

鸡 *Perilipin1* 基因启动子的克隆及分析

周纬男, 史铭欣, 乔书培, 史洪岩, 王宇祥*

(东北农业大学动物科学技术学院, 农业部鸡遗传育种重点实验室,
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)

摘要: 旨在研究鸡脂滴包被蛋白基因(*Perilipin1*, *Plin*)启动子的结构及特征。本研究采用 PCR 方法扩增了鸡 *Perilipin1* 基因 5'侧翼区约 2 kb 的 DNA 片段, 并对其进行了克隆、测序及生物信息学分析; 同时, 构建了其全长及系列截短突变的报告基因表达载体, 瞬时转染鸡胚成纤维细胞系(DF-1), 用双荧光素酶报告基因系统测定了荧光素酶活性, 确定了该基因的核心启动子区域。生物信息学分析结果表明, 鸡 *Perilipin1* 基因的启动子区不存在典型的 TATA box 结构和 CpG 岛, 但可能存在 TFIID、Sp1、AP2、PPAR、RXR、SREBP1、C/EBP、GATA、ER、KLF5 等多个转录因子结合位点; 报告基因分析结果表明, 本研究克隆的鸡 *Perilipin1* 基因启动子能够极显著地启动报告基因的表达($P < 0.01$), 并且随着启动子片段由 5'端逐渐截短, 报告基因活性表现出逐渐增强的趋势, 其中 -360/-11 片段具有最强的报告基因活性。综上所述, 鸡 *Perilipin1* 基因 -360/-11 区域的启动子片段具有最强的转录活性, 包含该基因的核心启动子序列。

关键词: 鸡; 脂滴包被蛋白; 启动子; 克隆; 分析

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)02-0249-11

Promoter Cloning and Analysis of Chicken *Perilipin1* Gene

ZHOU Wei-nan, SHI Ming-xin, QIAO Shu-pei, SHI Hong-yan, WANG Yu-xiang*

(Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Education Department of Heilongjiang Province, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The purpose of this study was to analyze the structure and characteristics of promoter of the chicken *Perilipin1* gene. A DNA fragment with 2 kb was cloned from the 5'-flanking region of *Perilipin1*, then sequenced and analyzed by bioinformatics methods. Subsequently, the luciferase reporter gene plasmids containing the full-length region of *Perilipin1* gene promoter and its serial truncation mutations were constructed, and transfected into chicken embryonic fibroblast cell line (DF-1). Through detecting the level of luciferase activity, the core promoter region was determined. The result of bioinformatics analysis revealed that the promoter region of the chicken *Perilipin1* gene had no typical TATA box and CpG islands, but many binding sites of transcription factors, such as TFIID, Sp1, AP2, PPAR, RXR, SREBP1, C/EBP, GATA, ER and KLF5. Luciferase reporter assays demonstrated that the chicken *Perilipin1* gene promoter could significantly trigger the expression of the reporter gene ($P < 0.01$). With the promoter fragment gradually truncated from the 5' end, luciferase activity increased correspondingly, and the -360/-11 promoter fragment showed the strongest activity. Taken together, the promoter region from

收稿日期: 2015-03-04

基金项目: 国家自然科学基金(青年科学基金)项目(31201796); 高等学校博士学科点专项科研基金(20122325120008); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-42)

作者简介: 周纬男(1987-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 硕士, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: zwn0501@163.com

* 通信作者: 王宇祥, 副教授, E-mail: wyx2000@neau.edu.cn

-360/-11 bp has the highest transcriptional activity, which could be the core regulatory region of the chicken *Perilipin1* gene.

Key words: chicken; *Perilipin1*; promoter; clone; analysis

脂滴是脂肪细胞内中性脂质最主要的储存场所,在过去的很长一段时间内,脂滴一直被认为是一个“惰性”的细胞器,仅被用来储存能量,并在细胞需要能量时予以供给。然而越来越多的研究表明,脂滴不仅仅是一个简单的能量储存器,它还是一个复杂的、动态变化的多功能细胞器^[1]。目前,脂滴的结构已经被研究的比较清楚,脂滴是由胆固醇酯和甘油三酯组成的非极性核心、胆固醇和磷脂组成的极性单分子层和其表面的许多功能性蛋白构成的。脂滴表面的这些蛋白对于脂滴的代谢及调节具有十分重要的意义。脂滴包被蛋白(*Perilipin1*, *Plin*)是脂滴表面含量最多的一种蛋白,对于脂滴的代谢具有重要的调节作用^[2]。哺乳动物的研究表明,*Perilipin1*在脂肪细胞脂解过程中发挥着重要的调控作用,在基础状态下,*Perilipin1*包被在脂肪细胞中脂滴的表面,通过阻止脂肪细胞中甘油三酯水解酶接近脂滴来抑制脂肪细胞的脂解作用^[3];另一方面,在儿茶酚胺的刺激下,*Perilipin1*可被蛋白激酶 A (Protein kinase A, PKA)高度磷酸化而有利于脂解酶接近脂滴表面并促进脂解作用^[4]。在转录调控方面,*Perilipin1*基因的转录主要受过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPAR γ)、雌激素受体相关受体 α (ERR α)和肝 X 受体(LXR)的调控^[5-7]。另外,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、维甲酸相关孤核受体 α (ROR α)、二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)、17- β 雌二醇、促酰化蛋白(ASP)、血清淀粉样蛋白 A(SAA)、雌激素受体 α (ER α)等可通过影响 *Perilipin1* 基因的表达来影响脂类代谢^[8-15]。

家禽的脂肪代谢规律与哺乳动物有诸多不同,为揭示 *Perilipin1* 基因在家禽脂质代谢过程中的作用,国内外研究者开展了大量的研究工作,并获得了一系列重要的研究成果。赵小玲等发现,*Plin* 基因在鸡腹脂和皮下组织中的发育性表达随个体日龄的增长明显上升,而且腹脂 *Plin* 基因的发育性变化同皮脂厚的发育性变化呈极显著正相关,胸肌 *Plin* 基因的发育性变化同肌内脂肪含量的发育性变化呈极显著正相关^[16]。潘志雄等发现,鹅 *Perilipin* 基因主要表达于腹脂和皮脂,而且填饲会引起 *Perilipin* mRNA 在鹅肝中表达丰度的极显著增加^[17]。本课题

