

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000061

人 miR-134 真核表达载体的构建及其鉴定

王明菊, 张 亮, 白顺杰, 杨 柳, 周婵娟, 房 亮, 谢 鹏

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建包含外源性 miR-134 前体的真核表达载体, 并使其在人类少突胶质瘤(oligodendroglia, OL)细胞中表达, 为进一步研究 miR-134 的功能及作用靶标提供技术支持。**方法:**从人类 OL 细胞基因组 DNA 扩增 miR-134 前体, 将所得目的片段克隆到 pEGFP-N1 载体上, 重组质粒经测序鉴定后将其转染至人类 OL 细胞中, 荧光倒置显微镜观察增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的表达情况, 并采用荧光定量 PCR 检测 miR-134 基因水平的表达。**结果:**pEGFP-miR-134 重组质粒经酶切、PCR 鉴定可见目的条带与预期结果一致, 经测序可见插入序列正确。将重组质粒转染 OL 细胞后, 荧光定量 PCR 结果示 pEGFP-N1 空质粒转染组与空白对照组的 miR-134 表达水平无统计学差异($P=0.882$); pEGFP-miR-134 质粒转染组 miR-134 表达水平是 pEGFP-N1 空质粒转染组的 52 倍, 两者具有统计学差异($P=0.023$)。**结论:**通过构建真核细胞表达质粒可以高效表达外源性 microRNA 分子, 为后续的研究奠定实验基础。

【关键词】miR-134; 微小 RNA; 真核表达载体; 转染**【中图分类号】**R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-10-07

Construction and identification of human eukaryotic expression vector of hsa-miR-134

Wang Mingju, Zhang Liang, Bai Shunjie, Yang Liu, Zhou Chanjuan, Fang Liang, Xie Peng

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the eukaryotic expression vector containing exogenous miR-134 precursor, to study its expression in the human oligodendroglia(OL) cells and to provide the technical platform for further studying the function of miR-134 and its target gene. **Methods:** miR-134 precursor sequence was amplified from the human genomic DNA and cloned into pEGFP-N1. After being confirmed by PCR and sequencing, recombinant plasmid was transfected into human OL cells and transcription level of miR-134 was detected by real-time PCR. In addition, transcription efficiency was monitored by the inverted fluorescence microscopy. **Results:** The target bands were consistent with the expected results by enzyme digestion and PCR identification, and the inserted sequence was correct in gene sequencing detection. After the recombinant plasmid being transfected into OL cells, fluorescence quantitative PCR detection showed that there was no difference between pEGFP-N1 empty plasmid group and control group in the expression level of miR-134($P=0.882$). Moreover, the miR-134 expression level of pEGFP-miR-134 plasmid transfected group was 52 times over that of pEGFP-N1 empty plasmid group, with significant statistical differences($P=0.023$). **Conclusions:** The miR-134 expression vector is successfully constructed, which paves the way for the future experiment.

【Key words】miR-134; microRNA; eukaryotic expression vector; transfection

微小 RNA(microRNAs, miRNAs)是一类内生的、长度约为19~23个核苷酸的非编码小 RNA^[1],是由约70~90个碱基大小的单链 RNA 前体经 Dicer 酶加工后生成^[2],功能比较复杂。其由基因编码,从 DNA 转录而来,但不翻译成蛋白^[3]。成熟 miRNAs 可以特异

性的识别和结合靶基因 mRNA 的 3'-非编码区(3'-UTR)^[3],从而促进靶基因 mRNA 降解或者抑制翻译,对真核细胞的基因表达、细胞增殖与凋亡、细胞分化、组织发育和干细胞的自我更新等多方面起调控作用^[4]。miRNAs 作为一种主要的小 RNA,已经成为生命科学研究的热点,并取得了重大突破。越来越多的研究发现 miRNAs 在调控机体正常生理功能的同时也与疾病的发生密切相关,参与了肿瘤、动物病毒性感染、心血管疾病、糖尿病、人类遗传性疾

作者介绍:王明菊, Email: wangmingju1988@hotmail.com,

研究方向:神经精神疾病。

通信作者:谢 鹏, Email: xiepeng@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家重大科学研究计划资助项目(编号:2009CB918302)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000061.html>

