

CCL11 和 CCL26 基因 3'UTR 真核表达载体的构建和意义

温志红, 代艳, 何爽

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:2011GXNSFC018019)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院儿科(温志红, 代艳), 康复科(何爽)

作者简介: 温志红(1967-), 女, 医学硕士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 儿科免疫性疾病、呼吸性疾病的诊治。E-mail: wenzhihong-de@163.com

[摘要] 目的 构建 CCL11、CCL26 基因 3'非翻译区(3'UTR)真核表达载体。方法 多聚酶链式反应(PCR)扩增获得 CCL11、CCL26 基因 3'UTR 目的片段, 双酶切目的基因片段及 pMIR REPORT 真核表达质粒后, 将目的基因片段插入 pMIR REPORT 质粒, 再将重组质粒转化感受态 DH5 α 菌株, 筛选阳性克隆行双酶切鉴定及测序分析。结果 成功构建 CCL11、CCL26 基因 3'UTR 真核表达载体。结论 CCL11、CCL26 基因 3'UTR 真核表达载体成功建立, 为进一步研究 CCL11、CCL26 基因与 MicroRNAs 的关系提供实验基础。

[关键词] CCL11 基因; CCL26 基因; 3'非翻译区; 真核表达载体; pMIR REPORT

[中图分类号] Q 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)01-0005-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.01.02

Construction of eukaryotic expression vectors of CCL11 gene 3'UTR and CCL26 gene 3'UTR and it's significance WEN Zhi-hong, DAI Yan, HE Shuang. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To construct the eukaryotic expression vectors of 3'untranslated regions(3'UTR) of CCL11 gene and CCL26 gene. **Methods** Target fragments in 3'UTR of CCL11 gene and CCL26 gene were amplified from genomic DNA by Polymerase chain reaction(PCR). The target fragments and pMIR REPORT vectors were double cut by restriction enzyme, and then the fragments were inserted into the pMIR REPORT plasmid to construct recombinant plasmid. The recombinant plasmid of pMIR REPORT-CCL11 3'UTR and pMIR REPORT- CCL26 3'UTR were transformed DH5 α competent cells, respectively. **Results** The 3'UTR sequence of CCL11 gene and CCL26 gene were successfully cloned into the pMIR REPORT vector, which verified by restrictive enzyme digestion and DNA sequencing. **Conclusion** The recombinant plasmid of pMIR REPORT-CCL11 3'UTR and pMIR REPORT- CCL26 3'UTR were successfully constructed, which lay a foundation of the further study of the relation between CCL11 gene, CCL26 gene and microRNAs.

[Key words] CCL11 gene; CCL26 gene; 3'UTR; Eukaryotic expression vector; pMIR REPORT

microRNA(miRNA)是一种小分子单链非编码核糖核酸,长度为20~25个核苷酸,通常与其靶基因3'非翻译区(3'UTR)结合并在转录后水平调控其靶基因的功能^[1,2],在机体的各种生命活动中发挥重要作用。我们于2008-11~2011-03构建人嗜酸粒细胞趋化蛋白1(CCL11)、嗜酸粒细胞趋化蛋白3(CCL26)基因3'端非翻译区(3'UTR)报告基因载体,为证实CCL11、CCL26基因是否为has-miR-335的靶基因提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和宿主菌 pMIR REPORT 真核表达质粒菌种购自美国 Ambion 公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂及酶类 Platinum[®] PCR Super-Mix 试剂盒及 T4 DNA 连接酶试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。质粒提取试剂盒胶回收试剂盒购自美国 QIAGEN 公司。限制性内切酶购自美国 New

England Biolabs(NEB)公司。

1.1.3 PCR 引物 由美国集成 DNA 技术公司(Integrated DNA Technologies)合成。PCR 仪为德国 Eppendorf 公司产品。二氧化碳培养箱为美国 Thermo 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 目的基因扩增 以健康人 DNA 为模版,用 PCR 方法扩增 CCL11、CCL26 基因 3'UTR。CCL11 基因 3'UTR 引物:上游 5'-GGCCGAGCTCCCATTTT-TGAAACCA-3',下游 5'-GGCCACGCGTATCTTTGTC-CCCCTCA-3'。CCL26 基因 3'UTR 引物:上游 5'-GGCCACTAGTCCGAAACAATTGTGA-3',下游 5'-GG-CCAAGCTTGAACAAGTCAACTCT-3'。反应条件为:94 ℃ 1 min 30 s 预变性,94 ℃ 22 s,58 ℃ 22 s,72 ℃ 50 s 经过 34 个循环,94 ℃ 22 s,58 ℃ 22 s,72 ℃ 7 min 再 1 个循环。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳。

