

## 猪 *CuZnSOD* 基因启动子的克隆鉴定及分析

石元\*, 陈伟\*, 曾勇庆, 祝洪磊, 徐正刚, 张哲, 杨云, 张天阳

山东农业大学动物科技学院 动物育种学实验室, 山东 泰安 271018

石元, 陈伟, 曾勇庆, 等. 猪 *CuZnSOD* 基因启动子的克隆鉴定及分析. 生物工程学报, 2014, 30(2): 213-222.

Shi Y, Chen W, Zeng YQ, et al. Cloning and analysis of promoter of pig copper zinc superoxide dismutase gene (*CuZnSOD*). Chin J Biotech, 2014, 30(2): 213-222.

**摘要:** 猪铜锌超氧化物歧化酶 (*CuZnSOD*) 是一种重要的抗氧化酶, 其功能已被广泛研究, 但 *CuZnSOD* 基因的转录调控尚不明确。为了研究猪 *CuZnSOD* 基因的核心启动子区域, 并对其转录调控机制进行探讨, 运用 PCR 方法从猪基因组克隆 *CuZnSOD* 基因 5'上游调控区 853 bp 的片段, 然后通过巢式 PCR 方法获得 5'末端逐渐缺失的启动子系列片段, 并将这些片段定向插入到荧光素酶报告基因表达载体 (pGL3-Basic) 中。瞬时转染小鼠胚胎细胞 (NIH/3T3), 利用双荧光素酶报告基因检测不同长度启动子活性。检测结果显示, 在 *CuZnSOD* 基因 5'上游调控区-87 bp 和-266 bp 处分别存在 2 个潜在转录起始位点, -383 bp~+67 bp 启动区活性最强, 进一步缺失分析发现-75 bp~-32 bp 区域内含有猪 *CuZnSOD* 基因转录所必需的基础启动子序列, 其中存在多个潜在的转录因子结合位点, 研究结果提示这些转录因子结合位点可能是参与 *CuZnSOD* 基因转录的重要调控序列。

**关键词:** 猪, *CuZnSOD* 基因, 启动子, 双荧光素酶报告基因

**Received:** May 21, 2013; **Accepted:** August 1, 2013

**Supported by:** National Transgenic Major Program (Nos. 2011ZX08006-002, 2013ZX08006-002), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA101008), Shandong Province Modern Pig Industry Technique System Project (No. SDAIT-06-011-02), Shandong Province Agricultural Animal Breeding Project of China (No. 2011LZ013-03).

**Corresponding author:** Yongqing Zeng. E-mail: yqzeng@sdau.edu.cn

\*These authors contributed equally to this study.

国家转基因重大专项 (Nos. 2011ZX08006-002, 2013ZX08006-002), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2008AA101008), 山东省现代农业 (生猪) 产业技术体系建设专项 (No. SDAIT-06-011-02), 山东省农业良种工程重大项目 (No. 2011LZ013-03) 资助。

网络出版时间: 2013-08-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130816.1714.004.html>

## Cloning and analysis of promoter of pig copper zinc superoxide dismutase gene (*CuZnSOD*)

Yuan Shi\*, Wei Chen\*, Yongqing Zeng, Honglei Zhu, Zhenggang Xu, Zhe Zhang, Yun Yang, and Tianyang Zhang

Laboratory of Animal Breeding and Genetics, College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

**Abstract:** Pig copper zinc superoxide dismutase (*CuZnSOD*) is an important antioxidant enzyme. Some studies focused on the function of *CuZnSOD* gene, but the transcriptional regulation of the *CuZnSOD* gene is not yet fully elucidated. Therefore, the aims of the study were to determine the core promoter region and to explore its mechanism of transcriptional regulation. The 853 bp DNA sequence of 5'-flanking promoter was amplified by performing PCR. A series of *CuZnSOD* promoter fragments with gradually truncated 5'-end were produced by nested PCR and inserted into pGL3-Basic vector. The activities of the promoters were measured by the dual-luciferase assay system after transient transfection into the NIH/3T3 cells. The results demonstrated that there were 2 potential transcription start sites in the regions from initiation codon to -87 bp and -266 bp, respectively. The region from -383 bp to +67 bp in *CuZnSOD* gene promoter showed higher activity than other regions, and further deletion analysis demonstrated that the region from -75 bp to -32 bp contained an essential promoter sequence for pig *CuZnSOD* gene transcription. In addition, several potential transcription factor binding sites were predicted with bioinformatics method. These results suggest that these transcription factor binding sites may be involved in the transcriptional regulation of *CuZnSOD* gene.

