

团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列克隆及其表达载体的构建

曲完成,周正峰,崔严慧,刘颖,胡萍华,金一春,尚婧璿

(上海海洋大学 生命与科学技术学院,上海 200090)

摘要: 首先运用 PCR-末端加尾法克隆了团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 脑下垂体糖蛋白激素 α 亚基 (Pituitary glycoprotein hormone α subunit, PGPH α) 基因 5' 端侧翼序列;然后利用生物信息学理论对该序列进行了序列分析;最后在序列分析结果的基础上,构建了荧光素酶质粒表达载体。序列分析结果显示,克隆所得到的团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列长 1 399 bp;其序列中包含潜在的 TATA 盒、GC 盒,以及 ERE、TRE、CRE、PGBE 等对 PGPH α 亚基基因转录调控起重要作用的转录因子结合位点;启动子区域位于 -40~10 bp 处。利用 PCR 方法扩增得到了全长 1 439 bp 以及 1 120 bp、532 bp、173 bp 均包含转录起始位点下游 40 bp 序列的缺失片段,并将其连接至 pGL3-Basic 报告基因载体,成功构建了团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列的表达载体,为进一步研究、分析其转录调控机制提供了基础。[中国水产科学,2008,15(4):550-558]

关键词: 团头鲂;垂体糖蛋白激素 α 亚基;5' 侧翼序列;启动子;表达载体

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)04-0550-09

高等脊椎动物腺垂体分泌的促滤泡激素 (Follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体激素 (Luteinizing-hormone, LH)、促甲状腺激素 (Thyroid-stimulating hormone, TSH),以及胚胎滋养层细胞分泌的绒毛膜促性腺激素,都是糖蛋白激素家族成员^[1]。这4种糖蛋白激素都是由 α 和 β 亚基以非共价结合组成。其中每种动物糖蛋白激素的 α 亚基是相同的;而 β 亚基则不同, β 亚基决定了每种激素的特异性^[2]。鱼类和其他脊椎动物一样,它们的两种促性腺激素 (Gonadotropin hormone, GtH),即 GtHI 和 GtH II^[3],也是由 α 和 β 两个亚基组成。GtHI 和 GtHII 的功能分别与哺乳类的 FSH 和 LH 相似,对鱼类配子的形成起着十分重要的作用^[4]。另一方面,在鱼类的腺垂体也同样存在促甲状腺激素细胞,合成和分泌 TSH。TSH 刺激甲状腺组织合成和分泌甲状腺激素,促进物质与能量代谢,促进生长和发育^[5]。

目前,关于哺乳类脑下垂体糖蛋白激素 α 亚基 (Pituitary glycoprotein hormone α subunit, PGPH α) 基因转录调控分子机制的研究已有较多报道,研究结果表明,一些反应元件对哺乳类 PGPH α 亚基基

因转录调控起着十分重要的作用^[6-11],并且存在一些细胞、组织特异性调控元件^[12-13]。国外学者对罗非鱼^[4]、鲤^[14]、大鳞大马哈鱼^[15]、金鱼^[16-17]等糖蛋白激素 β 亚基基因转录调控进行了研究,但关于鱼类 PGPH α 亚基基因转录调控的研究尚未见报道。鉴此,本研究利用 PCR-末端加尾法克隆团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列,并在对其进行生物信息学分析的基础上构建了含有团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列表达载体,旨在为进一步研究鱼类 PGPH α 亚基基因转录调控的分子机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 团头鲂 1 尾,购于上海松江水产良种场,体质量 220 g,体长 21 cm,健康状况良好。

1.1.2 试剂 末端转移酶 (TdT)、dNTP、dCTP、Ex TaqDNA 聚合酶、DNA 回收试剂盒、pMD18-T 载体、KpnI 和 SacI 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、100 bp DNA Marker 均购自 TaKaRa 工程 (大连) 有限公司;饱和酚、酚-仿试剂、DNA marker III、凝胶回收

收稿日期:2008-02-01;修订日期:2008-03-03。

基金项目:回国留学人员科研启动基金 (科 01-113);上海市重点学科建设项目资助 (Y1101);上海水产大学博士启动基金 (科 00-119)。

作者简介:曲完成 (1965-),男,副教授,硕士生导师,主要从事水生动物生理方面的研究。Tel: 021-65710525; E-mail: xcqu@shfu.edu.cn

试剂盒、DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖、氨苄青霉素、IPTG、X-gal、酵母粉、蛋白胨、琼脂购自美著生物技术有限公司; pGL3-Basic 报告基因载体质粒购自 Promega 公司。所用引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 PGP α 亚基基因 5' 端侧翼序列的克隆

