

# 一种利用分泌型荧光素酶基因表达变化监测活细胞中 miRNA 活性的新方法

田文洪<sup>1\*</sup>, 董小岩<sup>1,2,3\*</sup>, 王刚<sup>1</sup>, 吴小兵<sup>1</sup>

1 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052  
2 复旦大学生命科学学院 遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433  
3 北京五加和分子医学研究所有限公司, 北京 100176

**摘要:** 建立了一种以分泌型的荧光素酶 *Gluc* 为报告基因的 miRNA 传感器质粒 (命名为 Gsensor) 监测活细胞中 miRNA (microRNA) 活性的方法。首先构建了 pAAV2neo-*Gluc*-MCS-polyA 质粒作为 Gsensor 的空载体, 同时其中的 MCS 位点可供插入 miRNA 的靶序列。以 miR142-3p 为检测对象, 将 1 个和 3 个拷贝的与 miR142-3p 完全互补靶序列分别插入 pAAV2neo-*Gluc*-MCS-polyA 中, 构建成 miR142-3p Gsensor 和 miR142-3p Gsensor-3。将它们分别转染至 U937 细胞中, 检测培养上清中 *Gluc* 的表达水平。结果显示二者均可有效反映 U937 细胞中 miR 142-3p 的抑制活性 (分别与 Gsensor 空载体相比), 提示 Gsensor 中采用一个拷贝的 miRNA 靶序列即可满足检测要求。并且 miR142-3p Gsensor 也能有效地反映出 Anti-miR142 对 miR142-3p 活性的抑制作用。随后, 分析了时间、转染剂量对 Gsensor 检测结果的影响。结果表明, 在 U937 细胞中 miR142-3p Gsensor 表现的 miR142-3p 活性在 48 h 后趋于稳定; Gsensor 转染剂量在 0.001~0.05 pg/cell 范围内不影响其功能。最后, 利用 miR142-3p Gsensor 检测了 HEK293、U937、K562、SP2/0 和 P815 细胞内 miR142-3p 活性, 结果发现 miR142-3p 活性在 U937、K562、SP2/0 和 P815 细胞中均较高, 而在 HEK293 中几乎没有活性。用 QRT-PCR 方法检测 miR142-3p 的相对拷贝数。结果表明, 在 HEK293、U937 和 K562 细胞中, miR142-3p 活性与其相对拷贝数呈正相关。本研究表明 Gsensor 可作为一种有效的 miRNA 活性检测工具, 为体外实时动态监测 miRNA 活性提供了一种新方法。

**关键词:** miRNA, miRNA 活性, Gsensor, 监测

## A novel method for monitoring miRNA activity by expression changes of secreted luciferase gene in live cells

Wenhong Tian<sup>1\*</sup>, Xiaoyan Dong<sup>1,2,3\*</sup>, Gang Wang<sup>1</sup>, and Xiaobing Wu<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute for Viral Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100052, China

2 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

3 Beijing Fiveplus Molecular Medicine Institute, Beijing 100176, China

**Received:** January 28, 2010; **Accepted:** March 26, 2010

**Supported by:** Special Key Program on Infectious Diseases of China (No. 2008ZX10002-023).

**Corresponding author:** Xiaobing Wu. Tel: +86-10-63523187; Fax: +86-10-635232053; E-mail: wuxb0168@vip.sina.com

\*These authors contributed equally to this study.

传染病重大专项 (No. 2008ZX10002-023) 资助。

**Abstract:** We developed a method for monitoring of miRNA activity in live cells by a secreted luciferase gene based plasmid sensor named as Gsensor. Firstly, we constructed pAAV2neo-Gluc-MCS-polyA as “empty Gsensor”, which contained multiple cloning sites (MCS) for miRNA target inserted. To detect miR142-3p activity, miR142-3p Gsensor and miR142-3p Gsensor-3 were constructed by inserting one or three complementary miR142-3p targets into pAAV2neo-Gluc-MCS-polyA. Subsequently, miR142-3p Gsensor and miR142-3p Gsensor-3 were respectively transfected into U937 cells and Gluc activity was assayed in the supernatant 48 h post transfection. Results showed that both of them effectively indicated miR142-3p activity of inhibiting Gluc expression compared with empty Gsensor. Simultaneously, miR142-3p Gsensor also demonstrated the inhibition of miR142-3p activity by Anti-miR142 when they were cotransfected into U937 cells. This implied one copy of miRNA target in Gsensor was sensitive enough for investigation of miRNA activity. We further analyzed factors affecting Gsensor function including time and dose, and found that miR142-3p activity sensed by miR142-3p Gsensor rose within 48 h post transfection and approached stable thereafter. Transfected dose varying among 0.001–0.05 pg/cell had little effect on its function. Using miR142-3p Gsensor, we further detected miR142-3p activity in HEK293, U937, K562, SP2/0 and P815 cells. Results suggested that miR142-3p activity was high in U937, K562, SP2/0 and P815 cells and almost negative in HEK293. miR142-3p activity was positively correlated with its relative copies in HEK293, U937 and K562 detected by QRT-PCR. In conclusion, Gsensor proved to be an effective tool for monitoring of miRNA activity in live cells, and provide a new method for monitoring miRNA activity *in vitro*.

