

水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因 启动子克隆及其活性分析^①

李 胜¹, 黄时海², 张 艳¹, 石德顺¹, 李湘萍¹

1. 广西大学 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530005;

2. 广西大学 生命科学与技术学院, 南宁 530005

摘要: 为了解转录激活与信号转导因子 5(STAT5)在水牛乳腺发育及泌乳生理中的功能, 对水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因的 5'调控区启动子序列进行了克隆, 并比较其活性. 根据 GenBank 已公布的牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因序列设计特异性引物, 以广西本地水牛乳腺组织基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 法分别扩增不同长度 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子片段并进行生物信息学分析. 结果表明: 克隆得到的水牛 *STAT5a* 基因启动子片段(P1 和 P2)大小是 500 bp, 700 bp, *STAT5b* 基因启动子片段(P3, P4 和 P5)大小是 500 bp, 800 bp, 1 500 bp. 在线分析结果显示, 仅 P2 片段中存在高甲基化位点, 且富含 SP1, AP2 等转录因子结合位点. 将构建的不同长度启动子片段分别连入 pGL3-Basic 载体, 分别转染水牛乳腺上皮细胞, 检测荧光素酶表达水平. 与未转染组相比, P1~P5 质粒转染组的荧光素酶比值均显著提高($p < 0.05$); 添加 5 mg/mL 质量浓度催乳素(PRL)处理乳腺上皮细胞, P3 质粒转染组的荧光素酶比值显著高于其他各组($p < 0.05$). 以上结果表明, 水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子活性均受到 PRL 调节, 两者表达水平在水牛乳腺上皮细胞中不同, 且 *STAT5b* 基因表达受 PRL 调控更为明显.

关键词: 水牛; *STAT5a*; *STAT5b*; 启动子; PRL; 活性

中图分类号: S823.8⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)01-0001-08

STAT5 最初是从动物乳腺组织中分离鉴定出来的一种生长因子, 发现它与生长激素作用有关, 具有特定的生长激素结合序列, 并将其命名为 MGF 因子^[1]. 目前在哺乳动物中发现并已鉴定出的 *STATs* 蛋白家族成员共有 7 个, 包括 *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT4*, *STAT5a* 和 *STAT5b*, *STAT6*^[2-5] 等, 其中 *STAT5* 蛋白由 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因编码, 两者均为胞内信号传导因子, 受酪氨酸激酶及受体激活作用, 发生磷酸化修饰, 可形成同源或异源二聚体, 调节靶基因的表达, 广泛参与乳腺细胞增殖、分化和凋亡^[6-7]. *STAT5* 蛋白具有 7 个功能结构域, 按照结构和功能依次可划分为氨基端结构域(NH₂ Domain, ND)^[8-9]、卷曲结构(Coiled-coiled Domain, CCD)^[10]、DNA 结合结构域(DNA binding Domain, DBA)^[11-12]、连接结构域(Link Domain)、SH2 结构域(Src-homology Domain)^[13-14]、转录激活结构域(Transcription Activation Domian, TAD)^[15] 及羧基端(COOH Domain, CA)^[16-17]. *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因在转录调控功能上的差异主要由其基因调控元件所决定^[18-20].

PRL 作用下的 JAK-*STAT5* 通路对于乳腺生长、发育和泌乳具有重要的作用, *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因可以在不同类型乳腺细胞中通过内源性表达促进细胞增殖和乳蛋白合成^[21-23]. Nelson 等^[24] 分析 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因在染色体中的位置时发现, *STAT5* 结合位点在基因组中比较广泛, 这些碱基序

① 收稿日期: 2017-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560632); 广西自然科学基金项目(2016GXNSFDA380030).

作者简介: 李 胜(1988-), 男, 湖北阳新人, 博士研究生, 主要从事发育生物学的研究.

通信作者: 李湘萍, 研究员, 博士研究生导师.

列通常位于基因的内含子区,虽然 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因具有共同的靶点,但其表达水平不同,两者在启动子区存在较大差异,进而影响靶基因的表达,说明 *STAT5a* 和 *STAT5b* 蛋白在影响不同类型细胞增殖中的行为并不相同.对奶牛 *STAT5a* 基因多态性的研究表明,奶牛乳腺组织中,*STAT5a* 信号通路受催乳素激活和调节,可作为乳蛋白合成的主要通路,*STAT5a* 基因的突变会导致产生 3 种不同的基因型,即 AA/GG/AG 基因型,这些基因型和奶牛的产奶性状相关联,直接影响奶牛泌乳量及其品质的改变,由此推断 *STAT5a* 似乎是奶牛泌乳能力的标志^[25-26].因此,对 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因表达及调控元件的挖掘分析,可以进一步了解两者在乳腺发育和泌乳过程中的功能.

