

## 团头鲂促性腺激素 GtH II $\beta$ 亚基基因 5' 端启动子区克隆及表达载体构建

曲宪成<sup>1</sup>, 崔严慧<sup>1</sup>, 周正峰<sup>1</sup>, 曲学伟<sup>2</sup>, 金一春<sup>1</sup>, 胡萍华<sup>1</sup>, 尚晓莉<sup>1</sup>, 程翠<sup>1</sup>, 张开岳<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 蒋骄云<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 烟台市牟平区渔业技术服务中心, 山东 烟台 264100)

**摘要:** 利用改进的锚定 PCR 方法克隆了团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 促性腺激素 II $\beta$  (GtH II $\beta$ ) 亚基基因 5' 端侧翼序列, 并在生物信息学方法分析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: 克隆得到的 GtH II $\beta$  亚基基因 5' 端侧翼序列长度为 1 354 bp, 其中包括 TATA 盒、ERE、ARE、PRE、GRE、LHX3、SF-1、Sp1、Pit-1、NF-Y 和 AP1 等可能对 GtH II $\beta$  亚基基因转录调控起重要作用的功能转录因子结合位点; 转录起始位点位于 -40 ~ 10 bp。进一步利用 PCR 方法扩增得到了 811 bp (-771 ~ +40 bp)、601 bp (-561 ~ +40 bp)、386 bp (-346 ~ +40 bp)、239 bp (-199 ~ +40 bp) 和 98 bp (-58 ~ +40 bp) 的 5 个缺失片段, 并同全长片段一起分别连接至 pGL3-Basic 报告基因载体, 成功构建了团头鲂 GtH II $\beta$  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依据。[ 中国水产科学, 2010, 17 (4): 649-658 ]

**关键词:** 团头鲂; 促性腺激素 II $\beta$  亚基; 5' 侧翼序列; 启动子; 表达载体

**中图分类号:** Q959; S96

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2010)04-0649-10

与其他脊椎动物一样, 鱼类的促性腺激素 (Gonadotropin hormone, GtH) 由腺垂体分泌, 对性腺发育、成熟以及生殖活动起重要的调控作用。鱼类存在 2 种 GtH, 即 GtH I 和 GtH II<sup>[1]</sup>, 一般认为 GtH I 和 GtH II 分别对应于哺乳动物中的促滤泡激素 (Follicle-stimulating hormone, FSH) 和促黄体激素 (Luteinizing-hormone, LH)<sup>[2]</sup>。FSH、LH、促甲状腺激素 (Thyroid-stimulating hormone, TSH) 以及绒毛膜促性腺激素是糖蛋白激素家族成员。每种糖蛋白激素都是由  $\alpha$  和  $\beta$  2 个亚基组成, 其中在每种动物中  $\alpha$  亚基是相同的, 而  $\beta$  亚基都是不同的, 正是  $\beta$  亚基的特异性决定了这些激素不同的生物活性, 二者以非共价键结合, 形成具有生物活性的异源二聚体糖蛋白。

在鱼类中, GtH I 是在配子形成的早期, 即卵黄和精子生成阶段发挥作用; GtH II 是在配子形成后期, 即卵母细胞和精子成熟阶段发挥重要的作

用<sup>[3-4]</sup>。在一些鱼类<sup>[5-6]</sup>中 GtH I 和 GtH II 都能在体外诱导卵巢组织生成 17 $\beta$ -雌二醇, 如银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 在体外培养条件下, GtH I 和 GtH II 都能诱导精巢组织产生 11-酮基睾酮<sup>[7]</sup>。相比之下, 只有 GtH II 能够在体外条件下诱导生成成熟类固醇激素: 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -二羟黄体酮或 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -三羟黄体酮, 从而使得滤泡膜裂解形成成熟的卵母细胞<sup>[5-6]</sup>。所以, GtH II 的主要作用是在卵黄生成完成之后, 刺激滤泡细胞产生 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -二羟黄体酮或 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -三羟黄体酮, 以促使卵子和精子的最终成熟。

鱼类的正常繁殖生理活动需要对 GtH I $\beta$ 、GtH II $\beta$  和  $\alpha$ -糖蛋白亚基基因转录、翻译等进行协同调控, 保证 GtH I 和 GtH II 在不同时期的合成和分泌, 以完成个体在不同的发育时期的调控机能。但迄今, 对 GtH 调控的潜在分子机制尚不十分清楚。目

收稿日期: 2009-09-11; 修订日期: 2010-01-11.

基金项目: 上海市重点学科建设项目 (S30701).

作者简介: 曲宪成 (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: 021-61900418; E-mail: xcqu@shou.edu.cn

前的研究已表明,每个异源二聚体糖蛋白激素在基因表达、生物合成和最终分泌方面都有各自不同的途径<sup>[8]</sup>。Albanese等<sup>[9]</sup>认为,在2种不同的垂体细胞(GtH分泌细胞和TSH分泌细胞)中, $\alpha$ 亚基的表达是过量的,而 $\beta$ 亚基则在各自不同的细胞中有限表达。因此,对于 $\beta$ 亚基基因的转录调控机制的研究显得尤为重要。

