论著

文章编号:1000-5404(2009)23-2334-04

人 pre-miR-15a 真核表达载体的构建及其对 Raji 细胞生长的抑制作用

谌 琴,何冬梅 (暨南大学医学院血液病研究所,广州 510632)

摘 要:目的 构建人 pre-miR-15a 真核表达载体,并研究其对 Raji 细胞的生长抑制作用。**方法** 将 pre-miR-15a 与目标载体(PGCSIL-GFP)定向连接,转化细菌感受态细胞,PCR 鉴定阳性克隆,并测序。利用脂质体法将该载体转染 Raji 细胞,实验分为空白对照组、阴性对照质粒组和 pre-miR-15a 组($n=5$)。RT-PCR 检测 Bcl-2 mRNA 表达,间接免疫荧光法检测 Bcl-2 蛋白表达,台盼蓝细胞计数法检测细胞增殖活性。**结果** PCR 阳性克隆鉴定及测序结果均与目的序列一致。倒置荧光显微镜下见绿色荧光表达;RT-PCR 法示各组间 Bcl-2 mRNA 表达差异无显著性($P>0.05$);间接免疫荧光法示 pre-miR-15a 组的 Bcl-2 蛋白表达量较空白对照组和阴性对照质粒组显著降低($P<0.05$);台盼蓝拒染法示 pre-miR-15a 组 Raji 细胞生长受抑。**结论** 本实验成功构建了 per-miR-15a 真核表达载体,且 pre-miR-15a 可以抑制 Raji 细胞生长。

关键词: pre-miR-15a;Raji 细胞;淋巴瘤

中图法分类号: R394-33;R394.2;R73-362 **文献标识码:** A

Construction of eukaryotic expression vector of pre-miR-15a and its inhibitory effect on Raji cells proliferation

CHEN Qin, HE Dong-mei (Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Objective To construct an eukaryotic expression vector of pre-miR-15a, and to investigate the inhibitory effect of pre-miR-15a to Raji cells. **Methods** The pGCSIL-GFP vector encoding pre-miR-15a nucleotides was transfected into the bacterial competent cells, and then confirmed by PCR and sequencing analysis. The identified vector was transfected into Raji cells with oligofectamine 2000. The cells were divided into 3 groups, blank, negative control and pre-miR-15a group. Semi-quantitative RT-PCR was used to detect the expression of Bcl-2 mRNA, and immunofluorescence indirect for Bcl-2 protein expression. The growth of Raji cells was assayed by trypan blue dye exclusion method. **Results** PCR and sequences analysis indicated that the recombinant clones was identical with target sequences. Many green fluorescent cells were observed under fluorescent microscopy. The levels of Bcl-2 mRNA at every group had no obviously difference. Bcl-2 protein expression was obviously decreased at pre-miR-15a group compared with the other groups. Trypan blue dye exclusion method showed the cell growth was inhibited at 48 h and 72 h post-transfection. **Conclusion** We successfully construct the eukaryotic expression vector of pre-miR-15a, and it can inhibit the growth of Raji cells.

Key words: pre-miR-15a; raji cells; lymphoma

microRNA(miRNA)是由22个左右核苷酸组成的、高度保守性的、内源性非编码小分子RNA。它广泛存在,调控至少30%的基因表达,在细胞的生长、发育、分化、增殖和凋亡中起重要作用[1]。miRNA在恶性疾病中的作用已引起很大关注,认为miRNA在基因表达调节和肿瘤的发生机制中起重要作用[2,3]。miRNA可视为潜在的原癌基因或肿瘤抑制物[4]。当miRNA表达上调,抑制靶抑癌基因翻译,导致靶抑癌基因表达下降;相反,miRNA表达下调,抑制靶原癌基因翻译作用减弱,导致靶原癌基因高表达。一旦这种假设成立,可为肿瘤发生过程中基因调节提供重要线索,为肿瘤治疗开辟一条新的道路。模拟miRNA体内生成的自然过程,将miRNA前体序列插入到真核表达载体,转染真核细胞后,可望获得稳定的miRNA表达,从而为miRNA靶点的验证和功能研究提供强有力的工具。miR-15和miR-16是最早发现的具有肿瘤抑制功能的miRNA,可以靶向调控Bcl-2 mRNA的表达,进而抑制肿瘤的发生、发展[5]。

