

· 基础研究 ·

利用绿色荧光蛋白进行 microRNAs 靶点分析的研究*

陈 可, 刘 湘[△]

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘 要:目的 利用绿色荧光蛋白作为报告基因, 研究微 RNAs(microRNAs)与靶点相互作用。方法 在 pEGFP-C1 下游非编码区插入含 miR-122a 作用靶序列 HCV 5'UTR, 构建 pEGFP-UTR 载体, 将 miR-122a 与 pEGFP-UTR 共转染 HEK293 细胞, 观察增强绿色荧光蛋白 EGFP 表达强度变化, 并与双荧光素酶报告系统比对。结果 miR-122a 能明显抑制含 UTR 靶序列的 EGFP 蛋白表达, 与双荧光素酶报告系统相比, 绿色荧光蛋白在检测灵敏度上与双荧光素酶相接近。结论 利用绿色荧光蛋白作为报告基因, 能够清楚直观反映 miRNAs 与靶点作用情况。

关键词:微 RNAs; 靶点; 增强绿色荧光蛋白; 报告基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.014

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)05-0453-02

Study of utilizing green fluorescent protein to analyze microRNAs targets*

Chen Ke, Liu Xiang[△]

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the interaction between microRNA and its target using enhanced green fluorescence protein (EGFP) as report gene. **Methods** MiR-122a target gene hepatitis C virus 5' untranslated region (UTR) was inserted into pEGFP-C1 to construct plasmid pEGFP-UTR. pEGFP-UTR and miR-122a were cotransfected into HEK293 cell line. At 48h after transfection, EGFP expression was detected by fluorescence microscope as well as Western blot. Meanwhile, the sensitivity of EGFP as report gene was evaluated by luciferase report gene. **Results** miR-122a could inhibit EGFP expression loading HCV UTR at its 3' untranslated region. And the sensitivity of EGFP was close to luciferase. **Conclusion** EGFP can be used as report gene to reflect microRNAs and target interaction clearly and directly, and the feature of EGFP make it a good material for screening microRNAs and its unknown target.

Key words: microRNA; target; enhanced green fluorescence protein; report gene

微 RNA(microRNAs, miRNAs)是由机体自身编码, 进化上高度保守的小 RNA, 其通过 5' 端种子序列(seed sequence)与靶基因 3'UTR 互补配对, 作用于多种靶基因 mRNA, 形成复杂而精细的分子调控网络从而广泛参与生命过程中一系列重要进程^[1-2]。不同于干扰 RNA, miRNAs 通过对基因表达广泛而细微的调控从而实现分子网络的整体调控^[3-7]。因此, miRNAs 具有多个靶点, 对于 miRNAs 靶点的验证分析主要是利用双荧光素酶报告系统进行研究。本研究利用外源绿色荧光蛋白作为报告基因, 分析 miRNAs 及其靶点相互作用^[8]。通过研究, 作者发现利用绿色荧光蛋白作为报告基因能够清楚反映 miRNAs 与其靶点的相互作用关系, 其检测灵敏度与双荧光素酶报告系统相接近, 本研究为寻找 miRNAs 靶点提供了一种新的简便可行的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 JM109 感受态细胞、HEK293 细胞由本实验室保存。绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-C1 购自 Invitrogen 公司, pGL3-control 购自美国 Promega 公司, miR-122a 由大连 TaKaRa 公司合成, 序列为: 5'-UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3', LNA-122 由上海康城生物公司合成, 序列为: 5'-CAA ACA CCA TTG TCA CAC TCC A-3'。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶购自大连 TaKaRa 公司。

Trizol、Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品。鼠抗 EGFP 一抗及羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥公司。限制性内切酶 Nhe I、BamH I、XbaI 购自大连 TaKaRa 公司。双荧光素酶报告系统购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 利用生物信息学在 miRNAs 相关数据库中找 miR-122a 靶点 HCV 的 5'UTR 序列, 设计特异引物扩增该 UTR 片段。上下游引物分别为: UTR 上游: 5'-TAA TCT AGA GGC GAC ACT CCA CCA TGA-3'; UTR 下游: 5'-TAA TCT AGA CCG GTT CCG CAG ACC ACT-3' 上下游分别引入了限制性内切酶切位点 Nhe I 和 BamH I。PCR 扩增条件为: 预变性 94℃, 5 min; 变性 94℃, 30 s; 退火 57℃, 30 s; 延伸 72℃, 20 s; 循环 30 次; 再延伸 72℃, 3 min。扩增产物插入 pEGFP-C1 下游 3' 端, 构建好的重组 pEGFP-UTR 质粒经酶切鉴定后送测序。依照同样的方法克隆并构建 pGL3-UTR 重组质粒, 用于双荧光素酶报告系统。

