

研究报告

# 唐鱼 $\beta$ -actin 基因近端和远端启动子的鉴定及其启动活性分析

王海英<sup>1,2</sup>, 叶星<sup>1</sup>, 劳海华<sup>1</sup>, 夏仕玲<sup>1</sup>, 白俊杰<sup>1</sup>, 简清<sup>1</sup>

1 中国水产科学研究院珠江水产研究所 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广州 510380

2 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

**摘要:** 利用高保真 PCR 技术获得唐鱼(*Tanichthys albonubes*)长为 1.3 kb 的 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)近端启动调控序列(TA, 1.3 kb)。在此基础上采用基因组步移技术(Genome walker)获得 5'侧翼上游序列 1.7 kb, 再根据所获的近端启动子序列和上游序列设计引物, 扩增获得全长为 3.0 kb 的唐鱼 $\beta$ -actin 基因远端启动调控序列(TLA, 3.0 kb)。此 1.3 kb 和 3.0 kb 启动调控序列均包含 3 个转录活性元件: CAAT Box(-89~-85), CArG Box (-59~-49), TATA Box(-26~-20)。利用启动子分析软件 TRANSFAC 6.0 分析, 结果显示启动调控序列(-105~1261)中含有 E-Box、NF-Y、Sp1 等多个重要转录因子结合位点, 在远端启动调控序列(-1719~1261)中还含有更多的重要转录因子结合位点。将这两个序列分别定向克隆到红色荧光蛋白(Red fluorescent protein, RFP)表达载体中, 构建重组表达载体 pTLA-DsRed 和 pTA-DsRed, 并分别注射到唐鱼受精卵中, 结果显示转 pTLA-DsRed 基因唐鱼的阳性率较转 pTA-DsRed 的高, 且所发出的红色荧光的强度也比后者的强。采用 RT-PCR 检测孵化后第 15 天的转基因唐鱼中 RFP 的 mRNA, 结果显示转 pTLA-DsRed 基因唐鱼中 RFP mRNA 的表达量比转 pTA-DsRed 基因唐鱼高 35.7%。结果表明两种长度的启动调控序列均能有效驱使外源基因在唐鱼体内表达, 且长度为 3.0 kb 的启动子序列具有更强的驱动活性。

**关键词:** 唐鱼,  $\beta$ -肌动蛋白启动子, 红色荧光蛋白, 显微注射, 表达, 转录活性

## Identification of Two Different Length of $\beta$ -actin Promoters of *Tanichthys albonubes* and Comparison of Their Activity

Haiying Wang<sup>1,2</sup>, Xing Ye<sup>1</sup>, Haihua Lao<sup>1</sup>, Shiling Xia<sup>1</sup>, Junjie Bai<sup>1</sup>, and Qing Jian<sup>1</sup>

1 Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, CAFS, Guangzhou 510380, China

2 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Through PCR amplification, 1.3 kb of 5'-proximal promoter (TA, 1.3 kb) of the  $\beta$ -actin gene of white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes* was obtained. Using Genome Walker, a 1.7 kb 5'-upstream sequence from the proximal promoter of the  $\beta$ -actin gene was isolated, and a further promoter (3.0 kb in size) was amplified according to the isolated 5'-proximal and upstream sequences (TLA, 3.0 kb). Both the 1.3 kb and 3.0 kb promoters contain elements that were critical to the transcription

**Received:** March 3, 2008; **Accepted:** April 7, 2008

**Supported by:** the Guangdong Science and Technology Projects (Nos. 2003C20310 and 2005B20301018), the National Scientific and Technological Basic Condition & Platform Construction Program (No. 2006DKA30470-008).

**Corresponding author:** Xing Ye. Tel: +86-20-81617091; E-mail: gzyexing@163.com

广东省科技计划项目(No. 2003C20310), 广东省科技重点引导项目(No. 2005B20301018), 国家科技基础条件平台建设项目(No. 2006DKA30470-008)资助。

activity of other species, including the CCAAT Box (-89~-85), CArG Box (-59~-49), TATA Box (-26~-20). Results of putative transcription binding sites analysis of the promoters by software TRANSFAC 6.0 revealed the presence of E-box, several transcript binding sites NF-Y, SP1 (Stimulating Protein 1), AP1 (Activator Protein 1), and some more transcription binding sites existing in the further promoter. The two promoter sequences were inserted into the expression vector to construct the recombinant expression vector, pTA-DsRed and pTLA-DsRed, respectively. The vectors were microinjected into the fertilized eggs of *Tanichthys albonubes* and higher positive rate was obtained and stronger red fluorescence was observed in pTLA-DsRed transgenic fish. RT-PCR analysis showed that RFP (Red fluorescent protein) mRNA level in pTLA-DsRed transgenic fish was 35.7% higher than that of the pTA-DsRed transgenic fish of 15-days-post-hatched. The present study showed that both the proximal and further promoter sequences have effective transcription activities and the 3.0 kb promoter possesses higher potent activity than that of the 1.3 kb promoter.

