

体外微 RNA/信使 RNA 3' 非翻译区相互作用报告系统的构建及鉴定

周锐¹, 甘露² (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 I, 四川成都 610041)

摘要 [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、*Hind*III, 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 *Hind*III、*Eco*RI、*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。

关键词 微 RNA; 信使 RNA 非翻译区; 荧光素酶报告系统

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)22-10433-04

Construction and Identification of In-vitro miRNA/mRNA-3'UTR Interactions Reporter System

ZHOU Rui et al (The Laboratory I of Cardiovascular Diseases, The National Key Laboratories for Biotherapy, West-China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041)

Abstract [Objective] To construct and identify in-vitro miRNA/Mrna-3'utr interactions reporter system by molecular cloning method. [Method] EGFP, Luciferase coding region sequence were amplified by PCR using pIRES2-EGFP, pGL3-Control as template respectively and was directionally cloned into pBluescript-KS(-) using enzyme *Xho*I, *Hind*III. And then recombinant was digested using *Xho*I, *Not*I enzyme to obtain target inserts with MCS (multiple cloning sites) sequence in downstream and the final target vector whose IRES (internal ribosome entrance site) and EGFP sequence were deleted, and its vector frame is pUC system, cloning fragment downstream increased multiple cloning sites of common use enzyme sites including *Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI, *Xba*I, *Not*I and son on. Then, in-vitro miRNA/Mrna-3'utr interactions reporter system were constructed by using directional cloning, which is composed of miRNA expression vector--pUC-EGFP-MCS and mRNA-3'UTR reporter vector--pUC-Luciferase-MCS. At last, the level of mature miRNA1 was examined by Cyber green realtime RT-PCR and relative luciferase activities were determined in order to identify whether the system had been constructed successfully after pUC-EGFP-pre-miRNA1 and pUC-Luciferase-HDAC4-3'UTR were co-transfected into HEK 293-T cell as positive control. [Result] The result of DNA sequencing and restricted enzyme digest showed that both pUC-EGFP-MCS and pUC-Luciferase-MCS were constructed correctly. Co-transfection of pUC-EGFP-pre-miRNA1 and pUC-Luciferase-HDAC4-3'UTR showed that mature miRNA1 were expressed effectively. Moreover, compared to the negative control, the relative luciferase activities from the positive control were reduced significantly. [Conclusion] In-vitro miRNA/mRNA-3'UTR interactions reporter system were constructed successfully. The system can be used as an effective technical platform to screen and identify miRNA/mRNA-3'UTR interactions.

Key words MicroRNA; mRNA-3'UTR; Luciferase reporter system

miRNA 是一类大小约 21~23 个核苷酸(nt) 的非编码 RNA 分子, 一般来源于染色体的非编码区域, 由大约 70 个核苷酸大小的可形成发夹结构的前体加工而来, 其作用是在转录后水平上对基因表达产生抑制性作用^[1-5]。新近研究证明, miRNA 可能在生物的早期发育^[6]、细胞增殖和死亡^[7]、细胞程序性死亡和脂肪代谢^[8]、细胞分化^[9-10]等方面是关键性的调节因子, 此外通过同源重组获得的特定 miRNA 基因敲除小鼠显示出免疫缺陷^[11]以及心脏功能缺陷^[12], 提示 miRNA 的表达失调将导致疾病的发生。目前关于 miRNA 的研究主要集中在新 miRNA 基因的发现以及 miRNA 靶基因的找寻及其功能。新近的报道预测人类基因组中至少有近 1 000 个 miRNA 基因^[13-14], 而近 500 个已被陆续证实^[15]。然而只有很少一部分 miRNA 知道其靶基因及其功能, 因此找寻并鉴定 miRNA 未知靶基因显得尤为重要。目前惯用的做法是首先通过生物信息学网站对感兴趣的 miRNA 靶基因进行预测, 再通过体外报告系统, 靶基因蛋白检测以及生物学功能检测来鉴定^[16]。笔者通过对现有载体 pBluescript-KS(-) 多

