

骨外科

DOI: 10.11699/cyxh20131101

Let-7a 稳定转染尤文肉瘤细胞系的建立

张中卒¹, 黄路², 虞志明¹, 张政³, 韩智敏¹, 杨东¹, 詹平¹, 曹凯¹

(1. 南昌大学第一附属医院骨科, 南昌 330006; 2. 江西省妇幼保健院儿童保健科, 南昌 330006;

3. 重庆医科大学基础医学院生物与遗传学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建携带 let-7a 基因的真核表达载体, 建立稳定转染该质粒的尤文肉瘤(Ewing's sarcoma, ES)细胞株 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a。**方法:**通过 Gateway 克隆技术, 扩增 attB1-K-eGFP-let-7a-1-attB2 片段, 与 pDONR221 进行 BP 重组反应产生入门克隆, 再与母载体——pLV.Des2d.P/neo 进行 LR 重组反应, 生成目的质粒——pLV.Des2d.P/neo-EF1A>eGFP/let-7a; 通过 PCR 及测序验证目的质粒; 将携带 let-7a 的重组慢病毒质粒稳定转染 ES 细胞株 A673 和 SK-ES-1 获得 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a 细胞株; 通过 real-time PCR 检测稳定转染细胞株内 let-7a 的表达水平, Western blot 检测其靶基因 CDK6 的表达。**结果:**PCR 证实获得的目的条带与理论值相符, 测序分析证实携带 let-7a 的真核表达载体插入序列及位点正确; real-time PCR 及 Western blot 检测结果显示, 与转染空载质粒及未处理组的 A673、SK-ES-1 细胞株相比, 稳定转染重组目的基因的 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a 细胞高表达 let-7a, 分别达到 8.5 倍($P=0.000$)和 6.5 倍($P=0.001$), 差异具有统计学意义; 且细胞内 let-7a 靶基因 CDK6 的表达量明显减少。**结论:**成功构建稳定表达 let-7a 的 ES 细胞株 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a。

【关键词】let-7a; 尤文肉瘤; A673 细胞; SK-ES-1 细胞; 慢病毒**【中国图书分类法分类号】**R738.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-03-22

Establishment of Ewing's sarcoma cell lines stably expressing let-7a

ZHANG Zhongzu¹, HUANG Lu², YU Zhiming¹, ZHANG Zheng³,HAN Zhimin¹, YANG Dong¹, ZHAN Ping¹, CAO Kai¹

(1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Nanchang University; 2. Department of Child Care, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital; 3. Teaching and Research Section of Biology and Genetics, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct a eukaryotic expression plasmid carrying let-7a and to establish the Ewing's sarcoma(ES) cell line A673 and SK-ES-1 stably expressing let-7a. **Methods:** Fragment of attB1-K-eGFP-let-7a-1-attB2 coding let-7a was amplified using Gateway protocols. The let-7a gene was recombined with donor vector pDONR221 to construct an entry plasmid pDONR221-eGFP-let-7a, which forwarded to recombine with pLV.Des2d.P/neo to reconstruct pLV.Des2d.P/neo-EF1A>eGFP/let-7a. PCR and sequencing were used to confirm the plasmid. Lenti-let-7a transfected ES cell lines A673/let-7a and SK-ES-1/let-7a which can stably express let-7a were screened out. A673/let-7a and SK-ES-1/let-7a were confirmed by real-time PCR. Western blot analysis was performed to detect the expression of CDK6 in A673/let-7a and SK-ES-1/let-7a cells, which was the target gene of let-7a. **Results:** PCR results confirmed that the value of target fragment was consistent with the theoretic value. Sequencing analysis showed that let-7a was correctly inserted into the pLV.Des2d.P/neo-EF1A>eGFP/let-7a plasmid. Real-time PCR indicated that the expression of let-7a was increased remarkably in A673/let-7a and SK-ES-1/let-7a compared with that of control and blank cells; expressing values of let-7a were as high as 8.5 folds($P=0.000$) and 6.5 folds($P=0.001$) in A673/let-7a and SK-ES-1/let-7a respectively. Western blot analysis showed that ectopic expression of let-7a down-regulated the expression of CDK6. **Conclusions:** ES cell lines A673/let-7a and SK-ES-1/let-7a which can stably express let-7a are successfully established.

