

牛 lncRNA SNHG12 过表达载体构建

郭虹¹, 郝琴琴², 李鹏飞^{2*}

(1. 繁峙县畜牧业发展中心, 山西 繁峙 034300; 2. 山西农业大学生命科学学院, 山西 太谷 030801)

摘要:可卡因苯丙胺调节转录肽(cocaine-and amphetamine-regulated transcript, CART)是一种内源性神经肽类物质, CART 广泛存在于牛卵巢中, 并且对牛卵泡闭锁产生调节作用。miRNA 491 可以靶向结合牛 CART 基因 3'-UTR 区域, 从而调控 mRNA 表达极显著下调。通过 ENCORI 数据库预测发现 lncRNA SNHG12 可能作为 miRNA 491 的分子海绵, 从而影响牛 CART 基因的转录调控。本试验通过构建牛 lncRNA SNHG12 过表达重组载体, 为进一步探究 lncRNA SNHG12、miRNA 491 和牛 CART 基因三者的互作关系奠定试验基础。结果显示 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 载体序列检测正确; 转染 293T 细胞转染效果良好。荧光定量 PCR 结果显示在 293T 细胞中 NC 组的 lncRNA SNHG12 的表达水平极显著高于 miRNA 491 组, 试验表明 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 载体构建成功, 并且 lncRNA SNHG12 与 miRNA491 具有互作作用。

关键词: pcDNA3.1-EGFP-SNHG12; 荧光定量技术; CART; 细胞转染

中图分类号: Q782 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2023)02-0006-05

可卡因苯丙胺调节转录肽(cocaine-and amphetamine-regulated transcript, CART)是一种在体内广泛分布的内源性神经肽类物质^[1]。最初发现于羊的下丘脑中^[2], 但当时将 CART 当作一类生长抑制激素, 并未对其进行深入研究。直到 1995 年 Douglass 等^[3]发现这种多肽的表达受可卡因及苯丙胺这类精神活性物质调控, 此后一些类似的研究陆续被报道, 开启了 CART 功能相关探究。CART 在哺乳动物繁殖机能研究中同样得到深入研究, 课题组前期发现 CART 通过调节 FSH 诱导的雌激素的浓度, 从而对牛卵泡发育起到负调控作用。非编码 RNA(noncoding RNA, ncRNA)是一种小分子功能性 RNA, 不参与蛋白质翻译。ncRNA 包括 snoRNA、microRNA、siRNA、piRNA、circRNA 以及长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA) 它们都参与基因的转录翻译调控^[4]。miRNA 是真核生物中广泛存在的非编码小 RNA, 它广泛参与 mRNA 转录后调控作用^[5], miRNA 通常与靶基因 3'-UTR 结合, 来阻

止翻译过程, 抑制基因的表达^[6]。一个 miRNA 通常可调控多个基因, 同时一个基因可能受到多个 miRNA 的调控^[7]。lncRNA 是一种长片段非编码 RNA, 它具有多个 miRNA 靶向结合位点, lncRNA 作为 miRNA 的分子“海绵”。大量研究表明, lncRNA、miRNA 和 mRNA 存在复杂的交叉调控关系。lncRNA 不仅可以结合 miRNA, 还可以与把 mRNA 上的 miRNA 结合位点结合, 进而调控 miRNA^[8]。

课题组前期研究发现, miRNA 491 可以靶向结合牛 CART 基因 3'-UTR 区域, 从而调控 mRNA 表达极显著下调^[9], 后期通过 ENCORI 数据库预测发现 lncRNA SNHG12 可能作为 miRNA 491 的分子海绵, 从而影响牛 CART 基因的转录调控。但是 miRNA 491、CART 基因与 lncRNA SNHG12 三者的交叉互作关系尚未证实。本试验通过聚合酶链式反应(PCR)反应扩增 lncRNA SNHG12 目的片段与 pcDNA3.1-EGFP 载体连接, 构建 lncRNA SNHG12 过表达载体, 优化转染 293T 细胞的最适条件, 为后续探究三者的

收稿日期: 2022-11-15 修回日期: 2022-12-27

基金项目: 山西省应用基础研究计划面上项目(20210302123380); 山西农业大学校地合作项目(2021HX23, 2022HX010); 山西省现代农业产业技术体系建设专项

