

大鼠 miR-1 慢病毒表达载体的构建与鉴定^{*}邓海燕, 曾俊义, 魏云峰[△] (南昌大学第一附属医院 330000)

【摘要】 目的 构建并鉴定大鼠 miR-1 慢病毒过表达系统。**方法** 采用 EcoR I 酶双酶切将目的基因从合成载体上酶切后连接入 EcoR I 线性化慢病毒载体, 连接产物转化后进行阳性克隆鉴定。成功构建的 miR-1 重组质粒与慢病毒辅助包装质粒及 Lipofectamine 2000 共转染 293T 细胞, 产生慢病毒浓缩液并标定病毒滴度。重组慢病毒载体转染大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs), 观察转染效率及 miR-1 表达水平。**结果** 测序结果显示目的基因与 Genebank 序列完全一致; 孔稀释法检测病毒滴度为 3×10^8 TU/ μ L; 以感染复数(MOI)50 感染大鼠 MSCs, 感染效率达 90% 以上, 聚合酶链反应显示 miR-1 高水平表达。**结论** 成功构建大鼠 miR-1 慢病毒表达载体并可高效转染大鼠 MSCs, 为进一步研究 miR-1 基因的相关功能提供了合适的载体。

【关键词】 miR-1; 慢病毒载体; 293T 细胞; 绿色荧光蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.02.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)02-0137-03

Construction and identification of recombinant lentiviral vector encoding miR-1 of rat^{*} DENG Hai-yan, ZENG Jun-yi, WEI Yun-feng[△] (The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi 330000, China)

【Abstract】 Objective To construct and identify lentiviral vector system over-expressing miR-1 gene of rat. **Methods** The miR-1 gene was digested from synthesised vehicle by EcoR I restriction endonuclease twice, and linked with linearized lentiviral vector system. Then the product was transformed into competent cells. Recombinant lentivector plasmids and the other two helping plasmids were co-transfected into 293T cells by Lipofectamine 2000, and cell culture supernatant was collected after 48 hours. The virus supernatant was concentrated and tittered. In order to observe the transfection efficiency and the expression of miR-1, the vector was transfected into rat mesenchymal stem cells(MSCs) following by cytofluorimetric analysis of GFP positive cells and qPCR. **Results** The miR-1 gene sequence was consistent with the sequence reported in genebank; the titer of miR-1 gene virus was 3×10^8 TU/ μ L (TU, transduction unit). The best transfection efficiency was up to 90% and the expression levels which determined by qPCR were quite higher than those of control group when multiply of infection(MOI) was 50. **Conclusion** The construction of over-expression lentiviral system of rat miR-1 gene may support the further study of function of miR-1 gene as a potential over-expression technique.

【Key words】 miR-1; lentiviral system; 293T cell; green fluorescent protein

1993 年, Lee 等^[1]在秀丽隐杆线虫中首次发现了一类新的调控分子——微小 RNA (microRNA, miRNA)。此后, 大量研究逐渐证实, miRNA 是一类广泛存在于动植物体内、进化中高度保守的 18~26 个碱基长度的非编码单链 RNA。在转录后水平, 通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'-untranslated regions, 3'-UTRs) 互补结合, 形成基因沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC), 特异性引起靶基因 mRNA 的降解或抑制其翻译^[2]。miRNA 控制着约 40%~50% 的蛋白质编码基因, 构成了一个庞大的转录后调控网络, 几乎参与生物体所有的生理、病理过程, 在机体生命过程中发挥着重要的调控作用^[3-5]。因此, 进一步阐明 miRNA 具体调控网络及其相关作用机制对于生命与疾病本质的揭示意义重大。基于此, 本实验拟建立过表达 miR-1 的 PGC-FU 慢病毒系统, 为 miR-1 后续相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 pGC-FU 重组载体、pHelper 1.0、pHelper 2.0 (Genechem 公司), 293T 细胞株、大肠杆菌菌株 DH5 α (Genechem 公司), 引物 (捷瑞生物), 质粒抽提 Kit (Promega 公司), Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司), 1 kp DNA ladder 分子标记物 (Fermentas 公司), 250 bp DNA ladder 分子标记物 (捷瑞生物), 琼脂糖 (赛百盛公司), EcoR I、T4 DNA 连接酶

(NEB 公司), Taq DNA 聚合酶 SinoBio dNTP (Takara 公司), All-in-one miRNA qRT-PCR 检测试剂盒 (GeneCopoeia 公司)。

