

Hsa-microRNA-138 慢病毒表达载体的构建与鉴定*

江建新¹, 吴 渊¹, 高 珊², 孙诚谊^{1**}

(1. 贵阳医学院附院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附院 消化内科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 构建 hsa-microRNA-138 慢病毒表达载体。方法: PCR 扩增 pri-miR-138-2 前体序列, 克隆至 plenti-GFP 慢病毒表达载体, 双酶切及测序鉴定正确后进行慢病毒包装与滴度检测; 构建成功后感染人胰腺癌细胞 PANC-1, 48 h 后 Real-time Q-PCR 检测 miR-138 的表达。结果: 酶切、测序鉴定证明插入序列正确, 测定病毒滴度为 1×10^9 TU/ml, 病毒感染 48 h 后的 PANC-1 胰腺癌细胞观察可见绿色荧光, Real-time Q-PCR 显示被感染细胞的 miR-138 表达量较未感染细胞显著增高。结论: 建立了高效稳定表达 hsa-miR-138 的慢病毒转染系统。

[关键词] RNA, 小干扰; 慢病毒属; 载体; 波形蛋白; 胰腺肿瘤

[中图分类号] R373-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)04-0469-04

Construction and Identification of Hsa-microRNA-138 Lentiviral Vector

JIANG Jianxin¹, WU Yuan¹, GAO Shan², SUN Chengyi¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To construct hsa-microRNA-138 lentiviral vector. **Methods:** Pre-miR-138-2 amplified by PCR was cloned into plenti-GFP vector, and was identified by restriction endonuclease digestion and nucleotide sequencing, and then the lentivirus was packaged and virus titer was detected. After successfully constructed, the vector was transfected into human pancreatic cancer cell PANC-1. After 48h, the expression of hsa-miR-138 was detected by Real-time Q-PCR. **Results:** Restriction enzyme digestion and DNA sequencing demonstrated that the inserted sequences were correct. The titer of virus was 1×10^9 TU/mL. After lentiviral infection, green fluorescence was detectable under fluorescence inverted microscope in PANC-1 cells, and real-time Q-PCR showed that expression amount of hsa-miR-138 in transfected cells was more than that in non-transfected cells. **Conclusions:** The lentiviral vector expressing hsa-miR-138 efficiently and stably is successfully constructed.

[Key words] RNA, small interfering; lentivirus; vector; vimentin; pancreatic neoplasms

microRNA 是近年来在人体中发现的一类长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA, 它不直接参与蛋白质的合成, 但能通过对人体 1/3 左右的 mRNA 进行调节, 控制着细胞分化、增殖和凋亡等生命活动, 并能够特异性靶向 mRNA 实现对其转录后抑制^[1]。已有的研究表明, 波形蛋白作为胰腺癌上皮-间质化标志蛋白之一, 与胰腺癌的侵袭转移密

切相关^[2, 3]。通过生物信息学预测 hsa-miR-138 可靶向调控波形蛋白的表达, hsa-miR-138 前体为 pre-miR-138-1 和 pre-miR-138-2 两种, 成熟的 miR-138 主要来源于 pre-miR-138-2。本研究旨在构建针对 hsa-miR-138 高效的慢病毒表达系统, 为深入研究其靶向调控波形蛋白的表达及为胰腺肿瘤细胞侵袭转移提供研究工具。

* [基金项目] 国家自然科学基金资助(81160311), 贵州省科技厅贵阳医学院社发联合基金资助[黔科合(2010) 3171], 贵阳市科技局社会发展与民生科技计划资助[筑科合(2011103) 22 号]。

** 通讯作者 E-mail: chengyisun@medmail.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 慢病毒质粒 pLenti-CMV-GFP Puro (658-5)、包装质粒 pCMVDR8.74 和 pMD2.G 购自 Addgene 公司,大肠杆菌菌株 DH5 α 、HEK293FT、PANC-1 细胞由本研究所保存。