**Keywords:** miRNA, miRNA activity, Gsensor, monitor

miRNA 是生物体内源的长度为 18~25 个核苷酸的非编码 RNA<sup>[1]</sup>。目前, 在人类中已发现 700 多种 miRNA<sup>[2]</sup>。在体内, miRNA 与 AGO 等蛋白形成 RISC (RNA Induced Silencing Complex), 识别并结合 mRNA 3'UTR 的靶序列, 导致 mRNA 的降解和翻译抑制, 在转录后水平上对基因的表达进行负调控<sup>[3]</sup>。研究发现, miRNA 参与人类大约 1/3 基因的表达调控<sup>[4]</sup>, 在细胞分裂<sup>[5]</sup>、分化<sup>[6]</sup>、死亡<sup>[7]</sup>、凋亡<sup>[8]</sup>和新陈代谢<sup>[9]</sup>以及干细胞的分化<sup>[10]</sup>、肿瘤的发生<sup>[11]</sup>等诸多生理病理过程中发挥重要作用。

目前已经有许多检测 miRNA 表达水平的方法, 包括 Northern blotting、QRT-PCR、原位杂交、RAKE (RNA-primed array-based Klenow enzyme assay) 和 miRNA 标记法 (Ambion)<sup>[12]</sup>。然而, 这些方法均不能检测 miRNA 的活性, 并且操作繁琐。虽然现有的以 *Fluc* (Firefly Luciferase) 为报告基因的 miRNA 传感器可有效地检测 miRNA 活性, 但是由于 *Fluc* 不能分泌, 每次检测均需裂解细胞, 因此该传感器不能方便地应用于 miRNA 活性的连续监测。*Gluc* (*Gaussia Luciferase*) 来源于海洋桡脚类动物 *Gaussia princeps*, 具有易分泌、检测灵敏度高、反应不依赖于 ATP 等特点<sup>[13-14]</sup>。本研究拟利用 *Gluc* 的这些特点构建一种以 *Gluc* 为报告基因的 miRNA 活性检测传感器 miRNA Gsensor。将 miRNA Gsensor

和 Gsensor 空载体 (Empty Gsensor) 分别转染细胞, 检测细胞培养上清中的 *Gluc* 活性差异。利用 miRNA 抑制基因表达原理, 推测检测细胞内 miRNA 活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株和细胞

pGluc-Basic 质粒购自 NEB 公司; pAAV2neo、pAAV2neo-Fluc 和携带 3 个 miR142-3p 靶序列的 pAAV2neo-tri142T 质粒由本室构建保存; Max Efficiency DH5a<sup>TM</sup> 为 Invitrogen 公司产品; HEK293、U937、K562、P815 和 SP2/0 细胞购自 ATCC, 由本室保存, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。

### 1.2 试剂

限制酶和连接酶购自 NEB 公司; 质粒大提试剂盒购自 Qiagen 公司; DMEM 培养基、胎牛血清和脂质体 lipofectamine<sup>TM</sup>2000 均为 Invitrogen 公司产品; *Gaussia luciferase assay kit* 购自 NEB 公司; *Luciferase assay system* 购自 Promega 公司。

### 1.3 Gsensor 的构建

按照标准的分子克隆方法构建 Gsensor 空载体: pAAV2neo-Gluc-MCS-polyA。首先根据 pGluc-Basic 序列设计引物。上游引物: 5'-TTAGGTACCCAGC CACCATGGGAGTC-3', 下游引物: 5'-TGCCGAATT CCTCGAGCGGCCGCTTAGT-3', 下划线标记处为酶切位点, 上游引物酶切位点为 *Kpn* I, 下游为 *Eco*R I,

用于将 PCR 产物克隆入 pAAV2neo 载体。引物由 Invitrogen 公司合成。然后, 以 pGluc-Basic 为模板, PCR 扩增得到含 *Gluc* 目的片段, 插入 pAAV2neo 载体, 获得 Gsensor 空载体, 酶切测序鉴定。设计并由 Invitrogen 公司合成 2 条寡聚核苷酸: 5'-AATTC TCCATAAAGTAGGAAACACTACA-3' 和 5'-GATCT GTAGTGTTCCTACTTTATGGAG-3', 下划线标记处分别为 miR142-3p 序列和与其完全互补的靶序列, 于 95°C 10 min, 室温放置 2 h 退火后, 形成包含 *EcoR* I、*Bgl* II 粘性末端和 miR142-3p 靶序列的接头, 插入 Gsensor 空载体, 获得 pAAV2neo-Gluc-142T, 命名为 miR142-3p Gsensor, 测序鉴定。将含有 *Gluc* 片段的 PCR 产物插入 pAAV2neo-tri142T 载体, 获得 pAAV2neo-Gluc-tri142T, 命名为 miR142-3p Gsensor-3, 酶切测序鉴定。

