



吴桐, 牛康康, 彭玉玲, 冯启理. 家蚕 *Bmlark* 基因启动子活性及转录调控元件分析 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (3): 704-712.

# 家蚕 *Bmlark* 基因启动子活性及转录调控元件分析

吴桐, 牛康康, 彭玉玲, 冯启理\*

(华南师范大学生命科学学院, 广州市昆虫发育调控与应用研究重点实验室, 广东省昆虫发育生物学与应用技术重点实验室, 广州 510631)

**摘要:** LARK 蛋白是一个参与多个发育途径的重要调控转录因子。为研究家蚕 *Bmlark* 基因启动子活性及其调控蛋白, 本研究克隆了家蚕 *Bmlark* 基因的启动子序列 (-1 232 ~ +211), 构建了该启动子萤光素酶报告质粒, 转染至家蚕 Bm12 细胞中, 进行启动子萤光素酶活性检测。结果表明, *Bmlark* 基因的 -124 ~ -92 bp 和 -220 ~ -124 bp 区域参与了其转录调控。利用 -124 ~ -92 bp 区域的 DNA 片段作为分子探针, 发现该区域可能与蛋白 TAF7, Ets transcription factor, protein abrupt isoform X1 和 forkhead box protein N3 等结合。研究结果为进一步深入研究 *Bmlark* 转录调控的分子机制提供了线索。

**关键词:** *Bmlark* 基因; 启动子; 双萤光素酶报告系统; 结合蛋白

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 03-0704-09

## Activity and transcriptional regulatory elements of the promoter in *Bmlark* gene

WU Tong, NIU Kang-Kang, PENG Yu-Lin, FENG Qi-Li\* (Institute of Insect Science and Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou Key Laboratory of Insect Development Regulation and Application Research, Guangdong Provincial Key Laboratory of Insect Developmental Biology and Applied Technology, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** LARK protein is an important regulatory transcription factor involved in multiple developmental pathways. In order to study the activity of the promoter of the silkworm *Bmlark* gene and its regulatory protein, this study cloned the promoter sequence of the *Bmlark* gene of the silkworm (-1 232 ~ +211) to construct the luciferase reporter plasmid of the promoter and transfected it into the silkworm Bm12 cells. Promoter luciferase activity was tested, and the results showed that the -124 ~ -92 bp and -220 ~ -124 bp regions of the *Bmlark* gene were involved in its transcriptional regulation. Using the DNA fragment of -124 ~ -92 bp region as a molecular probe, it was found that this region may bind to protein TAF7, Ets transcription factor, protein abrupt isoform X1 and forkhead box protein N3. The research results provided clues for further in-depth study of the molecular mechanism of *Bmlark* transcription regulation.

**Key words:** *Bmlark* gene; promoter; dual luciferase reporter system; binding protein

*Lark* 基因最初是从果蝇羽化节律缺失的突变体中鉴定出来的 (Newby *et al.*, 1993), 是果蝇昼

夜节律起搏器输出路径的组成成分 (Zhang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005)。*Lark* 在时间和空间的信

基金项目: 国家自然科学基金 (31720103916, 31930102, 32000337)

作者简介: 吴桐, 女, 硕士研究生, 研究方向为昆虫变态发育, E-mail: 596931098@qq.com

\* 通讯作者 Author for correspondence: 冯启理, 男, 博士, 教授, 主要研究方向为昆虫生长发育的分子机理和昆虫与植物的相互作用, E-mail: qlfeng@sncu.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-03-02; 接受日期 Accepted: 2022-04-14

息传输, 导致行为变化的过程中发挥着重要作用, 如调节神经兴奋性, 这可能与 LARK 靶向调控编码钾离子通道的 mRNA 有关 (Huang *et al.*, 2009), 或者通过调节信号分子如激酶或者磷酸酶从而控制离子通道和兴奋性。LARK 表达水平的节律性变化对于成虫羽化的昼夜节律调节非常重要, 该蛋白质在介导蜕皮的时钟调节中起抑制作用, *lark* 基因产物增加会导致迟羽化表型 (Newby and Jackson, 1996; Gerard *et al.*, 1998; Iwai and Takeda, 2007)。

*Lark* 在母体遗传和胚胎发育过程中发挥着重要的作用。McNeil (1999) 等人发现在果蝇受精卵中 *lark* 开始进行转录之前 (0~2 h), 在前胚层胚胎中即含有丰富的 *lark* mRNA, 暗示了其作为母体遗传信号发挥着作用。在卵巢管发育的卵室中的营养细胞中也可以检测到 *lark* 表达, 缺少 *lark* 母体遗传成分的未受精卵子和受精卵都表现出“脆弱”表型, 大多数胚胎在胚盘形成之前停止进一步发育, 还会导致营养细胞细胞质倾覆和肌动蛋白细胞骨架组织的缺陷 (Mcneil *et al.*, 2009)。在本实验室前期工作中, 在家蚕 *Bombyx mori* 中用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 *Bmlark* 基因后, 纯合子突变体 *Bmlark*<sup>-/-</sup> 的胚胎死亡, 不能正常孵化出蚁蚕。

*lark* 对神经元发育和功能也至关重要。有研究表明, LARK 在整个胚胎中枢神经系统及成虫神经系统细胞中表达 (Newby *et al.*, 1993)。在果蝇的中枢神经系统 (CNS) 和腹神经系统 (VNS) 中检测到 LARK 的存在, 在含有甲壳类动物心脏活性肽 CCAP (Crustacean cardioactive peptide) 的神经元中, LARK 定位于细胞质中 (Huang *et al.*, 2007), 而在其他神经元中定位于细胞核。在其他组织中 LARK 也存在于细胞核和细胞质中, 暗示了 LARK 具有复杂的功能, 可能在 RNA 加工、转运、翻译等过程中起着调控作用 (Kojima *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2014)。

