

杂色鲍 *HSP90* 基因启动子的功能分析

张涛¹, 张子平², 贾锡伟¹, 王淑红¹, 王国栋¹, 王艺磊^{1*}

(1. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 为探索启动子在热休克蛋白90表达调控中的作用, 本研究在课题组已有杂色鲍 *HSP90* 基因cDNA的基础上, 通过Genome walking、Tail-PCR和常规PCR等技术克隆获得该基因的5'调控区序列。在翻译起始位点(ATG)和第一外显子(长度94 bp)之间有一个809 bp的内含子, 第一外显子之前的5'调控区共2800 bp, 从预测的转录起始位点(A)起, 共2811 bp。在转录起始位点(A)上游-30 bp处存在TATA box。潜在的转录因子结合位点包括ATF、TBP、Sp1、Oct-1、C/EBP α 、NF-1、NF- κ B、GATA-1、Sox-2等。CpG岛预测软件分析其含1个CpG岛, 长度为131 bp。实验构建了8个启动子缺失片段的萤火虫荧光素酶表达载体, 通过瞬时转染293T细胞并进行双荧光素酶报告基因活性检测, 确定杂色鲍 *HSP90* 基因核心启动子区位于-98~83 bp。在-624~-539 bp, Oct-1、C/EBP α 、NF-1这3个转录因子都起到一定的抑制作用。

关键词: 杂色鲍; *HSP90*; 启动子; 瞬时转染; 功能分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)隶属软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、原始腹足目(Archaeogastropoda)、鲍科(Haliotidae)、鲍属(*Haliotis*), 是一种重要的经济养殖贝类。高温、缺氧是夏季鲍大量死亡的主要原因之一, 也是引起各种疾病频繁发生的主要原因^[1]。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)作为细胞中广泛存在的分子伴侣, 可调节多个信号通路, 在细胞的运输、分化、发育过程中起关键作用。它是细胞在应对不良环境刺激下产生的一类蛋白质, 能保护细胞免受损伤, 并有助于细胞恢复其正常结构和机能的重建^[2]。热休克蛋白种类繁多, 广泛存在于真核生物和原核生物中, 以保证蛋白质的正确折叠和易位^[3]。HSPs主要分为4个家族: HSP90家族、HSP70家族、HSP60家族及小分子量smHSP家族^[4]。HSP90作为最重要的热休克蛋白之一, 可以与许多蛋白以

分子伴侣的形式发挥作用, 调节多个信号通路, 在细胞运输、分化、发育过程中起关键作用^[5], 并在肿瘤的发生及发展中起重要作用^[6]。目前, 已被克隆*HSP90*基因的水产无脊椎动物有杂色鲍^[7]、皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)^[8]、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[9]、香港牡蛎(*C. hongkongensis*)^[10]、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)^[11]等, 该基因在各种应激下的表达特征也已被分析, 但其启动子的克隆及调控其转录的研究尚未见报道。启动子是一段RNA聚合酶能够识别、结合并开启基因转录的DNA序列, 通常位于基因上游。在启动子上游核心通常有一些特殊的DNA序列, 即顺式作用元件, 可与转录因子结合从而激活或抑制基因的转录^[12]。启动子作为基因表达调控的重要元件, 研究其功能对于了解生物生长发育、探讨生物适应环境的机制有重要意义。

收稿日期: 2016-03-15 修回日期: 2016-10-16

资助项目: 国家自然科学基金(41176152); 集美大学创新团队基金(2010A001)

通信作者: 王艺磊, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

通过已知的HSP基因序列克隆其5'调控区序列, 并研究其功能特性, 是了解HSP基因转录调控的有效手段^[13]。宫伟娜等^[13]克隆得到植物紫茎泽兰(*Ageratina adenophora*) HSP基因5'调控区序列为864 bp, 其具有HSP启动子特有的热休克元件及其他一些启动子顺式作用元件, 如TATA-box、CAAT-box等。人的HSP90 β 5'上游启动子可以介导较高水平的基础转录, 参与基础转录的元件主要是CAAT、TATA盒及其附近的SP-1位点等GC丰富区^[14]。杂色鲍HSP90(*HdHSP90*) cDNA全长为2592 bp, 在健康的杂色鲍的消化道和黏液腺中HSP90有最高的mRNA表达量, 高温、缺氧应激下, 其在鳃和血淋巴中的表达量都有显著升高, 显示其参与应激反应的调控^[7], 这为进一步研究HdHSP90基因的转录调控奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