**Keywords:** pig, *CuZnSOD* gene, promoter, dual-luciferase reporter gene

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 是一种广泛存在于生物体中的金属酶,能够清除机体内氧化过程中产生的多余的超氧阴离子自由基,因此在维持生物体内氧自由基平衡方面起着重要作用<sup>[1]</sup>。SOD 可缓解或者抑制自由基的负面效应,提高商品猪的抗氧化能力,进而改善商品猪的肉质<sup>[2-3]</sup>。目前,已从哺乳动物体内分离出3种SOD:位于细胞质基质的CuZnSOD (SOD1)、位于线粒体的MnSOD (SOD2) 和位于细胞外基质的EC-SOD (SOD3)<sup>[4]</sup>。CuZnSOD 广泛分布于细胞质基质中,约占SOD总量的90%<sup>[5]</sup>。随着生物技术的发展,许多物种的 *CuZnSOD* 基因组序列已被克隆出来。杜金芳等<sup>[6]</sup>利用 RACE 的方法克隆得到了猪 *CuZnSOD* 基因的 cDNA 全

长序列。Fridovich<sup>[7]</sup>的研究发现在小鼠、大鼠、人的 *CuZnSOD* 基因近端启动子区存在 TATA-box、CCAAT-box 以及几个富含 GC 的高度保守区域。人类的 *CuZnSOD* 基因的启动子已得到研究并发现了许多假定转录因子结合位点<sup>[8]</sup>。Minc 等<sup>[9]</sup>已经证明 sp1 和 Egr-1 转录因子对人的 *CuZnSOD* 基因的基础表达和诱导表达发挥重要作用。目前对猪 *CuZnSOD* 基因的表达调控机制还未见报道。本研究以莱芜猪为试验对象,克隆了猪 *CuZnSOD* 基因启动子区不同长度的缺失序列,通过双荧光素酶表达载体分析启动子区的活性,旨在进一步探索 *CuZnSOD* 基因的结构与功能,为揭示 *CuZnSOD* 基因对猪抗氧化性能的影响,以及为研究其转录调控机制提

供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

载体 pGL3-Basic、pGL 4.74 及荧光素酶检测试剂盒 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 均购自 Promega 公司。转染试剂 X-tremeGENE HP 购于 Roche 公司。限制性内切酶和 *Taq* DNA 聚合酶等常用分子生物学试剂均购自 TaKaRa 公司。胶回收与质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。DMEM-F12 细胞培养基和新生牛血清购自 Gibco 公司(美国)。莱芜猪耳组织基因组 DNA、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和小鼠 NIH/3T3 细胞株均由本实验室保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物信息学分析

使用 Web Promoter Scan Service (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) 预测 *CuZnSOD* 5'端转录起始位点;使用 Primer5.0 软件里的 motif 模块进行 TATA-box、CAAT-box、GC-box 的预测;使用 Transcription Element Search System (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) 预测潜在的转录因子结合位点;使用 TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch>) 在线软件对潜在的转录因子结合位点进行预测。

#### 1.2.2 猪 *CuZnSOD* 基因 5'上游 853 bp 启动子序列的克隆扩增

根据 NCBI 基因数据库中猪 *CuZnSOD* 基因 5'上游序列,设计合适的引物。上游引物 SOD-F: 5'-ACTCTAACCTCCTTGACGGC-3', 下游引物 SOD-R: 5'-AGCTCGAAGTAG ATGGTGCC-3'。

使用 *PrimeSTAR HS DNA Polymerase*, 以猪基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *CuZnSOD* 基因 5'上游 853 bp 片段。

PCR 扩增体系: 5 $\times$ PrimeSTAR 缓冲液 10  $\mu$ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, 灭菌蒸馏水 32.5  $\mu$ L。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 66  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共计 30 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。使用胶回收试剂盒回收目的 PCR 片段, 连接到 pMD18-T 载体上, 构建重组质粒 pMD18-T-SOD1, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 氨苄青霉素平板涂板后培养过夜进行抗性筛选, 阳性克隆经酶切鉴定, 使用通用引物对其进行测序。