#### 1.4 转染

用 100  $\mu$ L 含 10% FBS 的 DMEM 培养液将细胞接种于 96 孔细胞培养板, 立即进行转染实验。参照说明书用 lipofectamine<sup>TM</sup> 2 000 将 empty Gsensor、miR142-3p Gsensor 或 miR142-3p Gsensor-3 分别转染至细胞中。每孔具体转染过程为: DNA 加入 25  $\mu$ L OPTI-MEM 培养液, 0.25  $\mu$ L lipofectamine<sup>TM</sup> 2 000 加入 25  $\mu$ L OPTI-MEM 培养液, 分别混匀, 于室温放置 5 min。然后将 2 种液体混匀, 于室温放置 20 min 后, 加入细胞中, 并前后摇晃 96 孔细胞培养板使液体混匀, 于 37°C 的 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

为了进一步验证 Gsensor 的功能, empty Gsensor 或 miR142-3p Gsensor 与 Anti-miR142 共转染 U937 细胞, 并同时转染 pAAV2neo-Fluc 质粒作为内参, 校正转染效率。具体过程为: U937 细胞接种于 96 孔细胞培养板 (1 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/孔), empty Gsensor 或 miR142-3p Gsensor、pAAV2neo-Fluc 各 50 ng 和 0~15 pmol Anti-miR142 加入 25  $\mu$ L OPTI-MEM 培养液, 0.75  $\mu$ L lipofectamine<sup>TM</sup> 2 000 加入 25  $\mu$ L OPTI-MEM 培养液, 分别混匀, 于室温放置 5 min。然后将 2 种液体混匀, 于室温放置 20 min 后, 加入细胞中, 并前后摇晃 96 孔细胞培养板使液体混匀, 于 37°C 的 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

#### 1.5 荧光素酶活性测定

##### 1.5.1 *Gluc* 活性测定

转染不同时间点后, 每孔取 20  $\mu$ L 细胞培养上清, 加入 *Gaussia* luciferase assay kit 中的底物 50  $\mu$ L, 用发光检测仪 (Modulus<sup>TM</sup> Luminometer) 测定其相对光强度单位 (Relative light unit, RLU), 每次测定收集光子 10 s。

##### 1.5.2 *Fluc* 活性测定

参照 luciferase assay system (Promega) 说明书制备细胞裂解液, 每孔取 20  $\mu$ L 细胞裂解液, 加入 luciferase assay system (Promega) 中的底物 100  $\mu$ L, 并按照 *Gluc* 活性测定方法检测发光强度。

#### 1.6 QRT-PCR 测定 miR142-3p 相对拷贝数

按照说明书, 用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取细胞内总 RNA。用 BioPhotometer plus (Eppendorf) 测定提取 RNA 浓度。参照 *TaqMan* MicroRNA Assay (Ambion) 说明书, 在 96 孔板中, 加入 0.6  $\mu$ g 总 RNA 于 15  $\mu$ L 反应体系中, 放入 Applied Biosystems 9 700 Thermocycler 中, 按程序 (16°C 30 min, 42°C 30 min, 85°C 5 min) 进行逆转录过程。然后, 应用 Applied Biosystems 7900HT fast real-time PCR system 进行 Real-time PCR 过程。具体为: 根据 *TaqMan* MicroRNA Assay 说明书, 在 96 孔板中加入 1.33  $\mu$ L 逆转录产物于 20  $\mu$ L 反应体系中, 按以下过程扩增: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环。所有反应均重复 4 次。

#### 1.7 统计分析

利用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 处理数据, 当  $P < 0.05$  时, 具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 U937 细胞中 miR142-3p 活性

*Gluc* 基因分别插入 pAAV2neo、pAAV2neo-tri142T 载体, 获得 empty G-sensor 和 miR142-3p Gsensor-3 (图 1A, C)。将单个拷贝的完全互补的 miR142-3p 靶序列克隆入 empty Gsensor 的 *EcoR* I 和 *Bgl* II 之间, 获得 miR142-3p Gsensor (图 1B)。为了验证 Gsensor 的有效性, empty Gsensor、miR142-3p Gsensor 和 miR142-3p Gsensor-3 分别转染 U937 细

胞。转染 48 h 后, 测定细胞培养上清中 Gluc 活性, 结果如图 2A 所示, 转染 miR142-3p Gsensor 和 miR142-3p Gsensor-3 的细胞培养上清中 Gluc 活性明显低于 empty Gsensor ( $P < 0.01$ ); 虽然转染 miR142-3p Gsensor 的细胞培养上清中 Gluc 活性高于 miR142-3p Gsensor-3, 但两者之间并无显著性差异 ( $P=0.21345 > 0.05$ )。这表明 Gsensor 中包含单拷贝 miRNA 靶序列就可有效地指示细胞内 miRNA 活性。由于插入单拷贝 miRNA 靶序列在载体构建上的简便性, 因此选择其作为后续细胞内 miR142-3p 活性检测的工具。

