



鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒的制备及其细胞感染率分析

刘静 张文建 褚衍凯 邢天宇 闫晓红 李辉 王宁*

农业部鸡遗传育种重点实验室/黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室/黑龙江省动物细胞与遗传工程重点实验室, 哈尔滨 150030

*通讯作者, wangning@neau.edu.cn

摘要 *MiR-17-92* 基因簇(*miR-17-92 cluster*) 在哺乳动物的细胞增殖、分化、凋亡、动物发育以及肿瘤发生等过程中发挥重要作用, 但是目前 *miR-17-92* 基因簇在鸡生长发育中的作用还不清楚。为了阐明 *miR-17-92* 基因簇在鸡(*Gallus gallus*) 生长发育中的作用和机制, 本研究构建了鸡 *miR-17-92* 基因簇的腺病毒表达载体。以鸡基因组为模板, 通过 PCR 扩增出鸡 *miR-17-92* 基因簇, 将其克隆至腺病毒表达系统穿梭质粒 *pacAd5 miR-GFP Shuttle Vector*, 获得重组穿梭质粒 *pacAd5-MiR-17-92 cluster*, 进而将其与骨架质粒 *pacAd5 9.2-100* 分别经 *Pac I* 酶切线性化后, 共转染 AD293 细胞, 经同源重组获得鸡重组腺病毒 *rAd5-MiR-17-92 cluster*。重组病毒扩增后, 采用半数细胞培养物感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 法测定病毒滴度, 采用 PCR 鉴定和测序鉴定重组腺病毒 *rAd5-miR-17-92 cluster*。结果显示重组腺病毒 *rAd5-MiR-17-92 cluster* 和空载体腺病毒 *rAd-control* 的滴度均达到 1×10^9 pfu/mL。PCR 扩增出了 879 bp 预期大小的特异产物; 测序结果与预期序列完全一致。将重组腺病毒感染永生化鸡前脂肪细胞, 实时 stem-loop RT-PCR 检测显示, 在重组腺病毒感染细胞 *miR-17-92* 基因簇中的 *miR-19a* 和 *miR-20a* 的表达量为对照组的 2.2 ± 0.2 倍 ($P < 0.01$)。将重组腺病毒分别感染 4 种人胚肾上皮细胞 (human embryonic kidney epithelial cell, HEK) 293A、293T、AD293 和 HEK293、永生化鸡前脂肪细胞 (immortalized chicken preadipocytes, ICPA)、鸡成纤维细胞 (chicken fibroblast cell, DF1)、人上皮细胞 (human epithelial cells, HaCaT) 和羊胚胎成纤维细胞 (sheep embryonic fibroblasts, SEF), 采用荧光显微镜观察判断病毒感染情况。结果发现, 重组腺病毒对上述 8 种细胞的感染效率不同, 其中, 在 4 种人胚肾上皮细胞 293A、293T、AD293 和 HEK293 中的感染效率很高, 在人上皮细胞及羊胚胎成纤维细胞中的感染效率中等, 但是在永生化鸡前脂肪细胞和鸡成纤维细胞中的感染效率较低。本研究成功构建的鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒为进一步研究 *miR-17-92* 基因簇在鸡生长发育中的作用及其机制提供研究工具。

关键词 鸡, *miR-17-92* 基因簇, 重组腺病毒, 感染率

中图分类号 S831 文献标识码 A

The Preparation and Infection Efficiency Analysis of the Recombinant Adenovirus Expressing Chicken (*Gallus gallus*) *miR-17-92* Cluster

LIU Jing ZHANG Wen-Jian CHU Yan-Kai XING Tian-Yu YAN Xiao-Hong LI Hui WANG Ning*

Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture / Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province / Key Laboratory of Animal Cellular and Genetic Engineering of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China

*Corresponding author, wangning@neau.edu.cn

Abstract The *miR-17-92* cluster plays crucial roles in cell proliferation, differentiation, apoptosis, animal

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31372299) 和农业部现代农业产业技术体系建设专项 (No. CARS-42)

收稿日期: 2017-02-22 接受日期: 2017-04-12

development and tumorigenesis in mammals. However, the roles and mechanisms of *miR-17-92 cluster* in chicken growth and development remain to be elucidated. To explore the roles and the mechanisms of *miR-17-92 cluster* in chicken growth and development, in this study, chicken *miR-17-92 cluster* was PCR amplified from chicken genomic DNA and ligated into pacAd5 *miR-GFP Shuttle Vector* to yield recombinant vector containing the chicken *miR-17-92 cluster*. The resultant vector pacAd5-*miR-17-92 cluster* and backbone plasmid pacAd5 9.2-100 were respectively linearized with *Pac I*, and then cotransfected into AD293 cells to generate the recombinant adenovirus expressing *miR-17-92 cluster*, named as rAd5-*miR-17-92 cluster*, by homologous recombination. The virus titer was determined by using TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) assay after the virus amplification. The recombinant adenovirus rAd5-*miR-17-92 cluster* was identified by PCR and sequencing. The recombinant adenovirus rAd5-*miR-17-92 cluster* and empty vector virus were inoculated into the immortalized chicken preadipocytes (ICPA), respectively, and the expression of *miR-17-92 cluster* member was detected by Real-time stem-loop RT-PCR. The results showed that the titers of both of recombinant adenovirus rAd5-*miR-17-92 cluster* and empty vector adenovirus rAd-control reached 1×10^9 pfu/ml. PCR identification showed a specific product of 879 bp was amplified from the recombinant adenovirus containing chicken *miR-17-92 cluster*, and sequencing result showed that the acquired sequence was identical to the expected sequence. Real-time stem-loop RT-PCR analysis showed the relative expression levels of *miR-19a* and *miR-20a*, two members of *miR-17-92 cluster*, were significantly increased to (2.2 ± 0.2) -fold in ICPA cells infected by recombinant adenovirus when compared with those in cells infected with empty vector virus ($P < 0.01$). Taken together, these results suggested the recombinant adenovirus rAd5-*miR-17-92 cluster* was successfully prepared. Four human embryonic kidney epithelial cells (HEK) (293A, 293T, AD293 and HEK293), ICPA cells, chicken fibroblast (DF1), human epithelial cells (HaCaT) and sheep embryonic fibroblasts (SEF) were individually infected by rAd5-*miR-17-92 cluster*, and infection efficiency was detected by fluorescence microscopy. The results showed that the infection efficiency of rAd5-*miR-17-92 cluster* was different in different cell types, it was high in 293A, 293T, AD293 and HEK293, moderate in HaCaT and SEF, but Low in ICPA and DF1 cells. Taken together, these data suggested that recombinant adenovirus expressing *miR-17-92 cluster* was successfully prepared, which can contribute to further study on the roles and mechanisms of *miR-17-92 cluster* in chicken growth and development.

