

牛肺泡巨噬细胞微小 RNA 的克隆与鉴定

徐广贤,张艳,贾浩,周萍,王玉炯*

(宁夏大学生命科学学院,银川 750021)

摘要: MicroRNA(miRNA)是一类长 19~26 个核苷酸的内源性非编码单链小分子 RNA,其异常表达将会导致生理的异常和疾病的产生。为了研究 miRNAs 在牛肺泡巨噬细胞抗菌机制中的作用,构建了牛肺泡巨噬细胞 miRNA cDNA 文库,从 438 个克隆中筛选出 22 个 miRNAs,其中有 19 个 miRNAs 在牛的 miRBase 数据库中没有发现,但是有 8 个 miRNAs 与人和(或)鼠中的序列完全同源,因此,将它们命名为 Bta-miR-141、Bta-miR-187、Bta-miR-191、Bta-miR-448、Bta-miR-589、Bta-miR-873、Bta-miR-463 和 Bta-miR-562;另外有 11 个 miRNAs 在所有 miR-Base 数据库中都没有发现,有待进一步研究。这些数据为研究 miRNAs 调控牛肺泡巨噬细胞抗菌机制奠定了基础。

关键词: MicroRNA;牛肺泡巨噬细胞;克隆;鉴定

中图分类号:S852.2;Q522

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)09-1410-04

Cloning and Identification of MicroRNA from Bovine Alveolar Macrophage

XU Guang-xian, ZHANG Yan, JIA Hao, ZHOU Ping, WANG Yu-jiong*

(College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding single-stranded RNA that play vital roles in many biological processes by regulating the expression of genes. To study the antibacterial mechanism of microRNAs in bovine alveolar macrophage, a cDNA library of microRNAs was constructed. By sequencing, 22 microRNAs have been screened in 438 clones. There are 19 microRNAs which have not been reported in miRBase, and 8 of them were sequence homology with human and rat. They are respectively named Bta-miR-141, Bta-miR-187, Bta-miR-191, Bta-miR-448, Bta-miR-589, Bta-miR-873, Bta-miR-463 and Bta-miR-562 by the rules. 11 others have not been found in any miRBase and should be further studied.

Key words: MicroRNAs; bovine alveolar macrophage; cloning; identification

MicroRNA(miRNA)是一类长约 22 个核苷酸的内源性非编码单链小分子 RNA,可调节与其序列互补 mRNA 的表达,普遍存在于高等生物界,在不同物种间具有高度的保守性,其表达具有高度组织特异性、保守性和时序性,能通过与其靶基因 mRNA 特异性的碱基配对导致其降解或翻译阻遏,从而参与个体发育、细胞分化、细胞增殖、物种进化以及疾病发生过程中的基因表达调控^[1-5]。miRNA 表达具

有严格的时间和组织特异性,其异常表达将会导致生理的异常和疾病的产生^[6-7]。

牛肺泡巨噬细胞是胞内寄生菌(如牛结核分枝杆菌、副结核分枝杆菌等)的主要靶细胞,在胞内寄生菌的发生、发展过程中起着重要的作用,肺泡巨噬细胞的增殖与凋亡对于胞内寄生菌的侵袭与在胞内存活起着决定性的作用^[8-13],有关 miRNAs 在牛肺泡巨噬细胞抗菌机制中的作用尚未见到报道。作

收稿日期:2008-11-04

资助项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目子课题(2006CB504401);国家自然科学基金项目(30860207,30960275);高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(706057);宁夏高等学校科研项目;宁夏大学科研基金项目(ZR200724)

作者简介:徐广贤(1973-),男,副教授,硕士生导师,主要从事病原微生物及人畜共患病发病机理的研究,E-mail: xgx205079@sina.com.cn

* 通讯作者:王玉炯(1963-),Tel:0951-2062033,E-mail: wyj@nxu.edu.cn

者拟通过分离纯化牛肺泡巨噬细胞,提取 miRNA、构建 miRNA cDNA 文库,克隆测序牛肺泡巨噬细胞 miRNA 分子,以期发现在牛肺泡巨噬细胞特异性表达的 miRNA 分子,研究 miRNA 分子对牛肺泡巨噬细胞抗菌活性的调节机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

