

斑马鱼*il-11b*基因5'端启动子序列及体外活性分析

丁安, 张秋月, 张哲, 徐行, 岳倩文, 任建峰, 李伟明, 张庆华

Sequence analysis of 5' upstream promoter of *il-11b* gene in zebrafish and construction of reporter gene vectors

DING An, ZHANG Qiuyue, ZHANG Zhe, XU Xing, YUE Qianwen, REN Jianfeng, LI Weiming, ZHANG Qinghua

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20191102843>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

东北七鳃鳗*NF-κB*基因启动子的构建及活性

Construction and activity of *NF-κB* promoter reporter in *Lampetra morii*

水产学报. 2020, 44(11): 1804 <https://doi.org/10.11964/jfc.20200112119>

中国明对虾*Fcβ* *GBP-HDL*基因和启动子的克隆及序列特征分析

Analysis of genomic structure and the promoter characterization of *Fcβ* *GBP-HDL* from *Fenneropenaeus chinensis*

水产学报. 2013, 37(2): 175 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2013.38200>

虹鳟免疫诱导型基因*Cathelicidin2*启动子功能分析

Functional Analysis of the Immune-Induced Promoter of the Rainbow Trout *Cathelicidin2* Gene

渔业科学进展. 2018, 39(4): 37 <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20170614001>

日本鳗鲡*IFN-γ*基因的鉴定、表达模式及启动子活性分析

CHARACTERIZATION, EXPRESSION PATTERN AND PROMOTER ACTIVITY ANALYSIS OF INTERFERON-GAMMA IN JAPANESE EEL, *ANGUILLA JAPONICA*

水生生物学报. 2017, 41(3): 589 <https://doi.org/10.7541/2017.76>

杂色鲍*HSP90*基因启动子的功能分析

Functional analysis of the promoter in *Haliotis diversicolor* *HSP90* gene

水产学报. 2017, 41(4): 490 <https://doi.org/10.11964/jfc.20160310311>

华贵栉孔扇贝*MSTN*基因启动子的功能分析

Functional analysis of *MSTN* promoter in scallop (*Chlamys nobilis*)

南方水产科学. 2019, 15(1): 63 <https://doi.org/10.12131/20180182>

文章编号: 1674-5566(2021)04-0581-09

DOI:10.12024/jso.20191102843

斑马鱼 *il-11b* 基因 5'端启动子序列及体外活性分析

丁安^{1,2}, 张秋月^{1,2}, 张哲^{1,2}, 徐行^{1,2}, 岳倩文^{1,2}, 任建峰^{1,2}, 李伟明³, 张庆华^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 3. 密歇根州立大学渔业与野生生物系, 美国密歇根东兰辛 48824)

摘要: 白细胞介素 11 (interleukin-11, IL-11) 是白细胞介素家族的重要成员, 其在伤口愈合、癌细胞迁移及免疫调控等过程中起到关键作用。为了深入研究 IL-11 的转录调控机制, 通过生物信息学分析, 找出斑马鱼 (*Danio rerio*) *il-11b* 基因的 3 000 bp 启动子序列, 经缺失处理获得 2 908 bp、2 000 bp、1 000 bp 和 500 bp 的片段, 进行 PCR 扩增并与 pGL3-enhancer 载体重组构建 pGL3-*il-11b*-promoter-Enhancer 报告基因质粒, 之后转染 HEK293T 细胞, 再用双荧光素酶报告基因检测系统检验其转录活性。结果显示: *il-11b* 启动子序列上存在 3 个潜在的启动子区和 7 个 CpG 岛, 潜在的转录因子结合位点包括 Sp1、CACCC-box、Egr-1、ICSBP、c-Jun、COUP、GR、RBP1、NF-kappaB、REV-ErbAalpha、ER、RAR-alpha1、RXR-beta、SRF、Oct-1、Oct-2、Pit-1a、GCN4、HNF-1、TBP、C/EBPalpha、HNF-1C、Oct-2.1、USF 等。成功扩增出 *il-11b* 不同片段启动子, 重组质粒双酶切检测条带大小一致, 测序比对正确, 双荧光素酶检测 pGL3-*il-11b*、pGL3-*il-11b*-Δ1、pGL3-*il-11b*-Δ2、pGL3-*il-11b*-Δ3、pGL3-*il-11b*-Δ4、pGL3-*il-11b*-Δ5 报告基因质粒的活性分别是 pGL3-enhancer 对照组的 1.94、14.92、5.33、9.11、0.75、1.32 倍。该结果为研究细胞因子参与的免疫相关信号调控提供了有力的研究工具。

关键词: 斑马鱼; *il-11b*; 启动子; 报告基因

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

自然界中的生物体依靠强大的免疫功能抵御和清除入侵的病原体, 使生物体处于动态平衡^[1]。目前, 病原体与宿主之间的相互作用关系是免疫学领域关注的焦点^[2]。鱼类作为脊椎动物, 尤其是硬骨鱼类, 其免疫系统与哺乳类存在极大的相似性^[3]。对其免疫系统研究^[4]发现, 鱼类的免疫系统主要以细胞免疫和体液免疫的方式对外来病原进行免疫应答。细胞因子行使广泛的免疫防御功能, 在众多生物的生理过程中发挥关键作用^[5]。

细胞因子来源于被活化后的单核细胞、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等, 其本质是具有广泛生物学活性的一类小分子蛋白质^[6], 是重要的免疫信号分子, 与相应的细胞受体结合, 发挥信号转导、调控炎症反应等生物学效应^[7]。它们通常在静