前期利用鸡全基因组芯片筛选 7 周龄肉鸡脂肪组织特异表达基因时发现,鸡 *Perilipin1* 基因在脂肪组织中高表达,同时代谢通路分析表明,鸡 *Perilipin1* 基因参与影响脂类代谢的重要调控通路—PPAR 信号通路。随后,又在鸡 *Perilipin1* 基因的结构、组织表达特性、基因的多态性与体组成性状的相关性以及基因功能等方面进行了研究,结果发现,过表达 *Perilipin1* 可促进鸡前脂肪细胞的脂质蓄积^[18]。

本研究利用 PCR、生物信息学分析及报告基因检测等方法对鸡 *Perilipin1* 基因的启动子进行了克隆及分析,发现了多个与脂质代谢相关的转录因子结合位点,并初步确定了该基因的核心启动子区域,这些结果为深入研究鸡 *Perilipin1* 基因的表达调控机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆载体 pEASY-T1 Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司;LA Taq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司;各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;凝胶回收(小量)试剂盒、质粒(小量)抽提试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;Lipofectamine[®] 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司;荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic、启动子活性对照质粒 pRL-TK、鸡胚成纤维细胞系(DF-1)为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 鸡 *Perilipin1* 基因启动子的克隆 根据鸡 *Perilipin1* 基因的 mRNA 序列(GenBank accession No.: GU327532.1)及鸡的全基因组序列(<http://genome.ucsc.edu>, UCSC)设计 1 对引物,用于克隆鸡 *Perilipin1* 基因的启动子。将第一外显子的第一个碱基定义为+1,上游引物命名为 *Plin*-1992,下游引物命名为 *Plin*-11,序列详见表 1,上游引物引入 *Kpn* I 酶切位点,下游引物引入 *Xho* I 酶切位点(下划线表示)。以鸡基因组为模板,利用

LA Taq 对鸡 *Perilipin1* 基因启动子区进行 PCR 扩增,反应条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,68 °C 30 s,72 °C 2 min,35 个循环;72 °C 7 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后连接到 pEASY-T1 Simple 载体上,重组质粒经 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切鉴定正确后,送上海英骏公司测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Product length
Plin-1992	F:CGGGGTACCTGGGCTGTCTCAGCAAGTACAGTCT	1 982
Plin-11	R:CCTCGAGGTGTGGTGTGGGGCACTACTACACC	
Plin-1834	F:GGGGTACCGCTGGGGGCTAGCAGTTAAATGTACC	1 824
Plin-11	R:CCTCGAGGTGTGGTGTGGGGCACTACTACACC	
Plin-1307	F:CGGGGTACCGCAGAATGGTAAGTGAGATAAGTAATCT	1 297
Plin-11	R:CCTCGAGGTGTGGTGTGGGGCACTACTACACC	
Plin-838	F:GGGTACCCTGGTGTGCATGCCTGTTCACCGTGG	828
Plin-11	R:CCTCGAGGTGTGGTGTGGGGCACTACTACACC	
Plin-360	F:GGGTACCTACCCTCCTGCTCCTGCTGCTTGGCT	350
Plin-11	R:CCTCGAGGTGTGGTGTGGGGCACTACTACACC	

表 2 启动子在线分析软件

Table 2 Software online for promoter analysis

软件名称 Software name	网址 URL	用途 Purpose
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	序列同源性比对
Promoter 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/	
Neural Network Promoter Prediction	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html	
Promoter Scan	http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/	核心启动子预测
FPROM	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fprom&group=programs&subgroup=promoter	
CpG Island Searcher	http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx	
CpG finder	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=cpgfinder&group=programs&subgroup=promoter	CpG 岛分析
JASPAR	http://jaspar.genereg.net/	
PROMO	http://algen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3	转录因子结合位点分析

1.2.3 细胞的复苏与培养 将一管(1 mL)液氮保存的 DF-1 细胞置于 37 °C 的水中,快速摇动冻存管至细胞完全融化。用 75%酒精清洁冻存管外壁后,将细胞悬液加入到装有 10 mL 37 °C 预热的完全

1.2.2 鸡 *Perilipin1* 基因启动子的序列分析 针对克隆测序获得的鸡 *Perilipin1* 基因启动子区序列(全长 1 982 bp),利用 Promoter 2.0 Prediction Server 等在线软件进行启动子和转录因子结合位点的特征分析(表 2)。

培养基的离心管中,轻轻吹打混匀,1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。弃上清,加入 10 mL 完全培养基,重悬细胞沉淀,全部接种于培养瓶中,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,48 h 后换液。

待细胞生长至 80%~90% 汇合时,弃培养基, PBS 洗 2 次,然后加入 37 °C 预热的 0.25% 胰蛋白酶-0.04% EDTA 混合消化液,37 °C 消化细胞约 2~3 min 至细胞呈流沙状,立即加入适量完全培养基终止消化,重悬细胞,按照 1:4 的比例进行传代,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,48 h 后换液。

1.2.4 启动子活性分析 待传代后的细胞汇合度达到 80%~90% 时,按 Lipofectamine® 2000 Reagent 说明书进行质粒转染。转染 48 h 后收集细胞,按双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。启动子活性分析共进行 3 次生物学重复,每次 3 个平行试验,启动子活性用 Fluc/Rluc 比值表示。

