

PRMT2 基因的 miRNA 载体构建及其活性鉴定

唐 焱,周 宏,钟 警,姜 浩

(南华大学附属第一医院超声诊断科,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 构建蛋白质精氨酸甲基转移酶 2 (PRMT2) 基因的 miRNA 真核表达载体,鉴定其转染乳腺癌 MCF7 细胞株后的生物活性。**方法** 根据 PRMT2 基因序列设计合成 4 对 pre-miRNA 片段,定向克隆到 pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR 真核表达载体上,采用菌落的 PCR 和测序分析鉴定插入序列的完整性;并将重组载体转染至 MCF7 细胞株中,采用 Western blot 方法鉴定重组载体转染 MCF7 细胞后对 PRMT2 蛋白表达的干扰效果以确定其生物活性。**结果** 构建的重组体插入片段的碱基序列完全正确,并且重组体瞬时转染 MCF7 细胞后成功干扰 PRMT2 的表达。**结论** 成功构建了靶向 PRMT2 基因的 pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR 真核表达载体,且在瞬时转染 MCF7 细胞后能下调 PRMT2 的表达。

关键词: miRNA; 蛋白精氨酸 N-甲基转移酶; 雌激素受体 α ; 转染

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A

Construction and Activity Identification of miRNA Expressing Eukaryotic Vector of PRMT2

TANG Yan, ZHOU Hong, ZHONG Jing, et al

(Department of Ultrasound Diagnosis, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To construct PRMT2 gene expressing eukaryotic miRNA recombinants, and to identify biological activity of recombinant in breast cancer cell line MCF7 cells after transfection. **Methods** According to sequence of PRMT2 gene, the pre-miRNA was designed and synthesized, then cloned into the GFP reporter pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR, and transfected into MCF7 cell line. The integrity of inserted fragment sequence was tested through colony PCR and sequence analysis, and the biological activity of recombinants was identified by detecting the interference efficiency of PRMT2 employing Western blotting. **Results** Sequences of insert fragment in four miRNA expressing recombinants proved to be correct, and the expression of PRMT2 was inhibited after the recombinants transient transfection in MCF7 cells.

Conclusion The expressing eukaryotic miRNA recombinants of reporter pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR of PRMT2 were constructed successfully, and the biological activity is stable after transfecting MCF7 cells.

Key words: miRNA; PRMT2; ER α ; transfection

miRNA 是一种内源性非蛋白质编码的小单链 RNA,它包含约 19~24 个核苷酸,能管理 mRNA 表达,由发夹结构的约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 经过酶加工后生成。miRNA 在细胞内具有多种重要的调节功能,可以通过与特定 mRNA 结合或调节特定 mRNA 的蛋白质翻译过程来调控基因的

表达。它可以有多个靶基因,而多个 miRNA 也可以共同调节一个靶基因。它的作用机制是与靶 mRNA 匹配,抑制靶 mRNA 的翻译或导致其降解来沉默特定基因,进而对 mRNA 进行调节,产生 RNA 干扰。因此,miRNA 在细胞的分化、增殖、调亡的过程中扮演关键角色,大量研究表明 miRNA 与多种恶性肿瘤,包括子宫肌瘤、垂体腺瘤、胰腺癌乳腺癌等的发病相关^[1-2]。

蛋白质精氨酸甲基转移酶 2 (protein arginine

methyltransferase 2, PRMT2) 是一种雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 共激活子,最初是基于它的蛋白质序列的相似性而从蛋白质精氨酸甲基转移酶 1 (protein arginine methyltransferase 1, PRMT1) 中分离出来的^[3]。近年来研究发现, PRMT2 能与 Rb 蛋白相互作用抑制 E2F1 的转录活性^[4]。本文针对乳腺癌 MCF7 细胞株,建立针对 PRMT2 基因的 miRNA 序列,构建了乳腺癌 miRNA 真核表达载体,该研究为 miRNA 靶向 PRMT2 的肿瘤基因治疗研究提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

