

余河玲, 朱师良, 何启华, 等. *PDPK1* 3'UTR 双荧光素酶报告载体的构建及与 *gga-miR-148a-5p* 的靶向验证[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1): 147-151.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.01.020

PDPK1 3'UTR 双荧光素酶报告载体的构建及与 *gga-miR-148a-5p* 的靶向验证

余河玲, 朱师良, 何启华, 王彦

(四川农业大学畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要: 本试验通过构建 *PDPK1* 基因 3'UTR 双荧光素酶报告载体, 并验证 *gga-miR-148a-5p* 与 *PDPK1* 的靶向关系。利用生物信息学软件预测 *gga-miR-148a-5p* 与 *PDPK1* 结合位点; 利用 PCR 扩增 *PDPK1* 基因 3'UTR 序列, 将其克隆到 PGL3-CMV-LUC-MCS 双荧光素酶报告基因载体中; 将 *gga-miR-148a-5p* 及阴性对照分别与野生型 *gga-PDPK1*-WT-3'UTR 双荧光素酶报告质粒共转染至 293T 细胞中, 双荧光素酶报告系统检测各组荧光素酶活性。Targetscan、miRbase 数据库预测结果显示, *gga-miR-148a-5p* 与 *PDPK1* 基因 3'UTR 存在互补结合位点; 酶切及测序结果表明, 双荧光素酶报告载体构建成功; 荧光素酶活性试验结果表明, *gga-miR-148a-5p mimics* 能够与 *PDPK1* 基因 3'UTR 结合并抑制荧光素酶活性。*gga-miR-148a-5p* 能够与 *PDPK1* 靶向性结合, *PDPK1* 是 *gga-miR-148a-5p* 的靶基因。

关键词: *PDPK1*; *gga-miR-148a-5p*; 禽白血病; 双荧光素酶报告基因检测系统

中图分类号: Q783 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2020)01-0147-05

Construction of *PDPK1* 3'UTR dual luciferase reporter vector and targeting verification with *gga-miR-148a-5p*

YU He-ling, ZHU Shi-liang, HE Qi-jian, WANG Yan

(Farm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In this study, the *PDPK1* gene 3'UTR dual luciferase reporter vector was established, and the targeting relationship between *gga-miR-148a-5p* and *PDPK1* was verified. Bioinformatics software was used to predict the binding site of *gga-miR-148a-5p* and *PDPK1*. The 3'UTR sequence of *PDPK1* gene was amplified by PCR and cloned into PGL3-CMV-LUC-MCS dual luciferase reporter vector. The *gga-miR-148a-5p* and negative control were cotransfected with wild-type *gga-PDPK1*-WT-3'UTR dual luciferase reporter plasmid into 293T cells, and the luciferase activity of each group was detected by dual luciferase reporter system. Prediction results from Targetscan and miRbase databases showed that there were complementary binding sites between *gga-miR-148a-5p* and the 3'UTR of *PDPK1* gene. The enzyme digestion and sequencing results showed that the dual luciferase reporter vector was successfully constructed. The results of luciferase activity assay indicated that *gga-miR-148a-5p mimics* could bind to the 3'UTR of *PDPK1* gene and inhibit luciferase activity. The *gga-miR-148a-5p* can bind to *PDPK1*, and *PDPK1* is the target gene of *gga-miR-148a-5p*.

