

鸭 $CD8\alpha$ 基因启动子区的克隆及荧光素酶报告基因重组体的构建

徐 琪¹, 陈 阳¹, 黄正洋¹, 赵文明¹, 张 扬¹, 李欣钰²,
赵荣雪¹, 李 秀¹, 段修军³, 陈国宏^{1*}

(1. 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009; 2. 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045; 3. 国家水禽种质资源基因库, 泰州 225300)

摘 要: 旨在了解分化群 α 基因可能的调控序列及其转录调控机制。本研究利用基因组步移技术扩增鸭 $CD8\alpha$ 基因的启动子区序列, 使用在线软件进行序列分析; 分别将鸭肝炎易感组和抗性组的 $CD8\alpha$ 基因启动子区定向亚克隆至荧光素酶表达载体 pGL3-Basic 中, 利用酶切与测序技术进行鉴定; 并瞬时转染细胞, 采用荧光素酶报告基因系统检测启动子载体的活性。结果, 扩增出一条长度为 2 480 bp 的片段(包含第一外显子 56 bp, 启动子区 2 424 bp)。经序列分析, 鸭 $CD8\alpha$ 基因启动子区具有典型的 TATA-box、GC-box 和 CAAT-box, 其转录起始位点位于翻译起始密码子 ATG 上游 -406 bp 处, 且发现了 CdxA、Nkx-2、GATA-1、SRY 等 41 个潜在转录因子结合位点。经酶切与测序鉴定, 成功构建了鸭 $CD8\alpha$ 基因荧光素酶报告基因重组体。荧光素酶报告基因检测系统显示, 构建的鸭肝炎易感组和抗性组的报告基因启动子载体具有相当的活性。研究结果为进一步探讨 $CD8\alpha$ 基因的转录调控奠定了基础。

关键词: 鸭; $CD8\alpha$ 基因; 启动子; 荧光素酶报告基因

中图分类号: S834; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)04-0546-07

Molecular Cloning and Construction of Luciferase Reporter Recombinant of $CD8\alpha$ Gene Promoter in Duck

XU Qi¹, CHEN Yang¹, HUANG Zheng-yang¹, ZHAO Wen-ming¹, ZHANG Yang¹,
LI Xin-yu², ZHAO Rong-xue¹, LI Xiu¹, DUAN Xiu-jun³, CHEN Guo-hong^{1*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Molecular Design, Yangzhou 225009, China; 2. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 3. National Waterfowl Germplasm Resourse, Taizhou 225300, China)

Abstract: This experiment was conducted to explore the potential regulatory sequences of duck $CD8\alpha$ gene and the mechanism of transcription regulation. The $CD8\alpha$ gene promoter was cloned by genome walking, the sequence of the promoter was analyzed by online software of bioinformatics, and then the promoters from DHV-resistant and DHV-susceptible duck were subcloned into the luciferase expression vector pGL3-Basic directly, and their luciferase activity was detected. The DNA sequence of 2 480 bp was amplified including 56 bp in exon1 and 2 424 bp of promoter region. There were TATA-box, GC-box, CAAT-box and transcriptional start site in the sequence. 41 transcriptional factor binding sites including CdxA, Nkx-2, GATA-1, SRY, and so on, were detected. The luciferase reporter gene recombinant pGL3- $CD8\alpha$ including correct target gene was constructed and identified by restrictive endonuclease enzyme cutting and sequencing,

收稿日期: 2011-07-07

基金项目: 国家自然科学基金(31101704); 现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-45-04); 江苏省属高校自然科学基金面上项目(07KJB230138)

作者简介: 徐 琪(1978-), 男, 江苏如东人, 博士生, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: xuqi@yzu.edu.cn

* 通讯作者: 陈国宏, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

the pGL3-Gy and pGL3-Gk plamids had strong luciferase activity. The result lay a foundation for exploring the promoter activity and transcriptional regulation mechanism of duck *CD8 α* gene.

