

鸡肝脏胆汁酸结合蛋白基因启动子活性分析

王启贵^{1,2,3,4}, 高广亮^{1,2,3,4}, 马广伟^{1,2,3}, 张心扬^{1,2,3}, 李辉^{1,2,3}

(1. 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030; 3. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; 4. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460)

摘要: 研究对鸡肝脏胆汁酸结合蛋白基因(L-BABP)启动子活性进行研究。利用在线分析软件分析L-BABP基因启动子区, 发现CCAAT box(-306)、TATA box(-995)、GATA-1(-1844)和SRE(-1866)等调控元件, 没有发现CpG岛。扩增鸡L-BABP基因5'侧翼区约2 kb的DNA片段, 构建鸡L-BABP基因报告基因系列缺失载体。报告基因结果表明, 鸡L-BABP基因启动子-1 096/-66区域具有最强的启动子活性, -545/-62区域启动子活性最弱; C/EBP α 可以显著抑制鸡L-BABP基因的表达, 可为深入研究鸡L-BABP的表达调控机制奠定基础。

关键词: 鸡; 肝脏胆汁酸结合蛋白; 启动子; 活性分析

中图分类号: S767.5; X172 文献标志码: A 文章编号: 1005-9369(2014)04-0088-06

王启贵, 高广亮, 马广伟, 等. 鸡肝脏胆汁酸结合蛋白基因启动子活性分析[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(4): 88-93.

Wang Qigui, Gao Guangliang, Ma Guangwei, et al. Activity analysis of chicken liver bile acid binding protein gene promoter [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2014, 45(4): 88-93. (in Chinese with English abstract)

Activity analysis of chicken liver bile acid binding protein gene promoter/WANG Qigui^{1,2,3,4}, GAO Guangliang^{1,2,3,4}, MA Guangwei^{1,2,3}, ZHANG Xinyang^{1,2,3}, LI Hui^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China; 2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China; 3. School of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 4. Chongqing Academy of Animal Science, Chongqing 402460, China)

Abstract: The objective of this study was to analyze the promoter structure and activity of the chicken liver bile acid binding protein (L-BABP) gene. Bioinformatics analysis revealed that the chicken L-BABP gene promoter fragment included HNF-1, SREBP-1, AP-1, C/EBP, Oct-1, TATA, CCAAT, GATA-1 and other regulatory elements binding sites and the gene promoter region cannot find CpG islands. The 5' flanking 2 kb of chicken L-BABP gene was amplified by PCR, cloned and sequenced. A series of recombination plasmids of L-BABP gene were constructed and transiently transfected into Human hepatoma cell line 2 (HEPG2). Then their luciferase activity was measured by dual luciferase reporter gene assay system. The activity of the promoter region analysis by Luciferase reporter assays demonstrated that promoter region (-1 096/-66) was strongest promoter activity and the promoter region (-545/-62) was worse, and C/EBP could repress the chicken L-BABP gene expression. This study will provide the foundation for in-depth study of the chicken L-BABP gene expression regulation mechanism.

Key words: chicken; L-BABP; promoter; activity analysis

收稿日期: 2013-07-21

基金项目: 国家自然科学基金(30972087); 现代农业产业技术体系建设项目(CARS-42); 黑龙江省高等学校科技创新团队建设项目(2010td02)

作者简介: 王启贵(1974-), 男, 教授, 博士, 研究方向为分子遗传学。E-mail: wangqigui@hotmail.com

脂肪酸结合蛋白家族(Fatty acid binding proteins, FABPs)对细胞内脂肪酸的运输起重要作用^[1-3],通过与脂肪酸结合增加脂肪酸可溶性,并将其运输到线粒体、过氧化氢酶体等位置进行氧化,内质网等位置酯化成甘油三酯或磷脂^[4]。肝脏型胆汁酸结合蛋白(Liver bile acid binding protein, L-BABP)属于FABPs中一员,对脂肪酸结合能力较弱,而对胆汁酸具有较强亲和力,且能够结合两分子胆汁酸^[5-6],该基因特异地存在禽类肝脏组织中^[7]。禽类胆固醇在肝脏中可分解为胆汁酸,所以胆汁酸对日粮中脂肪消化和吸收有重要影响^[8],胆固醇经肝左右管、肝总管、胆总管,进入十二指肠,参加消化,小肠中的胆汁酸被重吸收,经肝门静脉进入肝脏完成循环。