目前,关于哺乳动物LH $\beta$ 亚基基因启动子序列已有很多相关报道,如人、小鼠、大鼠、牛、兔、绵羊等<sup>[10]</sup>。将这5种哺乳动物的部分启动子序列(转录起始位点之前-180 bp)进行比对,发现其序列同源性很高、并且存在一些共同的潜在转录因子结合位点,例如:SF-1(Steroidogenic factor-1)、Egr-1(early growth response protein 1)和Ptx1(Pituitary homeobox factor 1)等<sup>[10]</sup>。相比而言,关于硬骨鱼类GtH II $\beta$ 亚基基因转录调控机制研究的报道相对较少。Xiong等<sup>[11]</sup>、Chang等<sup>[12]</sup>、Sohn等<sup>[13]</sup>、Rosenfeld等<sup>[14]</sup>分别在大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、金鱼和罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)中克隆得到了GtH II $\beta$ 亚基基因的5'侧翼序列。序列分析表明,这些基因的5'端侧翼序列中都存在潜在的顺式作用元件,但是其间的分布却各不相同。大鳞大麻哈鱼5'端侧翼序列中含有一个完整的具有回文结构的ERE作用元件和几个半ERE作用元件<sup>[11]</sup>,而罗非鱼、金鱼和鲤的5'端侧翼序列中只含有几个半ERE作用元件。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)作为中国目前主要养殖对象之一,国内研究者先后对团头鲂甲状腺激素和雄性激素浓度的周年变化以及GtH细胞的电镜观察等方面进行了研究,但没有关于团头鲂GtH II $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列研究的报道。本研究在本实验室已经获得了团头鲂脑垂体中GtH II $\beta$ 亚基cDNA序列<sup>[15]</sup>的基础上,利用PCR-末端加尾法克隆了团头鲂GtH II $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列;然后通过生物信息学手段对该序列进行分析,并根据分析结果构建了缺失表达载体,以便为进一步研究团头鲂GtH II $\beta$ 亚基基因的转录调控机制提供基础依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用团头鲂购于上海松江水产良种场。主要实验试剂:末端转移酶(TdT)、dNTP、dCTP、Ex Taq、DNA回收试剂盒、pMD18-T载体、KpnI和SacI、T4 DNA连接酶和100 bp DNA Marker购自TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司;饱和酚、酚-仿试剂、DNA marker II I、凝胶回收试剂盒和DH5 $\alpha$ 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、蛋白胨和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;小量质粒抽提试剂盒购自Axygen公司。本实验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 团头鲂基因组DNA的提取** 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  $\mu$ L裂解液(每1 mL裂解液含有1 mol/L Tris-HCl 50  $\mu$ L (pH 8.0),5 mol/L NaCl 20  $\mu$ L,10% SDS 100  $\mu$ L,0.5 mol/L EDTA 200  $\mu$ L (pH 8.0),双蒸水630  $\mu$ L)和2.5  $\mu$ 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  $\mu$ L RNase,再在37  $^{\circ}$ C孵育10 min。孵育结束后加入500  $\mu$ L饱和酚,上下翻转10 min,8 000 r/min离心5 min。取上清,加入500  $\mu$ L酚-仿溶液,上下翻转后,静置5 min,然后8 000 r/min离心5 min。再取上清,加入500  $\mu$ 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  $\mu$ 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,-20  $^{\circ}$ C保存备用。

**1.2.2 GtH II $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列的克隆** 本实验参考、并改进Rudi等<sup>[16]</sup>在1999年发表的锚定PCR法克隆已知片段侧翼序列的方法,克隆团头鲂GtH II $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列。主要步骤如下:

(1) 引物设计。根据已获得的GtH II $\beta$ 亚基第1个外显子到第2个外显子之间部分基因组序列设计基因特异性引物GSP1、GSP2和锚定引物(AAP)如下:

GSP1: 5'-GACAGGTGTCCCCGTTGCTCAGCAG-3'

GSP2: 5'-TCCCCGTTGCTCAGCAGGCTGT-3'

AAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACG16-3'

(2) PCR扩增。以提取的基因组DNA为模板进行PCR扩增。50  $\mu$ L反应体系如下: 灭菌的去离子水 23.82  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP mixture 4  $\mu$ L, 2  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L GSP1, 基因组DNA 14.93  $\mu$ L, Ex *Taq* 0.25  $\mu$ L (5 U/ $\mu$ L)。PCR反应程序如下: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 35 s, 64.2  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 4 min, 40个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸10 min; 4  $^{\circ}$ C保存。PCR扩增产物经试剂盒回收后, 用30  $\mu$ L灭菌去离子水溶解。

(3) 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  $\mu$ L加尾反应体系如下: 5 $\times$ TdT buffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dCTP 1.25  $\mu$ L, 0.1% BSA 2.5  $\mu$ L, PCR产物 15.75  $\mu$ L, TdT (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C反应30 min后, 75  $^{\circ}$ C 10 min灭活。

(4) 巢式PCR扩增。以加尾产物为模板, 用GSP2和AAP进行PCR扩增。50  $\mu$ L反应体系如下: 双蒸水 34.35  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP mixture 4  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L GSP2 2  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L AAP 2  $\mu$ L, 加尾产物 2.4  $\mu$ L, Ex *Taq* 0.25  $\mu$ L (5 U/ $\mu$ L)。PCR反应程序如下: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 35 s, 67.0  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 4 min, 40个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸10 min; 4  $^{\circ}$ C保存。

(5) 克隆测序。巢式PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳纯化回收后, 与pMD18-T载体相连。然后转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 平板培养, 挑选单克隆菌落, 经PCR验证后送最长插入片段进行测序分析。测序由捷瑞生物工程(上海)有限公司完成。

**1.2.3 GtH II $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列分析** 克隆所得到的团头鲂GtH II $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列潜在转录起始区的预测采用在线分析工具NNPP (Neural Network Promoter Prediction); GtH II $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列潜在转录因子结合位点预测采用AliBaba2.1、TESS和MatInspector, 预测所用参数均采

用在线默认设置。在线网址如下:

TESS: <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess?RQ=WELCOME>

NNPP: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)

AliBaba 2: [http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba\\_2\\_1.htm](http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba_2_1.htm)

MatInspector: <http://www.genomatix.de/>

另外, 团头鲂GtH II $\beta$ 亚基基因部分序列和团头鲂GtH II $\beta$  cDNA部分序列, 以及团头鲂和鲤鱼GtH II $\beta$ 亚基基因5'端侧翼部分序列比对运用DNASar进行分析。