**Keywords:** *Tanichthys albonubes*,  $\beta$ -actin gene promoter, red fluorescent protein (RFP), microinjected, expression, transcription activity

肌动蛋白(Actin)是真核细胞中所发现的最保守的蛋白。它在维持细胞骨架结构完整性、细胞运动、分化以及细胞间转运和收缩等方面具有重要作用。 $\beta$ -actin 是最主要的非肌肉或胞质肌动蛋白异型体,它在真核生物的大多数非肌肉细胞以及未分化的成肌细胞中表达<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -actin 基因为管家基因,其启动子具有广泛启动表达功能。该基因转录下调相关的元件位于 3'非翻译区,不带此 3'非翻译区下调相关元件的 $\beta$ -actin 启动子在所有研究过的细胞类型,包括肌肉细胞中组成性表达<sup>[2,3]</sup>。除了位于转录起始位点上游 100 bp 左右的 CAAT、TATA 框等基本调控元件外, $\beta$ -actin 基因可能还有更多的正调控或负调控元件,分布于近端或远端序列的不同区域,因此不同长度的 $\beta$ -actin 启动调控序列具有不同的启动活性。Liu 等研究发现 1.5 kb 鲤鱼 $\beta$ -actin 启动子(c $\beta$ AP)的活性强于 4.7 kb c $\beta$ AP<sup>[4]</sup>。Hwang 等发现 1.6 kb 的罗非鱼 $\beta$ -actin 启动子(ti $\beta$ AP)和 1.5 kb 的鲤鱼 $\beta$ -actin 启动子(c $\beta$ AP)在转基因罗非鱼大部分组织的启动活性要高于 4.7 kb 鲤鱼 $\beta$ -actin 启动子 c $\beta$ AP<sup>[5]</sup>。研究显示人的 $\beta$ -actin 基因的 5'侧翼序列以及第一个内含子的 $\beta$ -actin 启动子具有与 SV40 早期启动子相当的或更强的启动转录活性<sup>[6-9]</sup>。

鱼类方面,已分离到几种鱼类的 $\beta$ -actin 基因启动子,其中鲤的 $\beta$ -actin 启动子作为第一个被分离的鱼类自身强启动子已广泛应用于转基因鱼研究<sup>[10-13]</sup>。由于启动子的强度受一些内源或外源调控因子的影响,Higashijima 等<sup>[14]</sup>推测使用异源启动子可能导致外源基因表达量低等问题,因此分离出斑马鱼 $\beta$ -actin 启动子,并发现该序列能有效启动 GFP 在斑马鱼中表达。利用青鳉的 $\beta$ -actin 启动子,亦获得能

稳定遗传外源基因 GFP 的转基因青鳉<sup>[15]</sup>。出于安全方面的考虑,近年来提出了自源转基因(Auto-transgenic)的概念,多位学者进行自源转基因鱼的研究并取得进展,如 Nam 等<sup>[16]</sup>利用泥鳅的 $\beta$ -actin 启动子驱动泥鳅的 GH 基因在泥鳅中表达获得比对照个体大 30 倍的泥鳅。

唐鱼(*Tanichthys albonubes* Lin)又名白云金丝鱼(White cloud mountain minnow),属鲤形目,鲤科,鲴亚科,唐鱼属,为我国特有种,分布区狭窄,近代仅分布于广州白云山,花都以及附近山溪中,目前仅在从化发现自然生活的群体<sup>[17]</sup>。由于唐鱼的个体小、性成熟期与孵化期短、胚体透明、具有和斑马鱼(*Danio rerio*)等模式生物相似的特征,因此唐鱼既为观赏价值较高的观赏鱼也是鱼类转基因研究的良好材料。但迄今未见关于唐鱼的基因与表达调控的相关研究报道。本研究分离、比较两种长度的唐鱼 $\beta$ -actin 启动子在唐鱼体内驱动外源基因转录的活性,以期获得具有较强启动活性的启动子,为下一步构建转自源生长激素基因唐鱼的研究打下基础。

## 1 材料

高质量 DNA 提取试剂盒为 QIAGEN 公司产品。SV Total RNA Isolation System 为 Promega 公司产品。限制性内切酶、PCR 扩增试剂盒和 pMD19-T Easy Vector Systems 为 TaKaRa 公司产品。质粒 DNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司。Genome Walker Universal Kit 以及红色荧光蛋白基因载体(pDsRed2-1)购自 Clontech 公司。反转录试剂盒 RevertA Ace- $\alpha$ -TM 为 TOYOBO 公司产品。其他试剂和仪器其他试剂为国产分析纯。大肠杆菌 DH5 $\alpha$