(1) 基因组 DNA 提取 采用常规基因组 DNA 提取方法。主要过程如下: 取研磨碎的团头鲂肌肉组织 100 mg, 同时加入 500 μ L 裂解液(每 1 mL 裂解液含有 1 mol/L Tris-HCl 50 μ L (pH 8.0), 5 mol/L NaCl 20 μ L, 10% SDS 100 μ L, 0.5 mol/L EDTA 200 μ L (pH 8.0), 双蒸水 630 μ L 和 2.5 μ L 10 mg/mL 蛋白酶 K; 然后在 55 $^{\circ}$ C 环境下孵育 2 h 后, 加入 5 μ L RNase (10 μ g/ μ L), 再在 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。孵育结束后加入 500 μ L 饱和酚, 上下翻转 10 min, 8 000 r/min 离心 5 min。取上清, 加入 500 μ L 酚-仿溶液, 上下翻转后, 静置 5 min, 然后 8 000 r/min 室温离心 5 min。再取上清, 加入 500 μ L 预冷无水乙醇, 小心混匀后, -70 $^{\circ}$ C 静置 20 min; 然后 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入 1 mL 70% 乙醇, 静置 5 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 室温干燥 15 min 后, 加 100 μ L 灭菌的去离子水溶解。最后, 1% 凝胶电泳检测提取效果, 并测定其浓度, 经稀释使其最终质量浓度为 150 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2) 引物设计 本实验室已利用 RACE 法克隆得到了团头鲂 PGP α 亚基 cDNA 的全长序列(待发表), 首先根据已知 PGP α 亚基 cDNA 序列设计的基因特异性引物 1(GSP1) 进行 PCR 扩增; 接下来, 在扩增产物的 3' 末端进行加尾; 最后用巢式基因特异性引物 2(GSP2) 和与加尾序列匹配的锚定引物(AAP) 进行 PCR 扩增。各引物序列见表 1。

(3) 第 1 次 PCR 扩增 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。50 μ L 反应体系如下: 灭菌的去离子水 25.35 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 混合物 4 μ L, 2 μ L 10 μ mol/L GSP1, 基因组 DNA 13.4 μ L, Ex Taq 0.25 μ L (5 U/ μ L)。PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 35 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 4 min, 40 循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物经试剂盒回收后, 用 30 μ L 灭菌去离子水溶解。

(4) PCR 产物加尾 回收的 PCR 产物, 在

TdT 的作用下, 在 PCR 产物的 3' 末端进行加尾。25 μ L 加尾反应体系如下: 5 $\times$ TdT buffer 5 μ L, 10 mmol/L dCTP 1.25 μ L, 0.1% BSA 2.5 μ L, PCR 产物 15.75 μ L, TdT 0.5 μ L (5 U/ μ L)。37 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后, 70 $^{\circ}$ C 10 min 灭活。

(5) 巢式 PCR 扩增 以加尾产物为模板, 用 GSP2 和 AAP 进行 PCR 扩增。50 μ L 反应体系如下: 双蒸水 34.35 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 混合物 4 μ L, 2 μ L 10 μ mol/L GSP2, 10 μ mol/L AAP 2 μ L, 加尾产物 2.4 μ L, Ex Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L。PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 35 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 4 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

(6) 克隆测序 巢式 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收后, 与 pMD18-T 载体相连。然后转化 DH5 α 感受态细胞, 平板培养, 经菌落 PCR 验证, 将含有最长插入片段的单个菌落进行扩大培养, 送菌液测序。测序由捷瑞生物工程(上海)有限责任公司完成。

1.2.2 PGP α 亚基基因 5' 端侧翼序列分析 采用在线分析工具 NNPP (Neural Network Promoter Prediction)^[18] 对克隆得到的团头鲂 PGP α 亚基基因 5' 端侧翼序列进行潜在启动子区域的预测; 采用 AliBaba2.1^[19] 和 MatInspector^[20] 对 PGP α 亚基基因 5' 端侧翼序列潜在转录因子结合位点进行预测。分析时连同转录起始位点下游 40 bp 的第一个外显子序列和 114 bp 的第一个内含子序列一起输入进行分析, 预测所用参数均采用在线默认设置。另外, 团头鲂和鲤 PGP α 亚基基因部分序列比对分析运用 DNASTar。

1.2.3 缺失质粒表达载体的构建 在对克隆所得到的 PGP α 5' 端侧翼序列进行生物信息学分析的基础上, 为分析侧翼序列反应元件活性, 并考虑分析 Ptx-1 (Pituitary homeobox 1)、TRE (Thyroid hormone receptor element)、ERE、CRE、SF-1、LHX3 (LIM homeobox 3) 等对团头鲂 PGP α 亚基基因转录调控的影响, 利用引物组合 P1-P5; P2-P5; P3-P5; P4-P5 构建了 PGP α 5' 端侧翼序列全长和 3 个缺失表达载体(包括转录起始位点下游 40 bp 的第一个外显子序列), 分别称为 pGL3-Basic-PGP α 、pGL3-Basic-PGP α 1、pGL3-Basic-PGP α 2、pGL3-Basic-PGP α 3。上游和下游引物序列见表 1。

