

miR-15a/16-1 慢病毒表达载体的构建及鉴定*

张春鸿¹ 方潇碧¹ 张露¹ 王珍珍¹ 武鹏¹ 廖志苏¹

[摘要] 目的:构建 miR-15a/16-1 过表达慢病毒载体,并对其进行病毒包装、鉴定、滴度测定与感染靶细胞。方法:利用 PCR 法钓取 miR-15a/16-1 序列片段;将目的基因 miR-15a/16-1 克隆到慢病毒载体 LV3 中,经双酶切及测序鉴定并大量抽提;利用脂质体将重组质粒和包装质粒 pGag/Pol、pRev、pVSV-G 共转染 293T 细胞包装产生慢病毒。收集病毒悬液梯度稀释,感染 293T 细胞进行病毒滴度检测;将所得慢病毒感染靶细胞。结果:酶切与测序结果证明成功构建重组质粒,并成功包装成慢病毒,实验组病毒滴度为 1×10^9 TU/ml,对照组病毒滴度为 2×10^9 TU/ml。慢病毒成功感染靶细胞,其转染效率可达到 80% 左右。结论:成功构建 miR-15a/16-1 慢病毒表达载体,可获得高效 miR-15a/16-1 的慢病毒颗粒。

[关键词] miR-15a/16-1;慢病毒;293T 细胞;绿色荧光蛋白

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.12.016

[中图分类号] R762 **[文献标志码]** A

Construction and identification of lentiviral vector over-expressing miR-15a/16-1

ZHANG Chunhong FANG Xiaobi ZHANG Lu WANG Zhenzhen WU Peng LIAO Zhisu
(Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, 325000, China)

Corresponding author: LIAO Zhisu, E-mail: liaozhisu111@163.com

Abstract Objective: To construct a lentiviral vector that over-expression miR-15a/16-1, and to proceed with the lentivirus package, identification, titer determination and transfection to target cells. **Method:** miR-15a/16-1 sequence was obtained by PCR, and it was inserted into the lentiviral vector LV3, and then it was identified by double-enzyme cleavage and gene sequence analysis and extracted. The recombinant plasmid and packaging plasmid pGag/Pol, pRev, and pVSV-G were co-transfected into 293T cells with the application of liposomes to package the lentivirus. The viral suspension was collected and diluted with gradient, then it was transfected to 293T cells and the titre was determined, and last obtained lentivirus was transfected to target cells. **Result:** Restriction enzyme digestion and sequencing results showed that recombinant plasmid has been successfully constructed and packaged to lentivirus. The viral titer was 1×10^9 TU/ml in experimental group, and 2×10^9 TU/ml in control group. The target cells were successfully transfected and the transfection efficiency could reach to 80%. **Conclusion:** It was successful to construct lentiviral vector of miR-15a/16-1 and to obtain efficient lentiviral particle of miR-15a/16-1.

Key words miR-15a/16-1; lentivirus; 293T cells; green fluorescent protein

* 基金项目:浙江省科技计划项目基金资助(No:2010C34005)

¹温州医学院附属第一医院耳鼻咽喉科(浙江温州,325000)

通信作者:廖志苏, E-mail: liaozhisu111@163.com

- [5] PISSUWAN D, VALENZUELA S, CORTIE M B. Prospects for gold nanorod particles in diagnostic and therapeutic applications [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2008, 25: 93-112.
- [6] TONG L, WEI Q, WEI A, et al. Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation and photothermal effects [J]. *Photochem Photobiol*, 2009, 85: 21-32.
- [7] EL-SAYED I H, HUANG X, EL-SAYED M A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer [J]. *Nano Lett*, 2005, 5: 829-834.
- [8] HUANG X, EL-SAYED I H, EL-SAYED M A. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 2115-2120.
- [9] HUANG X, JAIN P K, EL-SAYED I H, et al. Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells using immunotargeted gold nanoparticles [J]. *Photochem Photobiol*, 2006, 82: 412-417.
- [10] EL-SAYED I H, HUANG X, EL-SAYED M A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles [J]. *Cancer Lett*, 2006, 239: 129-135.

