

Hsa-miR-17 基因启动子区 PCR 扩增及鉴定体系的构建^{*}

罗 凯,黎谢梦丹,王 倩,吴顺芳,贾小婷,贺智敏

(广州医科大学附属肿瘤医院/广州医科大学肿瘤研究所,广州 510095)

摘要:目的 建立 Has-miR-17 编码基因启动子区的 PCR 扩增及鉴定体系。方法 提取人源细胞系基因组 DNA 为实验样本,以 Has-miR-17 编码基因上游启动子区序列为目标序列,行序列特征分析并设计特异 PCR 扩增及测序引物,利用添加 DMSO 和使用 5' 加尾引物的体系优化策略建立 Has-miR-17 基因启动子区 PCR 扩增及鉴定体系并行性能评估。同时另以 10 例人源细胞系为样本初步验证该 PCR 及鉴定体系的应用效果。结果 经电泳鉴定与测序分析确认在联合使用 5' 加尾 PCR 引物和 5% DMSO 的条件下 Has-miR-17 基因启动子区 PCR 扩增及鉴定体系已成功建立,其检测下限达 10 ng/ μ l 且特异度好、重复性佳。利用该体系成功实现对 10 例人源细胞株 Has-miR-17 基因启动子区的 PCR 扩增及鉴定。结论 已成功建立 Has-miR-17 编码基因启动子区的 PCR 扩增及鉴定体系。

关键词: Has-miR-17; 基因; PCR; 启动子

中图分类号: R531.3; R381 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)05-004-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.002

Establishment of the PCR Amplification and Sequencing System of Hsa-miR-17 Gene Promoter Region

LUO Kai, LIXIE Meng-dan, WANG Qian, WU Shun-fang, JIA Xiao-ting, HE Zhi-min

(Affiliated Cancer Hospital of Guangzhou Medical University, Cancer Research Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China)

Abstract: **Objective** To establish the PCR amplification and sequencing system of Hsa-miR-17 gene promoter region. **Methods** To establish the PCR amplification and sequencing system of Hsa-miR-17 gene promoter region and evaluate its performance by analyzing the sequence characteristics, designing PCR and sequencing primers, extracting sample genome DNA from different human cell lines and using optimization strategy of adding DMSO to the final concentration of 5% and making use of 5' tailed PCR primers; Then the established system was further verified in 10 other cell line samples. **Results** The PCR amplification and sequencing system of hsa-miR-17 gene promoter region, which had good repeatability, good specificity and its detection limit was 10 ng/ μ l, was established successfully under the condition of using 5' tailed PCR primers and 5% DMSO and that was confirmed by electrophoresis analysis and Sanger sequencing. And fragment of Has-miR-17 gene promoter region in 10 human cell lines were successfully achieved and verified by this system. **Conclusion** The PCR system of Hsa-miR-17 gene promoter region was established successfully.

Keywords: Has-miR-17; gene; PCR; promoter

MicroRNA(miRNA)是一类内源性、非编码、长度约为 18~25bp 的小分子单链 RNA,其通过与互补的 mRNA 之 3' 非翻译区的完全或不完全结合来调控相应 mRNA 的降解和翻译,从而调控相应蛋白质的表达。相关研究^[1,2]显示 miRNA 不仅参与了细胞分化、增殖、凋亡等生物学过程的调控,也与肿瘤的发生、发展密切相关。启动子区是指位于结构基因 5' 端上游的一段 DNA 序列,不同转录因子通过与特异启动子区结合来调控相应基因的表达,从而实现对相应生理或病理过程的调节^[3,4]。因此研究 miRNA 基因启动子区与特定转录因子

间的相互作用对于阐明相应 miRNA 的表达调控机制进而理清其病理、生理功能具有重要意义。双荧光素酶报告基因实验是检测转录因子与目的基因启动子区 DNA 相互作用的一种经典实验方法,其核心是需构建插入特定基因启动子区 DNA 片段的双荧光素酶报告基因质粒,而构建质粒的前提则是获得启动子区的 DNA 片段^[5]。因此利用 PCR 扩增获得有效的启动子区 DNA 片段对开展相关基因的功能研究具有重要的实用价值。然而在很多基因的启动子区存在如 CpG 岛等的特殊基因结构,而这些特殊基因结构往往会引起引物的错