#### 1.2.3 *CuZnSOD* 基因启动子不同长度片段重组载体的构建

以测序鉴定正确的重组质粒 pMD18-T-SOD1 为模板, 设计 7 条上游引物, 在其上、下游引物的 5'端分别引入了 *Mlu* I 和 *Bgl* II 酶切位点, 用巢式 PCR 的方法扩增不同长度的 5'端缺失序列, 引物信息见表 1。PCR 扩增体系如 1.2.2。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共计 30 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经分离纯化后, 用限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Bgl* II 进行双酶切, 然后连接到同样经过 *Mlu* I 和 *Bgl* II 双酶切处理过的 pGL3-Basic 线性载体上, 阳性重组子经双酶切鉴定及测序保证正确。获得 7 个插入 *CuZnSOD* 基因启动子不同长度片段的重组表达质粒, 分别命名为 pGL3-A、pGL3-B、pGL3-C、pGL3-D、pGL3-E、pGL3-F 和 pGL3-G。

### 1.2.4 细胞培养及转染

NIH/3T3 细胞在含有 10% 新生牛血清的 DMEM-F12 培养基中, 于 37 °C、含 5% 的 CO<sub>2</sub> 的条件下培养。转染前, 将所培养细胞按照大约每孔 1×10<sup>5</sup> 细胞接种到 24 孔板, 待细胞完全贴壁生长至 70%–90% 密度时可用于转染试验。

按照 Roche 公司的 X-tremeGENE HP 转染试剂盒说明书进行转染, 将猪 *CuZnSOD* 启动子报告基因质粒与内参照质粒 pGL 4.74 共转染至 NIH/3T3 细胞中。转染时每孔加入报告基因质粒 0.5 μg, 内参照质粒 pGL 4.74 0.012 5 μg, 脂质体 1.5 μL, 每个实验组设置 4 个重复, pGL3-Basic 质粒和内参照质粒 pGL 4.74 共转染作为阴性对照。转染 48 h 后收集细胞, 检测荧光素酶活性。

### 1.2.5 双荧光素酶活性测定

按 Promega 公司提供的 Dual-luciferase Assay System 试剂盒进行双荧光素酶的检测, 启

动子活性用相对荧光素酶值 (萤火虫荧光素酶激发底物释放荧光的数值 M1 与内参照海肾荧光素酶释放荧光的数值 M2 的比) 表示。

### 1.2.6 数据统计分析

各组试验数据均计算平均值及标准误, 应用 SAS 8.2 软件进行方差分析, 采用 Duncan 法进行均数间多重比较, 统计学分析  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 猪 *CuZnSOD* 基因 5' 端序列的生物信息学分析

本研究采用 PCR 方法从猪基因组克隆得到 *CuZnSOD* 基因 5' 上游调控区 853 bp 的片段, 用生物信息学软件分析发现, 在猪 *CuZnSOD* 基因 5' 端 -87 bp 和 -266 bp 处存在 2 个潜在转录起始位点 (TSS), 缺乏经典的 CAAT-box 和 GC-box 保守序列, 但检测到一个 TATA-box (图 1)。