Key words: *PDPK1*; *gga-miR-148a-5p*; avian leukosis; dual luciferase reporter gene detection system

收稿日期: 2019-07-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601936); 四川省“十三五”育种攻关项目(2016NYZ0050)

作者简介: 余河玲(1992-), 女, 重庆云阳人, 硕士研究生, 主要从事家禽遗传育种与繁殖研究。(E-mail) 760963242@qq.com

通讯作者: 王彦, (E-mail) as519723614@163.com

禽白血病是由禽白血病病毒(Avian leukosis virus, ALV)引起的, 是鸡三大肿瘤性疾病(马立克氏病、白血病、网状内皮增生症病)中最先被人们关注并研究的一种禽类疾病。该疾病是由反转录病毒科(Retroviridae)禽白血病病毒(又称肉瘤病毒群病

毒)(ALV)引起的以造血细胞恶性增生为主的多种肿瘤性疾病的统称^[1]。据报道,在一些中国鸡群中,ALV-J可诱导各种肿瘤的发生^[2-3],导致鸡晚期发病和急性肿瘤^[4-5],且具有高达60%的发病率及20%的死亡率^[2]。由于ALV-J具有极高的突变率和重组率,且极易导致其宿主范围和毒性改变,可导致肿瘤、免疫缺陷、白血病和淋巴瘤。因此,研制相关疫苗存在一定难度。除此之外,在实际生产中,禽白血病病毒的传播方式也给禽白血病的防治带来了一定的难度。

3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(PDK1或PDPK1)是属于AGC激酶家族的古老丝氨酸-苏氨酸激酶,具有作为AGC激酶的主要调节剂的特性^[6]。众所周知,许多肿瘤是由关键信号传导途径的失调引起的。而PDPK1上游信号蛋白的改变,例如酪氨酸激酶受体的激活、PI3K组成型活化及PTEN功能丧失,都可以引发人类癌症。同时,PDPK1的多个下游效应物,如Akt、p90RSK、p70S6K、PKC和SGK,与癌症恶化趋向及更具侵袭性的疾病有关。例如,在人体前列腺癌中,与原发肿瘤相比,含有PDPK1基因的基因座在淋巴结转移和去势抵抗性前列腺癌中常被检测到^[7];在人体食管鳞状细胞癌中,与邻近的非癌组织相比,肿瘤细胞中PDPK1蛋白表达更高。此外,PDPK1的高表达与晚期肿瘤分期(阳性淋巴结转移或高组织学分级)和较短的总生存期相关^[8]。例如,PDPK1在40%以上的急性髓性白血病患者中过度表达,PDPK1高表达的患者呈现较差的治疗结果,且比PDPK1低表达的患者存活时间更短^[9]。

*hsa-miR-148a*位于鸡7号染色体,包含68个核苷酸序列。而*gga-miR-148a*位于鸡2号染色体上,有68个核苷酸序列。*miR-148a*的表达已在人、小鼠、大鼠和斑马鱼中得到证实,但尚未在鸡中得到验证。在正常生理条件下,*miR-148a*在各种人体组织中表达,包括脑、心脏、肝脏、胸腺、胰腺、肾、胎盘、子宫、睾丸和造血系统等^[10-12]。*miR-148a*的表达下调可以在多种癌症中检测到,包括胃癌、结肠直肠癌、胰腺癌、肝癌、食道癌、乳腺癌、非小细胞肺癌和泌尿生殖系统癌症。本实验室前期发现*gga-miR-148a-5p*在40日龄的禽白血病患病鸡和未患病鸡的脾脏组织中存在差异表达,但目前对于其与PDPK1的靶向关系尚未报道。本研究采用生物信息学方法对

*gga-miR-148a-5p*的直接作用靶基因及作用位点进行分析,并通过双荧光素酶报告基因系统分析*gga-miR-148a-5p*是否能靶向调控PDPK1基因,为进一步研究*gga-miR-148a-5p*在鸡抗禽白血病育种中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