1.1.2 主要酶和试剂 限制性内切酶 AgeI、EcoRI、T4 连接酶购自 Takara 公司,质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒均购自 OMEGA 公司,总 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司,Fugene HD 转染试剂购自 Roche 公司,hsa-miR-138 定量 PCR 引物及 miRNA qRT-PCR 检测试剂盒购自 GeneCopoeia 公司。

1.2 方法

1.2.1 合成 hsa-miR-138 前体序列 查询 Sanger miRBase 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk>),得到 miR-138 成熟序列 hsa-miR-138(MIMAT0000430): 5'-agcug guguug ugaaucc aggcgg-3'及其前体 pre-miR-138 (MI0000455) 序列 (cggtgctgca gctggtgtg tgaatcagcgc cgacgagcag cgcatectct taccggeta ttcacgaca ccagggttgc atca),根据其前体 pre-miR-138 序列设计引物,在 pre-miR-138 两侧各保留约 125 bp 序列。pre-miR-138 及其上下游侧翼序列,并加上酶切位点 Age I (ACCGGT) 和 EcoR I (GAATTC) 如下:5'-a * ccggtctgagccctggtgccatactggcctggggagcc attggtggg-gaaggt gttgtatgggttcactgtctcaaacggaggagc cacagc-cagagga ggaagcggcggagttctggatcgttctgca gctggtgtg tgaatcagcgcgcagcagcgcga tcctcttacc cggctattcacga-caccagggttg catcataccat cctctccagcgcagcctctgggac-cgggcccggacg caaggacctgggga ggggtggggaggagctgtgtg-gaaagctgtcctc ttagctcactggat ctcagcccagactg * aattc-3'。依照酶切位点,分别合成上述表达框架的正义链和反义链。

正义链: 5'-ccggtctgagccctggtgccatactggcctg ggg-gagccattggtggggaaggtgtttagtgggttcactgtctcaaacgg-gaggagccacagcccagaggaggaagcggcggagttctggatcgttgc-tgcagctggtgttgaatcagcgcagcagcgc gcatccttaccggc-gtatttcacgacaccaggggt tgcatacaccatcctctccagcgcagcctcg-tgggaccgggcccggag caaggacctggggatggggtt ggggtgggagct-gtgtgtgaaagctgtcctc ttagctcactggatctcagcccagactg-3'。

反义链: 5'-aattcagctgggctgagatccagtgagc-tacagagacaag ctttcacacacagactcccacccaacccatcccca-ggtccttgcgtccgg cccggctcccagagctcgcctggagaggatggtat

gatgcaaccc tgggtcgtgaaatagccgggtaagaggatgcgc tgctcctc-gcctgattcacaacaccagctgcagca acgataccagaactccggcgt-tcctcctctgggctgtggctccccggttt gagacagtgatgaaccatacaac-caccttcccacaaccaatggctccccagg ccagtatggcaccagggtcag-A-3'。

1.2.2 双链 DNA 寡核苷酸链制备与重组慢病毒质粒载体构建 上述表达框架经退火形成双链 DNA,用 Age I 和 EcoR I 双酶切,再与线性化的慢病毒载体 pLenti-CMV-GFP Puro 质粒 (<http://addgene.com/17448/>) 连接。反应条件:取酶切后双链 DNA 产物 1 μ l (100 mg/L) 线性化的 pLenti-CMV-GFP Puro 质粒 1 μ l (100 mg/L)、10 倍 T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μ l、T4 DNA 连接酶 1 μ l, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 均匀涂于含 Ampicillin (终浓度 50 mg/L) 抗性 LB 固体平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日在 LB 平板上各挑取 3 个单克隆菌落接种至 LB 液体培养基中,置 37 $^{\circ}$ C 摇床 (200 r/min) 培养 16 h,留取 2 ml 菌液送至 Takara 公司进行测序。小量提取质粒后,用 Age I 和 EcoR I 酶切鉴定,反应条件为 ddH $_2$ O 12 μ l、DNA 5 μ l、10 倍 K Buffer 2 μ l、Age I 0.5 μ l、EcoR I 0.5 μ l,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 2 h。取鉴定正确的菌液,大量提取 plenti-GFP-miR-138 慢病毒载体质粒。

