

## • 药材与资源 •

## 参环毛蚓 MT-2 基因及启动子的克隆研究

张秋风<sup>1</sup>, 李 薇<sup>1\*</sup>, 龚 玲<sup>2</sup>, 黄传奇<sup>1</sup>, 陈立红<sup>1</sup>

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430000

**摘要:** 目的 揭示参环毛蚓 MT-2 基因的转录调控机制, 为今后采用基因工程技术改良参环毛蚓重金属富集性状奠定基础。方法 根据已知的 MT-2cDNA 序列, 设计特异引物, 通过 PCR 扩增参环毛蚓 MT-2 基因的编码区基因组序列, 扩增产物经测序后自行比对分析。基于该序列设计 3 条特异引物, 采用基因步移技术克隆其上游的启动子序列, 同时运用 Promoter Prediction 在线软件分析预测其顺式元件。结果 经 PCR 扩增、测序后获得 2 826 bp MT-2 基因编码区序列, 将该序列与已知 MT-2 cDNA 序列 (登录号为 KC787373.1) 进行比对, 发现 MT-2 编码区由 4 个外显子和 4 个内含子组成。基因步移技术克隆得到 1 534 bp 的启动子序列, 经 Promoter Prediction 在线软件分析, 结果显示该序列不仅含有 TATA-box、CAAT-box 等核心启动子软件, 还具有 3 个特异响应重金属参与调控 MT-2 表达的 MRE 元件。结论 参环毛蚓的 MT-2 基因能被重金属诱导表达, MT-2 基因转录水平的金属调控是通过 MT-2 基因启动子区的金属调控元件 MRE 来实现的。

**关键词:** 参环毛蚓; 重金属富集; 金属硫蛋白; MT-2 基因; 转录调控

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)16-2902-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.022

Cloning of MT-2 gene and its promoter in *Pheretima aspergillum*ZHANG Qiu-feng<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, GONG Ling<sup>2</sup>, HUANG Chuan-qi<sup>1</sup>, CHEN Li-hong<sup>1</sup>

1. College of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430000, China

**Abstract: Objective** To lay a foundation for attenuating the heavy metal accumulation in *Pheretima aspergillum* by means of genetic engineering technology in further research, we revealed the transcriptional regulation mechanism of MT-2 gene. **Methods** The coding sequence of MT-2 gene was amplified by PCR with specific primers, which were designed according to their known cDNA sequences, and the outcomes were contrastively analyzed after the sequencing process. Prior to the isolation of 5' promoter sequence by genome walking technology, three specific primers were designed based on MT-2 cDNA sequence. Meanwhile, the cis-acting elements of MT-2 gene were analyzed by Promoter Prediction online software. **Results** After PCR and sequencing processes, a 2 826 bp coding sequence of MT-2 gene were obtained, four exons and four introns were found to compose the coding area by comparing with the known MT-2 cDNA sequence (accession No.KC787373.1). Besides, after genome walking and Promoter Prediction online analysing, a 1 534 bp promoter region of MT-2 was isolated, which contained not only CAAT box, TAAT box, and other core promoter elements, but also three MRE elements which specifically response to heavy metal involved in regulating the MT-2 expression. **Conclusion** The expression of MT-2 gene in *P. aspergillum* can be induced by heavy metal, and the transcriptional level is achieved by MRE regulatory elements located in MT-2 gene promoter region.

**Key words:** *Pheretima aspergillum* (E. Perrier); heavy metal accumulation; metallothionein; MT-2 gene; transcriptional regulation

参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 是《中国药典》2015 年版地龙项下 4 种原动物之一, 因其主产于广东、广西地区, 故又称为广地龙。其

性寒凉, 味咸, 具有清热定惊、通络、平喘、利尿等功效, 广泛应用于经络不通所致脑栓塞、脑梗死、冠心病、脑卒中、关节麻痹、肢体麻木、半身不遂

收稿日期: 2015-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30772741); 广东省科技计划项目 (2009B060700006); 广州市科技计划项目 (2010Y1-C981)

