

# 鹅垂体特异性转录因子荧光素酶报告基因 重组体的构建和鉴定

赵荣雪<sup>1</sup>, 段修军<sup>2</sup>, 赵文明<sup>1</sup>, 董 颺<sup>2</sup>, 徐 琪<sup>1</sup>, 孙国波<sup>1</sup>,  
乔 娜<sup>1</sup>, 张海波<sup>1</sup>, 陈国宏<sup>1\*</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 国家级水禽基因库, 泰州 225300)

**摘 要:** 为研究垂体特异性转录因子(Pituitary transcription factor 1, Pit1)启动子转录调控机制, 将获得的 *Pit1* 基因的启动子, 插入荧光素酶报告基因载体中, 构建 *Pit1* 基因启动子调控的报告基因重组表达质粒。本研究利用染色体步移技术扩增鹅 *Pit1* 基因的启动子, 定向亚克隆至荧光素酶表达载体 pGL3-Basic 中, 构建含有正确目的基因的 report 基因重组体 pGL3-Pit1, 并通过限制性内切酶酶切、PCR 及测序进行鉴定。通过酶切鉴定及基因测序证明, 所克隆的基因产物与预期结果一致, 序列无碱基突变。结果, 成功构建了含有 *Pit1* 启动子基因序列的荧光素酶报告基因真核表达载体, 为下一步分析该启动子活性及转录调控机理奠定基础。

**关键词:** 鹅; *Pit1* 基因; 启动子; 荧光素酶基因表达载体

中图分类号: S835; S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)07-1032-07

## Construction and Identification of Luciferase Reporter Recombinant Driven by *Pit1* Promoter of Goose

ZHAO Rong-xue<sup>1</sup>, DUAN Xiu-jun<sup>2</sup>, ZHAO Wen-ming<sup>1</sup>, DONG Biao<sup>2</sup>, XU Qi<sup>1</sup>, SUN Guo-bo<sup>1</sup>,  
QIAO Na<sup>1</sup>, ZHANG Hai-bo<sup>1</sup>, CHEN Guo-hong<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;  
2. National Native Waterfowl Gene Pool, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** To study the possible regulation mechanism of *Pit1* gene expression, promoter sequence of *Pit1* gene was subcloned and a *Pit1* promoter-luciferase reporter vector was constructed. The promoter of *Pit1* gene was cloned by genome walking and subcloned into the luciferase expression vector pGL3-Basic directly. The result showed that the recombinant reporter gene pGL3-Pit1 was constructed including correct target gene, and identified by restrictive endonuclease enzyme cutting, PCR and sequencing. The result indicate that the luciferase reporter gene eukaryotic expression vector containing *Pit1* promoter sequences was constructed successfully, furthermore, the result will play an important role for analyzing the promoter activity and transcriptional regulation mechanism.

**Key words:** goose; *Pit1* gene; promoter; luciferase reporter vector

垂体特异性转录因子(Pituitary transcription factor 1, PIT1)是 POU 结构域(PIT-OCT-UNC

domain)中几种同源(异型)蛋白之一, 目前已被正式命名为 Pit1<sup>[1]</sup>。POU 结构域是由一段 DNA 结

收稿日期: 2010-04-22

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-45-04); 优质高产水禽新品种选育国家科技部支撑计划重大专项资金(2006BDA01A09); 国家科技支撑计划重点项目(2006BDA14B06); 江苏省属高校自然科学基金面上项目(07KJB230138)

作者简介: 赵荣雪(1984-), 男, 内蒙古赤峰人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: zrxue88@163.com

\* 通讯作者: 陈国宏(1963-), 教授, 博士生导师, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