由本实验室保存。

试验用唐鱼为 4 月龄性成熟亲鱼, 为珠江水产研究所生物技术室培育。

## 2 方法

### 2.1 引物设计

根据已在 GenBank 上登录的, 如斑马鱼 AF057040, 鲤(*Cyprinus carpio*)M24113, 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)M25013 等十几种鲤科鱼类的  $\beta$ -actin 启动子序列以及尼罗罗非鱼  $\beta$ -actin 启动子序列<sup>[5]</sup>设计 1 对特异引物 Z1、Z2, 用于克隆唐鱼  $\beta$ -actin 近端启动子。根据已获得的近端启动子序列设计下游引物 SP1、SP2, 以试剂盒提供的接头引物 AP1、AP2 作为上游引物扩增唐鱼  $\beta$ -actin 启动子 5' 上游远端调控序列。根据 NCBI 上已登录的鱼类  $\beta$ -actin 基因的序列, 在保守区上设计一对 RT 内参引物扩增  $\beta$ -actin 基因作为内参, 上游引物  $\beta$ -actin-F 位于  $\beta$ -actin 基因第 4 个外显子中, 下游引物  $\beta$ -actin-R 位于第 5 个外显子中。同时在红色荧光蛋白基因序列的特异区上设计一对检测引物 Red-F、Red-R, 作为外源基因表达的检测引物(表 1)。

表 1 用于  $\beta$ -actin 启动子克隆及 RFP 检测的引物  
Table 1 Primers for  $\beta$ -actin promoter cloning and RFP assay

Primer	Sequence (5'-3')
Z1	GTGTGTGACGCTRGACC
Z2	AAACAGCACGAGGGGCATCATC
SP1	TTACCTTAGGTTTGGGGGGGGTTGTCC
SP2	GCTGTTTTATACGACACCACATGCCCC
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
$\beta$ -actin-F	GTGCCCATCTACGAGGGTTACGC
$\beta$ -actin-R	TGGTCTCGTGGATAACCGCAAG
Red-F	GTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGT
Red-R	CTACGGAACAGGTGGTGGCGG
TB-F	GGGAATTCGGCTGGTATCTTATGTC
TB-R	GAGGATCCGGCTGAACTGTAAATGTG

### 2.2 唐鱼 $\beta$ -actin 近端启动子的克隆

取唐鱼血液 100  $\mu$ L(含抗凝剂), 按 QIAGEN 基因组提取试剂盒提供的方法提取高质量基因组 DNA。

以唐鱼基因组 DNA 为模板, 以 Z1、Z2 为引物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94°C 3 min; {94°C 50 s,

54°C 1 min, 72°C 1 min}  $\times$ 30 循环; 72°C 10 min。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

PCR 扩增产物按胶回收试剂盒使用手册所提供的方法回收后, 与 pMD19-T Vector 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 菌株, PCR、酶切进行初步鉴定后委托上海英竣生物公司进行 DNA 序列测定。测定结果用 DNA 分析软件 VECTOR VTI 8.0 进行分析, 并通过 BLAST 软件搜索 NCBI 的核酸数据库, 进行同源性比较, 确定重组子命名为 TA-T。为便于将启动子插入红色荧光载体, 设计引物在启动子两端分别引入 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切位点。

### 2.3 唐鱼 $\beta$ -actin 远端启动子的分离

通过搜索 NCBI 的核酸数据库, 比较分析鲤科鱼类  $\beta$ -actin 基因上游调控序列, 并根据 GenomeWalker Universal Kit 使用手册, 将基因组 DNA 用 *EcoR* V 消化, 并与试剂盒所提供的接头进行连接。以连接产物为模板, 以 AP1 和 SP1 为引物进行第 1 次 PCR 扩增, 反应条件为 {94°C 25 s, 72°C 3 min}  $\times$ 7 循环; {94°C 25 s, 67°C 3 min}  $\times$ 32 循环; 67°C 7 min。取 1  $\mu$ L 1st PCR 产物 49  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中, 稀释 50 倍配制 PCR 反应液, 以稀释液为模板, 以 AP2 和 SP2 为引物进行二次 PCR, 反应条件为 {94°C 25 s, 72°C 3 min}  $\times$ 5 循环; {94°C 25 s, 67°C 3 min}  $\times$ 20 循环; 67°C 7 min。PCR 扩增产物参照 2.2 方法确定为唐鱼  $\beta$ -actin 启动子 5' 侧翼序列。

根据上述实验所获得的唐鱼  $\beta$ -actin 启动子 5' 上游侧翼序列以及唐鱼  $\beta$ -actin 近端启动子序列 TA 设计上下游引物 TB-F、TB-R, 以获得远端启动调控序列。为了便于将启动子序列插入到荧光蛋白基因载体上, 在上游引物 TB-F 引入 *EcoR* I 酶切位点, 下游引物 TB-R 引入 *Bam* H I 酶切位点, 引物序列见表 1。以高质量的唐鱼基因组 DNA 为模板, 以 TB-F、TB-R 为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物胶回收、连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 初步酶切鉴定后测序, 重组子命名为 TLA-T。

