

文章编号:1003-2754(2021)04-0292-04

doi:10.19845/j.cnki.zfysjzbz.2021.0076

神经轴突运动蛋白 Kif1a 启动子基因 全长序列报告基因载体构建

姜 威¹, 任 晴², 赖关淑媛¹, 张 欢¹, 张 纓¹, 于 澎², 董 铭¹

摘要: 目的 克隆 Kif1a 启动子区基因全长序列,构建并鉴定 Kif1a 启动子全长序列荧光素酶报告基因载体 pGL3-Kif1a。方法 以含 Kif1a 启动子基因全长序列的基因片段(2565 bp)的重组 pGEM-T easy 载体为模板,用含有酶切位点的特异性引物扩增出 Kif1a 启动子基因全长序列 1853 bp,克隆至荧光素酶表达载体 pGL3-basic,构建含正确目的基因的表达载体 pGL3-Kif1a,行 SacI 和 XhoI 酶切、PCR 及测序鉴定;并以该质粒转染小鼠 SCG 细胞进行活性检测。结果 酶切、PCR 及序列测定表明,克隆获得的 1853 bp 与 GenBank DNA 序列数据库对比分析序列一致,插入方向正确;且 pGL3-Kif1a 启动子在小鼠 SCG 细胞中有明显转录活性。结论 成功构建了 Kif1a 启动子基因全长序列荧光素酶报告基因载体,为下一步研究 Kif1a 启动子的活性分析、基因表达调控机制及其信号转导通路等研究奠定了基础。

关键词: kif1a; 荧光素酶报告基因载体

中图分类号: R741 **文献标识码:** A

Construction of a reporter gene vector for the full-length sequence of axonal motor protein Kif1a promoter gene

JIANG Wei, REN Qing, LAI Guanshuyuan, et al. (Department of Neurology and Neuroscience Center, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: **Objective** To clone full length of Kif1a gene promoter, and to construct and identify Kif1a gene promoter pGL3-Kif1a vectors. **Methods** Recombinant of pGEM-T easy vector (2565 bp) including Kif1a gene promoter full sequence was used as a template in the polymerase chain reaction (PCR) to amplify its promoter sequence (1853 bp). The PCR product was directly cloned into the luciferase reporter vector pGL3-Basic. Then the products were identified by DNA sequencing, nest PCR and restriction enzyme digestion. Then it was transfected into SCG cells, and the luciferase activity of the cells was analyzed after transfection. **Results** Restriction enzyme digestion and DNA sequencing confirmed that the sequenced segment (1853 bp) in the recombinant was identical to that in GenBank and the segment was inserted in right direction. The activity of pGL3-Kif1a was significantly higher than that in pGL3-basic vectors. **Conclusion** The luciferase expression vector-pGL3-Kif1a containing Kif1a gene promoter full length sequence is constructed successfully. The construction of pGL3-Kif1a recombinant plasmid lay a foundation of the analysis of promoter activities, gene expression regulatory mechanism and signal transduction of Kif1a.

Key words: kif1a; Luciferase expression vector

驱动蛋白(kinesin)是目前已知最小的分子马达,它能够通过催化作用将三磷酸腺苷(ATP)分子携带的化学能高效地转化为机械能,产生沿微管的连续前进动作,从而完成其携带的细胞器和细胞内物质的运输^[1]。驱动蛋白包括一个巨大的马达蛋白超家族(KIF superfamily)。KIF1A 属于 kinesin-3 家族,在体内常态以单体形式存在,是一种沿微管正向运动的驱动蛋白马达。与常见的双头驱动蛋白马达相比 KIF1A 有高度的前进性,实验研究表明:它能以约 1.5 $\mu\text{m}/\text{s}$ 的速度在不脱离微管表面的前提下连续前进约 700 步,这是普通驱动蛋白在微管表面运动步数的 5~6 倍。KIF1A 最早发现于神经

轴突膜泡运输的研究中,基于轴突免疫细胞化学方法的研究表明,快速运动的 KIF1A 主要负责神经系统里轴突上突触囊泡前体的快速运输,并且它介导

收稿日期:2021-02-10;修订日期:2021-03-30

基金项目:国家自然科学基金(31872772);吉林省自然科学基金(省联合基金白求恩医学专项 20200201606JC);吉林省卫生计生委科研计划(3D510P503428);2019 年度吉林大学第一医院科技成果转化基金项目(JDYZZH-1902039);吉林省卫健委科技能力提升项目(2016J049)

作者单位:(1. 吉林大学第一医院神经内科和神经科学中心,吉林 长春 130021;2. 吉林大学第二医院眼科中心眼底病科,吉林 长春 130041)