RNA-Solv reagent (Omega Bio-Tek, Lilburn, GA), 20 bp DNA Ladder (TaKaRa Code: D521), 14-30 ssRNA Ladder Marker (TaKaRa Code: D3416), Small RNA Gel Extraction Kit (TaKaRa Code: D9106), Small RNA Cloning Kit (TaKaRa Code: DRR065), T₄ DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶, pMD18-T-Vector 购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒 (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit), 质粒快速提取试剂盒 (Plasmid Rapid Isolation Kit, BioDev) 购自博大泰克公司; DH5 α 感受态细胞由本实验室保存。

1.2 牛肺泡巨噬细胞的分离与纯化培养

取健康新鲜宰杀的中国黑白花奶牛(雌性, 5 岁)肺脏, 表面用生理盐水冲洗干净, 再将 2 000~4 000 mL 的 DMEM 培养液经气管灌入, 轻轻按摩肺脏 5~10 min, 再经气管倒出, 用灭菌的纱布将洗液过滤, 除去胶原纤维和黏液, 2 000 r \cdot min⁻¹, 离心 5 min, 弃上清, 将细胞再用 DMEM 培养液轻轻悬浮, 离心, 洗涤 3 次, 最后用含有 10% 胎牛血清 DMEM 培养液悬浮沉淀, 将细胞调整到 2 \times 10⁶ mL⁻¹, 然后加入 6 孔培养板, 每孔加 3 mL, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 2~3 h 后, 弃上清, 用 DMEM 培养液洗涤 2~3 遍, 洗去悬浮的未贴壁细胞。

1.3 牛肺泡巨噬细胞总 RNA 的提取与 miRNA 分离回收

将经过纯化培养的巨噬细胞培养上清弃去, 然后直接加入 RNA-Solv 试剂, 按照试剂盒的操作说明, 直接提取巨噬细胞的总 RNA。将总 RNA 用含有 8 mol \cdot L⁻¹ 尿素的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 切出含有目的 miRNA 分子的凝胶块, 然后参照 Small RNA Gel Extraction Kit 操作说明, 进行 miRNA 分离回收。

1.4 cDNA 文库的构建

1.4.1 miRNA 5'端去磷酸化 将回收的 miRNA 加入碱性磷酸酶混匀后, 在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 使 5'

端去磷酸化, 防止自连, 然后利用苯酚/氯仿/异戊醇提取法纯化回收去磷酸化的 miRNA。

1.4.2 miRNA 3'端与生物素化的 RNA/DNA 接头连接 用 T₄ DNA 连接酶将 5'端去磷酸化的 miRNA 和 3'端标记了生物素的接头 (5'-CATC-GATCCTGCAGGCTAGAGAC-3') 连接, 然后利用标记亲和素的磁珠反应, 最后利用磁力架回收 3'端连有接头的 miRNA 分子。

1.4.3 5'端磷酸化反应与 RNA/DNA 接头连接

将 3'端连有接头的 miRNA 分子, 加入 T₄ Polynucleotide Kinas 混匀后, 在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 使 5'端磷酸化, 然后利用苯酚/氯仿/异戊醇提取法纯化回收磷酸化的 miRNA。然后用 T₄ DNA 连接酶将 5'端磷酸化的 miRNA 和 5'端接头 (5'-AAAGATC-CTGCAGGTGCGTCA-3') 连接, 然后利用磁力架回收 miRNA 分子。