环形 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR (Invitrogen 公司), MCF7 细胞、DH5 α 大肠杆菌 (本实验室保存), 壮观霉素等试剂 (上海生工生物工程有限公司)。

1.2 PRMT2 miRNA 的设计合成与构建

从 GenBank 数据库上搜索获得 PRMT2 基因的 mRNA 序列 (登录号: NM_206962)。从网站 www.invitrogen.com/rnai 获取工具用来设计 miRNA。选择 PRMT2 基因 mRNA 序列中 21nt 片段为合适的 miRNA 靶序列。结合线性化 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 真核表达载体特点,设计 4 个 64nt 的 pre-miRNA 寡核苷酸序列,该序列针对 PRMT2 基因不同区域,并且得到寡核苷酸序列互补的序列,经 NCBI Blast 的相似性搜索,排除其非特异同源部分。针对 PRMT2 基因的 miRNA 重组体分别命名为 miPRMT2-1、miPRMT2-2、miPRMT2-3、miPRMT2-4。

1.3 oligo 的退火

将 4 对合成好的 oligo 用 ddH₂O 溶解成 100 μ mol/L,互补单链各取 5 μ L 两两混合进行退火。然后将 4 份 oligo 混合物在 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min,然后放置室温自然冷却 20 min,形成双链 oligo。

1.4 退火产物与线性载体连接

将退火的 4 条双链 oligo 用 T4 DNA 连接酶与 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 线性载体连接。

1.5 转化及阳性克隆质粒的挑选

取连接反应物转化 DH5 α 菌株,在含有壮观霉素的 LB 固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,长出的单个菌落即为转化菌菌落。挑单菌落种于含有壮观青霉

素 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振摇过夜。

1.6 阳性克隆 PCR 鉴定与培养

PCR 引物为载体通用测序引物,阳性 PCR 产物为 250 bp 左右。将保留的阳性克隆菌株在 3 mL 含 50 μ g/mL 壮观霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床过夜培养。

1.7 质粒抽取并测序

利用北京天根生物技术有限公司的小量提取试剂盒小提质粒,经 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,取阳性克隆菌液送上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。

1.8 细胞培养和转染 MCF7 细胞

MCF-7 细胞采用含 1.0 mmol/L 丙酮酸钠、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、1.5 g/L 碳酸氢钠、0.01 g/L 牛胰岛素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内常规培养。取处于对数生长期细胞进行实验。采用 LipofectamineTM 2000 脂质体进行细胞转染,具体方法参照文献[5]。

1.9 Western 印迹法检测

分别提取未转染组细胞、阴性 miRNA 组细胞和上述各重组载体组细胞总蛋白进行 Western blot 检测,具体方法参照文献[5],一抗分别采用 PRMT2 多克隆兔抗。

2 结 果

2.1 PRMT2 序列

利用 Invitrogen 公司的工具,设计出 4 个 64nt 的 pre-miRNA 寡核苷酸序列,该序列必须针对 PRMT2 基因不同区域,并且充分结合 PRMT2 基因结合线性化真核表达载体 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR (见图 1)。设计完成后 (见表 1),其结构为 5'-TGC TG overhang + G + antisense target sequence + miRNA loop + Sense target sequence-3'。基于 NCBI Blast 排除非特异性同源性序列,建立其互补序列。该序列首先去掉寡核苷酸序列 5' 端的 TGCT,然后再形成正义链的互补,接下来在 5' 端添加 CCTG,最后在 3' 端添加 C 后形成的。结合线性化 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 载体的特点,在寡核苷酸双链的 5' 端形成 4nt 的悬垂,以与载体的粘性末端互补配对,形成定向克隆。