(收稿日期:2013-03-10)

微小 RNA(microRNA, miRNA)可通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区结合,诱导使沉默复合物降解或抑制靶 mRNA 蛋白翻译发挥基因表达调控作用,至少调节人类 1/3 的基因表达^[1-3]。通过调节细胞中 miRNA 的水平,进而调控相关基因的表达,研究细胞甚至组织生物学特性的变化,已是当前基因功能研究的热点。有研究发现,miR-15a/16-1 可通过调节 Bcl-2 基因转录后表达水平进而诱导凋亡^[4-5]。慢病毒载体能高效、稳定地将目的基因转染到哺乳动物各类细胞中,调节目的基因在靶细胞中的表达,进而为后续研究奠定基础。本实验通过构建并鉴定 miR-15a/16-1 慢病毒表达载体,为后续实验做准备。

1 材料与方 法

1.1 材 料

混合包装载体质粒(pGag/Pol、pRev、pVSV-G)、慢病毒载体 pGLV3/H1/GFP+Puro Vector(LV3)购自上海吉玛公司;DNA 内切酶、连接酶、marker 购自 Fermentas 公司;琼脂糖、DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;质粒 pGH-15a/16-1-X2370G 购自武汉晶赛生物工程技术有限公司;大肠杆菌感受态细胞为本室保存;质粒中量提取试剂盒购自杭州爱思进生物技术有限公司;细胞培养液 DMEM、RPMI-1640 购自 Invitrogen 公司;胎牛血清为美国 GIBCO 公司产品;Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒为 Invitrogen 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 目的基因的获取与扩增 根据 miR-Base 数据库获得 miR-15a/16-1 的序列,设计目的基因的上下游引物,其上游引物为: ATACGGATCCTAGCAGCACATAATGGTTTGTG,下游引物为: GTATCGAATTCAGCAGCACAGTTAATACTG,目的基因上下游引物分别加上 BamHI 和 EcoRI 及保护碱基,用于慢病毒载体的亚克隆。引物由上海吉玛制药技术有限公司合成。以 pGH-15a/16-1-X2370G 为模板,PCR 扩增 miR-15a/16-1 的基因序列。扩增条件:95℃ 预变性 3 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s;共 30 个循环;72℃ 延伸 5 min。PCR 反应完成后,利用 Agarose 电泳并切胶回收 miR-15a/16-1 基因片段。

1.2.2 目的基因 miR-15a/16-1 克隆到慢病毒载体 LV3 中并扩增重组后质粒 用 BamHI 和 EcoRI 对 miR-15a/16-1 目的基因片段及载体质粒 LV3 在 37℃ 下酶切 2 h,电泳后利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 miR-15a/16-1 基因片段和载体 LV3。二者在 T4 DNA 连接酶的作用下,在 22℃ 下连接 2 h。将连接产物转化感受态细胞,挑取单菌落,摇菌,提取质粒,将抽提好的质粒用 BamHI、EcoRI 限制性内切酶

进行双酶切并鉴定。取测序正确后的克隆,摇菌扩大培养,用除内毒素大提试剂盒提取质粒 DNA。

1.2.3 慢病毒包装 取对数生长期的 293T 细胞,于病毒包装前一天,在 15 cm 培养皿中接种并培养过夜。转染前 2 h 除去培养皿中培养液,加入无血清的 DMEM 培养液。利用脂质体将含目的基因的重组质粒(重组 LV3)和包装质粒 pGag/Pol、pRev、pVSV-G 共转染 293T 细胞(构建实验组慢病毒),同时利用脂质体将不含目的基因的质粒(LV3)和包装质粒 pGag/Pol、pRev、pVSV-G 共转染 293T 细胞(构建对照组慢病毒),在 37℃、5% CO₂ 培养箱中温育 4~6 h 后更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养 72 h。由于慢病毒载体 LV3 自身带有绿色荧光蛋白报告基因,48 h 后在荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白的表达。收集病毒上清液过滤器过滤,滤液在 4℃、20 000 r/min 的条件下超速离心 2 h 浓缩,收集浓缩病毒液保存于 -80℃ 下备用。