1.2.3 LV-plenti-GFP-miR-138 慢病毒制备和滴度测定 配制 D10 培养基 (DMEM 500 ml, FBS 50 ml, 青霉素及链霉素溶液 5 ml, 丙酮酸钠 5 ml) 和 Virus Production 培养基 (Ultraculture medium 500 ml, 青霉素及链霉素 5 ml, 丙酮酸钠 5 ml, 0.5 mol/L 丁酸钠 5 ml), 均 0.22 μ m 滤过除菌。配制 DNA 混合物: plenti-GFP-miR-138 慢病毒表达载体质粒 22 μ g、pCMVDR8.74 辅助质粒 15 μ g、pMD2G 质粒 (VSVg, 外壳蛋白) 7 μ g。将 DNA 混合物加至 100 μ l Fugene HD 转染试剂中,室温静置 40 min,加入到 4 个 T175 培养瓶,其中含 15 ml D10 培养基和贴壁生长的 HEK 293FT 细胞,转染 24 h 后,移去 D10 培养基,加入 20 ml Virus Production 培养基,转染 44 ~ 48 h,收集上清液到 50 ml 离心管内。重复上述步骤进行第二轮病毒的收集。将收集的上清液 4 $^{\circ}$ C, 1 000 r/min 离心 5 min,取上清液 0.45 μ m 滤膜过滤除菌。取 6 个 Beckman 超速离心管,70% 乙醇清洗后在生物安全柜中烘干;每管加入 30 ml 病毒上清液,然后将 2 ml 的 20% 蔗糖溶液 (PBS 配制) 加入上清液的底部,平衡后 4 $^{\circ}$ C、

25 000 r/min 离心 2 h;离心完毕后弃去上清液,管底白色沉淀晾干后加入 100 μ l 冷 PBS 重悬,轻轻吹打溶解后收集病毒,分装 5 μ l/管, -80 $^{\circ}$ C 冻存。按照说明书提供的梯度稀释法测定病毒滴度,根据公式:病毒滴度(TU/ml) = (绿色荧光蛋白阳性细胞数 \times 病毒上清稀释倍数) \times 10 计算出病毒滴度。

1.2.4 LV-plenti-GFP-miR-138 在胰腺癌细胞中的

表达 胰腺癌细胞 PANC-1 接种于 6 孔板中,待细胞覆盖至 70% 左右时,取其中 3 孔,以感染复数(MOI = 4:1)比例加入 LV-plenti-GFP-miR-138 感染胰腺癌细胞 PANC-1,观察绿色荧光蛋白表达情况。参考文献 Real-time Q-PCR 方法在 PANC-1 细胞内验证 hsa-miR-138 的表达^[4]。引物设计见表 1,数据分析采用 2- $\Delta\Delta$ CT 法。

表 1 Real-time Q-PCR 引物设计

Tab. 1 Primer designed for Real-time Q-PCR

Mature1_ID	Mature1_size	PCR_SIZE	Mature1_Seq	Primer_ID
RNU6B		75	reference small nuclear RNA	tcgtgaagcgtccatattttaa
hsa-miR-138	23	71	agcugguguugugaucaggccg	gtgttgtaatcaggccgaa

1.3 统计学处理

采用 *t* 检测,由 SPSS 17.0 统计软件分析结果。检测水准为 *P*(双侧) < 0.05。

2 结果

2.1 重组慢病毒质粒载体 plenti-GFP-miR-138 的

酶切测序鉴定

构建成功的慢病毒表达质粒 Takara 公司测序结果显示重组质粒中插入的 hsa-miR-138 序列 Sanger miRBase 中的序列一致,没有碱基缺失或替换等。部分测序结果见图 1。