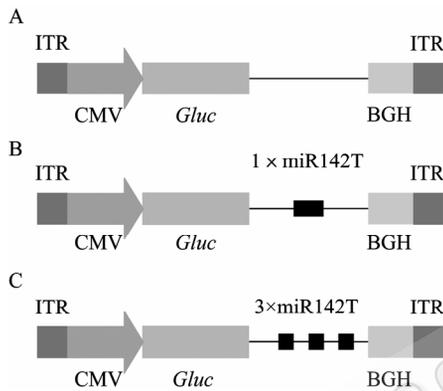


图 1 Gsensor 结构示意图

Fig. 1 Schematic map of Gsensors. ITR: AAV2 inverted terminal repeat; CMV: cytomegalovirus promoter; *Gluc*: *Gaussia* luciferase; BGH: bovine growth hormone polyA signal. miR142T: miR142-3p target sequence. (A) Schematic map of empty Gsensor. (B) Schematic of miR142-3p Gsensor. (C) Schematic map of miR142-3p Gsensor-3.

为了进一步验证 Gsensor 的有效性, empty Gsensor 或 miR142-3p Gsensor 与 Anti-miR142 共转染 U937 细胞, 并同时转染 pAAV2neo-Fluc 以校正转染效率。转染 24 h 后, 测定细胞培养上清中 Gluc 活性, 并用 Fluc 活性校正转染效率差异, 比较 empty Gsensor 和 miR142-3p Gsensor 表达 Gluc 差异, 换算成相对荧光素酶水平 (Relative luciferase level, RLL), 即 miR142-3p Gsensor 表达 Gluc 占 empty Gsensor 表达 Gluc 的百分比。结果见图 2B, RLL 随着转染 Anti-miR142 浓度的增加而升高。

## 2.2 Gsensor 功能影响因素分析

为了分析时间对 Gsensor 作用的影响, 等量的 empty Gsensor 和 miR142-3p Gsensor 分别转染 U937

细胞, 转染后不同时间点测定细胞培养上清中 Gluc 活性, 并换算成 RLL。结果如图 3A 所示, 转染后 RLL 逐渐开始下降, 直到 48 h 趋于平稳。

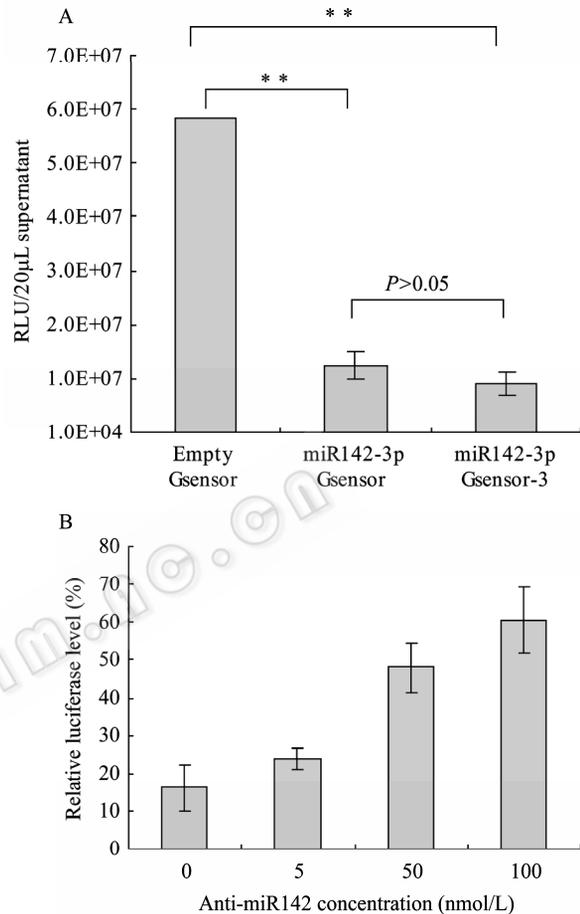


图 2 Gsensor 功能验证

Fig. 2 Validation of Gsensor. (A) Indicating miR142-3p activity by miR142-3p Gsensor and miR142-3p Gsensor-3 in U937 cells. Results were shown with  $\bar{x} \pm s$ . Data was analyzed using one-way ANOVA. RLU, relative light unit. \*\*,  $P < 0.01$ . (B) Enhancing miR142-3p activity by Anti-miR142. Differences in transfection efficiency were normalized using Fluc activity. Relative luciferase level =  $S_{Gluc}/C_{Gluc}$ . Gluc, Gluc activity. S, cells transfected with miR142-3p Gsensor. C, cells transfected with empty Gsensor. Results were represented with  $\bar{x} \pm s$ .

