

草鱼 C-反应蛋白基因上游调控序列的扩增与分析

苏建明, 伍小松, 朱鑫, 陈韬*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: C-反应蛋白(CRP)是一种急性时相血清蛋白,与鱼类的天然免疫和炎症反应有密切的关系。通过 Genome Walker 方法扩增草鱼 *CRP* 基因的上游序列,获得长度为 1 055 bp 的 DNA 片段,测序后经过 PLACE 和 BDGP 等启动子和转录因子结合位点预测软件的预测,初步鉴定草鱼 *CRP* 基因的复制起始子序列为保守的 TCAGATC, G 为转录起始位点。高度保守的 RNA 聚合酶 II 的结合位点 TATAA-box 位于-41 ~ -35 bp, CAAT-box 位于-94 ~ -91 bp,在-54 ~ -5 bp 处存在 1 个高度保守的核心启动子序列。此外,还发现与转录诱导调控有关的转录因子结合位点,包括 4 个 E-box 元件、3 个 GT1 共有序列、2 个 GT1 核心序列和 2 个 I-box 核心序列。

关 键 词: 草鱼; C-反应蛋白; 上游调控序列; 转录

中图分类号: S965.112; S961.6

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)06-0636-05

Amplification and analysis of up-stream regulatory sequence of C-reactive protein gene (*CRP*) from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

SU Jian-ming, WU Xiao-song, ZHU Xin, CHEN Tao*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: C-reactive protein (CRP) is a kind of acute phase serum protein associated with innate immunity and inflammatory reaction of fish. A 1 055 bp DNA fragment from grass carp *CRP* gene up-stream sequence was amplified by Genome Walker. Sequence analyzing by online software PLACE and BDGP for prediction of promoter sequence and transtription factor binding sites indicated that the conserved initiate sequence of grass carp *CRP* gene is TCAGATC and the initiate site of transcription is G. RNA polymerase II binding site, TATA-Box, is located in -41 to -35 bp which embed in a highly conserved core promoter sequence (-54 to -5 bp), CAAT-Box appears in -94 to -91 bp. Moreover, some transcriptional factor binding sites related to inducible regulation of transcription are found in up-stream sequence, including 4 E-box elements, 3 GT1 consensus sequences, 2 GT1-core elements, and 2 I-box-core elements.

Key words: grass carp; C-reactive protein; up-stream regulatory sequence; transcription

C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是一种急性时相血清蛋白,属于 Pentraxin 蛋白家族,与动物的天然免疫和炎症反应有密切的关系^[1-2]。CRP 能与细菌、真菌以及寄生虫细胞膜上的磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)以及凋亡坏死细胞膜脂质双层结构破坏时暴露的磷脂、脂蛋白、脂多糖、染色质、半乳糖和胆固醇等多种配体结合,具有与 IgG

和补体相似的调理和凝集作用^[3-5],能提高巨噬细胞的吞噬功能^[6-8],刺激单核细胞表面的组织因子表达及其他免疫调节功能^[9-11],因此,血清 CRP 水平的高低取决于炎症刺激的强度^[2]。

由于鱼类的免疫系统比哺乳动物低等,天然免疫在机体的免疫保护中所起的作用更加重要。但到目前为止,人们对于 CRP 在鱼类免疫过程中的作用

收稿日期: 2013-06-05

基金项目: 教育部博士点新教师基金(20094320120005); 湖南省教育厅青年基金项目(10B046)

作者简介: 苏建明(1974—),男,湖南茶陵人,博士,副教授,主要从事动物分子生物学研究, sjmauhn@163.com; *通信作者, chentao_114@163.com