克隆位点序列的利用, 重新对 pIRES2-EGFP 实施改造构建, 分别得到了带有 EGFP 序列的 miRNA 表达载体 pUC-EGFP-MCS 及 mRNA-3'UTR 荧光素酶报告载体 pUC-Luciferase-MCS, 组成了体外筛选和鉴定 mRNA-3'UTR 相互作用的报告系统, 并且通过构建 pUC-EGFP-pre-miRNA1 及 pUC-Luciferase-HDAC4-3'UTR 共转染 HEK293-T 细胞, 证明该报告系统的可靠性, 以期成为一个体外筛选鉴定 miRNA/mRNA-3'UTR interactions 有力的技术平台。

1 材料与方法

1.1 材料 pGL3-Control 载体、pBluescript-KS(-) 载体、pIRES2-EGFP 载体、pRL-SV40 均为四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室保存; pMD18-T 载体购自大连宝生物工程公司; URIZol 试剂、质粒抽提试剂盒由 Omega 公司提供; 胶回收试剂盒由 Qiagen 提供; 限制性内切酶由 Fermentas 公司提供; T4DNA 连接酶、*Taq* 酶、PCR 试剂盒系大连宝生物工程公司生产; M2MLV 逆转录酶试剂盒购自 Promega 公司; 大肠杆菌 DH5a、HEK293-T 细胞株由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室保存; DMEM 培养基, 新生牛血清购于 Gibco 公司; 转染试剂 JETPEI™ 购自武汉华瑞康生物科技有限公司; 常规生物化学试剂购自溶海生物工程公司。

作者简介 周锐(1982-), 男, 山西交口人, 硕士研究生, 研究方向: 心肌细胞钙离子的释放及调控。

收稿日期 2009-05-12

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 EGFP、Luciferase、pre-miRNA1 及 HDAC4-3' UTR。使用 Primer 5.0 软件设计引物,并分别在其上下游引物 5'端设计对应酶切位点,分别以质粒 pIRES2-EGFP、pGL3-Control 为模板,PCR 扩增 EGFP、Luciferase 片段。使用苯酚抽提法提取 C57 野生型小鼠组织 DNA,以 DNA 为模板,PCR 扩增 pre-miRNA1 基因。用 TRIzol 一步法提取 C57 野生型小鼠组织总 RNA,用随机 6 聚体引物和 M2MLV 逆转录酶将细胞总 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,PCR 扩增 HDAC4-3'UTR 序列。

1.2.2 构建 pMD18-T-EGFP/Luciferase/pre-miRNA1/HDAC4-3'UTR。PCR 产物经凝胶电泳分离,凝胶回收试剂盒回收目的片段,与 pMD18-T 载体连接,限制性酶酶切及测序鉴定阳性重组体。

1.2.3 构建重组质粒 pBluescript-KS(-)-EGFP/Luciferase。使用 Xho I、Hind III 酶切 pMD18-T-EGFP、pMD18-T-Luciferase 以获得重组目的片段,使用 Xho I、Hind III 酶切 pBluescript-KS(-)以获得重组目的载体,目的片段 EGFP、Luciferase 分别与目的载体连接,限制性酶酶切鉴定。

1.2.4 构建终目的重组质粒 pUC-EGFP-MCS/pUC-Luciferase-MCS 以及 pUC-EGFP-pre-miRNA1/pUC-Luciferase-HDAC4-3' UTR。

(1) 构建终目的重组质粒 pUC-EGFP-MCS/pUC-Luciferase-MCS。使用 Xho I/Not I 酶切 pBluescript-KS(-)-EGFP、pBluescript-KS(-)-Luciferase 以获得重组目的片段,使用 Xho I/Not I 酶切 pIRES2-EGFP 以获得重组目的载体,3'端带有一段多克隆位点序列的目的片段 EGFP、Luciferase 分别与目的载体连接,限制性酶酶切鉴定。

