مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٣٤/هفته‌ی دوم مرداد ماه ١٣٩٦

تاریخ دریافت: ١٣٩٥/١٢/١١
تاریخ پذیرش: ١٣٩٦/١/٢٨

طراحی و کلون کردن microRNA-148b در شاتل وکتور لنتی ویروسی

سمانه ملازاده[١]، وجیهه نشاطی[١]، بی‌بی صدیقه فضلی بزاز[٢]، مجید مجرد[٣]، محمد امین کراچیان[٣]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ریزRNAها (miRNAs)، RNAهای غیر کد کننده‌ی کوچکی هستند که بیان ژن را از طریق اتصال به mRNA هدف تنظیم می‌نمایند. از آن‌جایی که این مولکول‌ها در تکثیر و تمایز سلولی نقش مهمی دارند، می‌توان از آن‌ها در پزشکی ترمیمی استفاده کرد. از میان حاملین مختلفی که برای رهاسازی این الیگونوکلئوتیدها وجود دارد، سیستم لنتی ویروسی حامل مناسبی به نظر می‌رسد. از طرف دیگر، مشخص شده است که miR-148b در استئوژنز نقش دارد. بدین منظور، در مطالعه حاضر طراحی و کلون کردن microRNA-148b در شاتل وکتور لنتی ویروسی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: ابتدا پرایمرهای رشته‌های microRNA-148b-3p/-5p طراحی گردید و پس از هیبریداسیون، داخل پلاسمید شاتل لنتی ویروسی کلون شد. سپس ورود صحیح قطعه‌ها با استفاده از هضم آنزیمی و توالی‌یابی مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، پس از تولید ذرات لنتی ویروسی مربوط، از آن‌ها برای ترانس‌داکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده گردید.

یافته‌ها: miR-148b-3p/-5p طراحی شده با موفقیت داخل شاتل لنتی ویروسی کلون گردید. یافته‌های حاصل از هضم آنزیمی و توالی‌یابی، مؤید ورود موفقیت‌آمیز رشته‌های مورد نظر داخل پلاسمید لنتی ویروسی بود. بیان بالای Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) نشان دهنده‌ی کارایی بالای ترانس‌فکشن و ترانس‌داکشن بود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه‌ی حاضر دو نوع ویروس حامل miR-148b-3p و miR-148b-5p تولید گردید که می‌توانند جهت بررسی فرایند استئوژنز مورد بررسی قرار گیرند.

واژگان کلیدی: کلون کردن، MicroRNA، miR-148b، شاتل وکتور، لنتی ویروس

ارجاع: ملازاده سمانه، نشاطی وجیهه، فضلی بزاز بی‌بی صدیقه، مجرد مجید، کراچیان محمد امین. **طراحی و کلون کردن microRNA-148b در شاتل وکتور لنتی ویروسی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ١٣٩٦؛ ٣٥ (٤٣٤): ٧٠٦-٧٠١

مقدمه

ریزRNAها (microRNAs)، ساختارهای نوکلئوتیدی غیر کد کننده‌ی کوچکی می‌باشند که در گیاهان و جانوران یافت می‌شوند (٢-١) و تاکنون در ٥٨ گونه‌ی مختلف شناسایی شده‌اند و در حدود ٣٠ درصد از ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین را تنظیم می‌کنند (٣). از طرف دیگر، حدود ٥٠-٤٠ درصد از mRNA پستانداران در سطح ترجمه توسط ریزRNAها تنظیم می‌شود (٤، ٢). نتایج مطالعات نشان داده است که ریزRNAها در تکامل بافت‌هایی از جمله پوست، ماهیچه، عصب، چربی، غضروف و استخوان دخیل هستند (٥). علاوه بر این، ریزRNAها نقش مهمی در تمایز استئوبلاست و تشکیل استخوان دارند. حدود ٢٢ ریزRNA شناسایی شده است که تمایز استئوبلاست را مهار می‌کند. در مقابل، ریزRNAهایی وجود دارند که استئوژنز را افزایش می‌دهند (٨-٦). با شناسایی ریزRNAها، می‌توان از آن‌ها به عنوان نشانگرهای تمایزی استفاده نمود (٩، ٧). ریزRNAهای تنظیم کننده‌ی استخوان‌سازی، سرعت تشکیل استخوان را کنترل و یا تشکیل استخوان را در مرحله‌ی مینرالیزاسیون نهایی تنظیم می‌نمایند (٨).

