

在 小 鼠 和 食 蟹 猴 中 自 闭 症 相 关 **miR-197** 同 源 序 列 的 鉴 定

完 成 人

杨 丝 雨

指 导 小 组 成 员

郑 煜 芳 副 教 授

目 录

摘要	3
Abstract	4
一、前 言	5
二、材料与方法	8
2.1 实验材料	8
2.1.1 测序用菌株、细胞系和实验动物	8
2.1.2 试剂盒	8
2.2 实验方法	8
2.2.1 RNA 提取	8
2.2.2 RNA 逆转录	9
2.2.3 逆转录产物 cDNA 的 qPCR	9
2.2.4 Western Blot	10
2.2.5 连接与测序	15
三、研究结果	19
3.1 小鼠中 miR-197 的检测和鉴定	20
3.2 食蟹猴中 miR-197 的检测与鉴定以及 MeCP2-自闭症通路其他部分的验证	22
四、讨论	26
参考文献	28
致谢	29

摘要

自闭症或孤独症谱系障碍，是一类发育障碍疾病，包括狭义上的孤独症、天使综合症、Rett 综合征、阿斯伯格综合征等一系列复杂的神经发育障碍。其特征为三种主要的行为异常，包括社会交往障碍，语言和交流能力受损和重复刻板的行为及狭隘的兴趣^[1]。自闭症的发病率较高，并有逐年增长的趋势，给患者家庭和社会带来巨大的疾病负担。双生子研究证明自闭症有明显的遗传倾向。目前，对自闭症的遗传学研究主要集中在基因突变，染色体异常，拷贝数变异（CNV）等遗传变异。而近些年，许多报道指出，非编码 RNA，包括 microRNA、piRNA、lncRNA 等均在发育过程的调控中有着重要的作用。因此，我们希望能够从这样一个新的角度研究孤独症谱系障碍的遗传学病因以提供诊断及治疗孤独症的新思路。

此前实验室工作发现 miR-197 可通过促进神经细胞迁移分化并且可以逆转自闭症相关基因 MeCP2(甲基化 CpG 结合蛋白)突变导致的神经干细胞分化相关表型,我们认为 miR-197 可能是 MeCP2-自闭症相关通路中下游的一个关键因子。因此我们希望在常用的动物模型小鼠和与人较为接近的猴子中对 miR197 的同源序列进行鉴定，以期为后期动物模型实验奠定基础。本课题通过 PCR、qPCR、测序等实验方法对小鼠和食蟹猴中 miR-197 同源序列进行鉴定，并通过 Western Blot 等实验方法，在敲除及过表达 MeCP2 的食蟹猴组织样本中对 miR-197 相关通路的其他环节进行验证。

关键词：自闭症，miR-197，小鼠，食蟹猴

Abstract

Autism or Autism Spectrum Disorder(ASD), is a neurodevelopmental disorder in the category of pervasive developmental disorders. It is characterized by three main defects, including impaired social interaction, language and communication defects and repetitive and stereotype behaviors. The incidence of autism is relatively high and is still increasing rapidly. ASD is a heavy burden both for the patients' family and the whole society. Many studies have showed that ASD is highly genetic. Currently, most of pathogenesis studies about ASD's genetic basics focus on gene mutation, chromosomal abnormalities and copy number variations (CNVs). Recent years, many researches indicate that non-coding RNA, consist of microRNA, piRNA, lncRNA etc, plays a significant role in developing process. Therefore, we set up to explore new possibilities for non-coding RNA in genetic pathogenesis of ASD.

Previous unpublished work of our lab found that miR-197 can promote neuron differentiation and radial migration and through this can rescue the defect caused by MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) mutations (MeCP2 is an autism-related gene). We propose that miR-197 is an important downstream factor in MeCP2-autism pathway. To test our theory, we used tissue samples from mice, the widely used animal model, and monkey, the primate closely related to human.. The homologous sequence of miR-197 was identify in mice and *Macaca Fascicularis* by PCR, RT-qPCR, sequencing and other methods. I also tested other molecules within the MeCP2-miR-197 pathway in the MeCP2 knockout and overexpression *Macaca Fascicularis* models.

Key Words: Autism, miR-197, mice, *Macaca Fascicularis*

一、前言

自闭症或孤独症谱系障碍，是一类发育障碍疾病，包括狭义上的孤独症、天使综合征、Rett 综合征、阿斯伯格综合征、脆性 X 染色体综合征等一系列复杂的神经发育障碍。根据美国精神疾病诊断及统计手册第五版（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-V, DSM-V），其特征为三种主要的行为异常，包括社会交往障碍，语言和交流能力受损和重复刻板的行为及狭隘的兴趣^[1]。患者一般 3 岁前起病，终身受累，给患者家庭和社会带来巨大的疾病负担。流行病学研究对各个地区自闭症的发病率进行了统计，各个研究的统计结果各有差异，而根据 CDC（The Centers for Disease Control and Prevention）在 2012 发布的流行病学研究，孤独症报道的发病率已达到平均 88 个儿童中便有一人患病，54 个男孩中便有一人患病^[2]。而在同一机构在 2014 年公布的数据中，这一数字已经增长至 8 岁儿童中每 68 人中有一人患病，而男孩患病比例甚至高达 1/42^[3]。在中国，由于诊断的落后以及其他各种原因，根据目前的统计，15 岁以下的少年儿童的患病率约为每万人 16.1 个患者。并也在急速增长^[4]。哈佛公共健康学院的统计显示，在美国，一个自闭症患者终身的诊疗等费用可超过 320 万美元，整个社会平均每年在自闭症上的花费超过 350 亿美元^[5]。了解孤独症谱系障碍发病机制和原因可能对该病的预防、早期干预和治疗有重要的启示作用。双生子实验证明自闭症有明显的遗传倾向^[6]。目前，对自闭症的遗传学研究主要集中在基因突变，染色体异常，拷贝数变异（CNV）等遗传变异。而近些年，许多报道指出，非编码 RNA，包括 microRNA、piRNA、lncRNA 等均在发育调控中有着重要的作用。因此，我们希望能够从这样一个新的角度研究孤独症谱系障碍的遗传学病因以提供诊断及治疗孤独症的新思路。

Rett 综合征与自闭症症状十分相似，并属于孤独症谱系障碍大类。实验室此前未发表的工作发现，自闭症患者中带有 MeCP2（Methyl CpG binding protein 2）上的突变。说明 MeCP2 亦可能参与了自闭症的调控。实验室此后的研究发现 MeCP2 可通过上调成熟的 mir-197 从而抑制 ADAM10（A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10）的表达，而 ADAM10 参与了与神经细胞迁移分化相关的经典的 Notch 信号通路，从而 MeCP2 可能作为自闭症的

相关基因。其中，mir-197 作为非编码 RNA 在 MeCP2-自闭症通路中的作用引起我们的格外关注。

MicroRNA 是一类体内广泛存在的非编码小 RNA 分子，长度一般为 19-24nt^[7]，其前体 pri-microRNA 的编码序列多位于基因的内含子上，由于多数 microRNA 参与了基因表达的转录后调控，因此其在动植物的生长发育，癌症等多各方面均有着重要的作用。最经典的 microRNA 调控基因表达的方式是与靶标 mRNA 的 3'-UTR 上的互补序列结合，从而阻碍 mRNA 的翻译，促使其降解^[8]。目前，研究 microRNA 最常用的手段是通过逆转录定量 PCR 来检测组织或细胞中 microRNA 的表达量，并通过其 mimics 或 inhibitor 来检验其功能。