为了分析转染剂量对 Gsensor 功能的影响, 首先保持转染细胞数量不变, 将不同剂量 (0.01、0.1、0.2 µg/孔) 的 empty Gsensor 和 miR142-3p Gsensor 转染 U937 细胞。转染 48 h 后测定细胞培养上清中 Gluc 活性 (图 3B), 同时换算成 RLL (图 3C), 单因素方差分析发现不同剂量组间未见统计学差异 ( $P=0.2883$ )。然后固定每孔转染的 Gsensor 剂量 (0.1 µg/孔), 变化

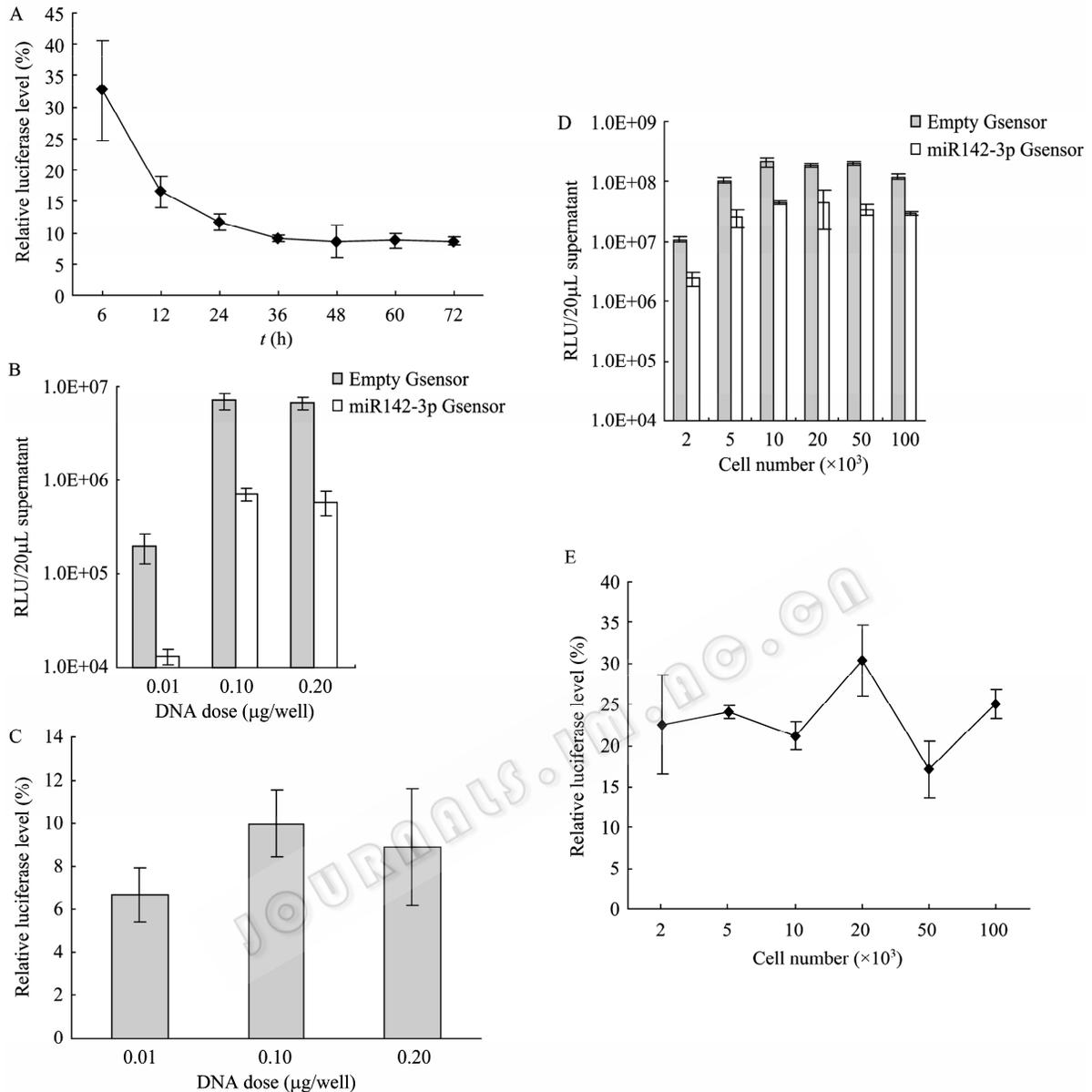


图3 Gsensor 功能影响因素分析

Fig. 3 Factors affect miRNA Gsensor. (A) miR142-3p activity variation with time in U937 cells. Relative luciferase level was represented with  $\bar{x} \pm s$ . (B) Gluc activity in the supernatant of U937 cells transfected with different doses of DNA. Results were represented with  $\bar{x} \pm s$ . RLU, relative light unit. (C) Relationship between relative luciferase level and DNA doses transfected. (D) Gluc activity in the supernatant of U937 cells with different cell number. Results were represented with  $\bar{x} \pm s$ . (E) Relationship between relative luciferase level and cell number.