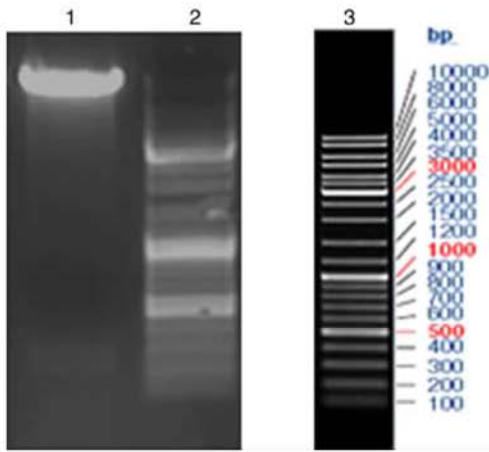
1.2.4 病毒滴度检测 滴度测定前一天,将 293T 细胞按 3×10^4 细胞/孔接种于 96 孔板中培养。将病毒原液用含 10% FBS 的 DMEM 培养液按梯度 10 倍稀释 3~5 个梯度。吸弃 96 孔板中的培养液,每孔加入 100 μ l 稀释的病毒液,同时设立空白对照组,于 37℃ 5% CO₂ 培养 24 h。吸弃 96 孔板中的稀释病毒液,每孔加入 150 μ l 含 10% FBS 的 DMEM 培养液,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48、72 h。通过荧光显微镜计数荧光细胞,计数最大稀释倍数孔中带有荧光的细胞个数,结合稀释倍数计算病毒滴度。病毒滴度(TU/ml) = (荧光细胞个数 \times 转染时细胞数/100 \times 每孔加入病毒稀释液体积) \times 1/稀释浓度。

1.2.5 病毒感染靶细胞 病毒感染靶细胞前一天,将对数生长的 CNE-2Z 细胞按 1×10^6 细胞/孔接种于 6 孔板中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。将病毒原液用含 10% FBS 的 1640 培养液按梯度 10 倍稀释 3 个梯度,加入终浓度为 5 μ g/ml 的 Polybrene。吸弃 6 孔板中的培养液,每孔加入 2 ml 稀释的病毒液,同时设立空白对照组,于 37℃、5% CO₂ 培养 24 h。吸弃 6 孔板中的稀释病毒液,每孔加入 2 ml 含 10% FBS 的 1640 培养液,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48、72 h。观察慢病毒感染结果。

2 结 果

2.1 LV3-miR-15a/16-1 重组质粒的酶切鉴定和测序

挑取 1 个阳性克隆进行扩增和抽提质粒,用 BamHI 和 EcoRI 对阳性克隆的重组质粒进行双酶切,电泳后得到的阳性克隆条带见图 1。



1:LV3-miR-15a/16-1 重组质粒 BamHI 和 EcoRI 双酶切;2,3:marker Fermentas SM0331。

图 1 电泳后得到的阳性克隆条带

表明质粒所在 8 000 bp 大小的为阳性重组质粒 LV3-miR-15a/16-1;测序结果证实 miR-15a/16-1 已正确插入LV3中,序列与预期序列一致。部分测序

结果见图 2。

2.2 重组慢病毒颗粒的制备及滴度测定

实验组慢病毒浓缩后的病毒滴度约为 1×10^9 TU/ml(图 3),对照组慢病毒浓缩后的病毒滴度约为 2×10^9 TU/ml。

2.3 慢病毒感染靶细胞(CNE-2Z)

