

读书报告

于若梦

2018.5.19

IF:4.2589

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Characterization of the promoter region of the bovine long-chain acyl-CoA synthetase 1 gene: Roles of E2F1, Sp1, KLF15, and E2F4

Received: 13 October 2015

Accepted: 16 December 2015

Published: 19 January 2016

Zhi-Dong Zhao¹, Lin-Sen Zan^{1,2}, An-Ning Li¹, Gong Cheng^{1,2}, Shi-Jun Li¹, Ya-Ran Zhang¹, Xiao-Yu Wang¹ & Ying-Ying Zhang¹

背景

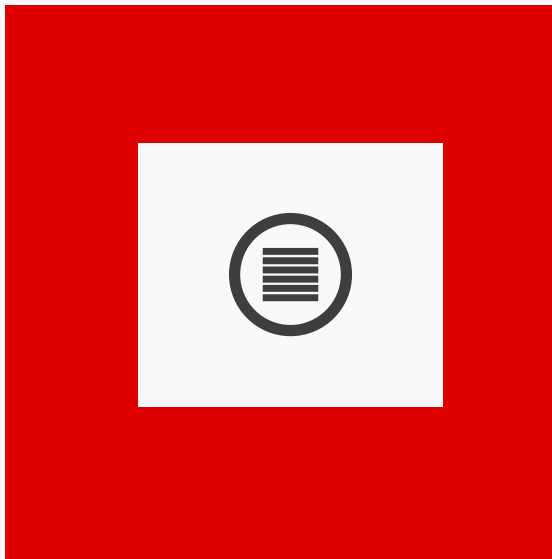
目录

结果

材料与
方法



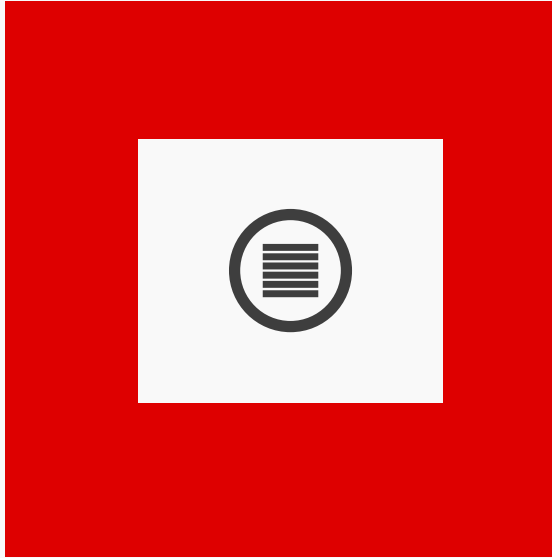
讨论



1/背景

不同类型的ACSL在组织中的分布情况及其作用

| 名称 | 分布 | 作用 |
|-------|----------------------------|--|
| ACSL1 | 肝、脂肪 | 催化AA形成AA-Co A，是参与脂肪酸沉积和甘油三酯合成的表达量最高的酰基Co A-合成酶 |
| ACSL3 | 主要表达在胎儿发育时期，内质网和胞质脂滴 (LDs) | 促进卵磷脂的合成和脂滴 (LDs) 的形成，从而调节甘油二酯的合成 |
| ACSL4 | 肾上腺和其他产类固醇器官 | 提高类二十烷酸-CoA的合成，促进类二十烷酸 (AA) 转换成PE、PI和TG的合成 |
| ACSL5 | 肝脏，十二指肠粘膜和棕色脂肪组织 | 促进脂肪酸脂酰化，从而合成DG和TG |
| ACSL6 | 脑和骨骼肌 | 催化二十二碳六烯酸 (DHA) 形成DHA-Co A，进一步合成PL和TG |



2/材料与amp;方法

1

组织表达
(RT-PCR)

2

c DNA末端扩增
(5'RACE)

3

启动子克隆和
构建突变体

4

细胞培养
和转染

5

电泳迁移率实
验 (EMSA)