合区域组成,包括 1 个 POU 特异性区域(POU-specific domain, POU-SD)和 1 个 POU 同源性区域(POU-homoeodomain, POU-HD)<sup>[2-3]</sup>。垂体特异性转录因子由 *Pit1* 基因编码,是动物垂体前叶特异表达的一种具有重要功能的转录因子<sup>[4]</sup>。*Pit1* 与垂体中 *PRL*、*GH*、*TSH-β* 基因以及 *Pit1* 自身的启动子结合,调控这些基因的转录,通过调节这些基因的表达而对动物的生长、发育、繁殖和免疫等很多方面起着重要的作用<sup>[2]</sup>。目前对该基因研究主要集中在基因的外显子和内含子的多态性以及基因表达等方面,并把此基因作为控制生长相关的候选基因,研究表明 *Pit1* 基因与猪的生长、屠宰性状和脂肪性状相关<sup>[5-9]</sup>,与牛的生长和屠宰性状<sup>[10-11]</sup>具有相关性,在家禽上也发现了许多 SNP 位点,已经证明在 POU 结构域的(A/T)突变与鸡的 8 周龄体质量具有极显著差异<sup>[12]</sup>,最近研究证明 *Pit1* 基因多态性和单倍型与鸡的生长性状具有相关性但与屠宰性状和脂肪性状相关性还未发现<sup>[13]</sup>。而对于该基因的表达调控方面研究则相对较少。在基因表达调控中,转录环节是最主要的调控点,而启动子在转录和调控此基因表达方面起着关键的作用,所以启动子的研究对整个基因的转录调控具有重要的意义。

为了深入分析 *Pit1* 基因启动子区域的功能以明确 *Pit1* 基因的表达调控机制,本研究以太湖鹅为试验对象,成功地克隆了太湖鹅 *Pit1* 基因启动子序列,构建并鉴定了太湖鹅 *Pit1* 基因启动子荧光素酶报告载体,为进一步研究其转录调控奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 太湖鹅由国家级水禽基因库(泰州)提供,10 周龄采集血样。

1.1.2 试剂 Genome Walking Kit、DNA 聚合酶、pMD19-T 载体连接试剂盒、限制性内切酶 *Xho*I、*Hind* III 和 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 为 TaKaRa 公司产品;不含启动子的荧光素酶报告质粒 pGL3-Basic 购自 Promega 公司;质粒提取试剂盒购自鼎国生物公司;引物合成及测序均由上海生工生物技术有限公司完成;大肠杆菌 DH5α 由本室保存。

### 1.2 方法

1.2.1 利用染色体步移技术扩增 *Pit1* 基因启动子 参照已经发表的鹅 *Pit1* 基因的第一外显子及部

分 CDS 序列(GenBank 登录号:EF522106),按 Genome Walking Kit 试剂盒说明书设计 3 对下游引物,上游为试剂盒的兼并引物,按试剂盒说明书的反应条件和体系进行巢式 PCR 扩增,取第 3 次扩增结果切胶回收,然后进行克隆测序。下游引物序列:sp1: GCACTTCCAGTCCTGCACATAATTG, sp2: TGTAG AGACAACATTTGGTCGCATGG, sp3: GCTGTGATG CATTATCAGAGGCAGAG。

#### 1.2.2 *Pit1* 的引物设计及 *Pit1* 启动子扩增

根据染色体步移扩增得到的 *Pit1* 基因启动子序列,利用 Premier 5.0 软件设计引物,上游引物引入限制性内切酶 *Xho*I 识别位点,下游引物引入限制性内切酶 *Hind* III 识别位点,引物序列:上游引物为 5' GGGGTACCGCCAAACCCAAAGTAATA 3', 下游引物为 5' CCCAAGCTTACCCTCAAAGAGGT-GAAA 3'。

以鹅基因组 DNA 为模板,利用常规 PCR 反应进行扩增;反应体系:10×PCR 缓冲液 2 μL, 25 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> 2.0 μL, 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 0.4 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 上下游引物各 1 μL, rTaq 酶 2.0 U, 100 ng·μL<sup>-1</sup> DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 12.2 μL。反应条件:95℃预变性 5 min;94℃变性 45 s, 65℃退火 45 s, 72℃延伸 1.5 min, 共进行 35 个循环;72℃终末延伸 5 min。扩增产物取 5 μL 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测;剩余 PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒回收纯化备用。

