

· 短篇论著 ·

SLC2A9 基因 rs13137074 位点双荧光素酶报告系统的构建及其对基因活性的影响*

陈邬锦¹, 玛依娜·卡哈尔², 田婷婷², 李 瑞³, 梁美婷^{2,4}, 贺 怡^{2,4},崔月娜², 刘业洲², 白 冰², 孙玉萍^{2△}

新疆医科大学基础医学院: 1. 形态中心; 2. 微生物教研室; 3. 人体寄生虫学教研室,

新疆乌鲁木齐 830011; 4. 新疆第二医学院, 新疆克拉玛依 834000

摘要:目的 构建该实验室定点突变联合双荧光素酶报告系统,并通过该系统了解 rs13137074 基因位点突变对葡萄糖易化转运蛋白-9(SLC2A9)基因转录活性的影响。方法 采用定点突变法对 rs13137074 基因位点进行点突变,并通过双酶切的方式连接构建双荧光素酶报告系统质粒。随后通过细胞转染及荧光素酶检测等方法确定突变位点对 SLC2A9 基因转录活性的影响程度。结果 rs13137074 基因位点突变成功;质粒转染过程中 Lipofectamine 3000 终水平为 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$,转染时间为 48 h 时效果最佳;rs13137074 位点发生突变时可导致 SLC2A9 基因转录活性下降 23.60%。结论 人群血尿酸水平可能受 SLC2A9 基因调控区 rs13137074 位点单核苷酸多态性的影响。

关键词:葡萄糖易化转运蛋白-9 基因; rs13137074 位点; 双荧光素酶报告系统; 载体构建

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.13.025

中图法分类号:R446.9

文章编号:1673-4130(2022)13-1658-03

文献标志码:A

高尿酸血症(HUA)可导致痛风,与慢性炎症及衰老的机制存在关联^[1]。人体每天约 2/3 的尿酸经肾脏排出,肾脏中参与尿酸排泄的转运体可大致分为尿酸再吸收转运体和排泄转运体 2 类^[2-3]。葡萄糖易化转运蛋白-9(SLC2A9)属于尿酸再吸收转运体位于肾小管上皮细胞基侧,参与尿酸盐的体内转运和排出^[4]。对 SLC2A9 基因调控区域的功能研究可阐释 HUA 的发病机制^[5]。本课题组前期对 SLC2A9 基因单核苷酸多态性(SNP)的测序发现 rs13137074 位点的多态性与尿酸代谢存在关联^[6]。有研究指出该位点的基因多态性可能与机体尿酸代谢紊乱相关^[7],但并未具体阐明 rs13137074 位点突变是否与 SLC2A9 基因的转录存在关联。因此,本研究通过定点突变技术联合双荧光素酶报告系统观察 rs13137074 位点对 SLC2A9 基因转录的影响,为进一步了解 HUA 的发病机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人胚胎肾细胞 293T 细胞株购自青旗(上海)生物技术发展有限公司。质粒提取试剂盒 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司, pGL3-Basic 质粒、pGL3-Control 质粒、pGL3-rs13137074-A 重组质粒、pRL-TK 内参质粒及 pAcGFP1-C1 质粒均购自通用生物系统(安徽)有限公司, Kpn I、Xho I 限制性内切

酶购自美国 BioLabs 公司, T4 DNA Ligase 购自 Takara(大连)生物技术有限公司, Lipofectamine 3000 购自 Thermo Fisher 公司,引物、DNA 片段合成及胶回收试剂盒等购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 双荧光素酶报告基因质粒构建

