

人 MicroRNA-335 阳性对照质粒真核表达载体的构建及意义

温志红, 代 艳, 何 爽

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:2011GXNSFC018019)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院儿科(温志红, 代 艳), 康复科(何 爽)

作者简介: 温志红(1967-), 女, 医学硕士, 硕士生导师, 主任医师, 研究方向: 儿科免疫性疾病和呼吸性疾病的诊治。E-mail: wenzhi-hongde@163.com

[摘要] 目的 构建人 MicroRNA-335 (has-miR-335) 阳性对照质粒表达载体。方法 根据与 has-miR-335 “种子区”完全匹配的序列设计并合成一对互补的寡聚核苷酸链, 经过缓慢降温退火得到目的小片段。将退火产物连接入荧光素酶报告基因载体 pMIR-REPORT 而得到 has-miR-335 阳性对照重组质粒。应用 Lipofectamine 2000 将 has-miR-335 阳性对照重组质粒、pMIR-REPORT 空载体, 分别与 Pre-miRTM microRNA335 Precursor 共转染至 293T/17 细胞, 用双荧光素酶方法检测 has-miR-335 在真核细胞中表达水平。结果 获得 has-miR-335 阳性对照重组质粒, 经测序结果正确。has-miR-335 与其阳性对照结合在真核细胞中的表达下降。结论 成功构建了 has-miR-335 阳性对照质粒表达载体。该载体可用于确认 has-miR-335 实验中 RNA 提取、转染和基因表达检测方法是否可靠。has-miR-335 双荧光素酶报告基因检测体系的建立为进一步进行 has-miR-335 靶基因检测及验证奠定基础。

[关键词] 人 MicroRNA-335; 阳性对照; 质粒; 荧光素酶报告基因载体; pMIR-REPORT

[中图分类号] Q 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)01-0001-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.01.01

Construction of the eukaryotic expression vector for positive control plasmid of human MicroRNA-335 and its significance WEN Zhi-hong, DAI Yan, HE Shuang. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To construct the eukaryotic expression vector for the positive control plasmid of has-miR-335. **Methods** One pair of complementary oligomeric chains of exact matching sequence for has-miR-335 seed region were synthesized, and then target fragments were obtained by annealing. The target fragments were inserted into pMIR-REPORT luciferase reporter vector. We cotransfected 293T/17 cell with the recombinant plasmid or pMIR-REPORT plasmid together with Pre-miRTM microRNA335 Precursor by Lipofectamine 2000. The expression of has-miR-335 in eukaryotic cells was tested by Luciferase Assay. **Results** The positive control recombinant plasmid of has-miR-335 was confirmed by sequencing. The expression of has-miR-335 decreases after combined with its positive control in eukaryotic cells. **Conclusion** The positive control plasmid for has-miR-335 can be used to confirm if the methods of experiments in RNA extraction, gene transfection and expression are reliable. The double luciferase reporter gene detection system of has-miR-335 is constructed successfully, which lays the foundation for testing and validation of has-miR-335 target genes.

[Key words] has-miR-335; Positive control; Plasmid; Luciferase reporter vector; pMIR-REPORT

MicroRNA 在真核生物基因调控中起重要作用, 广泛参与细胞增殖、分化、发育、代谢、凋亡以及免疫反应、肿瘤形成等一系列病理生理进程^[1-3]。MicroRNA 通过与靶基因的 3'非翻译区(3'-UTR)结合

来调控靶基因的表达。靶基因的验证主要方法是通过报告基因试验, 需构建阳性对照表达载体帮助确认目标 MicroRNA 试验检测方法的可靠性。2009~2013 年我们进行 has-miR-335 的系列研究, 构建 has-

miR-335 阳性对照质粒是为进一步研究 has-miR-335 的功能奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 Pre-miRTM microRNA335 Precursor (Pre-miR-335, microRNA335 前体) 质粒提取 质粒购于美国 Ambion 公司, CO₂ 恒温培养箱 37 °C 培养 16 h, 挑选独立白色菌落 10 个, 分别置于 10 ml LB (含 100 μl/ml 羧苄青霉素) 培养液试管中, 37 °C 摇床 175 r/min 振荡 12 h, 抽提质粒。所提取质粒经限制性核酸内切酶 EcoR I、NotI 双酶切, 经美国辛辛那提儿童医学中心测序室测序显示序列正确。CO₂ 恒温培养箱由美国 Thermo Scientific 公司生产, QIAprep Spin Miniprep 质粒提取试剂盒购于美国 QIAGEN 公司, 限制性内切酶购自美国 New England Biolabs (NEB) 公司, 参照说明书进行操作。