翟磊等^[27]分析了不同泌乳阶段和产奶水平对奶牛淋巴细胞凋亡的影响,但目前尚无关于水牛 *STAT5* 基因克隆及其功能的研究报道.本研究以广西本地水牛为研究对象,旨在克隆并分析水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子序列,通过构建双荧光素酶报告载体,并在水牛乳腺上皮细胞(BMECs)中分析 PRL 对 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子活性的影响.研究结果可为进一步研究 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因在水牛乳腺发育和泌乳过程中的表达及功能奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织与细胞来源

水牛乳腺组织取自于广西南宁市鲁班路屠宰场.

1.1.2 主要试剂

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; LA Taq 酶, DNA Marker III, 限制性内切酶 *Hind* III、*Kpn* I, T4 DNA Ligation, dNTP, 2×GC buffer, Reverse Transcriptase XL(AMV), Oligo dT, pMD18-T 载体等均购自大连宝生物公司; DH5 α 感受态细胞、TransIntroTM EL Transfection Reagent 细胞转染试剂盒均购自北京全式金生物科技公司; 蛋白酶 K、琼脂糖凝胶回收试剂盒、普通质粒提取试剂盒等购自北京天根生物科技公司; Dual Luciferase@Reporter Assay System kit 荧光素酶检测试剂盒、pGL3-Basic 和 pRL-TK 质粒购自 Promega 公司; DMEM、胰蛋白酶、青链霉素、胰岛素、氢化可的松、催乳素、转铁蛋白因子等购自 Sigma 公司细胞培养级; 其他均为国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 NCBI 和 Ensembl 数据库上的牛 *STAT5a* (AJ242522.1) 和 *STAT5b* (NM_174617.4) 基因序列, 利用 Oligo 6.0 软件分别设计 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区特异性引物, 在上下游引物序列 5' 端分别加入 *Hind* III 和 *Kpn* I 限制性内切酶位点, 引物序列如表 1 所示.

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
P1(<i>STAT5a</i>)	F: <u>AAGCTTAATTTTCGTTCTTAA</u> ATC GT R: <u>GGTACCCAGACACGCTTTCCT</u> GT	500
P2(<i>STAT5a</i>)	F: <u>AAGCTTAATTTTCGTTCTTAA</u> ATC GT R: <u>GGTACCCCTTCTTCTCTCCCCT</u>	700
P3(<i>STAT5b</i>)	F: <u>AAGCTTCCTTTTAAAAGTAAAA</u> R: <u>GGTACCATCTGATGAAGGGCATCGC</u>	500
P4(<i>STAT5b</i>)	F: <u>AAGCTTGTCTGAAAAGGTATCGTGGTA</u> R: <u>GGTACCATCTGATGAAGGGCATCGC</u>	800
P5(<i>STAT5b</i>)	F: <u>AAGCTTTGATGTCTTGGGTGATCTC</u> R: <u>GGTACCATCTGATGAAGGGCATCGC</u>	1 500

注: 下划线为引入的酶切位点.

1.2.2 启动子克隆

取 0.1 g 水牛乳腺组织, 通过酚/氯仿抽提的方法提取总 DNA, 以设计合成的 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因特异性引物, 扩增 5 段不同长度的启动子片段. PCR 反应体系共 20 μL : DNA 模板 1.0 μL 、LA Taq 1 μL 、 $2\times\text{GC}$ Buffer 10 μL 、dNTP 2 μL 、上下游引物各 0.5 μL 、ddH₂O 5 μL . 采用降落 PCR 方法扩增, 反应程序为 4 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 分别于 62 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、58 $^{\circ}\text{C}$ 、56 $^{\circ}\text{C}$ 、54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 其循环数分别为 5、5、5、10、10、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 0.5~2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存. PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析, 并对目的条带胶回收、TA 克隆, 然后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑菌后进行扩大培养; Cracking 法快速鉴定重组质粒, 然后提取质粒, 酶切鉴定并送至上海生工生物公司测序分析.

