

文章编号: 1674-5566(2017)01-0017-06

DOI:10.12024/j.sou.20160301713

## 草鱼 *SREBP-1-3'-UTR* 双荧光素酶报告载体构建及 miR-33 对其表达的影响

王俊丽<sup>1</sup>, 卢荣华<sup>2</sup>, 秦超彬<sup>2</sup>, 常志光<sup>2</sup>, 孙君君<sup>2</sup>, 杨峰<sup>2</sup>, 聂国兴<sup>2</sup>

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 为研究草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) miR-33 在固醇调节元件结合蛋白-1 (Sterol regulatory element binding protein 1, SREBP-1) 调节脂代谢中的作用, 构建了草鱼 *SREBP-1* 基因 3' 端非翻译区 (Untranslated region, UTR) 含 miR-33 靶序列的双荧光素酶报告基因载体。首先用 PCR 法获得 *SREBP-1* mRNA 含 miR-33 结合位点的 3'UTR 序列 (379 bp), 与双荧光素酶报告载体 pmirGLO 重组后转染 DH5 $\alpha$  感受态细胞。然后经筛选和双酶切鉴定, 获得含有 *SREBP-1* 基因 3'-UTR 的双荧光素酶报告载体: pmirGLO-*SREBP-1-3'-UTR*。最后在草鱼肝细胞 L8824 共转染 miR-33 mimics 和 pmirGLO-*SREBP-1-3'-UTR*, 明确 miR-33 与 *SREBP-1* 基因 3' UTR 区的靶向关系。结果表明, 含有 *SREBP-1* 基因 3'-UTR 序列的双荧光素酶报告基因载体构建成功, PCR、双酶切和基因测序证明序列与目标一致; 转染 pmirGLO-*SREBP-1-3'-UTR* 的 L8824 细胞可表达荧光素酶, 单独转染载体组的荧光素酶活性显著高于共转染载体和 miR-33 mimics 组 ( $P < 0.05$ )。本研究证实草鱼 *SREBP-1* 是 miR-33 的直接靶基因, miR-33 通过和 *SREBP-1* mRNA 3'UTR 结合, 调控 *SREBP-1* 基因的转录后表达。

**关键词:** 草鱼; SREBP-1; miR-33; 3'非翻译区; pmirGLO 报告基因载体; 荧光素酶活性

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

固醇调节元件结合蛋白 (Sterol regulatory element binding protein, SREBP) 是脊椎动物调节脂代谢的一类膜结合核转录因子, 目前在哺乳动物中已发现 3 个成员: SREBP-1a、SREBP-1c 和 SREBP-2, 其中 SREBP-1a 和 SREBP-1c 由同一个基因 *SREBP-1* 的不同启动子转录生成<sup>[1]</sup>。SREBP-1 主要激活与脂肪酸生成有关的基因, 如脂肪酸合成酶基因 (Fatty acid synthase, *FASN*), 硬脂酰辅酶 A 脱氢酶基因 (Stearoyl-CoA desaturase, *SCD*), 以及乙酰辅酶 A 羧化酶基因 1 (Acetyl-CoA carboxylase 1, *ACCI*) 等, 而 SREBP-2 主要作用于胆固醇调节基因, 如 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶基因 (*HMG-CoA reductase*, *HMGCR*)、低密度脂蛋白受体基因 (Low-density lipoprotein receptor, *LDLR*) 等<sup>[2]</sup>。

miRNA-33 是参与维持机体脂质稳态的一种小分子核糖核酸, 在人类发现有 miRNA-33a 和 miRNA-33b 两个亚型, 其编码序列分别定位于 *SREBP-2* 和 *SREBP-1* 基因的内含子上; 而在小鼠中只发现一种 miRNA-33, 定位于 *SREBP-2* 内含子上<sup>[3-6]</sup>。miR-33 不仅与其宿主基因共转录, 还一起参与维持机体胆固醇和脂质稳态<sup>[7]</sup>。miR-33 的主要靶基因为 ATP 结合盒转运子 A1/G1 基因 (ATP-binding cassette transporter A1/G1, *Abca1/Abcg1*)。通过与靶基因的 3'-UTR 区相应序列结合, 下调其表达, 进而降低细胞胆固醇的外流、高密度脂蛋白 (High-density lipoprotein, HDL) 的合成及胆固醇的逆转运<sup>[3]</sup>; 此外, miR-33 还能靶向肉毒碱棕榈酰基转移酶 (*CPT1A*)、肉碱 O 辛基转移酶 (*CROT*) 和羟烷基辅酶 A 脱氢酶 B