Keywords Chicken (*Gallus gallus*), *MiR-17-92 cluster*, Recombinant adenovirus, Infection efficiency

MicroRNAs (miRNAs) 是一类大小约 22 个核苷酸的非编码 RNA 分子, 是一类重要的转录后基因表达调控因子, 通过碱基互补结合于靶基因 mRNA 的 3'UTR, 导致靶基因 mRNA 降解或翻译抑制, 从而调控靶基因的表达 (Chakraborty et al., 2016)。miRNA 在细胞增殖、分化、凋亡、发育、代谢以及疾病中发挥重要作用 (Musilova et al., 2015)。

miRNA 在染色体上常紧密相邻, 以基因簇形式存在。*miR-17-92* 基因簇是一个高度保守的 miRNA 基因簇。*miR-17-92* 基因簇包括七个成熟的 miRNA, 分别是 *miR-17* (*miR-17-5p* 和 *miR-17-3p*)、*miR-18a*、*miR-19a*、*miR-19b*、*miR-20a* 及 *miR-92* (Fujiwara et al., 2015)。近年来, 对哺乳动物的研究发现, *miR-17-92* 基因簇参与心、肺、免疫系统及血

管生长发育等过程 (Chen et al., 2016; Mao et al., 2016; Fiedler, Thum, 2016)。研究还发现, *miR-17-92* 基因簇在胆管癌和甲状腺癌等多种肿瘤细胞中均高表达。*miR-17-92* 基因簇能够抑制细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A)、酪氨酸磷酸酶蛋白 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 和促凋亡蛋白 (Bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim) 的表达, 促进淋巴瘤的发生 (Wu et al., 2015)。*miR-17-92* 基因簇是第 1 个被确认的非编码癌基因 (oncomiR-1) (Olive et al., 2010)。但也有报道称, *miR-17-92* 基因簇可以作为抑癌基因, 有研究证实 *miR-17-5p* 在乳腺癌中通过抑制乳腺癌扩增基因 1 (amplified in breast cancer, *AIB1*) 抑制乳腺癌细胞的增殖 (Hos-

sain et al., 2006)。目前, *miR-17-92* 基因簇在鸡(*Galus gallus*) 生长发育中的作用及其机制尚不十分清楚。本课题组前期的鸡前脂肪细胞小 RNA 重测序研究发现 *miR-17-92* 基因簇在鸡前脂肪细胞中表达(Yao et al., 2011); 进一步的研究还发现, 鸡 *miR-17-92* 基因簇成员 *miR-19a* 和 *miR-19b* 靶作用于细胞周期调控分子(Lin-9 DREAM MuvB core complex component, LIN9), 而 LIN9 能够抑制永生鸡前脂肪细胞的增殖(宋鹤等, 2016)。这些研究结果提示 *miR-17-92* 基因簇在鸡脂肪生成中发挥作用。除此之外, 有研究报道称 *miR-17-92* 基因簇成员 *miR-19b-3p* 通过靶作用于酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 1(Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1, ACSL1) 促进鸡前脂肪细胞的增殖, ACSL1 可参与不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸代谢、过氧化物酶体和代谢通路(Huang et al., 2015)。

本研究选用复制缺陷型人 5 型腺病毒表达系统, 构建了鸡 *miR-17-92* 基因簇的重组腺病毒, 并比较其对不同细胞的感染效率, 以期为今后研究 *miR-17-92* 基因簇在鸡生长发育中的作用及其作用机制提供研究工具。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 质粒、菌株及细胞

复制缺陷型人 5 型腺病毒表达系统 RAPAd[®] miRNA Adenoviral Expression System(穿梭质粒 pacAd5miR-GFP Shuttle Vector 和骨架质粒 pacAd5 9.2-100 Vector) 购自 Cell Biolabs 公司(美国); 感受态大肠杆菌 Top10 购自北京全式金生物技术有限公司; 人胚肾上皮细胞(human embryonic kidney epithelial cell, HEK) AD293 细胞由四川大学华西医院范川文先生惠赠; 人胚肾细胞 293A、293T、HEK293、永生鸡前脂肪细胞(immortalized chicken preadipocytes, ICPA)、鸡成纤维细胞(chicken fibroblast cell, DF1)、人上皮细胞(human epithelial cells, HaCaT) 和羊胚胎成纤维细胞(sheep embryonic fibroblasts, SEF) 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Pac I*、*BamH I*、*Nhe I* 和 *Xba I* 均购自 New England BioLabs 公司(美国); 蛋白酶

K、DNA 聚合酶(TranStart *Taq* DNA Polymerase)、T4 DNA 连接酶、DNA marker 和 RT-PCR 试剂盒等均购自宝生物工程有限公司(TaKaRa, 中国大连); 质粒提取试剂盒(大提)和 DNA 纯化试剂盒购自 Qiagen(德国); 脂质体 Lipofectamine[™] 2000 和 Trypsin-EDTA 购自 Invitrogen(美国); DMEM 培养基粉剂和胎牛血清购自 GIBCO(美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

本研究所用细胞 293A、293T、AD293、HEK293、DF1、HaCaT、SEF 细胞均培养于添加了 10% 胎牛血清及终浓度为 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基, ICPA 细胞培养于添加了 10% 胎牛血清及终浓度为 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM/F12 培养基, 均在 37 °C, 5% CO₂ 条件下进行传代培养, 24~48 h 传代 1 次。

1.2.2 重组腺病毒穿梭质粒的构建

根据 *miR-17-92* 基因簇在鸡基因组中的序列信息(chr1: 152 248 070-152 248 865), 设计 *miR-17-92* 基因簇的 PCR 扩增引物(*miR-17-92* cluster-F, *miR-17-92* cluster-R)(表 1), 并且在其上游引入 *BamH I* 酶切位点, 下游引入 *Xba I* 酶切位点。以鸡基因组为模板, PCR 扩增鸡 *miR-17-92* 基因簇, 扩增产物大小为 879 bp。PCR 反应体系为: 含模板 DNA(50 ng/μL) 1 μL、上下游引物(10 μmol/L) 各 0.2 pmol、dNTP(2.5 mmol/L) 1 μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.1 μL、10 x buffer 1 μL, 用灭菌双蒸水补足 10 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 为一个循环, 进行 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 最后 4 °C 保温 10 min。*miR-17-92* 基因簇的 PCR 扩增产物和穿梭质粒 pacAd5 miR-GFP Shuttle Vector 经 *BamH I* 和 *Nhe I* 酶切, 通过琼脂糖凝胶电泳后回收上述两种线性化载体。将线性化的 PCR 扩增产物和穿梭质粒 pacAd5 miR-GFP Shuttle Vector 进行连接, 常规方法转化大肠杆菌(*Escherichia coli*), 挑取菌落, 培养后提取质粒进行测序验证。

