

家蚕hsp70 启动子的克隆及功能研究

庄兰芳¹ 危 浩¹ 林健荣² 钟伯雄^{1*}

(¹浙江大学动物科学学院, 杭州 310025; ²华南农业大学动物科学学院, 广州 510642)

摘要 该研究通过PCR的方法克隆得到家蚕热激蛋白70基因(*Bombyx mori* hsp70)的5'侧翼的两个长度分别为538 bp和305 bp的序列hsp70-538和hsp70-305。生物信息分析结果表明这两段序列在TATA序列的上游存在保守的热激元件HSE(heat shock element) CTnGAAnnTTCnAG。采用双荧光报告基因技术研究表明这两段序列在*BmN*细胞中都表现出热激活性, 转基因家蚕实验证明hsp70-305在家蚕个体中也具有热激活性, 可以认为这两个片段具有hsp70热激启动子特性。

关键词 hsp70启动子; 热激; *BmN*细胞; 家蚕

启动子按其功能及作用方式可分为3类: 诱导型启动子、组成型启动子、组织特异型启动子。诱导型启动子在某些特定的物理或化学因素的刺激下, 可以大幅度地提高基因的转录水平, 如热激蛋白70基因(*hsp70*)启动子。诱导型启动子往往具有增强子、沉默子或类似功能的序列结构, 感受诱导的序列都具有明显的专一性。果蝇热激蛋白启动子能够进行热激调节, 是由其热激元件(heat shock element, HSE)CTnGAAnnTTCnAG所决定的^[1-4], 其中hsp70启动子的热激活性最强, 使用最广泛。组成型启动子控制的结构基因的表达大体恒定在一定水平, 如家蚕肌动蛋白3(*Bombyx mori* actin 3, A3)启动子。组织特异型启动子调控基因在某些特定的器官或组织部位表达, 并往往表现出发育调节的特性, 如家蚕的丝素轻链(fibroin light chain, FibL)启动子。

家蚕热激蛋白hsp19.9(GenBank: FJ447563)、hsp20.4 (GenBank: EU350579)和hsp23.7(GenBank: FJ374261)的启动子已被相继克隆, 并在家蚕*BmN*细胞和家蚕组织中被验证了启动子活性, 但至今还没有关于家蚕hsp70启动子的报道。本研究旨在得到一个具有热激活性的家蚕hsp70启动子, 以便为利用该启动子在家蚕体内进行诱导性表达基因及生产外源蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 家蚕品种 家蚕品种为P50, 兰10。

1.1.2 载体质粒和细胞株 *BmN*细胞株和双荧

光质粒pA3RLuc-FLuc为本实验室保存。piggyBac转座子质粒pB[3×P3EGFP]-3^[5]和提供转座酶的辅助质粒已在别处描述^[6]。

1.1.3 主要试剂 Pyrobest Taq酶、*Sal* I、*Sac* I、T4连接酶、pMD19-T、DNase I 和PrimeScript™ RT Reagent Kit均购自大连宝生物公司, PCR产物琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和氨苄青霉素钠均购自上海生工, 质粒转染试剂Lipofectin 2000和RNA抽提试剂Trizol购自Invitrogen公司(Carlsbad, CA, USA)。

1.2 方法

1.2.1 PCR和RT-PCR 依照已公布的*Bombyx mori* Bmhsp70 mRNA的序列(GenBank: AB035326.1), 在KAIKObase上搜寻得到基因组序列(Scaffold ID: Bm_scaf128), 扩增基因编码框架前序列的引物设计、以及转座酶(Transposase)的PCR引物设计见表1 (下划线分别表示*Sal* I和*Sac* I酶切位点)。

RNA的提取方法参照Trizol试剂说明书, 反转录参照试剂说明书, PCR反应程序为94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 退火30 s, 72 °C 45 s, 30 cycles; 最后72 °C再延伸10 min。退火温度: hsp70-538和hsp70-305为55 °C, Transposase为53 °C。