通讯作者:董 铭, E-mail: dongge@jlu.edu.cn; 于 澎, E-mail: ypeng@jlu.edu.cn

的轴突运输对神经的成长、存活和功能发挥有重要的作用^[2]。机体内 KIF1A 的变异将引起学习记忆功能减弱、癌症、常染色体遗传性痉挛性截瘫、感觉神经元病变等多种神经功能有关的疾病^[3],而研究这些病理和开发相关药物与 KIF1A 的运动机制有密切的关系。因此,关于 KIF1A 的研究已成为生命科学、物理学、生物化学等诸多学科关注的焦点问题之一。本研究旨在构建 KIF1A 启动子基因全长序列荧光素酶报告基因载体,为下一步研究 KIF1A 基因表达调控机制及其信号转导通路等研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 DH5 α 由本校基础部保存。pGL3 系列荧光素酶基因的表达载体,购自美国 promega 公司。pGEM-T easy 载体、T4 DNA 连接酶、TaKaRa Prime STARTTM HS DNA Polymerase、各种限制性内切酶、电泳所用 DL 2000 marker 均购自 TaKaRa 公司。质粒提取、纯化试剂盒 E. Z. N. A. TM Plasmid Miniprep Kit I (50 preps)-Q Spin Column Format、以及 PCR 片断回收及纯化试剂盒 E. Z. N. A. TM Gel Extraction Kit (50 preps)-Q Spin Column Format 和 E. Z. N. A. TM Cycle Pure Kit (50 preps)-Q Spin Column Format 试剂盒购自美国 Omega 公司。Dotap 转染试剂购自瑞士 Roche 公司。凝胶成像分析系统 Gel Doc2000 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 报道的 kif1a 基因的启动子区 1853 bp DNA 序列(GenBank: NC_000002.12 (240713767.240821403, complement) 设计引物。用 Gene tool 软件设计一对特异性引物,5'端和 3'端分别引入 SacI 和 XhoI 酶切位点。上游引物为 F1:5'GCCGACATCTTCTG CCAGTTCA 3';下游引物为 R2:5'GAAGGACTTGGTCACCTCCACT 3'。由吉林省库美生物科技有限公司合成。

1.2.2 SCG 细胞的培养 仔鼠出生前日,铺胶。用 0.2% PEI 覆盖培养皿底物,4 °C 冰箱过夜。Matrigel 放冰上置于 4 °C 冰箱内,使均匀受冷解冻,避免生成沉淀。仔鼠出生当天,将仔鼠头部倒置固定于解剖台上,镜下沿颈总动脉向头部方向仔细分离,直至发现纺锤样 SCG,小心取出 SCG,放入置于冰盒上的 35 mm dish 中(内含 L-15 液),将 SCG 用吸管吸入 15 ml 试管,加 1X Trypsin 及 Collagenase IV 各约 1 ml,37 °C 振荡 3 ~ 4 h,吸走培养皿中 0.2% PEI,DDW 洗 3 遍,加入 Matrigel,室温放置半小时方可使用。打碎 SCG,镜检至成单细胞状态。加等量中和液,900 转离心 1 min,弃上清,加培养液,悬浮细胞并计数,调整浓度至 10⁴ 个/ml,吸走 Matrigel,加入

100 μ l SCG 细胞/培养皿,37 °C 1 h 等待细胞附壁,补充培养液至 1 ml 左右,37 °C CO₂ 孵箱培养。

1.2.3 kif1a 基因启动子模板的制备 本实验室前期已从人神经细胞基因组 DNA 中,应用 PCR 技术,克隆出包含 kif1a 启动子基因全长序列的基因片段(2565 bp)(GenBank: NC_000002.12, 240821403-240818837),DNA 测序证实序列正确,并成功构建重组 pGEM-T easy 载体。用无菌接种环蘸取冻存 kif1a 重组 pGEM-T easy 载体质粒菌株,氨苄青霉素 LB 琼脂培养平板(浓度为 50 g/ml)划线,在 37 °C 孵箱中培养过夜,直到菌落长出。用无菌牙签或吸头挑取单个菌落于 5 ml 含氨苄青霉素抗生素 LB 培养基(浓度为 50 μ g/ml),200 ~ 220 r/min,37 °C 过夜。质粒抽提(参照 EZNA 质粒抽提试剂盒说明书进行)。以重组 pGEM-T easy 载体质粒为模板,进行目的基因的扩增。