【Key words】let-7a; Ewing's sarcoma; A673 cells; SK-ES-1 cells; lentivirus

作者介绍: 张中卒, Email: zhangzhongzu@126.com,

研究方向: 恶性骨肿瘤基础与临床。

通信作者: 曹凯, Email: osteo.caokai@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81060221, 81260399);

江西省自然科学基金资助项目(编号: 2009GQY0204)。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长约 18~24 个核苷酸的非编码的单链 RNA 分子,最早于 1993 年由 Lee 等^[1]在线虫中发现,它具有序列特异性调节基因表达的功能,存在于多种生物基因组内,序列具有高度保守性。miRNA 主要在转录后水平发挥调控作用,抑制蛋白质翻译或导致 mRNA 的降解^[1-2]。miRNA 控制着约 40%~50% 的蛋白质编码基因,从而构成了一个庞大的转录后调控网络,参与细胞中各种基本生命过程的调控,包括发育、凋亡和细胞增殖。同时,miRNA 与肿瘤的发生也密切相关,大约 50% 已阐明的 miRNA 在基因组上定位于与肿瘤相关的脆性位点,这说明 miRNA 在肿瘤发生、发展过程中起了至关重要的作用^[3-9]。let-7a 是目前研究最为广泛的 miRNA 之一,通过作用于下游相关基因的 3'-UTR 区从而相应调节相关基因的表达。最近研究显示 let-7a 在多种肿瘤中表达下调^[10],充当“抑癌基因”的角色。拮抗乳腺癌 MT-1 细胞株以及宫颈癌 Hela 细胞中 let-7a 的表达,发现拮抗细胞内源性 let-7a 表达后的肿瘤细胞黏附、侵袭能力增加,且在营养缺失的环境下细胞的存活时间更长^[11]。这表明其在肿瘤的生物治疗中具有良好的前景。

近年研究发现,尤文肉瘤 (Ewing's sarcoma, ES) 细胞中 let-7a 表达明显减少^[12],提示 let-7a 与 ES 的发生、发展密切相关,但是其具体的作用机制还不十分清楚。本研究运用 Gateway 克隆技术构建携带 let-7a 基因表达载体,然后通过重组慢病毒转染 ES 细胞株 A673 和 SK-ES-1,获得稳定表达 let-7a 的 ES 细胞 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a,为进一步研究 let-7a 在 ES 中的功能、作用机制以及今后的生物治疗奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

新生牛血清为 PAA 公司产品;OPTI-MEM、H-DMEM+10%FBS、RPMI1640、McCoy's 5A 培养基、0.25%胰酶、Lipofectamine 2000、Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix、Gateway® LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix 购自 invitrogen 公司;QIAquick Gel Extraction Kit 购自 QIAGEN 公司;质粒小提试剂盒购自 TIANGEN 公司;Taq DNA Polymerase、dNTP Mix、GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder 购自 Fermentas 公司;PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase 为 Takara 公司产品;鼠抗人 CDK6 抗体和兔抗人 GAPDH 抗体 (Cell Signaling 公司);辣根过氧化物酶标记的

山羊抗小鼠、山羊抗兔的二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司);X 线片 (柯达公司)。

1.2 pDONR221-eGFP-let-7a 载体和 pLV.Des2d.P/neo-EF1A>eGFP/let-7a 载体的构建及鉴定

通过 PCR 技术扩增 attB1-K-eGFP-let-7a-1-attB2 片段,引物设计如下:attB1-K-EGFP-F (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCACCATTGCTGAGCAAGGGCG-AGGA-3');EGFP-R (5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3');EGFP-let-7a-1-F (5'-GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGTGTAAGAGGGTGATTTCTGAATCTT-3');attB2-let-7a-1-R (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCTGGAATGGAAGTACAATCTC-3'),将扩增好的片段割胶回收,根据 Gateway 克隆技术进行 BP 反应重组,将 100 ng attB1-K-eGFP-let-7a-1-attB2,100 ng 质粒 pDONR221 以及 1 μl BP Clonase™ II,TE buffer 混合 (总体积 5 μl)置于 EP 管中,25 ℃,BP 反应 1 h;加入 0.5 μl 蛋白激酶 K (2 μg/μl);37 ℃ 孵育 10 min 终止 BP 反应;取 2 μl BP 反应产物转化后接种于含卡那霉素的 LB 培养基,37 ℃ 孵育过夜后挑取单克隆菌落,在含卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 ℃ 振荡 12 h,再将菌接种至含氯霉素的固体培养基中 37 ℃ 培养 24 h,上述双重筛选初步验证 BP 反应产生入门克隆 pDONR221-eGFP-let-7a。

