

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) Activin 基因两种 β 亚基的启动子克隆及生物信息学分析*

刘蒙蒙 王 晶 高金宁 马丽曼 张全启^①

(中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 以牙鲆为研究对象,利用染色体步移(Genome walking)获得了 Activin 两个 β 亚基基因的上游部分启动子序列,并对其进行了转录调控元件的生物信息学预测分析。获得了 Activin β_A 和 β_B 两个亚基的启动子部分序列,长度分别约为 2.7 kb 和 2.4 kb;在预测的 Activin β_B 转录起始位点(+1 位)的上游 31 bp 处有 1 个典型的 TATA box,而在 Activin β_A 中未发现 TATA box 的存在。两个基因的启动子上发现了多个转录因子 Sp1、Oct-1、C/EBP、CREB、GATA-1、HNF-3、HNF-1、USF 等结合位点,还发现了与内分泌相关的 Pit-1、ER、PR、GR、RAR、RXR 等结合位点,但肌性转录因子 MyoD、myogenin 和雄性的性别决定基因 SRY 结合位点仅在 Activin β_A 启动子中发现。生物信息学分析显示,牙鲆 Activin β_A 和 β_B 表达受到多种潜在因子的调控,二者在调控上有所差异。

关键词 牙鲆; 激活素; 启动子; 生物信息学分析

中图分类号 S96 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0041-07

Activin 首次从猪卵泡液中分离出来,是一种糖蛋白激素,属于 TGF- β 超家族中的一员,由于它可以特异性刺激垂体分泌及合成卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone, FSH),因而被命名为激活素。随后人们发现 Activin 是由两种不同的 β 亚基(β_A 和 β_B),通过二硫键连接组成的同二聚体或异二聚体糖蛋白,分别为 Activin A(β_A - β_A)、Activin B(β_B - β_B)和 Activin AB(β_A - β_B) (Knight, 1996)。Activin 在动物体内分布极为广泛,但以性腺和脑组织最为丰富,可以通过 Activin/Inhibin 系统参与下丘脑-垂体-性腺轴调控来调节生殖细胞的发育和成熟(兰干球等, 2007)。Activin 不仅能够有效地促进促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的分泌活动(Calogero *et al*, 1998),还能够拮抗 Inhibin 的作用,在垂体局部调节并促进 FSH 的分泌(Knight *et al*, 2001)。此外, Activin 还能调节精原细胞和颗粒细胞的增殖、类固醇激素的生成以及滤泡细胞的发育和成熟,对卵

巢和睾丸有着多重调节作用(Mather *et al*, 1997)。除了在生殖方面起重要作用外, Activin 还在组织细胞分化、骨形成、胚胎发育、红细胞生成、免疫调节、组织损伤修复及炎症反应中均发挥重要作用。由于 Activin 重要的生物学作用,近年来成为研究的热点。

牙鲆属(*Paralichthys*)鱼类俗称比目鱼、牙片、偏口,在南、北美洲东西岸较多,已知的有近 20 种,在我国只有一种褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)。其肉质鲜美、营养价值较高,深受消费者青睐,并且生长快、繁殖能力强,具有很好的经济价值,是我国重要的海水养殖鱼类(臧坤等, 2013; 刘芝亮等, 2013)。本研究克隆了牙鲆 Activin β_A 和 β_B 基因的部分启动子序列,并利用生物信息学方法对其潜在的转录因子结合位点进行分析,为进一步了解 Activin 基因在生长和繁殖中的功能及其潜在的基因表达调控机制提供基础资料。

* 国家 863 计划课题(2012AA10A402; 2012AA10A408)资助。刘蒙蒙, E-mail: liumeng19880101@163.com

① 通讯作者: 张全启, 教授, E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2014-04-10, 收修改稿日期: 2014-06-24

