

脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子克隆及其转录调控分析

宋崇阳¹, 张思勉¹, 李永闯¹, 张攀¹, 赖晓芳¹, 王攀攀^{1,2,3}, 于飞⁴,
高焕^{1,2,3}, 阎斌伦^{1,2,3}

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005; 3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014; 4. 连云港市海洋与渔业发展促进中心, 江苏 连云港 222005)

摘要: 为探明脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) *Dnmt2* (DNA methyltransferase2, *Dnmt2*)启动子对 *Dnmt2* 转录的调控作用, 本研究利用染色体步移技术克隆得到脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子, 使用在线软件预测该基因启动子区域的转录调控元件及转录因子结合位点, 通过构建一系列缺失表达载体, 利用双荧光素酶报告基因检测技术鉴定了该基因核心启动子区, 并对其启动子活性进行检测。结果表明, 克隆的脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子长度为 1315 bp, 转录起始位点“*A*”位于 ATG 上游 236 bp, 启动子区域含有多重转录因子结合位点, 包括 STAT3、SOX、NF- κ B、E2F、GATA-1 等, 但缺乏 CpG 岛。双荧光素酶报告基因检测显示, *Dnmt2* 核心启动子区位于-196~+81 bp, 对启动子区域进行活性检测发现, 在该基因启动子-640~-452 bp 区域内可能存在促进基因表达的转录调控元件, 而在-1160~-640 bp 区域可能存在抑制该基因表达的转录调控元件。本研究结果为进一步研究 *Dnmt2* 启动子的表达调控机制提供理论依据。

关键词: 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*); *Dnmt2*; 核心启动子; 启动子活性; 转录调控元件

中图分类号: Q785; S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)05-0095-09

DOI: 10.11759/hyxx20211207001

DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)以活性甲基化合物 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体, 将甲基基团催化并转移到 DNA 特定碱基上的表观遗传修饰过程^[1], 在基因印迹^[2]、X 染色体失活^[3]和维持染色体结构完整性^[4]等方面发挥重要作用。DNA 甲基转移酶在生物体内由甲基化转移酶基因表达而来, 已知生物基因组中含有多种 DNA 甲基化转移酶基因, 包括 *Dnmt1*、*Dnmt2* 和 *Dnmt3* 等^[5], 其中 DNA 甲基转移酶 2 基因(DNA methyltransferase2, *Dnmt2*) 在各类真核生物中广泛存在, 含有 DNA 甲基转移酶的所有特征性保守基序, 是 DNA 甲基转移酶基因家族进化过程中最保守的家族成员^[6]。研究发现, DNMT2 还具有催化 tRNA 甲基化的功能^[7]。在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中的研究显示, *Dnmt2* 在卵巢中的表达量显著高于其他组织, 胚胎早期发育阶段中表达量显著高于其他发育阶段, 表明其可能在罗氏沼虾早期胚胎发育中起调节作用^[8]。对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) *Dnmt2*

基因于不同组织及发育阶段的表达分析中同样发现, *Dnmt2* 在三疣梭子蟹胚胎、幼体和性腺发育调控中可能具有重要作用^[9]。基因的表达受多种调控机制影响, 启动子是最主要的调控方式之一, 真核生物的启动子是一段位于结构基因 5'端上游的 DNA 序列, 含有 RNA 聚合酶特异性结合和转录起始所需的保守序列, 决定基因转录起始的位置^[10]。通常情况下, 转录因子通过与启动子上特定序列的结合,

收稿日期: 2021-12-07; 修回日期: 2022-02-22

基金项目: 江苏海洋大学江苏省海洋生物资源与环境重点实验室开放课题基金资助(SH20191203); 江苏省优势学科建设工程资助项目(PAPD); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX20-2877); 江苏海洋大学大学生创新创业训练计划项目(SZ202111641631003)

[Foundation: Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, No. SH20191203; Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, No.PAPD; Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province, No. KYCX20-2877; Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Jiangsu Ocean University, No. SZ202111641631003]

作者简介: 宋崇阳(1994—), 男, 硕士研究生, 山东潍坊人, 主要从事甲壳类生物遗传育种研究, 电话: 15261341815, E-mail: songchy@yeah.net; 阎斌伦, 通信作者, E-mail: yanbinlun1962@163.com

将来自细胞表面的信息传递至核内基因, 促进或抑制相关蛋白的转录^[11], 启动子区域的元件组成和其所具有的功能对于基因的表达和转录环节的调控至关重要^[12, 13]。