息状态下合成量很低, 只有在受到刺激后分泌才会升高, 以协同作用的方式作用于不同的细胞因子、病原相关分子等^[8]。白细胞介素 (interleukins, IL) 是一类非常重要的细胞因子, 成员众多, 功能复杂。

白细胞介素 11 (IL-11) 是具备多种功能的细胞因子, 来源于骨髓基质细胞, 调控造血和巨核细胞系祖细胞的生长^[9-10]。临床上已广泛用于非髓性白血病化疗后 III、IV 度血小板减少症和实体瘤等疾病的治疗^[11-12]。近期有关报道^[11]称, IL-11 通过非经典细胞外蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 依赖性自分泌途径调控成纤维蛋白的活化与失活, 进而影响组织器官的纤维化。IL-11 可通过调控硫氧还蛋白互作蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP) 的

收稿日期: 2019-11-01 修回日期: 2020-08-27

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项 (2019YFD0900102); 教育部留学回国人员科研启动基金 (D-8002-15-0042); 水产动物疾病与基因编辑育种的平台建设和前沿科学研究项目 (A1-3201-19-3013)

作者简介: 丁安 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子免疫学。E-mail: 740938009@qq.com

通信作者: 张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

表达从而参与丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)逃避宿主的固有免疫^[13]。异育银鲫(*Carassius auratus*) IL-11 在鲤疱疹病毒 II 型(cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染过程中发挥先天免疫的作用^[14]。鲤科鱼类有 *il-11a* 和 *il-11b* 两个直系同源基因,并且它们在免疫应答过程中可能扮演着不同的角色^[15]。但是对其转录水平的调控机制及其启动子的研究鲜有报道。

斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和金鱼(*Carassius auratus*)同属于鲤科硬骨鱼类,近年来广泛应用于早期发育、药物筛选、环境毒理等研究领域。斑马鱼作为脊椎动物,比果蝇和线虫更接近人类^[16],而且十分有利于观察病原体与鱼体内免疫细胞的实时动态变化关系^[17-18]。但是,目前相关抗体及细胞系的稀缺是斑马鱼研究的瓶颈,如何以斑马鱼为模型有效地深入研究基因的功能变得十分艰难,找到可行的办法显得格外重要。

目前,报告基因是基因功能研究的有效办法,其中启动子活性的检测通常用到双荧光素酶报告基因系统。因此构建报告基因系统可对目的基因所具备的功能及其所参与的信号通路提供有力的研究工具。目前张秋月等^[19]、岳倩文等^[20]分别构建了斑马鱼 *tnfβ* 和 *ifnγ* 的报告基因,为斑马鱼免疫应答机制研究提供了有力工具。但通过文献检索,未发现斑马鱼 *il-11b* 的启动子报告基因。本研究通过序列分析,对斑马鱼 *il-11b* 的启动子区进行研究,从而构建 *il-11b* 基因的荧光素酶报告系统,为今后深入研究与其调控机制相关的转录因子及细胞因子调控网络奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验用斑马鱼来源于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,本实验室参照 Westerfield (或 <http://zfinfo/zfbook/zfbk.html>) 养至性成熟。试验按照上海海洋大学动物伦理委员会的相关规定进行

(SHOU-DW-2016-002)。

1.2 试验方法

1.2.1 斑马鱼 *il-11b* 启动子生物信息分析

利用 UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu/index.html>) 和 Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) 数据库获得斑马鱼 *il-11b* 启动子序列;利用 Promoter 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) 及 PomoterScan 2.0 (<https://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) 预测启动子区;利用 EMBOSS Cpgplot (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/) 和 Methprimer-Design (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 预测 CpG 岛。利用 AliBaba (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) 预测潜在转录因子结合位点。

1.2.2 斑马鱼 *il-11b* 启动子报告基因载体构建

按照设定的试验流程(图 1)构建斑马鱼 *il-11b* 启动子报告基因载体。利用 DNA 提取试剂盒(TIANGEN, PD324-03)提取斑马鱼尾鳍基因组 DNA。根据预测的启动子序列,设计引物(表 1),按照试剂盒 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (TaKaRa, R045Q)说明进行 PCR 扩增,产物经凝胶电泳检测,如条带单一则直接按照试剂盒(TIANGEN, DP204)说明进行,如条带不单一则进行目的片段割胶回收(TIANGEN, DP209-02),纯化产物按照试剂盒(TaKaRa, 6109)进行加 A 尾反应,反应结束后按照试剂盒(TaKaRa, D102A)连接 pMD19-T 载体,之后按照试剂盒(TIANGEN, CB101)转化 DH5 α ,并按照试剂盒(TaKaRa, 9152A)挑选单克隆扩培后进行菌液 PCR,选取条带明亮单一的克隆进行测序。按表 1 中酶切位点引物进行 PCR 扩增,凝胶电泳检测,纯化回收 PCR 产物,将其和 pGL3-Enhancer 同时按照表 1 核酸内切酶酶切位点双酶切,其后操作除测序外同 1.2.2 节,扩大培养菌液后按照试剂盒(TIANGEN, DP106-02)提取重组质粒,然后进行双酶切检测,酶切反应均按照试剂盒说明书进行, *Kpn* I (TaKaRa, 1068S)、*Sac* I (TaKaRa, 1078S)、*Nhe* I (TaKaRa, 1241S)。