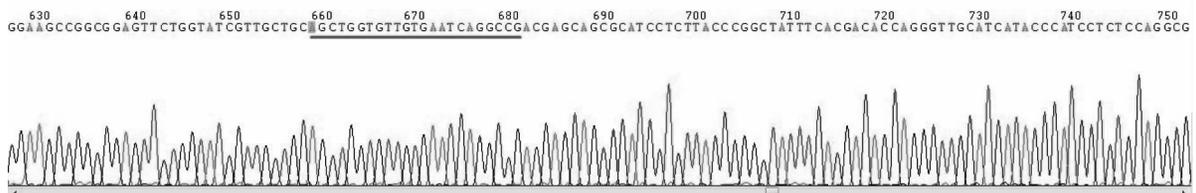


图 1 重组慢病毒质粒载体 plenti-GFP-miR-138 部分测序结果

Fig. 1 Some sequencing results of recombinant lentiviral plasmid vector plenti - GFP - miR - 138

2.2 LV- plenti-GFP-miR-138 慢病毒制备和滴度测定

筛选出的重组载体质粒与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,包装病毒,感染 293T 细胞,培养 48 h 后在荧光显微镜下观察(见图 2),可见清晰绿色荧光。根据公式计算病毒滴度为 1×10^9 TU/ml。成功包装的慢病毒命名为 LV- plenti-GFP-miR-138。

2.3 LV-plenti-GFP-miR-138 在胰腺癌细胞中的表达

LV-plenti-GFP-miR-138 感染 PANC-1 细胞,48 h 后 GFP 表达绿色荧光呈高峰(图 3)。Real-time Q-PCR 检测 hsa-miR-138 在 PANC-1 细胞中表达结果见表 2,结果显示 LV-plenti-GFP-miR-138 病毒感染 48 h 后较对照组的 miR-138 表达升高 200 多

倍。

3 讨论

成熟的 miR-138 主要来源于 pre-miR-138-2。miR-138 主要存在于甲状腺、中枢神经、空肠、外周血单核细胞为胎肝,在大多数成熟的器官和组织包括胰腺不表达^[5]。研究表明 miR-138 在多种肿瘤中表达失调,其可能参与了多种恶性肿瘤的发生发展。有文献报道,miR-138 被发现在头颈部鳞癌、舌癌、甲状腺癌、肺癌及白血病等表达下调,在肿瘤发生发展中发挥作用^[6-10]。最近研究表明,miR-138 能抑制头颈部鳞癌的侵袭转移,促进癌细胞凋亡^[11]。尽管多项研究已经证实 miR-138 的表达失调与肿瘤有密切关联,但是其在肿瘤发生发展过程

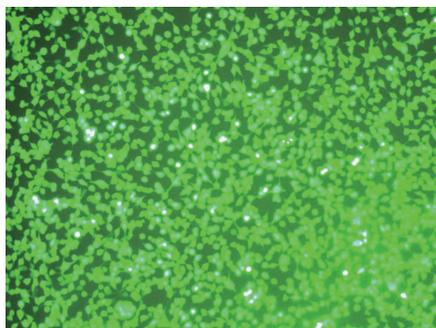


图2 LV-plenti-GFP-miR-138 感染的 293FT 细胞(48 h, ×100)

Fig.2 Fluorescence in 293 FT cells after infected with LV - plenti - GFP - miR - 138 for 48 h

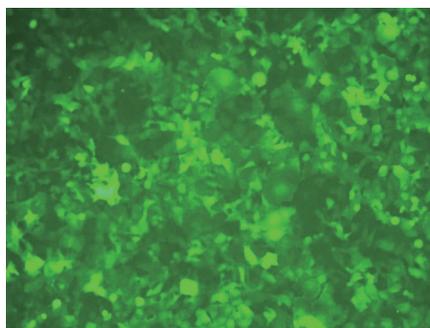


图3 LV-plenti-GFP-miR-138 感染胰腺癌 PANC-1 细胞(48 h, ×100)

Fig.3 Fluorescence in pancreatic cancer cell PANC - 1 after infected with LV - plenti - GFP - miR - 138 for 48 h