1.2.3 重组腺病毒的包装

将生长状况良好的 AD293 细胞接种于 60 mm 培养皿中, 待细胞融合度达 70% 时, 将 4 μg 重组腺

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称	引物序列(5'~3')	用途
Primer name	Primer sequence	Purpose
miR-17-92 cluster-F	CGGGAT <u>CCTTCTTTTCTTTC</u> CAGCAGG	miR-17-92 基因簇的扩增
miR-17-92 cluster-R	GCTCTAGATGTTTCAGCCTCTATCCC	Amplification of miR-17-92 cluster
miR-19a-F	ACACTCCAGCTGGGTGTGCAAATCTATGCAA	Real time stem-loop RT-PCR 表达分析
miR-19a-R	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTT- GAGTCAGTTTT	Real time stem-loop RT-PCR analysis
miR-20a-F	ACACTCCAGCTGGGTAAAGTGCTTATAGTGC	
miR-20a-R	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTT- GAGCTACCTGC	
URP	TGGTGTCTGGAGTCG	
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACAA	内参基因表达分析
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT	Real time reference genes RT-PCR analysis
YF	TTTGCACCATTTCTAAAGAAT	重组腺病毒 PCR 鉴定
YR	AAACCTCTTACATCAGTTA	Recombinant adenovirus PCR identification

单下划线表示 *Bam*H I 酶切位点, 双下划线表示 *Xba* I 酶切位点

*Bam*H I restriction site is underlined, and *Xba* I restriction site was double-underlined in the primer sequence

病毒穿梭质粒 *pacAd5-miR-17-92 cluster* 和 1 μ g 骨架质粒 *pacAd5 9. 2-100* 分别用 *Pac* I 酶切使之线性化, 然后用 DNA 纯化试剂盒进行纯化, 最后将纯化的两种线性化质粒混合, 利用 *Lipofecta mine*TM 2000 试剂转染已培养好的 AD293 细胞, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 7 d 后, 每日观察并隔天补换液, 待出现典型细胞病变(cytopathic effect, CPE)后, 收集细胞, 反复冻融 3 次, 离心弃细胞碎片, 收获重组腺病毒, 将其命名为 *rAd5-miR-17-92 cluster*, 置于 -80 $^{\circ}$ C 储存。

1.2.4 重组腺病毒的扩增

接种 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个 AD293 细胞于 T75 细胞培养瓶中, 待细胞融合度达 90% 时, 加入重组腺病毒 *rAd5-miR-17-92 cluster* 原液, 待大部分细胞出现典型的细胞病变, 且有 60%~80% 细胞脱壁时, 收集细胞, 制备病毒悬液, 步骤同 1.2.3。病毒进过 3~4 轮扩增后, 按照参考文献(李天寿等, 2015)的方法测定病毒滴度, 分装, 并置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 重组腺病毒的 PCR 鉴定

取 50 μ L 重组腺病毒液, 加入 2 μ L 蛋白酶 K (20 g/L), 56 $^{\circ}$ C 条件下反应 1 h, 沸水浴 5 min, 冰浴 30 s, 瞬时离心后取 2~5 μ L 的上清为模板, 利用腺病毒穿梭载体上的验证性引物(YR, YF)(表 1)进行 PCR 扩增 *miR-17-92* 基因簇。PCR 反应体系为: 含

重组腺病毒 DNA 模板 (50 ng/ μ L) 1 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.2 pmol、dNTP(2.5 mmol/L) 1 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 0.1 μ L、10 \times buffer 1 μ L, 用灭菌双蒸水补足 10 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 为一个循环, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保温 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 重组腺病毒的表达

将重组腺病毒 *rAd5-miR-17-92 cluster* 和空载腺病毒 *rAd5-control* 分别感染 ICPA 细胞, 48 h 后用 *Trizol* 试剂提取细胞总 RNA, 并测定总 RNA 浓度。取 RNA 1.0 μ g 为模板, 利用设计合成的 *miR-19a* 和 *miR-20a* 的茎环引物(miR-19a-R, miR-20a-R), 按照 *Promega Improm-II*(*Promega*)说明书合成 cDNA, 并按 *FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)* (*Roche*)说明书, 检测细胞中 *miR-17-92* 基因簇成员 *miR-19a* 和 *miR-20a* 的过表达情况。Real-time RT-PCR 反应体系: cDNA 模板 (50 ng/ μ L) 1.0 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.2 μ L, *FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)*(2 \times) 5 μ L, 用灭菌双蒸水补足 10 μ L。Real-time PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 复性延伸 60 s, 共 40 个循环。采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行 Real-time RT-PCR 检测分析。以 *U6* 基因为内参,

miR-19a, *miR-20a* 的上、下游引物分别为(*miR-19a-F*, *URP*)(*miR-20a-F*, *URP*)(表1)。

1.2.7 重组腺病毒对不同细胞的感染率的比较分析

分别接种 1×10^6 个的人胚肾上皮细胞 293A、293T、AD293 和 HEK293, ICPA 细胞、DF1 细胞、HaCaT 细胞以及 SEF 细胞共计 8 种细胞接种于 6 孔板中, 24 h 后, 将重组腺病毒 rAd5-*miR-17-92* cluster 以相同的感染复数(multiplicity of infection, MOI) (MOI=300) 分别感染这 8 种细胞, 感染后的 48 h 内, 在荧光显微镜(Leica 公司, 德国)下观察各个细胞的重组腺病毒 rAd5-*miR-17-92* cluster 感染效率。

1.2.8 统计学分析

应用 SPSS15.0 软件对实验数据进行统计学分析, 数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 采用方差分析进行各组间的差异比较分析, * $P < 0.05$ 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 鸡 *miR-17-92* 基因簇的 PCR 扩增

为构建 *miR-17-92* 基因簇的重组腺病毒穿梭载体, 设计 *miR-17-92* 基因簇克隆引物(*miR-17-92 cluster-F*, *miR-17-92 cluster-R*)(表 1), 引物的上、下游分别携带 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切位点, 以鸡基因组为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物预期大小为 879 bp。琼脂糖凝胶电泳分析显示, *miR-17-92* 基因簇的 PCR 扩增产物大小为 879 bp, 大小与预期一致(图 1), 表明成功扩增了鸡 *miR-17-92* 基因簇。