以家蚕P50丝腺DNA为模板, 应用高保真Pyrobest Taq扩增目的片段, 经电泳鉴定后, 回收目的片

收稿日期: 2010-03-30 接受日期: 2010-10-18

国家重点基础研究发展计划(No.2005CB121003)、国家自然科学基金项目(No.30972142)和浙江省科技厅(No.2009C32070)资助项目

*通讯作者。Tel/Fax: 0571-86971302, E-mail: bxzhong@zju.edu.cn

表1 PCR引物
Table 1 PCR primers

片段	引物
Fragments	Primers
hsp70-538	Forward: 5'- <u>GAG CTC</u> AGA AAG TTG TTG C-3'
	Reverse: 5'- <u>GTC GAC</u> GAA TAT TAA TCA CTG-3'
hsp70-305	Forward: 5'- <u>GAG CTC</u> CAT ATT TTT TTG TTG-3'
	Reverse: 5'- <u>GTC GAC</u> AAA TAA ATC GTC G-3'
Transposase	Forward: 5'-TAT TCT GGT AAT GAC AGC AGT GAG-3'
	Reverse: 5'-TTT ATA TGA GAC GAG AGT AAG GGG-3'

注: 下划线标示的是酶切位点。hsp70-538引物扩增hsp70-538片段; hsp70-305引物扩增hsp70-305片段。Transposase的引物用于转基因蚕中转座酶表达的RT-PCR检测。
Note: the underscores were the sites for restriction digest; primers of hsp70-538 for amplifying hsp70-538; primers of hsp70-305 for amplifying hsp70-305; primers of Transposase for RT-PCR assay.

段。按照pMD19 T载体使用说明进行TA克隆, 经转化、筛选、培养后提取质粒T-hsp70-538, T-hsp70-305

的DNA, 并进行电泳、酶切、测序鉴定。

1.2.2 重组表达质粒的构建、转化及鉴定 双荧光报告质粒pA3RLuc-FLuc包含有两个基因表达框, 一个是由A3启动子控制表达海肾荧光素酶(*renilla luciferase*, RLuc)基因的完整表达框, 另一个是无启动子控制的萤火虫荧光素酶(*firefly luciferase*, FLuc)基因的表达框, 可以用于启动子活性的研究。

将pA3RLuc-FLuc和T-hsp70-538、T-hsp70-305载体用*Sal* I和*Sac* I进行双酶切, 回收纯化pA3RLuc-FLuc载体片段和基因片段, 利用T4连接酶连接, 得到的产物即为双荧光质粒pA3RLuc-hsp70-538FLuc和pA3RLuc-hsp70-305FLuc(图1A)。

转基因质粒pB[3×P3EGFP]-3的构建方法见文献^[5]。然后pB[3×P3EGFP]-3经*Sal* I和*Sac* I双酶切后, 插入hsp70-305启动子, 得到的质粒再经*Sac* I和*Hind* III双酶切后, 插入piggyBac的Transposase基因, 结果得到了pB3×P3EGFP-hsp70-305Transposase质粒(图1B)。

所有质粒都经酶切鉴定正确后提供下一步实验用。

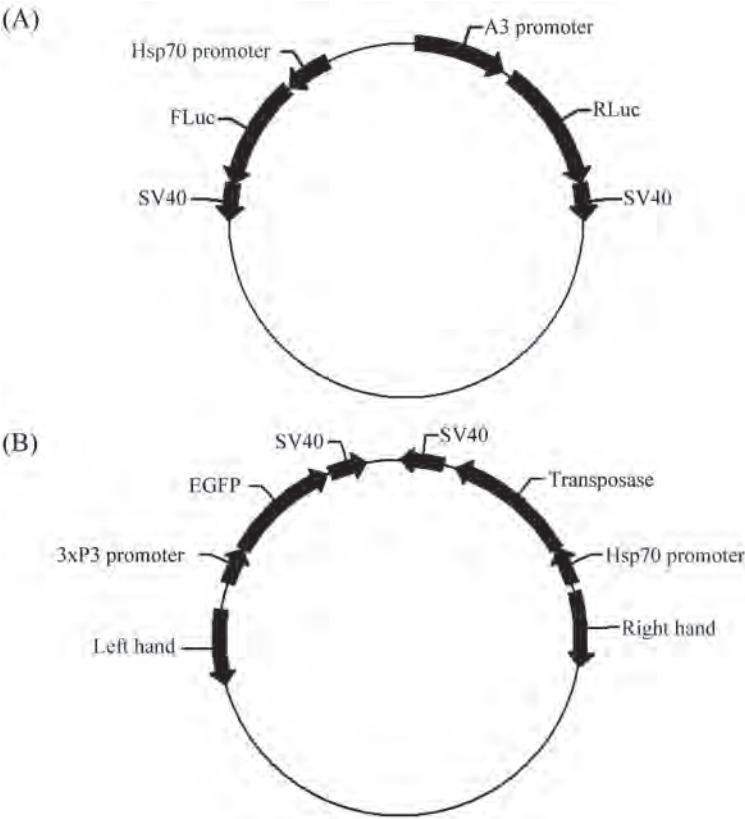


图1 用于细胞转染与家蚕转基因的质粒结构图

A: pA3RLuc-hsp70-538FLuc和pA3RLuc-hsp70-305FLuc的质粒结构; B: pB3×P3EGFP-hsp70-305 transposase的质粒结构。
Fig.1 Schematic structure of the plasmids for cell transfection and transformant
A: pA3RLuc-hsp70-538FLuc or pA3RLuc-hsp70-305FLuc; B: pB3×P3EGFP-hsp70-305 transposase.

