

# 牦牛 *VEGFA* 双荧光素酶载体构建及与 miR-200b 的靶向验证

谢建鹏, 陈平, 王斐, 何振富

(甘肃省农业科学院畜牧与绿色农业研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 为探究微小RNA(miR-200b)与血管内皮生长因子A(*VEGFA*)基因之间的靶向关系, 采用 miRanda 和 Targetscan 软件预测牦牛 miR-200b 与 *VEGFA* 可能存在结合位点, 构建了 *VEGFA* 基因 3'UTR 区的野生型和突变型双荧光素酶载体。利用与目的 miRNA 靶种子序列相结合基因的突变序列, 构建该靶基因的突变型重组质粒(pGL3-promoter-mut *VEGFA*), 再进行重组质粒和目的 miRNA 的 miRNA mimic 的共转染实验。结果表明, 预测到的 miR-200b 与 *VEGFA* 基因的 3'UTR 区存在结合位点。PCR 进行扩增和测序之后, *VEGFA* 基因 3'UTR 区的野生型、突变型载体构建成功。共转染 *VEGFA* 野生型载体和 miR-200b mimic 的双荧光素酶活性极显著低于对照组 ( $P<0.05$ ), *VEGFA* 突变型载体和 miR-200b mimic 共转染的双荧光素酶活性与对照组无显著差异 ( $P>0.05$ )。说明 *VEGFA* 基因的 3'UTR 区能与 miR-200b 结合并抑制双荧光素酶活性, 验证了 *VEGFA* 是 miR-200b 的靶基因。

**关键词:** 牦牛; 载体构建; 双荧光素酶; *VEGFA* 基因; miR-200b

中图分类号: S823.8

文献标志码: A

文章编号: 2097-2172(2023)08-0745-05

doi:10.3969/j.issn.2097-2172.2023.08.012

## Construction of Yak *VEGFA* Double Luciferase Vectors and Their Targeting against miR-200b

XIE Jianpeng, CHEN Ping, WANG Fei, HE Zhenfu

(Institute of Animal Husbandry, Pasture and Green Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** In order to investigate the targeting relationship between miR-200b related to yak reproduction and vascular endothelial growth factor A (*VEGFA*) gene, miRanda and Targetscan were used to predict the possible binding site between miR-200b and *VEGFA* in yak. The wild-type and mutant dual-luciferase vectors of *VEGFA* 3'UTR region was constructed. The mutant plasmid pGL3-Promoter-mut *VEGFA* of the target gene was constructed by using the mutant sequence of the target gene and the target seed sequence of the target miRNA. Then the co-transfection experiment of the target miRNA mimic and the recombinant plasmid was carried out. The results showed that the predicted binding site between miR-200b and the 3'UTR region of *VEGFA* gene existed. After PCR amplification and sequencing, the results showed that the wild-type and mutant vectors of *VEGFA* 3'UTR region were successfully constructed. The double luciferase activity of co-transfected *VEGFA* wild-type vector and miR-200b mimic was significantly lower than that of the control group ( $P<0.01$ ), while the double luciferase activity of co-transfected *VEGFA* mutant vector and miR-200b mimic was not significantly different from that of the control group ( $P>0.05$ ). These results indicated that the 3'UTR region of *VEGFA* gene could bind to miR-200b and inhibit dual luciferase activity, which verified that *VEGFA* was a target gene of miR-200b.

**Key words:** Yak; Vector construction; Dual-luciferase; *VEGFA* gene; miR-200b

RNA 干扰(RNAi)其中包括 miRNA mimics(即运用化学合成的方法, 模拟生物体内源的 miRNA, 特异性增强内源性 miRNA 的功能)技术, 是小片