我们的研究中相关的 microRNA 为 mir-197，成熟的 hsa-mir-197 的序列为 uucaccaccuuccaccaccagc (3p)，目前关于 mir-197 的研究主要集中在几种癌症上。研究发现，mir-197 表达量的上调可以抑制子宫肌瘤细胞的增殖^[9]，mir197 还可以影响癌细胞对化疗药物 5-氟尿嘧啶的敏感程度^[8]，还有报道 mir197 可以同其他几种 microRNA 一起，作为多种癌症的生物指标，如 mir197 表达量下降就可能是星形胶质细胞瘤等癌症的检测标准^[7]。

而在小鼠中，mmu-mir-197 在 2014 年从 mirbase 数据库中被撤号，撤号的理由是只有两个克隆证明了其在小鼠中存在，但其序列无法对应任何基因组或已知的转录组序列的茎环结构部分，因此被从 mirbase 中删除^[10]。但我们实验室前期未发表的工作以小鼠为实验材料进行的 mir-197 的功能试验中，该序列有和在人源细胞系中相似的作用，并且我们以人的序列设计引物能够检测到小鼠中该序列的表达。因此我的课题的目的首先就是证明与 hsa-mir197 相似的小 RNA 在小鼠中存在并表达。

此外，我们课题组从中科院仇子龙研究员组获得了 MeCP2 过表达的转基因食蟹猴^[11]和 MeCP2 的 knockout 猴子的组织样本。拟在食蟹猴样本中检测 miR-197 表达。由于数据库中此前并没有食蟹猴的 miR-197 信息，因此需先鉴定 hsa-mir-197 的相似序列。之后可通过 RT-qPCR 对比其在野生型，MECP2 敲除和过表达组织中的表达量。另外，我们还准备检测 MeCP2-miR197 通路上的其他蛋白。若能够在这样一个与人较为近缘的转基因猴模型上验证我们实验室此前在

人类细胞系和小鼠中得到的结论,那么无疑会进一步加强我们此前的结论的说服力,并且有望为自闭症的诊断和治疗开辟新的思路。

二、实验材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 测序用菌株、细胞系和实验动物

本课题中用来测序的感受态细胞为 DH5 α 菌株，购买自康为世纪公司。本课题中使用的 DH5 α 的培养基为液态 LB 培养基，培养条件是 37℃，200 rpm。

用于阳性对照的细胞系为 U251，细胞培养条件：37℃恒温箱，CO₂ 浓度 5%。

本课题中使用的小鼠为野生型 C57BL6 近交系，购买于上海斯莱克实验动物中心和复旦大学江湾动物房，在本实验室自行饲养和繁殖，以生产实验所需孕鼠。交配管理方法如下：于每日 18：00 后将雌雄鼠合笼，次日 9：00 检查雌鼠是否有阴道栓的形成，并计算为 E0.5。

2.1.2 试剂盒

1. QIAGEN 74104 RNeasy Mini Kit
2. Gene Copoeia AOMD-Q020 All-in-one miRNA qRT-PCR Detection Kit
3. TOYOBO FSK100, FSK-101 高效率逆转录试剂盒 First Strand cDNA Synthesis Kit ReverTra Ace – α -
4. TOYOBO QPK-201 SYBR GREEN Realtime PCR Master Mix
5. 碧云天 P0012A SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒
6. 康为世纪 CW06825 2*Ta α MasterMix(Dye)
7. 康为世纪 CW05245 微量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 Gel Extraction Micro Kit
8. Takara 6013 pMDTM 19-T Vector Cloning Kit

2.2 实验方法

2.2.1 RNA 提取（所用试剂盒：QIAGEN RNeasy Mini Kit Category No:74104）

提取前准备:

1. Buffer RW2 中加入 44mL 无水乙醇
2. 用 RNase-free H₂O 配制 70%乙醇
3. 匀浆用的大号钢珠用无水乙醇浸泡 20 分钟以上
4. 在提取前计算出 lysis buffer RLT 的用量, 并在其中加入 1%的 β -巯基乙醇, 例如 1mL RLT 中加入 10 μ L β -巯基乙醇, 现用现配。
5. 将匀浆仪的转子放入-20℃冰箱预冷。

组织中 RNA 的提取:

1. 用 DEPC 水处理过的解剖用具取出组织, 并称量, 所用组织 <20mg 时, 加入 350 μ L lysis buffer RLT, 所用组织>20mg 并<30mg 时, 加入 600 μ L RLT, 本实验一般选择取组织量<20mg, 以方便后续操作。
2. 加入浸泡好的大号钢珠一颗在装有所取组织的 RNase-free 的 2mL 离心管中, 按上述称量结果加入相应量的 RLT。
3. 将离心管尽量平衡放入预冷好的匀浆仪转子中, 60Hz 匀浆 60 秒。
4. 将组织匀浆液转移入一个新的 1.5mL 的 EP 管中, 全速离心 3min, 取上清。
5. 加入等体积的 70%乙醇, 混匀后全部转移入吸附柱, 离心 15 秒, 弃 flow-through。
6. 加入 700 μ L RW1 至吸附柱, 离心 15s, 弃 flow-through。
7. 加入 500 μ L RW2 至吸附柱, 离心 15s, 弃 flow-through。再重复一次。
8. 步骤 7 中洗第二次弃 flow-through 后, 离心 2 分钟, 以让膜干燥。将吸附柱放在一个新的配套的 1.5mL 的离心管中, 加入 30-50 μ L 水至吸附柱膜的正中央, 离心一分钟。
9. 用 nanodrop 或分光光度仪测定所得 RNA 的浓度及吸光度。

2.2.2 RNA 的逆转录

(一)、microRNA 的逆转录(所用试剂盒：Gene Copoeia All-in-one miRNA qRT-PCR Detection Kit)