将测序验证的入门克隆质粒进行 LR 反应,取 13.02 ng pDONR 221-eGFP-let-7a、60.41 ng 母载体 pLV.Des2d.P/neo、12.89 ng pUp-EF1A、1 μl LR Clonase™ II 和 TE buffer 混合 (总体积 5 μl)置于 EP 管中,混匀后于 25 ℃,LR 反应 16 h,加入 0.5 μl 蛋白激酶 K (2 μg/μl);37 ℃ 孵育 10 min 终止 LR 反应;取 2 μl LR 反应产物转化后接种于含 100 μg/ml 氨苄西林的固体 LB 培养基,37 ℃ 孵育过夜后挑取单克隆菌落,同上步骤中经过含氯霉素的固体 LB 培养基的双重筛选,挑选出符合条件的菌落进行进一步扩增。根据质粒提取试剂盒的方法提取质粒。琼脂糖凝胶电泳及测序分析入门克隆 pDONR221-eGFP-let-7a 和重组目的质粒 pLV.Des2d.P/neo-EF1A>eGFP/let-7a。入门克隆使用测序引物,pUpDo-flank-F: 5'-CGGCCAGTCTTAAGCTCGGG-3';pUpDo-flank-R: 5'-AATACGACTCACTATAGGGGA-3'。PCR 鉴定引物:pUpDo-flank-F: 5'-CGGCCAGTCTTAAGCTCGGG-3';pUpDo-flank-R: 5'-AATACGACTCACTATAGGGGA-3'。重组目的质粒使用测序引物,pLV-Final-internal-F: 5'-CAAGTTTGTAC-AAAA-AAGCAGGCT-3';pLV-Final-internal-R: 5'-AGCCTGCTT-TTTTGTACAACTTG-3'。PCR 鉴定引物:pLV-Final-internal-F: 5'-CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3';pLV/Final-internal/tail-R: 5'-CACTTTGTACAAGAAAGCTGG-3'。成功构建的重组质粒命名为 pLV.Des2d.P/neo-EF1A>eGFP/let-7a。反应过程示意图如图 1 所示。

1.3 细胞培养

A673、SK-ES-1 细胞系购自于美国 ATCC 细胞库。细胞用含 10% 胎牛血清、10 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的

培养基(A673 细胞使用 RPMI1640 培养基;SK-ES-1 细胞使用 McCoy'5A 培养基)在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度的条件下培养,待其贴壁生长至 80%~90%汇合率时用含 0.25%的胰蛋白酶-EDTA 消化进行传代。

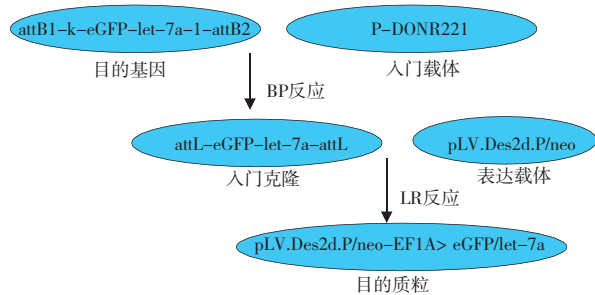


图 1 Gateway 技术构建 let-7a 表达载体示意图

Fig.1 Construction of eukaryotic expression plasmid carrying let-7a by Gateway

1.4 重组慢病毒载体的包装

取细胞状态良好,处于对数生长期的 293FT 细胞,细胞计数后,按照每个 10 cm 的培养皿 5×10^6 个细胞数接种于培养皿中,37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养过夜,用 Lipofectamine 2000 转染试剂分别转染 pLV/helper-SL3、pLV/helper-SL4、pLV/helper-SL5、目的质粒(各 4 μg),转染后 24 h,更换 10 ml 含 10%血清 DMEM 培养液,放置培养箱中继续培养,分别收集 48 h 和 72 h 的病毒上清液,收集好的病毒上清,将上清液进行浓缩后分装进 2 个 0.5 ml 进口 AXYGEN 管中,每管 100 μl。测得病毒原液的病毒滴度为: 5×10^8 TU/ml 后将分装好的病毒放置 -80℃ 保存备用。