**1.2.4 缺失质粒表达载体的构建** 对克隆所得到的GtH II $\beta$  5'端侧翼序列进行生物信息学分析, 在分析结果的基础上为分析侧翼序列顺式反应元件活性, 并考虑分析NF-Y (CCAAT-binding factor, CBF)、Pit-1a (Pituitary-specific factor 1)、ERE (Estrogen responsive element)、PRE (Progesterone receptor element)、ARE (Androgen-responsive element)、GRE (Glucocorticoid response element)、SF-1、LHX3 (Lim-homeodomain gene 3) 和Sp1 (Stimulating protein 1) 等转录因子对团头鲂GtH I $\beta$ 亚基基因转录调控的影响。利用引物P1-P7; P2-P7; P3-P7; P4-P7; P5-P7和P6-P7扩增缺失片段, 并且使获得的产物与pGL3-Basic载体相连, 构建了全长和5个缺失表达载体(包括转录起始位点下游41 bp), 分别称为pGL3-Basic-GtH II $\beta$ , pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D1, pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D2, pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D3, pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D4和pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D5。

上游和下游引物序列如下:

上游引物P1: 5'-GGTACCTTTGGTTCTGTGCCTCCCTTGACG-3'

上游引物P2: 5'-GGTACCGCTGAACCTCAAAGTTGGCAGCC-3'

上游引物P3: 5'-GGTACCGCGCTATACAAATAAATGTGAATTGAATCC-3'

上游引物P4: 5'-GGTACCGCAAACACTAATGA



ACTCGCTTACAG-3'

上游引物 P5 : 5'-GGTACCCTGTCCAAAGCAAC  
ACTGAATGCACAG-3'

上游引物 P6 : 5'-GGTACCGTTTAATTGTTGGTT  
ACCGCTTACAG-3' ;

下游引物 P7 : 5'-GAGCTCTTGACAGGTGTCCC  
CGTTGCT-3'

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 进行酶切。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 $\alpha$ , 进行平板培养。挑取单克隆菌落,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1 000~2 000 bp之间形成弥散状条带,回收1 000~1 500 bp的PCR扩增产物,并与pMD18-T载体连接后,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 然后进行单克隆插入片段大小检测。最后,送较长片段样本测序。测序结果显示,获得的团头鲂 *GtH* II $\beta$  亚基基因5'端侧翼序列为1 354 bp(图1)。

### 2.2 *GtH* II $\beta$ 亚基基因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 *GtH* II $\beta$  亚基基因5'端侧翼序列中存在多处转录起始位点。可能的转录起始位点在图2中用大号字体标出。

采用 TESS、AliBaba2.1 和 MatInspector 对潜在转录因子结合位点进行预测结果(图1)。在克隆所得到的团头鲂 *GtH* II $\beta$  亚基基因5'端侧翼序列中,存在 TATA 盒、ERE、ARE、PRE、GRE、LHX3、SF-1、Sp1、Pit-1、NF-Y 和 AP1 (Activating protein-1) 等主要反应元件。

### 2.3 重组质粒载体

利用6对引物,通过PCR扩增,分别得到1 354 bp 全长、771 bp、561 bp、346 bp、199 bp 及 58 bp 的缺失片段。对所构建的 pGL3-Basic-*GtH* II $\beta$  (含

1 354 bp 的全长), pGL3-Basic-*GtH* II $\beta$  D1 (含 771 bp 的缺失片段), pGL3-Basic-*GtH* II $\beta$  D2 (含 561 bp 的缺失片段), pGL3-Basic-*GtH* II $\beta$  D3 (含 346 bp 的缺失片段), pGL3-Basic-*GtH* II $\beta$  D4 (含 199 bp 的缺失片段) 和 pGL3-Basic-*GtH* II $\beta$  D5 (含 58 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(图3)。同时也对其进行了测序分析。结果显示全长及缺失片段与克隆所得到的序列完全一致。

## 3 讨论

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作用元件的分析,可初步判定影响该基因转录的各种因子。作者利用生物信息在线分析工具对团头鲂 *GtH* II $\beta$  亚基基因5'端侧翼序列进行了分析,结果显示:-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 *GtH* II $\beta$  亚基 cDNA 结果一致<sup>[15]</sup>。并且,在团头鲂 *GtH* II $\beta$  亚基基因5'端侧翼序列含有多个潜在的转录因子结合位点,包括 TATA 盒;一般性转录因子结合位点,如 AP-1、SP-1、NF-Y、NF-1 (Nuclear factor-1) 和 GATA-1 (GATA-binding factor 1); 以及 GRE、ERE、ARE 和 PRE 等。

分析发现,在团头鲂 *GtH* II $\beta$  亚基基因5'端侧翼序列中,TATA 框位于转录起始位点上游 30 bp 处,保证基因转录的精确起始。将克隆得到的团头鲂 *GtH* II $\beta$  亚基基因5'端侧翼序列与 GenBank 中金鱼的 *GtH* II $\beta$  亚基基因5'端侧翼序列进行了比对(图4)。结果显示:在-360 bp 内,两序列有较高同源性,这一点与哺乳动物类似。Suzuki 等<sup>[10]</sup> 将5种哺乳动物的 LH  $\beta$  5'侧翼-200 bp 序列比对结果显示序列间同源性很高,并且含有一些共同的转录元件,如 SF-1、Egr-1 和 Ptx1。由于这些元件高度一致地出现在调控序列中,因此认为其相应的转录因子对哺乳动物促性腺激素的转录调节将有重要作用。

