

牛 *CART* 基因启动子片段重组载体构建

郭跃荣¹, 任静², 李鹏飞^{2*}

(1. 繁峙县现代农业产业集聚区服务中心, 山西 繁峙 034300; 2. 山西农业大学生命科学学院, 山西 太谷 030801)

摘要: [目的] 构建以及鉴定可卡因—苯丙胺调节转录肽 (cocaine-and amphetamine regulated transcript peptides, *CART*) 基因启动子片段双荧光素酶报告载体, 为后续筛选 *CART* 基因核心启动子奠定试验基础。 [方法] 美国国家生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 基因数据库 (登录号: NC_037347.1) 获取牛 *CART* 基因序列, 经聚合酶链式反应 (PCR) 扩增启动子片段, 经双酶切后连接 pGL3-Basic 载体。将 pGL3-1222 载体、pGL3-Control 载体和 pRL-TK 载体转染 293T 细胞, 检测细胞相对荧光活性。 [结果] pGL3-1222 载体测序结果显示与目标序列一致, 证明载体构建成功; 转染 293T 细胞后, 细胞状态良好且绿色荧光分布均匀、强度适中, 则转染操作无误; 检测相对荧光活性显示 pGL3-1222 组相对荧光活性显著高于 pGL3-Basic, 则证明 *CART* 基因启动子片段具有活性。 [结论] *CART* 基因启动子 -1200 bp — +22 bp 区域双荧光素酶载体构建成功。

关键词: *CART*; 启动子; 双荧光素酶报告基因

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2023)03-0040-05

前言

牛属于单胎哺乳动物, 排卵率一直都是限制牛大规模繁殖的重要因素。牛的卵泡发育一般会经历原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、三级卵泡以及成熟卵泡五个阶段^[1]。随着卵泡不断成熟发育, 颗粒细胞会贴于卵泡壁形成颗粒层, 与此同时颗粒细胞在促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 分泌作用下产生雌二醇 (estrogen, E2) 等激素, 形成催乳素受体分泌于细胞膜上^[2]。随着 E2 浓度的升高, 卵泡不断增大并趋于成熟并成功排卵。可卡因—苯丙胺调节转录肽 (cocaine-and amphetamine regulated transcript peptides, *CART*) 一种内源性的神经活性物质, 最早于 1981 年在羊的下丘脑中被发现^[3], 广泛分布于下丘脑中枢神经和外周神经中。课题组前期研究发现, FSH 浓度一定的条件下, *CART* 浓度的增加则 E2 的分泌会减少, 由此证明 *CART* 能够抑制 E2 的分泌, 从而抑制卵巢卵泡颗粒细胞的增殖^[4]。研究表明, *CART* 基因通过转录翻译等一系列调控, 在下丘脑神经元内合成无活性的 *CART* 前体, 再通过转录后加工, 成熟的 *CART* 肽分泌到细胞外, 沿着

下丘脑—垂体—卵巢轴, 抑制 E2 的分泌, 从而抑制牛卵泡颗粒细胞进行负调控^[5]。在整个基因的表达过程中, 转录的起始是最重要的阶段。启动子上核心启动子、上游元件、起始子和应答元件与转录因子相互识别, 发挥着重要的转录调控作用。因此, 筛选 *CART* 基因启动子活性片段是探究牛下丘脑 *CART* 转录调控分子机制的第一步。

本试验通过将牛 *CART* 基因启动子 -1200 bp — +22 bp 片段与 pGL3 系列荧光素酶表达载体连接, 构建双荧光素酶重组质粒并转染 293T 细胞, 鉴定目的片段启动子活性, 本试验将为后续筛选牛 *CART* 基因核心启动子构建重组载体创造试验基础, 进而为后续探究牛下丘脑 *CART* 基因转录调控分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试验所需 HEK-293T 细胞株由山西农业大学生命科学学院提供; 美国 Promega 公司购置 pGL3 系列荧光素酶表达载体及内参 pRL-TK 载体; 美国 Gibco 公司购得 RPMI-1640 培养基、DMEM 培养