目前对于胆汁酸进出肝细胞和小肠上皮细胞受体系统和外排系统的分子机理较为清楚,而胆汁酸在肝脏和小肠细胞中的运输机制仍不清晰,然而对禽类的L-BABP基因功能研究报道主要集中在对其晶体结构方面研究。晶体结构研究中证实L-BABP基因可能为胆汁酸的运输者^[6],推测L-BABP基因可能参与胆汁酸的运输并在胆汁酸代谢途径中发挥重要作用。FABPs基因家族各种启动子保守性非常高,各个成员均既有TATA box^[9],推测C/EBP α 基因在转录水平上对L-BABP基因有一定影响。

本研究构建鸡L-BABP基因启动子系列载体并分析其活性,确定其有基本转录活性启动子区域及C/EBP α 基因对其启动活性影响,为进一步研究鸡L-BABP表达调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

克隆所用菌株DH5 α 由农业部鸡遗传育种重点实验室保存;pMD18-T Simple Vector、限制性内切酶*Mlu* I、*Bgl* II和*Xho* I内切酶和DNA分子质量Marker、LA *Taq*酶,dNTPs购自TaKaRa公司;荧光素酶报告基因载体、pGL3-Basic及海肾荧光素酶报告基因载体pRL2TK购自Promega公司;T₄DNA聚合酶、T₄DNA连接酶购自北京NEB公司;质粒回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒购自AXYGEN生物技术有限公司;转染试剂Fu GENE HD购自罗氏公司、DMEM高糖培养基、胎牛血清

购自GIBCO公司;荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Promega公司;引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成;测序由北京华大基因有限公司完成;人肝癌细胞系(HEPG2)由东北农业大学生命科学院馈赠;C/EBP α 表达载体由农业部鸡遗传育种重点实验室构建。

1.2 方法

1.2.1 启动子的序列分析

利用在线分析软件MOTIF Search(<http://motif.genome.jp/>)和TFSEARCH(<http://cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)分析L-BABP基因转录因子结合位点。利用CpG Island (http://www.bio2soft.net/sms/cpg_island.html)对序列进行CpG岛分析。

1.2.2 鸡L-BABP基因启动子报告基因载体的构建

根据GenBank中鸡L-BABP基因序列(Accession, AF380998),设计特异性引物(见表1)用于扩增鸡L-BABP基因启动子区,目标片段长度分别为1 922、1 043和479 bp。将扩增的L-BABP-1988/-66, L-BABP-1109/-66, L-BABP-545/-62,片段分别连接到pMD-18-Tsimple亚克隆载体上,利用引物两端设计的*Mlu* I和*Xho* I单酶切位点,将目的片段从亚克隆载体上切割并回收,回收目的片段并与pGL3-Basic载体连接,利用双酶切方法筛选阳性重组质粒,测序鉴定。

1.2.3 细胞培养

人肝癌细胞系(HEPG2)细胞用含10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和链霉素的DMEM高糖培养基,37℃5%CO₂条件下培养,饱和湿度的培养箱内传代培养,0.25%胰酶消化液消化传代,每1.5 d传代1次。所有试验均采用对数生长期的细胞。

1.2.4 鸡L-BABP基因启动子活性分析

细胞接种于12孔板中,待细胞生长至80%汇合时,采用罗氏HD转染试剂按照厂商推荐的方法转染细胞。每孔转染DNA总量为1 μ g,pGL3-L-BABP系列质粒分别与海肾荧光素酶报告基因载体(pRL2TK)的比为100:1。海肾荧光素酶报告基因载体作为内源参照,以消除由于转染效率及细胞活性等因素带来的差异。转染48 h后,根据Promega公司荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书,进行荧光素酶活性检测。试验重复5次,每次有3个平行试验,启动子相对活性用目的基因荧光/海