性类固醇激素在脑-垂体-性腺轴中发挥重要的调节作用。雌二醇的效应也发生在含有大量芳香

```

- 1354 tttggttctgtgacctcccttgacgagccgcccactgcgatttattcatctt
- 1304 caagttgttccaaacctgtatgaatttctttcttctgttgaaacacaaaag
- 1254 aagatattttgaagaatgtctgttaaccaaacagttgatgaaccccaatga
                                     NF-Y*
- 1204 cctccatttttgaaatagacagccttgtaaacaatgtcacataatgttacat
                                     Pit-1a
- 1154 tcatgtcattctgaccataactcaataactatctagaaagatgaactc
      1/2AP-1*
- 1104 taaagaggagcatttttcaaaacatatatgcactattttacatgtttcatt
- 1054 atatttttactcttattaaaattccactgtagccctatacttaatatataca
- 1004 atgaattcagtattgattagaattgaatttagatcagaattgaagcttagg
      1/2AP-1
- 954 aattgaaataaaaattgtgaaaactctaatataaacacagtaccctttatt
- 904 gtaccaagcagccataaacattgtaacatgtttgtcagtaaaccaaatgttt
- 854 gaaaatcacaaatacacttctgtgtatgcagtgtttttgtgtttgtcacac
- 804 cctgcaccccaatacgaataattctcactctaagctgaacttcaaaagttg
                                     NF-Y*
- 754 gcagccctatactgtgaaatcatactgtaactgtgagaagctttttaaagg
                                     ERE
- 704 ctgctacacactttttaaaaataggctcaaaaaggcggtttcacagcagt
                                     Sp1
- 654 gccacagaataaccatttttgttctccaaagatcctgtaatgttgacatg
                                     PRE
- 604 cattttctgtaaagctgttttgaaacaatacgtattttgaaaagcgctat
- 554 acaaataaatgtgaattgaaatcctttcagcaaatagttcttaaaagggaac
- 504 ctttttttcttggtgtgaagaaacaaaatctagaaccttttccactata
                                     ARE*
                                     NF-1
- 454 aagaacatttggaatagaaaatgggaatggaaagggttcattgatgacaa
                                     Pit-1a*
- 404 aaaagaacctttatttttaagagtgtatacagtatgatgtttgagtgttc
                                     GRE
- 354 actgccttgcaaacactaatgaactcgccttacagtgaatctgagagcag
      GRE
                                     SP1
- 304 ggccttagaccttgatcatttcctgacctgcgtttaacacagaggccatg
      SF-1*
- 254 gaactgaatttagctccacttaatactccatttttagatgagataaaaggac
      Pit-1a*
                                     GATA1
- 204 atgaaactgtccaaagcaaacactgaatgcacagcagggtgtcttttatctg
- 154 ttcattgctgacctgacaaatttaatagttggttacatgagaatggaaaca
                                     LHX3
- 104 cataatccacttgagatcagagtgattaatttaagggtcagattttagttt
                                     LHX3
- 54 aattgttggttacccgttacagtatataaatgtagccagatgctctgtgt
      TATA
-4 ctgaAcacatctaacagccctgctgagcaacgggga
+1

```

图1 团头鲂 GtH II $\beta$  亚基因 5' 端侧翼序列以及对潜在转录因子结合位点进行预测结果  
转录因子结合位点用方框或下划线标明; \* 表示结合位点位于反义链上; +1 所示为转录起始位点。

Fig. 1 The 5' flanking region of the blunt snout bream GtH II $\beta$  subunit 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.

化酶的脑中,并参与改变 GnRH 的脉冲释放。早期研究认为,雌二醇直接对 LH 起正向调控作用<sup>[17-18]</sup>,但研究结果显示:尽管哺乳动物中间的近端启动子区具有高度的同源性,但都缺少 ERE 一致序列,而仅是在大鼠 LH $\beta$  亚基因的 5' 侧翼区末端有一个能够结合 ER 的 ERE 近似序列<sup>[19]</sup>。并且近期的研究表

明,ER $\alpha$  配合体与 LH $\beta$  近端启动子相关联,但这一关联是间接产生的,并且与 SF-1 和 Pit-1 相互作用。在大麻哈鱼 LH $\beta$  基因的近端启动子区有一个近似的 ERE 元件,能够在促性腺细胞以及类似的非促性腺细胞中对 ER $\alpha$  的过量表达产生反馈<sup>[20]</sup>,在团头鲂的 GtH II $\beta$  亚基因的 -726 bp 存在一处 ERE,其是否

Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.80

(transcription start shown in larger font):

| Start | End  | Score | Promoter Sequence                                  |
|-------|------|-------|----------------------------------------------------|
| -723  | -673 | 0.89  | GTGAGAAAGCTTTTAAAGGCTGCTACACACTTTTAAAAATAGGCTCAAAA |
| -700  | -650 | 1.00  | TACACACTTTTAAAAATAGGCTCAAAAAGGCGGTTTCACAGCAGTGCCA  |
| -689  | -639 | 0.99  | AAAAATAGGCTCAAAAAGGCGGTTTCACAGCAGTGCCACAGAATAACCA  |
| -40   | 10   | 0.98  | GCTTACAGTATATAAATGTAGCCAGATGCTCTGTGTCTGAACACATCTAA |

图2 团头鲂GtH II $\beta$ 亚基因转录起始位点预测结果  
Fig. 2 Prediction result of transcription start site for the blunt snout bream GtH II $\beta$  subunit gene