表 1 PCR 引物序列

Table1 Primers sequence of PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
SOD1-A	CGACGCGTACTCTAACCTCCTTGACGGC	853
SOD1-B	CGACGCGTCCAAACAGGAAATGCTCGCA	753
SOD1-C	CGACGCGTCCAGGGATTGGGATGTTGCG	653
SOD1-D	CGACGCGTGACAACGTCACGACCAAAGT	533
SOD1-E	CGACGCGTCTCATTTTTCCAACCTTCGTG	453
SOD1-F	CGACGCGTCCGCGGGGCGGTGGGAGCCG	353
SOD1-G	CGACGCGTCGCGGAGCGGGCGATTGGTT	233
SOD1-G1	CGACGCGTGAGACGGTCCGGCCTATAA	192
SOD1-G2	CGACGCGTAAGGTTCCACGGCGCCGCC	174
SOD1-G3	CGACGCGTGTGCGCGTGTACTGCGGCC	143
SOD1-G4	CGACGCGTCCAGCCCGGACCGGAGCGCG	100
r-SOD1	GGAAGATCTAGCTCGAAGTAGATGGTGCC	

```

-758 ACTCTAACCT CCTTGACGGC TGTGCCAGCA GAGACAGGCC ACAGAGGTGC GTAGAAGATC
-725 AGTCAGGTGA CATTGTGTA TTTTATAGATT TGTGGCCTTG CCAAACAGGA AATGCTCGCA
-665 AAGAATACAC GAATCTGATA ACCAAAGAAG TAACTTCACA GGTCATGGAC TAAGAAAACCT
-605 CCAGGGAACA AAACCTGAGG CCAGGGATTG GCATGTTCCC ACTTTACACA CTCTCAGAAA
-545 TGACAAACAC TAGACACATA AAAAACGAAA ACTATCAAAA GCACCCAGCT CCATTGTGCC
-485 AACTTCTAAA TAACAAATGC GACAACGTCA CGACCAAAGT CAGAACGAAC TACGTTTCCA
-425 GACAAAGGGA CCTCAGGTCT TCAAGGCGTG CCGTGTATAC CTCATTTTTTC CAACTTCGTG
-365 TGCTGCAATC CACGGATTGC CCGTTTTTGA GGAGAAATGT TGTTTTTTTC CACAGCGCCA
-305 GCTTTCTGGG CGTTTACAG CCGCGGGGCG GTGGGAGCCG GCGGCGCGGA GAGGAAGGCT
-245 GCACACGCGG CCCCTTGGCC CCGCCCCCGG CCATTCCCGG CCGCTCGCGT CCCGAGGTTC
-185 CCCGTGGGGA GCGGGTTGAG CGCGCGAGCG GCGATTGGTT CCGGGCAAGG GTGGGCGGGG
-125 CGAGACGGTC CCGCC[TATAA] AGGTTCCACG GCGCCGCGCG CTCGGTTTGC GTCGGCGTGT
-65 ACTGCGGCCT CTCCCGCTGC TTCTGGTACC CTCCCAGCCC GGACCGGAGC GCGCCCCCGC
-5 GAGTCATGGC GACGAAGGCC GTGTGTGTGC TGAAGGGCGA CCGCCCCGGT CAGGGCACCA
+55 TCTACTTCCA GCT

```

图 1 猪 *CuZnSOD* 基因 5'端调控序列及预测分析

Fig. 1 Prediction of potential regulatory sequences of pig *CuZnSOD* 5'-flanking region. TSS: transcriptional start site.

## 2.2 *CuZnSOD* 基因启动子及缺失片段的克隆

以重组质粒 pMD 18-T-SOD1 为模板,以不同的引物扩增不同长度的 5'侧翼序列,片段预期长度分别为 853 bp、753 bp、653 bp、533 bp、453 bp、353 bp 和 233 bp,琼脂糖凝胶电泳分析显示得到了预期大小的片段(图 2),PCR 扩增产物与预期片段大小相符。

## 2.3 荧光素酶表达载体的构建及酶切鉴定

构建的荧光素酶报告基因载体经限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Bgl* II 双酶切,酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离(图 3)。检测结果表明,

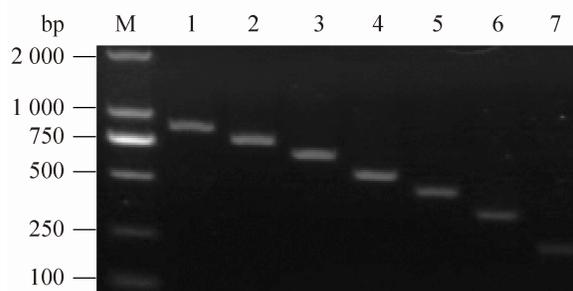


图 2 PCR 扩增 *CuZnSOD* 基因 5'端不同长度缺失片段

Fig. 2 PCR amplification of various length deletion fragments of *CuZnSOD* gene promoter. M: 2 000 bp DNA marker; 1: 853 bp; 2: 753 bp; 3: 653 bp; 4: 533 bp; 5: 453 bp; 6: 353 bp; 7: 233 bp.

