

真核表达 *Hsa-miR-1* 基因及其检测方法的建立

胡徐庞^a, 李 伟^a, 曹跃芬^b, 张 璇^a, 黄青红^a,
徐 科^a, 杨耿兵^a, 魏旭斌^a, 钱 程^a, 刘 立^a

(浙江理工大学生命科学学院, a. 新元医药研究所; b. 生物工程研究所, 杭州 310018)

摘 要: 获得 *Hsa-miR-1* 的方法主要由人工合成,需耗费很高的成本与时间。文章通过将 *Hsa-miR-1* 前体部分连接至 pcDNA3.0,可实现 *Hsa-miR-1* 基因的高表达。构建含有 *Hsa-miR-1* 基因表达前体的表达载体 pcDNA-*Hsa-miR-1* 和含有与 *Hsa-miR-1* 基因完全互补序列的检测载体 pEGFP-C1-CM1。通过共转染 pcDNA-*Hsa-miR-1* 和 pEGFP-C1-CM1 检测 *Hsa-miR-1* 基因的表达,并采用 Taqman 探针法定量检测 *Hsa-miR-1* 基因表达水平,成功构建了可高效表达 *Hsa-miR-1* 基因的真核生物质粒 pcDNA-*Hsa-miR-1*,并首次建立起 *Hsa-miR-1* 基因的检测系统 pEGFP-C1-CM1,该检测系统的建立将为今后 *Hsa-miR-1* 在肿瘤细胞中的研究提供准确、快捷的检测方法。

关键词: *Hsa-miR-1* 载体; Taqman 探针检测; pcDNA-*Hsa-miR-1*; pEGFP-C1-CM1

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A

0 引 言

Hsa-miR-1 家族有两个成员分别为 *Hsa-miR-1-1* 和 *Hsa-miR-1-2*。有文献报道 *Hsa-miR-1-1* 和 *Hsa-miR-1-2* 在肿瘤细胞里由于启动子被甲基化沉默导致 *Hsa-miR-1* 在肿瘤细胞里基本不表达。而当外源过表达 *Hsa-miR-1* 后多个癌基因如 *MET*, *HDAC4*, *FoxP1* 等就会被大量下调^[1]。上述研究现象表明 *Hsa-miR-1* 可能是一种抑癌因子,可以抑制多种癌基因的表达。目前对于 *Hsa-miR-1* 的获取来源主要由人工合成^[2-3],但由于人工合成 *Hsa-miR-1* 既耗费成本与时间,又不能高效准确体现真实的实验结果,成为一直以来困扰人们深入开展该项研究的瓶颈难题。

本实验设想从基因组中获得可以有效表达出成熟体 *Hsa-miR-1* 基因的部分前体,并连接到真核表达质粒 pcDNA3.0 上来实现高效表达 *Hsa-miR-1* 基因。并通过将 *Hsa-miR-1* 基因完全互补的序列连接到 pEGFP-C1 上构建出能够在荧光显微镜下通过观察 EGFP 报告基因的表达量来定性检测 *Hsa-miR-1* 的报告质粒,试图通过该项研究建立起能够简单、快捷、定性检测 pcDNA-*Hsa-miR-1* 质粒表达 *Hsa-miR-1* 的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

基因组抽提试剂盒、T4 连接酶,购自美国 Promega 公司,Effectin 转染试剂盒购自美国 Qiagen 公司,miRNA 逆转录试剂盒、TaqMan 探针购自美国 ABI 公司,凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,*Bam*H I 内切酶、*Eco*R I 内切酶、KOD-plus 聚合酶和 rTaq 聚合酶购自日本 Toyobo 公司,CIK 细胞(淋巴细胞)购自浙江血液中心,血清和 DMEM 购自 Gibco 公司,引物由广州赛百盛公司合成,pcDNA3.0 质粒、pEGFP-C1 质粒、