目前, 有关 *Dnmt2* 转录调控的研究较少, 尤其在甲壳动物中。脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) 广泛分布于中国沿海海域, 具有繁殖能力强、生长周期短、环境适应性广的特点。近年来, 在传统虾类养殖难度增加、利润下降的情况下, 脊尾白虾养殖产量增长迅速, 已成为中国沿海地区池塘单养或混养的重要品种^[14, 15]。本课题组前期克隆获得脊尾白虾 *Dnmt2* cDNA 全长序列 1 321 bp, 同源序列比对发现与罗氏沼虾 *Dnmt 2* 同源性最高为 78.67%, 进一步通过构建 NJ 系统进化树, 显示与罗氏沼虾 *Dnmt 2* 聚为一支。在此基础上, 本研究通过染色体步移技术克隆得到脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子序列, 运用生物信息学方法预测转录因子结合位点和 CpG

岛位点, 构建了相应的报告基因验证启动子活性, 为进一步揭示 *Dnmt2* 转录调控的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用脊尾白虾为实验室自繁而来个体, HEK293 细胞为本实验室保存。

1.2 实验方法

取脊尾白虾新鲜肌肉组织, 液氮研磨后用动物基因组 DNA 快速抽提试剂盒(生工生物工程)提取 DNA。根据本课题组克隆获得的脊尾白虾 *Dnmt2* cDNA 全长序列, 利用 PrimerPremier 5.0 设计步移引物(表 1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用 Genome Walking Kit(TaKaRa)试剂盒对 *Dnmt2* 启动子序列进行克隆。

表 1 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子区扩增引物

Tab. 1 Primers used to amplify *Dnmt2* promoter in the *E. carinicauda*

引物名称	引物序列(5'→3')	片段长度/bp	退火温度/°C	延伸/s	用途
1st-SP1	CTGAGACAGTTTTTGAAGAAGATCA		60.1		
1st-SP2	ATCCGGAGCAAAAGCTTCCAGATTG	1 197	68.9	2 min	第一次步移扩增
1st-SP3	GTGTTGATTTTCGTAGCTTCCGACGA		65.7		
2nd-SP1	CGTTTCACAACATTTTCCAACGCCT		68.4		
2nd-SP2	CCAGAAGTGTTAAAACCTGAACGAG	614	61.7	2 min	第二次步移扩增
2nd-SP3	AGAATAGCGGTTGCCTATCACCATG		67.8		

1.3 序列分析

利用在线分析网站 BDGP(https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)预测 *Dnmt2* 启动子序列起始位点, 使用 JASPAR(<https://jaspar.genereg.net/>)、TFBIND(<https://tfbind.hgc.jp/>)和 AnimalTFDB3.0(<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/AnimalTFDB/#/>) 预测分析启动子转录调控位点, 通过 MethPrimer(<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 预测 CpG 岛。

1.4 启动子活性分析

1.4.1 启动子不同截短体的构建

根据克隆得到的脊尾白虾 *Dnmt2* 的启动子序列, 设计启动子区域不同长度片段扩增引物, 引物序列见表 2。上下游引物 5'端分别添加 *MluI* 和 *SmaI* 酶切

位点(加粗字母表示), 酶切位点前添加保护碱基, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

以提取的 DNA 为模板, 使用 *Dnmt2* 启动子不同长度片段的扩增引物进行 PCR 扩增, 得到片段 D1、D2、D3、D4 和 T1、T2、T3、T4。使用 *MluI* 和 *SmaI* 快切酶(生工生物工程, 上海)分别双酶切片段 D1~D4、T1~T4 和 pGL3-Basic 质粒, 利用 T4 连接酶连接构建重组质粒, 并转化至 DH5 α 感受态细胞(Vazyme, China), 将菌液 PCR 筛选得到的阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。利用质粒小提试剂盒(生工生物工程, 上海)提取测序结果正确的阳性质粒, 使用 *MluI* 和 *SmaI* 快切酶进行双酶切验证, 将构建成功的重组质粒分别命名为 pGL3-Basic-D1~D4 和 pGL3-Basic-T1~T4。

表 2 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子不同长度片段克隆引物

Tab. 2 Primers used to amplify deletion fragments of the *E. carinicauda Dnmt2* promoter

