

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.001

• 基础研究 •

miR-126 报告基因载体的构建及其功能鉴定*

邬灿杰 卞兆连 盛黎 马雄[△]

(上海交通大学医学院附属仁济医院消化所及消化科 上海 200127)

摘要 目的:根据 miR-126 的预测靶点构建荧光素酶报告基因重组质粒,并进行功能鉴定。**方法:**利用 sanger 数据库提供的 miR-126 靶序列设计引物,PCR 扩增目的微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 靶基因 3' 非编码区 (three-prime untranslated regions, 3'UTRs) 序列,PCR 产物双酶切,后连入经过同样双酶切的 pGL3-control 载体中,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,进行阳性克隆鉴定。同样,将候选靶基因 3' UTRs 突变,突变型 3' UTR 克隆入 pGL3-control 报告载体,构建野生型和突变型的报告基因重组质粒。将野生型和突变型的报告基因载体分别和化学合成的 microRNA 以及内参质粒共转染 293TN 细胞,进行双荧光素酶检测。**结果:**成功构建 miR-126 报告基因野生型和突变型重组质粒 pGL3- VEGF-A -3'UTR 和 pGL3- VEGF-A -3'UTR,质粒测序及酶切结果完全正确。瞬时转染实验显示,过表达 miR-126 能直接抑制 VEGF-A-3'UTRs 报告基因活性。**结论:**miR-126 对 VEGF-A 具有靶向调节功能。

关键词: miR-126; 荧光素酶报告基因; 靶基因

中图分类号: Q75, Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)05-801-04

Construction of miR-126 Reporter Gene Vector and Detection of Its Function*

GUO Can-jie, BIAN Zhao-lian, SHENG Li, MA Xiong[△]

(Digestive Disease Laboratory and Department of Gastroenterology, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200127, China)

ABSTRACT Objective: To construct miR-126 luciferase reporter gene vector according to miR-126 predicted target sequences and to detect its function. **Methods:** The primers were designed and amplified by using the putative target site for miR-126 predicted by Sanger database and inserted at the XbaI site, and immediately downstream of the luciferase gene in the pGL3-control vector. A mutant version with a deletion the site of perfect complementarity was also generated. Wild type and mutant recombinant plasmid for pGL3-vegfa -2-3'UTR and pGL3-mutvegfa -2-3'UTR were constructed and confirmed by sequencing. Twenty four hours before transfection, pGL3-vegfa-3'UTR or pGL3-mutvegfa-3'UTR plus pRL-TK were transfect alone or in combination with miR-126 mimics. Luciferase activity was measured 24hr after transfection. **Results:** pGL3-vegfa-3'UTR and pGL3-mut vegfa-3'UTR recombined luciferase reporter gene vector were constructed successfully, and the result of sequencing and double digesting of recombined plasmid were completely correct. The experiment showed that luciferase activity of pGL3-vegfa-3'UTR reporter gene decreased after miR-126 overexpression. **Conclusion:** VEGF-A is the target of miR-126.

Key words: miR-126; Luciferase reporter gene; Target gene

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-801-04

前言

miRNAs 是近年发现的以序列特异性方式调控基因表达的一种非编码蛋白质的单链小分子 RNA, 长度通常为 21~25 核苷酸 (nucleotide, nt)。miRNAs 主要与靶基因转录的 mRNA 3' UTRs 通过完全互补或不完全互补方式结合, 在转录后水平调节靶基因的表达^[1]。一个 miRNA 可调节数百个靶基因包括转

录因子、细胞因子、受体等, 几种 miRNAs 也可以联合调控单一基因的表达, miRNAs 和靶基因组成了复杂的调节网络^[2], 揭示 miRNA 的作用靶点对认识体内 miRNAs 之间、miRNAs 与 mRNA 之间、miRNAs 与蛋白质以及 DNA 之间的网络交互作用具有重要意义。

依据 miRNA 与靶基因的 3' UTR 序列存在互补性, 同一家族的成熟 miRNAs 在 5' 端具备高度同源性, 成熟 miRNA 的

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81100296); 上海市青年科技启明星

计划项目(13QA1402500)

作者简介: 邬灿杰(1981-), 女, 博士, 医师, 主要研究方向: 肝纤维化发病机制

[△] 通讯作者: 马雄, 电话: 008621-63200874, E-mail: guocanjie@aliyun.com

(收稿日期: 2013-07-10 接受日期: 2013-07-30)

