doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.05.002

hsa-miR-20a 低表达慢病毒载体的构建及其表达鉴定 *

张 熠[1] 杨 靖[1] 吕运成[2] 钟 警[3] 文格波[3△]

（1 南华大学附属第一医院内分泌科 湖南 衡阳 421001；2 南华大学人体解剖学教研室 湖南 衡阳 421001；
3 南华大学附属第一医院临床医学研究所 湖南 衡阳 421001）

摘要 目的：构建 hsa-miR-20a 低表达慢病毒载体，检测其在 HL-60 中表达。**方法：**采用 In-fusion 重组交换克隆法设计并合成 hsa-miR-20a 前体序列的扩增引物，扩增获得目的片段插入慢病毒 GV159 中，得到重组的 LV-hsa-miR-20a 表达载体，通过与包装质粒共转染 293T 细胞，获得携带 hsa-miR-20a 的重组慢病毒并测定病毒滴度。取对数生长期 HL-60 细胞根据病毒滴度及细胞 MOI 值感染慢病毒，感染后 24 h、48 h、72 h、96 h 镜下观察荧光表达情况，判断感染效率，qRT-PCR 检测 HL-60 细胞 hsa-miR-20a 的表达变化。**结果：**成功构建 LV-hsa-miR-20a 低表达慢病毒载体，其病毒滴度为(8E+8)TU/mL。该病毒感染 HL-60 细胞的效率可高达到 80%，并可有效降低 HL-60 细胞 hsa-miR-20a 表达水平。**结论：**成功构建了 hsa-miR-20a 低表达慢病毒载体，包被的慢病毒可以在 HL-60 细胞中实现低表达效果，为后续功能研究奠定了基础。

关键词：Hsa-miR-20a；慢病毒载体；HL-60

中图分类号：Q75；Q78 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2015)05-804-04

Construction of a Recombinant Lentiviral Vector to Inhibit hsa-miR-20a Expression and Validation of its Transduction Efficiency*

ZHANG Yi[1], YANG Jing[1], LV Yun-cheng[2], ZHONG Jing[3], WEN Ge-bo[3△]

*(1 Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan, 421001, China;
2 Laboratory of Clinical Anatomy, University of South China, Hengyang, Hunan, 421001, China;
3 Clinic Research Center, the First Affiliated Hospital , University of South China, Hengyang, Hunan, 421001, China)*

ABSTRACT Objective: To construct a recombinant lentiviral vector to inhibit hsa-miR-20a expression and validation of its transduction efficiency in HL-60. **Methods:** Based on BD In-Fusion™ PCR cloning method, we designed and synthesized hsa-miR-20a gene with its promoter, then cloned it into a lentivirus vector GV159. After being conformed, the LV-hsa-miR-20a plasmid was co-transfected with packaging plasmid into 293T cells to obtain hsa-miR-20a lentivirus vector. Recombinant lentivirus was added to logarithmic growth phase HL-60 cells according to virus titer and MOI (multiplicity of infection) value, and its infection efficiency and hsa-miR-20a level were tested by fluorescent observation and real-time quantitative PCR respectively. **Results:** Hsa-miR-20a lower expressive lentiviral vector was constructed successfully, and virus titer was (8E+8)TU/mL. The infection efficiency of Recombinant lentiviruse in HL-60 cells reached 80%, and the expression level of hsa-miR-20a reduced effectively. **Conclusion:** The letiviral vector containing hsa-miR-20a with low expression was successfully constructed, which will be useful for researching the function of hsa-miR-20a in the future.