收稿日期: 2016-03-28

修回日期: 2016-07-08

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31372545, 31402311); 河南省高校科技创新团队支持计划 (14IRTSTHN013); 河南省科技创新杰出青年支持计划 (154100510009); 河南省基础与前沿技术研究项目 (142300410158); 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (13A240548)

**作者简介:** 王俊丽 (1971—), 女, 硕士生导师, 研究方向为生物酶制剂和功能性低聚糖。E-mail: wangjunli1971@126.com

**通信作者:** 聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn

(*HADHB*)等参与脂肪酸 $\beta$ 氧化的相关基因,从而减少脂肪酸的降解<sup>[6]</sup>。最近研究发现,miR-33还可靶向*SREBP-1*<sup>[8]</sup>。miR-33存在缺陷时,*SREBP-1*水平升高,脂肪酸合成增加并积聚于肝和脂肪组织。miR-33<sup>-/-</sup>小鼠出现肥胖和肝脂肪病变的主要机制是由于*SREBP-1*的过表达。

目前关于*SREBP*和miR-33的研究结果虽然大多来自哺乳动物,但有证据表明,二者在脊椎动物中高度保守<sup>[9-10]</sup>。对斑马鱼、大西洋鲑和金头鲷的研究显示,*SREBP-1*和鱼类的糖脂代谢有关,可调节脂肪酸合成或糖代谢相关基因的表达<sup>[9,11]</sup>,在此过程中,miRNAs也可能作为上游因子,通过调控*SREBP-1*的表达而成为*SREBP*调节网络中的重要成员。我们在之前的研究中已克隆出草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)*SREBP-1*基因全长cDNA<sup>[12]</sup>,其中3'-UTR长度为1 282 bp。本研究利用microRNA(miRNA)预测软件预测出该基因3'-UTR序列中含有两个与脂代谢相关的miRNA—miR-33和miR-16的靶序列。为进一步研究*SREBP-1*和miR-33在草鱼脂代谢中的作用及miR-33对*SREBP-1*表达的调控,我们克隆了*SREBP-1*基因3'-UTR区含有miR-33靶序列的碱基片断,构建了含miR-33结合位点的报告基因载体,并在草鱼肝细胞中进行荧光素酶活性检测,明确miR-33在草鱼*SREBP-1*表达中的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

草鱼肝细胞(L8824),购自中国典型培养物保藏中心(China center for type culture collection, CCTCC),呈贴壁生长;质粒pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector、双荧光素酶检测试剂盒Dual-Luciferase Reporter Assay System购自Promega(美国);gc-miR-33 mimic由上海吉玛制药技术有限公司合成;感受态细胞DH5 $\alpha$ 由北京鼎国生物科技有限公司提供。其他试剂有T4 DNA连接酶(Thermo 美国)、2 $\times$  Es Taq Master Mix(CWBIO,北京)、RNAiso Plus、PrimeScript RT Kit(Perfect Real Time)(TaKaRa,大连)、限制性内切酶*Sac* I和*Xba* I(NEB,北京)、无支原体优质胎牛血清(四季青,杭州)、青链霉素(Sigma,美国)、DMEM高糖培养基

(Gibico,上海)和lipofectamine 3000(Invitrogen,上海);主要仪器为全波长多功能酶标仪(Varioskan Flash,Thermo)。

### 1.2 靶向*SREBP-1*基因3'-UTR的miRNA预测

利用microRNA(miRNA)预测软件(<http://regna.mbc.nctu.edu.tw/html/prediction.html>),预测可能与*SREBP-1*基因3'-UTR相互作用的miRNA。按照生物信息学预测规则,寻找符合要求的miRNA。一般要符合两个原则,一是miRNA 5'的第2~8位的核苷酸序列(种子序列)要完全与*SREBP-1*基因的3'UTR互补;二是考虑在不同物种中其保守性高低和结合的自由能大小。