材料与amp;方法

启动子克隆和构建突变体

01

设计了特异性引物以扩增牛ACSL1基因TSS上游的2.0-kb基因组区域，为其启动子区域。

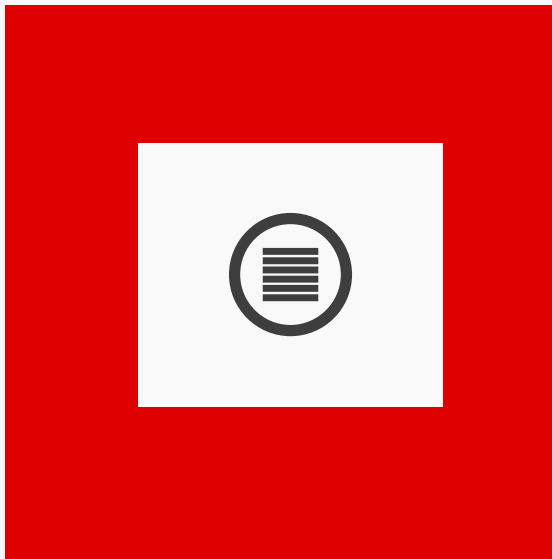
02

通过用Sac1和Xho1 (TaKaRa, Dalian, China) 消化，从T-Vector p MD19 (简单) 切下2.0kb牛ACSL1启动子片段，并连接到pGL3-1933。