Key words: Hsa-miR-20a; Lentivirus; HL-60

Chinese Library Classification(CLC): Q75; Q78 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2015)05-804-04

前言

miR-17-92 基因簇位于人类染色体 13q31 上，编码 miR-17、miR-19a、miR-19b、miR-20a、miR-92a 等 6 个 miRNA[1,2]。miR-17-92 基因家族的不同成员有着各自不同的功能，如 miR-19 在急性淋巴细胞性白血病[3]、乳腺癌[4]中呈过度表达，表现为原癌基因。而 miR-17 在乳腺癌、卵巢癌中低表达，则表现为抑癌基因功能[5,6]。已有研究发现 miR-17-92 基因簇在人早幼粒细胞(HL-60)中高表达，降低 miR-19a、miR-19b 的表达可诱导 HL-60 细胞凋亡[7]。而 miR-20a 对粒细胞生物学性状的影响尚无文献报道，本研究拟构建 hsa-miR-20a 低表达慢病毒载体以实现 HL-60 细胞中 hsa-miR-20a 的表达变化，为深入研究其功能和机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

* 基金项目：国家自然科学基金项目(81100560)

作者简介：张熠(1989-)，女，硕士研究生，主要研究方向：ATD 导致粒细胞缺乏的发生机制，
电话：15886416202，E-mail：120479402@qq.com
△通讯作者：文格波，E-mail: gb_wen@aliyun.com

(收稿日期：2014-08-23 接受日期：2014-09-18)

1.1.1 **细胞、菌株与质粒** HL-60、293T 细胞购自上海吉凯生物公司，GV254 载体、pHelper 1.0、pHelper 2.0 载体为 Invitrogen 公司产品。

1.1.2 **主要试剂和仪器** Lipofectamine 2000（美国 Invitrogen 公司），In-Fusion™ PCR Cloning Kit（美国 BD 公司），质粒抽提试剂盒（美国 promega 公司），SYBR Master Mixture（大连宝生物公司），miRNA 提取试剂盒（天根公司）。荧光倒置显微镜（日本 Olympus 公司），酶联免疫检测仪（Bio-Tek 公司 ELX-800），凝胶成像分析系统（美国 Alpha Innotech 公司），高速低温离心机（德国 Eppendorf 公司），Real time PCR 仪器（日本 Takara 公司），Nanodrop 分光光度计（美国 Thermo 公司）。

1.2 **实验方法**

1.2.1 Hsa-miR-20a **前体序列的 PCR 扩增** 根据 hsa-miR-20a 所在基因组的 DNA 序列，在包含 pre-miR-20a 序列上下游约 100 bp 范围内，按照 In-Fusion™ PCR Cloning Kit 要求，由 Primer5.0 软件设计 PCR 引物，设计的引物片段交由大连宝生物合成。上游引物为(保护碱基 - 有 Age I 酶切序列 - 引物序列)：5'-CCGGTCTACCTGCACTATAAGCACTTTATTTTTG -3'，下游引物为（保护碱基 - 含有 EcoR I 酶切位点 - 引物序列）：5'-AATTCAAAAATAAAGT GCTTATAGTGCAGGTAG-3'。以外周血单个核细胞 DNA 为模板扩增。PCR 反应体系为：Taq polymerase 0.2 μL，模板 DNA 10 ng，10 μM 上、下游引物各 0.4 μL，dNTPs (2.5 mM) 1.6 μL，5× Taq buffer 4 μL，ddH_2O 补足至 20 μL。反应程序为：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，30 个循环；72 ℃ 终末延生 10 min。PCR 产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳分离，切胶回收目的片段。

1.2.2 Hsa-miR-20a **载体的构建** 纯化回收的 PCR 产物与慢病毒载体 GV159，以 2∶1 的摩尔数比例使用 T4 连接酶在 16℃ 下，过夜连接，连接产物转化 TOP10 感受态细胞，挑选出克隆经酶切鉴定阳性克隆送上海生物工程有限公司测序。

1.2.3 **慢病毒包装及病毒滴度测定** 转染前 24 h，用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞，以含 10 %胎牛血清培养基调整细胞密度为 1.2× 10^7 细胞 /20 mL，重新接种于细胞培养皿，37 ℃、5 % CO_2 培养箱内培养。24 h 待细胞密度达 70 %～80 % 时，将慢病毒表达质粒与制备的各 DNA 溶液(pGC-LV 载体 20 μg，pHelper 1.0 载体 15 μg，pHelper 2.0 载体 10 μg) 混合，与 Lipofectamine 2000 共转染至 293T 细胞的培养液中，混匀，于 37 ℃，5 % CO_2 细胞培养箱中培养。培养 8 h 换液，转染 48 h 后取细胞上清液，于 4 ℃，4000× g 离心 10 min，除去细胞碎片，以 0.45 μM 滤器过滤纯化后分装，于 -80 ℃ 冻存备用。取其中一支进行病毒生物学滴度测定。采用荧光法测定病毒滴度，取对数生长期 293T 细胞稀释至每毫升 4× 10^5 个接种于 96 孔板，根据病毒的预期滴度，呈 10 的倍数稀释后感染细胞。3 天后观察荧光表达情况，根据细胞荧光表达情况计算病毒滴度。