1.2.3 PCR 产物回收及鉴定 将 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后,按 TaKaRa 公司 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 操作步骤进行切胶回收目的片段,将回收产物与 pMD-19 载体连接,然后转化 DH5α 并挑取阳性克隆,先菌液 PCR 鉴定为阳性克隆后送上海生工生物技术有限公司测序,序列鉴定正确的质粒命名为 T-Pit-1 质粒。

#### 1.3 双酶切 PGL3-Basic 载体和质粒 T-Pit-1

用限制性内切酶 *Xho*I 和 *Hind* III 内切酶将 pGL3-Basic 载体进行双酶切,酶切反应体系:pGL3-Basic 载体 1 μg, 10×M Buffer 5 μL, *Xho*I 和 *Hind* III 各 1 μL, 用双蒸水补足到总体积为 50 μL, 37℃水浴 3 h。酶切产物 1%琼脂糖凝胶电泳,用回收试剂盒回收纯化分子量的酶切产物,得到线性化的 pGL3-Basic 载体。

#### 1.4 质粒 T-Pit-1 双酶切及产物回收

酶切体系和条件与 pGL3-Basic 载体酶切一致,

酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 采用 TaKaRa 公司琼脂糖酶切试剂盒进行切胶回收, 具体操作步骤按说明书进行。

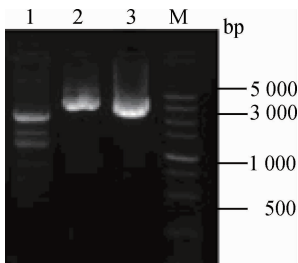
### 1.5 *Pit1* 启动子荧光素酶报告基因载体的构建

将酶切回收后的 pGL3-Basic 载体质粒和 *Pit1* 基因启动子目的片段在 0.2 mL 的离心管中进行连接反应, 16 °C 酶连过夜。取 10  $\mu$ L 连接产物直接转化 100  $\mu$ L 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。经过含有氨苄青霉素的 LB 平板固体培养基中选择培养。从转化子的平板上随机挑取 10 个菌落, 菌液 PCR 初步鉴定阳性克隆, 将阳性克隆的菌液经过不含氨苄青霉素的 LB 液体培养基扩增培养, 培养后用试剂盒抽提法提取质粒备用; 经过 PCR、酶切、测序鉴定。

## 2 结果

### 2.1 染色体步移扩增 *Pit1* 基因启动子并克隆测序

运用基因组步移扩增, 得到了大约 3 000 bp 的 *Pit1* 基因 5' 侧翼序列, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 测序结果表明, 序列总长度为 3 149 bp, 包括第一外显子 90 bp, 启动子区 3 059 bp, 在线启动子预测软件(<http://www.fruitfly.org/seq-tools/promoter.html>)预测表明, 该启动子在转录起始点上游包括典型的 TATA 框(-25 bp 处)和 CAAT 框(-76 bp 处), 但无 GC 框; 使用 TESS、Promoter TFSEARCH 等分析, 发现一系列潜在的启动子转录因子结合位点, 如 TFIID、TBP、TEF-1、GATA-1、AP-1、PBF、SP1 等。