بر اساس اهداف درمانی، ریزRNAها می‌توانند به دو صورت به‌کار گرفته شوند؛ اول درمان مهاری به کمک ریزRNAها، زمانی که ریزRNA بیش از حد بیان گردد و دوم درمان جایگزین به کمک

١- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
٢- استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
٣- استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی و گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: بی‌بی صدیقه فضلی بزاز
Email: fazlis@mums.ac.ir

ریزRNAها، زمانی که بیان ریزRNA سرکوب شود. در این روش‌ها می‌توان RNAهای کوچک را به طور مستقیم وارد نمود و یا از طریق ژن‌درمانی توسط پلاسمید یا ویروس، مولکول‌های درمانی را وارد کرد (۱۰). مهم‌ترین مسأله در کاربرد ریزRNAها به عنوان عوامل درمانی، بیان پایدار و اختصاصی آن‌ها است. آزادسازی این الیگونوکلئوتیدها توسط وکتورهای ویروسی، می‌تواند روش کارامدی را برای رهاسازی و تثبیت RNAهایی با ساختار سنجاق سری فراهم آورد (۱). وکتورهای لنتی ویروسی قادر به بیان پایدار ترانس ژن می‌باشند و به همین علت به طور گسترده‌ای در تحقیقات زیست‌شناسی و کلینیکی استفاده می‌شوند. علاوه بر این، با بهینه‌سازی سیستم‌های لنتی ویروسی، می‌توان بیان ژن‌های هدف خاصی را در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی کاهش داد (۱۱). بر این اساس، در مطالعه‌ی حاضر از وکتورهای لنتی ویروسی Human immunodeficiency virus-1 (HIV-۱) استفاده شد. این وکتورها دارای تروپیسم گسترده و کارایی بالایی می‌باشند و قادر هستند ترانس ژن را به DNA کروموزومی سلول‌های هدف وارد نمایند (۱۲). هدف از انجام مطالعه حاضر، تولید ناقل لنتی ویروسی بیان کننده‌ی مولکول microRNA-148b بود. این ریزRNA در تمایز استئوژنیک و تکامل بافت استخوانی نقش دارد (۱۳). با استفاده از این ناقل می‌توان تأثیرات افزایش بیان رشته‌های بالغ microRNA-148b (3p- و یا 5p-) را بر رفتارهای سلولی به خصوص تمایز سلول‌های بنیادی به سمت دودمان استئوژنیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار داد.

روش‌ها

طراحی و ساخت الیگونوکلئوتیدهای microRNA-148b

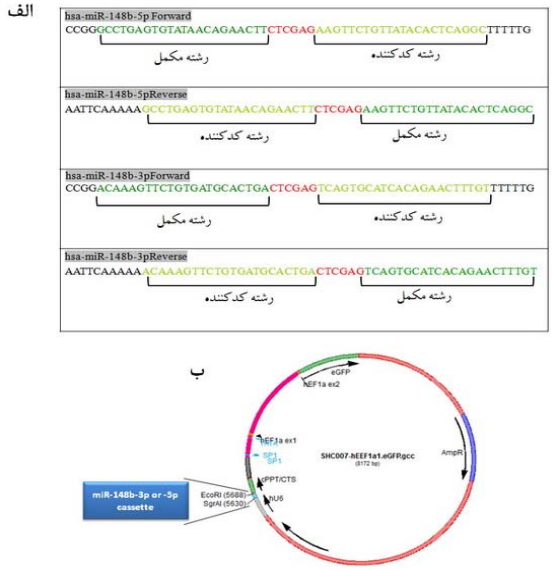
توالی‌های بالغ pre-miRNA کد کننده‌ی hsa-microRNA-148b از سایت miRBase (http://www.mirbase.org/) استخراج شد. این رشته و رشته‌ی مکمل آن به روش شیمیایی سنتز گردید. توالی‌های مربوط به جایگاه اثر آنزیم‌های EcoRI و SgrAI در انتهای رشته‌های کد کننده و مکمل قرار داده شد (شکل ۱، قسمت الف).