肾荧光值(Fluc/Rluc)比值表示。

1.2.5 C/EBP 基因对鸡 L-BABP 基因启动子活性影响分析

C/EBP α 真核表达载体 PCMV-HA-L-BABP 与分别与不同长度鸡 L-BABP 基因启动子报告基因载体共转染 HEPG2 细胞, PCMV-HA 载体与不同长度鸡 L-BABP 基因启动子报告基因载体共转染 HEPG2 细胞作为对照组。内源参照为海肾荧光素

酶报告基因载体。以报告基因相对表达量反映启动子活性。48 h 后分别检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。试验重复 5 次, 每次 3 个平行试验, 启动子相对活性用目的基因荧光/海肾荧光值 (Fluc/Rluc) 比值表示。

1.2.6 数据分析

所有数据均为 5 次独立试验结果, Mean \pm SD 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析与

表1 L-BABP 基因引物设计序列 (引物序列中酶切位点序列用下划线表示)

Table 1 Gene-specific primers of L-BABP used for PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	酶切位点 Enzyme sites
pGL3 L BABP 1988/ 66F	5' <u>ACGCGT</u> GGTACCGAGCTCTTACGCGTGTGAAAGCCACAGAGGTGG 3'	Mlu I
pGL3 L BABP 1988/ 66R	5' <u>CTCGAG</u> ACTTAGATCGCAGATCTCGAGATTCGGGTGCTATTTATGGAAAG 3'	Xho I
pGL3 L BABP 1096/ 66F	5' <u>ACGCGT</u> AGGTACCGAGCTCTTACGCGTGTGAAAGCCACAGAGGTGG 3'	Mlu I
pGL3 L BABP 1096/ 66R	5' <u>CTCGAG</u> ACTTAGATCGCAGATCTCGAGATTCGGGTGCTATTTATGGAAAG 3'	XhoI
pGL3 L BABP 545/ 62F	5' <u>ACGCGT</u> AGGTACCGAGCTCTTACGCGTGTGAAAGCCACAGAGGTGG 3'	Mlu I
pGL3 L BABP 545/ 62R	5' <u>CTCGAG</u> ACTTAGATCGCAGATCTCGAGATTCGGGTGCTATTTATGGAAAG 3'	Xho I

t 检验。P<0.05 为差异显著, P<0.01 差异极显著。

2 结果与分析

2.1 鸡 L-BABP 基因启动子的生物信息学分析

利用 MOTIF Search 和 TFSEARCH 网站分析鸡 L-BABP 基因 5'侧翼区序列, 结果表明在该基因转录起始位点上游处存在调控基因表达的基本调控元件, 如 CCAAT box(-306)、TATA box(-995)、GATA-1(-1844)和 SRE(-1866), 在转录起始位点上游 1 343 处存在 C/EBP α 的结合位点。启动子区调控元件见图 1。CpG Island 在线分析软件分析结果

表明, 鸡 L-BABP 基因 5'侧翼区 2 kb 范围内没有 CpG 岛存在。用该软件同时分析人和鼠 L-BABP 基因 5'侧翼区 2 kb 区域均无 CpG 岛。

2.2 鸡 L-BABP 基因启动子的生物信息学分析

根据 NCBI 提供的鸡 L-BABP(Accession No : AF380998)序列设计引物, 以鸡基因组为模板, 扩增片段 pGL3-L-BABP-1988/-66、pGL3-L-BABP-1096/-66 以及 pGL3-L-BABP-545/-62(见图 2), 并将 L-BABP 基因系列缺失载体克隆到报告基因载体 PGL3-Basic 上。提取质粒分别用 Mlu I / Bgl II 和 Mlu I / Xho I 双酶切, 得到质粒初步鉴定为阳性克