表 1 实验中所用引物序列
Tab.1 Oligonucleotide primers used in experiments

引物名称 Primer	核酸序列 (5' → 3') Nucleotide sequences
GSP1	CTTGGATACACTTGTCCAAGATG
GSP2	CTTGCTCCAGCATATCTTGTCC
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACG ₁₆
上游引物 P1 Upstream primer P1	GGGGTACCTAGAATCCAGTCAGGAAGCAGAATGG
上游引物 P2 Upstream primer P2	GGGGTACCTAGTTTGAAGTGTCTGAGTTTCAGATTTGATGC
上游引物 P3 Upstream primer P3	GGGGTACCCTCCTCTCCATCTGGCATTGAACTATTG
上游引物 P4 Upstream primer P4	GGGGTACCCAGTTCTTCATTACCTAATGGATTACAAGG
下游引物 P5 Downstream primer P5	GAGAGCTCCTTTGTTCTTGACTTCCAGTGAGATGTG

通过 PCR 扩增得到的全长及缺失片段,经凝胶电泳纯化回收后,用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Sac*I 酶切。然后再回收酶切产物并分别与 pGL3-Basic 质粒载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,进行平板培养。挑取白色菌落,利用上述引物进行 PCR 验证是否含有外源片段插入,同时酶切分析并对阳性质粒进行测序。

2 结果与分析

2.1 巢式PCR扩增结果

巢式 PCR 扩增的电泳结果显示,在 600~2 000 bp 之间区域有弥散状条带形成,结果如图 1 所示。回收 1 000~2 000 bp 的 PCR 扩增产物,并与 pMD18-T 载体连接后,转化大肠杆菌 DH5 α ,然后进行阳性克隆插入片段大小检测,其结果如图 2 所示。巢式 PCR 扩增过程中,在 500~1 500 bp 之间有不同大小的扩增片段,本实验选取含有最长插

入片段的 11 号样本进行测序,测序结果如图 3 所示序列。测序结果显示:获得的团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列为 1 399 bp。

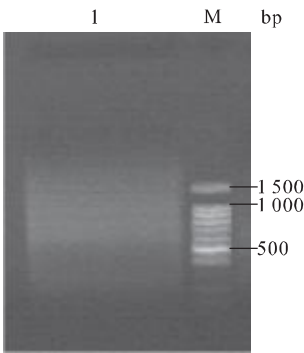


图 1 巢式 PCR 电泳图
1: 巢式 PCR 扩增产物; M: 100 bp DNA 分子标记
Fig.1 Electrophoretic analysis of nested PCR
1: Nested PCR product; M: 100 bp DNA marker

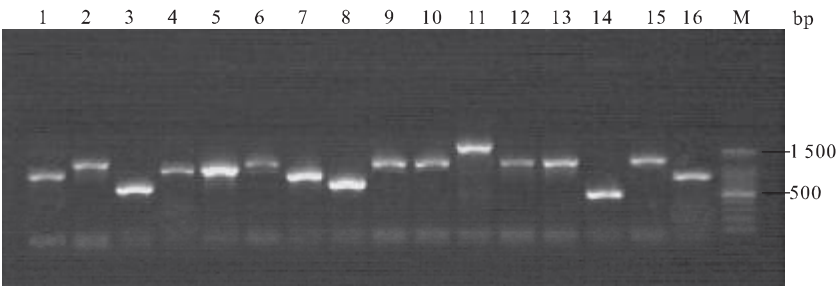


图 2 阳性克隆的 PCR 检测结果
1~16: 阳性克隆的 PCR 产物; M: 100 bp DNA 分子标记
Fig.2 PCR identification of positive clone
1 16: PCR product of positive clone; M: 100 bp DNA marker

2.2 PGPH α 亚基因 5' 端侧翼序列的生物信息学分析

利用在线分析工具 NNPP 预测结果: 团头鲂 PGPH α 亚基因 5' 端侧翼序列中存在 4 处潜在启动子区域, 它们分别位于 -1 119~-1 069、-1 026~-977、-40~-10、-27~-23 处。可能的转录起始位点在图 4 中用大号字体标出。