1~3. 以鹅基因组为模板的巢式 PCR 产物; M. DNA 相对分子质量标准 DL5000 marker

1-3. The nest PCR products from the goose genomic template; M. DL5000 DNA marker

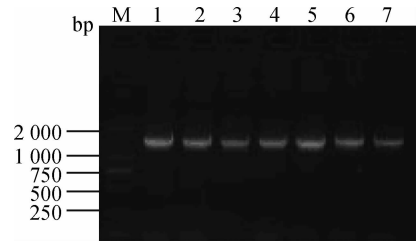
图 1 染色体步移 PCR 产物 1% 琼脂糖的凝胶电泳图

Fig. 1 PCR products on 1% agarose gel by genome walking

### 2.2 *Pit1* 基因启动子序列的 PCR 扩增

根据克隆测序所得序列, 设计 1 对引物, PCR 扩增产物为 1 485 bp, 扩增得到的产物用 1% 琼脂糖

凝胶电泳检测与预期大小相符, 说明扩增正确(图 2)。



1~7. PCR 扩增片段; M. DNA 相对分子质量标准 DL2000

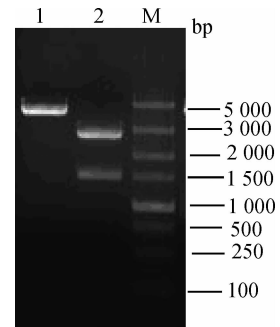
1-7. The PCR amplified fragment; M. DNA marker (DL2000)

图 2 鹅 *Pit1* 基因启动子 PCR 扩增 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 The results of *Pit1* gene promoter PCR amplification on 1% agarose gel

### 2.3 T 克隆 *Pit1* 基因启动子鉴定

切胶回收 PCR 产物, 连接、转化后, 菌液 PCR, 小提质粒后, 酶切鉴定, 如图 3。电泳结果表明, 单酶切把 T-Pit1 质粒酶切成线性化, 双酶切成目的片段和载体片段, 菌液送公司测序, 测序表明, 序列无碱基突变, 说明 T-Pit1 质粒已成功将 *Pit1* 启动子连接到载体中。



1. T-Pit1 质粒单酶切; 2. T-Pit1 质粒双酶切; M. DNA 相对分子质量标准 DL5000 marker

1, 2. Plamid of T-Pit1 after restrictive endonuclease digestion; M. DL 5000 DNA marker

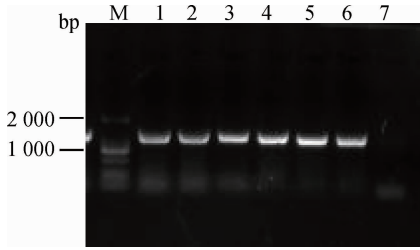
图 3 T-Pit1 质粒 1% 琼脂糖凝胶电泳酶切检测结果

Fig. 3 The assay the T-Pit1 plasmid by restriction endonuclease

### 2.4 *Pit1* 基因启动子 pGL-Basic 报告载体的构建和鉴定

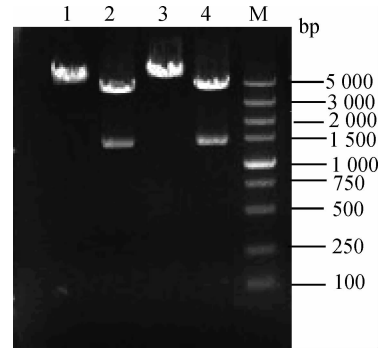
将 1 485 bp 的 *Pit1* 启动子插入到线性化的 pGL-Basic 报告载体, 转化感受态大肠杆菌后, 菌液 PCR 鉴定, 随机挑取 6 个单克隆, 菌液 PCR 检测, 如图 4 所示。6 个克隆均可扩增出长度为 1 485 bp 的目的片段, 说明这 6 个克隆中均被转化有启动子 pGL-Basic 报告基因; 将其中 2 个克隆提取质粒, *Xho* I 和 *Hind* III 酶切鉴定, 均得到与预期大小相

等的目的条带,如图 5,通过测序结果也证明与预期的一致无缺失突变发生(图 6),说明序列插入正确。



1~6. 挑取的重组体单克隆;7. 阴性对照;M. DNA 相对分子质量标准 DL2000 marker  
1-6. Picked the recombinant monoclonal; 7. Negative control; M. DL 2000 DNA marker

