

大鼠 Prestin-3'UTR 双荧光素酶报告 基因载体的构建与鉴定

王军义¹, 夏源¹, 张川¹, 朱艳丽², 杨湘宁²

(1. 广东药学院公共卫生学院, 广东 广州 510310; 2. 广东药学院附属第一医院, 广东 广州 510062)

摘要: **目的** 构建大鼠 Prestin 基因(SLC26A5)3'端 UTR 区双荧光素酶报告系统, 为研究 Prestin 基因的 microRNA 调控提供基础平台。 **方法** 以 C6 细胞基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 SLC26A5 基因的 3'UTR 序列, 并连接至 pmir-RB-REPORT™ 双荧光素酶报告载体多克隆位点, 测序验证插入序列并转染入 293T 细胞检测其荧光素酶活性。 **结果** 测序结果表明 PMIR-3'UTR 的插入序列正确, 在转染入 293T 细胞后其荧光素酶能正常表达。 **结论** 大鼠 Prestin-3'UTR 双荧光素酶报告基因载体构建成功。

关键词: Prestin; 3'非编码区; 双荧光素酶报告载体; 大鼠

中图分类号: R392.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2015)01-0008-04 DOI:10.13631/j.cnki.zggyx.2015.01.002

Constructing and identifying of rat Prestin-3'UTR dual-luciferase reporter gene vector

WANG Jun-yi*, XIA Yuan, ZHANG Chuan, ZHU Yan-li, YANG Xiang-ning

(* . Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, China)

Abstract: Objective To study the regulation of microRNA on Prestin gene, a rat Prestin-3'UTR dual-luciferase reporter gene vector was constructed. **Methods** The 3'untranslated region (3'UTR) fragment of SLC26A5 gene was amplified by PCR from genomic DNA of C6 cells. PCR products were cloned into pmir-RB-REPORT™ dual-luciferase reporter gene vector. DNA sequencing identified 3'UTR of SLC26A5 and the dual-luciferase reporter gene vector was transferred into 293T cells to quantitate the reporter activity by the Dual-Luciferase Reporter Assay System. **Results** The results showed that a 3'UTR fragment of SLC26A5 gene was successfully cloned into the pmir-RB-REPORT™ dual-luciferase reporter gene vector, which authenticated by DNA sequencing, and the luciferase activity of 293T cells which was transfected vector could expressed availably. **Conclusion** Rat Prestin-3'UTR dual-luciferase reporter gene vector was successfully constructed.

Key words: prestin; 3'untranslated region (3'UTR); dual-luciferase reporter gene vector; rat

2000 年 Zheng^[1] 首先应用减法 PCR 分离出一种在耳蜗外毛细胞 (OHC) 中特异表达的基因, 并在细胞中表达出相应蛋白, 对此蛋白功能特性的研究认为它就是耳蜗 OHCs 的分子马达, 将它命名为 Prestin。Dallos^[2] 用 cDNA 文库差减法验证了 Prestin 的存在。Liberman^[3] 构建了 Prestin 缺失的转基因小鼠, 发现这些突变小鼠的听觉阈值升高了, 说明 Prestin 蛋白在感音功能中起到重要的作用。

Prestin 蛋白的表达受很多外来因素的影响, 研究发现噪声、辐射、缺氧等因素会导致 OHCs 的 Prestin 表达水平变化^[4-7], 但目前尚无 Prestin 表达调控机制方面的研究报告。我们在大鼠噪声性听力损失的研究中发现, 其耳蜗 OHCs 的 Prestin 表达水平上调, 新一代高通量的 sRNA 测序分析发现噪声性听力损失大鼠耳蜗出现数百个差异性表达的 miRNAs, 我们构

建了大鼠 Prestin 基因 3'UTR 双荧光素酶报告载体, 试图对差异性表达的 miRNAs 进行靶点验证, 从而筛选出具有调控 Prestin 表达的 miRNAs, 为进一步的研究提供理论及实验依据。