片段名称	引物名称	引物序列(5'→3')	片段长度/ bp	退火温度/ °C	延伸/s	扩增区域/bp
D1	D-F-1	CGACGCGTGAATTTAGTCGTAAGAATTTTCTTA	307	65	30 s	-215~+92
	D-R-1	TCCCCCGGGATGGAGTGTACAAACAGTCACTTT				
D2	D-F-2	CGACGCGTAGAGCGATTTACTCGTTCAGGTTTT	533	68.1	40 s	-452~+81
	D-R-2	TCCCCCGGGCAAACAGTCACTTTACTATTATCTA				
D3	D-F-2	CGACGCGTAGAGCGATTTACTCGTTCAGGTTTT	346	68.1	30 s	-452~-106
	D-R-3	TCCCCCGGGTACTGTACTGTATGGTTTTTCATTC				
D4	D-F-2	CGACGCGTAGAGCGATTTACTCGTTCAGGTTTT	256	68.1	25 s	-452~-196
	D-R-4	TCCCCCGGGAAATTCTTACGACTAAATTCACACA				
T1	T-F-1	CGACGCGTGAACCAACTAAACATAATCTTCCAG	1 407	65.5	1 min30 s	-1315~+92
	D-R-1	TCCCCCGGGATGGAGTGTACAAACAGTCACTTT				
T2	T-F-2	CGACGCGTTTGTTCGTACATAGATACAAACCAT	1 032	63.7	1 min15 s	-940~+92
	D-R-1	TCCCCCGGGATGGAGTGTACAAACAGTCACTTT				
T3	T-F-3	CGACGCGTATTGATTTTATTCTGGATAAGTATT	732	64.8	1 min	-640~+92
	D-R-1	TCCCCCGGGATGGAGTGTACAAACAGTCACTTT				
T4	D-F-2	CGACGCGTAGAGCGATTTACTCGTTCAGGTTTT	544	68.1	45 s	-452~+92
	D-R-1	TCCCCCGGGATGGAGTGTACAAACAGTCACTTT				

注: 加粗字母表示酶切位点

1.4.2 细胞培养及瞬时转染

使用含有 10%血清、1%双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 完全培养基(生工生物工程, 上海), 于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 HEK293 细胞。细胞生长至指数生长期时, 接种于 24 孔板中, 待细胞完全贴壁生长至约 80%汇合时, 使用转染试剂 ExFect Transfection Reagent (Vazyme, China)进行瞬时转染, 内参质粒为 pRL-TK, 分别将重组质粒和空载质粒与内参质粒以 100 : 1 的比例共转染到细胞中, 每个样品做 3 次重复, 转染 32 h 后收集细胞, 使用 Dual Luciferase Reporter Assay Kit (Vazyme, China)报告基因活性检测试剂盒进行双荧光素酶活性检测。

1.4.3 双荧光素酶活性测定

待转染 32 h 后, 吸弃细胞培养基, 用 PBS 洗涤两次, 每个孔加入 100 μL 细胞裂解缓冲液, 室温静置裂解 5 min, 吹打并吸取细胞裂解产物至 1.5 mL 离心管中, 12 000 g 常温离心 2 min 后, 取上清用于后续检测。首先进行萤火虫荧光素酶反应检测: 将 100 μL 平衡至室温的荧光素底物加入检测管中, 小心吸取 20 μL 细胞裂解上清至检测管中, 迅速混匀后立即于发光检测仪(Promega GloMax 20/20)中检测萤火虫荧

光素酶报告基因活性。再进行海肾荧光素酶反应检测: 在以上反应液中加入 100 μL 新鲜配制的海肾底物工作液, 迅速混匀后立即于发光检测仪中检测海肾荧光素酶报告基因活性, 记录结果。

1.4.4 统计分析

启动子的相对活性用萤火虫荧光素酶的值/海肾荧光素酶的值表示。实验数据利用 SPSS22.0 进行统计学分析, 使用 Origin9.0 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子序列的克隆和生物信息学分析

通过染色体步移克隆获得 *Dnmt2* 启动子序列, 从翻译起始密码子(ATG)起向上游共 1 551 bp。对序列进行生物信息学分析, 结果显示: 转录起始位点是位于 ATG 上游的第 236 个碱基“A”, -26 bp 处发现 TATA-box, 分析启动子序列发现, *Dnmt2* 启动子含有多个转录因子结合位点, 包括 STAT3、NF-κB、E2F、GATA-1 和 SOX 等(图 1)。用在线软件 MethPrimer 预测启动子区域 CpG 岛(检索标准: Islands size>100.0、GCPercent>50.0、Obs/Exp>0.6), 结果显示本研究获得的 *Dnmt2* 启动子区域中不含 CpG 岛。

2.2 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子区不同长度片段的扩增

以脊尾白虾基因组 DNA 为模板, 用引物 D-F-1 和 D-R-1 扩增片段 D1(-215 bp~+92 bp), 引物 D-F-2 分别于 D-R-2、D-R-3 和 D-R-4 扩增片段 D2(-452 bp~+81 bp),

D3(-452 bp~-106 bp)和 D4(-452 bp~-196 bp), 引物 T-F-1, T-F-2, T-F-3 和 D-F-2 分别与 D-R-1 扩增片段 T1(-1315 bp~+92 bp), T2(-940 bp~+92 bp), T3(-640 bp~+92 bp)和 T4(-452 bp~+92 bp), PCR 产物大小分别与预期设计的长度一致(图 2), 表明成功获得目的 DNA 片段。

