

·方法学研究·

小鼠 RPS20 基因 miRNA 干扰载体的构建及鉴定

高小玲^{1,2}, 陈蔚文¹, 李茹柳¹, 郭文峰¹, 刘佳¹ (1. 广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405; 2. 河南中医学院, 河南 郑州 450008)

摘要: 目的 构建小鼠 RPS20 miRNA 干扰载体, 进行载体质粒的提取及鉴定, 以进行细胞转染实验。方法 针对小鼠 RPS20 基因 miRNA 序列, 设计合成阴性对照及 4 对目标基因 oligo, 采用载体构建试剂盒进行重组克隆, 经过退火、连接及转化后, 进行测序及质粒提取鉴定。结果 测序结果提示序列构建完全正确, 电泳结果提示质粒大小正确, 纯度较高。结论 成功构建了针对小鼠 RPS20 基因的 miRNA 干扰载体, 测序及电泳结果提示, 所构建序列可用于后续转染实验。

关键词: RPS20 基因; miRNA; 载体构建; 鉴定

中图分类号: R349.6; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)05-0639-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.030

Construction and Identification of Mice RPS20 miRNA Interference Vector

GAO Xiaoling^{1,2}, CHEN Weiwen¹, LI Ruliu¹, GUO Wenfeng¹, LIU Jia¹ (1. Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Henan College of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008 Henan, China)

Abstract: **Objective** RPS20 miRNA interference vector was constructed, and vector plasmid was extracted and identified for supplying evidence for cellular transfection experiment. **Methods** According to mRNA sequence of mouse RPS20 gene, we designed and synthesized the negative reference and four pairs of target genes (oligo). Vector construction kit was used for obtaining recombinant clones, and then the sequencing and identification of recombinant clones and plasmid extract were performed after annealing, connection, and transformation. **Results** The sequencing results suggested that the constructed sequence of the plasmid was entirely correct, and the results of electrophoresis suggested the digested plasmid had correct size and higher purity. **Conclusion** Mice RPS20 miRNA interference vector has been successfully constructed, and the results of sequencing and electrophoresis suggested that the constructed sequences can be used to subsequent transfection experiments.

Keywords: RPS20; miRNA; Vector construction; Identification

借助于质粒载体, 可以将特异靶基因人工合成的 microRNA(miRNA)导入细胞内, 达到抑制靶基因表达的效果^[1]。质粒载体介导的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)转染效率比 Small interfering RNA (siRNA)介导的 RNAi 稳定持久, 而且可以在细胞水平上进行有效序列筛选及相关基因功能研究^[2]。为了采用质粒介导的 RNAi 方法在结肠癌 CT26 细胞上筛选高效的 miRNA 干扰序列, 本研究应用 invitrogen 设计软件设计 4 条针对小鼠 RPS20 基因的靶向

miRNA 序列以及阴性对照序列, 退火后分别连接到 pcDNA™ 6.2 -GW/EmGFPmiR 质粒载体上, 构建 miRNA 干扰表达载体, 经酶切及测序鉴定 miRNA 干扰质粒载体构建是否成功, 以便进行细胞转染及有效序列筛选实验。

1 材料与方法

1.1 试剂 载体构建试剂盒(BLOCK-iT™ Pol II miRNAi Expression Vector Kit with EmGFP, PureLink™

收稿日期: 2014-03-18

作者简介: 高小玲, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 消化药理与临床。Email: gxling2005@163.com。通讯作者: 陈蔚文, 教授, 研究方向: 脾胃虚实辨证论治及其规律研究。Email: chenww@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(90809001); 中央财政支持地方高校专项资金项目“难治性脾胃病防治协同创新平台(财教[2013]338 号)”。

HiPure Plasmid DNA Purification Kits), 美国 Invitrogen 公司; Tryptone, Yeast Extract, Agar, 广州威佳公司, Japan 分装; 壮观霉素, 美国 Sigma 公司; BamHI, 宝生物工程(大连)有限公司; Tris Base, 广州捷倍斯生物科技有限公司。

1.2 仪器 生物安全柜, 美国 Thermo 公司; RNA/DNA Caculator, 美国 Amersham Biosciences 公司; HZQ-X100 震荡培养箱, 哈尔滨市东明医疗仪器厂; 隔水式恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 高速低温离心机, 德国 Sigma 公司。