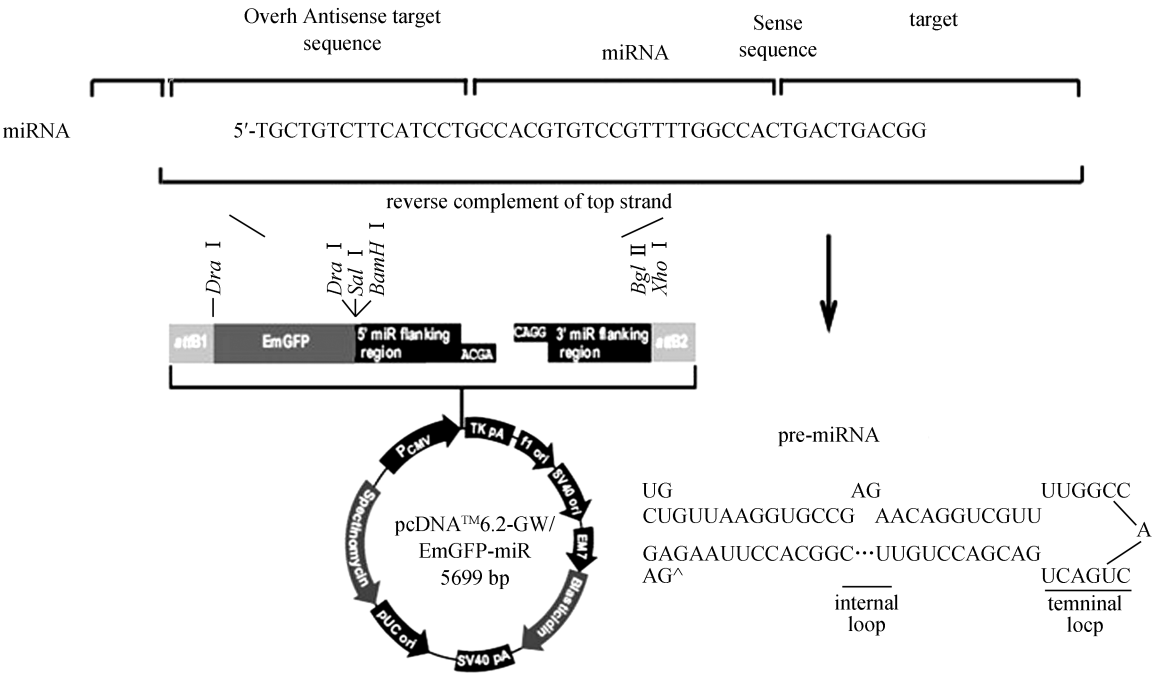


图 1 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 质粒图谱

Fig. 1 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR plasmid map

表 1 pre-miRNA 寡核苷酸序列

Table 1 pre-miRNA oligo sequence

名称	序列(5' - 3')
miPRMT2-1F	TGC TGT GGAAGTGGACGCTAAACCAGGTTTTTGGCCACTGACTGACCTGGTTTACTCCACTTCCA
miPRMT2-1R	CCTGTGGAAGTGGACTAAACCAGGTCAGTCAGTGCCAAAACCTGGTTTACCGTCCACTTCCAC
miPRMT2-2F	TGCTGTCTTCATCCTGCCACGTGTCCGTTTTTGGCCACTGACTGACGGACAGTCAGGATGAAGA
miPRMT2-2R	CCTGTCTTCATCCTGACGTGTCCGTCAGTCAGTGCCAAAACGGACAGTGGCAGGATGAAGAC
miPRMT2-3F	TGCTGATAGTGTGCACAGAAGAGACTGTTTTTGGCCACTGACTGACAGTCTCTTGTGCACACTAT
miPRMT2-3R	CCTGATAGTGTGCACAAGAGACTGTCAGTCAGTGCCAAAACAGTCTCTTCTGTGCACACTATC
miPRMT2-4F	TGCTGTGATGATGTGACGAAAGCCGTGTTTTTGGCCACTGACTGACACGGCTTTTGACATCATCA
miPRMT2-4R	CCTGTGATGATGTCAAAGCCGTGTCAGTCAGTGCCAAAACACGGCTTTGCTGACATCATCAC