作者简介: 张秋风 (1991—), 女, 硕士在读。Tel: 15876587622 E-mail: 1025610986@qq.com

\*通信作者 李 薇, 女, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: liwei-li@163.com

等疾病以及哮喘等呼吸道疾病, 是国内外药材市场中公认的地龙优品质<sup>[1]</sup>。目前广地龙和地龙药材多为野生采集, 其质量和产量容易受环境条件、自然气候、采集以及炮制等因素的影响而不稳定。其中, 环境因素里重金属超标问题一直难以控制, 极大地制约着广地龙药材的生产和发展。

金属硫蛋白 (metallothionein, MTs), 是一类广泛存在于生物中的低相对分子质量 (2 000~7 000)、富含半胱氨酸 (20%~30%)、低芳香族氨基酸的一类金属结合蛋白质, 因其具有独特的四面硫体结构可整合重金属<sup>[2]</sup>, 而成为多种生物体的重要的解毒途径。本课题组前期的研究发现参环毛蚓体内的 MTs 表达量会随着生活环境 Cd<sup>2+</sup>浓度的递增而增加<sup>[3-7]</sup>, 众多研究结果也表明 MTs 是主导参环毛蚓重金属耐受和富集的关键蛋白, 也是导致广地龙重金属超标的主要原因<sup>[8-9]</sup>。因此克隆 MT-2 5'端启动子序列来了解 MT-2 基因的转录调控机制<sup>[10-11]</sup>, 是从源头上探索解决广地龙重金属超标问题的重要研究方向, 也是近年来本团队工作的重点。

本研究通过分离克隆参环毛蚓 MT-2 基因组序列, 分析其启动子区的调控元件, 以期探索参环毛蚓 MT-2 基因的调控转录机制, 为今后用基因工程技术改良参环毛蚓重金属富集性状奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 动物材料

参环毛蚓样品来自广西省钦州市灵山县, 经广州中医药大学李薇教授鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的健康成熟活体, 实验室人工饲养 2 周。

### 1.2 养殖土壤

养殖土壤采自广州市番禺区长洲岛田间洁净土壤, 自然干燥。同时取部分土壤送青岛科标化工分析检测有限公司进行检测。土壤理化性质: 土壤 pH 值为 5.9, 有机质 76.67 g/kg, 含沙量 15.99%, 其中重金属 Cd 的量 30.0 μg/kg, 远低于国家土壤质量标准 (GB 15618-1995), 故农田土壤 Cd 的本底值可忽略。

### 1.3 试剂

Genome Walking Kit (TAKARA 公司, 批号 6108), pMD<sup>®</sup>18-T Vector (TAKARA 公司, 批号 D101A), Marker (Takara, 批号 D501A), 琼脂糖 (GENE COMPANY), Mollusc DNA Kit (美国 OMEGA 公司, 批号 D3373-01), DNA 纯化试剂

盒 (百泰克生物技术有限公司), GoldView 染料 (华齐盛生物科技有限公司), 蛋白酶 K (美国 MerCk 公司)。

称取 27 g Tris、1.86 g Na<sub>2</sub>EDTA、13.75 g 硼酸, 用去离子水配制成 250 mL 储存液, 常温储存, 得到 TBE 试剂。

称取 0.2 g 琼脂糖, 加入 20 mL 1×TBE, 于电炉上加热至融化, 冷却至 55 °C 左右, 再加入核酸染料 Goldview 1 μL, 混匀, 铺胶, 冷却至室温, 得到 1%琼脂糖凝胶。

### 1.4 引物设计

采用 Primer5 自行设计, 由北京六合华大基因科技股份有限公司和上海生工生物技术服务有限公司合成, 用无菌的去离子水溶解得到 100 μmol/L 的储存液。取适量稀释成 10 μmol/L 作为引物工作液, -20 °C 保存。

### 1.5 仪器

LDZX-50FAS 立式力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂), AUY120 电子分析天平 (日本岛津), TG16 微量高速台式离心机 (长沙湘怡离心机仪器有限公司), VS-840-1 洁净工作台 (等级 100 级, 上海讯实业有限公司医疗设备厂), PCR 仪 (杭州朗基科学仪器有限公司), WFH-203B 三用紫外分析仪 (上海驰唐电子有限公司), LSY 电热恒温水浴锅 (北京市医疗器械厂), SmartSpectmPlus Spectrophotometer 核酸蛋白检测仪、电泳仪、水平电泳槽、自动凝胶成像系统均购自美国 Bio-rad 公司。