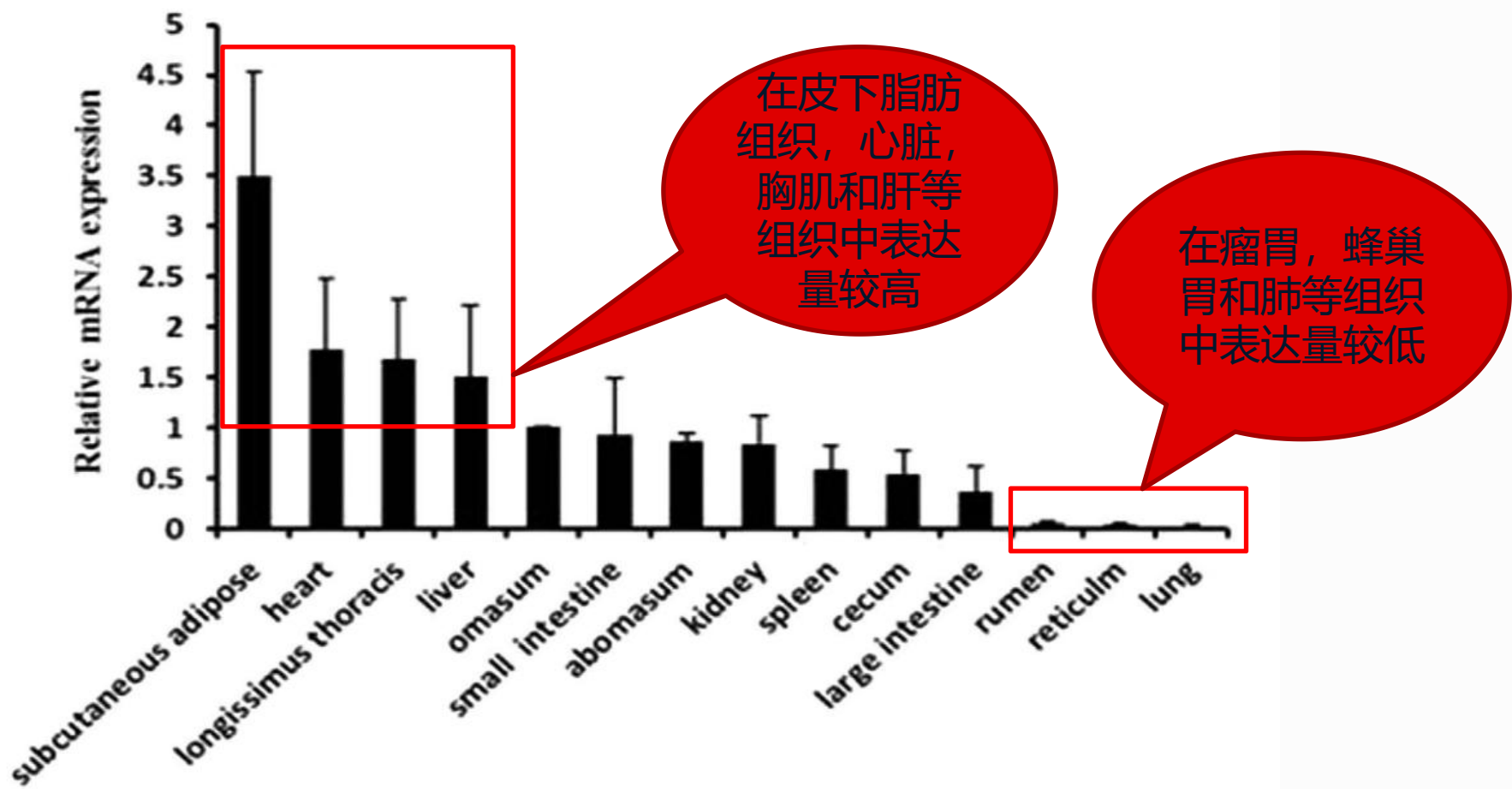
03

通过使用具有Sac1序列的特异性引物通过PCR扩增含有启动子的“单向缺失”的质粒pGG3-1328, -1034, -730, -325, -251, -207, -40和-80, Xho1限制性位点并接入p GL3-1933作为模板

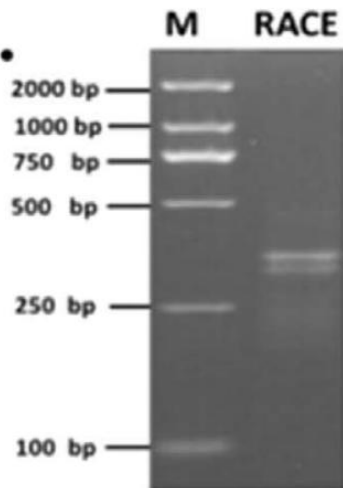
注：替换突变构建体由Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 构建。使用<http://www.genomatix.de>软件在线获取的Mat Inspector程序来分析ACSL1启动子的正链和负链上的假定转录因子结合位点，并确保定点诱变不会产生新的结合其他转录因子的位点。



3/结果



图一 ACSL1基因在牛中的组织表达差异

a.

5'-RACE鉴定ACSL1基因的TSS (转录起始位点)

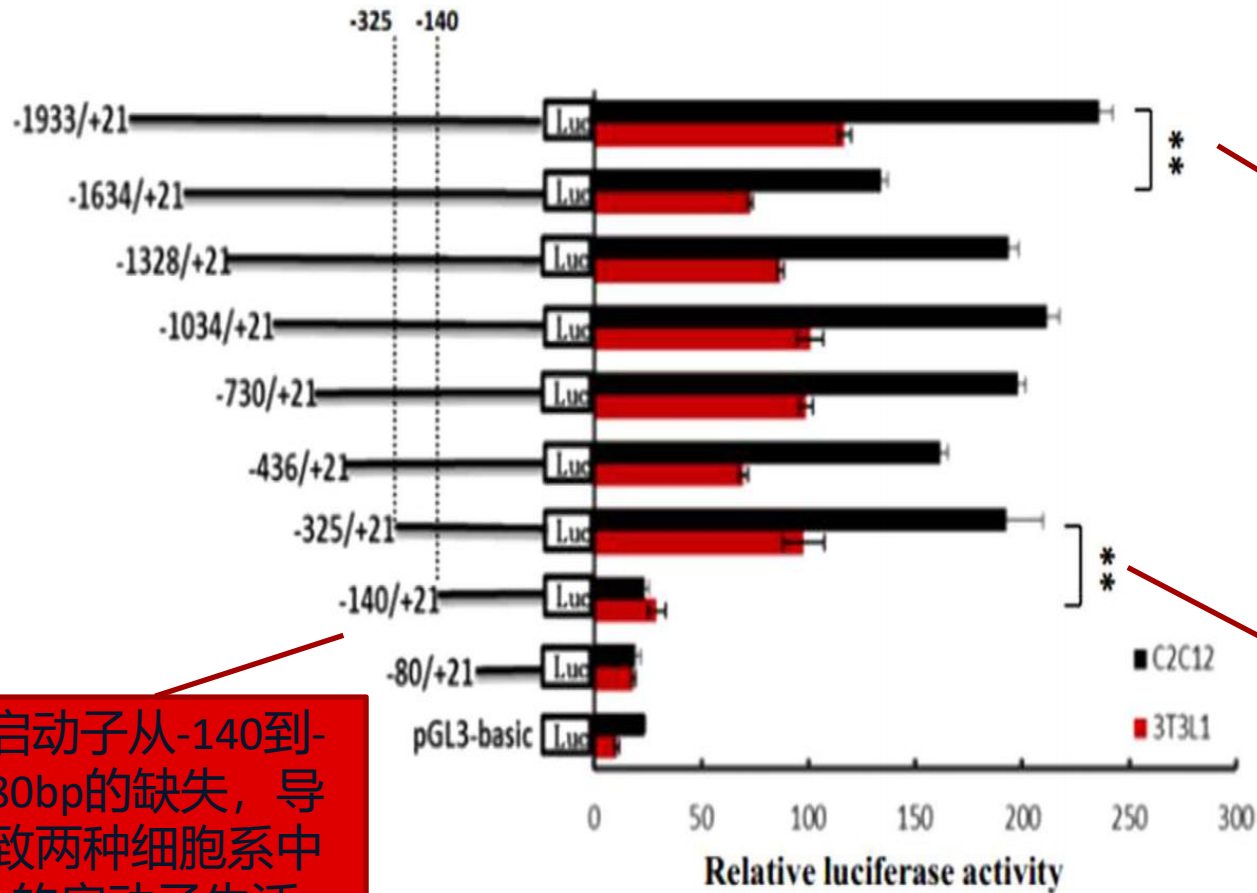
b.