试剂盒逆转录及 QPCR 原理：

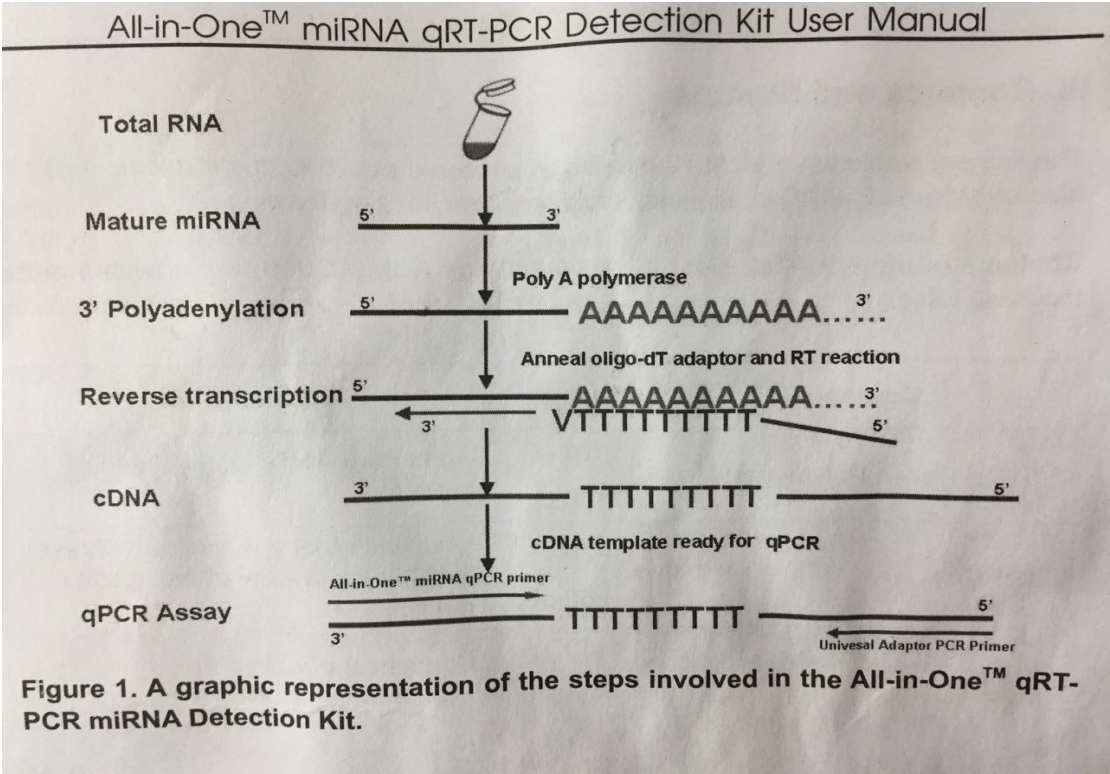


图 1. Gene Copoeia All-in-one miRNA qRT-PCR Detection Kit miRNA 逆转录及 qPCR 原理

1. 逆转录体系配制：

2.5U/μL Poly A Polymerase	1μL
RTase Mix	1μL
5× PAP/RT Buffer	5μL
Total RNA	2μg
RNase-free H ₂ O	to 20μL

2. 逆转录程序

37℃	60min
-----	-------

85℃灭活	5min
4℃	forever

(二) mRNA 的逆转录（所用试剂盒：高效率逆转录试剂盒 First Strand cDNA Synthesis Kit ReverTra Ace – α - TOYOBO FSK100, FSK-101）

1. RNA 的热变性，按以下配制，65℃，5min 后，立即置于冰上。

RNase Free H ₂ O	(11-X) μL
Primer Oligo(dT) ₂₀	1 μL
Total RNA	1 μg 以下

2. 逆转录体系配制（共 20 μL）

RNA+Primer 溶液	12 μL
5*RT Buffer	4 μL
dNTP Mixture(各 10 μM)	2 μL
RNase Inhibitor(10 U/μL)	1 μL
ReverTra Ace	1 μL

3. 逆转录程序

42℃	20min
99℃	5min
4℃	5min

2.2.3 逆转录产物 cDNA 的 qPCR

(一) microRNA 逆转录产物的 qPCR(所用试剂盒：Gene Copoeia All-in-one miRNA qRT-PCR Detection Kit)

1. qPCR 体系配制

2*All-in-One™ qPCR Mix	10 μL
------------------------	-------

All-in-one miR197/U6 primer (2 μ M)	2 μ L
Universal Adaptor PCR Primer(50 μ M diluted to 2 μ M)	2 μ L
ddH ₂ O	4 μ L
Template cDNA	2 μ L

2. qPCR 程序

预变性 95℃	10min	
变性 95℃	10sec	} 40 cycle
退火 60℃	20sec	
延伸 72℃	45sec	

(二) mRNA 逆转录产物的 qPCR (所用试剂盒: SYBR GREEN Realtime PCR Master Mix TOYOBO QPK-201)

1. qPCR 体系

SYBR GREEN Realtime PCR Master Mix	10 μ L
ddH ₂ O	6.4 μ L
MeCP2/ β -actin Forward Primer	0.8 μ L
MeCP2/ β -actin Reverse Primer	0.8 μ L
Template cDNA(1:3 diluted)	2 μ L

2. qPCR 程序

预变性 95℃	2min	
变性 95℃	20sec	} 40 cycle
退火 58℃	20sec	
延伸 72℃	45sec	

2.2.4 Western Blot

相关试剂的配制：SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳（所用试剂盒：碧云天 P0012A SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒）

A. 分离胶（下层胶）10% SDS-PAGE 胶

10%分离胶配方（每块胶约需要 5mL）

成分	配制不同体积SDS-PAGE分离胶所需各成分的体积(毫升)					
10%胶	5	10	15	20	30	50
蒸馏水	1.3	2.7	4.0	5.3	8.0	13.3
30%Acr-Bis(29:1)	1.7	3.3	5.0	6.7	10.0	16.7
1M Tris, pH8.8	1.9	3.8	5.7	7.6	11.4	19.0
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.012	0.02

图 2. 碧云天 P0012A SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 说明书截图

B. 浓缩胶（上层胶）5% SDS-PAGE 胶

5%浓缩胶配方（每块胶约需要 1.5mL）

2. 按照如下表格配制SDS-PAGE的浓缩胶(也称堆积胶、积层胶或上层胶)：

成分	配制不同体积SDS-PAGE浓缩胶所需各成分的体积(毫升)					
5%胶	2	3	4	6	8	10
蒸馏水	1.4	2.1	2.7	4.1	5.5	6.8
30%Acr-Bis(29:1)	0.33	0.5	0.67	1.0	1.3	1.7
1M Tris, pH6.8	0.25	0.38	0.5	0.75	1.0	1.25
10%SDS	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.1
10%过硫酸铵	0.02	0.03	0.04	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.002	0.003	0.004	0.006	0.008	0.01

图 3.碧云天 P0012A SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 说明书截图

配好的胶可直接用于蛋白电泳或放入塑封袋，加入少量 ddH₂O,4℃ 保存不超过一周。

1*TBST：10*TBST 用超纯水稀释至 1*，1L 中加入 1mL Tween-20,摇匀，现配现用。

10*TBST：每 500mL10*TBST 配制需：NaCl:40g Tris:12.1g 用浓盐酸调节 pH 值至 7.4。

Western Blot 操作步骤：

1. 配置 RIPA-强全裂解液，配方如下：10mL RIPA（强）+ 1 片蛋白酶抑制剂，4℃ 保存
2. 取 10-30mg 组织，加入适宜量的 RIPA（强）裂解液，如 20mg 组织约加入 200μL 左右 RIPA（强）。
3. 在冰上裂解，冰浴 30min。
4. 将混合液 4℃，12000g 离心 30min 后，小心吸取上清。