1 材料和方法

1.1 Prestin (SLC26A5) 3'UTR 序列分析

利用 targetscan、NCBI、miRDB 及 ensembl 网站预测大鼠 SLC26A5 3'UTR 序列, 根据 miRNA 通过其种子序列 (5'端第 2 至第 7 或第 8 核苷酸) 同靶基因 mRNA 分子 3'UTR 特异性, 结合调控靶基因表达的原则, 在大鼠 SLC26A5 3'UTR 序列寻找到 miRNA 相应的靶点 (targetscan 预测), 以 3'UTR 序列 200~500 bp 片段构建载体。

1.2 根据大鼠 SLC26A5 3'UTR 序列信息对其进行扩增

根据大鼠 SLC26A5 3'UTR 序列信息设计其扩增引物, 以大鼠细胞系的脑胶质瘤细胞 (C6 细胞) 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 SLC26A5 基因的 3'UTR 序列。

收稿日期: 2014-03-20; 修回日期: 2014-07-09

作者简介: 王军义 (1964—), 男, 医学硕士, 副教授, 研究方向: 职业噪声性听力损失。

通讯作者: 杨湘宁, 主任医师, E-mail: yxngy@163.com。

PCR 反应 (PCR 仪, Bio-RAD 公司) 体系设计为 30 μl 总体系: 5 $\times$ Prime STAR Buffer 6 μl (Fermentas 公司)、2.5 mmol/L dNTPmix 2 μl (Fermentas 公司)、上下游引物 (锐博生物, 广州, 10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μl 、Prime STAR HS DNA 聚合酶 (Fermentas 公司, 2.5 U/ μl) 0.3 μl 、DNA 模板 1 μl (约 100 ng); 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min 预变性, 循环内 98 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s 变性, 从 66 $^{\circ}\text{C}$ 每个循环降 1 $^{\circ}\text{C}$ 退火, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s; 10 个循环; 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火, 进行 15 个循环; PCR 反应循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 3 min, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 反应完取 2 μl PCR 产物进行 1% 琼脂糖 (BioWest 公司, 西班牙) 电泳分析, 按照凝胶纯化试剂盒 (天根生化, 北京) 说明书进行纯化 PCR 产物。

1.3 大鼠 SLC26A5 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体的构建

利用 XhoI、NotI 两个限制性内切酶 (Fermentas 公司) 将大鼠 SLC26A5 3'UTR 基因片段连接 (Ligation) 到 pmiR-RB-REPORTTM 双荧光素酶报告载体 (pmiR-RB-REPORT Vector, 锐博生物, 广州) 中, 构建大鼠 SLC26A5 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体 (图 1)。

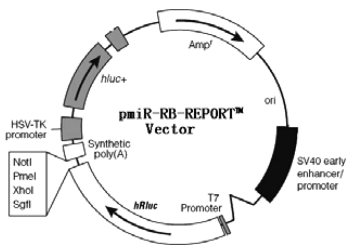


图 1 pmiR-RB-REPORTTM 双荧光素酶报告载体图谱

双酶切反应体系如下: 10XH 缓冲液 3 μl , 目标基因片段约 2 μg , 2 种内切酶 (10 U/ μl) 各 1 μl , 灭菌去离子水补足到 30 μl 。反应条件 37 $^{\circ}\text{C}$ 、3 h。酶切后回收纯化酶切产物, 按照纯化试剂盒说明书进行纯化产物。

连接反应体系如下: 目的基因片段 15 μl 、载体 1 μl 、10XT4 连接缓冲液 2 μl 、T4 连接酶 (Fermentas 公司) 1 μl 、灭菌去离子水补足到 20 μl , 22 $^{\circ}\text{C}$ 连接 3 h。

1.4 大鼠 SLC26A5 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体的鉴定

转化 (transformation): 取连接产物加到 DH5 α 感受态细胞 (天根生化, 北京) 中, 冰浴 30 min。将上述转化液置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 s, 后立即置于冰浴中放置 2~3 min, 加入 900 μl 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 LB (不含