Key words: duck; *CD8 α* gene; promoter; luciferase reporter gene

CD8 是 T 细胞表面的双链糖蛋白,存在 *CD8 α* 和 *CD8 β* 2 种亚基形式,也是 T 淋巴细胞表面的重要标志物。*CD8 α* 参与胸腺分化以及 T 细胞活化的信号传导,而 *CD8 β* 主要是协助 *CD8 α* 发挥生物学功能。*CD8 α* 作为白细胞分化群基因家族的重要成员之一,在哺乳动物和禽类免疫防御中起重要作用^[1]。自 Kothlowa 等首次克隆了 *CD8 α* 基因以来^[2],该基因研究已引起多个学者的关注。Mancebo 等研究发现 *CD8 α* 基因的 Gly→Ser 突变会导致 *CD8* 分子免疫缺陷^[3-4],鸡感染马立克病毒后,也会引起 *CD8 α* 基因的表达下降^[4]。亦有研究证实,*CD8 α* 基因表达的调节可能存在包括 *CD8 α* 特异性增强子和可能的沉默子在内的多种顺式调控元件和反式作用因子^[5]。因此,研究并阐明 *CD8 α* 基因的表达调控机制具有重要的生物学意义。然而,目前关于 *CD8 α* 调控机制的研究仍鲜有报道,其启动子区域仍不清楚。

本研究通过染色体步移法,拟扩增鸭 *CD8 α* 基因的启动子区序列,并构建 *CD8 α* 启动子荧光素酶报告基因重组体,为进一步研究 *CD8 α* 基因的转录调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 试验用金定鸭来自国家水禽种质资源基因库。

1.1.2 试验试剂 Genome Walking Kit、LA *Taq* DNA Polymerase、dNTPs、pMD19-T 载体、限制性内切酶 *Xho* I、*KPN* I、琼脂糖凝胶 DNA 回收

试剂盒购自 TaKaRa 公司,质粒小量提取试剂盒购自鼎国生物公司,荧光素酶报告质粒 pGL3-Basic 购自 Promega 公司,鸡淋巴瘤 DT40 细胞和淋巴细胞培养液由上海佛雷堡科技发展有限公司提供,大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型构建 建立金定鸭全同胞家系,3 日龄通过肌注、口服和滴鼻感染 I 型雏鸭肝炎标准毒株(0.3 mL·只⁻¹),2~3 d 后,部分出现雏鸭肝炎典型症状(易感组),另有部分个体未出现任何症状(抗性组),采集血样样本用于 DNA 提取。

1.2.2 引物设计 参照鸭 *CD8 α* 基因序列(GenBank 登录号:AF378373.1),按照 Genome Walking Kit 试剂盒要求,利用在线引物设计软件 Primer 3.0 设计 3 条特异性下游引物(Sp1:GTCTTGTGGGCTTGCTCTTCATTT, Sp2:TGAACGCCTTAACCCCTTTTACTC 和 Sp3:ATACTCACA-GAGCCCCAGGCTGA)。根据第 1 次步移结果再设计 3 条特异性下游引物(Sp4:GACAGAGCAAACAAGATGCTGGAA, Sp5:TCTTTCAGCCCATTGTTCTCTG, Sp6:AAACCCATCAA-GAAAGCCCTGTG),上游引物为 Genome Walking Kit 提供的兼并引物 AP3。具体步移引物设计策略见图 1。根据基因组步移结果,利用 Premier 5.0 软件设计报告基因重组体引物(F_2 :CGGGGTACCATG-GATCTTAGTGGGCGTAA, R_2 :CCGCTCGAGTCG-GGACGAGGCAGCGAGCA,斜体为酶切位点,前为保护性碱基),所有引物由上海生工生物技术有限公司合成。

