls in artificial insemination practice on the reproductive efficiency of Italian buffalo cows[J]. Anim Reprod Sci, 1997, 47(3): 171-180.
- [3] MANJUNATHA B M, RAVINDRA J P, GUPTA P S, et al. Oocyte recovery by ovum pick up and embryo production in river buffaloes (*Bubalus bubalis*) [J]. Reprod Domest Anim, 2008, 43(4): 477-480.
- [4] DI FRANCESCO S, NOVOA M V, VECCHIO D, et al. Ovum pick-up and in vitro embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons[J]. Theriogenology, 2012, 77(1): 148-154.
- [5] PONTES J H, MELO STERZA F A, BASSO A C, et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors[J]. Theriogenology, 2011, 75(9): 1640-1646.
- [6] 崔奎青,刘庆友,李秀林,等. 基于线粒体控制区变异的水牛群体遗传分析[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(1): 76-82.
- [7] 崔奎青,张会娜,刘 帅,等. 沼泽型水牛 *NANOG* 基因 5'调控序列克隆与功能分析[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(3): 387-394.
- [8] 邓彦飞,刘真真,李云芳,等. 不同逆转录载体系统应用于水牛胎儿成纤维细胞转基因的探索[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(4): 558-563.
- [9] 龚 云,乔树叶,林 浪,等. 水牛 *YY1* 基因克隆及其 shRNA 片段的筛选[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(1): 62-68.
- [10] 苏 节,刘庆友,朱 鹏,等. 沼泽型水牛 *CYP19A1* 基因克隆、序列分析及组织表达研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(4): 514-521.
- [11] SHI J W, SHENG J Q, PENG K, et al. Expression pattern of the zona pellucida 3 (*ZP3*) gene during ovarian development and the location of *ZP3* protein in oocytes in a natural, wild triploid crucian carp mutant, *Carassius auratus* var. *Pingxiangnensis* [J]. Genet Mol Res, 2013, 12(4): 5640-5650.
- [12] GUPTA S K, BHANDARI B, SHRESTHA A, et al. Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization[J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(3): 665-678.
- [13] YONEZAWA N, KANAI-KITAYAMA S, KITAYAMA T, et al. Porcine zona pellucida glycoprotein *ZP4* is responsible for the sperm-binding activity of the *ZP3/ZP4* complex [J]. Zygote, 2012, 20(4): 389-397.
- [14] LAN Z J, XU X, COONEY A J. Differential oocyte-specific expression of Cre recombinase activity in GDF-9-iCre, *Zp3cre*, and *Msx2Cre* transgenic mice [J]. Biol Reprod, 2004, 71(5): 1469-1474.
- [15] DE VRIES W N, BINNS L T, FANCHER K S, et al. Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes[J]. Genesis, 2000, 26(2): 110-112.
- [16] LIANG L, SOYAL S M, DEAN J. FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes [J]. Development, 1997, 124(24): 4939-4947.
- [17] EPIFANO O, LIANG L F, FAMILARI M, et al. Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis [J]. Development, 1995, 121(7): 1947-1956.
- [18] LIU C, LITSCHER E S, MORTILLO S, et al. Targeted disruption of the *mZP3* gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(11): 5431-5436.
- [19] EPIFANO O, LIANG L F, DEAN J. Mouse *Zp1* encodes a zona pellucida protein homologous to egg envelope proteins in mammals and fish[J]. J Biol Chem, 1995, 270(45): 27254-27258.
- [20] SHI J, PENG K, SHENG J, et al. A specific genomic organization and a novel promoter sequence for both *ZP2* and *ZP3* gene expressions in the Pingxiang red transparent crucian carp, *Carassius auratus* var. *pingxiangnensis* [J]. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2013, 8(4): 275-282.
- [21] LEWANDOSKI M, WASSARMAN K M, MARTIN G R. *Zp3-cre*, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line[J]. Curr Biol, 1997, 7(2): 148-151.

(责任编辑:张震林)