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用成体牙鲆于2013年4月由山东烟台海阳黄海水产有限公司提供。Genome Walking Kit 购自大连 TaKaRa 公司, 克隆载体 pMD18-T 和感受态细胞 Trans 5 α 购自北京全式金生物技术有限公司, DNA 胶回收试剂盒购自 ZYMO(美国)。引物由上海桑尼生物科技有限公司合成, DNA 测序由华大基因科技股份有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用常规的酚-氯仿提取法。取牙鲆肌肉组织约 50 mg, 放入 1.5 ml 离心管, 用手术剪将组织块尽量剪碎, 加入 550 μ l TNES 裂解缓冲液和 10 μ l 蛋白酶 K(20 mg/ml)。混匀后置于 56 $^{\circ}$ C 水浴中直至组织消化完全。裂解物用等体积的饱和酚/氯仿/异戊醇(25: 24: 1)和氯仿/异戊醇(24: 1)各抽提两次, 12000 r/min 离心 15 min。取上清液加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 700 μ l 异丙醇, 置于 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 2-3 h, 4 $^{\circ}$ C、12800 r/min 离心 20 min。沉淀物用无水乙醇洗涤两次, 室温自然干燥。待乙醇挥发完全后, 用适量的 TE 溶液溶解。-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 染色体步移 根据本实验室前期已克隆得到的牙鲆 Activin β_A 和 β_B 的 DNA 序列和染色体步移试剂盒的特异性引物设计原则, 使用 Primer 5.0 软件从距离转录起始点较远的一端按 3' \rightarrow 5'端方向分别依次设计 3 条反向特异性引物 SP1、SP2、SP3(表 1)。正向接头引物 AP1-AP4 由试剂盒提供。PCR 反应条件均按照该试剂盒中说明书上的步骤设置。

表 1 牙鲆 Activin β_A 和 β_B 启动子克隆所需引物

Tab.1 Primers for cloning of the promoters of *P. olivaceus* Activin β_A and β_B

名称 Name	序列 Sequence (5' \rightarrow 3')
SP1(ACT β_A)	CCTCTTCACCGCTTCCACCACATCT
SP2(ACT β_A)	TGAGGATGGACGGTCAGAGAAAGCG
SP3(ACT β_A)	TAAGACGGACATGACGGCGGCAGAT
SP1(ACT β_B)	TTGGGGATCTCCACCCTCCCGT
SP2(ACT β_B)	ACGGGACCGGGTGCGTGATGTT
SP3(ACT β_B)	AGAGGACGCAAGCCACGAGGAGT

表 2 牙鲆 Activin β_A 和 β_B 预测的转录起始位点

Tab.2 The predicted transcription start site of *P. olivaceus* Activin β_A and β_B

名称 Name	位置 Location	分值 Score	序列 Sequence
Activin β_A	1137-1187	0.94	TCAACAGGTTTAAATAATGAGCCGTTGTTATTTCATCTCTCCGTGAGGAAGAGCCCTG
Activin β_B	1888-1938	0.99	AATATAAAGCGGAGGAGAGAGAGAGGAGGCTGCAGAGTCTCG

扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离后进行切胶回收、载体连接、转化、PCR 筛选, 选取阳性克隆进行测序。

1.2.3 启动子序列的生物信息学分析 利用 NCBI 在线 blastn 软件对所得序列和本实验室前期克隆得到的 Activin β_A 与 β_B 的 cDNA 序列重叠区域进行比对。然后, 将所获得启动子序列利用 NNPP(http://fruitfly.org:9005/seq_tools/promoter.html)进行预测, 最终确定转录起始位点 TSS(表 2)。利用在线软件 Alibaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>), TFSEARCH (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)以及 Matinspector (<http://www.genomatix.de/cgi-bin//matinspector>)进行启动子区域序列的元件预测分析, 获得潜在的转录因子结合位点。所用参数均为在线设置的默认参数。

2 结果

2.1 牙鲆 Activin β_A 和 β_B 启动子序列的克隆

通过染色体步移方法, 得到 Activin β_A 和 β_B 的部分启动子序列, 分别约为 2.7 kb 和 2.4 kb (GenBank ID 分别为 KJ000423 和 KJ000424)。