1.2.2 SLC2A9 基因 rs13137074 位点野生型及突变质粒构建 (1)基因位点合成:将 Kpn I 及 Xho I 酶切位点分别合成至 rs13137074 位点的野生型和突变型上、下游,备用。(2)质粒连接:将空载质粒 pGL3-Basic 900 ng 加入由 CutSmart 5 μL 、Kpn I 及 Xho I 酶各 1 μL 、ddH₂O 42 μL 共同组成的酶切体系中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,再 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,取出后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜保存。取上述合成片段 3 μL 、开链 pGL3-Basic 质粒 1 μL 加入由 10 \times ligation 2 μL 、T4 DNA Ligase 1 μL 及 ddH₂O 3 μL 组成的连接体系中 4 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。(3)质粒转导:取连接好的质粒 2 μL 与 50 μL DH5 α 感受态细胞混悬液混合后冰上静置 15 min。将上述混合物全部加入电击杯中,于 25 μF 、200 Ω 、2 500 U、2 mm 条件下电击,取出后迅速加入 500 μL LB 培养液置摇床 160 r/min 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。取出培养液将其涂布于含有氨苄西林(AMP)的平板中 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81960169);新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2019D01C219、2021D01C275、XJEDU2021Y054);新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题(2020D04024)。

△ 通信作者, E-mail:544481723@qq.com。

养,挑取单个菌落液体扩增备用。(4)无内毒素质粒提取:取上述培养液 5 mL,以 3 000 r/min 离心 10 min 弃上清液,加入 1 mL Bacterial Endotoxin Erasol 颠倒混匀 4~6 次 12 000 r/min 离心 1 min 弃上清液,重复清洗 2 次后用参照质粒抽提试剂盒进行质粒抽提。(5)质粒鉴定:将抽提质粒参照(2)酶切鉴定成功后送测序,并与参比序列比对完全一致后备用。

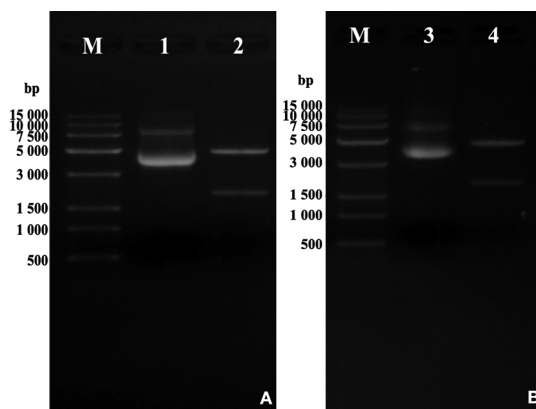
1.2.3 双荧光素酶报告基因检测转录活性检测^[8]

(1)细胞复苏与传代:将人胚胎肾细胞(293T)从液氮中取出后遵循“慢冻快融”原理进行复苏和冻存,传代标准为细胞贴壁融合达 90% 时。细胞培养液为 DMEM 完全培养基(含双抗及 10% 胎牛血清)。培养特殊要求为饱和湿度。(2)质粒转染条件摸索:将含有 DMEM 培养基 50 μ L, 1 μ L 水平为 1~5 μ g/ μ L 的哺乳动物表达载体(pAcGFP1-C1)质粒, 2 μ L P3000TM 转染体系中加入 0. 375、0. 750 μ L Lipofectamine 3000 试剂并各自设立 24 h 组及 48 h 组,共 4 组每组 3 个平行样品,混匀后室温静置 15 min 备用。将上述混合液全部转移至贴壁生长好的 293T 细胞培养板中置细胞培养箱中分别按照 24 h 和 48 h 继续培养。(3)实验分组:共设阳性对照组(pGL3-Control 质粒)、阴性对照组(空载 pGL3-Basic 质粒)、SLC2A9 基因 rs13137074 位点野生型组(pGL3-SLC2A9-WT 质粒)和 SLC2A9 基因 rs13137074 位点突变型组(pGL3-rs13137074-A 质粒)4 组,每组 3 个平行样进行检测。每组按照均 20:1 的比例加入目标质粒及 pRL-TK 内参质粒。(4)双荧光素酶活性检测:按照(2)所得最佳培养时间取出转染细胞,平衡至室温后取 150 μ L 细胞加入装有 150 μ L 已制备的 Dual-Glo Luciferase 试剂的 EP 管中室温静置 30 min。待细胞充分裂解后吹打混匀后避光条件下取 75 μ L 加入黑色 96 孔板中,静置 30 min 后检测萤火虫荧光素酶荧光值。随后向每孔添加已制备的 Dual-Glo Stop& Glo 试剂 75 μ L 静置 30 min 后检测海肾荧光素酶的荧光值。荧光素酶活性=海肾荧光素酶荧光值/萤火虫荧光素酶的荧光值。