抗生素) 培养基 (OXOID, 英国), 150 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 45 min。2500 r/min 离心 5 min, 吸走上清液, 留 100 μl 混匀菌液加到含 Amp 抗生素 LB 固体琼脂培养基上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h。

菌落 PCR 鉴定: 取平皿中白色菌落做模板进行 PCR (PCR 仪, Bio-RAD 公司)。PCR 反应体系设计为 10 μl 总体系: 10X Taq Buffer 1 μl 、25 mmol/L MgCl₂ 1 μl 、2.5 mmol/L dNTP mix 0.8 μl 、载体上下游引物 (10 mmol/L) 各 0.5 μl 、Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ μl) 0.1 μl 、DNA 模板 0.5 μl (约 100 ng), 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min 预变性, 循环内 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 变性, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 25 个循环, PCR 反应循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 3 min, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将白色菌落的 PCR 产物进行跑胶, 如果有目标条带则认为是阳性克隆, 并将该单菌落培养的菌液提取质粒后送测序公司 (金唯智生物, 苏州) 进行测序, 检测是否成功将进一步鉴定。

1.5 大鼠 SLC26A5 3'UTR 双荧光素酶报告系统荧光活性检测

将大鼠 SLC26A5 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体和 mimic NC (Non-target Control) 或 mo-miR-211-5p 的 mimic (阳性对照) 分别转染入 293T 细胞, 24 h 后按照双荧光素酶检测试剂盒 (Promega 公司, 美国) 提供的操作方法检测荧光素酶活性的改变, 荧光光度计 (PE 公司) 分别检测转染 3'UTR 双荧光素酶报告系统与阳性对照载体的萤火虫荧光素酶活性 (Rn) 和海肾素荧光素酶活性 (Ff), 以萤火虫荧光素酶活性/海肾素荧光素酶活性值作为荧光素酶活性。

2 结果

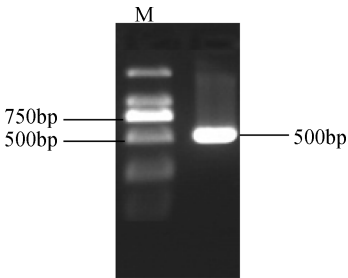
2.1 基因序列分析

在 targetscan 网站上预测到大鼠 SLC26A5 的转录本为 NM_030840, 但在 NCBI、miRDB 及 ensembl 网站上均没有找到大鼠 SLC26A5 (NM_030840) 3'UTR 序列, 只找到其编码 (CDS) 序列; 在 ensembl 网站上取 CDS 序列后的 500 bp 3'侧翼序列 (3'Flanking sequence) 为 3' UTR 序列, 在 3' 侧翼序列中找到 miRNA 相应的靶点 (targetscan 预测), 可作为目标基因片段构建载体。

2.2 大鼠 SLC26A5 3'UTR 序列引物设计其扩增

设计 PCR 扩增大鼠 SLC26A5 3'UTR 引物序列: 上游: 5'-CCACTCGAGGACCTGCATGGGGTTGTG-3' (XhoI), 下游: 5'-ATTGCGGCCGCACTGACTGTTCTTCCTG-3' (NotI); 划线部分分别为 XhoI、NotI 酶切位点序列。

PCR 反应完成后取 0.2 μ l 产物进行 1% 琼脂糖电泳分析, 结果见图 2。电泳结果显示, PCR 产物特异且大小与预期相符。回收该产物, 并将其连接到 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体中。



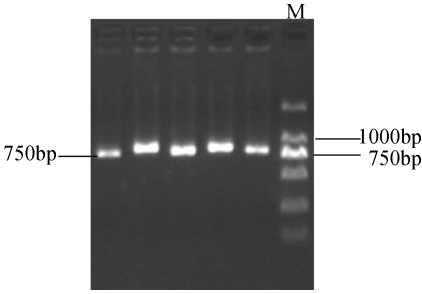
M:DL2000, 扩增大小与理论大小相符

图 2 3'UTR 序列扩增 PCR 产物琼脂糖电泳分析

2.3 大鼠 SLC26A5 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体的鉴定结果

2.3.1 转化的菌落鉴定 挑取 5 个转化的菌落, 进行 PCR, 取 5 μ l PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳分析,