1.2.5 数据分析 数据用 JMP 5.0 统计软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

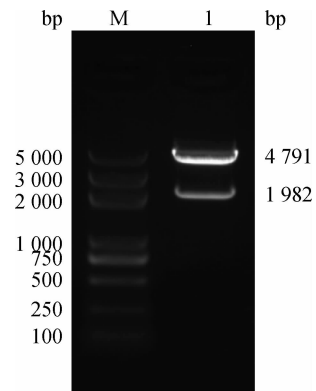
2.1 鸡 *Perilipin1* 基因启动子的克隆

本课题组前期的研究结果显示,鸡 *Perilipin1* 基因位于 10 号染色体,其 mRNA 序列由 9 个外显子、8 个内含子组成(ATG 位于第 2 外显子上)。在此基础上,本研究根据鸡 *Perilipin1* 基因的 mRNA 序列(GenBank accession No.: GU327532.1)及鸡的全基因组序列(<http://genome.ucsc.edu>, UCSC)设计 1 对引物(Plin-1992/Plin-11),以鸡基因组为模板进行 PCR 扩增,得到 1 条特异性条带,通过克隆测序后发现该片段长度为 1 982 bp,与预测目的片段大小一致。重组质粒经 *Kpn* I、*Xho* I 酶切鉴定,结果显示,载体和目的基因条带大小均与理论值相符(图 1),进一步的测序结果表明重组质粒构建成功。

2.2 鸡 *Perilipin1* 基因启动子的序列分析

2.2.1 同源性分析 根据人 *Perilipin1* 基因的完整序列(GenBank accession No.: NG_029172.1),小鼠 *Perilipin1* 基因的 mRNA 序列(GenBank accession No.: NM_175640.2, No.: NM_001113471.1)及小鼠的全基因组序列(<http://genome.ucsc.edu>, UC-SC),查找并确定人、小鼠 *Perilipin1* 基因第 1 外显子上游的 2 000 bp 基因序列,并将这两段序列与本研究中克隆获得的鸡 *Perilipin1* 基因启动子序列进行了比对分析,结果发现,鸡 *Perilipin1* 基因启动子序列与人、小鼠的启动子序列同源性分别为

40.44% 和 40.62%(表 3、图 2)。



M. DNA 相对分子质量标准;1. 重组质粒 Plin-1992/-11 经 *Kpn* I、*Xho* I 酶切结果

M. Trans2K Plus DNA marker; 1. Recombinant plasmid Plin-1992/-11 digested by *Kpn* I and *Xho* I

图 1 鸡 *Perilipin1* 基因启动子报告基因重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of chicken *Perilipin1* gene promoter recombinant plasmids by digestion

表 3 Clustal 软件对不同物种 *Perilipin1* 基因启动子序列同源性的分析结果

Table 3 Identity alignment of *Perilipin1* gene promoter sequence among different species by Clustal2.1 %

	鸡 Chicken	人 Human	小鼠 Mouse
鸡 Chicken	100.00	40.44	40.62
人 Human	40.44	100.00	49.86
小鼠 Mouse	40.62	49.86	100.00

2.2.2 启动子结构的预测与分析 对扩增获得的鸡 *Perilipin1* 基因 5' 侧翼序列进行启动子分析时,不同的在线软件分析结果有所不同。Promoter 2.0 和 Neural Network Promoter Prediction (NNPP) 软件在该片段中预测出潜在的启动子位置及序列(表 4、表 5),而 Promoter Scan 和 FPROM 软件则在该段序列中未发现启动子结构(不存在典型的 TATA box 序列)(表 6)。在对小鼠 *Perilipin1* 基因 5' 侧翼序列进行核心启动子预测时也发现了类似的结果(表 4、表 5、表 6)。但对人 *Perilipin1* 基因 5' 侧翼序列进行核心启动子预测时,Neural Network Promoter Prediction 和 FPROM 软件在该片段中预测出潜在的启动子位置、序列及 TATA box 位置(表 5、表 6),而 Promoter 2.0 和 Promoter Scan 软件则在该段序列中未发现启动子结构(表 4)。

CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment

```

Chicken      TGGGCTGTCTCAGCAAGTACAGTCTTAACCTGGGAGATGGGCAATGAATTTTCAGCCTT
Human        ---CCAGGCTGAGGAGGAGGATGG-----AGAAAGATTGAGATGTAGAGCC---TCTGG
Mouse        AAGGCAGGCTGCCCTTTAGCCTGG-----GCTGT
              * * **
              *

Chicken      CCTCAGCCTTACCTGTTCCATTTGGCATAACAC--AGGTCAG--AGCGTACAGGAGTAAC
Human        GTTGAAGAGGGACCTCTG--AAATG--AACTCATCTAGACTGCTGCCATGGA--GATGGTGC
Mouse        GTCCAGATGCAAGTCTCCCAGATTACTGTCCTGAACCTTGAAGCAAAGGCAGAGGCCAC
              **  * * * * * * * * * *
              * * *

Chicken      TTAAGTGGATG---TTAAGCACTAATACTGCCTTTCTGCTCCTCTGCTGGGGGCTAGCAG
Human        TCTACAGTAGC-----CCTGTCAATCGCTGGCT-----GGCTTCTGCC---TAG
Mouse        TTTACACGCTCCCTCCTTCCCCACTGCTGTCTTACAGCCAAAGGCTCAGACC---AAG
              * ** * * * * * * * * * *
              * * * * *

Chicken      TTAAATGTACCTTAATGTGATGTGAC-----TGAAGCCATAGAATTGCAATCA
Human        GTAAGTCTGCCTTGAATTCATGGTGG-----TATGTT-----ATGTTAC
Mouse        ATTAATAAGTATCAAATGCATGACATATTCATTACCTCTTCTGGAAGTCTCCTTGTCCAC
              * * * * * * * * * *
              *

Chicken      AATGGAGAAAAATCCTTTTAGTGCCTTTTCTGTGTATGTTTCTGATACGACAGCTGGAATG
Human        AGTGGTATCCATCTTGGTA-----CTTTTG-TCCT-----
Mouse        ACCCTCCCTTTCCTGGCA-----TCTTGTTCCTGTTTTATTATACTGAAGATAAAATT
              * * * * * * * * * *
              * * *

Chicken      AGGAG-----AGCTGTTTGAACACAAGCAATAAACGTTGATGCATATGACACTGCATCT
Human        --CTGCAATGGTGGTGGGGAGTTTGGGAAATACTAC-----
Mouse        TACTACCAAGGATCTATCGGTAGCCTTTCTCACATCCTTATTGTTTA-----TTGCATTT
              * * * * * * * * * *
              * *

