

陈改拓,周志杰,周泽斌,等.斑马鱼 *ddx27* 基因对 *tp53* 基因的调控作用[J].华中农业大学学报,2022,41(6):201-207.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.06.023

斑马鱼 *ddx27* 基因对 *tp53* 基因的调控作用

陈改拓¹,周志杰¹,周泽斌¹,包林珠¹,邱军强¹,李伟明²,张庆华¹

1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室/

上海海洋大学国家水生动物病原库,上海 201306;

2. 密歇根州立大学农业和自然资源学院,美国,密歇根,东兰辛 48824

摘要 为探究斑马鱼 *ddx27* 基因对 *tp53* 基因表达的影响,根据 NCBI 网站在线数据库中分析得到的 *ddx27* 基因编码序列(coding sequence, CDS),利用同源重组技术构建斑马鱼 *ddx27* 真核表达载体 pCMV-3×Flag-*ddx27*。通过亚细胞定位试验和蛋白质免疫印迹技术验证 *ddx27* 基因的表达,并利用双荧光素酶试验验证 *ddx27* 基因的过表达对 *tp53* 基因转录活性的影响。结果显示,*ddx27* CDS 区及阳性克隆的电泳片段大小以及测序比对均与预期结果一致。蛋白质免疫印迹显示 Ddx27 重组质粒可正常表达,且蛋白大小与预测结果一致。亚细胞定位显示 Ddx27 蛋白表达于 HEK293T 细胞的细胞核中。而且,过表达 pCMV-3×Flag-*ddx27* 真核表达载体能够显著增强 *tp53* 启动子报告基因载体 pGL3-*tp53*-Luc 的活性,为对照组的 1.8 倍($P<0.05$)。以上结果表明,斑马鱼 pCMV-3×Flag-*ddx27* 真核表达载体构建成功,能够在哺乳动物的细胞核中表达,且 *ddx27* 基因可以促进 *tp53* 基因的表达。

关键词 斑马鱼; *ddx27*; 亚细胞定位; 真核表达载体; *tp53*

中图分类号 S857.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)06-0201-07

DDX 解旋酶(DEAD-box RNA helicase, DDX) 属于解旋酶超家族 2(helicase superfamily 2, SF2) 的成员,是真核生物、古细菌和细菌中最大的 RNA 解旋酶家族之一^[1]。DDX 解旋酶的特征是存在一个特定的氨基酸基序 Asp-Glu-Ala-Asp(D-E-A-D),它参与 RNA 代谢并发挥多种功能,如翻译过程、转录过程、RNA 稳定性、mRNA 输出、mRNA 剪接等^[2]。在人类和斑马鱼中 DDX 解旋酶家族成员众多,数量庞大,并且它们在结构上高度保守^[3]。DDX 解旋酶主要与癌症、病毒感染和个体发育相关。例如人类 DDX3 在多数乳腺癌患者中过度表达,并且与乳腺癌远端转移相关^[4]。

斑马鱼 *ddx27* 和人类 *DDX27* 一样,作为 DDX 解旋酶家族的一员,同样也含有保守的 D-E-A-D 序列。*DDX27* 调控核糖体 RNA(rRNA) 的成熟,参与调节 47S 核糖体 RNA(rRNA) 的形成^[5]。目前有关 *DDX27* 的研究主要聚焦于人类癌症领域,发现

DDX27 与恶性肿瘤的发生有关。例如,*DDX27* 通过控制细胞周期有助于胃癌细胞的集落形成,而 *DDX27* 的敲除可以抑制细胞周期进程而降低胃癌细胞的生存能力^[6]。在大肠癌中 *DDX27* 的异位表达增强了大肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,同时也抑制了细胞凋亡^[7]。斑马鱼 *ddx27* 除了调控核糖体的生物发生外,还与肌肉发生过程中特异转录物的翻译有关,缺失 *ddx27* 的斑马鱼骨骼肌的生长和再生遭受了严重损害,这种情况被认定为一种新的核糖体疾病^[8]。

TP53 基因在调控癌症发生和发展中具有重要作用,并且与 DDX 解旋酶关系密切。例如有研究发现 *TP53* 与 *DDX3* 基因之间的 P53-*DDX3* 通路的改变会导致 P21 蛋白减少,与早期人乳头瘤病毒相关肺癌病人的无复发生存率(recurrence free survival, RSF) 相关^[9]。*DDX5* 和 *DDX17* 基因在乳腺癌中高表达,苏木酰化的 *DDX5* 和 *DDX17* 通过调节雌激素