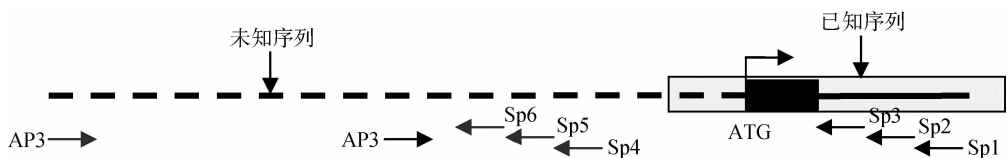


图 1 鸭 *CD8 α* 基因扩增示意图

Fig. 1 Amplifying protocol of *CD8 α* gene in duck

1.2.3 基因组步移 PCR 扩增及测序 分别利用设计的 2 组特异性引物(Sp1~Sp3、Sp4~

Sp6),以鸭基因组 DNA 为模板进行步移 PCR 扩增,反应体系和扩增程序按照基因组步移试剂盒操

作说明书方法操作,连续进行 3 轮巢式 PCR 扩增,1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。取 2 次第 3 轮步移 PCR 产物,经琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收后,连接到 pMD19-T 载体,转化到 DH5 α 感受态宿主菌中培养过夜;随机挑选阳性单克隆菌株,扩增,菌液 PCR 鉴定,并将阳性克隆送上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.4 序列分析 启动子序列分析、转录因子结合位点预测、启动子区序列比对和进化树构建、以及 CpG 岛预测分别通过在线软件 http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html、<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/>、<http://www.cbr.jp/research/db/TFSEARCH.html>、<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml> 和 <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html> 完成。

1.2.5 鸭 CD8 α 基因启动子区扩增 分别以易感组和抗性组雏鸭基因组 DNA 为模板,利用常规 PCR 反应进行扩增;反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 45 s,65.5 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,并对 PCR 产物回收纯化。

1.2.6 报告基因 pGL3- CD8 α - promoter 载体的构建 将回收的 PCR 产物与 pGM19-T 载体连接,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,扩增,提取质粒后,进行 Xho I、KPN I 双酶切和克隆测序鉴定。并将酶切后的启动子亚克隆至 pGL3- Basic 真核表达载体,命名为 pGL3- CD8 α - promoter,酶切、菌液 PCR 和克隆测序鉴定。

1.2.7 鸭 CD8 α 基因启动子转录活性的检测 将 DT40 细胞培养在添加 10% 胎牛血清的 1640 培养液中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 的条件下培养,待细胞状态良好,密度达到 1 \times 10 6 个 \cdot mL $^{-1}$ 时,以 500 个 \cdot 孔 $^{-1}$

接种细胞至 24 孔板中,继续在培养箱中培养 24 h,然后将质粒 pGL3- Basic、pGL3- Basic-promoter、pGL3-Gy、pGL3-Gk 分别瞬时转染 DT40 细胞。参照荧光素酶检测试剂盒(Promega)操作说明进行,裂解细胞后,利用化学发光仪(Promega)测定荧光素酶活性,每组重复 3 孔。

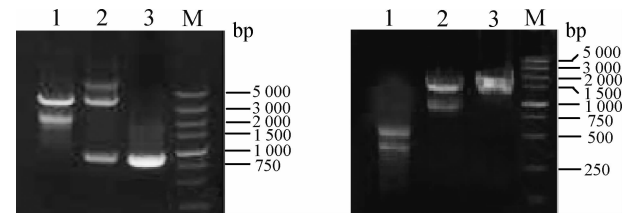
1.3 统计学处理

数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 基因组步移 PCR 扩增与克隆测序

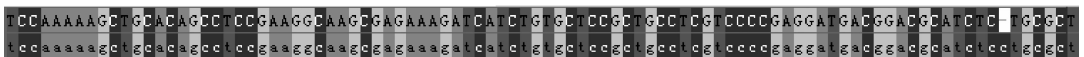
运用基因组步移扩增,分别得到了大约 800 和 1 850 bp 的条带(图 2)。将 2 次第 3 轮步移 PCR 产物进行克隆测序,截除 2 组引物间的重叠序列,经拼接获得长为 2 480 bp 的片段,包括第 1 外显子 56 bp,启动子区 2 424 bp,该片段与已知序列进行比对(图 3),仅在编码区发现有 1 个碱基的缺失,说明该步移结果即为鸭 CD8 α 基因启动子区。



左图为第 1 次步移结果,右图为第 2 次步移结果;1、2、3. 分别是以鸭基因组为模板的巢式 PCR 产物;M. DNA 相对分子质量标准

Left is the result of the first genome walking, right is the result of the second genome walking; 1, 2, 3. The nest PCR products from the duck genomic template; M. DL5000 DNA marker