### 1.3 构建pmirGLO-*SREBP-1*-3'-UTR双荧光素酶报告载体

根据本课题组已克隆的*SREBP-1*基因3'-UTR区的碱基序列(KJ162572)和预测出的miR-33所在的靶序列,采用Premier 5.0软件设计PCR引物,序列为:*SREBP-3'UTR-F1*:5'CCCGGGTCTAGATTCTTCCCAACAGTTCATCAC3';*SREBP-3'UTR-R1*:5'CCCGGGGAGCTCATCCAGACGATAACAGGTAA3'(加下划线分别为*Xba* I、*Sac* I酶切位点序列,之前序列为保护碱基,引物的扩增产物长度应为379 bp,位于*SREBP-1*基因3'-UTR的第148~527 bp处)。提取草鱼肝脏总RNA,RT-PCR法获取*SREBP-1*的3'UTR片段。反应体系为:2 $\times$  Taq Master Mix 10  $\mu$ L, Forward primer (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Reverse primer (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 无菌水补足20  $\mu$ L。反应条件为:95  $^{\circ}$ C预变性5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s, 59.4  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min共35个循环;72  $^{\circ}$ C延伸10 min;4  $^{\circ}$ C保存。1%琼脂糖凝胶电泳分析PCR反应产物,并对产物进行纯化。用*Sac* I和*Xba* I对纯化的PCR产物和载体进行双酶切,然后T4酶连接(连接时PCR产物与荧光素酶报告载体的摩尔数之比为3:1,连接体系共10  $\mu$ L)。将连接产物导入DH5 $\alpha$ 感受态细胞进行阳性克隆验证,双酶切及电泳检测正确后,送公司测序鉴定。鉴定正确的重组载体命名为pmirGLO-*SREBP-1*-3'-UTR。

### 1.4 瞬时转染草鱼肝细胞L8824

将构建的pmirGLO-*SREBP-1*-3'-UTR载体感染草鱼肝细胞L8824。采用24孔板进行细胞培养,细胞接种密度为 $5 \times 10^4$ 。在含10%胎牛血清

的 DMEM 培养液, 28 °C 和 5 % CO<sub>2</sub> 条件下, 培养至细胞密度达 70% ~ 85% 时开始转染。转染细胞分为两组: 只转染 pmirGLO-*SREBP-1* 3'-UTR 报告载体的为对照组, 共转染 pmirGLO-*SREBP-1* 3'-UTR 报告载体和 miR-33 mimic 为处理组。每组细胞设 6 个平行。转染方法: 吸去原培养液, 每孔加入 300 μL 新鲜无血清培养液; 然后每孔加入 200 μL 转染试剂 [ 对照组转染试剂: 4 μL 报告载体 (500 ng/μL) + 1.5 μL Lipofectamine 3000 + 1 μL P3000 + 200 μL 无血清培养液; 处理组转染试剂: 4 μL 报告载体 + 1.5 μL Lipofectamine3000 + 1 μL P3000 + 2 μL miR-33 mimics (20 μmol/L) + 200 μL 无血清培养液 ]; 培养箱中培养 48 h 后检测荧光素酶活性。本实验重复 3 次。

### 1.5 荧光素酶活性测定

采用全波长多功能酶标仪, 按照 Promega 公司提供的双荧光素酶检测试剂盒操作说明, 分别检测对照组和处理组的荧光素酶活性。

### 1.6 统计学处理

所有数据用 SPSS 17.0 统计软件进行 *t* 检验。分析结果以平均数 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。当 *P* < 0.05 时表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 靶向 *SREBP-1* 基因 3'-UTR 的 miRNA 预测结果

预测结果显示: *SREBP-1* 的 3'UTR 区存在两个与脂代谢相关的 miRNAs 靶序列, 即 miR-33 和 miR-16。miR-33 的靶序列位于 *SREBP-1* 基因 3'-UTR 的第 433 ~ 463 bp 处, miR-16 位于第 650 ~ 671 bp 处。两个 miRNA 均从第二位碱基开始与靶序列互补配对 (图 1)。