杂色鲍采购于福建厦门大嶝岛, 采集其肌肉组织, 经液氮速冻后于-80 °C冷冻保存。实验所用的人胚胎肾293T细胞株由厦门大学医学院眼科研究所馈赠。感受态细胞DH5 α 由本实验室自制。pGL3-Basic质粒(含萤火虫荧光素酶报告基因)及pRL-TK内参质粒(含海肾荧光素酶报告基因)购自Promega公司, pEGFP-N1由厦门大学医学院眼科研究所馈赠, pEGFP-1质粒载体购自长沙优宝生物科技有限公司。

1.2 实验方法

杂色鲍DNA的提取 根据上海捷锐公司的DNA提取试剂盒的操作说明提取杂色鲍肌肉基因组DNA。

HdHSP90基因启动子的克隆与测序 根据课题组已获得的HdHSP90基因的cDNA序列(Genbank登录号: KC161208), 用Primer 5.0 软件设计反向引物进行启动子的扩增, 参照TaKaRa公司Gemome Walker Kit试剂盒的操作, 经过三轮巢式PCR反应, 每次都能获得不同长度的片段, 将目的片段割胶回收, 与载体pMD19-T连接后再进行转化培养, 阳性重组质粒送至上海生工生物工程有限公司测序。如此经过多次的片段扩增、测序及验证, 得到该基因的启动子区。

生物信息学分析

通过在线软件BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)和Alibaba2 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>)等预测可能的核心启动子区域和潜在的转录因子结合位点。利用在线分析软件Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>)预测CpG岛。

HdHSP90基因启动子不同缺失片段的扩增

根据生物信息学的分析结果, 设计7个不同上游引物以及2个下游引物(表1)。所设计的引物位置尽量避免中断潜在的顺式作用元件, 上、下游引物分别添加Kpn I 和Xho I 酶切位点和保护碱基。以杂色鲍DNA为模板, 以90-1为上游引物, 90-r为下游引物(位于预测的核心启动子区下游), 扩增出最长的启动子片段, 连接到pMD19-T载体上, 经测序正确后, 以此为模板, 通过PCR扩增不同长度HdHSP90基因启动子片段, 并连接到pMD19-T载体上, 转化进行测序, 验证其正确后进行后续实验。

表 1 HdHSP90基因启动子缺失片段引物序列

Tab. 1 The sequence of primers for constructing the vector of HdHSP90 gene promoter

引物 primer	引物序列(5'→3') primer sequence	扩增长度/bp amplified length
90-1	CGGGGT <u>ACC</u> ACCGCCCACT	1772
90-2	AGTCTCACAA CGGGGT <u>ACC</u> ACGATTTC	1241
90-3	CGGGGT <u>ACC</u> CAACAATCGT	1106
90-4	GGTGTATTCTTCG CGGGGT <u>ACC</u> GCTTGATTTT	947
90-5	AGGAGACACAAACG CGGGGT <u>ACC</u> TGTTACTTC	707
90-6	AATGGCACCG CGGGGT <u>ACC</u> CAACATCTTG	622
90-7	AAGATTGCGTAA CGGGGT <u>ACC</u> AGAACCCGGC	211
90-r	TACCCAACTA CCGCTCGAGCTTTACTTAA	
90-r1	TTCAGTGGTGTG CCGCTCGAGCGTCACGATT	
	TAGTTGGGTAG	

注: 下划线为酶切位点, 下同

Notes: restriction enzyme cutting sites are underlined, the same below

缺失表达载体的构建 将含目的片段的重组T载质粒和pGL3-Basic质粒经Kpn I和Xho I两种内切酶同时37 °C酶切后, 分别割胶并纯化目的片段和pGL3-basic质粒载体, 并将不同缺失目的片段分别与纯化后的pGL3-Basic质粒连接, 16 °C连接过夜。连接产物转化至感受态DH5 α 中, 将阳性单克隆进行测序。验证后用无内毒素质粒

提取试剂盒(Omega公司)提取质粒用以转染。

转基因质粒pEGFP-90-1的构建 具体步骤同“启动子区缺失表达载体的构建”,但是转基因质粒载体为pEGFP-1,该质粒载体没有启动子区。目的片段上下游引物序列与90-1和90-r相同,但是其5'端添加的酶切位点正好相反,分别