病甚至神经系统重大疾病的发生^[4],其有可能在临床疾病诊断和治疗中发挥重要作用。

miR-134 作为庞大的 miRNAs 家族成员之一,其在大脑组织中的表达丰度比较高,定位于人类染色体 14q32.31^[5],参与了多种病理和生理过程。本研究成功构建了能够表达成熟 miR-134 分子的真核表达质粒,通过脂质体转染法,将重组 miR-134 表达载体转染入人类少突胶质瘤(oligodendroglia, OL)细胞中。随后,检测该质粒是否能够在细胞中顺利表达外源性的 miRNAs,从而为 miR-134 参与的基因调控以及相关疾病的机理提供了一个很好的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 pEGFP-N1 质粒载体为哈尔滨医科大学张凤民教授惠赠,包含 CMV 启动子、增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)报告基因、卡那霉素抗性基因;大肠杆菌 DH5 α 购自天根生化科技有限公司;人类 OL 细胞由德国柏林自由大学路德维希教授惠赠。

1.1.2 仪器与试剂 PCR 仪(PTC-200 DNA Engine cycler, BIO-RAD),凝胶成像系统(ChemiDoc III, Bio-Rad),恒温振荡器(ZHwY-103B, 上海智城),分光光度计(NanoDrop 1000, Thermo),离心机(Heraeus Fresco 21, Thermo),CO₂培养箱(SERIES II, Thermo),超净工作台(SW-CJ-1D, 苏州净化),限制性内切酶 *Pst* I、*Bam*H I (大连宝生物公司),T4 连接酶(大连宝生物公司),DNA Marker(大连宝生物公司),天根 DP103-离心柱型质粒小提试剂盒,A 型小量 DNA 片段快速回收试剂盒(北京博大泰克),柱式浓缩型 PCR 产物纯化试剂盒(上海华舜),LB 培养基为实验室自配(胰蛋白胨和酵母提取物为英国 OXOID 产品,NaCl 购于上海生工),Dulbecco's modification of eagle medium/High glucose (DMEM/Hyclone),胎牛血清(Hyclone),青/链霉素浓缩液(Hyclone),质粒转染试剂盒(Invitrogen 公司),荧光定量 PCR 试剂 All-in-one qPCR Mix (Genecopoeia)。

1.2 方法

1.2.1 miR-134 真核表达质粒的构建及鉴定

1.2.1.1 目的片段的扩增 依据 Sanger miRBase 数据库(<http://www.mirbase.org>)收录的 miRNA 数据,找到 hsa-miR-134 的成熟序列(5'-UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG-3'),其前体序列 pre-hsa-miR-134(5'-CAGGGUGUGACUGGUU-GACCAGAGGGGCAUGCACUGUGUACCCUGUGGGCCAC-CUAGUCA-CCAACCCUC-3'),通过人类基因组 BLAST 数据库找到 pre-hsa-miR-134 的定位,并且向其两端侧翼序列延伸得到一段序列。根据 pre-miR-134 序列设计引物,扩增产物的总长度约为 290 bp。上游引物 5'-AACTGCAGAGCTGTG-GTTCTGT-3',下游引物 5'-CGCGGATCCCGTGTTCATCGCA-

3',下划线为酶切位点,上游引物的酶切位点为 *Pst* I,下游引物为 *Bam*H I,引物由上海英俊生物技术有限公司合成。用 PCR 的方法从人类 OL 细胞基因组中扩增含有 miR-134 基因的目的片段。PCR 反应条件为:95 °C 2 min;95 °C 30 s, 60 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 5 min。PCR 结束后,先取 5 μ l 产物上样进行 1%琼脂糖凝胶电泳,观察是否获得目的条带,如条带大小正确,则进行第 2 次电泳,上样 40 μ l,电泳结束切取目的条带,按博大胶回收试剂盒说明书回收目的片段。

