

# 小鼠 T-bet 启动子荧光素酶报告基因载体的构建及活性鉴定

徐惠娟, 周守标

安徽师范大学生命科学学院 安徽省重要生物资源保护与利用研究省级重点实验室, 安徽 芜湖 241000

徐惠娟, 周守标. 小鼠 T-bet 启动子荧光素酶报告基因载体的构建及活性鉴定. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1733-1741.

Xu HJ, Zhou SB. Construction and identification of luciferase reporter gene containing mouse T-bet promoter. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1733-1741.

**摘要:** 为了研究 T-bet 在 T 细胞中的转录调控机制, 并研究其在多发性硬化症中的信号通路, 本研究构建小鼠 *TBX21* (编码 T-bet) 基因启动子区和增强子区萤火虫荧光素酶报告基因载体。在对小鼠 *TBX21* 基因 5'侧翼区进行详尽生物信息学特征分析后, 设计相应引物, 用 PCR 的方法从小鼠基因组中扩增出 *TBX21* 基因 5'侧翼区-1 000 bp-28 bp 片段长为 1 028 bp 的启动子区 (以翻译起始点 ATG 为+1) 和-3 308 bp--2 000 bp 片段长为 1 308 bp 的非编码区保守序列 (No-coding conserved sequence, CNS), 再用定向克隆的方法将这两个片段定向重组入专门用于启动子活性研究的萤火虫荧光素酶报告基因载体 (pGL4.10) 中, 构建出包含小鼠 *TBX21* 基因启动子区和 CNS 区的萤火虫荧光素酶报告基因载体 (pGL4.10-TBX21pr-CNS), 电泳与测序鉴定, 最后再将 pGL4.10-TBX21pr-CNS 与内参 pRL-TK 用 lipofectamine 2000 共转染 293T 细胞和 Jurkat 细胞中, 通过双荧光素酶报告基因检测系统鉴定 pGL4.10-TBX21pr-CNS 的启动子和增强子活性, 并用独立样本 *t* 检验方法进行统计分析。对照组共转染 pGL4.10 与内参 pRL-TK。结果表明, 成功构建出荧光素酶报告基因重组质粒 pGL4.10-TBX21pr-CNS。与转染空质粒 pRL-TK 组相比, 293T 细胞 ( $P = 0.012\ 2$ ) 和 Jurkat 细胞 ( $P = 0.002\ 2$ ) 中转染 pGL4.10-TBX21pr-CNS 组荧光素酶活性升高。研究结果表明在 293T 细胞和 Jurkat 细胞中 pGL4.10-TBX21pr-CNS 可以表现出启动子活性, 为后续小鼠 T-bet 转录调控研究提供了基本材料。

**关键词:** T-bet, 启动子, 荧光素酶, 报告基因, 转录调控

**Received:** February 21, 2014; **Accepted:** March 18, 2014

**Supported by:** Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 11040606M77), Key Foundation of Education Department of Anhui Province (No. KJ2011A129).

**Corresponding author:** Shoubiao Zhou. Tel: +86-553-5910810; E-mail: zhoushoubiao@vip.163.com

安徽省自然科学基金 (No. 11040606M77), 安徽省高校自然科学基金重点项目 (No. KJ2011A129) 资助。

网络出版时间: 2014-07-31

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140093.html>

# Construction and identification of luciferase reporter gene containing mouse T-bet promoter

Huijuan Xu, and Shoubiao Zhou

Anhui Provincial Key Laboratory of the Conservation and Exploitation of Biological Resources, College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, Anhui, China