表2 hsa-miR-138 在感染 PANC-1 细胞前后的表达量

Tab.2 Expression amount of hsa-miR-138 in the pancreatic cancer cell line PANC-1 before and after infection

样本	U6 Ave. Ct	hsa-miR-138 Ave. Ct	hsa-miR-138 相对于 U6 的表达量差异(ΔCt)	相对于对照样品的表达量差异(ΔΔCt)	hsa-miR-138 表达量差异倍数(2 ^{-ΔΔCt})
对照组	14.28	29.50	15.22	0	1
实验组	14.55	22.09	7.54	-7.68	204.183

中所扮演的角色和具体的作用机制仍不明确,miR-138 在胰腺癌中的表达情况及其作用亦未见研究报道。因此,建立稳定、高效、持久的 hsa-miR-138 慢病毒表达系统对于验证研究靶点的正确性和发掘其生物学功能有着极其重要的科学意义。

目前研究 microRNA 作用机制方法众多,主要分为过表达和抑制表达 2 种方式。过表达包括构建 miRNA 慢病毒表达载体并包装为慢病毒感染和用体外合成的 miRNA 类似物进行转染 2 种方式。相比 miRNA 类似物转染,慢病毒感染有其特有的优势,慢病毒载体能够感染的宿主细胞范围非常广泛,包括非分裂期细胞和分裂期细胞,并且能够将外源基因整合入宿主基因组,长期稳定表达,因而是一种强有力的基因运输工具,成为基因治疗的首选载体^[12]。

本研究成功构建 hsa-miR-138 慢病毒表达系统,经双酶切测序分析,与 Sanger miRBase 中的序列一致,没有碱基缺失或替换;包装成慢病毒感染胰腺癌细胞 PANC-1 后能稳定高效地表达成熟 hsa-miR-138,为深入研究 hsa-miR-138 的生物学功能和作用机制提供强有力的工具。

致谢:感谢中国科学院深圳先进技术研究院潘建青博士提供技术支持!

4 参考文献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004 (2): 281 - 297.
- [2] Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, et al. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2007(8): 2803 - 2808.
- [3] 江建新, 申铭, 秦仁义, 等. 胰腺癌细胞转染 hSSTR2 基因对下游波形蛋白表达的影响及其意义[J]. 中国普通外科杂志,2009 (3): 237 - 242.
- [4] Jianxin Jiang, Ming Shen, Renyi Qin, et al. Construction of a lentiviral vector for RNA interference of human VIM gene and its silencing effect in pancreatic cancer cells [J]. Chinese-German Journal of Clinical Oncology,2009 (3): 145 - 149.
- [5] Liang Y, Ridzon D, Wong L, et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues [J]. BMC Genomics,2007(8): 166 - 172.
- [6] Liu X, Chen Z, Yu J, et al. MicroRNA profiling and head and neck cancer[J]. Comp Funct Genomics,2009 (3):514 - 520.

(下转第 475 页)

见白纹伊蚊从蛹羽化成成蚊时,其唾液腺尚发育不全,蛋白质量是随着它的发育逐渐增加的,到 5 日龄其唾液腺蛋白质量达到最大值,是 0 日龄的 2.88 倍,统计学分析有显著差异,表明蚊虫自羽化后,其唾液腺为了适应吸血的习性,在不断的发育。随着蚊龄的进一步增加,其唾液腺蛋白趋于稳定。