酶切下的目的片段大小与预期吻合。将重组载体进行测序，测序结果亦表明插入片段序列及方向正确无误。

#### 2.4 5'端缺失片段的双萤光素酶活性检测

将上述构建的含 *CuZnSOD* 不同长度启动子的 7 种表达载体与内参照 pGL 4.74 载体分别共转染 NIH/3T3 细胞，以 pGL3-Basic 和 pGL 4.74 共转染作为阴性对照，48 h 后收集细胞，测定荧光

素酶的相对表达活性。结果表明，pGL3-E 活性最强，启动子活性都显著性高于其他载体 ( $P < 0.05$ )。从 pGL3-E 到 pGL3-G，相对活性出现了显著下降 ( $P < 0.05$ )，pGL3-F 的相对荧光素酶活性是 pGL3-E 的 75%，pGL3-G 的相对荧光素酶活性是 pGL3-E 的 33%。pGL3-F 和 pGL3-G 相对于 pGL3-E 都缺少了 -385~-285 bp 区域，提示 -385~-285 bp 区域内存在正调控区域或增强子。

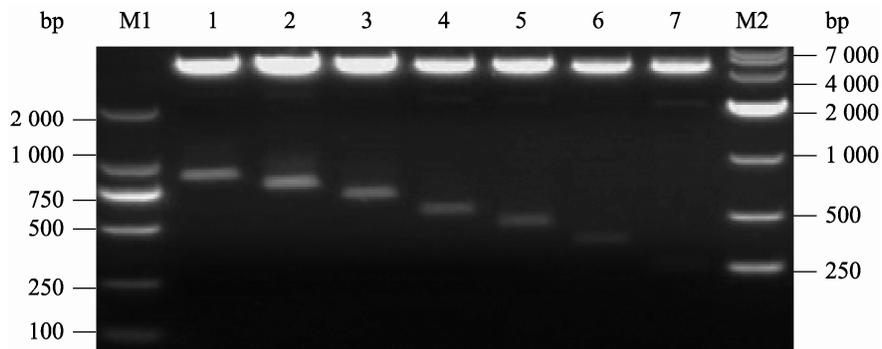


图 3 重组载体的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmids with digestion. M1: 2 000 bp DNA marker; M2: 10 000 bp DNA marker; 1: 853 bp; 2: 753 bp; 3: 653 bp; 4: 533 bp; 5: 453 bp; 6: 353 bp; 7: 233 bp.

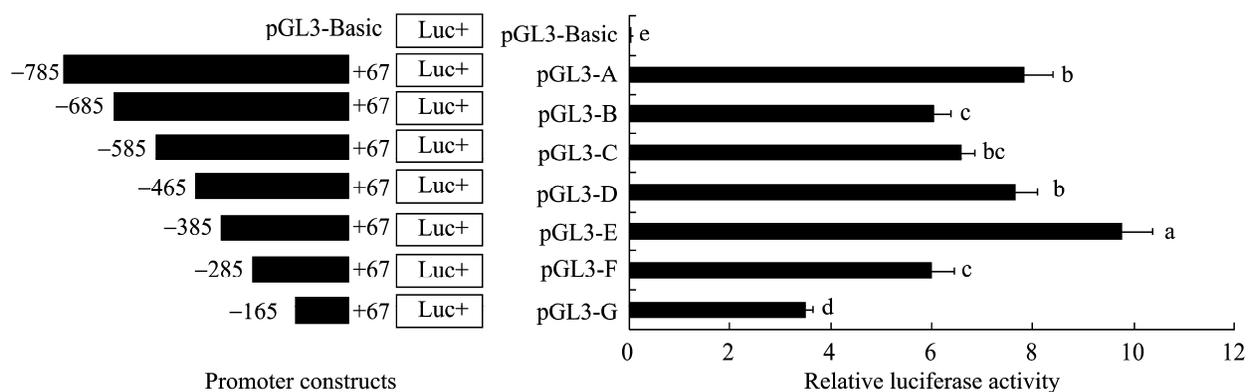


图 4 猪 *CuZnSOD* 基因 5'侧翼序列的启动子活性检测

Fig. 4 Results of 7 fragments analyzed with dual-luciferase reporter system. pGL3-A-G: the activity of A-G in pGL3-Basic vector, respectively; pGL3-Basic: negative control, the activity in blank vector. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