收稿日期: 2023-05-17 修回日期: 2023-06-29

基金项目: 山西省应用基础研究计划面上项目 (20210302123380); 山西农业大学校地合作项目 (2021HX23, 2022HX010); 山西省现代农业产业技术体系建设专项

作者简介: 郭跃荣 (1988—), 男, 本科学历, 主要从事农业农村工作。

* 通讯作者: 李鹏飞 (1978—), 男, 博士, 教授, 主要从事动物生殖生理方面的研究。

基、链霉素与青霉素;胎牛血清(FBS)购自美国 ScienceCell 公司;1PBS 缓冲液、胰蛋白酶购自北京索莱宝公司;双荧光素酶报告基因试剂盒购自上海碧云天公司;TransIntro™ EL 购自北京全式金公司;限制性内切酶 Mlu I、Xho I 购自日本 Takara 公司;DH5 α 感受态细胞购自北京康为世纪;E. Z. N. A Endo-Free Plasmid DNA Mini Kit II 试剂盒购自美国 Omega 公司。另外,试验过程中用到数显恒温水浴锅、二氧化碳培养箱、PCR 仪、细胞计数仪以及 Glo-Max Multi 酶标仪等仪器。

1.2 试验方法

1.2.1 PCR 扩增 *CART* 基因启动子片段 根据检索美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)基因数据库(登录号:NC_037347.1)获得牛 *CART* 基因可能的启动子及转录调控区域序列 -1200 bp — +22 bp 区域。借助 Primer premier 5.0 软件,设计扩增引物并扩增目的片段。

1.2.2 双荧光素酶载体构建 目的片段在 5' 端和 3' 端分别加入 Mlu I、Xho I 酶切位点并对 pGL3 - Basic 质粒进行双酶切,将目的片段与载体连接。酶切反应体系如下:10 \times H Buffer 添加 5 μ L, Mlu I 限制酶、Xho I 限制酶各 1 μ L, DNA 5 μ L, ddH₂O 38 μ L。得到混合体系置于 37 $^{\circ}$ C 下反应 2 h,取反应液进行琼脂糖凝胶电泳,回收酶切产物。将酶切产物与质粒连接获得重组质粒命名为 pGL3 - 1222。

1.2.3 转化 DH5 α 感受态细胞 按照每 1 mL 培养基添加 1 μ L 比例向 LB 培养基中加入卡那霉素溶液,充分摇匀后制作 LB 固体培养基,室温下冷凝备用。LB 培养基表面均匀涂抹 X - gal 和 IPTG 诱导剂,于 37 $^{\circ}$ C 放置 3 h。解冻 50 μ L DH5 α 感受态细胞,添加 5 μ L 重组产物后在冰上静置 30 min,后 42 $^{\circ}$ C 水浴 30 s,再冰上静置 3 min。加入无氨苄溶液的 LB 液体培养基,置于恒温摇床培养 45 min。取细胞液涂布,玻璃棒涂布于 LB 固体培养基,放置于恒温培养箱 37 $^{\circ}$ C 30 min 后倒置培养 10 h。

1.2.4 蓝白斑筛选与质粒抽提 观察平板菌落,选取蓝白斑落中多个单一白色菌落置于装有培养基的离心管中,置于恒温摇床振荡过夜。取 200 μ L 菌液送至上海生物工程有限公司测序,剩余菌液妥善保存。本试验使用 E. Z. N. A. Endo-Free Plasmid DNA Mini Kit II 试剂盒进行质粒抽提。将菌液在室温下离心后去除上清液,加入 RNase A 的 Solution I 吹打重悬。再加入 Solution II 轻轻混匀并在室温下孵育 5 min。再加入预冷后的 N3,反复颠倒直到液体浑浊,在室温下离心,转移上清液至 RNase-Free EP 管

中加入 0.1 倍体积的 ETR,颠倒混匀后于冰上静置 10 min,然后 42 $^{\circ}$ C 水浴孵育 6 min。离心后收集上清液加入无水乙醇后充分振荡,室温孵育 2 min。将所得溶液转移至吸附柱中,加入 500 μ L HBC Buffer,室温下离心后弃去液体,再加入 600 μ L DNA Wash Buffer 离心并重复步骤,在超净台开盖静置后转移至新的 EP 管中,加入 80 μ L Elution Buffer,室温静置 2 min 后离心,所得溶液为纯化后的重组质粒。