^{*} 基金项目:广州市卫计委医药卫生科技项目(No. 20161A011086)。

作者简介:罗 凯(1977—),男,硕士,副主任技师,肿瘤的靶向治疗耐药机制与分子靶向检测,E-mail:luokainan@126.com。

通讯作者:贺智敏(1956—),男,博士,研究员,肿瘤的发生及耐药机制,E-mail:hezhimin2005@yahoo.com。

配或导致局部二级结构的形成从而致使 PCR 扩增失败。所以通过何种方法来实现启动子区 DNA 片段的有效 PCR 扩增及鉴定是相关研究工作常需面对的问题。

相关研究报道^[6~8], Hsa-miR-17 在脑胶质瘤、白血病等多种肿瘤组织中高表达且与预后相关, 因此 Hsa-miR-17 是一个重要的潜在癌基因。同时 Hsa-miR-17 也参与了乳腺癌化疗响应和非小细胞肺癌的靶向治疗耐药, 所以其也是一个潜在的肿瘤治疗药物靶点^[9,10]。然而 Hsa-miR-17 的表达调控以及相关功能尚未完全阐明, 因此成功构建 Hsa-miR-17 基因启动子区的 PCR 扩增及鉴定体系对于促进 Hsa-miR-17 的相关研究具有实际意义。该研究拟以 Hsa-miR-17 基因启动子区为目标区域, 通过序列特点分析、引物设计、PCR 反应体系优化、测序体系建立等步骤构建 Hsa-miR-17 基因启动子区的 PCR 扩增及鉴定体系。

1 材料与方法

1.1 实验样本 肺癌 HCC827, H1650, MS-TO211H 细胞购自中科院上海细胞所, G6, B2, C10, C8, E5 为 HCC827 细胞之单克隆化子细胞; 肺癌 H460 细胞、脑胶质瘤 U251 和 T98G 细胞为本实验室保存细胞。另取裸鼠组织 3 例。

1.2 试剂和仪器 DNA 提取试剂盒购自美国 O-MEGA 公司; PCR 反应体系、测序试剂购自美国 Thermo 公司; Veriti 梯度 PCR 仪与 3130 测序仪也购自美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 靶序列获取与引物设计: 在 UCSC 网站搜索获得 Hsa-miR-17 基因上游 2 000 bp 启动子区 DNA 序列; 下载序列后利用 oligo7 软件分析序列特征; 其后结合序列特征利用 primer 5 软件设计 Hsa-miR-17 启动子区扩增引物以及测序引物。最后利用 NCBI 网站的 Primer-BLAST 功能分析引物的特异性。

1.3.2 基因组 DNA 提取: 根据说明书步骤提取样品基因组 DNA, 微量分光光度计测定核酸浓度。

1.3.3 Hsa-miR-17 基因启动子区 PCR 扩增及鉴定体系的建立、优化与鉴定: 以 HCC827 细胞基因组 DNA 为样品, 在不同退火温度及二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 浓度条件下行 PCR 扩增, 1.5 g/dl 琼脂糖凝胶电泳和 Sanger 测序做 PCR 产物鉴定, Sanger 测序实验步骤参见相关文献^[11]。反应体系: Green Mix 7.5 μ l, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ l, H₂O 或 DMSO H₂O (9.9 ml/dl, 16.5 ml/dl) 4.5 μ l, DNA 1 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, (47, 50, 53, 56, 59, 62) $^{\circ}$ C 各

30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 40 循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。

1.3.4 性能评估试验: 特异性: 分别以水、HCC827 细胞 DNA 和裸鼠组织 DNA 为阴性对照、阳性对照和实验样品进行特异性试验。

检测下限和重复性实验: 将 40 ng/ μ l 浓度 HCC827 细胞 DNA 按 2 倍倍比稀释 5 个浓度梯度形成样品系列, 利用已建立的 PCR 体系扩增该样品系列, 各样品均设 3 个重复管。

1.3.5 应用试验: 使用已建立的 Hsa-miR-17 基因启动子区 PCR 体系扩增 10 例细胞样品基因组 DNA; 1.5 g/dl 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增效果; 其后利用已建立的 Hsa-miR-17 基因启动子区 Sanger 测序鉴定体系鉴定 PCR 扩增产物的序列正确性。