1.5 细胞感染与稳转细胞的筛选

转导前 1 d 将 A673、SK-ES-1 细胞分别接种于 T25 培养瓶中培养,待密度达到 80%~90%时进行转导,设置 let-7a、eGFP 以及空白组,向 let-7a 以及 eGFP 组分别转导 30 μl 的 lenti-let-7a-eGFP/Neo 和 lenti-eGFP/Neo 病毒液,7 h 后更换培养基,48 h 后于荧光显微镜下观察转导效果。待细胞长满后,将 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a 和 A673/GFP、SK-ES-1/GFP 细胞接种至加入 G418 6 孔板中进行药筛,每 2 d 换液 1 次,直至空白细胞全部凋亡,给纯化后的 A673/GFP、SK-ES-1/GFP 换上新鲜的 10%FBS 完全培养基继续培养。而 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a 细胞低密度接种培养,至细胞形成克隆后在荧光显微镜下挑取纯度较高的克隆接种于 12 孔板中,扩增培养足够细胞量后取部分细胞与对照细胞进行 real-time PCR 检测。

1.6 Real-time PCR 检测

Trizol 法提取稳定转染细胞株 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a、A673/GFP、SK-ES-1/GFP 细胞及未处理的 A673、SK-ES-1 细胞的总 RNA,并逆转录生成 cDNA,再以 cDNA 为模板,进行 real-time PCR 扩增。以 U6 作为内参,设计引物如下: let-7a-F: 5'-GCGCCTGAGGTAGTAGGTTG-3'; let-7a-R: 5'-CACTGCAGGTTCCGAGGT-3'。U6-F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCATATACT-3'; U6-R: 5'-ACGCTTCACGAATTTGCG-

TGTC-3'。PCR 反应条件为 95℃ 30 s 后 95℃ 5 s,60℃ 20 s,循环 40 次,PCR 扩增结束后绘制熔解曲线,对目的基因的表达采用 2^{-ΔΔCt} 法行相对定量分析。

1.7 Western blot 检测 CDK6 的表达

收取细胞,提取总蛋白并用 BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 处理的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温振荡封闭 2 h,鼠抗人的一抗 CDK6 按 1:1 000 稀释;兔抗人的一抗 GAPDH 按 1:20 000 稀释,4℃ 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,加入 CDK6 相应山羊抗鼠的二抗(1:8 000 稀释);GAPDH 相应山羊抗兔的二抗(1:80 000),室温孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,ECL 化学发光,暗室显影。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 15.0 软件对数据进行统计分析,全部数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入门克隆和重组目的质粒的鉴定

BP 反应产物—入门克隆质粒(图 2A)和 LR 反应产物—重组目的质粒(图 2B),测序结果均与 GenBank (NR_029476.1) 中 let-7a 基因序列吻合,表明目的基因在预期位点成功插入,且序列正确。入门克隆和重组目的载体转化大肠杆菌后,挑取阳性克隆菌落 PCR 扩增后,入门克隆质粒 PCR 产物经脂糖凝胶电泳显示条带大小为 1 650 bp,与理论值相符(图 3A);重组目的质粒 PCR 产物经脂糖凝胶电泳显示条带大小为 1 450 bp,与理论值相符(图 3B)。表明入门克隆 pDONR221-eGFP-let-7a 和重组目的质粒 pLV.Des2d.P/neo-EF1A>eGFP/let-7a 构建成功。