采用 AliBaba2.1 和 MatInspector 对潜在转录因子结合位点进行预测结果如图 3 所示。在克隆所得到的团头鲂 PGPH α 亚基因 5' 端侧翼序列中, 存在 TBP (TATA binding protein)、SP1 (Specificity protein-1)、SF-1、Pit-1 (Pituitary-specific transcription factor 1)、LHX3、ERE、CREB、TRE 和 AP1 (Activating protein-1) 等主要反应元件。

```

-1399 tagaatccagtcaggaagcagaatgggattggtcctttagacgaggttaata
                                CAAT*
-1349 atacaatagatttgtcacatttctcatgttttaaggacacatacaaatg
-1299 ctgtgtttttgtctacatacccaaataggggcaatttgacaagttaataa
-1249 aatgatctgtggggcattttgagttgaaacttcacagacacattctgggg
                                Pit-1
-1199 acaccagagacttatattacatccttgtgaaaagggtattataggttccat
                                CEBPB
-1149 ttaaaaagaaaaataactttaaatgagtttgttgaaatgtgctatataatgt
                                TATA
-1099 ggtcacaattagatgataaatagttttgaactgtcagtttcaagatttgatgc
                                ERE GATA CEBPA
-1049 aataatacttgcattgtcttgaatattttaattataaaggttcaccacc
                                LHX3 TATA
-999 tataggtttggcttctgagtcacatgcatgtgtgttactgttatatgactact
                                GRE AP1
-949 ggctaactctaggacaagaaaaagatgattttattgagcttctagtttta
-899 tcaccaaaatgaattttgaatcatgaatgaatgaataaataaattcttg
                                GATA-1* Pit-1 Pit-1*
-849 tttttacatgtttgatggaaattgcatgtttgatccagagcttttggg
-799 tdtttatacactattcaggtgaaacgtgatcagaagttagtgttgagag
                                TATA*
-749 cagatgtattcaagccttcagctatttttgtgaaatggagtccttcatct
                                CEBPB
-699 agacatttatgttttagaaaaaaaatgttgatgtgctgtgttctcttcaata
                                CREB GRE
-649 tattatttcagttttctttacttttctttaaaatggtctttgtacattta
                                GRE pit-1
-599 gagaacgtgaaagcagaagtaatggtgaaataattcagaaaggtctcaaa
-549 taaacttcagtggttgaaaatattgcataaaaatattatttaatttattatg
                                LHX3 CREB
-499 tcacattctctctccatctggcattgaaactattgaattaccttgcacat
                                TRE
-449 caggcatgaaacagcataatccaaaccaaggtcttgttgatttgcgtcag
-399 atggaaagattgagagatagtcgaggcaaacacacattcattccttgacaa
-349 ttgatactgtgtgtttatagagttgagggacaacggtaattacagattac
-299 ttcatgtgacagtaaatcatgtaacaaatccggagggtttagattgaaaatg
                                1/2USF* TRE CEBPA Ptx-1*
-249 taacgaatgtgtttatgcacaagcttttagtgtgccttatcacaaatcaaaa
-199 tgtaatgccggttaaaagtcagagatctcaagccagaaatagtttaattga
                                USF LHX3
-149 aacttcagttacaatattcagttcttcatcttacctaattggaatcacaaggtca
                                GRE SF-1
-99 gcaagggaacaatcacatgtgatgcacacacacacgctcacacacaaaat
-49 ggggcaggcgtaagccaggtataaaaaggtagctatatctgctgtctgagaA
                                SPI TATA
+2 gtcagattgatcacatctcactgggaagtcaagaacaaag

```

图 3 团头鲂 PGPH α 亚基因 5' 端侧翼序列及其潜在转录因子结合位点

转录因子用方框和下划线标明; “*” 表示结合位点位于反义链上; “+1” 所示为转录起始位点。

Fig.3 5' flanking region of blunt snout bream PGPH α gene and predicted transcription factor binding sites

The potential transcription factors are boxed or underlined; “*” means the binding sites is in anti-sense strand; “+1” means transcription start site.

起点 Start	终点 End	分值 Score	启动子序列 Promoter Sequence
-1119	-1069	0.97	TTGAATGTGCCTATATATGTGGTCACAATTGATGATAAATAGTTTGAAC
-1026	-977	0.94	ATATTTAATTTATAAAGGTTACACCTATAGGTTTGTCTGAGTCATGC
-40	+10	0.85	GTAAGCCAGGTATAAAGGTAGCTATATCTGCGTCTGAGAAGTCAGATTG
-27	+23	0.34	AAAAGGTAGCTATATCTGCGTCTGAGAAGTCAGATTGATCACATCTCACT

图4 团头鲂 PGPH α 亚基基因启动子区域预测结果
大号字体表示可能的转录起始位点。

Fig.4 Prediction results of PGPH α gene promoter sequence in blunt snout bream
The potential transcription start sites shown in larger font.

