文章编号:1000-5404(2007)09-0803-03

论著

小鼠微小 RNA miR-22 真核表达载体的构建及功能初步研究

张炜炜,王 涛,艾国平,粟永萍,王军平,邹仲敏,邓 均,董世武 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 从基因组DNA扩增miR-22前体对应的基因组片段并克隆到pIRES2-EGFP,构建miR-22的真核表达载体。**方法** 利用PCR技术从基因组DNA扩增miR-22前体对应的基因组片段,克隆到质粒pUCm-T,测序正确后构建到真核表达载体pIRES2-EGFP中,经*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ双酶切后1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并进行序列测定。脂质体Lipofectamin 2000法转染Hela细胞后G418筛选获得稳定转染克隆,提取总RNA,通过RT-PCR方法对neo片段进行鉴定,采用Northern blot技术检测miR-22的表达。**结果** PCR扩增得到的334 bp片段与预期的miR-22前体对应的基因组片段序列一致;成功构建了真核表达载体pIRES2-EGFP/miR-22,测序结果正确。重组质粒转染Hela细胞后,经G418筛选成功获得阳性克隆。Northern blot分析显示miR-22在Hela细胞内高效表达。**结论** 本实验成功克隆了miR-22的前体对应的基因组片段,构建其真核表达载体,并在Hela细胞内获得高表达,为深入研究微小RNA miR-22的功能奠定了基础。

关键词: 微小RNA;真核表达载体;miR-22;基因组片段;Hela;Northern blot
中图法分类号: R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Construction of eukaryotic expression vector of mouse microRNAs miR-22

ZHANG Wei-wei, WANG Tao, AI Guo-ping, SU Yong-ping, WANG Jun-ping, ZOU Zhong-min, DENG Jun, DONG Shi-wu (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone microRNA22 fragment from human genomic DNA and construct it into the eukaryotic expression vector. **Methods** MicroRNA22 genomic sequence was amplified from mouse genomic DNA by PCR and cloned into pUCm-T plasmid, then sequenced. The sequence was cloned into eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP plasmid, then identified with *Bam*HⅠ and *Eco*RⅠ in 1.5% agarose gel electrophoresis and sequenced. Hela cells were tansfected with the identified pIRES2-EGFP/miR-22 and pIRES2-EGFP by Lipofectamin 2000. **Results** The 334-bp genomic fragment amplified by PCR was correct. Eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP/miR-22 was successfully constructed and confirmed by sequencing. G418-resistant clones of Hela cells were obtained and confirmed as positive by RT-PCR. Northern blotting showed the expression of miR-22 increased. **Conclusion** The successful cloning of genomic sequence corresponding to pre-miR-22 and construction of its eukaryotic expression vector has laid the foundation for the further study of miR-22 function.

Key words: microRNAs; eukaryotic expression vector; miR-22; genomic sequence; Hela; Northern blotting

microRNA(miRNA)是继siRNA(small interfering RNA)之后,发现的又一调节mRNA稳定和mRNA翻译的一类非编码RNA,是一类21~23 nt的单链小分子RNA,大部分miRNA由70~90 nt的具有"茎环"结构的前体RNA分子(pre-miRNAs)经Dicer酶剪切加工生成的。在包括线虫果绳、家鼠、人体以及拟南芥等生物中普遍存在,通过与相应的靶mRNA的3′端非编码区域(3′-untranslated region, 3′ UTR)非完全或完全配对结合,从而阻止翻译的起始或破坏mRNA的稳定性,实现对基因表达的转录后调控,在调控生物体正常发育等生理过程中扮演重要角色。Chen等[1]在2006

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522605)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522605)
作者简介:张炜炜(1980-),女,河南省舞钢市人,硕士研究生,主要从事微小RNA在成肌分化过程中的作用机制方面的研究。电话:13637915860, E-mail:vivi018@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:艾国平,电话:(023)68753660,E-mail:aigping@yahoo.com
收稿日期:2006-10-25;修回日期:2007-01-24