收稿日期:2022-04-27

基金项目: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(A1-3201-19-3013)

陈改拓, E-mail: cgt501684720@163.com

通信作者:张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

受体和P53的活性对乳腺癌产生影响^[10]。DEAD-box RNA解旋酶家族成员之间在结构上高度保守,并且在进化上也高度保守,均含有RNA和ATP结合位点这两个高度保守的核心区域结构^[11]。而DDX27、DDX3、DDX5和DDX17同属于DEAD-box RNA解旋酶家族,均与癌症发生联系密切。因此,我们猜测*ddx27*和*tp53*之间也可能存在相应的调控关系,有必要进行详细的研究。

目前斑马鱼被广泛用于水产及人类疾病模型的研究,如早期发育、免疫调节^[12]、合成代谢^[13]和癌症等领域。斑马鱼在病理生理、发育和遗传方面与人类表现出高度的相似性^[14]。相较于线虫和果蝇,斑马鱼与哺乳动物在进化上的关系更密切,具有更强的研究潜力。本研究通过构建斑马鱼*ddx27*基因真核表达载体,并将其转染到HEK293T细胞中,利用亚细胞定位和蛋白质免疫印迹检测蛋白水平的表达,最后将*ddx27*真核表达载体与*tp53*启动子共转,探究过表达*ddx27*对*tp53*的影响,以期为疾病及动物发育相关机制的深入研究提供良好的实验材料,并为水生动物DDX解旋酶家族成员的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和主要试剂

试验用人胚肾细胞(human embryonal kidney, HEK293T)和内参质粒pRL-TK均由海军军医大学李楠教授惠赠。*tp53*基因启动子报告基因载体pGL3-*p53*-Luc由笔者所在实验室自行构建。

DH5 α 感受态细胞购自北京擎科生物科技有限公司;高保真酶购自天根科技(北京)有限公司;胶回收/DNA纯化试剂盒、质粒提取试剂盒和同源重组试剂2 \times ClonExpress Mix均购自南京诺唯赞科技股份有限公司;简单培养基Opti-MEMTM、胰蛋白酶购自Gibco Life Technologies(美国);Fugene[®] HD Transfection Reagent转染试剂、Dual-Luciferase[®]报告基因活性检测试剂盒均购自Promega(美国);哺乳动物表达载体p3XFLAG-CMV-7、Bovine Serum Albumin、TritonTM x-100购自Sigma(美国);小鼠抗FLAG-tag单克隆抗体、 β -actin、Rabbit pAb、Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;Goat anti-Mouse IgG(H+L) Secondary Antibody、Alexa FluorTM488goat anti-mouse IgG9(H+L)购自Invitrogen(美国)。

试验所用主要仪器:共聚焦显微镜(Leica, STELLARIS 5),酶标仪(BioTek, Synergy2),电泳仪(Bio-Rad, PowerPac Basic),照胶仪(Bio-Rad, Gel Doc EZ Imager)。

1.2 斑马鱼Ddx27氨基酸序列保守性分析

首先利用SMART网站(<http://smart.embl.de/>)分析斑马鱼Ddx27蛋白的结构域。通过NCBI网站得到其他物种的Ddx27氨基酸序列之后,对斑马鱼Ddx27氨基酸序列与人(*Homo sapiens*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、蟒蛇(*Python bivittatus*)、大山雀(*Parus major*)和鸭嘴兽(*Ornithorhynchus anatinus*)等物种的Ddx27氨基酸序列进行比对。之后将各物种的Ddx27氨基酸序列输入MEGA7.0软件,利用软件内的邻接法(NJ)构建系统进化树分析斑马鱼Ddx27氨基酸序列的种间保守性。