2.2 牙鲆 Activin β_A 和 β_B 启动子区域序列的生物信息学分析

将测序结果分别与两个基因的 cDNA 序列和染色体步移得到的序列进行比对, 并以 NNPP 软件辅助分析, 最终确定了转录起始位点。结果显示, 在预测的 Activin β_B 转录起始位点(+1 位)的上游 31 bp 处有一个典型的 TATA box, 而在 Activin β_A 中却未发现 TATA box 的存在。

通过 Alibaba 2.1、TFSEARCH 和 Matinspector 等在线软件分析, 预测结果如图 1、图 2 所示。在得到的启动子序列中存在多个与基因的激活和增强相关的转录因子结合位点: 特异性蛋白 Sp1、CCAAT/增强子结合蛋白 C/EBP、cAMP 反应元件结合蛋白 CREB、细胞内转录激活因子 AP-1、上游刺激因子 USF; 发现了许多与胚胎和组织的发育、器官的发生相关的转录因子结合位点: 肝细胞核因子 HNF-1、HNF-3、肌性转录因子 MyoD、myogenin、八聚体结

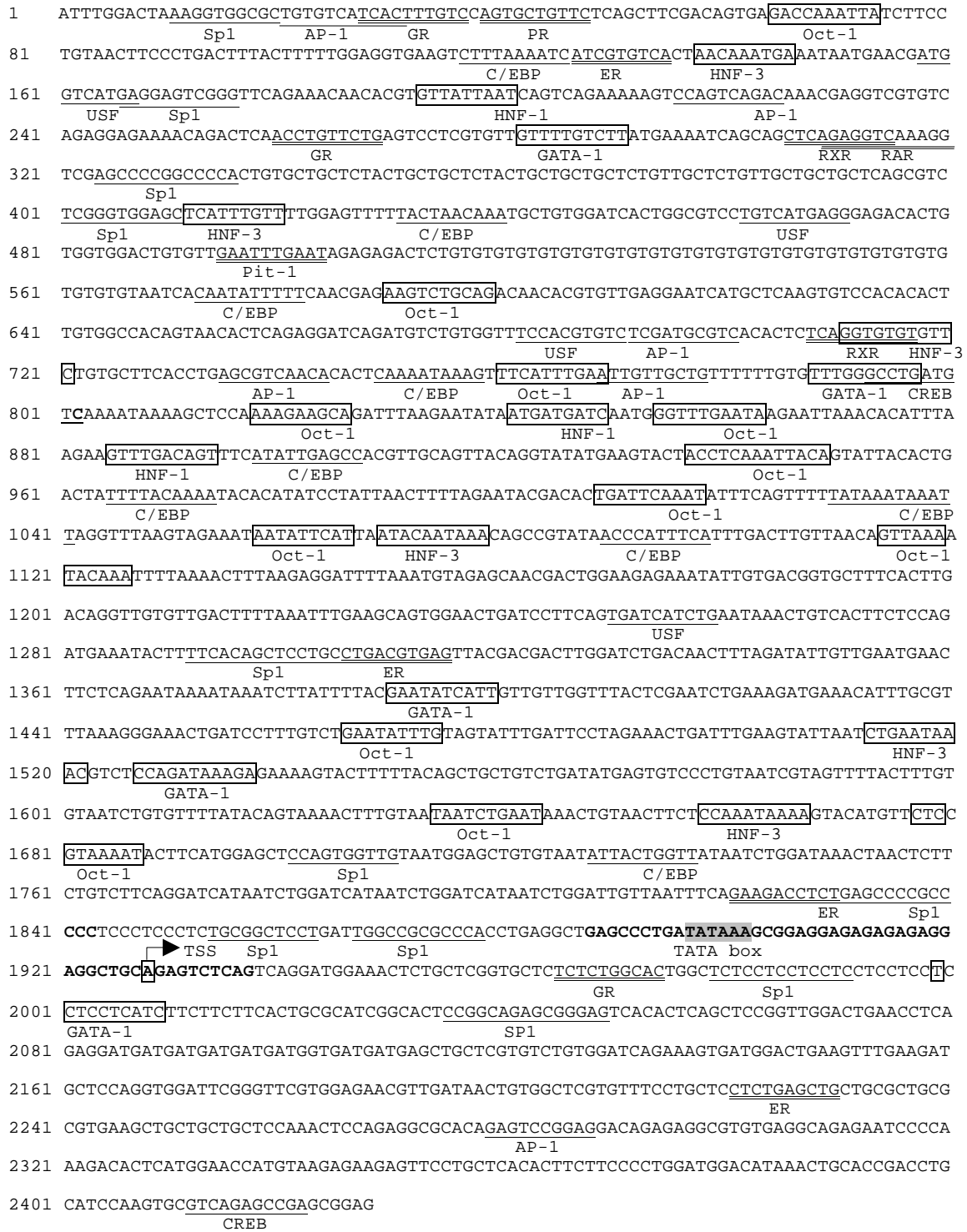


图2 牙鲆 *Activin β_B* 启动子序列及对部分潜在转录因子结合位点预测结果

Fig.2 Nucleotide sequence of *P. olivaceus* *Activin β_B* promoter and prediction of potential transcription factor binding site region

潜在的转录起始位点用 TSS 表示；部分启动子序列用黑体表示；TATA box 用阴影表示；与基因的激活和增强相关的转录因子结合位点用单下划线表示；与胚胎和组织的发育、器官的发生相关的转录因子结合位点用方框表示；与内分泌和性腺的功能相关的转录因子结合位点用双下划线表示

Potential transcription initiation site is marked by TSS; partial promoter sequences are highlighted in bold; TATA box is indicated with a shadow; potential transcription factor binding sites related to the activation and enhancement of genes are single-underlined; potential transcription factor binding sites related to development of tissue, embryo and organogenesis are shown in the boxes; potential transcription factor binding sites regarding endocrine and gonadal function are double-underlined

