

大鼠 ASIC1 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建及其功能鉴定

周仁鹏, 吴小山, 王志森, 谢亚亚, 李悦, 代贝贝, 王志强, 葛金芳, 陈飞虎

摘要 目的 构建大鼠酸敏感离子通道 1 (ASIC1) 基因启动子荧光素酶报告质粒 pGL3-ASIC1-promoter, 并进行功能的鉴定。方法 设计、合成 ASIC1 启动子引物, 采用聚合酶链反应 (PCR) 技术从大鼠全基因组 DNA 中扩增出 ASIC1 启动子片段; Nhe I 和 Xho I 双酶切后将目的片段连接到 pGL3-Basic 报告载体上; 构建的 pGL3-ASIC1-promoter 重组质粒和 pRL-TK 内参质粒瞬时共转染 293T 细胞检测 ASIC1 启动子活性。结果 PCR 扩增得到大鼠 ASIC1 基因启动子片段; 成功构建 pGL3-ASIC1-promoter 报告基因载体, 菌落 PCR 和测序结果表明启动子 DNA 序列正确。与空质粒 pGL3-Basic 转染组相比, pGL3-ASIC1-promoter 质粒转染组的荧光素酶活性明显增加 ($P < 0.01$)。结论 成功构建了大鼠 ASIC1 基因启动子报告基因载体, 为探究 ASIC1 转录表达的调控机制奠定基础。

关键词 ASIC1; 启动子; 荧光素酶; 报告基因

中图分类号 R 392.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)05-0620-05

酸敏感离子通道 (acid sensing ion channels, ASICs) 是一类胞外 H^+ 激活的阳离子通道, 属于阿米洛利敏感的上皮钠通道/退变素 (epithelial Na^+ channels/degenerin, ENaC/DEG) 超家族, 广泛地表达在中枢和外周神经系统以及非神经组织中, 通过介导 Na^+ 和 Ca^{2+} 内流参与各种病理生理效应^[1]。ASIC1 因其对 Ca^{2+} 有通透性而有广泛的生物学功能及重要的生理病理学意义^[2]。ASIC1a 在佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠关节软骨细胞上有表达^[3-4], 并参与关节软骨的代谢过程^[5]; 阻断 ASIC1a 可以降低酸诱导的 AA 大鼠关节软骨细胞凋亡^[6-7]。由此推测 ASIC1 可能在类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的发生和发展过程中发挥着重要作用。该研究通过构建大鼠 ASIC1 启动子报告基因质粒, 并观察其转录调控活性, 为探究其基

因转录活性的调控机制以及为进一步探究 ASIC1 在 RA 中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 293T 细胞株 (本实验室保存); DMEM/F-12 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、Taq 酶和 dNTP、PrimeSTAR、6 $\times$ Loading Buffer、DL2000 DNA Marker (日本 TaKaRa 公司); 1 000 bp DNA ladder Marker (美国 Thermo Scientific 公司); 细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (美国 Axygen 公司); 限制性内切酶 Nhe I 和 Xho I (美国 NEB 公司); pGL3-Basic 载体、内参质粒 pRL-TK、Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Kit、小抽试剂盒、GloMax[®] Multi Jr 单管型多功能检测仪 (美国 Promega 公司); 无缝克隆试剂盒 (上海生博生物医药科技有限公司); 脂质体 Lipofectamine2000、Opti-MEM (美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒抽提大鼠脑组织 DNA, 具体实施步骤按照产品操作说明手册进行。对提取 DNA 测量光密度 (optical density, OD) 值后, 加 ddH₂O 保存于 $-20^{\circ}C$ 。

1.2.2 ASIC1 基因启动子序列 PCR 扩增及纯化 登陆美国国立生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI), 搜索 GenBank 数据库中的大鼠 ASIC1 DNA 序列 (Gene ID: 79123), 利用 Primer 5.0 软件辅助设计针对 ASIC1 基因启动子区 ($-1545 \sim +384$) 的引物, 上游引物: 5'-CT-TACGCGTGCTAGCGCTTTATAGGTCGCCCATGGA-3'; 下游引物: 5'-ATCGCAGATCTCGAGCCTTGCC-CAAGGGGATCCTG-3', 上、下游引物分别引入酶切位点分别为 Xho I、Nhe I, 实验所需引物均委托上海捷瑞生物工程有限公司进行合成。以所提取的大鼠脑基因组 DNA 为扩增模板, 采用 50 μl 反应体系: 前段引物 (10 $\mu mol/L$) 1.0 μl 、后段引物 (10 $\mu mol/L$)