基金项目: 国务院侨办重点学科建设基金(51205002)
Supported by the Foundation of Key Disciplines Construction of State Council Overseas Chinese Affairs (51205002)

作者简介: 谌 琴,女,江西省宜春市人,硕士,讲师,主要从事小分子RNA与血液肿瘤的治疗方面的研究。E-mail: 554338653@qq.com

通信作者: 何冬梅, E-mail: thedm@jnu.edu.cn

收稿日期: 2009-05-13;**修回日期:** 2009-06-15

本研究目的在于将 pre-miR-15a 构建于 pGCSIL-GFP 真核表达载体的 U_6 启动子下游,形成稳定表达 pre-miR-15 的真核表达载体,通过模拟人体内 miR-15a 的高表达,进而抑制 Raji 细胞的生长。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂

大肠杆菌、pGCSIL-GFP 载体及 *Age* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ酶切购自上海吉凯基因化学技术有限公司,Raji 细胞株购自上海细胞库 3 代培养细胞。Trizol 购自奥地利 PAA 公司,PCR 用试剂 Primer、dsDNA oligo 由上海吉凯基因技术有限公司合成,*Taq* polymerase 为 TaKaRa 公司产品,*Age* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、T_4 DNA ligase buffer、T_4 DNA ligase 为 NEB 公司产品,BSA 购自上海捷倍思基因技术有限公司,LB 购自 ATCC 公司,250bp DNA ladder Marker 购自捷瑞,琼脂糖购自赛百盛公司,阳性克隆测序在美季公司,RT-PCR 试剂盒购自上海申能博彩公司,鼠抗人 Bcl-2 抗体购自博士德公司,台盼蓝购自 Sigma 公司。

1.2　质粒构建

1.2.1　获得目的片段　　从"The miRNA Registry"数据库(http://microrna.sanger.ac.uk/)中获得 pre-miR-15a 序列(CCTTGGAGTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGATTTTGAAAAGGTGCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAAAATACAAG)。设计目的序列获得片段(PGCSIL-GFP-pre-miR-15a-1:CGGGTACCGGTCCTTGGAGTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGATTTTG-AAAAGGTGC;PGCSIL-GFP-pre-miR-15a-2:CCGGAATTCCTTGTATTTTTGAGGCAGCACAATATGGCCTGCACCTTTTCAAAATCCAC),引入 *Age* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ酶切位点。PCR 扩增获得目的片段。

1.2.2　重组质粒 pre-miR-15a 的构建　　*Age* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ酶切 pGCSIL-GFP 载体以使其线性化,酶切反应体系:纯化的 DNA 质粒(1 μg/μl) 2 μl, 10×Buffer 5 μl, 100×BSA 0.5 μl, *Age* Ⅰ(10 U/μl) 1 μl, *Eco*R Ⅰ (10 U/μl) 1 μl, ddH_2O 定容至 50 μl。置于 37 ℃ 1 h。将酶切产物与目的质粒进行连接,连接反应体系:酶切回收的载体 DNA (100 ng/μl) 1 μl,退火的双链 DNA (100 ng/μl) 1 μl,10×T_4 DNA 连接酶缓冲液 1 μl,T_4 噬菌体 DNA 连接酶 1 μl,dd H_2O 定容至 10 μl。置于 4 ℃ 12 h。将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞。