1.2.3 启动子生物信息学分析

利用 UCSC 和 Ensembl 分析克隆得到 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区最长序列; Methprimer 分析启动子区 CpG 岛; FirftEF 和 BDGP 分析转录起始位点; TFBIND 预测启动子区结合元件.

1.2.4 启动子荧光素酶报告载体构建及鉴定

将 pMD-18T-P1~P5 和 pGL3-Basic 重组质粒分别用 *Hind* III 和 *Kpn* I 进行双酶切, 酶切片段经琼脂糖凝胶电泳后回收, 用 T4 DNA 连接酶将启动子片段定向连接入 pGL3 骨架载体, 重组载体命名为 P1~P5. 转化提取质粒, 进行酶切鉴定.

1.2.5 启动子活性检测

转染前 1 d 将细胞以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 24 孔板, 待 80%~90% 汇合度时进行细胞转染, 转染方法参照全式金细胞转染试剂盒说明书进行操作. 每组设置 3 个重复, 将 P1~P5 质粒和内参 pRL-Trk 质粒分别按照 9:1 质量比共转染水牛乳腺上皮细胞. 在水牛乳腺上皮细胞培养中, 分别设置添加 5 mg/mL 质量浓度的 PRL 药物处理组和未添加组作为对照. 72 h 后收集细胞, 按照双荧光素酶法检测试剂盒说明书操作分析启动子活性.

1.2.6 数据分析

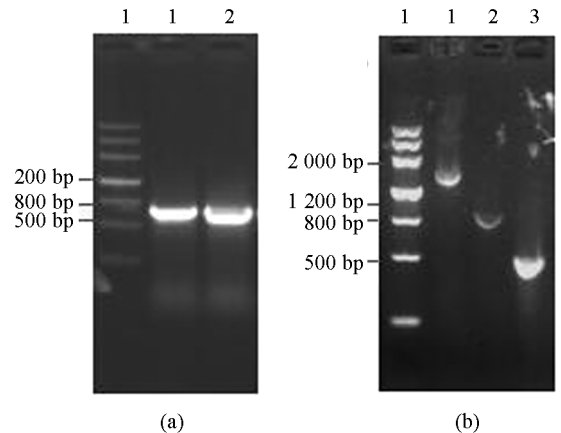
使用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析 (ANOVA); 所有试验均重复 3 次以上, $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $p > 0.05$ 表示差异不具有统计学意义.

2 结 果

2.1 水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子的克隆与分析

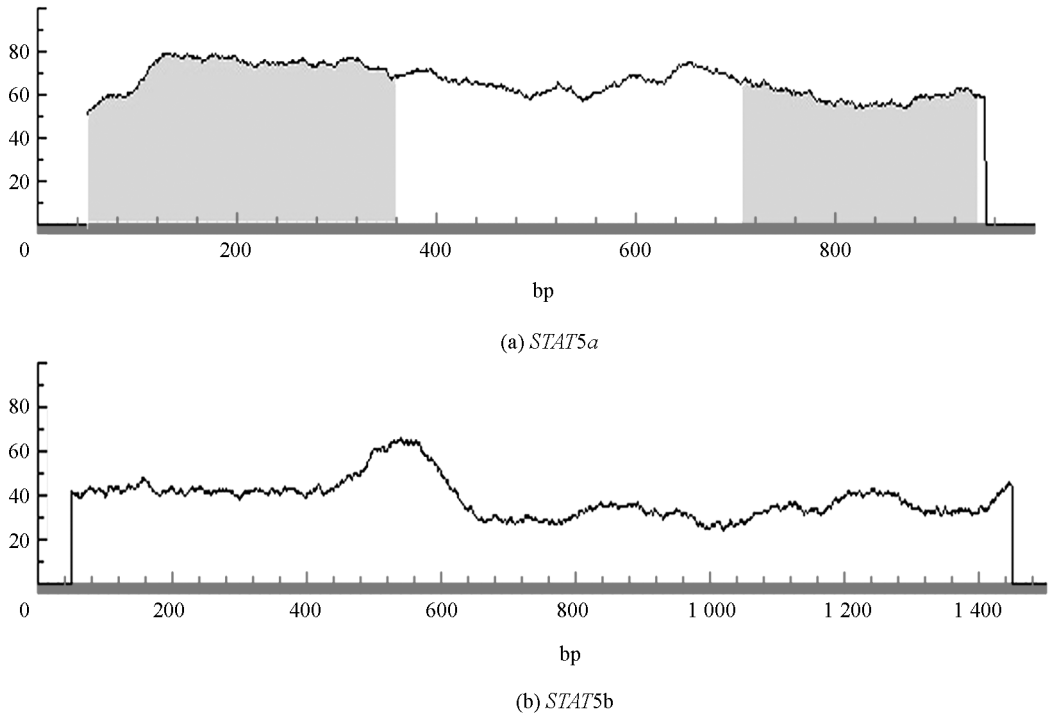
利用 Oligo 6.0 软件共设计 5 对特异性引物, 以本地水牛乳腺组织 DNA 为模板, 扩增得到的 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子片段大小和预期一致 (图 1). 将 PCR 产物纯化后, 分别与 pMD-18T 载体连接, 筛选得到阳性重组质粒, 命名为 pMD-18T-P1, pMD-18T-P2, pMD-18T-P3, pMD-18T-P4 和 pMD-18T-P5. 经测序分析, 水牛 *STAT5a* 基因启动子片段大小分别为 500 bp 和 700 bp, *STAT5b* 基因启动子片段大小分别为 500 bp, 800 bp 和 1 500 bp.