合蛋白 Oct-1 和珠蛋白转录因子 GATA-1; 同时还预测到了大量与内分泌和性腺功能相关的转录因子结合位点: 垂体特异性转录因子 Pit-1、雄性的性别决定基因 SRY、视黄醇受体 RXR、视黄酸受体 RAR、雌激素受体 ER、黄体酮激素受体 PR、糖皮质激素受体 GR 等。在 *Activin* β_B 中未发现 MyoD、myogenin 和 SRY 三个结合位点。

3 讨论

启动子作为基因表达调控的关键序列区域, 是转基因工程研究的热点。因此, 研究启动子功能序列, 对于基因表达调控机制的研究是十分必要的(陈维宇等, 2008; 刘秀霞等, 2009)。迄今为止, 有关 *Activin* 的研究多集中在其结构特征、生理功能、对生殖的作用及其与受体的作用方式等(West *et al.*, 2001; Walton *et al.*, 2012), 而有关 *Activin* 表达调控机制的研究较为薄弱。本研究利用染色体步移方法在牙鲆中克隆得到 *Activin* β_A 和 β_B 上游的序列, 长度分别约为 2.7 kb 和 2.4 kb, 并对其进行了一系列的生物信息学分析。发现两个基因启动子区域潜在的转录因子结合位点主要是与基因的激活和增强、胚胎和组织的发育、器官的发生以及内分泌和性腺功能相关, 结合位点大多数都相同, 但同时也存在差异。

早期的研究认为, TATA box 是所有真核生物结构基因所必需的。随着基因组大规模测序计划的完成, 越来越多的真核生物基因序列被测定, 发现许多基因的 5'侧翼区没有 TATA box (张小辉等, 2008)。对果蝇 205 个核心启动子分析显示, 只有 43% 的结构基因的启动子中存在 TATA box (Kutach *et al.*, 2000)。对人 1031 个潜在的核心启动子分析显示, 只有 32% 的结构基因存在 TATA box (Suzuki *et al.*, 2001)。本研究发现只有牙鲆 *Activin* β_B 上游序列存在 1 个 TATA box, 而牙鲆 *Activin* β_A 上游序列则不存在 TATA box, 这种现象可能是正常的, 可以由转录因子来弥补。对得到的结合位点进行筛选, 保留了 Sp1、C/EBP、CREB、MyoD、myogenin、Pit-1、RXR、ER、PR 等作为重点进行讨论。