5' GGCAGTGGGCTGTAGTGACAGCCGGCGGGACGGCCGGGCTGCGGAGGAgtgagtgc.....20562bp.....tcccacagACTGTGGC
 TTAGGACACTGCCAGCCAGGATGATGCAAGCCACGAGCTGTTCCAGTACTTTCGGCTGCCAGAGCTGCTTGACTTCCGGCAGTACGTGC
 GCACCCCTCCAACCAACACGCTCATGGGCTTCGGCGCATTTCGGGGCTCAACCACCTTCTGGTACGCCACGGGCCACGGGCCCTGAAGCC
 TCCATGCGACCTGGCCATGCAGTCAGTGGAGGTGCCgtaagtgg.....14455bp.....tttccagGGCAGTGATGGTCCCGGAGATC
 CACGCTCCTGGACAGTGACGAGCCCTGGTGTATTCTACGATGACGTCAGAACGTTATACGAAGGTTTCCAGAGGGGCTTACACGTGTCC
 Agtaageat.....4153bp.....cattgtagGTTGAAGATATGCCAGAGTGTGTGGGCTCAGCACTGCTCCACAAGGGCTTCAAGGCAGCT
 CCAGACCAGTTTATTGGCATCTTCGCTCAGAACAGACCTGAG...3'

RACE -ACSL1 -R2

RACE -ACSL1 -R1

图2a ACSL1基因TSS (转录起始位点)



与pGL-1933 / + 21相比, pGL-1634 / + 12启动子活性在3T3L1细胞中降低约37%, C2G12细胞中与pGL-1933 / + 21相比降低了43%

与pGL-140 / + 12相比, 3T3L1细胞中pGL-325 / + 12启动子活性降低约75%, C2C12细胞中启动子活性降低了93%

启动子从-140到-80bp的缺失, 导致两种细胞系中的启动子失活

图3 ACSL1基因核心启动区序列确定

a.

-325 ttgtgaaatccagg

-311 gcagtccgga^cgcctggagatg^cgttctgtccccgcagtg^cceccaagcttccccag^cccgct

-249 gggcacgcgctcgacgggacagcagggcagggcgcgcggctgcagggccg^ccg gagggcggg E2F1.01

-187 gctgagacgggggcgggggtc^cg gagcgggg cggggcgg ggccgggg^cggcggggcccagggc

SP1.03 KLF15 E2F4.01

-125 ggggcggggcggggcccgcgcaactggcctcagcccggctcgttaggctgcagcgagcggctgga

TATA box

-63 gcgcagccagctctcggaagcagcggdggcgcccttaaatagcatcggggaccggcagggggcc

+1 ggcagtgGGCTGTAGTGACAG

b.