用载体上游和载体下游引物扩增的条带理论大小为 750 bp 左右, 其实际扩增条带见图 3。电泳结果显示, 挑取的 5 个单克隆均为阳性克隆, 选择其中一个阳性克隆进行测序验证。



M:DL2000, 扩增大小与理论大小相符

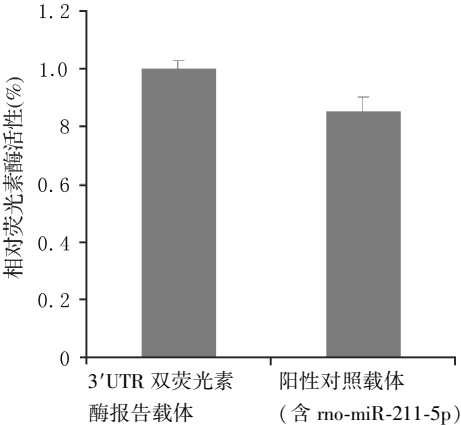
图 3 转化菌落 PCR 产物琼脂糖电泳分析

2.3.2 阳性克隆测序鉴定 大鼠 SLC26A5 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体测序结果显示成功将 3'UTR 序列插入的 pmiR-RB-REPORT Vector。序列如图 4 (下划线标注为插入序列, 两边为载体序列)。

AAATGCTGTGACAGGAGGAGCTCCAGATGAATGGCTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGC
TGAAGAACGAGCAGTAATTCTAGGCGATCGCTCGAGGACCTGCATGGGGTTGTGCGCCGCGCTGAA
TTCTGAACCTTAACACACTTTAAATACCAGGTGCGAGGCTTTCTTCCCACCGCCCAAGGAAATGCTGGT
AGTTACGGCTCGATTTCGAGGGTGAATGAAGCCTAGCAAGATGTATCTCAGCCTTGCCTGTTTAAG
CTGAATACTTCAAAGATTAACTGGCTTCTTGGGTTTATGCAGTGACATTTCATCACACCTTAATGTT
AGCTCTGTTTGTGAGTTTTTTTTTCTTACTCCTGATTTCTTTTTTATCTGAAGCCTTTTGAAACTAA
TCACATAAAATTACAAAGTTAGCAAATGTCTTTTTTTTTTTTTTAAGATTATTTATTATATATAAGT
ACACTGTAGCTGTCTTCAGACACGCCAGAAGAGGGCACCAGATCTCATGACAGATGGTTCTGAGCCA
CCATGTGATTGCTGGGATTTGAACCTCAGGACCTCAGGAAGAACAGTCAGTGCAGCGCCGCTGGCCGCAA
TAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGCTTTTTTGTGTGAGGATCTAAATGAGTC

图 4 大鼠 SLC26A5 3'UTR 基因载体序列图

2.3.3 大鼠 SLC26A5 3'UTR 双荧光素酶报告系统荧光值表达 测定结果显示, SLC26A5 3'UTR 双荧光素酶报告系统与阳性对照报告基因载体分别转染入 293T 细胞后, 均能在细胞内产生荧光素表达 (见图 5)。