Hela 细胞(宫颈癌细胞)、Bel-7404 细胞(肝癌细胞)和 PLC 细胞(肝癌细胞)为本实验室所有。

1.2 基因组中调取 *Hsa-miR-1* 前体

由于 *Hsa-miR-1-2* 和 *Hsa-miR-133-1* 是同一个转录子,在 NCBI 找到 *Hsa-miR-1-2* 和 *Hsa-miR-133a-1* 的转录产物序列^[1],利用生物信息学方法检测到 *pre-Hsa-miR-1* 序列,在其两端各延伸 380 bp 设定引物以保证其可以顺利形成茎环和被剪切为成熟体并在 5' 和 3' 端分别引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。引物序列:上游 5'-GGATCCTCACTCTGAAGACTGAAGAAAC-3',下游 5'-CGGAATCCTTTCTGTACAAATCAGTGAG-3'。从 HeLa 细胞中提取基因组(按照 Promega 公司的说明书步骤)后利用上面引物用高保真的 KOD-plus 聚合酶 PCR 得到目的片段并进一步用 rTaq 聚合酶使目的片段加 A,最后将目的片段连入 pMD-18T 载体上并进行测序(上海英骏公司)。

1.3 质粒的构建和鉴定

将测序正确的 pMD-18T 载体上的目的片段利用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳并切胶回收(按照 Axygen 公司的说明书步骤)。同时用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pcDNA3.0 质粒琼脂糖凝胶电泳切胶回收。将目的片段连入 pcDNA3.0 上标记为 pcDNA-Hsa-miR-1。合成 *Hsa-miR-1* 的完全互补序列并在 5' 端和 3' 端分别引入 *Eco*R I 和 *Bam*H I 位点,同时在 *Eco*R I 酶切位点后加入 *Pvu* II 酶切位点以用于连接后质粒的鉴定,序列分别为 5'-AATTCAGCTGGAATGTAAAGAAGTATGTAT-3' 和 5'-GATCATA-CATACTTCTTTACATTCCAGCTG-3',PCR 仪上 95℃ 5 min,65℃ 15 min 后连入 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切回收的 pEGFP-C1 上标记为 pEGFP-C1-CM1。

1.4 共转染鉴定 *Hsa-miR-1* 表达情况

用 10% 血清的 DMEM 培养液将 HeLa 细胞稀释成 5×10^4 个/mL,并接种到 6 孔板中,培养 12 h 后换成含 2% 血清的 DMEM 培养液,用 Effentin 转染试剂将第一个孔转入 300 ng 的 pcDNA-Hsa-miR-1 和 300 ng 的 pEGFP-C1-CM1,第二个孔转入 300 ng 的 pcDNA3.0 和 300 ng 的 pEGFP-C1-CM1,第三个孔转入 300 ng 的 pEGFP-C1-CM1,另设一空白孔,转染步骤按照 Qiagen 公司 Effectin 转染试剂盒的说明书操作,6 h 后换成 5% 血清的 DMEM 培养液,转染 48 h 后在荧光显微镜下用蓝色激发光观察。

1.5 Taqman 探针鉴定 *Hsa-miR-1* 的表达

用 10% 血清的 DMEM 培养液将 HeLa 细胞稀释成 5×10^4 个/mL,并接种到 6 孔板中,培养 12 h 后换成含 2% 血清的 DMEM 培养液,用 Effectin 转染试剂分别将 pcDNA-Hsa-miR-1 和 pcDNA3.0 转染到两个 6 cm 的细胞培养皿中,6 h 后换成含 5% 血清的 DMEM 培养液,转染 48 h 后用 Trizol 提取总 RNA,分别用 miRNA 逆转录试剂盒逆转录 *Hsa-miR-1* 和内参 U6(按照 ABI 公司的 miRNA 逆转录试剂盒说明书的步骤进行,*Hsa-miR-1* 和 U6 逆转录引物为 ABI 公司合成),逆转录后在实时定量 PCR 仪(ABI 公司,7300)上用 TaqMan 探针(按照 ABI 公司的 Taqman 探针的使用方法设定参数)检测 *Hsa-miR-1* 的表达量。

2 结 果

2.1 PCR 获得 *Hsa-miR-1* 并测序鉴定

抽提 HeLa 细胞基因组后,PCR 获得目的 840 bp 的条带(如图 1a 所示),回收后连接 pMD-18T 载体,送上海英骏公司进行测序,结果发现在 *pre-Hsa-miR-1* 下游的第二个碱基为 A,和已有报道不一致^[1],重新 PCR 连接 pMD-18T 载体测序结果还是与上次测序一致。故抽提肝癌细胞系 Bel-7404、PLC、正常细胞 CIK 细胞,进行 PCR 并回收目的片段连接 pMD-18T 载体测序,结果 *pre-Hsa-miR-1* 下游的第二个碱基均为 A,测序结果如图 1b 所示。