图 4 pGL-Pit1 重组体菌液 PCR 电泳检测结果  
Fig. 4 The assay the pGL-Pit1 recombinant vector by bacteria PCR



1,3. pGL-Pit1 重组体单酶切;2,4. pGL-Pit1 重组体双酶切;M. DNA 相对分子质量标准 DL5000 marker  
1-4. Plamid of pGL-Pit1 after restrictive endonckease digestion; M. DL 5000 DNA marker

图 5 pGL-Pit1 重组体酶切电泳检测结果  
Fig. 5 The assay the pGL-Pit1 recombinant vector by restriction endonuclease

```

Query 1   CCAAAOCCEAAAGTAATATAGATGGCAGTTCATTGGTGGGGTATCTTCCATAATATTGT 60
          |||
Sbjct 1 576 CCAAAOCCEAAAGTAATATAGATGGCAGTTCATTGGTGGGGTATCTTCCATAATATTGT 1 635

Query 61  AATGATTATTTTAAAGTTTTTGTAAATTTTACAATATAGAAGTGTATACGAAAGTAG 120
          |||
Sbjct 1 636 AATGATTATTTTAAAGTTTTTGTAAATTTTACAATATAGAAGTGTATACGAAAGTAG 1 695

Query 121 TTATATCAGTATTTAGCCTCATTACTGCTAAAGCACATATGCAATTTGC AAAATGCAGTA 180
          |||
Sbjct 1 696 TTATATCAGTATTTAGCCTCATTACTGCTAAAGCACATATGCAATTTGC AAAATGCAGTA 1 755

Query 181 ATTCTGAAATTTCTCCACAACCAAGGACACAGCCTTCACAAAATCAGATTACAGATAA 240
          |||
Sbjct 1 756 ATTCTGAAATTTCTCCACAACCAAGGACACAGCCTTCACAAAATCAGATTACAGATAA 1 815

Query 241 TATCAAGGATTCAACAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCAATATGTGATCTCTCCATAOCA 300
          |||
Sbjct 1 816 TATCAAGGATTCAACAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCAATATGTGATCTCTCCATAOCA 1 875

Query 301 CATATGGAAGTCTGTTACATCAAAAATCTACTTCAGGCATTGATCCAGTTTGGAAATAT 360
          |||
Sbjct 1 876 CATATGGAAGTCTGTTACATCAAAAATCTACTTCAGGCATTGATCCAGTTTGGAAATAT 1 935

Query 361 CCAAGAAGGCTTAAACCAAGAGTATCGTCATCTTTACGGGCTGACCCAACATCTCTGGGT 420
          |||
Sbjct 1 936 CCAAGAAGGCTTAAACCAAGAGTATCGTCATCTTTACGGGCTGACCCAACATCTCTGGGT 1 995

Query 421 TACAAATTAATAAAAAAAAAATACATTTTAOCTCTAAAAAGTAAAATGAATGAAATGGAAC 480
          |||
Sbjct 1 996 TACAAATTAATAAAAAAAAAATACATTTTAOCTCTAAAAAGTAAAATGAATGAAATGGAAC 2 055

Query 481 ATATGATTCTTTTTTTTCTTTAAAAATTTATGAOCTATATGTAGAATATATGACTATGA 540
          |||
Sbjct 2 056 ATATGATTCTTTTTTTTCTTTAAAAATTTATGAOCTATATGTAGAATATATGACTATGA 2 115

Query 541 TGTACTTAGTGATTTTCATCATTTTCAGATTAAOCTGTATACTTTTTACTGTTCOC AAG 600
          |||
Sbjct 2 116 TGTACTTAGTGATTTTCATCATTTTCAGATTAAOCTGTATACTTTTTACTGTTCOC AAG 2 175