1.3 斑马鱼*ddx27*真核表达载体的构建

根据NCBI网站上登录的斑马鱼*ddx27*基因(NM_001002869.1)的编码序列(coding sequence, CDS)在两端设计引物:利用诺唯赞官网的CE Design引物设计程序,输入*ddx27*基因CDS区序列、载体序列并选择好2个酶切位点,确认后得到带同源臂的引物序列,如表1所示。利用高保真酶与野生型(wild type, WT)斑马鱼的cDNA,进行*ddx27* CDS区片段的扩增,扩增程序为:98 $^{\circ}$ C变性10 s、56 $^{\circ}$ C退火15 s、72 $^{\circ}$ C延伸30 s,进行34个循环,最后保存在4 $^{\circ}$ C(扩增体系同文献[15])。电泳检测PCR产物,用割胶纯化试剂盒对目标条带进行PCR产物纯化回收。回收产物为带有同源臂的片段,再利用同源重组连接酶使之与Pst I和BamH I双酶切后的pCMV-3 \times Flag质粒连接。得到连接产物后,将产物加入到解冻后的DH5 α 感受态细胞中,冰置30 min,通过热激转化法将连接产物也就是重组质粒转化到DH5 α 感受态细胞中,经过氨苄抗性筛选出多个单菌落进行扩培养,再以扩培养的菌液为模板用通用引物(表1)进行菌液PCR,将出现正确片段大小的菌液全部送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果与目的片段序列一致的菌液继续扩培养,取其中部分进行保藏,剩下的菌液通过试剂盒提取重组质粒。

1.4 Western blot验证Ddx27蛋白的表达

使用脂质体法将试验组pCMV-3 \times Flag-*ddx27*真核表达载体与对照组pCMV-3 \times Flag载体各自转染至HEK293T细胞中,在细胞裂解液中加入

表1 构建 *ddx27* 重组质粒所用引物以及酶切位点的选择Table 1 Primers required for the construction of *ddx27* recombinant plasmid and selection of enzyme digestion sites

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Sequence of primers (5' - 3')	酶切位点 Enzyme cutting sites
<i>ddx27</i> -2331-F	gacaagcttgcctgctcagATGGATCTGATCAGAACTATTGATGATG	<i>Pst</i> I 和 <i>Bam</i> H I
<i>ddx27</i> -2331-R	cagggatgccaccgggatccTCACTTCTTTTGAAGCTTGGCCT	
CMV-30	AATGTCGTAATAACCCCGCCCGTTGACGC	通用引物 Universal primer
CMV-24	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC	

注:引物序列中的小写字母为同源臂,它也是引物的一部分。Note: The lowercase letters in the primer sequence are the homology arms, which are also part of the primers.

1:1 000 蛋白酶抑制剂,在培养 36 h 后向 24 孔板加入细胞裂解液提取蛋白。取试验组与对照组各 20 μ L 和 40 μ L 蛋白样品进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,加入冰盒后先 80 V 电泳 30 min,待样品迁移至浓缩胶后再 100 V 电泳 80 min。电泳结束后用湿法转膜器将凝胶上的条带转至 NC 膜上,封闭液封闭 1 h,弃去封闭液,以鼠源 FLAG-tag 抗体为一抗(1:3 000 倍稀释)孵育过夜,后用 PBST 漂洗滤膜 3 次,每次 6 min,以山羊抗鼠为二抗(1:3 000 倍稀释)孵育 5 h,再用 PBST 漂洗滤膜 4 次,每次 6 min,加入显影液拍照,用相同的操作得到 β -actin 蛋白条带,最后分析 Western blot 结果。

1.5 亚细胞定位检测 Ddx27 蛋白的表达位置

将复苏后的 HEK293T 细胞培养至状态稳定后,把 pCMV-3 \times Flag-*ddx27* 质粒转染到细胞中。在培

养皿中用 HD 转染试剂将 pCMV-3 \times Flag-*ddx27* 和 pCMV-3 \times Flag 各自转染 800 ng。转染 36 h 后,经多聚甲醛固定,甲醇透化,缓冲液封闭后,添加一抗(FLAG-tag)和荧光二抗进行孵育,之后添加 DAPI 于黑暗中孵育,最后在共聚焦显微镜下观察标本并拍照。详细步骤参照文献[16]。

1.6 双荧光素酶试验

待复苏后的 HEK293T 细胞状态稳定后,将转染复合物(表 2)添加到 24 孔细胞培养板中。培养 36 h 后使用酶标仪进行双荧光素酶检测并利用分析软件计算萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)与海肾荧光素酶(*Renilla* luciferase)所激发的荧光强度的比值,比较对照组与试验组之间的差异。每组设置 3 个生物学重复,每个生物学重复内再设置 3 个技术重复,共 9 个重复。详细步骤参照文献[15]。