```

图 2 人、小鼠、鸡 *Perilipin1* 基因启动子序列同源性的比对分析(部分)Fig. 2 Sequence alignment analysis of human, mouse and chicken *Perilipin1* gene (partial)表 4 Promoter 2.0 软件对 *Perilipin1* 基因启动子的预测结果Table 4 Promoter prediction of *Perilipin1* gene by Promoter 2.0

物种 Species	位置/bp Position	分值 Score	可能性 Likelihood
人 Human	/	/	/
	-1 601	0.510	临界预测
小鼠 Mouse	-1 101	0.605	临界预测
	-601	0.521	临界预测
鸡 Chicken	-493	0.630	临界预测

2.2.3 CpG 岛的预测 在 CpG 岛的检测中,本研究利用 CpG Island Searcher 软件,以 GC% 为 55%、GC 二核苷酸比例(Observed-to-expected)为 0.65、CpG 岛片段长度为 600 bp、相邻 CpG 岛的间隔 100 bp 为检测依据^[19]进行分析,结果发现,人、小鼠、鸡 *Perilipin1* 基因启动子序列中含有多个 CpG 位点,但均不存在典型的 CpG 岛结构(图 3)。

2.2.4 转录因子结合位点的预测 利用 JASPAR 和 PROMO 在线软件预测鸡 *Perilipin1* 基因启动子的转录因子结合位点时,JARPAR 软件在该序列中发现了 79 种转录因子共 228 个结合位点,

PROMO 软件发现了 159 种转录因子共 2 374 个结合位点,两种软件共有的转录因子共 16 种,对应 20 个结合位点,其中包括 TFIIID、Sp1、AP2、PPAR、RXR、SREBP1、C/EBP、GATA、ER、KLF5 等转录因子(表 7、图 4)。

2.3 鸡 *Perilipin1* 基因启动子报告基因重组质粒的构建

为进一步确定鸡 *Perilipin1* 基因的核心启动子区域,本研究构建了该基因的全长启动子及系列截短突变的报告基因重组质粒。我们以 Plin-1992/-11 质粒为模板,利用相应引物(表 1)进行

表 5 Neural Network Promoter Prediction 软件对 *Perilipin1* 基因启动子的预测结果

Table 5 Promoter prediction of *Perilipin1* gene by Neural Network Promoter Prediction

物种 Species	预测结果定位/bp Location	评分 Score	启动子序列 Promoter sequence
人 Human	-902~-852	0.58	CAACAATACATATAAATTCCACCAGCAACAAAGAAAATAAGT TTTTGT TTTTC
	-643~-593	0.63	ACCCAGGAGAATAAAAAATCTACTTGGCTCTCCTACTCTTCATTCTGGTAG
	-564~-514	0.55	TTTTTTGAATTCTAAGAAGTGGGAATTCCTCCCTCAACTCAAAGGCTATA
小鼠 Mouse	-1 689~-1 639	0.62	CATTTATGCATTTATTTGGGGTGTGTGTGCGTGTGTGTGCGTGTGTGTGT
	-1 290~-1 240	0.76	CTAGTTGGTCTAAAGACACAGCTTGGCACCACAGTGCTCCATCAACATTA
	-640~-590	0.50	AATGTTTTCTTTAACCCTGGGGGTTTACAGAGGATGAGACATCTCCTGCG
鸡 Chicken	-187~-137	0.71	TTGCCTAAACATCCCCATAGAAGTTAGGGTGAGCCAGGGGACACCCTG
	-1 505~-1 455	0.72	GGATAACGAGTAAAAAGAAGCTCTTGCTGGTAGCTTACTGCTTACTCCTA
	-1 078~-1 028	0.76	GTGGAAGGCAATAAATCGGTCTCTAATCCACCCAAGGGGTAATACATATA
	-700~-650	0.74	GGGGTGAGCCTGTTAATGCAGGGCTGTGGACAAGCCAGGCTCTTCCAGG