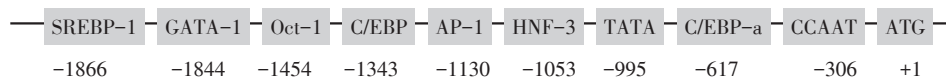


图1 L-BABP 基因 5'侧翼区生物信息学分析

Fig. 1 Schematic diagram of chicken L-BABP gene promoter

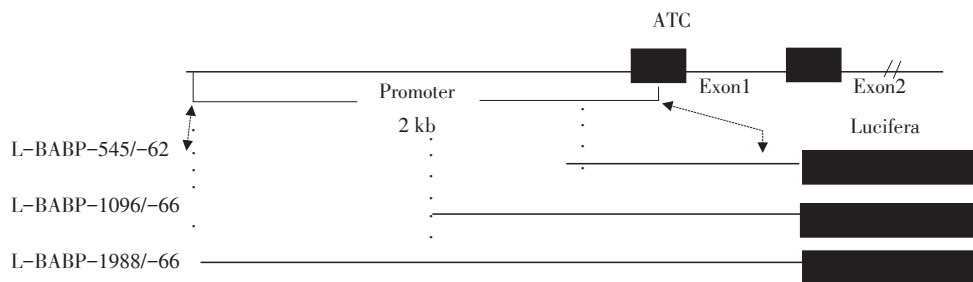


图2 L-BABP 基因启动子区系列载体构建

Fig. 2 Schematic diagram of a series of recombination plasmids of chicken L-BABP gene

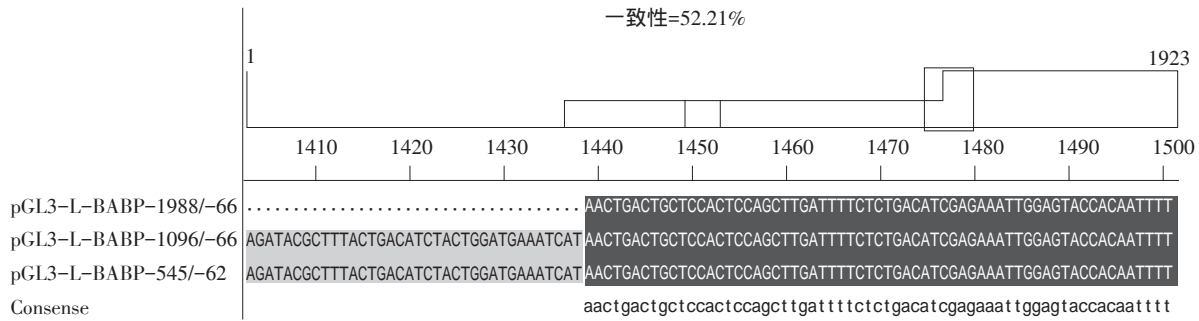


图3 pGL3-L-BABP-1988/-66、pGL3-L-BABP-1096/-66以及pGL3-L-BABP-545/-62
测序结果与NCBI提供的鸡L-BABP序列比对结果

Fig. 3 Result of pGL3-L-BABP-1988/-66、pGL3-L-BABP-1096/-66 and
pGL3-L-BABP-545/-62 plasmids blast with the chicken sequence

隆，再通过测序进一步验证(见图3)。

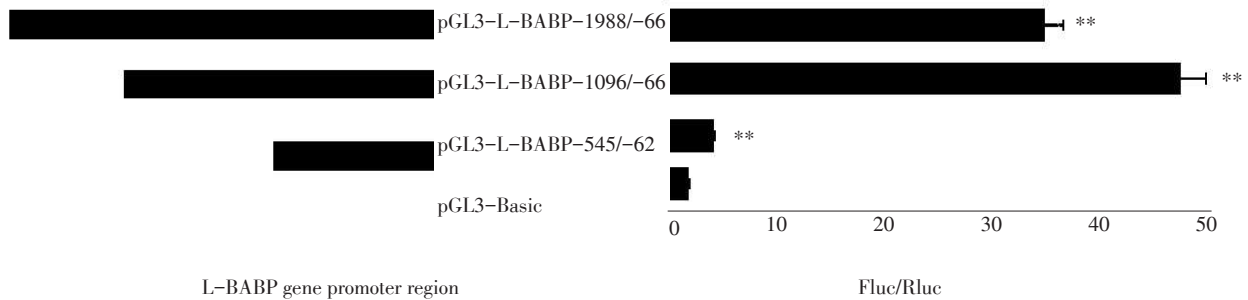
2.3 鸡L-BABP基因启动子报告基因分析

为进一步研究鸡L-BABP基因启动子不同区域的活性，将带有不同长度L-BABP基因启动子的报告基因表达载体分别与海肾质粒(pRL2TK)共转染HEPG2细胞，48 h后分别检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。结果发现，克隆的三段启动子报告基因载体均有明显的启动活性，与对照空载体质粒(pGL3-Basic)相比，差异均达到极显著水平($P < 0.01$) (见图4)。在-1096/-66区域，报告基因活性最强，随着片段由5'端逐渐缩短，报告基