表 2 双荧光素酶试验转染复合物配比

Table 2 Dual-luciferase assay transfection complex proportion

分组 Groups	pCMV-3 \times Flag- <i>ddx27</i> /ng	pCMV-3 \times Flag /ng	pGL3- <i>tp53</i> -Luc/ ng	phRL-TK/ng	Opti-MEM/ μ L	Fu GENE HD/ μ L
对照组 Control group	0	200	100	10	45	0.93
试验组 Experimental group	200	0	100	10	45	0.93

1.7 统计学处理

试验所有原始数据用 Excel 软件进行统计分析,以平均值(mean) \pm 标准误差(SE)表示。利用 Prism 8 软件进行显著性分析,若 $P < 0.05$ 则表示组间具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼 Ddx27 氨基酸序列同源性分析

SMART 网站结构域分析结果显示斑马鱼 Ddx27 蛋白编码 776 个氨基酸,拥有 2 个主要的结构域:位于 220~421 氨基酸位点的 DEXDc 结构域与 460~541 氨基酸位点的 HELICc 结构域,这 2 个结构

域符合 Ddx27 蛋白作为 RNA 解旋酶的这一功能。氨基酸序列比对结果显示斑马鱼与遮目鱼 Ddx27 氨基酸一致性最高,为 83.99%,与人 DDX27 的一致性为 72.39%,与小鼠的一致性为 71.46%,与鸭嘴兽的一致性为 70.78%,与家燕的一致性为 67.85%,与鬃狮蜥的一致性为 61.64%。系统进化树构建结果表明,哺乳动物、鸟类和爬行类 DDX27 聚为一大支,硬骨鱼类 Ddx27 聚为另一大支,哺乳动物各自聚为一个分支(图 1)。结合上述斑马鱼 Ddx27 结构域与同源性分析结果,我们发现斑马鱼 Ddx27 蛋白在进化中具有较高的保守性。

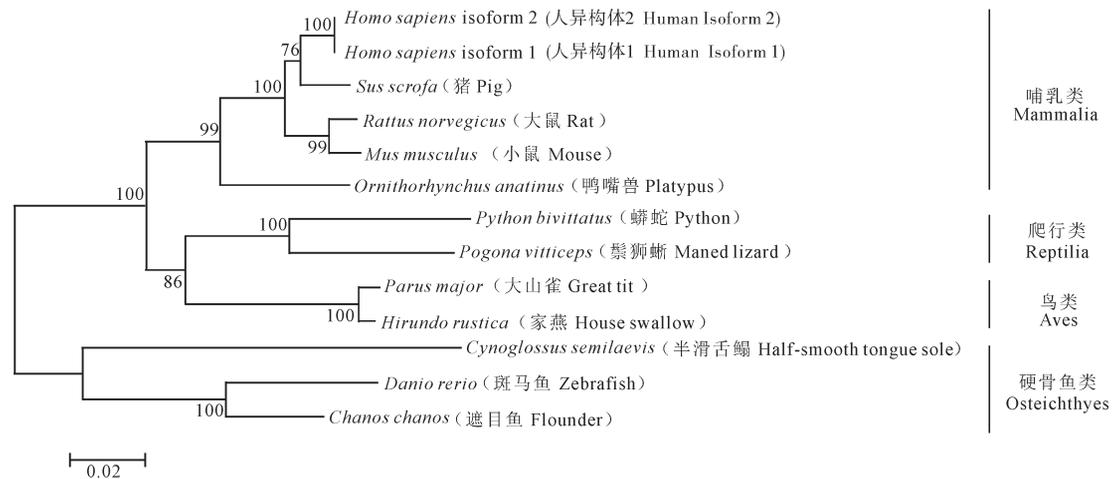
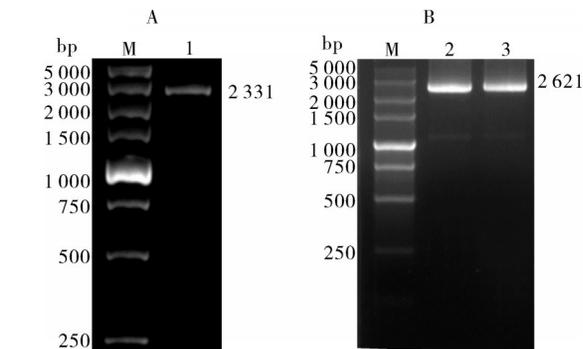