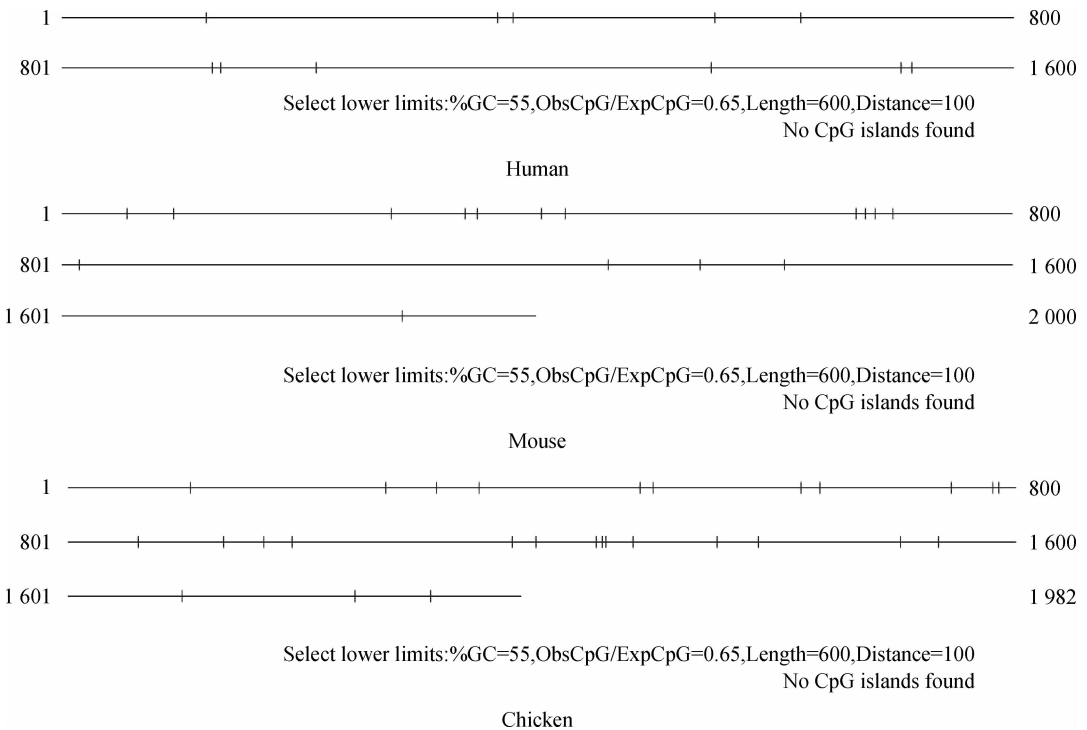
序列中的阴影字母表示预测的转录起始位点

The letters in shadow in sequence mean the predicted transcription start site

表 6 FPROM 软件对 *Perilipin1* 基因启动子的预测结果

Table 6 Promoter prediction of *Perilipin1* gene by FPROM

物种 Species	启动子位置/bp Promoter position	TATA box 位置/bp TATA box position
人 Human	-603	-634
小鼠 Mouse	/	/
鸡 Chicken	/	/



横线为 *Perilipin1* 基因启动子序列, 竖线为 CpG 位点

The horizontal lines are *Perilipin1* gene promoter sequences, vertical lines are CpG sites

图 3 CpG Island Searcher 软件对 *Perilipin1* 基因启动子中 CpG 岛的预测结果

Fig. 3 CpG islands predictions of *Perilipin1* gene promoter by CpG Island Searcher

表 7 鸡 *Perilipin1* 基因启动子的转录因子结合位点预测结果Table 7 Transcription factor binding sites predictions of chicken *Perilipin1* gene promoter

转录因子 Transcription factor	起始位置/bp Start position	终止位置/bp End position	序列 Sequence	预测软件 Prediction software
AhR;Arnt	-614	-605	GCACGCCCCC	PROMO(JASPAR)
C/EBP-alpha	-1 373	-1 370	ATTT	PROMO(JASPAR)
C/EBP-alpha	-1 332	-1 322	ATTTTCATAATA	PROMO(JASPAR)
C/EBP(C/EBP-beta)	-1 956	-1 950	TGGGGCA	PROMO(JASPAR)
Crx	-1 059	-1 052	CTCTAATC	PROMO(JASPAR)
Ddit3;C/EBP-alpha	-1 392	-1 381	AGCATTGCATTC	PROMO(JASPAR)
Elk-1	-933	-926	ACAGGAAG	PROMO(JASPAR)
GATA-1	-1 294	-1 289	GAGATA	PROMO(JASPAR)
GATA-1(GATA-4)	-1 295	-1 288	TGAGATAA	PROMO(JASPAR)
HNF4A	-786	-772	CTGCCCTTTGTCCCA	PROMO(JASPAR)
MyoD	-1 725	-1 718	GACAGCTG	PROMO(JASPAR)
NF-AT2(NFATC2)	-507	-501	TTTTCT	PROMO(JASPAR)
NF-AT3(NFATC2)	-1 638	-1 629	GGAAAAGAGA	PROMO(JASPAR)
Nkx2-1(Nkx2-5)	-1 083	-1 077	ACAAGTG	PROMO(JASPAR)
Nkx3-2	-1 083	-1 075	ACAAGTGGA	PROMO(JASPAR)
Nkx6-2(Nkx3-2)	-981	-973	TTAAGTGAA	PROMO(JASPAR)
PPAR-gamma;RXR-alpha	-785	-774	TGCCCTTTGTCC	PROMO(JASPAR)
RFX1	-86	-73	GTTTCCCCAGCAAC	PROMO(JASPAR)
RXR-beta(RXR-alpha)	-1 903	-1 893	CACAGGTCAGA	PROMO(JASPAR)
STAT4(STAT3)	-1 227	-1 222	GGAAGA	PROMO(JASPAR)
KLF5	-926	-917	GGGGAGGGGA	JASPAR
SP1	-1 112	-1 102	GAGGGAGGGGG	JASPAR
AP-2	-1 456	-1 447	TCCCCTGCAG	PROMO
GATA-2	-576	-568	GCCATATCC	PROMO
SREBP-1c	-982	-973	CTTAAGTGAA	PROMO
ER α	-594	-587	CTGACCA	PROMO
ER α	-1 904	-1 894	ACACAGGTCAG	PROMO
TFIID	-975	-967	GAAATAAAA	PROMO

PCR 扩增,以约 500 bp 的距离截短启动子,获得了长度分别为 1 824、1 297、828 和 350 bp 的启动子片段。将这些片段进一步亚克隆到 pGL3-Basic 载体上,获得鸡 *Perilipin1* 基因启动子系列片段缺失报告基因重组质粒,各报告基因重组质粒依次命名:

Plin-1834/-11、Plin-1307/-11、Plin-838/-11 及 Plin-360/-11。重组质粒经 *Kpn* I、*Xho* I 酶切鉴定,结果显示,载体和目的片段条带大小均与理论值相符(图 5),进一步测序结果表明重组质粒构建成功。