2.2 重组穿梭质粒和骨架质粒的酶切鉴定

腺病毒骨架质粒和穿梭载体需经 *Pac* I 线性化后共转染细胞, 在细胞内进行同源重组后获得重组腺病毒。与理论相符, 骨架质粒 pacAd5 9.2-100 经 *Pac* I 单酶切获得两条大小不同的片段, 分别为 33 和 2 kb(图 2)。鸡 *miR-17-92* 基因簇 PCR 扩增片段经 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切后插入腺病毒穿梭载体 pacAd5 *miR-GFP Shuttle Vector*, 获得重组穿梭质粒 pacAd5-*miR-17-92 cluster*。重组穿梭质粒经 *Pac* I 单酶切进行鉴定, 结果可见一条约 8.7 kb 的条带(图 3)。将酶切鉴定正确的重组穿梭质粒送上海英骏公司测序, 测序结果表明, 重组穿梭质粒所得序列跟上述 PCR 克隆片段序列完全一致(图 4)。

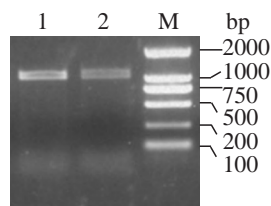


图 1 鸡 *miR-17-92* 基因簇的 PCR 扩增电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis analysis of the PCR products of chicken *miR-17-92* cluster

M: DNA 相对分子质量标准 Trans2K; 泳道 1~2: *miR-17-92* 基因簇 PCR 产物

M: Trans2K DNA marker; 1~2: PCR product of *miR-17-92* cluster

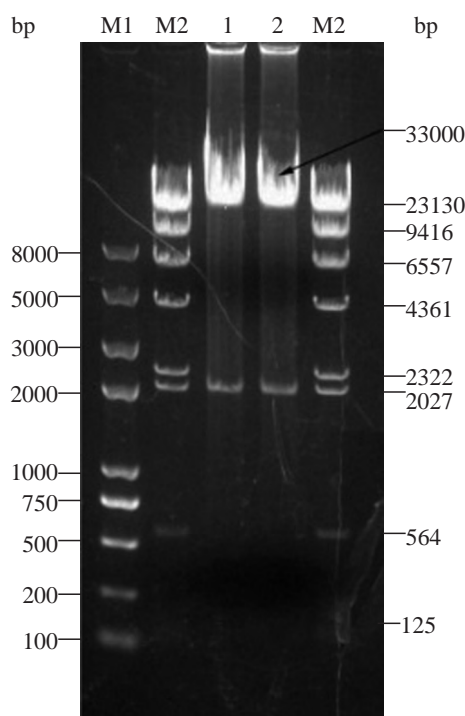


图 2 骨架质粒 pacAd5 9.2-100 的酶切鉴定

Figure 2 Restriction enzyme digestion of backbone plasmid pacAd5 9.2-100

M1: DNA 相对分子质量标准 Trans2K Plus II; M2: DNA 相对分子质量标准 λ -Hind III digest; 1~2: 骨架质粒 pacAd5 9.2-100 经 *Pac* I 酶切的产物

M1: Trans2K Plus II DNA marker; M2: λ -Hind III digested DNA marker; 1~2: Backbone plasmid pacAd5 9.2-100 digested with *Pac* I

2.3 鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒的包装

将重组腺病毒穿梭质粒 pacAd5-*miR-17-92 cluster* 和骨架质粒 pacAd5 9.2-100 分别用 *Pac* I 酶切使之线性化后共转染 AD293 细胞 24 h 后, 利用

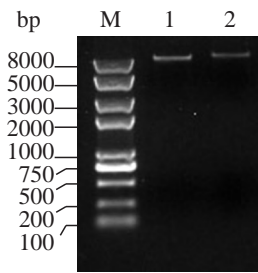


图3 重组穿梭质粒 *pacAd5-miR-17-92* 的单酶切鉴定

Figure 3 Restriction enzyme digestion of the recombinant plasmid *pacAd5-miR-17-92* cluster

M: DNA 相对分子质量标准 Trans2K Plus II ; 1: 质粒 *pacAd5-miR-control* 经 *Pac I* 酶切的产物; 2: 质粒 *pacAd5-miR-17-92* 经 *Pac I* 酶切的产物

M: Trans2K Plus II DNA marker; 1: *pacAd5-miR-control* digested with *Pac I* ; 2: *pacAd5-miR-17-92* digested with *Pac I*

荧光显微镜观察可见少量绿色荧光蛋白表达(图 5A), 且随着时间延长, 绿色荧光蛋白的表达数量

和强度逐渐增高, 至 14 d 时, 可见较多细胞变圆、脱落(图 5B)。该实验结果表明, *pacAd5-miR-17-92* cluster 质粒已成功在 AD293 细胞中包装为腺病毒。

2.4 鸡 miR-17-92 基因簇重组腺病毒的扩增

包装的重组腺病毒滴度较低, 病毒量比较少, 需经扩增来提高病毒滴度。为此, 将重组腺病毒重复感染 AD293 细胞, 当所有感染细胞变圆, 大约一半脱落时(通常在感染后 24~48 h)收集细胞, 反复冻融 3 次, 离心弃细胞碎片, 将收获的重组腺病毒 *rAd5-miR-17-92* cluster 置于 -80°C 储存。经 2 轮扩增后, 荧光显微镜观察可见大量成团的绿色荧光, 较多细胞变圆, 脱落(图 6)。经过每一轮的扩增, 病毒滴度会增加 10~100 倍, 一般经过 4 轮即可获得高滴度病毒液。

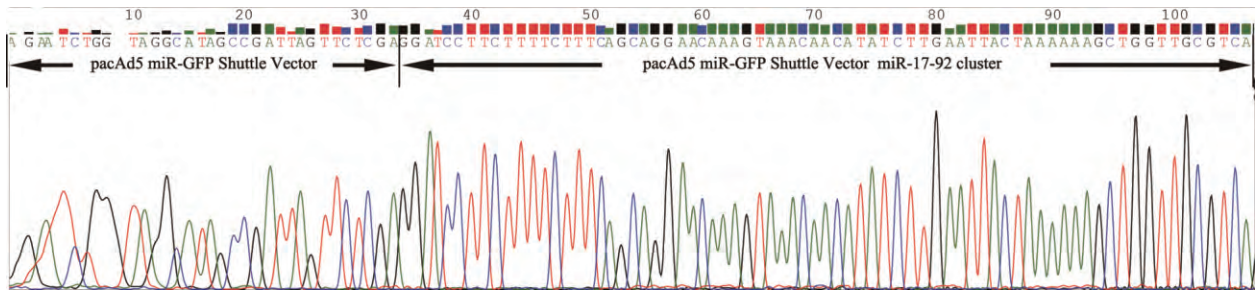


图4 *pacAd5-miR-17-92* 基因簇质粒测序图谱

Figure 4 Sequencing of *pacAd5-miR-17-92* cluster

pacAd5-miR-17-92 基因簇质粒所测序列由左至右分别为: 部分腺病毒穿梭载体 *pacAd5 miR-GFP Shuttle Vector* 序列及部分 *miR-17-92* 基因簇扩增序列