2 结果

2.1 目标序列特征分析及引物设计 oligo7 软件分析发现 Hsa-miR-17 基因上游 2 000 bp 启动子区 DNA 序列平均 GC 含量为 48%, 但前 500 bp 和后 1 500 bp 序列的 GC 含量分别为 80.8% 和 37.1%, 表明该目标序列为高、低 GC 含量 DNA 片段的嵌合序列, 具有特殊性。做目标序列的熔解温度分析也呈前高后低的特征, 见图 1A。根据后续功能分析需要和序列自身特征, PCR 上下游引物分别设计在高、低 GC 含量 DNA 片段交界区和下游起始转录位点后, 涵盖整个低 GC 含量启动子区, 在此基础上增加设计一对 5' 端添加了接头序列的加尾引物。测序引物包含正、反向两套引物系统, 每套引物各含 4 条引物, 各条引物均匀分布在目标序列的前、中、后部, 通过序列拼接分析, 该测序引物体系可测通整段目标序列。详见表 1。BLAST 分析显示引物特异性良好。

2.2 Hsa-miR-17 基因启动子区 PCR 扩增及鉴定体系的初步建立 常规 PCR 引物在各种条件下均未成功扩增目的片段; 加尾引物分别在 DMSO 终浓度为 3% 且退火温度在 53 $^{\circ}$ C~62 $^{\circ}$ C 时和 DMSO 终浓度为 5% 且退火温度在 53 $^{\circ}$ C~59 $^{\circ}$ C 时可成功扩增目的片段, 产物电泳可见 1 608bp 清晰单一目的条带。选择 DMSO 终浓度为 5% 搭配退火温度 59 $^{\circ}$ C 为最终反应条件, 相应反应管 PCR 产物做测序鉴定, 测序所得 PCR 产物序列与目标序列完全相符。见图 1B, 1C。Hsa-miR-17 基因启动子区 PCR 扩增及鉴定体系已初步建立。

2.3 性能评估试验结果 特异性试验: 阴、阳性对照分别未见和可见目的扩增条带, 3 例裸鼠组织样品扩增均未见目的扩增条带, 所有样品均未见非特异性扩增条带, 表明该 PCR 体系特异性佳。

检测下限和重复性试验: 已建立的 Hsa-miR-

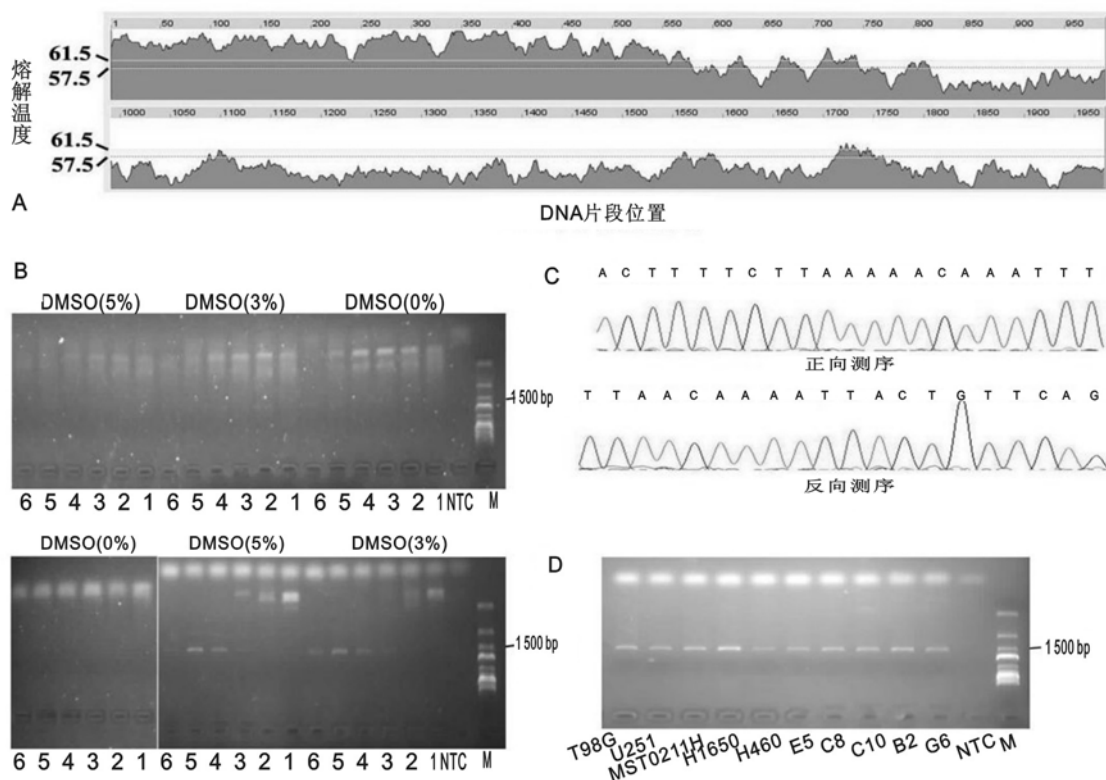
17 基因启动子区 PCR 扩增体系在样本基因组 DNA 浓度 10~40 ng/ μ l 范围内各反应管(含重复管)PCR 产物电泳鉴定均可见单一、清晰目的扩增条带;而在 1.25~5 ng/ μ l 范围内各样本梯度的 3 个重复管未能全见或完全未见单一、清晰目的扩增条带;以上结果表明该 PCR 体系重复性良好,检测