注: 以海肾荧光酶基因为内参检测萤火虫酶基因荧光活性

图 5 3'UTR 双荧光素酶报告系统与阳性对照相对荧光活性比较

3 讨论

常用的报告基因有胭脂碱合成酶基因、章鱼碱合成酶基因、新霉素磷酸转移酶基因、氯霉素乙酰转移酶基因、庆大霉素转移酶基因、葡萄糖苷酶基因、荧光素酶基因等^[8], 其中荧光素酶的检测则只需短短数秒, 由萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶组成的双荧光素酶报告基因系统, 可检测出 1×10^{-19} mol 的酶分子, 具有超高的灵敏性与特异性, 检测的线性范围可达 6~8 个数量级, 所以双荧光素酶报告基因是理想的报告基因^[9,10]。目前判定 miRNA 是否与靶基因的 3'UTR 结合主要通过双荧光素酶检测系统^[11], 构建 Prestin 基因 3'UTR 双荧光素酶报告载体就是为了验证 Prestin 基因具有转录后调控作用的 miRNA。

本文通过扩增大鼠 Prestin 基因 3'UTR 区, 连接至双荧光素酶报告载体中, 并检测 3'UTR 双荧光素酶报告系统的荧光值, 证实大鼠 SLC26A5 3'UTR 双

表 1 各组大鼠脑皮质 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活力 (n=6, $\bar{x}\pm s$) $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mg pro})$

组别	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶	Ca ²⁺ -ATP 酶
对照组	6.67±0.21	3.41±0.42
低剂量 MeHg 组	5.38±0.29**	2.54±0.17**
高剂量 MeHg 组	3.21±0.14**	2.13±0.09**
DM 预处理组	5.56±0.24▲▲	3.00±0.11▲▲

注:与对照组比较, ***P*<0.01;与高剂量 MeHg 组比较, ▲▲*P*<0.01。

表 2 各组大鼠脑 Ca²⁺、ROS 含量及细胞凋亡率 (n=4, $\bar{x}\pm s$)

组别	Ca ²⁺ (nmol/L)	ROS(荧光强度)	细胞凋亡率(%)
对照组	94.84±15.01	101.58±24.50	2.30±0.85
低剂量 MeHg 组	152.51±32.79*	185.38±24.49**	10.08±2.27**
高剂量 MeHg 组	227.71±39.68**	399.77±43.23**	25.40±4.69**
DM 预处理组	180.18±28.24▲	254.18±30.76▲▲	16.85±3.57▲▲

注:与对照组比较, **P*<0.05, ***P*<0.01;与高剂量 MeHg 组比较, ▲*P*<0.05, ▲▲*P*<0.01。

3 讨论

神经病理学观察发现经 MeHg 染毒后大鼠大脑皮质组织结构紊乱、间质严重水肿、染色淡,神经元数量减少,呈变性、坏死改变,表明 MeHg 对大鼠的神经毒性模型已经建立。

谷氨酸(Glu)是中枢神经系统具有代表性的兴奋性氨基酸^[4]。当 Glu 释放增加,胶质细胞重摄取功能下降时,就会导致 Glu 代谢转运障碍。本实验发现随着 MeHg 染毒剂量的增加, Glu 代谢转运中的 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活力降低,这可导致细胞间隙内 Glu 的大量蓄积进而引发 Glu 代谢转运障碍。Glu 作用于细胞膜上的 NMDA 受体,升高细胞内 Ca²⁺浓度,造成 Ca²⁺超载,最终导致细胞死亡^[5,6]。本结果也显示,随着 MeHg 染毒剂量的增加细胞内 Ca²⁺含量随之升高。过量的 Ca²⁺沉积于线粒体,线粒体呼吸链的氧化功能受到干扰, ROS 生成增多^[7],核酸内切酶和凋亡基因在 Ca²⁺的激活下进行表达,细胞凋亡也相应增加,细胞凋亡率明显升高。

本实验表明 DM 预处理对甲基汞所致神经毒性起到一定的拮抗作用。此外,有研究表明 ROS 的产生、增加可以加重 MeHg 对 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力的抑制^[8],减少对 Glu 的重摄取,进一步加重由 Glu 过量表达引起的 Glu 代谢转运障碍。由此可见,甲基汞可以通过影响 Glu 代谢障碍来增加胞内 ROS 的生成,诱发氧化损伤;而 ROS 生成过多也可以加重 Glu 代谢转运障碍,提示 Glu 代谢转运障碍与氧化损伤之间存在一定的交互作用。

参考文献:

[1] Lu T H, Hsieh S Y, Yen C C, *et al.* Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury [J]. *Toxicol Lett*, 2011, 204 (1): 71-80.