利用启动子分析软件在线分析 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区 CpG 岛情况, 分析标准为 Window > 100 bp, GC% > 50%, Obs/Exp > 0.8. 结果显示, *STAT5a* 基因启动子序列存在 2 个 CpG 岛, *STAT5b* 基因启动子序列不存在 CpG 岛 (图 2). 转录因子预测结果发现, *STAT5a* 基因启动子区转录因子以 SP1, AP1 等为主, *STAT5b* 基因则包含 CREB, AP1 等主要的转录因子结合位点 (表 2).



Note: M1, Marker III; a. *STAT5a* 启动子片段扩增产物; 1, P2; 2, P1; b. *STAT5b* 启动子片段扩增产物; 1, P5; 2, P4; 3, P3.

图 1 水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区 PCR 扩增结果

图 2 水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区甲基化预测图谱表 2 水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因转录因子结合分析

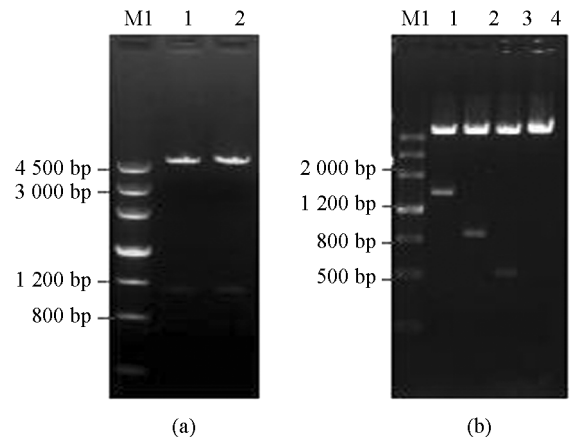
基因	结合位点	分数	共有序列	信号序列
<i>STAT5a</i>	SP1	0.860 419	NGGGGGCGGGGYN	GGATGGAGGGAGG
	AP1	0.857 394	RSTGACTNMNW	CGTGACTGGGA
	CREB	0.839 813	TGACGTMA	AGACGTCTG
	STAT	0.818 503	TTCCCRKAA	TTCCCAACA
	P53	0.847 011	NGRCWTGYCY	AAGCGTGTCT
<i>STAT5b</i>	AP1	0.848 609	RSTGACTNMNW	TCTTAGCCACT
	CREB	0.788 588	NNGNTGACGYNN	ACACCTCATTGT
	SP1	0.753 551	NGGGGGCGGGGYN	GCAGCCACCCAC
	YY1	0.786 370	NNNNNCCATNTWNNWN	AAGATTTCAGTTTTCAGTC

2.2 双荧光素酶报告基因载体构建

将测序验证正确的 pMD-18T-P1, pMD-18T-P2, pMD-18T-P3, pMD-18T-P4, pMD-18T-P5 和 pGL3-basic 重组质粒分别用 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切, T4 连接后分别得到 pGL3-*STAT5a*-promoter (P1 和 P2), pGL3-*STAT5b*-promoter (P3, P4 和 P5) 重组质粒. 酶切鉴定重组质粒, 均得到 1 条预期大小 DNA 片段(图 3), 测序验证亦证明构建正确.

