

# 人微小 RNA-302s 表达载体的构建及其对细胞周期的影响

葛秋燕<sup>1,2</sup> 丁利军<sup>2</sup> 颜桂军<sup>2</sup> 刁振宇<sup>2</sup> 孙海翔<sup>1,2</sup> 胡娅莉<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学鼓楼临床医学院, 南京 210029; <sup>2</sup>南京大学医学院附属鼓楼医院生殖医学中心, 南京 210008)

**摘要** PCR 扩增人 miR-302s 的启动子区和编码区, 亚克隆至 pEGFP-C1 载体, 构建 miR-302s 重组表达载体 pEGFP-C1-miR-302s。经过测序鉴定该载体含有核心启动子区(TATA)和 miR-302s (miR-302a、miR-302a<sup>#</sup>、miR-302b、miR-302b<sup>#</sup>、miR-302c、miR-302c<sup>#</sup>、miR-302d、miR-367 和 miR-367<sup>#</sup> 簇)的编码子。荧光素酶报告基因实验结果显示 pEGFP-C1-miR-302s 转染 HEK293 细胞后抑制细胞周期相关基因 cyclin D1 和 PCAF 3'UTR 的活性, 提示 cyclin D1 和 PCAF 是 miR-302s 的靶基因。pEGFP-C1-miR-302s 转染 HEK293 细胞后, Real-time Q-PCR 检测发现 miR-302s 高表达, Western blot 分析发现 cyclin D1 和 PCAF 的表达降低, 流式细胞术分析进一步表明细胞转染后细胞周期 G<sub>1</sub> 期缩短, S 期延长, 表明 miR-302s 对细胞周期 G<sub>1</sub>-S 期转换具有重要调节作用。

**关键词** miR-302s; PCAF; cyclin D1; 细胞周期

MicroRNAs (miRNAs) 是一类长约 22nt 的非编码的单链小 RNA 分子, 广泛存在于动植物细胞内, 通过碱基配对原则与靶 mRNA 的 3'UTR 区结合, 诱发转录后抑制与降解, 从而调控靶基因的表达<sup>[1]</sup>。人类编码 miRNAs 的基因约占基因组的 1%~3%, 每个 miRNA 的潜在靶 mRNA 数为 100~200 个, 据推测约 30% 的人类基因受到 miRNA 的调控<sup>[2]</sup>。其中, 人 miR-302 簇的编码区位于第四号染色体, 含有九个不同的 miRNAs: miR-302a、miR-302a<sup>#</sup>、miR-302b、miR-302b<sup>#</sup>、miR-302c、miR-302c<sup>#</sup>、miR-302d、miR-367 和 miR-367<sup>#</sup>, 以多顺反子的形式转录<sup>[3]</sup>。MiR-302s 在人和小鼠胚胎干细胞(embryostem cell, ES)中特异表达而不在其它体细胞内表达<sup>[4-6]</sup>, 其表达受到 Oct3/4、Nanog、Sox2 和 Rex1 等干性基因的调控<sup>[6]</sup>, 同时参与调控多个细胞周期基因(cyclin D1 等), 维持胚胎干细胞的全能性和自我更新<sup>[6]</sup>。通过 MiRbase 软件扫描 miR-302s 基因组范围的靶基因发现, miR-302s 的靶基因中很多与细胞周期调控相关, 包括 cyclin D1、cyclin D2、PCAF、MYST3、CDK2、MECP2、MECP1-p66 和 CPEB2。另外, miR-302s 参与胚胎早期发育三胚层特化, 暗示其与胚胎发育密切相关<sup>[7]</sup>。但是, 目前对于人 miR-302s 的功能研究较少, 对于其调控的靶基因及其对细胞周期的影响缺乏了解, 本研究通过克隆人 miRNA-302 簇(miRNA-302s), 对其细胞周期调控功能进行探讨, 为理解

miRNAs 在胚胎干细胞生理活动中的调控作用提供新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I、*Xba* I, DNA 连接试剂盒, LA Taq、SYBR Premix Ex Taq 酶和感受态 DH5 $\alpha$  (TaKaRa), 质粒小量抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工), 质粒大量抽提试剂盒(Biomega), 梭华-Sofast 转染试剂(厦门太阳马), Trizol(Invitrogen), 反转录试剂盒、Dual-Luciferase Reporter Assay Kit(Promega), 蛋白定量试剂盒(Bradford), 细胞周期流式检测试剂盒(BD BioScience), 一抗: 鼠抗 cyclin D1、PCAF 和  $\beta$ -actin 单抗(Santa Cruz), 二抗: 羊抗鼠 Ig-HRP 多抗(中杉金桥)。pEGFP-C1 质粒、pGL3-CMV-basic 质粒(本实验室保存)。DMEM 培养基(高糖)、胎牛血清、青链双抗(Hyclone)。荧光素酶报告基因检测仪(Berthold), DFC 200FX 倒置相差显微镜及照相系统(Leica), PCR 仪、Real-time Q-PCR 仪(Bio-Rad), 流