年通过基因芯片检测到 miR-22 在骨骼肌细胞分化成熟过程中表达增高，且呈现一定的时空特异性。为了进一步阐明 miR-22 在成体干细胞的分化调控中的作用，本研究对其进行了克隆和真核表达载体构建，旨在为深入研究微小 RNA miR-22 的功能奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存的菌株；T 载体 pUCm-T 购自 Bio Basic 公司；真核表达载体质粒 pIRES2-EGFP 为西南医院全军烧伤研究所惠赠，Hela 细胞为本科室保存的细胞株。

1.2 试剂

引物由 Invitrogen 公司合成；*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ 购于 TaKaRa 公司；快速质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购于 Promega 公司，基因组 DNA 提取试剂盒为 Omega 公司产品；细胞总 RNA 提取试剂 Trizol 为 Invitrogen 公司产品，异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)为 Sigma 公司产品，脂质体 Lipofectamin 2000 为 Invitrogen 公司产品，细胞培养基 DMEM 购自 Hiclone 公司，类标准胎牛血清为民海生物公司产品，胰酶为 DIFCO 产品，半干转印仪为 Bio-Rad 公司产品，其他常规化学试剂为分析纯以上产品。

1.3 引物合成设计

根据 miRBase Sequences 公布的 miR-22 前体对应的基因组序列，参照 Primer 软件引物序列设计如下：引物 1 ：5′- CTAGCTAGCCAGGTTTGGATGGCCTGT-3′，引物 2：5′-CGCGGATCCAGTGGGGGTAAGGGCTCC -3′。

1.4 小鼠肌肉组织总 DNA 提取和 miR-22 前体片段克隆

取 BALB/c 小鼠 1 只，脱臼处死后取肌肉组织，依照试剂盒说明提取基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板，引物 1、2 分别为上、下游引物，循环条件：94 ℃ 30 s，62 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，共进行 35 个循环后 72 ℃延伸 5 min，扩增 miR-22 前体片段序列。

1.5 pUCm-T/miR-22 测序载体的构建

回收 PCR 产物，经纯化后将之构建到 pUCm-T 质粒，然后转染感受态 DH5α 细菌，蓝白斑筛选，挑选白斑单克隆接种培养后，取菌液作为模板 PCR 鉴定后，小量法提取质粒进行双酶切鉴定，送含阳性重组质粒的细菌测序。

1.6 pIRES2-EGFP/miR-22 表达载体的构建

小量法提取序列正确的 pUCm-T/miR-22 重组质粒，经 *Bam*H Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切后琼脂糖电泳胶回收 miR-22 前体片段，构建到 pIRES2-EGFP 真核表达载体上。再转化感受态 DH5α 细菌，卡那霉素抗性筛选，挑选转化单克隆接种培养，取菌液作为反应模板 PCR 鉴定后，小量法提取质粒进行双酶切鉴定，送含阳性重组质粒的细菌测序。

1.7 脂质体 2000 转染 Hela 细胞与 G418 筛选稳定转染克隆

转染细胞为人子宫颈癌细胞 Hela 细胞，常规培养于含 10% 类标准胎牛血清的 DMEM 培养基，稳定传代后接于 24 孔板中培养，待其约 80% 融合时用于转染。转染脂质体 Lipofectamin 2000，将重组质粒和空载体分别转染 Hela 细胞，用终浓度 400 μg/ml 的 G418 筛选 5 周后，大量扩增最终获得足量的转染细胞用于后续实验。

1.8 转染细胞的 RT-PCR 鉴定

收集转染后的 2 组细胞，加入 Trizol 提取总 RNA 后，采用 TaKaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒推荐的方法，设计针对 neo 基因片段的引物进行 RT-PCR 扩增。引物 1：ATTCGGCTATGACTGGGCACAACA，引物 2：GAGCAAGGTGAGATGACAGGA GAT。反应条件为：94 ℃ 2 min→94 ℃ 30 s→56 ℃ 30 s→72 ℃ 4 min，30 个循环。