2.3 水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子活性分析

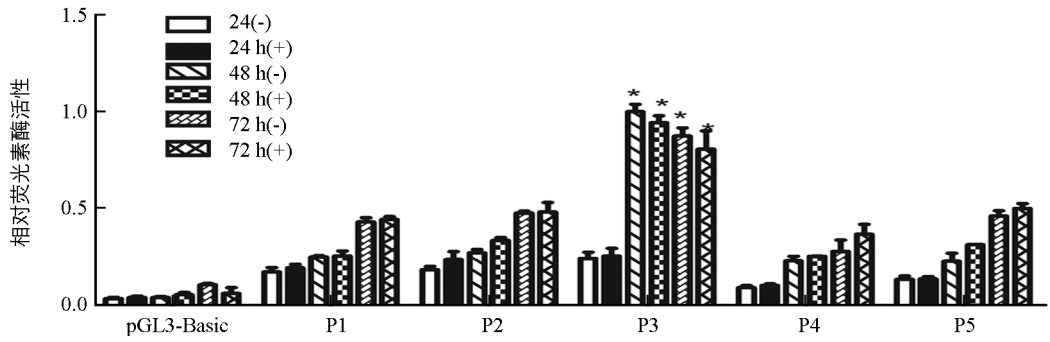
将含启动子的双荧光素酶报告质粒 P1~P5 分别与内参 pRL-TK 质粒共转染 BMECs 细胞, 转染 48 h 后检测双荧光素酶表达水平, 并计算荧光素酶比值. 结果显示, 在 BMECs 细胞系中, 与对照组相比添加 5 mg/mL 质量浓度 PRL 处理乳腺上皮细胞时, P3 质粒转染组荧光素酶比值显著高于其他各组 ($p < 0.05$); 随着 PRL 激素处理时间延长, 各组荧光素酶



Note: M1, Marker III; a. pGL3-*STAT5a*-promoters; 1. pGL3-*STAT5a*-0.7 kb; 2. pGL3-*STAT5a*-0.5kb; a. pGL3-*STAT5b*-promoters; 1. pGL3-*STAT5b*-1.5kb; 2. pGL3-*STAT5b*-0.8kb; 3. pGL3-*STAT5b*-0.5kb; 4. pGL3-Basic.

图 3 重组质粒酶切鉴定结果

比值明显提高, 说明 PRL 可以促进 *STAT5a* 和 *STAT5b* 启动子活性(图 4).



图中柱子上 * 表示与其他组差异具有统计学意义 ($p < 0.05$).

图 4 PRL 对启动子活性的影响

4 讨 论

STAT5a 和 *STAT5b* 基因在不同物种的各组织中广泛表达, 受到生长激素(GH)、催乳素及红细胞生成素(EPO)等与细胞生长和增殖功能密切相关的激素或细胞因子调节, 参与了细胞增殖、分化和凋亡, 在免疫、癌症、乳腺发育等过程中均发挥重要的作用^[7, 28-30]. 研究发现, *STAT5* 蛋白由 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因分别转录翻译而来, 在小鼠中两者均定位在 11 号染色体上, 其氨基酸序列相似性达到 96%^[31]. *STAT5* 基因在体内受 PRL 作用, 参与了乳腺发育和泌乳过程, 但目前对其在水牛乳腺发育和泌乳中的功能尚无报道. 本试验首次克隆并分析了水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区序列, 为进一步研究水牛 PRL 诱导下的 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因在水牛乳腺发育和泌乳中的功能奠定基础.