段 RNA 与目的基因 mRNA 的特定区域发生特异性结合, 进而使得靶 mRNA 的降解加剧, 从而出现失活现象, 这一技术已广泛运用于分子生物学研

收稿日期: 2022-10-09; 修订日期: 2023-06-20

基金项目: 甘肃省农业科学院科研条件建设及成果转化项目(2021GAAS51)。

作者简介: 谢建鹏(1990—), 男, 甘肃会宁人, 助理研究员, 博士, 研究方向为动物营养及繁殖。Email:18709480641@163.com。

作者简介: 何振富(1985—), 男, 甘肃会宁人, 副研究员, 硕士, 研究方向为动物营养及繁殖。Email:gshezhenfu.163.com。

究领域<sup>[1]</sup>。而现有方法包括 qRT-PCR、GFP 蛋白融合及 Western Bolt 等，在检测 RNA 干扰对相应靶基因调控的验证技术中，这些方法操作繁杂，并且对高通量选择的需要无法满足<sup>[2-3]</sup>。miRNA mimics 技术已有许多报道，如刘鸿艳等<sup>[4]</sup>通过双荧光素酶报告系统探究了猪 *E2F3* 基因 3'UTR 区与 miR-10a-5p 的靶向关系，表明猪 *E2F3* 基因与 miR-10a-5p 之间存在靶向关系；张凤等<sup>[5]</sup>鉴定了 miR-25 与肉牛 *DKK3* 3'UTR 区存在靶向关系。牦牛 (*Bos grunniens*) 主要分布在青藏高原及其毗邻高海拔地区，是当地牧民重要的生产和生活资料，但由于饲草料资源匮乏，严重制约着牦牛生产水平的提高。牦牛的生产水平与其繁殖力关系紧密，结合遗传学方法从遗传本质上提高牦牛的繁殖效率，可明显提高牦牛的生产水平。谢建鹏<sup>[6]</sup>的研究表明，在冷季补充混合饲料，通过提高牦牛的营养水平进而提高了其繁殖效率。通过高通量测序技术对牦牛的卵巢组织进行 Small RNA 测序，获取差异表达 miRNA，预测差异表达 miRNA 靶基因，并进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析，筛选牦牛通过营养水平与繁殖力相关的 miRNA。实时荧光定量 (qRT-PCR) 验证发现，miR-200b 表达显著下调，*VEGFA* 表达上调，这与 miRNA 调控靶基因的特点一致，提示 miRNA 可能通过靶向调控基因参与牦牛的繁殖过程。我们通过 miRanda 和 Targetscan 预测 *VEGFA* 和 miR-200b 的结合位点，随后构建双荧光素酶载体并进行了双荧光素酶报告基因实验，以验证 miR-200b 对 *VEGFA* 的靶向调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

TransStart FastPfu Fly DNA 聚合酶，购自天根生化科技有限公司；Trans2K Plus II DNA 标记，购自 TaKaRa 公司；限制性内切酶 (Kpn I; Bgl II; Xho I)，购自北京全式金生物有限公司；EasyPure 快速凝胶提取试剂盒，购自凯基生物有限公司；T4 DNA 连接酶，购自博士德生物有限公司；Trans1-T1 噬菌体抗性化学感受态细胞，购自北京全式金生物有限公司；TransCult™ LB 琼脂平板，购自天根生化科技有限公司；EasyPure Hipure Plasmid Maxi-Prep 试剂盒，购自北京全式金生物有限公司；

TransSerum EQ 胎牛血清，购自文渊阁生物技术有限公司；TransDetect 双荧光素酶报告基因检测试剂盒，购自北京全式金生物有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 miRNA 的靶基因预测 利用 Targetscan 和 miRanda 靶基因软件对 miR-200b 的靶基因进行预测。目标靶基因的选取通过取交集确定，再结合 KEGG 通路筛选，进而获得较为可信的靶位点。

1.2.2 靶序列野生型 pGL3-Promoter 载体构建 候选靶基因 cDNA 的序列通过 NCBI 网站查找，依据 miRNA 与其对应靶基因的结合位点位置进行常规合成，以含有结合位点的 *VEGFA* 基因 3'UTR 区构建野生型载体。将以上基因合成产物和 pGL3-Promoter 载体进行酶切和链接，图谱信息和原理见图 1。

