

团头鲂白细胞介素 6 基因启动子报告载体的构建及活性分析

扶晓琴^{1,2} 丁祝进^{1,2} 饶友亮³ 王卫民¹ 刘红^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070;

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070;

3. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

摘要 为了解鱼类白细胞介素 6(IL-6)基因的转录调控原理及其免疫作用机制,构建 5 个团头鲂 *il-6* 基因启动子的荧光素酶报告质粒(PGL3-IL-6P),以 PGL3-basic 质粒作为阴性对照,将它们分别与内参质粒 pRL-TK 共转染进鲤 EPC 细胞,并用 100 ng/mL 的 LPS 诱导转染过重组载体的细胞,24 h 后检测荧光素酶的活性。结果显示:与阴性对照组相比,质粒转染组 PGL3-IL-6P-0、PGL3-IL-6P-1、PGL3-IL-6P-2、PGL3-IL-6P-3 与 PGL3-IL-6P-4 的荧光素酶活性均明显升高,其中 PGL3-IL-6P-4 组的荧光素酶活性最高,表明该启动子缺失体(-379 至+34)包含 *il-6* 的核心启动子。用 LPS 刺激转染过重组载体的细胞后发现,与未经 LPS 刺激的对照组相比,仅 PGL3-IL-6P-4 组的活性明显增强,而其余缺失体的活性则没有显著变化,这进一步表明 PGL3-IL-6P-4 缺失体包含核心启动子区,并推测该核心启动子区域存在的潜在转录因子 NF- κ B 与 C/EBP β 等可能是响应 LPS 刺激的重要作用元件。

关键词 团头鲂; 白细胞介素 6; 荧光素酶报告质粒; 启动子活性; LPS

中图分类号 Q 959.46⁺8 : S 917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0086-06

白细胞介素 6(IL-6)是一种多功能细胞因子,在调控动物免疫应答反应、急性期蛋白的合成和造血功能等方面具有非常重要的作用。许多细胞,如活化的 T/B 淋巴细胞、单核-巨噬细胞、血管内皮细胞、肿瘤细胞、肝细胞、造血干细胞、神经细胞等^[1-2]都可以产生 IL-6。正常状态下,动物血浆与肌体中 IL-6 的含量并不高,而在外界因子刺激下,IL-6 的浓度在极短的时间内显著增加,并以“内分泌”的方式存在于机体中。研究表明,*il-6* 基因可以被如 IL-1B、TNF-A、Poly I:C、病毒和细菌等多种外源因子所诱导^[3]。*il-6* 基因表达的调控主要发生在转录水平^[4],其转录的开启受上游控制基因的支配,其中 *il-6* 基因的启动子在这个过程中起着关键作用。据报道 *il-6* 基因参与鱼体的非特异性免疫功能^[5],近年来虽然关于鱼类 *il-6* 基因的基础研究越来越多,但对于其表达调控的研究却非常少,对于鱼类 *il-6* 启动子的研究则更少^[5-7]。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是我国重要的淡水养殖鱼类,近年来的年产量在 70 万 t 左右,但是其在养殖过程中容易受到病原微生物的侵扰,使其养殖业蒙受到巨大的经济损失^[8]。目前关于团头鲂的研究主要集中在营养与饲料学^[9]、形态学^[10]、细胞与分子遗传学以及遗传改良^[11-12]等方面,而关于其免疫学的研究相对较少^[13-15]。因此,鉴于 *il-6* 基因在动物机体免疫中的重要作用,为了更好地了解 *il-6* 基因的转录调控原理,从而进一步了解其在鱼类免疫反应中的作用机制,我们首先构建了团头鲂 5 个 *il-6* 启动子的 PGL3 重组载体,将系列重组载体与内参质粒 pRL-TK 共转染进鲤 EPC 细胞,进而用 LPS 诱导,检测启动子的活性。本研究初步筛选出团头鲂 *il-6* 基因的核心启动子区,推测团头鲂 *il-6* 基因启动子区存在响应 LPS 刺激的重要转录因子,旨在为进一步研究团头鲂 *il-6* 基因的转录原理及其免疫作用机制奠定基础。