人肾上皮细胞(293T)、大肠杆菌DH5 α 感受态细胞、双荧光素报告基因载体(PGL3-CMV-LUC-MCS)均购自上海吉满公司,胶回收试剂盒购自凯杰生物技术有限公司(上海),小提质粒试剂盒购自OMEGA公司,LipofectamineTM2000购自Invitrogen公司(美国),Taq polymerase、DNA ladder购自TaKaRa宝生物(大连)科技有限公司,Hieff Clone[®] Plus One Step Cloning Kit购自YEASEN,琼脂糖购自上海前尘生物有限公司,Mlu I、Xho I内切酶购自Fermantas公司,胎牛血清、DMEM、胰酶均购自GIBICO公司(美国),引物合成及测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。二氧化碳培养箱,SHELLAB公司产品;荧光倒置显微镜,Nikon公司产品;CFX96荧光定量PCR仪,Bio-Rad公司产品;超低温冰箱,Thermo公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 *gga-miR-148a-5p*靶基因的预测及靶基因富集 前期课题组曾对miRNA与鸡白血病之间的关系进行了探究,通过采集40日龄患病鸡和健康鸡的脾脏组织进行全转录组测序,最终筛选出了7个差异表达的miRNA(*gga-miR-205a*、*gga-miR-21-5p*、*gga-miR-383-5p*、*gga-miR-203*、*gga-miR-223*、*gga-miR-148a-5p*、*gga-miR-21-3p*)。在此基础上,首先,通过使用miRDB、TargetScan7.1等生物信息学软件预测*gga-miR-148a-5p*靶基因,求其交集。然后,利用生物信息学软件DAVID将靶基因的交集在NF- κ B信号通路进行靶基因富集,最终选定PDPK1作为*gga-miR-148a-5p*的靶基因。

1.2.2 构建PDPK1野生型双荧光素酶报告基因质粒 本试验结合miRDB软件和NCBI数据库,找到PDPK1与*gga-miR-148a-5p*的结合位点(http://www.mirdb.org/cgi-bin/target_detail.cgi?targetID=541541),共构建3个PDPK1基因3'UTR野生型报告基因质粒。选用的载体为PGL3-CMV-LUC-MCS

(上海吉满生物科技有限公司提供),首先通过双酶切的方法得到线性化载体,然后通过 PCR 扩增的方法得到 PCR 扩增片段, *gga-PDPK1* 引物序列: *gga-PDPK1-F*: 5'-AGATCGCCGTGTGACTCGAGTAACA-ATCAGACATGCAGTCACCTTGC-3', *gga-PDPK1-R*: 5'-CCCCGACTCTAGCACGCGTCTTGACACAAGATTGAAACTGCC-3', 其引物末端具有 20 个线性化载体末端的同源碱基,其中黑色下划线部分序列为同源臂序列,未划线部分分别为 *PDPK1* 的上游引物序列和下游引物序列, *Mlu* I、*Xho* I 酶切位点为引物两端添加同源臂的位置。*PDPK1* 报告基因质粒及 *gga-miR-148a-5p* mimics 序列由上海吉满生物科技有限公司合成。

双酶切 PCR 产物, 2% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收; *Mlu* I、*Xho* I 双酶切 PGL3-CMV-*LUC-MCS* 空载体, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收; 采用无缝克隆的方式, 根据 HieffClone™ 重组反应体系, 将酶切好的载体与目的片段进行连接, 于 50 °C 连接 20 min, 再取 10 μ l 的连接产物加入制备好的 DH5 α 感受态细胞中, 置于冰上。最后再加入到含氨苄霉素或卡那霉素等的平板上, 涂板后挑选若干个单菌落, 进行小量摇菌培养, 然后进行测序鉴定。

1.2.3 双荧光素酶活性检测 分别将接种构建成功的 *PDPK1* 3'UTR 报告基因载体质粒菌液移至 5 ml LB 培养液中, 37 °C 摇床 (220 r/min) 过夜, 用高