2016-03-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81271949)

作者单位: 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

作者简介: 周仁鹏, 男, 博士研究生;

陈飞虎, 男, 博士生导师, 责任作者, E-mail: cfhchina@sohu.com

L) 1.0 μl , 5 $\times$ Buffer(with Mg^{2+}) 10 μl , dNTP(各 2.5 mmol/L) 4 μl , DNA 模板 1.0 μl , PrimeSTAR 0.5 μl , 加 ddH₂O 补足至 50 μl 。循环条件为 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 终止反应。PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并对 PCR 扩增产物回收纯化备用。

1.2.3 pGL3-ASIC1-promoter 载体的构建 用 Xho I 和 Nhe I 分别双酶切 PCR 产物和 pGL3-Basic 载体, 回收目的片段。将线性化载体和回收的目的片段以 1:2(摩尔比)的比例加到试管中进行重组反应(42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min), 放置 2~3 min 后取 10 μl 反应液体转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 并涂布于含氨苄青霉素(100 mg/L)抗性的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h 后, 从转化子的平板上随即挑取 8 个菌落, 挑取菌落接种于 10 μl 含氨苄抗性的 LB 培养液中。取培养后的菌液(1 μl), 进行菌落 PCR, 上游引物: 5'-TCGCAGACACTCGTAGGCG-3'; 下游引物: 5'-CCTTATGCAGTTGCTCTCC-3', 以培养后的菌液为模板, 采用 20 μl 反应体系: 前段引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μl , 后段引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μl , 5 $\times$ Buffer(with Mg^{2+}) 2 μl , dNTP(各 2.5 mmol/L) 1.6 μl , DNA 模板 1.0 μl , Taq 酶 0.1 μl , 加 ddH₂O 补足至 20 μl 。循环条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 终止反应。进行凝胶电泳、观察并照相。选取阳性克隆接种到 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌过夜; 取含 ASIC1 启动子的菌液行 DNA 测序, 之后提取质粒备用。构建携带 ASIC1 基因启动子序列的 pGL3 表达载体, 命名为 pGL3-ASIC1-promoter。

1.2.4 荧光素酶报告基因载体转染 293T 细胞 293T 细胞于含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM/F-12 培养基中进行培养, 转染前 24 h 将对数生长期的 293T 细胞消化计数(密度为 1×10^5 个/孔), 种于 24 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养至 60%~70%, 用 50 μl Opti-MEM 培养基稀释 0.9 μg 质粒报告质粒和 0.1 μg pRL-TK 质粒, 同时 1 μl Lipofectamine2000 溶于 50 μl Opti-MEM 培养基中, 5 min 后将两者混合室温静置 20 min; 用 PBS 清洗细胞 3 次后加入 400 μl Opti-MEM, 再逐滴加入质粒-脂质体混合物, 轻轻摇晃, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养 6 h, 然后更换含 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养液 500 μl 继续培养 48 h。实验中将作为阴性对照的

pGL3-Basic 空载体与作为内参的 pRL-TK 质粒共转染。每组试验重复 3 次, 试验设 6 个复孔/次。

1.2.5 荧光素酶报告基因活性的检测 细胞转染 48 h 后, 弃培养液, PBS 清洗细胞 1 次, 室温摇动 15 min。按照双荧光素酶检测试剂盒的操作说明书, 取 100 μl Luciferase Assay Buffer II 于 1.5 ml 的离心管中; 将 GloMax[®] Multi Jr 单管型多功能检测仪测定间隔设定为 2 s, 测读为 10 s; 将 293T 细胞裂解液转移到新的 1.5 ml 离心管中, 用移液器轻轻吸打 2~3 次混匀, 切勿要旋涡振荡, 将离心管放入到化学发光仪中读取萤火虫荧光素酶发光值; 再将离心管移出发光仪, 加入 100 μl Stop & Glo Reagent, 用移液器吹打混匀后, 再将离心管放回多功能检测仪中读取海肾荧光素酶发光值, 计算前者与后者的发光值的比值, 即为被检测质粒的相对荧光素酶活性(relative light unit, RLU)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 t 检验行两组间的差异性分析, 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 pGL3-Basic 载体双酶切 用 Nhe I 和 Xho I 对 pGL3-Basic 表达载体(图 1A)进行酶切, 琼脂糖电泳结果表明, 在 4 000~5 000 bp 有明显条带, 回收 4 807 bp 长度的 pGL3-Basic 载体片段(图 1B)。

