

[文章编号] 1007-385X(2007)02-0187-03

· 短篇论著 ·

Survivin 靶向 microRNA 表达载体的构建和鉴定

Construction and identification of microRNA expression vector targeting survivin gene

骆晓梅, 刘家云, 苏明权, 郝晓柯(第四军医大学西京医院检验科, 西安 710032)

[摘要] **目的:** 设计并构建 Survivin 靶向的 microRNA 表达载体, 观察其对 Survivin 基因的抑制作用。**方法:** 以 Survivin 为靶基因, 根据 pPRIME 载体要求, 设计针对 Survivin 的 microRNA 序列, PCR 扩增获得目的片段并克隆到载体中, 序列正确的载体脂质体转染 Hela 细胞, RT-PCR 和 Western blotting 检测其对 Survivin 的抑制作用。**结果:** 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定、DNA 测序证实构建的 microRNA 表达载体序列正确, 后者在 mRNA 和蛋白水平上均能明显抑制 Hela 细胞中 Survivin 的表达。**结论:** Survivin 靶向 microRNA 表达载体构建成功, 并能抑制靶基因的表达, 为其在肿瘤基因治疗中的应用奠定了基础。

[关键词] microRNA; Survivin; 靶向治疗

[中国分类号] R730.54 **[文献标志码]** A

microRNA 是一组长约 22 个核苷酸的非编码 RNA 分子, 其在基因表达调控中发挥着重要作用。microRNA 在不同组织不同发育阶段的持续保守性表达, 具有广泛的调控功能。其作用机制是通过与靶 RNA 的序列互补, 与靶序列部分互补的 microRNA 能抑制 mRNA 的翻译, 与靶序列高度互补的 microRNA 能使靶序列降解^[1-2]。目前, 在线虫、果蝇、水稻及人类等真核生物中已鉴定出大约 700 种 microRNA^[3]。microRNA 调控基因表达的功能与来源无关, 因此, microRNA 已经成为重要的实验工具^[4]。

Survivin 是凋亡抑制蛋白(IAP)家族中的新成员, 在人类众多恶性肿瘤中高表达, 具有强烈的凋亡抑制功能和促细胞增殖活性, 并与部分肿瘤的血管生成和预后密切相关, 因而已成为基因治疗的热门靶点^[5]。为探讨 microRNA 在肿瘤治疗中的应用, 本研究设计并合成了靶向 Survivin 的 microRNA 序列, 构建了 microRNA 的表达载体, 转染 Hela 细胞, 观察其对 Survivin 的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Hela 细胞为本实验室保存, pPRIME 载体为哈佛大学医学院 Elledge 教授惠赠; RPMI 1640 为 Gibco 公司产品; Vent DNA 聚合酶为 NEB 公司产品; *Xho* I 酶、*Eco*R I 酶和 T4 DNA 连接酶均为 Takara 公司产品; 山羊抗人 Survivin 多克隆抗体为 R&D 公司产品; HRP 标记的兔抗山羊二抗为博士德公司产品; HRP 标记的鼠抗 GAPDH 为康成公司产品; TR-Izol、脂质体 Lipofectamine 2000 为 invitrogen 公司产品; RT-PCR 试剂盒、质粒纯化试剂盒及胶回收试剂盒为 Promega 公司产品。其他试剂均为国产或进口

分析纯。

1.2 Survivin 靶向特异性 microRNA 的设计

根据 Survivin 基因序列(NM_001168), 应用 RNAi 设计软件设计 microRNA, 采用 BLAST 对选择的靶序列进行同源分析, 排除非特异性 microRNA。选择 Survivin 基因 cDNA 序列中 22 nt 片段为合适的 microRNA 靶序列, 其序列为: CCCAGTGTTCCTTCTGCTTCA。根据 pPRIME 载体的要求, 设计 97 nt 的 pre-microRNA 长链序列: 5'-TGCTGTTGACAGT-GAGCGACCCAGTGTTCCTTCTGCTTCATAGTGAAGC CACAGATGTATGAAGCAGAAGAAACACTGGGCTGC CTACTGCCTCGGA-3'。同时设计一对两端分别含有 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切位点的引物, 其序列分别为 P1: 5'-GATGGCTGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTG ACAGTGAGCG-3'; P2: 5'-GTCTAGAGGAATTC CGA GGCAGTAGGCA-3'。上述核苷酸由北京奥科生物技术有限公司合成。

1.3 microRNA 表达载体的构建

以合成的 97 nt 的长链为模版, 加入引物 P1、P2 和 Vent DNA 聚合酶进行 PCR 反应, 反应条件: 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 75 °C 30 s, 16 个循环, 75 °C 延伸 2 min。反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳, 回收 PCR 产物。pPRIME 载体用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切, 回收的片段与经相同酶切的 PCR 回收产物用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在氯霉素抗性平板上筛

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30500433)