1.2.4 **慢病毒感染 HL-60 细胞** 将处于对数生长期的 HL-60 细胞悬液接种于 12 孔板中，37 ℃ 5 % CO_2 培养箱培养待细胞融合度达到约 50 %。根据细胞 MOI 值及病毒滴度，加入相应量的病毒。感染 24 h～96 h 后通过观察荧光表达情况判断感染效率。

1.2.5 qRT-PCR **检测 hsa-miR-20a 的表达** 收集细胞，使用 miRNA 抽提试剂盒提取总 miRNA，按 miRNA 逆转录试剂盒说明书进行逆转录。qPCR 反应体系为：2× miRNA Premix（含 SYBR，ROX）10 μL，上游引物（10 μM）0.5 μL，下游引物（10μM）0.5 μL，cDNA 1.0 μL，RNase-Free H_2O 补足至 20 μL。循环参数：预变性 94 ℃ 2 min 后，94℃ 20 s，60℃ 34 s，重复 40 个循环。

1.3 **统计学处理**

采用△△CT 法计算 hsa-miR-20a 表达量，内参 U6 进行校正。数据以($\bar{x}\pm s$)来表示，SPSS17.0 统计软件进行数据分析，组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 **慢病毒表达载体测序鉴定结果**

重组慢病毒质粒 LV-hsa-miR-20a 经 PCR 及测序鉴定，证实阳性克隆目的片段已正确插入载体克隆位点（图 1）。

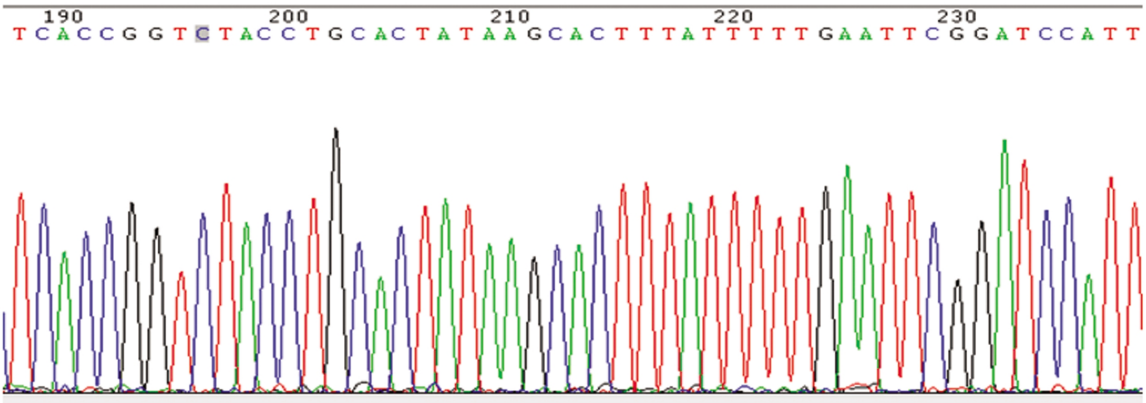


图 1 LV-hsa-miR-20a **测序鉴定结果**

Fig.1 LV-hsa-miR-20a sequencing results

2.2 **病毒滴度的检测**

以倍数稀释后不同浓度的病毒感染对数生长期的 293T 细胞，3 天后，荧光显微镜下观察 GFP 荧光表达情况（图 2）。计算病毒滴度为（8E+8）TU/mL。病毒包装量可满足进一步研究要求。