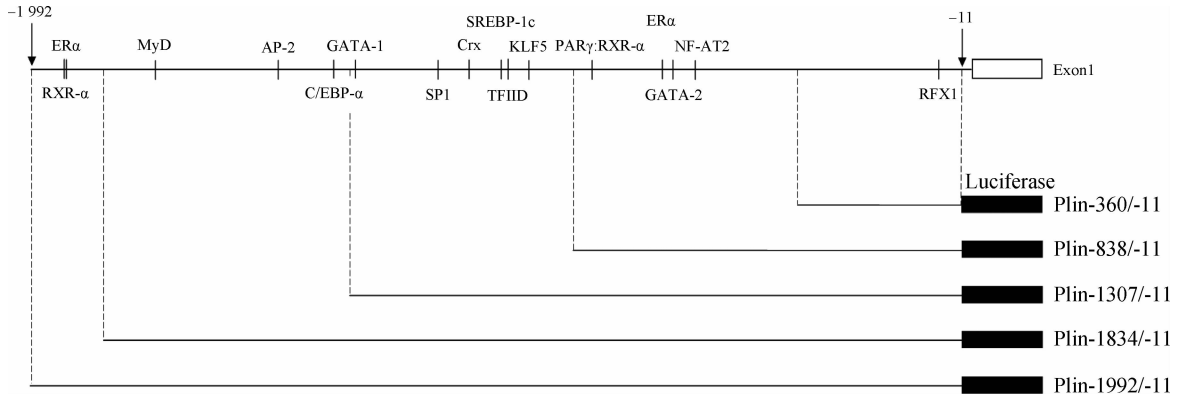
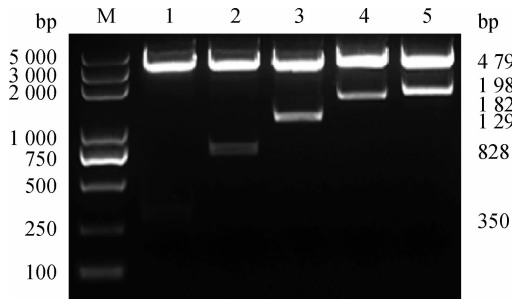


图 4 鸡 *Perilipin1* 基因启动子的转录因子结合位点预测结果

Fig. 4 Transcription factor binding sites predictions of chicken *Perilipin1* gene promoter



M. DNA 相对分子质量标准; 1. 重组质粒 Plin-360/-11 经 *Kpn* I、*Xho* I 酶切; 2. 重组质粒 Plin-838/-11 经 *Kpn* I、*Xho* I 酶切; 3. 重组质粒 Plin-1307/-11 经 *Kpn* I、*Xho* I 酶切; 4. 重组质粒 Plin-1834/-11 经 *Kpn* I、*Xho* I 酶切; 5. 重组质粒 Plin-1992/-11 经 *Kpn* I、*Xho* I 酶切

M. Trans2K plus DNA marker; 1. Recombinant Plin-360/-11 digested by *Kpn* I and *Xho* I; 2. Recombinant Plin-838/-11 digested by *Kpn* I and *Xho* I; 3. Recombinant Plin-1307/-11 digested by *Kpn* I and *Xho* I; 4. Recombinant Plin-1834/-11 digested by *Kpn* I and *Xho* I; 5. Recombinant Plin-1992/-11 digested by *Kpn* I and *Xho* I

图 5 鸡 *Perilipin1* 基因启动子报告基因重组质粒的酶切鉴定

Fig. 5 Identification of chicken *Perilipin1* truncation mutations promoter plasmids by digestion

2.4 鸡 *Perilipin1* 基因的启动子活性检测

将 5 种启动子报告基因重组质粒分别与对照质粒 (pRL-TK) 共转染到 DF1 细胞中, 转染 48 h 后检测报告基因活性。结果显示, 与对照组相比, Plin-1992/-11、Plin-1834/-11、Plin-1307/-11、Plin-838/-11 及 Plin-360/-11 质粒均具有极显著的报告基因活性 ($P < 0.01$), 并且随着启动子片段由 5' 端逐渐截短, 报告基因活性表现出逐渐增强的趋势, 其中 Plin-360/-11 质粒具有最强的报告基因活性 (图 6), 3 次独立试验得到了一致的结果。这表明, 鸡 *Perilipin1* 基因-360/-11 区域的启动子片段具有最强的转录活

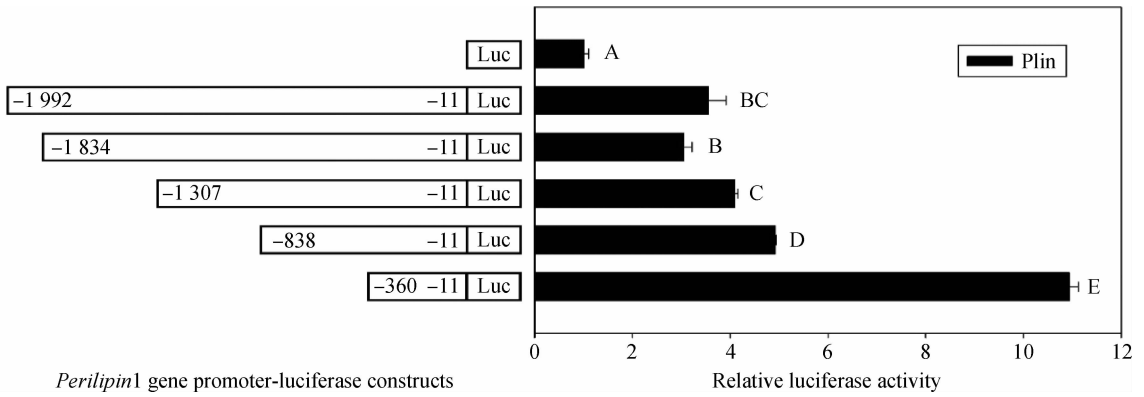
性, 包含该基因的核心启动子序列。

3 讨论

PAT 蛋白家族是一类包被在中性脂滴表面的结构蛋白, 它们与脂肪细胞中脂滴的代谢具有密切的关系^[2]。其家族成员包括脂滴包被蛋白 (Perilipin, Perilipin1)、脂肪细胞分化相关蛋白 (ADRP, Perilipin2)、尾连蛋白 (TIP47, Perilipin3)、S3-12 (Perilipin4) 和 OXPAT/MLDP (Perilipin5), 它们在氨基末端大约 100 个氨基酸的区域高度保守。