### 2.4 调控序列转录因子的预测分析

利用在线工具 Matinspector software(<http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector.pl>)以及 Match program (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/bin/match.cgi>)的分析软件 TRANSFAC 6.0, 对启动子进行预测分析。根据转录调控因子结合位点

核心区的相关度, 选取相关系数大于 0.9 的结合位点以确保其具有较高的特异性。

## 2.5 $\beta$ -actin 启动子-RFP 表达载体的构建, 显微注射以及荧光检测

取近端调控序列重组子 TA-T 的 PCR 产物以及远端调控序列重组子 TLA-T 经 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切回收后, 与经同样酶切消化后的红色荧光表达载体(pDsRed2-1, 4.1 kb)连接, 连接产物转化大肠杆菌后提取质粒, 进行初步酶切鉴定后委托上海英俊生物公司进行 DNA 序列测定, 分别命名为 pTA-DsRed(5.4 kb)和 pTLA-DsRed(7.1 kb)。将质粒分别用内切酶 *Hind III* 线性化后, 参照简清、朱新平等<sup>[18,19]</sup>的方法将重组质粒显微注射到唐鱼的受精卵中, 进行孵化、培育, 用荧光显微镜(带有 2072 滤光片组合)检测 RFP 的表达情况, 数码相机存储实验结果。

## 2.6 转基因唐鱼中的外源基因 RFP 的 RT-PCR 检测

分别取孵化出膜 15 d、荧光显微镜下已检测出有红色荧光的转 pTA-DsRed 基因、转 pTLA-DsRed 基因唐鱼以及野生唐鱼(作对照组)各 20 尾, 进行 RFP mRNA 的半定量分析。根据 SV Total RNA Isolation System 试剂盒所提供的方法提取总 RNA。取 1  $\mu$ g 总 RNA, 以 Oligo(dT)<sub>20</sub> 为引物按照 TOYOBO ReverTra Ace(TOYOBO, Japan)的使用说明合成 cDNA 第一链。

以 2  $\mu$ L cDNA 第一链为模板, 以  $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R 为引物扩增  $\beta$ -actin 基因预期长为 346 bp 的中间片段, 同时以 Red-F 和 Red-R 为引物扩增红色荧光蛋白基因预期长为 487 bp 的片段。PCR 反应条件为: 预变性 94°C 3 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。

PCR 产物各取 5  $\mu$ L 于 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 AlphaImager<sup>TM</sup> 图像分析系统观察、记录电

泳结果, 并用其软件进行浓度分析。RFP 基因的表达丰度以 RFP mRNA 与  $\beta$ -actin 基因的比值表示, 取重复试验的平均值。

## 3 结果与分析

### 3.1 唐鱼 $\beta$ -actin 近端启动子及部分开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 的获得

采用特异引物, 以唐鱼基因组 DNA 为模板, 扩增出一条约 1400 bp 的特异带。将其回收后与 pMD19-T Vector 连接, 经菌落 PCR 和酶切筛选出重组子并命名为 TA-T, 重组子测序。序列经分析并登录于 GenBank (Accession No. EF026000)。序列分析表明: 所克隆到的片段长度为 1464 bp, 含 1374 bp 的近端启动子和 90 bp 的  $\beta$ -actin 基因的部分开放阅读框序列, 近端启动子序列包含 105 bp 的 5'侧翼序列以及长为 1.2 kb 的  $\beta$ -actin 的第 1 个不翻译的外显子和第 1 个内含子, 部分开放阅读框编码 30 个氨基酸。通过 BLAST 软件搜索 NCBI 的核酸数据库, 发现该部分开放阅读框与其它鱼类的  $\beta$ -actin 基因具有高度的保守性: 与斑马鱼的同源性为 100%, 与斑点叉尾鲷的同源性为 97%, 与罗非鱼的同源性为 96.7%。其 5'侧翼序列含有与大多数鱼类相同的与转录密切相关的几个转录元件: CAAT Box、CArG Box 和 TATA Box, 其位置分别在转录起始位点(+1)上游的 -89、-59、-26 处(图 1)。

### 3.2 唐鱼 $\beta$ -actin 远端启动子的获得

基因组 DNA 经内切酶 *EcoRV* 消化纯化后产物与 GenomeWalker Universal Kit 所提供的接头连接后, 可用接头引物 AP1 和特异引物 SP1 进行扩增得到目的背景带, 背景带用接头引物 AP2 和特异引物 SP2 进行扩增得到 1800 bp 的特异带。该特异带经克隆测序后证实为  $\beta$ -actin 5'侧翼序列。序列见图 2。