收稿日期: 2010-03-25 接受日期: 2010-05-21

江苏省母胎医学重点学科建设项目(No.XK200709), 国家 973 项目(No.2007CB948004), 国家自然科学基金(No.30900847)和江苏省博士后基金(No.0802026B)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 025-83106666-66808, E-mail: yali\_hu@hotmail.com



式细胞仪(BD BioScience)。

## 1.2 方法

**1.2.1 构建载体的引物** 根据 miRBase Sequences 公布的 miR-302s 前体对应的基因组序列, 参照 Primer5 软件设计引物(Table 1)。根据 NCBI 提供的人 cyclin D1、PCAF-3'UTR 的序列设计引物, 引物由上海生工合成。

**1.2.2 pEGFP-C1-miR-302s、pGL3-cyclin D1-3'UTR 和 pGL3-PCAF-3'UTR 表达载体的构建** 以人胎盘基因组 DNA 为模板, 采用 miR-302s 的引物, 循环条件: 94 °C 5 min 后按照 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min 进行 35 个循环, 然后 72 °C 延伸 5 min, 扩增 miR-302s 前体序列片段。以人胎盘基因组 DNA 为模板特异地扩增 cyclin D1-3'UTR 和 PCAF-3'UTR 片段。

上述 PCR 产物按照设定的酶切位点分别经 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切与 *Xba* I 单酶切。酶切产物纯化后, 采用 DNA 连接试剂盒的 Solution I 分别将 miR-302s 与 pEGFP-C1 质粒、cyclin D1-3'UTR 与 pGL3-basic、PCAF-3'UTR 与 pGL3-basic 16 °C 4 h 连接后, 转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。根据质粒的自身抗性, 分别加卡那霉素、氨苄霉素进行抗性筛选。挑选单克隆接种培养, 小量法提取后, 酶切鉴定。阳性克隆经测序正确后进行后续实验。

**1.2.3 细胞培养及转染** HEK293 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素及 1% 链霉素的 DMEM 高糖培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养。当细胞融合度长至 50% 汇集时, 根据梭华转染试剂盒说明书转染细胞, 分别取 4  $\mu$ g 质粒及 10  $\mu$ l 梭华试剂稀释于 100  $\mu$ l 不含血清和抗生素的 DMEM 中, 轻轻混匀。将脂质体混合液缓慢滴加到质粒稀释液中, 充分混匀后室温孵育 15 min~20 min, 再加入到 6 孔板中, 轻轻摇动使均匀混合后放置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h。

**1.2.4 Real-time Q-PCR 检测 miR-302s、PCAF、cyclin D1 表达** HEK293 细胞转染 pEGFP-C1-miR-302s 48 h 后, 荧光显微镜观察是否有绿色荧光。细胞总 RNA 依 Trizol 试剂盒提供方法进行抽提, 取 2  $\mu$ g RNA 为模板按照 Promega 逆转录酶试剂盒说明书逆转录为 cDNA。miR-302s 反转录的引物为: miR-302s 茎环引物和 U6 的下游引物。以 cDNA 为模板, Real-time Q-PCR 检测 miR302s 表达成熟序列丰度。检测方法: 每个样本做 3 个复孔, 采用 U6 RNA 作为内参, Real-time Q-PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火、延伸 60 s, 循环 40 次, 通过 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法计算基因表达的相对比值。类似的方法检测 PCAF、cyclin D1 表达。

Table 1 DNA sequences of primers used for PCR and Real-time Q-PCR

Genes	Primer sequences
miR-302s	
Forward primer	5'-CCG CTC GAG AGT CTG TGG TTT AAA TTC TGT CAT-3'
Reverse primer	5'-CCG GAA TTC GGT GGG CTC CCT TCA ACT-3'
Cyclin D1 3'UTR	
Forward primer	5'-GCT CTA GAG GCC ACC TGT CCC ACT CCT AC-3'
Reverse primer	5'-GCT CTA GAG CAC GCA GCC TCC CAA ACA-3'
PCAF 3'UTR	
Forward primer	5'-GCT CTA GAT TTC CCC TCT GCT TCT T-3'
Reverse primer	5'-GCT CTA GAA TAA AAT AAA AAT GTC CTA-3'
Cyclin D1 Real-time	
Forward primer	5'-GAG GAA GAG GAG GAG GAG GA-3'
Reverse primer	5'-GAG ATG GAA GGG GGA AAG AG-3'
PCAF Real-time	
Forward primer	5'-CCA GCA AAA GAA AGG CAA AC-3'
Reverse primer	5'-AGT GAA GAC CGA GCG AAG CA-3'
miR-302s	
Stem-loop primer	5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG TCA CCA AA-3'
MiR-302s amplification	
Forward primer	5'-ACA CTC CAG CTG GGT AAG TGC TTC CAT GTT T-3'
Reverse primer	5'-GGT GTC GTG GAG TCG GCA ATT CAG TTG AG-3'
Internal U6	
Forward primer	5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'
Reverse primer	5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'