1.4.4 miRNA 分子 cDNA 第一链的合成 以 5'端和 3'端都连有接头的 miRNA 分子为模板, 用反转录引物 (5'-GTCTCTAGCCTGCAGGATCGATG-3'), 进行 miRNA 分子 cDNA 第一链的合成, cDNA 合成的总体积为 20 μ L, 加入 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2 μ L, 100 pmol \cdot L⁻¹ PCR-R&RT-Primer (5'-GTCTCTAGCCTGCAGGATCGATG-3') 1 μ L, 5 \times buffer 4 μ L, AMV 反转录酶 1 μ L (50U \cdot μ L⁻¹), RNA 酶抑制剂 1 μ L (40 U \cdot μ L⁻¹), DEPC 处理水 9 μ L, 反转录条件是 42 $^{\circ}$ C 1 h, 72 $^{\circ}$ C 5 min。反应结束后, 利用标记亲和素的磁珠回收合成的 cDNA 第一链。

1.4.5 miRNA 分子 cDNA 第二链的合成、克隆与测序 用 5 μ L 0.1 mol \cdot L⁻¹ NaOH 将结合在磁珠上的 cDNA 第一链洗脱下来, 作为 PCR 模板, 然后利用上游引物 (F: 5'-AAAGATCCTGCAGGTGCGTCA-3') 和下游引物 (R: 5'-GTCTCTAGCCTGCAGGATCGATG-3') 进行 cDNA 第二链的合成。PCR 条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 15 个循环; 72 $^{\circ}$ C 3 min。PCR 产物 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 结束后, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收 60~70 bp 的目的片段, 克隆到 T 载体, 对阳性克隆进行测序。

2 结 果

经纯化培养的肺泡巨噬细胞提取总 RNA 后, 用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测提取的牛肺泡巨

噬细胞总 RNA,可以很清楚地看到,提取的 RNA 各条带清晰分明,没有弥散托尾,这表明提取的 RNA 质量较好,没有降解(图略)。以 5' 端和 3' 端都连有接头的 miRNA 分子为模板,进行 PCR 扩增,合成 cDNA,以 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,在 60~70 bp 有一特异性目的条带,说明成功的构建了 cDNA 文库,回收 60~70 bp 左右的目的片段,将其克隆到 T 载体,并对阳性克隆进行测序,作者共

挑取了 438 个克隆,利用 NCBI 中的 Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)、miRBase 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) 和牛的基因组数据库 (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>) 对测序结果进行比对分析,共筛选出 22 个 miRNAs(表 1),其长度在 19~25 bp,个别的长度为 16~17 bp,都能够在牛基因组中找到相应的位置。

表 1 牛肺泡巨噬细胞 miRNAs 的克隆与鉴定

Table 1 Novel miRNAs identified from the bovine alveolar macrophage

MicroRNA	序列 Sequence(5'-3')	核苷酸数 Size/nt	链型 Strand	染色体 Chromosome	起始位置 Start	终止位置 End
Bta-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUG	21	+	Chr19. 19	199671	199691
Bta-miR-21a	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	22	+	Chr19. 19	199671	199692
Bta-miR-21b	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGAC	23	+	Chr19. 19	199671	199693
Bta-miR-141	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG	22	-	Chr5. 149	540408	540429
Bta-miR-187	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCG	21	+	Chr24. 31	370771	370791
Bta-miR-191	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCU	22	-	Chr22. 85	141348	141369
Bta-miR-448	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCCAU	22	+	ChX	91494	91515
Bta-miR-589	GAACCACGUCUGCUCUGUG	19	+	Chr8. 146	42807	42825
Bta-miR-873	GCAGGAACUUGUGAGUCUCCU	21	-	Chr5. 46	343175	343195
Bta-miR-463	UGAUAGACACCAUAUAAGGUAG	22	+	Chr9. 107	342337	342356
Bta-miR-562	AAAGUAGCUGUACCAUUUG	19	+	Chr4. 105	180156	180174
AM-B172	GGAGGAUCUUGAAAUUCUUGA	21	+	Chr1. 6	325496	325516
			-	Chr5. 89	107825	107849
			+	Chr3. 161	370532	370556
AM-104	GGAGACCGGGUUCGAUUCCCGAC	25	-	Chr3. 161	424221	424245
			-	Chr3. 49	582334	582358
			-	ChrUn. 96184	34	58
AM-B-156	UUGC GCGCCUGCUGCCUCCUUGGA	25	+	ChrUn. 93227	251	275
			+	ChrUn. 92162	258	282
			+	ChrUn. 96035	121	140
AM-77	CCACCAGAGUUUCCUCUGGC	20	+	ChrUn. 96002	109	128
			+	ChrUn. 93596	16	35
			+	Chr25. 17	487679	487694
AM-B-232	GACGCACCUGCAGGAUCUU	19	+	Chr9. 100	85012	850138
			+	ChrUn. 1868	63673	63688
			+	ChrUn. 97851	73	89
AM-68	UCUGGACCGCUACGGACCUC	20	+	ChrUn. 96002	93	109
AM-18	UUUGGGGCACCAGCACCUCU	20	+	Chr7. 61	54969	54984
AM-78	ACCGGAAACGAACCCGGGC	20	-	Chr4. 34	614071	614090
AM-35	UAUCGGGUCCAAACAGC	17	+	ChrUn. 7694	31843	31857
AM-113	GCCUACUCGUCAGGGCA	17	+	Chr3. 87	1045909	1045923
AM-90	GUCAAGAUAUUCUUG	16	-	Chr19. 87	145920	145935