(2) 构建 pUC-EGFP-pre-miRNA1/pUC-Luciferase-HDAC4-3' UTR。方法同上。

1.2.5 细胞培养和转染试验。为检测该系统是否有效,

HEK193-T 细胞转染前 1 d 以每孔 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板中,用含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养基,37 °C、5% CO₂ 条件下培养,24 h 至 50% ~ 60% 融合度,用 JETPEI™ 转染细胞 (n = 3),每孔 2.2 μl JETPEI™ + 200 ng pUC-EGFP-pre-miRNA1 + 200 ng pUC-Luciferase-HDAC4-3'UTR + 100 ng pRL-SV40(内参) + 110 μl 50 nmol/L NaCl。对照组转染等剂量 pUC-EGFP-MCS 空载体、pUC-Luciferase-HDAC4-3'UTR 及 pRL-SV40(内参),空白对照组未作任何处理。48 h 后观察荧光检测荧光素酶活性。

1.2.6 荧光定量 RT-PCR 检测 mature miRNA1 的表达。以每孔 1×10^5 个 HEK193-T 细胞接种于 6 孔板中,24 h 后转染转染组 (n = 2) 转入 500 ng pUC-EGFP-pre-miRNA1。对照组 (n = 2) 转入 500 ng pUC-EGFP-MCS。24 h 后观察一光估计转染效率,收集细胞提取总 RNA,利用引物延伸法原理^[17]使用 miRNA 特异引物逆转录 mature miRNA1,在使用荧光定量 PCR 检测 mature miRNA1 的表达情况。

1.2.7 荧光素酶活性测定。转染前荧光显微镜下观察荧光估计转染效率,按试剂盒(Promega)说明书操作,弃掉细胞培养基,PBS 冲洗细胞 2 次,加入 $1 \times$ RLB 裂解液,放置室温 10 min 后,吹打细胞,收集细胞裂解液。荧光素酶活性测定:荧光测定管中加 100 μl LAR II(luciferase assay reagent),再加细胞裂解液 20 μl,放置发光仪中,测定 pUC-Luciferase-HDAC4-3'UTR/ pUC-Luciferase-MCS 中的 firefly 荧光素酶活性,读数为 M1;立即加入 100 μl Stop & Glo® Reagent 吹打或轻微旋涡震荡以混合,将萤光光度计试管置于萤光光度计中并开始读数并记录内参 pRL-SV40 中的 Renilla Luciferase 活性值,读数为 M2。用 M1/M2 比值表示相对荧光素酶活性。