**Abstract:** The aim of this study is to clone the mouse T-bet promoter and enhancer, construct and identify the firefly luciferase reporter gene plasmid pGL4.10-TBX21pr-CNS for T-bet transcription regulation study and its function in signaling of multiple sclerosis. The promoter and CNS of T-bet were predicted by bioinformatics assay. The predicted fragment of mouse T-bet promoter plus CNS was amplified by PCR and cloned into pGL4.10. The recombinant plasmid pGL4.10-TBX21pr-CNS was transferred into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . The positive clone was identified by double digestion with *Kpn* I and *Sfi* I and DNA sequencing. Finally, pGL4.10-TBX21pr-CNS was cotransfected with pRL-TK into 293T cells and Jurkat cells, pRL-TK and pGL4.10 as a control. The luciferase activity in 293T cells ( $P=0.012\ 2$ ) and Jurkat cells ( $P=0.002\ 2$ ) was higher than that of the control group. A fragment of 1 028 bp mouse T-bet promoter plus 1 308 bp CNS was successfully cloned and the firefly luciferase reporter gene plasmid pGL4.10-TBX21pr-CNS was constructed. In 293T cells and Jurkat cells, pGL4.10-TBX21pr-CNS has the promoter functions. This work offers a basic material for the research of T-bet transcription.

**Keywords:** T-bet, promoter, luciferase, reporter genes, transcription regulation

适应性免疫应答 (Adaptive immunity) 反应中的 T 淋巴细胞按其功能主要分为 3 个群: 辅助性 T 细胞、细胞毒性 T 细胞和调节性 T 细胞。辅助性 T 细胞至少包括 Th1、Th2、Th17 和滤泡辅助 T 细胞 (Tfh), 这 4 个独立细胞亚群都表达各自的主要转录因子和细胞因子。表达特异性转录因子 T-bet 的 Th1 细胞, 主要通过分泌 IFN- $\gamma$ , 在抗胞内病原体 (病毒、细菌) 的感染中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>; Th2 细胞主要产生 IL-4、IL-5、IL-10、IL13, 在清除寄生虫等和过敏反应中意义重大, 它的转录因子为 GATA-3<sup>[3-4]</sup>; Th17 细胞的主要调控子为 ROR $\gamma$ t, 产生 IL-17A、IL-17F 和 IL-21, 在防御某些肠道病原菌的感染方面发挥积极作用<sup>[5]</sup>。

Szabo 等首先于 2000 年报道了辅助 T 细胞亚型 Th1 细胞中重要的转录因子 T-bet (T-box expressed in T cells)<sup>[6]</sup>。它是 T-box 基因家族的

新型转录因子, 因刚发现时被认为只表达于 T 细胞内而得名。T-bet 为 T-box 基因家族 Tbr1 亚家族成员<sup>[7]</sup>, 含 530 个氨基酸, 其中有一个 189 个氨基酸组成的能与 T 盒 DNA 结合的结构域。人与小鼠的 *TBX21* 基因 (编码 T-bet) 具有 88% 的同源性。T-bet 在 naive T 细胞向 Th1 方向分化时具有重要的作用。T-bet 作为 Th1 细胞的谱系限定转录因子, 对于 Th1 细胞的分化及稳定起了非常重要的作用。同时 T-bet 又能通过抑制其他细胞亚型的细胞因子的表达从而抑制其分化。Th1 细胞又称为炎症性 T 细胞, 介导与细胞内病毒和局部炎症有关的免疫应答, 参与细胞免疫及迟发型超敏性炎症的形成, 目前报道与多种自身免疫疾病相关<sup>[8]</sup>, 尤其与人类的自身免疫病多发性硬化症有关。