## 2 方法

### 2.1 参环毛蚓基因组 DNA 提取

选取性成熟, 生殖环带明显的成年参环毛蚓, 吐泥 1 d。置超净工作台上, 75%乙醇简单麻醉后, 剪取尾巴处的肌肉组织约 50 mg, ddH<sub>2</sub>O 震荡洗涤 3 次, 吸水纸吸干。采用软体动物 DNA 提取试剂盒 (Omega 公司) 提取样品 DNA, 并使用 DNA 纯化试剂盒 (Biotek) 对所提取的 DNA 进行纯化。

### 2.2 参环毛蚓 MT-2 编码区序列扩增

本课题组前期研究利用 RT-PCR 及 TA 克隆技术获知了参环毛蚓 MT-2 基因的部分 cDNA 序列 518 bp, 虽然未包含内含子部分, 但为设计扩增 MT-2 基因编码区全长的引物和启动子序列的引物提供参考。根据此 cDNA 序列设计 PCR 引物 SP1: 5'-TGTTCTCGAAATTAATGCTAGCCCA-3'、QYWF: 3'-AAGGCGAGAAACTCTTTGTGGCGGA-5'。PCR

反应体系与程序如下: PCR 反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 含有 DNA 模板 5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ PCR Buffer LA Taq 5  $\mu\text{L}$ , dNTP (2 mmol/L) 5  $\mu\text{L}$ , 引物 SP1 和 QYWF 各 2  $\mu\text{L}$ , LA Taq (Takara) 0.5  $\mu\text{L}$ , 双蒸水补足体积。PCR 扩增参数为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。将 PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳 (90 V, 30 min) 检测, 将条带大小正确的样品送到上海生工科技有限公司测序, 测序获得的序列与本实验室之前克隆获得的 MT 基因 cDNA 序列 (登录号 KC787373.1) 进行比对。

### 2.3 参环毛蚓 MT-2 基因启动子序列扩增

**2.3.1 特异引物的设计** 根据“2.2”项方法获得的 MT-2 基因编码区序列, 按照 TAKARA Walking 试剂盒特异性序列设计原则设计 3 条特异性的引物序列。设计方向为需要扩增的未知区域方向, SP2 的位置应设计在 SP1 的内侧, SP3 位于 SP2 的内侧。引物序列见表 1。

表 1 MT-2 基因启动子扩增引物序列

Table 1 Amplification primers of MT-2 gene promoter

引物名称	引物序列 (5'-3')	方向
W296-1 (SP1)	TTTACACCACACCTAACGACTTCTGC	反向
W296-2 (SP2)	ATTAGATTCGTAATCTTTCTGTC	反向
W296-3 (SP3)	CGAACTCGGCTAATTCATTCGTT	反向

### 2.3.2 MT-2 基因启动子 PCR 的扩增

(1) 第 1 轮 PCR 反应: PCR 反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 含有 DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 8  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ LA PCR Buffer II ( $\text{Mg}^{2+}$  plus) 5  $\mu\text{L}$ , TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , AP1~AP4 引物 (genome walking kit 试剂盒) (100 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , W296-1 (SP1) (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 双蒸水补足体积。PCR 扩增参数为 94  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 98  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2~4 min, 共 5 个循环; 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 25  $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2~4 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2~4 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2~4 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 44  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2~4 min, 共 15 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

(2) 第 2 轮 PCR 反应: 将第 1 轮 PCR 反应液稀释 1~1 000 倍后, 取 1  $\mu\text{L}$  作为第 2 轮 PCR 反应的模板, 以 AP1 引物为上游引物, W296-2 (SP2)