对不同日龄雌蚊唾液腺总蛋白谱电泳结果显示白纹伊蚊唾液腺总蛋白谱主要由 12 条主带所组成,它们分别是 15 kDa、18 kDa、28 kDa、30 kDa、32 kDa、34 kDa、45 kDa、48 kDa、50 kDa、62 kDa 及 68 kDa、>116 kDa 1 条;除此以外,还有许多弱的条带。这一结果与埃及伊蚊唾液腺总蛋白谱只有 7 条主带^[3]、大劣按蚊 7 条主带^[4]、致倦库蚊 9 条主带^[3]相比,白纹伊蚊唾液腺蛋白种类丰富。Peng 等^[5]通过免疫印迹技术比较 10 余种蚊虫唾液腺蛋白存在的变应原研究中,也发现白纹伊蚊唾液腺中具有变态反应的蛋白最多,其中在 28 ~ 68 kDa 之间,有 8 条带显色,这一方面说明这些蛋白很有可能在蚊虫吸血时注入宿主,另一方面也说明白纹伊蚊唾液腺组分中具有丰富的变应原蛋白。此外,吴家红等^[6]研究显示白纹伊蚊吸血后,唾液腺蛋白量显著下降,也进一步证实了蚊虫吸血时,唾液组分蛋白也随之注入了宿主。比较不同日龄唾液腺蛋白谱发现 0 日龄与其他日龄的唾液腺蛋白条带有差异,表现为条带有增减(即缺少了 28 kDa 的条带与增加了 40 kDa 的条带)及蛋白条带亮度降低。这可能是由于刚刚羽化的蚊虫,其唾液腺仍处于分化阶段,随着日龄的增加,蚊虫逐渐发育成熟,故而与其他日龄的蛋白条带有所差异。而

3 日龄以后的唾液腺蛋白条带是一致的,仅有蛋白条带亮度的变化,说明 3 日龄后的唾液腺已基本发育成熟,主要表现为蛋白量的增加,这一结果与蚊唾液腺蛋白定量的结果是一致的。此外,本研究还显示 5 日龄唾液腺体积大,好解剖,因此提示在今后的实验中可采用 5 日龄蚊唾液腺作为研究材料。

4 参考文献

- [1] 吴家红. 蚊虫唾液组分的抗凝血活性及其对宿主的免疫调控作用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2008 (5): 481 - 483.
 - [2] Coleman J, Juhn J, James AA. Dissection of midgut and salivary glands from *Aedes aegypti* mosquitoes [J]. J Vis Exp, 2007(5): e228.
 - [3] Orr CWM, Hudson A, West AS. Decrease of mosquito salivary gland proteins after a blood meal: an implication for pathogenesis of mosquito bite allergy [J]. J Med Assoc Thai, 2005(suppl 4): S255 - 259.
 - [4] Jariyapan N, Choochote W, Jitpakdi A, et al. Salivary gland proteins of the human malaria vector, *Anopheles dirus* B (Diptera: Culicidae) [J]. Rev Inst Med Trop, S Paulo, 2007(1): 5 - 10.
 - [5] Peng Z, Estelle F, Simons R. Mosquito allergy and mosquito salivary allergens [J]. Protein Pept Lett, 2007 (10): 975 - 81.
 - [6] 吴家红, 孙宇, 程金芝, 等. 白纹伊蚊 3 日龄雌蚊吸血前后唾液腺总蛋白谱 [J]. 中国媒介生物学与控制杂志, 2009(2): 102 - 104.
(2012-05-24 收稿, 2012-07-23 修回)
编辑: 潘 娅
-
- (上接第 472 页)
- [7] Jiang L, Dai Y, Liu X, et al. Identification and experimental validation of G protein alpha inhibiting activity polypeptide 2 (GNAI2) as a microRNA-138 target in tongue squamous cell carcinoma [J]. Hum Genet, 2011 (2): 189 - 197.
 - [8] Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, et al. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines [J]. Cancer Sci, 2008 (2): 280 - 286.
 - [9] Seike M, Goto A, Okano T, et al. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009 (29): 12085 - 12090.
 - [10] Zhao X, Yang L, Hu J, et al. miR-138 might reverse multidrug resistance of leukemia cells [J]. Leuk Res, 2010 (8): 1078 - 1082.
 - [11] Liu X, Jiang L, Wang A, et al. MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines [J]. Cancer Lett, 2009 (2): 217 - 222.
 - [12] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. Mol Biotechnol, 2007 (3): 184 - 204.
(2012-06-20 收稿, 2012-08-13 修回)
编辑: 张丽君