1.2.1.2 表达载体的连接、测序及序列分析 将回收 hsa-miR-134 基因的 PCR 产物和载体 pEGFP-N1 分别用 *Pst* I 和 *Bam*H I 限制性核酸内切酶进行双酶切,37 °C 2.5 h。1%琼脂糖凝胶电泳,用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收酶切后的目的片段和载体大片段。22 °C 3 h 连接目的片段和载体,转化 DH5 α 感受态细胞,用卡那抗性的 LB 固体培养基初步筛选阳性克隆,挑选阳性单克隆接种 LB 液体培养基中,37 °C (220 r/min)震荡培养过夜,第 2 天提取菌液中的质粒,送上海英俊公司测序。测序的结果和 miRNA 的前体序列用 Vector NTI 软件及 Align 程序进行序列比对分析。构建成功的质粒载体命名为 pEGFP-miR-134。

1.2.2 细胞培养和转染 细胞转染参照 Lipofectamine LTX 和 Plus Reagents 说明书(Invitrogen 公司)进行。复苏人类 OL 细胞,用含 10% FCS 的 DMEM 培养基培养至对数生长期,经细胞计数后于 6 孔板中加入 2.5×10^5 个细胞/孔。第 2 天待细胞生长密度达到 60%~80%左右,用无血清培养基清洗细胞后加入 DNA/脂质体混合物,6 h 后改用完全培养基。转染时分为 pEGFP-miR-134 组、pEGFP-N1 空质粒组以及空白对照组,并且每组设置 3 个复孔。

1.2.3 荧光显微镜观察 重组质粒转染人类 OL 细胞 48 h 后,将各组细胞放置于倒置荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况,并采集图像。

1.2.4 qRT-PCR 检测成熟的 hsa-miR-134 的表达情况 转染 48 h 后收集细胞,采用 Trizol 法(Invitrogen 公司)提取总 RNA,紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和纯度,按照 All-in-one miRNA qRT-PCR detection kit 操作说明采用 poly A 加尾法进行反转录反应。qRT-PCR 反应体系:2 $\times$ All-in-One qPCR Mix 10 μ l;上游引物(2 μ mol/L)2 μ l;下游引物(2 μ mol/L)2 μ l;cDNA 模板 10 ng;补足 ddH₂O 至总体积 20 μ l。反应条件:预变性 95 °C 10 min;变性 95 °C 10 s,退火 60 °C 20 s,延伸 72 °C 20 s,40 个循环,延伸阶段收集荧光信号。所涉及的基因 qPCR 扩增引物序列如下:hsa-miR-134 上游引物为 5'-ACACTCCAGCTGGGTGTGACTGTTGACC-AGAGG-3',下游引物为通用引物;U6 上游引物为 5'-GCTT-CGGCAGCACATATACTAAAT-3',下游引物为通用引物。本研究实验结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} 法进行相对表达量统计计算。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,对数据进行单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

miRNAs 以单拷贝、多拷贝或基因簇等多种形式广泛存在于真核生物基因组中,这些小 RNA 能

够识别特定的靶基因,具有转录后调控基因表达的功能^[3,6]。1993 年 Lee 等^[7]研究人员在秀丽线虫中发现了第一个 miRNAs 基因 lin-4,它不编码蛋白质但能调控靶基因 lin-14^[7-8]及 lin-28^[9]的表达。Reinhart 等^[10]于 2000 年发现了第二个具有转录后调节功能的 miRNAs,即 let-7,其作用是控制发育过程中的基因表达。这些研究起初并没有得到科学家足够的重视,直到 2003 年以后,这种小 RNA 分子的大作用才不断被发现,miRNAs 研究的突破性进展,是生物医学领域近二十年来,可与人类基因组计划相提并论的最重大成果之一。近年来,关于 miRNAs 的研究已经从小 RNA 表达检测、功能机制的阐明,转移到 miRNAs 靶基因的辨认。