引物为下游引物, 进行第 2 次 PCR 反应。PCR 反应体系与程序如下: PCR 反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 含有 DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 8  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ LA PCR Buffer II ( $\text{Mg}^{2+}$  plus) 5  $\mu\text{L}$ , TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , AP1~AP4 引物 (100 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , W296-2 (SP2) (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 双蒸水补足体积。PCR 扩增参数为 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 44  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 共 15 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

(3) 第 3 轮 PCR 反应: 将第 2 轮 PCR 反应液稀释 1~1 000 倍后, 取 1  $\mu\text{L}$  作为第 3 轮 PCR 反应的模板, 以 AP1 为上游引物, W296-3 (SP3) 为下游引物, 进行第 3 轮 PCR 反应。PCR 反应体系与程序如下, PCR 反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 含有 DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 8  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ LA PCR Buffer II ( $\text{Mg}^{2+}$  plus) 5  $\mu\text{L}$ , TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , AP1~AP4 引物 (100 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , W296-3 (SP3) (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 双蒸水补足体积。PCR 扩增参数为 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2~4 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、2~4 min, 共 15 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

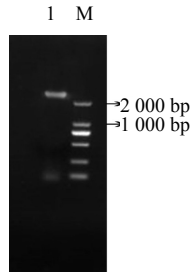
(4) 琼脂糖凝胶回收: 将 3 轮扩增的产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳 (90 V, 30 min) 检测。取第 3 轮条带大小正确的 PCR 反应产物, 使用凝胶回收试剂盒 (Bioteke), 切胶回收。再经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (90 V, 30 min) 检测回收产物, 进行 TA 克隆测序。

**2.3.3 MT 基因启动子序列分析** 采用启动子分析软件 Promoter Prediction 和 Patch 软件 (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/patch/bin/patch.cgi?>) 等对克隆得到的启动子序列进行序列分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 参环毛蚓 MT-2 基因编码区序列扩增

采用引物 SP1 和 QYWF 从参环毛蚓基因组 DNA 中扩增到长度约 2 800 bp 的片段 (图 1), 该片段送至上海生工科技有限公司进行测序, 获得总长度为 2 826 bp 的序列, 为 MT-2 基因编码区的全长。将该序列与本实验室之前克隆获得的 MT-2 基因 cDNA 序列 (登录号为 KC787373.1) 通过 NCBI 中 Blast 及手工相结合方法比对, 发现除外显子序列有几个碱基突变外完全相同, 此外该序列还包含 4 个内含子。其中, 第 1 个内含子位于