2~8 位碱基序列为“miRNA seed”原则^[3],采用 miRanda 法对 GeneBank 中的序列进行扫描,搜索 miRNA 的靶基因^[4]。结果发现,miR-126 与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)VEGF-A mRNA 间存在 7 bp 的互补序列,有较强的互补性,可作为反义作用因子与其结合,在转录后水平对 VEGF-A 起负调节作用。因此,为进一步证实,本课题组利用双荧光素酶报告基因实验对 miR-126 的潜在靶基因进行验证,为其后续的功能研究提供了良好的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

pGL3-control 载体(E1741),pRL-TK 载体(E6241)和 Dual-Luciferase RePorter Assay 试剂盒购于 Promega 公司,Taq DNA 聚合酶、dNTP、T4DNA 连接酶限制性内切酶、DNA marker、质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒:大连宝生物

(TaKaRa)工程有限公司;基因组 DNA 提取试剂盒:申能博彩生物科技有限公司;质粒中提试剂盒:Qiagen 公司;DMEM 培养基,胎牛血清:Gibco 公司;大肠杆菌 DH 5 α ,293TN 细胞均由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 查询 Sanger miRBase 数据库收录的 miRNA 数据,找到 mir-126 的成熟序列,采用 miRanda 法对 GeneBank 中的序列进行扫描,搜索 miRNA 的靶基因,结果发现,miR-126 与 VEGF-A mRNA 间存在较强的互补性,miR-126 与 VEGF-A mRNA 存在 7 bp 的互补序列。(图 1)根据提供的靶序列,设计引物序列,野生型引物:上游引物 5'-CTGCTCTA-GAGACAAAGACG-3';下游引物 5'-AATCTGTGTTTCCAATC-TCTCTC-3'。突变型上游引物 5'-CTGCTCTAGAGACAAAG-ACGTGATGTT AATATCTTTTCCCCACATAAATACTTGGA-TAA-3';下游引物 5'-AATCTGTGTTTCCAATCTCTCTC-3'。



图 1 miR-126 与 VEGF-A 3'UTR 预测结合靶点

图 1 Putative binding sites of miR-126 in VEGF-A 3'UTR

1.2.2 PCR 扩增 取 1 μ g 总 DNA 按 PCR 反应体系试剂盒操作,以大鼠基因组 DNA 为模板,PCR 扩增,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min(预变性);94 $^{\circ}$ C 30 s(变性),相应退火温度 45 s(退火),72 $^{\circ}$ C 45 s(延伸),共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min(延伸)。扩增产物于 2%琼脂糖凝胶中电泳,条带长度根据 2000 bp DNA 分子量 marker 确定。

1.2.3 重组表达载体 pGL3-VEGF-A-3'UTR 和 pGL3-mutVEGF-A-3'UTR 的连接、序列鉴定 对质粒表达载体(pGL3 vector)以及回收的 PCR 片段进行酶切线性化处理,取 10 μ L 酶切产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,切胶后回收酶切产物,分光光度计测定 OD260 值,计算浓度。取 50 μ L 感受态细菌 DH5 α ,加入 10 μ L 连接产物。将抽提质粒做酶切鉴定,将含有重组质粒的菌液送上海英骏生物技术公司作 DNA 测序鉴定,以证实目的片段确是否克隆入载体。

1.2.4 双荧光素酶检测 293 细胞培养 24 小时。实验分五组:单加 pGL3-control(100ng)组,单加 pGL3-VEGFA-3'UTR (100ng)组,pGL3-VEGFA-3'UTR (100ng)和 mir-126 (50nM)组,pGL3-mutVEGFA-3'UTR 和 miR-126 (50nM)组,pGL3-VEGFA-3'UTR 和 miR-GFP (50nM)组,转染试剂用 Qiagen 公司的 Hiperfect 转染试剂,浓度按照说明书推荐。所有的实验组均同时转染 pRL-TK (Promega) 海肾质粒作为内参。转染 24 小时后,按 Promega 试剂盒 Dual-Luciferase RePorter Assay System 技术手册操作(图 6)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件包对所获数据进行统计学分析。所有实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示,组间差异采用 t 检验, $P < 0.05$ 表明差异有统计学差异。

2 结果

2.1 microRNA 靶基因预测

跨物种比较 microRNA 序列的保守性及种子序列的保守性,可见靶位点 ATTATTA 在大鼠、小鼠、人类跨物种中存在保守性,即靶位点在多物种 3'UTR 比对中相同位置碱基相同。根据 miRanda 靶基因预测软件,大鼠、小鼠、人类三种物种中 miRNA 的 5' 端和靶 RNA 的 3'UTR 端结合,miRNA 的 5' 端 2-8 或 2-7 个核苷酸称为种子区(seed region),miRNA 种子区能与靶序列配对。