2.2 大鼠 ASIC1 基因启动子的扩增 以基因组 DNA 为模板扩增 ASIC1 启动子序列, 扩增的 PCR 产物经过 1.2% 琼脂糖电泳后, 结果可见在约 2 000 bp 处出现单一的明亮的条带, 与 1 929 bp 的 ASIC1 启动子片段大小相符合(图 2)。

2.3 大鼠 ASIC1 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建与鉴定 PCR 扩增大鼠 ASIC1 基因启动子片段(-1545~+384)后, 将其克隆至 pGL3-Basic 载体上构建 pGL3-ASIC1-promoter 质粒。重组质粒经转化后涂布于 LB 琼脂平板上, 挑取 8 个克隆摇菌, 菌落 PCR 鉴定结果显示均出现了阳性克隆片段(图 3A); 另外将所得阳性克隆送公司测序, DNA 测序结果显示, 两者序列一致(图 3B)。上述结果提示大鼠 pGL3-ASIC1-promoter 质粒已成功构建。

2.4 大鼠 ASIC1 基因启动子荧光素酶报告质粒的功能鉴定 重组质粒 pGL3-ASIC1-promoter 和 pGL3-Basic 质粒分别与内参质粒 pRL-TK 共转染 293T 细胞后, 观察萤火虫以及内参海肾荧光素酶报告基因活性, 两者活性的比值即为 ASIC1 启动子活

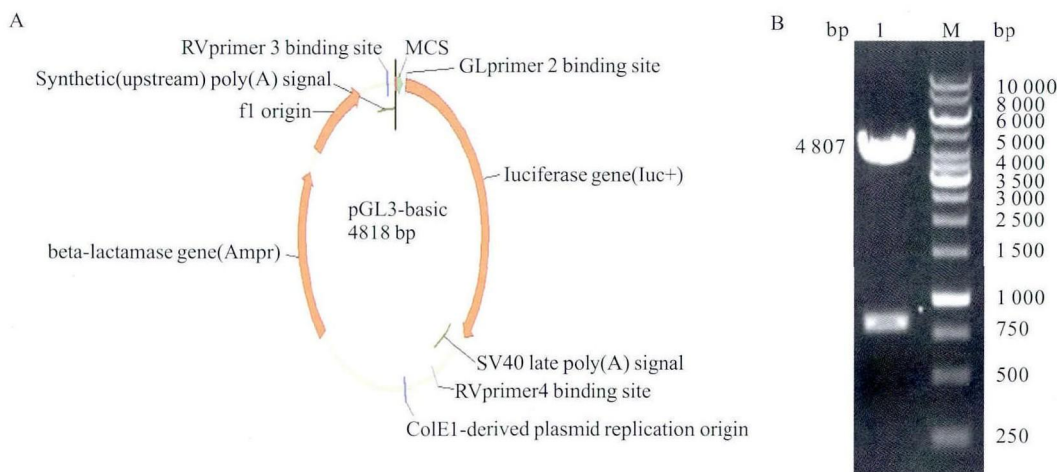


图1 载体及双酶切琼脂糖电泳

A: pGL3-Basic 质粒载体图谱; B: Nhe I、Xho I 双酶切后结果; M: Marker; 1: 4 807 bp 的 pGL3-Basic 片段