图1 斑马鱼 Ddx27 系统进化树构建

Fig.1 Phylogenetic tree construction of zebrafish Ddx27

2.2 斑马鱼 *ddx27* 基因 CDS 区真核表达载体构建结果与验证

为了能够在体外表达斑马鱼 Ddx27 蛋白,利用同源重组法构建了斑马鱼 *ddx27* 真核表达载体,结果显示,*ddx27* 基因 CDS 区 PCR 扩增结果(图 2A)与菌液 PCR 电泳检测结果(图 2B)均在对应位置显示出与预测片段大小一致的单一明亮条带。说明目的片段已经成功连接到载体上。将构建的真核表达载体命名为 pCMV-3×Flag-*ddx27*,经测序验证其信息与预测信息一致,表明 *ddx27* 真核表达载体构建



A: *ddx27* 基因 CDS 区的克隆; B: *ddx27* 基因重组质粒的构建。
M: DNA marker; 1: 斑马鱼 *ddx27* 基因 CDS 区克隆片段; 2、3: 菌液 PCR 阳性克隆片段。 A: Cloning of CDS region fragment of *ddx27*; B: Construction of recombinant plasmid of *ddx27* gene.
M: DNA marker; 1: Cloned fragment of CDS region of zebrafish *ddx27* gene; 2, 3: PCR positive clone fragment of bacterial fluid.

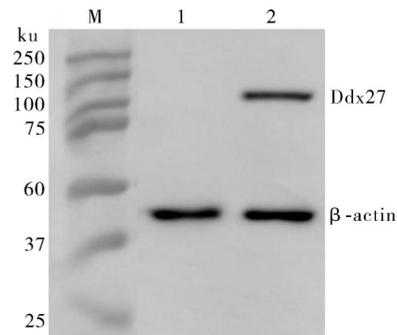
图2 *ddx27* 基因 CDS 区序列克隆与真核表达载体构建验证

Fig.2 Sequence cloning of CDS region of *ddx27* gene and validation of eukaryotic expression vector construction

成功。

2.3 蛋白免疫印迹法验证重组质粒的表达

为了验证重组质粒能否在 HEK293T 细胞中表达,利用 Western blot 进行蛋白表达分析,结果显示只有试验组出现了明显的条带,大小约为 100 ku,与预测蛋白大小基本一致。表明重组质粒成功在 HEK293T 细胞中表达 Ddx27 蛋白(图 3)。



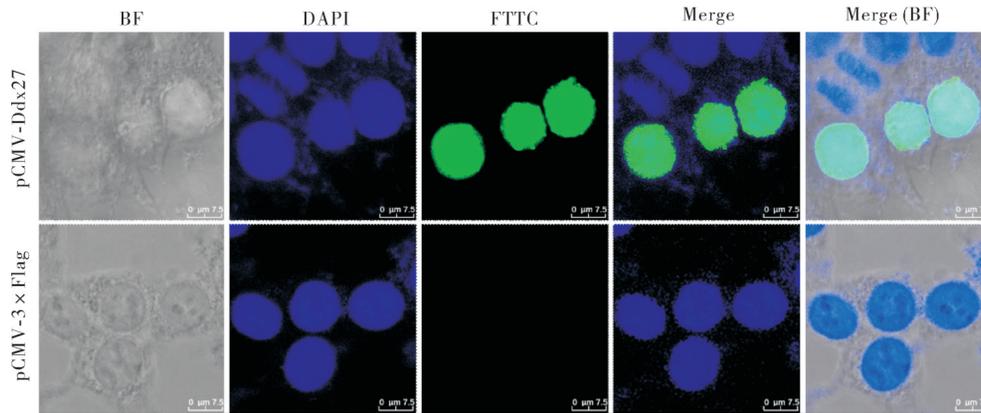
M: 蛋白 Marker; 1: 对照组,未转染重组质粒; 2: 试验组,已转染重组质粒。 M: Protein marker; 1: Control group, not transfected with recombinant plasmids; 2: Experimental group, which has been transfected with recombinant plasmids.