[2] Thomas D M, Kuhn D M. MK-801 and dextromethorphan block microglial activation and protect against methamphetamine-induced neurotoxicity [J]. *Brain Res*, 2005, 1050 (1): 190-198.

[3] 陈传义, 彭仁琇, 李元涛. 七氟醚麻醉对大鼠脑 ATP 酶的动态影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21 (8): 972-974.

[4] Tsurugizawa T, Torii K. Physiological roles of glutamate signaling in gut and brain function [J]. *Bio Pharm Bull*, 2010, 33 (11): 1796-1799.

[5] Luo Y, Good C H, Diaz-Ruiz O, *et al.* NMDA receptors non-dopaminergic neurons in the VTA support cocaine sensitization [J]. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 2010, 5 (8): e12141.

[6] Avshalumov M V, Rice M E. NMDA receptor activation mediates hydrogen peroxide-induced pathophysiology in rat hippocampal slices [J]. *Neurophysiol*, 2002, 87 (6): 2896-2903.

[7] Farina M, Aschner M, Rocha J B. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 256: 405-417.

[8] Dada L A, Sznajder J I. Mechanisms of pulmonary edema clearance during acute hypoxemic respiratory failure: role of the Na⁺/K⁺-ATPase [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31 (4 suppl): S248-S252.

(上接第 10 页)

荧光素酶报告系统在细胞中可以正常表达,说明大鼠 Prestin-3'UTR 双荧光素酶报告基因载体的构建成功,这将为进一步研究调控 Prestin 基因表达的 miRNA 提供了研究基础和工具。

[本文为广东药学院科技处-附属第一医院联合自然科学基金培育基金(GYFYLH201326)资助]

参考文献:

[1] Zheng J, Shen W, He D Z, *et al.* Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells [J]. *Nature*, 2000, 405: 149-155.

[2] Dallos P, Fakler B. Prestin, a new type of moter protein [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 104-111.

[3] Liberman M C, Gao J. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier [J]. *Nature*, 2002, 419 (6904): 300-304.

[4] Chen G D. Prestin gene expression in the rat cochlea following intense noise exposure [J]. *Hear Res*, 2006, 222 (1-2): 54-61.

[5] Mazurek B, Haupt H, Amarjargal N, *et al.* Up-regulation of prestin mRNA expression in the organs of Corti of guinea pigs and rats

following unilateral impulse noise exposure [J]. *Hear Res*, 2007, 231 (1-2): 73-83.

[6] Gross J, Machulik A, Amarjargal N, *et al.* Expression of prestin mRNA in the organotypic culture of rat cochlea [J]. *Hear Res*, 2005, 204 (1-2): 183-190.

[7] 杜莎莎, 任陈, 田允鸿, 等. 电离辐射大鼠耳蜗外毛细胞 Prestin 蛋白表达影响的实验研究 [J]. *热带医学杂志*, 2010, 11 (10): 1127-1130.

[8] Naylor L H. Reporter gene technology: the future looks bright [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58 (5): 749-757.

[9] 张信基, 石小军, 孙鹏宇, 等. Gluc-Fluc 双荧光素酶质粒转染 MB49 细胞后荧光表达特性 [J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31 (3): 499-503.

[10] 郑传宜, 杨堃, 李军亮, 等. 大鼠 GLUT3 基因启动子区荧光素酶报告基因载体的构建与鉴定 [J]. *海南医学院学报*, 2012, 18 (5): 577-581.

[11] Araujo P R, Burle-Caldas G A, Silva-Pereira R A, *et al.* Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of Trypanosoma cruzi mRNAs [J]. *Parasitol Int*, 2011, 60 (2): 161-169.