2 结果与分析

2.1 构建系统载体流程 示意图见图 1。

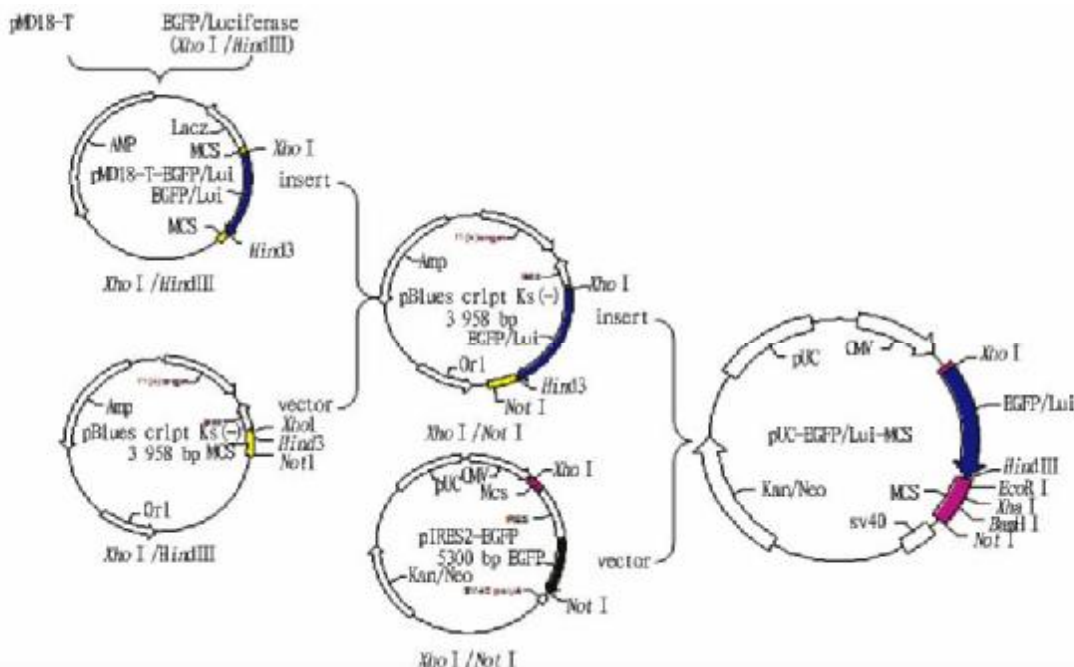


图 1 构建系统载体流程示意

Fig.1 Process schematic diagram of constructed system vector

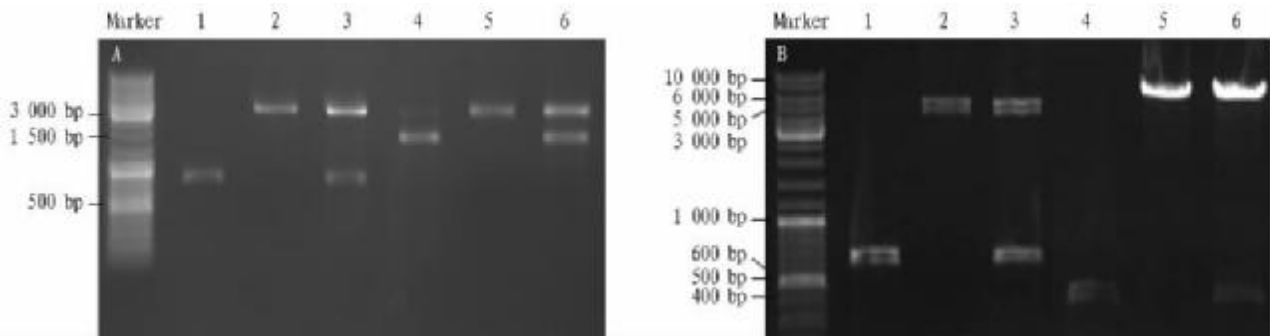
2.2 构建载体

(1) 构建 pMD18-T-EGFP, Luciferase, pre-miRNA1、HDAC4-3'UTR. RT-PCR 扩增 EGFP、Luciferase、HDAC4-3'UTR 及以基因组为模板 PCR 扩增 pre-miRNA1, 纯化, 构建 T 载体, 测序均正确无突变。

(2) 构建 pBluescript-KS (-)-EGFP、Luciferase。酶切 pMD18-T-EGFP, Luciferase 并纯化获取目的片段 EGFP, Lucif-

erase 克隆至 pBluescript-KS(-) 载体, 重组质粒 pBluescript-KS (-)-EGFP, Luciferase 经酶切检测正确。

(3) 构建 pUC-EGFP-MCS、pUC-Luciferase-MCS、pUC-EGFP-preMicroRNA1、pUC-Luciferase-HDAC4-3' UTR。方法同上, 酶切检测结果见图 2, 图 2 中 A 为 pUC-EGFP-MCS、pUC-Luciferase-MCS; B 为 pUC-EGFP-preMicroRNA1、pUC-Luciferase-HDAC4-3' UTR。



注: 图 2 A 中 1, 4 为重回收纯化组质粒 pBluescript-KS(-)-EGFP/Luciferase 经 *Xho*I/ *Not*I 双酶切回收纯化的插入片段 EGFP、Luciferase。2, 5 为 *Xho*I/ *Not*I 双酶切 pIRES2-EGFP 纯化后的骨架载体。3, 6 为重组质粒 pUC-EGFP-MCS / pUC-Luciferase-MCS 经 *Xho*I/ *Not*I 双酶切鉴定。图 2B 中 1 为 pMD18-T-pre-miRNA1 *Hind*III/ *Xba*I 双酶切回收纯化插入片段; 2 为 pUC-EGFP-MCS 经 *Hind*III/ *Xba*I 双酶切回收骨架载体; 3 为重组质粒 pUC-EGFP-pre-miRNA1 经 *Hind*III/ *Xba*I 双酶切鉴定; 4 为 pMD18-T-HDAC4-3' UTR 经 *Eco*RI/ *Bam*HI 双酶切回收纯化插入片段; 5 为 pUC-Luciferase-MCS 经 *Eco*RI/ *Bam*HI 双酶切回收骨架载体; 6 为重组质粒 pUC-Luciferase-HDAC4-3' UTR 经 *Eco*RI/ *Bam*HI 双酶切鉴定。