1.2.3 细胞转染和荧光检测 按照Invitrogen公司提供的Lipofectin 2000的转染步骤, 于六孔板中转染1 μ g载体质粒。转染两天后, 经不同温度处理后裂解细胞, 离心上清液用Promega公司提供的双荧光检测试剂盒检测细胞萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。

1.2.4 显微注射和转基因蚕的筛选 显微注射和转基因阳性个体的筛选方法参照文献^[7]。转座质粒与辅助酶质粒的浓度比为1: 0.5, 每个胚胎大约注射15~20 nl的混合质粒, DNA浓度为0.3 μ g/ μ l。

2 结果

2.1 家蚕hsp70基因上游的HSE元件分析

2.1.1 家蚕hsp70上游片段的序列分析 克隆得到的片段hsp70-538和hsp70-305之间的序列的相对位置如图2所示, 与NCBI上已公布的*Bombyx mori* Bmhsp70 mRNA(GenBank: AB035326.1)的全序列相比较由此

确立了转录起始位点, tta aat a可能是TATA盒, 两序列相比较, hsp70-538比hsp-305多包含193 bp(-438~-246)的非转录序列和40 bp(59~98)的转录但非编码序列。

2.1.2 果蝇与家蚕HSE元件的比较 在果蝇的基因组中共发现了5个hsp70基因, 这些基因转录起始位点前都有一段长350 bp的保守序列。该序列无论在自身同源细胞或是在猴细胞^[1,4]、蟾蜍卵细胞^[8]和鼠细胞^[9]中都具有热激活性。将这350 bp的序列进行删除实验, 发现大约70 bp是在猴细胞CV-1和COS-7的热激反应中必不可少的^[4]。而在Amin等^[10]的果蝇细胞实验中, 除了70 bp外, 还必须包括(-90~-68)这一区域的序列。在Parker和Topol的印记分析中指出, RNA聚合酶II恰恰要与(-90~-40)之间的序列结合^[11], 它们之间的作用是相互协调的, 删除任何一个都会使转录减少10倍以上^[10]。由此确立了具有完整功能的果蝇hsp70启动子的最短序列^[10,12~14]。