多发性硬化症 (Multiple sclerosis, MS) 是

一种由 T 细胞介导的自身免疫疾病,它也是一种累及中枢神经系统白质的自身免疫疾病<sup>[9]</sup>。它的自身反应性 T 细胞所识别的靶抗原是神经髓鞘碱性蛋白 (Myelin basic protein, MBP) 等。随着病情的发展,最终可导致全身瘫痪和中枢神经系统功能丧失。其具体的发病机制依然不十分清楚,一般认为异常激活的抗原特异性 CD4+T 淋巴细胞穿过血脑屏障进入中枢神经系统,并针对特异性髓鞘蛋白,如髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (Myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG35-55)、髓鞘磷脂碱性蛋白 (Myelin basic protein, MBP)、髓鞘蛋白脂蛋白 (Myelin proteolipid protein, PLP) 等产生免疫反应,引起炎性细胞浸润和中枢神经系统白质脱髓鞘,导致了多发性硬化症的发病。实验性脑脊髓炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 在临床症状和发病机理上和多发硬化症很相似<sup>[10]</sup>,因此被认为是 MS 理想的动物模型<sup>[11]</sup>。在此前发现 Th1 细胞是介导多发硬化症发病的主要细胞亚型之一,但是当 IFN- $\gamma$  敲除之后 EAE 发病并没有很好地缓解反而加重<sup>[12]</sup>。而 T-bet 敲除就不能诱导 EAE 发病了<sup>[13]</sup>,这表明 T-bet 作为 Th1 介导 EAE 的关键的细胞因子<sup>[14]</sup>,然而其作用机制还不清楚。

启动子是真核基因转录起始位点上游一段长度不等的特异性序列,能顺式调控基因的转录。增强子是指能使与它连锁的基因转录频率明显增强的 DNA 序列。目前发现的保守的非编码区序列 (No-coding conserved sequence, CNS) 类似于一般远端的增强子。我们用 VISTA tools 比对软件对小鼠和人 TBX21 基因上游 5 kb 序列进行比对,得到一个保守性且转录因子结合位点较多的 CNS。为了研究 Th1 在介导的多发性

硬化症中的信号通路的作用,我们构建了含小鼠 T-bet 启动子和 CNS 的荧光素酶报告基因,通过对细胞内荧光素酶活性的检测鉴定了所构建的报告基因载体的有效性。为下一步研究 Th1/Th17 细胞介导的自身免疫病多发性硬化症的发病机制提供了材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、细胞株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、人肾上皮细胞系 293T 细、T 淋巴细胞系 Jurkat、细菌人工染色体 RP23-451G13 由本课题组保存;pGL4.10、pRL-TK 购置于 Promega 公司。

#### 1.1.2 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清购置于 Gibco 公司;PCR 反应试剂盒、限制性内切酶、DNA 连接酶购置于大连宝生物有限公司;DNA marker 购置于天根生化科技(北京)有限公司和 Fermentas 公司;质粒小量提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒购置于博迈德生物有限公司;转染试剂 lipofectamine 2000 购置于 Life technology 公司;双荧光素酶报告基因活性检测试剂盒购置于 Promega 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 T-bet 基因启动子生物信息学分析

根据 UCSC 中小鼠和人全基因组序列,选取小鼠和人 T-bet 基因 TBX21 转录起始位点上游 5 kb,在线用 VISTA tools 进行序列分析比对,得到小鼠 TBX21 基因上游起始位点 5 kb 内非编码区保守序列 (No-coding conserved sequence, CNS)。

#### 1.2.2 引物设计和合成

根据 PCR 引物设计原则和 GenBank 中小鼠

TBX21 基因序列,应用 Prime Primer 5.0 软件设计引物:TBX21 启动子上游引物加入 *Kpn* I 酶切位点 (GGTACC),下游引物加入 *Xho* I 酶切位点 (CTCGAG),并分别在上游和下游引物的 5'端加上保护碱基;TBX21 CNS 上游引物加入 *Sfi* I 酶切位点 (GGCCTAACTGGCC);下游引物加入 *Kpn* I 酶切位点 (GGTACC)。引物由南京金斯瑞有限公司合成,启动子扩增片段长度为 1 028 bp, CNS 扩增片段长度为 1 308 bp。