کلون کردن microRNA-148b داخل وکتور لنتی ویروسی:

مراحل کلون کردن microRNA-148b به داخل وکتور مشابه روشی که پیش از این ذکر شد، انجام گرفت (۱۴). به طور خلاصه، الیگونوکلئوتیدهای کد کننده‌ی microRNA-148b با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار تهیه و با یکدیگر مخلوط و در دمای ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. در ادامه، به منظور تسهیل واکنش هیبریداسیون بین الیگوها، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. از محصول فوق برای واکنش اتصال به شاتل وکتور لنتی ویروسی SHC007 (شرکت Sigma-Aldrich، آلمان) استفاده گردید. از این وکتور برای بیان توالی‌هایی مانند ریزRNAها استفاده می‌شود و بیان قطعات با کمک پروموتور وکتور قابل کنترل است. برای آماده‌سازی پلاسمید مذکور، وکتور با آنزیم‌های EcoRI و SgrAI برش داده شد (شکل ۱، قسمت ب). واکنش لیگاسیون با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase (شرکت Fermentas، آمریکا) در دمای اتاق صورت گرفت. وکتورهای نوترکیب با استفاده از شوک حرارتی، به داخل باکتری Escherichia coli (E.Coli) سویه‌ی Gene Hog ترانسفورم شدند. ماهیت پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از توالی‌یابی سنگر تأیید گردید.

تولید ویروس نوترکیب:

ناقلین نوترکیب حاصل به همراه پلاسمیدهای کمکی (pLP/VSVG ،PSPAX2) به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ در داخل رده‌ی سلولی HEK-293 ترانسفکت شد. بدین جهت، پس از کشت این سلول‌ها و زمانی که تراکم آن‌ها به حدود ۷۰-۶۰ درصد رسید، محیط ترانسفکشن محتوی NaCl (۱۵۰ میلی‌مولار) و پلی‌اتیلن ایمین (Polyethylenimine یا PEI) (Polysciences Europe، آلمان) اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۱۶-۱۴ ساعت در مجاورت محلول PEI و وکتورها قرار گرفتند.



شکل ۱. طراحی پرایمرهای پیشرو و پیرو برای رشته‌های کد کننده‌ی miRNA-148b و کلون کردن آن‌ها در شاتل لنتی ویروسی

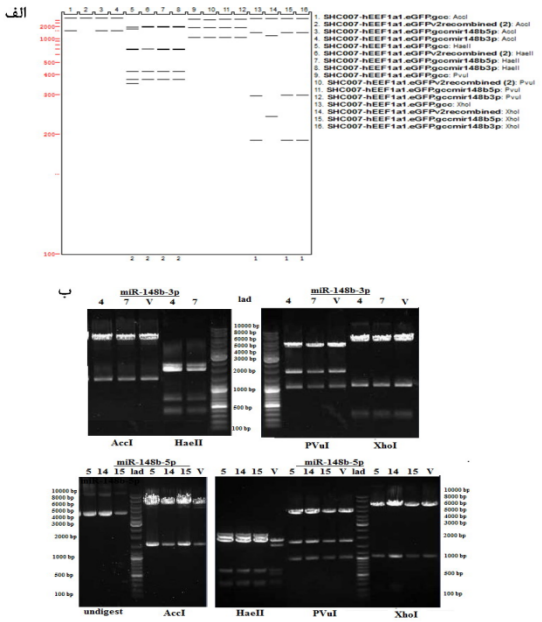
توالی‌های سبز رنگ رشته‌های کد کننده و توالی‌های مکمل آن را نشان می‌دهند. توالی قرمز رنگ برای ساخت ساختار سنجاق سری ضروری می‌باشد و توالی‌های سیاه رنگ نیز پس از هیبرید شدن دو رشته‌ی پیشرو و پیرو، جایگاه‌های اثر آنزیمی را تشکیل می‌دهند (قسمت الف). نقشه‌ی ژنتیکی وکتور SHC007 که در آن قسمت‌های مختلف تشکیل دهنده‌ی وکتور و جایگاه‌های برش آنزیمی EcoRI و SgrAI نشان داده شده است (قسمت ب).