Pelham进一步对比了果蝇的hsp83、hsp70、

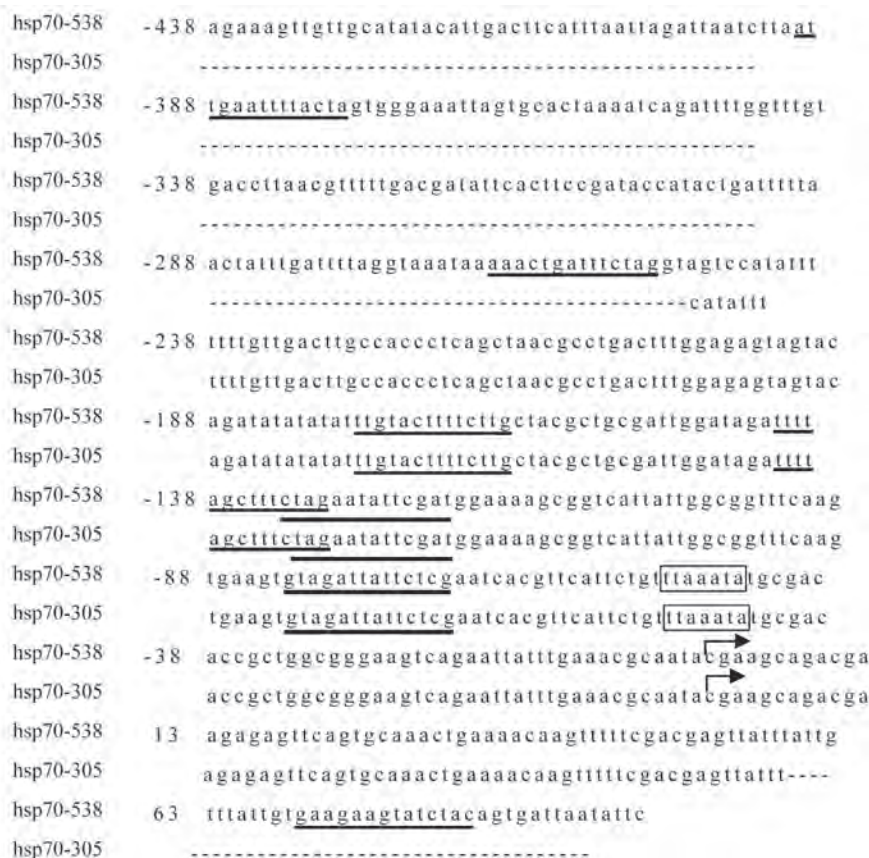


图2 hsp70上游序列的特征

注: 下划线表示可能的HSE元件, 箭头表示起始位点, 方框表示TATA盒。

Fig.2 The characteristics of two hsp70 upstream sequences

Note: the underscores indicate the HSE, arrow indicates the transcription initiate start site, box indicates the TATA box.

hsp68、hsp27、hsp26、hsp23、hsp22的启动子序列,发现有一个14 bp的回文序列,其中的10 bp是高度保守的,其序列为CTnGAAnnTTCnAG,称为HSE(heat shock element)元件^[1],它能够进行热激调控,已被Pelham的实验证实,如果只配对4或5个碱基,序列没有热激活性,1或2个碱基的错配可以被容忍,没有特定的碱基是非必需的^[15]。HSE中存在HSF1(heat-shock factor 1)^[16]、CHBF(constitutive HSE-binding factor)^[17]、Ku因子^[18]等的结合位点,这也许是HSE序列能够实现热激调节的原因。

我们将克隆得到的*Bombyx mori* hsp70上游片段与这公认的HSE中10个保守碱基进行比较,发现最多的有9个共同碱基,而*Bombyx mori* hsp19.9启动子有6个, hsp20.4启动子有8个, hsp23.7启动子有10个(表2)。这些共有的保守序列通常为蛋白质的结合位

点,据此我们可以推断在果蝇、蟾蜍细胞、猴细胞和家蚕中都有具有相似结构的蛋白作用因子,能够直接与这些序列相互作用。

2.2 家蚕hsp70基因上游片段的热激活性分析

2.2.1 家蚕hsp70基因上游片段在BmN细胞中的热激效应 热激蛋白基因启动子是诱导型启动子,虽在所有类型细胞中都有存在,但在正常的生理状态下,该启动子处于低水平表达状态,只有当受热激或其他胁迫作用时它才会启动^[19,20]。我们将1 μg的pA3RLuc-hsp70-305FLuc质粒导入到BmN细胞中,培养48 h后分别置于三种环境温度27 ℃、37 ℃、42 ℃中温育2 h,每种处理4次重复,然后置于正常培养温度27 ℃恢复2 h,最后测定细胞的双荧光素酶活性。细胞实验结果表明(图3),在27 ℃温度培养时,所用的hsp70-305片段控制表达的FLuc酶活性较低,随着温

表2 HSE元件的比较
Table 2 Comparison of the HSE

品种 Strain	保守序列 Consensus <u>CTnGAAnnTTCnAG</u>	与TATA的距离 Bases from TATA	与保守序列的匹配数 Bases matching consensus
<i>Drosophila melanogaste</i> hsp83	<u>CTAGAAGTTTCTAG</u>	26	10
<i>Drosophila melanogaste</i> hsp70	<u>CTCGAATGTTTCGCG</u>	15	9
<i>Bombyx mori</i> hsp70	<u>CTAGAATATTCGAT</u>	66	9
<i>Bombyx mori</i> hsp20.4	<u>TTAGAATTTTCAAT</u>	302	8
<i>Bombyx mori</i> hsp23.7	<u>CTAGAATCTTCCAG</u>	36	10
<i>Bombyx mori</i> hsp19.9	<u>TTAGAAACTAAGCG</u>	95	6

注:下划线表示热激保守序列。
Note: the heat shock consensus sequences are indicated by underscores.