1.2 pMIR REPORT 真核表达质粒提取及回收 pMIR REPORT 质粒抽提及纯化见参考文献^[4]。

1.3 pMIR-REPORT-has-miR-335 阳性对照质粒的构建 要求: has-miR-335 阳性对照核苷酸序列与 has-miR-335 的 5' 端第 2~8 个核苷酸 (种子区) 序列完全匹配。方法: 从 miRBase Targets 数据库查找 has-miR-335 核苷酸序列 (3' uguuaaaagcaauaaCGAGAACu 5'), 首先合成与 has-miR-335 结合的靶位点 DNA 序列及互补序列, 5'-GGG CCC ACT AGT ACA TTT TTC GTT ATT GCT CTT GAA AGC TTA AAT TT-3' 及 5'-AAA TTT AAG CTT TCA AGA GCA ATA ACG AAA AAT GTA CTA GTG GGC CC-3'。两条寡聚核苷酸链用 TE 缓冲液稀释成 50 μM 浓度, 各取 10 μl 置于无核酸酶的管中混合, 95 °C 2min, 置温水浴中使其温度在 1~2 h 逐渐降至 30 °C, 得到退火合成的寡聚核苷酸。HinD III 及 SpeI 限制性核酸内切酶双酶切退火合成的寡聚核苷酸插入物和 pMIR-REPORT 真核表达载体。反应体系 (30 μl) SpeI 1 μl, Hind III 1 μl, Buffer 2 3 μl, BSA 0.3 μl。在加入 pMIR-REPORT 4 μg 或寡聚核苷酸插入物 4 μg 后, 置 37 °C 恒温水浴 4 h, 随后 65 °C 20 min 灭活限制性核酸内切酶。将经过上述处理的双链插入序列按 3:1 摩尔浓度连接到 pMIR-REPORT 真核表达载体中, 14 °C 过夜。寡聚核苷酸链由美国集成 DNA 技术公司 (Integrated DNA Technologies) 合成, 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶试剂盒分别购自美国 New England Biolabs (NEB) 公司和 Invitrogen 公司。

1.4 转化 连接产物用热休克法转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 抽提转化后大肠杆菌内的重组

质粒, 方法详见参考文献^[4], 送辛辛那提儿童医学中心测序室进行 has-Mir-335 阳性对照质粒测序分析鉴定。大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自美国 Invitrogen 公司。

1.5 验证 pMIR-REPORT 真核表达载体作为阴性对照来进行验证。

1.5.1 细胞培养及转染 选择 24 孔板在 37 °C CO₂ 恒温培养箱培养 293T7/17 细胞, 待细胞融合 70% 后共转染 has-miR-335 3'UTR 阳性对照载体和 Pre-miR-335 或同等数量纯化的 pMIR-REPORT 载体和 Pre-miR-335, 继续在 37 °C CO₂ 培养箱中培养 48 h。参照美国 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书进行操作。DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.5.2 细胞收集 转染 48 h 后, 吸干细胞培养液, 每孔中的附着细胞用 PBS 洗涤 1 次, 每孔加入 100 μl PLB 细胞裂解液, 在 22 °C (室温) 下水平摇床震荡 15 min。取 96 孔板, 每孔加入 20 μl 裂解细胞培养物, 采用美国 Promega 公司的双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性, 试验重复 3 次。检测仪器为美国 Biotek 公司生产的 synergyTM 2 多功能酶标仪; PLB 细胞裂解液购于美国 Promega 公司。严格按照说明书进行操作。

1.6 统计学方法 应用 Graphpad Prism5 软件进行统计、制图, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 has-miR-335 阳性对照质粒测序显示插入物含 GTTCTCG 序列, 提示 has-miR-335 阳性对照载体中插入序列与 has-miR-335 种子区完全匹配, 即 has-miR-335 阳性对照载体构建成功。

2.2 与阴性对照载体 (pMIR-REPORT 空载体) 比较, 阳性对照表达载体加入 Pre-miR-335 后蛋白表达明显下降 ($P < 0.01$)。见图 1。