1.2 方法

1.2.1 miR-1 慢病毒表达载体构建 使用 EcoR I 酶切纯化的含有目的基因的质粒并进行琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化 miR-1 目的基因片段, 获得的目的基因与线性化慢病毒载体连接。连接反应体系: 酶切载体 DNA 5 μ L, 酶切纯化的聚合酶链反应 (PCR) 产物 10 μ L, 10 $\times$ T4 Buffer 2 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, 50% 聚乙二醇 (PEG4000) 2 μ L, dd H₂O 10 μ L, 于 22 $^{\circ}$ C 连接 3 h 后进行转化。

1.2.2 miR-1 慢病毒表达载体鉴定 将连接产物转化预先用氯化钙制备的新鲜大肠杆菌感受态细胞后转移到 AMP 抗性 (100 μ g/mL) 的 LB 琼脂培养基上, 挑取长出的克隆进行 PCR 鉴定, 接种阳性转化子, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后保存为甘油菌, 分装 200 μ L 送测序。PCR 鉴定引物 rno-miR-1-SEQR; GAA TTC AGT GGC CAT TTT CT, EGFP-C-F; CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

1.2.3 miR-1 慢病毒表达载体包装 病毒包装前进行 293T 细胞的培养。转染前 24 h 取对数生长期 293T 细胞, 调整密度为 6×10^5 /mL, 接种于 15 cm 细胞培养皿, 待细胞密度达 70%

^{*} 基金项目: 江西省自然科学基金项目。 [△] 通讯作者, E-mail: wsdhy_1986@yahoo.com。

~80%时转染。转染前 2 h 更换为无血清培养基。制备各 DNA 溶液(pGC-LV 载体 20 μg, pHelper 1.0 载体 15 μg, pHelper 2.0 载体 10 μg),与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀,调整总体积为 2.5 mL,在室温下温育 5 min。取 100 μL Lipofectamine 2000 与 2.4 mL Opti-MEM 混合,在室温下温育 5 min。将稀释后的 DNA 与稀释后 Lipofectamine 2000 混匀,在室温下温育 20 min 以形成转染复合物。将转染复合物移至 293T 细胞的培养液中培养,8 h 后倒去培养基,PBS 充分洗涤后加入含 10% 血清的细胞培养基继续培养,48 h 后收集细胞上清液,于 4 ℃ 4 000 r/min 离心 10 min 以除去细胞碎片,用 0.45 μm 滤器过滤上清液于 40 mL 超速离心管中,离心浓缩病毒液至所需浓度,分装后-80 ℃长期保存。

1.2.4 miR-1 慢病毒表达载体滴度检测 测定前 1 d,在 96 孔板中以 4×10^4 /孔接种 293T 细胞,共 10 孔,体积为 100 μL。取 7 个无菌 Ep 管,在每个管中加入 90 μL 的无血清培养基,取待测定的病毒原液 10 μL 加入到第一个管中,混匀后取 10 μL 加入到第二个管中,继续相同的操作直到最后一管。选取所需的细胞孔,吸去 90 μL 培养基,替换 90 μL 稀释好的病毒溶液,放入培养箱培养,24 h 后加入完全培养基 100 μL,4 d 后观察荧光表达情况并计算病毒滴度。病毒滴度计算公式为:病毒滴度(TU/mL)=(GFP 阳性细胞数/病毒原液量) $\times 10^3$ 。

1.2.5 重组慢病毒载体转染大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)效率检测 分离培养大鼠骨髓间充质干细胞,传代培养至第 3 代用于转染。将细胞以适当密度接种到 96 孔板,分别按感染复数(MOI)值 10、25、50、75、100 加入病毒液进行转染,每孔同时加入终浓度为 8 μg/mL 的凝聚胺,24 h 后更换为正常培养基继续培养,倒置荧光显微镜下观察转染后 24、48、72、96 h 细胞 GFP 表达情况,评价慢病毒感染效率并确定最佳 MOI 值。以最佳 MOI 值感染大鼠骨髓间充质干细胞并扩大培养,同时以空载体病毒为参照,于转染第 4 天提取细胞总 RNA 并进行 qRT-PCR,检测转染后 miR-1 在骨髓间充质干细胞中的表达水平。miR-1 的检测以 U6 作内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算结果, $\Delta\Delta Ct = [(Ct_{miR-1} - Ct_{U6})_{MSCsmiR-1} - (Ct_{miR-1} - Ct_{U6})_{MSCs-Null}]$ 。