图 2 鸭 CD8 α 基因启动子区基因组步移扩增电泳图
Fig. 2 PCR products on 1% agrose gel by genome walking



上为基因组步移结果;下为鸭 CD8 α 基因已知序列
The above is sequence got by genome walking, the next is the known sequence

图 3 鸭 CD8 α 基因启动子区基因组步移结果与已知序列比对结果
Fig. 3 Sequence alignment between sequence got by genome walking and known sequence

2.2 鸭 CD8 α 基因启动子区序列分析

对已拼接的鸭 CD8 α 基因启动子区序列使用在线软件进行启动子区结构及生物信息学分析。将鸭 CD8 α 基因启动子区序列提交网站(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)使用神经网络方法在线预测到鸭 CD8 α 基因启动子区有 1 处得分较高(0.98),发现鸭 CD8 α 基因启动子区具有典型的真核生物启动子结构元件和序列特征,含有

fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)使用神经网络方法在线预测到鸭 CD8 α 基因启动子区有 1 处得分较高(0.98),发现鸭 CD8 α 基因启动子区具有典型的真核生物启动子结构元件和序列特征,含有

TAAT-box、GC-box、CAAT-box 以及转录起始位点(位于翻译起始密码子 ATG 上游 -406 bp 处),如图 4 斜体部分所示。使用在线软件 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 分析鸭 CD8 α 基因启动子区域,发现了 CdxA、Nkx-2、GATA-1、SRY 等 41 个潜在转录因子结合位点

(Transcription factor binding site, TFBS),如图 4 中下划线所示。使用在线软件 (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) 预测鸭 CD8 α 基因启动子区含有 1 个 CpG 岛(Island size > 100, GC Percent > 60.0),包含部分第 1 外显子序列,长约 122 bp,如图 5 所示。