*Bmlark* 作为具有重要生物学功能的基因, 其转录调控机制尚不明确。本研究通过构建 *Bmlark* 基因启动子双萤光素酶报告系统, 鉴定其调控活性区及可能与之结合的调控蛋白, 为进一步研究 *Bmlark* 基因转录调控的分子机制提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

家蚕 Bm12 卵巢细胞株来自中山大学徐卫华教授实验室; 胎牛血清 (FBS) 和 Grace 液体培养基购自美国 Gibco 公司。无血清培养基 Opti-MEM 购自美国 Invitrogen 公司。X-tremeGENE™ HP DNA 转染试剂购自美国 SIGMA 公司。一步法克隆试剂盒 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 购自美国 Vazyme 公司。大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  购自深圳康体生命科技有限公司。dNTP (10 mM)、rTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III 购自 Takara 公司。凝胶 DNA 小量回收试剂盒购自 Magen 公司。质粒提取试剂盒购自天根深化科技有限公司。双萤光素酶报告基因检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司。核蛋白提取试剂盒和 LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit 购自美国 Thermo 公司。DNA 引物合成及基因测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。蛋白质谱分析由广州唯智智合科技有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 家蚕 *Bmlark* 基因启动子序列的 PCR 扩增

在美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库获得包含启动子区域的家蚕 *Bmlark* 基因序列 (-1 232 ~ +211) (GenBank Accession No.: NC\_051360.1)。通过 Primer premier 5.0 软件设计扩增该 DNA 序列的 PCR 引物, 在上、下游引物的 5' 端分别引入与线性化载体两端一致的 16 bp 同源重组序列及 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点序列 (表 1)。以家蚕基因组 DNA 作为 PCR 模板进行目的片段的扩增。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L) 为: 2  $\times$  taq Master 10  $\mu$ L、DNA 模板 2.5  $\mu$ L、上下游引物各 0.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 6.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小正确后, 切胶并用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化, 扩增正确的 PCR 产物命名为 P1 (-1 232 ~ +221)。设计引物对 P1 进行系列截短 PCR 扩增, 得到的目的

PCR 产物依次命名为 P2 ( - 529 ~ + 211)、P3 ( - 220 ~ + 211)、P4 ( - 124 ~ + 211)、P5 ( - 92 ~ + 211)、P6 ( - 66 ~ + 211) 和 P7 ( - 8 ~ + 211)。所有 PCR 产物均经过测序验证其正确性。

表 1 扩增 *Bmlark* 基因启动子区各序列片段的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for amplifying each sequence fragment in the promoter region of *Bmlark* gene

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
<i>Bmlark</i> - F ( - 1 232)	<i>CGCGTGCTAGCCCCGGGCTCGAGTGGAGAATCTTT</i>
<i>Bmlark</i> - F ( - 529)	<i>CGCGTGCTAGCCCCGGGCTCGAGAAATTCATCAAA</i>
<i>Bmlark</i> - F ( - 220)	<i>CGCGTGCTAGCCCCGGGCTCGAGGGTTGGACTGGTTGC</i>
<i>Bmlark</i> - F ( - 124)	<i>CGCGTGCTAGCCCCGGGCTCGAGAATAATGTCGCCA</i>
<i>Bmlark</i> - F ( - 92)	<i>CGCGTGCTAGCCCCGGGCTCGAGATTTTATAGTCTGGT</i>
<i>Bmlark</i> - F ( - 66)	<i>CGCGTGCTAGCCCCGGGCTCGAGTAGGATGTATGAGTG</i>
<i>Bmlark</i> - F ( - 8)	<i>CGCGTGCTAGCCCCGGGCTCGAGGACTTGAACGCCATT</i>
<i>Bmlark</i> - R ( + 211)	<i>ACAGTACCGGAATGCCAAGCTTTAGATTCTGAAACGCATAC</i>

注: 斜体部分表示与线性化载体末端同源的序列, 下划线部分表示酶切位点。Note: Italic part represented the homologous sequence to the linearized plasmid terminal, the underlined part represented the restriction enzyme cutting site.

### 1.2.2 家蚕 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒的构建

用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 对 pGL3-Basic 质粒进行酶切, 并切胶回收纯化。家蚕 *Bmlark* 基因启动子 PCR 产物与线性化的 pGL3-Basic 质粒进行连接反应, 反应条件参照 vazyme ClonExpress<sup>®</sup> II One Step Cloning Kit 说明书。重组产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 然后涂布于氨苄青霉素抗性平板培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑单克隆菌落进行扩增培养, 提取质粒 DNA 进行目的片段的 PCR 鉴定, 将大小正确的 PCR 产物进行测序。测序正确的重组质粒分别命名为 pLP1 ( - 1 232 ~ + 221)、pLP2 ( - 529 ~ + 211)、pLP3 ( - 220 ~ + 211)、pLP4 ( - 124 ~ + 211)、pLP5 ( - 92 ~ + 211)、pLP6 ( - 66 ~ + 211) 和 pLP7 ( - 8 ~ + 211)。

### 1.2.3 细胞培养与转染

用含有 10% 胎牛血清的 Grace 昆虫培养基, 于 27 $^{\circ}$ C ~ 28 $^{\circ}$ C 恒温培养中贴壁培养家蚕 Bm12 细胞。在 24 孔细胞培养板里加入 10<sup>5</sup> mL 的细胞, 培养过夜, 至细胞密度 80% ~ 90% 时, 进行转染。取 0.1  $\mu$ g 各 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒、0.01  $\mu$ g 内参质粒 SV40、转染试剂 0.3  $\mu$ L, 加入 25  $\mu$ L Opti-MEM 培养基中充分混匀, 室温静置 15 ~ 20 min, 然后转染 Bm12 细胞。每组设置 3 个重复, 同时设置 pGL3-Basic 空载体转染组作为阴性对照。