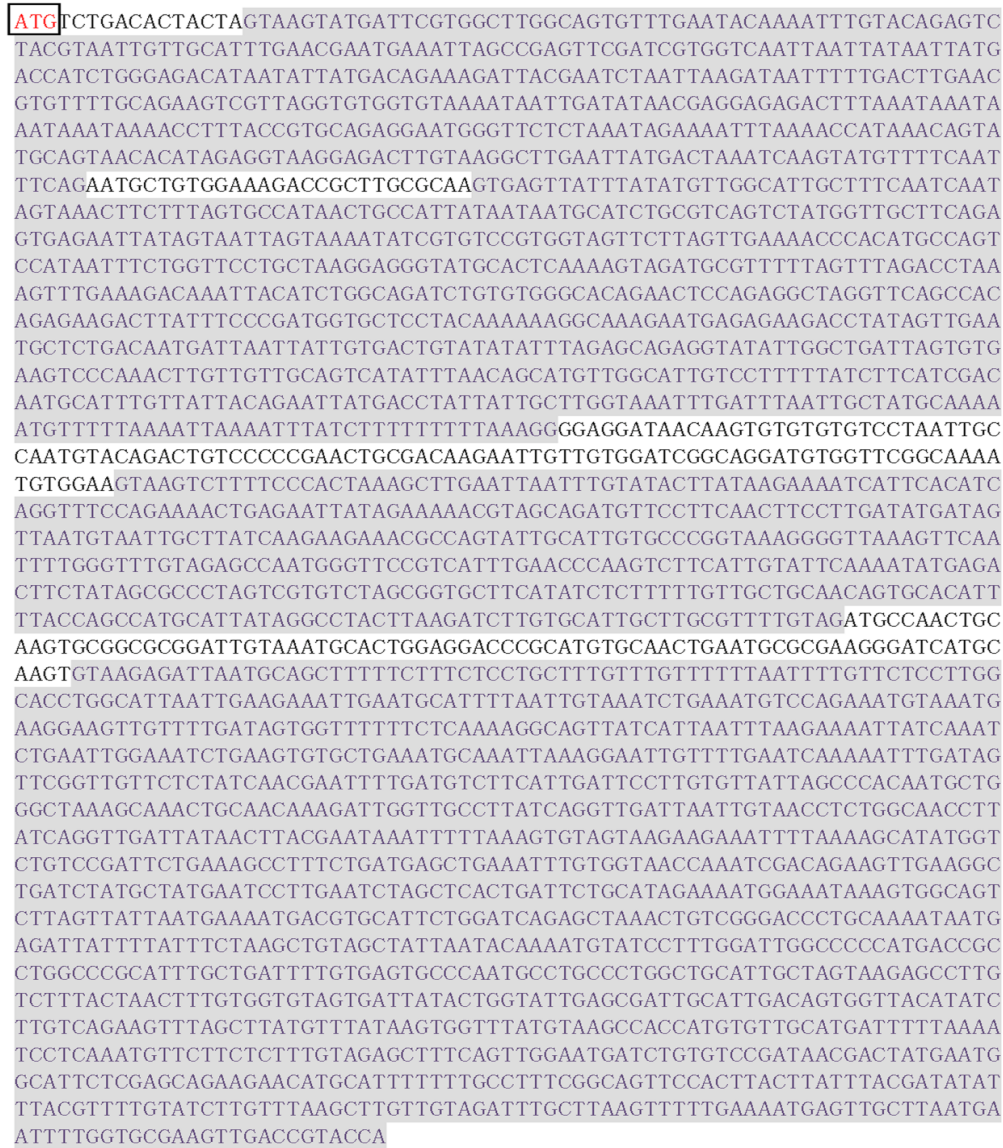


M-Marker 1-MT-2 基因 PCR 产物  
M-Marker 1-PCR products of MT-2 gene

图 1 MT-2 基因 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of MT-2 gene by PCR

基因组转录起始位点 17 bp 位置, 长度为 403 bp; 第 2 个内含子在 447 bp 的位置, 长度为 626 bp; 第 3 个内含子在 1 181 bp 位置, 长度 396 bp, 第 4 个内含子在 1 661 bp 位置, 长度 1 065 bp(图 2)。将其和可检索到的红正蚓 *Lumbricus rubellus* MT-2 基因组 3 种基因位点序列结构对比分析, 两种蚯蚓编码区的序列外显子和内含子组成数目并不相同, 参环毛蚓编码区较红正蚓多出 1 个内含子, 且两者内含子的长度相差悬殊。本研究还发现蚯蚓的第 1 和第 2 个外显子的碱基长度较哺乳动物的短 (表 2)。



阴影部分为内含子序列, 黑色方框为转录起始密码子

The sequence of intron is marked with shadows, the initiation codon is marked with black box

图 2 MT-2 基因编码区序列

Fig. 2 MT-2 gene coding sequence

表 2 蚯蚓 MT-2 基因外显子和内含子碱基比例及位置

Table 2 Percentage and location of exons and introns in MT-2 gene

物种	总基因碱基数	外显子 I/bp	内含子 I/bp	外显子 II/bp	内含子 II/bp	外显子 III/bp	内含子 III/bp	外显子 IV/bp	内含子 IV/bp
参环毛蚓	2 826	16	403	27	626	108	396	84	1 065
红正蚓	7 302~10 956	22	752~1 043	27	450~468	99	993~2 953	86	—