作者简介: 郭虹(1978—), 女, 专科, 畜牧师, 主要从事畜牧管理和实验室检测工作。

* 通讯作者: 李鹏飞(1978—), 男, 博士, 教授, 主要从事动物生殖生理方面的研究。

互作关系奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

HEK-293T 细胞株由山西农业大学生命科学院提供; *CART* 过表达载体和 miRNA 491 mimics 购自上海吉玛公司; PBS 缓冲液、二甲基亚砜 (DM-SO)、胰蛋白酶-EDTA 消化液、青链霉素混合液 (100 ×) (北京索莱宝公司); DMEM 培养基、RPMI Medium 1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (FBS)、限制性内切酶 (*Xho* I、*Spe* I) (日本 Takara 公司); DNA 连接酶 (美国 Thermo 公司); 转染试剂盒 TransIntro™ EL Transfection Reagent (北京全式金公司); 高纯度质粒大量提取试剂盒 (上海碧云天公司); CO₂ 培养箱、细胞计数仪 (美国 Thermo 公司); GloMax Multi 酶标仪 (美国 Promega 公司); 恒温振荡培养箱 (北京索莱宝公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 LncRNA SNHG12 过表达载体构建 根据美国国家生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 基因数据库 (登录号: NC_037329.1) 中 lncRNA SNHG12 序列, PCR 扩增目的序列, 利用 *Xho* I、*Sac* I 酶切割目的片段和 pcDNA3.1-EGFP 载体, 酶切反应条件如表 1。得到的混合体系置于 37 ℃ 条件下反应 2 h。将目的片段链接于载体上, 载体连接反应体系如表 2。构建过表达重组载体命名为 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12。

表 1 酶切反应体系

试剂	体积/μL
10 × Buffer	5
Sac I 限制酶	1
Xho I 限制酶	1
pcDNA3.1-EGFP 载体	5
ddH ₂ O	定容至 50 μL

表 2 载体连接反应体系

试剂	体积/μL
T4 DNA ligase buffer	2
pcDNA3.1-EGFP 载体	2
T4 DNA ligase	1
目的片段	1
ddH ₂ O	定容至 20 μL

1.2.2 获取 DH5α 感受态细胞并转化 解冻大肠

杆菌 DH5α 感受态细胞, 将其接种于 LB 液体培养基中, 37 ℃ 恒温振荡培养 24 h。将菌液均匀涂布于 LB 固体培养基上, 待表面干燥后倒置平板恒温培养 16 h。挑取平板中单一饱满的白色菌落接种于液体培养基振荡培养。将得到菌液置于冰上静置 10 min 后离心, 再加入预冷 CaCl₂ 重悬沉淀, 获取感受态细胞。在 50 μL 感受态细胞加入目的 DNA 5 μL, 轻轻混匀置于冰上 25 min, 42 ℃ 水浴 45 s 后立即置于冰上 2 min。加入 800 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基混匀后, 37 ℃ 振荡培养 1 h; 取菌液涂布于 Kana-mycin LB 固体培养基, 待菌液渗透后倒置平板恒温培养 16 h。

1.2.3 蓝白斑筛选与质粒抽提 平板中挑选饱满的单独菌落置于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 恒温振荡培养 16 h, 取菌液送至上海生工有限公司测序。剩余菌液于甘油中保存。质粒构建成功后按照质粒抽提试剂盒说明书进行抽提。菌液离心弃去上清液, Solution I / RNase A 重悬沉淀, 再加入 Solution II 轻轻混匀, 室温孵育后加入预冷的 Neutralization Buffer, 上下颠倒出现絮状沉淀后静置并离心, 取上清液再加 ETR Solution (蓝色) 混匀后于冰上静置, 溶液澄清, 恒温孵育后再次离心, 取上次水相, 加入 GBT Buffer。将溶液转移至 HiBind DNA Maxi 吸附柱, 依次加 HB Buffer、DNA Wash Buffer 弃废液, 超净台中晾干, 最后加入 DNA Elution Buffer 洗脱, 将所得质粒 -20 ℃ 保存。

1.2.4 293T 细胞培养与三质粒转染 将实验室冻存的 293T 细胞从液氮取出, PBS 清洗两次, 胰酶消化, 37 ℃ 5% CO₂ 的恒温箱中静置 3 min。加入完全培养基使消化终止, 离心弃去上清液, 再次加入完全培养基吹打均匀。利用细胞计数仪计数, 将细胞均匀接种于 24 孔板内, 再加入完全培养基置于培养箱中。待细胞汇合度为 50% ~ 60% 时, 将完全培养基换成无血清培养基。将 miRNA 491 mimics、*CART* 过表达载体以及 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 3 种质粒按照 1: 1: 1 进行配置, 将其设为一组; 将 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12、*CART* 过表达载体和 NC mimic 为一组; 空白对照为一组。三组质粒中加入 DMEM 培养基, 取再加入 TransIntro™ EL 转染试剂, 室温静置 20 min。