### 1.2.4 启动子活性的萤光素酶测定

萤光素酶活性测定参照上海翊圣生物科技有限公司生产的双萤光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行。上述细胞转染 48 h 后, 每孔加 200  $\mu$ L 裂解液, 4 $^{\circ}$ C 摇床轻微震荡 5 min, 充分裂解细胞, 10 000 rpm 离心 1 min, 取 20  $\mu$ L 上清和 100  $\mu$ L 萤光素酶底物加入 1.5 mL 离心管中混匀, 用 Promega Glo Max 发光检测仪测定萤光素酶活性 M1 后, 加入 100  $\mu$ L 反应终止液, 继续测定海參萤光素酶发光值 M2, M1/M2 的置即为萤光素酶的相对活性 (Relative Luciferase Activity, RLA), 同一转染试验重复 3 次, 取平均值。

### 1.2.5 Bm12 细胞核蛋白提取步骤

贴壁细胞生长密度至 90% ~ 100% 后, 将预冷的 PBS 直接加入到细胞培养瓶中清洗细胞两次, 弃上清。每瓶加入 360  $\mu$ L 胞浆提取缓冲液, 均匀后冰上静置 5 min。用吸头吹打几次后转移到预冷的 1.5 mL 离心管中, 涡旋大力震荡 15 s 后, 4 $^{\circ}$ C 最高速离心 5 min; 弃上清, 用 0.5 mL 预冷 PBS 重悬沉淀, 10 000 rpm 离心 5 min 后弃上清, 每样品加入 150  $\mu$ L 核提取缓冲液, 涡旋大力震荡 15 s, 冰上孵育 1 min, 重复 4 次; 迅速将核提取物转入到预冷的离心管套管中, 14 000 rpm, 离心 30 s, 收集沉淀的核蛋白, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 中。

### 1.2.6 电泳迁移率转移法 (DNA mobility shift assay, EMSA) 检测

制备 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶。用 0.5  $\times$

TBE 缓冲液, 100 V 电压、冰浴中预电泳 1 h。DNA-蛋白结合反应: 通过北京擎科新业生物技术有限公司合成 *Bmlark* 启动子 32 bp ( -124 ~ -92) 的寡核苷酸序列作为探针并进行生物素标记, 同时合成未生物素标记的的竞争探针, 探针序列 For: 5'-AATAATGTCGCCAAATATTATGCCGA AAAATAA-3', Rev: 5'-TTATTTTTTCGGCATAATAT TTGGCGACATTATT-3'。DNA-蛋白结合反应混合液包括探针 2  $\mu$ L, 核蛋白 8  $\mu$ L, 2  $\mu$ L 10  $\times$  结合缓冲液, 1  $\mu$ L 50% 甘油, 1  $\mu$ L 1% NP-40, 1  $\mu$ L poly ( dI-dC) 封闭核蛋白非特异性结合, 以及促进 DNA 和核蛋白结合的 MgCl<sub>2</sub>、KCl 和 EDTA。上述混合液室温 28 $^{\circ}$ C 放置 20 min, 作为对照, 同时进行单纯探针反应和特异性竞争反应 ( 在结合反应体系的基础上分别 50 倍和 100 倍未标记的探针)。上样后, 于 0.5  $\times$  TBE 缓冲液, 100 V 电压进行电泳 2 h。电泳后转膜, 转膜完成后, 将膜取出, 置于玻璃皿中, 溴酚蓝面向上, 将膜放置于紫外灯 ( 波长 254 nm) 下进行交联 0.8 min。根据 Thermo

LightShift<sup>®</sup> Chemiluminescent EMSA Kit 的方法进行化学发光检测生物素标记的 DNA 探针与蛋白结合的情况。

### 1.3 统计学处理

利用 GraphPad Prism 7 软件对实验数据进行分析 and 展示, 萤光素酶的相对活性以 “平均值  $\pm$  标准差” 表示, 对各启动子片段相对萤光素酶活性采用 t 检验, \*  $P < 0.05$  表示最低的显著意义, \*\*  $P < 0.01$  表示中等程度的显著意义, \*\*\*  $P < 0.001$  表示最高的显著意义,  $P > 0.05$  表示差异不显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Bmlark* 基因启动子转录活性检测

以家蚕基因组 DNA 为模板, 上游引物 *Bmlark*-F ( -1 232) 和下游引物 *Bmlark*-R ( +211) 进行 PCR 扩增, 获得一约 1.4 Kb 的 PCR 产物 P1 ( -1 232 ~ +211) ( 图 1-A)。经测序验证, 表明该 PCR 产物为 *Bmlark* 启动子目的片段。