## 2.5 核心启动子的确立

根据 *CuZnSOD* 基因调控区 7 个缺失片段相对活性的检测结果,我们以重组载体 pGL3-G 为模板,再次设计 4 条上游引物 SOD1-G1、SOD1-G2、SOD1-G3 和 SOD1-G4 (表 1),预期得到片段大小分别为 192 bp、174 bp、143 bp 和 100 bp,按照上述相同的方法构建重组载体,依次命名为 pGL3-G1、pGL3-G2、pGL3-G3 和 pGL3-G4 (图 5)。按照同样的方法分别转染细胞检测荧光素酶活性。结果发现,从 pGL3-G 到 pGL3-G4,启动子相对活性出现了显著下降 ( $P < 0.05$ ),重组载体 pGL3-G2 与 pGL3-G3 相差了 31 个碱基,但两者的相对活性差异不显著 ( $P > 0.05$ )。pGL3-G3 与 pGL3-G4 的启动子相对活性差异显著 ( $P < 0.05$ ),但 pGL3-G4 的启动子活性与 pGL3-Basic 无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 6)。这表明在 -75~-32 bp 范围内存在调控基础转录活性元件。为了进一步确定该调控序列,使用在线软件 TESS 对该区域进行预测,表明这一区域有 RAF (TCGG)、T-Ag (GCGGC)、ADR1 (TCTCC)、MAZ (CCCTCC)、CTCF (CCCTC)、

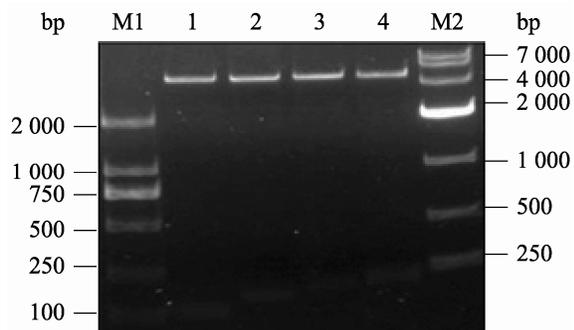


图 5 二次构建的重组载体双酶切鉴定

Fig. 5 Identification of 4 recombinant plasmids with digestion. M1: 2 000 bp DNA marker; M2: 10 000 bp DNA marker; 1: 100 bp; 2: 143 bp; 3: 174 bp; 4: 192 bp.

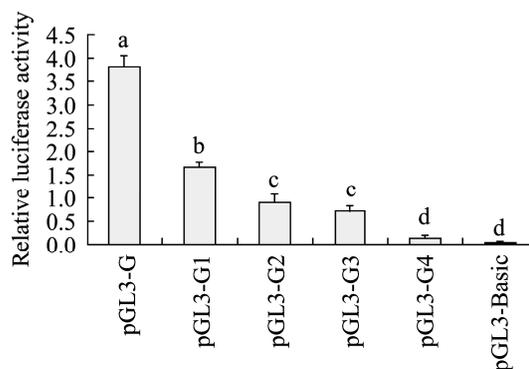


图 6 二次构建的重组载体的启动子活性

Fig. 6 Results of 4 fragments analyzed with dual-luciferase reporter system. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

AP-2 和 AP-2 $\alpha$  (CCMNSSS) 等重要转录因子的潜在结合位点;用 TFSEARCH 分析这一序列含有 HSF、Egr-1 和 ADR1 等转录因子结合位点。

## 3 讨论

超氧化物歧化酶是一种重要的细胞内抗氧化酶,能够保护细胞以抵御超氧化物自由基的侵害,它能将超氧阴离子自由基快速歧化为  $H_2O_2$  和  $O_2$ <sup>[10]</sup>。许多刺激都可以影响 *CuZnSOD* 基因的表达,例如应激、促炎性细胞因子、生长因子<sup>[11-12]</sup>等。Park 等<sup>[13]</sup>研究结果表明,*CuZnSOD* 基因的 5'侧翼含有一个抗氧化反应元件 (ARE);ARE 是一个 DNA 基序,它存在于一些因应答氧化应激而被活化的解毒基因的上游调控区域中<sup>[14]</sup>。

真核生物启动子属于 mRNA 基因启动子,相对复杂,位于结构基因 5'端上游,主要包括 TATA-box、起始子、CAAT-box 和 GC-box 等,其中的 TATA-box 和起始子被称为核心启动子<sup>[15]</sup>,TATA-box 是转录因子 TF II D 的 TBP 亚基的结合位点。本研究利用 PCR 技术克隆了 *CuZnSOD*

基因 5'上游启动子区 853 bp (-785 bp~+67 bp) 长度的片段,并通过 DNA 序列分析证实了其序列无突变。生物信息学软件分析发现距起始密码子 ATG 上游 105 bp 处含有一个 TATA-box,符合真核生物基因的典型启动子结构。