以及鱼类 *CRP* 基因表达调控的机制了解不够深入, 相关的研究报道也很少。唐春华等^[12]采用 RACE 方法克隆了 *CRP* 基因全长 cDNA, 并利用 RT-PCR 半定量法对健康及被嗜水产气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 人工感染的草鱼的不同组织 *CRP* 的 mRNA 表达水平进行检测, 结果显示 *CRP* 基因在草鱼的心脏、脑、前肠、肾脏、肝胰脏、肌肉、脾等组织中均有表达, 表达水平差异不明显。但在人工感染 24 h 后, 各组织中 *CRP* 的 mRNA 水平均有显著升高, 与哺乳动物和一些鱼类在炎症反应中血清 *CRP* 水平升高一致, 表明 *CRP* 基因的转录调控是可诱导的。基因上游调控序列包含的启动子是基因的组成部分, 控制基因表达的起始时间和表达的程度。有研究^[13]表明, 不同物种的相同基因在启动子序列结构上存在的差异, 可能直接影响基因的转录活性, 因此, 鉴定草鱼 *CRP* 基因的上游调控序列, 是研究上游调控序列在 *CRP* 基因转录水平表达调控过程中的作用, 探讨 *CRP* 基因转录调控的模式的前提。

1 材料与方法

1.1 供试草鱼

I 龄草鱼成鱼购自湖南农业大学水产养殖基地, 平均体长(20 ± 2) cm, 平均体质量(112 ± 11) g。

1.2 试剂

基因组 DNA 提取试剂盒、Genome Walker 试剂盒购自大连宝生物公司; Advantage® 2 PCR 试剂盒购自 Clontech 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; 1 kb Plus DNA Ladder 购自 BIONOVAS Biotechnology 公司; MarkerIII DNA Ladder 购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 草鱼肝脏基因组 DNA 的提取

取 20 mg 新鲜草鱼肝脏组织, 剪成碎块后用基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 并进行电泳检测。

1.3.2 草鱼 *CRP* 基因上游序列扩增

按照 Genome Walker 试剂盒说明, 根据 *CRP* 基

因的 cDNA 序列设计特异性引物: SP1(5'-GGAAACAGAAGTACTTTACC-3') 用于第 1 轮扩增, SP2(5'-CAAGACCCACTTCAGCAGCC-3') 用于第 2 轮扩增, SP3(5'-CCAGCATCTTGCTGCAGGTG-3') 用于第 3 轮扩增。扩增方法参照试剂盒说明, 根据引物的退火温度对 PCR 条件稍作修改: 第 1 轮 PCR 程序为: 92 °C 预变性 3 min; 95 °C 预变性 1 min; 5 个循环(94 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min), 1 个循环(94 °C 变性 30 s, 25 °C 退火 3 min, 72 °C 延伸 2 min), 10 个循环(94 °C 变性 30 s, 44 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2.5 min), 15 个循环(94 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2.5 min), 1 个循环(94 °C 变性 30 s, 44 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2.5 min); 第 2 轮 PCR 程序为: 92 °C 预变性 3 min, 95 °C 预变性 1 min, 15 个循环(94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2.5 min, 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2.5 min, 94 °C 变性 30 s, 44 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2.5 min)。第 3 轮 PCR 程序与第 2 轮相同。3 轮 PCR 扩增的产物, 用于琼脂糖凝胶电泳分析, 并将 PCR 目的条带回收纯化后送生工生物工程(上海)股份公司测序。

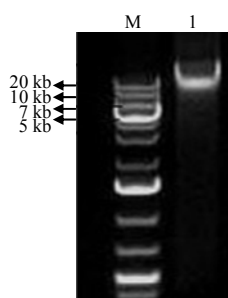
1.3.3 序列分析

将测序结果整理后利用在线启动子预测软件 PLACE(<http://www.Dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 和 BDGP(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 分析 *CRP* 上游调控序列中的核心启动子各组成部分以及相关的转录因子结合位点。

2 结果与分析

2.1 *CRP* 基因上游序列 Genome Walker 扩增结果

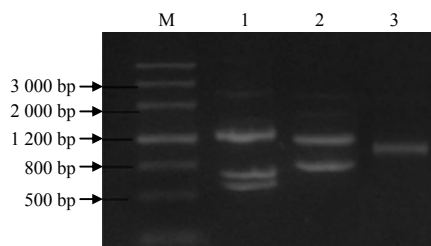
利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析草鱼肝脏基因组 DNA(图 1), DNA 条带清晰, 无明显降解。Genome Walker 扩增结果电泳分析(图 2)表明, 第 1 轮 PCR 扩增产物出现多个条带, 而第 2 轮 PCR 出现条带相对较少, 第 3 轮 PCR 得到 1 条长度约稍大于 1 000 bp 的清晰条带。目的条带在 3 轮 PCR 中长度依次变小, 这是由于巢式 PCR 中后一轮 PCR 的产物比前一轮要小。将第 3 轮 PCR 产物回收纯化后送测序, 得到长度为 1 055 bp 的序列。