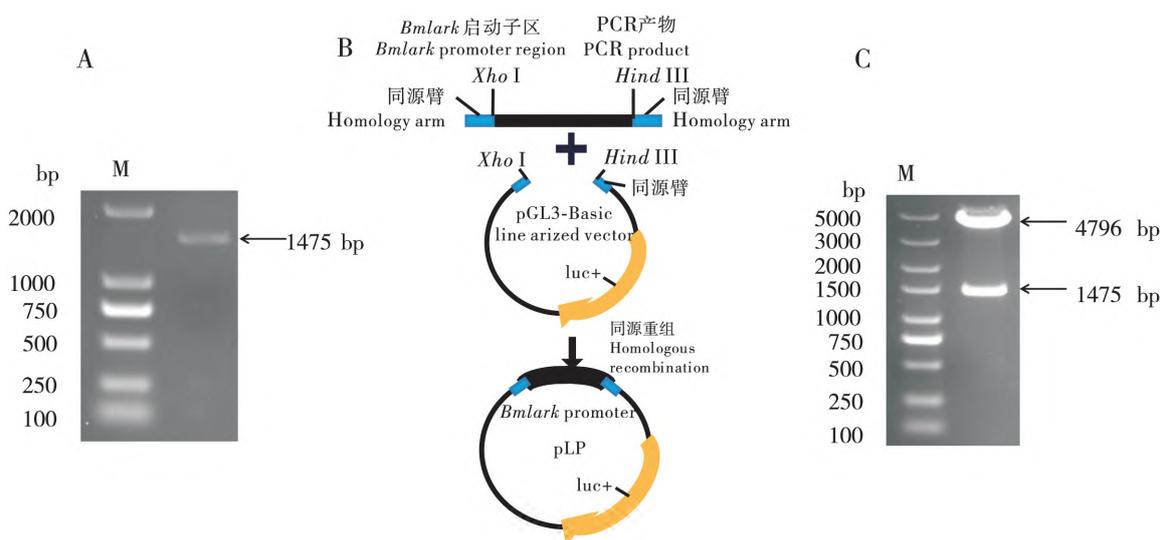


图 1 家蚕 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒的构建

Fig. 1 Construction of the luciferase reporter plasmid of the *Bmlark* gene promoter in silkworm

注: A, 家蚕 *Bmlark* 基因启动子序列 P1 ( -1 232 ~ +211) 的 PCR 扩增产物的凝胶电泳分析; M, DL2000 DNA 标准分子量; B, 利用同源重组构建家蚕 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒示意图; C, 家蚕 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒 pLP1 ( -1 232 ~ +211) 的 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定分析; M, DL5000 DNA 标准分子量。Note: A, Gel electrophoresis analysis of the PCR amplified product of the promoter sequence P1 ( -1 232 ~ +211) of the silkworm *Bmlark* gene; M, DL2000 DNA standard molecular weight; B, Schematic diagram of constructing the luciferase reporter plasmid of the silkworm *Bmlark* gene promoter by homologous recombination; C, *Xho* I and *Hind* III double enzyme digestion analysis of the luciferase reporter plasmid pLP1 ( -1 232 ~ +211) of the *Bmlark* gene promoter; M, DL5000 DNA standard molecular weight.

上述 PCR 产物的两端设计与 pGL3-Basic 萤光素酶报告载体多克隆位点同源的接头序列。利用 *Xho* I 和 *Hind* III 两个酶切位点, 酶切使 pGL3-Basic 载体线性化, 随后将 *Bmlark* 基因启动子片段 P1 ( -1 232 ~ +211), 通过同源重组的方式克隆至 pGL3-Basic 质粒中 (图 1-B)。转化大肠杆菌细胞后提取质粒后双酶切验证, 结果显示, 该 1 475bp 目的片段已重组到 pGL3-Basic 中。测序结果显示, 插入序列完全正确, 表明含家蚕 *Bmlark* 基因启动子片段的萤光素酶报告质粒 pLP1 ( -1 232 ~ +211) 构建成功。

为验证克隆得到的家蚕 *Bmlark* 基因启动子是否具有转录活性, 将报告质粒 pLP1 和 pGL3-Basic 空载体分别与 SV40 海肾萤光素酶报告质粒 (内参) 共转染家蚕 Bm12 细胞。萤光素酶活性检测结果显示, 表达 pLP1 细胞中的萤光素酶活性比 pGL3-Basic 阴性对照增加约 461 倍 ( $P = 0.0002$ , 图 2), 表明家蚕 *Bmlark* 基因的 -1 232 ~ +211 bp 区域具有启动子活性。

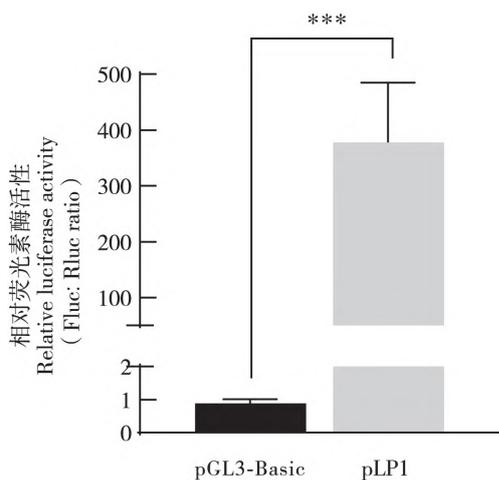


图2 家蚕 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒 pLP1 ( -1 232 ~ +211) 转录活性检测

Fig. 2 Detection of the transcriptional activity of the *Bmlark* promoter luciferase reporter plasmid pLP1 ( -1 232 ~ +211)

注: 萤光素酶的相对活性以“平均值 ± 标准差”表示,  $n = 3$ ,  $*** P < 0.001$ 。Note: Relative activity of luciferase was expressed as " mean ± standard deviation",  $n = 3$ ,  $*** P < 0.001$ .

## 2.2 *Bmlark* 基因启动子转录调控活性区的鉴定

为进一步定位 *Bmlark* 基因启动子的转录调控

活性区, 以 pLP1 ( -1 232 ~ +211) 为模板, 采用移步截短法设计引物对 pLP1 ( -1 232 ~ +211) 进行系列截短扩增, 得到 6 个大小与预期一致的截短片段: P2 ( -529 ~ +211)、P3 ( -220 ~ +211)、P4 ( -124 ~ +211)、P5 ( -92 ~ +211)、P6 ( -66 ~ +211)、P7 ( -8 ~ +211) (图 3-A), 测序结果显示序列正确。经同源重组分别把这些片段插入到 pGL3-Basic 载体。对阳性重组质粒进行双酶切鉴定 (图 3-B) 和测序, 结果显示插入序列完全正确, 证明系列截短的 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒 pLP2 ( -529 ~ +211)、pLP3 ( -220 ~ +211)、pLP4 ( -124 ~ +211)、pLP5 ( -92 ~ +211)、pLP6 ( -66 ~ +211)、pLP7 ( -8 ~ +211) 构建成功。