2.2 pcDNA-Hsa-miR-1 和 pEGFP-C1-CM1 质粒的构建和鉴定

Hsa-miR-1 连入 pcDNA3.0 得到 pcDNA-Hsa-miR-1,用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双切鉴定,从图 2c 中可以看出 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切 pcDNA-Hsa-miR-1 后,得到 840 bp 的目的片段,证明 pcDNA-Hsa-miR-1 构建正确。*Hsa-miR-1* 的完全互补序列连入 pEGFP-C1 得到 pEGFP-C1-CM1,用 *Pvu* II 单酶切后,从图 2d 的电泳图中可以看出共切出 3 220 bp、910 bp、608 bp 三条带,证明 pEGFP-C1-CM1 构建正确。

2.3 共转染 pcDNA-Hsa-miR-1 和 pEGFP-C1-CM1

图 3 显示共转染 pcDNA-Hsa-miR-1 和 pEGFP-C1-CM1 的绿色荧光蛋白表达量明显低于转染 pcD-

NA3.0 和 pEGFP-C1-CM1 以及只转染 pEGFP-C1-CM1。而转染 pcDNA3.0 和 pEGFP-C1-CM1 以及只转染 pEGFP-C1-CM1 的绿色荧光蛋白表达量接近一致。因此,实验结果表明 pcDNA-Hsa-miR-1 是可以表达出有效的 *Hsa-miR-1* 从而抑制 pEGFP-C1-CM1 中 EGFP 蛋白的表达。