转染的 U937 细胞数量 (2 000~100 000/孔)。同样转染 48 h 后检测细胞培养上清中 Gluc 活性 (图 3D), 换算成图 3E 表示的 RLL 值, 单因素方差分析发现不同数量细胞组间 (2 000~20 000/孔) 没有统计学差异 ( $P=0.1567$ )。

### 2.3 Gsensor 测定不同细胞 miR142-3p 活性

利用已建立的 Gsensor 方法, 本研究检测了

HEK293、U937、K562、P815 和 SP2/0 细胞中的 miR142-3p 活性。细胞培养上清中的 Gluc 活性如图 4A 所示, RLL 值如图 4B 所示。从图 4B 的结果可知, HEK293 细胞的 RLL 值大约为 100%, 表明该细胞内未检测到 miR142-3p 活性, 但 K562、U937、P815 和 SP2/0 的 RLL 值均小于 20%, 提示 miR142-3p 活性较高。

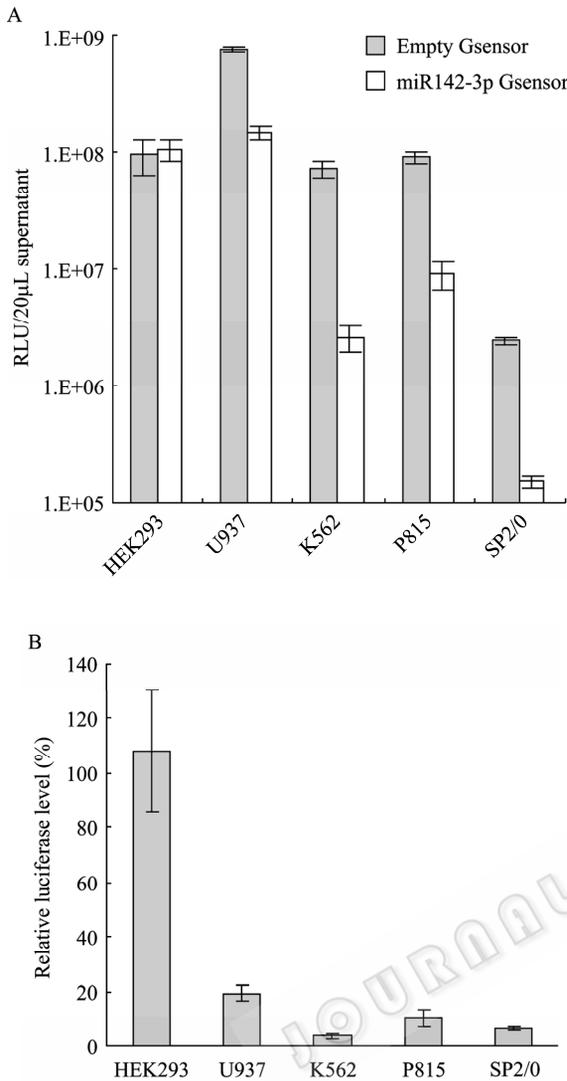


图 4 HEK293、U937、K562、P815 和 SP2/0 细胞中 miR142-3p 活性测定

Fig. 4 miR142-3p activity in HEK293, U937, K562, P815 and SP2/0 cells. (A) Gluc activity varied in the supernatant of HEK293, U937, K562, P815 and SP2/0 cells. Results were represented with  $\bar{x} \pm s$ . (B) Relative luciferase level in HEK293, U937, K562, P815 and SP2/0 cells. Relative luciferase level =  $S_{\text{Gluc}}/C_{\text{Gluc}}$ . Gluc: *Gaussia* luciferase activity; S: cells transfected with miR142-3p Gsensor; C: cells transfected with empty Gsensor. Results were represented with  $\bar{x} \pm s$ .

#### 2.4 miR142-3p 拷贝数与其活性的关系

为了分析 miRNA 拷贝数与其活性之间的关系, 应用 *TaqMan* MicroRNA Assay (Ambion) 系统, 检测了 HEK293、U937 和 K562 细胞中 miR142-3p 的相对拷贝数。由图 5 的结果可知, miR142-3p 在细胞中的相对拷贝数为: K562 > U937 > HEK293, 与细胞内的 miR142-3p 活性一致。