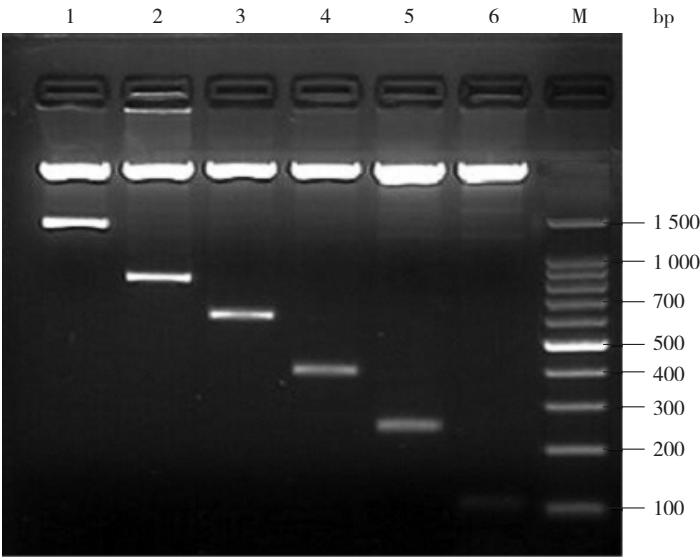


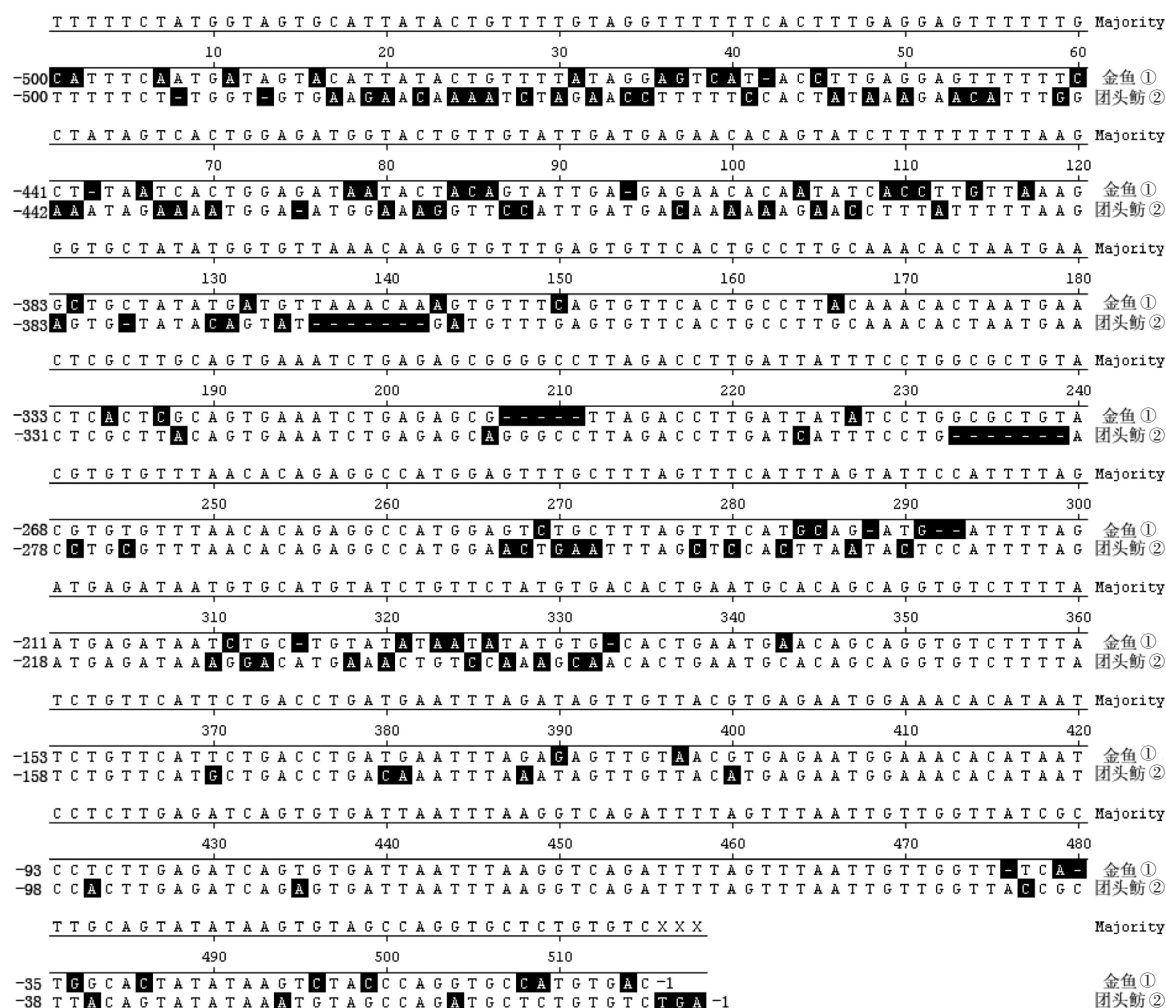
图3 表达载体的KpnI和SacI双酶切分析  
1-6: 分别为表达载体pGL3-Basic-GtH II $\beta$ 、pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D1、pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D2、pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D3、pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D4和pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D5的双酶切产物; M: 100 bpDNA分子量标记。  
Fig. 3 Enzyme digestion analysis of recombinant plasmids with KpnI and SacI  
1-6: Enzyme digestion products of pGL3-Basic-GtH II $\beta$ , pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D1, pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D2, pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D3, pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D4 and pGL3-Basic-GtH II $\beta$  D5, respectively; M: 100 bpDNA marker.