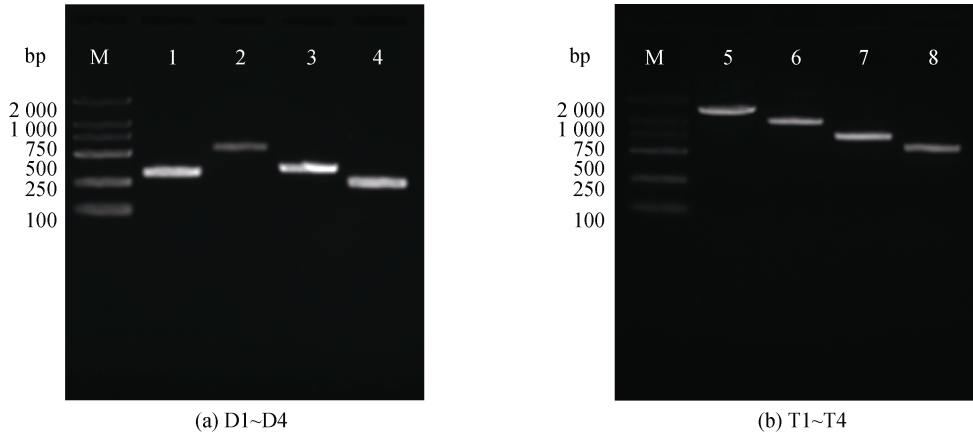


图 2 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子不同长度片段的扩增(M. DL2000 DNA Marker)
Fig. 2 Amplification of *Dnmt2* promoter deletion fragments of the *E. carinicauda*

2.3 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子不同长度片段表达载体的构建

用 *Mlu*I 和 *Sma*I 快切酶双酶切各表达载体 PGL3-

Basic-D1~D4 以及 PGL3-Basic-T1~T4, 电泳检测结果(图 3)显示, 有相应的载体和启动子片段 2 条带, 说明表达载体构建成功。

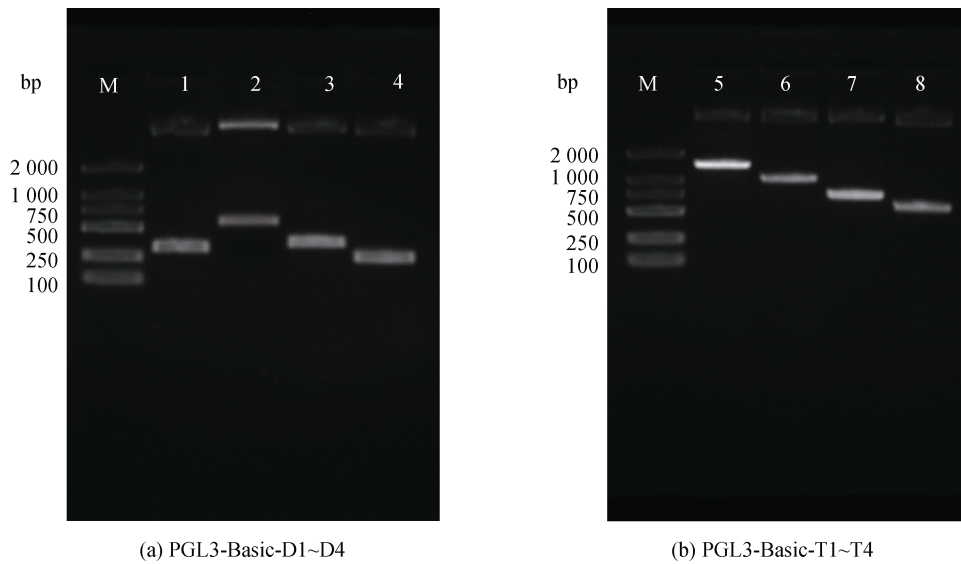


图 3 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子不同长度片段的扩增(M.DL2000 DNA Marker)
Fig. 3 Amplification of *Dnmt2* promoter recombinant plasmids of the *E. carinicauda*

2.4 脊尾白虾 *Dnmt2* 核心启动子区的验证

将构建的双荧光素酶报告基因重组质粒 pGL3-Basic-D1~D4(图 4)和空载质粒 pGL3-Basic 分别与内参质粒 pRL-TK 共转染至 HEK 293 细胞, 转染 32 h

后, 收集细胞检测荧光值, 将检测的结果进行单因素方差分析。结果显示, 重组质粒 pGL3-D4 荧光活性与对照质粒 pGL3-Basic 无显著性差异($P < 0.05$), pGL3-Basic-D1、pGL3-Basic-D2 和 pGL3-Basic-D3

与对照质粒 pGL3-Basic 均有显著性差异($P<0.05$), 其中 pGL3-Basic-D2 的相对荧光活性最高, pGL3-Basic-D1 和 pGL3-Basic-D3 活性次之(图 5)。结果表明-196bp~+81bp 能够维持 *Dnmt2* 启动子基本转录活性, 为该基因核心启动子区域。