分析启动子活性,需要将启动子插入到报告基因的上游构建表达载体,通过转染细胞来检测启动子对报告基因表达水平的影响。韩凤桐等<sup>[16]</sup>和张东杰等<sup>[17]</sup>采用这种方法分别对牛 *Sry* 基因和猪 *MC4R* 基因的核心启动子区进行了分析,均发现了一段对目的基因基础转录活性起重要作用的序列。Ruan 等<sup>[18]</sup>对猪生长激素基因启动子进行了研究,发现该基因的最小启动子区为-110 bp~+61 bp;Ling 等<sup>[19]</sup>研究表明在猪脂联素基因启动子-1 671 bp~-1 455 bp 区域内存在着对脂联素基因高表达所需的潜在调控元件。本研究利用巢式 PCR 的方法获得一系列 5'末端逐渐缺失的 *CuZnSOD* 基因启动子,并将这些片段定向连接到 pGL3-Basic 载体上,然后与内参质粒 pGL 4.74 共转染细胞以检测启动子的活性。pGL3-Basic 含有萤火虫荧光素酶报告基因,不含启动子,其荧光素酶活性直接反映了克隆区域内启动子的活性;内参质粒 pGL 4.74 含有海肾荧光素酶报告基因,用来校正转染效率。为消除实验误差,每次转染和测定都做重复样。检测结果表明:第一次构建的 7 种载体中 pGL3-E 活性最强,启动子活性都显著性高于其他载体 ( $P < 0.05$ ),pGL3-A 次之,pGL3-G 活性最弱,但也显著性高于 pGL3-Basic ( $P < 0.05$ ),从 pGL3-E 到 pGL3-G,相对活性逐渐下降。为进一步缩小区域以确定该基因启动子重要调控区

域,本研究利用相同方法又构建了 4 个不同长度启动子的重组载体。荧光素酶活性分析表明,从 pGL3-G 到 pGL3-G4 相对活性出现了显著下降,pGL3-G3 和 pGL3-G4 之间差异显著 ( $P < 0.05$ ),但 pGL3-G4 已不再具有启动活性,因此认为 pGL3-G4 相对 pGL3-G3 所缺少的-75 bp~-32 bp 这一片段中包含着 *CuZnSOD* 基因的重要调控序列。

Minc 等<sup>[9]</sup>研究表明人 *CuZnSOD* 基因启动子-71~+1 bp 区域对基础水平的转录是必需的,并且已经确认-59~-48 bp 区域能够结合 SP-1 和 Egr-1。本研究利用 TESS 生物信息学软件分析-75~-32 bp 这一区域,发现在这 44 bp 的片段里存在多个潜在转录因子的结合位点,如 RAF (TCGG)、T-Ag (GCGGC)、ADR1 (TCTCC)、MAZ (CCCTCCC)、CTCF (CCCTC)、AP-2 和 AP-2 $\alpha$  (CCMNSSS) 等潜在结合位点;利用 TFSEARCH 软件分析发现该区域含有 HSF、Egr-1 和 ADR1 等转录因子结合位点,这提示乙醇脱氢酶基因调节因子 ADR1 可能参与猪 *CuZnSOD* 基因的转录调控。Kim 等<sup>[20]</sup>研究表明 AP2、CREB 和 HSF 可能参与鼠 *CuZnSOD* 基因表达;Gralla 等<sup>[21]</sup>研究表明铜依赖性转录因子 ACE1 能够激活酵母 *CuZnSOD* 基因的表达;Minc 等<sup>[9]</sup>和 Seo 等<sup>[22]</sup>研究都表明 sp1 在人 *CuZnSOD* 基因的表达调控中起着关键作用,说明不同物种 *CuZnSOD* 基因的表达中起关键转录调控因子可能有所不同。