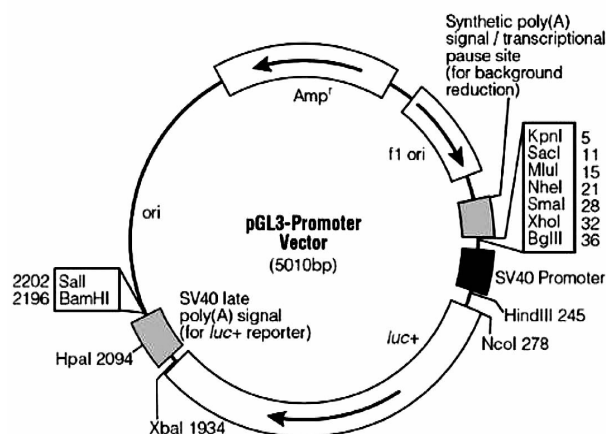


图 1 pGL3-Promoter 载体质粒图谱和多克隆位点信息

1.2.3 突变型 pGL3-Promoter 载体构建 在靶序列两端设计点突变引物，引物序列见表 1。利用 Fast Mutagenesis System 点突变试剂盒将预测的靶基因进行缺失。PCR 反应体系为 20 μL: 2 × Taq PCR Master Mix 10 μL，上下游引物各 1.0 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH<sub>2</sub>O 补至 20 μL。PCR 扩增反应程序为：95 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 30 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 60 s，共 31 个循环；72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。取 5 μL PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 点突变引物序列

基因	名称	引物序列 (5'-3')
mt <i>VEGFA</i>	F	CTTGGTTAATATTTAATTTCAACT
	R	AATTAAGAGTAGGGTTTTTTT

按 T4 DNA Ligase 说明书将线性化质粒用 T4 DNA 连接酶连接, 每个平板挑取 3 个单克隆测序。将冻存的 293T 细胞复苏, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行细胞培养。

1.2.4 双荧光素酶报告基因检测 按体积比 1:4 将 5 × Cell Lysis Buffer 同 ddH<sub>2</sub>O 混合后备用。将细胞培养基去除, 用 PBS 小心润洗, 润洗 2 次之后加入 100 μL 1 × Cell Lysis Buffer, 室温下充分裂解, 时间为 10 min。将细胞挂取到 1.5 mL 离心管中离心, 取上清备用。将 100 μL 平衡至室温的 Luciferase Reaction Reagent 加入试管中, 吸取 20 μL 细胞裂解物加至试管, 混匀, 于化学发光仪中检测, 观察萤火虫荧光素酶报告基因的活性。之后吸取 100 μL 平衡至室温的 Luciferase Reaction Reagent II, 加入上述反应管中, 在化学发光仪中检测, 观察海肾荧光素酶报告基因的活性。

2 结果与分析

2.1 bta-miR-200b 的靶基因预测

选择在前期试验已知差异表达的 miR-200b 为研究对象, 通过软件共同预测及分析查找, 获得较为可信的靶位点。VEGFA 基因为 miR-200b 的候选靶基因, 其结合位点如图 2 所示。

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P <sub>CT</sub>
Position 1312-1318 of VEGFA 3' UTR	5' ... GAGUAGGGUUUUUUCAGUAUUC ...	7mer-m8	-0.23	95	-0.19	4.184	0.62
bta-miR-200b	3' GUAGUAAUGGUCGUCUAUAU						

图 2 预测的 miR-200b 与 VEGFA 基因的结合位点

GGTACCTTGGAGACCCCTCCGTGCGCATCTTGCCCCCGCCAGGGGCACTGCCTGGAAGACTCAGGAGCCTGGGCAGCC  
<sup>5' KpnI</sup>  
TTCACCTCCTCACCCGCTTCCAAGATGCCAGGAGGCCACCGACATGTCTCAGCGAAGAGAAGAGACGTTGGTGGAGGAAG  
GGCCACCCCGGTGACAGCTGGTCTCCGAGGGAAGGGCCTCTGCCTTGGCCCTCTCCAGCTTCGCTCCCCGGGTGCAGCC  
CAGGAGGGCCCGATGTCTCAGACCATTGAAACCACTAGTTCTGTCCCTCCAGGAGACCTGGCTGTGTGTGTGTGAGTGGT  
TAACCCACCTCCGTCCCCAACCCACCTACCCACCCGACCCAACCTTCCCGCGGCGCAGAGAGACAGGGCAGGATCCC  
CGTGCCACCCCTGGAGGCAGAGAAAAGAGAAAGTGTTTTATATACGGTACTTATTTAATATCCCTTTTAAATTAGAAAATTAAC  
AGTTAATTTAATTAAGAGTAGGGTTTTTTT**CAGTATT**CTGGTTAATATTTAATTTCAACTATTTATGAGATGATTTCTTGCTC  
TCTCGCTCTCTGTGTTGTACTGGTCTTTGTGTAGAAAACCTGTTTCCAATCTCTCTCTGATCGGTGACAGTCACTAGC  
TTGTCCTGAACAGATATTTAATTTGCTAACACTCAACTCTGCCCTCCCCATCCCTGGCTCCCCACCACACATTCCTTTGAAA  
TAAGGTTTCAATATACATCTACATACTATATATATTTGGCAACTGTGTTTGTATATATATATATATATATATATATGTTTATGTATA  
TATGTGATTCTGATAAATAGACATTGCTATTCTGTTTTTATATGTAAAAACAAAACAAGAAAAAATAGAGAATTCTACATACT  
AAATCTCTCTCTTTTAAATTTAATATTTGTTATCATTTATTTATTGGTGTACTGTTTATCCATAATAATTGTGGGAAAAAG  
AGATCT  
<sup>BglI</sup>