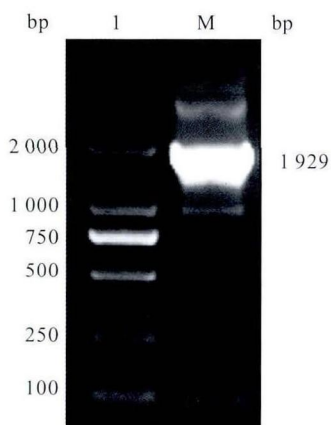


图2 ASIC1 启动子 PCR 扩增结果

M: Marker; 1: 1 929 bp 的 ASIC1 启动子片段

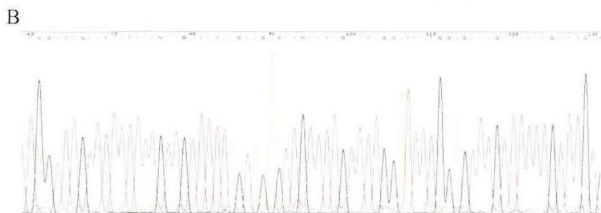
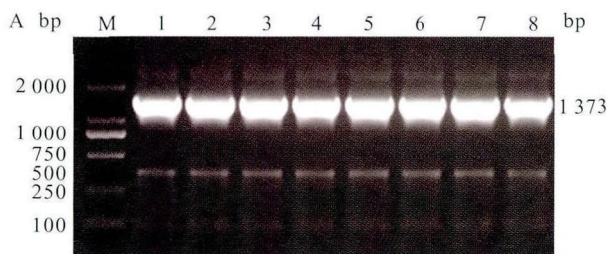
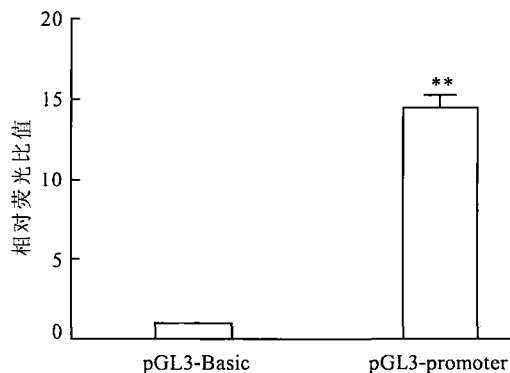


图3 pGL3-ASIC1-promoter 质粒的鉴定

A: 菌落 PCR 扩增结果; M: Marker; 1 ~ 8: 8 个克隆的 pGL3-ASIC1-promoter 质粒菌落 PCR 扩增产物; B: pGL3-ASIC1-promoter 质粒的测序图谱(部分)

性,内参质粒 pRL-TK 可以排除由于转染效率和细胞数目等因素不同所引起的组间差异,结果表明,与空质粒 pGL3-Basic 转染组相比,重组质粒 pGL3-ASIC1-promoter 质粒转染组的荧光素酶活性高 14 倍,两者相比,差异有统计学意义($t = -19.077, P < 0.01$)(图 4)。提示构建的大鼠 pGL3-ASIC1-promoter 质粒可以反映 ASIC1 启动子的功能。

图4 pGL3-ASIC1-promoter 转染 293T 细胞后的相对荧光素酶活性与 pGL3-Basic 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

ASICs 是一类 H^+ 门控的阳离子通道,当细胞外 pH 值下降(H^+ 浓度上升)时,ASICs 被激活,其离子通道打开,通过对 Na^+ 和 Ca^{2+} 的通透形成内向电流,引起细胞膜去极化而产生兴奋性效应;几乎所有疾病如癌症、炎症、缺血、缺氧等的过程都会引起不同程度的 pH 值下降,而 ASICs 作为一种重要的酸感受器,感受这种变化进而影响着组织病理生理的改变^[8]。近年来对 ASICs 的研究发展非常迅速,到目前为止,已克隆出来由 4 个基因编码(ASIC1/Ac-

cn2、ASIC2/Accn1、ASIC3/Accn3、ASIC4/Accn4) 的 7 个 ASIC 亚基: ASIC1a、ASIC1b、ASIC1b2、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3、ASIC4; 其中 ASIC1a 因其可以参与 Ca^{2+} 内流的调控并具有重要的生物学特性和病理生理学价值而深受关注^[9]。大鼠 ASIC1 基因的全长约为 28 620 bp, 包括由 13 个外显子和 12 个内含子, 定位于第 7 号染色体 7q36; 其 mRNA 约 3 800 bp, 基因编码 528 个氨基酸, 蛋白质分子量约 59 ku。近些年来, 已有对 ASIC1 基因敲除、转录后水平调控及下游靶分子的研究^[10-11], 但对于其转录水平调控研究较少。启动子是转录激活过程中起启动作用的特异的 DNA 序列, 与序列上的转录因子结合后可以调节基因的转录, 进而影响蛋白质翻译, 因此对于 ASIC1 基因启动子研究显得尤为必要。