**1.2.5 荧光素酶报告基因活性测定** 采用梭华转染试剂将 pEGFP-C1-miR-302s、pRL-SV40 和 pGL3-cyclin D1-3'UTR 或 pGL3-PCAF-3'UTR 质粒瞬时共转染 HEK293 细胞。继续培养 48 h 后吸净 6 孔板内培养基, PBS 洗涤一遍。按 Dual-Luciferase Reporter Assay Kit 试剂盒所述方法裂解细胞, 收集细胞裂解液, 5 000 r/min 4 °C 离心 1 min, 收集上清。检测荧光素酶活性, 以海肾荧光素酶的活性作为内对照, 消除转染效率间的差异。

**1.2.6 PCAF、cyclin D1 的表达检测** 在转染 pEGFP-C1-miR-302s 质粒 48 h 后, 吸净培养基, PBS 洗涤两遍, 加入 1 ml 细胞裂解缓冲液[50.0 mmol/L Tris pH=7.6, 150.0 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1.0% NP-40, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)], 刮取细胞, 4 °C 旋转裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清。Bradford 法定定蛋白质浓度, 取 60 µg 的总蛋白经 10% SDS-PAGE 胶电泳分离, 常规方法转印至 PVDF 膜上, 分别加入 PCAF 单克隆抗体(1:400 稀释)和 cyclin D1 单克隆抗体(1:400 稀释)检测 PCAF、

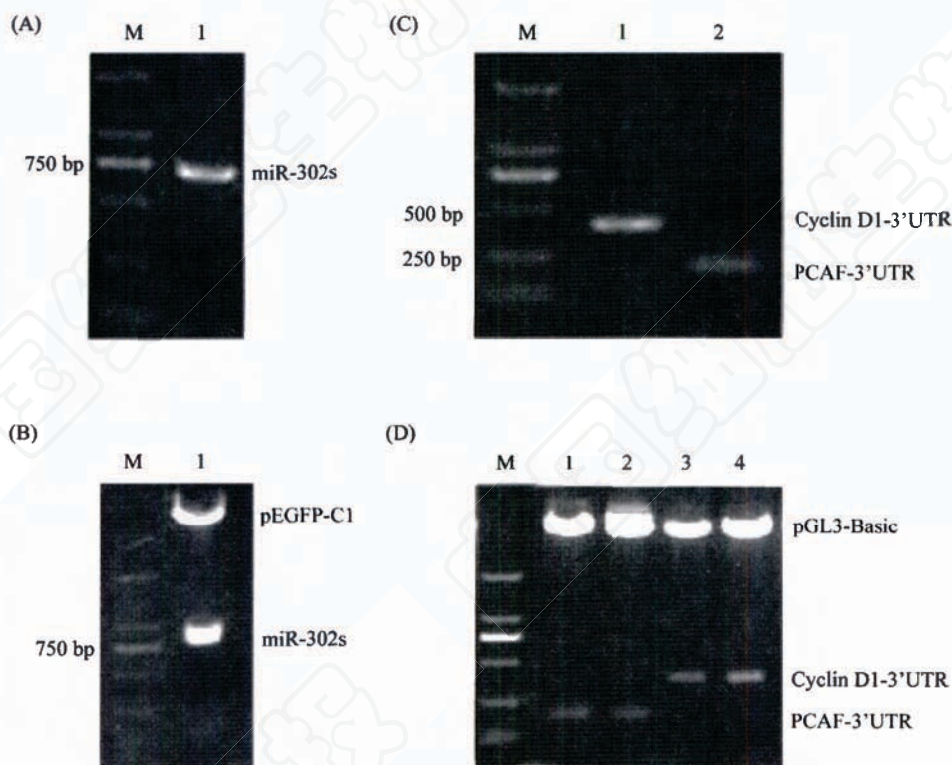
cyclin D1 表达。

**1.2.7 细胞周期分析** 将转染重组质粒 pEGFP-C1-miR-302s 和 pEGFP-C1 空载体的 HEK293 细胞培养 48 h 后, 按照说明书进行细胞周期分布检测: (1)1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞; (2)弃去上清, PBS 漂洗一次, 将细胞重悬于预冷的 80% 乙醇中, -20 °C 固定 24 h; (3)1 000 r/min 离心 5 min 收集固定后的细胞; (4)PBS 洗涤一遍, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞; (5)将细胞重悬于含 100 µg/ml RNase A 和 50 µg/ml PI 的 PBS 中, 室温孵育 30 min; (6)将经 PI 染色和 RNase A 消化后的细胞悬液上流式细胞仪检测。