(下划线为限制性内切酶; 加粗为结合位点)

图 3 合成 VEGFA 基因载体构建的序列

2.2 野生型 pGL3-Promoter 载体构建

常规合成含有结合位点的 VEGFA 基因 3'UTR 区, 进行野生型载体构建。靶基因 VEGFA 3'UTR 区在合成序列两端分别引入 5'(Kpn I)和 3'(BglII) 酶切位点, 将基因通过 5'KpnI、3'BglII 克隆至载体 pGL3-promoter (Ampicillin), 制备 maxi-scale (Endo-free) 重组质粒DNA和含有该重组质粒的穿刺菌。合成 VEGFA 基因载体构建的序列具体见图 3。合成 VEGFA 基因 3'UTR 区序列总长度为 1 011 个碱基, GC 含量为 48.17%(图 4)。

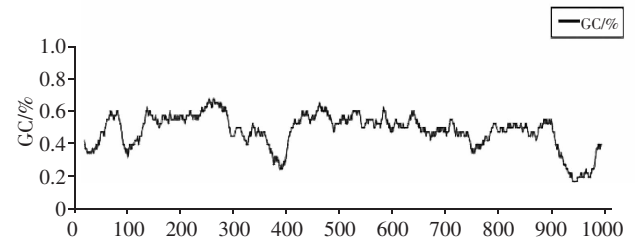
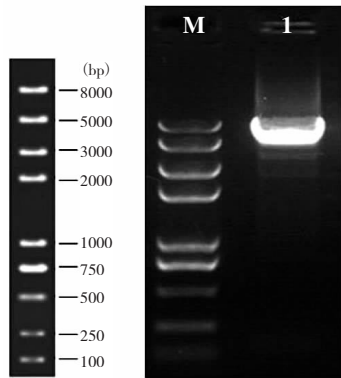


图 4 VEGFA 基因载体构建的序列 GC 含量

2.3 突变型 pGL3-Promoter 载体构建与鉴定

2.3.1 靶基因缺失 PCR 结果利用 Fast Mutagenesis System 点突变试剂盒将预测的靶基因进行缺失, 取 10 μL PCR 产物进行 1%TAE 琼脂糖凝胶电泳检测点突变扩增。结果显示, 缺失突变产物成功扩增,

且条带较亮，经 DMT 酶消化后可用于后续实验。靶基因缺失 PCR 结果见图 5。



[M 为 Trans2K Plus II DNA Marker (5 μL); Lane 1 为 mtVEGFA 质粒电泳结果(2 μL)]

图 5 靶基因缺失 PCR 结果

2.3.2 单克隆测序结果 每个平板挑取 3 个单克隆进行测序，测序结果如图 6 所示，结果表明，挑取的 6 个单克隆均成功缺失对应的靶基因。

### 2.4 不同靶序列与 miRNA 作用验证结果

利用 miR-200b mimics 与野生型重组载体 (pGL3-promoter-wtVEGFA)，对 293T 细胞进行共转染，对海肾荧光素酶的活性变化进行统计。利用与目的 miRNA 靶种子序列结合的基因的突变序列，构建该靶基因的突变型重组质粒 (pGL3-promoter-mutVEGFA)，进行重组质粒和目的 miRNA 的 miRNA mimic 的共转染实验，结果见图 7。miR-200b mimics 分别与 pGL3-promoter-wt/mut