1.2.5 293T 细胞培养与质粒转染 复苏实验室冻存的 293T 细胞,用 PBS 轻柔清洗细胞两次后将胰酶加入培养基,在 37 $^{\circ}$ C 下消化 3 min,加入完全培养液终止胰酶消化,转移细胞悬液至离心管中,离心 6 min 弃上清液,再次加入完全培养基,用血细胞计数仪进行计数,以 2.5×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板,继续加入完全培养基后放置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 的培养箱中培养。

DMEM 培养基加入离心管中,加入质粒后轻轻混匀,室温孵育 5 min,另取离心管中加入 DMEM 培养基和 TransIntro™ EL 转染试剂比例为 20:1,后轻柔混匀,室温孵育 5 min 后将试剂加入到 pGL3 - 1222 载体、pGL3 - Control 载体和 pRL - TK 海肾荧光素酶报告基因载体中。待 24 孔板内细胞密度达到 70% ~ 80% 时,吸取 24 孔板中培养液加入 PBS 轻柔洗两次,每孔加入 RPMI - 1640 培养基,将转染混合物加入孔板中。将其置于培养箱中 5 h 后吸出转染液后加入完全培养基继续培养,细胞转染 48 h 后用 PBS 清洗两次再加入完全培养基,在荧光显微镜下观察细胞状态。

1.2.6 荧光素酶报告基因活性检测 转染细胞加入报告基因细胞裂解液,裂解 30 min;离心去沉淀,收集裂解液离心后去沉淀,转移上清液于黑色酶标板中,在添加萤火虫荧光素酶检测液,在 560 nm 波长下检测荧光活性,再加酶标板板中加入海肾荧光素酶检测液,在 465 nm 波长检测荧光活性。计算两次测定的比值,利用 GraphPad Prism 9.0 软件处理试验数据并作图。

2 结果与分析

2.1 pGL3 - 1222 重组质粒测序结果

截取 *CART* 基因启动子片段 -1200 bp — +22 bp 区域,构建 *CART* 启动子 1222 bp 大小目的片段,利用 Mlu I、Xho I 双酶切割 pGL3 系列载体,连接于质粒 pGL3 - Basic 多克隆位点,然后转化 DH5 α 感受态细胞,构建重组荧光素酶报告基因质粒,测序结果如图 1 所示,测序结果显示序列与目标序列一致,

表明重组载体构建成功。

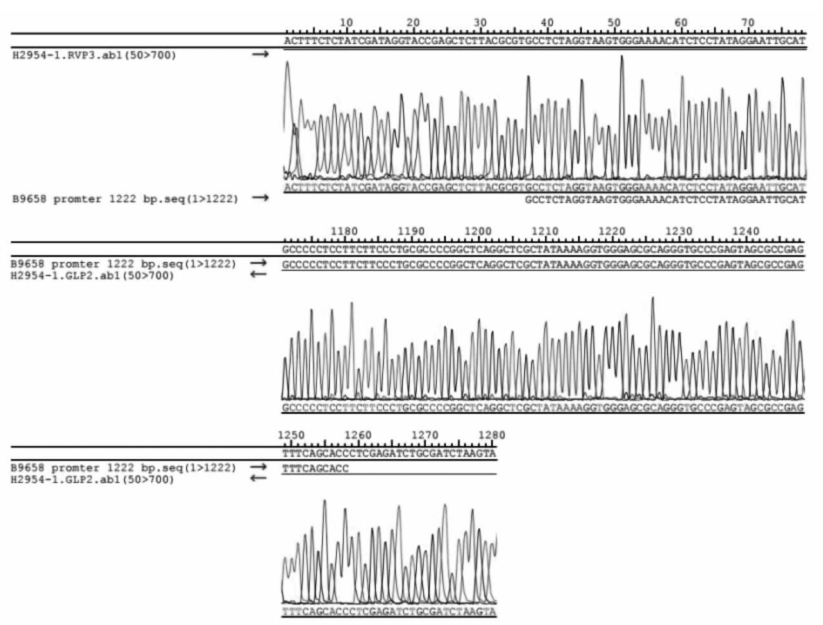


图 1 pGL3 - 1222 重组质粒部分测序图谱

2.2 293T 细胞转染效果检测

复苏实验室冻存的 293T 细胞, 细胞状态良好, 生长速度快且贴壁牢固。将细胞培养至密度达 70% ~ 80% 时, 如图 2a 所示, 进行细胞转染, pGL3

