维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)02-0138-04

微小 RNA 抑制胚胎细胞 MAD2 基因的表达

施 琼[1,2],翁亚光[2],徐远久[2],蔡 燕[2],蒋洪彦[2]

(1.重庆医科大学基础医学院放射医学教研室;2.重庆医科大学临床检验诊断学实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨微小 RNA(microRNA)抑制胚胎细胞 MAD2 基因表达的机理。方法:用定量 real-time PCR 比较 microRNA 转染前后的胚胎细胞内源性基因 MAD2 mRNA 表达水平,同时用 western blot 比较转染前后 Mad2 蛋白的表达水平。结果:对照组的 MAD2 基因 mRNA 拷贝数 /GAPAH mRNA 拷贝数为 0.1780 ± 0.0688,而转染 microRNA 重组质粒后,实验组的 mRNA 比值分别为 0.1778 ± 0.0689 和 0.1778 ± 0.0670,经统计分析,两实验组细胞的内源性 MAD2 基因 mRNA 水平与对照组无显著性差异;而其中一实验组的蛋白水平在转染后有明显降低。结论:microRNA 主要在翻译水平调节哺乳动物细胞内基因的表达,为研究基因表达的调控机制奠定了良好的基础。

【关键词】微小 RNA;MAD2 基因;定量 RT-PCR

【中国图书分类法分类号】R394.2;Q343.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-23

MicroRNA depresse the expression of MAD2 gene in trophoblastic cells

SHI Qiong, et al

(*Department of nucleur, College of Basie medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To discuss the mechanism of down-regulated expression of MAD2 gene in trophoblastic cells by microRNA. *Methods*: Endogenous MAD2 mRNA level was compared by using quantitative real-time PCR before and after transfected with microRNA plasmid; and the Mad2 protein level was compared by western blot. *Results*: Ratio of MAD2 mRNA/GAPDH mRNA of control group was 0.1780 ± 0.0688, and after transfected with microRNA recombinant plasmid was 0.1778 ± 0.0689 and 0.1778 ± 0.0670respectively. Statistical study of samples showed they have no instinct different; otherwise the protein level in one of the experimental groups was significantly decreased after transfected with microRNA plamid. *Conclusion*: This study established microRNA can down-regulate gene expression in mammalian cells at translation level, it is a good foundation to study on the control of gene expression.

【Key words】MicroRNA; MAD2 *gene*; *Quantitative real-time* PCR

MicroRNAs(微小 RNA,miRNA)是近两年发现的一大类单链 RNA 短片段,尽管对 miRNA 的研究还处于初级阶段,据推测 miRNAs 在高级真核生物体内对基因表达的调控作用可能和转录因子一样重要,它可能代表在一个新发现的层次上的基因表达调控方式。Rieder 等[1,2]认为细胞内的着丝粒点相关蛋白-关卡蛋白(Checkpoint protein,CP),是细胞分裂监控体系中的重要组成部分。同时,只有在细胞分裂的中期所有的染色体着丝粒点与纺锤丝连接并排列在细胞的赤道面时,细胞中的染色体才能正常地向细胞的两极移动并进入两个子细胞,人类 CP 中 MAD2(Mitotic Arrest Deficient)基因编码的 CP 的功能尤其引人注目本文利用 Real-timePCR、Western blot 等方法比较分析 microRNA 转染前后 MAD2 基因 mRNA 和蛋白水平的变化,探讨 miRNA 对 MAD2 基因表达的调控。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒及菌种:质粒为 PTZU6+1,菌种为 JM109,均来自重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室。

主要试剂和仪器:核酸内切酶购自 Promega 公司,脂质体 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen,Life technologies。DMEM 和特优级血清购自 Hyclon 公司。CK 抗体和波形蛋白抗体购自北京中山公司。定量 PCR 所用探针由上海 Genecore 合成。Mad2 蛋白一抗购自 Santa cruz 公司(抗体编号 SC-1720)。

作者介绍:施 琼(1969-),女,博士生,
主要研究方向:细胞周期和染色体分离。

基金项目:重庆医科大学校办课题(NSFLX200519)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

omniscript™ Reverse Transcriptase 试剂盒购自 QIAGEN。platinum Taq polymerase 购自 invitrogen,life technologies。T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司。Real-time PCR 仪为美国 MJ 公司生产的 opticon monitor2。