### 1.2.3 小鼠 T-bet 基因启动子区和 CNS 区序列扩增

以细菌人工染色体 (BAC, RP23-451G 13) 为模板,用 TBX21 pr U/D 和 TBX21 CNS U/D 两对引物,分别扩增 TBX21 启动子和 CNS DNA 序列。扩增体系为:*Taq* DNA 聚合酶 0.125  $\mu$ L、10 $\times$ 缓冲液 2.5  $\mu$ L、dNTP mix 2  $\mu$ L、模板 DNA 2  $\mu$ L、引物一 1  $\mu$ L、引物二 1  $\mu$ L、灭菌双蒸水 16.375  $\mu$ L。反应参数设置如下:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 复性 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,扩增 35 个循环,72  $^{\circ}$ C 最后延伸 5 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物行于琼脂糖凝胶中,在 100 V 电压下电泳,256 nm 紫外灯下观察结果。

### 1.2.4 小鼠 T-bet 启动子荧光素酶报告基因载体的构建与鉴定

从琼脂糖凝胶中切出需回收的产物电泳条带,用胶回收试剂盒对 PCR 反应产物 TBX21pr 进行纯化,纯化后再次进行琼脂糖凝胶电泳确认。确认后将 PCR 纯化产物 TBX21pr 和 pGL4.10 载体用 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切。将酶切纯化产物 TBX21pr 与 pGL4.10 载体连接。连接体系为 pGL4.10 载体 1  $\mu$ L、Solution I 5  $\mu$ L、酶切纯化产物 TBX21pr 3  $\mu$ L、灭菌双蒸水 1  $\mu$ L。体系置于金属浴中 16  $^{\circ}$ C 连接 2 h。连接的 PCR 产物转

化感受态细菌 DH5 $\alpha$  后,接种于含 Amp+LB 培养基培养筛选。挑取 8 个单菌落,接种 5 mL Amp<sup>+</sup>LB 培养基过夜培养,然后小提质粒,用 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切,4 h 后进行琼脂糖凝胶电泳,以鉴定目的片段是否转入。将经过鉴定的阳性克隆菌落摇菌,提质粒,送测序。重组载体命名为 pGL4.10-TBX21-pr。再将 PCR 纯化产物 TBX21 CNS3/4/5/6 与 pGL4.10-TBX21-pr 用 *Sfi* I、*Kpn* I 双酶切。将酶切纯化产物 TBX21 CNS 与 pGL4.10-TBX21-pr 连接。连接体系为 pGL4.10-TBX21-pr 1  $\mu$ L、Solution I 5  $\mu$ L、酶切纯化产物 TBX21 CNS 3  $\mu$ L、灭菌双蒸水 1  $\mu$ L。体系置于金属浴中 16  $^{\circ}$ C 连接 2 h。连接的 PCR 产物转化感受态细菌 DH5 $\alpha$  后,接种于含 Amp<sup>+</sup>LB 培养基培养筛选。挑取 8 个单菌落,接种 5 mL Amp<sup>+</sup>LB 培养基过夜培养,然后小提质粒,用 *Kpn* I、*Sfi* I 双酶切,4 h 后进行琼脂糖凝胶电泳,以鉴定目的片段是否转入。将经过鉴定的阳性克隆菌落摇菌,提质粒,送测序。测序由北京华大基因研究中心有限公司完成。重组载体命名为 pGL4.10-TBX21-pr-CNS。

### 1.2.5 细胞培养及转染

人肾上皮细胞系 293T 细胞在含 10%胎牛血清、100  $\mu$ g/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素的高糖型 DMEM 培养基中培养,培养条件为 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>,相对湿度 95%。细胞用 0.1%胰蛋白酶-EDTA 进行消化传代。细胞转染利用转染试剂 lipofectamine 2000 按照 life technology 公司提供的实验方法进行转染。

T 细胞 Jurkat 培养于含 10%胎牛血清、100  $\mu$ g/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中培养,培养条件为 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>,相对湿度 95%,3-4 d 传代一次。细胞转染使用 0.4 cm 电