为*Xho* I和*Kpn* I(表2)。含目的片段的质粒和转基因质粒pEGFP-1经双酶切后,回收目的片段和酶切后质粒载体按一定的比例进行连接。连接产物转化至感受态DH5 α 中,经筛选测序后,提取质粒备用。

转录因子结合位点的突变 在不同长度缺

表2 引物及其酶切位点

Tab. 2 Primer and restriction enzyme cutting sites

质粒 plasmid	正向引物(5'→3') forward primer	反向引物(5'→3') reverse primer
pEGFP-90-1	CCGCTCGAGACCGCCCACTAGTCTCACAA (<i>Xho</i> I)	CGGGGTACCCTTTACTTAATTCAGTGGTGTG (<i>Kpn</i> I)

失片段活性分析的基础上,发现缺失片段pGL-90-6r和pGL-90-5r之间活性存在显著性差异,这2个片段之间存在预测转录因子Oct-1(AATTCATGCA)、C/EBP α (TGCAATCAAACA)和NF-1(ACACTGCCAA),将这3个转录因子结合位点分别突变为(AATGGATGCA)、(TGCAAAGAAACA)和(ACACTCGCAA)(下划线表示突变位点),其中上游引物分别为Oct-1-F: ACCGATGGGCAATGGATGCAATCAAACACTGCCA, C/EBP-F: ACCGATGGGCAATTCATGCAAAGAAACACTGCCA, NF-1-F: ACCGATGGGCAATTCATGCAATCAAACACTCGCA,下游引物为90-r。

细胞培养及瞬时转染 293T细胞所用的培养基为DMEM高糖培养基,加入10%FBS和1%的青霉素—链霉素双抗溶液,于37℃,5% CO₂培养箱培养。转染前的24 h将生长至覆盖率达到70%~90%的细胞用胰酶消化,按每孔1×10⁵细胞/mL的密度接种到48孔培养板上,待细胞完全贴壁且细胞密度达到80%左右时进行转染实验。转染试剂参照Lipofectamine[®]2000的说明书(Invitrogen公司)进行转染,设置空载体pGL3-Basic质粒作为阴性对照,可用显微镜观察到荧光的pEGFP-N1质粒作为阳性对照,其中对照组质粒、目的质粒和pRL-TK内参质粒(含海肾荧光素酶报告载体)以比例为20:1共转染到细胞中。转染24 h后如果能从显微镜下观察到转染质粒pEGFP-N1的细胞发绿色荧光,则说明本次转染成功,可以进行双荧光素酶活性的测定。整个实验重复3次,其中每个样品重复3次。

双荧光素酶报告基因活性的检测 按双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书配置所需试剂,待转染24 h后吸出旧的培养基,加入1×PBS清洗1~2次,吸出PBS后每孔加入60 μ L配制的

PLB裂解液,室温将细胞板用微型振荡器振荡15~20 min,收集细胞裂解液。离心后取上清液15 μ L,用管式发光仪检测活性,按顺序分别加入Luciferase Assay Reagent II (LAR II) 50 μ L、Stop&GloTM试剂50 μ L,分别读出萤火虫荧光素酶活性及内参质粒海肾荧光素酶活性数值,各质粒的相对活性需经内参海肾荧光素酶活性校正,二者比值为该质粒的荧光素酶相对活性值。

2 结果

2.1 杂色鲍HSP90基因5'调控区的克隆

通过Genome walking、Tail-PCR和常规PCR等技术克隆获得了杂色鲍HSP90基因的5'调控区序列。在翻译起始位点(ATG)和第一外显子(长度94 bp)之间有一个809 bp的内含子,第一外显子之前的5'调控区共2800 bp,从预测的转录起始位点(A)起,共2811 bp (GenBank登录号: KU836934)。

2.2 克隆片段的生物信息学分析

通过在线软件BDGP预测分析发现一处得分最高(score=1.00)的区域很可能是杂色鲍HSP90基因5'调控区的转录起始位点(A)所在的区域,其上游-30 bp处存在TATA-box。Alibaba2分析潜在的转录因子结合位点包括ATF、NF-1、TBP、Sp1、Oct-1、C/EBP α 、NF- κ B、GATA-1、Sox-2等。CpG岛预测软件分析(GC Percent>50.0, Obs./Exp.>0.6, length>100 bp),发现1个CpG岛,长度为131 bp,位于-110~21 bp处(图1)。