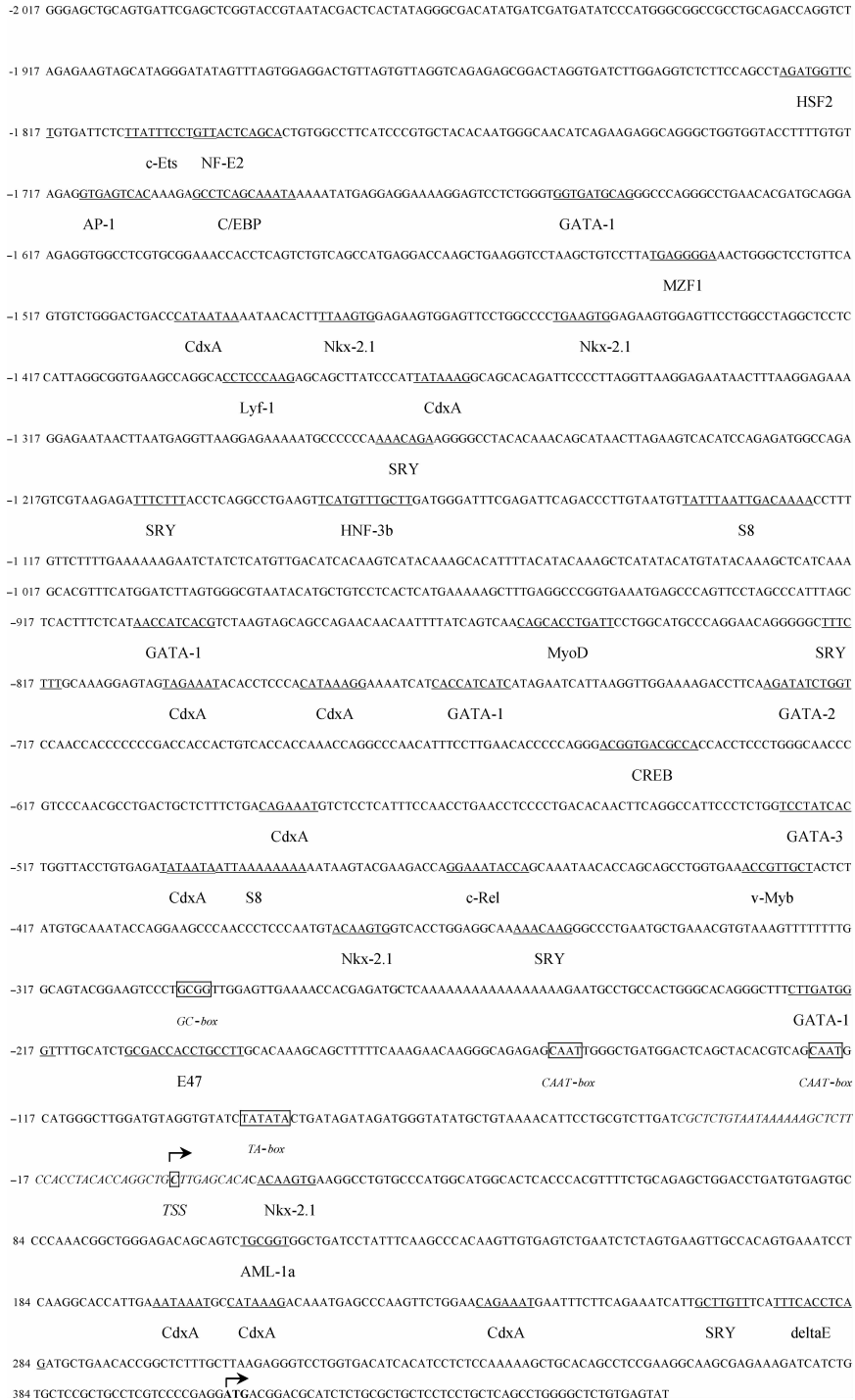


图 4 鸭 CD8 α 基因启动子区序列分析
Fig. 4 Analysis of promoter region of duck CD8 α gene

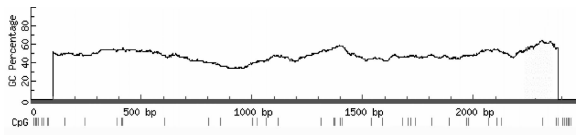
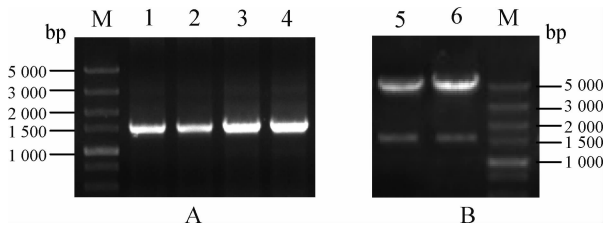


图5 鸭 *CD8α* 基因启动子区 CpG 岛的预测

Fig. 5 Bioinformatics analysis of CpG island of duck *CD8α* gene

2.3 鸭 *CD8α* 基因 pGL3-*CD8α*-promoter 载体的构建

根据基因组步移所获得的序列信息,分别构建易感组和抗性组 *CD8α* 基因 pGL3-*CD8α*-promoter 载体。首先扩增 2 组 *CD8α* 启动子区片段,琼脂糖凝胶电泳可见在约 1 400 bp 处出现单一条带(图 6A),与 1 415 bp 的片段大小相符,再将该片段亚克隆至 pGM-T 载体,构建 pGM-T-*CD8α*-promoter 重组体,将经酶切的 *CD8α* 启动子(1 415 bp)亚克隆至 pGL3-Basic 构建 pGL3-*CD8α*-promoter 载体,进行 *Xho* I、*KPNI* 双酶切,琼脂糖凝胶电泳可获得 1 条约 1 400 bp 的片段(图 6B),测序结果显示,*CD8α* 基因启动子成功插入到 pGL3-Basic 载体中,且发现易感组和抗性组间存在 5 处碱基突变(-985T>C、-552G>A、-484G>A)在这 3 个突变位点中,其中-985T>C 突变导致易感组的 *CD8α* 基因增加 1 个 MZF1 转录因子结合位点。



1、2. 为易感组和抗性组 PCR 扩增结果;3、4. 为易感组和抗性组菌液 PCR 鉴定;5、6. 为易感组和抗性组双酶切鉴定;M. DNA 相对分子质量标准

1, 3. The PCR result; 2, 4. The identification by bacteria PCR; 5, 6. The identification by enzyme digestion; M. DL5000 DNA marker