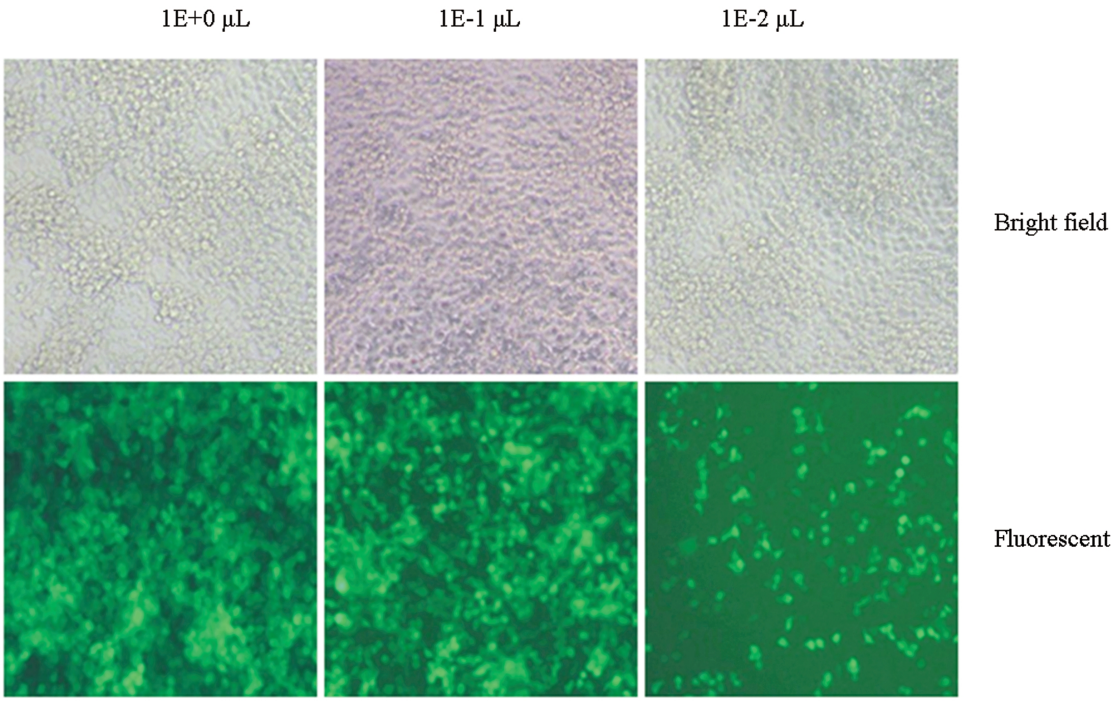


图 2 hsa-miR-20a 低表达慢病毒载体感染 293T 细胞后滴度荧光照片(× 100)

Fig.2 Flueorensce microscopic analyses of hsa-miR-20a lower expressive lentiviral vector transfected 293T cells(× 100)

2.3 HL-60 细胞慢病毒感染效率的检测

采用倒置荧光显微镜下观察感染后 24 h、48 h、72 h、96 h HL-60 细胞中 GFP 荧光表达情况,评价细胞感染效率。如图 3 所示:细胞在慢病毒感染后 24 h 到 72 h,感染效率逐渐增加,72 h 后呈下降趋势。后续试验可以选择 48 h、72 h 作为观察时间点进行研究。

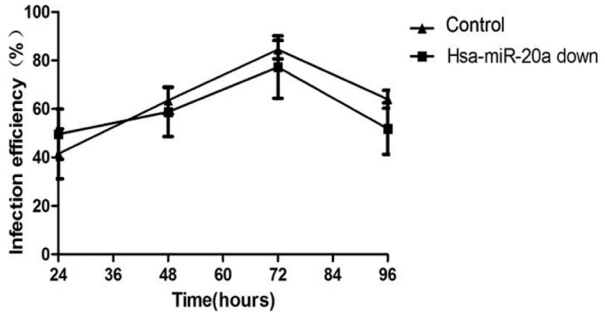


图 3 HL-60 细胞感染率

Fig. 3 Infection efficiency of HL-60 cells

2.4 Hsa-miR-20a 在 HL-60 细胞中的表达变化

根据上述感染效率检测结果,进一步观察慢病毒感染后 48 h、72 h 各组细胞 hsa-miR-20a 表达量的变化。如图 4 所示,低表达组 hsa-miR-20a 表达量在 48 h、72 h 分别分别是对照组的 0.51 和 0.47 倍(P< 0.01)。