纯度质粒抽提试剂盒 QIAprep® Miniprep Handbook 制备质粒。将状态良好, 处于对数生长期的空白细胞用 0.25% 胰酶消化, 用完全培养基悬浮成单细胞悬液, 细胞计数后, 接种于 24 孔培养板中, 培养过夜, 观察细胞生长状态。在细胞覆盖率 70% 左右时, 进行转染试验, 转染 2 h 前将培养基换为新鲜的培养基, 分别为 *miR-148a-5p* mimics + *PDPK1* WT1 + TK、*miR-148a-5p* mimics + *PDPK1* WT2 + TK、*miR-148a-5p* mimics + *PDPK1* WT3 + TK、*miR-148a-5p* mimics + UTRNC + TK、*miR* NC + *PDPK1* WT1 + TK、*miR*NC + *PDPK1* WT2 + TK、*miR*NC + *PDPK1* WT3 + TK、*miR*NC + UTRNC + TK, 转染 48 h 后, 从培养箱中取靶细胞裂解、离心, 收取上清液, 然后根据报告基因检测试剂盒说明书操作进行检测。

1.2.4 统计学分析 所有试验结果均采用 SPSS 18.0 软件进行统计, 结果用均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *gga-miR-148a-5p* 与 *PDPK1* 3'UTR 互补结合位点预测

通过生物信息学软件 Targetscan、miRbase 筛选得分较高, 且交集较多的靶基因, 结果发现 *gga-miR-148a-5p* 与 *PDPK1* 3'UTR 存在互补结合位点 (图 1)。

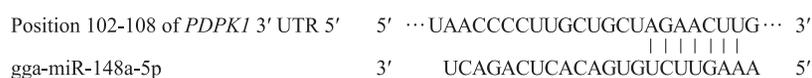


图 1 *gga-miR-148a-5p* 与 *PDPK1* 3'UTR 互补结合的靶位点

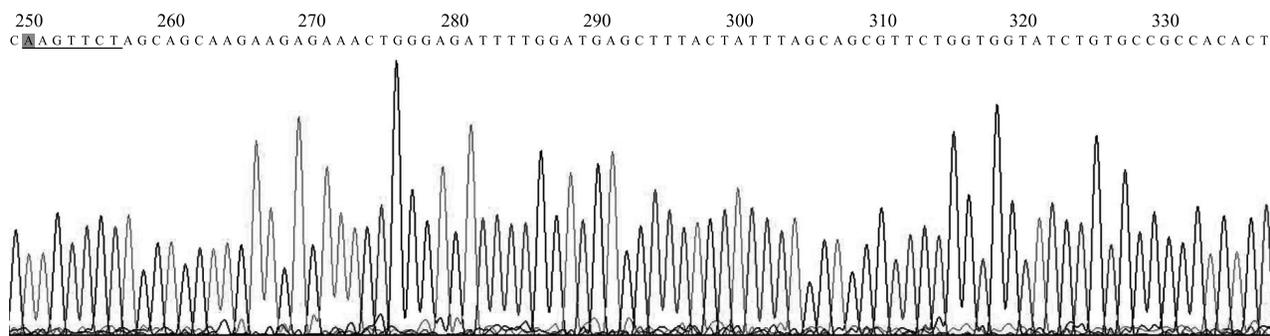
Fig.1 Target site of complementary binding between *gga-miR-148a-5p* and 3'UTR of *PDPK1* gene

2.2 重组载体质粒的测序结果

重组载体质粒基因测序选用 sanger 测序法, 其中 PGL3-CMV-*LUC-gga-PDPK1* 3' UTR (*gga-miR-148a-5p*) WT1、PGL3-CMV-*LUC-gga-PDPK1* 3' UTR (*gga-miR-148a-5p*) WT2 采用 sanger 反向测序法, PGL3-CMV-*LUC-gga-PDPK1* 3' UTR (*gga-miR-148a-5p*) WT3 采用 sanger 正向测序法。3 种 PGL3-CMV-*LUC-gga-PDPK1* 3'UTR (*gga-miR-148a-5p*) WT 阳性重组克隆测序分别如图 2、图 3、图 4, 经过比对, 重组克隆中插入片段序列与目的片段序列完全一致, 因此载体构建成功。