收稿日期: 2015-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572613); 国家科技支撑计划(2012BAD26B00); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY042 和 2662015PY134)

扶晓琴, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: 2282866105@qq.com

通信作者: 刘红, 博士, 教授, 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 试验材料

取 1 尾健康团头鲂用于提取尾鳍组织 DNA 从而构建 *il-6* 基因启动子的荧光素酶报告质粒。鲤 EPC 细胞系、PGL3-basic 和 pRL-SV40 质粒为笔者所在实验室保存。试验中用到的其他主要试剂盒和试剂包括双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega, 美国), PCR 胶回收试剂盒 (Axygen, 美国), T4 DNA 连接酶 (Tsingke, 北京), 限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Xho* I (Fermentas, 立陶宛), 质粒提取试剂盒 (TIANGEN, 北京); 胎牛血清 (四季青, 杭州), 脂质体 2000 (Invitrogen, 美国), LPS (Sigma, 美国); 双抗, 0.25% EDTA 胰酶, opli-MEM[®] I 低血清培养基以及 MEM 培养基 (Gibico, 美国) 等。

1.2 引物设计

用草鱼 *il-6* 全长 cDNA 序列 (GenBank 数据库登录号: KC535507) 与团头鲂全基因组序列 (未公

布) 进行比对, 初步得到团头鲂 *il-6* 基因组 DNA 及转录起始位点上游约 1.5 kb 的 DNA 序列。针对 PGL3-basic 载体上的酶切位点情况, 采用 Premier 5.0 软件对候选启动子序列 (-1 503 ~ +34 bp) 进行酶切位点分析, 结合预测的潜在转录因子的位置, 设计引物并加入相应的酶切位点与保护碱基, 本文所用引物见表 1。

1.3 团头鲂 *il-6* 基因不同启动子荧光素酶报告质粒的构建

1) 以酚氯仿法提取团头鲂鳍条组织 DNA, 并以此为模板进行 PCR 扩增 (引物见表 1), 纯化回收 PCR 产物后连接到 pBlue-T 载体上, 12~14 h 后转化到感受态细胞 DH5 α 中并涂布于含 Amp 的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养后挑取菌落接种于 2 mL 含 Amp 的 LB 培养液中, 菌液 PCR 后电泳检测, 挑选大小合适的菌液送公司测序。将测序正确的阳性克隆菌液扩大培养, 最后提取质粒 DNA, 即 pBlue-T-IL-6 载体。

表 1 构建团头鲂 *il-6* 基因不同启动子缺失体重组载体所需引物序列

Table 1 Primers used for construction of promoter plasmids of *Megalobrama amblycephala il-6* gene

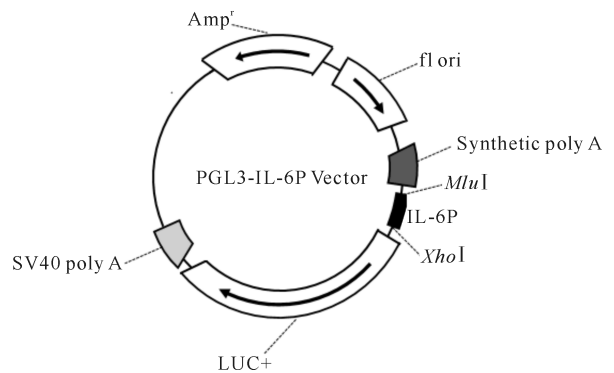
引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Sequences (5'→3')
PGL3-IL-6P-F0	<u>GCAACGCGT</u> GACTGCTCAAGAAGTTAATGC
PGL3-IL-6P-F1	<u>GCAACGCGT</u> TGAGCATCAGAACTGGACC
PGL3-IL-6P-F2	<u>GCAACGCGT</u> CTCTTTCAGCGGGTAAT
PGL3-IL-6P-F3	<u>GCAACGCGT</u> TTCAGGGGTCTAGAGGAGTC
PGL3-IL-6P-F4	<u>GCAACGCGT</u> GTGTCCCTAGCATGATTTA
PGL3-IL-6P-R	<u>CCGCTCGAGG</u> TGTGATGTCTTCAAGCAAAC

注: 下划线分别表示保护性碱基, 粗黑体表示 *Mlu* I、*Xho* I 酶切位点。Note: The protect bases is underlined and the restriction sites (*Mlu* I / *Xho* I) is in bold.