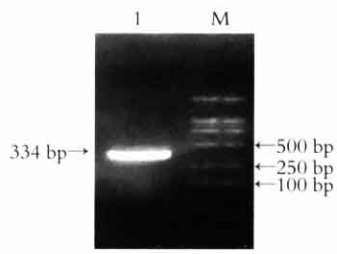
1.9 Northern blot 检测 miR-22 表达

收集转染后阳性细胞，Trizol 提取细胞总 RNA，紫外分光仪测定 RNA 浓度。各取 20 μg 总 RNA 进行 SDS-PAGE 电泳，聚丙烯酰胺凝胶浓度为 15%（40% 丙烯酰胺 2.8 ml，10 × TBE 0.75 ml，3.6 g 尿素，加 DEPC 水至 7.5 ml，10% 过硫酸铵30 μl，TEMED 7.5 μl）。RNA 转移时采用半干转印仪（Bio-Rad 公司），400 mAps，1 h。合成探针序列：miR-22 ACAGTTCTTCAACTGGCAGCTT，U6 ATATGGAACGCTTCACGAATTT。以 ^{32}P 标记针对 miR-22 探针进行杂交检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增的 miR-22 前体对应的基因组片段

1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示在 334 bp 处有一特异扩增条带，片段大小与理论预测值一致（图 1）。

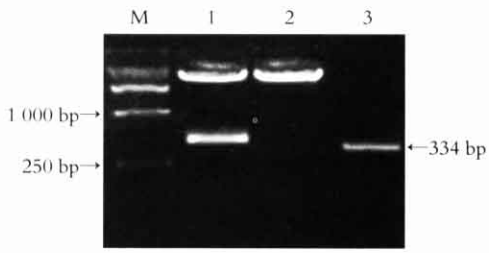


M：DNA 标准（DL 2000）；1：miR-22 的 PCR 产物

图 1 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 miR-22 PCR 产物

2.2 pIRES2-EGFP/miR-22 重组质粒构建

pIRES2-EGFP/miR-22 经 *Bam*H Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切后琼脂糖凝胶电泳显示在 250 bp 和 1 000 bp 之间有一条带，证明表达载体构建成功（图 2）。



M：DNA 标准（DL 15000）；1：pIRES2-EGFP/miR-22 双酶切产物；2：pIRES2-EGFP 空载体双酶切产物；3：miR-22 的 PCR 产物

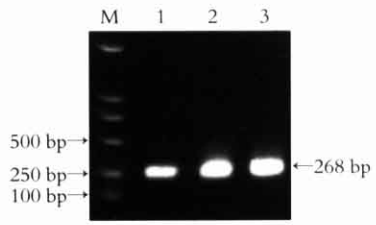
图 2 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 pIRES2-EGFP /miR-22 双酶切产物

2.3　序列测定

全自动 DNA 序列分析仪分析鉴定重组质粒 pIRES2-EGFP/miR-22，所读序列经测序结果分析软件分析证明，克隆片段确实为小鼠 miR-22 前体对应的基因组片段序列，在所测片段上下游分别检测到所用的限制性内切酶位点，经同源性比较分析证实与参考文献[2－5]公布序列相一致。

2.4　细胞转染及 RT-PCR 鉴定

将重组质粒 pIRES2-EGFP/miR-22 和空载体质粒 pIRES2-EGFP 转染 Hela 细胞，加 G418 筛选 10 d 可见阳性细胞克隆出现，转染细胞被命名为 Hela-miR-22 和 Hela-pIRES2。为确定重组质粒在转染细胞中的存在，采用 RT-PCR 的方法进行检测。结果显示：以转染细胞 cDNA 为模板所扩增的产物与以质粒 DNA 为模板所扩增的产物完全相同（图 3），说明细胞的转染是成功的。