转杯在电转仪 340 V 的条件下电转。转染所用的质粒均由本实验室提供。

### 1.2.6 荧光素酶活性检测

用 Promega 公司的 Dual-Luciferase Reporter Assay System (E1960) 进行样品荧光素酶活性检测, 方法如下: 转染前一天接种  $2.5 \times 10^5$  个细胞于 24 孔板上。细胞转染 48 h 后加入 PBS 清洗细胞, 再加入 100  $\mu$ L 的 PLB (Passive lysis buffer), 室温轻微振荡 15 min, 收集细胞裂解液。收集细胞裂解液, 使用手动的双荧光检测仪 (Promega, GloMax 生物发光检测仪) 读值: 将 20  $\mu$ L 每样品加入 100  $\mu$ L LAR 工作液, 快速混匀, 读值 2 s。读值完毕后, 每样品再加入 100  $\mu$ L Stop & Glo<sup>R</sup> Reagent, 快速混匀后, 放入发光检测仪中, 读值 2 s; 保存数据。

### 1.2.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5 软件处理分析, 组间差异用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 小鼠 *T-bet* 基因转录起始位点上游 5 kb 序列生物信息学分析

在 UCSC 数据库中获得小鼠和人 *TBX21* 基因转录起始位点上游 5 kb 基因序列, 在线用 VISTA tools (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>)

进行序列分析比对, 得到小鼠 *TBX21* 基因上游起始位点 5 kb 内非编码区保守序列 (No-coding conserved sequence, CNS) (图 1) 其中 4 段非编码区保守序列的保守性很强。

### 2.2 小鼠 *T-bet* 启动子区及 CNS 扩增结果

以细菌人工染色体 (RP23-451G13)DNA 为模板, 克隆出 2 段序列, 分别为 *TBX21* 启动子序列 1 028 bp (-1 000/+28)、*TBX21* CNS3/4/5/6 1 308 bp (-3 308/-2 000) (图 2)。

### 2.3 pGL4.10-TBX21pr 及 pGL4.10-TBX21pr-CNS 质粒鉴定结果

*TBX21* 启动子的 PCR 产物插入 pGL4.10-Basic 载体后, 构建成重组载体 pGL4.10-TBX21-pr, 用 *Kpn* I/*Xho* I 双酶切鉴定; *TBX21* CNS3/4/5/6 的 PCR 产物插入重组质粒 pGL4.10-TBX21-pr 后, 构建成重组质粒 pGL4.10-TBX21-pr-CNS, 用 *Sfi* I/*Kpn* I 双酶切鉴定。图 3 显示了 pGL4.10-TBX21-pr 在相应位置切出来载体条带与目的 DNA 片段, 释放出 1 028 bp 大小的片段。pGL4.10-TBX21-pr-CNS 因为在 *Kpn* I 酶切位点前后均有一个 *Sfi* I 酶切位点, 因此酶切之后释放出 1 035 bp 和 1 308 bp 两个不同大小的片段 (图 4)。测序结果证实包含小鼠 *TBX21* 启动子和 CNS3/4/5/6 序列, 序列

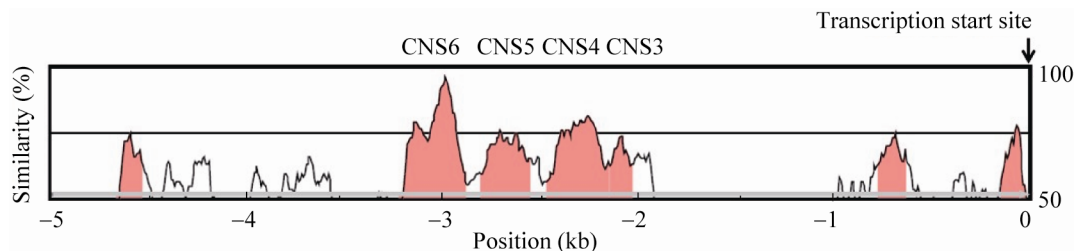


图 1 小鼠和人 *TBX21* 基因序列在线 VISTA 软件比对结果图

Fig. 1 VISTA plot of CNS sites (Pink) in human and mouse *TBX21* DNA, presented relative to their positions in the mouse genome (horizontal axis). CNS3-6 is located -3kb, from the transcriptional start site of mouse *TBX21*.