2 结 果

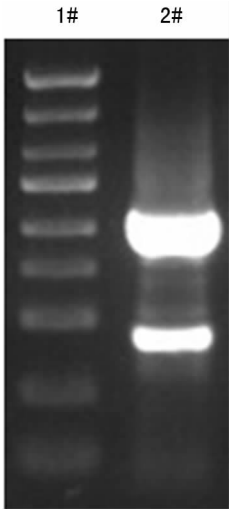
2.1 miR-1 慢病毒表达载体构建 EcoR I 酶切化学合成的含有目的基因的质粒,琼脂糖凝胶电泳显示在 289 bp 位置有条带,与目的基因实际片段大小相符(图 1)。同样,使用 EcoR I 对载体质粒进行酶切消化,因从细菌中提取的质粒可能存在超螺旋、开环、线性等不同的构象而具有不同的迁移速率,在琼脂糖凝胶电泳中呈现大小不同的条带,质粒经单酶切消化后,在目标位置呈现出均一的电泳条带,显示载体线性化成功(图 2)。

2.2 miR-1 慢病毒表达载体鉴定 miR-1 重组表达载体转化大肠杆菌后,挑选 8 个转化子进行 PCR 扩增,产物琼脂糖凝胶电泳可见连接入 rno-miR-1 片段的阳性克隆 2、7 号 382 bp 位置出现特异性条带,表明 miR-1 慢病毒表达载体构建成功(图 3)。挑选 7 号转化子进行测序,测序结果与目标序列完全一致。

2.3 miR-1 慢病毒表达载体包装与滴度检测 采用 293T 细胞进行病毒包装,收集并浓缩病毒颗粒后用孔稀释法检测其滴度,结果显示 miR-1 慢病毒表达载体对 293T 细胞具有良好的转染效率,病毒滴度为 3×10^8 TU/μL。

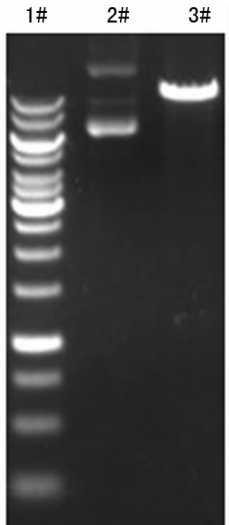
2.4 miR-1 慢病毒表达载体感染大鼠 MSCs 效果 倒置荧光显微镜下连续观察病毒以不同 MOI 值感染大鼠 MSCs 情况,各组细胞 GFP 表达随时间增加而不断增强,至 72 h 荧光表达

强度基本稳定;各感染组相比较,MOI 值为 50 时感染效率达 90%以上,与 MOI 为 75、100 时感染效率无明显差别,即 50 为最佳感染复数。qPCR 检测 MOI 50 转染 4 d 时大鼠 MSCs 的 miR-1 表达水平,结果显示 miR-1 表达量较空载体转染组显著升高。



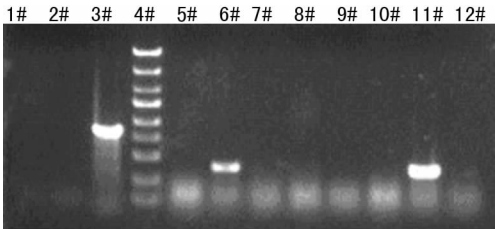
注:1#表示 DNA 分子标记物(条带从上到下依次为 5、3、2、1.5、1 kb 及 750、500、250、100 bp);2#表示酶切的目的基因质粒。

图 1 酶切目的基因质粒



注:1#表示 1 kb DNA 分子标记物(条带从上到下依次为 10、8、6、5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1 kb 及 750、500、250 bp);2#表示 pGC-FU Vector;3#表示 pGC-FU Vector EcoR I Enzyme cutting production。

图 2 酶切载体质粒



注:1#表示阴性对照(ddH₂O);2#表示阴性对照(空载自连对照);3#表示阳性对照(GAPDH);4#表示 DNA 分子标记物(从上至下依次 5、3、2、1.5、1 kb 及 750、500、250、100 bp);5#~12#表示 rno-miR-1 #1~8 号转化子。