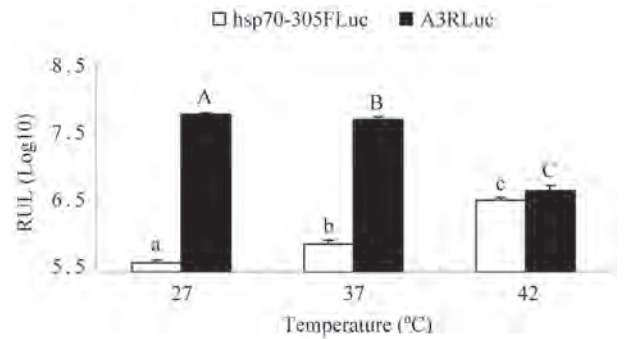


图3 hsp305FLuc 和 A3RLuc在BmN细胞中的热激反应
RLU: 相对光子数(光子/60秒); 每组数据取平均值±标准差(LSD test, $P<0.05$; a, b, c: hsp70-305FLuc; A, B, C: A3RLuc)。

Fig.3 Heat-shock expression of hsp305FLuc and A3RLuc in BmN cells

RLU: relative light units (photos per 60 s); The values are represented as mean±SD (letters indicate results of LSD test, $P<0.05$; a, b and c: hsp70-305FLuc; A, B and C: A3RLuc)。

度的升高活性逐渐增加,三种温度之间的表达差异达到显著水平($P<0.05$),在42 ℃刺激下具有显著的热激效应,比不热激(27 ℃)时活性提高至近8倍,能启动下游的基因大量表达FLuc酶,体现了热激启动子活性。

A3启动子是家蚕肌动蛋白3启动子,属于组成型启动子,控制的结构基因的表达大体上应该恒定在一定水平。而本研究发现 A3启动子在27 ℃时活性很高,但随温度刺激的加强,活性呈下降趋势,三种温度之间的表达差异也达到显著水平($P<0.05$)。A3启动子的这种特性有待我们在研究中加以注意。

2.2.2 家蚕hsp70基因上游片段的热激累积效应 将1 μg的pA3RLuc-hsp70-305FLuc质粒转染BmN细胞,培养48 h后,于42 ℃对细胞分别热激0 h、1 h、2 h、3 h、4 h,相应的恢复时间为4 h、3 h、2 h、1 h、0 h,恢复温度为27 ℃,3~4次重复,最后测定细胞的双荧光素酶

活性。细胞实验结果(图4)表明, 热处理的时间越长, FLuc酶的表达量越多, 差异达到显著水平($P<0.05$)。在hsp70-305FLuc处理2 h后热激作用趋于变缓, 处理3 h与处理4 h的比处理2 h增加较少。

与hsp70-305FLuc的表达情况相反, A3启动子控制表达的RLuc酶量, 与热激的时间成反比, 三种热激时间之间的表达差异均达到显著水平($P<0.05$)。在热激条件下, A3启动子再次与hsp70启动子表现相反的特性, 值得我们在研究中加以注意。

2.2.3 长度不同的上游片段之间的活性比较 将1 μ g质粒pA3RLuc-hsp70-305FLuc和pA3RLuc-hsp70-538FLuc分别转染BmN细胞, 培养48 h后, 于42 $^{\circ}$ C对细胞分别热激0 h、1 h、2 h、3 h、4 h, 相应的恢复时间为4 h、3 h、2 h、1 h和0 h, 恢复温度为27 $^{\circ}$ C, 3~4次重复, 最后测定细胞的双荧光数值。结果显示(图5)在总监测时间为4 h内, 片段hsp70-538的表达活性是hsp70-305表达活性的1~3倍。说明长度为538 bp的上游片段比305 bp片段具有更好的热激效应。

2.3 长度不同的家蚕hsp70上游片段之间的HSE元件比较

hsp70-538和hsp70-305这两个片段相比较, hsp70-538除了包含共有的HSE外, 还包含3个可能的HSE元件(图2), 其中两个位于非转录区内, 一个位于转录非

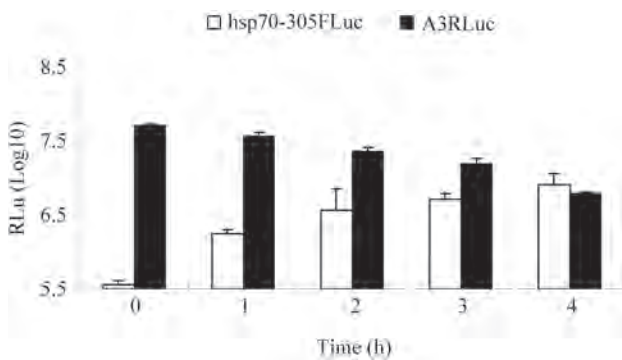


图4 hsp70-305FLuc 和 A3RLuc表达量在42 $^{\circ}$ C的热激累积效应 1: 在42 $^{\circ}$ C热激1 h, 在27 $^{\circ}$ C恢复3 h; 2: 在42 $^{\circ}$ C热激2 h, 在27 $^{\circ}$ C恢复2 h; 3: 在42 $^{\circ}$ C热激3 h, 在27 $^{\circ}$ C恢复1 h; 4: 在42 $^{\circ}$ C热激4 h; RLU: 相对光子单位(光子数/60秒)。