1.3 统计学处理 本研究所得数据选用 SPSS23.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 双酶切鉴定结果 将野生型质粒 pGL3-SLC2A9-WT 与突变型质粒 pGL3-rs13137074-A 经双酶切后电泳显示目标片段连接成功,均出现了 2 条明显的条带见图 1。



注:A 为野生型质粒酶切电泳图;B 为突变型质粒酶切电泳图;M 为分子标准带;1 为双酶切前野生型质粒;2 为双酶切后野生型质粒;3 为双酶切前突变型质粒;4 为双酶切后突变型质粒。

图 1 目标质粒双酶切鉴定电泳图

2.2 质粒测序结果 野生型质粒 pGL3-SLC2A9-WT 测序结果经分析与参比序列完全一致,见图 2。

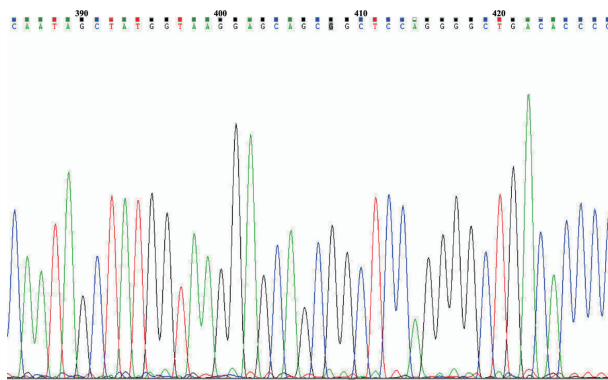


图 2 pGL3-SLC2A9-WT 部分测序峰图

2.3 质粒转染条件摸索 经检测转染试剂 Lipofectamine 3000 在 0. 75 μ L/孔(24 孔板)效果最好,即每 1mL 培养液中需加入 1. 5 μ L Lipofectamine 3000 试剂,最佳转染时间为 48 h。

2.4 SLC2A9 基因 rs13137074 位点对转录活性影响检测结果 经双荧光素酶检测可得转染 rs13137074 位点突变型报告载体,与野生型载体相比,其荧光素酶活性显著下调了 23. 60%,见表 1。

表 1 双荧光素酶检测 SLC2A9 基因 rs13137074 位点对转录活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	荧光素酶活性
pGL3-Basic 组	1. 416 \pm 0. 103
pGL3-Control 组	38. 704 \pm 3. 490 *
pGL3-SLC2A9-WT 组	6. 518 \pm 0. 454 * #
pGL3-rs13137074-A 组	4. 980 \pm 0. 338 * # Δ

注:与 pGL3-basic 组比较,* $P < 0.05$;与 pGL3-Control 组比较,# $P < 0.05$;与 pGL3-SLC2A9-WT 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨 论