The acquired sequence of *pacAd5-miR-17-92* cluster from left to right: the partial sequence of the *pacAd5 miR-GFP Shuttle Vector* and the partial sequence of *miR-17-92* cluster

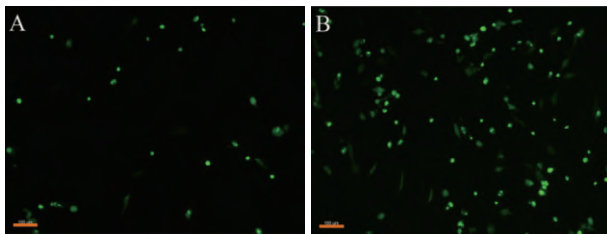


图5 重组腺病毒的包装(标尺=100 μm)

Figure 5 Fluorescent microscopy of the AD293 cells co-transfected with *pacAd5-miR-17-92* cluster and *pacAd5 9.2-100* (Bar=100 μm)

A: 转染后 24 h 的荧光照片; B: 转染后 10 d 的荧光照片

A: Fluorescent image of the AD293 cells at 24 h after transfection; B: Fluorescent image of the AD293 cells at 10 d after transfection

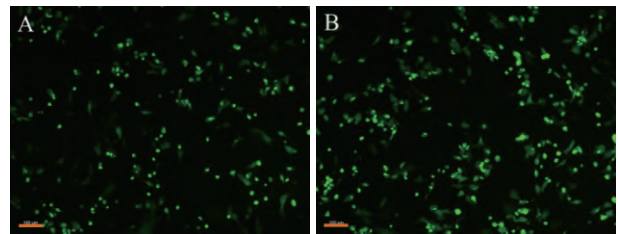


图6 重组腺病毒的扩增(标尺=100 μm)

Figure 6 Amplification of the recombinant adenovirus *rAd5-miR-17-92* cluster (Bar=100 μm)

A: 第 1 轮扩增后 2 d 的荧光照片; B: 第 2 轮扩增后 2 d 的荧光照片

A: Fluorescent image of the AD293 cells at 2 d after first round amplification; B: Fluorescent image of the AD293 cells at 2 d after the second round amplification

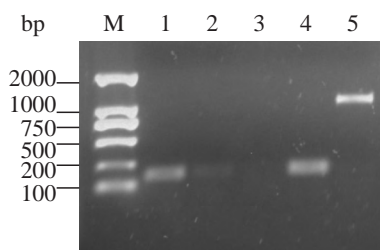


图7 鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒的PCR鉴定

Figure 7 Identification of the recombinant adenoviruses encoding *miR-17-92* cluster by PCR

M: DNA 相对分子质量标准 Trans2K; 1, 2, 4: rAd5-control 的 PCR 产物; 3: 无模板(阴性对照); 5: rAd5-*miR-17-92* cluster 的 PCR 产物

M: Trans2K DNA marker; 1, 2 and 4: PCR product of rAd5-control; 3: No template (Negative control); 5: PCR product of rAd5-*miR-17-92* cluster

2.5 重组腺病毒的滴度测定

将获得的病毒液梯度稀释后,接种细胞,观察细胞病变并计数。在稀释度为 $10^1 \sim 10^6$ 的孔中的细胞均出现细胞病变,稀释度为 10^7 、 10^8 和 10^9 的孔的阳性率依次为 0.9、0.8 和 0.3(阳性率为同一稀释度下细胞病变孔数占总孔数的百分比),稀释度为 $10^{10} \sim 10^{13}$ 的孔的阳性率均为 0。根据半数细胞培养物感染量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)方法计算得出,重组腺病毒 rAd5-*miR-17-92* cluster 滴度为 $10^{(8.2+0.8)} = 10^9$ pfu/mL。

2.6 鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒的鉴定

为了确认包装出的重组腺病毒携带鸡 *miR-17-92* 基因簇,以重组腺病毒 rAd5-*miR-17-92* cluster 的 DNA 为模板,用腺病毒穿梭载体 pacAd5 *miR-GFP* Shuttle Vector 上的特异性引物进行鉴定(YR, YF)(表 1)(特异性引物可以扩增腺病毒穿梭载体上 *Bam*H I 和 *Nhe* I 两个酶切位点间的序列),进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳分析显示,空载腺病毒 rAd5-control 的 PCR 产物可见 153 bp 的条带,而重组腺病毒 rAd5-*miR-17-92* cluster 的 PCR 产物可见 1 023 bp(含部分载体序列及 879 bp *miR-17-92* 基因簇)的特异条带(图 7),表明该重组腺病毒携带鸡 *miR-17-92* 基因簇。

2.7 鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒的表达验证

为确认鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒能否表达 *miR-17-92* 基因簇,将 rAd5-*miR-17-92* cluster 腺

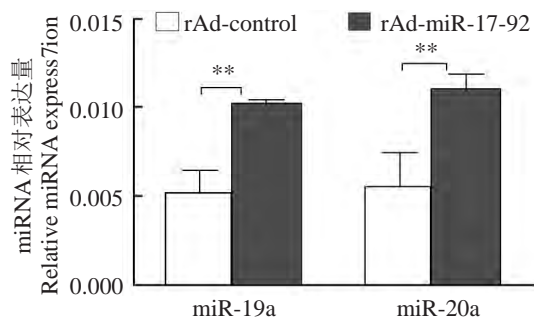


图8 实时定量PCR检测 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒在 ICPA 细胞中的表达

Figure 8 MiRNA expression analysis of the recombinant adenovirus rAd5-*miR-17-92* cluster in ICPA cells by Real-time stem-loop RT-PCR

n=3, *U6* 作为内参基因; **: $P < 0.01$

n=3, *U6* was used as an internal control; **: $P < 0.01$

病毒接种 ICPA 细胞,48 h 后,采用 real-time stem-loop RT-PCR 检测 ICPA 细胞中 *miR-17-92* 基因簇的 2 个成员 miR-19a 和 miR-20a 的表达情况(图 8)。与对照组空载体病毒 rAd-control 感染的细胞相比,实验组细胞中 miR-19a 和 miR-20a 的表达量极显著地高于对照组($P < 0.01$),表达量为对照组的 2.2 ± 0.2 倍,这表明本研究构建的 rAd5-*miR-17-92* cluster 腺病毒能够成功表达 *miR-17-92* 基因簇。