## 2 结果

### 2.1 pEGFP-C1-miR-302s、pGL3-cyclin D1-3'UTR 和 pGL3-PCAF-3'UTR 重组表达载体构建

以人胎盘基因组为模板, 扩增出 miR-302s 前体序列(图 1A)。PCR 扩增的 cyclin D1-3'UTR、PCAF-3'UTR 对应的基因组片段见图 1C。



**Fig.1 Construction of pEGFP-C1-miR-302s, pGL3-cyclin D1-3'UTR and pGL3-PCAF-3'UTR recombinant expression plasmids**  
A: (M) 2 Kb ladder marker, (1) 1% agarose gel electrophoresis of PCR amplification product of miR-302s precursor sequence; B: (M) 2 Kb ladder marker, (1) electrophoresis of pEGFPc1-miR302s recombinant digested by restriction enzymes; C: (M) 2 Kb ladder marker, (1) PCR product of cyclinD1-3'UTR, (2) PCR product of PCAF-3'UTR; D: (M) 2 Kb ladder marker, (1,2) pGL3-PCAF-3'UTR recombinant digested by restriction enzymes, (3,4) electrophoresis of pGL3-cyclinD1-3'UTR recombinant digested by restriction enzymes.



pEGFP-C1-miR302s 经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示在 750 bp 附近有一目的条带, 表明表达载体构建成功(图 1B)。测序结果经 Blast 与已发表的人的 miR-302s 前体序列对比, 相似性 100%。

pGL3-cyclin D1-3'UTR 和 pGL3-PCAF-3'UTR 分别经 *Xba* I 单酶切后经 2% 琼脂糖凝胶电泳显示在 500 bp 和 250 bp 附近各有一目的条带(图 1D), 测序结果显示连接正确。

## 2.2 MiR-302s 抑制细胞周期蛋白 cyclin D1 和 PCAF 的表达

2.2.1 HEK293 细胞转染 pEGFP-C1-miR-302s 及表达 重组质粒 pEGFP-C1-miR302s 转染 HEK293 细胞, 转染 48 h 后可见绿色荧光(图 2A), 表明细胞转染成功。为确定重组质粒在转染细胞中成熟 miR-302s 的表达丰度, 采用 Real-time Q-PCR 的方法进行检测。结果显示: 转染 4  $\mu$ g pEGFP-C1-miR-302s 组与 4  $\mu$ g 空载对照组相比, 其 miR-302s 表达量显著增加(图

2B)。

2.2.2 HEK293 细胞转染 pEGFP-C1-miR-302s 后 cyclin D1 和 PCAF 的表达 Real-time Q-PCR 及 Western blot 结果表明 HEK293 细胞转染 pEGFP-C1-miR-302s 48 h 后 cyclin D1 和 PCAF 的 mRNA 和蛋白表达水平显著下降(图 2C, 图 2D)。

2.2.3 MiR-302s 降低 pGL3-cyclin D1/PCAF-3'UTR 荧光素酶活性 MiRbase 软件分析在 cyclin D1 和 PCAF-3'UTR 区分别存在 MiR-302s 的结合位点(图 3A), 推测 miR-302s 在转录后水平调控 cyclin D1 和 PCAF 的表达, 因此我们检测了 pGL3-cyclin D1-3'UTR、pGL3-PCAF-3'UTR 分别与 miR-302s 共转染后, 萤火虫荧光素酶活性 M1 和海肾荧光素酶活性 M2, M1/M2 比值表示相对荧光素酶活性。在转染 pGL3-cyclin D1-3'UTR 与 pRL-SV40 量一致的情况下, 空载对照组, 0.8  $\mu$ g pEGFP-C1-miR-302s 组, 1.6  $\mu$ g pEGFP-C1-miR-302s 组, M1/M2 比值依次为 3.517, 2.672, 1.096。在 pGL3-PCAF-3'UTR 与 pRL-SV40 的