能够对雌二醇产生应答反应有待进一步的研究。

雄激素同样是在下丘脑-脑下垂体-性腺轴发挥重要的调节作用。对大鼠和牛LH $\beta$ 基因转录调控区的研究显示:雄激素受体(AR)通过不同的机制发挥作用。在牛LH $\beta$ 亚基因启动子区内,结合的AR与SF-1相互作用,这种作用需要AR蛋白中的DNA结合域(DNA binding domain, DBD)的参与。尽管在这一过程中AR不直接与DNA发生相互作用,但其DNA结合域参与AR与其他转录因子的蛋白相互作用,这种机制与AR对 $\alpha$ 亚基的抑制效应机制相似<sup>[21-22]</sup>。相比之下,AR对大鼠LH $\beta$ 亚基因

的调控作用依赖于近端启动子区Sp1和CArG位点的存在<sup>[23]</sup>。研究表明,孕酮可以激活FSH $\beta$ 亚基因的转录,过量表达的孕酮受体能够促进大鼠FSH $\beta$ 启动子的活性,这一应答反应被定位在大鼠启动子的3个区域中,包括PRE近似序列<sup>[24-26]</sup>。PR直接与PRE紧密结合,产生由孕酮引起的应答反应<sup>[27]</sup>。在团头鲂的启动子序列中,ARE位于-485 bp,PRE位于-635 bp,这些类固醇受体结合位点为今后研究类固醇激素在团头鲂促性腺细胞中的作用机制提供了依据。

糖皮质激素(glucocorticoid)由糖皮质激素受体



① *Carassius auratus*; ② *Megalobrama amblycephala*

图4 团头鲂与金鱼 GtH II $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列比对结果

Fig. 4 Sequence alignment of the 5' flanking region of GtH II $\beta$  subunit gene for the blunt snout bream and goldfish

(glucocorticoid receptor, GR) 介导而对靶基因发挥作用, 其中GR能够与一些特殊的神经肽和神经递质, 如PVN(室旁核)的 $\beta$ -END( $\beta$ -内啡肽)、NPY(神经肽Y)和CRH(促肾上腺皮质激素释放激素)共同作用, 调控LH的分泌<sup>[28]</sup>。对LH $\beta$ 亚基基因转录调控的研究发现, GR的功能与泛素的调控密切相关<sup>[29]</sup>, 其他研究也显示在泛素-蛋白酶途径中有多种酶作为共协调因子参与GR的调节活动<sup>[30-31]</sup>。对人类GnRH基因的研究发现其调控区存在GRE元件, 这一元件成为糖皮质激素对GnRH基因转录起调控作用的重要条件<sup>[32]</sup>。在团头鲂GtH II $\beta$ 启动区序列-359 bp处存在一个GRE, 其是否能够参与糖皮质激素调控

GtH II $\beta$ 基因的表达还有待进一步研究。并且, 团头鲂GRE只存在于GtH II $\beta$ 启动区, 在GtH I $\beta$ 启动区没有GRE反应元件<sup>[33]</sup>, 因此GRE在团头鲂性腺最终成熟过程中是否具有重要的作用也是下一步分析的重点之一。

SF-1属于孤儿核受体(orphan nuclear receptor)家族<sup>[34]</sup>, SF-1能够调控参与繁殖相关作用的基因表达, 对脑垂体中促性腺细胞的发育<sup>[35]</sup>, 促性腺激素细胞中糖蛋白激素 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基基因的表达起重要的作用<sup>[36-37]</sup>。SF-1基因缺失的转基因小鼠由于促性腺激素细胞发生受阻而不能够分泌LH和FSH<sup>[35]</sup>。在研究的硬骨鱼和哺乳动物中, 都存在SF-1结合位点。



近年研究表明:SF-1能够与其他因子共同作用调控GtH $\beta$ 亚基基因的表达<sup>[38]</sup>。Drean等<sup>[37]</sup>研究发现,在罗非鱼中,ER的存在使SF-1对GtH $\beta$ 启动子的激活作用显著增强;而在大鼠中,这2种转录因子都能分别促进LH启动子的转录活性,但不能协同促进其转录活性。在团头鲂GtH $\beta$ 启动区序列中,潜在的SF-1结合位点位于-295 bp处,其是否能在与靶蛋白结合后,促进基因的表达还有待进一步的深入研究。

LHX是含有LIM结构域和同源异型结构域的LIM同源异型结构域蛋白。在哺乳动物中,已经有12种属于LIM家族的转录因子得到证实。这些蛋白质支配着2个LIM同源结构域与DNA结合,其多功能结构使得能与配体蛋白相互作用从而调控靶基因的转录活性<sup>[39]</sup>。LIM同源结构域参与调控诸多内分泌系统和神经系统组织的发育,其mRNA编码形成许多蛋白成员,包括:ISL1、ISL2、LHX2、LHX3和LHX4,这些蛋白在垂体发育的过程中能被检测到<sup>[40]</sup>。其中LHX3能激活一些含有垂体激素和转录因子启动子的报告基因的转录,LHX3还能与Pit1或Pitx1共同作用促进基因转录<sup>[41-43]</sup>。在团头鲂GtH $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列中,分别在-81 bp和-136 bp处存在LHX3结合位点,其是否能显著促进GtH $\beta$ 亚基基因转录还有待进一步分析说明。

Pit-1属于POU同源域蛋白,是一种在垂体细胞中表达的特异性蛋白质,能够通过对生长激素、泌乳素以及TSH $\beta$ 亚基的转录活性调节来调控促甲状腺细胞、亲躯体细胞和泌乳素细胞的生长,但其在促性腺细胞中的作用尚未明确<sup>[44]</sup>。在团头鲂GtH $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列存在多处Pit-1a结合位点,其能否显著促进GtH $\beta$ 亚基基因转录还有待进一步分析说明。

NF-Y是广泛表达的异源三聚体转录因子,是许多基因中起重要作用的基础调控因子。尽管已知GATA-2和GATA-3转录因子参与糖蛋白激素 $\alpha$ 亚基基因的表达<sup>[45]</sup>,但是GATA-1是否参与 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基基因的转录尚不清楚。与哺乳动物相似,NF-1结合位