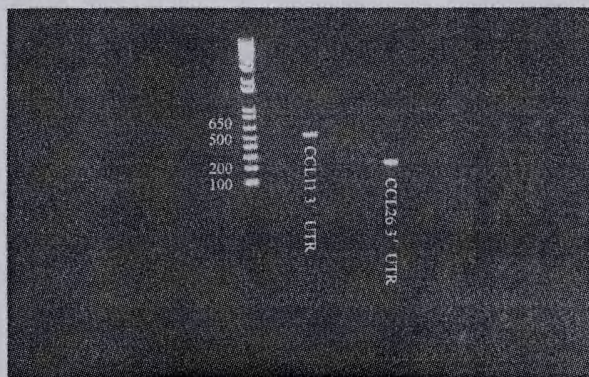
1.2.2 质粒纯化和限制性核酸内切酶消化 取真核表达质粒 pMIR REPORT 菌种 100 μ l,加入 100 ml LB 培养液(含 100 μ g/ml 羧苄青霉素)中,混匀后置于 37 ℃ 200 r/min 摇床振荡 12 h,抽提 pMIR REPORT 质粒,取 10 μ l 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,凝胶回收。以 Mlu I、Sac I 双酶切 CCL11 3'UTR 基因片段及 pMIR REPORT 质粒,Hind III 和 Spe I 双酶切抽提的 CCL26 3'UTR 基因片段及 pMIR REPORT 质粒,65 ℃ 20 min 灭活限制性核酸内切酶。取双酶切后 CCL11 3'UTR、CCL26 3'UTR 基因片段及 pMIR REPORT 质粒 20 μ l 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,凝胶回收。严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 连接和转化 凝胶回收后的 CCL11 3'UTR、CCL26 3'UTR 基因片段和载体 pMIR REPORT 以摩尔浓度 3:1 的比例混合,加入 T4 DNA 连接酶 14 ℃ 连接 12 h。连接产物用热休克法转化感受态大肠埃希菌 DH5 α 细胞:取 DH5 α 感受态细胞 100 μ l 置于冰浴中,加入上述连接反应物 8 μ l,轻轻混匀离心管后冰浴 30 min,置于 42 ℃ 水浴中热休克 90 s,热击后快速转至冰上冷却 2~3 min,向离心管中加入 900 μ l 无菌 LB 培养基(不含抗生素),混匀后置于 37 ℃ 摇床振荡 45 min(170 r/min)使菌体复苏,吸取 100 μ l 已转化产物涂于 LB 平板(含 100 μ g/ml 羧苄青霉素),37 ℃ 恒温箱培养 12~16 h,观察菌落生长情况。用接种针挑取 10 个白色单菌落,分别加入 10 管 5 ml 的 LB 培养液(含 100 μ g/ml 羧苄青霉素)中,混匀后置于 37 ℃ 摇床 180 r/min 振荡培养过夜得菌液,参照试剂盒说明书提取重组质粒。

1.2.4 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR 的双酶切和测序鉴定 提取的真核表达质粒 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR 以 Mlu I、Sac I 双酶切、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR 以 Hind III 和 Spe I 双酶切鉴定阳性克隆。双酶切反应体系:pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR 4 μ g,Buffer2 3 μ l,BSA0.3 μ l,Mlu I 和 Sac I 各 1 μ l,加 RNA free 水至 30 μ l 混匀,37 ℃ 温浴消化(1 μ g 1 h),65 ℃ 酶活性灭活 20 min。pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR 用 Hind III 和 Spe I 进行双酶切,其余同上述方法。取双酶切产物各 10 μ l 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定阳性克隆,并送至美国辛辛那提儿童医学中心测序室进行测序。

2 结果

2.1 CCL11 3'UTR 和 CCL26 3'UTR PCR 产物鉴定 PCR 获得 CCL11 3'UTR、CCL26 3'UTR 产物,1% 琼脂糖凝胶电泳分析得到条带,与预期 539 bp、231 bp 片段相符。见图 1。



(Marker 由下至上为 100,200,300,400,500,650,850,1000,1650,2000,3000,4000,5000,5500,6000,7000)

图 1 CCL11 和 CCL26 3'UTR PCR 产物

2.2 真核表达质粒 pMIR-REPORT 鉴定 抽提的 pMIR-REPORT 质粒 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,得到条带与预期 6 470 bp 大小的片段相符。见图 2。

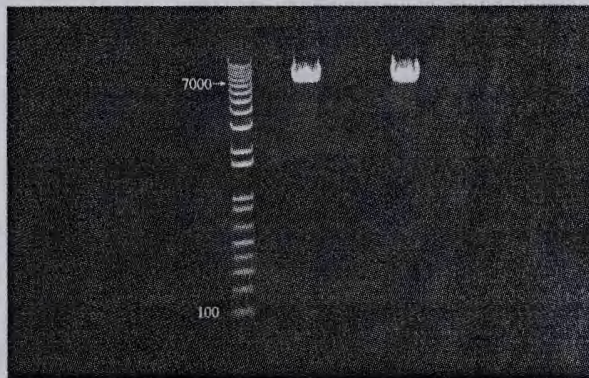
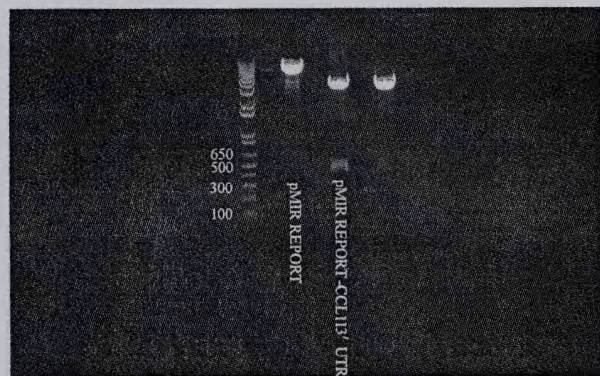