因活性逐渐减弱，在-545/-62达到最弱。

2.4 鸡C/EBP α 基因对L-BABP基因的转录调控

为进一步研究鸡C/EBP α 基因对L-BABP基因的转录调控，将不同长度L-BABP基因启动子的报告基因载体分别与C/EBP α 基因真核表达载体共转染HEPG2细胞，48 h后分别检测萤火虫荧光素酶活性。结果表明，C/EBP α 基因对L-BABP基因启动子区有负调控作用，而且对各片段均有作用，尤其对-1096/-66区域启动子活性作用更为明显，该区域活性降低了59.24倍(见图5)。结果表明，鸡L-BABP基因可能受C/EBP α 的负调控，而且启

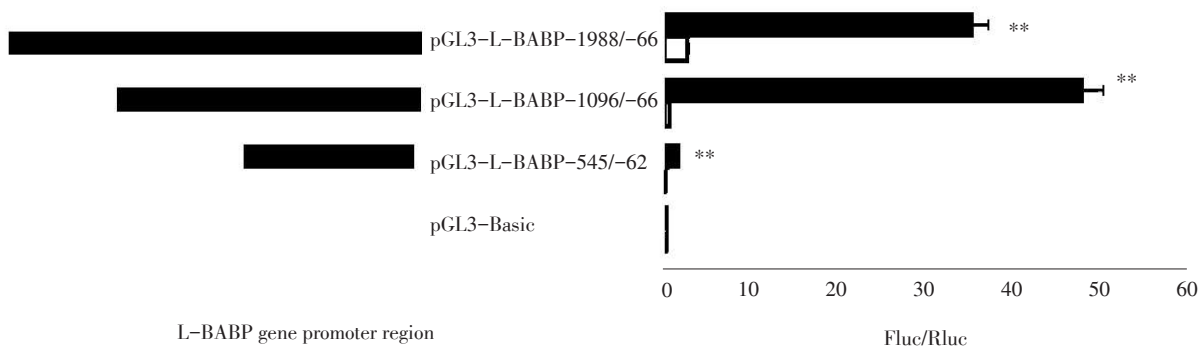


将不同长度鸡L-BABP基因启动子报告基因载体(-545/-62，-1096/-66，-1988/-66)转染HEPG2细胞，并以pGL3-Basic载体作为阴性对照。以报告基因相对表达量反映启动子活性。经过五次平行试验。左侧条形图表示鸡L-BABP基因启动子区域，右侧条形图表示相应的启动子相对活性。**表示差异极显著($P < 0.01$)

The left of the figure schematically shows the chicken L-BABP gene promoter and its serial promoter truncation mutations, and the right of the figure is the relative promoter activity. Data are the Mean \pm SD of five replicates. **means significantly different ($P < 0.01$). **means significantly different ($P < 0.01$)

图4 L-BABP基因启动子报告基因活性分析

Fig. 4 Deletion analysis of the chicken L-BABP promoter fragment



鸡L-BABP基因启动子各报告基因载体(-1988/-66, -1096/-66, -545/-62)分别与PCMV-HA-C/EBP α 表达载体共转染HEPG2细胞作为试验组,与PCMV-HA载体共转染HEPG2细胞作为对照组。以报告基因相对表达量反映启动子活性。五次平行试验。左侧条形图表示鸡L-BABP基因启动子区域,右侧条形图表示相应的启动子相对活性。SPSS13.0进行3组数值之间单因素方差分析与 t 检验,**表示差异极显著($P<0.01$)。

Data are the Mean \pm SD of five replicates. The left of the figure schematically shows the chicken L-BABP gene promoter and its serial promoter truncation mutations, and the right of the figure is the relative promoter activity. **means significantly different ($P<0.01$).