5. 用 nanodrop2000 或 BSA 测定蛋白浓度,并计算上样量,每孔蛋白量约 50 μ g。
6. 取适量的上清与 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液混合均匀至 1 $\times$, 95 $^{\circ}$ C 高温变性 5min。之后可置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。
7. 离心冷却后,上样,每孔上样量应尽量保持一致,若此前所测蛋白浓度差距较大,可先用 RIPA (强)+SDS-PAGE 上样缓冲液稀释。所用 10 孔梳子每孔最大上样量为 25 μ L。进行 SDS-PAGE 电泳,80V 30min 浓缩胶,120V 分离胶跑至前沿溴酚蓝跑出胶下沿为止。
8. 跑完 SDS-PAGE 电泳后,将凝胶从胶板中取出,丢弃去上层胶后放入盛有 1 $\times$ 转膜液的浅盘中备用。
9. 在电泳结束前 30min 左右,裁剪适当大小的 PVDF 膜(以稍大于下层胶为宜),在甲醇中浸泡并轻轻晃动 10s 后,浸泡于转膜液中 30min。
10. 将三明治转膜夹子置于上述浅盘内,使黑色负极夹板在下,从下往上,依次摆放浸透转膜液的海绵 1 层,滤纸 3 层,凝胶, PVDF 膜,滤纸 3 层,海绵 1 层。叠放 PVDF 膜之后每叠放一层使用试管小心地挤压匀,赶出气泡。将其夹好后,放入转膜槽中,使得黑色负极夹板对应槽黑色面,正极白色夹板对应槽红色面。
11. 在转膜槽中放入生物冰,并倒转膜液至满,盖上盖子,冰浴,以 200mA 的恒流进行转膜 70-120min。(根据需标蛋白分子量决定转膜时间)
12. 完成转膜后,将 PVDF 膜小心取出,与 PAGE 胶相接触的一面为正面。根据蛋白 marker 将膜剪开,使每条膜上只有一种目的蛋白或内参蛋白。
13. 配置封闭液:封闭液为 5%脱脂奶粉,即每 5g 脱脂奶粉用 100mL 1 $\times$ TBST 溶解。将 PVDF 膜放置于封闭液中,室温低速摇床上封闭 2h。
14. 用 TBST 润洗 2 次。
15. 一抗标记:用 TBST 配制一抗溶液,浓度为 MeCP2: 1:1000, GFAP: 1:2000, ADAM10: 1:2500, MAP2: 1:2000, GAPDH: 1:5000。小心的将膜放入塑封袋中,并加入 2-3mL 一抗溶液,去除气泡后封口,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱摇床上,慢速孵育过夜。
16. 将 PVDF 膜从塑封袋中取出,并用 TBST 洗 3 次,每次 15min。

17. 二抗标记：用 TBST 配制二抗溶液，浓度 1: 5000，同样放置于塑封袋中进行标记，室温下在摇床上摇 1h。
18. TBST 润洗 3 次，每次各 15min。
19. 显影，用 Thermo #34080 SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate 两瓶 1:1 混匀，每条膜约需 0.5-1mL 显色液，仪器序列曝光。

2.2.5 连接与测序

(一)、测序目的片段的逆转录及 PCR

1. RNA 提取及逆转录同本文上述实验方法一、二，不再赘述。
2. cDNA 的 Taq 酶 PCR（所用试剂盒：康为世纪 CW06825 2*Taq MasterMix(Dye)）

1) PCR 反应体系(20 μ L 反应体系)

2*Taq MasterMix(Dye)	10 μ L
Forward Primer(miR-197 primer)(2 μ M)	4 μ L
Reverse Primer (Uni Primer) (50 μ M 稀释至 2 μ M)	4 μ L
Template DNA(<0.5 μ g 逆转录产物 1:5 稀释)	2 μ L

2) PCR 反应程序

预变性	94℃	2min	
变性	94℃	30s	} 30 cycle
退火	60℃	30s	
延伸	72℃	30s	
终延伸	72℃	2min	
冷却	4℃	forever	

所得产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳。

(二)、PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳与目的片段的割胶纯化

1. 琼脂糖凝胶电泳

1) 琼脂糖凝胶配制

电泳使用 1.5% 琼脂糖凝胶 配方为：3g 琼脂糖 加入 200mL 1*TAE

buffer, 微波融化 2-3min, 稍稍冷却后, 倒入胶板, 加入约 100 μ L EB, 晃匀, 插入梳子, 等待凝胶。

2) 上样

将配制好的琼脂糖凝胶放入电泳槽, 倒入足量的 1*TAE 电泳缓冲液, 浸没凝胶, 每孔上样 10 μ L, 两侧孔加入 20bp DNA Ladder (Dye Plus) TaKaRa 3420A, 此 marker 的 Agarose 电泳图像示意图如下:

20bp DNA Ladder (Dye Plus) Agarose 电泳图像示意图

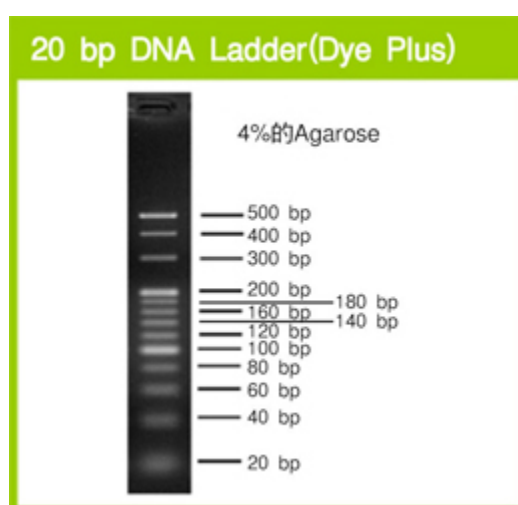


图 4. 20bp DNA Ladder 琼脂糖电泳示意图

3) 电泳

100-150V 电泳约 40min, 拍照打印结果

2. DNA 琼脂糖凝胶回收 (所用试剂盒: 微量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 Gel Extraction Micro Kit 康为世纪 CW05245)

- 1) 在紫外灯下将目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下, 尽量切除多余部分, 放入离心管中, 称量凝胶重量。
- 2) 向切下的凝胶中加入 1-3 倍体积 Buffer PG, 凝胶密度按 1 处理。
- 3) 50 $^{\circ}$ C 金属浴, 经常小心颠倒离心管, 直至凝胶溶解。
- 4) 溶解后稍许冷却, 将其加入吸附柱。

- 5) 当回收片段较小 (<300 bp) (本实验回收片段约为 70bp), 因此适用, 加入胶体积一半的异丙醇, 颠倒混匀。
- 6) 柱平衡: 向吸附柱中加入 200 μ L Buffer PS, 最大转速离心 1 分钟, 弃 flow-through。
- 7) 将溶胶溶液加入到吸附柱中, 室温放置 2 分钟, 最大转速离心 1 分钟, 弃 flow-through。
- 8) 吸附柱加入 450 μ L Buffer PW (加过无水乙醇), 最大转速离心 1 分钟, 弃 flow-through。
- 9) 用 450 μ L Buffer PW 再洗一次, 弃净 flow-through。
- 10) 最大转速离心 1 分钟, 将吸附柱取出放置一段时间, 以晾干残留的乙醇。
- 11) 将吸附柱放到一个新的干净的 1.5ml EP 管中, 向吸附柱的滤膜中间悬空滴加 30-50 μ L ddH₂O, 室温放置 2min。最大转速离心 1 分钟。可直接使用也可保存在-20℃。

(三) 连接与转化 (所用试剂盒: Takara pMD™ 19-T Vector Cloning Kit)

1. 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液, 总量为 5 μ L。

试剂	使用量
pMD19-T Vector	1 μ L
Insert(control/上述回收所得目的片段/阴性对照)	1 μ L
ddH ₂ O	3 μ L

2. 加入 5 μ L (等量) 的 Solution I。
3. 16℃反应 30min。或 4℃连接过夜。
4. 总量加入至 100 μ L DH5 α 感受态细胞中, 冰浴 30min。
5. 42℃加热 45s 后, 冰浴 1min。

-
6. 加入 890 μ L LB 培养基，37℃振荡培养 60min。
 7. 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB-琼脂平板培养基上 37℃培养过夜，形成单菌落。
 8. 挑选白色菌落，加入装有 5mL 含氨苄的 LB 液体培养基中，37℃振荡培养过夜，取菌液送公司测序。