2.2 VEGF-A-3'UTR 和 mutVEGF-A-3'UTR 的 PCR 扩增

2%琼脂糖凝胶电泳。PCR 成功扩增出包括野生型和突变型 VEGF-A 3'UTR 的片段,电泳结果可见大小分别约 433bp (野生型)和(突变型)的特异性条带。M 为 DL2000 DNA Marker,1 为 mutVEGF-A-3'UTR 的 PCR 产物,2 为 VEGF-A-3'UTR 的 PCR 产物。

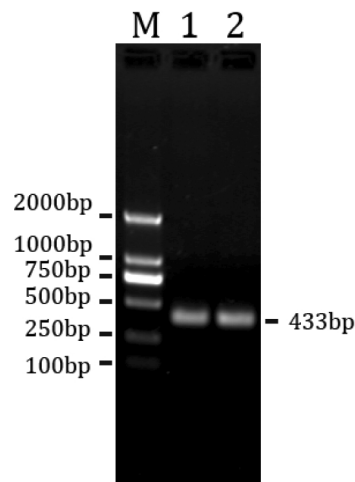


图 2 VEGF-A-3'UTR 和 mutVEGF-A-3'UTR 的 PCR 产物凝胶电泳结果

Fig.2 Gel electrophoresis of the PCR product of VEGF-A-3'UTR and mutVEGF-A-3'UTR

2.3 荧光素酶报告基因载体的示意图

miRNA 靶标表达克隆包含 SV40 启动子驱动的报告基因 (萤火虫荧光素酶) 的下游紧接 3'-UTR (即 miRNA 作用位点)

序列。第二个报告基因 renilla luciferase, 可用于监测转染, 表达效率, 并可以作内参。



图3 萤火虫报告基因基本结构

Fig.3 Schematic representation of the basic structure of firefly luciferase (f-luc) reporter gene

2.4 PCR 鉴定阳性克隆

根据 DNA Marker 判断, 目的条带 (528bp=433bp (片段) +95bp (载体多克隆位点两端)) 长度所处位置正确, 所检测的 4 组菌落均为阳性转化菌株。

2.5 测序鉴定结果

测序鉴定图谱结果与设计序列完全一致 (图 5)。

2.6 Luciferase 活性检测

在含有 VEGF-A-3'UTR 预测靶位点的质粒构建成功后, 将其与 mir-126 转染 293TN, 转染 28h 后进行分析荧光素酶活性, 反映 VEGF-A-3'UTR 是否可与预测靶标作用。结果如图 6 所示: 在稳定表达的细胞系 293TN 中, 当转染了含 VEGF-A-3'UTR 预测靶位点的质粒 pGL3-VEGF-A-3'UTR 后, 荧光素酶的活性有明显降低, 而含有 mutVEGF-A-3'UTR 序列的阴性对照和空白质粒都没有明显变化: 在稳定转染了 pGL3-mutVEGF-A-3'UTR 和 pGL3-control 的细胞中, 荧光素酶的活性均没有明显变化。因此, 提示 VEGF-A-3'UTR 基因组中 ATTATTA 就是 mir-126 的靶位点。

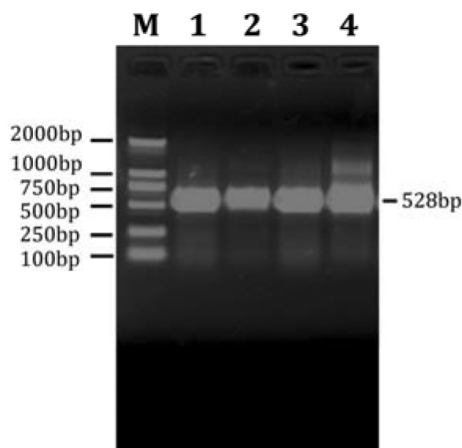


图4 PCR 产物阳性菌落检测电泳 M 道: DL2000 分子量标准; 1-4 道: 阳性菌落

Fig.4 PCR screen positive clone, agarose gel electrophoresis analysis of PCR products