Sp1(Specificity Protein 1)属于 Sp/KLF 转录因子家族, 含有 1 个锌指蛋白结构域, 能与 DNA 直接结合, 对氧化磷酸化、核酸代谢相关基因等许多持家基因均有重要的调控作用(Zaid *et al.*, 1999), 尤其是对启动子中缺乏 TATA box 的基因的表达具有决定性的作用。*Activin* β_A 上游序列没有 TATA box, 但是却存在许多 Sp1 结合位点, 也正好印证了这一点。

在 *Activin* β_A 和 β_B 启动子序列中都存在 C/EBP 的结合位点, C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein)是一种具有“亮氨酸拉链”结构的 DNA 结合蛋白, 能够与一些增强子元件结合。作为真核细胞转录调控因子, 通常以二聚体的形式结合在 DNA 上调控细胞增殖、分化和细胞特异性基因的表达。另有研究显示, *Activin* (Meunier *et al.*, 1988; Tuuri *et al.*, 1994)和 *Activin* 受体(Mathews, 1994)在全身的很多组织中都有表达, 尤其 *Activin* β_A 在脂肪组织中有很高的表达量(Vejda *et al.*, 2002)。前脂肪细胞的分化主要受控于 C/EBP 和 PPAR(Peroxisome proliferator-activated receptors) (Gregoire *et al.*, 1998; Rosen *et al.*, 2000), 所以这也暗示了 *Activin* 基因还可能参与脂肪细胞的分化过程。

研究表明, 垂体中 *Activin* 不仅可以对促性腺激素起作用, 还能抑制生长激素 GH、促肾上腺皮质激素 ACTH 和 GH 释放激素 GHRH 对胞内 cAMP 表达水平的提高(Ying, 1988; Mather *et al.*, 1997)。在 *Activin* β_A 和 β_B 启动子序列中都存在 cAMP 反应元件结合蛋白 CREB, 这表明它们的基因表达受第二信使 cAMP 的调控。但基因表达的具体调节机制有待进一步深入研究。

研究表明, MyoD 控制肌细胞的生长与分化。*Activin* A 能通过抑制 MyoD 的表达而抑制鸡胚胎肌肉前体细胞的分化。所以, 在 *Activin* A 的处理下只有少量前体肌细胞发生分化, 并且这些分化的肌细胞不能融合形成肌管, 但是前体肌细胞随着 *Activin* A 效果的减弱又可以开始继续分化(He *et al.*, 2005), 由此推测除了 myostatin, *Activin* β_A 更有可能是肌肉生长抑制的候选基因。*Activin* β_A 启动子序列中存在肌性转录因子 MyoD 和 myogenin 的结合位点, 这也就更加肯定了其在肌肉发育中的功能。牙鲆 myostatin、follistatin、MyoD、myogenin 等肌肉发育相关基因已经被克隆(Zhang *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2008), 研究 *Activin* 与这些基因间的相关作用将会进一步促进认识其在肌肉生长和发育中的功能。

在 *Activin* β_A 和 β_B 启动子序列中还存在着 Pit-1 和 RXR 的转录因子结合位点, 它们同属于 POU domain factor。Pit-1 在垂体特异表达并且指导 GH、PRL、TSH 等多种垂体特异性基因的表达。在牙鲆垂体中检测到大量 *Activin* β_A 和 β_B mRNA 表达, 推测 Pit-1 可能是 *Activin* β_A 和 β_B 在垂体中的表达增强子。RXR 是一类激素核受体家族的成员, 可以通过形成同源二聚体或者异源二聚体而发挥不同的作用。但 RXR 是如何调控 *Activin* β_A 和 β_B 转录的还不清楚, 相关研究很少或未见报道。