M 为 1 kb Plus DNA Ladder ; 1 为草鱼肝脏的 DNA。

图 1 草鱼基因组 DNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of Genomic DNA from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)



M Marker III DNA Ladder ; 1 第 1 轮 PCR 产物 ; 2 第 2 轮 PCR 产物 ; 3 第 3 轮 PCR 产物。

图 2 Genome Walker 扩增草鱼 CRP 基因上游序列

Fig. 2 Up-stream sequence of CRP gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) amplified by Genome Walker

2.2 序列分析

将测序得到的序列与CRP全长cDNA序列进行比较,发现其中仅包括57 bp的CRP 5'-UTR序列,其余部分均为非转录的上游序列。启动子元件和转录起始位点的预测结果(图3)显示,在CRP上游序列中起始子序列为“TCAGATC”与草鱼CRP保守起始子序列(PyPyA+1NT/A PyPy)^[14]一致,其中的G为转录起始位点。在-41~-35 bp处发现高度保守的RNA聚合酶II的结合位点TATAA-box;在-54~-5 bp处发现1个高度保守的核心启动子序列;在-94~-91 bp处发现1个CAAT-box。此外,还发现一些转录因子结合位点,包括4个E-box元件(CANNTG),其位置分别在-924~-919 bp、-438~-433 bp、-349~-344 bp、-202~-197 bp;3个GT1共有序列(GT1 consensus, GRWAAW),分别位于-606~-601 bp、-594~-589 bp、-131~-126 bp;2个GT1-core元件(GGTAA),分别位于-391~-386 bp、-268~-263 bp;2个I-box-core元件(GATAA),分别位于-606~-602 bp、-142~-138 bp。

```

CTTGATCATTTTTACAACAACCTTTTAACTTGAAAACCTTTAGAAAAGGGACTTTTATC
      E-box 4
AACCTTTTATAAGTTTCAAGTGGATATATTGACTGGGTTGGGGTTTATATTGCGCT
ACAAAACCTTCTAATAAACTGCCTGTACATTTTCGGTTTTATTTTACTTATTTGTCT
ATATATTATTTCTTTTACATTATATTATTATTTTCAGACTACTAAAATGTCAATAAAA
GACACTTTGTCAAAGTGTAGAGTTTAATTTTATCATCAAAAGTCAACAGAGCAGAGA
TCAACATCCCATAATGCAATTCACAGACATTGTCAAACGTAGAGTAATTTTATCATC
      GT1 consensus3
AAAAGTCAACAGAGCAGAGATCAACATCCCATAAGATCTGCAATTCACAAAGATAAT
      GT1 consensus2
      I-box2
AAGCAGAAAAAATTGTGAATCACAAAATATGGATTTTTTTTTTACAGTAATAGTTACA
GAAGTAATGCTGAATGTTCTCCATATTTGCCAGTAGCTTATGAGGGCTTAATTTAA
      E-box 3
TGCTAATAATAGTGTATTGTTATTTACATTATTTTGTCTCAAATAATCACATGTATG
      GT1 core 2
AGCTTTTCCCTTCAAATTTTTGACTTGTTCAACTACGGTTAAATAATGACATGTAA
      E-box 2
CCCATGTCCTATAATAAAGCAGCATTGATACTGAAAAGAAACACTATAGTCAGGGT
      GT1 core 1
ATGCCAACACTTATCTTGTACCCCAAAACCCCTAAAACCCAGAGGGTTAAAGGGA
      E-box 1
TAGTTCACCCCCACAAAGAACTATATCATTTTATGTCACCATTACTCAAACCTCA
      I-box 1
      GT1 consensus1
      CAAT-box
AATGGTTCTCATGTTTATGAGTTTCTTTTTTCATTGATCACACAAACAAGCCATAC
      GATAA
      TATA-box
      +1
      core promoter sequence
GCTGTCGTATTTGCTGACAATTTGATTCAGATCTGTGAGACAAACATCTGTCCTGAA
      core promoter sequence
CTGATCTTCTCTCTGAAATCACCTGTTGA