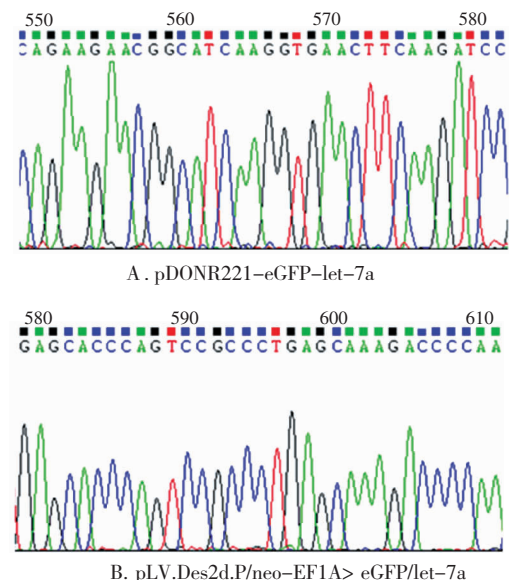
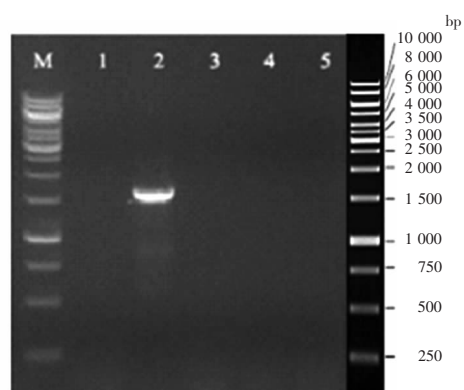
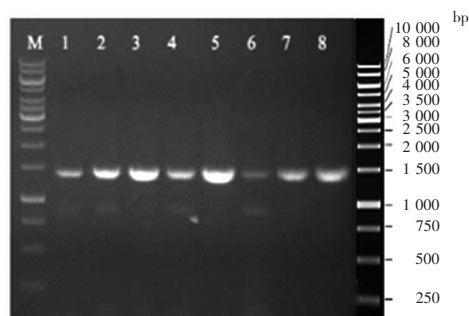


图 2 重组质粒的测序

Fig.2 Sequencing analysis of recombinant plasmids



A. pDONR 221-eGFP-let-7a



B. pLV.Des2d.P/neo-EF1A>eGFP/let-7a

图 3 重组质粒的构建以及鉴定

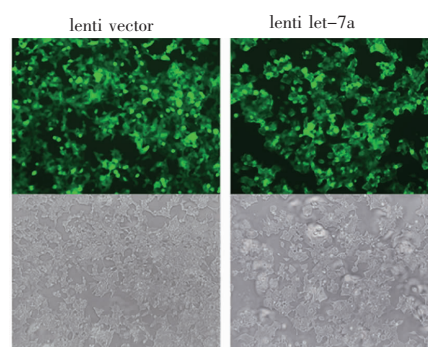
Fig.3 Construction and identification of recombinant plasmid

2.2 Let-7a 稳定转染 ES 细胞系结果

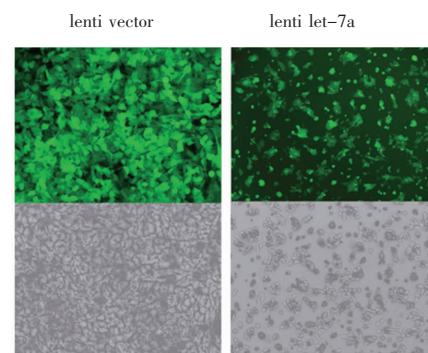
使用上述构建的慢病毒表达质粒 lenti-let-7a-eGFP/Neo 和对照质粒 lenti-eGFP/Neo 在 293FT 细胞中包装产生重组慢病毒颗粒。由于慢病毒表达质粒携带有绿色荧光蛋白基因,故可以通过观察荧光强度检测包装时的感染效率,倒置荧光显微镜观察培养的细胞可见 90% 以上的细胞都带有绿色荧光标记(图 4A)。收集、浓缩病毒颗粒用于感染 A673、SK-ES-1 细胞。图 4B、图 4C 显示了表达 let-7a 的重组慢病毒(lenti-let-7a)和对照慢病毒(lenti-vector)感染 A673、SK-ES-1 细胞后,荧光细胞的比例约 90% 以上,说明感染效率也在 90% 以上。