三、研究结果

3.1 小鼠中 miR-197 的检测与鉴定

3.1.1 小鼠中 miR-197 的时空表达谱（qRT-PCR 结果）

由于小鼠中的 miR-197 被撤号，我们用人的 miR-197 在小鼠基因组中进行比对，比对结果发现小鼠基因组中并没有与人 miR-197 完全相同或相似度很高的序列（评分大于 40），图 5。

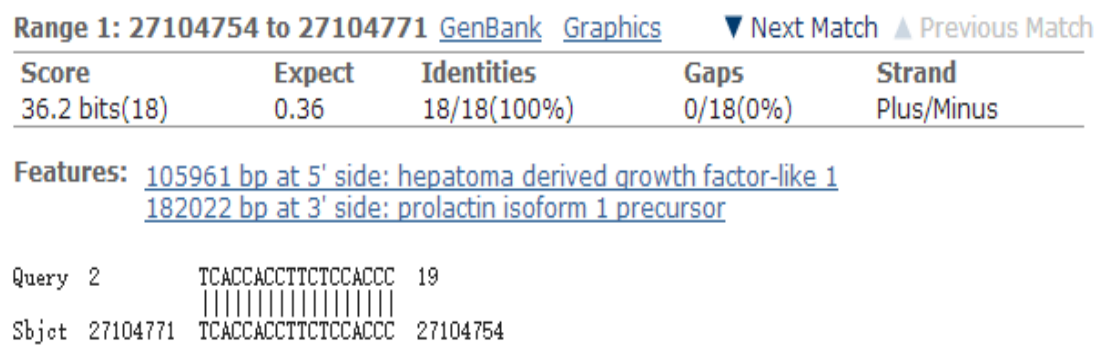


图 5.人成熟 miR-197 序列全长与小鼠基因组比对结果

虽然没有完全相似的 miR-197，但是当我们取 Embryonic Day 16.5（E16.5）胚胎 6 只的大脑组织，分别提取总 RNA、逆转录、用购自的引物，进行 RT-qPCR。miR-197 为目标 RNA，RNU6（小核 RNA）为内参 RNA，计算出 E16.5 大脑中 miR-197 的相对表达量，图 6。我们可看出，虽然各胚胎的表达量存在一定的个体差异，但在胚胎期 16.5 天的小鼠大脑中，以人的 miR-197 设计的引物可扩增出稳定并且较为丰富表达的小 RNA 序列，说明小鼠中虽然 miR-197 被撤号，但仍存在与人 miR-197 序列相似的小 RNA 序列。

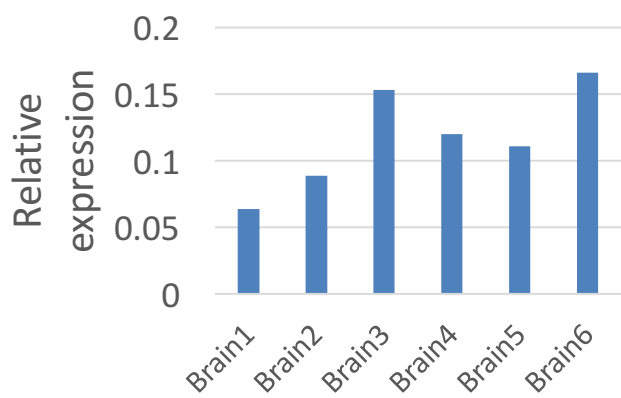


图 6. 小鼠 E16.5 胚胎大脑中 miR-197 的相对表达量

之后，我们分别取 Postnatal Day 2(P2)、Postnatal Day 6(P6)各两只乳鼠的大脑、小脑、肝脏、心脏组织(其中 P2 心脏组织未获取)，处理方法同上，并计算出不同时期不同组织 miR-197 相对于 U6 的相对表达量 (Relative Expression)，图 7。我们可看出，P6 时期较 P2 时期各组织中 U6 的表达量都较高，P6 中，大脑中表达量最高，小脑其次，符合我们人体内 has-miR-197 的表达模式^[12]。但 P2 中肝脏中表达量较高，可能 miR-197 在该时期有着其他更主要的功能，例如前言中提到的癌症相关的细胞分化增殖等方面的功能。

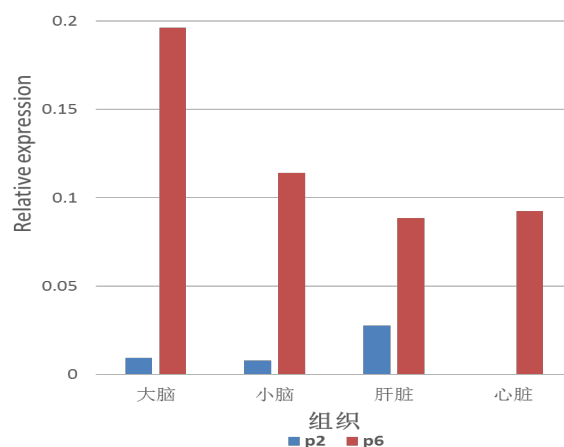


图 7. 小鼠中 miR-197 的 P2、P6 的时空表达谱 (qRT-PCR 结果, n=2)

3.1.2 确认 miR-197 逆转录 PCR 产物的长度和正确性。

我们取上述 E16.5 胚胎大脑 Brain1、Brain2 的 miR-197 逆转录所得 cDNA 进行 Taq 酶 PCR，所得条带为约 70bp 的单一产物，与所用试剂盒说明书中一致。这进一步证实了，小鼠中有着与 hsa-mir-197 相似序列的小 RNA 表达。

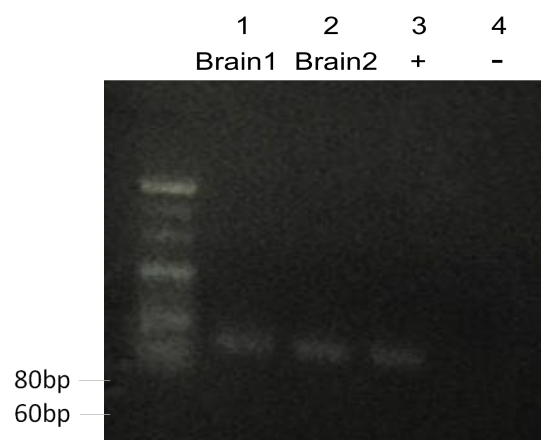


图 8. miR-197 的 Taq 酶 PCR 产物电泳图，正对照采用人 U251 细胞用同样步骤进行 PCR。

负对照为 cDNA 换为 ddH₂O。

3.1.3 miR-197 的测序结果

因此，为掌握小鼠中与 hsa-mir-197 相似序列的序列信息，我对 miR-197 的 PCR 产物进行了测序，共测了 5 个单克隆，分别来自于三个 Taq 酶 PCR 产物连接 T 载体转化培养所得，其中三个为阳性克隆，测序结果以及与 hsa-miR-197 比对结果如下：

Sequencing Result(5'→3')