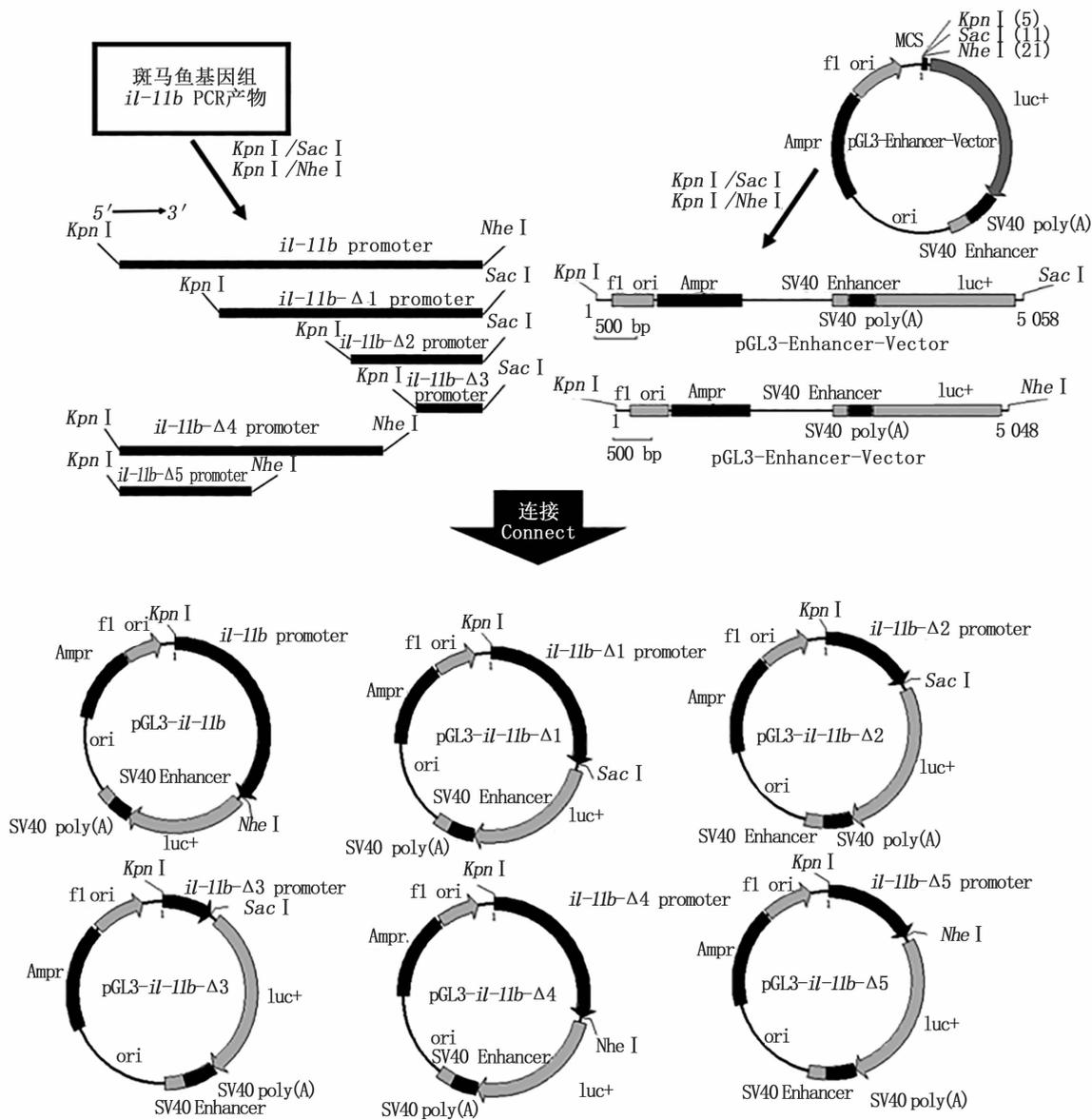


图 1 *il-11b* 启动子报告基因构建过程
 Fig. 1 Progress of construction of the *il-11b* promoter reporter gene

表 1 启动子片段引物序列
 Tab. 1 Primer sequences of promoters

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	片段大小 Fragment size/bp	酶切位点 Restriction enzyme cutting sites
<i>il-11b</i>	F:GTGGCTATGACGACCCTAC R:TTATTCTCCGCTACGGCTGAC	2 908	<i>Kpn</i> I <i>Nhe</i> I
<i>il-11b-Δ1</i>	F:GGTCTGATGTTTGTATTATAACTT R:GTCATCAGAAAATAAAAAGTCCCCGC	2 000	<i>Kpn</i> I <i>Sac</i> I
<i>il-11b-Δ2</i>	F:TCCAATTATTAGTTATTCATTAGTG R:GTCATCAGAAAATAAAAAGTCCCCGC	1 000	<i>Kpn</i> I <i>Sac</i> I
<i>il-11b-Δ3</i>	F:GTGCTACTCTTGCTGTCAGGTTTC R:GTCATCAGAAAATAAAAAGTCCCCGC	500	<i>Kpn</i> I <i>Sac</i> I
<i>il-11b-Δ4</i>	F:GACGACTACTATGGCGTTATGATT R:TTACTGATGTCCATGTAACAGTCA	2 000	<i>Kpn</i> I <i>Nhe</i> I
<i>il-11b-Δ5</i>	F:GACGACTACTATGGCGTTATGATT R:AGCGGCCGCAGCTCTTAAGCTAAGC	1 000	<i>Kpn</i> I <i>Nhe</i> I

1.2.3 斑马鱼 *il-11b* 启动子体外活性分析

HEK293T 细胞培养于 10% FBS-DMEM 培养液, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 每 48 h 传代 1 次, 转染前 24 h 以约 2.0×10^4 /孔的密度接种于 96 孔细胞培养板, 达到 80% 汇合度, 进行转染, 转染试剂混合物及转染条件按照试剂盒 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche, 06366236001) 说明进行。37 °C、5% CO₂ 培养 24 h, 荧光素酶检测按照试剂盒 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, E1910) 使用说明进行, 将 Firefly Luciferase 与 Renilla Luciferase 进行对比。每次实验设 3 个复孔, 每组实验重复 3 次。使用 Prism graphpad 画图, 利用 SPSS 软件进行显著性分析 ($n = 3$, ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼 *il-11b* 启动子序列生物信息学分析