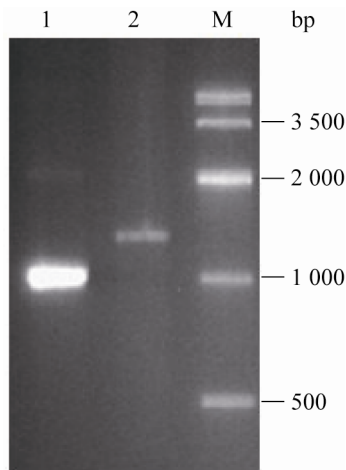


图2 TBX21-pr 和 TBX21-CNS3/4/5/6 的 PCR 产物  
Fig. 2 PCR results of TBX21-pr and TBX21-CNS3/4/5/6. 1: PCR product of TBX21-pr; 2: PCR product of TBX21-CNS3/4/5/6; M: TIANGEN DNA marker IV (MD104).

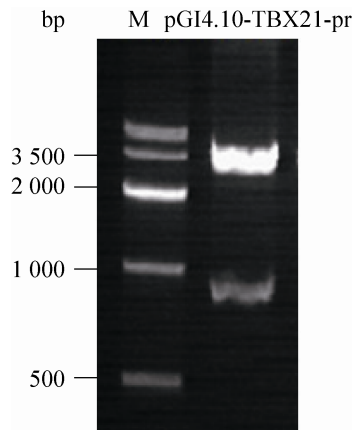


图3 重组质粒 pGL4.10-TBX21-pr 的 *Kpn* I/*Xho* I 酶切鉴定图谱

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pGL4.10-TBX21-pr digested by *Kpn* I and *Xho* I.

与 GenBank 里小鼠启动子序列完全匹配, 表明包含 TBX21 启动子报告基因载体构建成功。

#### 2.4 pGL4.10-TBX21-pr 和 pGL4.10-TBX21-pr-CNS 荧光素酶活性检测结果

pGL4.10-TBX21-pr-CNS 和 pRL-TK 共转染

表皮细胞系 293T 后, 测定萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性, 并将两者的比值, 作为衡量 TBX21 启动子活性的依据。结果显示, 与 pGL4.10 相比, 重组载体 pGL4.10-TBX21-pr-CNS 转染 293T ( $P=0.012$ ) 和 Jurkat ( $P=0.002$ ) 细胞后, 荧光素酶报告基因的表达显著增强, 两者相比, 具有显著的统计学意义。说明构建的小鼠 TBX21 启动子荧光素酶报告基因 pGL4.10-TBX21-pr-CNS 具有启动子活性 (图 5)。

目前已知 T-bet 对于 Th1 分化及相关细胞因子的表达起着至关重要的作用, 是 Th1 细胞的主要转录因子, 也是免疫系统一个重要的转录因子。目前发现 T-bet 表达存在正负调控的网络, 其正调控主要通过以下途径: 1) IFN- $\gamma$  与受体结合后, 诱导 T-bet 的表达, 而 T-bet 又可促进 CD4<sup>+</sup>T 细胞产生 IL-12R $\beta$ 2 和 IFN- $\gamma$ <sup>[15]</sup> 2) IL-12 与受体结合后, 先诱导 IFN- $\gamma$ , 然后经 IFN- $\gamma$  再

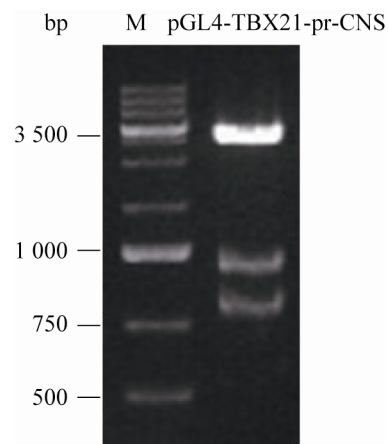


图4 重组质粒 pGL4.10-TBX21-pr-CNS 的 *Sfi* I/*Kpn* I 酶切鉴定图谱

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pGL4.10-TBX21-pr-CNS digested by *Sfi* I and *Kpn* I.