尿酸是嘌呤代谢的终产物,在体内主要以尿酸盐

的形成存在于血清中,作为一种氧自由基的清除剂,参与机体多种细胞的抗氧化、抗衰老及代谢过程^[9]。体内过高浓度的尿酸会引起高尿酸血症、慢性肾病及痛风等疾病;而过低浓度的尿酸则会引起人体出现多种炎症及与诱发抗氧化能力下降相关疾病,如阿尔茨海默症、帕金森及多发性硬化症等^[10]。人体尿酸平衡的维持主要依赖于肾脏对尿酸盐的重吸收和排泄,SLC2A9 作为肾脏尿酸盐排泄途径中重要转运体之一^[11],该基因的突变与肾脏引起的 HUA 存在显著关联^[12]。SLC2A9 基因除了在肾脏表达外还可表达于肝脏、胎盘和胰腺等多种细胞和器官中,同时也是癌症抑制因子 P53 的直接靶基因,可有助于抗氧化防御作用^[13],目前报道的该基因的调控相关蛋白只有核受体家族成员(HNF)4 α 及 PDZ 结构域 1(PDZK1)^[14]。但其他与 SLC2A9 调控相关的基因尚未被深入研究,多项研究指出 SLC2A9 的多个位点 SNP 与血清尿酸水平存在关联,但大多位于内含子非编码区,且这些位点改变血尿酸水平的分子机制尚不清楚^[15-16]。本课题前期在对本地区居民 SLC2A9 基因功能区突变与 HUA 的关联研究中发现多个 SNP 与尿酸代谢异常存在关联,但未涉及 rs13137074 位点 SLC2A9 基因转录活性的探索^[6]。本研究定点突变 rs13137074 位点并通过双荧光素酶检测,发现该位点发生突变使得 SLC2A9 基因转录活性下调了 23.60%。说明 rs13137074 位点位于 SLC2A9 基因转录的调控区,该基因的突变与 SLC2A9 基因转录存在明显关联。本研究的开展进一步证实了 rs13137074 位点 SNP 可影响 SLC2A9 基因的表达进而影响人群血尿酸水平。

参考文献

- [1] JOOSTEN L A B, CRISAN T O, BJORNSTAD P, et al. Asymptomatic hyperuricaemia; a silent activator of the innate immune system[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(2):75-86.
- [2] KIMURA T, TAKAHASHI M, YAN K, et al. Expression of SLC2A9 isoforms in the kidney and their localization in polarized epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e84996.
- [3] XU L, SHI Y, ZHUANG S, et al. Recent advances on uric acid transporters[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59):100852-100862.
- [4] LE M T, SHAFIU M, MU W, et al. SLC2A9—a fructose transporter identified as a novel uric acid transporter[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(9):2746-2749.
- [5] CAULFIELD M J, MUNROE P B, O'NEILL D, et al. SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans[J]. *PLoS Med*, 2008, 5(10):e197.
- [6] SUN Y P, XU F L, YAN D D, et al. Association between SLC2A9 genetic variants and risk of hyperuricemia in a uygur population[J]. *Curr Med Sci*, 2019, 39(2):243-249.
- [7] LI C, CHU N, WANG B, et al. Polymorphisms in the presumptive promoter region of the SLC2A9 gene are associated with gout in a Chinese male population[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e24561.
- [8] 徐倩, 汪沙, 刘麒麟, 等. 双荧光素酶报告基因系统验证 hsa-miR-1291 对 ARHGAP29 基因的调控作用[J]. *首都医科大学学报*, 2021, 42(1):53-57.
- [9] WANG Q, WEN X, KONG J. Recent Progress on Uric acid detection; a review[J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2020, 50(4):359-375.
- [10] PARK J H, JO Y I, LEE J H. Renal effects of uric acid: hyperuricemia and hypouricemia[J]. *Korean J Intern Med*, 2020, 35(6):1291-1304.
- [11] PHAY J E, HUSSAIN H B, MOLEY J F. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9)[J]. *Genomics*, 2000, 66(2):217-220.
- [12] WINDPESSL M, RITELLI M, WALLNER M, et al. A novel homozygous SLC2A9 mutation associated with renal-induced hypouricemia[J]. *Am J Nephrol*, 2016, 43(4):245-250.
- [13] ITAHANA Y, HAN R, BARBIER S, et al. The uric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense[J]. *Oncogene*, 2015, 34(14):1799-1810.
- [14] KETHARNATHAN S, LEASK M, BOOCOCK J, et al. A non-coding genetic variant maximally associated with serum urate levels is functionally linked to HNF4A-dependent PDZK1 expression[J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 17(22):3964-3973.
- [15] LEASK M, DOWDLE A, SALVESEN H, et al. Functional urate-associated genetic variants influence expression of lincRNAs LINC01229 and MAFTRR[J]. *Front Genet*, 2019, 21(9):733-736.
- [16] KANAI M, AKIYAMA M, TAKAHASHI A, et al. Genetic analysis of quantitative traits in the Japanese population links cell types to complex human diseases[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(3):390-400.

(收稿日期:2021-10-23 修回日期:2022-03-21)