2.1.1 *il-11b* 启动子区域预测分析

在 UCSC 数据库获得一条 *il-11b* 3 000 bp 启动子序列, 分别使用生物信息学在线软件 Promoter 2.0 和 PromoterScan 2.0 对序列进行潜

在的启动子区域预测(图 2), 设置 cutoff 值为 53.00。Promoter 2.0 在 *il-11b* 3 000 bp 启动子序列上预测到 2 个非常可能的启动子区, 分别位于 -1 500 bp 和 -900 bp; PromoterScan 2.0 预测到 3 个启动子区(图 1), 第 1 个启动子区位于 -2 957 bp ~ -2 701 bp, 启动子得分 = 215.93, 第 2 个启动子区位于 -2 502 bp ~ -2 252 bp, 启动子得分 = 61.20, 第 3 个启动子区位于 -1 372 bp ~ -1 122 bp, 启动子得分 = 66.48, 并预测到在转录起始过程中起到至关重要作用的 TATA 框 (TATA box) 和转录起始位点 (Transcription Start Site, TSS), 分别位于 -1 160 bp 和 -1 130 bp。

根据 Promoter 2.0 的预测结果, 初步判断斑马鱼 *il-11b* 3 000 bp 启动子序列的启动子区域应该位于 -1 500 bp 至 -900 bp。根据 PromoterScan 2.0 的预测结果, 因为 TATA box 和 TSS 位于第 2 个启动子区, 所以 *il-11b* 核心启动子区应该位于 -1 372 bp 至 -1 122 bp, 并且在在其上游远端 -2 957 bp ~ -2 707 bp 和 -2 502 bp ~ -2 252 bp 存在调控元件。综合考虑两个生物信息学预测分析的结果, 斑马鱼 *il-11b* 启动子区域可能位于 -2 957 bp ~ -900 bp。

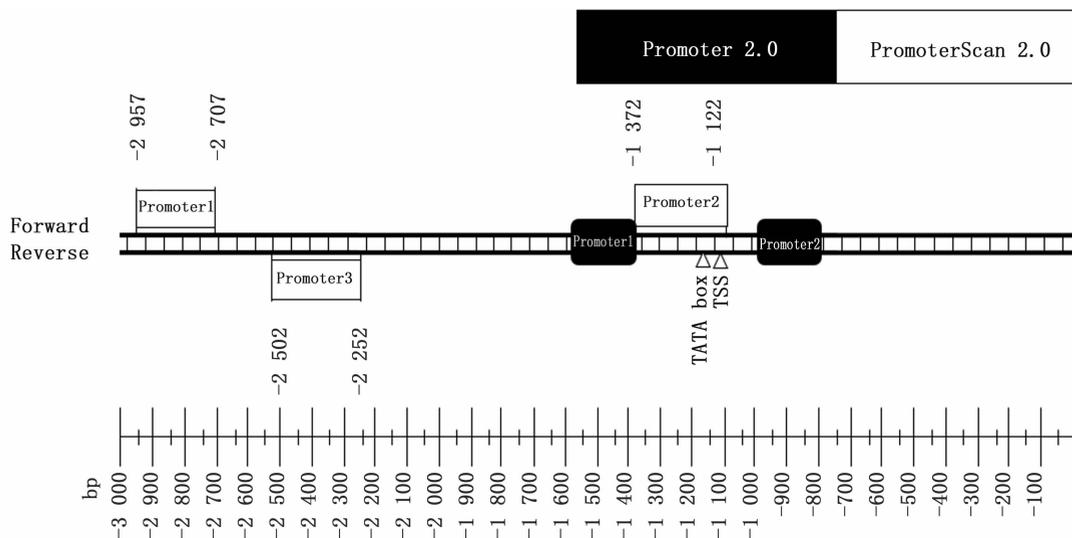


图 2 *il-11b* 的 5' 调控序列上潜在的启动子区域

Fig. 2 Schematic representation of *il-11b* promoter construction

2.1.2 *il-11b* 启动子序列 CpG 岛预测及分析

启动子的一个结构特征就是 CpG 岛, 对真核生物的转录调控起到重要作用, 其为转录起始位点处的高 CG 含量 DNA 序列, 存在十分广泛, 一

般长于 200 bp; G + C 含量在 50% 以上, 同时 $pCpG > 0.6 \times pG \times pC$, 其可为启动子预测并提高预测效率提供帮助^[21]。分别使用 EMBOSS Cpplot 和 Methprimer-Design 软件预测斑马鱼

il-11b 3 000 bp 启动子序列上的 CpG 岛。

用 EMBOSS Cpplot 软件预测到 2 个 CpG 岛,分别位于 -2 829 bp ~ -2 528 bp(302 bp)和 -1 665 bp ~ -1 456 bp(210 bp),见图 3a。使用 Methprimer-Design 在斑马鱼 *il-11b* 3000 bp 序列上预测到 7 个 CpG 岛,Island 1 位于 -2 829 bp ~ -2 528 bp(302 bp),Island 2 位于 -2 476 bp ~