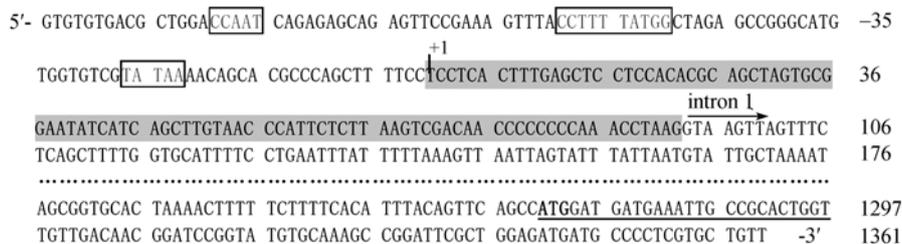


图 1 唐鱼  $\beta$ -actin 基因近端启动子序列

Fig. 1 Sequence of the proximal promoter of *Tanichthys albonubes*  $\beta$ -actin gene

The CAAT, CArG and TATA Box were showed in box; +1 is the site for initiation of transcription; shadow is the first exon of  $\beta$ -actin gene; the first codon was shown in bold



图 2 唐鱼  $\beta$ -actin 基因 5'-远端序列及潜在的转录因子结合位点

Fig. 2 Putative transcription factor binding sites in the further 5'-flanking region of *Tanichthys albonubes*  $\beta$ -actin gene  
E-Box, Sp1, USF are indicated by box, dots and a solid line, respectively. Shadow is the partial 5'-flanking region of TA

采用特异引物 TB-F 以及 TB-R, 以唐鱼基因组 DNA 为模板, 扩增出一条约 3000 bp 的特异带, 该特异带经克隆测序后确定为  $\beta$ -actin 启动子序列, 命名为 TLA, 包含 1.8 kb 的 5'侧翼序列以及长为 1.2 kb 的  $\beta$ -actin 的第一个不翻译的外显子和第一个内含子。

### 3.3 转录因子的在线分析

分析表明 3.0 kb 的全长启动调控序列含有 16 个 E-Box 位点(CANNTG), 23 个 USF(Upstream stimulating factor)位点, 2 个 SRF(Serum response factor)位点等多种转录因子结合位点(相关度系数>0.9)(表 2)。与

近端启动子(1.3 kb)的相比, 在远端启动调控序列的 5'上游区(-1719~-105)还存在有 10 个 E-Box 位点, 11 个的 USF 位点, 1 个 NF-Y(Recognize consensus sequence CCAAT), 4 个 Sp1 (Promoter specificity factor 1)位点等多个转录因子结合位点(图 2)。

### 3.4 转 pTA-DsRed 和 pTLA-DsRed 唐鱼的构建

将唐鱼  $\beta$ -actin 近端和远端启动子序列分别经粘端连接插入红色荧光蛋白表达载体 pDsRed2-1 中, 连接产物转化大肠杆菌后提取阳性质粒, 测序结果表明启动子与载体连接正确, 分别命名为 pTA-DsRed (5.4 kb)和 pTLA-DsRed(7.1 kb)。

表 2 启动子序列 TLA 可能存在的重要转录结合因子和启动元件的预测

**Table 2 Prediction of important transcription factor binding sites and promoter elements in TLA**

Name	Sequence position (5'-3', bp)	Score <sup>a</sup>
TATA box	-26~-24	1.00
CREB	-1710~-1703 <sup>b</sup> //-755~-750	1.00
MTBF	-1706~-1698	0.92
RU49	-1665~-1659	0.99
	-435~-429	0.98
E Box-	-1571~-1566// -1060~-1055// -1027~-1022// -991~-986 <sup>b</sup> // -961~-956// -664~-659 <sup>b</sup> // -503~-498// -494~-489 <sup>b</sup> // -310~-305 <sup>b</sup> // -134~-129// -38~-33// 222~-228 <sup>b</sup> // 310~315// 405~410// 458~463 <sup>b</sup> // 1198~1203 <sup>b</sup>	1.00
NF-Y	-855~-851// -89~-85	1.00
SRF	-59~-50// 1068~1077	1.00
USF	-1106~-1102// -1099~-1095// -1025~-1021// -992~-988// -959~-955 <sup>b</sup> // -665~-658// -646~-642// -495~-491// -361~-357// -311~-307// -132~-128 <sup>b</sup> // -119~-115// -105~-101 <sup>b</sup> // -36~-32// 32~36 <sup>b</sup> // 228~232// 311~315 <sup>b</sup> // 356~360 <sup>b</sup> // 457~461// 714~718// 755~759 <sup>b</sup> // 891~896// 1196~1200	>0.90
AP1	-1706~-1702 <sup>b</sup> // -1262~-1258 <sup>b</sup> // -1218~-1214 <sup>b</sup> // -1138~-1134 <sup>b</sup> // -1108~-1104 <sup>b</sup> // -994~-990 <sup>b</sup> // -755~-748// -667~-663 <sup>b</sup> // -651~-647// 1178~1182~497~-493 <sup>b</sup> // -381~-377// -323~-319// -231~-227 <sup>b</sup> // -668~-664 <sup>b</sup> // -99~-95// 195~199 <sup>b</sup> // 306~310 <sup>b</sup> // 319~323// 376~380 <sup>b</sup> // 446~450 <sup>b</sup> // 518~522// 575~579// 750~754// 856~860// 870~874 <sup>b</sup> // 1014~1018// 1113~1118// 1135~-1139 <sup>b</sup> // 1157~1161 <sup>b</sup> // 1192~1196	>0.93

a: indicates matrix similarity score, 1.00 represents a perfect match; b: indicates antisense sequence