2.3 Let-7a 在稳定转染 ES 细胞系中的表达

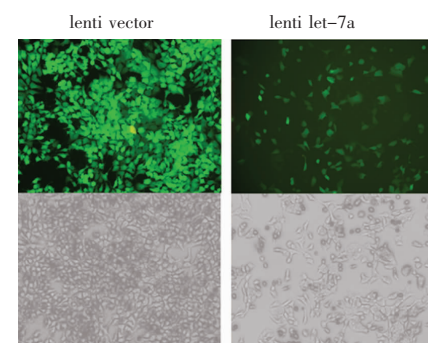
Real-time PCR 结果显示(图 5),转染目的质粒后 A673 细胞中 let-7a 组(8.716 ± 0.885)的表达量较未转染组(1.144 ± 0.475)和对照组(1.000 ± 0.485)而言增加约 8.5 倍($F=140.97$, $P=0.000$, let-7a 组与未转染组两两比较 $P=0.000$, let-7a 转染组与对照组两两比较 $P=0.000$)。SK-ES-1 细胞中 let-7a 组(6.516 ± 1.023)的表达量较未转染组(1.124 ± 0.365)和对照组(1.000 ± 0.455)而言增加约 6.5 倍($F=64.35$, $P=0.000$, let-7a 组与未转染组两两比较 $P=0.001$, let-7a 组与对照组两两比较 $P=0.000$)。A673/GFP、SK-ES-1/GFP 与未处理 A673 和 SK-ES-1 细胞相比,let-7a 表达水平无统计学差异($P=0.830$, $P=0.793$),结果表明 let-7a 在 ES 细胞中表达成功,稳定转染细胞系构建成功。



A. 293FT 细胞



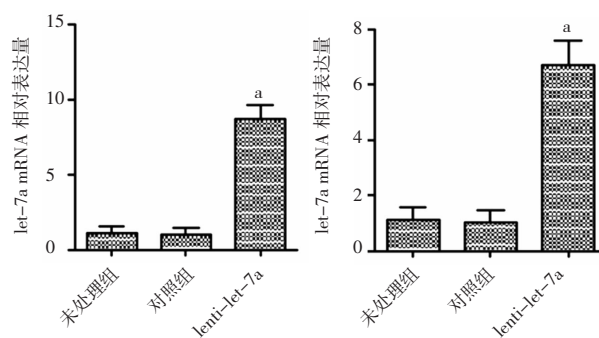
B. A673 细胞



C. SK-ES-1 细胞

图 4 重组慢病毒的包装和感染

Fig.4 Packaging and infection of recombinant lentivirus



a. 与另外 2 组相比,差异有统计学意义

A. let-7a 在 A673 细胞病毒感染后的表达检测

B. let-7a 在 SK-ES-1 细胞病毒感染后的表达检测

图 5 let-7a 被细胞病毒感染后的表达

Fig.5 Expression of let-7a after cell virus infection detected by real-time PCR

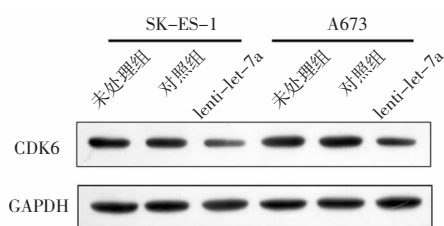


图6 Western blot 检测过表达 let-7a 的 A673、SK-ES-1 细胞中 CDK6 表达量的变化

Fig.6 Expression of CDK6 in A673 and SK-ES-1 cells detected by Western blot

2.4 Western blot 检测过表达 let-7a 细胞内 CDK6 表达量的变化

Western blot 结果显示(图6),CDK6 在 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a 中的平均灰度值分别为 0.402 ± 0.005 、 0.489 ± 0.006 ;在未转染组为 1.242 ± 0.360 、 1.068 ± 0.145 ;在对照组为 1.089 ± 0.068 、 0.946 ± 0.012 。数据表明过表达 let-7a 的 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a 细胞中的 CDK6 表达量均明显低于未转染组(A673 细胞组中 $F=13.349$, $P=0.006$, let-7a 组与未转染组两两比较 $P=0.003$, let-7a 组与对照组两两比较 $P=0.007$,而未转染组与对照组两两比较 $P=0.409$;SK-ES-1 细胞组中 $F=40.59$, $P=0.000$, let-7a 组与未转染组两两比较 $P=0.000$, let-7a 组与对照组两两比较 $P=0.001$,而未转染组与对照组两两比较 $P=0.125$)。CDK6 是 let-7a 的靶基因之一,过表达 let-7a 后 CDK6 表达量减少,与实验结果相符,表明在 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a 细胞中过表达的 let-7a 是有生物学活性的。