1.2.4 目的基因的扩增 以含有 kif1a 启动子基因全长序列的重组 pGEM-T easy 载体模板,以 F1、R2 为引物,反应体系为 50 μ l,进行 PCR 扩增 kif1a 基因启动子的 DNA 片断。反应条件:98 °C 2 min;98 °C 10 s;66 °C 15 s;72 °C 1 min 30 s,反应共 30 个循环,72 °C 延伸 8 min,取 5 μ l PCR 产物在含溴化乙锭的琼脂糖凝胶(10 g/L)中进行电泳,在紫外灯下观察结果并用凝胶成像分析系统成像。将 PCR 产物用低熔点的琼脂糖凝胶(10 g/L)电泳分离后,用 EZNA TM Gel Extraction Kit(50 preps)-Q Spin Column 试剂盒回收并纯化。

1.2.5 荧光素酶报告基因载体的构建 感受态大肠杆菌 DH5 α 的制备及连接产物的转化,均按常规方法进行。将纯化的 PCR 产物及 pGL3-basic 荧光素酶基因表达载体,分别用 SacI 和 XhoI 进行双酶切(6 h),并经低熔点琼脂糖凝胶(10 g/L)电泳分离双酶切产物后,用 EZNA TM Cycle Pure Kit(50 preps)-Q Spin Column Format 试剂盒回收并纯化。将经双酶切并回收的 PCR 产物和 pGL3-basic 荧光素酶基因表达载体,用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 下连接 12 h,将 kif1a 基因的启动子定向插入 pGL3-basic 荧光素酶基因表达载体中,即构建成 pGL3-kif1a 表达载体。以连接产物按常规方法转化感受态的大肠杆菌 DH5,然后涂布于含有 IPTG(200 g/L)、X-gal(20 g/L)、氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 琼脂平板上,于 37 °C 培养 14 h。

1.2.6 荧光素酶报告基因载体的酶切、测序鉴定 随机挑取白色菌落,提取质粒后用 SacI 和 XhoI 进行双酶切,以重组质粒 pGL3-kif1a 为模板,应用上游引物 F1 和下游引物 R2,进行 PCR 扩增,并进行 DNA 序列分析(吉林省库美生物科技有限公司完成)。

1.2.7 荧光素酶报告基因载体转染 脂质体法转染 SCG 细胞,将 SCG 细胞培养至贴壁面积占瓶底面积 60% ~ 80% 时,以每孔 2×10^5 个细胞移入 6 孔板内,在 37 °C、5 % CO₂ 培养箱内,以无血清培养基孵育 24 h。接种 3 个孔,分别转染 3 种质粒,即 pGL3-basic(阴性对照)、pGL3- kif1a(重组质粒)及 pGL3-promoter(阳性对照,含 SV40 启动子)。每种质粒的用量均为 2.5 μg/孔,PRL 为 0.05 μg/孔(作为内对照),分别与 15 μl 脂质体混合后进行转染,详细操作见试剂盒说明书。在相同条件下重复 3 次转染实验。

1.2.8 荧光素酶报告基因活性的检测 冰浴条件下,足够的冷 PBS 轻轻漂洗,至少洗 4 次,倾斜 6 孔板放置 20 min,彻底祛除培养基,加 1 × PLB 裂解液 500 μl,摇床冰浴摇 15 min,将裂解液转移到 EP 管,离心后取上清,立刻检测;100 μl LARII 于 96 孔板;加入 20 μl 细胞裂解液,与 LARII 混匀放入仪器中读数;记录 Firefly luc. 数值,时间 15 s;取出检测管,加 100 μl Stop/Glo 试剂,涡旋混匀后放入仪器,读数,并记录 Renilla luc. 数值,时间 15 s。

1.3 统计学分析 所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 *t* 检验行两组间的差异性分析。采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析,*P* < 0.05 为有显著意义。

2 结果

2.1 kif1a 基因的启动子全长序列的 PCR 扩增

用 Gene tool 软件设计一对特异性引物,5' 端和 3' 端分别引入 SacI 和 XhoI 酶切位点,显示了酶切位点在载体上的连接位置与方向(见图 1)。从本实验室前期构建的包含 kif1a 启动子基因全长序列的基因片段重组 T 载体质粒中选择性扩增 kif1a 启动子,取 PCR 产物 P 进行琼脂糖凝胶电泳。结果显示,在 1853 bp 左右处见一特异性条带(见图 2),证明扩增成功。

2.2 荧光素酶报告基因载体酶切及 PCR 鉴定

重组质粒 pGL3-kif1a 经 SacI 和 XhoI 双酶切后,进行电泳分离,出现大小约为 1853 bp 的条带(见图 3)。以重组质粒 pGL3-kif1a 为模板,用 F1、R2 作为引物进行 PCR 扩增。取 PCR 产物进行电泳分离,出现大小约为 1853 bp 的条带。证明 pGL3-kif1a 启动子报告基因载体构建成功。