2.3 杂色鲍HSP90基因不同长度缺失片段的扩增

以90-1为上游引物,90-r为下游引物,扩增出最长启动子片段后提取质粒,将其命名为90-

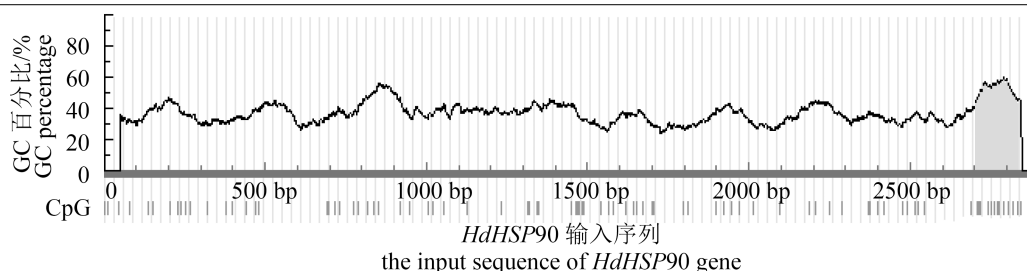


图 1 *HdHSP90* 基因 5' 调控区预测的 CpG 岛

预测时输入序列是从 5' 到 3' 端, 横坐标下的竖条纹表示 CpG 双核苷酸的位置, 阴影部分即为预测的 CpG 岛

Fig. 1 The predicted CpG island of 5' flanking region in *HdHSP90* gene

The input sequence is from 5' to 3', the vertical stripes under it represent the sites of CpG double nucleotides, the shadow is the predicted CpG island

1r (1772 bp) 作为之后不同缺失启动子片段扩增的模板。分别扩增得到质粒 90-2r (1241 bp)、90-3r (1106 bp)、90-4r (947 bp)、90-5r (707 bp)、90-6r (622 bp)、90-7r (211 bp)。

2.4 重组质粒 pGL3-Basic-*HSP90-luc* 的构建及鉴定

将用无内毒素质粒提取试剂盒提取的重组质粒分别命名为 pGL-90-1r、pGL-90-2r、pGL-90-3r、pGL-90-4r、pGL-90-5r、pGL-90-6r、pGL-90-7r。将重组质粒送测鉴定, 并将所提质粒进行双酶切鉴定, 电泳结果与预测条带大小一致 (图 2)。

2.5 核心启动子区的确定

将质粒 90-1r 作为模板, 以 90-1 为上游引物, 90-r1 为下游引物 (位于预测的核心启动子区上游), 扩增得到质粒 90-1r1, 并构建重组质粒 pGL-90-1r1。将 pGL3-Basic、重组质粒 pGL-90-1r 和 pGL-90-1r1 分别与 pRL-TK 共转染 HEK293T 细胞, 单因素方差分析显示, 与 pGL-90-1r 相比,



图 2 重组质粒 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切电泳图

Vector: pGL-Basic

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids double-digested by *Kpn* I and *Xho* I

Vector: the served empty carrier of pGL-Basic; M. Marker; 1. pGL-90-1r; 2. pGL-90-2r; 3. pGL-90-3r; 4. pGL-90-4r; 5. pGL-90-5r; 6. pGL-90-6r; 7. pGL-90-7r

pGL-90-1r1 的相对荧光素酶活性出现极显著下降 ($P < 0.01$)。pGL-90-1r1 启动子片段比 pGL-90-1r 启动子片段少了 -98~83 bp 区域, 其相对荧光活性出现极显著下降, 初步确定 *HdHSP90* 基因核心启动子位于 -98~83 bp (图 3)。