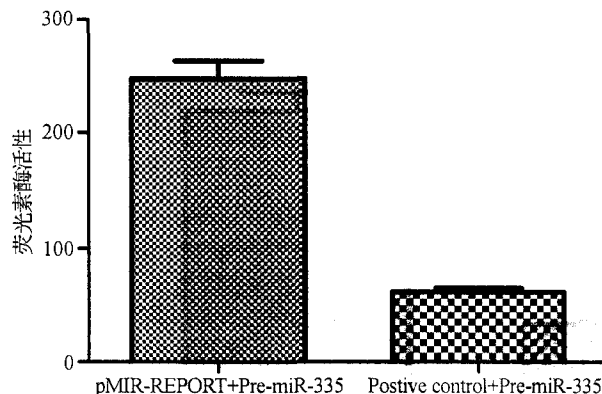


图 1 has-miR-335 在真核细胞中荧光素酶活性

3 讨论

3.1 MicroRNA 通过其转录后调控机制在人体内发挥着非常广泛而重要的调控作用。据预测,人体 30% 的基因受 MicroRNA 的调控^[5]。MicroRNA 5' 端 2-8 核苷酸特定位点(种子区)与其靶标基因的 3' UTR 绑定,完全互补则抑制翻译,不完全互补则使 mRNA 降解,从而对靶基因进行调控^[6-8]。识别 MicroRNA 的靶标基因是认识其调节功能的关键。双荧光素酶报告基因试验(Dual-Luciferase Reporter Assay)是确定 MicroRNA 是否能影响(上调或下调)靶基因的首选研究方法。为保证试验获得有意义的结果,设立必要的阳性对照和阴性对照是非常重要的。因此,构建 has-miR-335 的阳性对照质粒,是我们最终研究目的——has-miR-335 靶基因预测及验证的前提条件之一。

3.2 pMIR-REPORT 真核表达载体包含一个受哺乳动物启动子/终止子系统控制的荧光素酶,荧光素酶基因下游的多克隆位点可插入核苷酸序列。我们所构建阳性对照质粒就是将与 has-miR-335 种子区序列完全匹配的核苷酸序列插入 pMIR REPORT 真核表达载体的多克隆位点中,测序结果表明 has-miR-335 阳性对照质粒构建成功,为下一步进行 has-miR-335 相关试验结果正确判断打下基础。

3.3 Promega 双荧光素酶报告基因检测系统中含有在同一细胞中同时表达的萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶,前者为实验报告基因,而后者作为“内参照”对照报告基因,可减少各种实验条件变化对荧光素酶检测的影响,增加实验数据的可信度。293T 细胞贴壁能力强,容易培养且转染效率高,适于进行荧光素酶报告基因分析^[9]。本研究 293 T7/17 细胞共转染构建成功的 has-miR-335 阳性对照表达载体、MicroRNA335 前体或 pMIR-REPORT 空载体、MicroR-

NA335 前体,收集细胞后采用双荧光素酶报告基因检测系统测定 has-miR-335 表达水平。MicroRNA335 前体共转染入真核细胞后,由自带的核糖核酸酶 Dicer 切割,可形成与内源性成熟 MicroRNA335 化学结构及生物功能一致的功能性单链,与人工构建的 MicroRNA335 互补位点(阳性对照)结合。结果表明与阴性对照质粒相比,阳性对照质粒加入 MicroRNA335 前体后蛋白表达明显下降,与预测结果相符,提示 has-miR-335 在 293 T7/17 细胞起下调蛋白表达作用。has-miR-335 阳性对照表达载体成功构建及 has-miR-335 下调真核细胞蛋白表达的预测对今后 has-miR-335 靶基因预测及其功能研究提供良好的试验基础。

参考文献

- 1 Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer [J]. Cancer Sci, 2010, 101(11): 2309-2315.
- 2 滕尧树,曹晓林,李 勇. microRNA 在气道变应性疾病中的研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(1): 114-118.
- 3 刘 煜,李 华,李 东,等. MicroRNA-1 对肝癌细胞 BAG4 表达的影响[J]. 免疫学杂志, 2014, 36(6): 479-482, 487.
- 4 温志红,代 艳,何 爽. CCL11 和 CCL26 基因 3'UTR 真核表达载体的构建和意义[J]. 中国临床新医学, 2013, 7(1): 5-7.
- 5 Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease[J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 827-887.
- 6 Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles[J]. Cell, 2009, 136(1): 26-36.
- 7 Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels [J]. Nature, 2010, 466(7308): 835-840.
- 8 Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA [J]. Cell, 2013, 153(3): 516-519.
- 9 琚丽萍,邱妙颜,陈 瑛,等. 构建 psiCHECK-2-解耦联蛋白 2 双荧光素酶报告基因及其荧光素酶活性的分析[J]. 内科理论与实践, 2013, 8(6): 414-418.

[收稿日期 2014-09-25][本文编辑 黄晓红]

书写文稿摘要、关键词和作者简介的要求

根据国家新闻出版广电总局发出的(1999)17 号文件精神,入编正式期刊要执行《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》,为此,来稿中请书写摘要、关键词和作者简介。论著摘要采用结构式摘要,内容包括目的、方法、结果、结论,“四要素”连排,不分段。其他文体可采用报道指示性摘要。摘要均用第三人称写法。关键词尽可能选用《医学索引》(Index Medicus)的医学主题词表(MeSH)中的词语。重点文稿还须增加英文摘要及关键词。作者简介包括姓名、出生年、性别、学历、学位、职称、研究方向(任选)等。