图6 鸭 *CD8α* 启动子区 PCR 扩增、PCR 鉴定及 pGL3-*CD8α*-promoter 的重组体双酶切鉴定

Fig. 6 PCR result of *CD8α* promoter identification of the recombinant plasmid pGL3-promoter by bacteria PCR and enzyme digestion

2.4 鸭 *CD8α* 基因启动子载体活性分析

将质粒 pGL3-basic、pGL3-basic-promoter、pGL3-Gy、pGL3-Gk 分别瞬时转染 DT40 细胞,利

用荧光素酶检测系统测定其荧光值,结果表明,本试验所构建的 pGL3-Gy、pGL3-Gk 与 pGL3-basic 空载体相比都具有明显的启动活性($P < 0.01$),且两者启动子活性相似($P > 0.05$,图 7)。

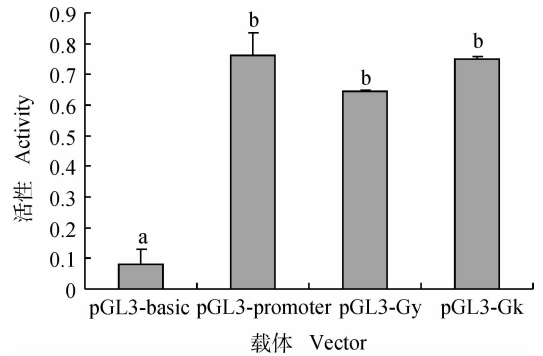


图7 鸭 *CD8α* 基因启动子报告基因重组体活性分析

Fig. 7 Luciferase assay of the *CD8α* promoter reporter constructs in duck

3 讨论

基因表达调控是一个多层次的复杂过程,其中转录水平的调控是最重要、最复杂的环节。转录起始水平的调节机制则是基因表达的基本控制点。启动子是转录激活过程中起发动作用的特异 DNA 序列,与转录因子结合后调节基因的转录,所以对特定基因启动子的研究尤为重要^[5]。本研究通过基因组步移法成功地获得了鸭 *CD8α* 启动子区序列,与公共数据库的鸭 *CD8α* mRNA 序列相比,仅在编码区发现了 1 个碱基缺失,这充分证明了克隆结果的正确性。

目前,已有 2 000 多种转录因子识别序列得到了鉴定,而各种分析转录因子结合位点的工具软件也不断出现,这为利用生物信息学方法研究转录因子对基因表达调控的作用奠定了基础^[6]。生物信息学在基因 5' 调控区转录因子和启动子分析中已得到了广泛的应用^[7]。本研究结果显示,鸭 *CD8α* 启动子区具有典型的 TATA-box、GC-box 和 CAAT-box。作为真核生物的启动子最常见的元件之一,TATA-box 能准确地识别转录起始位置,对转录水平有定量效应。本研究预测的 TATA-box (5'-TATATA-3') 符合真核生物启动子 5'-TATA [A/T] A-3' 序列模式。但是,一般认为 TATA-box 位于转录起始点上游 30~50 bp^[8],本研究发现 TATA-box 距转录起始点为 -87 bp,这可能与预测的