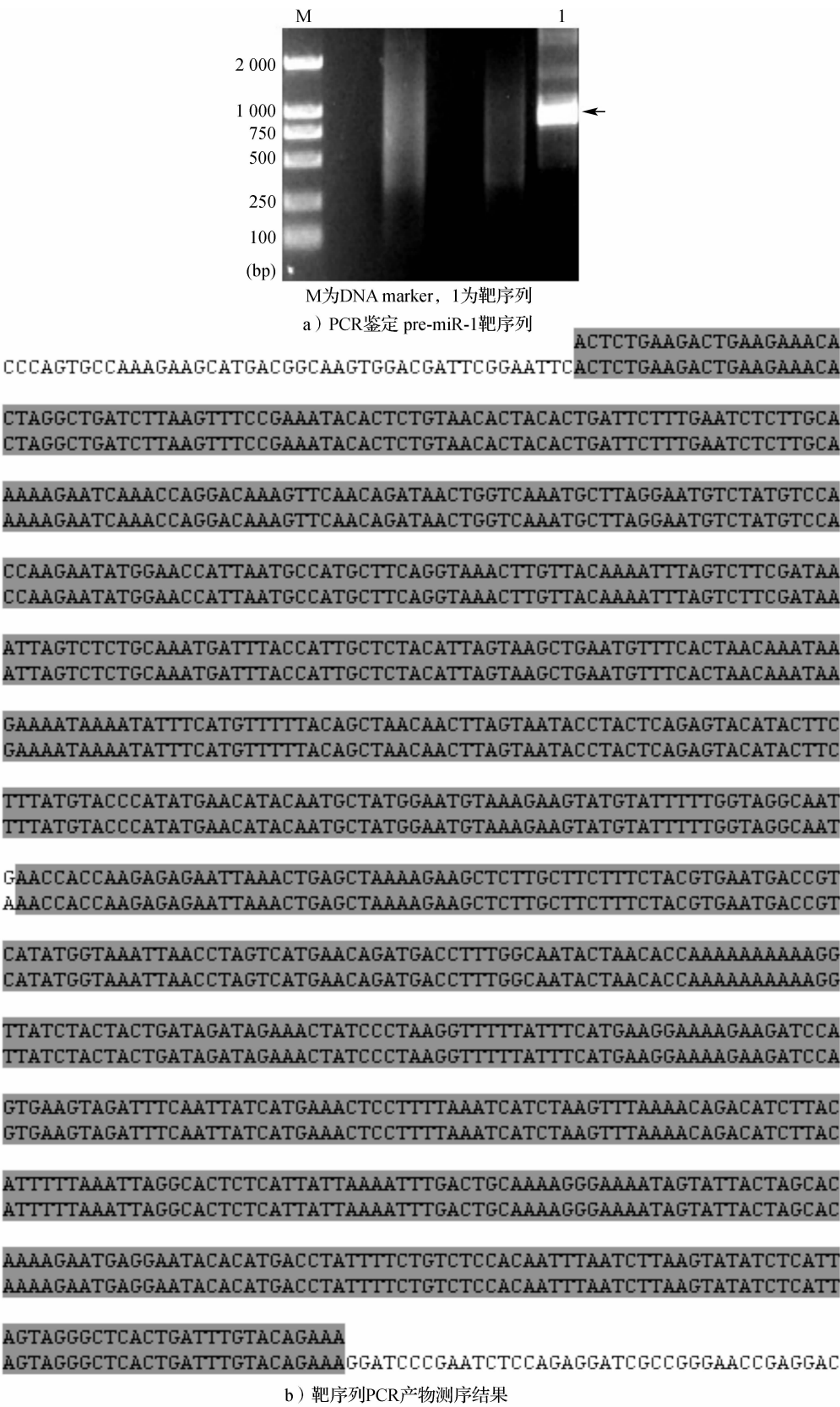
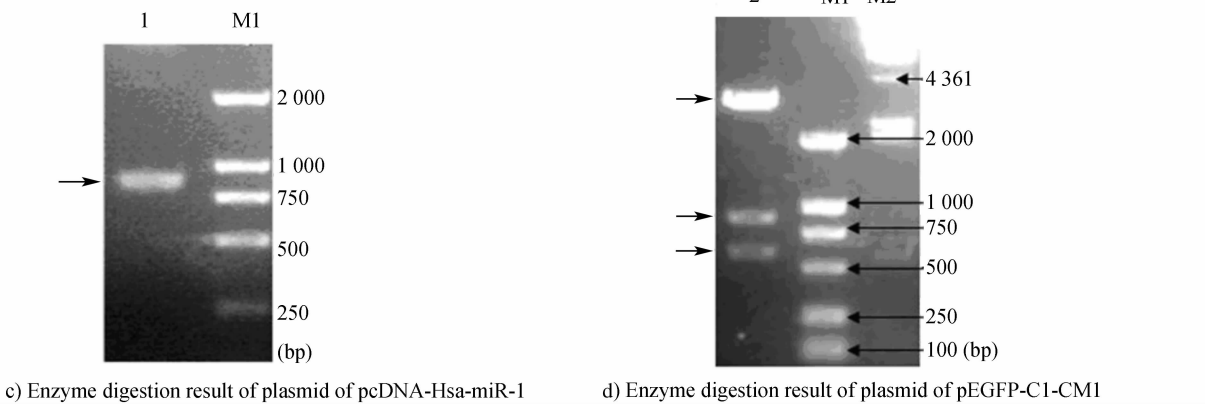
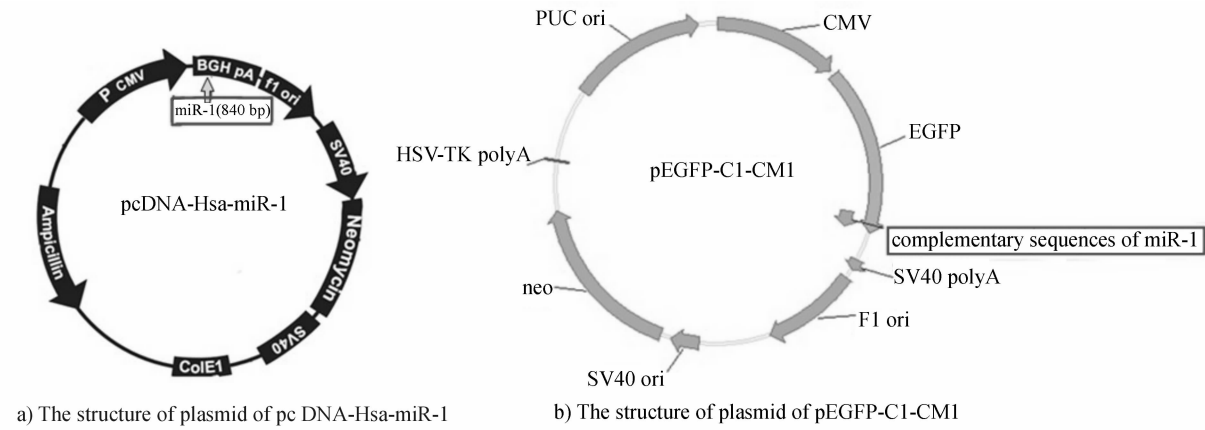