本研究通过构建缺失片段的荧光素酶报告基因重组载体,将猪的 *CuZnSOD* 基因启动子区核心元件定位在-75~-32 bp 区域内,研究结果

不仅为详细阐明猪 *CuZnSOD* 基因的表达调控机制奠定了基础,而且也将为研究与猪 *CuZnSOD* 基因启动子区结合的转录因子提供数据参考。

## REFERENCES

- [1] Zyracka E, Zadrag R, Koziol S, et al. Yeast as a biosensor for antioxidants: simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52(3): 679–684.
- [2] Li H, Zeng YQ, Wei SD, et al. Changes of superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in postmortem muscle and their association with meat quality in pigs. *Acta Vet Zootech Sin*, 2010, 41(3): 257–261 (in Chinese).  
李华, 曾勇庆, 魏述东, 等. 猪宰后肌肉 SOD 与 MDA 的变化及其对肉质特性的影响. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(3): 257–261.
- [3] Du JF, Zeng YQ, Wang H, et al. *CuZnSOD* gene expression and its relationship with anti-oxidative capacity and pork quality. *S Afr J Anim Sci*, 2010, 40(3): 265–272.
- [4] Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, et al. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active. *Dev Biol*, 2008, 320(1): 1–11.
- [5] Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases. *Med Sci Moint*, 2002, 8(9): 210–215.
- [6] Du JF, Zeng YQ, Chen W, et al. Cloning, expression and functional analysis of *CuZnSOD* gene in swine. *Hereditas*, 2010, 32(10): 1037–1042 (in Chinese).  
杜金芳, 曾勇庆, 陈伟, 等. 猪 *CuZnSOD* 基因的克隆、表达及功能分析. *遗传*, 2010, 32(10): 1037–1042.
- [7] Fridovich I. Superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem*, 1975, 44: 147–159.
- [8] Kim HT, Kim YH, Nam JW, et al. Study of 5'-flanking region of human *Cu/Zn* superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 201(3): 1526–1533.
- [9] Minc E, de Coppet P, Masson P, et al. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (*SOD1*) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem*, 1999, 274(1): 503–509.
- [10] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene Family: a comparison of the *CuZnSOD* (*SOD1*), *MnSOD* (*SOD2*), and *EC-SOD* (*SOD3*) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biol Med*, 2002, 33(3): 337–349.
- [11] Chang MS, Yoo HY, Rho HM. Transcriptional regulation and environmental induction of gene encoding copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *Method Enzymol*, 2002, 349: 293–305.
- [12] Yoo HY, Chang MS, Rho HM. The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem*, 1999, 274(34): 23887–23892.
- [13] Park EY, Rho HM. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol Cell Biochem*, 2002, 24(1/2): 47–55.
- [14] Mulcahy RT, Wartman MA, Bailey HH, et al. Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J Biol Chem*, 1997, 272(11): 7445–7454.
- [15] Pedersen AG, Baldi P, Chauvin Y, et al. The biology of eukaryotic promoter prediction. *Compute Chem*, 1999, 23(6): 91–209.
- [16] Han FT, Lin XK, Liu D, et al. Identification of the regulation sequences of bovine sry promoter. *Sci*

- Agric Sin, 2010, 43(14): 2996–3004 (in Chinese).  
韩凤桐, 林秀坤, 刘娣, 等. 牛 Sry 启动子调控序列的鉴定. 中国农业科学, 2010, 43(14): 2996–3004.
- [17] Zhang DJ, Wang L, Liu D, et al. Cloning and activity analysis of promoter of pig melanocortin-4 receptor gene (MC4R). J Agric Biotech, 2011, 19(4): 734–739 (in Chinese).  
张东杰, 汪亮, 刘娣, 等. 猪黑素皮质激素受体-4 基因 (MC4R) 启动子克隆及其分析. 农业生物技术学报, 2011, 19(4): 734–739.
- [18] Ruan N, Zhang MJ, Ju HM, et al. Cloning and functional analysis of the porcine growth hormone gene promoter. Agr Sci Technol, 2012, 13(4): 893–896.
- [19] Ling F, Li JQ, Chen YS, et al. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the pig adiponectin gene. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 381(2): 236–240.
- [20] Kim YH, Yoo HY, Jung G, et al. Isolation and analysis of the rat genomic sequence encoding Cu/Zn superoxide dismutase. Gene, 1993, 133(2): 267–271.
- [21] Gralla EB, Thiele DJ, Silar P, et al. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(19): 8558–8562.
- [22] Seo SJ, Kim HT, Cho G, et al. Spl and C/EBP-related factor regulate the transcription of human Cu/Zn SOD gene. Gene, 1996, 178(1/2): 177–185.

(本文责编 陈宏宇)

### 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要:基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose):主要说明作者写此文章的目的,或说明本文主要要解决的问题;方法(Methods):重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要,可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results):本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions):如系基础研究,应写明本文的创新之处,及文章在讨论部分表述的观点;如系应用性研究,应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要:包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望,尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点:英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后,务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称,尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句,避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语,除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等),或者确实是非常长,而且出现多次的短语才允许用缩写语,并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英文摘要中,不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。