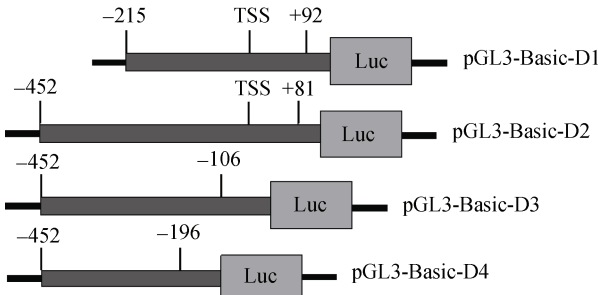


图 4 质粒 pGL3-Basic-D1~D4 简图
Fig. 4 Diagram of plasmids pGL3-Basic-D1~D4

2.5 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子不同截短体的活性分析

对 *Dnmt2* 启动子不同长度片段的双荧光素酶报告基因表达载体进行活性检测。结果显示, 重组质粒 pGL3-Basic-T1、pGL3-Basic-T2、pGL3-Basic-T3、pGL3-Basic-T4 转染 32 h 后的活性较对照质粒 pGL3-Basic 均显著性增强($P<0.05$)。pGL3-Basic-T3 的相对荧光活性显著高于其他组($P<0.05$), pGL3-Basic-T1 和

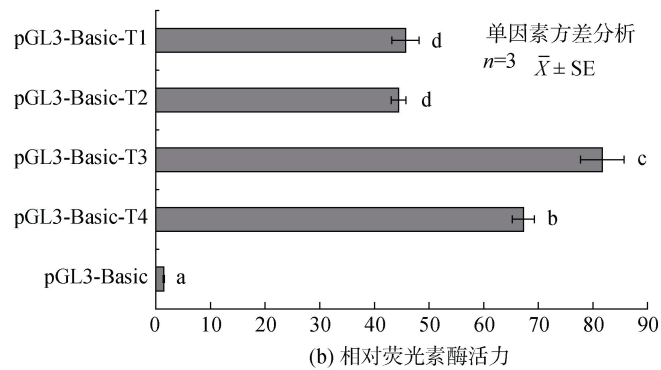
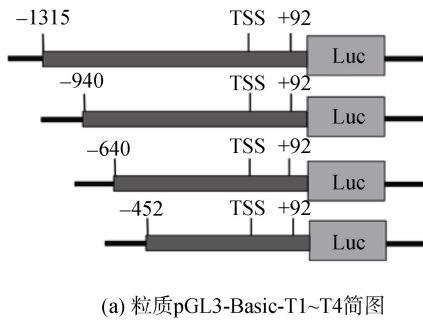


图 6 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子不同长度片段示意图及活性分析

Fig. 6 Diagrammatic drawing (a) and activity analysis (b) of deletion fragments of the *E. carinicauda Dnmt2* promoter

3 讨论

3.1 启动子结构及转录因子分析

本研究获得脊尾白虾 *Dnmt2* 5'端上游 1 315 bp 启动子序列, 转录起始位点为翻译起始密码子 ATG 上游 236 bp 处的碱基“A”, 在其上游 26 bp 处发现

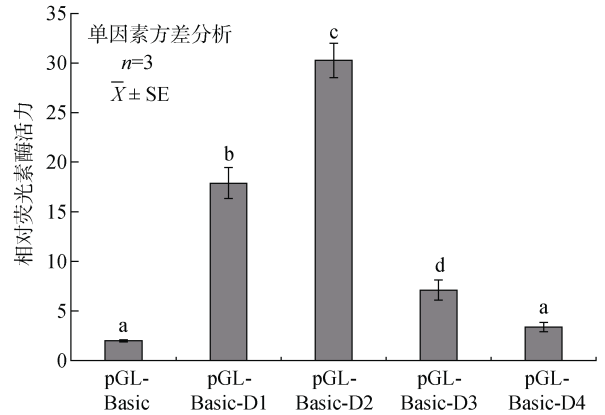


图 5 脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子含转录起始位点和不含转录起始位点活性分析

Fig.5 Activity analysis of the fragments containing and not containing transcription start site of the *E. carinicauda Dnmt2* promoter

数据以平均值 ± 标注误差表示(每个样品 3 个重复); 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 图 6 同

Date are described as Mean±SE ($n=3$); Different small letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$), the same as Fig.6

pGL3-Basic-T2 两组之间活性无显著性差异($P<0.05$), pGL3-Basic-T4 的相对荧光活性显著低于 pGL3-Basic-T3($P<0.05$)(图 6b)。结果说明, 在脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子-640 bp~-452 bp 区域可能存在促进该基因表达的转录调控元件, 在-940 bp~-640 bp 区域的转录调控元件表现出抑制该基因表达的作用。