将不同片段长度的重组质粒与内参 SV40 质粒共转染 Bm12 细胞, 以 pGL3-Basic 作为阴性对照同步转染, 48 h 后进行双萤光素酶检测。质粒 pLP1、pLP2、pLP3、pLP4、pLP5、pLP6 的萤光素酶表达水平均较 pGL3-Basic 显著增加。其中, pLP4 的萤光素酶表达最高, 较 pLP3 升高了约 13 倍 ( $P = 0.0004$ ), 暗示在 -220 ~ -124 bp 启动子区域可能存在转录抑制因子结合位点或负向调控元件。pLP5 的萤光素酶表达水平较 pLP4 降低了约 5 倍 ( $P = 0.0007$ ), pLP6 的萤光素酶表达水平较 pLP5 又下降了约 6 倍 ( $P = 0.0007$ ), 暗示在 -124 ~ -92 bp 可能存在转录激活因子结合位点或正调控元件 (图 4)。

## 2.3 启动子结合蛋白的 EMSA 分析

为了鉴定是否有核蛋白结合到该 -124/-92 bp 潜在的转录激活因子结合位点或正调控元件序列, 从 Bm12 细胞中提取的核蛋白后, 以生物素标记的该片段 (32 bp) 探针 (For: 5'-ATAATGTCGC CAAATATTATGCCGAAAAATAA-3', Rev: 5'-TTAT TTTTCGGCATAATATTTGGCGACATTATT-3') 进行 EMSA 分析。结果显示有 4 个核蛋白与探针结合 (图 5)。当在反应体系中加入竞争探针 (非标记的同样探针) 的浓度增加时, 蛋白 1、蛋白 2、蛋白 4 的结合信号消失, 蛋白 3 结合信号在逐渐减弱但不能被探针完全竞争。结果表明, 这些蛋白与探针的结合是特异性的。

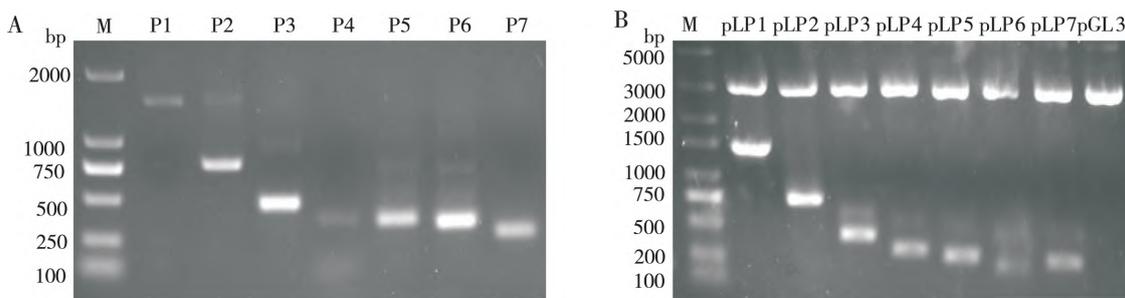


图 3 系列截短的 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒的构建

Fig. 3 Construction of a series of truncated *Bmlark* gene promoter luciferase reporter plasmids

注: A, 系列截短的家蚕 *Bmlark* 基因启动子序列 PCR 扩增产物的凝胶电泳; M, DL2000 DNA 标准分子量; B, 系列截短的家蚕 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定; M, DL5000 DNA 标准分子量。Note: A, Gel electrophoresis of PCR amplified products of a series of truncated silkworm *Bmlark* gene promoter sequence; M, DL2000 DNA standard molecular weight; B, A series of truncated silkworm *Bmlark* gene promoter luciferase reporter plasmids *Xho* I and *Hind* III double restriction digestion identification; M, DL5000 DNA standard molecular weight.

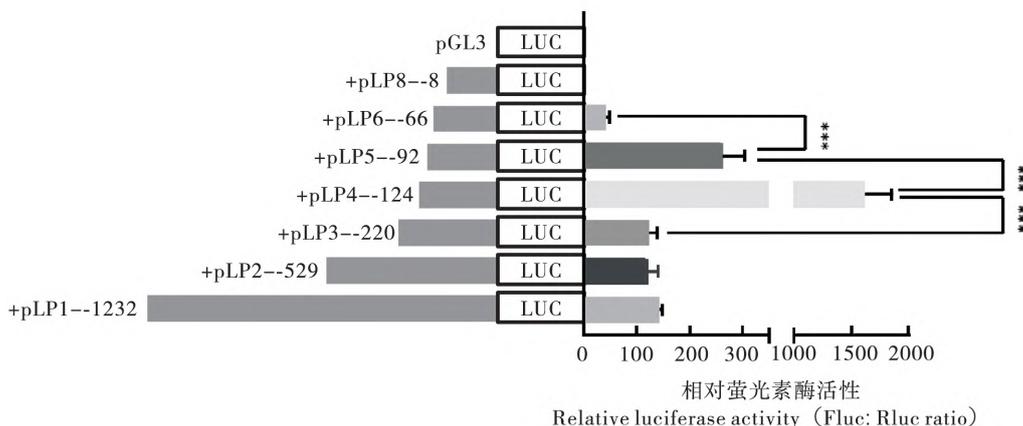


图 4 系列截短的家蚕 *Bmlark* 基因启动子萤光素酶报告质粒的转录活性检测

Fig. 4 Transcriptional activity detection of a series of truncated silkworm *Bmlark* gene promoter luciferase reporter plasmids

注: 萤光素酶的相对活性以“平均值 ± 标准差”表示,  $n = 3$ ,  $*** P < 0.001$ 。Note: Relative activity of luciferase was expressed as “mean ± standard deviation”,  $n = 3$ ,  $*** P < 0.001$ .