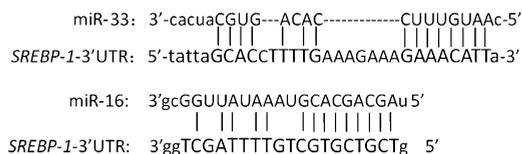


图 1 预测的 miRNA 与 *SREBP-1* 基因 3'UTR 靶序列的互补情况

Fig.1 Base complementation between the predicted miRNAs and target sequences in *SREBP-1* 3'UTR

### 2.2 pmirGLO-*SREBP-1* 3'-UTR 双荧光素酶报告载体的构建与鉴定

根据预测的 miR-33 在 *SREBP-1* 3'-UTR 的靶序列及其所在位置设计引物, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示为一条长度约 380 bp 的条带, 与实际长度 (379 bp) 相符 (图 2), 测序结果证实该片段基因序列完全正确。将扩增片段插入线性化的 pmirGLO 载体, 再用双酶切鉴定, 结果显示酶切后得到的片段与预期片段大小相符 (图 3)。双向测序结果显示, 重组载体中的 *SREBP-1* 3'-UTR 序列与 PCR 产物完全一致, 也与 GenBank 数据库上的吻合, 表明该序列已成功转入 pmirGLO 载体中。

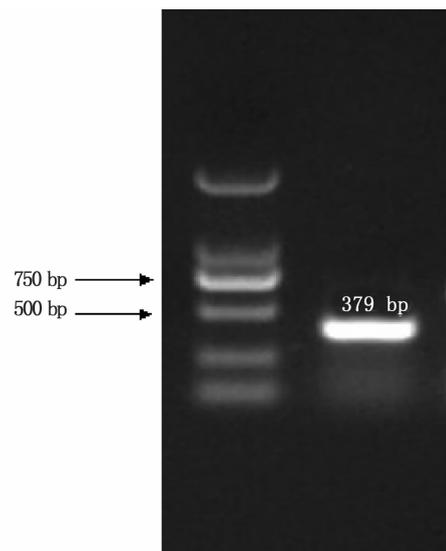


图 2 *SREBP-1* 基因 3'UTR 扩增产物电泳图  
Fig.2 PCR products of *SREBP-1*-3'UTR by 1% agrose gel

### 2.3 转染细胞的荧光素酶活性

对照组 (只转染 pmirGLO-*SREBP-1* 3'-UTR 载体) 和处理组 (共转染 pmirGLO-*SREBP-1* 3'-UTR 载体和 miR-33 mimic) 细胞均检测到荧光素酶活性, 但对照组酶活性 ( $1.417 \pm 0.141$ ) 显著高于处理组 ( $1.064 \pm 0.081$ ) ( $P < 0.05$ , 图 4)。miR-33mimics 显著下调了 pmirGLO-*SREBP-1* 3'-UTR 荧光素酶报告载体的报告荧光, 说明 *SREBP-1* 应是 miR-33 的靶基因。

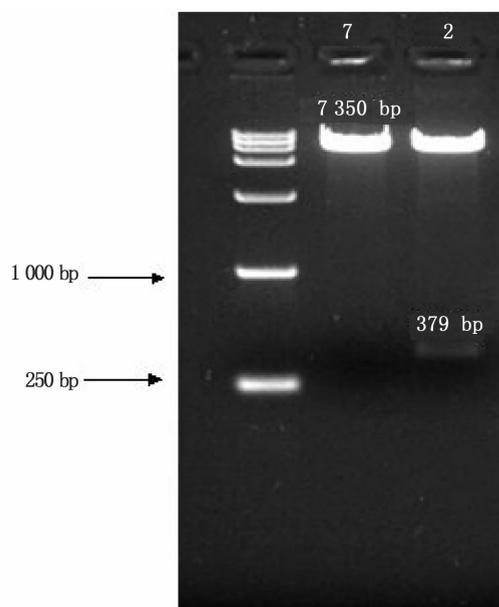


图3 pmirGLO 重组载体双酶切结果  
Fig.3 The double digestion results of pmirGLO recombination plasmid