2.8 鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒对不同细胞感染效率的比较

为了解鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒对不同细胞的感染效率,并为下一步的鸡 *miR-17-92* 基因簇功能分析研究奠定基础,将重组腺病毒 rAd5-*miR-17-92* cluster 分别接种 4 种人胚肾上皮细胞(293A, 293T, AD293 和 HEK293)、ICPA 细胞、DF1 细胞、HaCaT 细胞及 SEF 细胞共 8 种细胞,采用荧光显微镜观察其对上述 8 种不同细胞的感染效率。结果显示,感染后 48 h,重组腺病毒 rAd5-*miR-17-92* cluster 在 4 种人胚肾上皮细胞 293A、293T、AD293 和 HEK293 中的感染效率很高,在 HaCaT 细胞和 SEF 细胞中的感染效率中等,但是在 ICPA 细胞及 DF1 细胞中的感染效率较低(图 9)。

3 讨论

本研究采用 RAPAd[®] miRNA 腺病毒表达系统,成功获得了高滴度的鸡 *miR-17-92* 基因簇重组腺病毒。通过对不同细胞的感染效率研究发现,重

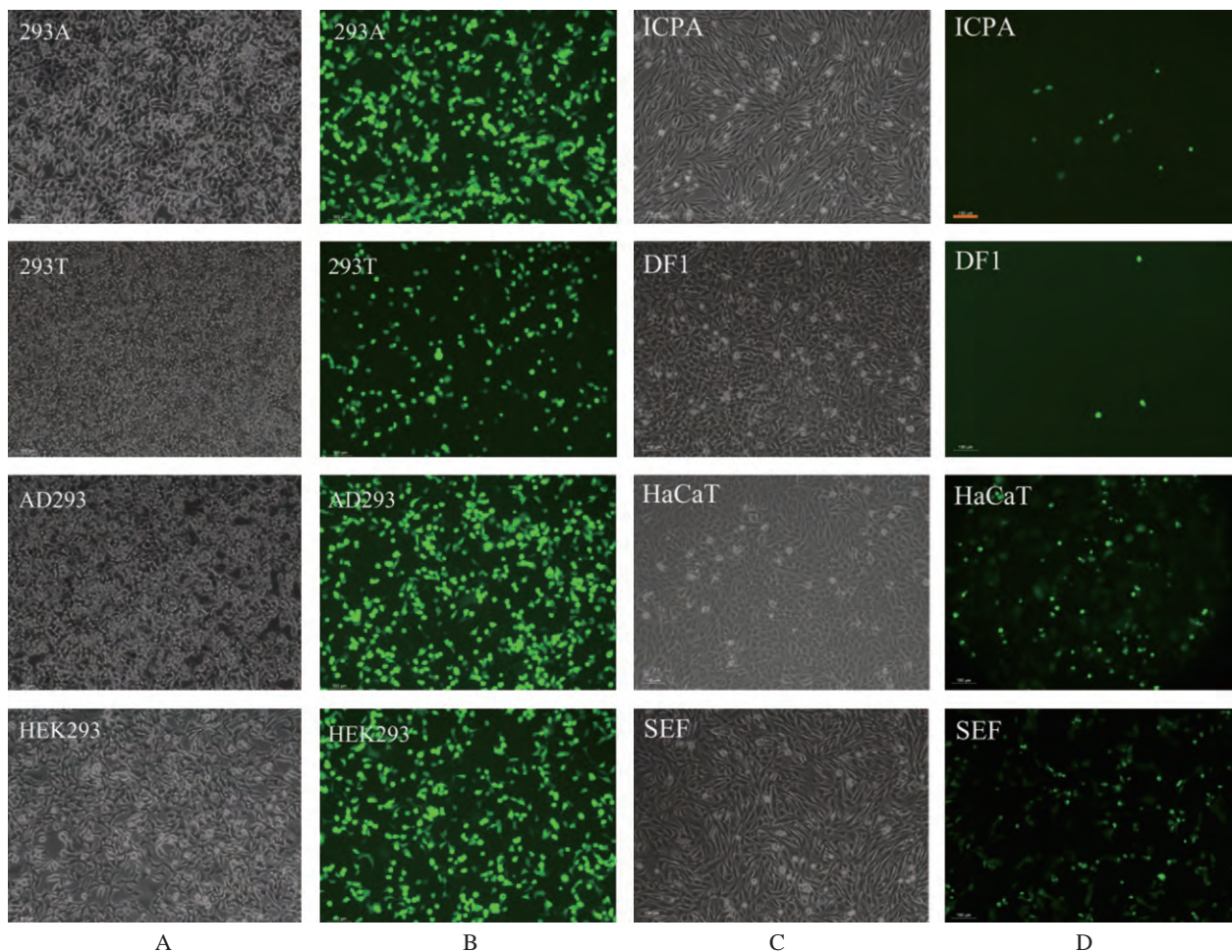


图9 重组腺病毒对不同细胞感染效率的比较分析(标尺=100 μm)

Figure 9 Comparison analysis of the infection efficiency of recombinant adenovirus rAd5-*miR-17-92* cluster in different cell types (Bar=100 μm)

A和B: 重组腺病毒rAd5-*miR-17-92* cluster感染4种人胚肾细胞(293A、293T、AD293和HEK293)的普通光学显微镜和荧光显微镜的照片; C和D: 重组腺病毒rAd5-*miR-17-92* cluster感染永生代鸡前脂肪(ICPA)、鸡成纤维细胞(DF1)、人上皮细胞(HaCaT)和羊胚胎成纤维细胞(SEF)的普通光学显微镜和荧光显微镜的照片

Light microscopy (A) and fluorescence microscopy images (B) of four human embryonic kidney cells (293A, 293T, AD293 and HEK293) infected by recombinant adenoviruses. Light microscopy (C) and fluorescence microscopy images (D) of immortalized chicken preadipocytes (ICPA), chicken fibroblast cells (DF1), human epithelial cells (HaCaT) and sheep embryonic fibroblasts (SEF) infected by recombinant adenoviruses

组腺病毒rAd5-*miR-17-92* cluster在4种人胚肾上皮细胞(293A, 293T, AD293和HEK293)、HaCaT细胞以及SEF细胞的感染效率较高,但在ICPA细胞和DF1细胞中的感染效率较低。本研究的结果与文献报道的重组腺病毒对人胚肾上皮细胞(293A, 293T, AD293和HEK293)、HaCaT细胞以及SEF细胞的感染效率相一致(Saha et al., 2014; 吴晓萍等, 2007; 张存芳等, 2012)。对哺乳动物的研究证实, 重组腺病毒能够在肺、肌肉和大脑等相对静止的组织