图3 Ddx27 蛋白 Western blot 检测结果

Fig.3 Western blot results of Ddx27 protein

2.4 重组质粒在 HEK293T 细胞中的表达位置

亚细胞定位结果如图 4 所示。图中呈现蓝色荧光的是 DAPI 试剂标记的细胞核,呈现绿色荧光的是 FLAG 标签抗体标记的 pCMV-3×Flag-*ddx27*,同时进行明场观察。试验组绿色荧光与蓝色荧光重叠,而对照组没有观察到绿色荧光,说明 pCMV-3×Flag-*ddx27* 载体聚集于 HEK293T 细胞的细胞核中进行表达, Ddx27 蛋白定位于细胞核,符合 *ddx27* 参与细胞核内 rRNA 加工的功能。



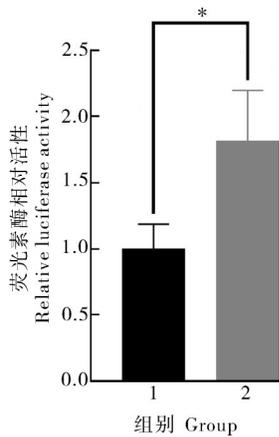
BF:明场; DAPI:蓝色荧光,用于标记细胞核; FITC:绿色荧光,用于标记重组质粒; Merge:DAPI和FITC 2张图的重合; Merge(BF):BF、DAPI和FITC 3张图的重合。BF:Bright field; DAPI:Blue fluorescence, used to label the nucleus; FITC:Green fluorescence, used to label the recombinant plasmid; Merge:Overlap of two plots of DAPI, and FITC; Merge (BF):Overlap of three plots of BF, DAPI and FITC.

图4 pCMV-3xFlag-*ddx27*在HEK293T细胞中的定位

Fig.4 Localization of pCMV-3xFlag-*ddx27* in HEK293T cells

2.5 双荧光素酶试验结果

通过比较对照组与试验组 pGL3-*tp53*-Luc 启动子的荧光素酶相对活性,发现过表达斑马鱼 *ddx27* 基因后, pGL3-*tp53*-Luc 启动子的转录活性显著升高,约为对照组活性的 1.8 倍,试验组和对对照组具有显著差异(图 5)。说明过表达斑马鱼 *ddx27* 基因可以显著促进 *tp53* 基因的表达。



1. 对照组; 2. 试验组; $n=3$, *: $P<0.05$ 。1. Control group; 2. Experimental group; $n=3$, *: $P<0.05$ 。

图5 斑马鱼 *ddx27*对 *tp53*转录活性的影响

Fig.5 Effect of zebrafish *ddx27* on the transcriptional activity of *tp53*

3 讨论

DEAD-box 解旋酶家族几乎参与各种与 RNA 相关的生化进程,其中 DDX27 参与调控核糖体的生物发生中 rRNA 的成熟^[17]。斑马鱼 Ddx27 能够调控特定细胞中 rRNA 的成熟,具有特异性,当斑马鱼缺乏

Ddx27 会导致肌肉细胞核的 rRNA 合成缺陷,而其他 DDX 解旋酶家族成员不能弥补这种缺陷,验证了 *ddx27* 在骨骼肌中的高度特化作用^[8]。我们研究发现 *ddx27* 在 HEK293T 细胞的细胞核中表达,证实了 *ddx27* 于细胞核内调控 rRNA 的成熟的功能,但 HEK293T 细胞属于肾细胞,并且 DDX27 在多种癌细胞中高表达,说明 DDX27 的功能并不局限于此。

最新研究发现在人类乳腺癌中 DDX27 的过度表达可增强与干细胞相关的生物标记物的表达,并促进干细胞活性,导致乳腺癌细胞的增殖和迁移^[18]。DDX27 还能通过增强 ERK 信号传导,在人类肝癌中起诱导作用^[19]。通过 siRNA 技术敲除肾癌细胞中的 DDX27 基因后能够有效降低肾癌细胞的迁移和侵袭能力^[20]。上述研究都在人类癌细胞中发现 DDX27 高表达,暗示 DDX27 在人类癌细胞中发挥癌基因作用,可以将其作为癌症治疗的靶点。斑马鱼 *ddx27* 基因作为人类 DDX27 基因的同源基因,参与斑马鱼肌肉的发育,而我们的研究发现 *ddx27* 基因可以增强 *tp53* 基因的转录活性,并且斑马鱼 *tp53* 基因启动子区预测到了 Sp1、c-Jun 和 NF- κ B1 等转录因子结合位点,Sp1 和 c-Jun 均与凋亡相关,NF- κ B1 能够调节翻译水平上的 P53 表达^[15]。另有研究发现 DDX10 下调后可以通过 Akt/NF- κ B 途径促进卵巢癌的增殖^[21],说明斑马鱼 *ddx27* 可能通过 Akt/NF- κ B 途径调控 *tp53*,而 *tp53* 在斑马鱼脑神经发育中起到了重要作用^[22],因此 *ddx27* 除了参与多种癌症的发生,还可能参与动物不同组织器官的发育过程,这需要进一步的深入研究。斑马鱼作为新兴的模式