2002 年, Ambrosio 等^[32]克隆人 *STAT5* 基因时发现, *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因主要差异位于非编码区, 并且进一步确定了 *STAT5a* 基因启动子区 CpG 岛所占碱基比率为 23.2%, *STAT5b* 基因启动子区 CpG 岛占碱基比率为 30.2%, 同时发现 GH 作用下 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子活性不同. 本试验以水牛乳腺基因组 DNA 为模板, 克隆得到了水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因 5' 端非编码区序列, 采用生物信息学方法分析发现, 水牛 *STAT5a* 基因转录起始位点附近具有多个高甲基化位点. 启动子区预测结果显示, 水牛 *STAT5a* 基因存在 2 个 CpG 岛, 水牛 *STAT5b* 基因 5' 端调控区域内未发现 CpG 岛. 此外, 在水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区内, 我们不仅发现了典型的启动子元件如 TATA box, CAAT box 等, 同时也发现一些转录因子及 Cis 元件. *STAT5a* 基因启动子区以 SP1, AP1 等转录因子结合位点为主, *STAT5b* 基因则包含 CREB, AP1 等主要的转录因子结合位点. 以上结果说明克隆得到的水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区序列是正确的, 并且进一步发现 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子上转录因子结合位点和甲基化位点存在差异, 提示两者在基因表达和调控机制上的功能可能不同.

在动物乳腺中已有发现, *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子上确实存在甲基化修饰, 因此 *STAT5a* 和 *STAT5b* 受到特定的转录因子调节影响两者启动子活性, 并且和乳腺泌乳过程密切相关. 2013 年, 郑宜文等^[33]发现奶牛 *STAT5a* 基因启动子区上游 -689~0 bp 存在一个 CpG 岛, 包含 P300 和 SP1 等多个转录因子的结合位点, 泌乳期 *STAT5a* 基因甲基化水平低于妊娠期. 2015 年, 吴贤锋等^[34]研究发现山羊 *STAT5a* 基因存在 DNA 甲基化 CpG 岛, *STAT5a* 基因表达受 PRL 激素调节, 在泌乳期甲基化水平变化与产奶量显著相关. 本试验构建了水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子的双荧光素酶报告载体, 在水牛乳腺上皮细胞中验证启动子活性, 结果发现各启动子片段均有启动活性. 在水牛乳腺上皮细胞中, *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子活性受到 PRL 作用持续增强, 有趣的是 *STAT5b* 基因 500 bp 长度启动子活性最高 ($p < 0.05$). Crispi 等^[35]对 HeLa, HepG2 和 Jurkat 等 3 种细胞系的研究发现, *STAT5a* 基因(-430~+244, -430~+1 075, -2 119~+244)各长度启动子均比

STAT5b 基因(+100~+1 739,-1 690~+236)启动子活性相对要高,且甲基化程度低的 *STAT5a* 基因启动子活性明显高于 *STAT5b* 基因.我们在水牛乳腺上皮细胞中发现了 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子活性受 PRL 影响,首次发现 *STAT5b* 启动子活性明显高于 *STAT5a*,在 PRL 作用下 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因通过启动子区的甲基化修饰阻止特定转录因子结合,DNA 甲基化修饰可能是影响水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子表达的重要因素之一,这一推测还有待进行进一步验证.

5 结 论

本试验克隆并分析了水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区片段,并分析了 PRL 对两者启动子转录活性的影响.研究结果发现水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子区甲基化位点和转录元件存在差异,仅在 *STAT5a* 基因启动子区存在高甲基化位点;PRL 可以增强水牛 *STAT5a* 和 *STAT5b* 基因启动子在乳腺上皮细胞中的活性.

参考文献:

- [1] SCHMITT-NEY M, DOPPLER W, BALL R K, et al. Beta-Casein Gene Promoter Activity is Regulated By the Hormone-Mediated Relief of Transcriptional Repression and a Mammary-Gland-Specific Nuclear Factor [J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(7): 3745-3755.
- [2] LEVY D E, DARNELL J J. Stats: Transcriptional Control and Biological Impact [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9): 651-662.
- [3] COPELAND N G, GILBERT D J, SCHINDLER C, et al. Distribution of the Mammalian Stat Gene Family in Mouse Chromosomes [J]. *Genomics*, 1995, 29(1): 225-228.
- [4] IHLE J N. STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription [J]. *Cell*, 1996, 84(3): 331-334.
- [5] MIKLOSSY G, HILLIARD T S, TURKSON J. Therapeutic Modulators of STAT Signalling for Human Diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(8): 611-629.
- [6] FURTH P A, NAKLES R E, MILLMAN S, et al. Signal Transducer and Activator of Transcription 5 as a Key Signaling Pathway in Normal Mammary Gland Developmental Biology and Breast Cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(5): 220-233.
- [7] GALLEGO M I, BINART N, ROBINSON G W, et al. Prolactin, Growth Hormone, and Epidermal Growth Factor Activate Stat5 in Different Compartments of Mammary Tissue and Exert Different and Overlapping Developmental Effects [J]. *Dev Biol*, 2001, 229(1): 163-175.
- [8] XU X, SUN Y L, HOEY T. Cooperative DNA Binding and Sequence-Selective Recognition Conferred By the STAT Amino-Terminal Domain [J]. *Science*, 1996, 273(5276): 794-797.
- [9] BRAUNSTEIN J, BRUTSAERT S, OLSON R, et al. STATs Dimerize in the Absence of Phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(36): 34133-34140.
- [10] ZHANG T, KEE W H, SEOW K T, et al. The Coiled-Coil Domain of Stat3 is Essential for Its SH2 Domain-Mediated Receptor Binding and Subsequent Activation Induced By Epidermal Growth Factor and Interleukin-6 [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(19): 7132-7139.
- [11] SHUAI K, HORVATH C M, HUANG L H, et al. Interferon Activation of the Transcription Factor Stat91 Involves Dimerization Through SH2-Phosphotyrosyl Peptide Interactions [J]. *Cell*, 1994, 76(5): 821-828.
- [12] BOUCHERON C, DUMON S, SANTOS S C, et al. A Single Amino Acid in the DNA Binding Regions of STAT5A and STAT5B Confers Distinct DNA Binding Specificities [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(51): 33936-33941.
- [13] WAKAO H, GOUILLEUX F, GRONER B. Mammary Gland Factor (MGF) is a Novel Member of the Cytokine Regulated Transcription Factor Gene Family and Confers the Prolactin Response [J]. *EMBO J*, 1994, 13(9): 2182-2191.
- [14] KISSELEVA T, BHATTACHARYA S, BRAUNSTEIN J, et al. Signaling Through the JAK/STAT Pathway, Recent

- Advances and Future Challenges [J]. *Gene*, 2002, 285(1/2): 1–24.
- [15] ONISHI M, NOSAKA T, MISAWA K, et al. Identification and Characterization of a Constitutively Active STAT5 Mutant That Promotes Cell Proliferation [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(7): 3871–3879.
- [16] SOLDAINI E, JOHN S, MORO S, et al. DNA Binding Site Selection of Dimeric and Tetrameric Stat5 Proteins Reveals a Large Repertoire of Divergent Tetrameric Stat5a Binding Sites [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(1): 389–401.
- [17] GRIMLEY P M, DONG F, RUI H. Stat5a and Stat5b: Fraternal Twins of Signal Transduction and Transcriptional Activation [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1999, 10(2): 131–157.
- [18] BUITENHUIS M, COFFER P J, KOENDERMAN L. Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT 5) [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(11): 2120–2124.
- [19] WYSZOMIERSKI S L, YE H J, ROSEN J M. Glucocorticoid Receptor/Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT 5) Interactions Enhance STAT 5 Activation By Prolonging STAT 5 DNA Binding and Tyrosine Phosphorylation [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(2): 330–343.
- [20] LIU X, ROBINSON G W, GOUILLEUX F, et al. Cloning and Expression of Stat5 and an Additional Homologue (Stat5b) Involved in Prolactin Signal Transduction in Mouse Mammary Tissue [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(19): 8831–8835.
- [21] WATSON C J, BURDON T G. Prolactin Signal Transduction Mechanisms in the Mammary Gland: the Role of the Jak/Stat Pathway [J]. *Rev Reprod*, 1996, 1(1): 1–5.
- [22] MIYOSHI K, SHILLINGFORD J M, SMITH G H, et al. Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat) 5 Controls the Proliferation and Differentiation of Mammary Alveolar Epithelium [J]. *J Cell Biol*, 2001, 155(4): 531–542.
- [23] SULTAN A S, XIE J, LEBARON M J, et al. Stat5 Promotes Homotypic Adhesion and Inhibits Invasive Characteristics of Human Breast Cancer cells [J]. *Oncogene*, 2005, 24(5): 746–760.
- [24] NELSON E A, WALKER S R, ALVAREZ J V, et al. Isolation of Unique STAT5 Targets By Chromatin Immunoprecipitation-Based Gene Identification [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 54724–54730.
- [25] BRYM P, KAMINSKI S, RUSC A. New SSCP Polymorphism Within Bovine STAT5A Gene and Its Associations with Milk Performance Traits in Black-and-White and Jersey Cattle [J]. *J Appl Genet*, 2004, 45(4): 445–452.
- [26] USMAN T, YU Y, LIU C, et al. Genetic Effects of Single Nucleotide Polymorphisms in JAK2 and STAT5A Genes on Susceptibility of Chinese Holsteins to Mastitis [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(12): 8293–8301.
- [27] 翟 磊, 李改英, 朱建营, 等. 不同泌乳阶段和产奶水平对奶牛淋巴细胞凋亡的影响 [J]. *江西农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 38(6): 1127–1134.
- [28] GOUILLEUX F, PALLARD C, DUSANTER-FOURT I, et al. Prolactin, Growth Hormone, Erythropoietin and Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Induce MGF-Stat5 DNA Binding Activity [J]. *EMBO J*, 1995, 14(9): 2005–2013.
- [29] WOOD T J, SLIVA D, LOBIE P E, et al. Mediation of Growth Hormone-Dependent Transcriptional Activation by Mammary Gland Factor/Stat 5 [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(16): 9448–9453.
- [30] QUELLE F W, WANG D, NOSAKA T, et al. Erythropoietin Induces Activation of Stat5 Through Association with Specific Tyrosines on the Receptor That Are Not Required for a Mitogenic Response [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(4): 1622–1631.
- [31] LIU X, GALLEGRO M I, SMITH G H, et al. Functional Rescue of Stat5a-Null Mammary Tissue Through the Activation of Compensating Signals Including Stat5b [J]. *Cell Growth Differ*, 1998, 9(9): 795–803.
- [32] AMBROSIO R, FIMIANI G, MONFREGOLA J, et al. The Structure of Human STAT5A and B Genes Reveals Two Regions of Nearly Identical Sequence and an Alternative Tissue Specific STAT5B Promoter [J]. *Gene*, 2002, 285(1/2): 311–318.
- [33] 郑宜文. 奶牛泌乳性状相关基因启动子甲基化分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.