1.2.2 HEK293 细胞的培养和脂质体转染 HEK293 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (含青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 U/mL) 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。收集对数生长期细胞接种于 24 孔板, 16~18 h 后细胞融合度达 80%, 利用脂质体转染试剂 lipofectamine 2000 介导 miR-122a 分别与质粒 pEGFP-UTR 及 pGL3-UTR 共转染。同时设置 LNA-

122 与 pEGFP-C1 及 pGL3-control 作为空白对照。将上述各组转染 HEK293 细胞,设 3 个复孔,转染步骤按说明书进行。转染后 4 h,更换含 10 % 胎牛血清的 DMEM 完全培养基。

1.2.3 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达 转染后 48 h,在荧光显微镜下观察各实验组之间绿色荧光蛋白表达前差异,并拍照记录。用于转染的细胞在接种前均经过细胞计数,保证接种密度的一致性。

1.2.4 蛋白质印迹检测细胞内 EGFP 的改变 预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,加入细胞裂解液(含 10 % β_2 -巯基乙醇)裂解细胞,沸水煮 5 min,12 % SDS-PAGE 电泳,80 V 恒定电压 2 h,转至硝酸纤维素膜,含 5 % 奶粉 TBST 封闭 1.5 h,加入鼠抗 EGFP mAb (工作浓度为 1 : 5 000),4 ℃ 过夜, TBST 洗膜后,再加辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗(工作浓度为 1 : 10 000)室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min, ECL 化学发光法显影,暗室胶片曝光,以 GAPDH 为内参。

1.2.5 双荧光素酶报告系统进一步验证比较 HEK293 细胞转染后 48 h,裂解细胞进行双荧光素酶报告系统检测,依照 Promega 公司操作说明进行。

2 结 果

2.1 miRNAs 明显抑制含靶点序列的绿色荧光蛋白表达 转染后 48 h,于荧光显微镜下观察,发现含有 UTR 序列的绿色荧光蛋白表达强度明显弱于不含有靶序列的空白对照组;当利用 LNA-122 反义寡核苷酸技术干扰 miR-122a 表达后,绿色荧光蛋白表达明显增强(封 2 图 1)。利用分析软件发现,miR-122a 能使用 pEGFP-UTR 组荧光强度较正常组降低约 55 %,见图 2。

miR-122a抑制含UTR序列EGFP表达

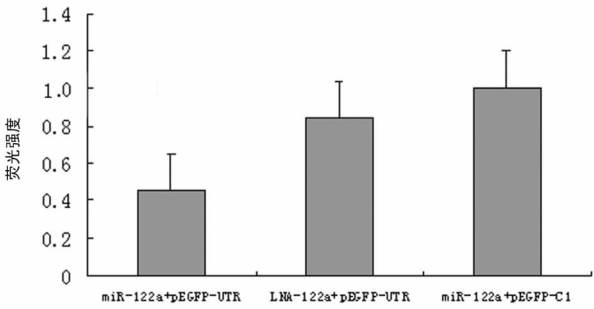
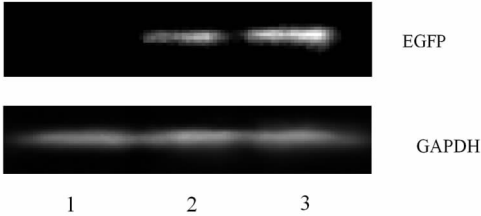


图 2 miR-122a 抑制含 UTR 靶序列绿色荧光蛋白表达强度分析

2.2 miRNAs 能够明显抑制绿色荧光蛋白 EGFP 表达 提取细胞总蛋白进行蛋白质印迹检测,发现 miR-122a 能明显降低含靶点序列绿色荧光蛋白表达量,在应用 LNA-122 干扰 miR-122a 表达后,绿色荧光蛋白表达量增强,见图 3。