点也出现在团头鲂GtH $\beta$ 近端启动子区域中。作者认为,对以上所有潜在的顺式作用元件功能特征的研究将会显得更加重要。

综上所述,本实验克隆了1354 bp团头鲂GtH $\beta$ 亚基基因5'端侧翼序列。根据生物信息学分析,获得了可能对基因转录调控起重要作用的潜在的顺式作用元件,并构建了5个缺失某些重要反应元件的表达载体,为进一步研究这些转录因子对该基因转录调控的分子机制提供了前提基础。希望通过该内容的研究为进一步认识和理解团头鲂GtH $\beta$ 亚基基因的转录调控以及鱼类性腺最终成熟的分子机制。

#### 参考文献:

- [1] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999.
- [2] Li M D, Ford J J. A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the alpha- and beta-subunits of glycoprotein hormone gene family [J]. J Endocrinol, 1998, 156: 529-542.
- [3] Yaron Z, Gur G, Melamed P, et al. Regulation of fish gonadotropins [J]. Internat Rev Cytol, 2003, 225: 131-185.
- [4] Kobayashi M, Morita T, Ikeguchi K, et al. In vivo biological activity of recombinant goldfish gonadotropins produced by baculovirus in silkworm larvae [J]. Aquaculture, 2006, 256: 433-442.
- [5] Suzuki K, Nagahama Y, Kawauchi H. Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins [J]. Gen Compar Endocrinol, 1988b, 71: 452-458.
- [6] Okada T, Kawazoe I, Kimura S, et al. Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*) [J]. Intern J Pept Prot Res, 1994, 43: 69-80.
- [7] Planas J V, Swanson P. Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins, GTH I and GTH II. in vitro [J]. Biol Repr, 1995, 52: 697-704.
- [8] Kumar T R, Schuff K G, Nusser K D, et al. Gonadotroph-specific expression of the human follicle stimulating hormone  $\beta$  gene in transgenic mice [J]. Molec Cellul Endocrin, 2006, 247: 103-115.
- [9] Albanese C, Colin I M, Crowley W F, et al. The gonadotropin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control [J]. Rec Progr Horm Res, 1996, 51: 23-58.
- [10] Suzuki O, Koura M. Analyses of the cDNA and genomic DNA sequences encoding the luteinizing hormone  $\beta$ -subunit precursor protein in the rabbit [J]. Gen Comp Endocrin, 2007, 150: 514-519.



- [11] Xiong F, Liu D, Elsholtz HP, et al. The chinook salmon gonadotropin II b subunit gene contains a strong minimal promoter with a proximal negative element [J]. *Mol Endocrinol*, 1994, 8: 771–81.
- [12] Chang Y S, Huang F L, Lo T B. Isolation and sequence analysis of carp gonadotropin beta-subunit gene [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1992, 1: 97–105.
- [13] Sohn Y C, Yoshiura Y, Suetake H, et al. Nucleotide sequence of gonadotropin II-subunit gene in goldfish [J]. *Fish Sci*, 1999, 65: 800–801.
- [14] Rosenfeld H, Levavi-Sivan B, Melamed P, et al. The GtH-subunits of tilapia: gene cloning and expression [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1997, 17: 85–92.
- [15] 曲宪成, 刘颖, 杨艳红等. 团头鲂促性腺激素 $\beta$ 亚基 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31: 377–385.
- [16] 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): 1170–1177.
- [17] Gharib S D, Wierman M E, Shupnik M A, et al. Molecular biology of the pituitary gonadotropins [J]. *Endocr Rev*, 1990, 11: 177–199.
- [18] Keri R A, Wolfe M W, Saunders T L, et al. The proximal promoter of the bovine luteinizing hormone beta-subunit gene confers gonadotrope-specific expression and regulation by gonadotropin releasing hormone, testosterone, and 17 $\beta$ -estradiol in transgenic mice [J]. *Mol Endocrinol*, 1994, 8: 1807–1816.
- [19] Shupnik M A, Rosenzweig B A. Identification of an estrogenresponsive element in the rat LH beta gene. DNA-estrogen receptor interactions and functional analysis [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 17084–17091.
- [20] Luo M, Koh M, Feng J, et al. Cross talk in hormonally regulated gene transcription through induction of estrogen receptor ubiquitylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 7386–7398.
- [21] Jorgensen J S, Nilson J H. AR suppresses transcription of the alpha glycoprotein hormone subunit gene through protein-protein interactions with cJun and activation transcription factor 2 [J]. *Mol Endocrinol*, 2001a, 15: 1496–1504.
- [22] Jorgensen J S, Nilson J H. AR suppresses transcription of the LH beta subunit by interacting with steroidogenic factor-1 [J]. *Mol Endocrinol*, 2001b, 15: 1505–1516.
- [23] Curtin D, Jenkins S, Farmer N, et al. Androgen suppression of GnRH-stimulated rat LHbeta gene transcription occurs through Sp1 sites in the distal GnRH-responsive promoter region [J]. *Mol Endocrinol*, 2001, 15: 1906–1917.
- [24] Webster J C, Pedersen N R, Edwards D P, et al. The 5' -flanking region of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene contains six progesterone response elements: three proximal elements are sufficient to increase transcription in the presence of progesterone [J]. *Endocrinology*, 1995, 136: 1049–1058.
- [25] O'Conner J L, Wade M F, Prendergast P, et al. A 361 base pair region of the rat FSH- $\beta$  promoter contains multiple progesterone receptor-binding sequences and confers progesterone responsiveness [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 136: 67–78.
- [26] O'Conner J L, Wade M F, Edwards D P, et al. Progesterone and regulation of the follicle-stimulating hormone (FSH-beta) gene [J]. *Steroids*, 1999, 64: 592–597.
- [27] 王亚馥, 戴灼华, 遗传学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [28] Briski K P. Effects of peripheral versus central administration of the endogenous glucocorticoid, corticosterone, and the glucocorticoid receptor agonist, RU 28362, on LH release in male rats [J]. *Brian Res*, 1995, 670(1): 66–74.
- [29] Luo M, Koh M, Feng J, et al. Cross talk in hormonally regulated gene transcription through induction of estrogen receptor ubiquitylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 7386–7398.
- [30] Perissi V, Aggarwal A, Glass C K, et al. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors [J]. *Cell*, 2004, 116: 511–526.
- [31] Verma S, Ismail A, Gao X, et al. The ubiquitin-conjugating enzyme UBC7 acts as a coactivator for steroid hormone receptors [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 8716–8726.
- [32] Radovik S, Wondisford F E, Culter G B. Isolation and characterization of the human gonadotropin-releasing hormone gene in the hypothalamus and placenta [J]. *Mol Endocrinol*, 1990, 4(3): 476–480.
- [33] 曲宪成, 崔严慧, 周正峰等. 团头鲂促性腺激素 GtH I $\beta$  亚基因 5' 端启动子区克隆及表达载体构建 [J]. *水生生物学报*, 2008, 32: 558–567.
- [34] Parker K, Schimmer B. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function [J]. *Endocr Rev*, 1997, 18: 361–377.
- [35] Ingraham H A, Lala D S, Ikeda Y, et al. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis [J]. *Genes Development*, 1994, 8: 2302–2312.
- [36] Barnhart K M, Mellon P L. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene in pituitary gonadotropes [J]. *Mol Endocrinol*, 1994, 8: 878–885.
- [37] Drean Y L, Liu D, Xiong F, et al. Presence of distinct cis-acting elements on gonadotropin gene promoters in diverse species dictates the selective recruitment of different transcription factors by