2) 用限制酶 *Xho* I 和 *Mlu* I 双酶切克隆载体 pBlue-T-IL-6, 12 h 后检测酶切产物, 待条带被完全切开后纯化回收目的片段。按照目的片段与 PGL3-basic 载体 6 : 1 的比例 4 °C 过夜连接。将连接产物转化到感受态细胞中, 挑出阳性克隆、菌液 PCR 后电泳检测, 挑选合适的菌液送公司测序。将测序正确的菌液扩大培养后提取高纯度质粒, 检测质粒的浓度与纯度。将构建好的载体即 PGL3-IL-6P (图 1 所示), 分别命名为 PGL3-IL-6-0 (-1 503 ~ +34 bp)、PGL3-IL-6-1 (-1 350 ~ +34 bp)、PGL3-IL-6-2 (-1 045 ~ +34 bp)、PGL3-IL-6-3 (-856 ~ +34 bp) 和 PGL3-IL-6-4 (-379 ~ +34 bp)。

1.4 细胞培养与重组质粒转染鲤 EPC 细胞

28 °C 条件下, 鲤 EPC 细胞在加双抗、含 10% 血清的 MEM 培养基中贴壁生长, 根据细胞生长状态隔 2~3 d 用含 0.25% 胰酶+0.02% EDTA 的消化



图中的 IL-6P 表示插入的团头鲂 *il-6* 基因启动子序列。IL-6P represents the *M. amblycephala il-6* gene promoter sequences.

图 1 PGL3-IL-6P 质粒

Fig.1 Illustration of recombinant plasmid PGL3-IL-6P 液进行消化传代。待细胞状态稳定且良好时, 选取生长旺盛的细胞接种于 24 孔板中 (1 × 10⁵ / mL) 培养。待细胞融合度达到 70% 时, 以脂质体 Lipo-

fectamine™ 2000 作为转染试剂,将阴性对照质粒 pGL3-basic 和 5 个不同长度的重组质粒(PGL3-IL-6P)分别与内参质粒(pRL-TK)同时共转染进鲤 EPC 细胞中。转染后 24 h 检测荧光素酶的活性。

1.5 LPS 对团头鲂 *il-6* 基因启动子的诱导

细胞培养及转染实验与本文“材料与方法 1.4”相同。转染 4~6 h 后弃转染复合物,PBS 洗涤后更换含 100 ng/mL LPS 的正常有血清培养基,18 h 后检测荧光素酶活性。

1.6 双荧光素酶报告基因检测

重组质粒转染鲤 EPC 细胞 24 h 后收集细胞裂解物,用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测上述 *il-6* 基因启动子的荧光活性。将目的基因的萤火虫荧光素酶活性标记为 L,内参 pRL-SV40 质粒的荧光素酶活性标记为 S,L/S 即为被检测质粒的相对荧光素酶活性。