```

图3 草鱼CRP基因上游调控序列分析

Fig. 3 Analysis of up-stream regulatory sequence of CRP

3 讨 论

Genome Walker 方法是利用已知序列(如 cDNA)从基因组中获得基因的上游(如启动子)或下游序列的方法^[15]。由于基因组 DNA 较复杂,如果在 PCR 反应的最初阶段退火温度较低,容易造成非特异性扩增。Genome Walker 先采用较高退火温度,再采用较低退火温度的扩增方式,称为降落 PCR,在此 PCR 的最初几个循环,扩增效率不高,但扩增的特异性较高,从而积累特异性 PCR 产物,随后通过降低退火温度而提高扩增的效率。本研究用 Genome Walker 法,经 3 轮巢式 PCR 扩增 CRP 上游序列,确保了扩增产物的特异性。

和哺乳动物一样,鱼类 CRP 基因的表达是可诱导的。在正常情况下,CRP 以较低水平表达(组成型表达),这种表达主要是由遗传因素决定的。当鱼类受到病原体的感染或其他诱导物刺激时,血清中 CRP 的水平可以在 24~48 h 内迅速升高,如用嗜水产气单胞菌可以诱导鲤鱼血清 CRP 水平升高^[16],用重金属镉可以诱导鲤科鱼类的 CRP 表达升高^[17]。类似的研究在斑马鱼^[18]和虹鳟^[19-20]中也有报道,其 CRP 表达升高的调控主要是发生在转录水平。真核生物转录的调控,主要是通过一些反式调控因子与位于基因上游的一些顺式调控元素结合,从而提高转录起始频率来实现的。Szalai 等^[21-22]的研究表明,人类 CRP 基因的内含子区域和启动子区域中的一些重复出现的二核苷酸能影响 CRP 的基础表达。最近的研究表明,人类 CRP 基因 3' 端非翻译区域和外显子 2 中核苷酸的多态性也能影响 CRP 的组成型表达^[23],但这些不是主要的调控模式。通过对草鱼 CRP 基因上游序列的分析可以看出,除了含有 TATA-box、CAAT-box 这些真核生物中基因组型表达启动子所必须的序列以外,还含有大量的转录因子结合位点,包括 E-Box 元件、GT1 共有序列、GT1 核心序列、I-box 核心序列等。这些转录因子结合位点对于 CRP 基因受到诱导后的高水平表达具有十分重要的作用。Stalberg 等^[24]将具有诱导调控作用的基因上游序列中重复出现的 E-box 突变以后,其可以导致所控制的基因的转录明显降低,意味着这些 E-box 可能通过和某些转录因子结合来增强转

录。而 GT1 共有序列、GT1-core 元件、I-box-core 元件则都是诱导调控的必要元件,如 GT1 能通过与 DNA 的结合后经 GT1 与 TFIIA 的相互作用,稳定 TFIIA-TBP-DNA (TATA box) 复合体,从而提高转录效率^[25],而 I-box 核心序列则是存在于很多光诱导表达的植物基因的上游序列中的保守序列^[26]。

由于本次扩增获得的上游调控序列只有 1 055 bp 左右,或许还有其他一些顺式作用元件位于更远的上游,这些元件可能在草鱼 CRP 基因转录的诱导调控中同样重要。本研究所获得的上游序列,可经引入报告基因和缺失突变,从细胞水平确定所预测的顺式作用元件的功能。

参考文献:

- [1] Tillett W S, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1930, 52(6): 561-571.
- [2] Du Clos T W, Mold C. C-reactive protein [J]. Immunologic Research, 2004, 30(3): 261-277.
- [3] Szalai A J, VanCott J L, McGhee J R, et al. Human C-reactive protein is protective against fatal salmonella enterica serovar typhimurium infection in transgenic mice [J]. Infection Immunity, 2000, 68(10): 5652-5656.
- [4] Kaplan M H, Volanakis J E. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin [J]. The Journal of Immunology, 1974, 112(6): 2135-2147.
- [5] Siegel J, Rent R, Gewurz H. Interactions of C-reactive protein with the complement system I. Protamine-induced consumption of complement in acute phase sera [J]. The Journal of Experimental Medicine, 1974, 140(3): 631-647.
- [6] Robey F A, Liu T Y. Limulin: A C-reactive protein from Limulus polyphemus [J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(2): 969-975.
- [7] Lin L, Liu T Y. Isolation and characterization of C-reactive protein (CRP) cDNA and genomic DNA from *Xenopus laevis*: A species representing an intermediate stage in CRP evolution [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(9): 6809-6815.
- [8] Volanakis J E. Human C-reactive protein: Expression,

- structure and function[J]. *Molecular Immunology*, 2001, 38(2/3): 189–197.
- [9] Tilg H, Vannier E, Vachino G, et al. Anti-inflammatory properties of hepatic acute phase proteins: Preferential induction of Interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 β synthesis by human peripheral blood mononuclear cells[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1993, 178(5): 1629–1636.
- [10] Ballou S P, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein[J]. *Cytokine*, 1992, 4(5): 361–368.
- [11] Galve-de R B, Wiktorowicz K, Kushner I, et al. C-reactive protein increases production of IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF-alpha, and expression of mRNA by human alveolar macrophages[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1993, 53(4): 439–445.
- [12] 唐春华, 左振华, 陈韬, 等. 草鱼 *CRP* 基因全长 cDNA 的克隆及其表达分析[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2009, 35(6): 673–678.
- [13] 赵发兰, 周瑞雪, 成嘉, 等. 鳊鱼与鲢鱼肌球蛋白轻链 2 启动子的克隆及其序列比较分析[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2011, 34(1): 75–79.
- [14] Smale S T. Core promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes[C]// Conaway R C, Conaway J W. *In Transcription: Mechanisms and Regulation*. New York: Raven Press, 1994: 63–81.
- [15] Siebert P D, Chenchik A, Kellogg D E, et al. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(6): 1087–1088.
- [16] MacCarthy E M, Burns I, Imnazarow I, et al. Serum CRP-like protein profile in common carp *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(11): 1281–1289.
- [17] Sinha S, Mandal C, Allen A K, et al. Acute phase response of C-reactive protein of *Labeo rohita* to aquatic pollutants is accompanied by the appearance of distinct molecular forms[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 396(2): 139–150.
- [18] Lin B, Chen S, Cao Z, et al. Acute phase response in zebra fish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: Striking similarities and obvious differences with mammals [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(4): 295–301.
- [19] Kodama H, Matsuoka Y, Tanaka Y, et al. Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(5): 589–597.
- [20] Kodama H, Yamada F, Murai T, et al. Activation of trout macrophages and production of CRP after immunization with *Vibrio anguillarum*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1989, 13(2): 123–132.
- [21] Szalai A J, McCrory M A, Cooper G S, et al. Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the *CRP* gene[J]. *Genes Immunology*, 2002, 3(1): 14–19.
- [22] Szalai A J, Wu J, Lange E M, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (*CRP*) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2005, 83(6): 440–447.
- [23] Russell A I, Cunningham-Graham D S, Shepherd C, et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus [J]. *Human Molecular Genetics*, 2004, 13(1): 137–147.
- [24] Stalberg K, Ellerstrom M, Ezcurra I, et al. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds[J]. *Planta*, 1996, 199: 515–519.
- [25] Villain P, Mache R, Zhou D X. The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 32593–32598.
- [26] Terzaghi W B, Cashmore A R. Light-regulated transcription[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1995, 46: 445–474.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维