灵敏度可达 10 ng/ μ l。

2.4 应用试验 利用已建立的 Hsa-miR-17 基因启动子区 PCR 扩增体系成功扩增 10 例细胞样品基因组 DNA,产物电泳鉴定可见单一清晰目的扩增条带;所有 PCR 产物测序,测序结果与目标扩增序列完全一致。见图 1D。

表 1 Hsa-miR-17 基因启动子区扩增及测序引物

扩增位点	引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
扩增引物	上游	GGCTACGCGAGAATC	1 560
	下游	TACCTGCACTGTAAGCACTTT	
加尾扩增引物	上游	GAACCAGATCTTGGAATTCTTCGAAGGCTACGCGAGAATC	1 608
	下游	GTCGGTACCAAGCGCTACCGTTACCTGCACTGTAAGCACTTT	
测序引物	正向 1	TGCCATCAGGACCACA	
	正向 2	TAGATTGGACGGTGGTA	
	正向 3	TGGCTTATGCAGTTTACG	
	正向 4	CCCATTAGGATTATGCT	
	反向 1	TGCTACAAGTGCCTTCAC	
	反向 2	CTGGAAGTGGTGGCTCT	
	反向 3	TGCATAAGCCAGTTTCC	
	反向 4	AGAGTAAGAGTCGAGCAATAC	



注:M 为北京天根 1KB DNA Marker;NTC 为阴性对照;1 至 6 分别代表退火温度分别为 47℃,50℃,53℃,56℃,59℃和 62℃。

图 1 Hsa-miR-17 基因上游启动子区 PCR 扩增体系的构建

3 讨论 Hsa-miR-17 是一个肿瘤相关 miRNA,同时其还与肿瘤的化疗和靶向治疗耐药相关,但相关机制尚未阐明。因此研究 Hsa-miR-17 的表达

调控与相关肿瘤病理过程的关系对阐明此类肿瘤的发生机制并寻找新的治疗靶点具有重要意义。miRNA 的生成主要包含以下几个步骤:首先 miR-

NA 基因在细胞核内转录生成其初级产物 Pri-miRNA; 其后 Pri-miRNA 在核糖核酸酶 Drosha 的作用下被切割成 70~100bp 具发夹结构的前体 miRNA, 最终前体 miRNA 由胞核转移至胞浆后由核糖核酸酶 Dicer 切割生成成熟 miRNA。虽然相关基因编码的 miRNA 并不生成蛋白质, 但其表达调控却与编码蛋白质的基因类同, 其基因上游的启动子区对表达调控具有重要意义。启动子区的长度大约在 1 000~1 500 bp 左右, 利用 PCR 成功的钓取启动子区片段并鉴定其序列正确性对于开展相关基因的表达调控研究具有重要的实用价值。