和细胞中稳定表达目的基因(Rauschhuber et al., 2012),且对人胚肾上皮细胞、HaCaT细胞以及SEF细胞有较高的感染效率(Martin et al., 2015; 邹小辉等, 2016)。与本研究结果相一致,傅安静等(2008)也曾报道人源复制缺陷型腺病毒载体对鸡胚成纤维细胞(CEF)的感染效率为22.3%。这些研究表明,人源腺病毒可能对鸡细胞的感染效率确实较低。实时定量PCR结果显示,与对照组相比,重组腺病毒rAd5-*miR-17-92* cluster在ICPA细胞中的过表达效果并不高。此结果与本研究的结论中的重组腺病毒在鸡细胞中的感染效率较低是一致的。

腺病毒进入靶细胞的路径是通过识别靶细胞表面的腺病毒受体而使细胞对腺病毒发生内吞作用(马春玲, 卢山, 2008)。目前已知,腺病毒的感染效率不仅与MOI有关,还受到靶细胞膜表面的受体的影响,靶细胞膜表面的受体表达量越高,腺病毒的感染效率就越高(Communal et al., 2003)。腺病毒首先与靶细胞膜上具有高亲和力的柯萨奇腺病毒受体(coxsackie-adenovirus receptor, CAR)结合(Bergelson et al., 1997; Hidaka et al., 1999),然后再经腺病毒五邻体基座上的RGD序列(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)与细胞膜上的整合素家族成员($\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$)相互作用,从而使细胞膜发生内吞,包裹腺病毒,由微管运输至宿主细胞核从而发挥作用。细胞膜上的整合素家族成员($\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha 3\beta 1$)均可以识别RGD序列,从而促进靶细胞对腺病毒的内吞作用(Wickham et al., 1993; Davison et al., 1997; Ruoslahti, 1996)。Communal等(2003)发现在老化的心肌细胞中, $\alpha 3\beta 1$ 的表达是降低的,而阻断 $\beta 1$ 表达后会进一步减少腺病毒的感染效率,结果说明整合素家族成员($\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha 3\beta 1$)能够影响腺病毒的感染效率。本研究中重组腺病毒rAd5-*miR-17-92* cluster对ICPA细胞和DF1细胞的感染效率低的原因可能是这两种鸡细胞中的整合素($\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha 3\beta 1$)表达较低,导致靶细胞对腺病毒的内吞作用不完全;也有可能是由于ICPA细胞及DF1细胞表面的腺病毒CAR受体较少导致腺病毒感染效率较低。

本研究制备*miR-17-92*基因簇重组腺病毒载体的目的是为了采用基因过表达方法开展*miR-17-92*基因簇在鸡生长发育中的作用和作用机制。虽然本研究成功制备了高滴度的*miR-17-92*基因簇重组腺病毒,但是细胞感染效率分析发现,重组腺病毒rAd5-*miR-17-92* cluster对ICPA细胞和DF1细胞的感染效率较低,这导致无法直接利用这一重组腺病毒开展*miR-17-92*基因簇的功能分析。下一步本课题组将尝试一些办法来提高病毒感染效率。目前提高腺病毒感染效率的方法有很多,常用的方法有聚凝胺(polybrene)法,聚凝胺可以增强重组腺病毒的细胞感染效率(高爱君等, 2015),但是之前本课题组在实验过程中加入聚凝胺后并没有明显提高鸡细胞感染效率(结果未发表)。此外,用高分子聚合物修饰腺病毒表面可以改变腺病毒感染细胞的路径从而提高腺病毒的感染效率。Meunier等研究发

现许多高分子聚合物(如阳离子聚合物和脂类)能够克服来自腺病毒表面与表皮细胞的电荷排斥力,从而提高腺病毒对癌细胞的感染效率,增强腺病毒介导的基因转移(Meunier-Durmort et al., 1997; Fernandez, Rice, 2009; van der Poel et al., 2002; Park et al., 2006)。聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)是众所周知的一种阳离子聚合物,易与DNA形成紧密的复合物,并通过静电吸引与细胞膜结合,通过内吞作用进入细胞(Lee et al., 2012)。经过修饰的PEI可与脱氧胆酸(deoxycholic acid, DA)在水中形成聚合物,通过共价键结合或者静电力作用,将此种高分子聚合物修饰到病毒衣壳上,可以使腺病毒不被CAR识别即能通过内吞作用进入细胞从而提高腺病毒对靶细胞的感染效率(Chae et al., 2011)。未来将在腺病毒载体上尝试使用高分子聚合物修饰腺病毒来提高重组腺病毒rAd5-*miR-17-92* cluster对鸡细胞的感染效率。后续将利用构建的重组腺病毒分析*miR-17-92*基因簇在鸡脂肪生成中的作用及其作用机制。如果上述办法都不能有效提高重组腺病毒的感染效率,将尝试制备*miR-17-92*基因簇的重组逆转录病毒或慢病毒,进而开展*miR-17-92*基因簇在鸡生长发育中的作用研究。

4 结论

本研究成功构建了鸡*miR-17-92*基因簇重组腺病毒,感染永生化鸡前脂肪细胞后成功检测到了miR-19a和miR-20a的表达。细胞感染率分析表明,重组腺病毒对人胚肾上皮细胞的感染效率很高,对人上皮细胞及羊胚胎成纤维细胞中的感染效率中等,但对鸡前脂肪细胞和鸡成纤维细胞感染效率较低。本研究构建的鸡*miR-17-92*基因簇重组腺病毒为深入研究*miR-17-92*基因簇在鸡生长发育中的作用提供研究工具。

参考文献

- 傅安静, 汤承, 李定霏, 等. 2008. 腺病毒载体介导的GFP在鸡胚成纤维细胞中的表达及RNA干涉[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 34(02): 276-280. (Fu A J, Tang C, LI D F, et al. 2008. The expression and RNAi of GFP gene adenovirus vector mediated in chick embryo fibroblast cells[J]. Journal of Southwest University for Nationalities(Natural Science Edition), 34(02): 276-280.)