系列质粒和 pRL - TK 质粒转染 293T 细胞 48 h 后, 观察细胞如图 2b, 绿色荧光蛋白广泛分布于细胞中, 且荧光强度适中, 表明转染试剂和转染操作无误。

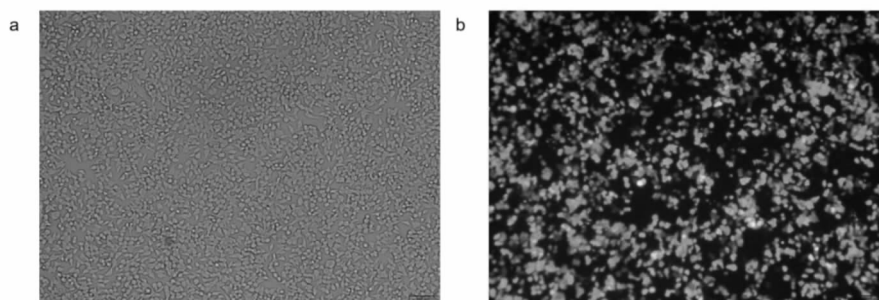


图 2 293T 细胞转染效果 (10 ×)

2.3 牛 *CART* 基因启动子片段相对荧光活性

构建牛 *CART* 基因启动子 - 1200 bp — + 22 bp 片段双荧光素报告载体, 成功转染 293T 细胞, 经过 48 h 后双荧光素酶报告基因系统检测 *CART* 基因启动子片段相对荧光活性, 结果如图 3 显示, 相对与 pGL3 - Basic 组与 pGL3 - 1222 组, pGL3 - Control 相对荧光活性极显著升高, 表明成功转染 293T 细胞, 并且 pGL3 系列质粒的双荧光素酶表达无异常。pGL3 - 1222 组相对荧光活性显著高于 pGL3 - Basic, 表明在牛 *CART* 基因启动子 - 1200 bp — + 22 bp 区域内具有转录活性。试验证明 *CART* 基因启动子片段双荧光素酶重组载体构建成功。

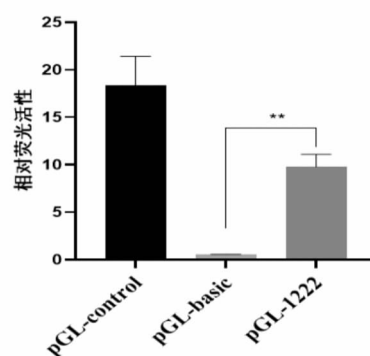


图 3 牛 *CART* 基因启动子片段相对荧光活性检测

3 讨论

在牛的发情周期中, 往往会出现 2 ~ 3 个卵泡

波^[6],促卵泡素同时也会出现相应的峰值。而在卵泡波前,伴随着促卵泡激素少量上升的现象,如果此时抑制促卵泡激素分泌会导致卵泡波被抑制^[7]。促卵泡激素还会调控卵泡的生长,在一定范围内,促卵泡激素浓度的升高促使卵泡募集,增加排卵数量。募集到的卵泡中通常只有一个可以持续生长被称为优势卵泡,其余卵泡将发生凋亡闭锁,其中优势卵泡分泌雌二醇的能力会更强^[8],并且优势卵泡对促卵泡激素的反应更加敏感^[9]。*CART*作为一种下丘脑分泌的内源性神经肽,*CART*肽成熟后沿着丘脑-垂体-卵巢轴调控卵巢中雌激素的分泌,从而影响牛卵泡颗粒细胞增殖^[10]。首次证实 *CART* 在哺乳动物繁殖机能中的功能是由美国密歇根州立大学在牛卵巢中发现的。李玲玉等^[11]人证明水牛卵泡颗粒细胞中,外源的 *CART* 会抑制促卵泡激素,从而会影响颗粒细胞中雌二醇的合成与分泌。课题组前期采集牛优势卵泡与从属卵泡,通过转录组、发蛋白组测序发现 *CART* 对牛卵泡发育有明显负调控作用,进而引起牛卵泡闭锁^[12]。经过后续试验证实 *CART* 通过抑制雌二醇分泌进而调控卵泡颗粒细胞发育,导致卵泡闭锁。