1: MiR-122a + pEGFP-UTR; 2: LNA-122a + pEGFP-UTR; 3: MiR-122a + pEGFP-C1

图 3 miR-122a 抑制含 UTR 序列 EGFP 蛋白表达

2.3 绿色荧光蛋白外源报告系统与双荧光素酶报告系统比较

分析 为检测采用绿色荧光蛋白作为报告基因的灵敏度,将本系统的实验结果与双荧光素酶报告系统的结果进行了比较分析,通过对比发现,利用绿色荧光蛋白在检测灵敏度上与双荧光素酶报告系统相接近,见图 4。

miR-122对含UTR序列luciferase活性影响

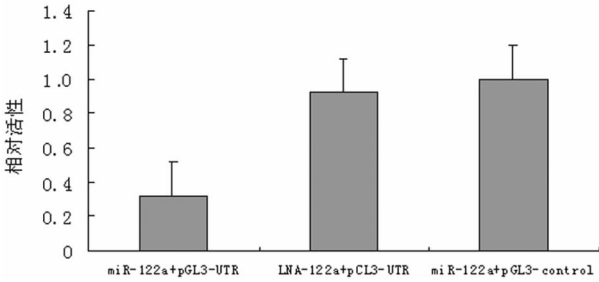


图 4 miR-122a 抑制含 UTR 靶序列从荧光素酶活性表达

3 讨 论

miRNAs 是近年来受学界热捧的明星分子。随着研究的深入,关于 miRNAs 的知识及其功能正在被逐一了解发现。对于 miRNAs 功能的研究首先是从寻找其靶位点开始的^[9-10]。目前,对于寻找 miRNAs 靶点的方法主要还是通过生物信息学预测,根据 miRNAs 自身作用特点对基因组中的非编码区序列进行搜索,找出符合条件的靶点序列^[10]。由于生物信息学分析本身存在假阳性,因此对于预测结果还需要利用实验手段进行验证^[11-15]。目前对于靶点验证最常用的是利用双荧光素酶报告系统对靶点进行甄别,双荧光素酶报告方法操作简单,灵敏度高,对于验证 miRNAs 靶点具有独特优势。然而,双荧光素酶检测需要特殊试剂及器材,如果用于大范围初步筛选费用过于昂贵。本研究利用增强绿色荧光蛋白作为报告基因,研究 miRNAs 和其靶点的相互作用。增强型绿色荧光蛋白是一种优化的突变型绿色荧光蛋白,其荧光比野生型强 35 倍,具有结构稳定、高效表达、无种系依赖性等特点,更适用于细胞基因表达和蛋白定位检测及细胞示踪标记。本研究发现,miRNAs 能够明显降低含靶序列 EGFP 蛋白表达,在检测灵敏度上,利用 EGFP 和 luciferase 相接近,且 EGFP 作为一种报告基因较之 luciferase 具有稳定性好,不易衰减等特点,对于 EGFP 的检测不需要特殊试剂,降低了检测成本。对于同时进行多个靶点筛选来说,应用 EGFP 进行初筛具有独到的优势。

参考文献:

[1] Bentwich I. A postulated role for microRNA in cellular differentiation[J]. FASEB J, 2005, 19(8): 875- 879.
[2] Chen YX, Raymond LS. Differential Patterns of MicroRNA Expression in Neuroblastoma Are Correlated with Prognosis, Differentiation, and Apoptosis[J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 976-983.
[3] Mati M, Omer B, Reuven A, et al. MiRNA-based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate[J]. PNAS, 2010, 107(36): 15804-15809.
[4] Selvi D, Bart JK, Izabella SP, et al. MicroRNAs, macro Control: Regulation of miRNA processing [J]. RNA, 2010, 16(6): 1085-1095.
[5] Josh TC, Noah F, James C. Carrington. Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes [J]. Plant Cell, 2011, 23(2): 431-442.

成功。随着鼠龄增长,裸鼠免疫功能逐渐增强,肿瘤可能逐渐消失。如需长期观察,可以在实验前进一步抑制裸鼠免疫功能,延长肿瘤生长时间。

本次研究通过 CP 细胞原代培养,裸鼠皮下种植纯化的肿瘤细胞悬液初步建立了 CP 移植瘤动物模型。该方法成瘤时间短、操作简便、损伤小、瘤体保持原有上皮表型,可以作为 CP 移植瘤模型的实验方法之一。但该方法目前相对成瘤率仍较低,以后实验可以通过提高细胞密度、增强细胞增殖活性或降低裸鼠免疫能力等方法,改善该移植瘤模型成功率。

参考文献:

[1] Garrè ML,Cama A. Craniopharyngioma:modern concepts in pathogenesis and treatment[J]. Curr Opin Pediatr,2007 (19):471-479.

[2] Müller HL. Childhood craniopharyngioma-current concepts in diagnosis, therapy and follow-up [J]. Nat Rev Endocrinol, 2010(6):609-618.