VEGFA-3' UTR 共转染时，pGL3-promoter-wtVEGFA-3'UTR+miR-200b mimics 组荧光素酶活性显著低于 pGL3-promoter-wtVEGFA-3'UTR+mimic-sNC 组 ( $P < 0.01$ )，pGL3-promoter-mutVEGFA-3'UTR+ miR-200b mimics 组与对照组 pGL3-promoter-mutVEGFA-3'UTR+mimicsNC 荧光素酶活性无显著差异 ( $P > 0.05$ )；miR-200b mimics+pGL3-promoter 组与 mimicsNC+pGL3-promoter 组荧光素酶活性差异不显著 ( $P > 0.05$ )。表明 miR-200b 具有靶向结合 VEGFA 3'UTR 并调控其表达的功能。

### 3 讨论与结论

本试验前期在非繁殖季节探究了补饲对牦牛卵巢 miRNA 表达谱的影响，发现了 51 个差异表达的 miRNA，基于 qRT-PCR，对差异表达的 miR-200b 进行了预测并鉴定了其靶基因 VEGFA [7]。本试验通过双荧光素酶报告系统验证了 miR-200b 和靶基因 VEGFA 的靶向关系，从繁殖层面探索了 miRNA 和靶基因相互作用的关系。有研究表明，miR-200b 可以负向靶向 VEGFA。Liu 等 [8] 报道，在 3'-UTRs 中选择了种子序列保守的 mRNAs 用于肿瘤和正常肾脏间差异表达的 miR，并鉴定了表达与 miR 呈负相关的靶 mRNA，发现 miR-200 家族和 VEGF 之间存在明显的负相关。藏小晴等 [9] 研究了正常肝细胞和肝癌细胞 miR-200b-3p 与 VEGFA mRNA 的表达，双荧光素酶报告检测靶向关系，结果表明 miR-200b-3p 直接靶向负调控