对照组及实验组慢病毒浓缩成 1 ml 后,分别取 $10 \mu\text{l}$ 按照 1 : 10 稀释后 6 孔板中感染 CNE-2Z 细胞 72 h 后,对照组及实验组慢病毒感染 CNE-2Z 细胞的效率可达到 80%左右(图 4、5)。

3 讨论

慢病毒载体是以 HIV-1 病毒为基础发展而来的基因载体,其能将目的基因整合到宿主细胞基因组中,持续且稳定地介导目的基因的表达,能高效率地感染分裂细胞和非分裂细胞,属于反转录病毒的一种。慢病毒载体不具备自身复制能力,具有自身灭活的作用,并且能在宿主细胞中长时间表达,对宿主细胞毒性小,对多种类型的细胞,都具有较好的感染效果,被广泛应用于生物医学的研究。近

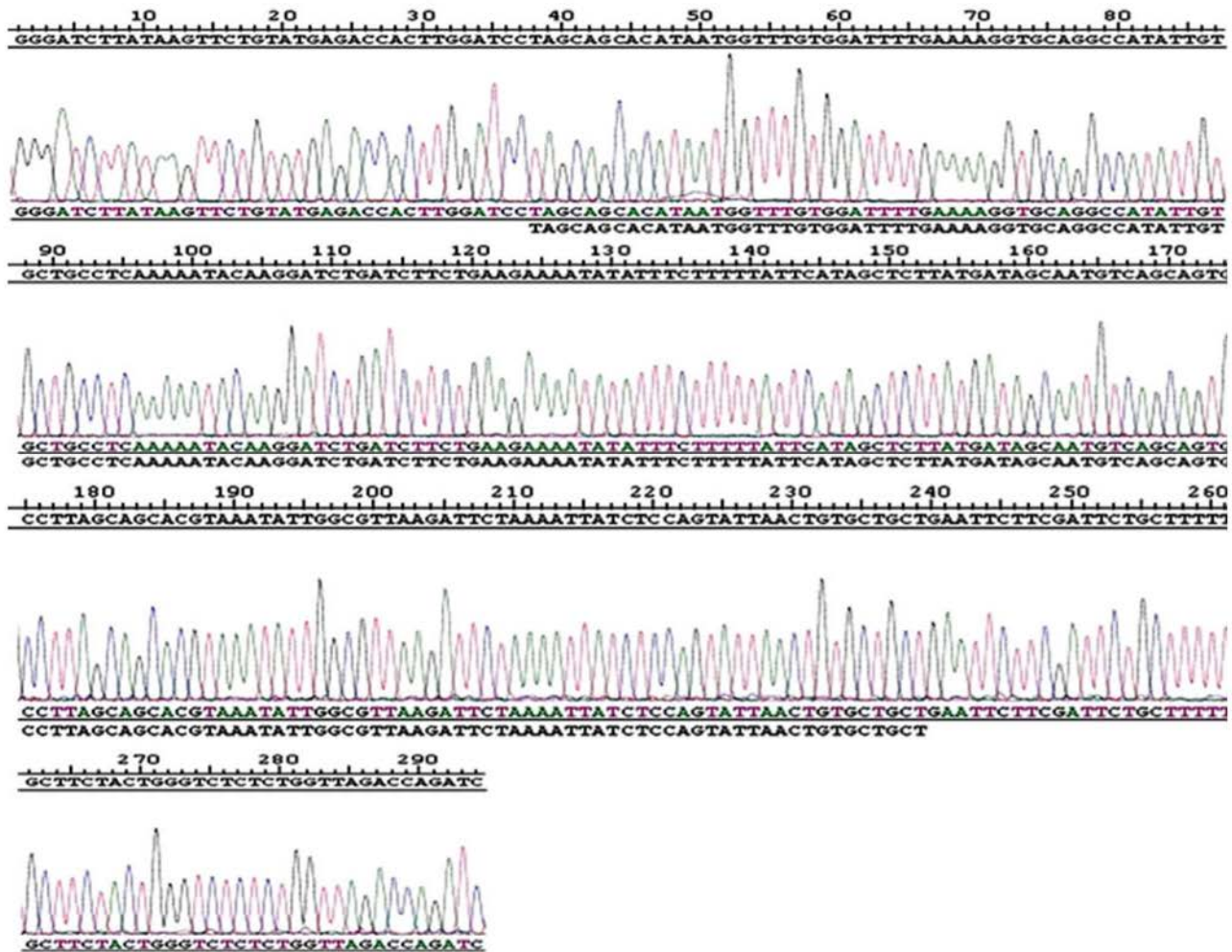


图 2 LV3-miR-15a/16-1 重组质粒双酶切后部分测序结果

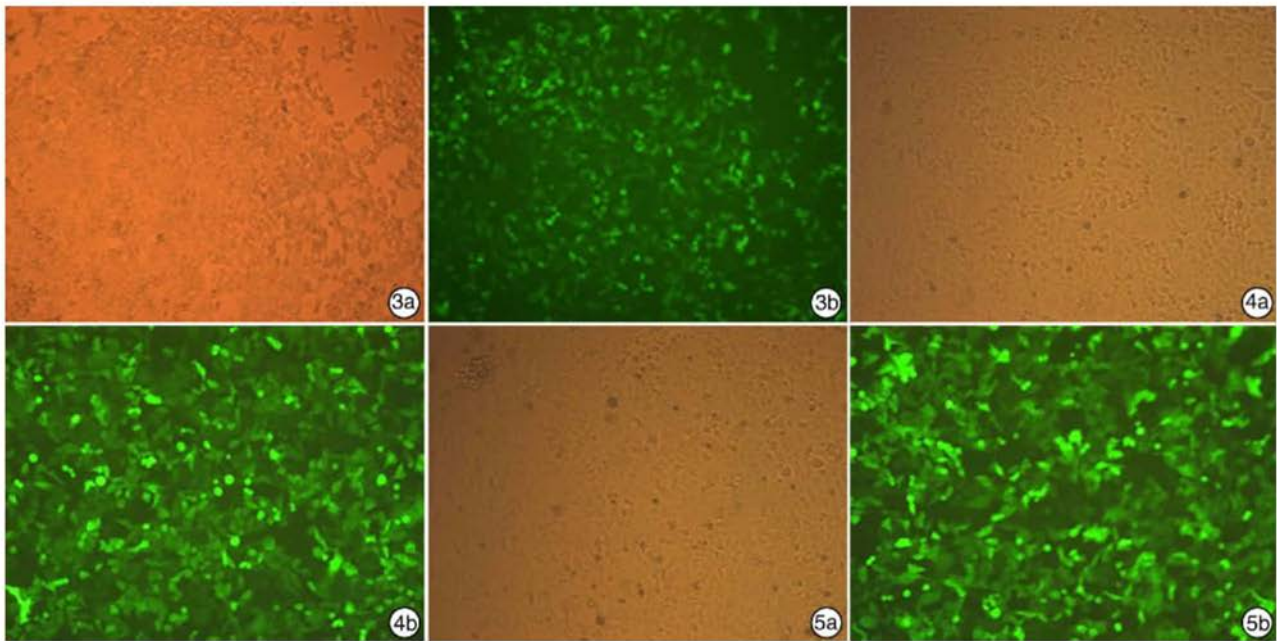


图 3 实验组慢病毒感染 293T 细胞 48 h 后观察到的绿色荧光蛋白的表达(×200) 3a:普通光显微镜下所见;3b:钴蓝光荧光显微镜下所见; 图 4 10 倍稀释对照组慢病毒感染 CNE-2Z 72 h 后(×200) 4a:普通光显微镜下所见;4b:钴蓝光荧光显微镜下所见; 图 5 10 倍稀释实验组慢病毒感染 CNE-2Z 72 h 后(×200) 5a:普通光显微镜下所见;5b:钴蓝光荧光显微镜下所见。