2.2 重组体鉴定结果

菌落 PCR 扩增出的片段大小为 250 bp 左右 (见图 2), 琼脂糖电泳所显示的条带符合预期结果。初步证明 pre-miRNA 片段已正确定向插入到载体中。测序分析证明重组体中含有 pre-miRNA 片段, 且插入片段的碱基序列完整, 没有碱基的突变以及丢失。

2.3 PRMT2 蛋白表达水平的变化

PRMT2 基因的 Western blot 结果见图 3。和未转染组相比, PRMT2 蛋白表达水平在 PRMT2-1、miPRMT2-2、miPRMT2-3、miPRMT2-4 等 4 个重组体转染组都有所降低, 其中 miPRMT2-3 转染组的 PRMT2 蛋白表达水平相对最低。而阴性 control-miRNA 对照组和未转染组相比则无明显变化。

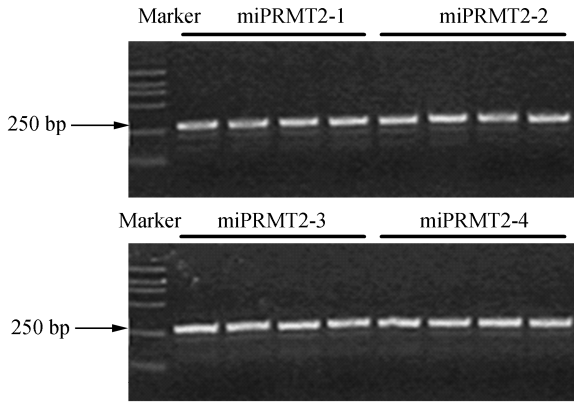


图 2 PRMT2 蛋白表达水平的变化
Fig. 2 Colony PCR results of positive clones

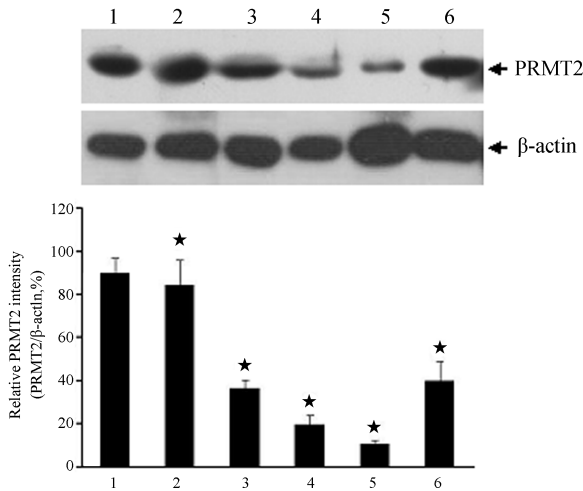


图 3 各组 PRMT2 蛋白表达水平的比较 1:未转染组,2:阴性 miRNA 组,3:miPRMT2-1 组,4:miPRMT2-2 组,5:miPRMT2-3 组,6:miPRMT2-4 组. ★:未转染组与 miPRMT1-4 组比较, $P < 0.05$
Fig. 3 PRMT2 protein expression in every group

3 讨 论

miRNA 是一种近年来发现的单链小 RNA,它包含约 1 924 个核苷酸,隶属于内源性非蛋白质编码的调控 RNA 家族,它与基因的转录和翻译相关,且下调靶基因的表达^[6]。miRNA 不同于 siRNA,但和 siRNA 密切相关。miRNA 调控基因表达的功能与其来源无关,因此继 siRNA 后,miRNA 成为 RNA 干扰领域中一种重要的研究手段和实验工具^[7],而且 miRNA 具有更好的转录后基因沉默效应^[8]。