2.3 双荧光素酶活性

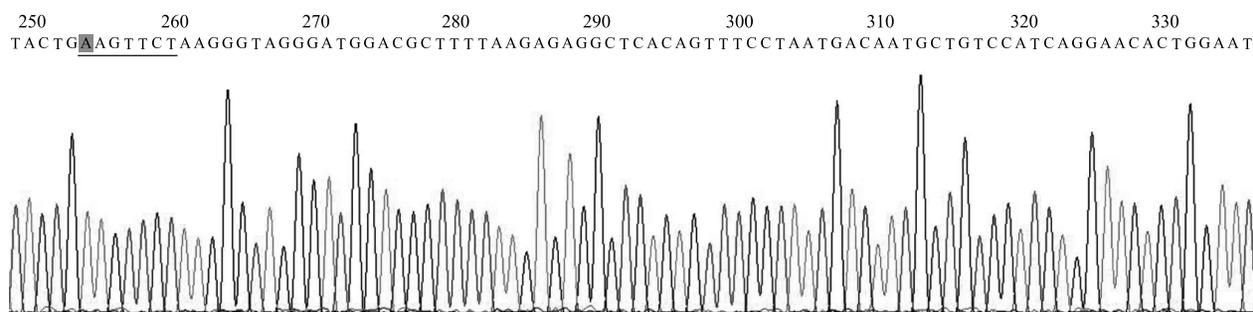
转染 48 h 后, 在 infinite M1000 荧光检测仪上检测萤火虫与海肾荧光素酶值, 并计算二者相对荧光素酶活性 (ΔCt), 3 次独立重复试验结果显示, 每个样品的萤火虫及海肾的荧光素酶值均较高且表达稳定。在转染重组载体质粒 PGL3-CMV-*LUC-gga-PDPK1* 3' UTR WT 的试验中, 与 *gga-miR-148a-5p* NC 组相比较, *gga-miR-148a-5p* 组的荧光素酶活性和 *miR-148a-5p* mimics 组荧光素酶活性均显著下降, 差异显著; 转染空白载体质粒的试验中, 2 组荧光素酶活性无显著差异 (图 5)。



下划线为 *gga-miR-148a-5p* 结合序列。

图2 PGL3-CMV-LUC-*gga-PDPK1* 3'UTR(*gga-miR-148a-5p*) WT1 阳性克隆测序结果

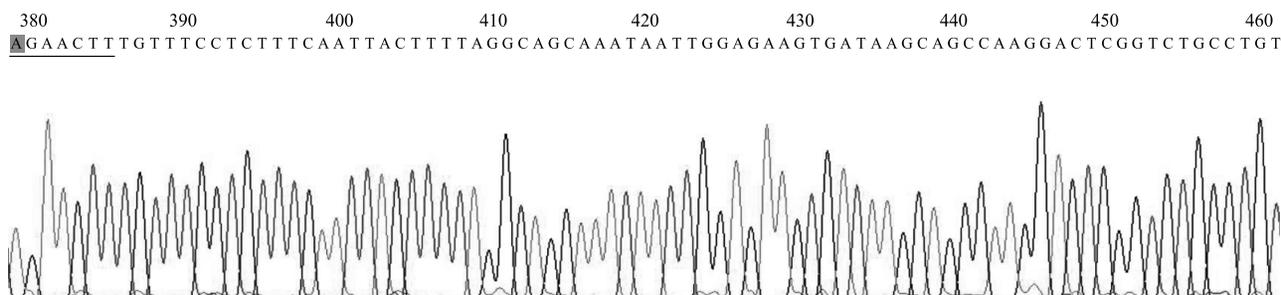
Fig.2 Positive clone sequencing results of PGL3-CMV-LUC-*gga-PDPK1* 3'UTR(*gga-miR-148a-5p*) WT1