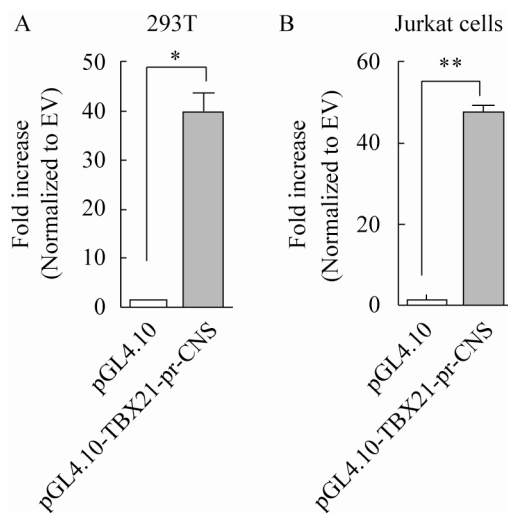


图 5 T-bet 启动子及非编码保守序列在 293T (A) 和 Jurkat 细胞 (B) 中的转录活性

Fig. 5 Transcription activity of T-bet gene promoter and CNS in 293T cells (A) and Jurkat cells (B).

诱导 T-bet 的转录；3) 与 IL-12 同源的 IL-23 和 IL-27，分别与相应受体结合后，也诱导 T-bet 的表达，而负调控主要是 GATA3 对 T-bet 的直接抑制作用<sup>[16]</sup>。T-bet 与 STAT1、STAT4、IFN- $\gamma$  在 Th1 细胞中是一种环状反馈表达关系。但这些细胞因子是如何调控 T-bet 的表达目前尚不清楚。基因的表达调控可在转录、翻译、翻译后等多个水平上，但转录调控水平最为重要。基因启动子的研究是转录调控的一个重要内容，其中启动子的克隆又是基因启动子功能研究的基础。

随着生物信息学技术的不断发展，各种生物信息学软件对启动子预测的准确率逐步提高。在预测出结果之后，再设计相应的引物用 PCR 方法，就可较为容易地克隆出目的片段。这可以大大减少实验的盲目性，提高实验效率，已被越来越多的研究者所采用。本研究前期已经对小鼠 T-bet 基因的 5'非转录区调控序列进行

了较为充分的分析，依据分析结果设计相应的引物，成功扩增出了一段长约 1 028 bp 和一段长约 1 308 bp 的片段，经过测序后证实所克隆片段 GenBank 中小鼠 T-bet 基因的 5'非翻译区序列一致。

报告基因载体的构建是研究启动子功能的一种常用手段，检测报告基因的表达量，可以直接反映所克隆片段的启动子活性<sup>[17]</sup>。报告基因常用于测定启动子对基因表达的影响及其与反式作用因子的相互作用，即将所研究的目的基因调控序列克隆到含有报告基因的表达质粒中，然后将重组质粒导入适当的细胞系，通过测定报告基因表达的水平，间接评价在调控序列指导下对基因表达的诱导作用。pGL4.10 载体多克隆位点下游含有荧光素酶基因，该基因编码萤火虫荧光素酶，在 ATP、氧气、和  $Mg^{2+}$  存在条件下氧化 D-荧光素，产生的荧光产物可以进行定量测定。将调控序列插入多克隆区域，驱动萤火虫荧光素酶基因转录表达，通过测定荧光产物的量即可反映该调控序列的转录活性。pRL-TK 包含一个编码海肾荧光素酶的 cDNA，海肾荧光素酶的表达为萤火虫荧光素酶报告基因正态化提供内对照值，以降低培养细胞数目和健康状况的差别以及细胞转染和裂解效率的差别。