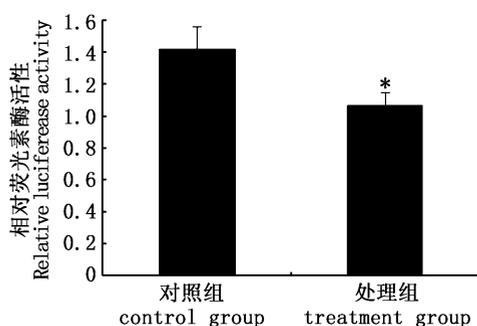


图4 转染细胞的荧光素酶活性  
Fig.4 Relative luciferase activity of transfected cells

### 3 讨论

miRNA 和 SREBP 均是脂代谢调节网络中的重要成员。SREBP 是哺乳动物肝脏脂肪生成基因的主要调节者<sup>[1-2]</sup>,不仅在脂类代谢中发挥重要作用,还参与对葡萄糖的代谢调节<sup>[13]</sup>。miRNA 几乎参与了动物脂代谢的所有调节层次,包括脂肪细胞分化、脂肪组织能量代谢、肝脏脂类代谢和脂类代谢调节相关激素的分泌<sup>[14-15]</sup>。目前已确定包括 miR-33、miR-122、miR-370、miR-378、miR-302a 和 miR-106b 在内的多个 miRNA 参与调控脂类代谢<sup>[16]</sup>,其中 miR-33 定位在 *SREBP* 基

因的内含子上,与 SREBP 共表达,二者共同参与调控机体胆固醇及脂类稳态<sup>[7]</sup>。miR-33a 不仅靶向调控 *Abca1*、*Abcg1*、*CPT1A*、*CROT* 等与细胞胆固醇稳态和脂肪酸氧化相关的基因<sup>[3,6]</sup>,也是 *SREBP-1* 表达的调节因子<sup>[8]</sup>,通过与 *SREBP-1* 3'-UTR 结合下调其表达。虽然已证实 *SREBP-1* 与 miR-33 在脊椎动物中高度保守<sup>[9-10]</sup>,但在鱼类中关于二者的研究并不多。我们在之前的研究中已克隆出草鱼 *SREBP-1* 全长 cDNA<sup>[12]</sup>。为验证草鱼 *SREBP-1* 是否如哺乳动物一样是 miR-33 的靶基因,本研究先通过软件预测靶向 *SREBP-1* 基因的 miRNA,发现 miR-33 和 miR-16 在 *SREBP-1* 的 3'UTR 区均存在可以互补配对的靶序列。为避免假阳性需通过实验的方法验证预测结果是否准确<sup>[17]</sup>。一般采用双荧光素酶检测和免疫印迹进行验证<sup>[18-19]</sup>,本研究选择双荧光素酶基因报告法,通过克隆含 miR-33 结合位点的 *SREBP-1* 的 3'UTR 序列,成功构建了 *SREBP-1*-3'UTR 双荧光素酶基因报告载体,并通过 miR-33 mimics 和报告基因载体共转染草鱼肝细胞 L8824,判断 miR-33 对细胞荧光素酶表达的影响。结果表明,miR-33 mimics 明显下调了 *SREBP-1*-3'-UTR 荧光素酶报告载体的报告荧光,说明 *SREBP-1* 是 miR-33 直接调控的靶基因,miR-33 通过与 *SREBP-1* mRNA 3'UTR 结合,对其进行转录后水平调控。本研究为进一步揭示 miR-33 与 SREBP-1 在草鱼脂代谢调节网络中的作用奠定了理论和材料基础。

### 参考文献:

- [1] HORTON J D, GOLDSTEIN J L, BROWN M S. Brown. SREBPs; activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2002, 109(9): 1125-1131.
- [2] ONO K, HORIE T, NISHINO T, et al. MicroRNA-33a/b in lipid metabolism-novel "Thrifty" models [J]. Circulation Journal, 2015, 79(2): 278-284.
- [3] HORIE T, ONO K, HORIGUCHI M, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (*Srebp2*) regulates HDL in vivo [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(40): 17321-17326.
- [4] MARQUART T J, ALLEN R M, ORY D S, et al. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(27): 12228-12232.