10 多年来,慢病毒载体已成为基础和应用研究领域
中十分有效的基因转移工具^[6]。

在基因表达过程中,miRNA 起着重要的分子
调控作用。miRNAs 为一类短小的内源性单链非
编码 RNA 片段,长约 22 个核苷酸。它可通过与靶
基因 mRNA 的 3'UTR 或编码区域完全匹配,促使
靶基因的 mRNA 发生降解^[7],或者通过与靶基因
3'UTR 的不完全匹配结合,抑制靶基因 mRNA 的
翻译,进而影响蛋白表达水平,在转录后水平抑制
基因表达^[8]。目前已研究发现,miRNAs 在肿瘤组
织中有不同程度的异常表达,以肿瘤异常表达的
miRNAs 为分子靶点,纠正肿瘤中 miRNAs 的异常
表达,从而实现对肿瘤的综合治疗,已初现曙光。
目前,基于 miRNAs 在肿瘤发生中作用的不同,以
miRNAs 为分子靶点的治疗,主要有两种策略。一
种是,当 miRNAs 在肿瘤中过度表达,起着类似类
癌基因的作用时,通过减少肿瘤组织中相关 miR-
NAs 的表达,而达到治疗肿瘤的目的;另一种是,当
miRNAs 在肿瘤中低表达或缺失,起着类似抑癌基
因的作用时,通过一定方法上调 miRNAs 的表达,
或进行 miRNAs 的替代治疗,从而达到肿瘤治疗的
目的。

miR-15a/16-1 被认为是一类高度保守的 mi-
croRNA^[9],主要起着抑制肿瘤发生的作用。其在
大多数恶性肿瘤细胞中呈低表达或者不表达状
态^[10-11]。研究发现其参与到多种肿瘤的病理活动
中,如非小细胞肺癌^[12]和前列腺癌^[13],还参与正常

的个体发育^[14],并参与调解许多疾病。Corthals
等^[10]研究证实 miR-15a 和 miR-16-1 的靶基因之一
是 Bcl-2,人工异位高表达的 miR-15a 和 miR-16-1
能通过与 Bcl-2 基因编码的 mRNA 的 3'UTR 区特
异性结合而抑制其翻译,从而减少癌细胞的增殖和
侵袭能力,促进癌细胞凋亡。在大脑缺血症状的研
究中发现,抑制 miR-15a 的表达,能提高 Bcl-2 蛋白
的表达水平,进而抑制 caspase-3 的表达,减少
DNA 的断裂,达到抑制大脑上皮细胞死亡的作用,
最终对大脑缺血症状起到血管保护作用^[15]。人工
上调 miR-15a 和 miR-16-1 的表达,可抑制 Bcl-2 基
因的表达,增加胃癌细胞及耐药骨肉瘤细胞对化疗
药物的敏感性^[16-17]。在乳腺癌的研究中发现,通过
提高 miR-15a 的表达,可以消除 MCF-7 细胞对化
疗药物他莫昔芬的不敏感性,从而提高该药对
MCF-7 细胞的杀伤作用^[18]。Hua 等^[19]研究发现,
miR-15a/16-1 家族可调节鼻咽癌中肿瘤新生血管
形成因子 VEGFA 和 MET 等的表达,认为 miR-
15a/16-1 与鼻咽癌的发生、发展密切相关。Yin
等^[20]在肿瘤血管形成方面的研究中,通过构建小鼠
的缺血模型,人为过表达 miR-15a,抑制血管内皮生
长因子的表达,进而显著抑制血管的形成。以
miR-15a/16-1 为分子靶点,将其应用于肿瘤的诊
断和治疗,具有可观的前景。