TATA-box 转录结合位点。TATA-box 为真核生物启动子序列关键的调控元件, 通常位于转录起始位点前 25~30 bp 区域内^[16], 能与 RNA 聚合酶 II 特异性结合形成转录前起始复合物(Transcription pre-initiation complex, PIC), 调节转录起始。TATA-box 一旦发生突变将导致转录效率降低, 甚至转录被阻止^[17]。而另

有研究发现, 缺少 TATA-box 的启动子也可以调节基因的组织特异性表达^[18]。在甲壳类动物中, TATA-box 调控基因表达的机制还需要进一步研究。

经在线软件预测, *Dnmt2* 启动子区域含有 STAT3、NF- κ B、E2F、SOX、GATA-1 等多种转录因子结合位点。其中, SOX 转录因子广泛参与生物体早期胚胎及神经系统发育的调控^[19], 并在性别决定和分化过程中发挥重要作用^[20]。STAT3 转录因子具有信号转导和转录激活的双重作用, 是 JAK-STAT 信号途径的重要环节^[21]。同时也在胚胎早期发育的过程中扮演重要角色, 在小鼠 (*Mus musculus*) 的试验中表明, STAT3 转录因子对于大鼠胚胎早期发育和存活至关重要^[22]。转录因子 E2F 家族可以通过调节细胞 DNA 合成以及与细胞增殖有关的基因表达参与细胞周期的调控, 在细胞增殖、分化和凋亡的过程中发挥作用^[23]。以上转录因子的存在, 提示 *Dnmt2* 启动子有可能参与脊尾白虾早期胚胎发育及性腺发育过程。

CpG 岛通常位于基因的启动子和第一个外显子区域^[24], 这些区域的 DNA 甲基化与转录激活密切相关^[25]。将本研究获得的启动子进行软件分析, 发现其不含 CpG 岛。统计显示, 大约有 40% 的哺乳动物基因在其启动子和外显子区域中包含 CpG 岛^[26], 提示脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子可能不含 CpG 岛, 也另有可能是因目前获得的脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子太短, 需进一步向上游扩增获得更长的序列再进行 CpG 岛检测。

3.2 核心启动子区分析

核心启动子区是指在 RNA 聚合酶及转录因子共同作用下精确指导转录起始的最小一段 DNA 序列, 包含 TATA-box、TFIIB 识别元件和以转录起始位点为中心的起始子等结构, 是基因准确有效转录的核心区域^[27]。本研究的核心启动子区验证结果显示-196~+81 bp 能够维持 *Dnmt2* 启动子基本转录活性, 为该基因核心启动子区域。在 DNA 甲基转移酶基因家族成员 *Dnmt1* 启动子的研究中, 小鼠 *Dnmt1* 核心启动子被发现位于-1 866~-1 734 bp 区域内^[28]。因此, 不同基因核心启动子在结构和功能上会存在差异^[29]。

3.3 启动子调控原件分析

为检测 *Dnmt2* 启动子区域活性, 本研究同时构建了 4 个启动子逐渐缺失片段表达载体, 用萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶双报告基因检测各缺失片段表达载体的转录活性。结果发现, 在脊尾白虾 *Dnmt2* 启

动子-640b~-452 bp 区域可能存在促进该基因表达的转录调控原件, 经在线软件分析, 在-640~-452 bp 内发现 GATA-1 转录因子结合位点, 表明 GATA-1 转录因子可能正调控 *Dnmt2* 表达, 这与 GATA-1 转录因子在中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) β GBP-HDL 基因启动子中表现出的正调控作用一致^[30]。在胚胎发育过程中, 组织器官的形成依赖于干细胞正确的定向分化以及中间细胞的凋亡, 在这一精确调控过程中, GATA 转录因子家族扮演了不可或缺的角色^[31-32]。另有研究表明, *Dnmt2* 在斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎发育期敲除后, 导致斑马鱼视网膜、肝脏和大脑出现分化上的缺陷^[33]。以上结果进一步提示 *Dnmt2* 可能参与调控脊尾白虾早期胚胎发育过程。本研究中, *Dnmt2* 启动子活性并没有随序列长度的增加而上升, 长片段 pGL3-Basic-T1 和 pGL3-Basic-T2 与较短片段 pGL3-Basic-T3 的转录活性相比显著性下降 ($P < 0.05$)。在小鼠 *Dnmt1*、*Dnmt3a* 和 *Dnmt3b* 启动子研究结果中^[34], 转录因子对小鼠每种 DNA 甲基转移酶基因启动子片段的调节作用各不相同; 但从整体上看, 不同转录因子对各 DNA 甲基转移酶基因启动子区域的长启动子片段都表现出抑制作用, 这与我们的实验结果一致。接下来可利用点突变、EMSA 和 ChIP 等方法进一步研究 *Dnmt2* 启动子中起关键调控作用的转录因子。以上结果为探明脊尾白虾 *Dnmt2* 启动子的表达调控网络奠定理论基础。

