

【作者】	周锐, 甘露
【单位】	四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室心血管疾病研究室1, 四川成都
【卷号】	37
【发表年份】	2009
【发表刊期】	22
【发表页码】	10433-10436
【关键字】	微RNA; 信使RNA非翻译区; 荧光素酶报告系统
【摘要】	<p>[目的] 利用分子克隆技术, 构建一套体外miRNA/mRNA 3' UTR interactions reporter system 并鉴定其功能。 [方法] 分别以质粒 pIRES2 EGFP、pGL3 Control为模板PCR扩增EGFP, Luciferase编码序列, 并依次在5', 3' 添加酶切位点 Xho I、Hin dIII, 定向克隆到pBluescript KS( )中的多克隆位点中, 利用该载体中的多克隆位点序列使用 Xho I、Not I 酶切获取3' 带有一段常用酶切位点的多克隆序列, 最后定向克隆到pIRES2 EGFP中, 由于取代了前者中的核糖体进入位点序列(IRES)及EGFP, 而其载体骨架为pUC系列且克隆片段下游增加了一段包括 Hin dIII、EcoR I、Bam HI、Xba I、Not I 等常用酶切位点的多克隆位点序列, 为miRNA及mRNA 3' UTR的构建提供了便利的条件, 故新构建载体分别取名为pUC EGFP MCS, pUC Luciferase MCS。构建pUC EGFP pre miRNA1及pUC Luciferase HDAC4 3' UTR共转染HEK293 T细胞, 使用荧光定量PCR检测miRNA1的过表达情况并测定相对荧光素酶活性, 以检测所建立系统是否有效。 [结果] 所构建载体pUC EGFP MCS、pUC Luciferase MCS 经酶切及测序证明构建正确; 阳性对照组pUC EGFP pre miRNA1及pUC Luciferase HDAC4 3' UTR共转染细胞后miRNA1得到有效表达且相对于对照组, 即pUC EGFP MCS, pUC Luciferase HDAC4 3' UTR, 试验组的相对荧光素酶活性显著降低。 [结论] 成功构建In vitro miRNA/mRNA 3' UTR interactions reporter system, 为体外筛选鉴定miRNA/mRNA 3' UTR interactions提供了一个有力的技术平台。</p>
【附件】	 <a href="#">PDF下载</a> <a href="#">PDF阅读器下载</a>

关闭