目前, 荧光素酶报告基因是检测检测转录因子与目的基因启动子区 DNA 相互作用的一种检测方法; 即将目的基因的启动子序列插入到报告基因质粒中, 然后将构建的质粒转入相应的细胞中, 最后通过观察报告基因表达的水平, 可反映插入的启动子序列的功能^[12-13]。在前期研究的基础上, 本实验运用 PCR 技术扩增了 ASIC1 启动子序列, 并将这段序列定向克隆入 pGL3-Basic 载体中, 菌落 PCR 和 DNA 测序分析证明导入序列、片段大小正确, 成功构建了 ASIC1 的报告基因质粒。将构建成功的重组质粒 pGL3-ASIC1-promoter 与内参质粒 pRL-TK 共转染到 293T 细胞中, 采用双荧光素酶报告基因 (DLRTM) 检测系统进行相对表达活性的检测。结果显示, 空载体 pGL3-Basic 阴性对照组的转录活性非常的低; 而 pGL3-ASIC1-promoter 质粒转染组有明显的转录活性。证实了 1 929 bp 碱基 ASIC1 基因启动子区启动了荧光素酶的表达, 提示这段靶序列具有较好的功能。成功构建出大鼠 pGL3-ASIC1-promoter 质粒是探究 ASIC1 表达转录的前提, 这为进一步寻找 ASIC1 基因调控区中的顺式作用元件及其转录因子、甲基化状态提供了有效工具, 也为探究和筛选 ASIC1a 的抑制剂奠定了前期基础。

参考文献

- [1] Li W G, Xu T L. Acid-sensing ion channels: a novel therapeutic target for pain and anxiety [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(7): 885-94.
- [2] Li X, Wu F R, Xu R S, et al. Acid-sensing ion channel 1a-mediated calcium influx regulates apoptosis of endplate chondrocytes in intervertebral discs [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(1): 1-14.
- [3] Yuan F L, Chen F H, Lu W G, et al. Acid-sensing ion channel 1a mediates acid-induced increases in intracellular calcium in rat articular chondrocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 340(1-2): 153-9.
- [4] 袁凤来, 陈飞虎, 李霞, 等. 大鼠关节软骨酸敏感离子通道的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2007, 42(5): 513-6.
- [5] Yuan F L, Chen F H, Lu W G, et al. Inhibition of acid-sensing ion channels in articular chondrocytes by amiloride attenuates articular cartilage destruction in rats with adjuvant arthritis [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(11): 939-47.
- [6] Hu W, Chen F H, Yuan F L, et al. Blockade of acid-sensing ion channels protects articular chondrocytes from acid-induced apoptotic injury [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(4): 327-35.
- [7] Rong C, Chen F H, Jiang S, et al. Inhibition of acid-sensing ion channels by amiloride protects rat articular chondrocytes from acid-induced apoptosis via a mitochondrial-mediated pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(7): 635-41.
- [8] 周仁鹏, 陈飞虎. 酸敏感离子通道在类风湿关节炎中作用的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(3): 315-8.
- [9] Deval E, Lingueglia E. Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 94: 49-57.
- [10] Yu X W, Hu Z L, Ni M, et al. Acid-sensing ion channels promote the inflammation and migration of cultured rat microglia [J]. *Glia*, 2015, 63(3): 483-96.
- [11] 周仁鹏, 吴小山, 王志森, 等. ASIC1 基因敲除小鼠的繁殖及基因鉴定[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(9): 1341-3.
- [12] Tirodkar T S, Lu P, Bai A, et al. Expression of ceramide synthase 6 transcriptionally activates acid ceramidase in a c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent manner [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(21): 13157-67.
- [13] 赵虹, 高星杰, 葛林, 等. 人 Tudor-SN 基因启动子荧光素酶报告基因表达质粒的构建及活性检测[J]. *医学分子生物学杂志*, 2011, 8(3): 198-203.

Construction and identification of the rat ASIC1 promoter luciferase reporter plasmid

Zhou Renpeng, Wu Xiaoshan, Wang Zhisen, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct rat acid sensing ion channel 1 (ASIC1) promoter recombinant luciferase reporter