乳腺癌病因目前尚不清楚,乳腺是人体多种重要的内分泌激素的靶器官,其中雌酮和雌二醇对乳

腺癌的发病有直接关系。有部分乳腺癌含有雌激素受体或者孕激素受体,受体阳性的乳腺癌对激素治疗敏感^[2,9-10]。已经有研究表明 PRMTs 被证实是在激活核受体与肿瘤的过度表达有关,而且能够抑制 PRMT1 的物质能抑制雌激素与雄激素受体介导的转录活性^[11]。充分利用 pcDNA™ 6. 2-GW/EmGF PmiR 的特点,这个真核表达质粒是一个能够产生与靶位点完全互补的、能使 mRNA 降解的、进而达到干扰目的基因表达的成熟 miRNA,该质粒的作用机制是通过人工设计的靶向目的 mRNA 的 pre-miRNA 片段进而进行实现。

PRMT 家族是一个在哺乳动物中常见的酶类,负责对蛋白质底物进中的精氨酸进行甲基化。PRMT2 是 PRMT 家族中的一员,它最初是基于它的蛋白质序列相似性而从 PRMT1 中分离出来的^[3],最近的研究表明 PRMT2 能通过多种机制如组蛋白甲基化,转录因子甲基化,RNA 差异剪接等发挥不同的转录调节作用^[4,12]。本研究设计并构建了乳腺癌靶向基因 PRMT2 的 miRNA 真核表达载体,通过转染 MCF7 细胞后,miPRMT2-1、miPRMT2-2、miPRMT2-3、miPRMT2-4 等 4 个重组体蛋白表达都有不同程度地降低,其中 miPRMT2-3 转染组的 PRMT2 蛋白表达水平相对最低,而未转染组与阴性对照组相比则无明显变化。这提示 4 个 miRNA 重组体转染乳腺癌 MCF7 细胞株后都有干扰 PRMT2 基因表达的活性,并且 PRMT2-3 转染组的干扰作用是研究中最强的。本研究成功构建了针对乳腺癌靶向 PRMT2 基因的 miRNA 真核表达载体,同时筛选出了该基因的最佳干扰效率的靶点(研究组 miPRMT2-3 中靶点),为应用 miRNA 靶向 PRMT2 的基因功能研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Ross JS, Carlson JA, Brock G. miRNAnew gene silencer [J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128(5):830-836.
- [2] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique miRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis[J]. Cancer Cell, 2006, 9:189-198.
- [3] Katsanis N, Yaspo ML, Fisher EM. Identification and mapping of a novel humangene, HRMT1L1, homologous to the rat protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) gene [J]. Mamm Genome, 1997, 8(7): 526-529.

(上接第 363 页)

- [4] Yoshimoto T, Boehm M, Olive M, et al. The arginine methyltransferase PRMT2 binds RB and regulates E2F function[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(11): 2040-2053.
- [5] 钟警, 陈亚军, 汤帅, 等. 蛋白质精氨酸甲基转移酶 2 在乳腺癌细胞中的表达及其对 SKBR-3 细胞生长特性的影响[J]. 肿瘤, 2010, 30 (12): 991-997.
- [6] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 5: 843-854.
- [7] Rajewsky N. MiRNA target predictions in animals[J]. Nat Genet, 2006, 36(S): 8-13.
- [8] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, et al. Micro RNA targeting specificity in mammals, determinants beyond seed pairing[J]. Mol Cell, 2007, 27(1): 91-105.
- [9] Katzenellenbogen BS, Frasor J. Therapeutic targeting in the estrogen receptor hormonal pathway[J]. Semin Oncol, 2004, 31(S3): 28 - 38.
- [10] Robertson JFR, Cannon PM, Nicholson RI, et al. Oestrogen and progesterone receptors as prognostic variables in hormonally treated breast cancer[J]. Int J Biol Markers, 1996, 11(1): 29-35.
- [11] Chen W, Daines MO, Hershey GK. Methylation of STAT6 modulates STAT6 phosphorylation nuclear translocation and DNA-binding activity [J]. Immunol, 2004, 172(11): 6744-6750.
- [12] Ganesh L, Yoshimoto T, Moorthy NC, et al. Protein methyltransferase 2 inhibits NF-kappa B function and promotes apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(10): 3864-3874.