M lane: DL2000 DNA marker; 1-4 Lane: positive clone

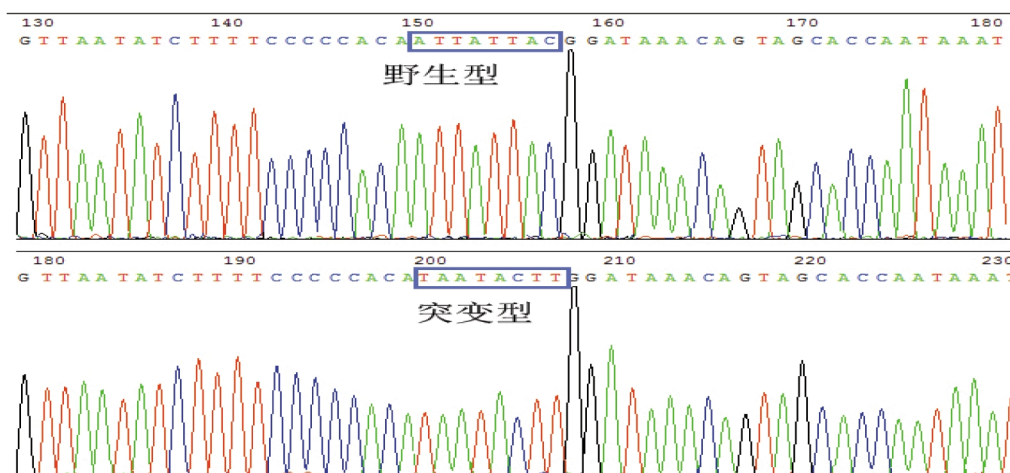


图5 慢病毒载体 pGL3-VEGF-A-3'UTR 和 pGL3-mutVEGF-A-3'UTR 的测序图

Fig.5 Sequencing map of the lentiviral vector pGL3-VEGF-A-3'UTR and pGL3-mutVEGF-A-3'UTR

3 讨论

miR-126 及其互补相似物 miR-126* 是目前最受关注与血管生成有关的基因表达调控因子, 定位于表皮生长因子样结构域 7 (epidermal growth factor-like domain 7, EGFL7) 基因 7 号内含子内^[5,6]。在许多肿瘤细胞或组织中, miR-126 表达较正常组

为低^[7-10]。不仅如此, miR-126 还在细胞生长增殖、免疫调节方面起着重要的作用^[11-14], 这一特点无疑将使 miR-126 成为治疗肿瘤的一种新的选择。在 miRNA 的研究过程中, 遇到最大的瓶颈就是 miRNA 靶基因的证实, miRNA 被预测可调控上千种哺乳动物的基因, 但是相对的, 只有很少的靶点经过试验有效的确认^[15]。由于 miRNA 只与其靶基因的 3' -UTR 的 18-22 个碱基

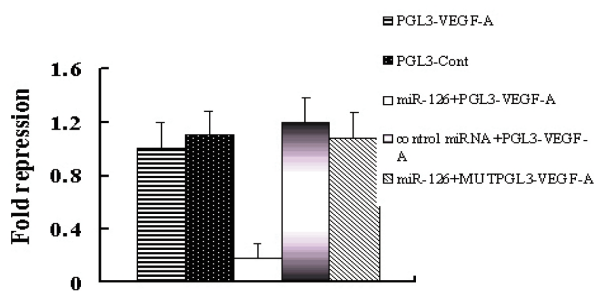


图6 双荧光素酶法检测报告基因强度,293TN细胞分为5组分别被共转染后在荧光分光光度计检测萤火虫素酶强度,单加 PGL3-control (100ng)组,单加 pGL3-VEGF-A-3'UTR (100ng)组, pGL3-VEGF-A-3'UTR (100ng)和 miR-126 (50nM)组, pGL3-mutVEGF-A-3'UTR 和 miR-126 (50nM)组, pGL3-VEGF-A-3'UTR 和 miR-GFP (50nM)组。数据采用均数± 标准差,重复4次。"*":表示与空白对照组(Con组)比较具有显著性差异($P < 0.05$)

Fig.6 Dual luciferase assay is performed in 293TN, which has been transfected with luciferase construct alone or cotransfected with miR-126 mimics or mimics control. Firefly luciferase construct containing mutant (MutPGL3-VEGF-A) target site of the VEGF-A 3'UTR is generated and transfected as indicated. Firefly luciferase activity is normalized to Renilla luciferase activity for each sample. * $P < 0.05$ compared to pGL3-VEGF-A.