Note: Fig. 2 A 1, 4 are insert fragment EGFP purified by *Xho*I/ *Not*I double digestion recycle of re-recycled purified group plasmid pBluescript-KS(-)-EGFP/Luciferase, Luciferase respectively; 2, 5 are skeleton vector purified by pIRES2-EGFP of *Xho*I/ *Not*I double digestion. 3, 6 are recombinant plasmid pUC-EGFP-MCS / pUC-Luciferase-MCS identified by *Xho*I/ *Not*I double digestion respectively; Fig. 2B 1. pMD18-T-pre-miRNA1 *Hind*III/ *Xba*I insert fragment of recycled and purified double digestion; 2. pUC-EGFP-MCS skeleton vector recycled by *Hind*III/ *Xba*I double digestion; 3. pUC-EGFP-pre-miRNA1 identified by *Hind*III/ *Xba*I double digestion respectively; 4 are insert fragment of pMD18-T-HDAC4-3' through *Eco*RI/ *Bam*HI recycled and purified by double digestion; 5. pUC-Luciferase-MCS skeleton vector recycled by *Eco*RI/ *Bam*HI double digestion; 6. Recombinant plasmid pUC-Luciferase-HDAC4-3' UTR identified by *Eco*RI/ *Bam*H double digestion.

图 2 酶切检测结果

Fig. 2 Restriction enzyme test results

2.3 细胞转染试验

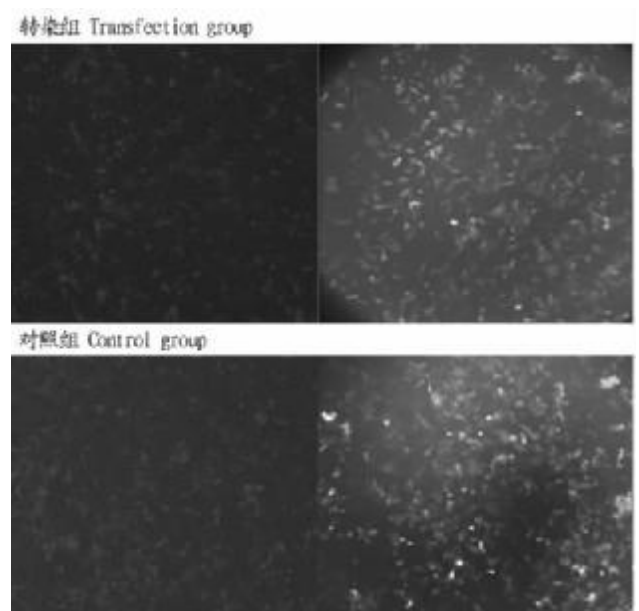
2.3.1 miRNA1 过表达检测。 HEK293 细胞转染 pUC-EGFP-pre-miRNA1 质粒, 对照组转染等剂量 pUC-EGFP-MCS Negative Control。于 24 h 后, 通过观察转染细胞荧光比例估计转染效率可以看出 EGFP 得到了有效地表达且转染效率在 70% 以上(图 3), 然后用荧光定量 RT-PCR 方法检测 mature miRNA1 的表达情况(图 4)。转染 pUC-EGFP-pre-miRNA1 组较对照组转染, mature miRNA1 的表达明显增加。