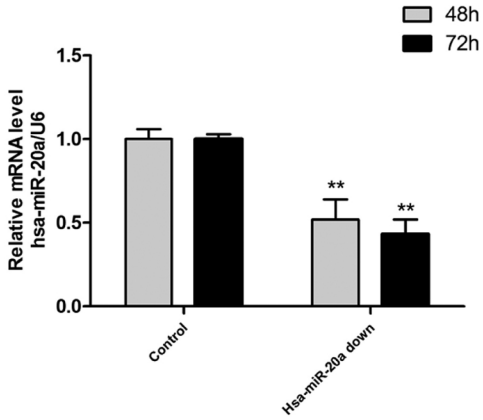


图 4 qRT-PCR 检测 hsa-miR-20a 的表达变化

Fig.4 Hsa- miR-20a level were tested by real-time quantitative PCR

3 讨论

目前改变细胞内 miRNA 表达的方法主要包括[8]:(1)按照成熟 miRNA 序列化学合成其模拟物(mimic)或抑制剂(inhibitor),mimic 能够显著提高成熟 miRNA 的表达,而 inhibitor 能够竞争性与成熟 miRNA 结合,阻止其正常行使功能。(2)构建 miRNA 表达载体,通过表达载体在细胞内转录、剪切形成成熟的 miRNA 或干扰其形成,达到过表达或低表达的效果。其中,化学合成法相对比较方便、经济,可以较快的获得结果,但无法应用于一些转染效率比较低的原代细胞、悬浮细胞、干细胞中,也无法实现稳定表达。而应用慢病毒表达载体无需转染试剂,转染效率高,实验周期短;对分裂期和非分裂期细胞均有感染作用,可在短时间内获得稳定表达特定 miRNA 的细胞株;可以根据需要选择各种报告基因,亲和标签及筛选抗性基因融合[9-11]。本研究中 HL-60 细胞为悬浮细胞,化学合成物模拟物及抑制剂转染效率较低,因此选择慢病毒表达载体更为合适。

Hsa-miR-20a 属于 miR17-92 家族成员之一[12,13]。目前已有的关于 hsa-miR-20a 的研究主要集中在肿瘤研究领域,hsa-miR-20a 作为一个原癌基因,在前列腺癌[14]、胃癌[15]、胆囊癌[16]、宫颈及卵巢癌[17,18]等实体瘤发病过程中都发挥着重要的作用。hsa-miR-20a 在肿瘤组织高表达可以抑制抑癌基因或激活原癌

基因而促进肿瘤细胞的增殖和转移，降低其表达可促进肿瘤细胞凋亡。在血液系统肿瘤中，目前已经发现 hsa-miR-20a 在骨髓异常增生综合症及 T 淋巴细胞白血病细胞中呈高表达，可以促进肿瘤细胞的增殖抑制其凋亡[19,20]，而 hsa-miR-20a 在急慢性粒细胞白血病的发生中的具体机制尚不明确。

通过本研究，我们成功构建了低表达 hsa-miR-20a 的慢病毒载体。hsa-miR-20a 病毒载体成功感染 HL-60 细胞，我们观察到，在低表达 LV-hsa-miR-20a 感染后 24 h～72 h，HL-60 细胞中感染效率逐渐增高，72 h 高峰时感染效率达到 80 %，此后呈下降趋势。我们进一步用 qRT-PCR 检测感染后细胞hsa-miR-20a 表达的变化，发现低表达组 hsa-miR-20a 表达量在 48 h、72 h 较对照组约降低 1 倍，成功实现 hsa-miR-20a 在 HL-60 细胞的低表达。本研究为进一步研究 hsa-miR-20a 对 HL-60 细胞（或其它高表达 hsa-miR-20a 细胞）生物学性状的影响及其机制的研究奠定了基础。