1.3 载体重组克隆 设计合成 4 对目标基因 oligo, 退火成双链, 然后用载体构建试剂盒(BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP) 进行重组克隆, 将 4 对双链的 miRNA oligo 分别插入到 miRNA 表达载体 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR 中, 构建 4 个 miRNA 表达质粒, 并转化至大肠杆菌(DH5a)感受态细胞。

1.3.1 miRNA 的设计与合成 在 invitrogen.com 网站上根据小鼠 RPS20 mRNA(NM_026147, GenBank)基因序列, 利用在线软件 BLOCK-iT™ RNAi Designer 设计 4 对 miRNA oligo, 4 对 oligo 通过软件用错配比较分析等算法设计, 每条 oligo 长 64 bp, 形成发夹结构, 每对 oligo 退火后能形成特殊的粘性末端, 可与线形载体 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR 的粘性末端互补连接形成环状质粒。4 对 oligo DNA 及阴性对照序列由上海英峻生物技术有限公司合成。4 对 oligo 序列及阴性对照序列见表 1。

表 1 miRNA oligo 序列及阴性对照序列

Table 1 miRNA oligo sequence and negative control sequence		
名称	序列	
MiRNA1-F	5'-TGCTGATTGGAATTCGGTGAATCGCGCTTTTGGCCACTGACTGACGGCGATTCCGAATTCGAAT-3'	
MiRNA1-R	5'-CCTGATTGGAATTCGGATTCGCGCTCAGTCAGTGGCCAAAACGGCGATTACCGAATTCGAATC-3'	
MiRNA2-F	5'-TGCTGATCAAGTCGCGCAAAACCTTCGCTTTTGGCCACTGACTGACGAAAGCTTTGCGGACTTGAT-3'	
MiRNA2-R	5'-CCTGATCAAGTCGCGCAAACTTCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGAAGCTTTGTCGGGACTTGATC-3'	
MiRNA3-F	5'-TGCTGATCAATGACTGCTTGTGGATGTTTGGCCACTGACTGACATCCACAAGACTCATTGAT-3'	
MiRNA3-R	5'-CCTGATCAATGACTCTTGTGGATGTCAGTCAGTGGCCAAAACATCCACAAGGACTCATTGATC-3'	
MiRNA4-F	5'-TGCTGCTCAGAAAGCACTATGTAATCGCTTTTGGCCACTGACTGACGATTACAGTCCTTCTGAG-3'	
MiRNA4-R	5'-CCTGCTCAGAAAGCACTGTAATCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGATTATACATAGCTCTTCTGAGC-3'	
Negative-F	tgtgtAAATGTAAGTGGCGGTGGAGACGTTTTTGGCCACTGACTGACGCTCTCCAGCGAGTACATTT	
Negative-R	cctgtAAATGTAAGTGGCGGTGGAGACGTTTTTGGCCACTGACTGACGCTCTCCAGCGAGTACATTTc	

1.3.2 oligo 退火 将 4 对合成好的 oligo 用 ddH₂O 溶解成 100 μmol, 互补单链各取 5 μL 两两混合, 按表 2 体系进行退火。然后将 4 份 oligo 混合物在 95 ℃加热 5 min, 再放置室温自然冷却 20 min, 形成双链 oligo。

1.3.3 连接 将退火的双链 oligo 继续稀释成 10 nmol·L⁻¹,

表 2 miRNA oligo 退火体系

Table 2 miRNA oligo annealing system		
试剂名称	用量 /μL	
top strand oligo(100 μmol·L ⁻¹)	5	
bottom strand oligo(100 μmol·L ⁻¹)	5	
10 × oligo annealing buffer	2	
ddH ₂ O	8	
总体积	20	

按表 3 体系在室温连接 30 min。将 4 对双链的 miRNA oligo 分别插入到 miRNA 表达载体 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR 中(见图 1), 构建 4 个 miRNA 表达质粒。

表 3 酶连接体系

Table 3 Enzyme linked system		
试剂名称	用量 /μL	
5 × ligation buffer	4	
pcDNA6.2-GW/EmGFP	2	
ds oligo(10 nmol·L ⁻¹)	4	
T4 DNA ligase(1 U·μL ⁻¹)	1	
ddH ₂ O	9	
总体积	20	