[3] Holsken A,Buchfelder M,Fahlbusch R,et al. Tumour cell migration in adamantinomatous craniopharyngiomas is promoted by activated Wnt-signalling [J]. Acta Neuropathol,2010,119(5):631-639.

[4] Wang KC,Hong SH,Kim SK,et al. Origin of craniopharyngiomas:implication on the growth pattern [J]. Childs New Syst,2005,21(8/9):628-634.

[5] Xia ZQ,Liu WQ,Li SD,et al. Expression of matrix metalloproteinase-9,type IV collagen and vasmlar endo thelinl growth factor in adamantinons craniopharyngion a [J]. Neurochem Res,2011,36(12):2346-2351.

[6] Xu J,You C,Zhou L,et al. The cell-cycle kinetics of craniophawgnioma and its clinical ilgificance[J]. J Neuroon-

col,2010,98(1):71-76.

[7] 江荣才,刘字更是,朱诚. 颅咽管瘤现代培养和博莱霉素的体外抑瘤实验[J]. 中华神经外科杂志,2001,17(1):29-31.

[8] 徐建国,游潮,蔡博文,等. 颅咽管瘤动物模型的初步建立 [J]. 中华神经外科杂志,2005,21(9):564-567.

[9] Li Z,Huang X,Li J,et al. Human breast carcinoma xenografts in nude mice[J]. Chin Med J (Engl),2002,115(2):222-226.

[10] Kohrt HE,Houot R,Goldstein MJ,et al. CD137 stimulation enhances the antilymphoma activity of anti-CD20 antibodies[J]. Blood,2011,117(8):2423-2432.

[11] Marampon F,Bossi G,Ciccarelli C,et al. MEK/ERK inhibitor U0126 affects in vitro and in vivo growth of embryonal rhabdomyosarcoma[J]. Mol Cancer Ther,2009,8 (3):543-551.

[12] Morikawa K,Walker S M,Jessup J M,et al. In vivo selection of highly metastatic cell from surgical specimens of different primary human colorectal carcinomas implanted into nude mice[J]. Cancer Res,1988,48(9):1943-1948.

[13] 周杰,潘军,漆松涛. 颅咽管瘤相关基础研究现状 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2010,37(5):426-429.

[14] Xu JG,You C,Zhang SZ,et al. Angiogenesis and cell proliferation in human craniopharyngioma xenografts in nude mice[J]. J Neurosurg,2006,105 Suppl 4:S306-310.

[15] 张磊涛,黄洪章,曾东林,等. 人成釉细胞瘤裸鼠皮下移植瘤模型的建立 [J]. 华西口腔医学杂志,2007,25(1):12-14.

(收稿日期:2011-09-23 修回日期:2011-10-20)

(上接第 454 页)

[6] Lim LP,Lau NC,Garrett EP,et al. Microarray analysis shows that somemicroRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. Nature,2005,433(17):769-773.

[7] McDaneld TG. MicroRNA:mechanism of gene regulation and application to livestock [J]. J Anim Sci, 2009, 87 Suppl 14:E21-E28.

[8] Mendes ND,Freitas AT,Sagot MF. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets[J]. Nucleic Acid Res,2009,37(8):2419-2433.

[9] Ray MM,Jiri V. Efficient use of accessibility in microRNA target prediction[J]. Nucleic Acids Res,2011,39(1):19-29.

[10] Masashi I,Koji O,Naoto T,et al. Functional screening using a microRNA virus library and microarrays; a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs[J]. Carcinogenesis,2010,31(8):1354-1359.

[11] Pfeffer S,Zavolan M,Grasser FA,et al. Identification of

virus-encoded microRNAs[J]. Science,2004,304(5671):734-736.

[12] Pfeffer S,Sewer A,Laqos QM,et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family [J]. Nat Methods, 2005,2(4):269-276.

[13] Xu YP,Zhou XF,Zhang WX. MicroRNA prediction with a novel ranking algorithm based on random walks [J]. Bioinformatics,2008,24(13):i50- i58.

[14] Toffanin S,Hoshida Y,Lachenmayer A,et al. MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a[J]. Gastroenterology,2011, 140(5):1618-1628.

[15] Nikolov S,Vera J,Schmitz U,et al. A model-based strategy to investigate the role of microRNA regulation in cancer signalling networks[J]. Theory Biosci,2011,130(1):55-69.

(收稿日期:2011-04-16 修回日期:2011-07-07)