图 3 PCR 阳性克隆鉴定

3 讨 论

近年来,鉴于其强大的调控作用,miRNA 相关研究得到广泛开展。截至目前,Sanger microRNA 序列数据库(miRBase)已涵盖共计 140 多个物种的 miRNA 前体序列近两万条,其中人类前体序列逾千条^[6]。尽管越来越多的 miRNA 被逐渐发现和认识,但其相关功能及作用机制远未得到阐明。miR-1 家族由 miR-1 亚家族及 miR-206 组成。其中 miR-1 亚家族又包括 miR-1-1 和 miR-1-2^[7]。相关研究发现,miR-1 在生命体心脏发育及心肌细胞分化过程中发挥着重要的调控作用。Chen 等^[8]和 Ivey 等^[9]在体外基因敲除或过表达研究中证实 miR-1 可以促进干细胞向心肌细胞的分化。Zhao 等^[10]通过基因敲除 miR-1-2,发现几乎一半的突变小鼠在胚胎发育期或出生时因室间隔缺损导致心力衰竭而死亡,小部分的老鼠虽能存活至成年,却表现出电生理异常(如:平均心率降低、PR 间期缩短、QRS 增宽)。因此,miR-1 在心脏发育及心肌细胞分化过程中具有不可或缺的作用,进一步研究其调控机制对于心脏发育过程及相关疾病的阐明具有重要意义。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷病毒(HIV-1)为基础发展起来的基因治疗载体,对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染力,同时该慢病毒载体为“自杀”性病毒,即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒,确保病毒感染高效安全^[11-12]。此外,慢病毒载体还具有容纳外源性目的基因片段大、在体内表达稳定、免疫反应小等诸多优点^[13],使其成为当前基因转染研究较为理想的载体。本研究所选用慢病毒作为 miR-1 的过表达载体,具有较强的可行性。

本研究通过对 miR-1 基因重组慢病毒载体转化阳性克隆进行鉴定,测序结构与目标序列完全一致,表明 miR-1 慢病毒表达载体构建成功。对收获的病毒进行超高速离心,得到了较高的病毒滴度,可以满足体内外转染的需要。将慢病毒转染大鼠 MSCs 细胞,转染效率达到 90% 以上,同时检测到 miR-1 表达水平显著上升,并持续稳定表达。这不仅为开展 miR-1 对干细胞调控作用的体内外试验研究奠定了基础,更为进一步广泛研究 miR-1 功能与相关作用机制提供了有效的研究工具。

参考文献

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense
- (上接第 136 页)
- 测分析[J]. 医学理论与实践, 2009, 22(6): 695-696.
- [3] 王士旗. 原发性高血压患者血液流变学变化分析[J]. 中国血液流变学杂志, 2007, 17(3): 489-492.
- [4] 乔艳红. 92 例高血压患者血液流变学指标的测定分析[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(9): 94-95.
- [5] 宋元彬. 血液流变学指标在临床诊断中的应用价值[J]. 中国血液流变学杂志, 2008, 18(1): 146-148.
- [6] 许德英, 郜恒友, 常永超, 等. 高血压患者血液流变学指标分析[J]. 中国血液流变学杂志, 2010, 20(2): 303-304.
- [7] 王红梅. 血液流变学检验及其临床应用[J]. 中国民族民间医药, 2010, 15(1): 129.
- [8] 王品晓, 林加锋, 罗立宏, 等. 原发性高血压患者超敏 C 反应蛋白水平分析[J]. 心脑血管病防治, 2007, 7(2): 124-

- complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 111(6): 843-854.
- [2] Stark A, Brennecke J, Bushati N, et al. Animal microRNAs contribute to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution[J]. Cell, 2005, 123(6): 1133-1137.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(6751): 350-355.
- [5] Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology[J]. Nature, 2011, 469(7330): 336-342.
- [6] Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(3): 226-239.
- [7] McCarthy JJ. MicroRNA-206; the skeletal muscle-specific myomiR[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1779(4): 682-691.
- [8] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nat Genet, 2006, 16(3): 228-233.
- [9] Ivey KN, Muth A, Arnold J, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(3): 219-229.
- [10] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2[J]. Cell, 2007, 129(2): 303-317.
- [11] Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors[J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 241-245.
- [12] Pluta K, Kacprzak MM. Use of HIV as a gene transfer vector[J]. Acta Biochim Pol, 2009, 56(4): 531-595.
- [13] Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2010, 58(2): 107-119.

(收稿日期: 2012-05-13 修回日期: 2012-11-13)

- 125.
- [9] 莫云秋, 何贵新, 王强, 等. 超敏 C 反应蛋白与原发性高血压的关系[J]. 广西医学, 2005, 27(11): 1736-1737.
- [10] 张光彩, 蒋玉敏, 黄祥, 等. 高血压及高血压性心脏病患者检测血 hs-CRP 和 Hcy 的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(4): 418.
- [11] 陈亚红, 鲁科峰, 蒋整. 冠心病、高血压患者血清同型半胱氨酸和超敏 C 反应蛋白的水平变化及临床意义[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(21): 2350-2351.
- [12] 周熙琳, 陈德生, 周柱玉. 老年高血压患者颈动脉粥样硬化与血清超敏 C 反应蛋白水平的相关性分析[J]. 临床医学, 2009, 29(8): 89-90.

(收稿日期: 2012-06-20 修回日期: 2012-10-19)