在基因的表达过程中,转录是最核心的步骤。在整个转录过程中,RNA聚合酶识别启动子序列与启动子和模板特异性结合,随后进行延伸,直至转录终止位点,转录停止。而启动子是转录起始的重要调控元件。启动子是结构基因5'端上游,与RNA聚合酶特异性识别的序列通常与转录因子相结合从而调控基因转录。而 *CART* 研究主要集在加工、定位以及功能研究中,目前其转录调节分子机制研究已经取得部分进展^[13]。人、大鼠和小鼠的 *CART* 基因启动子已经分离出来,根据序列推测其相关转录调节转录因子与信号通路关系,进一步探究其转录调控机制。Dominguez等^[14]通过生信预测分析小鼠 *CART* 基因启动子区存在 TATA 盒、STAT、cAMP 反应元件、AP1、AP2、SP1、E 盒等调控元件。Li等^[15]研究发现,*CART* 启动子区域包含神经元限制性沉默元件、神经元限制性沉默因子,通过转录调控元件对 *CART* 基因进行转录调控作用。

牛 *CART* 基因转录调控机制还未得到深入研究,因此,筛选牛 *CART* 基因启动子活性片段是探究其基因表达调控的第一步。张静等^[13]研究 *CART* 基因内含子调控元件对 *CART* 基因转录调控作用,构建荧光素酶报告载体 pGL3 - Basic - *CART*32 观察荧光素酶活性变化,证明内含子调控元件活性区域。陈伟等^[16]人构建关岭牛解偶联蛋白3(uncoupling protein 3, UCP3)和肌球蛋白重链1(myosin

heavy chain 1, MYH1)基因启动子双荧光素酶重组载体转染小鼠 C2C12 和 3T3 - L1 细胞筛选其核心启动子。本试验通过截取 *CART* 基因启动子片段,构建双荧光素酶重组载体转染 293T 细胞,探究其启动子片段活性具有可行性。

4 结论

本试验构建了 *CART* 基因启动子 - 1200 bp + 22 bp 片段双荧光素酶重组质粒,并成功转染 293T 细胞,试验结果显示,牛 *CART* 基因启动子区域具有显著活性,表明 pGL3 - 1222 报告基因载体构建成功。本文将为后续筛选牛 *CART* 基因启动子活性片段提供试验基础。

参考文献:

- [1] KANITZ W, BRUSSOW K P, BECKER F, et al. Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation in cattle and pigs[J]. *Archiv Fur Tierzucht*, 2001, 44(1): 9-23.
- [2] BEN-JONATHAN N, HNASKO R. Dopamine as a prolactin(PRL) inhibitor[J]. *Endocr Rev*. 2001, 22(6): 724-763.
- [3] SPIESS J, VILLARREAL J, VALE W. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(7): 1982-1988.
- [4] LI P, MENG J, JING J, et al. Study on the relationship between expression patterns of cocaine- and amphetamine regulated transcript and hormones secretion in porcine ovarian follicles[J]. *Biol. Res.*, 2018, 51(1): 1-9.
- [5] SMITH G W, SEN A, FOLGER J K, et al. Putative role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CARTPT) in dominant follicle selection in cattle[J]. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 2010, 67: 105-117.
- [6] BELLMANN A. FOLLIKELDYNAMIK and korrespondierende Hormonkonzentrationen beim Rind unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten in Depotformulierung (Decapeptyl Depot) [Elektronische Ressource][J]. *Univ Leipzig*. 2004.
- [7] GINTHER O J, KNOFF L, KASTELIC J P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves[J]. *J Reprod Fertil*. 1989, 87(1): 223-230.
- [8] EVANS AC, FORTUNE JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors[J]. *Endocrinology*. 1997, 138(7): 2963-2971.
- [9] MIHM M, CROWE MA, KNIGHT PG, et al. Follicle wave growth in cattle[J]. *Reprod Domest Anim*. 2002, 37(4): 191-200.
- [10] SMITH G W, SEN A, FOLGER J K, et al. Putative role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CARTPT) in dominant follicle selection in cattle[J]. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 2010, 67: 105-117.
- [11] 李玲玉, 郑海英, 于农淇, 等. *CART* 对 FSH 诱导下水牛颗粒细胞雌二醇分泌及相关基因表达的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(9): 2876-2883.