本研究成功构建了 miR-15a/16-1 慢病毒过表
达载体,并制备了高滴度、能在细胞中稳定高效表
达 miR-15a/16-1 的慢病毒颗粒,将其成功感染靶

细胞,观察到绿色荧光蛋白的表达。相比直接转染 miRNAs 寡核苷酸,慢病毒载体不会造成细胞内 miRNAs 快速降解,实现了 miR-15a/16-1 对靶细胞的稳定干扰,从而为后续研究的顺利进行打下了基础。与同质粒载体相比,慢病毒载体具有更高的效率,克服了质粒载体不能转染非分裂相细胞的不足,使靶细胞高效、稳定地表达 miR-15a/16-1,进而长期抑制目的基因的表达。该载体及高滴度慢病毒颗粒的获得,为研究 miR-15a/16-1 对鼻咽癌生物学功能的影响及其分子机制奠定了基础,为后续细胞及动物实验的研究提供了依据。

参考文献

- [1] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116: 281—297.
- [2] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136: 215—233.
- [3] AXTELL M J, WESTHOLM J O, LAI E C. Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals[J]. *Genome Biol*, 2011, 12: 221—221.
- [4] CIMMINO A, CALIN G A, FABBRI M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 13944—13949.
- [5] CALIN G A, CIMMINO A, FABBRI M, et al. miR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 5166—5171.
- [6] WESTERMAN K A, AO Z, COHEN E A, et al. Design of a trans protease lentiviral packaging system that produces high titer virus [J]. *Retrovirology*, 2007, 4: 96—96.
- [7] HORNSTEIN E, MANSFIELD J H, YEKTA S, et al. The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development[J]. *Nature*, 2005, 438: 671—674.
- [8] AUKERMAN M J, SAKAI H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 2730—2741.
- [9] BANDI N, ZBINDEN S, GUGGER M, et al. miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 5553—5559.
- [10] CORTHALS S L, JONGEN-LAVRENCIC M, DE KNEGT Y, et al. Micro-RNA-15a and micro-RNA-16 expression and chromosome 13 deletions in multiple myeloma[J]. *Leuk Res*, 2010, 34: 677—681.
- [11] LERNER M, HARADA M, LOVEN J, et al. DLE-U2, frequently deleted in malignancy, functions as a critical host gene of the cell cycle inhibitory microRNAs miR-15a and miR-16-1[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315: 2941—2952.
- [12] BANDI N, VASSELLA E. miR-34a and miR-15a/16 are co-regulated in non-small cell lung cancer and control cell cycle progression in a synergistic and Rb-dependent manner[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 55—55.
- [13] MUSUMECI M, COPPOLA V, ADDARIO A, et al. Control of tumor and microenvironment cross-talk by miR-15a and miR-16 in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2011, 30: 4231—4242.
- [14] FRIEDMAN L M, DROR A A, MOR E, et al. MicroRNAs are essential for development and function of inner ear hair cells in vertebrates [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 7915—7920.
- [15] YIN K J, DENG Z, HAMBLIN M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury[J]. *J Neurosci*, 2010, 30: 6398—6408.
- [16] XIA L, ZHANG D, DU R, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123: 372—379.
- [17] ZHAO Y, ZHANG C L, ZENG B F, et al. Enhanced chemosensitivity of drug-resistant osteosarcoma cells by lentivirus-mediated Bcl-2 silencing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390: 642—647.
- [18] CITTELLY D M, DAS P M, SALVO V A, et al. Oncogenic HER2{Delta}16 suppresses miR-15a/16 and deregulates Bcl-2 to promote endocrine resistance of breast tumors [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31: 2049—2057.
- [19] HUA Z, LV Q, YE W, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia [J]. *PLoS One*, 2006, 1: e116.
- [20] YIN K J, OLSEN K, HAMBLIN M, et al. Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 27055—27064.

(收稿日期: 2013-12-22)