[作者简介] 骆晓梅(1971-), 女, 陕西西安人, 主治医师, 硕士生, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究

[通讯作者] 郝晓柯, E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

选重组质粒。用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定并进行 DNA 测序。

1.4 HeLa 细胞的转染

将 HeLa 细胞按每孔 1×10^5 的数量接种于 6 孔培养板, RPMI 1640 培养液(含 10% 小牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 U/ml 链霉素) 37 °C、5% CO₂ 培养, 待细胞生长融合至 80% 左右, 更换无抗生素、无血清的 RPMI 1640 培养液继续培养 4 h 后, 用脂质体 Lipofectamine 2000™(invitrogen 公司) 进行转染。按其说明书方法进行, 每孔细胞分别加入 2 μg 质粒和 5 μl 脂质体, 转染 6 h 更换含 10% 小牛血清的无抗生素的 RPMI 1640 培养液。转染后 72 h 收集细胞检测 Survivin 的表达水平。

1.5 RT-PCR 检测转染后 HeLa 细胞 mRNA 的表达

细胞转染后 72 h, 在每孔细胞中加入 0.5 ml TRIzol (Invitrogen 公司), 按照说明书方法提取总 RNA, 各取 1 μg 总 RNA, 按照 ImProm- II™ Reverse Transcription System (Promega) 进行 cDNA 第一链的合成。用于扩增 Survivin 基因上游引物为 P3: 5'-CTTTCTCAAGGACCACCGCATCT; 下游引物为 P4: 5'-GCACTTTCTCCGCGAGTTTCCTC; 预期扩增片段长 359 bp。用于扩增内参照 GAPDH 基因的上游引物为 P5: 5'-ATGGCAAATTCCATGGCACCGTCA-3'; 下游引物为 P6: 5'-CCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACG-3'; 预期扩增片段长 560 bp。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 7 min。扩增结束后取 PCR 产物 5 μl 琼脂糖凝胶电泳, 观察并记录结果。

1.6 Western blotting 检测 HeLa 细胞转染后 Survivin 蛋白的表达

细胞转染 72 h 后, 在每孔细胞中加入 RIPA 裂解液裂解细胞, 获得蛋白, 裂解上清用 BCA 试剂盒定量蛋白浓度。各组分别取蛋白 30 μg, 经 15% SDS-PAGE 后 100 V 电转 1 h, 1.5% BSA 室温封闭 1 h, 加入山羊抗人 Survivin 多克隆抗体(1:5 000) 和 HRP 标记的鼠抗 GAPDH(1:5 000), 室温轻摇 1 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入 HRP 标记的兔抗山羊 IgG(1:400), 室温平缓摇动 1 h。用 TBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, DAB 显色 30 min, 观察结果。

2 结果

2.1 microRNA 表达载体的成功构建

经 PCR 扩增获得约 110 bp 产物, 与预期大小一致。挑选 PCR 扩增的 microRNA 片段与 pPRIME 载体连接后的重组克隆, 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴

定, 可切出大小约为 110 bp 的片段, 与 PCR 产物大致相同(图 1), DNA 测序表明序列正确, 提示重组载体构建成功, 将此重组载体命名为 pPRIME-SVV。

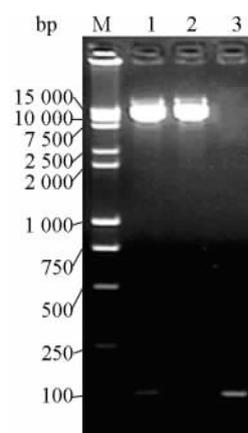


图 1 microRNA 表达载体的酶切鉴定

1: pPRIME-SVV; 2: pPRIME; 3: PCR 扩增产物

2.2 microRNA 对 Survivin mRNA 的降解

以序列正确的 pPRIME-SVV 和 pPRIME 转染 HeLa 细胞后, 经 RT-PCR 检测发现, pPRIME-SVV 转染组 Survivin 的 mRNA 水平明显降低, 而未转染组和 pPRIME 转染组 Survivin 的 mRNA 水平无显著差异, 各组内参照 GAPDH 的 mRNA 水平无明显变化(图 2)。由此表明 pPRIME-SVV 可以抑制 Survivin mRNA 的表达水平。

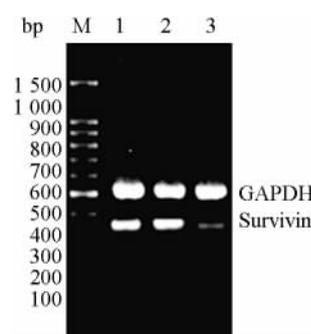


图 2 microRNA 对 Survivin mRNA 表达的抑制

1: 阴性对照; 2: pPRIME; 3: pPRIME-SVV

2.3 microRNA 对 Survivin 蛋白表达的影响

以 pPRIME-SVV、pPRIME 分别转染 HeLa 细胞后, Western blotting 分析发现, pPRIME-SVV 转染组 Survivin 蛋白表达水平明显降低, 而未转染组和 pPRIME 转染组 Survivin 蛋白表达水平无显著差异, 各组内参照 GAPDH 的蛋白表达水平无明显变化(图 3)。由此表明 pPRIME-SVV 能够抑制 Survivin