-325 -239

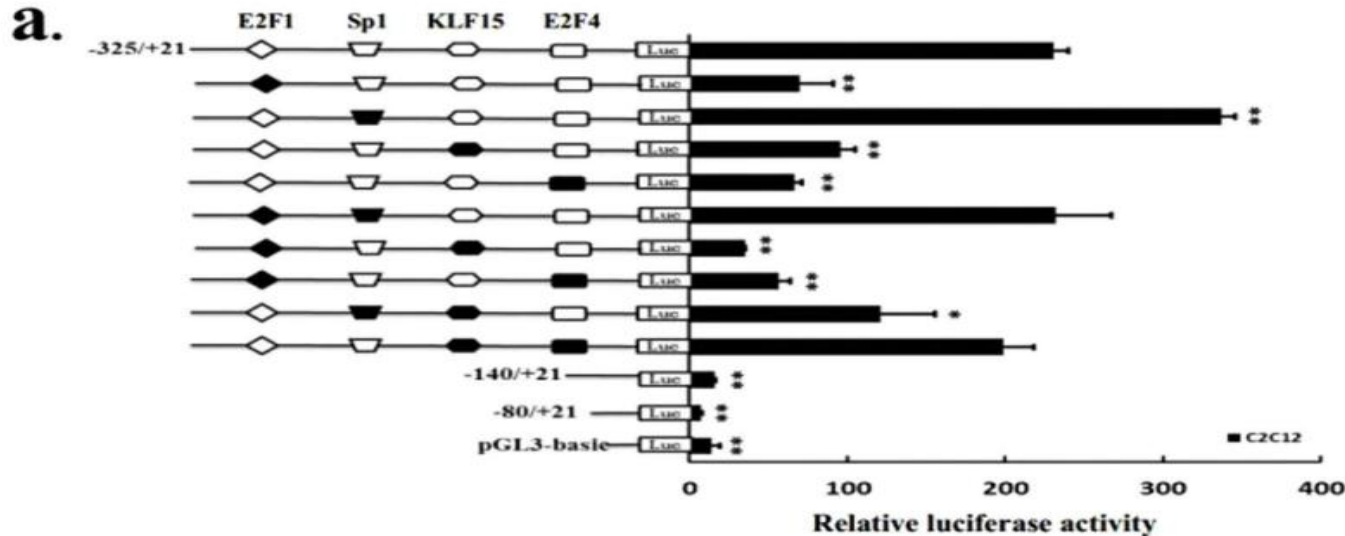
| | | |
|------------|--|--------------------------------------|
| KT232078 | TTGTGAAATCCAGGG...CAGTCCGGACGCCTGGAGATGGGTTTCGTCCCCCGCAGTGC | CCCAAGCCTTCCCG...CAGCCGCTGGCAAGCCGCT |
| Bos taurus | TTGTGAAATCCAGGG...CAGTCCGGACGCCTGGAGATGGGTTTCGTCCCCCGCAGTGC | CCCAAGCCTTCCCG...CAGCCGCTGGCAAGCCGCT |
| Pig | TTATGAAATCCAGGG...CAGTCTGGGCGACTCAGCCGGGTTTCGCGCGCCAGCCCTTCG | CCGCGGG...CACCCGCCAGCCAGCCGG |
| Human | CCGCGGGTCTGAGGG...GCTTGGATCAGCCOAGTAGGGCCGGGTTTGGGAGGCGGGAA | TGGCCCGATGGGGCCGGGACTGTAGGGAAGCCGT |
| Mouse | TTATGAAATCCCGGACAGTAGGGCTACTOAGGGGTT...TCCCAAGCCTTCCCGGAACT | CCCGACCTGCTGCAGCCGGAAGCCG |