1.2.3　阳性克隆的 PCR 鉴定及测序　　利用载体上的引物进行 PCR 鉴定阳性克隆。引物序列为:上游 5′-CCTATTCCCATGATTTCCTTCATA-3′,下游 5′-GTAATACGGTTATCCACGCG-3′。挑选阳性克隆菌液送测序(美季公司进行 ABI 3733 型测序仪进行测序分析)。

1.3　质粒提取

按照质粒抽提试剂盒抽提质粒。

1.4　细胞培养

将 Raji 细胞接种于含体积分数 10% 的新生牛血清,无青、链霉素的 RPMI1640 培养基中,在含体积分数 5% CO_2 的培养箱 37 ℃连续培养,每 2~3 天换液传代培养,细胞维持对数生长。

1.5　细胞转染

按照 Oligofectamine 2000 试剂盒分别转染各组细胞,实验分为空白对照组、阴性对照质粒组和 pre-miR-15a 组,每组复 5 孔。转染 24 h 后检测转染效率,在荧光显微镜下选 10 个 200 倍视野,每个视野中统计 200 个细胞中带绿色荧光的细胞数,计算荧光细胞的百分比。

1.6　半定量 RT-PCR 检测转染后 Bcl-2 mRNA 表达水平

离心收集转染 48 h 的各组细胞。采用 Trizol 三步法抽提总 RNA。根据试剂盒进行逆转录反应及 PCR 扩增,Bcl-2 引物序列如下:上游 5′-GTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3′,下游 5′-CTTCAGAGACAGCCAGGAG-3′,产物长度 212 bp;内对照 β-actin 引物序列:上游 5′-TGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-3′,下游 5′-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGAG-3′,产物长度 592 bp。PCR 产物在 3% 的琼脂糖凝胶上电泳观察并照相,于 Gel-Doc 1000 型紫外凝胶图像分析仪上观察、分析。

1.7　间接免疫荧光及流式细胞仪检测 Bcl-2 蛋白表达

离心收集转染后 48 h 的各组细胞,用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 洗后加体积分数 3% H_2O_2,室温 10 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,加 10 g/L Triton X-100,室温 10 min,PBS 洗后加血清室温封闭 40 min,甩去不洗,滴加鼠抗人 Bcl-2 抗体,4 ℃过夜,次日复温 30 min, PBS 洗,加入 20 μl Cy3 标记的羊抗鼠二抗孵育细胞,室温避光反应 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,PBS 混匀后上机,流式细胞仪(FCM)测定 Bcl-2 蛋白表达的阳性率。

1.8　台盼蓝拒染法测细胞生长抑制率

将对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板中,按照上述步骤进行转染,分别于 24、48、72 h 收获细胞,常规台盼蓝(0.5%)染色,用血球计数板计数活细胞数目,实验重复 3 次。

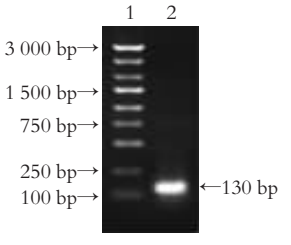
1.9　统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较,采用完全随机区组设计的单因素方差分析,组间的比较选用可进行多个样本均数间每两个均数比较的 q 检验。

2　结果

2.1　PCR 获得目的片段

设计的目的基因获得片段,兼具模版与引物的功能,经 PCR 扩增获得 130 bp 的产物(图 1)。酶切 PCR 产物,以便进行下一步的连接反应。



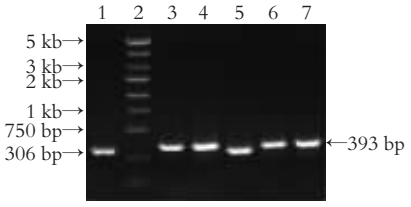
1:DNA 标准;2:目的片段

图 1　PCR 扩增电泳结果

2.2　重组质粒 pre-miR-15a 的阳性克隆鉴定

与目的片段连接成功的重组质粒阳性克隆 PCR 产物大小为 393 bp,载体质粒或未连接成功的载体克隆 PCR 产物大小为 306 bp。图 2 为重组质粒克隆经 PCR 后的电泳图,条带 1 是以空质粒为模版进行 PCR 的阴性对照,条带 3~7 是以连接后的