1.2.4 荧光定量 PCR 测定 lncRNA SNHG12 表达量 细胞转染 24 h 后用 PBS 洗 2 次, 500 μL Trizol 试剂加入每个孔中, 提取细胞总 RNA。反转录获得 cDNA, 用于后续 *CART* 和 lncRNA SNHG12 的 qRT-PCR 检测。miRNA 去除基因组反应 50 μL 体系如下: 总 RNA ≤ 44 μL, 再加入 10 × DNase I Buffer 5

μL , 5 U/ μL DNase I 0.5 μL , ddH₂O 定容。反转录体系如下: RNA 反应溶液 3.75 μL , 2 $\times$ mRQ Buffer 5 μL , mRQ Enzyme 1.25 μL 。MiRNA 491 扩增体系如下: 2 $\times$ TB Green Advantage Premix 12.5 μL , mRQ3' Primer、10 $\mu\text{mol/L}$ miRNA-specific primer 各 0.5 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 定容至 25 μL 。CART 基因和 lncRNA SNHG12 扩增体系: 2 $\times$ TB Green Premix Ex Taq 10 μL , cDNA 2 μL , 正反引物各 0.8 μL , ddH₂O 定容至 20 μL 。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; PCR 反应 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 40 个循环; 溶解曲线阶段: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。miR-491 引物为: ATAGTGGGGAACCCCTTCCATGAGG; CART 基因上游引物: CCTGCTGCTGCTGTACCTTTG, 下游引物: CCACGGCGGAGTAGATGTC-

CAG; lncRNA SNHG12 上游引物: CGTCGGTCGTCT-TGTCTGTCTTG, 下游引物: GCTCAACATCTTGC-CGCCTCTAG。β-actin 为 lncRNA SNHG12 和 CART 的内源性对照。U6 用作 miRNA 491 的对照。GraphPad Prism 9.0 软件对试验数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 质粒测序

PCR 扩增 lncRNA SNHG12 片段, *Xho* I、*Sac* I 酶切割 pcDNA3.1-EGFP 载体, 构建 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 重组载体, 转化 DH5 α 感受态细胞。如图 1 所示, 测序结果表明过表达载体构建成功。

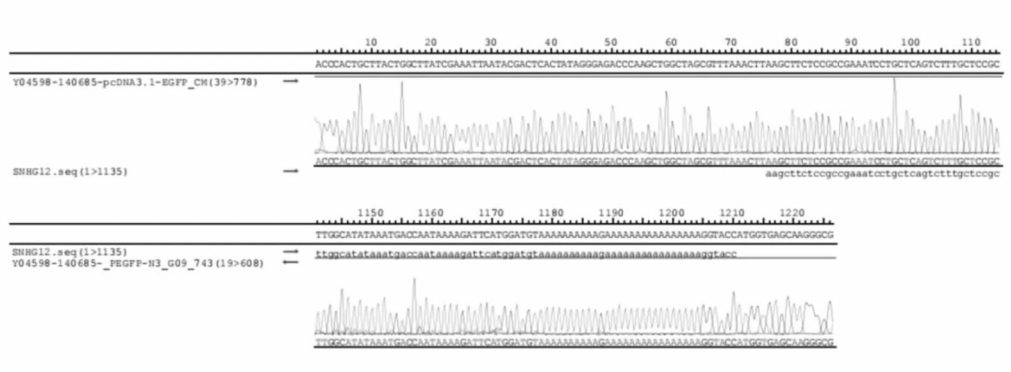


图 1 重组质粒测序部分图谱

2.2 细胞培养与转染效果检测

293T 细胞生长状态良好, 边缘清晰并且培养基内无悬浮细胞。细胞汇合度达 50% ~ 60% 时, 符合转染要求。观察转染后 24 h 的 293T 细胞, 在光镜