-238 -141

| | | | |
|------------|---|--|--------------------|
| KT232078 | CGAAGGGACAGCAAGGGCAAGCGGCGCGGCTTCAGGGCCCGCC | TGAGGGGGGGCTGAGTGGGGCGGGTCCGAGCGGG | CGGGGCGGGG...CGGGG |
| Bos taurus | CGAAGGGACAGCAAGGGCAAGCGGCGCGGCTTCAGGGCCCGCC | TGAGGGGGGGCTGAGTGGGGCGGGTCCGAGCGGG | CGGGGCGGGG...CGGGG |
| Pig | G..GCPGACAGGGAGGGGGAGCGGGCCGCTCG..... | CGGGGGGGGGCTG..GGGGGGGGGGCTCG...GCGGGGCGGGG... | CGGGG |
| Human | GGGTGTGATGGGGCGGGACAGCCCTCGAAGCTGTGCG...ACAAGAGGGGGAGGACTGGCC | AGGGGAGGGGAGTTGGCGGGCTATAGATGGGGCGGGAGGAGCCCTTCG | |
| Mouse | CGAAGCTGACGGGAGGGCCAGCGGCGCGGGG..... | GTGGGGGGGAC...GTGATGTGGGGGGTGTCTCTGTATGGGGCGGGG...CCTGAG | |