质粒(共复5组)为模版进行的PCR,编号分别为PGCSIL-GFP-pre -miR -15a-1,2,3,4,5。其中条带5的PCR产物大小与条带1接近,可见条带5未连接成功;条带3、4、6、7的PCR产物片段较条带1大,约为393 bp,可见条件3,4,6,7连接成功。



1:阴性对照(空载体为PCR克隆模版);2:DNA标准;3-7:PGCSIL-GFP-pre-miR-15a-1,2,3,4,5

图2 重组质粒pre-miR-15a的阳性克隆鉴定

2.3 重组质粒pre-miR-15a的测序鉴定

挑选阳性克隆PGCSIL-GFP-pre-miR-15a菌液送测序,测序结果与pre-miR-15a序列一致。

2.4 细胞转染效率

将转染24 h的细胞置于倒置荧光显微镜下观察,可见部分细胞呈现绿色荧光(图3),在荧光显微镜下选10个200倍视野,每个视野中统计200个细胞中带绿色荧光的细胞数,计算荧光细胞的百分比即转染率,其值为(39±2.4)%。后面的实验均按该转染效率下的脂质体与质粒比例进行转染。

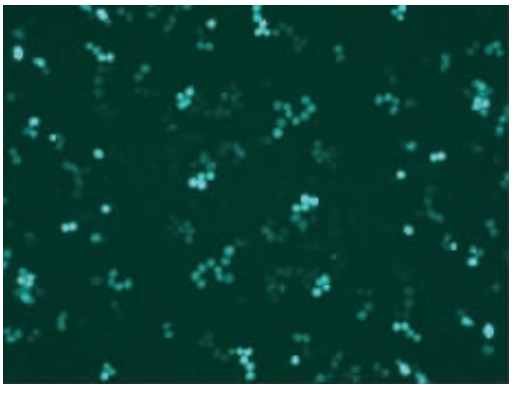
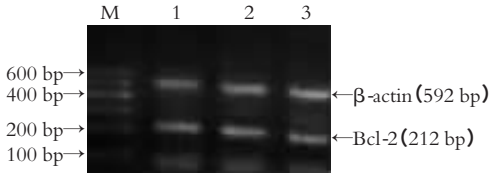


图3 转染重组质粒24 h后转染效率 (荧光显微镜×100)

2.5 RT-PCR检测转染后Bcl-2 mRNA表达水平

由Bcl-2扩增产物的凝胶电泳图可见,内对照β-actin在各处理组均有表达,Bcl-2扩增产物电泳区带约在210 bp位置,与设计引物的理论值一致(图4)。对电泳产物分析,计算Bcl-2 mRNA/β-actin的光密度值的比值,反映各组相对丰度。经统计学分析,各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。表明miR-15a不降解Bcl-2 mRNA,而是抑制其翻译。



M:DNA标准;1:空白对照组;2:阴性对照质粒组;3:pre-miR-15a组

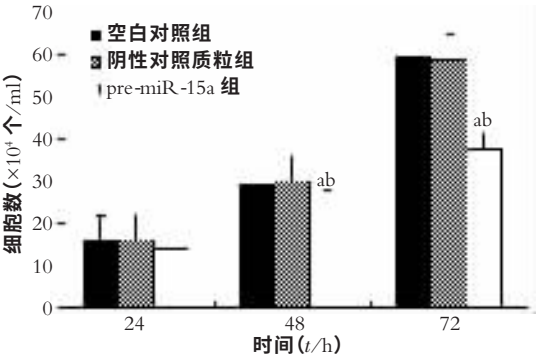
图4 转染重组质粒48 h后RT-PCR测得Bcl-2 mRNA表达水平

2.6 间接免疫荧光及流式细胞仪检测Bcl-2蛋白表达

转染48 h后pre-miR-15a组Bcl-2蛋白表达量为(58.4±1.1)%,与空白对照组和阴性对照质粒组比较明显降低($P<0.05$),后两组Bcl-2蛋白表达量分别为(97.8±0.6)%和(96.8±0.9)%,且二者间差异无显著性($P>0.05$)。