下划线为 *gga-miR-148a-5p* 结合序列。

图3 PGL3-CMV-LUC-*gga-PDPK1* 3'UTR(*gga-miR-148a-5p*) WT2 阳性克隆测序结果

Fig.3 Positive clone sequencing results of PGL3-CMV-LUC-*gga-PDPK1* 3'UTR(*gga-miR-148a-5p*) WT2



下划线为 *gga-miR-148a-5p* 结合序列。

图4 PGL3-CMV-LUC-*gga-PDPK1* 3'UTR(*gga-miR-148a-5p*) WT3 阳性克隆测序结果

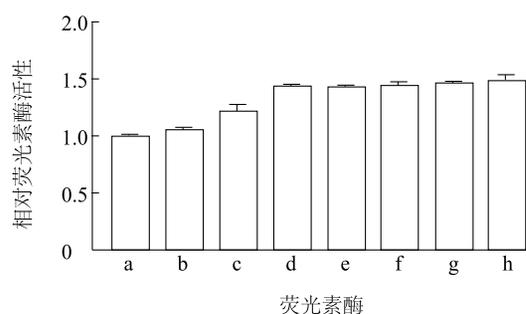
Fig.4 Positive clone sequencing results of PGL3-CMV-LUC-*gga-PDPK1* 3'UTR(*gga-miR-148a-5p*) WT3

3 讨论

截至目前,已经报道了 994 个与鸡有关的成熟 miRNA,但尚不清楚 miRNA 参与 ALV-J 诱导肿瘤发生的机制以及参与宿主抗 ALV-J 应答调节的具体 miRNA。ALV-J 在受感染的鸡中能引发肿瘤性疾病,从而导致其死亡,同时引起非肿瘤性疾病,即由免疫抑制引起的继发感染^[1],使得病鸡出现身体消瘦、耐受性病毒血症和免疫抑制等症^[13-14]。ALV-

J 影响了全球家禽业,它已在美国^[15]、中东^[16]、澳大利亚^[17]等地被发现,并造成了巨大的经济损失。

miRNA 作为重要的基因表达和蛋白质翻译过程中的调控因子,在肿瘤的发生发展中,miRNA 通过结合其靶基因 3'UTR 区域沉默其靶基因的功能,从而发挥其调控枢纽的作用^[18]。在本试验前期阶段,我们利用生物信息学技术,在 miRNA 靶基因预测网站(miRDB, TargetScan)发现,*PDPK1* 基因 3'UTR 的第 42、2 455、3 731、3 907、4 110 碱基序列



a: miR-148a-5p mimics+*PDPK1* WT1+TK; b: miR-148a-5p mimics+*PDPK1* WT2+TK; c: miR-148a-5p mimics+*PDPK1* WT3+TK; d: miR-148a-5p mimics+UTR NC+TK; e: miR NC+*PDPK1* WT1+TK; f: miR NC+*PDPK1* WT2+TK; g: miR NC+*PDPK1* WT3+TK; h: miR NC+UTR NC+TK. UTR NC: 构建 3'UTR 区域报告基因质粒的对照; TK: 海肾内参。

图5 各组荧光酶活性比较

Fig.5 Comparison of luciferase activities in each group

位置可能和 *gga-miR-148a-5p* 互补,所以据此推测, *PDPK1* 可能是在癌症发生、发展过程中 *gga-miR-148a-5p* 的一个潜在靶基因, *gga-miR-148a-5p* 调控 *PDPK1* 基因 mRNA 表达。所以为了进一步研究 *gga-miR-148a-5p* 和 *PDPK1* 之间的关系,本试验采用双荧光素酶报告基因检测系统,验证二者之间是否存在靶标关系。我们将含有 *gga-miR-148a-5p* 结合靶位点 3'UTR 的 *PDPK1* 基因目的片段克隆插入 PGL3-CMV-LUC-MCS 双荧光素酶报告载体中的 *Xho* I, *Mlu* I 的酶切位点,将构建成功的质粒经 *Xho* I, *Mlu* I 酶切,并经过测序后证明质粒构建成功。试验结果表明, *gga-miR-148a-5p* 能够显著抑制荧光素酶的表达, *gga-miR-148a-5p* 能够直接作用于 *PDPK1* 的 3'UTR 区并对其产生负性调控作用, *PDPK1* 是 *gga-miR-148a-5p* 的靶基因。