动物,作为硬骨鱼类的代表,对其DDX解旋酶家族分子功能的研究较少。我们的研究显示斑马鱼Ddx27蛋白氨基酸序列与人类及小鼠同源基因的一致性高达70%以上,表明斑马鱼*ddx27*基因与人类和小鼠中的同源基因功能存在较高的保守性,因此,斑马鱼能够成为研究人类疾病机制的有效动物模型。

综上所述,本研究对构建成功的斑马鱼pCMV-3×Flag-*ddx27*真核表达载体进行了蛋白表达分析以及亚细胞定位,过表达斑马鱼*ddx27*基因载体后,能够增强*tp53*基因的表达,为进一步解析动物发育疾病及人类各种癌症发生的详细机制奠定了理论基础,也为进一步研究DDX家族的功能和机制提供可靠的研究材料。

参考文献 References

- [1] ROCAK S, LINDER P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism[J]. *Nature reviews molecular cell biology*, 2004, 5(3): 232-241.
- [2] TASCHUK F, CHERRY S. DEAD-box helicases: sensors, regulators, and effectors for antiviral defense[J/OL]. *Viruses*, 2020, 12(2): 181 [2022-04-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32033386/>. DOI: 10.3390/v12020181.
- [3] 时灿, 包林珠, 任建峰, 等. 斑马鱼DEAD-box家族的分子结构特征及进化分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(11): 4934-4946. SHI C, BAO L Z, REN J F, et al. Molecular structure characteristics and evolutionary analysis of the DEAD-box family in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Genomics and applied biology*, 2020, 39(11): 4934-4946 (in Chinese with English abstract).
- [4] HE Y, ZHANG D, YANG Y F, et al. A double-edged function of *DDX3*, as an oncogene or tumor suppressor, in cancer progression (Review)[J]. *Oncology reports*, 2018, 39(3): 883-892.
- [5] KELLNER M, ROHRMOSER M, FORNÉ I, et al. DEAD-box helicase *DDX27* regulates 3' end formation of ribosomal 47S RNA and stably associates with the PeBoW-complex[J]. *Experimental cell research*, 2015, 334(1): 146-159.
- [6] TSUKAMOTO Y, FUMOTO S, NOGUCHI T, et al. Expression of *DDX27* contributes to colony-forming ability of gastric cancer cells and correlates with poor prognosis in gastric cancer [J]. *American journal of cancer research*, 2015, 5(10): 2998-3014.
- [7] YANG C X, LI D J, BAI Y, et al. DEAD-box helicase 27 plays a tumor-promoter role by regulating the stem cell-like activity of human colorectal cancer cells[J]. *Onco targets and therapy*, 2018, 12: 233-241.
- [8] BENNETT A H, O'DONOHUE M F, GUNDRY S R, et al. RNA helicase, *DDX27* regulates skeletal muscle growth and regeneration by modulation of translational processes [J/OL]. *PLoS genetics*, 2018, 14(3): e1007226 [2022-04-27]. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007226>.
- [9] WU D W, LIU W S, WANG J, et al. Reduced p21 (WAF1/CIP₁) via alteration of p53-DDX3 pathway is associated with poor relapse-free survival in early-stage human papillomavirus-associated lung cancer [J]. *Clinical cancer research*, 2011, 17(7): 1895-1905.
- [10] MOONEY S M, GRANDE J P, SALISBURY J L, et al. Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(1): 1-10.
- [11] PYLE A M. Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases [J]. *Annual review of biophysics*, 2008, 37: 317-336.
- [12] 黄敏, 程珂, 马春松, 等. 6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞炎症通路和抗氧化作用的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2022, 41(1): 202-209. HUANG M, CHENG K, MA C S, et al. Effects of 6-shogaol on inflammation response and antioxidant capacity in zebrafish liver cells [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2022, 41(1): 202-209 (in Chinese with English abstract).
- [13] 王玉梅, 任天应, 高坚. 不同脂肪源饲料对斑马鱼 *elov15*, *elov12* 和 *fads2* 在高度不饱和脂肪酸合成中的作用影响[J]. *华中农业大学学报*, 2021, 40(5): 138-145. WANG Y M, REN T Y, GAO J. Effects of dietary different lipid sources on *elov15*, *elov12* and *fads2* in highly unsaturated fatty acids biosynthesis in zebrafish [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40(5): 138-145 (in Chinese with English abstract).
- [14] MACRAE C A, PETERSON R T. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. *Nature reviews drug discovery*, 2015, 14(10): 721-731.
- [15] 包林珠, 时灿, 卢玲儿, 等. 斑马鱼 (*Danio rerio*) *mapk1* 基因对 *tp53* 基因调控研究[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(12): 160-168. BAO L Z, SHI C, LU L E, et al. Regulation of gene *mapk1* in *Danio rerio* on gene *tp53* [J]. *Biotechnology bulletin*, 2021, 37(12): 160-168 (in Chinese with English abstract).
- [16] 吴坤坤, 徐行, 季策, 等. 斑马鱼 *notch3* 基因真核表达载体的构建及其表达分析[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(1): 179-186. WU K K, XU X, JI C, et al. Eukaryotic expression vector construction of *Danio rerio notch3* gene and its expression analysis [J]. *Biotechnology bulletin*, 2022, 38(1): 179-186 (in Chinese with English abstract).
- [17] LINDER P, JANKOWSKY E. From unwinding to clamping: the DEAD box RNA helicase family [J]. *Nature reviews molecular cell biology*, 2011, 12(8): 505-516.
- [18] LI S, MA J F, ZHENG A, et al. DEAD-box helicase 27 enhances stem cell-like properties with poor prognosis in breast cancer [J/OL]. *Journal of translational medicine*, 2021, 19(1): 334 [2022-04-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34362383/>. DOI: 10.1186/s12967-021-03011-0.
- [19] XIAO Q W, BING Z, YANG W L, et al. DEAD-box helicase 27 promotes hepatocellular carcinoma progression through ERK signaling [J/OL]. *Technol cancer res treat*, 2021, 20: 15330338211055953 [2022-04-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8649435/>. DOI: 10.1177/15330338211055953.