2.7 台盼蓝拒染法测细胞增殖情况

实验结果显示,终浓度为0.6 μmol/L的表达pre-miR-15a重组质粒转染Raji细胞后,24 h作用效果不明显($P=0.065$)。48 h和72 h可发挥对细胞的生长抑制作用,与空白对照组和阴性对照质粒组比较差异有显著性($P<0.05$),且随着作用时间的增加,效果逐渐增强,48 h作用效果明显,有明显的时效关系(图5)。



a:$P<0.05$,与阴性对照质粒组比较;b:$P<0.05$,与空白对照组比较

图5 台盼蓝拒染法检测miR-15a对Raji细胞的生长的抑制作用

3 讨论

大量研究表明miRNA的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]。有研究者证实[7],编码miRNA的基因通常都位于脆性位点和(或)与肿瘤相关的基因组区。探索这些miRNAs的功能及其靶基因对于人类的疾病治疗有重要意义。

miR-15a和miR-16-1位于13q14.3,一个30 kb的缺失区域,65%的B-CLL这两种基因水平下调[5]。Cimmino等[5]发现,在CLL中,miR-15a的表达与Bcl-2的表达成负相关,两种miRNA均可在转录后水平负性调节Bcl-2。这一研究说明,miR-15是Bcl-2的天然反义干扰物,可以通过它们来治疗Bcl-2过表达的肿瘤。因此,通过分子克隆和转染的方法实现miRNA的表达,对于探讨miRNA的生物学功能具有重要意义。体外合成的成熟的miRNA或miRNA前体在转染入细胞后容易被降解,作用不能持久,构建miRNA真核表达载体可以实现miRNA的持久表达,也更贴近于体内的miRNA表达方式,更有利于进行miRNAs的生物学研究。张小勇等[8]将pre-miR-16及其报告质粒pXF3H-HBs共转染肝癌细胞系HepG2后,实验组的HBsAg的基因表达量显著降低。

本实验是通过将体外扩增合成miR-15a前体序列

构建于 pGCSIL-GFP 真核表达载体,转染细胞后,在 U_6 启动子的作用下转录为“茎环”结构的 pre-miR-15a,通过细胞内自身的 RNA 聚合酶Ⅲ Dicer 的作用下剪接加工成为成熟 miR-15a,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,符合实验需要。pGCSIL-GFP 真核表达载体带有的启动子 U_6 具有明确的转录起点和终点,不会影响下游基因的表达,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。本实验还引入了结合通用引物快速简便鉴定阳性克隆的 PCR 方法,利用载体通用引物与 pGCSIL-GFP 真核表达载体进行菌液 PCR 反应,用 PCR 产物电泳结果来筛选阳性克隆,有效的对短插入片段重组子进行筛选与鉴定。与传统的酶切和普通 PCR 鉴定方法相比,该方法简便快速,是筛选和鉴定阳性克隆的有效手段[9]。本实验构建的 pre- miR-15a 真核表达载体经 PCR 阳性克隆鉴定及基因测序均与目的序列一致,这为进一步研究 miR-15a 在肿瘤细胞中的生物学功能奠定了实验基础。

本实验间接免疫荧光法检测 pre-miR-15a 组 Bcl-2 蛋白的表达量明显低于对照组,台盼蓝拒染法测 pre-miR-15a 组细胞 24 h 细胞计数与相应对照组间差异无显著性,而 48 h 和 72 h 增殖活性显著下降,结果表明,本实验成功构建了 pre-miR-15a 真核表达载体,且 pre-miR-15a 可下调 Bcl-2 蛋白的表达,而抑制 Raji 的生长。