-2 376 bp(101 bp),Island 3 位于 -2 307 bp ~ -2 155 bp(153 bp),Island 4 位于 -1 929 bp ~ -1 820 bp(110 bp),Island 5 位于 -1 665 bp ~ -1 456 bp(210 bp),Island 6 位于 -792 bp ~ -686 bp(107 bp),Island 7 位于 -641 bp ~ -526 bp(116 bp),见图 3b。

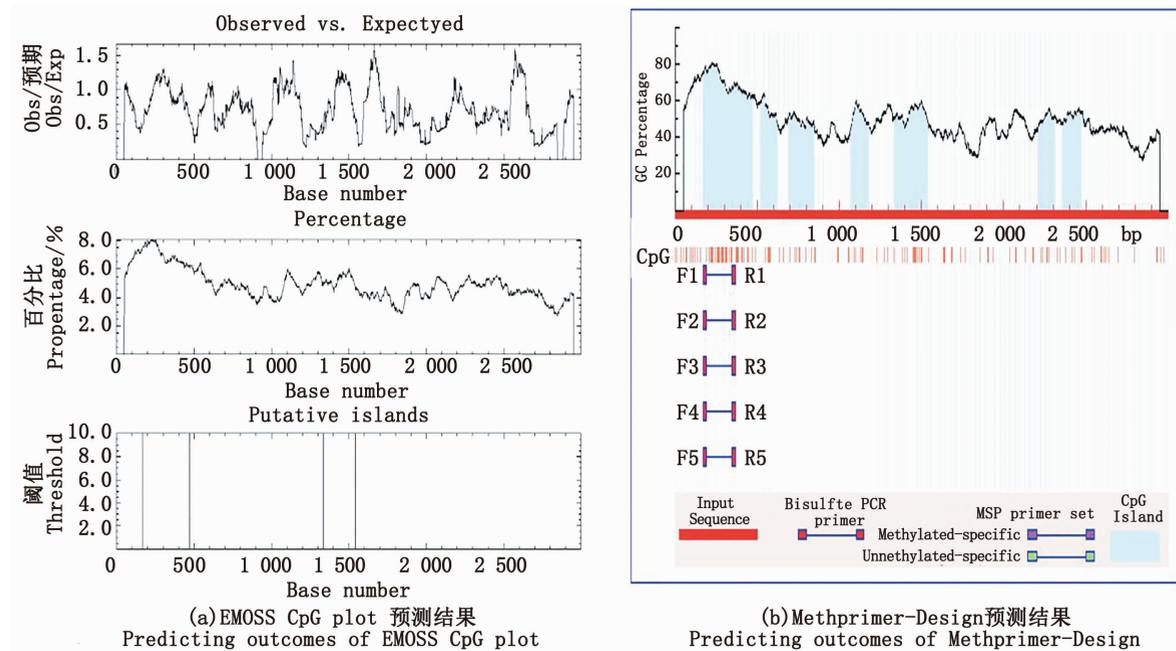


图 3 *il-11b* 基因启动子区 CpG 岛预测结果

Fig. 3 Results of CpG island prediction in *il-11b* promoter

2.1.3 *il-11b* 启动子序列转录因子结合位点预测及分析

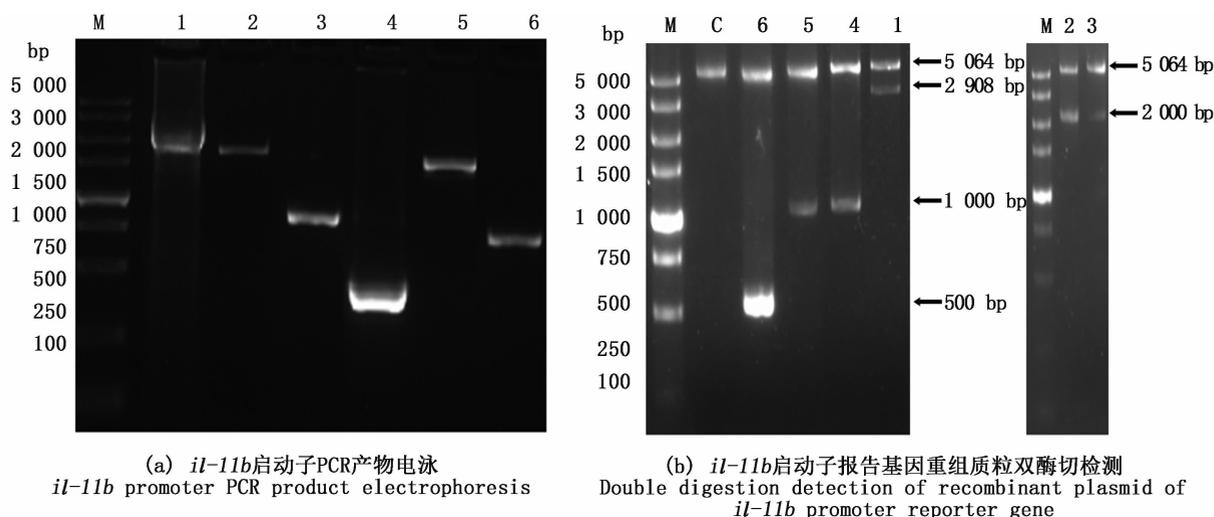
利用 AliBaba 预测 *il-11b* 启动子序列上潜在的转录因子结合位点,包括 Adf-1、Krox-24、Sp1、CACCC-box、Egr-1、ICSBP、c-Jun、COUP、GR、RAP1、NF-kappaB、REV-Erbalpha、ER、RAR-alpha1、RXR-beta、SRF、Oct-1、Oct-2、Pit-1a、GCN4、HNF-1、TBP、C/EBPalpha、HNF-1C、Oct-2.1、USF 等。