Fig.4 The accumulative effect of heat shock on the expression of hsp70-305FLuc and A3RLuc at 42 $^{\circ}$ C

1: heat-shocked for 1 h at 42 $^{\circ}$ C and maintained at 27 $^{\circ}$ C for 3 h; 2: heat-shocked for 2 h and maintained at 27 $^{\circ}$ C for 2 h; 3: heat-shocked for 3 h and maintained at 27 $^{\circ}$ C for 1 h; 4: heat-shocked for 4 h; RLU: relative light units (photos per 60 s); The values are represented as mean $\pm$ SD; Letters indicate results of LSD test.

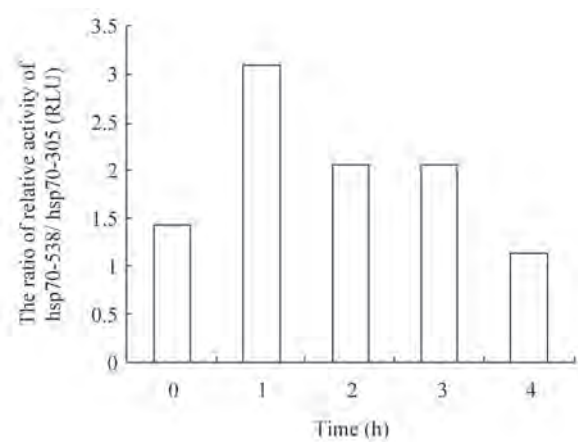


图5 hsp70-538 与hsp70-305 在42 $^{\circ}$ C时的相对热激活性比较 0: 表示未热激1 h, 在27 $^{\circ}$ C保持4 h; 1: 表示在42 $^{\circ}$ C热激1 h, 在27 $^{\circ}$ C恢复3 h; 2: 表示在42 $^{\circ}$ C热激2 h, 在27 $^{\circ}$ C恢复2 h; 3: 表示在42 $^{\circ}$ C热激3 h, 在27 $^{\circ}$ C恢复1 h; 4: 表示在42 $^{\circ}$ C热激4 h; 相对活性为FLuc的相对光子数/RLuc的相对光子数。

Fig.5 The comparison of the relative activity between hsp70-538 and hsp70-305 at 42 $^{\circ}$ C

0: maintained at 27 $^{\circ}$ C for 4 h; 1: heat-shocked for 1 h and maintained at 27 $^{\circ}$ C for 3 h; 2: heat-shocked for 2 h and maintained at 27 $^{\circ}$ C for 2 h; 3: heat-shocked for 3 h and maintained at 27 $^{\circ}$ C for 1 h; 4: heat-shocked for 4 h; relative activity was calculated by RLU of FLuc/RLU of RLuc.

翻译区中。此外, 它们还有一些重复或是反向重复, 虽然它们的作用模式不清楚, 但是他们的序列却是保守的。这些差别对下游基因表达影响的原因可能涉及两个方面, 一方面可能是这两个不同长度的启动子所包含的HSE元件和重复序列有差异, 导致了两者与RNA聚合酶的结合能力不同, 致使转录水平不同; 另一方面可能是两个不同长度的mRNAs的翻译效率有差异, 相对较长的非翻译前导序列更有益于翻译表达的现象, 已被多个实验所发现^[21-23]。

2.4 家蚕转基因及在家蚕个体中hsp70-305的热激活性

转基因质粒pB3 $\times$ P3EGFP-hsp70-305Transposase与转座辅助质粒一同注射入家蚕兰10的胚胎中, 成活的蚕蛾与野生型兰10蚕蛾杂交, G1代进行荧光检测。转基因实验的G1代阳性率为15.7%h表3), 阳性个体的蚕蛾表现绿眼(图6A4), 将转基因阳性个体在42 $^{\circ}$ C分别热激1 h、2 h和3 h, 以不热激的阳性家蚕做对照(饲养温度22 $^{\circ}$ C), 然后用RT-PCR的方法检测经热激后的Transposase mRNA, 结果热激的转基因家蚕获得680 bp的扩增片段(图6B), 与预期的目标片段分子量相符, 而且随着热激时间的增加, Transposase mRNA对应的量

表3 转基因结果统计
Table 3 Results of G₀ transgenesis

蚕种	注射卵	可育蚕蛾	EGFP阳性的卵圈	转基因阳性率
Strain	Injected eggs	Fertile moths	Broods with EGFP-positive larvae	Ratio of G ₀ transformed moths in fertile moths
Lan 10	2 100	51	8	15.7%

注: 转基因阳性的G₀代蚕蛾数目等同于在幼虫中发现有阳性转基因家蚕的蛾圈数目。
Note: the number of G₀ transformed moths equals to that of broods with enhanced green fluorescent protein (EGFP)-positive larvae.