3 讨论与小结

牛肺泡巨噬细胞是胞内寄生菌的主要靶细胞,有关 miRNAs 对肺泡巨噬细胞的抗菌机制调节的研究,未见报道,作者首次建立了牛肺泡巨噬细胞 miRNA cDNA 文库,并从中发现 19 个新的 miRNAs 分子,其中有 8 个 miRNAs 与人和(或)鼠中的序列完全同源,因此,将它们命名为 Bta-miR-141、Bta-miR-187、Bta-miR-191、Bta-miR-448、Bta-miR-589、Bta-miR-873、Bta-miR-463 和 Bta-miR-562。另外有 11 个 miRNAs 在所有 miRBase 数据库中都没有发现,其功能尚属未知,有待进一步研究。本研究为进一步研究 miRNAs 调控牛肺泡巨噬细胞的抗菌机制提供了有用的帮助。

参考文献:

- [1] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] DENNIS C. Small RNAs : The genome's guiding hand? [J]. *Nature*, 2002, 420: 732.
- [3] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 2000, 403: 901-906.
- [4] BRENNECKE J, HIPFNER D R, STARK A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*[J]. *Cell*, 2003, 113(1): 25-36.
- [5] XU P Z, VEMOOY S Y, GUO M, et al. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism[J]. *Curr Biol*, 2003, 13(9): 790-795.
- [6] CHEN X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development [J]. *Science*, 2004, 303: 2022-2025.
- [7] DOSTIE J, MOURELATOS Z, YANG M, et al. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs[J]. *RNA*, 2003, 9(2): 180-186.
- [8] ADEREM A, UNDERHILL D M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages[J]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17 :593-623.
- [9] RUSSELL D G, DANT J, STURGILL-KOSZYCKI S. Mycobacterium avium- and Mycobacterium tuberculosis-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma[J]. *J Immunol*, 1996,156:4764-4773.
- [10] SCHAIBLE U E, STURGILL - KOSZYCKI S, SCHLESINGER P H, et al. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages[J]. *J Immunol*,1998,160:1290-1296.
- [11] ROOK G A W, SEAH G, USTIANOWSKI A M. Tuberculosis :immunology and vaccination [J]. *Eur Respir J*, 2001, 17:537-557.
- [12] DERETIC V, FRATTI R A. Mycobacterium tuberculosis phagosome [J]. *Mol Microbiol*, 1999, 31 : 1603-1609.
- [13] DIELI F, TROYE-BLOMBERG M, IVANVI J, et al. V γ 9/V δ 2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis [J]. *Eur J Immunol*,2000,30:1512-1519.