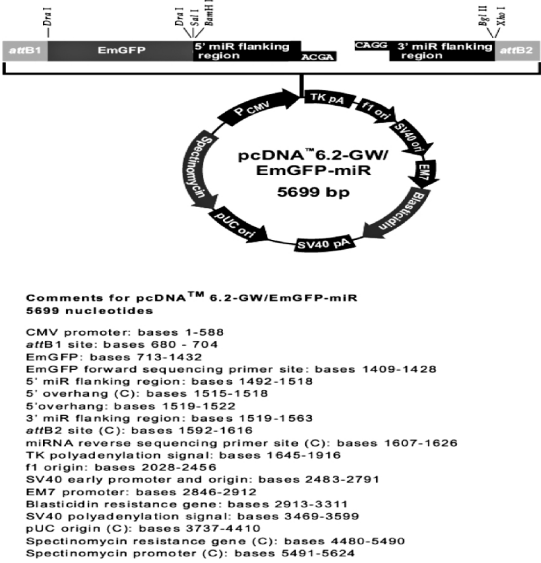


图 1 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR 载体

Figure 1 pcDNA6.2-GW/EmGFPmiR Vector

1.3.4 转化大肠杆菌 在感受态细胞 DH5a 中加入 2 μL 连接液, 冰上孵育 5~30 min, 42 ℃热激 30 s 后, 立即转移至冰上, 室温下加入 250 μL SOC 培养液, 拧紧盖子后 200 r·min⁻¹ 震荡, 37 ℃培养 1 h。

1.3.5 LB 平板挑菌测序 按说明书比例配制 LB 固体培养基, 直径 90 mm 培养皿加入约 20 mL LB 液体培养基, 并加入壮观霉素 50 μg·mL⁻¹, 待其冷却后, 取 50~200 μL 铺于 LB 平板上, 用无菌枪头或牙签轻轻

划线，倒置放置于 37 ℃培养箱，培养过夜。每个转化平板分别挑取 3 个克隆进行测序，以验证重组克隆中插入片段序列是否与设计的 oligo 序列一致。

1.4 质粒提取及鉴定

1.4.1 质粒提取 挑取培养皿上分隔较好的单菌落，加入含有 50 mg·mL⁻¹ 壮观霉素的 LB 液体培养基中，37 ℃ 170 r·min⁻¹ 摇菌过夜，培养 12~16 h。收集菌液，4000 g 离心 10 min，弃去 LB 培养液。按照试剂盒说明方法提取质粒。提取质粒后真空干燥 10 min，200 μL 无菌水重悬，分装，-20 ℃保存。

1.4.2 质粒 DNA 浓度检测及鉴定 质粒浓度检测：取 10 μL 纯化后的质粒 DNA，加入 690 μL pH 值为 7.75 的 Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹，充分混匀，DNA Caculator 上检测其纯度和含量。

质粒鉴定：取 5 μL 质粒 DNA，加入 6×Loading Buffer 1 μL，混匀后上样，Marker 上样量为 5 μL，120 V 电泳 15~20 min 检测其完整性。取质粒 DNA，加入适量无菌超纯水，总体积为 5 μL，按比例加入表 4 中的试剂，37 ℃水浴孵育 1 h，0.7 % 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪上成像，进行酶切鉴定。

表 4 酶切体系

Table 4 Enzyme systems	
试剂名称	用量/μL
BamHI (冰上操作)	1
10 × Buffer	1
ddH ₂ O	3

1.5 荧光显微镜观察转染效率 按照脂质体试剂说明书的方法及推荐剂量，对阴性对照载体进行转染。以放大 100 倍的视野为标准，在荧光显微镜明场下固定视野，计数细胞总数，再转换为荧光激发光，计数发绿色荧光的细胞数量。转染效率=(发绿色荧光的细胞数/细胞总数)×100 %。共计 6 个视野，求其平均值。

2 结果

2.1 测序结果 见图 2 ~ 图 5。重组克隆中插入片段序列与设计的 oligo 序列完全一致，测序图谱上没有套峰出现，说明重组载体构建成功。

2.2 质粒 DNA 电泳及酶切鉴定 从质粒 DNA 电泳结果看，在约 5 kb 处条带比较明显，而质粒 DNA 的大小在 5700 bp 左右，不能明确判断其所在位置。因此采用质粒上的酶切位点之一 BamHI 及 SacI 进行酶切后电泳，见图 6。质粒 DNA 经 BamHI 及 SacI 酶切为线性质粒后，电泳结果提示，5000~6000 bp 处，条