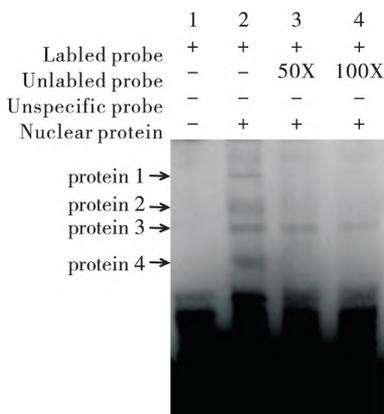


图 5 电泳迁移率转移法 (EMSA) 分析 *Bmlark* 基因启动子的 -124 ~ -92 bp 序列探针与 Bm12 细胞核蛋白的结合

Fig. 5 Electrophoretic mobility transfer method (EMSA) analysis of *Bmlark* gene promoter

-124 ~ -92 bp sequence probe binding to Bm12 nuclear protein

注: 用生物素标记 *Bmlark* 基因启动子的 -124 ~ -92 bp 序列探针, 未标记探针作为冷探针。Note: -124 ~ -92 bp sequence probe of *Bmlark* gene promoter was labeled with biotin, and the unlabeled probe was used as a cold probe.

将蛋白 1~4 切胶, 并分别进行质谱检测。质谱结果显示 protein 1、protein 2、protein 3、protein 4 分别有 177、124、104、95 个候选蛋白 (见 S1), 将获得的蛋白通过 Omic Share 网站及 Gene Ontology 数据库分析获得 GO 富集分析, 这些蛋白主要与生殖过程、新陈代谢、生物调节相关, 具有核酸及蛋白结合和催化等活性 (图 6)。根据蛋白分子量, 是否细胞核蛋白以及是否具有 DNA 结

合结构域等因素, 鉴定出 4 个可能与该 -124 ~ -92 bp 序列结合的蛋白, 分别为 TAF7 (NC\_051358.1), Ets transcription factor (NC\_051374.1), protein abrupt isoform X1 (NW\_021011484.1) 和 forkhead box protein N3 (XM\_004928387.4) (表 2)。今后将对这 4 个候选蛋白或转录因子进行进一步的实验验证。