目前人类基因组中已被确认的 miRNAs 大约有四百多个,可能参与人类约 30%蛋白质的表达调控^[11]。miRNAs 在不同组织、不同细胞间的表达谱表现特征不同,因此其表达谱可以作为某些组织或细胞的特异性分子标志^[12]。有研究发现大量 miRNAs 在大脑和神经细胞系中表达,且伴随着神经系统发育不断完善,miRNAs 的表达量也呈现出不同程度的上调或下调^[13]。越来越多的研究表明,miRNAs 在神经系统发育、神经元分化、突触可塑性等方面具有调节作用,中枢神经系统中许多病理改变也涉及到 miRNAs,包括了脑肿瘤、神经退行性疾病、脑血管疾病以及精神疾病等^[14]。然而 miRNAs 调节神经系统功能的研究尚处于初级阶段,其与神经系统疾病发生和发展的关系尚未研究得十分透彻。

有研究提示^[15]miR-134 在人类少突胶质细胞瘤、胶质母细胞瘤组织及恶性胶质瘤细胞系 U87 中表达量下调,其异常表达通过抑制 Nanog 基因的表达抑制了胶质瘤细胞的增殖、侵袭及迁移能力同时促进了细胞凋亡,这表明 miR-134 有可能成为潜在的生物标志物用于诊断脑肿瘤。Tay 等^[16]最新研究结果显示 miR-134 在促进胚胎干细胞向外胚层细胞谱系分化中起到重要作用。另外,miR-134 可以在转录后水平调控其靶基因 cAMP 应答元件结合蛋白 (CAMP response element binding protein, CREB) 的表达从而影响记忆功能和神经可塑性^[17]。但要对 miR-134 功能进行深入探究,仍需依赖于在特定的细胞或组织中外源性抑制或过表达 miR-134,然后检测其在生理病理学方面引起的变化。因此,构建 miRNAs 真核表达质粒是非常必要的。

本研究成功合成了 pre-miRNA-134 核酸片段,并且将其与携带有 CMV 启动子的真核表达载体相连接。测序检测结果表明,包含 pre-miRNA-134 的 DNA 片段成功插入到 pEGFP-N1 质粒中。利用脂质体转染法将 pEGFP-miR-134 质粒转染至人类 OL

细胞,获得瞬时转染重组质粒的细胞系,经 qPCR 鉴定 miR-134 的基因表达水平与正常人类 OL 细胞相比明显升高,这为进一步研究小分子 RNA 作为神经精神系统性疾病靶向生物治疗提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] 汪进业,蔡 荣,罗本燕.MicroRNA 与神经系统重大疾病[J].生物化学与生物物理进展,2009,36(1):25-32.
- [2] Ando T, Yoshida T, Enomoto S, et al. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect[J]. Int J Cancer, 2009, 124(10): 2367-2374.
- [3] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] 赵 奎, 庞全海. MicroRNA 研究进展[J]. 生物技术通报, 2010, 12(5): 7-11.
- [5] Fiore R, Khudayberdiev S, Christensen M, et al. Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels[J]. EMBO J, 2009, 28(6): 697-710.
- [6] Guarnieri DJ, DiLeone RJ. MicroRNAs: a new class of gene regulators[J]. Ann Med, 2008, 40(3): 197-208.
- [7] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C.elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [8] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C.elegans[J]. Cell, 1993, 75(5): 855-862.
- [9] Moss EG, Lee RC, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C.elegans and is regulated by the lin-4 RNA[J]. Cell, 1997, 88(5): 637-646.
- [10] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
- [11] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? [J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(3): 118-126.
- [12] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in caenorhabditis elegans[J]. Science, 2001, 294(5543): 862-864.
- [13] Smith B, Treadwell J, Zhang D, et al. Large-scale expression analysis reveals distinct microRNA profiles at different stages of human neurodevelopment[J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11109.
- [14] Liu NK, Xu XM. MicroRNA in central nervous system trauma and degenerative disorders[J]. Physiol Genomics, 2011, 43(10): 571-580.
- [15] Niu CS, Yang Y, Cheng CD. MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression[J]. Int J Oncol, 2013, 42(5): 1533-1540.
- [16] Tay YM, Tam WL, Ang YS, et al. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1[J]. Stem Cells, 2008, 26(1): 17-29.
- [17] Gao J, Wang WY, Mao YW, et al. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134[J]. Nature, 2010, 466(7310): 1105-1109.

(责任编辑: 关蕴良)