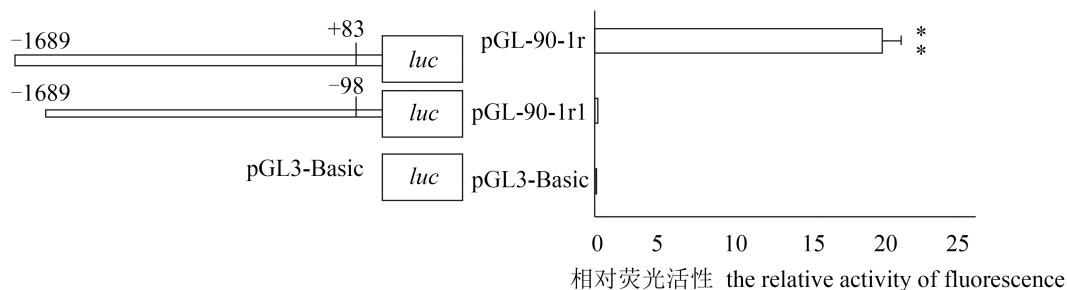


图 3 *HdHSP90* 基因包含和去除预测的核心启动子区的质粒的相对活性

**. 该质粒与其他质粒相比, 其相对活性存在极显著差异

Fig. 3 The relative luciferase promoter activity of the various deletion constructs and the promoter-less construct of the *HdHSP90* gene promoter

**. extremely significant difference at relative luciferase values between the plasmid and other plasmids

2.6 转基因质粒pEGFP-90-1的表达情况

质粒pEGFP-N1和pEGFP-1分别转染细胞后,经过24 h的培养,前者可以从显微镜下观察到荧光,而后者观察不到荧光是由于缺失了启动子部分,GFP无法在细胞中表达。而本实验将扩增的启动子片段连接到质粒pEGFP-1上,通过观察荧光的有无来判断扩增片段启动活性的有无。为了验证获得的较长片段中的启动子活性,将构建的质粒pEGFP-90-1转染HEK293T细胞,分别设置阴性对照(pEGFP-1)和阳性对照(pEGFP-N1)。结果显示pEGFP-90-1能在HEK293T细胞系中驱动EGFP蛋白的表达,但是其表达量低于阳性对照(图4)。

2.7 杂色鲍HSP90基因不同长度缺失片段活性

用上述构建的7个不同长度缺失片段重组质粒和pGL3-Basic载体质粒分别与pRL-TK共转染HEK293T细胞,pGL3-Basic质粒作为阴性对照。

在所有的缺失片段的启动子中,活性都比较高,没有明显降低的启动子缺失片段,但缺失片段pGL-90-6r相比其他缺失片段活性最高,与缺失片段pGL-90-5r的活性有显著性差异($P<0.05$)(图5)。

2.8 转录因子结合位点的突变

将缺失片段pGL-90-5r和pGL-90-6r之间仅有的3个转录因子Oct-1、C/EBPalpha、NF-1都进行突变,由于这3个转录因子结合位点有互相重叠的部分,也有各自独立的部分,所以突变时,仅突变其各自独立结合的碱基,就不会影响其余2个转录因子的结合位点。突变后的重组质粒分别命名为pGL-mut-oct、pGL-mut-c/ebp、pGL-mut-nf(图6)。

结果发现突变后的3个转录因子结合位点之间没有显著差异,而且都比缺失片段pGL-90-5r活性高,且有显著性差异($P<0.05$),比缺失片段pGL-90-6r活性低,说明Oct-1、C/EBPalpha、

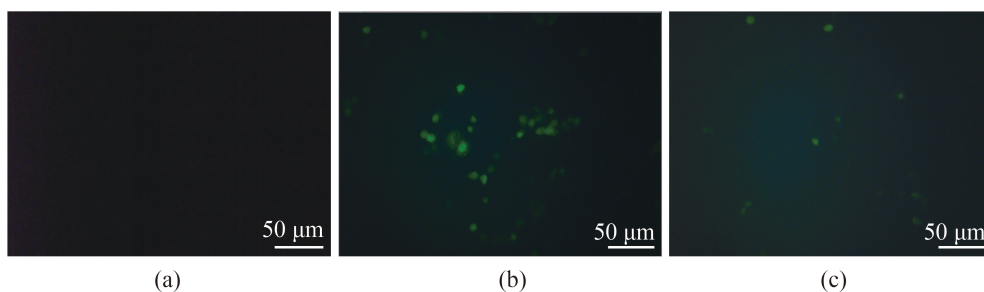


图4 质粒pEGFP-90-1转染HEK293T细胞的表达情况

(a) 阴性对照; (b) 阳性对照; (c) 质粒pEGFP-90-1

Fig. 4 The expression of EGFP in the HEK293T cell transfected with plasmid pEGFP-90-1