蛋白的表达。

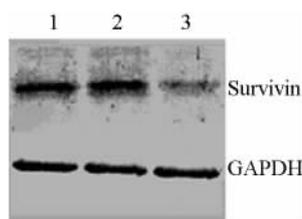


图3 microRNA 对 Survivin 蛋白表达的抑制

1: 阴性对照; 2: pPRIME; 3: pPRIME-SVV

3 讨论

microRNA 是在多细胞真核生物表达的一系列 22 nt 的非编码 RNA, 已经在植物和动物中发现了几百个不同的 microRNA。这些小的调控 RNA 通过两种作用方式发挥其生物功能: 当它们与靶 mRNA 完全或几乎完全配对时, 可以引起靶 mRNA 的剪切反应即 RNA 干扰作用; 在不完全配对的时候, 可以引起靶 mRNA 的翻译抑制^[6-7]。更重要的是, 由于 microRNA 可以通过含有 pol II 启动子的载体表达, 因而可以具有高度组织特异性^[8], 这是其较之 siRNA 优越之处。在体内或体外转录 microRNA, 使之表达可以更好地发挥特定 microRNA 的作用。正是基于这一想法, ZENG 等^[9]根据 microRNA-30 前体设计合成靶向荧光素酶 (Luc) 的 microRNA, 并使其在哺乳动物细胞中特异性表达。在此基础上 Frank 等^[10]构建了能在哺乳动物细胞中表达 microRNA 的 pPRIME 载体, 用此表达载体将靶向 Rb 的 microRNA 导入细胞中, 发现 Rb 的 mRNA 和蛋白表达均受到抑制。这些研究为 microRNA 在基因治疗中的应用提供了良好基础。

Survivin 是凋亡抑制蛋白 (IAP) 家族中的新成员, 主要表达于细胞 G₂/M 期, 其在细胞中的生理功能涉及到细胞周期的调控、细胞凋亡和肿瘤中血管的生成等。该蛋白具有特异性的抗凋亡效应通路: 对 caspase-3 和 (或) caspase-7 的直接和 (或) 间接作用途径, 以及对纺锤体装置的调节途径。Survivin 可见于胚胎发育过程及部分胎儿组织, 在成人终末分化组织低表达或不表达, 而在人类众多恶性肿瘤中表达, 具有强烈的凋亡抑制功能和促细胞增殖活性, 并与部分肿瘤的血管生成和预后有密切关系^[11]。基于 Survivin 的作用机制和相对特异的组织分布, 其已经成为肿瘤靶向治疗的新靶点。已有应用反义核苷酸、RNAi 等方法抑制肿瘤细胞 Survivin 基因表达, 促进肿瘤细胞凋亡的研究^[12-13]。但应用 microR-

NA 来抑制 Survivin 表达尚未不多见。

本课题设计并构建了靶向 Survivin 的 microRNA 表达载体, 通过脂质体转染 HeLa 细胞后, 经 RT-PCR 和 Western blotting 检测表明: pPRIME-SVV 载体转染组 mRNA 和蛋白表达水平明显降低, 而正常细胞和 pPRIME 转染组 Survivin 基因的表达无明显差异。表明 Survivin 靶向的 microRNA 表达载体构建成功, 并能特异地抑制靶基因的表达, 为 microRNA 在基因治疗中的应用提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development[J]. Science, 2003, 301(5631): 336-338.
- [3] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.
- [4] Rajewsky N. MicroRNA target predictions in animals[J]. Nat Genet, 2006, 38 (suppl): S8-S13.
- [5] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(2): 360-372.
- [6] Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation[J]. Oncogene, 2006, 25(46): 6156-6162.
- [7] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II[J]. EMBO J, 2004, 23(20): 4051-4060.
- [8] Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RH. Approaches to microRNA discovery[J]. Nat Genet, 2006, 38 (Suppl): S2-S7.
- [9] Zeng Y, Cai X, Cullen BR. Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs[J]. Methods Enzymol, 2005, 392: 371-380.
- [10] Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, et al. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (37): 13212-13217.
- [11] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
- [12] Choi KS, Lee TH, Jung MH. Ribozyme-mediated cleavage of the human survivin mRNA and inhibition of antiapoptotic function of survivin in MCF-7 cells[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(2): 87-95.
- [13] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Ther, 2004, 10 (1): 162-171.

[收稿日期] 2006 - 10 - 16

[修回日期] 2007 - 01 - 20

[本文编辑] 王莹