3 讨论

Let-7 是研究得较多的 miRNA 之一。目前认为 let-7 家族有 10 个成员,共来自于 13 个 pre-let-7 (let-7a-1、let-7a-2、let-7a-3、let-7b、let-7c、let-7d、let-7e、let-7f-1、let-7f-2、let-7i、let-7g、miRNA-98 和 miRNA-202)。现在普遍认为 let-7 是抑癌基因,并且在多种肿瘤组织呈低水平表达^[10]。miRNA 芯片结果显示在肺癌组织中 let-7 家族的表达水平呈现特异性的降低^[13]并且降低量与患者的预后以及术后生存期呈正相关^[14]。De 等^[12]横向比较了间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)与 3 例 ES 原代细胞以及 4 株 ES 细胞系(A673、TC252、SK-ES-1、STA-ET-8.2)中 let-7 的表达水平,发现后两者的 let-7 水平较 MSCs 明显偏低。之后他们用 A673 构建了 ES 小鼠模型,运用外源性的 let-7a 治疗带瘤小鼠发现治疗后的小鼠肿块生长速度较未治疗组明显降低,并且其 2 个下游靶基因 HMGA2 和 LIN28B 的表

达量也下降。但 let-7a 对 ES 发生发展的影响却还不清楚,如果能明确地了解 let-7a 的作用机理并且运用于 ES 的治疗,将会为其治疗带来新的平台。

随着 miRNA 功能研究的不断深入,miRNA 的表达方法也趋于多样化,而 miRNA 质粒表达载体构建仍然是研究其功能的重要基础之一,具有许多不可替代的优势。编码 miRNA 的基因序列在 RNA 聚合酶 II (pol II) 的作用下被转录成几 kb 的初级 miRNA(primary miRNA, pri-miRNA),在胞核内 pri-miRNA 被 Drosha 酶分解为具有茎环结构的 70 nt miRNA 前体(pre-miRNA)。Pre-miRNA 经 Exportin-5 转运到细胞质,由 Dicer 酶切割及 RNA 解旋酶作用形成成熟 miRNA 和马上被降解的 miRNA。由于 miRNA 在细胞质中的成熟过程与 siRNA 非常相似,都依赖于核糖核酸酶 Dicer 的剪切过程,理论上只要能够在细胞质中表达出 miRNA 的前体,就可以经过细胞自身的 Dicer 酶剪切而形成成熟体 miRNA。let-7a-1、let-7a-2 与 let-7a-3 都是 let-7a 的前体,本实验模拟内源性 miRNA,设计编码人工 miRNA 前体的序列(let-7a-1),与质粒重组后转染 ES 细胞,构建完成的 let-7a 稳定表达的 ES 细胞株,为今后 let-7a 在 ES 发病机制以及治疗的研究提供了理论模型。

Gateway 克隆技术是 invitrogen 公司发明的一项基于 lambda 噬菌体位点的特异性重组反应。其主要运用 BP 和 LR 重组反应体系来构建载体^[15]。BP 反应(BP recombination)是利用 1 个含有 attB 位点 DNA 片段和 1 个含有 attP 位点供载体发生重组反应,使末端含有 attB 重组位点的 PCR 产物插入含有 attP 位点的供载体中,创建 1 个含有 attL 位点的入门克隆。之后,直接把含有 attL 位点的入门载体和含有 attR 位点的目的载体的 2 种 DNA 分子混合,加入由整合酶、宿主整合因子和噬菌体切割酶构成的 LR 克隆酶混合物,产生了含有 attB 位点表达目的的表达载体^[16]。与传统的克隆技术相比,该项技术:(1)大大地简化了基因克隆和胶片段回收的步骤,只需更换反应的酶以及载体即可完成质粒的构建;(2)典型的克隆效率高达 95%或者更高;(3)快速、高特异性地将异源 DNA 片段克隆到不同的载体中^[17];(4)由于 Gateway 技术中起到重组作用的是重组位点:attB、attP、attL 和 attR^[18],各项重组反应中质粒两端的接头不同,能够很好地解决目的基因连入的方向问题。同时,在中间载体和表达载体上的

ccdB 自杀基因可以降低载体构建过程中的假阳性^[19], 确保了克隆的高度正确性。在植物表达载体的构建中, 这种技术已经得到广泛应用, 在国外 Gateway 克隆技术已普遍应用于生物医学, 但在国内仍未被广泛应用。本实验采用了 Gateway 克隆技术快速有效地构建了重组目的质粒 pLV.Des2d.P/neo-EF1A>eGFP/let-7a。