Mouse: UACCUUCUCCACCCAGC 17nt

Hsa-mir197 3p: UUCACCACCUUCUCCACCCAGC 22nt

可看出，该 RNA 的 3'端序列与 Hsa-mir-197 非常相似或完全相同（无法排除引物与模板在中间有一个碱基的错配等情况）。而 RNA 的 5'端序列则可能与 hsa-mir-197 区别较大，因此无法扩增出来，也有可能是引物序列未覆盖该段，但我们无法向公司要到我们所用的引物信息，因此只能推测。我们再次用测出的 17nt 的序列与小鼠的全基因组序列进行比对，得到了两个完全吻合的 Blast 结果，图 9。此后，希望通过这两个 Hit 能够通过其他实验方法，找齐 5'端的序列，并确认 3'端序列的测序结果。

Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 5, GRCm38.p3 C57BL/6J

Sequence ID: [ref|NC_000071.6|](#) Length: 151834684 Number of Matches: 270

Range 1: 87639744 to 87639760 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
34.2 bits(17)	0.29	17/17(100%)	0/17(0%)	Plus/Plus

Features: [49524 bp at 5' side: estrogen sulfotransferase, testis isoform](#)
[27487 bp at 3' side: alpha-S1-casein isoform a precursor](#)

```
Query 1      GCTGGGTGGAGAAGGTA 17
             |||||
Sbjct 87639744 GCTGGGTGGAGAAGGTA 87639760
```

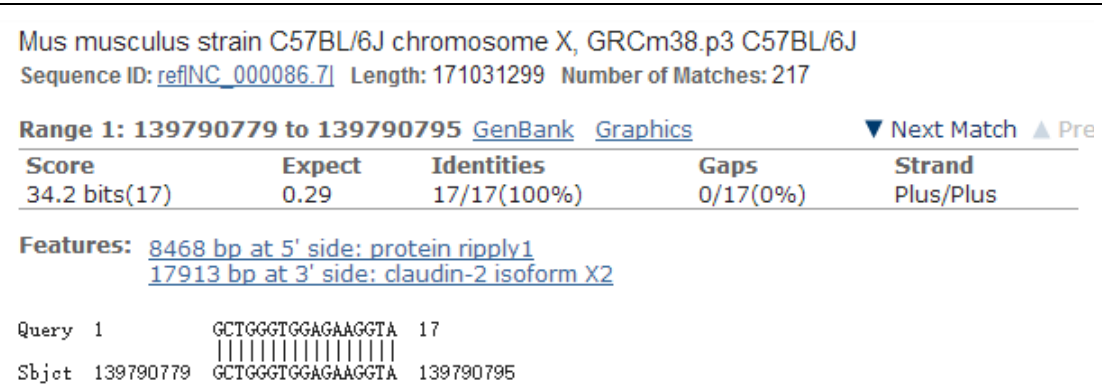


图 9. 测序结果序列与小鼠基因组序列比对

3.2 食蟹猴自闭症模型中 miR-197 的检测以及 MeCP2-自闭症通路其他环节的验证。

3.2.1 性别鉴定

由于 MeCP2 在 X 染色体上，因此雌猴和雄猴携带的 MeCP2 拷贝数本来不同，可能会影响到 Western Blot 及 RT-qPCR 检测 MeCP2 表达时的实验结果。因此做了性别鉴定，提取 DNA，PCR 扩增 SRY 片段，为了确保性别鉴定结果的准确性，我们在 SRY 基因不同区段设计了两对引物，引物信息如下：

Y1-Forward Primer TCAGTGTGAAGCAGGAGAAAA

Y1-Reverse Primer CTGCAACTGTTTTGCAGCAT

Y2-Forward Primer GCTCTCCGGAGAAGCTCTTC

Y2-Reverse Primer TTTGTCGAGTGGCTGTAGCG

引物对 Y1 扩增产物大小为 297bp，引物对 Y2 扩增产物大小为 524bp。

性别鉴定的结果为除已知的 T007 和鉴定出的 D02 为雄性，其余均为雌性，图 10，图 11。

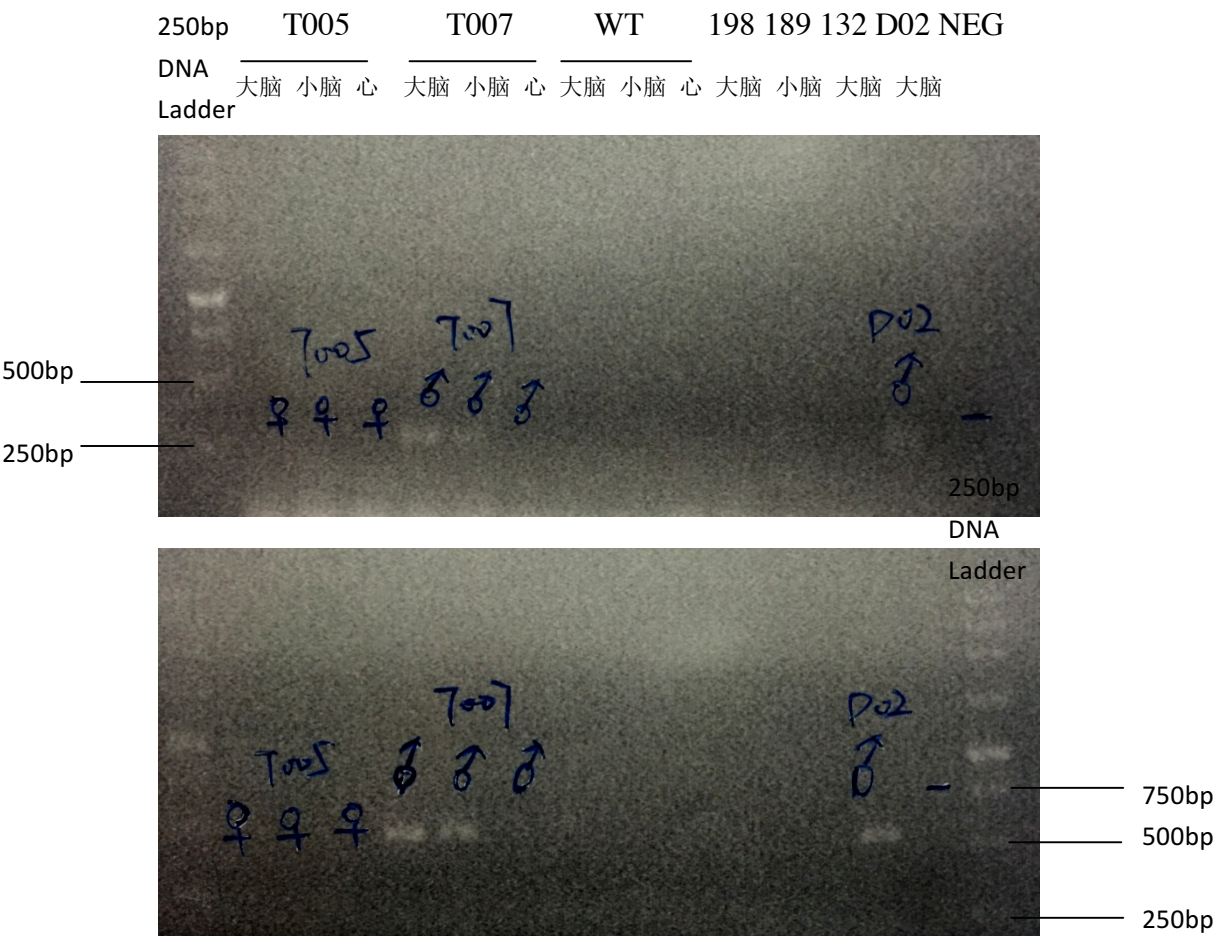


图 10. SRY 基因的 PCR 性别鉴定扩增产物电泳图，其中 T005 为已知的雌猴，T007 为已知的雄猴，T007 心脏样本质量较差，因此无扩增条带。除雄性对照外，只有 D02 有条带，且两对引物鉴定性别结果一致，因此鉴定的样本中，D02 为雄猴，其余为雌猴。