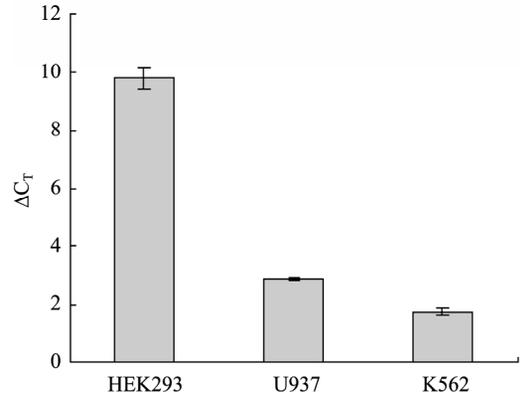


图 5 HEK293、U937 和 K562 细胞中 miR142-3p 相对拷贝数测定

Fig. 5 Relative copies of miR142-3p in HEK293, U937 and K562 cells. Relative copy number was assayed using QRT-PCR (Ambion).  $\Delta C_T = C_{T-\text{miR142-3p}} - C_{T-\text{EC}}$ .  $C_{T-\text{miR142-3p}}$ :  $C_T$  value of miR142-3p; EC: endogenous control and U6B selected as endogenous control in this assay;  $C_{T-\text{EC}}$ :  $C_T$  value of EC.

### 3 讨论

实时动态地监测细胞内 miRNA 活性变化有助于认识 miRNA 参与调节体内生理病理过程的机制。遗憾的是, 现有 Northern blotting 和 QRT-PCR 等 miRNA 检测技术只能检测 miRNA 表达水平不能检测 miRNA 活性。而且, 需要裂解细胞和提取 RNA, 操作过程繁琐、费时。本研究描述了一种利用 Gsensor 灵敏、简便和无创伤检测细胞内 miRNA 活性的方法, 使实时动态监测细胞内 miRNA 活性成为可能。

本研究通过计算转染 miRNA Gsensor 的细胞中的 Gluc 活性与转染 empty Gsensor 的 Gluc 活性的比值 (RLL 值) 来表示细胞内的 miRNA 活性。由于 Gluc 分泌性好, 不用裂解细胞直接取细胞培养上清即可检测细胞内 Gluc 表达情况, 催化反应不依赖于 ATP, 因此相比于 Fluc (Firefly luciferase), Gluc 表达检测更加简单、方便和快捷。同时不用裂解细胞, 可以长期持续地检测相同细胞的 Gluc 表达, 使实时动态监测 miRNA 活性成为可能。

本研究中, 基于 miRNA 调节基因表达的机制, 构建了以 *Gluc* 为报告基因的携带单个和 3 个拷贝 miR142-3p 完全互补靶序列的 miR142-3p Gsensor 和 miR142-3p Gsensor-3 (图 1B、1C), 同时构建不携带 miRNA 靶序列的 empty Gsensor (图 1A)。选用

miR142-3p 活性较高的造血干细胞系来源细胞株 U937<sup>[15-16]</sup>, 验证 miR142-3p Gsensor 和 miR142-3p Gsensor-3 的功能, 发现这两种 Gsensor 均可有效地指示 U937 细胞内 miR142-3p 活性, 且两者之间无统计学上差异 (图 2A)。应用 miR142-3p Gsensor 检测了 Anti-miR142 对 U937 细胞内 miR142-3p 活性的抑制作用, 采用 RLL 值表示细胞内的 miRNA 活性, 结果表明 miR142-3p Gsensor 有效地揭示了 Anti-miR142 的抑制作用。这表明 Gsensor 中插入某种 miRNA 的单拷贝的靶序列已经能够用于 miRNA 活性检测。为了更好地模拟体内一个基因通常只携带单个拷贝某种 miRNA 靶序列的情况, 以及考虑 Gsensor 构建的简便性, 选择 miR142-3p Gsensor 进行其余实验。

Gsensor 连续 96 h 监测 U937 细胞内 miR142-3p 活性, 结果发现 Gsensor 所指示的 miR142-3p 活性随时间逐渐增加, 48 h 后达到峰值并保持不变 (图 3A)。这可能是由于 miRNA 形成 RISC 并识别其靶序列, 从而抑制基因表达是一个过程, 导致 miRNA 的抑制作用滞后于基因表达, 但随着时间的延长, miRNA 的抑制作用与基因表达达到动态平衡, 因此 Gsensor 表现出的 miRNA 活性趋于平稳。提示选择合适的检测时间点, 有助于真实地反映细胞内 miRNA 活性。因此, 本研究选择转染后 48 h 测定细胞中的 miRNA 活性。另外, 本研究结果表明, 转染剂量在 0.001~0.05 pg/cell 范围内变化时, 不影响 Gsensor 的功能, 降低了转染操作时对剂量的限制, 方便了操作过程。

质粒对某些细胞转染效率低, 可能成为质粒型 miRNA 传感器应用的障碍。但在本研究中, Gsensor 对不易转染的悬浮细胞 SP2/0 细胞也能灵敏地反映出细胞内的 miR142-3p 活性, 分析原因可能有以下 2 点: 首先, Gluc 检测灵敏度高, 分别是 Fluc 的 100 倍<sup>[13]</sup>, SEAP (secreted alkaline phosphatase) 的 1 000 倍<sup>[17]</sup>; 其次, 由于 Gluc 活性可在 37°C 细胞培养液中稳定保持 48 h<sup>[14]</sup>, 因此 Gluc 在细胞培养液中的积累可显著提高 Gsensor 的灵敏度。