2.3 重组质粒载体

利用4对引物、通过PCR扩增,分别得到1439 bp全长,及1120 bp、532 bp、173 bp的缺失片段,扩增结果如图5所示。

对所构建的pGL3-Basic-PGPH α (含有1439 bp的全长),pGL3-Basic-PGPH α 1(含有1120 bp的缺失片段),pGL3-Basic-PGPH α 2(含有532 bp的缺失片段),pGL3-Basic-PGPH α 3(含173 bp的缺失片段)质粒利用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Sac*I 进行酶切分析,其结果如图6所示。同时也对其进行了测序鉴定,结果显示:全长及缺失片段与克隆所得到的序列完全一致。缺失表达载体的成功构建,为进一步探索对鱼类PGPH α 亚基基因转录起关键作用的转录调控因子及其调控的分子机制提供基础。

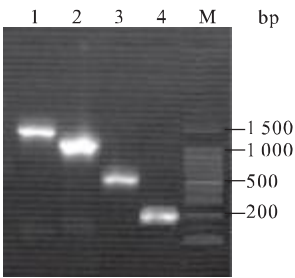


图5 PCR扩增的全长及缺失片段电泳图
1: 全长扩增产物; 2~4: 缺失片段扩增产物; M: 100 bp DNA 分子标记。
Fig.5 PCR amplification and electrophoretic analysis of the full length and deletion fragments
1: PCR product of the full-length fragment; 2~4: PCR products of deleted fragments; M: 100 bp DNA marker.

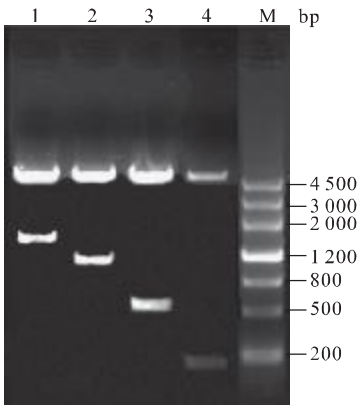


图6 表达载体的双酶切分析
1~4: 分别为表达载体 pGL3-Basic-PGPH α 、pGL3-Basic-PGPH α 1、pGL3-Basic-PGPH α 2、pGL3-Basic-PGPH α 3 的双酶切产物; M: DNA 分子标记 III。
Fig.6 Enzyme digestion analysis of recombinant plasmids with *Kpn*I and *Sac*I
1~4: Enzyme digest products of pGL3-Basic-PGPH α , pGL3-Basic-PGPH α 1, pGL3-Basic-PGPH α 2, pGL3-Basic-PGPH α 3, respectively; M: DNA marker III.

3 讨论

基因侧翼序列的克隆常采用基因组步移技术 (Genome walking), 以及一些改进的基于 PCR 方法的基因侧翼序列克隆技术, 如反向 PCR (Inverse PCR)^[21]、锅柄 PCR (Panhandle PCR)^[22]、热不对称 PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR)^[23]、多功能接头 PCR (Versatile PCR)^[24] 等, 但这些方法受到诸多因素限制, 如步移范围有限、特异性低 (尤其对于富含 GC 的启动子区)、依赖于特定的酶切图谱、酶切及连接反应操作烦琐等。本研究参考 Rudi 等^[25] 在 1999 年发表的非酶切 - 末端加尾法, 并加以改进, 成功克隆得到 1399 bp 的团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列。结果显示, 此方法特异

性高、周期短、并且避免了烦琐的酶切、消化及连接反应操作。

目前,在 GenBank 中,只存在鲤 PGPH α 亚基基因的报道(注册号 X56497);并且所报道的序列中不含有 5' 端侧翼序列。因此,本研究将所得到的团头鲂 PGPH α 亚基基因第 1 个外显子、第 1 个内含子以及第 2 个外显子的部分序列与鲤第 1 个外显子、第 1 个内含子以及第 2 个外显子的部分序列进行了比对(图 7),结果显示,它们之间具有较高的同源性(79.3%)。这说明通过本研究获得了团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列。

基因侧翼序列的生物信息学分析是研究特定基因转录调控机制的重要手段,可以通过对基因侧翼序列中存在顺式或反式元件的分析,初步判定影响该基因转录的各种因素。本研究利用生物信息学对克隆所得到的 1 399 bp 的团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列进行了分析,结果表明,在团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列中存在 4 处潜在的启动子区域,其中 -40~10 bp 预测区域所显示的转录起始位点与本实验室利用 RACE 法克隆到的团头鲂 PGPH α 亚基 cDNA 结果(待发表)一致,可以确定 -40~10 bp 即为团头鲂 PGPH α 亚基基因启动子区域。

在克隆所得团头鲂 PGPH α 亚基 5' 端侧翼序列中 TATA 盒及 GC 盒分别位于转录起始位点上游 30 bp 和 49 bp 处。TATA 盒一般位于起始位点上游 25~30 bp 处,保证精确起始。当 TATA 盒的序列因发生突变或缺失而改变时,会影响与转录酶的结合能力,从而影响转录速率^[26]。但是,有很多基因的启动子序列中缺少 TATA 盒,却含有多个转录起始位点及 SP1 结合位点,SP1 在这些启动子中指导前起始复合体的形成^[26]。GC 盒和 CAAT 盒则主要控制转录起始的频率,特别是 CAAT 盒对转录起始频率的作用更大。在团头鲂 PGPH α 亚基基因转录起始位点附近未发现 CAAT 盒,但在 -1 378~-1 364 bp 处的反义链上存在一个 CTF(CCAAT-binding transcription factor)结合位点,