```

```

Query 601 TCATTCTGTTTTTCATGCCAGCAAATCATTAGATAGTTAATCTTTGTAAAAAGATTCTG 660
      |||
Sbjct 2 176 TCATTCTGTTTTTCATGCCAGCAAATCATTAGATAGTTAATCTTTGTAAAAAGATTCTG 2 235

Query 661 CATTACTTAGTCACTAGAACAAATAAAGACCAGGAOCTTCTGGATGAGACTGTAGATGTT 720
      |||
Sbjct 2 236 CATTACTTAGTCACTAGAACAAATAAAGACCAGGAOCTTCTGGATGAGACTGTAGATGTT 2 295

Query 721 GCAATGCTATAAAATTAATAATAGTAACTGTGAGTGAATTTTCATGTGTCACATATAGGCTCT 780
      |||
Sbjct 2 296 GCAATGCTATAAAATTAATAATAGTAACTGTGAGTGAATTTTCATGTGTCACATATAGGCTCT 2 355

Query 781 TTCAAGATTTTATCTTAGATAAACATTCAGCAGTCTCTGCTTATGTAAAACTGTCGTTC 840
      |||
Sbjct 2 356 TTCAAGATTTTATCTTAGATAAACATTCAGCAGTCTCTGCTTATGTAAAACTGTCGTTC 2 415

Query 841 AGCAGCTTTCTCTGGATACAGTTGATCTGTGTTACACATCACTGTGTTTTACTAGTATA 900
      |||
Sbjct 2 416 AGCAGCTTTCTCTGGATACAGTTGATCTGTGTTACACATCACTGTGTTTTACTAGTATA 2 475

Query 901 GCAAGACAAATGATGACTGTGTAACCTGCTAGGAATTTGGTTAATTCAGAGTATTTTGCTA 960
      |||
Sbjct 2 476 GCAAGACAAATGATGACTGTGTAACCTGCTAGGAATTTGGTTAATTCAGAGTATTTTGCTA 2 535

Query 961 TAGGTTCTTGACTGTGCAGACTTTTGATTGAGCTCTCAGTCAGGTGTCITOCAGACAA 1 020
      |||
Sbjct 2 536 TAGGTTCTTGACTGTGCAGACTTTTGATTGAGCTCTCAGTCAGGTGTCITOCAGACAA 2 595

Query 1 021 TTGCTGGATGAGATTCTAGGGCCAGGTGTTAACTGTGGAACCTACTTAATATTAACCG 1 080
      |||
Sbjct 2 596 TTGCTGGATGAGATTCTAGGGCCAGGTGTTAACTGTGGAACCTACTTAATATTAACCG 2 655

Query 1 081 TAOCCTGCTCTTTGCTAOCGACTTTGGAGATGGAACCTTTATTTTTTTTTTCTGCTGCA 1 140
      |||
Sbjct 2 656 TAOCCTGCTCTTTGCTAOCGACTTTGGAGATGGAACCTTTATTTTTTTTTTCTGCTGCA 2 715

Query 1 141 TTGTTCTTCACAAAAGAOCTAATTGAAAATATCTGTTAAATCATGTCCTGTTTCCCTC 1 200
      |||
Sbjct 2 716 TTGTTCTTCACAAAAGAOCTAATTGAAAATATCTGTTAAATCATGTCCTGTTTCCCTC 2 775

Query 1 201 TOCTTCTTCCATACTAATTTGGATGTGATTGTGTTGTGTTGGAAAGGAAGGCTCTA 1 260
      |||
Sbjct 2 776 TOCTTCTTCCATACTAATTTGGATGTGATTGTGTTGTGTTGGAAAGGAAGGCTCTA 2 835

Query 1 261 TAGCAGTATAGCAATATTGCTGGGAAAAGAACATTAATAATGGATAAAGGATTCTCTGGT 1 320
      |||
Sbjct 2 836 TAGCAGTATAGCAATATTGCTGGGAAAAGAACATTAATAATGGATAAAGGATTCTCTGGT 2 895

Query 1 321 GGTATAAATAOCTGCACACGACGTOOCTGTGCTCTGGAGCOOCTTCTGTATATGTATATGC 1 380
      |||
Sbjct 2 896 GGTATAAATAOCTGCACACGACGTOOCTGTGCTCTGGAGCOOCTTCTGTATATGTATATGC 2 955

Query 1 381 AAGTACAAAGACTGGAATACAGTTGGAGCTGCTGTTAATCACTCAGGATCTGTTCTGTTA 1 440
      |||
Sbjct 2 956 AAGTACAAAGACTGGAATACAGTTGGAGCTGCTGTTAATCACTCAGGATCTGTTCTGTTA 3 015

Query 1 441 GAAAACAGGGGAAGGTGGCTCTTTGCTTTCAOCTCTTTGAGGGT 1 485
      |||
Sbjct 3 016 GAAAACAGGGGAAGGTGGCTCTTTGCTTTCAOCTCTTTGAGGGT 3 060