3.2 参环毛蚓 MT-2 基因启动子的克隆

根据 MT-2 基因的 5'端序列设计 3 个巢式的特异性引物作为反向引物，以 Genome Walking Kit 试剂盒自带的随机引物 AP1~AP4 作为正向引物，通过染色体步移法扩增 MT-2 基因的启动子序列。将 3 轮的 PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。电泳结果显示，试剂盒中的随机引物 AP3 和 3 个特异引物在 3 轮 PCR 中扩增得到较清晰明亮的条带，而采用随机引物 AP1、AP2、AP4 扩增的产物均出现抹带或无条带的现象（图 3，泳道 9、10、12）。尤其是在第 3 轮 PCR 中，只有随机引物 AP3 和特异引物 SP3 成功扩增出 MT-2 基因的启动子（图 3，泳道 11），长度约 1 600 bp。将产物进一步纯化后连接至 T 载体进行 TA 克隆，随机挑选阳性克隆测序。获得了一个长度为 1 646 bp 的序列，将其自行拼接后与参环毛蚓的 MT-2 基因编码区序列比对，两者间有 112 bp 的重复序列，表明其为参环毛蚓 MT-2 基因的 5'端序列。

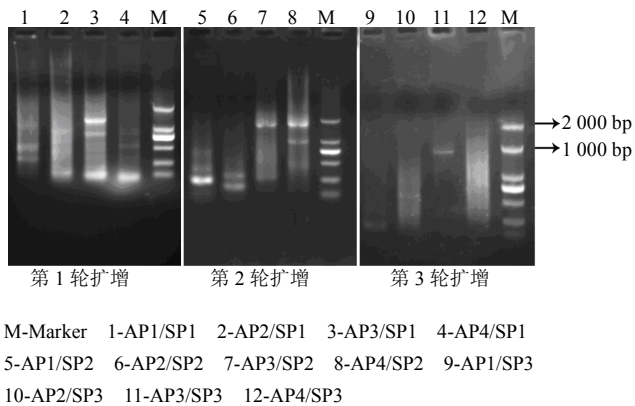


图 3 MT-2 基因启动子 PCR 扩增

Fig. 3 Amplification of MT-2 promoter by PCR

3.3 参环毛蚓 MT-2 基因启动子序列分析

将克隆分析得到的 1 646 bp 序列，经 Promoter Predictions 软件分析后（<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/signal/>）发现，MT-2 基因启动子除具有一般启动子含有的作用元件：RNA 聚合酶的结合位点 TATA box 和调控基因转录起始频率的 CAAT box 外，还有很多潜在的顺式作用元件如 SP1、Ap-1、

abaA 等转录因子结合位点，都是基础启动子所具有的转录激活因子。此外，还发现 3 个 MTF 的结合位点，即典型的 MT 基因启动子所具有金属响应元件 MRE 的序列（TGCRNC）。将主要的转录因子结合位点标注在克隆得到的序列中，发现参环毛蚓 MT-2 的 MRE 主要位于启动子-212~-215、-1 425~-1 382 以及互补链-380~-374 的位置处（图 4）。然而其拷贝数目远没有哺乳动物报道的 4~6 个之多，说明蚯蚓的 MT 基因的调控机制与哺乳动物可能存在着差异。

4 讨论

基因的表达模式和水平取决于启动子的顺式作用元件，故获得 MT-2 启动子序列是揭示 MT-2 基因的转录调控机制的基础。本研究通过基因步移技术，自行设计 3 个特异引物进行扩增，其中只有随机引物中的 AP3 和自行设计的引物能扩增出目的序列，由此可见，启动子的成功克隆引物是关键。

在脊椎动物中，所有 MT 基因启动子区都具有典型的 MRE 保守序列。本研究对获知的 MT-2 启动子序列进行分析，发现该序列不仅含有 TATA-box、CAAT-box 等核心启动子软件，还具有 3 个与脊椎动物类似能特异响应重金属启动 MT-2 表达的 MRE 元件，表明参环毛蚓可能具有脊椎动物同样的 MT-2 基因的调控方式，且 MRE 是实现其转录水平调控的核心元件<sup>[10-12]</sup>。因此，MT-2 启动子及其 MRE 的克隆和鉴定，对于研究广地龙重金属富集机制和利用基因工程技术改良蚯蚓重金属超富集性状有着重要意义。