1.2 胚胎细胞的培养及鉴定

由重庆医科大学附属医院妇产科收集妊娠 10 周以内的人工流产胚胎,夫妇双方均无有毒有害物质接触史,家族中无遗传病史,女方无自然流产史和先兆流产的症状、年龄在 23~32 岁之间,染色体核型分析正常。

胚胎组织的所有器械均进行无菌处理,专人将胚胎组织及时送达细胞培养室,立即对胚胎组织进行洗涤和分选,获取其绒毛组织。

基础培养液是 DMEM,胎牛血清浓度为 20%,原代细胞培养 7~10 天进行传代,以后每次传代细胞的时间为 4~6 天。

用 CK7 抗体鉴定绒毛滋养层细胞为阳性,而非滋养层细胞为阴性;相反波形蛋白抗体作为阴性对照,鉴定绒毛滋养层细胞为阴性,而非滋养层细胞为阳性,鉴定细胞为 3~5 代的细胞。

1.3 microRNA 表达质粒的构建

美国哈福大学的分子实验室以实验为依据,应用生物信息学相关知识,为预测人类基因的 miRNA 建立了专门的检索网站:http://www.microrna.org/mammalian/index_new.html 我在该网站查找到本课题所需的 hsMAD2 的 miRNA 及作用位点是 123:has-mir-18 和 474:has-mir-190.其中茎环结构为 7 个碱基 TTAAGAG .BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)分析,microRNA 序列与其他基因没有同源性。MAD2 基因的 microRNA 序列交由上海生工合成,将其溶于三蒸水,使其终浓度为 25μm。将正反链按等摩尔数加入退火缓冲液,95℃孵育 5min,然后水浴缓慢使其降至室温,使其形成双链。

克隆所用的两个核酸内切酶位点是 Sal Ⅰ和 Xba Ⅰ,鉴定所用酶切位点 EcoR Ⅰ和 Hind Ⅲ,克隆质粒交由博亚测序,测序结果与合成序列完全吻合。

设计的 BUB1 基因的 microRNAs 序列如下:

MAD2-miRNA-1-F:TCGAGATAGACGTGATCTACGTGGAATTTAAGAGATTCCACGTAGATCACGTCTATTTTTT

MAD2-miRNA-1-R: CTAGAAAAAATAGACGTGATCTACGTGGAATCTCTTAAATTCCACGTAGATCACGTCTATC

MAD2-miRNA-2-F:TCGAGTGGATTATATAGTTTGTATAGTTTAAGAGACTATACAAACTATATAATCCATTTTT

MAD2-miRNA-2-R:CTAGAAAAATGGATTATATAGTTTGTATAGTCTCTTAAACTATACAAACTATATAATCCAC

1.4 转染胚胎细胞

测序鉴定后质粒抽提保存于-80℃。将培养 3~5 代的绒毛细胞计数后传至培养板中进行培养,24h 后,细胞完全贴壁,使用 Lipofectamine 2000 转染细胞,操作方法照说明书。

1.5 用定量 real-time PCR 测定转染前后 MAD2 基因的 mRNA 水平

A 实验组别设计:将原代培养的胚胎细胞,每空按 1×10^6 个细胞数种于 6 孔板中,待其长满后,3 孔转染 1.0μgPTZU6+1 空质粒即对照组,3 孔转染 1.0μg MAD2-miRNA-1 质粒组;3 孔转染 1.0μg MAD2-miRNA-2 质粒组,转染 48h 后,收集每组 1 孔细胞提取总 RNA,操作按说明书,紫外分光光度计对总 RNA 定量。应用一步法,即逆转录和扩增在同一体系内完成的聚合酶链反应。反应体积为 25μl。反应条件:50℃ 2min,95℃ 10min 1 个循环;95℃ 30s,60℃ 1min 40 个循环。其余两空收集细胞提取总蛋白,用于作 western blot 检测。

B MAD2 基因特异的引物和探针序列如下:(交由上海 necore 公司合成)

MAD2-FAM:CGAGTTCTTCTCATTCGG

MAD2-FP:GAGCAGGGAATCACCCTGC

MAD2-RP:CCACGCTGATATAAAATGCTGTTG

C 标准品用 T 载体构建(T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司),克隆序列如下:

TGTGGTTGCTGTCCGCGGAGTGGAAGCGCGTGCTTTTGTTTGTGTCCCTGGCCATGGCGCTGCAGCTCTCCCGGGAGCAGGGAATCACCCTGCGCGGGAGCGCCGAAATCGTGGCCGAGTTCTTCTCATTCGGCATCAACAGCATTTTATATCAGCGTGGCATATATCCATCTGAAACCTTTACTCGAGTGCAGAAATACGGACTCACCCTTGCTT