Activin 能够有效地促进 GnRH 的分泌活动 (Calogero *et al*, 1998), 在垂体局部调节并促进 FSH 的分泌 (Knight *et al*, 2001), 在未分化的大鼠颗粒细胞中还可促进其表达芳香化酶、FSH 和 LH 受体, 刺激雌激素和孕酮的分泌 (Xiao *et al*, 1991)。不仅如此, 激活素还能调节精原细胞的增殖、颗粒细胞的增殖, 对睾丸和卵巢有着多重调节作用 (Mather *et al*, 1997)。本研究发现, Activin β_A 和 β_B 启动子序列中存在多个雌激素受体 ER 和孕激素受体 PR 的结合位点, 同时还发现了雄性的性别决定基因 SRY 的结合位点。ER 和 PR 可以与 Activin β_A 和 β_B DNA 调控区域结合, 表明 Activin β_A 和 β_B 的合成与分泌亦受到性类固醇激素的调控 (Kipp *et al*, 2007)。SRY 结合位点的存在进一步表明 Activin 参与了性腺的分化和发育。这些结果与以往的研究结论相一致。

然而, 肌性转录因子 MyoD、myogenin 和性别决定蛋白 SRY 结合位点并不是在两个基因启动子内都存在, 这可能是由于不同类型的 Activin β 亚基受不同的机制调控从而发挥着不同功能的结果。

另外, 在 Activin β_A 和 β_B 启动子上发现的转录因子结合位点中, 存在较多的 AP-1、USF、Oct-1 和 GATA-1 结合位点, 它们的功能非常广泛, 在很多组织和器官中起作用。已有的研究发现, Activin 还有其他更广泛的生物学功能: 参与机体急性期反应调节、参与组织损伤和炎症修复、调节神经细胞分化、诱导胚胎中胚层形成、免疫调节功能、调节成骨细胞功能、调节红细胞生成等。Activin β_A 和 β_B 能够在牙鲆的鳃、肾、肠、脾、心脏等成体组织中表达, 可能就是这些转录因子的作用, 这些结合位点的存在, 佐证了该基因功能的分子基础。

综上所述, 本研究克隆并分析了牙鲆 Activin β_A 和 β_B 上游启动子的序列, 利用生物信息学网站预测了可能存在的转录因子结合位点并对其进行初步的分析, 为进一步系统研究 Activin 的功能及其他相关转录因子的调控网络奠定了基础。

参 考 文 献

- 兰干球, 黄雄军, 郭亚芬, 等. 广西巴马小型猪活化素 β_A/β_B 基因 cDNA 克隆与序列分析. 实验动物科学, 2007, 24(6): 1-5
- 刘秀霞, 梁旭方, 王琳, 等. 鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) β -肌动蛋白基因 cDNA 全序列与 5'侧翼区的克隆与分析. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 102-108
- 刘芝亮, 徐永江, 柳学周, 等. T 型标志牌标记牙鲆苗种. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 80-86
- 张小辉, 祁艳霞. 真核生物启动子 TATA-box · GC-box 和 CAAT-box 的分析. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1380-1381, 1395
- 陈维宇, 李卫东, 柯才焕. 杂色鲍肌动蛋白的克隆与序列分析. 厦门大学学报, 2008, 47(5): 624-629
- 臧坤, 徐永江, 柳学周, 等. 两种养殖条件下牙鲆的血液生理生化指标比较分析. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 36-42
- Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, *et al*. Activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens. J Endocrinol, 1998, 156(2): 269-274
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev, 1998, 78(3): 783-809
- He L, Vichev K, Macharia R, *et al*. Activin A inhibits formation of skeletal muscle during chick development. Anatomy Embryol, 2005, 209(5): 401-407
- Kipp JL, Kilen SM, Woodruff TK, *et al*. Activin regulates estrogen receptor gene expression in the mouse ovary. J Biol Chem, 2007, 282(50): 36755-36765
- Knight PG. Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. Front Neuroendocrinol, 1996, 17(4): 476-509
- Knight PG, Glister C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. Reproduction (Cambridge, England), 2001, 121(4): 503-512
- Kutach AK, Kadonaga JT. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters. Mol Cell Biol, 2000, 20(13): 4754-4764
- Mather JP, Moor A, Li RH, *et al*. Activins, inhibins and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. Proc Soc Exp Biol Med, 1997, 215: 209-222
- Mathews LS. Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. Endocr Rev, 1994, 15: 310-325
- Meunier H, Rivier C, Evans RM, *et al*. Gonadal and extragonadal expression of inhibin α , β_A , and β_B subunits in various tissues predicts diverse functions. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 247-251
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, *et al*. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes & Dev, 2000, 14(11): 1293-1307
- Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, *et al*. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. Genome Res, 2001, 11(5): 677-684
- Tuuri T, Eramaa M, Hilden K, *et al*. The tissue distribution of activin β_A - and β_B -subunit and follistatin messenger ribonucleic acids suggests multiple sites of action for the activin-follistatin system during human development. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 78: 1521-1524
- Vejda S, Cranfield M, Peter B *et al*. Expression and dimerization of the rat activin subunits β_C and β_E : evidence for the formation of novel activin dimers. J Mol Endocrinol, 2002, 28: 137-148
- Walton KL, Makanji Y, Harrison CA. New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. Mol Cell Endocrinol, 2012, 359: 2-12
- Xiao S, Findlay JK. Interactions between activin and follicle-