2.3.2 荧光素酶相对活性检测。 HEK293 细胞转染 pUC-EGFP-pre-miRNA1/pUC-Luciferase-HDAC4-3' UTR/pRL-SV40 质粒, 对照组转染等剂量 pUC-EGFP-MCS/pUC-Luciferase-HDAC4-3' UTR/pRL-SV40 质粒 ($n=3$)。于 48 h 后, 检测荧光素酶相对活性。结果显示, 转染组较对照组转染, 荧光素酶相对活性明显降低且有统计学意义。

3 结论与讨论

(1) 越来越多的研究表明, miRNA 是生物早期发育^[6]、细胞增殖和死亡^[7]、细胞程序性死亡和脂肪代谢^[8]、细胞分化^[9-10] 等方面是关键的调节因子。此外特定 miRNA 基因敲除小鼠显示出免疫缺陷^[11] 以及心脏功能缺陷^[12], 提示 miRNA 的表达失调在人类疾病的发生过程中起着重要的作用。因此找寻并鉴定 miRNA 的靶基因可能会给疾病的治疗提供

新的有力措施。试验通过对现有商用载体的合理利用和改

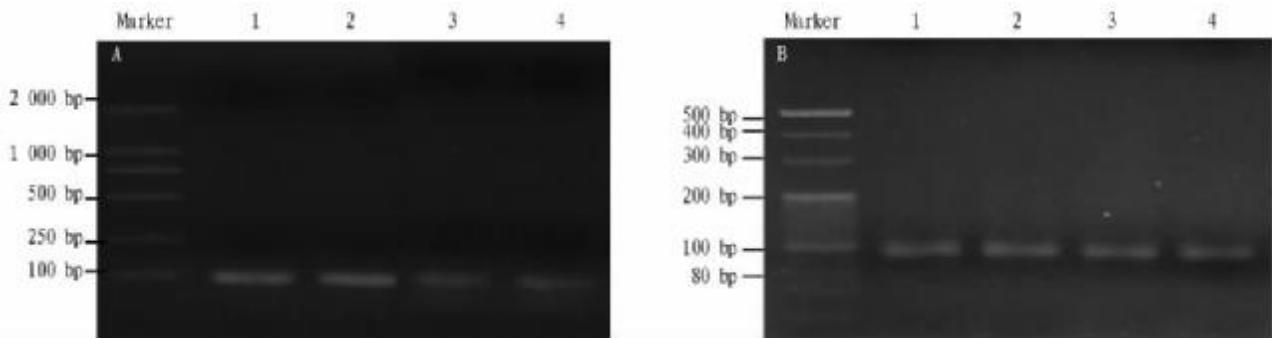


注: 左图为普通光学显微镜下图片; 右图为荧光显微镜图片。

Note: Left map is under common optical microscope; Right map is under fluorescence microscope;

图 3 转染细胞

图 3 Transfection cell



注:图4A中1,2为pUC-EGFP-pre-miRNA1质粒转染组;3,4为pUC-EGFP-MCS对照组。B为对应内参5sRNA。

Note: Fig. 4 A1,2 pUC-EGFP-pre-miRNA1 plasmid transfection group;3,4. pUC-EGFP-MCS control group;B. Corresponding internal parameters 5sRNA.

图4 Mature miRNA1 表达检测结果

Fig. 44 Mature miRNA1 expression detection results

造构建了一套研究体外微RNA/信使RNA相互作用报告系统。该系统由miRNA表达载体pUC-EGFP-MCS及mRNA-3'UTR荧光素酶报告载体pUC-Luciferase-MCS组成,而这具有相同的骨架载体即pIRES2-EGFP,通过巧妙选择合适的酶切位点XhoI/HindIII把目的片段EGFP, Luciferase定向克隆到过载体pBluescript-KS(-),再利用XhoI/NotI酶切上述重组体,从而在目的插入片段下游得到一段含有多个常用酶切位点的多克隆位点序列,取代骨架载体pIRES2-EGFP中的IRES(核糖体进入位点)及EGFP序列,最终得到目的载体miRNA表达载体pUC-EGFP-MCS及mRNA-3'UTR荧光素酶报告载体pUC-Luciferase-MCS。Chen等报道miRNA1通过对组蛋白去乙酰化酶4(HDAC4)翻译抑制而促进骨骼肌肌肉细胞的发生与分化,因此该试验通过构建pUC-EGFP-pre-miRNA1/pUC-Luciferase-HDAC4-3'UTR,作为阳性对照来验证该系统^[1]。共转染人HEK193-T细胞后,相对于阴性对照组,miRNA1明显高表达,阳性组的相对荧光素酶活性显著下降,且EGFP得到有效地表达,证明该系统是有效可行的。