```

图 6 构建好的 pGL-Pit1 重组质粒及序列比对结果

Fig. 6 The results of construction of pGL-Pit1 recombinant plasmid and sequence alignment

### 3 讨 论

垂体特异性转录因子 1(Pit 1)基因是重要的组织特异性转录因子,同时是调控垂体 GH、PRL、TSH- $\beta$  亚基转录的重要反式因子,对动物早期发育和相关基因的启动表达起重要的调控作用,是与生长相关的候选基因之一,也是研究动物生长机制的重要基因之一。启动子是指 DNA 分子上被 RNA 聚合酶识别并结合形成起始转录复合物的区域,它还包括一些调节蛋白因子的结合位点。如启动子及其上游远处的转录调控蛋白的结合位点<sup>[14-15]</sup>。本试验通过染色体步移获得的 *Pit1* 基因启动子序列,包含典型的启动子结构域(如 TATA 框和 CAAT 框等)和转录因子结合位点(如 TTFIID、TBP、TEF-1、GATA-1、AP-1、PBF、SP1 等)。至于结构域和转录调控元件序列的改变是否影响启动子活性和基因表达,还有待进一步研究,但近年来,对真核生物细胞的转录调控的研究取得了一些进展:研究证实,启动子区转录调控元件序列的改变会影响基因的表达,而调控元件与调控元件之间的序列突变一般不影响启动子的功能,如 CAAT 框内的突变对基因转录起始的影响很大,使转录效率低下或不能起始转录<sup>[16]</sup>。本研究选取的 *Pit1* 基因作为控制动物生长、发育、繁殖和免疫的候选基因,因此对其启动子的克隆及其序列分析,为进一步研究基因的转录调控机制具有重要的意义。

目前,启动子区的研究主要是调控区功能性分析,进而评价调控区模拟内源基因表达模式,即通过报告基因与目的启动子连接的方法,启动子区调控报道基因的转录。而目前多采用荧光素酶报告基因,由于荧光素酶报告基因技术以其简单、快速、定量等特点,在研究基因调控机制方面起到广泛应用,pGL-Basic 是一个能表达荧光素酶蛋白的质粒,作为研究启动子调控的常用载体,大量的转录调控研究都是依靠荧光素酶报告基因为媒介,构建荧光素酶报告基因重组子进行启动子区域的转录因子及其作用元件分析,进而确定转录调控的机制<sup>[16-18]</sup>。本研究成功地构建了含有启动子序列的荧光素酶报告基因载体,并通过酶切和测序加以鉴定,为后续系列启动子缺失体构建、启动子活性检测和调控区域(正、负调控区)确定奠定基础。