参考文献:

[1] Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857 - 866.
[2] McManus M T. MicroRNAs and cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(4):253 - 258.
[3] Gregory R I, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3509 - 3512.
[4] Chen C Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. N Engl J Med, 2005, 353(17): 1768 - 1771.
[5] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, *et al*. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(39): 13944 - 13949.
[6] Zamore P D, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs[J]. Science, 2005, 309(5740): 1519 - 1524.
[7] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, *et al*. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(9): 2999 - 3004.
[8] 张小勇,余　冰,倪　明,等. 人 miR-16 真核表达载体的构建与鉴定[J]. 医学分子生物学杂志,2008,5(1):31 - 34,39.
[9] 崔　静,黄爱龙,张文露. 结合通用引物快速简便鉴定阳性克隆的 PCR 方法[J]. 生物技术通报,2008,(3):99 - 102.

(编辑　张　维)

文章编号:1000-5404(2009)23-2337-01

个案与短篇

成人返流性肾病 1 例

吴　静,杨惠标,袁发焕,赵景宏,黄云剑,张　憬,叶自林,冯　兵　(第三军医大学新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

1　资料资料

患者,男性,43 岁,因“腰痛伴夜尿增多 4 年余,发现肾功能减退 1 年”入院。患者入院前 4 年开始出现腰痛,伴夜尿增多,起夜 2 ~ 3 次,总量 600 ~ 800 ml,外院查腹部平片示“左侧输尿管上段靠近盆腔入口处轻度扩张”,诊治不祥。入院前 1 年发现血肌酐(SCr) 154.7 μmol/L,未行诊治。病程中患者无血尿,无尿路刺激征,无发热,无皮疹及关节肿痛。近日患者因腰痛加重,收入我科。入院时查体:血压 120/70 mmHg,心肺腹无异常。化验显示:尿常规示尿蛋白(+),尿比重 1.005,尿蛋白定量 0.77g/24 h;肾功:肌酐 182 μmol/L,尿素氮 6.4 μmol/L。腹部 B 超检查显示:右肾轻度增大,左肾明显缩小,双肾形态不规则;右肾小囊肿,膀胱壁较厚。静脉肾盂造影显示:双肾盂扩大及双侧输尿管稍增粗,左肾转位欠佳。自由尿流率测定最大尿流率正常。尿动力学分析正常。排尿性膀胱造影检查:输尿管、肾盂明显扩张,造影返流入全段输尿管及肾集合系统内(图 1)。肾脏活检病理报告:轻中度系膜增生性肾小球病变伴间质性血管慢性病变(图 2)。根据患者病史体征和辅助检查,确诊为返流性肾病。

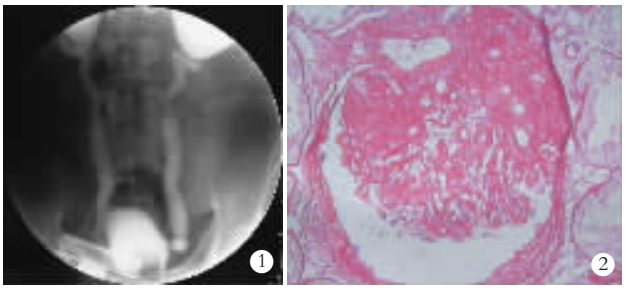


图 1　返流性肾病患者膀胱造影
图 2　肾脏活检组织病理观察　(过碘酸雪夫反应染色 ×400)

作者简介:吴　静,女,重庆市人,医师,主要从事急性肾炎方面的研究。电话:(023)60758057,E-mail:wujing_614@163.com

收稿日期:2009-02-13;修回日期:2009-02-26

(下转 2346 页)