- [20] 周政宇. DDX27 在肾透明细胞癌侵袭、转移中的作用及临床预后相关性的初步研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2021. ZHOU Z Y. DDX27 effects the invasion and metastasis of renal clear cell carcinoma and correlates with clinical prognosis [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [21] GAI M, BO Q F, QI L X. Epigenetic down-regulated DDX10 promotes cell proliferation through Akt/NF- κ B pathway in ovarian cancer [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2016, 469(4): 1000-1005.
- [22] XIA Z D, TONG X J, LIANG F, et al. Eif3ba regulates cranial neural crest development by modulating p53 in zebrafish [J]. Developmental biology, 2013, 381(1): 83-96.

Regulation of *tp53* gene by *ddx27* in zebrafish (*Danio rerio*)

CHEN Gaituo¹, ZHOU Zhijie¹, ZHOU Zebin¹, BAO Linzhu¹,
QIU Junqiang¹, LI Weiming², ZHANG Qinghua¹

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University/National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. College of Agriculture and Natural Resources, Michigan State University, East Lansing 48824, USA

Abstract The aim of this study was to investigate the regulatory effect of *ddx27* gene on *tp53* gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). The zebrafish *ddx27* eukaryotic expression vector pCMV-3 \times Flag-*ddx27* was constructed using homologous recombination technology based on the coding sequence (CDS) of *ddx27* gene from NCBI online database. Sub-cellular localization and Western blotting were used to confirm the expression of *ddx27* gene, the effect of *ddx27* gene overexpression on *tp53* gene expression was tested using dual-luciferase reporter gene assay. The results showed that the electrophoretic fragment size and sequencing alignment of *ddx27* CDS region and positive clones were consistent with expectations. Western blotting showed that Ddx27 recombinant plasmid could be expressed normally, and the protein size was consistent with the predicted results. Sub-cellular localization showed that Ddx27 protein was expressed in the nucleus of HEK293T cells. Furthermore, the pCMV-3 \times Flag-*ddx27* vector could significantly enhance the activity of *tp53* promoter reporter gene pGL3-*tp53*-Luc, which was 1.8 times than that of the control group ($P < 0.05$). The above results showed that the zebrafish pCMV-3 \times Flag-*ddx27* eukaryotic expression vector was successfully constructed and could be expressed in the mammalian nucleus, and *ddx27* gene could promote the expression of *tp53* gene.

Keywords zebrafish; *ddx27*; subcellular localization; eukaryotic expression vector; *tp53*

(责任编辑: 边书京)