1.7 数据分析

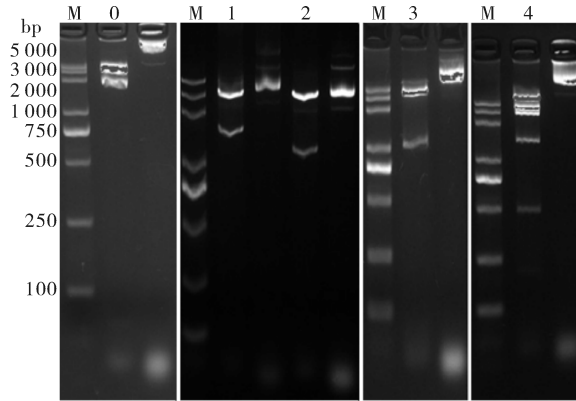
所得数值均用平均值±标准误(mean±SE)表

示,用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),并用 LSD 和 Duncan's 进行多重比较。当 $P < 0.05$ 时,认为差异显著;当 $P < 0.01$ 时,认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 团头鲂 *il-6* 启动子系列 PGL3 重组载体的构建

先构建好团头鲂 *il-6* 基因启动子系列克隆载体(pBlue-T-IL-6),然后将克隆载体双酶切,纯化回收酶切产物后连接到 pGL3-basic 载体上,挑选阳性克隆后菌液 PCR 鉴定,将测序正确的克隆菌液扩大培养并提取高纯度质粒。双酶切该质粒,检测系列重组载体 PGL3-IL-6 是否正确。电泳检测发现重组质粒均被切开,且都包含与目的片段大小一致的条带(如图 2 所示),并经纯化测序鉴定正确,表明不同长度的 *il-6* 基因启动子缺失体成功插入到了 PGL3-basic 载体中。



数字 0~4 分别表示重组载体 PGL3-IL-6P-0(-1 503~+34 bp)、PGL3-IL-6P-1(-1 350~+34 bp)、PGL3-IL-6P-2(-1 045~+34 bp)、PGL3-IL-6P-3(-856~+34 bp)、PGL3-IL-6P-4(-379~+34 bp)的双酶切条带,右边是与之相应的原重组质粒条带。The numbers 1 to 4 indicate double digestion electrophoresis of recombinant vector PGL3-IL-6P-0 (-1 503~+34 bp), PGL3-IL-6P-1(-1 350~+34 bp), PGL3-IL-6P-2(-1 045~+34 bp), PGL3-IL-6P-3(-856~+34 bp), PGL3-IL-6P-4(-379~+34 bp) respectively, the corresponding original plasmid electrophoresis is on the right.

图 2 团头鲂 *il-6* 启动子系列 PGL3-IL-6 重组质粒双酶切电泳

Fig.2 Double digestion electrophoresis of *M. amblycephala* PGL3-IL-6 plasmids

2.2 团头鲂 *il-6* 基因各启动子缺失体的活性测定

将 5 个重组质粒、阴性对照质粒分别与内参质粒以 10 : 1 混合,分别转染进 EPC 细胞中,并用 LPS 诱导,转染 24 h 后检测双荧光素酶的相对活性,即间接检测了各缺失体的启动子活性。各启动子缺失体的示意图如图 3 所示。

2.3 LPS 处理前后团头鲂 *il-6* 基因各启动子缺失体活性变化

双荧光素酶检测结果发现:质粒转染组 PGL3-IL-6P-0、PGL3-IL-6P-1、PGL3-IL-6P-2、PGL3-IL-6P-3 和 PGL3-IL-6P-4 的荧光素酶活性均比 PGL3-basic 组高的多,其中 PGL3-IL-6P-4 组的荧光素酶