参考文献:

- [1] 郝春丽,胡梅,柴建亭. 禽白血病病毒特性的研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2010,1(1):20-21.
- [2] GAO Y L, QIN L T, WEI P, et al. Avian leukosis virus subgroup J in layer chickens, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2010,16(10):1637-1638.
- [3] CHENG Z Q, ZHANG L, LIU S D, et al. Emerging of avian leukosis virus subgroup J in a flock of Chinese local breed[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(4):584-587.
- [4] FADLY A M, SMITH E J. Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avian leukosis virus associated with myeloid leukemia in meat-type chickens in the United States[J]. Avian Diseases, 1999,43(3):391-400.

- [5] PAYNE L N, GILLESPIE A M, HOWES K. Recovery of acutely transforming viruses from myeloid leukemia induced by the HPRS-103 strain of avian leukosis virus [J]. Avian Diseases, 1993, 37(2):438-450.
- [6] ALESSIO R, JAMES S R, DOWNES CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α [J]. Current Biology, 1997,7(4):261-269.
- [7] YANG Z, WU Z, LIU T, et al. Upregulation of *PDPK1* associates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma with facilitating tumorigenicity in vitro [J]. Medical Oncology, 2014, 31(12):337.
- [8] ZABKIEWICZ J, PEARN L, HILLS R K, et al. The *PDPK1* master kinase is over-expressed in acute myeloid leukemia and promotes PKC-mediated survival of leukemic blasts [J]. Haematologica, 2014,99(5):858-864.
- [9] BAI X, LI P, XIE Y, et al. Overexpression of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 is associated with prognosis of gastric carcinoma [J]. Tumour Biology, 2016,37(2):2333-2339.
- [10] WU X Y, WANG J R, LIU F Q, et al. Correlation of *PDPK1* expression with clinicopathologic features and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Onco Targets and Therapy, 2016,9:5597-5602.
- [11] LANDGRAF P, RUSU M, SHERIDAN R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing [J]. Cell, 2007,129(7):1401-1414.
- [12] MANASTER I, GOLDMAN-WOHL D, GREENFIELD C, et al. miRNA-mediated control of HLA-G expression and function [J]. PLoS ONE, 2012,7(3):e33395.
- [13] FENG Y H, TSAO C J. Emerging role of microRNA-21 in cancer [J]. Biomedical Reports, 2016, 5(4):395-402.
- [14] JI J, LI H, ZHANG H, et al. Complete genome sequence of an avian leukosis virus isolate associated with hemangioma and myeloid leukemia in egg-type and meat-type chickens [J]. Journal of Virology, 2012, 86(19):10907-10908.
- [15] LI H, XUE C, JI J, et al. Complete genome sequence of a J subgroup avian leukosis virus isolated from local commercial broilers [J]. Journal of Virology, 2012, 86(21):11937-11938.
- [16] BAGUST T J. Avian leukosis virus-J in Australia: scenarios and options for control. In proceedings of the international symposium on ALV-J and other avian retroviruses, rausischolzhausen [J]. Germany, 2000,5(1):234-239.
- [17] BAGUST T J, FENTON S P, REDDY M R. Detection of subgroup J avian leukosis virus infection in Australian meat-type chickens [J]. Australian Veterinary Journal, 2010,82(11):701-706.
- [18] ZHANG B, PAN X, COBB G P, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Developmental Biology, 2007, 302(1):1-12.

(责任编辑:陈海霞)