E2F1 SP1 KLF15 E2F4

图4 ACSL1基因核心启动区序列分析



在ACSL1基因的核心启动区, E2F1, Sp1, KLF15和E2F4对转录有激活或抑制功能。

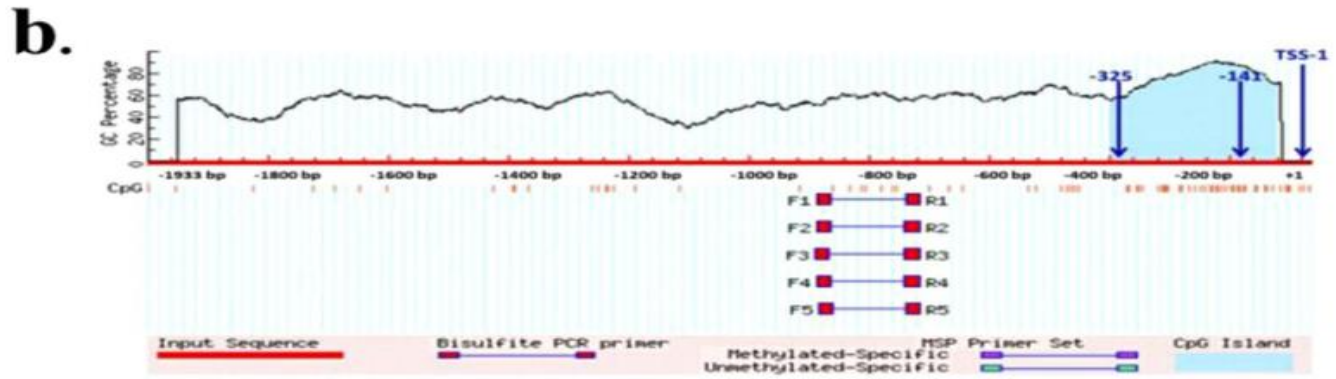


图5 ACSL1基因核心启动区序列分析

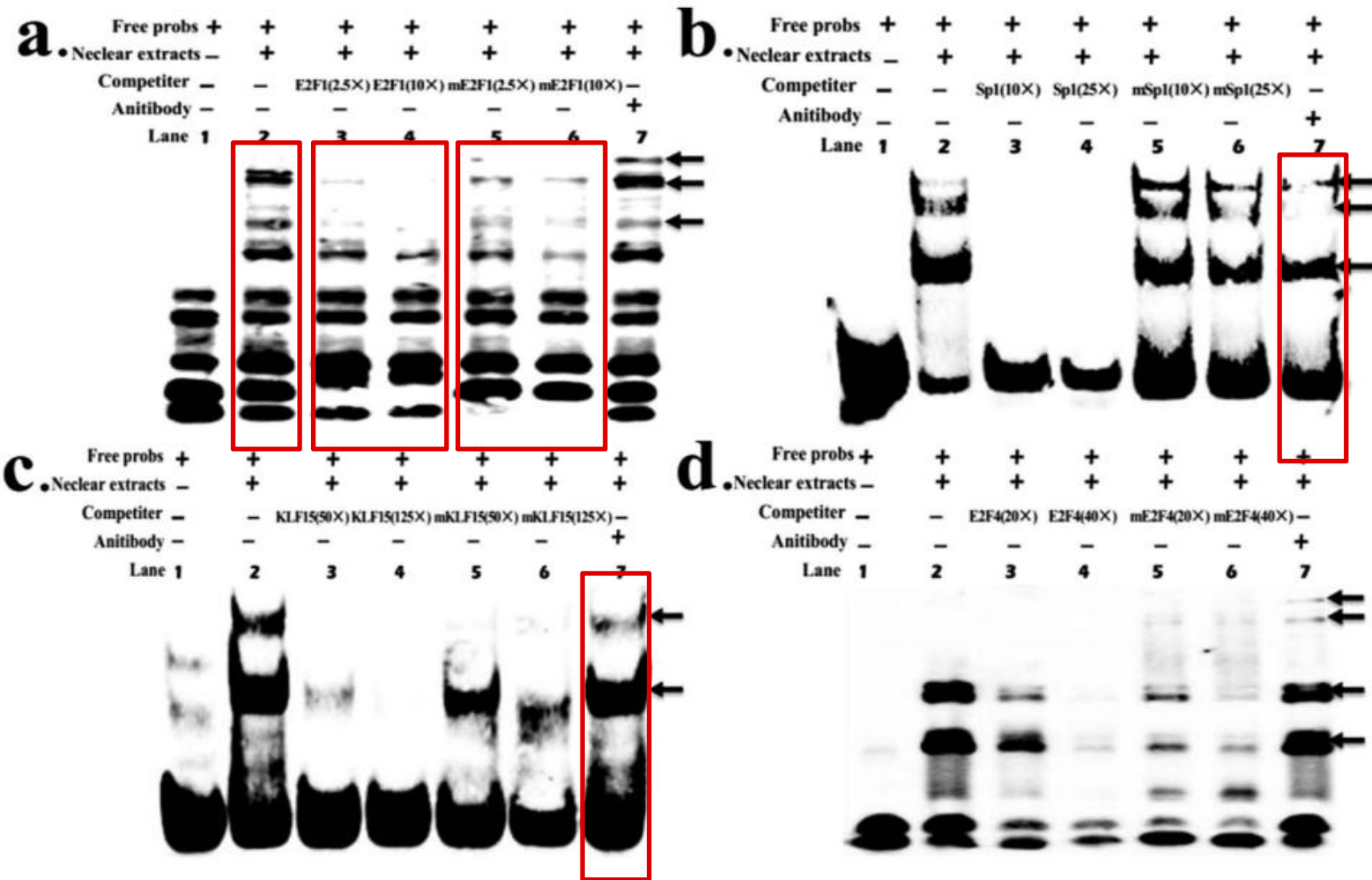
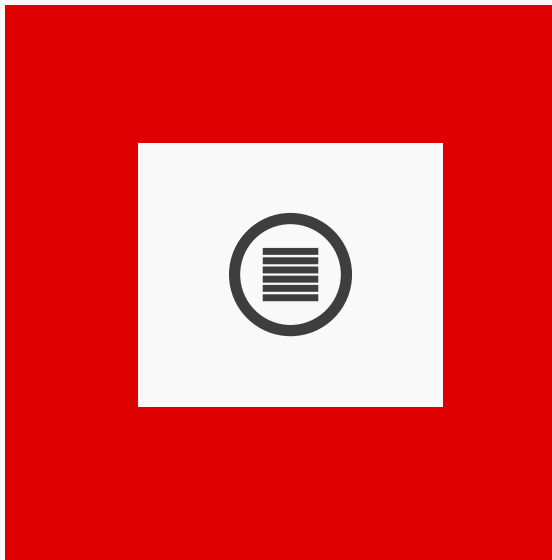


图6 E2F1, Sp1, KLF15和E2F4在体外结合ACSL1核心启动区



4/讨论

讨论

牛*ACSL1*在皮下脂肪组织中高度表达

*ACSL1*的表达由多种转录因子调节，包括*E2F1*，*Sp1*，*KLF15*和*E2F4*。

*ACSL1*启动子的遗传修饰对基因转录的影响尚待研究。



敬请各位老师同学批评指正

于若梦

2018.5.19