图 1 *Hsa-miR-1* 表达前体鉴定



M1;DNA marker DL2000;M2;DNA marker λ-hind III;1;质粒 pcDNA-Hsa-miR-1;2;质粒 pEGFP-C1-CM1
图 2 pcDNA-Hsa-miR-1 和 pEGFP-C1-CM1 的鉴定

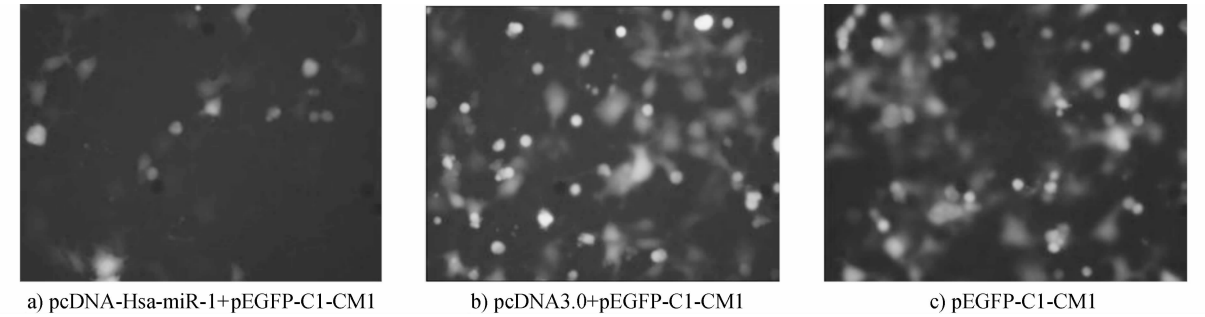


图 3 质粒转染 HeLa 细胞后 48 h 检测 EGFP 蛋白的表达情况(100×)

2.4 TaqMan 探针定量 Hsa-miR-1 的表达

转染 48 h 后,抽提总 RNA,用 ABI 公司的 miRNA 逆转录试剂盒进行逆转录,进一步利用高效特异的 TaqMan 探针在荧光定量 PCR 仪上进行反应。实验结果(见图 4)表明只转染 pcDNA3.0 对对照组基本不表达 Hsa-miR-1,而 pcDNA- Hsa-miR-1 可以高效地表达出 Hsa-miR-1,其表达效率是转染 pcDNA3.0 对照组的 100 倍,说明已成功地构建出高效表达 Hsa-miR-1 的 pcDNA- Hsa-miR-1 质粒。TaqMan 探针对 Hsa-miR-1 也验证了上面报告质粒检测结果的准确性。

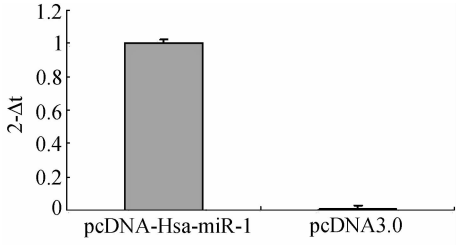


图 4 转染质粒 48 h 后检测 Hsa-miR-1 的表达水平

3 讨 论

目前通常采用外源表达 microRNA 的方法来研究其功能。最常用的有:a)直接转染人工合成的成熟体 microRNA^[1-3];b)直接转染人工合成的 pre-microRNA^[1];c)将 microRNA 最原始的转录前体(pri-microRNA)在基因组中的序列连接到质粒载体或病毒载体上,并在细胞中转染质粒或感染病毒来表达 microRNA^[3-5]。前两种方法只能瞬时提高 microRNA 在细胞内的表达量,同时由于人工合成,成本耗费高。第三种方法虽可以长时间表达 microRNA,且构建成功可以长久用于研究,耗费成本低,但由于本研究中 *Hsa-miR-1* 的两个家族成员 *Hsa-miR-1-1* 和 *Hsa-miR-1-2* 都是与 *Hsa-miR-133* 共同转录,并且其转录前体(primary sequence)长度有 4 251 bp,因此无法直接利用第三种方法去表达 *Hsa-miR-1*。