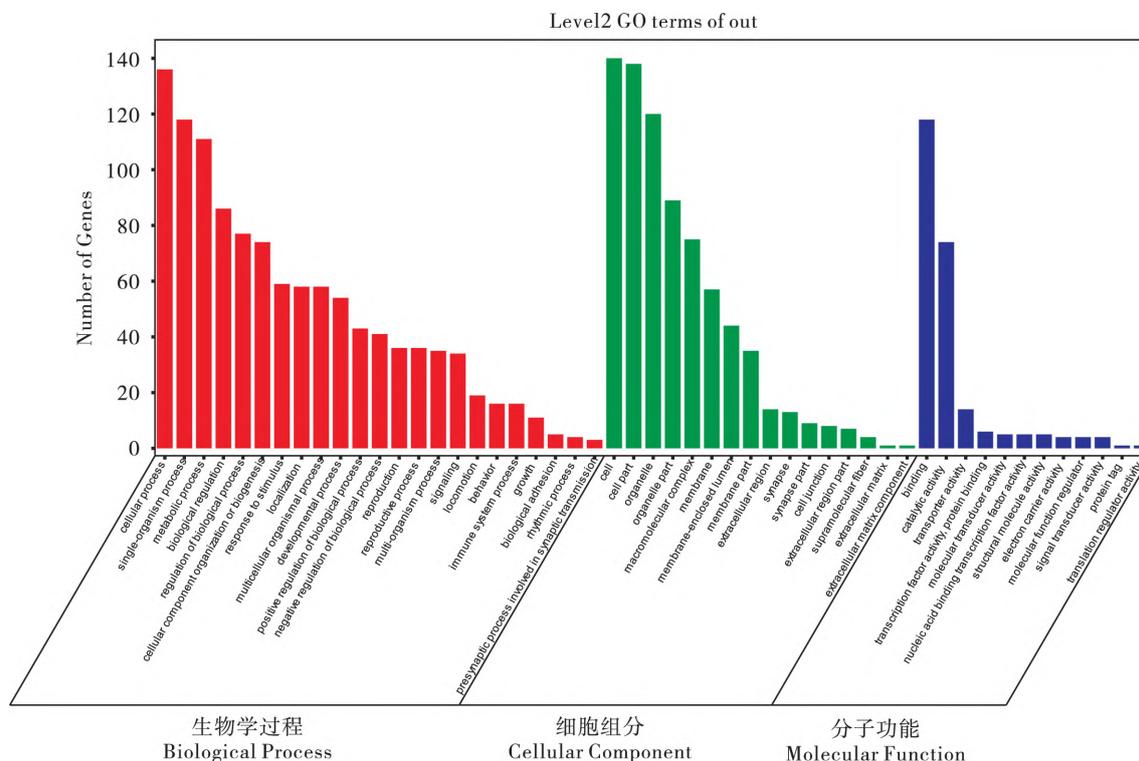


图 6 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis

注: 将质谱分析获得的共 500 个蛋白质向 Gene Ontology 数据库的各个 term 映射, 选取蛋白质显著富集的 GO term, 通过 GO 显著性分析能确定质谱检测到的蛋白质行使的主要生物学功能。Note: Map a total of 500 proteins obtained by mass spectrometry to each term in the Gene Ontology database, selected GO terms that were significantly enriched in different proteins, and used GO significance analysis to determine the main biological functions of the proteins detected by mass spectrometry. Cellular process, 细胞过程; Single-organism process, 单个组织过程; Metabolic process, 代谢过程; Biological regulation, 生物调控; Regulation of biological process, 生物过程调控; Cellular component organization or biogenesis, 细胞组分组织或合成; Response to stimulus, 刺激反应; Localization, 定位; Multicellular organismal process, 多细胞生物过程; Developmental process, 发育过程; Positive regulation of biological process, 生物过程正调控; Negative regulation of biological process, 生物过程负调控; Reproduction, 生殖; Reproductive process, 生殖过程; Multi-organism process, 多组织过程; Signaling, 信号发生; Locomotion, 运动; Behavior, 行为; Immune system process, 免疫系统过程; Growth, 生长; Biological adhesion, 生物附着; Rhythmic process, 生物节律过程; Presynaptic process involved in synaptic transmission, 突触传导中的突触前过程; Cell, 细胞; Cell part, 细胞部分; Organelle, 细胞器; Organelle part, 细胞器部分; Macromolecular complex, 高分子复合物; Membrane, 膜; Membrane-enclosed lumen, 有膜腔室; Membrane part, 膜部分; Extracellular region, 胞外区; synapse, 突触; Synapse part, 突触部分; Cell junction, 细胞连接; Extracellular region part, 胞外区部分; Supramolecular fiber, 超分子纤维; Extracellular matrix, 细胞外基质; Extracellular matrix component, 细胞外基质部分; Binding, 结合; Catalytic activity, 催化活性; Transporter activity, 转运活性; Transcription factor activity, 转录因子活性; Protein binding, 蛋白结合; Molecular transducer activity, 分子传感器活性; Nuclei acid binding transcription factor activity, 核酸结合转录分子活性; Structural molecule activity, 结构分子活性; Electron carrier activity, 电子携带活性; Molecular function regulator, 分子功能调控; Signal transducer activity, 信号传导活性; Protein tag, 蛋白标签; Translation regulator activity, 翻译调控活性。

表 2 候选 4 个蛋白的相关信息  
Table 2 Information about the 4 candidate proteins

蛋白名称 Protein name	GenBank Accession No.	分子量 (kDa) Molecular weight	预测功能结构域 Predictive functional domain	可能结合的靶基因 Possible target genes
TAF7	NC_051358.1	44.3	TAFII55_N	TATA
Ets transcription factor	NC_051374.1	23.4	ETS DNA-binding domain	GGAA
Protein abrupt isoform X1	NW_021011484.1	33.4	zf-C2H2	GCCAGG
Forkhead box protein N3	XM_004928387.4	41.2	Fork_head	GACGC、RYAAAYA

### 3 结论与讨论

有研究发现, *Bmlark* 是昼夜节律中输出通路的重要组成部分, 对胚胎发育有着极其重要的作用, 参与神经元发育和功能 (Sundram *et al.*, 2012), 其表达水平受转录因子调控, 但对于 *Bmlark* 的转录调控机制的研究尚无报道。本研究拟通过寻找 *Bmlark* 基因启动子的关键转录调控元件及结合蛋白, 探索 *Bmlark* 基因的转录调控机制。

利用双萤光素酶报告基因系统鉴定基因启动子及调控元件, 具有检测快、灵敏度高、操作简单、结果确切等优点。应用该方法, 本研究对家蚕 *Bmlark* 基因的启动子区域进行了克隆并构建了家蚕 *Bmlark* 基因萤光素酶报告基因 pLP1。与作为内参的 SV40 共同转染 Bm12 细胞后, 确定家蚕 *Bmlark* 基因的 -1 232 ~ +211 bp 区域具有启动子活性, 并进一步通过截短试验发现, 在 -124 ~ -92 bp 启动子区域可能存在正向调控元件, 可增强 *Bmlark* 基因的启动子活性。而在区域 -220 ~ -124 bp 可能存在转录抑制因子结合位点或负调控元件。这些结果表明, *Bmlark* 基因的转录可能同时受到正和负的协同调控。经 Jaspar 在线网站预测, 区域 -124 ~ -92 bp 包含转录因子 Cad、Dbx、Ade-B 等转录因子结合位点, 区域 -220 ~ -124 bp 包含转录因子 Su(Hw)、Br、H2.0 等转录因子结合位点, 但预测结合转录因子与 EMSA 获取的转录因子没有重合。

为了找到与 -124 ~ -92 bp 区域结合的调控蛋白, 利用 Bm12 中提取的核蛋白进行 EMSA 分析, 发现有 4 个蛋白结合条带 protein1、protein2、protein3、protein4。经过甄别分析后, 筛选出 TAF7、Ets transcription factor、protein abrupt isoform X1、forkhead box protein N3 等 4 个蛋白最有可能与该调控区结合, 参与对 *Bmlark* 基因转录的调控。

TAF7 在 RNA 聚合酶 II 中可以通过结合 TAF1 来调节转录活性 (Gegonne *et al.*, 2008), 是转录启动的流量控制器 (Gegonne *et al.*, 2013)。但也有研究指出, TAF7 也可以作为一个独立的转录因子起作用 (Devaiah *et al.*, 2010)。TAF7 对胚胎发育至关重要, 是细胞增殖的关键调节因子, 缺失 TAF7 会导致胚胎致死, TAF7 在人类体内积极参与调节 MHC I 类基因的转录 (Gegonne *et al.*, 2012)。Ets transcription factor 具有 RNA 聚合酶 II 顺式调节区序列特异的 DNA 结合活性, 控制细胞周期、边界卵泡细胞迁移等过程, 对神经系统、心脏、气管和眼睛的发育至关重要, 参与表皮生长因子受体信号通路, 成纤维细胞生长因子受体等信号通路 (Poon and Kim, 2017; Sizemore and Pitarresi, 2017)。Protein abrupt isoform X1 与蜕皮激素 tai 结合时会负调控蜕皮激素的信号传导。它调节器官和多种组织形态发生, 介导神经元分化以及细胞迁移 (Julie *et al.*, 2011; Turkel *et al.*, 2013; Turkel *et al.*, 2015)。Forkhead box protein N3 具有 RNA 聚合酶 II 顺式调节区序列特异性 DNA 结合活性 (Rogers *et al.*, 2019), 参与器官形态发生、唾液腺形态发生、细胞周期调控以及碳水化合物和脂质代谢的发育 (Kong *et al.*, 2019)。虽然从蛋白的结构及 EMSA 分析结果来看, 这些蛋白有可能与这个启动子片段结合, 但直接证据仍需要通过获得这些蛋白后, 再通过 EMSA 实验和其他方法加以验证。