配对,其可以通过部分或者全部配对起作用,因此一个 miRNA 可以有数千个靶基因,一个靶基因也可以有数千个 miRNA 与其配对,它们形成错综复杂的网状结构,给靶基因的预测和证实带来了困难^[16]。大规模的 miRNA 靶基因芯片筛选技术已经开始运用,为疾病的发病机制和诊断治疗的研究提供了新的思路,但芯片技术也有其局限性,包括信息质量的稳定性差、费用较高等^[17]。通过生物信息学预测和体外荧光素酶报告基因的证实仍然是目前 miRNA 靶标寻找的最常用的方法^[18,19]。荧光报告载体实验是即将含有目的 miRNA 结合位点的靶基因 mRNA 3' UTR 片段克隆插入荧光素酶编码区的下游,构建荧光报告载体^[20]。当前,利用荧光素酶报告基因检测实验寻找或验证 miRNA 对靶点作用性已成为不可或缺的实验技术。

本研究通过生物信息学分析发现 VEGF-A 可能是 miR-126 的靶基因,且相关性极大,同时通过构建 miR-126 报告基因野生型和突变型重组质粒 pGL3-VEGF-A-3'UTR 和 pGL3-mutVEGF-A-3'UTR,并与含海肾荧光素酶的内参质粒 pRL-TK 共转染 293TN 细胞,运用双荧光素酶报告基因法检测 miR-126 对 pGL3-VEGF-A-3'UTR 的直接作用,通过观察荧光素酶的表达强度证实了我们的假想---VEGF-A 就是 miR-126 的靶基因。miR-126 报告基因载体的成功构建及其体外实验证实了其靶基因 VEGF-A 良好的可控性,为后续基因研究和治疗提供了新的实验基础。

参考文献(References)

[1] Okamura K. Diversity of animal small RNA pathways and their biological utility[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012, 3(3): 351-368

[2] O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D, et al. microRNA regulation of inflammatory responses[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 295-312

[3] Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, et al. Strategies to deliver microRNAs as potential therapeutics in the treatment of cardiovascular pathology[J]. Drug Deliv, 2012, 19(8): 392-405

[4] Witkos TM, Koscińska E, Krzyżosiak WJ, et al. Practical Aspects of microRNA Target Prediction[J]. Curr Mol Med, 2011, 11 (2): 93-109

[5] Meister J, Schmidt MH. miR-126 and miR-126*: new players in cancer[J]. Scientific World Journal, 2010, 10: 2090-2100

[6] Li Z, Chen J. In vitro functional study of miR-126 in leukemia[J]. Methods Mol Biol, 2011, 676: 185-195

[7] Yan T, Liu Y, Cui K, et al. MiR-126 regulates EPCs function: implications for a role of miR-126 in preeclampsia[J]. J Cell Biochem, 2013

[8] Zhang Y, Yang P, Sun T, et al. miR-126 and miR-126(*) repress recruitment of mesenchymal stem cells and inflammatory monocytes to inhibit breast cancer metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(3): 284-294

[9] Shi H, Chen L, Wang H, et al. Synergistic induction of miR-126 by hypoxia and HDAC inhibitors in cardiac myocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(2): 827-832

[10] Shen J, Stass SA, Jiang F, et al. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors[J]. Cancer Lett, 2013, 329(2): 125-236

[11] Watahiki A, Wang Y, Morris J, et al. MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer[J]. PLoS ONE, 2011, 6(9): e24950

[12] Rahbari R, Holloway AK, He M, et al. Identification of differentially expressed microRNA in parathyroid tumors [J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18 (4): 1158-1165

[13] Namlos HM, Meza-Zepeda LA, Baroy T, et al. Modulation of the Osteosarcoma Expression Phenotype by MicroRNAs[J]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e48086

[14] Zandberga E, Kozirovskis V, Abols A, et al. Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2013, 52(4): 356-369

[15] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing [J]. Mol Cell, 2007, 27(1): 91-105

[16] Mathelier A, Carbone A. Large scale chromosomal mapping of human microRNA structural clusters[J]. Nucleic Acids Res, 2013

[17] Gao Z, Shi T, Luo X, et al. High-throughput sequencing of small RNAs and analysis of differentially expressed microRNAs associated with pistil development in Japanese apricot [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 371

[18] Zhao WG., Yu SN, Lu ZH, et al. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(10): 1726-1733

[19] Qin A, Wen Z, Zhou Y, et al. MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(2): 252-264

[20] Wang W, Zhao LJ, Tan YX, et al. MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(5): 1113-1120