(a) negative control; (b) positive control; (c) plasmid pEGFP-90-1

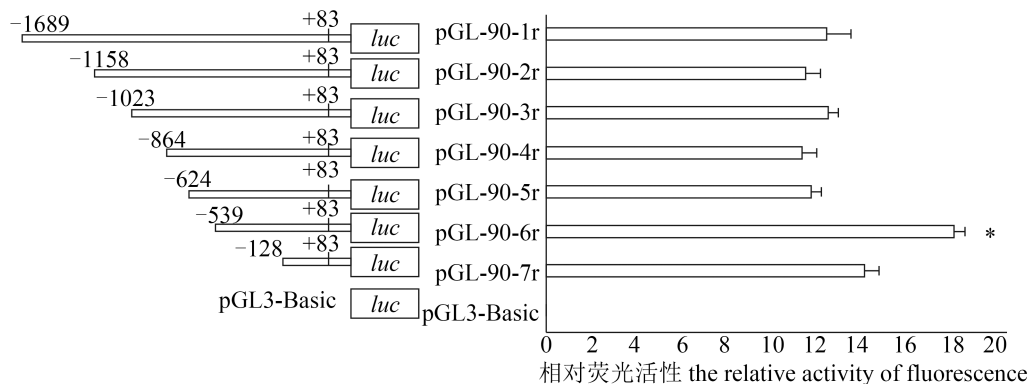


图5 HdHSP90基因不同长度缺失片段的相对活性

*. 该质粒与其他质粒相比,其相对活性存在显著差异

Fig. 5 The relative luciferase activity of the various deletion constructs of the HdHSP90 gene

*. significant difference at relative luciferase values between the plasmid and other plasmids

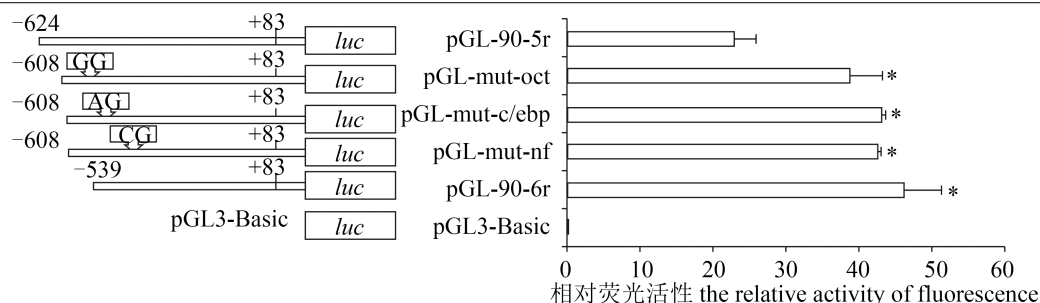


图 6 *HdHSP90* 基因转录因子结合位点突变质粒和野生型质粒相对活性

*. 该质粒与 pGL-90-5r 质粒相比, 其相对活性存在显著差异

Fig. 6 The relative luciferase activity analysis of transcription factor binding sites in mutated plasmids and wild plasmids of *HdHSP90* gene

*. significant difference at relative luciferase values between the plasmid and pGL-90-5r

NF-1 这 3 个转录因子都起到一定的抑制作用。

3 讨论

HSP90 在细胞中以分子伴侣的形式, 广泛参与蛋白质的折叠、细胞内的定位以及细胞生长和生存的关键调控蛋白的水解作用^[15]。为了研究作为分子伴侣 *HSP90* 基因的启动子功能, 本实验根据课题组已有的杂色鲍 *HSP90* 基因序列, 克隆得到了 2800 bp 的 5' 调控区序列。pGL-90-1r1 与 pGL-90-1r 相比, 其相对荧光素酶活性出现极显著下降, 提示 -98~83 bp 启动子区为启动子核心序列。CpG 岛常被认为是启动基因表达的标志^[16], *HdHSP90* 基因的 CpG 岛位于 -110~21 bp 处, 与得到的启动子核心序列区相近, 这一结果为进一步研究 *HSP90* 基因表达调控的分子机制奠定了基础。