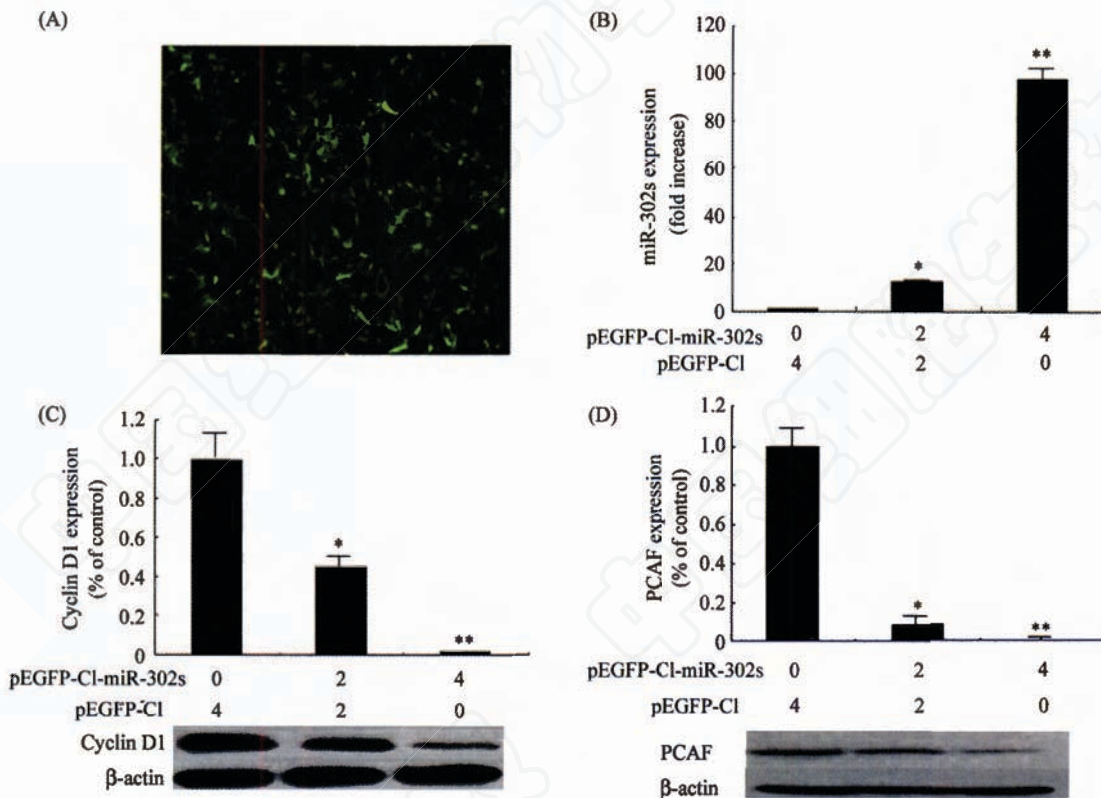
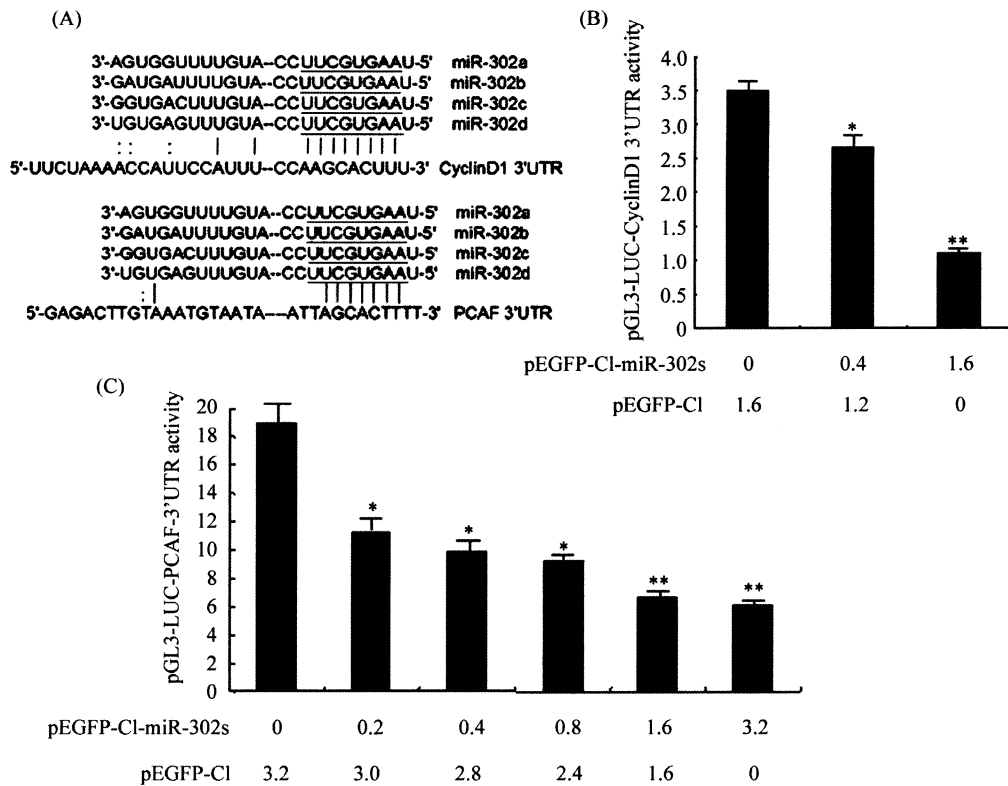