D 内参选用人的 GAPDH 基因,其探针和引物购自 Genecore 公司。

1.6 Western blot 检测 MAD2 蛋白水平

一抗已述,滴度 1:300。用 β-actin 作内参,选用鼠抗人的 β-actin 抗体(购自 Santa cruz 公司,编号为 SC-1720)。二抗为辣根过氧化物酶标记的鼠抗羊(用于 MAD2 蛋白检测)和羊抗鼠(用于 β-actin 检测)(均购自北京中山公司),滴度 1:5000。Western blot 用化学发光方法显色。北京鼎国的预染 marker。

2 结 果

2.1 滋养层细胞的培养和鉴定

绒毛组织块原代培养,再经消化传代法对其进行纯化,用 anti-cytokeratin 和 anti-vimentin 抗体对传代到第 5 代的细胞进行鉴定,结果 85%以上的细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞为滋养层细胞，满足实验要求。可作为质粒转染细胞。

2.2 定量 Real-time PCR 检测 MAD2 基因的 mRNA 水平

标准曲线的 r^2=0.999

每一样品做 5 个平行管。每例标本 MAD2 基因 mRNA 拷贝数与该标本 GAPDH 基因 mRNA 拷贝数之比值显示，转染 microRNA 质粒后，MAD2 基因的 mRNA 水平分别与对照组经 SPSS 12.0 软件对两独立样本进行 t-test 统计学检验，两实验组与对照组的比较结果均显示 $P>0.05$，无显著性差异，说明胚胎细胞在转染 microRNA 质粒后，其内源性基因 MAD2 的 mRNA 水平未受到影响，microRNA 对 MAD2 基因表达的调控不是在转录水平上实现的（见表 1）。

2.3 Western blot 检测转染 microRNA 质粒前后 Mad2 蛋白的表达

microRNA 质粒转染胚胎细胞 48h 后，其中转染 MAD2-miRNA-1 质粒组的 Mad2 蛋白水平明显降低，而转染 MAD2-miRNA-2 质粒组 Mad2 蛋白水平无明显变化，说明 microRNA 对靶基因蛋白表达的调节可能在转录后的翻译水平。

表 1 转染 microRNA 质粒前后胚胎细胞 MAD2 基因的 mRNA 拷贝数/GAPDH 基因 mRNA 拷贝数的统计分析表（n=5）

分组	MAD2 基因的 mRNA 拷贝数/GAPDH 基因 mRNA 拷贝数均值
对照组	0.1780 ± 0.0688
转染 MAD2-miRNA-1 质粒组	0.1778 ± 0.068
转染 MAD2-miRNA-2 质粒组	0.1778 ± 0.0670