本文采用的是双荧光素酶报告基因检测系统 (Dual-luciferase reporter assay system) 检测 TBX21-luc 的活性。双荧光报告系统的原理是：利用萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的酶结构及底物要求不同而选择性地区别这两种发光报告基因的活性。萤火虫荧光素酶是一个 61 kDa 单亚基蛋白，海肾荧光素酶是一个 36 kDa 大小的单亚基蛋白。利用两者底物要求的不同，先

加入萤火虫荧光素酶的底物检测其活性 (实验报告基因), 然后加入终止液, 同时加入海肾荧光素酶的底物检测海肾荧光素酶活性 (对照报告基因), 最后计算两者的比值, 从而排除转染效率和加样量的差异, 真实可靠地反映 TBX21-luc 的转录活性。

一个基因的转录需要一定大小片段的启动子序列和一系列的增强子序列。非编码区保守序列 (No-coding conserved sequence, CNS) 是最新发现的类似于增强子的序列。一些转录因子可以结合到 CNS 区调控基因的转录。很多文章有报道通过构建含基因启动子和 CNS 的荧光素酶报告基因<sup>[18-19]</sup> 验证了免疫系统中各辅助 T 细胞的分化和增殖的机制<sup>[20]</sup>。

本实验成功构建了小鼠 T-bet 启动子和保守非编码区荧光素酶报告基因, 并在细胞内鉴定了其具有启动和增强荧光素酶基因表达的活性, 为进一步研究 T-bet 表达调控机制及 EAE 中的信号转导机制等提供基本材料。

## REFERENCES

- [1] Koch MA, Perdue NR, Killebrew JR, et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*, 2009, 10(6): 595–602.
- [2] Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, et al. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature*, 2009, 458(7236): 351–356.
- [3] Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*, 2009, 326(5955): 986–991.
- [4] Chung Y, Tanaka S, Chu F, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*, 2011, 17(8): 983–988.
- [5] Linterman MA, Pierson W, Lee SK et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*, 2011, 17(8): 975–982.
- [6] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 2000, 100(6): 655–669.
- [7] Zhang WX, Yang SY. Cloning and characterization of a new member of the T-box gene family. *Genomics*, 2000, 70(1): 41–48.
- [8] Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. *Nat Immunol*, 2011, 12(7): 597–606.
- [9] Hemmer B, Nessler S, Zhou D et al. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(4): 201–211.
- [10] Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1810–1819.
- [11] Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1952–1960.
- [12] Lee E, Chanamara S, Pleasure D, et al. IFN-gamma signaling in the central nervous system controls the course of experimental autoimmune encephalomyelitis independently of the localization and composition of inflammatory foci. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 7.
- [13] Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, et al. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 2004, 200(1): 79–87.
- [14] Lovett-Racke AE, Rocchini AE, Choy J, et al. Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes. *Immunity*, 2004, 21(5): 719–731.
- [15] Afkarian M, Sedy JR, Yang J, et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 2002, 3(6): 549–557.



- [16] Mullen AC, High FA, Hutchins AS et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*, 2001, 292(5523): 1907–1910.
- [17] Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, 1990, 188(2): 245–254.
- [18] Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, et al. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol*, 2006, 8(2): 145–153.
- [19] Lewis MD, Miller SA, Miazgowicz MM, et al. T-bet's ability to regulate individual target genes requires the conserved T-box domain to recruit histone methyltransferase activity and a separate family member-specific transactivation domain. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(24): 8510–8521.
- [20] Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*, 2008, 9(11): 1297–1306.

(本文责编 陈宏宇)

—————

### 《生物工程学报》入选“中国精品科技期刊”

2014年9月26日,中国科学技术信息研究所发布了《2014年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,《生物工程学报》入选300种“第3届中国精品科技期刊”,为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

《2014年中国科技期刊引证报告(核心版)》,涵盖了1989种中国科技核心期刊2013年的评价指标。通过对影响因子和总被引频次等指标进行综合评价,《生物工程学报》综合评分列生物工程类核心期刊第一名。