Fig. 2 MiR-302s repressed the expression of cyclin D1 and PCAF

A: HEK293 cells expressed the EGF protein after transfected with pEGFP-C1-miR-302s; B: the relative expression levels of miR-302s in HEK293 cells after transfected with different dose of pEGFP-C1 and pEGFP-C1-miR-302s expression plasmids indicated in the figure; C: mRNA and protein levels of cyclin D1 in HEK293 cells decreased after transfected with pEGFP-miR-302s; D: mRNA and protein levels of PCAF in HEK293 cells decreased after transfected with pEGFP-miR-302s. An asterisk (\*) indicates a *P* value of <0.05, two asterisks (\*\*) indicate a *P* value of <0.01.



**Fig.3** MiR-302s decreased the relative luciferase activity of cyclinD1/PCAF-3'UTR in HEK293 cells transfected with pEGFP-miR-302s

A: the core miR-302s binding site (underlined) in cyclinD1/PCAF-3'UTR region; B: the relative luciferase activity of cyclinD1-3'UTR after transfected with different dose of pEGFP-C1 and pEGFP-C1-miR-302s expression plasmids indicated in the figure; C: the relative luciferase activity of PCAF-3'UTR transfected with different doses of pEGFP-C1 and pEGFP-C1-miR-302s expression plasmids indicated in the figure. An asterisk (\*) indicates a  $P$  value of  $<0.05$ , and two asterisks (\*\*) indicate a  $P$  value of  $<0.01$ .

量一致的情况下, 空载对照组, 0.2  $\mu\text{g}$  pEGFP-C1-miR-302s组, 0.4  $\mu\text{g}$  pEGFP-C1-miR-302s组, 0.8  $\mu\text{g}$  pEGFP-C1-miR-302s组, 1.6  $\mu\text{g}$  pEGFP-C1-miR-302s组, 3.2  $\mu\text{g}$  pEGFP-C1-miR-302s组, M1/M2 比值依次为 19, 11.24, 9.893, 9.149, 6.58, 6.104。随着转染 pEGFP-C1-miR-302s 的量递增, cyclin D1-3'UTR 与 pGL3-PCAF-3'UTR 相对荧光素酶活性显著降低(图 3B, 图 3C)。

### 2.3 HEK293 细胞转染 pEGFP-C1-miR-302s 后细胞周期的变化

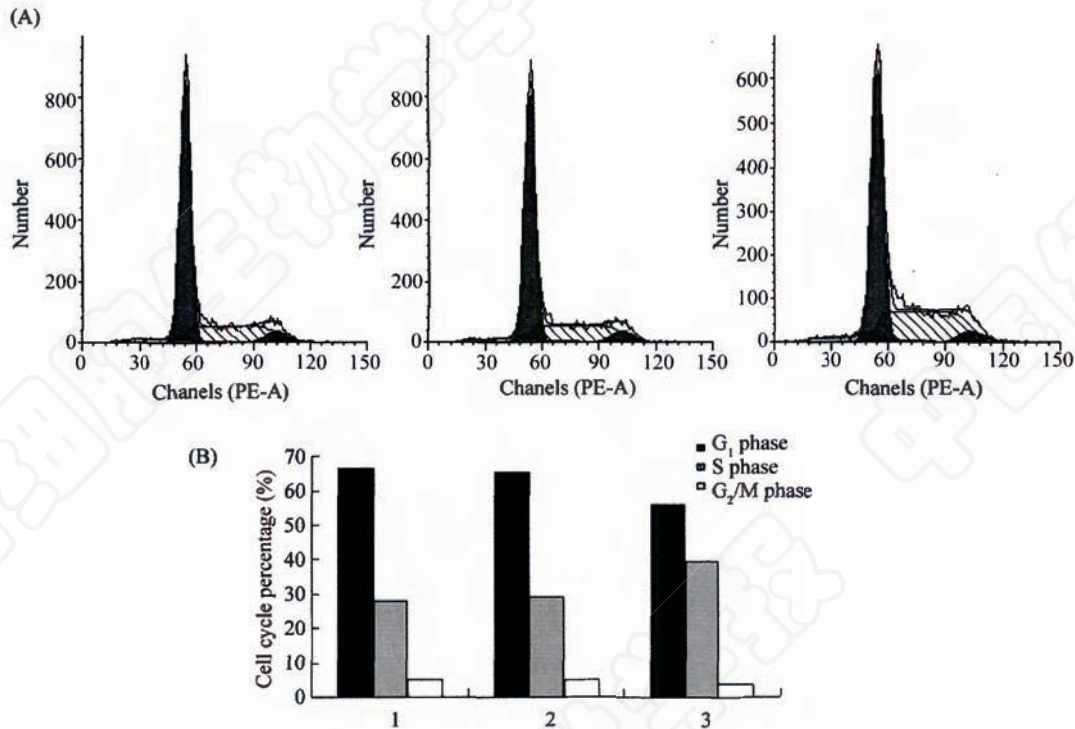
采用流式细胞仪检测 HEK293 细胞转染 pEGFP-C1-miR-302s 后 48 h 细胞周期的变化。在空载对照组, 2  $\mu\text{g}$  pEGFP-C1-miR-302s 组, 4  $\mu\text{g}$  pEGFP-C1-miR-302s 组 HEK293 细胞  $G_1$  期细胞分别为 66.47%, 65.35%, 56.04%, S 期细胞分别为 28.17%, 29.25%, 39.60%。随着转染 pEGFP-C1-miR-302s 的剂量增加, HEK293 细胞  $G_1$  期缩短, S 期延长, 提示 miR-302s 调控细胞周期  $G_1$ -S 期转换。