转录起始点(Transcription start site, TSS)的准确性有一定关系。转录因子结合位点分析表明,CD8 α 启动子区域 41 个潜在的转录因子结合位点,其中包含有 9 个同源的 CdxA 作用元件,3 个甲状腺转录因子-1(Nkx-2.1)作用元件、3 个 GATA-1 作用元件,CdxA 元件能够增强基因的转录活性^[9],但是数目众多的 CdxA 对 CD8 α 转录调控起何种作用尚不明,而在化学传感器基因(Chemoreceptor gene)中一般只出现 1 次^[10]。不少研究表明,转录因子 NKX-2.1、GATA-1 和激活蛋白 1(AP-1)参与细胞增殖、细胞凋亡以及病变过程的基因表达调控^[11-13]。NKX2.1 是甲状腺组织特异性转录因子的家族成员之一,目前发现,NKX2-1 对 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D 的启动子活性有正向调节作用,其表达和缺失与许多疾病关系密切,且该转录因子是一些与癌症相关的亚基因的表达所必需的,如溶酶体相关膜蛋白 3、癌胚抗原相关性细胞黏附分子 6^[14-15]。GATA-1 是最早发现的 GATA 家族成员,在正常红细胞增殖、分化过程中起重要的生物学作用,且控制着巨核细胞、肥大细胞和嗜酸性细胞的分化。转录因子 GATA.1 可以和许多生物大分子相互作用,如红细胞生成素(EPO)、FOG(Friend of GATA)、GATA-2 等,在血小板减少症、多发性骨髓瘤、白血病等疾病发病中发挥着重要的生物学效应^[16]。AP-1 是一类立早基因(Immediate early genes, IEGs)编码的核转录因子,这种转录因子主要由 Jun、Fos、ATF 及 JDP 亚家族组成,亚家族单体以同源或异源二聚体的形式结合 DNA 靶序列,调节靶基因,在细胞的正常生长和病变过程中起着重要作用。有研究报道,AP-1 对于病毒性肝炎的发病机制有重要意义,病毒蛋白和其他的激活因子可通过与 AP-1 结合位点的作用调控有关基因的转录与表达,另外与 Jun 和 Fos 家族的相互作用也是影响 AP-1 功能的重要方式^[17]。同时,张澄等在-647~-637 bp 处发现 CREB 转录因子作用元件,该元件与 CREB 基序(motif)5'-tgacgtca-3'具有很高的同源^[18],试验证实,CREB 是激活多个免疫基因的作用元件^[19],Gao 等人研究发现,人 CD8 a 基因的一143~-133 bp 处的 CREB 结合位点是影响启动子活性的关键,研究还发现-429 bp 处的 CREB 结合位点的突变也会降低启动子活性^[20]。通过比较易感组和抗性组的 pGL3-CD8 α -promoter 载体序列,虽发现有 3 处碱基突变,但仅在易感组增加 1 个

髓样锌指蛋白-1(MZF1)转录因子潜在结合位点,该转录因子是一种 C2H2 锌指蛋白转录因子,研究发现此因子可调节细胞增殖和分化,并参与肿瘤形成^[21]。至于这些关键的转录因子是如何来调节 CD8 α 基因转录调控的,笔者将在下一步的研究工作中,通过凝胶阻滞迁移率分析、染色质免疫共沉淀和 RNA 干扰等试验确认上述转录因子在 CD8 α 基因转录调控以及其在疾病发生发展中的作用。此外,笔者还发现,CD8 α 基因启动子区域含有 1 个典型的 CpG 岛区,这也提示 CD8 α 基因的表达调控可能还涉及表观遗传修饰(如甲基化修饰)的调节。CD 基因家族启动子区 CpG 岛的甲基化修饰在疾病相关基因表达调控中的作用已得到广泛的研究和认可^[22-24]。

荧光素酶报告基因载体不含启动子,将目的基因调控序列克隆到含有报告基因的表达质粒,荧光素酶的表达受重组质粒上游启动子序列的调节,重组质粒转染适当的细胞系,荧光素酶活性可直接反映启动子的强度。目前,此研究方法已经被广泛应用^[25-26]。本研究分别将易感组和抗性组 CD8 α 启动子克隆到荧光素酶报告基因载体,且两者均具有较高的启动活性,这为后续的 CD8 α 转录调控研究提供了有效工具。

4 结 论

本研究获得了鸭 CD8 α 启动子区序列,该基因启动子具有典型的启动子元件,并成功构建了鸭 CD8 α 基因荧光素酶报告基因重组体。为进一步研究调控区中的各种顺式作用元件和与之发生相互作用的反式作用因子,及阐明 CD8 α 基因的表达调控机制奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] 徐胜威. 斜带石斑鱼 CD8 α 和 CD8 β 基因克隆及表达模式分析[C]. 广东: 中山大学, 2010.
- [2] KOTHLOWA S, MANNESB N K, SCHAERERA B, et al. Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies[J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29 (5): 733-748.
- [3] 袁 舟. 稳定表达鸡 CD4、CD8 α 细胞系的建立与鉴定[C]. 江苏: 扬州大学, 2008.
- [4] MANCEBO E, MORENO-PELAYO M A, MENC A, et al. Gly111Ser mutation in CD8A gene causing CD8 immunodeficiency is found in Spanish Gypsies