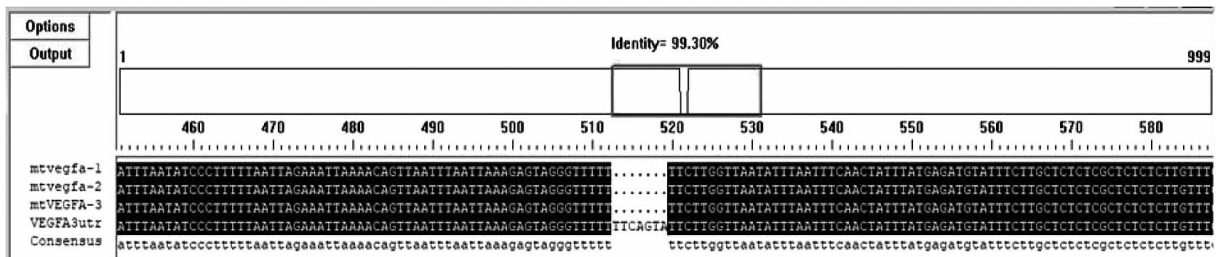


图 6 pGL3-promoter-mtVEGFA 测序结果

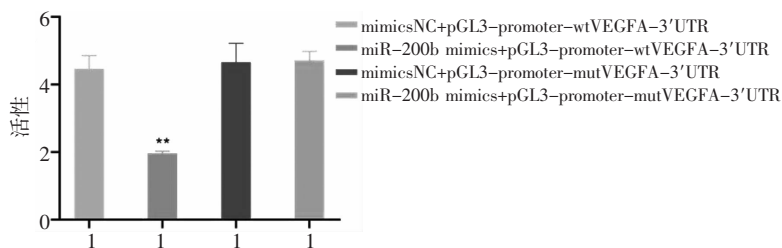


图 7 miR-200b 和 VEGFA 基因的靶向验证

*VEGFA*。以上研究揭示, miR-200b 靶向调控 *VEGFA* 与肿瘤相关, 通过查阅相关文献发现, *VEGFA* 对家畜繁殖也存在关联。

相关研究表明, *VEGF* 家族由 *VEGFA*、*PLGF*、*VEGFB*、*VEGFC*、*VEGFD*、*VEGFE* 等 6 个成员组成, 其中 *VEGFA* 对血管内皮细胞增殖和分化的影响最大。*VEGFs* 在早期卵泡发育过程中, 表达量相对较低, 随着卵泡不断地成熟, 它在颗粒层和膜层的含量将会显著增加<sup>[10]</sup>。在卵泡选择中, FSH 和随后 LH 诱导的颗粒细胞层内的 *VEGF* 产生增强了卵泡膜层内的血管生成, 进而增强黄卵黄的掺入促进了排卵前卵泡的快速生长<sup>[11]</sup>。由于卵泡发育的特殊性, *VEGF* 主要通过促血管生成作用从而促进卵泡中血管网的形成, 而血管网的形成为供应促性腺激素、生长因子、类固醇激素前体等营养物质提供了保证, 最终 *VEGF* 通过旁分泌与自分泌等形式周期性地促进卵巢中血管生长与形成, 调节卵巢的血流, 从而调节了卵泡的生长<sup>[12]</sup>。

本研究预测到的 miR-200b 与 *VEGFA* 基因的 3'UTR 区存在结合位点, miR-200b mimics 分别与 pGL3-promoter-wt/mut*VEGFA*-3'UTR 共转染 *VEGFA* 野生型载体和 miR-200b mimic 的双荧光素酶活性极显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), *VEGFA* 突变型载体和 miR-200b mimic 共转染的双荧光素酶活性与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。说明 *VEGFA* 基因的 3'UTR 区能与 miR-200b 结合并抑制双荧光素酶活性, 验证了 *VEGFA* 是 miR-200b 的靶基因。

#### 参考文献:

- [1] ZAMORE P D. RNA interference: listening to the sound of silence[J]. *Nature Structural Biology*, 2001, 8: 746-750.
- [2] BHATTACHARYA T K, SHUKLA R, CHATTERJEE R N, et al. Knock down of the myostatin gene by RNA interference increased body weight in chicken[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 241: 61-68.
- [3] INOUE, MASAYORI. The first demonstration of RNA interference to inhibit mRNA function[J]. *Gene*, 2016, 592(2): 332-333.
- [4] 刘鸿艳, 郑仰清, 徐 晶, 等. 猪 E2F3 基因 3'UTR 双荧光素酶报告基因质粒构建及其与 miR-10a-5p 的靶向验证[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(15): 28-32; 169.
- [5] 张 凤, 陈明新. 肉牛 DKK3 基因 3'UTR 双荧光素酶报告质粒构建及与 miR-25 的靶向验证[J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58(6): 135-140.
- [6] 谢建鹏. 冷季补饲后牦牛卵巢 miRNA 和血清差异蛋白的筛选与鉴定[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.
- [7] XIE J, KALWAR Q, YAN P, et al. Effect of concentrate supplementation on the expression profile of miRNA in the ovaries of yak during non-breeding season [J]. *Animals*, 2020, 10(9): 1640.
- [8] LIU H A R, BRANNON A R, REDDY, et al. Bhanot. Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma[J]. *BMC Syst Biol*, 2010, 4: 51.
- [9] 藏小晴, 张燊璐, 薛 乐. miR-200b-3p 靶向 *VEGFA* 并调节 PI3K/AKT 信号通路抑制肝癌 MHCC-97H 细胞的迁移、侵袭和上皮间质转化[J]. *医学分子生物学杂志*, 2020, 17(6): 8.
- [10] GINTHER O J, GASTAL E L, GASTAL M O, et al. In vivo effects of pregnancy-associated plasma protein-A, activin-A and vascular endothelial growth factor on other follicular-fluid factors during follicle deviation in mares[J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2005, 129: 489-496.
- [11] KNIGHT P G, GLISTER C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development[J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2006, 132: 191-206.
- [12] BALASCH J, GUIMERÁ M, MARTINEZ-PASARELL O, et al. Adrenomedullin and vascular endothelial growth factor production by follicular fluid macrophages and granulosa cells[J]. *Human reproduction (Oxford, England)*, 2004, 19: 808-814.