## 3 讨论

MiRNA 合成关键酶 Dicer 敲除小鼠 ES 细胞表现出增殖、分化缺陷, 其细胞周期  $G_1$  和  $G_0$  期延长<sup>[8]</sup>。另外一个 miRNA 合成关键酶 Dgcr8 缺陷后, ES 细胞抑制在  $G_1$  期<sup>[4]</sup>。这些都提示 miRNA 调控 ES 细胞周期  $G_1/S$  期转换, 维持细胞增殖, 抑制自主分化等特征。我们的研究结果表明, ES 特异性 miRNA-miR-302 簇转染 HEK293 细胞后可以缩短细胞  $G_1$  期, 处在 S 期的细胞明显增多, 表明 miR-302s 在调控细胞周期方面具有重要作用。值得注意的是, 最近的研究表明 iPS 细胞 miR-302s 表达明显升高, 提示 miR-302s 簇在重编程和细胞周期调控中的重要作用<sup>[9]</sup>。

MiR-302s 调控细胞周期主要是通过调控一系列细胞周期因子的表达实现的, 主要包括 cyclin D1<sup>[6]</sup>、Cdk4<sup>[6]</sup>以及本研究证实的新靶基因 PCAF, 还有潜在的靶基因 cyclin D2、CDK2、MYST3 等。本研究的结果显示, miR-302s 抑制 cyclin D1、PCAF3'UTR 活性以及 cyclin D1、PCAF 蛋白的表达, 抑制可达





**Fig.4 HEK293 transfected with pEGFP-C1-miR-302s resulted in more cells in S phase and less cells in G<sub>1</sub> phase**

A: flow cytometry analysis after transfected different pEGFP-C1-miR-302s into HEK293 cells, 1: transfection of 4  $\mu$ g pEGFP-C1, 2: 2  $\mu$ g pEGFP-C1-miR-302s+2  $\mu$ g pEGFP-C1, 3: 4  $\mu$ g pEGFP-C1-miR-302s; B: cells number in different cell cycle phases.

80%以上,提示其通过对靶基因3'UTR活性的调控从而影响靶基因的表达。

Cyclin D1是G<sub>1</sub>期重要的调节因子,Cdk4/6-cyclin D1复合物可以磷酸化RB蛋白(retinoblastoma protein,成视网膜细胞瘤蛋白),上调E2F靶基因表达,使细胞通过G<sub>1</sub>期检验点,进入S期<sup>[10]</sup>。Cyclin D1下调可以促进细胞G<sub>1</sub>/S期转换,缩短细胞G<sub>1</sub>期,快速进入S期,加快细胞增殖<sup>[6]</sup>。miR-302s抑制cyclin D1表达可能与ES细胞G<sub>1</sub>期很短,缺乏G<sub>1</sub>期细胞检验点密切相关。同时我们也发现ES细胞分化后miR-302s表达下降,cyclin D1表达显著上升,G<sub>1</sub>期明显延长(未发表资料)。

PCAF作为乙酰化转移酶,是细胞周期和分化的重要调节因子。有文献报道PCAF可以与Cyclin直接结合,促进细胞脱离正常的细胞周期,启动分化<sup>[11]</sup>。亦有文献报道PCAF可以乙酰化PTEN的两个赖氨酸残基(Lys125和Lys128),诱发PTEN介导的细胞G<sub>1</sub>期抑制,从而抑制细胞增殖<sup>[12]</sup>。PCAF乙酰化myoD等基因促进肌原细胞向肌细胞方向分化<sup>[13]</sup>。我们曾发现子宫内膜HOXA 10抑制PCAF表达,促进间质细胞增殖<sup>[14]</sup>。这些均表明PCAF与细胞分化密切相关,而ES细胞内miR-302s对PCAF的调控,可能也