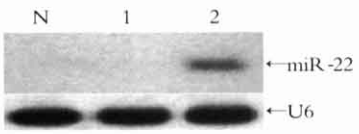


M：DNA 标准（DL 2000）；1：pIRES2-EGFP；2：Hela-pIRES2；3：Hela-miR-22

图 3　转染细胞的 RT-PCR 鉴定电泳图

2.5　miR-22 在 Hela 细胞中的表达检测

Northern blot 方法检测转染细胞中的 miR-22 表达，结果显示重组质粒转染 Hela 细胞后 miR-22 表达升高（图 4）。



N：正常 Hela 细胞；1：Hela-pIRES2；2：Hela-miR-22

图 4　Northern blot 检测 Hela 细胞中 miR-22 的表达

3　讨论

miRNA 是一类广泛存在于真核细胞中，由基因组编码的高度保守的非编码单链小分子 RNA。诸多研究表明其表达具有一定的时空特异性，在生长发育、增殖分化、肿瘤发生和病毒感染等多种生物学事件中发挥了重要作用[6]，探明这些 miRNAs 的功能以及靶 mRNA 对于人类疾病治疗有重要意义。研究表明小鼠 miR-22 基因定位 11 染色体上，全长 22 nt，是由 95 nt 的茎环节构前体剪切加工成熟，在骨骼肌、心脏、肾脏等多种组织中有表达。Houbaviy 等[3]研究表明 miR-22 在胚胎早期发育过程中表达显著增高，这提示 miR-22 在胚胎干细胞分化过程中可能起了重要的调控作用。因此对于研究 miR-22 的生物学功能，阐明其作用机制，以及进一步探索干细胞的定向分化机制有重要意义。

目前研究微小 RNA 功能的方法很多，本试验采用构建 miRNAs 高表达载体的方法来研究其功能。这种方法是通过扩增 pre-miRNA 对应的基因组片段，定向克隆入真核表达载体，转染细胞后在载体启动子作用下转录为具有“茎环”结构的 pre-miRNAs，通过胞内自身的 RNA 聚合酶 Ⅲ Dicer 的作用剪接加工成为成熟的 miRNA，从而发挥对靶基因的调控作用。这符合 miRNA 的一般生物合成过程和作用原理，相对经济、简便、效果稳定，符合试验需要。由于细胞分化是一个过程，研究微小 RNA 在其中的调控的作用需要有一定的观察时间，因此在表达基因时我们采用的真核表达载体 pIRES2-EGFP，该载体带有的启动子 PCMV 有明确的转录起点和终点，具有 IRES 序列，插入片段不会影响下游其他基因的表达，并且含有绿色荧光蛋白基因和 G418 筛选标记，便于观察和筛选，可用于基因的稳定表达。我们将 miR-22 表达质粒转染到 Hela 细胞，细胞培养过程中始终维持 G418 筛选压力，获得的细胞是质粒整合进基因组 DNA 的单克隆细胞，可以持续、长期表达 miR-22，发挥对于细胞分化的调控作用。对于筛选获得的细胞进行 RT-PCR 检测，证实 miR-22 表达质粒存在于实验细胞中。为验证 miR-22 表达质粒在 Hela 细胞中的表达水平，我们利用 Northern blot 技术进行检测，结果显示 miR-22 在 Hela 细胞内获得较高水平表达，说明 miR-22 基因真核表达载体在 Hela 细胞中发挥了作用。

本试验成功制备了 miR-22 的真核表达载体，并将其转染 Hela 细胞，G418 筛选得到阳性克隆，Northern blot 检测结果显示 miR-22 在 Hela 细胞内高水平表达。这为进一步研究 miR-22 在细胞分化过程中的生物学功能奠定了实验基础。

参考文献：

[1] Chen J F, Mandel E M, Thomson J M, *et al*. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. Nat Genet, 2006, 38(2): 228－233.

[2] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, *et al*. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [J]. Curr Biol, 2002, 12(9): 735－739.

[3] Houbaviy H B, Murray M F, Sharp P A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs [J]. Dev Cell, 2003, 5(2): 351－358.

[4] Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, *et al*. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs[J]. RNA, 2003, 9(2): 180－186.

[5] Poy M N, Eliasson L, Krutzfeldt J, *et al*. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion[J]. Nature, 2004, 432(7014): 226－230.

[6] Zamore P D, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs[J]. Science, 2005, 309(5740): 1519－1524.

（编辑　栾　嘉）