参考文献:

- [1] LYKO F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(2): 81-92.
- [2] SAZHENOVA E A, LEBEDEY I N. Evolutionary aspects of genomic imprinting[J]. *Molecular Biology*, 2021, 55(1): 1-15.
- [3] DEOBAGKAR D. Epigenetics with special reference to the human X chromosome inactivation and the enigma of Drosophila DNA methylation[J]. *Journal of Genetics*, 2018, 97(2): 371-378.
- [4] KIM S, KAANG B K. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2017, 49(1): e281.
- [5] EDWARDS J R, YARYCHKIVSKA O, BOULARD M, et al. DNA methylation and DNA methyltransferases[J]. *Epigenetics & Chromatin*, 2017, 10(1): 23.
- [6] ASHAPKIN V V, KUTUEVA L I, VANYUSHIN B F. *Dnmt2* is the most evolutionary conserved and enigmatic cytosine DNA methyltransferase in eukaryotes[J].

- Russian Journal of Genetics, 2016, 52(3): 237-248.
- [7] JELTSCH A, EHRENHOFER-MURRAY A, JURKOWSKI T, et al. Mechanism and biological role of *Dnmt2* in Nucleic acid methylation[J]. RNA Biology, 2017, 14(9), 1108-1123.
- [8] FENG C Z, DING X, LI Y, et al. The DNA methyltransferase-2 gene in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: characteristics and expression patterns during ovarian and embryonic development[J]. Zoological Science, 2007, 24(11): 1059-1065.
- [9] 蔡影, 孟宪亮, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹甲基转移酶 2 基因克隆及在胚胎、幼体和性腺发育过程中的表达分析[J]. 中国水产科学, 2018, 25(5): 928-935.
CAI Ying, MENG Xianliang, LIU Ping, et al. Molecular cloning of the DNA methyltransferase-2 gene and its expression during embryonic, larval, and gonadal development in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(5): 928-935.
- [10] FITZ E, WANKA F, SEIBOTH B. The promoter toolbox for recombinant gene expression in *trichoderma reesei*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2018, 6: 135.
- [11] BANSAL M, KUMAR A, YELLA V R. Role of DNA sequence based structural features of promoters in transcription initiation and gene expression[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2014, 25: 77-85.
- [12] YELLA V R, BANSAL M. DNA structural features of eukaryotic TATA - containing and TATA - less promoters[J]. FEBS Open Bio, 2017, 7(3): 324-334.
- [13] SEBASTIAN G, STEVEN H. Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2013, 38(12): 603-611.
- [14] 梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾全人工繁育技术初步研究[J]. 水产科学, 2017, 36(3): 290-295.
LIANG Junping, LI Jian, LI Jitao, et al. Controlled propagation of ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. Fisheries Science, 2017, 36(3): 290-295.
- [15] 裴倩倩, 张涛, 杨刚, 等. 长江口脊尾白虾繁殖生物学[J]. 生态学杂志, 2017, 36(3): 702-706.
PEI Qianqian, ZHANG Tao, YANG Gang, et al. Reproductive biology of *Exopalaemon carinicauda* in Yangtze River Estuary[J]. Chinese Journal of Ecology, 2017, 36(3): 702-706.
- [16] EMOTO M, MIKI M, SARKER A H, et al. Structure and transcription promoter activity of mouse flap endonuclease 1 gene: alternative splicing and bidirectional promoter.[J]. Gene, 2005, 357(1): 47-54.
- [17] SAVINKOVA L, DRACHKOVA I, ARSHINOVA T, et al. An experimental verification of the predicted effects of promoter TATA-Box polymorphisms associated with human diseases on interactions between the TATA boxes and TATA-Binding protein[J]. PloS One, 2013, 8(2): e54626.
- [18] HOCHHEIMER A, TJIAN R. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression[J]. Genes & Development, 2003, 17(11): 1309-1320.
- [19] SHE Z Y, YANG W X. SOX family transcription factors involved in diverse cellular events during development[J]. European Journal of Cell Biology, 2015, 94(12): 547-563.
- [20] JULIAN L M, MCDONALD A C, STANFORD W L. Direct reprogramming with SOX factors: masters of cell fate[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2017, 46: 24-36.
- [21] VILLARINO A V, KANNO Y, O'SHEA J J. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system[J]. Nature Immunology, 2017, 18(4): 374-384.
- [22] TAKEDA K, NOGUCHI K, SHI W, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(8): 3801-3810.
- [23] JULIAN L M, LIU Y, PAKENHAM C A, et al. Tissue-specific targeting of cell fate regulatory genes by E2f factors[J]. Cell Death & Differentiation, 2015, 23(4): 565-575.
- [24] YAO W, LI Y X, LI B J, et al. Epigenetic regulation of bovine spermatogenic cell-specific gene *Boule*[J]. PloS One, 2015, 10(6): e0128250.
- [25] LONG H K, KING H W, PATIENT R K, et al. Protection of CpG islands from DNA methylation is DNA-encoded and evolutionarily conserved[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(14): 6693-6706.
- [26] FATEMI M, PAO M M, JEONG S, et al. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20): e176.
- [27] VO N L, KASSAVETIS G A, KADONAGA J T. The RNA polymerase II core promoter in *Drosophila*[J]. Genetics, 2019, 212(1): 13-24.
- [28] 张远, 杨甸甸, 吴风瑞, 等. 小鼠 *Dnmt1* 启动子荧光素酶报告基因的构建及活性分析[J]. 生物技术通报, 2013, 10: 109-112.
ZHANG Yuan, YANG Xunxun, WU Fengrui, et al. Construction and analysis of luciferase reporter vectors of mouse *Dnmt1* gene promoter[J]. Biotechnology Bulletin, 2013, 10: 109-112.
- [29] IL'ICHEVA I A, KHODIKOV M V, POPTSOVA M S, et al. Structural features of DNA that determine RNA polymerase II core promoter[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 973.