正常条件下, *HSP90* 与 HSF1 以复合物的形式存在, HSF1 无活性, 但受到胁迫时, *HSP90* 与 HSF1 解离而与变性蛋白结合, 游离的 HSF1 被激活后进入细胞核内, 在核内与热休克蛋白上游启动子区的热休克元件结合, 进一步启动热休克蛋白的表达^[17]。一般认为 *HSP90* 是通过 HSF1 结合到其 5' 调控区的热休克元件 HSE 而发挥应答作用^[18]。本实验 *HdHSP90* 5' 调控区序列有多个 HSE 的结合位点, 这些转录因子结合位点的存在是否对 *HdHSP90* 基因的活性有影响还有待进一步证实。关于 HSF1 对 *HSP90* 基因表达调控的研究现在已经比较清楚, 而 Ammirante 等^[19] 的研究证明 NF- κ B 的活性可以调控 *HSP90* 基因启动子的活性; Stephanou 等^[20] 证明了白细胞介素—6 可以活

化 *HSP90* 启动子, 从而增强 *HSP90* 的表达量。对于杂色鲍 *HSP90* 基因所构建的缺失片段的启动子中, 通过突变转录因子结合位点的实验发现, 在 -624~-539 bp 的 Oct-1、C/EBP α 、NF-1 这 3 个转录因子都起到一定的抑制作用, 但是它们的调控机理尚不明确, 仍需要深入研究。

人的 *HSP90* 基因以是否含有丰富的谷氨酰胺片段可分为 *HSP90 α* 和 *HSP90 β* 两种异构体, 二者同源率为 84%^[21], *HSP90 β* 在 *HSP90* 的特异性分子伴侣作用中可能占主导地位^[19]。将杂色鲍 *HSP90* 基因通过 NCBI 进行序列比对, 结果显示杂色鲍的 *HSP90* 与哺乳动物中的 *HSP90 β* 基因比较接近。第一内含子对 *HSP90 β* 基因的高组成性及热诱导表达至关重要, 人 *HSP90 β* 基因第一内含子介导的热诱导转录主要受 HSF1 的调控^[22], 对杂色鲍 *HSP90* 基因的内含子还有待进一步分析。

参考文献:

- [1] 孙秀秀, 苏友禄, 冯娟, 等. 杂色鲍肌肉萎缩症的组织病理学研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 27(3): 1098-1101. Sun X X, Su Y L, Feng J, et al. Study on histopathology of withering syndrome in *Halotis diversicolor reeve*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 27(3): 1098-1101 (in Chinese).
- [2] 张君岚, 黄善生, 凌亦凌. 不同家族热休克蛋白的生理功能及病理意义[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14(5): 549-552. Zhang J L, Huang S S, Ling Y L. Physiological and pathological significance of different families of heat shock protein[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 1998, 14(5): 549-552 (in Chinese).