目前蚯蚓种属中唯一明确 MT-2 基因启动子序列的物种是红正蚓 *L. rubellus* Hoffmeister，且与参环毛蚓亲缘关系较近，故将二者进行比较，发现两者的 MRE 元件拷贝数量一致，但分布位置不同，参环毛蚓的 MRE 分别在转录起始位点上游的-212~-215、-1 425~-1 382 以及互补链-355~-362 位置处，分布成近端和远端，而红正蚓的 MRE 则集中位于近起始密码子-350 bp 以内，形成近端集群<sup>[13]</sup>。有文献报道 MRE 分布位置的不同，其活性及重金属响应活性不尽相同。如银鱼 MT-2 启动

```

-1 534 ACTGAAAATGTTTCGTGAAGAAGGTGTTATGTAATACGTATCTGACAATGATATTCCTAT
-1 474 TAACTGTGACTACTATCTGTATCTGTGAGGCGTTGTTAGTAT TGCACGC TTTTGTGGAA
                                     MRE
-1 414 GTTTTTGAAGTTAAGGGTTAGATGTTTTTGTCAAAATGATTCAATTTCTCAA TATA TTT
                                     TATA-box
-1 354 AATGAGAGATGTTGGAACCAGACAGTGAATTTGTTTCAGTGTGCTGTCATTACAAATTTTG
-1 294 ATCAACCTTTATGAAT TATA CATTCTGGTGTCCGAGTTTCAGTGTGTTGGGTAAGCAAC
                                     TATA-box
-1 234 TACGAACCCAGTCATACCATTCAACTTTCAGTGGGTGAT TATA TTGATTCTTGGGATAA
                                     TATA-box
-1 174 AAGTTAAGAGCTTTCATTATCCACCATTCTGGAAAGTCTATGTTCAAGCAGTATCAAACC
-1 164 ACTTGTAATAAACCACGTTTTGGCTAAATATTTGATTTCTGAGTGGTGTTCGAATTTGG
-1 054 CTGAAAACCAAAGGCCTTTCATGATGGAAAGGAAAGATCATTTTGCTCTGAAGGAATGT
-094 TTCGATAATTACAGTCACATATTTGGCTATTTTCATATGTGTTATGACAACCTTCTGAAGA
-094 CTTTAATACATCTCTTGGCTGTGTATTGGTTTGGGATAGCGCTTCGCATTCCACCAGCA
-084 GAAGGGATGAAGGCCTTCGGTTTTTCCATAGAGCTTGCCAAAATAAAGGCAGGCGC TATA
                                     TATA-box
-084 TAAGTCCCTTATTACCTTACATTAGTAACATTACAGAAGCCACCTGTCCAACGGGGACCT
-074 ATTCTAAAAGCTTCGACCAAAGTGTGTTGATGGCAGGCCTACTTCATATCCATCAGCAA
-064 GTCTAGGTCAGGGATGCCAAAGACTGGATCTAGAAACTTAGGCATAATTACTCATTACGA
-064 CCCCATTAAACCATTCTTTAGATTACAATC TATA GACGCGTACAAATATTCCATTCTGT
                                     TATA-box
-054 CTCAAAGTATTCATTCTGTTTTTAAGACGAAATGGAATATTTGTAACGTATGAGTCAT
-054 GACATACATTCTAAGTAAATAAACCACGTGACGAAGAAAAACTTGAGACGCAATATTAC
-044 ATAGATTTTCTTAACATCAACTAATTTGTTTTAAATCTTTGAAATCACTTAGTTTACT
-034 AATACAGGCATAAG TGTGCA TTTAGAAACATAATAGTAATTTCAAAATTTAATTAGCGCT
                                     CACACGT MRE
-034 AAAAAATTTGCTCGTCTGTCTAACATACGAGACAAACATATTTCTGAGATCGTCGGTCT
-024 AGTAATATTTGGACTACGTCAAGGGTTTGTGCTCAAACCTTGGGCTTTTCACTCGGCGTT
-024 TGT TGCACAC GGCACCTTAGGGCCGGGCGAAACGTGCAGACCGACTGCAGAC CAAT CAGT
                                     MRE CAAT-box
-014 GATCGTCTTCGTGTCTCTGGAAGCGCCAGC CAAT CAGATCGAGCGAAGCGACCCAGTTT
                                     CAAT-box
-094 TAGATGGCTATTTAAACCCTCGAAGTCTCCTCATGAGACAAATTAATTTTGAATTTTCAT
                                     +1
-034 CAATTGAAGCGGAGAAACTCTTTGTGGCGGAAAGATG
    
```