下如图 2a 所示, 细胞状态良好, 在荧光显微镜下转染效果如图 2b 所示, 绿色荧光蛋白分布均匀, 表明质粒合格, 转染操作无误。

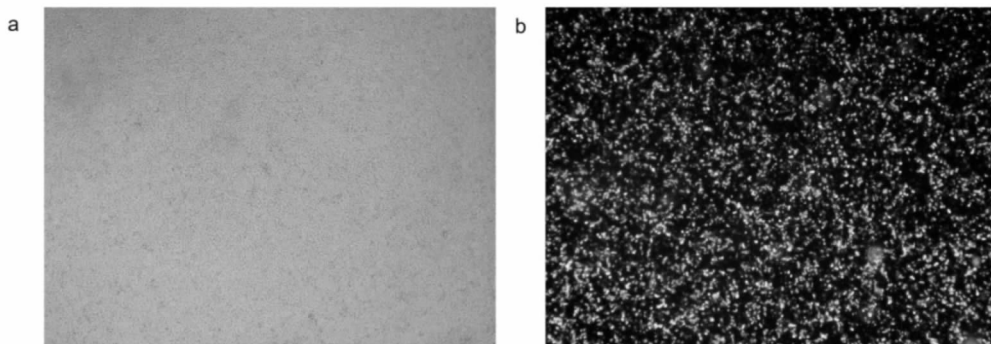


图 2 293T 细胞转染效果 (4 $\times$)

2.3 lncRNA SNHG12 表达量分析

通过 qRT-PCR 测定 lncRNA SNHG12 表达量, 如图 3 显示, lncRNA SNHG12 + miRNA 491 + CART 组和 lncRNA SNHG12 + NC + CART 组与为转染空白组 293T 细胞相比, lncRNA SNHG12 均有表达, 说明 lncRNA SNHG12 过表达载体转染 293T 细胞无误, 并且 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 载体构建成功。lncRNA SNHG12 + miRNA 491 + CART 与 lncRNA SNHG12 + NC + CART 组相比极显著表达 ($P < 0.001$), 证明 miRNA 491 与 lncRNA SNHG12 有互作关系。

lncRNA SNHG12 过表达载体转染 293T 细胞无误, 并且 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 载体构建成功。lncRNA SNHG12 + miRNA 491 + CART 与 lncRNA SNHG12 + NC + CART 组相比极显著表达 ($P < 0.001$), 证明 miRNA 491 与 lncRNA SNHG12 有互作关系。

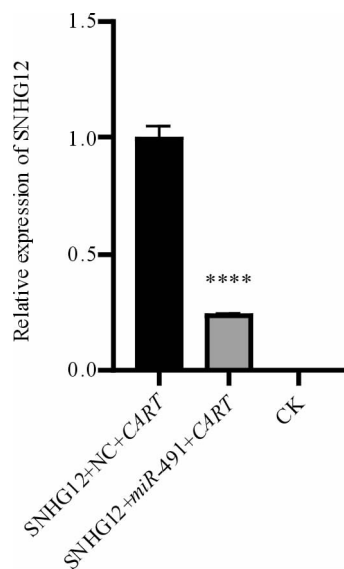


图3 lncRNA SNHG12 过表达结果

3 讨论

CART作为一种神经肽类物质,在各物种间是高度保守的。牛的 *CART* 基因与大鼠同源性达85%,与人的 *CART* 基因同源性达90%,而氨基酸序列同源性高达97%^[10]。*CART* 广泛存在于调节摄食的下丘脑神经核中^[11],从而调节哺乳动物摄食与体重;另外有研究证明 *CART* 还会使动物产生气味厌恶^[12],因此有研究者认为,*CART* 从下丘脑控制区域以及化学感应区控制摄食^[13]。*CART* 肽在药物成瘾方面研究广泛,有研究发现不同剂量 *CART* 会导致下丘脑神经阻断多巴胺的分泌^[14]; *CART* 还会参与 *VTA-NAc* 通路的调节,从而达到调节精神兴奋的作用^[15]。*CART* 分布于伏隔核以及杏仁核中,意味着 *CART* 与药物诱导的奖赏行为有密切关系^[16]。Kobayashi 等^[17] 最早发现 *CART* 在哺乳动物繁殖机能中起到重要作用,*CART* 广泛存在于牛卵巢中,并且对牛卵泡闭锁产生调节作用。Sen 等^[18] 研究发现,牛卵巢颗粒细胞大量表达 *CART* 基因,而一定浓度的 *CART* 对卵泡发育有显著的负调控作用,从而引起卵泡闭锁,导致牛排卵率下降进而影响牛繁殖率。如果能够解除这种抑制则会增加提高母牛排卵率从而提高繁殖效率。