作为磷蛋白家族的主要成员之一, Perilipin1 特异性的包被于脂肪细胞中脂滴的表面^[20], 其在调控基础脂解代谢以及刺激脂肪细胞脂解过程中发挥着重要作用。一方面, 在饲喂或基础条件下, Perilipin1 形成一个中性脂滴的保护屏障, 阻止细胞质中的脂肪酶接近脂滴^[21], 进而抑制脂肪细胞的脂肪分解作用; 另一方面, 在儿茶酚胺类激素刺激、禁食或长期运动的状态下, 被 PKA 高度磷酸化的 Perilipin1 通过许多机制来促进脂肪酶的作用, 进而促进脂肪细胞的脂肪分解作用^[8, 22-25]。

为进一步研究 *Perilipin1* 基因在脂肪细胞中发挥作用的机理, S. Nagai 等对小鼠 *Perilipin1* 基因的 5' 侧翼区进行了分析, 结果发现, 小鼠 *Perilipin1* 基因启动子区不存在典型的 TATA box、GC box 和 CAAT box 等基本转录元件, 并且在转录起始位点附近也没有典型的启动子起始序列^[26]。在本研究中, 对鸡 *Perilipin1* 基因 5' 侧翼序列的分析结果表明, 鸡 *Perilipin1* 基因的启动子与人、小鼠 *Perilipin1* 基因的启动子同源性均较低, 但其结构与人的不同, 与小鼠的类似, 同样也不存在 TATA box 等基本转



启动子活性表示为相对荧光素酶活性(萤火虫/海肾),对照质粒 pGL3-Basic(Luc)的启动子活性表示为“1”;不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)

The promoter activity was expressed as relative luciferase activity (Fluc/Rlu), and the promoter activity of pGL3-Basic vector (Luc), the negative control, was represented as “1”. Different capital letters represent highly significant difference ($P < 0.01$)

图6 鸡 *Perilipin1* 基因的启动子活性分析

Fig. 6 The analysis of chicken *Perilipin1* gene promoter activity

录元件。本研究在鸡 *Perilipin1* 基因启动子区却发现了 TFIID 转录因子的结合位点(-967~-975 bp),该转录因子是 TATA-box 结合蛋白(TATA-box binding protein, TBP)和 13 种 TBP 协同因子(TBP-associated factors, TAFs)在体内装配的多蛋白复合物,可与转录激活因子结合形成共激活因子,启动 RNA 转录起始复合物的形成,引发 RNA 合成过程,是调控基因转录的基本转录因子^[27]。因此,推测鸡 *Perilipin1* 基因的转录表达可能与此位点有关。本研究还发现,人、小鼠、鸡 *Perilipin1* 基因的启动子区虽存在多个 CpG 位点,但均没有典型的 CpG 岛,暗示 *Perilipin1* 基因的表达调控受 DNA 甲基化影响的可能性较小。

人和小鼠上的研究结果表明,*Perilipin1* 基因是 PPAR γ 、ERR α 和 LXR 的靶基因^[5-7]。PPAR γ 直接结合于 *Perilipin1* 基因的 -1 986~-1 974 bp 区域,上调 *Perilipin1* 基因表达^[5];ERR α 直接结合于 *Perilipin1* 基因的 -414~-406 bp 区域,上调 *Perilipin1* 基因表达^[6];LXR 直接结合于 *Perilipin1* 基因启动子区域近端,下调 *Perilipin1* 基因表达^[7]。本研究的结果表明,鸡 *Perilipin1* 基因的 5'侧翼序列也存在许多转录因子结合位点,如 Sp1、AP2、PPAR、RXR、SREBP1、C/EBP、GATA、ER、KLF5 等,但未发现 ERR α 、LXR 等转录因子的结合位点。这些结果表明,鸡 *Perilipin1* 基因启动子的结构与人类、小鼠的不尽相同,暗示其转录调控机制也有所区别,其具体的机制有待进一步深入研究。

利用生物信息学预测和分析启动子序列后,需要进行启动子缺失突变转化分析,目的是验证生物信息学预测的结果,同时缩小启动子功能序列的范围。在本研究中,生物信息学方法对鸡 *Perilipin1* 基因启动子区域的预测结果与报告基因获得的结果有较大不同,前者预测转录起始位点在 -493 bp (Promoter 2.0, 表 4),启动子区域在 -1505/-1455、-1078/-1028、-700/-650 三个区域 (Neural Network Promoter Prediction, NNPP, 表 5),后者则发现该基因的 -360/-11 区域表现出最强的启动子活性。究其原因,一方面是 Promoter 2.0 的结果仅为“临界预测(Marginal predictions)”,即仅有 65%的真实性;另一方面是 NNPP 软件预测的结果主要依据于人和果蝇的相关数据和算法,利用此软件分析禽类的启动子也存在一定的误差。而报告基因的结果则是在鸡胚成纤维细胞中试验验证的数据,更具有可信性。因此,推测 -360/-11 区域包含鸡 *Perilipin1* 基因的核心启动子序列,在该基因的转录调控中具有重要作用。但该片段中控制鸡 *Perilipin1* 基因转录的调控元件及确切的转录起始位点尚需进一步研究确定。

此外,报告基因检测结果表明,启动子片段由 -838/-11 截短至 -360/-11 时,报告基因活性有极显著的提高($P < 0.01$),结合生物信息学分析结果可知,鸡 *Perilipin1* 基因的 -838~-360 bp 区域存在 GATA-2 等负调控因子的结合位点,因此,推测这些负调控因子可能对鸡 *Perilipin1* 基因的