- [30] 赖晓芳, 高焕, 孔杰, 等. 中国明对虾 *FcβGBP-HDL* 基因和启动子的克隆及序列特征分析[J]. 水产学报, 2013, 37(2): 175-183.
LAI Xiaofang, GAO Huan, KONG Jie, et al. Analysis of genomic structure and the promoter characterization of *FcβGBP-HDL* from *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(2): 175-183.
- [31] LENTJES M H, NIESSEN H E, AKIYAMA Y, et al. The emerging role of GATA transcription factors in development and disease[J]. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2016, 18: e3.
- [32] TREMBLAY M, SANCHEZ-FERRAS O, BOUCHARD M. GATA transcription factors in development and disease[J]. Development, 2018, 145(20): dev164384.
- [33] RAI K, CHIDESTER S, ZAVALA C V, et al. *Dnmt2* functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish[J]. Genes & Development, 2007, 21(3): 261-266.
- [34] 杨甸甸. 小鼠植入前胚胎 DNA 甲基化模式比较及 *Dnmts* 启动子功能分析[D]. 合肥: 安徽大学, 2012.
YANG Xunxun. Comparison of genomic-wide methylation patterns preimplantation embryos and functional analysis of *Dnmts* promoter of mouse[D]. Hefei: Anhui University, 2012.

Cloning and transcriptional regulation of *Dnmt2* promoter in *Exopalaemon carinicauda*

SONG Chong-yang¹, ZHANG Si-mian¹, LI Yong-chuang¹, ZHANG Pan¹, LAI Xiao-fang^{1, 2, 3}, WANG Pan-pan^{1, 2, 3}, YU Fei⁴, GAO Huan^{1, 2, 3}, YAN Bin-lun^{1, 2, 3}

(1. Jiangsu Ocean University, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Key lab of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005, China; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Lianyungang 222005, China; 3. The Jiangsu Provincial Infrastructure for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China; 4. Lianyungang Marine and Fishery Development Promotion Center, Lianyungang 222005, China)

Received: Dec. 7, 2021

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; *Dnmt2*; core promoter; promoter activity; transcriptional regulatory element

Abstract: In order to explore the regulation of *Dnmt2* promoter of *Exopalaemon carinicauda* on *Dnmt2* transcription, the *Dnmt2* promoter of *E. carinicauda* was cloned by chromosome walking technique, and the transcription regulatory elements and transcription factor binding sites in the promoter region of the gene were predicted by online software, By constructing a series of deletion expression vectors, the core promoter region of the gene was identified by double luciferase reporter gene detection technology, and its promoter activity was detected. The results showed that the length of the cloned *Dnmt2* promoter was 1315 bp, the transcription start site “A” was 236 bp upstream of ATG, and the promoter region contained a variety of transcription factor binding sites, including STAT3, Sox, NF-κB, E2F, GATA-1, etc., but lacking CpG island. The detection of double luciferase reporter gene showed that the core promoter region of *Dnmt2* was located at -196~+81 bp. The activity detection of the promoter region showed that there may be transcriptional regulatory elements promoting gene expression in the -640~-452 bp region of the gene promoter, while there may be transcriptional regulatory elements inhibiting gene expression in the -1160~-640 bp region. The results of this study provide a theoretical basis for further study on the expression regulation mechanism of *Dnmt2* promoter.

(本文编辑: 谭雪静)