起始密码子以+1 标出，已鉴定的顺式作用元件用黑框标示，其对应的名称在黑框下方标出

The initiation codon ATG is marked with +1, the identified cis-acting element is marked with black boxes under which the name of the elements is present

图 4 MT-2 基因上游调控序列及预测的顺式作用元件

Fig. 4 Upstream nucleotide sequence of MT-2 gene and predicted cis-regulatory elements

子在均含有位于近起始密码子位置近端和远端的 MRE 时诱导活性最强，然而只有近端的 MRE 能够响应金属<sup>[14]</sup>。由此表明，2 种蚯蚓 MT-2 基因响应重金属诱导表达的方式可能稍有不同。

本研究通过克隆和分析参环毛蚓 MT-2 基因的启动子序列，在分子层面阐明了 MT-2 基因的的转录调

控机制，还进一步在本实验室所建立的肠上皮细胞 (IEC) 培养系统基础上研究 MT 基因表达调控过程，但局限于实验条件，使得构建启动子的荧光素酶载体未能顺利转染。以期在今后的研究中，优化已建立的参环毛蚓 IEC 培养体系，逐步解决这些问题，以期从多层面阐明 MTs 介导参环毛蚓重金属富集机制。

## 参考文献

- [1] 林小桦, 李 薇, 侯雪芹, 等. 参环毛蚓细胞原代培养灭菌方法的研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(3): 264-267.
- [2] Ngu T T, Sturzenbaum S R, Stillman M J. Cadmium binding studies to the earthworm *Lumbricus rubellus* metallothionein by electrospray mass spectrometry and circular dichroism spectroscopy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(1): 229-233.
- [3] 吴 波, 李 薇, 付玉梅, 等. 重金属镉对参环毛蚓胃肠道上皮细胞超微结构损伤的研究 [J]. 中药材, 2011, 34(12): 1833-1837.
- [4] 郭永灿, 王振中, 赖 勤, 等. 株洲工业区土壤重金属污染与蚯蚓同工酶的研究 [J]. 应用生态学报, 1995, 6(3): 317-322.
- [5] 牛明芬, 崔玉珍. 蚯蚓对垃圾与底泥中镉的富集现象 [J]. 农村生态环境, 1997, 13(3): 54-55.
- [6] 李 薇, 沈 克, 杨洁瑜, 等. 广地龙对重金属富集特性的初步研究 [J]. 中药材, 2007, 30(5): 519-521.
- [7] Morgan J E, Morgan A J. Zinc sequestration by earthworm (Annelida: Oligochaeta) chloragocytes. An in vivo investigation using fully quantitative electron probe X-ray micro-analysis [J]. *Histochemistry*, 1989, 90(5): 405-411.
- [8] 吴 波, 李 薇, 江庆萍, 等. 金属硫蛋白在参环毛蚓不同组织中的表达研究 [J]. 中国药房, 2012, 23(15): 1345-1347.
- [9] 李 维, 李 薇, 吴文如, 等. 4 种重金属对参环毛蚓金属硫蛋白诱导特性的研究 [J]. 中国药房, 2013, 24(15): 1348-1350.
- [10] Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, et al. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter [J]. *EMBO J*, 1993, 12(4): 1355-1362.
- [11] Andrews G K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(1): 95-104.
- [12] Wimmer U, Wang Y, Georgiev O, et al. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione [J]. *Nucl Acids Res*, 2005, 33(18): 5715-5727.
- [13] Sturzenbaum S R, Georgiev O, Morgan A J, et al. Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, 38(23): 6283-6289.
- [14] Scudiero R, Carginale V, Capasso C, et al. Structural and functional analysis of metal regulatory elements in the promoter region of genes encoding metallothionein isoforms in the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* (icefish) [J]. *Gene*, 2001, 274(1/2): 199-208.