此外, 本研究还应用 miR142-3p Gsensor 测定了 HEK293、U937、K562、P815 和 SP2/0 中 miR142-3p

活性。结果表明, 在造血干细胞系来源的 U937、K562、P815 和 SP2/0 细胞中 miR142-3p 活性较高, 在非造血干细胞来源的 HEK293 细胞中 miR142-3p 活性则几乎测不到。这提示 miR142-3p 在造血干细胞系中具有一定的保守性, 可能在造血干细胞系的发育中发挥重要作用。而且 miR142-3p 活性与其相对拷贝数呈正相关。这也说明在细胞生长适宜的条件下, miRNA 活性与其拷贝数呈现相似的变化规律。

总之, 本研究提出了一种基于 Gsensor 的简单、方便和非创伤的 miRNA 活性检测方法, 可实时动态检测细胞内 miRNA 活性, 为 miRNA 的活性检测提供了新的选择工具。

## REFERENCES

- [1] Bartel DP. MiRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297.
- [2] Griffiths-Jones S. The microRNA registry. *Nucl Acids Res*, 2004, **32**: D109-D111.
- [3] Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translation repression. *Genes Dev*, 2004, **18** (5): 504-511.
- [4] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, **120**(1): 15-20.
- [5] Careton M, Cleary MA, Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle*, 2007, **6**(17): 2127-2132.
- [6] Iovino N, Pane A, Gaul U. miR-184 has multiple roles in *Drosophila* female germline development. *Dev Cell*, 2009, **17**(1) 123-133.
- [7] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, 2003, **113**(6): 673-676.
- [8] Jovanovic M, Henqartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene*, 2007, **25**(46): 6176-6187.
- [9] Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res*, 2009, **15**(21): 6479-6483.
- [10] Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan GJ, et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, 2009, **137**(4): 647-658.
- [11] Schichel R, Boyerinas B, Park SM, et al. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation,

- tumorigenesis and cell death. *Oncogene*, 2008, **27**(45): 5959–5974.
- [12] Lu J, Tsourkas A. Imaging individual microRNAs in single mammalian cells *in situ*. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(14): e100.
- [13] Tannous BA, Kim DE, Fernandez JL, *et al*. Codon-optimized *Gaussia* luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and *in vivo*. *Mol Ther*, 2005, **11**(3): 435–443.
- [14] Wurdinger T, Badr C, Pike L, *et al*. A secreted luciferase for *ex vivo* monitoring of *in vivo* processes. *Nat Methods*, 2008, **5**(2): 171–173.
- [15] Chen CZ, Li L, Lodish HF, *et al*. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, **303**(5654): 83–86.
- [16] Brown BD, Venneri MA, Zingale A, *et al*. microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med*, 2006, **12**(5): 585–591.
- [17] Tannous BA. *Gaussia* luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and *in vivo*. *Nat Protoc*, 2009, **4**(4): 582–591.



## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 基因克隆与操作 (生命科学前沿丛书) (原书第二版)

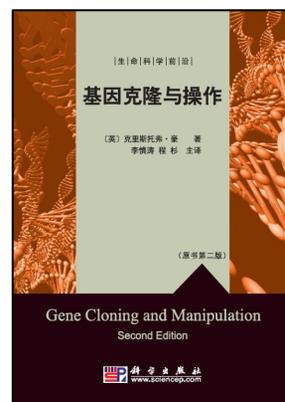
(英) 克里斯托弗·豪 著 李慎涛 等译

978-7-03-027438-0 ¥55.00 2010年5月

#### 内容简介

本书作者克里斯托弗·豪是剑桥大学植物与微生物生物化学专业的教授,教授分子生物学达20年。本书是对第一版的完全更新,反映了基因克隆和操作领域最新的进展,对重组DNA技术进行了全面而简洁的介绍:首先阐释了生物化学的基本原理;然后介绍了PCR以及使用大肠杆菌宿主和质粒、噬菌体和杂合载体进行克隆;之后介绍了文库的构建和筛选,以及如何对克隆化序列进行改造、灭活和表达;最后讨论了在许多其他生物中进行的遗传操作,包括细菌、真菌、藻类,以及植物、昆虫和哺乳动物。

本书是为要使用重组DNA技术的高年级本科生、研究生和科研工作者而作,重点放在特定类型克隆载体上,以帮助读者理解并能够在新的实验状态下提出适当的策略。本书还介绍了一系列“现实的”生物学问题,以使读者能够评估自己对知识的理解并准备考试。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: [www.dangdang.com](http://www.dangdang.com) [www.joy.com](http://www.joy.com) [www.amazon.cn](http://www.amazon.cn) [www.beifabook.com](http://www.beifabook.com)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目