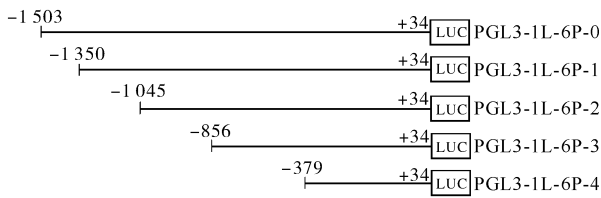
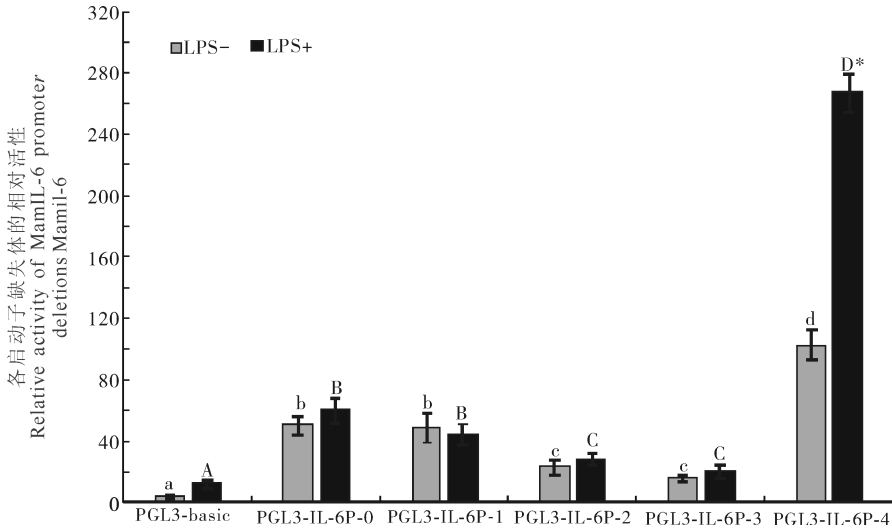


图 3 团头鲂 *il-6* 系列启动子缺失体的示意图
Fig.3 Schematic representation of *M. amblycephala il-6* promoter

活性最高(图 4),表明团头鲂 *il-6* 基因的核心启动子区域可能位于 -379 至 +34 bp 之间。LPS 刺激后发现,与未经 LPS 刺激的对照组相比,只有 PGL3-IL-6P-4 的活性有显著上升,而其余缺失体的活性则无显著改变(图 4),进一步表明 PGL3-IL-6P-4 缺失体包含核心启动子。分析该核心启动子区域的转录因子,推测该区域存在的潜在转录因子 NF- κ B、C/EBP β 等可能是响应 LPS 刺激的重要作用元件。



数据以平均值±标准误表示(每个样品 3 个重复)。不同的字母表示差异显著。小写字母表示非 LPS 处理组,大写字母表示 LPS 处理组。“*”表示 LPS 处理与非处理组之间的差异显著, $P < 0.05$ 。Data are shown as mean \pm SE ($n = 3$). Different letters manifest significant difference. Lowercase letters and capitalized letters indicate the LPS not-treated or treated groups respectively. The asterisk indicate a significant difference between two groups, $P < 0.05$.

图 4 团头鲂 *il-6* 系列启动子缺失体相对活性

Fig.4 Relative activity of *M. amblycephala il-6* promoter deletions

3 讨论

转录水平的调节对真核生物基因的表达调控具有非常重要的作用,转录的起始阶段对于整个转录过程至关重要,而位于基因上游的启动子区控制着基因的转录起始及表达程度^[16]。真核生物的启动子分为核心、近端和远端启动子,其中核心启动子是真核生物基因转录能够正常发生的最小 DNA 序列,包含许多重要的转录因子结合位点,能与 RNA 聚合酶 II 及许多转录因子结合^[17]。因此,作为调节转录水平最重要的一种顺式作用元件,启动子的研究,特别是核心启动子的研究尤其重要。

PGL3-basic 载体含有荧光素酶报告基因,但不含启动子与增强子,是分析目的基因启动子活性的

有效工具;而插入的外源启动子可以启动下游报告基因的表达,因此,荧光素酶的活性可以直接反映启动子中转录因子的作用情况^[18]。本研究成功构建了团头鲂 *il-6* 启动子 5 个不同长度的荧光素酶报告基因重组载体,通过检测这些缺失体的活性并进行分析,发现 PGL3-IL-6P-4(-379 bp 至 +34 bp)缺失体可能包含核心启动子区域。