- stimulating hormone-suppressing protein and their mechanisms of action on cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1991, 79(1-3): 99-107
- Xu P, Tan X, Zhang Y, *et al.* Cloning and expression analysis of myogenin from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and promoter analysis of muscle-specific expression. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem & Mol Biol*, 2007, 147(1): 135-145
- Ying SY. Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Reviews*, 1988, 9(2): 267-293
- Zaid A, Li R, Luciakova K, *et al.* On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenergetics Biomembranes*, 1999, 31(2): 129-135
- Zhang Y, Tan X, Zhang PJ, *et al.* Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis. *Mar Biotechnol (New York)*, 2006, 8(2): 139-148
- Zhong Q, Zhang Q, Chen Y, *et al.* The isolation and characterization of myostatin gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): Ubiquitous tissue expression and developmental specific regulation. *Aquaculture*, 2008, 280(1-4): 247-255

(编辑 冯小花)

Bioinformatic Characterization of Promoters of Two Activin- β Subunit Genes in *Paralichthys olivaceus*

LIU Mengmeng, WANG Jing, GAO Jinning, MA Liman, ZHANG Quanqi^①

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract Activin is a member of the transforming growth factor- β (TGF- β) family and regulates sex hormones. It was originally discovered in pig ovarian follicular fluid. Activin contains two β subunits and plays a vital role in the hypothalamus-pituitary-gonad axis (HPG). It regulates the secretion of pituitary gonadotropin, the production of steroid hormones and the maturation of oocyte in ovary. *Paralichthys olivaceus* is a type of important commercial fish species that has advantageous traits in aquaculture such as the fast growth rate. Better understanding of its reproduction mechanism is essential for the guidance of the breeding of *P. olivaceus*. In this study, we analyzed the expression and regulation of Activin gene related to the reproductive endocrinology of *P. olivaceus*. Our data should provide important information for future studies on biological functions of Activin and for the practice in the culture of *P. olivaceus*. We used the genome walking method to obtain the partial sequence of promoters located in the upstream of Activin β_A and β_B genes of *P. olivaceus*, and predicted the binding sites of transcriptional regulation elements using the bioinformatical method. The promoters of these two genes were 2.7 kb and 2.4 kb in length respectively. The results showed that the TATA box of Activin β_B was located at 31 bp in the upstream region of the transcription initiation site, however this structure was not found in Activin β_A . We found in the two promoters a number of binding sites of the transcription factors including Sp1, Oct-1, C/EBP, CREB, GATA-1, c-Jun, HNF-3, HNF-1, and USF. Moreover, we also found multiple transcription binding sites of endocrine-related factors such as Pit-1, ER, PR, GR, RAR, and RXR. However, the binding sites of MyoD, myogenin and SRY were only found in Activin β_A . In conclusion, the bioinformatical analysis suggested that the basic and hormone-inducing expression of both Activin β_A and β_B was regulated by a variety of factors; however, the mechanisms of the regulation were different between the two genes.

Key words *Paralichthys olivaceus*; Activin; Gene promoter; Bioinformatics analysis

① Corresponding author: ZHANG Quanqi, E-mail: qzhang@ouc.edu.cn