线性化后的重组表达载体分别显微注射到唐鱼的受精卵中, 经孵化培育。两组转基因唐鱼仔鱼(孵化出膜 72 h)在荧光显微镜下均可见体表发出红色荧光, 部分转 pTLA-DsRed 仔鱼在普通解剖镜下即可观察到鱼体背部的红色荧光; 两种转基因唐鱼成鱼在肉眼下均可观察到红色荧光(图 3)。

### 3.5 转基因唐鱼红色荧光蛋白基因 mRNA 表达水平的半定量分析

分别以转 pTA-DsRed 基因唐鱼、转 pTLA-DsRed 基因唐鱼和野生型唐鱼的 cDNA 第一链为模板, 以 Red-F/Red-R 和β-actin-F/β-actin-R 为引物分别进行 RFP 和β-actin 基因的扩增及电泳(图 4)。AlphaImager™ 图像分析系统的相对半定量分析显示: 2 种转基因唐鱼

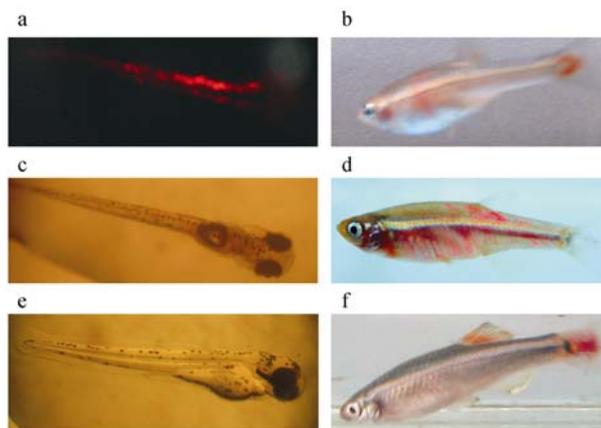


图 3 RFP 在转基因唐鱼中的表达

**Fig. 3 Expression of RFP in transgenic *Tanichthys albonubes***  
 a: pTA-DsRed transgenic fish under UV light (72 hph); b: pTA-DsRed transgenic fish under normal light(4-month-old); c: pTLA-DsRed transgenic fish under normal daylight (72 hph); d: pTLA-DsRed transgenic fish under normal daylight(4-month-old); e: wild fish under normal daylight (72 hph); f: wild fish under normal daylight(4-month-old)

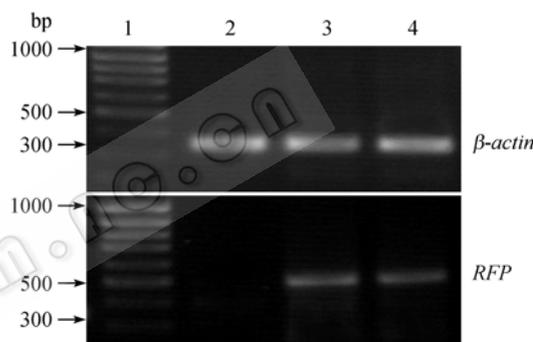


图 4 半定量 RT-PCR 检测两种转基因唐鱼体内 RFP 表达量

**Fig. 4 RT-PCR detection of RFP expression in two transgenic *Tanichthys albonubes***

1: 100 bp marker; 2: wild fish; 3: pTLA-DsRed transgenic fish; 4: pTA-DsRed transgenic fish

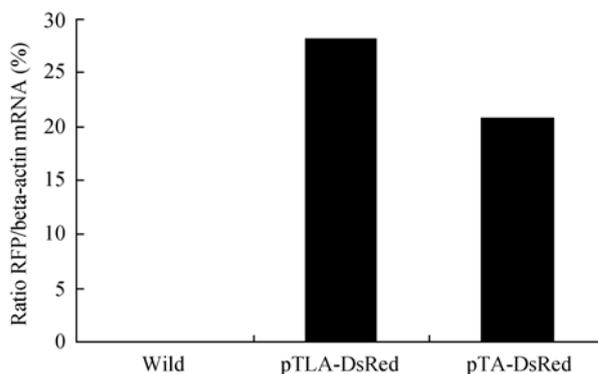


图 5 两种转基因唐鱼体内 RFP 与 β-actin mRNA 表达量比率的比较

**Fig. 5 Ratio of RFP/β-actin mRNA abundance of the two transgenic *Tanichthys albonubes***

均能检测出外源基因 RFP 的 mRNA, 且在转 pTLA-DsRed 基因唐鱼中 RFP mRNA 的表达量比在转 pTA-DsRed 基因唐鱼中的高 35.7%(图 5)。