对该核心启动子片段 -379 bp 至 +34 bp 进行分析,发现该区域存在许多重要的顺式作用元件^[19],如 NF-IL6 或 C/EBP β 、EST1、GATA 和 NF- κ B 等。类似地,金头鲷 *il-6* 基因的核心启动子区域(-171 bp 到 +64 bp)包含 NF- κ B、GATA、AP-1 和 cETS1 等作用元件;鸡、人和虹鳟的核心启动子区间包含 NF- κ B、NF-IL6 或 C/EBP β 等元件^[5,7]。

据此可以推测, NF- κ B(NF-IL6)、CEBP β 可能是激活 *il-6* 启动子所必需的顺式作用元件^[20]。本研究构建的各缺失体中, 只有 PGL3-IL-6P-4 的活性显著高于其他缺失体, 推测可能与该区域存在 C/EBP β 与 NF- κ B 转录因子有关。

已有研究表明, *il-6* 启动子可以被许多外源因子所诱导, 如 TNF α 、IL-10、IL-2 以及细菌等^[5,7]。例如, 虹鳟 *il-6* 启动子可以被 NF- κ B p50 和大肠杆菌所激活^[5]; 金头鲷 *il-6* 启动子可以被 TFN α 和 IL-2 等外源因子强烈诱导^[7]; 此外, *il-6* 启动子还可以被 LPS 强烈诱导^[6]。本研究中, 用 LPS 刺激团头鲂 *il-6* 各启动子缺失体, 发现仅 PGL3-IL-6P-4 缺失体(-379 bp 至 +34 bp) 的活性有显著增加, 其余缺失体的活性无明显变化, 进一步表明 PGL3-IL-6P-4 缺失体包含该基因的核心启动子。对 PGL3-IL-6P-4 缺失体进行分析发现其存在 NF-IL6 或 C/EBP β 、NF- κ B 等转录因子结合位点^[19]。人的 NF-IL6 被认为在 LPS 介导的 *il-6* 启动子激活中发挥重要作用, LPS 可以调节人 *il-6* 基因的表达, 这主要是由于 LPS 刺激了转录因子 NF-IL6 与其他 C/EBP 家族成员而引起 *il-6* 表达量的上升^[21]; 在比目鱼中, NF- κ B 被认为在 LPS 介导的 *il-6* 启动子激活中起重要作用^[6]。在本研究中, LPS 明显激活了团头鲂 *il-6* 核心启动子区域, 推测可能与该区域存在 NF-IL6 或 C/EBP β 和 NF- κ B 等转录因子结合位点有关。