(2)该系统特点有:①miRNA/mRNA-3'UTR载体构建简便。由于载体中EGFP/Luciferase的下游有包括HindIII、EcoRI、BamHI、XbaI、NotI在内的等一段常用多克隆位点,使得重组载体的构建操作简单易行。②miRNA、EGFP/Luciferase的高效准确表达。由于骨架载体是pIRES2-EGFP,为真核表达载体,含有科扎克一致翻译起始位点(Kozak consensus translation initiation site),高启动效率的CMV启动子序列且在多克隆位点序列下游有SV40增强子,因此保证了EGFP/Luciferase的高效表达,且由于多克隆位点序列下游的SV40多聚腺嘌呤序列也保证了mRNA的准确生成。③细胞实验示踪剂。由于miRNA表达载体pUC-EGFP-MCS表达EGFP,作为标记可直观的了解转染细胞的转染效率,省去细胞转染试验中再去转染带有荧光载体的操作。④利用miRNA表达载体pUC-Luciferase-MCS构建细胞转染稳定筛选株。利用该载体的新霉素抗性基因可以获取感兴趣miRNA重组质粒的转染细胞稳定株,极高地表达特定miRNA的细胞株,为特定miRNA功能的研究提供了有利的条件。

参考文献

- [1] CHEN J F, MANDEL E M, THOMSON J M, et al. The role of MicroRNA1 and MicroRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nature Genetic, 2006, 38: 228 - 233.
- [2] ZAMORE P D, HALEY B. The big world of small RNAs[J]. Science, 2005, 309: 1519 - 1524.
- [3] AMBROS V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing[J]. Cell, 2003, 113: 673 - 676.
- [4] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281 - 297.
- [5] LAI E C. microRNAs: runts of the genome assert themselves[J]. Curr Biol, 2003, 13: 925 - 936.
- [6] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21 nucleotide let-7 RNA regulates C. elegans developmental timing in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901 - 906.
- [7] BRENNECKE J, HIPFNER D R, STARK A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila[J]. Cell, 2003, 113(1): 25 - 36.
- [8] XU P, VERNOOY S Y, GUO M, et al. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism[J]. Curr Biol, 2003, 13(9): 790 - 795.
- [9] DOSTIE J, MOURELATOS Z, YANG M, et al. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs[J]. RNA, 2003, 9(2): 180 - 186.
- [10] CHEN X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development[J]. Science, 2004, 303(5666): 2022 - 2025.
- [11] RODRIGUEZ A, VIGORITO E, CLARE S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function[J]. Science, 2007, 316: 606 - 611.
- [12] VAN ROOIJ E, SUTHERLAND L B, QI X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA[J]. Science, 2007, 316: 575 - 579.
- [13] BENTWICH I, AVNIEL A, KAROV Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs[J]. Nat Genet, 2005, 37: 766 - 770.
- [14] BEREZIKOV E, VAN TETERING G, VERHEUL M, et al. Many novel mammalian microRNA candidate identified by extensive cloning and RAKE analysis[J]. Genome Res, 2006, 16: 1289 - 1298.
- [15] GRIFFITHS-JONES S, GROCOCK R J, VAN DONGEN S, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(S1): 140 - 144.
- [16] KUHN D E, MARTIN M M, FELDMAN D S, et al. Experimental validation of miRNA targets[J]. Methods, 2008, 44: 47 - 54.
- [17] RAYMOND C K, ROBERTS B S, GARRETT-ENGELE P, et al. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs[J]. RNA, 2005, 11(11): 1737 - 1744.