此位点是否影响团头鲂 PGPH α 亚基基因的转录调控还有待研究。

LHX3 是转录因子 LIM 同源结构域家族成员之一,存在于多种垂体细胞中,能与 PGPH α 亚基基因启动子结合,增强其启动子活性。Bach I. 等将构建的含有鼠 PGPH α 亚基基因启动子的荧光素酶报告基因载体与 LHX3 表达载体共转染非洲绿猴肾细胞 CV-1,发现 LHX3 能使 PGPH α 亚基基因启动子活性增强 6~10 倍^[27]。另一方面,LHX3 在 PGPH α 亚基基因启动子对丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号途径做出应答的过程中也起着重要的作用^[28]。在团头鲂 1 399 bp 的 PGPH α 亚基基因调控序列中有 3 个潜在的 LHX3 结合位点,分别位于 -162~-148 bp、-518~-504 bp 及 -10 275~-1 013 bp 处,这些位点是否都影响团头鲂 PGPH α 亚基基因的表达调控也有待研究。

促性腺细胞特异元件(Gonadotrope-specific element, GSE)是转录因子 SF-1 的结合位点,团头鲂 PGPH α 5' 端侧翼序列中 GSE 位于 -110~-101 bp 处。在人 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼序列中,GSE 位于 -225~-200 bp 处,这一区域的缺失或突变能明显降低促性腺细胞中 α 亚基基因启动子的基础转录活性,但不影响 α 亚基在促甲状腺细胞及胎盘细胞中的表达^[6,10]。在垂体中,SF-1 只在促性腺细胞中有表达,能够促进 PGPH α 及 LH β 的表达^[10,29-31],但对 FSH β 的表达没有影响^[32]。-273~-257 bp 处反义链上存在一个 Ptx-1 结合位点,此转录因子在垂体细胞中均有表达,对大多数垂体激素基因启动子的活性都有显著增强作用,如 PGPH α 、LH β 、FSH β 、TSH β 、催乳素、促性腺激素释放激素受体等^[32]。

基于上述对 PGPH α 亚基基因转录调控的分析,本研究构建了团头鲂 PGPH α 亚基基因 5' 端侧翼区的缺失表达载体,为下一步研究调控元件对团头鲂 PGPH α 亚基基因转录调控的分子机制提供了基础。

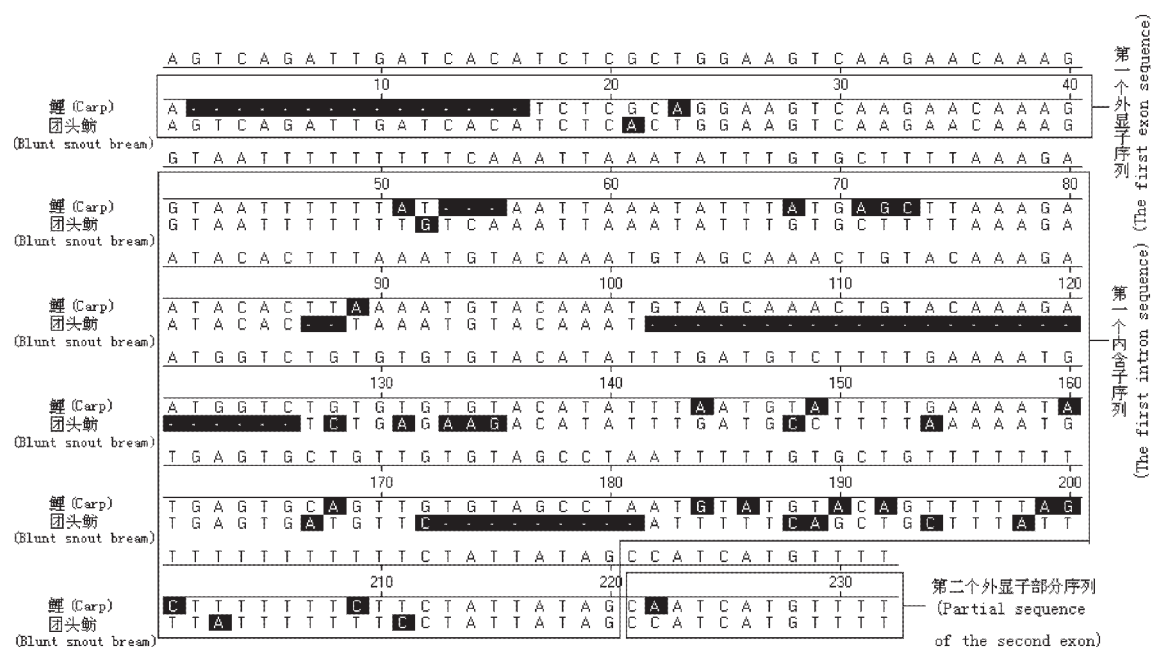


图7 团头鲂和鲤 PGPH α 亚基基因第1个外显子、第1个内含子及第2个外显子部分序列比对结果

Fig.7 Sequence alignment of exon 1, intron 1 and part of exon 2 of blunt snout bream and carp PGPH α subunit gene