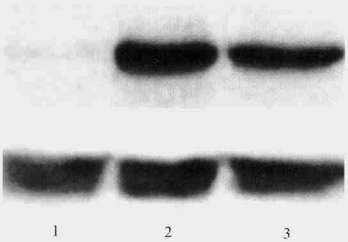


图 1 胚胎细胞转染 microRNA 质粒 48h 后 Mad2 的 western blot 结果图

1. 转染 pMAD2-miRNA-1 质粒后 48h
2. 转染 pMAD2-miRNA-2 质粒后 48h
3. 转染 ptzu6+1 空质粒后 48h

3 讨 论

MicroRNA（miRNA）是一种大小约 21~23 个核苷酸的单链小分子 RNA，是由具有发夹结构的约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后生成[3]。国外已研究发现，哺乳动物的胚胎癌性细胞（ECC）内有多种稳定存在的 microRNA，分别对不同的基因表达进行调控。MicroRNA 还具有组织和器官的特异性，在人的肝、肾、肺等组织器官分化形成阶段发现不同的 microRNAs 的稳定表达，以此来确立和（或）保持组成器官的细胞和组织生物学性状的稳定[4]。目前认为 microRNA 对目的基因的调节是依靠 microRNA 与目的基因的转录产物 mRNA 的 3'untranslated regions（3'UTR，非编码区）的特异核苷酸序列配对结合，可在翻译或转录后两个水平上实现[3]。在人类，micro RNAs 主要是对基因表达翻译水平的调节，所以对于翻译水平调节的基因，则 microRNAs 是基因表达调节很重要的机制；而对那些转录后水平调节的基因，microRNAs 同样可通过翻译水平的下调，起到辅助或补充调节的作用。针对不同的生物体以及同一生物体内不同的靶基因，microRNA 对其调控的方式是不明确的，使其成为 microRNA 研究中一个急待解决的问题。目前国内外对基因调控的机理尚不明确，这也是基因组学研究的重点和难点之一。已经证实哺乳动物多潜能状态细胞中表达的一簇 microRNAs[5]，在人和鼠的神经元细胞的分化成熟中起着重要的调节作用，microRNAs 的表达是多潜能状态干细胞分化为成熟神经元细胞必不可少的条件[6]。同时在疾病的研究中发现，有些 microRNAs 与染色体的重排有关，而这种染色体的重排会导致某种疾病的发生[7]。例如 Calin 等人报道，mir-15 和 mir-16 作用在染色体 13q14，在慢性淋巴细胞白血病（CLL，Chronic lymphocytic leukemia）病人中发现 mir-15 和 mir-16 的表达降低或完全不表达。另外文献报道已成功应用 northern blot 分析技术找到了与糖尿病发生有关的一簇 microRNAs，同时证实了 microRNAs 作用的靶基因，这项研究为了解身体如何调节胰岛素分泌过程开辟了新路，使我们对糖尿病发病机理认识有了重大突破，并可能为糖尿病的治疗奠定基础。随着 microRNAs 对靶基因表达调控机理研究的深入，从根本上使预防和治疗遗传病和基因病成为可能。miRNAs 在

维普资讯 http://www.cqvip.com

生命过程的某个阶段关闭或调控基因表达水平，从而控制细胞的多种生命活动，包括早期发育(Reinhart2000)，细胞增殖，细胞凋亡，细胞死亡(Brennecke2003)，脂肪代谢(Xu 2003)和细胞分化(Kawasaki2003)。MiRNA 在胚胎的发育和肿瘤的发生机制中有很重要的意义。

染色体正常分离是细胞分裂中一个十分重要的过程，在染色体的分离过程中有一个由 check-point protein(CP)组成的监控体系，能够准确地识别纺锤丝微管与染色体着丝粒点的连接，从而保证染色体的正常分离。目前认为 MAD2 是 CP 的主要成分之一，可以通过磷酸化和去磷酸化来调节其蛋白的活性起到调节纺锤体微管和着丝粒连接的作用。深入研究细胞内 MAD2 基因的表达，对探讨染色体不分离的分子机制具有十分重要的意义。

本课题组在完成 shRNA 干扰抑制 MAD2 基因表达的研究基础上，进一步研究 microRNA 对基因表达的调控机制。实验中分别用定量 real-time PCR 和 western blot 方法检测转染 microRNA 质粒前后的 MAD2 基因的 mRNA 水平和蛋白水平，发现 mRNA 水平在对照组和实验组无显著差异而蛋白水平在实验组明显降低，说明 microRNA 主要在翻译水平参于基因的表达调控。而与以前的 RNA 干扰主要在转录水平调节目的基因的表达有所区别。虽然近年来，人们发现了很多 miRNAs，但对其功能的研究进展缓慢。miRNAs 作为基因表达的重要调控机理，有很多奥秘等着我们去探索。随着我们在人体内发现的 miRNA 的增多，以及对 miRNA 认识的深入，人类就会在更高的层面上诠释与生命现象和疾病的发生有关的基因调控机理，为防治胚胎发育异常和肿瘤的发生奠定坚实的理论基础。

参 考 文 献

[1] Rieder CL, Cole RW, Alexey K, et al. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores [J]. J Cell Biol, 1995; 130(4): 941-948.

[2] Ouyang B., Lan Z., Meadows J, et al. Tension-sensitive kinetochore phosphorylation in vitro[J]. J Cell Sci, 1998; 111(21): 3189-3196.

[3] Palatnik JF, Allen E, Wu X, et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs[J]. Nature, 2003; 425: 257-263.

[4] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human[J]. RNA, 2003; 9: 175-179.

[5] Carthew RW. Gene regulation by microRNAs[J]. Curr Opin Genet Dev, 2006 16(2): 203-208.

[6] Freemantle SJ, Kerley JS, Olsen SL, et al. Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma [J]. Oncogene, 2002; 21: 2880-2889.

[7] Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation[J]. Curr Biol, 2003; 13: 784-789.