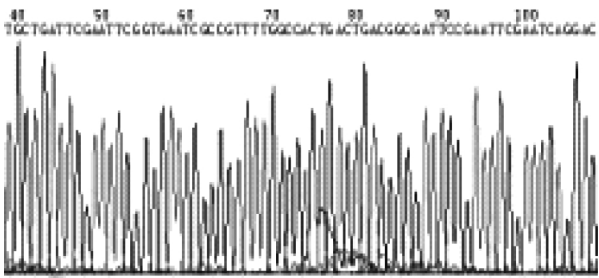


图 2 miRNA1 重组克隆测序图谱(39-102)
Figure 2 miRNA1 cloning and sequencing of recombinant (39-102)

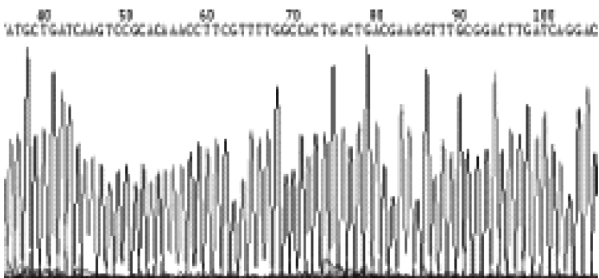


图 3 miRNA2 重组克隆测序图谱(37-100)
Figure 3 miRNA2 cloning and sequencing of recombinant (37-100)

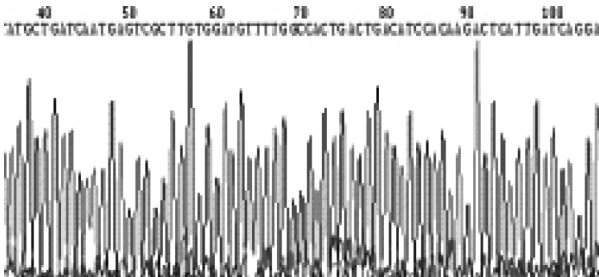


图 4 miRNA3 重组克隆测序图谱(37-100)
Figure 4 miRNA3 cloning and sequencing of recombinant (37-100)

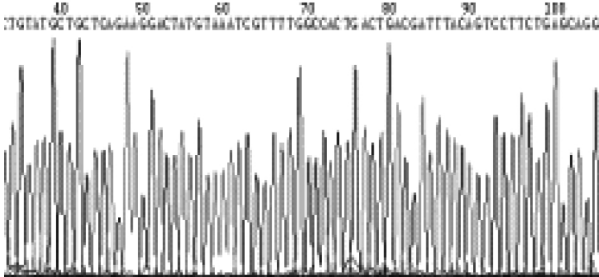
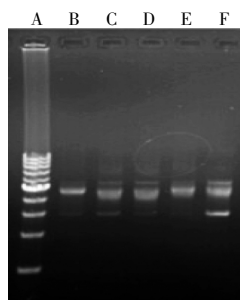


图 5 miRNA4 重组克隆测序图谱(38-101)
Figure 5 miRNA4 cloning and sequencing of recombinant (38-101)

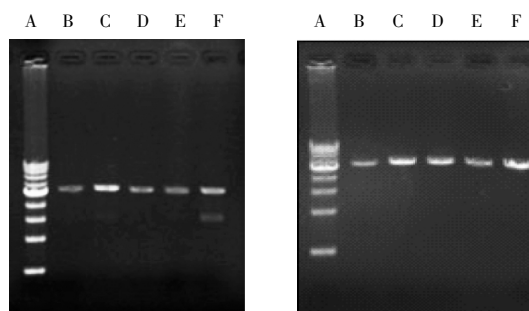
带清楚，大小正确，无明显杂带，说明质粒 DNA 纯度较高，可以用于后续转染等一系列实验，见图 7 和图 8。



注：A 为 Marker；B、C、D、E 分别为 miRNA1、miRNA2、miRNA3、miRNA4；F 为阴性对照质粒。

图 6 质粒提取 DNA 电泳结果

Figure 6 Extraction of plasmid DNA electrophoresis results



质粒 DNA BamHI 酶切电泳

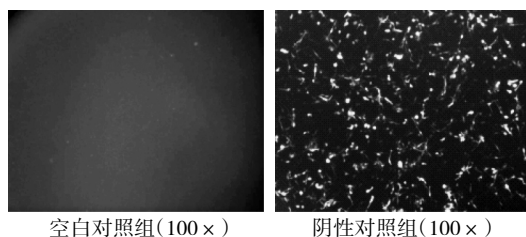
质粒 DNA SacI 酶切电泳

注：A 为 Marker；B、C、D、E 分别为 miRNA1、miRNA2、miRNA3、miRNA4；F 为阴性对照质粒。

图 7 质粒 DNA BamHI 及 SacI 酶切电泳结果

Figure 7 BamHI and SacI enzyme electrophoresis results of Plasmid DNA

2.3 荧光显微镜下观察转染效率 荧光显微镜下，空白对照组无荧光表达；阴性对照组可见强荧光表达，转染率约为 30%，见图 8。



空白对照组(100×)