图5 C/EBP α 基因对L-BABP基因启动子报告基因活性的影响

Fig. 5 C/EBP α activate the L-BABP promoter

启动子区内存在多个C/EBP α 结合位点。

3 讨论

本研究发现,鸡L-BABP基因5'端-1096/-66区域,报告基因活性最强;在-545/-62区域,报告基因活性最弱。因此,推测在-1096/-66区域有重要的正调控因子结合位点;-1988/-66区域有重要的负调控因子结合位点。

FABPs基因家族是组织特异性基因并且绝大多数是在转录水平上进行调控的,该基因家族各种启动子保守性非常高且协同相互作用^[10]。生物信息学软件分析结果表明,在转录起始位点上游-306、-617和1343处存在C/EBP α 的结合位点。C/EBP基因序列在人和鸡之间具有高度保守,氨基酸保守性很高^[11-12]。在不同物种间C/EBPs家族都具有重要生物学作用的功能基因^[13-14]。本研究发现C/EBP α 对L-BABP基因启动子区各片段均有负调控作用,且随着片段的逐渐缩短,C/EBP α 对L-BABP基因抑制作用逐渐减弱。因此,推断这段区域内可能存在3个或3个以上C/EBP α 结合位点。L-BABP基因特异存在于禽类的肝脏组织中,目前没有哺乳动物的肝脏组织中发现该基因^[15]。人肝脏细胞中没有发现该基因,但人肝脏组织中的环境与禽类的肝脏所提供环境相似,因此L-BABP基因启动

子报告基因系列缺失载体在人肝癌细胞系(HEPG2)中有表达。

4 结论

研究克隆并构建鸡L-BABP基因启动子系列缺失载体,通过对其启动子活性进行分析和表达调控研究,发现鸡L-BABP基因受多种转录因子和上游序列的调控,C/EBP α 基因对其起到负调控作用。

[参考文献]

- [1] Spector A. A Structure and lipid binding properties of serum albumin [J]. Methods in Enzymology 1986: 1320-1339. 1985, 128: 320-339.
- [2] Veerkamp J H, Peeters R A, Maatman R. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1991, 1081(1): 1-24.
- [3] Flower D. The lipocalin protein family: Structure and function [J]. Biochem J, 1996, 318: 1-14.
- [4] Veerkamp J H, Van Kuppevelt T, Maatman R, et al. Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid-binding proteins [J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1993, 49 (6): 887-906.

- [5] Nichesola D, Perduca M, Capaldi S et al. Crystal structure of chicken liver basic fatty acid-binding protein completed with choric acid[J]. *Biochemistry*, 2004; 43(44): 14072-14079.
- [6] Capaldi S, Guariento M, Perduca et al. Crystal structure of axolotl (*Ambystoma mexicanum*) liver bile acid-binding protein bound to cholic and oleic acid[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 64(1): 79-88.
- [7] 张庆秋, 石慧, 丁宁, 等. 鸡肝脏胆汁酸结合蛋白 (L-BABP) 抗血清制备及组织表达特性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(3): 571-576.
- [8] Kramer W, Corsiero D, Friedrich M et al. Intestinal absorption of bile acids: paradoxical behaviour of the 14 ku ileal lipid-binding protein in differential photoaffinity labelling[J]. *Biochem J*, 1998, 333: 335-341.
- [9] Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism [J]. *Journal of applied genetics*, 2006, 47(1): 39-48.
- [10] Avery L, McIntosh, Barbara P et al, Liver type fatty acid binding protein (L-FABP) gene ablation reduces nuclear ligand distribution and peroxisome proliferator-activated receptor- α activity in cultured primary hepatocytes [J]. *Arch Biochem Biophys* .2009, 485(2):160-73
- [11] 张爱朋, 王守志, 王启贵, 等. 鸡 C/EBP α 基因的多态性与生长和体组成性状的相关研究[J]. *农业生物技术学报*, 2010,18(4): 746-752 .
- [12] Zelilinger S, Ebner A, Marosits T. The Hypocrea jecorina HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAATbox(ATTGG) within the cbh2(cellobiohydrolase II gene) activating element [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001,266(1): 56-63.
- [13] Hynes M J, Draht O W, Davis M A. Regulation of the acuF gene, encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*[J]. *Journal of bacteriology*, 2002, 184(1): 183-190.
- [14] Murai A, Furuse M, Kitaguchi K, et al. Characterization of critical factors influencing gene expression of two types of fatty acid-binding proteins (L-FABP and Lb-FABP) in the liver of birds[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 154(2): 216-223.