- [3] Parsell D A, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins[J]. *Annual Review of Genetics*, 1993, 27(1): 437-496.
- [4] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 1998, 80(2): 183-201.
- [5] McClellan A J, Xia Y, Deutschbauer A M, *et al.* Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches[J]. *Cell*, 2007, 131(1): 121-135.
- [6] 李艳光, 曹富民. HSP90的功能及HSP90抑制剂的进展[J]. *食管外科电子杂志*, 2013, 1(4): 168-172.
- Li Y G, Cao F M. The research progress of the function and inhibitor of HSP90[J]. *Journal of Esophageal Surgery (Electronic Version)*, 2013, 1(4): 168-172 (in Chinese).
- [7] Huang Y T, Cai X H, Zou Z H, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of three heat shock responsive genes from *Halotis diversicolor*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(2): 590-599.
- [8] Zhang W B, Wu C L, Mai K S, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of heat shock protein 90 from Pacific abalone, *Halotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 280-286.
- [9] Choi Y K, Jo P G, Choi C Y. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 147(3): 286-292.
- [10] Fu D K, Chen J H, Zhang Y, *et al.* Cloning and expression of a heat shock protein (HSP) 90 gene in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under osmotic stress and bacterial challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(1): 118-125.
- [11] Li J T, Han J Y, Chen P, *et al.* Cloning of a heat shock protein 90 (HSP90) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 1191-1197.
- [12] 路静, 赵华燕, 何奕昆, 等. 高等植物启动子及其应用研究进展[J]. *自然科学进展*, 2004, 14(8): 856-862.
- Lu J, Zhao H Y, He Y K, *et al.* The research progress of the promoter and its application in higher plant[J]. *Progress in Natural Science*, 2004, 14(8): 856-862(in Chinese).
- [13] 宫伟娜, 万方浩, 谢丙炎, 等. 紫茎泽兰 *hsp90* 和 *hsp17.66* 基因启动子的克隆及其序列分析[J]. *热带亚热带植物学报*, 2009, 17(5): 451-457.
- Gong W N, Wan F H, Xie B Y, *et al.* Cloning and sequence analysis of promoters in *hsp90* and *hsp17.66* genes from *Ageratina adenophora*[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2009, 17(5): 451-457(in Chinese).
- [14] 刘巨洪. 人热休克蛋白90 β (*hsp90 β*)的转录调控[D]. 北京: 中国协和医科大学, 1995.
- Liu J H. The transcriptional control of heat shock protein 90 β (*hsp90 β*) in human[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 1995(in Chinese).
- [15] Richter K, Hendershot L M, Freeman B C. The cellular world according to Hsp90[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2007, 14(2): 90-94.
- [16] 许登高, 周扬, 潘庆杰. 哺乳动物CpG岛甲基化研究进展[J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2012, 29(4): 252-260, 266.
- Xu D G, Zhou Y, Pan Q J. The methylation of CpG island in mammals[J]. *Journal of Qingdao Agricultural University (Nature Science Edition)*, 2012, 29(4): 252-260, 266 (in Chinese).
- [17] Bruce J L, Price B D, Coleman C N, *et al.* Oxidative injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins[J]. *Cancer Research*, 1993, 53(1): 12-15.
- [18] Leach M D, Budge S, Walker L, *et al.* Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(12): e1003069.
- [19] Ammirante M, Rosati A, Gentilella A, *et al.* The activity of *hsp90 α* promoter is regulated by NF- κ B transcription factors[J]. *Oncogene*, 2008, 27(8): 1175-1178.
- [20] Stephanou A, Latchman D S. Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by STAT family transcription factors[J]. *Gene Expression*, 1998, 7(4-6): 311-319.
- [21] 姚元春. HSP90 α 、HSP90 β 蛋白和mRNA在人胃癌组织中的表达及临床意义[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- Yao Y C. Expression and clinical significance of HSP90 α , HSP90 β protein and mRNA in human gastric

- carcinoma tissues[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2013(in Chinese).
- [22] 王晓哲. 第一内含子在人热休克蛋白90 β 基因(hsp90 β)转录调控中的作用机制[D]. 北京:中国协和医科大学, 1998.
- Wang X Z. Transcription regulation mechanism of the first intron in heat shock protein 90 β (hsp90 β) gene in human[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 1998(in Chinese).

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

ZHANG Tao¹, ZHANG Ziping², JIA Xiwei¹, WANG Shuhong¹,
WANG Guodong¹, WANG Yilei^{1*}

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture,
College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Heat shock protein 90 (HSP90), a molecular chaperone in cell, which can regulate multiple signaling pathways, plays a key role in the process of cell differentiation, development and transportation. To explore the role of the promoter in regulating the expression of heat shock protein 90, based on the HSP90 gene cDNA of *Haliotis diversicolor* from our lab, its 5' flanking region was cloned by genome walking and Tail-PCR techniques. Results showed that there is an 809 bp intron between translation initiation site (ATG) and first exon (94 bp). The length of 5' flanking region is 2800 bp before the first exon and 2811 bp before the predicted transcriptional start site (A). A TATA-box was located in the upstream -30 bp of the transcriptional start site (A). Potential transcription factor binding sites include ATF, TBP, Sp1, Oct 1, C/EBPalpha, NF-1, NF-kappaB, GATA-1, and Sox-2, etc. A CpG island was found by the CpG island prediction software, whose length is 131 bp. Eight firefly-luciferase reporter gene vectors with different deletions of *HdHSP90* gene were constructed and transiently transfected into 293T cells, and the activity of dual-luciferase reporter gene was detected. The results showed that the core promoter is located between -98 to 83 bp, and the three transcription factors between -624 to -539 bp, Oct-1, C/EBPalpha, and NF-1, can inhibit the gene transcription.

Key words: *Haliotis diversicolor*; HSP90; promoter; transient transfection; functional analysis

Corresponding author: WANG Yilei. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41176152); Innovation Team of Jimei University (2010A001)