Transgenic	T005	MECP2 transgenic monkey	1 year Female
	T007	MECP2 transgenic monkey	3 years Male
	198-1	aborted newborn MECP2 transgenic monkey	Female
Wildtype	132-1	aborted newborn wild-type monkey	Female
	D02-3	aborted newborn wild-type monkey	Male
	Wildtype		Female
Knockout	D189-3	aborted newborn MECP2 knockout monkey	Female

图 11：各食蟹猴样本的性别鉴定

3.2.2 Western Blot 检测食蟹猴模型中 MeCP2 的表达

我们拿到的猴子样本见上页性别鉴定表格，分为 MeCP2 Transgenic, MeCP2 Knockout, 和 WT 三类。为了确认 MeCP2 的过表达和敲除的情况，通过 Western Blot 检测 MeCP2 表达量。检测结果见图 10，其中除 198 外，MeCP2 过表达的食蟹猴样本中，MeCP2 表达量较高，而在 MeCP2 敲除的食蟹猴样本中，MeCP2 表达量很低，虽未完全敲除，但基本符合样本信息，但 Western Blot 结果不够稳定，需再进行重复实验。

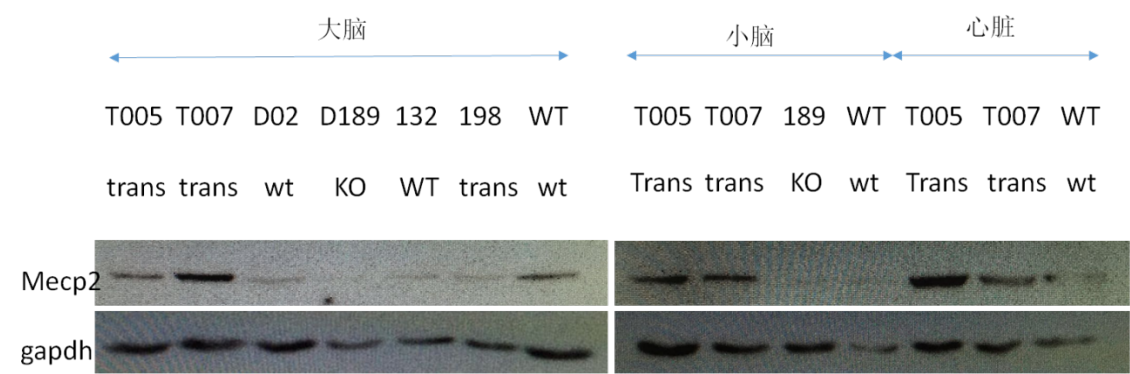


图 10. 各样本大脑、小脑、心脏的 Western Blot，GAPDH 及 MeCP2 的一抗均购自 Abcam，GAPDH 一抗工作浓度为 1:5000，是鼠源抗体，标出的 GAPDH 亚基为 36kDa。MeCP2 一抗工作浓度为 1:1000，是兔源抗体，标出的蛋白大小约为 70-80kDa。

3.2.3 mRNA 的 RT-qPCR 检测食蟹猴模型中 MeCP2 的表达

由于 Western Blot 检测的结果不太稳定，因此希望进行 MeCP2 的 RT-qPCR 从 mRNA 水平来进一步检测 MeCP2 的表达情况，但由于样本保存时间较长，RNA 降解提取质量较差，只有部分样本得到了 RNA，在检测的样本中，除 T005 大脑外，其他基本符合我们的预期，图 12。扩增所用的引物信息如下，内参使用管家基因 β -Actin。

ACTB Forward Primer: GCTCGCCATGGATGATGATA
ACTB Reverse Primer: ACATGATCTGGGTCATCTTCTCG
MeCP2 Forward Primer: CGGAGACATCAGAAGGGTCG
MeCP2 Reverse Primer: GGCTTTTCCCTGGGGATTGAT

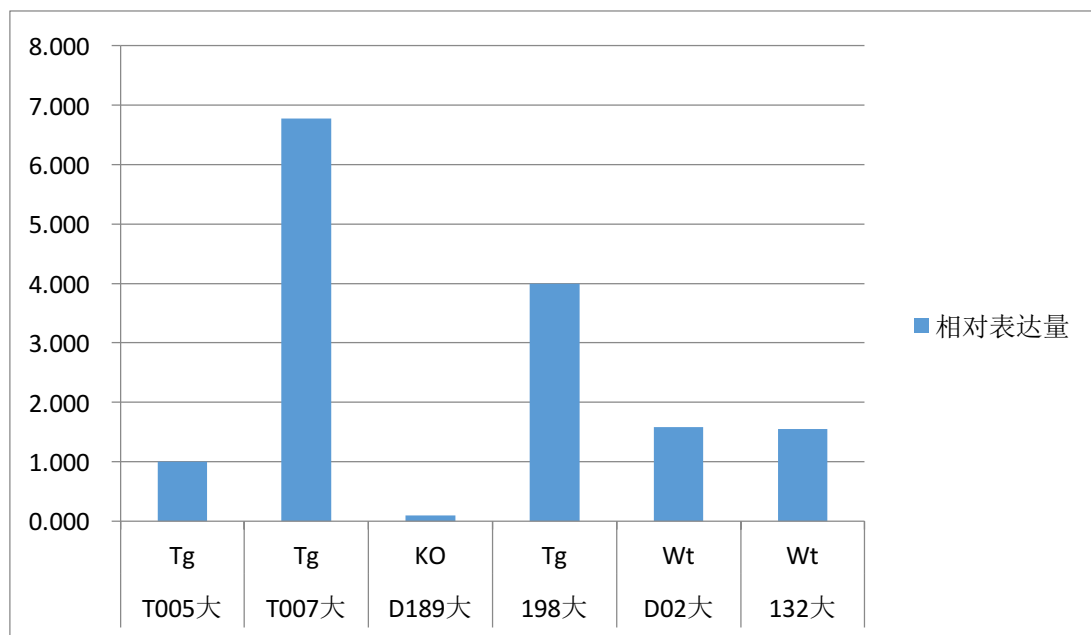


图 12: RT-qPCR 检测 MeCP2 相对表达量。以 β -actin 为内参，计算 MeCP2 的相对表达量，并使第一个 T005 大脑中 MeCP2 的相对表达量为 1。其余与第一个进行对比。

3.2.4 miRNA 的 RT-qPCR 检测食蟹猴模型中 miR-197 的表达

在对 MeCP2 过表达、野生型、敲除的食蟹猴样本的 MeCP2 表达量进行验证后，下一步显然是用此前在小鼠中使用的相同方法对猴子中是否存在以及表达多少 miR-197。qPCR 结果显示与 hsa-miR-197 序列相似的小 RNA 在食蟹猴中存在，但表达量的比较由于未来得及做重复实验不太可靠，图 13。