对预测出来的各个转录因子结合位点位置、出现次数及对应的转录因子功能进行统计,结果发现,在斑马鱼 *il-11b* 3 000 bp 启动子序列上出现次数最多的转录因子结合位点是 Sp1 (special protein1, Sp1),多达 26 次,而其他的转录因子结合位点出现的次数均不多于 5 次,其中,RAP1 出现 4 次,GR、ER、RAR-alpha1、RAR-beta、Oct-1 各

出现 2 次,其余转录因子均只出现 1 次。

2.2 斑马鱼 *il-11b* 启动子报告基因载体构建

以斑马鱼基因组为模板,以 *il-11b* 启动子序列设计引物,进行 PCR 扩增,产物经电泳检测,扩增的条带出现在目的片段处,且无杂带(图 4a)。将扩增的序列连接至 pMD-19T 载体转化至 DH5 α 感受态细胞中,进行测序,序列比对正确。表明笔者成功克隆了 *il-11b* 不同片段长度的启动子。以测序成功的菌液作为模板,按照表 1 的限制性核酸内切酶进行酶切位点 PCR,纯化后与载体 pGL3-enhancert 同时进行双酶切,纯化后进行酶切片段与酶切载体连接。之后转化,扩大培养,并抽提质粒。将重组质粒进行双酶切,2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,均出现 2 条带,约 5.0 kbp 的为载体条带,约 3.0 kbp、2.0 kbp、1.0 kbp、0.5 kbp 的为启动子片段条带(图 4b)。



M. 5 000 bp DNA marker; 1. *il-11b*; 2. *il-11b*- Δ 1; 3. *il-11b*- Δ 2; 4. *il-11b*- Δ 3; 5. *il-11b*- Δ 4; 6. *il-11b*- Δ 5.

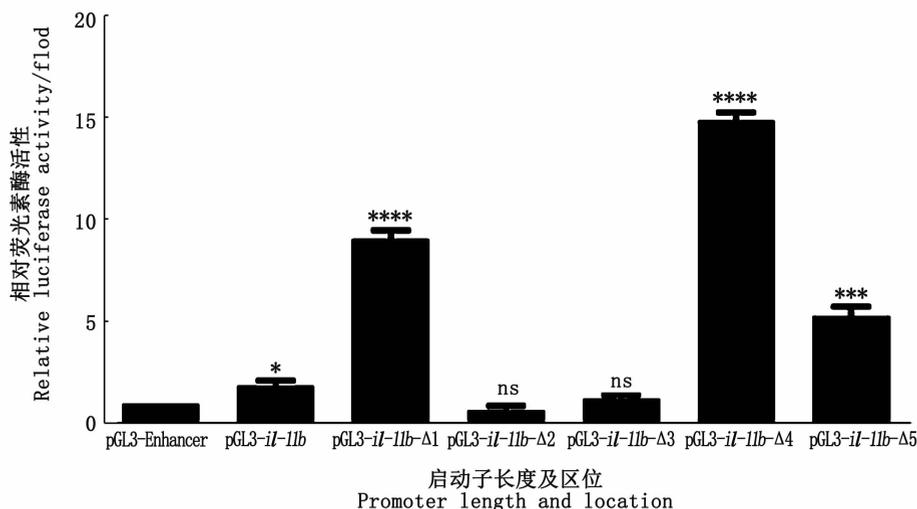
图 4 *il-11b* 启动子 PCR 产物电泳及双酶切检测电泳

Fig. 4 Electrophoresis of *il-11b* promoter PCR product and double digestion detection

2.3 *il-11b* 启动子体外转录活性

将对照组质粒 pGL3-Enhancer 和实验组构建的目的片段 pGL3-*il-11b*、pGL3-*il-11b*- Δ 1、pGL3-*il-11b*- Δ 2、pGL3-*il-11b*- Δ 3、pGL3-*il-11b*- Δ 4、pGL3-*il-11b*- Δ 5 重组质粒分别转染 HEK293T 细胞,表达一定时间后用双荧光素酶报告基因系统检测酶活。结果显示,构建的不同片段长度的 *il-11b* 启

动子报告基因的荧光素酶较对照质粒的活性存在差别,其中 pGL3-*il-11b*、pGL3-*il-11b*- Δ 1、pGL3-*il-11b*- Δ 2、pGL3-*il-11b*- Δ 3、pGL3-*il-11b*- Δ 4、pGL3-*il-11b*- Δ 5 质粒转染组分别为 pGL3-Enhancer 对照转染组的 1.94、9.11、0.75、1.32、14.92、5.33 倍(图 5),使用 SPSS 进行显著性分析($n=3$, ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。



$n=3$; ns $P > 0.05$; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

图 5 重组质粒 pGL3-*il-11b*-promoter-Enhancer 转染 HEK293T 细胞后荧光素酶相对表达量

Fig. 5 Luciferase relative expression of recombinant plasmid pGL3-*il-11b*-promoter-Enhancer after transfecting HEK293T

3 讨论

通过生物信息手段获得斑马鱼 *il-11b* 的启动子序列并对其进行相关的分析,在此基础上成功构建启动子报告基因,为研究细胞因子调控网络及相关信号通路之间的调控提供了强有力的研究工具。

利用 UCSC Genome Browse 数据库预测并获得斑马鱼 *il-11b* 启动子序列, Promoter 2.0 预测出 2 个启动子区, Promoter 3.0 预测出 3 个启动子区,且发现 TSS 和 TATA 框。TATA 框为 TBP (TATA box binding protein) 提供结合位点,两者是转录起始的关键因子,说明 *il-11b* 启动子序列上存在多个调控转录的元件。预测结果的不同是因为二者算法的差异, Promoter 2.0 采用的是基于神经网络的算法函数,而 PromoterScan 2.0 采用的是基于位置矩阵的算法函数。之前大多数的研究仅采取一种算法软件进行启动子区预测,考虑到不同算法的准确性,本研究采用代表 2 种算法的软件对启动子区进行预测,可以尽可能准确地预测序列中所包含的启动子区。