- 高爱君, 司维柯, 赵宸, 等. 2015. 聚凝胺增强 Ror2 重组腺病毒感染 K562 细胞效应的研究[J]. 解放军医学杂志, 40(12): 976-980. (Gao A J, Si W K, Zhao H, et al. 2015. Polybrene enhances infection effect of Ror2 recombinant adenovirus on K562 cells[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 40(12): 976-980.)
- 李天寿, 李桥川, 苏丽华, 等. 2015. 促血管生成素-1 基因重组腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 广西医学, 37(2): 140-142. (Li T S, Li Q C, Su L H, et al. 2015. Construction and identification of recombinant adenovirus vectors carrying angiopoietin-1 gene[J]. Guangxi Medical Journal, 37(2): 140-142.)
- 马春玲, 卢山. 2008. 人类腺病毒受体的研究进展[J]. 微生物与感染, 3(04): 238-242. (Ma C L, Lu S. 2008. The research progress of human adenovirus receptor[J]. Journal of Microbes and Infection, 3(04): 238-242.)
- 宋鹤, 张潇飞, 褚衍凯, 等. 2016. 鸡 miR-19a、miR-19b 通过靶向抑制 LIN9 促进前脂肪细胞增殖[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 32(08): 943-952. (Song H, Zhang X F, Chu X K, et al. 2016. Chick miR-19a and miR-19b promote chicken preadipocyte proliferation by targeting LIN9 [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 32(08): 943-952.)
- 吴晓萍, 曾耀英, 贺芳. 2007. 腺病毒介导重组 hKGF 基因转染 HaCat 细胞及其表达[J]. 中国生物工程杂志, 27(03): 1-5. (Wu X P, Zeng Y Y, He Fang. 2007. Recombinant adenovirus infected HaCat cells express human keratinocyte growth factor (hKGF) [J]. China Biotechnology, 27(03): 1-5.)
- 张存芳, 王令, 任刚, 等. 2012. 靶向绵羊 MSTN 基因的锌指核酸酶腺病毒表达载体的构建及活性验证[J]. 畜牧兽医学报, 43(08): 1192-1199. (Zhang C F, Wang L, Ren Gang, et al. 2012. Construction and detection of the adenoviral vector encoding zinc-finger nucleases targeted to MSTN in Sheep[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 43(08): 1192-1199.)
- 邹小辉, 肖蓉, 郭小娟, 等. 2016. 一种经 miniSOG 标记的人腺病毒的制备[J]. 病毒学报, 32(1): 32-38. (Zou X, Xiao R, Guo X, et al. 2016. Preparation of recombinant human adenoviruses labeled with miniSOG[J]. Chinese Journal of Virology, 32(1): 32-38.)
- Bergelson J M, Cunningham J A, Droguett G, et al. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5[J]. Science, 275(5304): 1320-1323.
- Chae S Y, Kim H J, Lee M S, et al. 2011. Energy-independent intracellular gene delivery mediated by polymeric biomimetics of cell-penetrating peptides[J]. Macromolecular Bioscience, 11(9): 1169-1174.
- Chakraborty C, Sharma A R, Patra B C, et al. 2016. MicroRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronic myeloid leukemia[J]. Oncotarget, 7(27): 42683-42697.
- Chen T, Zhou Q, Tang H, et al. 2016. miR-17/20 controls prolyl hydroxylase 2 (PHD2)/hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) to regulate pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. Journal of the American Heart Association, 5(12): e004510.
- Communal C, Huq F, Lebeche D, et al. 2003. Decreased efficiency of adenovirus-mediated gene transfer in aging cardiomyocytes[J]. Circulation, 107(8): 1170-1175.
- Davison E, Diaz R M, Hart I R, et al. 1997. Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16[J]. Journal of virology, 71(8): 6204-6207.
- Fernandez C A, Rice K G. 2009. Engineered nanoscaled polyplex gene delivery systems[J]. Molecular Pharmaceutics, 6(5): 1277-1289.
- Fiedler J, Thum T. 2016. New insights into miR-17-92 cluster regulation and angiogenesis[J]. Circulation Research, 118(1): 9-11.
- Fuziwara C S, Kimura E T. 2015. Insights into regulation of the miR-17-92 cluster of miRNAs in cancer[J]. Frontiers of Medicine (Lausanne), 2:64.
- Hidaka C, Milano E, Leopold P L, et al. 1999. CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts[J]. Journal of clinical investigation, 103(4): 579-587.
- Hossain A, Kuo M T, Saunders G F. 2006. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA[J]. Molecular and Cellular Biology, 26(21): 8191-8201.
- Huang H Y, Liu R R, Zhao G P, et al. 2015. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in abdominal adipose tissues in chickens[J]. Scientific Reports, 5:16132.
- Lee D, Kim D, Mok H, et al. 2012. Bioreducible crosslinked polyelectrolyte complexes for MMP-2 siRNA delivery into human vascular smooth muscle cells[J]. Pharmaceutical Research, 29(8): 2213-2224.
- Mao J T, Xue B, Smoake J, et al. 2016. MicroRNA-19a/b mediates grape seed procyanidin extract-induced anti-neoplastic effects against lung cancer[J]. Journal of nutrition-

- al biochemistry, 34: 118-125.
- Martin V, Pascual E, Avia M, et al. 2015. Protective efficacy in sheep of adenovirus- vectored vaccines against blue-tongue virus is associated with specific T cell responses [J]. PLoS One, 10(11): e143273.
- Meunier-Durmort C, Grimal H, Sachs L M, et al. 1997. Adenovirus enhancement of polyethylenimine- mediated transfer of regulated genes in differentiated cells[J]. Gene Therapy, 4(8): 808-814.
- Musilova K, Mraz M. 2015. MicroRNAs in B-cell lymphomas: How a complex biology gets more complex[J]. Leukemia, 29(5): 1004-1017.
- Olive V, Jiang I, He L. 2010. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 42(8): 1348-1354.
- Park T G, Jeong J H, Kim S W. 2006. Current status of polymeric gene delivery systems[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 58(4): 467-486.
- Rauschhuber C, Noske N, Ehrhardt A. 2012. New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells[J]. European Journal of Cell Biology, 91(1): 2-9.
- Ruoslahti E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 12: 697-715.
- Saha B, Wong C M, Parks R J. 2014. The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion[J]. Viruses, 6(9): 3563-3583.
- van der Poel H G, Molenaar B, van Beusechem V W, et al. 2002. Epidermal growth factor receptor targeting of replication competent adenovirus enhances cytotoxicity in bladder cancer[J]. Journal of Urology, 168(1): 266-272.
- Wickham T J, Mathias P, Cheres D A, et al. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment[J]. Cell, 73(2): 309-319.
- Wu Y, Heinrichs J, Bastian D, et al. 2015. MicroRNA-17-92 controls T-cell responses in graft-versus-host disease and leukemia relapse in mice[J]. Blood, 126(11): 1314-1323.
- Yao J, Wang Y, Wang W, et al. 2011. Solexa sequencing analysis of chicken pre-adipocyte microRNAs[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 75(1): 54-61.

(责任编辑 任立刚)