转录活性有一定的抑制作用^[28],其确切的调控机制有待后续试验验证。

4 结 论

本研究成功克隆了鸡 *Perilipin1* 基因的启动子,并对其进行了初步的结构和启动子活性分析。研究表明,鸡 *Perilipin1* 基因的-360/-11 区域具备最强的转录活性,是其核心启动子区域,这些结果为深入研究鸡 *Perilipin1* 基因的表达调控机制奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] 张淑妍,杜雅兰,汪 洋,等. 脂滴——细胞脂类代谢的细胞器[J]. 生物物理学报,2010,26(2):97-105.
ZHANG S Y, DU Y L, WANG Y, et al. Lipid droplet——A cellular organelle for lipid metabolism[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2010, 26(2):97-105. (in Chinese)
- [2] BRASAEMLE D L. Thematic review series: Adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins; Stabilization of lipid droplets and control of lipolysis[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(12):2547-2559.
- [3] BRASAEMLE D L, RUBIN B, HARTEN I A, et al. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49):38486-38493.
- [4] TANSEY J T, HUML A M, VOGT R, et al. Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(10):8401-8406.
- [5] ARIMURA N, HORIBA T, IMAGAWA M, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(11):10070-10076.
- [6] AKTER M H, YAMAGUCHI T, HIROSE F, et al. Perilipin, a critical regulator of fat storage and breakdown, is a target gene of estrogen receptor-related receptor alpha [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368(3):563-568.
- [7] STENSON B M, RYDÉN M, VENTECLEF N, et al. Liver X receptor (LXR) regulates human adipocyte lipolysis[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(1):370-379.
- [8] SOUZA S C, PALMER H J, KANG Y H, et al. TNF-alpha induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(6):1077-1086.
- [9] OHOKA N, KATO S, TAKAHASHI Y, et al. The orphan nuclear receptor RORalpha restrains adipocyte differentiation through a reduction of C/EBPbeta activity and perilipin gene expression[J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(6):759-771.
- [10] WANG Y C, KUO W H, CHEN C Y, et al. Docosahexaenoic acid regulates serum amyloid A protein to promote lipolysis through down regulation of perilipin [J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21(4):317-324.
- [11] WOHLERS L M, SPANGENBURG E E. 17beta-estradiol supplementation attenuates ovariectomy-induced increases in ATGL signaling and reduced perilipin expression in visceral adipose tissue[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(2):420-427.
- [12] WU J, JIAO Z Y, LU H L, et al. The molecular mechanism of acylation stimulating protein regulation of adipophilin and perilipin expression; Involvement of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(6):1622-1629.
- [13] LIU L R, LIN S P, CHEN C C, et al. Serum amyloid A induces lipolysis by downregulating perilipin through ERK1/2 and PKA signaling pathways[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2011, 19(12):2301-2309.
- [14] LECCHI C, INVERNIZZI G, AGAZZI A, et al. Effects of EPA and DHA on lipid droplet accumulation and mRNA abundance of PAT proteins in caprine monocytes[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 94(2):246-251.
- [15] WEND K, WEND P, DREW B G, et al. ERalpha regulates lipid metabolism in bone through ATGL and perilipin [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(6):1306-1314.
- [16] 赵小玲,刘益平,罗 轶,等. 鸡多个组织 *Perilipin* 基因表达的发育性变化与脂肪性状的相关研究[J]. 畜牧兽医学报,2009,40(2):149-154.
ZHAO X L, LIU Y P, LUO Y, et al. Study on the relationship between developmental variants of *PLIN* gene expression and fatness traits in chickens[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(2):149-154. (in Chinese)
- [17] 潘志雄,王继文,唐 慧,等. 鹅 *Perilipin* 基因部分片段的克隆、不同品种及填饲对组织 mRNA 表达水平的影响[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(8):939-943.
PAN Z X, WANG J W, TANG H, et al. Cloning of goose *Perilipin* gene, tissues expression and the effect of overfeeding on its mRNA level[J]. *Acta Vet-*

- erinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(8): 939-943. (in Chinese)
- [18] 周纬男, 王宇祥, 李 辉. 脂滴包被蛋白对鸡前脂肪细胞脂质蓄积的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(9): 944-947, 951.
ZHOU W N, WANG Y X, LI H. Effect of perilipin 1 on chicken preadipocyte lipid accumulation[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2012, 28(9): 944-947, 951. (in Chinese)
- [19] TAKAI D, JONES P A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(6): 3740-3745.
- [20] CASTRO-CHAVEZ F, YECHOOR V K, SAHA P K, et al. Coordinated upregulation of oxidative pathways and downregulation of lipid biosynthesis underlie obesity resistance in perilipin knockout mice: A microarray gene expression profile[J]. *Diabetes*, 2003, 52(11): 2666-2674.
- [21] MARTINEZ-BOTAS J, ANDERSON J B, TESSIER D, et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice[J]. *Nat Genet*, 2000, 26(4): 474-479.
- [22] SZTALRYD C, XU G, DORWARD H, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation[J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(6): 1093-1103.
- [23] ZHANG H H, SOUZA S C, MULIRO K V, et al. Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A-stimulated lipolysis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(51): 51535-51542.
- [24] MIYOSHI H, SOUZA S C, ZHANG H H, et al. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and-independent mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(23): 15837-15844.
- [25] MIYOSHI H, PERFIELD J W 2nd, SOUZA S C, et al. Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(2): 996-1002.
- [26] NAGAI S, SHIMIZU C, UMETSU M, et al. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element within the murine perilipin gene[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(5): 2346-2356.
- [27] BIENIOSSEK C, PAPA G, SCHAFFITZEL C, et al. The architecture of human general transcription factor TFIID core complex[J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 699-702.
- [28] 张志威, 陈月婵, 裴文宇, 等. 过表达鸡 *Gata2* 或 *Gata3* 基因抑制 *Ppar γ* 基因的转录[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(9): 835-842.
ZHANG Z W, CHEN Y C, PEI W Y, et al. Overexpression of chicken *Gata2* or *Gata3* suppressed the transcription of *Ppar γ* gene[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 28(9): 835-842. (in Chinese)

(编辑 郭云雁)