阴性对照组(100×)

图 8 空白及阴性对照组荧光表达

Figure 8 fluorescence expression of Blank and the negative control group

3 讨论

RPS20 是核糖体蛋白的重要组成部分。前期基因芯片研究^[3]发现，脾虚患者 RPS20 基因表达下调，荧光定量 PCR 进一步检测也得到一致的结果，说明 RPS20 低表达可能是脾虚证重要病理现象。为了对 RPS20 的生理功能进行鉴定，本实验室采用 RNAi 技术干扰小肠上皮细胞(IEC-6)RPS20 后，细胞形态结构发生改变，提示其可能存在消化吸收功能低下；而它的迁移、增殖能力受到抑制，表明小肠上皮细胞的

黏膜修复可能存在减慢趋势^[4]。电镜下，干扰后的 IEC-6 细胞呈现出空泡化状态，这说明 IEC-6 细胞可能处于整体消化吸收功能异常的状态。这与课题组最初选择的脾气虚证患者都处于消化吸收障碍亚型的情况相一致^[4]。由此可见，RPS20 很可能是脾虚证发生发展过程中的重要相关基因。

脾虚证的虚损病变是由轻到重的渐进过程，在细胞上的干扰实验不能完全真实的反应 RPS20 在整个脾虚证发生发展过程中所起的作用。因此，在动物活体内干扰 RPS20 基因，进一步对其功能进行鉴定是很必要的。

目前，多数的 RNAi 实验采用化学合成方法制备 siRNA，虽然能够特异性抑制哺乳动物细胞内同源基因的表达，但其干扰基因短暂，细胞内 siRNA 很容易被降解，不能实现稳定的 RNAi，在实际应用中受到严格限制^[5]。相比之下，质粒载体或病毒载体就能在细胞内长时间、稳定地生成 siRNA，达到相对稳定的抑制效果。而通过构建 miRNA 表达载体，可以依赖 RNA 聚合酶 III 启动子，将目的序列及其反向重复序列插入含有启动子质粒染色体，同时插入作为检测标志的 GFP 或 EGFP 报告基因^[6]。表达载体转染细胞后，能够转录出茎环状(发夹状)siRNA，表达载体的方法将合成 siRNA 的过程转移至细胞内进行，不但效率大大提高，而且可以排除 RNA 酶的干扰。

本实验通过借助于 miRNA 前体表达框架，构建小鼠 RPS20 基因 miRNA 干扰载体，经过测序及酶切鉴定，序列插入正确，质粒提取完整且纯度较高，阳离子脂质体转染实验表明，构建的阴性对照载体转染率目前约为 30%，后续实验将进一步优化，并提高转染效率。本实验为 RPS20 基因的功能进行进一步深入研究提供了条件，同时也为采用 RNAi 技术为中医证候的基因组学研究开辟新的思路。

参考文献：

- [1] Lochmatter D, Mullis PE. RNA interference in Mammalian cell systems [J]. Horm Res Paediatr, 2011, 75(1): 63-69.
- [2] Shan ZX, Lin QX, Yang M. A quick and efficient approach for gene silencing by using triple putative microRNA-based short hairpin RNAs [J]. Mol Cell Biochem, 2008, 323(1-2): 81-89.
- [3] 陈蔚文, 王颖芳, 劳绍贤, 等. 脾气虚证患者基因差异表达研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(1): 148-152.
- [4] 王静. 脾气虚证相关基因 RPS20 在 IEC-6 细胞的生物功能鉴定 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2009: 3-8.
- [5] Schepers U. 实用 RNAi 技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 6-8.
- [6] Jankovic R, Radulovic S, Brankovic-Magic M. siRNA and miRNA for the treatment of cancer[J]. J Buon, 2009, 14(Suppl 1): 43-49.

(编辑: 梁进权)