CpG 岛通常以甲基化状态位于基因的启动子区和第一个外显子区。启动子区的甲基化导致 DNA 发生构象改变,影响转录因子与 DNA 之间的互作,降低 RNA 聚合酶对启动子的识别,甚至无法识别,造成基因转录降低,甚至沉默^[22]。本研究中利用 EMOSS CpG plot 在 *il-11b* 启动子序列上预测出 2 个 CpG 岛,利用 Methprimer-Design 预测出 7 个 CpG 岛。虽然两款软件的预测结果存在差异,但是 2 个软件均预测出 -2 829 ~ -2 528 (302 bp) 和 -1 665 ~ -1 450 (210 bp) 2 个位置可能存在 CpG 岛。因为 CpG 岛是预测启动子并提高预测准确性的重要序列,所以我们所获得序列的启动子可能存在于 -2 829 bp ~ -2 528 bp 和 -1 665 bp ~ -1 456 bp 处。之所以 Methprimer-Design 预测出的结果多于 EMBOSS CpGplot,是因为这两个预测软件所使用的函数关系是不同的,因为 CpG 岛长于 200 bp,而 Methprimer-Design 预测出的 CpG 岛中 Island 2, Island 3, Island 4, Island 6, Island 7 长度均小于 200 bp,表明 Methprimer-Design 对 CpG 岛的预测存在假阳性现象。

用 AliBaba 预测出启动子序列上存在 Adf-1、

Krox-24、Sp1、CACCC-box、Egr-1、ICSBP、c-Jun、COUP、GR、RAP1、NF-kappaB、REV-Erbalpha、ER、RAR-alpha、RXR-beta、SRF、Oct-1、Oct-2、Pit-1a、GCN4、HNF-1、TBP、C/EBPalpha、HNF-1C、Oct-2、1、USF 等位点。其中 Sp1、USF、C/EBPalpha 和 NF-kappaB^[22] 是直接参与炎症反应的细胞因子,表明斑马鱼 *il-11b* 可能在免疫调控的过程中发挥重要作用。Sp1 调控管家基因的表达,参与细胞增殖、分化、细胞凋亡、衰老、DNA 损伤反应、血管生成和炎症发生等过程^[23-24],表明斑马鱼 *il-11b* 可能在以上这些过程中扮演重要角色。因此,构建的报告基因质粒对于探究 *il-11b* 的功能以及其在免疫应答信号通路中参与的具体机制提供了有力的工具。

通过双荧光素酶检测系统,发现构建的斑马鱼 *il-11b* 不同位置和大小启动子存在活性差异(图 5), *il-11b*、*il-11b-Δ1*、*il-11b-Δ4*、*il-11b-Δ5* 启动子活性较对照组有显著性增强,且强度依次降低,而 *il-11b-Δ2*、*il-11b-Δ3* 启动子活性较对照组没有显著性差异,说明斑马鱼 *il-11b* 基因的核心启动子区域为 -3 000 ~ -2 000 bp,有待后续进行详细的研究。

参考文献:

- [1] MERRELL D S, FALKOW S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis[J]. Nature, 2004, 430 (6996): 250-256.
- [2] SEN R, NAYAK L, DE R K. A review on host-pathogen interactions: classification and prediction [J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 2016, 35 (10): 1581-1599.
- [3] RAUTA P R, NAYAK B, DAS S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms [J]. Immunology Letters, 2012, 148 (1): 23-33.
- [4] 申丽媛. 鱼类细胞培养与免疫机制概述[J]. 农业与技术, 2016, 36 (14): 74, 82.
SHEN L Y. An overview of fish cell culture and immune mechanisms [J]. Agriculture and Technology, 2016, 36 (14): 74, 82.
- [5] PRIETO G A, COTMAN C W. Cytokines and cytokine networks target neurons to modulate long-term potentiation [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2017, 34: 27-33.
- [6] HOLDSWORTH S R, GAN P Y. Cytokines: names and numbers you should care about [J]. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2015, 10 (12): 2243-2254.