参考文献:

- [1] Pierce J G, Parsons T F. Glycoprotein hormones: structure and function [J]. Annu Rev Biochem, 1981, 50: 465-495.
- [2] Gupta C S, Dighe R R. Biological activity of single chain chorionic gonadotropin, hCG $\alpha\beta$, is decreased upon deletion of five carboxyl terminal amino acids of the α subunit without affecting its receptor binding [J]. J Mol Endocrinol, 2000, 24: 157-164.
- [3] Suzuki K, Kawuchi H, Nagahama Y. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands [J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 71: 292-301.
- [4] Rosenfeld H, Levavi S B, Gur G, et al. Characterization of tilapia FSH β gene and analysis of its 5' flanking region [J]. Comp Biochem Physiol B, 2001, 129: 389-398.
- [5] 姚泰. 生理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 5: 387.
- [6] Heckert L L, Schultz K, Nilson J H. Different composite regulatory elements direct expression of the human α subunit gene to pituitary and placenta [J]. J Biol Chem, 1995, 270: 26 497-26 504.
- [7] Steger D J, Hecht J H, Mellon P L. GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin α -subunit gene in the placenta and pituitary gland [J]. Mol Cell Biol, 1994, 14: 5 592-5 602.
- [8] Schoderbek W E, Kim K E, Ridgway E C, et al. Analysis of DNA sequences required for pituitary-specific expression of the glycoprotein hormone α -subunit gene [J]. Mol Endocrinol, 1992, 6: 893-903.
- [9] Roberson M S, Schoderbek W E, Tremml G, et al. Activation of the glycoprotein hormone α -subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor [J]. Mol Cell Biol, 1994, 14: 2 985-2 993.
- [10] Horn E, Windle J J, Barnhart K M, et al. Tissue-specific gene expression in the pituitary: the glycoprotein hormone α -subunit gene is regulated by a gonadotrope-specific protein [J]. Mol Cell Biol, 1992, 12: 2 143-2 153.
- [11] Heckert L L, Schultz K, Nilson J H. The cAMP response elements of the α subunit gene bind similar proteins in trophoblasts and gonadotropes but have distinct functional sequence requirements [J]. J Biol Chem, 1996, 271: 31 650-31 656.
- [12] Bokar J A, Keri R A, Farmerie T A, et al. Expression of the glycoprotein hormone α -subunit gene in the placenta requires a functional cyclic AMP response element, whereas a different cis-acting element mediates pituitary-specific expression [J].