与细胞周期G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>期缩短,抑制分化促进细胞增殖具有密切关系,其功能有待进一步研究。

总之,我们构建miR-302s表达载体,并初步研究miR-302s对细胞周期的影响,表明miR-302s抑制cyclin D1、PCAF等靶基因的表达,缩短G<sub>1</sub>期,S期细胞比例增加,为揭示miR-302s在ES细胞的细胞周期调控中的作用奠定了基础。

#### 参考文献(References)

- Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132(21): 4653-62.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by Adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 14;120(1): 15-20.
- Barroso-del Jesus A, Lucena-Aguilar G, Menendez P. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle* 2009; 8 (3): 394-8.
- Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G<sub>1</sub>-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 2008; 40(12): 1478-83.
- Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, Sun N, Butte AJ, Wu JC. MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2009;18(5): 749-58.
- Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina



- Y, *et al.* Oct4/Sox2-regulated miR-302s targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2008;28(20): 6426-38.
- 7 Rosa A, Spagnoli FM, Brivanlou AH. The miR-430/427/302 family controls mesendodermal fate specification via species-specific target selection. *Dev Cell* 2009; 16(4): 517-27.
- 8 Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(34): 12135-40.
- 9 Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DT, Chen DT, *et al.* Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 2008;14 (10): 2115-24.
- 10 Collier HA. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(8): 667-70.
- 11 Reutens AT, Fu M, Wang C, Albanese C, McPhaul MJ, Sun Z, *et al.* Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signaling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner. *Mol Endocrinol* 2001;15(5): 797-811.
- 12 Okumura K, Mendoza M, Bachoo RM, DePinho RA, Cavenee WK, Furnari FB. P/CAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem* 2006; 281(36): 26562-8.
- 13 Roth JF, Shikama N, Henzen C, Desbaillets I, Lutz W, Marino S, *et al.* Differential role of p300 and CBP acetyl-transferase during myogenesis: p300 acts upstream of MyoD and Myf5. *EMBO J* 2003; 22: 5186-96.
- 14 Sun H, Chen L, Yan G, Wang R, Diao Z, Hu Y. *et al.* HOXA10 suppresses p/CAF promoter activity via three consecutive TTAT units in human endometrial stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379(1): 16-21.

## Construction of Human miR-302s Expression Plasmid and Its Effect on Cell Cycle

Qiu-Yan Ge<sup>1,2</sup>, Li-Jun Ding<sup>2</sup>, Gui-Jun Yan<sup>2</sup>, Zhen-Yu Diao<sup>2</sup>, Hai-Xiang Sun<sup>1,2</sup>, Ya-Li Hu<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Drum Tower School of Clinical Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; <sup>2</sup>Center of Reproductive Medicine, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

**Abstract** Promoter region and coding region of Human miR-302s were amplified from human genomic DNA and inserted to pEGFP-C1 vector to construct human pEGFP-C1-miR-302s expression plasmid. The plasmid contained the core promoter (TATA) and miR-302s cluster (miR-302a, miR-302a<sup>#</sup>, miR-302b, miR-302b<sup>#</sup>, miR-302c, miR-302c<sup>#</sup>, miR-302d, miR-367 and miR-367<sup>#</sup>) encoding sequence. Decreased levels of relative luciferase activity of P/CAF and cyclin D1 were detected in HEK 293 cells transfected with pEGFP-C1-miR-302s, which indicated that cyclin D1 and P/CAF were targets of miR-302s. Real-time Q-PCR analysis demonstrated that miR-302s highly expressed, and Western blot analysis showed that the protein levels of cyclin D1 and P/CAF significantly decreased. Furthermore, the flow cytometry analysis showed the S phase extended and G<sub>1</sub> phase shortened in HEK293 cells after the transfection of pEGFP-C1-miR-302s. These results confirmed the important regulatory role of human miR-302s in the G<sub>1</sub>-S transition of cell cycle.

**Key words** miR-302s; P/CAF; cyclin D1; cell cycle

Received: March 25, 2010 Accepted: May 21, 2010

This work was supported by the Key Subject Construction of Maternal Fetal Medicine of Jiangsu Province (No.XK200709), Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (No.2007CB948004), the National Natural Science Foundation of China (No.30900847) and Postdoctoral Science Foundation of Jiangsu Province (No.0802026B)

\*Corresponding author. Tel: 86-25-83106666-66808, E-mail: yali\_hu@hotmail.com