- [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45: 479-484.
- [5] 祁胜宾, 双剑博, 卢晓昭, 等. GDDR 基因启动子的克隆和报告基因载体构建[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(2): 229-232.
- [6] MARTHA L B. Computational prediction of transcription factor binding site locations[J]. *Genome Biol*, 2003, 5(1): 201-212.
- [7] 刘永峰, 咎林森, 赵栓平, 等. 牛 *GDF5* 基因启动子的克隆与序列分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(4): 392-397.
- [8] LAGRANGE T, GAU VIN S, MACHE R, et al. S2F, a leaf specific transcription factor, binds to a novel cis-acting element and differentially activates the RPL21 gene [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(8): 1469-1479.
- [9] HANG M H, CHOU C M, HSIEH Y C, et al. Identification of 5'-upstream region of pufferfish ribosomal protein 129 gene a strong constitutive promoter to drive GFP expression in zebrafish[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314: 249-258.
- [10] McCARROLL S A, LI H, BARGMANN C I. Identification of transcriptional regulatory elements in chemosensory receptor genes by probabilistic segmentation[J]. *Current Biol*, 2005, (15): 347-352.
- [11] KOBAYASHI M, YAMAMOTO M. Regulation of GATA1 gene expression[J]. *J Biochem*, 2007, 142(1): 1-10.
- [12] LIU W, ZHANG P, CHEN W, et al. Characterization of two functional NKX2.1 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): 471-481.
- [13] WINSLOW M M, DAYTON T L, VERHAAK R G, et al. Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1[J]. *Nature*, 2011, 473: 101-104.
- [14] 杨莉, 应可净. NKX2-1 与肺组织疾病的关系及研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30(10): 606-609.
- [15] 程璐, 王波. 甲状腺转录因子 NKx2.1 的疾病研究进展[J]. *生命科学*, 2011, (8): 762-765.
- [16] 金呈强, 刘仿. 转录因子 GATA-1 的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2009, 32(01): 47-51.
- [17] 冯洁, 臧国庆, 余永胜. 转录因子 AP-1 在肝病中的作用[J]. *肝脏*, 2007, 12(5): 418-419.
- [18] 张澄, 王萍. 转录因子 CREB 对细胞周期调控机制的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(5): 577-583.
- [19] WEN A Y, SAKAMOTO K M, MILLER L S. The role of the transcription factor CREB in immune function[J]. *J Immunol*, 2010, 185(11): 6413-6419.
- [20] GAO M H, KAVATHAS P B. Functional importance of the cyclic AMP response element-like decamer motif in the CD8 alpha promoter[J]. *J Immunol*, 1993, 150(10): 4376-4385.
- [21] PETERSON M J, MORRIS J F. Human myeloid zinc finger gene MZF produces multiple transcript and encodes a SCAN box protein[J]. *Gene*, 2000, 254(1-2): 105-118.
- [22] PESTANO G A, ZHOU Y L, TRIMBLE L A, et al. Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death [J]. *Science*, 1999, 284(4): 1187-1191.
- [23] HAMERMAN J A, PAGE S T, PULLEN A M. Distinct methylation states of the CD8 beta gene in peripheral T cells and intraepithelial lymphocytes [J]. *J Immunol*, 1997, 159(3): 1240-1246.
- [24] LUO J, YU Y, ZHANG H M, et al. Down-regulation of promoter methylation level of CD4 gene after MDV infection in MD-susceptible chicken line [J]. *BMC Proceed*, 2011, 5: 1751-1756.
- [25] 陈华, 陈宏权, 周倩倩, 等. 猪 THRSP 基因 5' 侧翼区序列转录调控活性的鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(3): 329-334.
- [26] 韩凤桐, 林秀坤, 刘娣, 等. 牛 Sry 启动子调控序列的鉴定[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(14): 18-26.

(编辑 郭云雁)