



# 斑马鱼 *deltaD* 基因对血管内皮生长因子家族基因 (*vegfaa* 和 *flt4*) 的调控

程瑶, 杜璇, 包林珠, 邱军强, 祖尧, 李伟明, 张庆华  
上海海洋大学  
电子邮箱: 2223148030@qq.com

应用双荧光素酶(Luciferase)实验体外验证 *deltaD* 基因对 *vegfaa* 和 *flt4* 的调控作用。利用加州大学圣克鲁兹分校基因组浏览器数据库获得斑马鱼 *deltaD*、*vegfaa* 及 *flt4* 基因序列, 并成功构建表达载体 p3xFLAG-CMV-*deltaD* 和双荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-*vegfaa*-Luc、pGL3-*flt4*-Luc。双荧光素酶报告基因实验结果显示, pGL3-*vegfaa*-Luc 和 pGL3-*flt4*-Luc 报告基因载体在 HEK293T 细胞中的荧光素酶活性分别约为对照组的 92 倍和 3.9 倍。进一步将 p3xFLAG-CMV-*deltaD* 分别与 pGL3-*vegfaa*-Luc、pGL3-*flt4*-Luc 转染至 HEK293T 细胞, 与对照组相比其荧光素酶活性分别约为 2.3 倍和 3.7 倍。本研究明确了 Notch 信号通路的配体基因 *deltaD* 可以通过调控血管内皮生长因子家族中的 *vegfaa* 配体和 *flt4* 受体基因从而影响血管发育, 为深入研究 Notch 信号通路在血管发育中的调控机制提供实验材料和科学依据。



图1 *deltaD* 基因 CDS 全长片段扩增、p3xFLAG-CMV-*deltaD* 菌液 PCR 及酶切验证

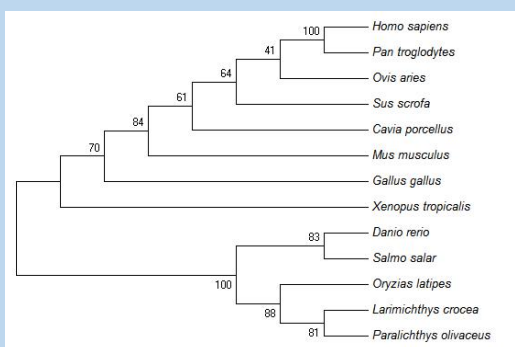


图2 NJ法构建 *deltaD* 进化树  
注: A: *deltaD* 系统进化树

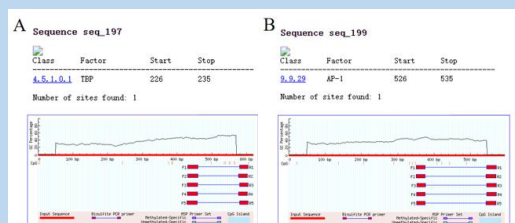


图3 Methprimer-Design 软件预测启动子区 CpG 岛  
注: A: *vegfaa* 基因启动子区 CpG 岛;  
B: *flt4* 基因启动子区 CpG 岛

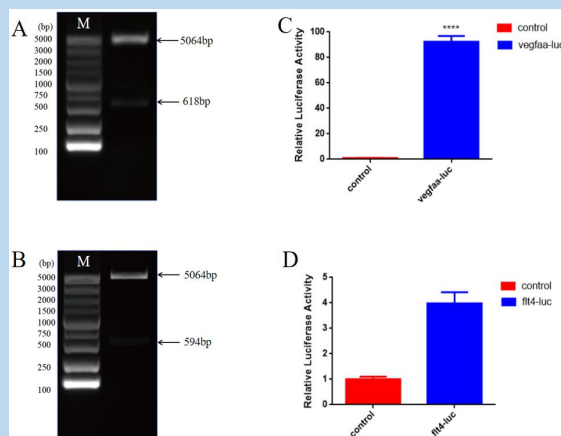


图4 重组质粒酶切结果及活性分析

注: M: Marker5000;  
A: *vegfaa*-luc 酶切结果;  
B: luciferase 实验验证 *vegfaa*-luc 表达载体活性;  
C: *flt4*-luc 酶切结果;  
D: luciferase 实验验证 *flt4*-luc 表达载体活性

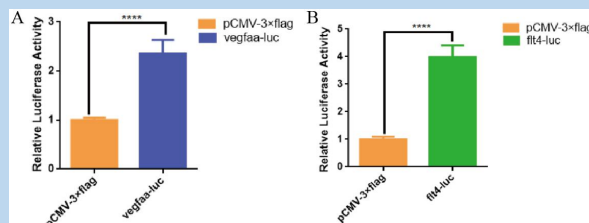


图5 双荧光素酶实验显示 *deltaD* 激活 *vegfaa*-luc 及 *flt4*-luc 结果  
注: t test, n=3, ns p>0.05, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001

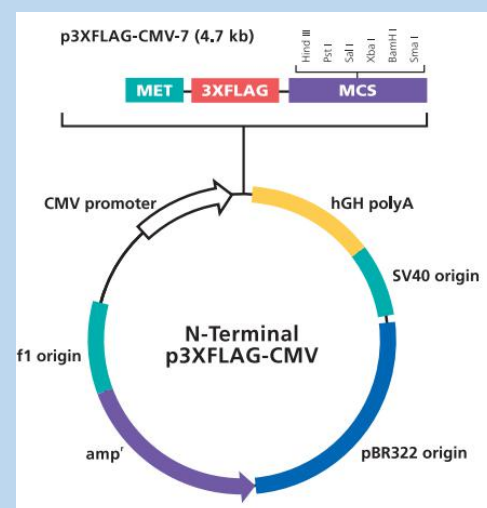


图6 pCMV-p3xFLAG 表达载体质粒图谱

结论

1. 通过 AliBaba 软件分析靶序列上潜在的转录因子结合位点, 发现在 *vegfaa* 靶序列中含有 TBP 转录因子结合位点, 在 *flt4* 靶序列中含有 AP-1 转录因子结合位点。
2. 通过 Methprimer-Design 软件分析, 均没有发现与转录起始有关的 CpG 岛。
3. p3xFLAG-*deltaD* 可以促进 pGL3-*vegfaa*-Luc 和 pGL3-*flt4*-Luc 的表达。

致谢

本研究由国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2019YFD0900102); 教育部留学回国人员科研启动基金(D-8002-15-0042); 水产动物疾病与基因编辑育种的平台建设和前沿科学研究项目(A1-3201-19-3013)共同资助。