## 4 讨论

对人类或鱼类等多个物种的 $\beta$ -actin 基因及启动子研究的结果显示,  $\beta$ -actin 5'侧翼区以及 5'非翻译区是保持高水平转录活性所必需的序列<sup>[6,20-22]</sup>。 $\beta$ -actin 启动子包含典型的 CAAT box 及 TATA box 以及进化保守的 CArG motif, 即 CC(A/T)<sub>6</sub>GG 序列。 $\beta$ -actin 启动子的活性除了与上述 5'侧翼区调控元件密切相关外, 也与 5'非翻译区有关。已证实 $\beta$ -actin 基因的第一个内含子中含有增强子<sup>[2]</sup>。Liu 等<sup>[4]</sup>分析了鲤的 $\beta$ -actin 基因的序列, 发现包含上游基本序列以及不翻译的第一个外显子和第一个内含子的启动子序列, 其转录 CAT 的活性要比单纯具有上游基本序列的启动子的活性高出 4 倍, 其中包含在第一个内含子序列中的长 304 bp 的 Pst I 片段对于转录的活性尤为重要, 这段序列的反转和缺失都会使启动子的转录活性几乎为零。本试验根据这些研究结果设计并分离的唐鱼 $\beta$ -actin 基因近端和远端启动调控序列均含有 $\beta$ -actin 基因典型的调控因子: 位于转录起始位点(+1)上游-89~-85 处的 CAAT box、位于-59~-49 处的 CArG box、位于-26~-20 处的 TATA box 以及不翻译的第 1 个外显子和第 1 个内含子, 并通过报告基因 RFP 证明了两者在唐鱼体内均具有有效的转录启动活性。

不同长度的 $\beta$ -actin 启动调控序列具有不同的启动活性。Liu 等发现 1.5 kb 的鲤鱼 $\beta$ -actin 启动子(c $\beta$ AP)的活性强于 3.7 kb 的鲤鱼 $\beta$ -actin 启动子(c $\beta$ AP), 同时发现在该基因 5'上游-2300 到-1100 的区域内有一个负调控元件, 包含此负调控元件的序列(3.7 kb c $\beta$ AP)会使启动子转录 CAT 的活性降低一倍多, 而包含更长上游序列的 4.7 kb c $\beta$ AP 使启动子转录 CAT 的活性略微升高, 但也仅为只包含上游 100 bp 左右序列的 1.5 kb c $\beta$ AP 启动活性的 70%<sup>[4,10]</sup>。人的 $\beta$ -actin 基因调控序列-1433~-1418 的区域内则存在 CArG Box<sup>[23]</sup>。Hwang 等利用报告基因 lacZ 通过转基因罗非鱼比较了 1.6 kb 长的罗非鱼 $\beta$ -actin 启动子(ti $\beta$ AP)以及 1.5 kb 和 4.7 kb 的鲤鱼 $\beta$ -actin 启动子(c $\beta$ AP)的活性, 发现 1.6 kb ti $\beta$ AP 和 1.5 kb c $\beta$ AP 在转基因罗非鱼大部分组织的启动活性要高于 4.7 kb c $\beta$ AP, 说明鲤鱼和罗非鱼仅包含上游约 100 bp 序列的 $\beta$ -actin 启动子比含更长 $\beta$ -actin 基因 5'端上游序列

更强的启动转录活性<sup>[5]</sup>。本研究结果却显示 3.0 kb 的唐鱼 $\beta$ -actin 启动调控序列的启动活性明显高于 1.3 kb 的唐鱼 $\beta$ -actin 启动调控序列, 在转 pTLA-DsRed 基因唐鱼体表的红色荧光强度以及组织 RFP mRNA 的表达量高于转 pTA-DsRed 基因唐鱼, 推测在 3.0 kb 的唐鱼 $\beta$ -actin 启动调控序列中可能存在其它未知的影响转录活性的正调节因子。软件分析表明在 3.0 kb 的启动序列中包含有更多的转录因子结合位点, 其中还有 E-box、USF、Sp1 以及 NF-Y 等肌肉特异性结合位点, 推测可能是由于这些结合位点的存在而提高了外源基因的表达效率。关于这些结合位点的转录调控功能与机制尚待进一步的研究。