综上, 本研究构建了 5 个团头鲂 *il-6* 启动子重组载体并转染进鲤 EPC 细胞, 用 LPS 诱导后分析了启动子的活性。结果表明, 团头鲂 *il-6* 的核心启动子可能位于 -379 bp 至 +34 bp 之间, 分析该核心启动子, 推测该区域可能存在响应 LPS 刺激的重要作用元件 NF- κ B 和 NF-IL6 等, 为进一步了解鱼类 *il-6* 基因的表达调控原理和其免疫作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] ATAIE -KACHOIE P, POURGHOLAMI M H, RICHARDSON D R, et al. Gene of the month: interleukin 6 (IL-6) [J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2014, 67: 932-937.
- [2] NAKA T, NISHIMOTO N, KISHIMOTO T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine [J]. *Arthritis Research*, 2002, 4: S233-S242.
- [3] CASTELLANA B, ILIEV D B, SEPULCRE M P, et al. Molecular characterization of interleukin-6 in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45: 3363-3370.
- [4] SAMUEL J M, KELBERMAN D, SMITH A J, et al. Identification of a novel regulatory region in the interleukin-6 gene promoter [J]. *Cytokine*, 2008, 42: 256-264.
- [5] ZANTE M D, BORCHEL A, BRUNNER R M, et al. Cloning and characterization of the proximal promoter region of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6 gene [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43: 249-256.
- [6] KONG H J, NAM B H, KIM Y O, et al. Characterization of the flounder IL-6 promoter and its regulation by the p65 NF-kappaB subunit [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28: 961-964.
- [7] CASTELLANA B, MARÍN-JUEZ R, PLANAS J V. Transcriptional regulation of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) interleukin-6 gene promoter [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35: 71-78.
- [8] 王卫民. 团头鲂养殖产业现状 [J]. *科学养鱼*, 2009(4): 44-45.
- [9] LIU B, XU P, XIE J, et al. Effects of emodin and vitamin E on the growth and crowding stress of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40: 595-602.
- [10] 李思发, 蔡完其, 周碧云. 团头鲂种群间差异的形态差异和生化遗传差异 [J]. *水产学报*, 1991, 15: 204-211.
- [11] 曾聪, 曹小娟, 高泽霞, 等. 团头鲂生长性状的遗传力和育种值估计 [J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(2): 89-95.
- [12] 高泽霞, 王卫民, 蒋思明, 等. 团头鲂种质资源及遗传改良研究进展 [J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(3): 138-144.
- [13] XIA H, WU K, LIU W, et al. Molecular cloning and expression analysis of immunoglobulin M heavy chain gene of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40: 129-135.
- [14] 郗明君, 刘立春, 张涓, 等. 3 种壳聚糖对团头鲂体外头肾吞噬细胞呼吸爆发功能的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(3): 72-77.
- [15] 张涓, 陈思思, 何玉慧, 等. 团头鲂 β -防御素 1 基因 cDNA 的克隆、序列分析及表达特征 [J]. *华中农业大学学报*, 2015, 34(3): 97-103.
- [16] 巨立中, 成军, 钟彦伟. 启动子 DNA 结合蛋白研究策略 [J]. *世界华人消化杂志*, 2004(12): 141-142.
- [17] LEE T, YOUNG R A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes [J]. *Annual Review of Genetics*, 2000, 34: 77-137.
- [18] CHENG L, ZIEGELHOFFER P R, YANG N S. *In vivo* promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90: 4455-4459.
- [19] FU X, DING Z, FAN J, et al. Characterization, promoter analysis and expression of the interleukin-6 gene in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. *Fish Physiology and*

Biochemistry, 2015, DOI:10.1007/s10695-015-0075-4.

&. Cell Biology, 1997, 29:1525-1539.

[20] XIA C, CHESHIRE J K, PATEL H, et al. Cross-talk between transcription factors NF- κ B and C/EBP in the transcriptional regulation of genes [J]. International Journal of Biochemistry

[21] NATSUKA S, AKIRA S, NISHIO Y, et al. Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6 [J]. Blood, 1992, 79:460-466.

Reporter plasmids construction of *Megalobrama amblycephala* interleukin 6 gene promoter and analysis of their bioactivity

FU Xiaoqin^{1,2} DING Zhujin^{1,2} RAO Youliang³ WANG Weimin¹ LIU Hong^{1,2}

1. College of Fisheries/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Fresh Water Aquaculture Collaboration Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;
3. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine, playing important roles in immune defense. To better understand the transcriptional principle and immune mechanism of fish *il-6*, five reporter plasmids of the *Megalobrama amblycephala il-6* promoter were constructed, co-transfected with the internal control plasmid pRL-TK into carp EPC cell, induced by LPS, and the luciferase activity was then detected after 24 h. The results showed that compared with the negative control PGL3-basic group, the luciferase activity of the PGL3-IL-6P-0, PGL3-IL-6P-1, PGL3-IL-6P-2, PGL3-IL-6P-3 and PGL3-IL-6P-4 groups were increased, and the PGL3-IL-6P-4 group showed the highest luciferase level, suggesting that the promoter deletion (-379 to +34) contains the core promoter region of the *il-6* promoter. After stimulation by 100 ng/mL LPS, the luciferase activity of the PGL3-IL-6P-4 group was significantly activated, while that of the other groups did not change significantly, further indicating that PGL3-IL-6P-4 indeed contains the core promoter region and the potential transcription factor NF- κ B and C/EBP β in this promoter region may play primary roles in response to LPS induction.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; IL-6; luciferase reporter plasmid; promoter activity; LPS

(责任编辑:边书京)