此研究在分析 Hsa-miR-17 基因上游启动子区序列特征时发现该段序列虽总的 GC 含量正常, 但 GC 碱基的分布却极不均匀, 在序列前 500bp GC 碱基含量高达 80.8%, 而后 3/4 段则降至 37.1%。Daliparthi 等^[12]报道 PCR 法常难以有效扩增高 GC 含量的 DNA 片段, 分析其原因可能包括此类片段存在复杂的二级结构、碱基比例失调导致错配位点增多等。而低 GC 含量的 DNA 片段也存在相同问题。在该研究中, 虽然 PCR 上下游引物均设计在低 GC 含量的 DNA 片段上, 但加尾与未加尾 PCR 引物分别搭配常规 PCR 体系在较宽的退火温度范围内均未能成功扩增目的片段则再次证明了 PCR 扩增此类 DNA 片段的难度。同时, 在未加尾 PCR 引物组的电泳图中可见多条非特异性扩增条带的存在也从侧面提示在碱基比例严重不均衡的 DNA 序列中易出现较多的引物非特异性结合位点从而影响特异 PCR 产物的有效扩增。所以, 该 PCR 引物系统仅通过引物的优化设计仍难以成功扩增目的片段。

相关研究报道^[13,14], 在 PCR 反应体系中加入一定浓度的 DMSO, 甜菜碱可提高 GC 含量等特殊 DNA 片段的扩增成功率。另有研究显示^[15], 在引物的 5'端加尾也可一定程度促进 PCR 反应的特异性和效率。在该研究中, Hsa-miR-17 基因启动子区 PCR 扩增体系的优化也利用了以上两种设计思路。首先, 终浓度为 3% 和 5% 的 DMSO 被分别加入了使用常规引物的 PCR 扩增体系, 相对未加入 DMSO 的对照组, 产物电泳可见非特异性扩增明显减少, 但仍未见特异性目的条带出现, 表明通过添加此类促解链物质可在一定程度上降低非特异性扩增的出现, 但并未能实现目的片段的有效扩增。其后, 加入了 DMSO 的 PCR 反应体系被用于与 5'加尾引物搭配, 此时产物电泳可见清晰、单一的目的扩增条带, 而未使用 DMSO 的对照组, 即便使用了 5'加尾引物也未扩出目的条带, 但非特异性扩增条带也未见。这表明 5'加尾引物也具有降

低非特异性扩增的功能, 但单独使用 5'加尾引物同样不能实现目的片段的有效扩增。所以该 Hsa-miR-17 基因启动子区 PCR 扩增体系的成功构建依赖于 DMSO 和 5'加尾引物的联合使用。究其原因可能有以下几点: ①DMSO 促进了 DNA 模板解链有利于引物与模板的特异性结合, 同时 DMSO 的促解链效应也可降低引物与非特异性结合位点的结合效率, 从而实现降低非特异性扩增并提高 PCR 扩增效率的实验效应。但过高的 DMSO 浓度也会阻碍引物与模板的有效结合最终导致 PCR 扩增效率的快速降低。②引物 5'端加尾会增加引物的空间位阻, 因引物与非特异性结合位点的结合力本就较弱, 故适当增加的空间位阻并不影响引物与特异性结合位点的结合但却会使引物与非特异性结合位点的结合稳定性进一步降低超过临界点从而减少非特异性扩增的出现并间接提高 PCR 的扩增效率。③DMSO 与 5'加尾引物联合应用时, 以上两种效应可呈现叠加或协同效应从而进一步提高 PCR 扩增的成功率。因此, 在扩增高、低 GC 含量的特殊 DNA 片段时, 利用两种或两种以上的优化策略对保证目的片段的成功扩增常常是必需的, 其中应用 DMSO 联合 5'加尾引物是一种有效的优化策略。

该研究虽成功建立了 Hsa-miR-17 基因上游启动子区 PCR 扩增及鉴定体系, 但其检测下限仅达 10 ng/ μ l, 较前期研究所建立的其他 PCR 扩增体系略低^[16]。另可见使用加尾引物后引物二聚体条带明显增加。提示该 PCR 扩增体系虽然具有特异性好、重复性佳的优点, 但也存在引物二聚体增加和检测下限略高的不足。

综上所述, 该研究利用合理的引物设计以及两种以上的优化策略成功建立了 Hsa-miR-17 基因上游启动子区 PCR 扩增及鉴定体系, 该体系具有特异性高、重复性好等优点, 实用价值良好。

参考文献:

- [1] 许文剑. miRNA 与肿瘤关系的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(17): 3120-3123.
Xu WJ. Research progress of correlation between miRNA and cancer[J]. Medical Recapitulate, 2013, 19(17): 3120-3123.
- [2] 周明玉, 岳双磊, 何文杰, 等. microRNA-214 在恶性肿瘤中的表达及相关性的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(4): 787-790.
Zhou MY, Yue SL, He WJ, et al. The research progress of miRNA-214 expression in malignant tumor and relationship between miRNA-214 and malignant tumor[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17(4): 787-790.