**致谢** 中国科学院海洋研究所谭训刚博士为本文调控序列转录因子在线预测提供了帮助, 特致谢忱!

## REFERENCES

- [1] Wolfgang W, Lin ZY, Linliana DZ, *et al.* The  $\beta$ -actin promoter. *J Biol Chem*, 1989, **264**(10): 9539-9546
- [2] Liliana DZ, Anne ST, Bruce MP. A 40-base-pair sequence in the 3' end of the  $\beta$ -actin gene regulates  $\beta$ -actin mRNA transcription during myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **85**: 1389-1393.
- [3] Anne ST, Juanita DE, Bruce MP. Expression and regulation of chicken actin genes introduced into mouse myogenic and nonmyogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 2980-2984.
- [4] Liu ZJ, Moav B, Faras AJ, *et al.* Functional analysis of elements affecting expression of the  $\beta$  actin gene of carp. *Mol Cell Biol*, 1990, **10**(7): 3432-3440.
- [5] Gyu-Lin H, Rabman MA, Shaherudin AR, *et al.* Isolation and characterization of tilapia *beta-actin* promoter and comparison of its activity with carp *beta-actin* promoter. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1625**(1): 11-18.
- [6] Robert M, Frederickson, Monette R, *et al.* 5' flanking and first intron sequences of the human  $\beta$ -actin gene required for efficient promoter activity. *Nucl Acids Res*, 1989, **17**(1): 254-270.
- [7] Melloul D, Aloni B, Calvo J, *et al.* Developmentally regulated expression of chimeric genes containing muscle actin DNA sequences in transfected myogenic cells. *EMBO J*, 1984, **3**(5): 983-990.
- [8] Grichnik JM, Bergsma DJ, Schwartz RJ. Tissue restricted and stage specific transcription is maintained within 411 nucleotides flanking the 5' end of the chicken alpha-skeletal actin gene. *Nucl Acids Res*, 1986, **14**(4): 1683-1701.
- [9] Gunning P, Hardeman E, Wade R, *et al.* Differential patterns of transcript accumulation during human

- myogenesis. *Mol Cell Biol*, 1987, **7**(11): 4100–4114.
- [10] Liu Z, Zhu Z, Roberg K, *et al.* The  $\beta$ -actin gene of carp (*Cyprinus carpio*). *Nucl Acids Res*, 1989, **17**(14): 5850.
- [11] Liu Z, Zhu Z, Roberg K, *et al.* Isolation and characterization of  $\beta$  actin gene of carp (*Cyprinus carpio*). *DNA Seq*, 1990, **1**: 125–136.
- [12] Liu Z, Boaz M, Faras AJ, *et al.* Development of expression vectors for transgenic fish. *Bio Technol*, 1990, **8**: 1268–1272.
- [13] Moav B, Hinitz Y, Groll Y. Inheritance of recombinant carp  $\beta$ -actin/GH cDNA gene intransgenic carp. *Aquaculture*, 1995, **137**(1~4): 179–185.
- [14] Higashijima S, Okamoto H, Ueno N, *et al.* High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably expression GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev Biol*, 1997, **192**: 289–299.
- [15] Kinoshita M, Yamauchi M, Sasanuma M, *et al.* A transgene and its expression profile are stably transmitted to offspring in transgenic medaka generated by the particle gun method. *Zool Sci*, 2003, **20**: 869–875.
- [16] Nam YK, Noh JK, Cho YS, *et al.* Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res*, 2001, **10**(4): 353–362.
- [17] Pearl River Fisheries Research Institute. Chinese Academy of Fishery Sciences. The Freshwater Fishes of Guangdong Province. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press, 1991, 77–78.  
中国水产科学研究院珠江水产研究所. 广东淡水鱼类志. 广州: 广东科技出版社, 1991, 77–78.
- [18] Jian Q, Bai JJ, Ye X, *et al.* Cloning of Mylz2 promoter and generation of green fluorescence transgenic zebrafish. *J Fish Sci China*, 2004, **11**(5): 391–395.  
简清, 白俊杰, 叶星, 等. 斑马鱼 Mylz 启动子的克隆与转绿色荧光蛋白基因鱼的构建. 中国水产科学, 2004, **11**(5): 391–395.
- [19] Zhu XP, Xia SL, Zhang Y, *et al.* Preliminary study on transgenic mud carp of antifreeze protein gene. *J Fish Sci China*, 1997, **4**(2): 79–80.  
朱新平, 夏仕玲, 张跃, 等. 转抗冻蛋白基因鲢鱼的初步研究. 中国水产科学, 1997, **4**(2): 79–80.
- [20] Ponte P, Ng S, Engel J, *et al.* Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human  $\beta$ -actin cDNA. *Nucl Acids Res*, 1984, **12**: 1687–1696.
- [21] Noh JK, Cho KN, Ham EH, *et al.* Genomic cloning of mud loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes Cobitidae)  $\beta$ -actin gene and usefulness of its promoter region for fish transgenesis. *Mar Biotechnol (NY)*, 2003, **5**(3): 244–252.
- [22] Feng H, Cheng J, Luo J, *et al.* Cloning of black carp  $\beta$  actin gene and primarily detecting the function of its promoter region. *Acta Genetica Sin*, 2006, **33**(2): 133–140.
- [23] Miyamoto NG. Nucleotide sequence of the human  $\beta$ -actin promoter 5' flanking region. *Nucl Acids Res*, 1987, **15**: 9095.