在整个基因的表达调控中 miRNA 可以与基因靶向结合,一些非编码 RNA 同样可以靶向吸附 miRNA,从而解除 miRNA 对其靶基因的调控作用,使靶基因表达水平升高,所形成的网络关系被称为竞争性内源 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA)^[19]。课题组前期证明 miRNA 491 可以与牛 *CART* 基因 3'-UTR 区靶向结合,从而抑制 *CART* 转录翻译,影响 *CART* 表达水平。根据生信预测 lncRNA SNHG12 可作为 miRNA 491 分子海绵,对 miRNA 491 进行吸附,从而影响下游 *CART* 基因的表达水平。构建过表达载体转染模式细胞,再通过荧光定量 PCR 技术检测其表达水平,是探究基因组功能常用的方法^[20]。毋若楠等^[21] 探究拟南芥 lncRNA At5NC056820 影响植物干旱性的分子机制的探究中构建其过表达载体,再通过 PCR 鉴定 lncRNA 表达量。李佩韦等^[22] 在探究 siRNA 介导脂肪细胞分化相关蛋白 2 (*PLIN2*) 基因沉默研究中,构建 siRNA 与 *PLIN2* 基因过表达载体转染脂肪细胞,经过 qRT-PCR 检测其表达量。因此本试验通过构建牛 lncRNA SNHG12 过表达载体,与 *CART*、miRNA 491 过表达载体共转染 293T 细胞,qRT-PCR 检测其表达水平,探究三者的互作关系具有可行性。

构建 lncRNA、miRNA 和靶基因过表达载体,3 种质粒共转染模式细胞是用来探究三者的互作作用。3 种质粒之间相互存在竞争关系,会导致转染细胞效率降低,相较于单质粒转染试验难度增大。付强等^[23] 构建腺病毒重组载体,将 3 种质粒共转染 293T 细胞探究不同转染条件下的转染效率。强华等^[24] 构建 3 种离子通道相关质粒共转染 293T 细胞,建立钙离子通道模型,为后续试验奠定基础。本试验构建 miRNA 491、牛 *CART* 基因以及 lncRNA SNHG12 过表达质粒共转染 293T 细胞,试验具有可行性。

4 结论

本试验构建牛 lncRNA SNHG12 过表达载体,并成功转染 293T 细胞,经过 qRT-PCR 检测发现牛 lncRNA SNHG12 在细胞中过表达,表明 pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 载体构建成功。

本试验为后期课题组构建 miRNA 和牛 *CART* 基因与 lncRNA 三质粒转染模式细胞,提供试验基础。

参考文献:

- [1] KUHAR M J, YOHO L L. *CART* peptide analysis by western blotting[J]. *Synapse*, 1999, 33(3): 163-171.
- [2] SPIESS J, VILLARREAL J, VALE W. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(7): 1982-1988.
- [3] DOUGLASS J, MCKINZIE A A, COUCEYRO P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine[J]. *J. Neurosci.*, 1995, 15: 2471-2481.
- [4] LE P, ROMANO G, NANA-SINKAM P, et al. Non-coding RNAs in cancer diagnosis and therapy: Focus on lung cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(6): 1372.
- [5] BARTEL D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.