### 4 结 论

本研究以太湖鹅为试验对象,利用染色体步移技术成功地克隆了太湖鹅 *Pit1* 基因启动子序列,构建并鉴定了太湖鹅 *Pit1* 基因启动子荧光素酶报告载体,为进一步研究其转录调控奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] COHEN L E, ZANGER K, BRUE T, et al. Defective retinoic acid regulation of the *PIT-1* gene enhancer a novel mechanism of combined pituitary hormone deficiency [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(3): 476-484.
- [2] ROSENFELD M G. POU-domain transcription factors: powerful developmental regulators [J]. *Genes Dev*, 1991, 5: 897-907.
- [3] AARSKOG D, EIKEN H G, BJERKNES R, et al. Pituitary dwarfism in the R271W *PIT-1* gene mutation [J]. *Eur J Pediatr*, 1997, 156(11): 829-834.
- [4] TUGGLE C K, TRENKLE A. Control of growth hormone synthesis [J]. *Domestic Animal Endocrinol*, 1996, 13: 1-33.
- [5] YU T P, TUGGLE C K, SCHMITZ C B, et al. Association of *PIT1* polymorphisms with growth and carcass traits in pigs [J]. *Anim Sci*, 1995, 73: 1282-1288.
- [6] STANCEKOVA K, VASICEK D, PESKOVICOVA D, et al. Effect of genetic variability of the porcine pituitary-specific transcription factor (*PIT-1*) on carcass traits in pigs [J]. *Anim Genet*, 1999, 30: 313-315.
- [7] BRUNSCH C, STERNSTEIN I, REINECKE P, et al. Analysis of associations of *PIT1* genotypes with growth, meat quality and carcass composition traits in pigs [J]. *Appl Genet*, 2002, 43: 85-91.
- [8] SONG C Y, GAO B, TENG Y, et al. *MspI* polymorphisms in the 3rd intron of the swine *POU1F1* gene and their associations with growth performance [J]. *Appl Genet*, 2005, 46: 285-289.
- [9] FRANCO M M, ANTUNES R C, SILVA H D, et al. Association of *PIT1*, *GH* and *GHRH* polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs [J]. *Appl Genet*, 2005, 46: 195-200.
- [10] ZHAO Q, DAVIS M E, HINES H C. Associations of polymorphisms in the *Pit-1* gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle [J]. *Anim Sci*,

- 2004, 82:2229-2233.
- [11] XUE K, CHEN H, WANG S, et al. Effect of genetic variations of the *POU1F1* gene on growth traits of Nanyang cattle [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33: 901-907.
- [12] JIANG R, LI J, QU L, et al. A new single nucleotide polymorphism in the chicken pituitary-specific transcription factor (*POU1F1*) gene associated with growth rate [J]. *Anim Genet*, 2004, 35:344-346.
- [13] NIE Q H, FANG M X, XIE L. The *Pit1* gene polymorphisms were associated with chicken growth traits [J]. *BMC Genet*, 2008, 9: 20 doi:10.1186/1471-2156-9-20.
- [14] MIZZEN C A, ALLIS C D. Transcription. New insights into an old modification [J]. *Science*, 2000, 289:2290-2291.
- [15] PEDERSEN A G, BALDI P, CHAUVIN Y, et al. The biology of eukaryotic promoter prediction [J]. *Comput Chem*, 1999, 23:191-207.
- [16] LIU W W, ZHANG P G, CHEN W W, et al. Characterization of two functional NKX3.1 binding sites upstream of the *PCAN1* gene that are involved in the positive regulation of *PCAN1* gene transcription [J]. *BMC Mol Biol*, 2008, 9:45
- [17] 王 艳. 大白猪与梅山猪肝脏组织差异表达基因的分 离以及基因功能的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2009.
- [18] CHEN H G, HAN W J, DENG M, et al. Transcriptional regulation of PP2A-A $\alpha$  is mediated by multiple factors including AP-2 $\alpha$ , CREB, ETS-1, and SP-1 [J]. *PLOS ONE*, 2009, 4(9): e7019.

(编辑 郭云雁)