- [5] RAYNER K J, SUÁREZ Y, DÁVALOS A, et al. miR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis [J]. *Science*, 2010, 328(5985): 1570-1573.
- [6] GERIN I, CLERBAUX L A, HAUMONT O, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(44): 33652-33661.
- [7] NAJAFI-SHOUSHTARI S H, KRISTO F, LI Y X, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis [J]. *Science*, 2010, 328(5985): 1566-1569.
- [8] HORIE T, NISHINO T, BABA O, et al. MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2883.
- [9] CARMONA-ANTOÑANZAS G, TOCHER D R, MARTINEZ-RUBIO L, et al. Conservation of lipid metabolic gene transcriptional regulatory networks in fish and mammals [J]. *Gene*, 2014, 534(1): 1-9.
- [10] GHARIPOUR M, SADEGHI M. Pivotal role of microRNA-33 in metabolic syndrome: a systematic review [J]. *ARYA Atherosclerosis*, 2013, 9(6): 372-376.
- [11] EGEE M, METÓN I, CORDÓBA M, et al. Role of Sp1 and SREBP-1a in the insulin-mediated regulation of glucokinase transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(2): 359-367.
- [12] 孙君君, 卢荣华, 杨峰, 等. 草鱼 *SREBP-1* 基因的克隆及糖对其在肝脏中表达的影响 [J]. *水产学报*, 2014, 38(8): 1057-1067.
- SUN J J, LU R H, YANG F, et al. Molecular cloning of SREBP-1 gene and effects of carbohydrates on its expression in liver of *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1057-1067.
- [13] JEON T I, OSBORNE T F. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2012, 23(2): 65-72.
- [14] TARIQ Z, GREEN C J, HODSON L. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. *Liver International*, 2014, 34(7): e180-e190.
- [15] HUA X X, SAKAI J, HO Y K, et al. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(49): 29422-29427.
- [16] 邵芳, 朱斌, 顾志良. microRNA 在脂类代谢中的功能研究进展 [J]. *生命科学*, 2013, 25(7): 676-684.
- SHAO F, ZHU B, GU Z L. Function of microRNAs in lipid metabolism [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(7): 676-684.
- [17] ØROM U A, LUND A H. Experimental identification of microRNA targets [J]. *Gene*, 2010, 451(1/2): 1-5.
- [18] LI S J, LI Z G, GUO F J, et al. miR-223 regulates migration and invasion by targeting Artemin in human esophageal carcinoma [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2011, 18: 24.
- [19] ARAÚJO P R, BURLE-CALDAS G A, SILVA-PEREIRA R A, et al. Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs [J]. *Parasitology International*, 2011, 60(2): 161-169.

## Construction of dual luciferase recombinant vector containing *SREBP-1* 3'-UTR of *Ctenopharyngodon idella* and effect of miR-33 on its expression

WANG Junli<sup>1</sup>, LU Ronghua<sup>2</sup>, QIN Chaobin<sup>2</sup>, CHANG Zhiguang<sup>2</sup>, SUN Junjun<sup>2</sup>, YANG Feng<sup>2</sup>, NIE Guoxing<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxian 453007, Henan, China; 2. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxian 453007, Henan, China)

**Abstract:** To explore the role of miR-33 in the regulation of fat metabolism by sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1), the dual-luciferase reporter assay vector containing SREBP-1 gene 3'-untranslated region of *Ctenopharyngodon idella* has been constructed. The 3'-UTR of *SREBP-1* with miR-33 combining site was first amplified (with the length of 379 bp) and transfected into competent cells (DH5 $\alpha$ ) after being recombined with dual-luciferase reporter assay vector (pmirGLO). Screening and identifying with XbaI and SacI to digest the recombinant vector were then conducted. Finally, the relationship between miR-33 and the 3'-UTR of *SREBP-1* was analysed by the co-transfection of the recombinant vector and miR-33 mimics into L8824 cells. The electrophoretogram of PCR products, the restriction map of recombinant vector, and the result of gene sequencing confirmed that the dual-luciferase reporter assay vector containing 3'-UTR of *SREBP-1* was successfully constructed. In addition, the activity of luciferase expressed by transfected L8824 cells was detected and the expression level of the control was significantly higher than that of the co-transfected group including the recombinant vector and miRNA-33 mimics. The results suggested *SREBP-1* is the target gene of miR-33. By binding to the 3'-UTR region of *SREBP-1*, miR-33 plays an important role in the regulation of post-transcription of SREBP-1.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; SREBP-1; miR-33; 3'UTR; pmirGLO dual-luciferase reporter vector; luciferase activity