- [6] TAN Y J, WONG B Y X, VAIDYANATHAN R, et al. Altered cerebrospinal fluid exosomal microRNA levels in young-onset alzheimer's disease and frontotemporal dementia[J]. *J. Alzheimer's Dis. Rep.*, 2021, 5(1): 805-813.
- [7] KABEKKODU S P, SHUKLA V, VARGHESE V K, et al. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases [J]. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 2018, 93(4): 1955-1986.
- [8] WANG J Y, YANG Y, MA Y, et al. Potential regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in osteosarcoma[J]. *Biomed. Pharmacother.*, 2020, 121: 109627.
- [9] 李鹏飞, 成俊丽, 杜海燕. 一种牛 CART 基因真核过表达载体的构建与应用[P]. 山西省: CN114592003A, 2022, 06, 07.
- [10] RAKOVSKA A, BARANYI M, WINDISCH K, et al. Neurochemical evidence that cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) 55-102 peptide modulates the dopaminergic reward system by decreasing the dopamine release in the mouse nucleus accumbens[J]. *Brain Res. Bull.*, 2017, 134: 246-252.
- [11] BANNON A W, SEDA J, CARMOUCHE M, et al. Multiple behavioral effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptides in mice: CART 42-89 and CART 49-89 differ in potency and activity[J]. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, 299(3): 1021-1026.
- [12] AJA S, ROBINSON B M, MILLS K J, et al. Fourth ventricular CART reduces food and water intake and produces a conditioned taste aversion in rats[J]. *Behav. Neurosci.*, 2002, 116(5): 918-921.
- [13] ZHENG H, PATTERSON L M, BERTHOUD H R. CART in the dorsal vagal complex: sources of immunore activity and effects on Fos expression and food intake[J]. *Brain Res.*, 2002, 957(2): 298-310.
- [14] BRUNETTI L, ORLANDO G, MICHELOTTO B, et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide-(55-102) and thyrotropin releasing hormone inhibit hypothalamic dopamine release [J]. *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, 409(2): 103-107.
- [15] JAWORSKI J N, VICENTIC A, HUNTER R G, et al. CART peptides are modulators of mesolimbic dopamine and psychostimulants[J]. *Life Sci.*, 2003, 73(6): 741-747.
- [16] KUCHAR M J, DALL VECCHIA S E. CART peptides: Novel addiction- and feeding-related neuropeptides[J]. *Trends Neurosci.*, 1999, 22(7): 316-320.
- [17] KOBAYASHI Y, JIMENEZ-KRASSEL F, IRELAND J J, et al. Evidence of a local negative role for cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), inhibins and low molecular weight insulin like growth factor binding proteins in regulation of granulosa cell estradiol production during follicular waves in cattle [J]. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2006, 4(1): 22-23.
- [18] SEN A, BETTEGOWDA A, JIMENEZ-KRASSEL F, et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript regulation of follicle-stimulating hormone signal transduction in bovine granulosa cells [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(9): 4400-4410.
- [19] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA hypothesis: The Rosetta stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358.
- [20] PEISTER A, MELLAD J A, WANG M, et al. Stable transfection of MSCs by electroporation[J]. *Gene Ther.*, 2004, 11(2): 224-228.
- [21] 毋若楠, 王红, 杨成成, 等. 拟南芥 lncRNA-At5NC056820 过表达载体构建及其转基因植株的抗旱性研究[J]. *西北植物学报*, 2017, 37(10): 1904-1909.
- [22] 李佩韦, 张薇依, 成功, 等. 秦川肉牛脂肪细胞 *PLIN2* 基因干扰 siRNA 筛选及过表达载体效率检测[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(8): 2727-2735.
- [23] 付强, 李艳, 郑昭芬, 等. 聚乙烯亚胺介导三质粒共转染 HEK293 细胞的条件优化[J]. *生物医学工程学杂志*, 2015, 32(1): 137-141.
- [24] 强华, 魏峰, 张爱峰, 等. 多质粒共转染建立 Cav1.3 L-型钙通道的研究模型[J]. *陕西医学杂志*, 2009, 38(6): 643-647.

Construction of lncRNA SNHG12 Overexpression Vector

GUO Hong¹, HAO Qin-qin², LI Peng-fei^{2*}

(1. Animal Husbandry Development Center of Fanshi County, Fanshi, Shanxi 034300;

2. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

Abstract: Cocaine- amphetamine regulated transcript (CART) is an endogenous neuropeptide substance. CART is widely found in bovine ovaries and has a regulatory effect on bovine follicular atresia. miRNA 491 can bind to the 3'-UTR region of bovine CART gene, thereby regulating mRNA expression significantly down-regulated. It has predicted that lncRNA SNHG12 may act as a molecular sponge of miRNA 491 based on ENCORI database, thereby affecting the transcriptional regulation of bovine CART genes. In this study, bovine lncRNA SNHG12 overexpression recombinant vector was constructed, which would lay a foundation for further exploration of the interaction between lncRNA SNHG12, miRNA 491 and bovine CART genes. The results showed that the sequence of pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 vector was correct. The transfection effect of 293T cells was good. Fluorescence quantitative PCR results showed that the expression level of lncRNA SNHG12 in the NC group was significantly higher than that in the miRNA 491 group. The experiment showed that the pcDNA3.1-EGFP-SNHG12 vector was successfully constructed, and lncRNA SNHG12 interacted with miRNA491.

Key words: pcDNA3.1-EGFP-SNHG12; fluorescence quantitative technique; CART; cell transfection