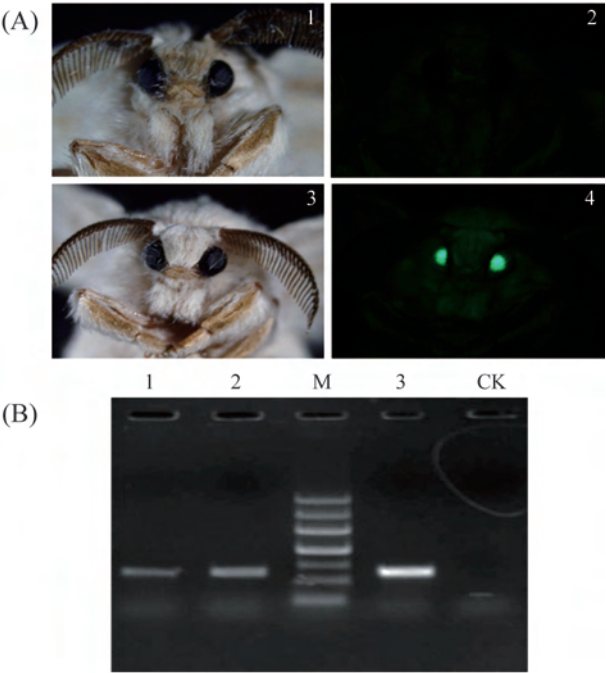


图6 在转基因家蚕中分析热激片段

A: 转基因阳性家蚕的表达模式, 1和3为白光检测, 2和4为绿色荧光检测, 1和2是空白对照; B: RT-PCR结果分析, 家蚕样品1、2和3分别热激1、2和3小时然后置于22℃饲养温度, 将未热激的转基因阳性家蚕作为空白对照(CK), M: DNA marker由DNA片段(4 500 bp、3 000 bp、2 000 bp、1 200 bp、800 bp、500 bp、200bp)组成。

Fig.6 Transgenic analysis of the heat shock fragment in silkworm

A: expression patters in transgenic silkworm, 1 and 3 were in bright field in moth, 2 and 4 were screened for green fluorescence; 1 and 2 were controls; B: the result of RT-PCR analysis, the transgenic silkworms were heat shocked for 1 h, 2 h and 3 h at 42 °C, respectively, and then maintained at the 22 °C; the transgenic silkworm being not heat-shocked was used as the control(CK); M: DNA marker (4 500 bp、3 000 bp、2 000 bp、1 200 bp、800 bp、500 bp、200bp).

也增加, 对照不热激的阳性家蚕没有扩增出片段, 说明hsp70-305在家蚕体内也具有热激活性。

这种具有热激活性的、相对较短的启动子, 更有利于以piggyBac为载体的转基因家蚕实验中携带

较长序列的外源基因。

致谢: 我们衷心地感谢浙江大学农业生物与环境科学研究所985平台提供相关实验仪器的帮助。

参考文献(references)