奥曲肽在蜜蜂毒疼痛模型中的抗伤害感受作用 及对背根神经节 pCREB 表达的影响

唐 珍^{1*}, 欧阳征鹏^{2*}, 王含彦^{3*}, 易 芳¹, 郭冬梅¹, 罗 蓉³

摘要 目的 利用伤害感受敏感型 DA 大鼠研究奥曲肽(OCT)在蜜蜂毒(BV)疼痛模型中的抗伤害感受作用以及背根神经节(DRG)内磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白(pCREB)表达的变化,为生长抑素受体(SSTR)的外周镇痛作用提供理论依据。方法 于 DA 大鼠右爪足底中间部位,用 50 μ l 微量注射器皮下注射 BV(0.1 mg/50 μ l)建立 BV 疼痛模型。成年雄性 DA 大鼠随机分为 5 组:对照组、BV 组、OCT 组、对侧 OCT 组和环生长抑素(c-SOM)组。分别用秒表和计数器记录大鼠注射 BV 后抬/舔爪时间和自发性缩足反射次数等伤害感受行为。大鼠机械敏感性阈值用 up-down 法测定,用 50% 机械缩爪阈值(PWMT)表示,分别于注射前 1 h 和注射后 1.5 h 测量。热刺激反应应用热缩爪潜伏期(PWTL)表示,于注射前 30 min 和注射后 2 h 测量。采用免

疫组织化学方法观察 pCREB 在 DRG 表达的变化。结果 在 DA 大鼠足底注射 BV 后 1 h 内,OCT 组比 BV 组的抬/舔爪持续时间均缩短($P < 0.05$);OCT 组 PWMT 较 BV 组升高,但这两组间 PWTL 差异无统计学意义。注射 BV 后 BV 组同侧 DRG 中 pCREB 阳性细胞百分数较对照组明显增加($P < 0.05$),局部 OCT 预处理明显减少 pCREB 阳性细胞百分数($P < 0.05$)。结论 足底注射 OCT 抑制 BV 导致的自发性伤害感受行为和机械痛敏,并伴有同侧 DRG 内 pCREB 表达降低,这一作用可能是 OCT 通过激活外周局部 SSTR 导致的。

关键词 奥曲肽;蜜蜂毒疼痛模型;背根神经节; pCREB

中图分类号 Q 426

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)05-0624-05

2016-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81160141);四川省教育厅自然科学基金(编号:15ZA0251);成都医学院自然科学基金资助课题(编号:CYZ14-005)

作者单位:¹ 川北医学院生物化学教研室,南充 637000

² 四川省医学科学院、四川省人民医院心血管超声及心功能科,成都 610072

³ 成都医学院体温与炎症四川省高校重点实验室,四川 610083

作者简介:唐 珍,女,讲师,硕士;

罗 蓉,女,副研究员,博士,责任作者,E-mail:luorong77@126.com

* 对本文具有同等贡献

生长抑素(somatostatin, SST)是广泛分布于中枢和外周神经系统的肽类物质,激活生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR)能抑制脊髓背角神经元的活性并导致动物伤害性行为的抑制和人类急性慢性疼痛减轻^[1]。奥曲肽(octreotide, OCT)是一种人工合成的由 8 个氨基酸组成的 SST 类似物。磷酸化 cAMP 应答元件结合蛋白(phosphorylated cAMP response element binding protein, pCREB)在痛觉信号传递中有重要作用。局部皮下注射角叉菜胶^[2]、福尔马林^[3]后双侧脑内前扣带回皮质、岛叶皮质、脊髓背角神经元和背根神经节(dorsal root ganglion,

gene plasmid, and then identify its function. **Methods** Primers were designed and synthesised, ASIC1 promoter fragment from rat genome DNA was replicated by polymerase chain reaction(PCR). The luciferase report gene pGL3-Basic reporter vector and ASIC1 promoter were digested with restriction enzymes NheI and XhoI separately, and then ASIC1 promoter was connected to pGL3-Basic reporter vector. 293T cells were transiently co-transfected with the constructed pGL3-ASIC1-promoter plasmid and pRL-TK control plasmid, and then detected for luciferase activity after 48 hours. **Results** Rat ASIC1 gene promoter was amplified by PCR and pGL3-ASIC1-promoter reporter vector was successfully constructed, and the result of colony PCR and sequencing analysis of recombined plasmid were correct. The transcriptional activity of pGL3-ASIC1-promoter plasmid group was significantly increased compared to that of pGL3-Basic plasmid group ($P < 0.01$). **Conclusion** The rat ASIC1 promoter luciferase reporter gene vector can be successfully constructed, which provides a pivotal basis for further study of regulatory mechanism of ASIC1 gene in transcription.

Key words ASIC1; promoter; luciferase; reporter gene