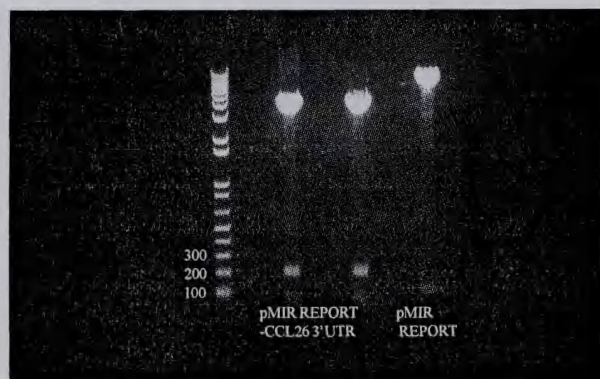
图 2 pMIR REPORT

2.3 真核表达质粒 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR 双酶切和测序鉴定重组质粒 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳分析,见图 3,4。测序结果与 UCSC genomic browser 中序列完全一致。



第 1 列为 pMIR REPORT,第 2,3 列为 pMIR REPORT-CCL11 3'UTR

图 3 pMIR REPORT-CCL11 3'UTR 酶切后



第 1,2 列为 pMIR REPORT-CCL26 3'UTR,第 3 列为 pMIR REPORT

图 4 pMIR REPORT-CCL26 3'UTR 酶切后

3 讨论

3.1 miRNA 具有广泛的生物学效应^[3],是国内外各领域的研究热点。已证实 miRNA 与其靶基因 3'UTR 通过碱基互补结合后发挥基因调控作用^[4],但一种 miRNA 可多个靶基因^[5],从而决定 miRNA 的功能研究的复杂性。目前人们掌握的 miRNA 调控基因的共性规律非常少,故研究某种 microRNA 的功能,鉴定其靶基因的工作就显得尤为重要。

3.2 本研究选择的 pMIR-REPORT 质粒是一种荧光素酶真核表达载体。pMIR-REPORT 荧光素酶包含一个荧光素酶基因。该基因受 CMV promoter 控制,荧光素酶基因中的多克隆位点可插入 miRNA 的

绑定靶点或其他核苷酸序列。将靶序列插入 pMIR-REPORT 载体的克隆位点后,可用于准确、定量评估 miRNA 的功能,还可评判 3'UTR 序列对基因表达的影响,提示 pMIR-REPORT 是研究 miRNA 及其靶基因的良好载体。

3.3 CCL11、CCL26 属嗜酸粒细胞趋化因子,其作用是使嗜酸粒细胞募集到炎症部位,促进脱颗粒、释放嗜酸粒细胞阳离子蛋白^[6,7],在支气管哮喘、变应性鼻炎等免疫相关疾病中发挥重要作用。我们前期研究发现,白介素-13 刺激人气道上皮细胞后,多种 miRNA 表达上调或下降,has-miR-335 是表达下降最明显的一个,提示 has-miR-335 可能参与免疫相关的呼吸系统疾病。文献报道 miRNA 确实参与免疫反应,在哮喘等慢性呼吸道炎症性疾病中发挥作用^[8]。经生物信息学软件 Miranda、Targetscan 预测,CCL11、CCL26 可能是 has-miR-335 的靶基因。因此,成功构建 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR 真核表达载体,对证实 CCL11、CCL26 是否是 has-miR-335 的靶基因以及进一步研究 CCL11、CCL26 与 has-miR-335 的关系提供实验基础。

参考文献

- 1 Jimin M. microRNA in autoimmune disorders[J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2011,34(6):439-446.
- 2 Smith-Vikos T, Slack FJ. MicroRNAs and their roles in aging[J]. J Cell Sci, 2012,125(Pt 1):7-17.
- 3 Anokye-Danso F, Snitow M, Morrissey EE. How microRNAs facilitate reprogramming to pluripotency[J]. J Cell Sci, 2012,125(Pt 18):4179-4187.
- 4 Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification[J]. Nucleic Acids Res, 2011,39(16):6845-6853.
- 5 李洁,秦性良,邵宁生. MicroRNA 及其靶基因的时空特异性和动态变化[J]. 生物化学与生物物理进展,2013,40(7):617-626.
- 6 Günther C, Wozel G, Meurer M, et al. Up-regulation of CCL11 and CCL26 is associated with activated eosinophils in bullous pemphigoid[J]. Clin Exp Immunol, 2011,166(2):145-153.
- 7 Coleman JM, Naik C, Holguin F, et al. Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset[J]. Thorax, 2012,67(12):1061-1066.
- 8 Oglesby IK, McElvaney NC, Greene CM. MicroRNAs in inflammatory lung disease—master regulators or target practice? [J]. Respir Res, 2010,11:148.

[收稿日期 2013-10-14][本文编辑 刘京虹 吕文娟]