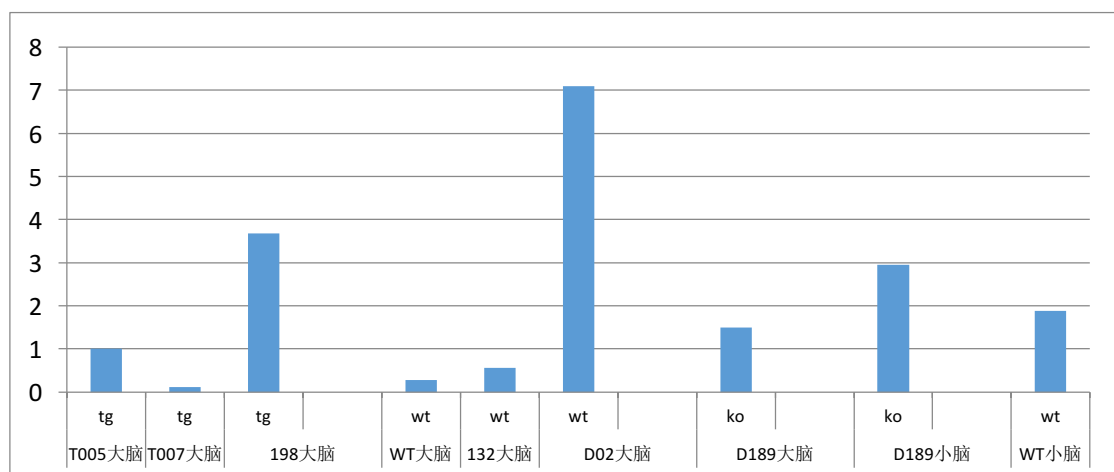


图 13. miRNA 的 RT-qPCR 检测食蟹猴模型中 miR-197 的表达。以 U6 为内参，计算 miR-197 的相对表达量，并使第一个 T005 大脑中 miR-197 的相对表达量为 1。其余与第一个进行对比。

四、讨 论

在本课题的第一部分，在小鼠中，我们证明了有与 hsa-miR-197 相似序列的非编码小 RNA 的存在，并通过 RT-qPCR 检测了其在 P2、P6、E16.5 等时期不同组织中的时空表达谱。另外，我们对此序列进行了 T 载体测序，得到其不完整的部分序列为 UACCUUCUCCACCAGC，并依据此序列进行比对，为确定小鼠中 miR-197 相似的小 RNA 的完整准确序列奠定了基础。

在本课题的第二部分，在食蟹猴中，我们获得了 MeCP2 过表达、MeCP2 敲除和野生型的食蟹猴组织样本。首先，样本信息中缺乏各样本的性别，由于 MeCP2 基因在 X 染色体上，其表达与样本性别直接相关，因此我们对这些样本进行了性别鉴定。然后，我们通过 Western Blot 在蛋白水平上、RT-qPCR 在转录水平上检测 MeCP2 过表达、敲除的效果，确认了各样本的基因型，并且尝试标出 GFAP、MAP2、ADAM10 等蛋白（结果图未展示），但结果十分不稳定，因此还需更多重复实验。此后，我们对食蟹猴中 miR-197 的存在情况和表达情况进行了检测，根据 RT-qPCR 结果，应可以认为食蟹猴中存在 miR-197 的相似序列，但由于时间有限，RT-qPCR 结果未经重复，并且由于体内 microRNA 含量远低于 mRNA，且我们的样本又多为流产胎猴，RNA 降解严重，microRNA 的含量更是极低，因此该 miR-197 的 RT-qPCR 结果与我们 MeCP2 可促进 miR-197 表达的预测不符可能是有以上原因引起的，并不能作为 miR-197 的实际表达情况。

本课题在完成过程中遇到了许多问题，包括实验结果不够稳定，也有许多遗留未解决的问题，将来，希望能从以下方面对本课题继续探究。

1. 测定小鼠中与 miR-197 相似的小 RNA 的完整序列，可通过比对结果在测出序列的 5'端上游设计引物进行扩增并测序来寻找不完整序列的剩余部分以及确定 3'端测序结果与人相同的部分的序列是否准确。
2. 得到 miR-197 的完整准确序列后，可考虑通过 miRNA inhibitor 或 mimics 重复此前实验，并可构建 miR-197 敲除或过表达的转基因小鼠模型，从表型上验证结论。
3. 重复食蟹猴中的 Western Blot 及 miR-197 的 RT-qPCR 实验，验证 MeCP2-自闭症通路的其他环节，并确定 miR-197 的表达情况。
4. 对食蟹猴中的 miR-197 进行测序，确定其序列。

通过以上实验对 miR-197 的信息进行完善并确定其在 MeCP2-自闭症通路中的作用，应对自闭症的诊疗有着一定意义。

参 考 文 献

- [1] American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders(DSM-5®)(2013) American Psychiatric Pub
- [2] Thomas Insel, Autism Prevalence: More Affected or More Detected?
- [3] Baio J. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 Years-autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2010. In: Mmwr Surveill Summ, Center for Disease Control and Prevention, 2014. 1–21, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6302a1.htm>
- [4] Wong, V.C.N. and S.L.H. Hui, Epidemiological Study of Autism Spectrum Disorder in China. Journal of Child Neurology, 2007. 23(1): p. 67-72.
- [5] Harvard School of Public Health (HSPH). Autism has high costs to U.S. society. HSPH, 2006, <http://archive.sph.harvard.edu/pressreleases/2006-releases/press04252006.html>
- [6] GENETICS OF AUTISM: COMPLEX AETIOLOGY FOR A HETEROGENEOUS DISORDER.
- [7] Yang, C., et al., Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas. Int J Cancer, 2013. 132(1): p. 116-27.
- [8] Sun, Z., et al., MicroRNA-197 influences 5-fluorouracil resistance via thymidylate synthase in colorectal cancer. Clinical and Translational Oncology, 2015. 17(11): p. 876-883.
- [9] Ling, J., et al., Upregulation of miR-197 inhibits cell proliferation by directly targeting IGFBP5 in human uterine leiomyoma cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 2015. 51(8): p. 835-842.
- [10] <http://www.mirbase.org/>
- [11] Liu, Z., et al., Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. 2016. advance online publication.
- [12] http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/php/mirna_entry.php?acc=MI0000239

致 谢

在“长亭外，古道边”的歌声中，在本科即将毕业之际，回忆起进入郑煜芳老师的课题组已两年有余，这是在我大学四年生活学习中非常重要的一段学习经历。在这两年多中，我学到的不仅仅是实验技能、科研思路，也有对待学术的态度，提问和思考的能力。

在写完自己毕业论文最后一段后，我感慨颇多，在自己的一个个结果背后，甚至是在自己的一句句文字中，都有着老师的指导、师兄师姐的帮助以及同学们、师妹们以及父母的支持，我仿佛可以在字里行间看到郑煜芳老师在指导我应怎样思考自己的课题，在鼓励我该如何提出科学问题，在我实验失败的时候帮我做 trouble-shooting，可以看到王雨萌师姐在手把手地交我做实验，甚至在我实验做到太晚的时候帮我做剩下的让我早点回寝室，还有和我一届的同学申忆帆，虽然我们经常吵吵闹闹，但每次需要她帮忙的时候，她从不推辞。另外马安云师兄、景迎春师姐、高小雅师姐、已毕业的李增民师兄、张子尧师姐，以及张欣蕊师妹和钟珮瑜师妹在我实验和生活上都给了我很多支持和帮助。感谢的话很难说尽，但是致谢的篇幅有限，将尽未尽的谢意我会通过认真地对待以后的试验和生活来回报所有帮助我的人。