通过生物信息学的方法检测到 pre-*Hsa-miR-1-2* 序列,并在其基因组序列的上游和下游各延伸 380 bp 来作为表达 *Hsa-miR-1* 的前体,从而保证转录子可以形成正确的茎环结构并被剪切为成熟体。在 HeLa 细胞的基因组中得到此前体后连入真核表达质粒 pcDNA3.0,转染 HeLa 细胞的实验结果表明:pcDNA-*Hsa-miR-1* 可以有效地表达出成熟体 *Hsa-miR-1*。提示只要 pre-microRNA 的两端保留足够的碱基就可以保证 microRNA 在形成过程中能够顺利形成茎环和被剪切酶所识别,即使没有完整的 pri-microRNA 也完全可以表达出成熟体 microRNA。此外,在检测 microRNA 表达效率的报告质粒中,为了克服实验成本较高和检测方法复杂的缺点,基本上都采用 *EGFP* 作为报告基因^[6-8]。本文研究中发现将 *Hsa-miR-1* 的完全互补序列连接到 pEGFP-C1 质粒的报告基因 *EGFP* 的 3'UTR 上,共转染 pcDNA-*Hsa-miR-1* 和 pEGFP-C1-CM1 质粒,48h 后在荧光显微镜下可有效地检测到 *Hsa-miR-1* 的表达情况。其后的 TaqMan 探针也进一步定量验证了 pcDNA-*Hsa-miR-1* 表达 *Hsa-miR-1* 的高效性和报告系统 pEGFP-C1-CM1 质粒的可靠性。

4 结 论

真核表达 *Hsa-miR-1* 基因及其检测方法的成功建立,不仅为进一步有关 *Hsa-miR-1* 靶基因的研究及其与肿瘤关系的研究奠定了坚实的实验基础,而且也为今后 microRNA 表达情况和 microRNA 靶点研究的定性检测提供了一种新的检测方法。

参考文献:

- [1] Datta J, Kutay H, Nasser M W, et al. Methylation mediated silencing of microRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5049-5058.
- [2] Fujita S, Iba H. Putative promoter regions of miRNA genes involved in evolutionarily conserved regulatory systems among vertebrates[J]. Bioinformatics, 2008, 24(3): 303-308.
- [3] Ambs S, Prueitt R L, Yi M, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6162-6170.
- [4] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(39): 13944-13949.
- [5] Zeng Y, Cai X, Cullen B R. Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs[J]. Methods Enzymol, 2005, 392: 371-380.
- [6] Mansfield J H, Harfe B D, Nissen R, et al. MicroRNA-responsive sensor transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression[J]. Nat Genet, 2004, 36(10): 1079-1083.
- [7] Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNA-221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(50): 18081-21808.
- [8] Yekta S, Shih I H, Bartel D P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA[J]. Science, 2004, 304(5670): 594-596.

Eukaryotic Expression of *Hsa-miR-1* Gene and Establishment of Its Detection Method

HU Xu-pang^a, LI Wei^a, CAO Yue-fen^b, ZHANG Xuan^a, HUANG Qing-hong^a,

XU Ke^a, YANG Geng-bin^a, WEI Xu-bin^a, QIAN Cheng^a, LIU Li^a

(Zhejiang Sci-Tech University, a. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology;

b. Institute of Bioengineering, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Currently available *Hsa-miR-1* mainly by the synthetic methods, is very costly and time-consuming. By part precursor of the *Hsa-miR-1* connecting to the pcDNA3.0, can be realized *Hsa-miR-1* genes were highly expressed. Constructing containing *Hsa-miR-1* precursor gene expression vector pcDNA-Hsa-miR-1 and containing *Hsa-miR-1* gene completely complementary sequence detection vector pEGFP-C1-CM1, and using Taqman probes for quantification of *Hsa-miR-1* gene expression level, can successfully constructe and highly expressed *Hsa-miR-1* genes in eukaryotic plasmid pcDNA-Hsa-miR-1. It is the first time to establish *Hsa-miR-1* gene detection system pEGFP-C1-CM1, and the detection system for *Hsa-miR-1* in tumor cells study can provide accurate and quick detection method in future.

Key words: *Hsa-miR-1* vector; taqman probe; pcDNA-Hsa-miR-1; pEGFP-C1-CM1

(责任编辑: 许惠儿)