(下转 12 页)

- [3] 邱进,刘辉,热孜宛古丽·伊敏,等. MEF2C 基因启动子区碱基突变对转录活性的影响[J]. 新疆医科大学学报,2017,40(5):606-611,616.
Qiu J, Liu H, Reziwanguli YM, et al. Effect of base mutation in MEF2C promoter region on transcription activity[J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2017,40(5):606-611,616.
- [4] 李璐,梁辉,陈群蓉. 鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化分析[J]. 现代检验医学杂志,2015,30(2):39-41,45.
Li L, Liang H, Chen QR. Methylation of SYK gene promoter region in nasopharyngeal carcinoma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015,30(2):39-41,45.
- [5] 裴静娴,王月刚,张艺军,等. p53RFP 基因启动子荧光素酶报告基因载体的构建及鉴定[J]. 广东医学,2017,38(2):170-172.
Pei JX, Wang YG, Zhang YJ, et al. Construction and identification of luciferase reporter plasmid containing p53RFP gene promoter[J]. Guangdong Medical Journal, 2017,38(2):170-172.
- [6] 李星光,卢圣奎,王帅. microRNA-17 过表达对胶质瘤患者预后的影响[J]. 脑与神经疾病杂志,2016,24(3):168-171.
Li XG, Lu SK, Wang S. Influence of expression level of miR-17 on prognosis of glioma patients[J]. Journal of Brain and Nervous Diseases, 2016,24(3):168-171.
- [7] 周君纯,郑丽,刘家华,等. 以 microRNA-17 为靶点的反义核酸对白血病细胞 K562 的作用[J]. 白血病·淋巴瘤,2013,22(7):428-430,435.
Zhou JC, Zheng L, Liu JH, et al. Effects of antisense oligonucleotides targeting microRNA-17 on human leukemic K562 cells[J]. Journal of Leukemia & Lymphoma, 2013,22(7):428-430,435.
- [8] Dellago H, Bobbili MR, Grillari J. MicroRNA-17-5p: At the crossroads of cancer and aging-a mini-review[J]. Gerontology, 2017,63(1):20-28.
- [9] Liao XH, Xiang Y, Yu CX, et al. STAT3 is required for MiR-17-5p-mediated sensitization to chemotherapy-induced apoptosis in breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2017,8(9):15763-15774.
- [10] Gong J, He L, Ma J, et al. The relationship between miR-17-5p, miR-92a, and let-7b expression with non-small cell lung cancer targeted drug resistance[J]. Journal of the Balkan Union of Oncology, 2017,22(2):454-461.
- [11] 王倩,罗凯. 一种 EGFR 基因突变检测方法的建立及初步应用[J]. 重庆医学,2014,43(11):1351-1353,1356.
Wang Q, Luo K. Establishment of a method for detecting EGFR gene mutations and its preliminary application[J]. Chongqing Medicine, 2014,43(11):1351-1353,1356.
- [12] Pratyush DD, Tiwari S, Kumar A, et al. A new approach to touch down method using betaine as cosolvent for increased specificity and intensity of GC rich gene amplification[J]. Gene, 2012,497(2):269-272.
- [13] Obradovic J, Jurisic V, Tosic M, et al. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-rich EGFR promoter sequence[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2013,27(6):487-493.
- [14] Strien J, Sanft J, Mall G. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences[J]. Mol Biotechnol, 2013,54(3):1048-1054.
- [15] Vandenbussche F, Lefebvre DJ, De Leeuw I, et al. Laboratory validation of two real-time RT-PCR methods with 5'-tailed primers for an enhanced detection of foot-and-mouth disease virus[J]. Journal of Virological Methods, 2017,246:90-94.
- [16] 罗凯,黎谢梦丹,石兴源,等. 人 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 现代检验医学杂志,2017,32(2):26-29.
Luo K, Lixie MD, Shi XY, et al. Establishment and preliminary application of the method for detecting expression of human CDK14 with real-time quantitative PCR[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017,32(2):26-29.