- steroidogenic factor-1 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 135: 31–40.
- [38] Le Drean Y, Liu D, Xiong F, et al. Presence of distinct cis-acting element on gonadotropin gene promoter in diverse species dictates the selective recruitment of different transcription factors by steroidogenic factor-1 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 135: 31–40.
- [39] 程立波, 陈洁等, Lims E. 一个新的 LIM 同源域基因的克隆和初步分析[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2007, 27: 550–554.
- [40] Hobert O, Westphal H. Functions of LIM-homeobox genes [J]. *Trends Genet*, 2000, 16: 75–83.
- [41] Bach I, Rhodes S J, Pearce II, 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 U S A*, 1995, 92: 2720–2724.
- [42] Sloop K W, Meier B C, Bridwell J L, et al. Differential activation of pituitary hormone genes by human Lhx3 isoforms with distinct DNA binding properties [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13: 2212–2225.
- [43] Sloop K W, Parker G. E, Rhodes S J. Transcriptional regulation in mammalian pituitary development and disease [J]. *Curr Genom*, 2001c, 2: 379–398.
- [44] Zhu X, Lin C R, Prefontaine G G, et al. Genetic control of pituitary development and hypopituitarism [J]. *Curr Opin Gen Devel*, 2005, 15: 332–340.
- [45] Steger D J, Hecht J H, Mellon P L. GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin alpha-subunit gene in the placenta and pituitary gland [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1994, 14: 5592–5602.

## Molecular cloning and construction of expression vector of 5' flanking region in *Megalobrama amblycephala* gonadotropin II $\beta$ -subunit gene

QU Xiancheng<sup>1</sup>, CUI Yanhui<sup>1</sup>, ZHOU Zhengfeng<sup>1</sup>, QU Xuewei<sup>2</sup>, JIN Yichun<sup>1</sup>, HU Pinghua<sup>1</sup>, SHANG Xiaoli<sup>1</sup>, CHENG Cui<sup>1</sup>, ZHANG Kaiyue<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, JIANG Jiaoyun<sup>1</sup>

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Fisheries Technical Service Center of Muping District, Yantai 264100, China)

**Abstract:** In teleosts, as in other vertebrates, the pituitary gonadotropic hormones, GtH I and GtH II, play an important role in regulating gametogenesis. However, the mechanism of gonadotropin II  $\beta$ -subunit gene transcriptional regulation has not been thoroughly understood yet. The present study was to get basic information of the possible cis-acting elements that involved in transcriptional regulation of the GtH II  $\beta$  gene expression of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*), and provide preconditions for further research on the molecular mechanism of these cis-acting elements in the GtH II  $\beta$  gene transcriptional regulation. According to cDNA sequence information of blunt snout bream gonadotropin II  $\beta$ -subunit (bGtH II  $\beta$ ) gene, the 5' region of bGtH II  $\beta$  was cloned by a simple method for cloning genomic DNA segments outside the boundaries of known sequences. In the first step of the method, a library of single-stranded flanking sequences is generated by linear amplification with one primer in the known region. Then a homooligomeric cytosine tail is added to each of the single-stranded fragments by a terminal transferase catalyzed reaction. The tailed fragments are 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 are separated by cloning and characterized by sequencing. Sequence analysis reveals that the length of the 5' flanking region of bGtH II  $\beta$  gene is 1 354 bp and the region contains some potential transcription factors which may have important functions for the transcriptional regulation of the gene, such as ERE, ARE, PRE, GRE, LHX3, SF-1, Sp1, Pit-1, NF-Y, AP1 etc. And the promoter sequence is located on  $-40 \sim 10$  bp. Based on the above information, five partial deletion fragments as well as the full length of the 5' flanking region were cloned from the genome by PCR and linked to a luciferase reporter gene. These partial fragments contained 811bp ( $-771+40$  bp), 601 bp ( $-561+40$  bp), 386 bp ( $-346+40$  bp), 239 bp ( $-199+40$  bp) and 98 bp ( $-58+40$  bp), respectively. It lays foundation for further research on mechanism of GtH II  $\beta$  subunit gene transcriptional regulation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (4): 649–658]

**Key words:** *Megalobrama amblycephala*; GtH II  $\beta$  subunit; 5' flanking region; promoter; expression vector