2.3 荧光素酶报告基因载体序列分析

对插入 pGL3-basic 载体的 pGL3- kif1a 的 PCR 产物进行序列分析表明,kif1a 基因启动子的序列与 GenBank 中 kif1a 基因的启动子的序列相一致。

2.4 荧光素酶报告基因载体的活性检测

重组质粒 pGL3-kif1a 转染 SCG 细胞后,产生的荧光素酶活性同阴性对照 pGL3-basic 质粒转染后产生的荧

光素酶活性相比较,有显著的启动子活性;但同阳性对照(pGL3-promoter)质粒转染后产生的荧光素酶活性相比较,pGL3-kif1a 启动子活性明显低于 pGL3-promoter(见图 4)。

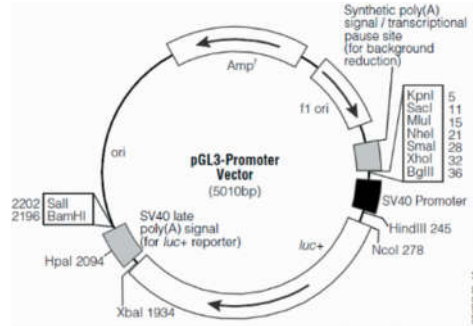


图 1 pGL3-Promoter 荧光素酶报告载体限制性内切酶切位点

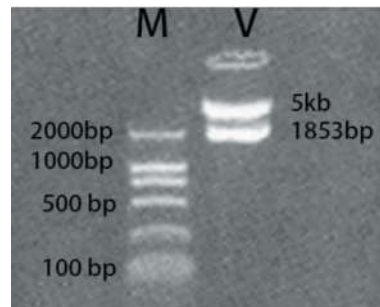


图 2 pGL3-kif1a 启动子序列 双酶切 1853 bp 和 5 kb 片段。M: DNA Marker DL2000

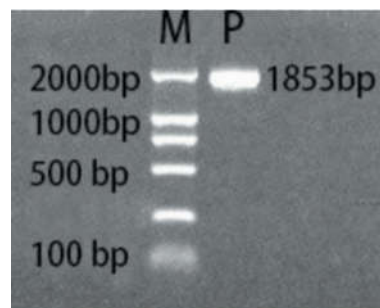


图 3 重组质粒 pGL3-kif1a 为模板 PCR 扩增结果。P:PCR 扩增产物;M:DNA Marker DL2000

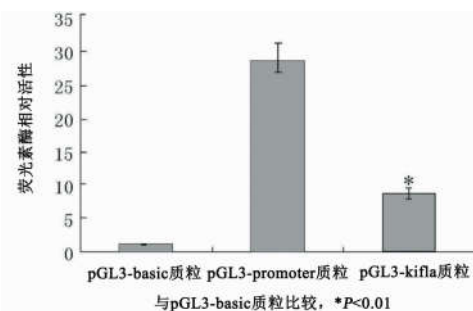


图 4 pGL3-kif1a 启动子在 SCG 细胞中启动活性

3 讨论

KIF1A 主要参与轴突上分泌囊泡前体沿微管的正向运输,它的变异可能导致多种神经病变和发育的缺陷,例如阿尔茨海默病、帕金森病、遗传性感觉和自主神经病变 II 型 (hereditary sensory and autonomic neuropathy type II, HSANII)、常染色体隐性遗传性痉挛性截瘫 (SPG30) 亚型以及和感觉神经功能相关等^[3-5],近年来,人们已对 kif1a 及其配体的结构和功能进行了深入的研究,但对其转录调控表达机制的研究甚少。关于它在成年动物体内的功能至今仍不完全清楚。为了能对其转录调控表达机制进行深入研究,我们构建了 kif1a 启动子基因全长序列荧光素酶报告基因载体。基因报告系统已广泛应用于研究真核细胞基因的表达和调控,利用报告系统研究 kif1a 启动子的调控作用可以最大限度地避免下游基因表达产物对启动子的反馈干扰,能真实地反映外周因素对调控序列的影响。pGL3-basic 是一个能表达荧光素酶蛋白的质粒,是研究启动子调控的常用载体^[6],其敏感性高且易于表达,与 CAT 报告基因相比更加适合对基因瞬时表达的研究,从而使其成为研究可诱导系统一种理想的报道分子。KIF1A 的突变可能抑制脑神经干细胞的增殖,并且阻断脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 介导的神经元迁移。同时,研究表明 KIF1A 与学习、记忆等高级脑功能的调节有关,基于 KIF1A 的轴突运输能够调节脑的高级功能并反映大脑活动的变化。研究人员在处于富集环境的活体小鼠的海马体和体外海马神经元里,观测到了 BDNF 增量调节 KIF1A 和 KIF1A 物质运输的现象,通过分析发现缺少 KIF1A 的增量调节将损害富集作用促使的海马体突触发生和学习增强,另外发现高表达的 KIF1A 通过形成突触前终扣促进突触发生。这些发现表明 KIF1A 对于在富集环境诱导下 BDNF 介导的海马体突触发生和学习增强是必不可少的。由于富集环境对大脑的结构和功能有多种影响,所以 KIF1A 作为一个潜在的改善脑疾病的治疗目标将有重要的研究价值^[7]。