参 考 文 献(References)

[1] Sandhu S K, Fassan M, Volinia S, et al. B-cell malignancies in microRNA Emu-miR-17~92 transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(45): 18208-18213

[2] Van Haaften G, Agami R. Tumorigenicity of the miR-17-92 cluster distilled[J]. Genes Dev, 2010, 24(1): 1-4

[3] Ye H, Liu X, Lv M, et al. MicroRNA and transcription factor co-regulatory network analysis reveals miR-19 inhibits CYLD in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40 (12): 5201-5214

[4] Zhang X, Yu H, Lou J R, et al. MicroRNA-19 (miR-19) Regulates Tissue Factor Expression in Breast Cancer Cells [J]. J Biol Chem, 2011, 286(2): 1429-1435

[5] Hossain A, Kuo M T, Saunders G F. Mir-17-5p Regulates Breast Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Translation of AIB1 mRNA [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(21): 8191-8201

[6] Yu Z, Willmarth N E, Zhou J, et al. microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(18): 8231-8236

[7] 陈飞. miR-19a、miR-19b 在儿童急性淋巴细胞白血病中的表达分析及功能研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2012
Chen Fei. The expression and functional study of miR-19a, miR-19b in children with acute lymphoblastic leukenia[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2012

[8] Rubio-Somoza I, Weigel D, Franco-Zorilla J M, et al. ceRNAs: miRNA target mimic mimics[J]. Cell, 2011, 147(7): 1431-1432

[9] Furukawa N, Sakurai F, Katayama K, et al. Optimization of a microRNA expression vector for function analysis of microRNA[J]. J Control Release, 2011, 150(1): 94-101

[10] Hu T, Fu Q, Chen P, et al. Construction of an artificial MicroRNA expression vector for simultaneous inhibition of multiple genes in mammalian cells[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(5): 2158-2168

[11] Shin K J, Wall E A, Zavzavadjian J R, et al. A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(37): 13759-13764

[12] Sawera M, Gorodkin J, Cirera S, et al. Mapping and expression studies of the mir17-92 cluster on pig chromosome 11 [J]. Mamm Genome, 2005, 16(8): 594-598

[13] Huang G, Nishimoto K, Zhou Z, et al. miR-20a encoded by the miR-17-92 cluster increases the metastatic potential of osteosarcoma cells by regulating Fas expression [J]. Cancer Res, 2012, 72 (4): 908-916

[14] Pesta M, Klecka J, Kulda V, et al. Importance of miR-20a expression in prostate cancer tissue[J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3579-3583

[15] Li X, Zhang Z, Yu M, et al. Involvement of miR-20a in promoting gastric cancer progression by targeting early growth response 2 (EGR2) [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(8): 16226-16239

[16] Chang Y, Liu C, Yang J, et al. MiR-20a triggers metastasis of gallbladder carcinoma[J]. J Hepatol, 2013, 59(3): 518-527

[17] Kang H W, Wang F, Wei Q, et al. miR-20a promotes migration and invasion by regulating TNKS2 in human cervical cancer cells [J]. FEBS Lett, 2012, 586(6): 897-904

[18] Fan X, Liu Y, Jiang J, et al. miR-20a promotes proliferation and invasion by targeting APP in human ovarian cancer cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2010, 42(5): 318-324

[19] Vasilatou D, Papageorgiou S G, Kontsioti F, et al. Expression analysis of mir-17-5p, mir-20a and let-7a microRNAs and their target proteins in CD34+ bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes[J]. Leuk Res, 2013, 37(3): 251-258

[20] 吴顺泉,徐珍珍,林君,等.miR-20a 海绵载体构建及在白血病细胞株 Jurkat 中的表达[J]. 中国实验血液学杂志,2012,20(5):1056-1062
Wu Shun-quan, Xu Zhen-zhen, Lin Jun, et al. Construction of miRNA sponge targeting miR-20a and stable expression in Jurkat leukemia cell line [J]. Journal of Experimental Hematology, 2012, 20 (5): 1056-1062