- Mol Cell Biol, 1989, 9: 5 113 5 122.
- [13] Jameson J L, Powers A C, Gallagher G D, et al. Enhancer and promoter element interactions dictate cyclic adenosine monophosphate mediated and cell-specific expression of the glycoprotein hormone α -gene [J]. Mol Endocrinol, 1989, 3: 763-772.
- [14] Chang Y S, Huang F L, Lo T B. Isolation and sequence analysis of carp gonadotropin β -subunit gene [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1992, 1: 97-105.
- [15] Xiong F, Liu D, Elsholtz, H P, et al. The chinook salmon gonadotropin II β -subunit gene contains a strong minimal promoter with a proximal negative element [J]. Mol Endocrinol, 1994, 8: 771-781.
- [16] Sohn Y C, Suetake H, Yoshiura Y, et al. Structural and expression analysis of gonadotropin I β -subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Gene, 1998, 222: 257 267.
- [17] Sohn Y C, Yoshiura Y, Suetake H, et al. Nucleotide sequence of gonadotropin II β -subunit gene in goldfish [J]. Fish Sci, 1999, 65: 800 801.
- [18] http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
- [19] http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba_2_1.htm
- [20] <http://www.genomatix.de/>
- [21] Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetic application of an inverse polymerase chain reaction [J]. Genetics, 1988, 120: 621-623.
- [22] Jones D H, Winistorfer S C. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA [J]. Nucl Acid Res, 1992, 20: 595-600.
- [23] Liu Y G, Whittler R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from PI and YAC clones for chromosome walking [J]. Genome, 1995, 25: 674 681.
- [24] Nthangeni M B, Ramagoma F, Tlou M G, et al. Development of a versatile cassette for directional genome walking using cassette ligation-mediated PCR and its application in the cloning of complete lipolytic genes from Bacillus species [J]. J Micro Meth, 2005, 61: 225 234.
- [25] Rudi K, Fossheim T, Jakobsen K S. Restriction cutting independent method for cloning genomic DNA segments outside the boundaries of known sequences [J]. Biotechniques, 1999, 27 (6): 1 170-1 177.
- [26] 凯里 M, 斯梅尔 S T. 陈晓红等译. 真核生物转录调控—概念、策略与方法 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 10.
- [27] Bach I, Rhodes S J, Pearse II R V, et al. P-lim, a lim homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with pit-1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92: 2 720-2 724.
- [28] Denis J G, Richard A M. MRG1 binds to the LIM domain of Lhx2 and May function as a coactivator to stimulate glycoprotein hormone α -subunit gene expression [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (51): 36 159 36 167.
- [29] Barnhart K M, Mellon P L. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone α -subunit gene in pituitary gonadotropes [J]. Mol Endocrinol, 1996, 8: 878-885.
- [30] Halvorson L M, Kaiser U B, Chin W W. Stimulation of luteinizing hormone β gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1 [J]. J Biol Chem, 1996, 271: 6 645-6 649.
- [31] Keri R A, Nilson J H. A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone β subunit promoter in gonadotropes of transgenic mice [J]. J Biol Chem, 1996, 271: 10 782-10 785.
- [32] Tremblay J J, Lanctôt C, Drouin J. The pan-Pituitary Activator of Transcription, Ptx1 (Pituitary Homeobox 1), Acts in Synergy with SF-1 and Pit1 and Is an Upstream Regulator of the Lim-Homeodomain Gene Lim3/Lhx3 [J]. Mol Endocrinol, 1998, 12 (3): 428 441.

Molecular cloning of 5' flanking region of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) pituitary glycoprotein hormone α subunit gene and construction of expression vector

QU Xian-cheng, ZHOU Zheng-feng, CUI Yan-hui, LIU Ying, HU Ping-hua, JIN Yi-chun, SHANG Jing-jin
(Shanghai Ocean University, Shanghai 200090)

Abstract: The pituitary follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing-hormone (LH), thyroid-stimulating hormone (TSH) and human chorionic gonadotropin (HCG) are members of glycoprotein family. In teleosts, as in other vertebrates, each glycoprotein hormone is non-covalently binded to form bioactive dimer molecules by α and β subunits. The α subunit is common and highly conserved; whereas β subunit is specific to each hormone and determines the specificity of hormone physiological processes. Nowadays, researches on the transcriptional molecular mechanism of mammiferous PGPH α have been reported comprehensively, but not in fishes. At present, genome walking and methods based on PCR technologies, such as inverse PCR, panhandle PCR, thermal asymmetric interlaced PCR etc, are usually used to clone the gene flanking region, but these methods are used restrictedly because of the low specificity, complexity to manipulation and some other vulnerabilities. In this study, the 5' flanking region of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) pituitary glycoprotein hormone α subunit (PGPH α) gene was cloned with an improved end tailed-PCR strategy, which was simple and not dependent on restriction cutting or mapping. In the first step of this method, a library of single-stranded flanking sequences was generated by linear amplification with one primer in the known region. A homooligomeric cytosine tail was added to each of the single-stranded fragments by a terminal transferase catalyzed reaction. The tailed fragments were then amplified by PCR with a nested primer in the known region and a poly-guanine primer complementary to the cytosine tail in the unknown region. Finally, the different fragments were separated by cloning and identified by sequencing. The cloned sequence was analyzed using bioinformatics tools. Then, on the basis of bioinformatics analysis, the luciferase expression vectors were constructed. Sequence analysis revealed that 5' flanking region of blunt snout bream PGPH α subunit gene is 1 399 bp containing potential TATA box, GC box and other binding sites, such as ERE, TRE, CRE, GSE, PGBE etc, for functional transcription factors played an important role in regulating transcription of PGPH α subunit gene. The promoter sequence was located on -40-10 bp. Based on the bioinformatical analysis, the full-length fragment of blunt snout bream 5' flanking region (-1 399-+40 bp) as well as a series of deletion fragments (-1 080-+40 bp, -492-+40 bp, -133-+40 bp) were amplified by PCR and these segments were fused to luciferase reporter vectors pGL3-Basic. Identified by restriction enzyme analysis and sequencing, luciferase plasmid expression vectors including the full-length and deletion fragments of blunt snout bream 5' flanking region were successfully constructed. It lays foundation for further research on molecular mechanism of PGPH α subunit gene transcriptional regulation in fishes. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (4): 550-558]

Key words: blunt snout bream; *Megalobrama amblycephala*; PGPH α subunit; 5' flanking region; promoter; expression vector