- [7] FRIEDRICH M, POHIN M, POWRIE F. Cytokine networks in the pathophysiology of inflammatory bowel disease [J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 992-1006.
- [8] IHLE J N. Cytokine receptor signalling [J]. *Nature*, 1995, 377(6550): 591-594.
- [9] KARIN M, CLEVERS H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration [J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 307-315.
- [10] SCHAFER S, VISWANATHAN S, WIDJAJA A A, et al. IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis [J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 110-115.
- [11] 陈琴, 杨琳. 重组人白介素-11 与重组人促血小板生成素治疗化疗相关血小板减少的疗效比较 [J]. *海峡药学*, 2016, 28(12): 88-90.
CHEN Q, YANG L. Comparison of Effect between rhIL-11 and rhTPO on treatment for lung cancer patients with thrombocytopenia [J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2016, 28(12): 88-90.
- [12] 骆慧莎, 陈汀芳, 谭永亮, 等. 难治性免疫性血小板减少性紫癜患者应用小剂量利妥昔单抗联合 IL-11 治疗的临床效果探讨 [J]. *中国医药科学*, 2019, 9(3): 213-216.
LUO H S, CHEN T L, TAN Y L, et al. Clinical effect of small dose of rituximab combined with IL-11 in patients with refractory immune thrombocytopenic purpura [J]. *China Medicine and Pharmacy*, 2019, 9(3): 213-216.
- [13] TRAN H B, CHEN S C, CHAUNG H C, et al. Molecular cloning of IL-6, IL-10, IL-11, IFN- γ and modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines in cobia (*Rachycentron canadum*) after *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 230: 10-18.
- [14] PODOK P, XU L J, XU D, et al. Different expression profiles of *Interleukin 11 (IL-11)*, *Intelectin (ITLN)* and *Purine nucleoside phosphorylase 5a (PNP 5a)* in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in response to Cyprinid herpesvirus 2 and *Aeromonas hydrophila* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(1): 65-73.
- [15] HUISING M O, KRUISWIJK C P, VAN SCHIJNDEL J E, et al. Multiple and highly divergent IL-11 genes in teleost fish [J]. *Immunogenetics*, 2005, 57(6): 432-443.
- [16] HULKE M L, SIEFERT J C, SANSAM C L, et al. Germline structural variations are preferential sites of DNA replication timing plasticity during development [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2019, 11(6): 1663-1678.
- [17] BUCHAN K D, PRAJSNAR T K, OGRYZKO N V, et al. A transgenic zebrafish line for in vivo visualisation of neutrophil myeloperoxidase [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215592.
- [18] GHOSH A, BANERJEE A, AMZEL L M, et al. Structure of the zebrafish galectin-1-L2 and model of its interaction with the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) envelope glycoprotein [J]. *Glycobiology*, 2019, 29(5): 419-430.
- [19] 张秋月, 丁安, 张哲, 等. 斑马鱼 *tnfb* 启动子的克隆和报告基因载体的活性分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(8): 3296-3303.
ZHANG Q Y, DING A, ZHANG Z, et al. Cloning of *tnfb* promoter from zebrafish (*Danio rerio*) and activity analysis of reporter gene vector [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(8): 3296-3303.
- [20] 岳倩文, 丁安, 张秋月, 等. 斑马鱼 *ifn- γ* 基因启动子的克隆和报告基因载体的活性分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(11): 4928-4937.
YUE Q W, DING A, ZHANG Q Y, et al. Clone of *ifn- γ* promoter of zebrafish (*Danio rerio*) and activity analysis of reporter gene vector [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(11): 4928-4937.
- [21] 孙吉贵, 韩霄松, 卢欣华, 等. 真核生物启动子的预测技术 [J]. *计算机科学*, 2009, 36(1): 5-9, 33.
SUN J G, HAN X S, LU X H, et al. Computational prediction technology of eukaryotic promoters [J]. *Computer Science*, 2009, 36(1): 5-9, 33.
- [22] HASSA P O, HOTTIGER M O. A role of poly (ADP-Ribose) polymerase in NF- κ B transcriptional activation [J]. *Biological Chemistry*, 1999, 380(7/8): 953-959.
- [23] ZHANG Y H, CHEN Y Y, QU H M, et al. Methylation of *HIF3A* promoter CpG islands contributes to insulin resistance in gestational diabetes mellitus [J]. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2019, 7(4): e00583.
- [24] HIROSE T, HORVITZ H R. An Sp1 transcription factor coordinates caspase-dependent and -independent apoptotic pathways [J]. *Nature*, 2013, 500(7462): 354-358.

Sequence analysis of 5' upstream promoter of *il-11b* gene in zebrafish and construction of reporter gene vectors

DING An^{1,2}, ZHANG Qiuyue^{1,2}, ZHANG Zhe^{1,2}, XU Xing^{1,2}, YUE Qianwen^{1,2}, REN Jianfeng^{1,2}, LI Weiming³, ZHANG Qinghua^{1,2}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA)

Abstract: As one of the important members of interleukin, interleukin-11 (IL-11) plays a pivotal role in many biological processes, including wound healing, cancer cells migrating, immunity regulating, and so on. To study the transcription regulatory mechanism of *il-11b*, the 3 000 bp promoter of an interleukin-11b (*il-11b*) in zebrafish (*Danio rerio*) was found through bioinformatics analysis, and we obtained 2 908 bp, 2 000 bp, 1 000 bp and 500 bp different fragments after deletion processing. These promoter sequences were amplified through PCR method and reconstructed into pGL3-enhancer empty plasmid to form reporter gene vectors. We used dual-luciferase reporter assay system to detect the activity of these promoters in HEK293T cell line. Bioinformatics results indicated there are about 3 promoter regions and 7 CpG islands in the sequence of *il-11b* promoter, and 60 binding sites including Adf-1, Krox-24, Sp1, CACCC-box, Egr-1, ICSBP, c-Jun, COUP, GR, RAP1, NF-kappaB, REV-Erbalpha, ER, RAR-alpha1, RXR-beta, SRF, Oct-1, Oct-2, Pit-1a, GCN4, HNF-1, TBP, C/EBPalph, HNF-1C, Oct-2.1, USF, etc. The fragment sizes of all recombinant plasmids were consistent by double enzyme digestion, and the sequences were correct. Compared to control group, the results of luciferase showed the activity of pGL3-*il-11b*, pGL3-*il-11b*-Δ1, pGL3-*il-11b*-Δ2, pGL3-*il-11b*-Δ3, pGL3-*il-11b*-Δ4, pGL3-*il-11b*-Δ5 were about 1.94, 14.92, 5.33, 9.11, 0.75, 1.32 folds, respectively. These results may provide a tool to investigate the immune signals in which cytokines are involved.

Key words: zebrafish; *il-11b*; promoter; reporter gene