- 1 Pelham HR. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. Cell 1982; 30(2): 517-28.
- 2 Nover L. Expression of heat-shock genes in homologous and heterologous systems. Enzyme Microb Tech 1987; 9(3): 130-44.
- 3 Topol J, Ruden DM, Parker CS. Sequences required for in vitro transcriptional activation of a *Drosophila* hsp70 gene. Cell 1985; 42(2): 527-37.
- 4 Mirault ME, Southgate R, Delwart E. Regulation of heat shock genes: a DNA sequence upstream of *Drosophila* hsp70 genes is essential for their induction in monkey cells. EMBO J 1982; 1: 1279-85.
- 5 Zhuang LF, Wei H, Lu CD, Zhong BX. The relationship between internal domain sequences of piggyBac and its transposition efficiency in *BmN* cells and *Bombyx mori*. Acta Bioch Bioph Sin 2010; 42(6): 426-31.
- 6 Handler AM, Harrell RA. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. Insect Mol Biol 1999; 8(4): 449-57.
- 7 Zhong BX, Li J, Chen J, Ye J, Yu SD. Comparison of transformation efficiency of piggyBac transposon among three different silkworm *Bombyx mori* Strains. Acta Bioch Bioph Sin 2007; 39(2): 117-22.
- 8 Voellmy R, Rungger D. Transcription of a *Drosophila* heat-shock gene is heat-induced in *Xenopus* Oocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79(6): 1776-80.
- 9 Corces V, Pellicer A, Axel R, Meselson M. Integration, transcription, and control of a *Drosophila* heat shock gene in mouse cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(11): 7038-42.
- 10 Amin J, Mestril R, Lawson R, Klapper H, Voellmy R. The heat shock consensus sequence is not sufficient for hsp70 gene expression in *Drosophila melanogaster*. Mol Cell Biol 1985; 5(1): 197-203.
- 11 Parker CS, Topol J. A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region-specific DNA-binding

- activity. Cell 1984; 36(2): 357-69.
- 12 Dudler R, Travers AA. Upstream elements necessary for optimal function of the hsp70 promoter in transformed flies. Cell 1984; 38(2): 391-8.
 - 13 Lee HS, Kraus KW, Wolfner MF, Lis JT. DNA-sequence requirements for generating paused polymerase at the start of hsp70. Gene Dev 1992; 6(2): 284-95.
 - 14 Simon JA, Sutton CA, Lobell RB, Glaser RL, Lis JT. Determinants of heat shock-induced chromosome puffing. Cell 1985; 40(4): 805-17.
 - 15 Pelham HR, Bienz M. A synthetic heat-shock promoter element confers heat-inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. EMBO J 1982; 1(11): 1473-7.
 - 16 Morimoto RI. Cells in stress-transcriptional activation of heat-shock genes. Science 1993; 259(5100): 1409-10.
 - 17 Mosser DD, Theodorakis NG, Morimoto RI. Coordinate changes in heat-shock element-binding activity and hsp70 gene-transcription rates in human-cells. Mol Cell Biol 1988; 8(11): 4736-44.
 - 18 Turturici G, Geraci F, Candela ME, Cossu G, Giudice G, Sconzo G. Hsp70 is required for optimal cell proliferation in mouse A6 mesoangioblast stem cells. Biochem J 2009; 421: 193-200.
 - 19 Ashburner M, Bonner JJ. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. Cell 1979; 17(2): 241-54.
 - 20 Schlesinger M, Ashburner M, Tissieres A. Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
 - 21 Schoffl F, Rieping M, Baumann G, Bevan M, Angermuller S. The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. Mol Gen Genet 1989; 217(2-3): 246-53.
 - 22 Holmgren R, Corces V, Morimoto R, Blackman R, Meselson M. Sequence homologies in the 5' regions of 4 *Drosophila* heat-shock genes. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(6): 3775-8.
 - 23 Klemenz R, Hultmark D, Gehring WJ. Selective translation of heat shock mRNA in *Drosophila melanogaster* depends on sequence information in the leader. EMBO J 1985; 4(8): 2053-60.

Identification of *Bombyx mori* hsp70 Promoter and Its Function

Lan-Fang Zhuang¹, Hao Wei¹, Jian-Rong Lin², Bo-Xiong Zhong^{1*}

(¹College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²College of Animal Sciences, South China of Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract We have got two fragments located in the upstream of *Bombyx mori* hsp70 gene, one was hsp70-538 (538bp in length), and the other was hsp70-305 (305bp) through the PCR amplification. By comparing analysis, these two fragments possess of the consensus sequence of HSE (heat shock element) associated with the heat shock genes of *Drosophila*: CTnGAAnnTTCnAG. Applying the technology of dual-luciferase vector, these two fragments can confer heat inducement in *BmN* cells. And the hsp70-538 fragment can induce more activity than hsp70-305 fragment. We also informed it by transgenic analysis in silkworm. Its activity was increased with the elevated temperature. The more exposure to 42 °C, the more amount of target gene expression we got. So these two fragments can be considered as heat shock promoters.

Key words hsp70 promoter; heat induce; *BmN* cell; transgenic silkworm

Received: March 30, 2010 Accepted: October 18, 2010

This work was supported by the National Basic Research Program of China (No.2005CB121003), the National Natural Science Foundation of China (No.30972142) and the Science and Technology Department of Zhejiang Province (No.2009C32070)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971302, E-mail: bxzhong@zju.edu.cn