- [12] HAO Q, ZHU Z, XU D, et al. Proteomic characterization of bovine granulosa cells in dominant and subordinate follicles [J]. *Hereditas*, 2019, 156(1): 1-9.
- [13] 张静, 王思涵, 杨印祥, 等. 内含子序列对 *CART* 基因转录调控作用的初步研究 [J]. *军事医学*, 2011, 35(04): 272-277.
- [14] DOMINGUEZ G. The *CART* gene: structure and regulation [J]. *Pep-tides*, 2006, 27(8): 1913-1918.
- [15] LI Y, LIU Q, YANG Y, et al. Regulatory role of neuron-restrictive silencing factor in the specific expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript gene [J]. *J Neurochem*. 2008, 106(3): 1314-1324.
- [16] 陈伟, 许厚强, 陈祥, 等. 牛 UCP3 和 MYH1 基因启动子在 C2C12 和 3T3-L1 细胞中的启动活性分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(12): 3825-3832.

Construction of Recombinant Vector for the Promoter Fragment of Bovine *CART* Gene

GUO Yue-rong¹, REN Jing², LI Peng-fei^{2*}

(1. Service Center of Modern Agricultural Industry Cluster Zone in Fanshi County, Xinzhou City, Fanshi, Shanxi 034300, China;

2. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: The double luciferase reporter vector to identify the promoters of the cocaine and amphetamine regulated transcript peptides (*CART*) gene was constructed, which would lay the experimental foundation for the subsequent screening of the core promoter of *CART* gene. The bovine *CART* gene sequence was obtained from the national center for biotechnology information (NCBI) Gene Database (Accession No.: NC_037347.1), and the promoter fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR). After double enzyme digestion, the pGL3—Basic vector was ligated. The pGL3—1222 vector, pGL3—Control vector and pRL—TK vector were transfected into 293T cells, and the relative fluorescence activity of the cells was detected. The sequencing results of pGL3—1222 vector were consistent with the target sequence, indicating the successful construction of the vector. After transfection, the 293T cells were in good condition with uniform green fluorescence distribution and moderate intensity, indicating that the transfection operation was correct. The relative fluorescence activity of pGL3—1222 group was significantly higher than that of pGL3—Basic, which proved that the *CART* gene promoter fragment was active. The dual luciferase vector in the -1200 bp — +22 bp region of *CART* gene promoter was successfully constructed. This experiment will create experimental conditions for screening the core promoter of *CART* gene in the future.

Key words: *CART*; promoter; dual luciferase reporter gene

(上接第 39 页)

Effect of Different Food Attractants on Feeding Preference of Dual – purpose Calves

LUO Dong¹, PAN Hao¹, HUANG Zong-chang¹, GONG Fei-fei^{1*}

(1. Xinjiang Tiankang Feed Limited Company, Wujiaqu, Xinjiang 831300)

Abstract: For dual – purpose calves, being able to consume calf feed earlier and increasing feed intakes is the key means to achieve early weaning and increase daily weight gain. In this experiment, three kinds of commonly used pellet feed additives for calves (S1 0.03% milk flavor attractant; S2 0.015% saccharin sodium; S3 0.3% coated sodium butyrate) were selected to evaluate the feeding effect, and best bait effect product would be popularized in the production of pellet feed for calves. The result showed that the feeding effects of the three different attractants on dual – purpose calves were as follows: 0.03% milk flavored food attractant > 0.015% saccharin sodium > 0.3% coated sodium butyrate.

Key words: dual-purpose calves; calf feed; food attractant; feed intake