本研究的测序结果表明目的基因在预期位点成功插入且序列正确, 入门克隆以及目的质粒的 PCR 结果显示均与理论值相符, 表明质粒构建成功。由于慢病毒表达质粒携带有绿色荧光蛋白基因, 故可以通过观察荧光强度检测包装时的感染效率, 倒置荧光显微镜观察培养的 A673 细胞中可见 90% 以上的细胞都带有绿色荧光标记, 表明包装病毒成功转染了 A673 细胞。运用 real-time PCR 法检测了转染后的 A673 以及 SK-ES-1 细胞, 发现转染目的质粒的细胞中 let-7a 表达量较对照组以及未转染组明显上升, 证明重组质粒成功地在 ES A673 以及 SK-ES-1 细胞中稳定表达。多项实验已经证实 CDK6 是 let-7a 的直接靶基因^[20], CDK6 的 3'UTR 区存在 let-7a 的结合位点, let-7a 能够靶向调节 CDK6, 影响肿瘤细胞的周期、增殖和凋亡。课题组检测了细胞中 CDK6 的表达, 发现过表达 let-7a 细胞中的 CDK6 表达量减少, 与理论相符, 表明在 A673/let-7a、SK-ES-1/let-7a 细胞中过表达的 let-7a 是有生物学活性的。

本研究成功构建了携带 let-7a 的绿色荧光蛋白真核表达载体, 建立了稳定表达 let-7a 的 ES 细胞系 A673/let-7a 和 SK-ES-1/let-7a, 并且证明了 let-7a 在 ES 细胞中同样能够靶向调节 CDK6 的表达。为进一步研究 let-7a 在 ES 发生、发展中的作用机制以及在今后肿瘤治疗中的运用奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V, et al. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] Wightman B, Ha I, Ruvkun G, et al. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C.elegans*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 855-862.
- [3] Chang T C, Mendell J T. MicroRNAs in vertebrate physiology and human disease[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007, 8: 215-239.
- [4] Stefani G. Roles of microRNAs and their targets in cancer[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7(12): 1833-1840.
- [5] Martin B L, Kimelman D. Developmental biology: micro(RNA)-managing nodal[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(22): 975-977.
- [6] Corbin R, Olsson C K, Slack F, et al. The role of microRNAs in synaptic development and function[J]. *BMB Rep*, 2009, 42(3): 131-135.
- [7] Cordes K R, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development[J]. *Circ Res*, 2009, 104(6): 724-732.
- [8] Visone R, Croce C M. MiRNAs and cancer[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(4): 1131-1138.
- [9] Kumar M S, Lu J, Mercer K L, et al. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 673-677.
- [10] Hara A J, Wang L, Dezube B J, et al. Tumor suppressor microRNAs are underrepresented in primary effusion lymphoma and Kaposi sarcoma[J]. *Blood*, 2009, 113(23): 5938-5941.
- [11] Yang X, Rutnam Z J, Jiao C, et al. An anti-let-7 sponge decoys and decays endogenous let-7 functions[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(16): 3097-3108.
- [12] De V C, Riggi N, Suva M L, et al. Let-7a is a direct EWS-FLI-1 target implicated in Ewing's sarcoma development[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23592.
- [13] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis[J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(3): 189-198.
- [14] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753-3756.
- [15] Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination[J]. *Annu Rev Biochem*, 1989, 58: 913-949.
- [16] karimi M, Depicker A, Hilson P. Recombinational cloning with plant gateway vectors[J]. *Plant phtsiol*, 2007, 145(4): 1144-1154.
- [17] 肖素勤, 孙 振, 轩秀霞, 等. 用于通路 (Gateway) 克隆技术的植物表达载体研究进展[J]. *植物科学学报*, 2012, 30(5): 528-544.
- Xiao S Q, Sun Z, Xuan X X, et al. Research progress on plant expression vectors for gateway cloning technology[J]. *Plant Science Journal*, 2012, 30(5): 528-544.
- [18] Magnani E, Bartling L, Hake S. From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event[J]. *BMC Mol Biol*, 2006, 7: 46.
- [19] Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes[J]. *J Mol Biol*, 1992, 226(3): 735-745.
- [20] Takahashi M, Sung B, Shen Y, et al. Boswellic acid exerts antitumor effects in colorectal cancer cells by modulating expression of the let-7 and miR-200 microRNA family[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(12): 2441-2449.

(责任编辑: 冉明会)