- [34] 吴贤锋. 山羊 STAT3 和 STAT5A 基因 SNPs、mRNA 表达及甲基化对生产性能的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [35] CRISPI S, SANZARI E, MONFREGOLA J, et al. Characterization of the Human STAT5A and STAT5B Promoters: Evidence of a Positive and Negative Mechanism of Transcriptional Regulation [J]. FEBS Letters, 2004, 562(1/3): 27–34.

Cloning and Activity Analysis of Buffalo *STAT5a* and *STAT5b* Promoters

LI Sheng¹, HUANG Shi-hai², ZHANG Yan¹,
SHI De-shun¹, LI Xiang-ping¹

1. State Key Laboratory of Conservation And Utilization of Subtropical Agro-Bioresources,
Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: In order to understand the role of transcriptional activation and signal transduction factor 5 (STAT5) protein in the development of the mammary gland and lactation in buffalo, we cloned and analyzed the promoter sequences of 5' regulatory region of *STAT5a* and *STAT5b* genes and compared their activity. We designed specific primers according to the *STAT5a* and *STAT5b* gene sequences published in GenBank, used the mammary gland tissue genomic DNA of Guangxi local buffaloes as a template, amplified the promoter fragments of *STAT5a* and *STAT5b* genes by PCR, and made bioinformatics analysis of them. The size of the promoter fragments (P1 and P2) of the buffalo *STAT5a* gene was shown to be 500 bp and 700 bp, and the size of the promoter fragments (P3, P4 and P5) of the *STAT5b* gene was 500 bp, 800 bp and 1500 bp, respectively. The results of on-line analysis showed that there were hypermethylation sites in P2 fragment, which were also rich in transcription factor binding sites such as SP1 and AP2. The promoter fragments were inserted into pGL3-Basic vector, and transfected into buffalo mammary epithelial cells respectively. Detection of the expression level of luciferase showed that the ratio of luciferase in P1~P5 plasmid transfected group was significantly higher than that of in untransfected group ($p < 0.05$). By adding 5mg/mL PRL (prolactin) to mammary epithelial cells, the promoter activity was significantly higher in P3 than the other groups ($p < 0.05$). The above results showed that the promoter activity of the *STAT5a* and *STAT5b* genes was regulated by PRL, and such regulation was more obvious for *STAT5b*.

Key words: buffalo; *STAT5a*; *STAT5b*; promoter; PRL (prolactin); activity