此外,KIF1A 是老化相关的神经回路功能障碍和胰岛素信号转导调节记忆的一个关键调节器。研究发现当 KIF1A 功能表达降低时,机体神经回路功能障碍将随年龄增加而加速恶化,相反在 KIF1A 功能表达上调时,机体的神经回路功能得到了极大的改善并且寿命也有所延长。同时,针对与记忆和学习相关的测试,KIF1A 功能表达上调的实验动物的表现要好于未上调动物的表现。另外,研究还发现在 KIF1A 对胰岛素信号通路下调起到必要的保护作用。这些发现使得当以维持机体健康为目的时,

与 KIF1A 有关的轴突运输已成为药物干预的一个潜在目标^[8]。令人惊异的是 KIF1A 还与一些癌症有关。与它在神经传输中的功能一致,KIF1A 可能是检测神经母细胞瘤的一项指标,而且它也是鼻咽癌的一个潜在肿瘤抑制物,此外其启动子区域的甲基化是肺癌的一项指标^[9,10]。考虑到 KIF1A 在生命过程和一些疾病中的重要作用,研发基于 KIF1A 的药物和治疗方案也是科研工作者的一个重要选项,而这一切必须以阐明 KIF1A 的运动机制为出发点,这也是目前研究的热点问题之一。

因此我们应用 PCR 技术从人基因组 DNA 克隆出包含 kif1a 启动子序列的基因片段,构建过度 T 载体,再以 T 载体为模板构建 kif1a 基因全长序列报告基因载体 pGL3-kif1a,并转染人 SCG 细胞,结果表明,pGL3-kif1a 启动子在人 SCG 细胞中具有明显的转录活性。总之,kif1a 荧光素酶报告基因载体 pGL3-kif1a 的成功构建,为体外研究 kif1a 启动子转录调节提供了新的手段。为下一步我们将研究该基因核心启动子区、启动子区重要的顺式调控元件和相关的反式作用因子以及该基因对于诱导信号的应答机制奠定基础。

[参考文献]

- [1] Vale RD. The Molecular motor toolbox for intracellular transport [J]. Cell, 2003, 112 (4) : 467-480.
- [2] Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, et al. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10 (10) : 682-696.
- [3] Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease [J]. Neuron, 2010, 68 (4) : 610-638.
- [4] Ylikallio E, Kim D, Isohanni P, et al. Dominant transmission of de novo KIF1A motor domain variant underlying pure spastic paraplegia [J]. European Journal of Human Genetics, 2015, 23 (10) : 1427-1430.
- [5] Tanaka Y, Niwa S, Dong M, et al. The molecular motor KIF1A transports the TrkA neurotrophin receptor and is essential for sensory neuron survival and function [J]. Neuron, 2016, 90 (6) : 1215-1229.
- [6] Eyek P, Sabine B, Ulrich L, et al. Molecular cloning of a functional promoter of the human plakoglobin gene [J]. Eur J Endocrinol, 2001, 145: 625-633.
- [7] Caraballona A, Hu DJ, Vallee RB. KIF1A inhibition immortalizes brain stem cells but blocks BDNF-mediated neuronal migration [J]. Nature Neuroscience, 2016, 19 (2) : 253-262.
- [8] Hirokawa N, Tanaka Y. Kinesin superfamily proteins (KIFs): various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases [J]. Experimental Cell Research, 2015, 334 (1) : 16-25.
- [9] Li LB, Lei H, Arey R, et al. The neuronal kinesin UNC-104/ KIF1A is a key regulator of synaptic aging and insulin signaling regulated memory [J]. Current Biology, 2016, 26 (5) : 605-615.
- [10] Rath O, Kozielski F. Kinesins and cancer [J]. Nature Reviews Cancer, 2012, 12 (8) : 527-539.