综上所述, 本研究成功构建了家蚕 *Bmlark* 基因启动子双萤光素酶报告系统, 并发现 -124 ~ -92 bp 区域可能存在转录激活因子结合位点或正调控元件, -220 ~ -124 bp 可能存在转录抑制因子结合位点或负调控元件, 并筛选出了可能结合在 -124 ~ -92 bp 正调控区域的蛋白。研究为进一步深入研究 *Bmlark* 基因转录调控提供了线索。

## 参考文献 (References)

- Devaiah BN, Lu H, Gegonne A, et al. Novel functions for TAF7, a regulator of TAF1 - independent transcription [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (50): 38772 - 38780.
- Gegonne A, Devaiah BN, Singer DS. TAF7: Traffic controller in transcription initiation [J]. *Transcription*, 2013, 4 (1): 29 - 33.
- Gegonne A, Tai X, Zhang J, et al. The general transcription factor TAF7 is essential for embryonic development but not essential for the survival or differentiation of mature T cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2012, 32 (10): 1984 - 1997.
- Gegonne A, Weissman JD, Lu H, et al. TFIID component TAF7 functionally interacts with both TFIIF and P - TEFB [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (14): 5367 - 5372.
- Huang Y, Genova G, Roberts M, et al. The LARK RNA - binding protein selectively regulates the circadian eclosion rhythm by controlling E74 protein expression [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2 (10): 1 - 10.
- Huang Y, Howlett E, Stern M, et al. Altered LARK expression perturbs development and physiology of the *Drosophila* PDF clock neurons [J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2009, 41 (2): 196 - 205.
- Huang Y, McNeil GP, Jackson FR. Translational regulation of the DOUBLETIME/CKI8/ $\epsilon$  kinase by LARK contributes to circadian period modulation [J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10 (9): 1 - 13.
- Iwai S, Takeda M. Expression analysis of two types of transcripts from circadian output gene lark in *Bombyx mori* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 146 (4): 470 - 476.
- Kojima S, Matsumoto K, Hirose M, et al. LARK activates posttranscriptional expression of an essential mammalian clock protein, PERIOD1 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104 (6): 1859 - 1864.
- Kong X, Zhai J, Yan C, et al. Recent advances in understanding FOXN3 in breast cancer, and other malignancies [J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 1 - 14.
- McNeil GP, Kaur M, Purrier S, et al. The *Drosophila* RNA - binding protein Lark is required for localization of Dmoesin to the oocyte cortex during oogenesis [J]. *Development Genes and Evolution*, 2009, 219 (1): 11 - 19.
- McNeil GP, Zhang X, Genova G, et al. A molecular rhythm mediating circadian clock output in *Drosophila* [J]. *Neuron*, 1998, 20 (2): 297 - 303.
- McNeil GP, Zhang X, Roberts M, et al. Maternal function of a retroviral-type zinc-finger protein is essential for *Drosophila* development [J]. *Developmental Genetics*, 1999, 25 (4): 387 - 396.
- Newby LM, Jackson FR. A new biological rhythm mutant of *Drosophila melanogaster* that identifies a gene with an essential embryonic function [J]. *Genetics*, 1993, 135 (4): 1077 - 1090.
- Newby LM, Jackson FR. Regulation of a specific circadian clock output pathway by lark, a putative RNA - binding protein with repressor activity [J]. *Journal of Neurobiology*, 1996, 31 (1): 117 - 128.
- Poon GMK, Kim HM. Signatures of DNA target selectivity by ETS transcription factors [J]. *Transcription*, 2017, 8 (3): 193 - 203.
- Rogers JM, Waters CT, Seegar TCM, et al. Bispecific forkhead transcription factor FoxN3 recognizes two distinct motifs with different DNA shapes [J]. *Molecular Cell*, 2019, 74 (2): 245 - 253.
- Sizemore GM, Pitarresi JR, Balakrishnan S, et al. The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17 (6): 337 - 351.
- Sundram V, Ng FS, Roberts MA, et al. Cellular requirements for LARK in the *Drosophila* circadian system [J]. *Journal of Biological Rhythms*, 2012, 27 (3): 183 - 195.
- Turkel N, Portela M, Poon C, et al. Cooperation of the BTB - Zinc finger protein, Abrupt, with cytoskeletal regulators in *Drosophila* epithelial tumorigenesis [J]. *Biology Open*, 2015, 4 (8): 1024 - 1039.
- Turkel N, Sahota VK, Bolden JE, et al. The BTB - zinc finger transcription factor abrupt acts as an epithelial oncogene in *Drosophila melanogaster* through maintaining a progenitor - like cell state [J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9 (7): 1 - 24.
- Wang ZL, Li J, Xia QY, et al. Identification and expression pattern of Bmlark, a homolog of the *Drosophila* gene lark in *Bombyx mori* [J]. *DNA Sequence*, 2005, 16 (3): 224 - 229.
- Zhang X, McNeil GP, Hilderbrand - Chae MJ, et al. Circadian regulation of the lark RNA - binding protein within identifiable neurosecretory cells [J]. *Journal of Neurobiology*, 2000, 45 (1): 14 - 29.
- Zhu L J, Christensen RG, Kazemian M, et al. FlyFactorSurvey: A database of *Drosophila* transcription factor binding specificities determined using the bacterial one - hybrid system [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39 (Suppl. 1): D111 - D117.