در ادامه، سلول‌ها با Phosphate-buffered saline (PBS) (۱x) شستشو داده شد و محیط تازه به سلول‌ها اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت، سوپرناتانت سلولی که حاوی ذرات ویروسی بود، برداشته شد و ویروس‌ها به روش اولتراسانتریفوژ تغلیظ شد. ورود پلاسمید و تولید ویروس نوترکیب با واسطه‌ی بیان Enhanced green fluorescent protein (eGFP) مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان کنترل کیفی، ۳ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از ویروس‌های ساخته شده بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثر داده شد و پس از سه روز، ورود ویروس‌ها و بیان ترانس‌ژن با واسطه‌ی بیان eGFP مورد پایش قرار گرفت.

یافته‌ها

جهت تأیید ورود الیگونوکلئوتیدها در جهت درست به وکتور، واکنش هضم آنزیمی انجام گرفت. بدین ترتیب که برای هر نمونه پلاسمید تخلیص شده، ۴ آنزیم (AccI، HaeII، PVuI و XhoI) انتخاب شد. در صورتی که قطعات به طور صحیحی وارد پلاسمید شده باشد، انتظار می‌رود باندهایی مشابه با شکل ۲، قسمت الف ایجاد گردد. با توجه به نتایج به دست آمده (شکل ۲، قسمت ب)، کلون‌های ۴ و ۷ از نمونه‌ی miR-148b-3p و کلون‌های ۵، ۱۴ و ۱۵ از نمونه‌ی miR-148b-5p دارای قطعه‌ی insert بودند. با این حال، نتایج حاصل از توالی‌یابی نشان داد که نمونه‌ی ۴ از miR-148b-3p و نمونه‌های ۵ و ۱۴ از miR-148b-5p قابل استفاده و توالی آن‌ها سالم و بدون جهش بود. کلون‌های صحیح از miR-148b-3p و miR-148b-5p برای ساخت لنتی ویروس‌های مربوط مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

نتایج ترانس‌فکشن سلول‌های Human embryonic kidney-293 (HEK-۲۹۳) حاکی از آن بود که قسمت اعظمی از سلول‌ها eGFP را بیان می‌کنند (شکل ۳، قسمت الف). سه روز بعد از ترانس‌داکت سلول‌های مزانشیمی با ذرات ویروسی، اغلب سلول‌های آلوده شده، eGFP+ بودند (شکل ۳، قسمت ب). از آن‌جایی که بیان eGFP با عملکرد وکتورها ارتباط دارد، ترانس‌ژن‌های کلون شده‌ی داخل وکتورها بیان بالایی دارند. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، حدود ۸۰-۷۰ درصد از سلول‌ها $eGFP^+$ و سبز رنگ بودند.

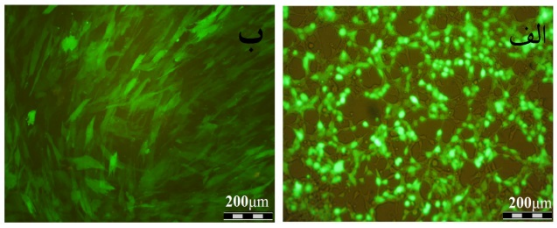


شکل ۲. نتایج حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم‌های AccI، HaeII، PVuI و XhoI

اندازه‌ی قطعاتی که انتظار می‌رود توسط آنزیم‌ها در نمونه‌های مختلف ایجاد شود (قسمت الف). اندازه‌ی قطعات حاصل از هضم آنزیمی در کلون‌های مختلف از miR-148b-3p و miR-148b-5p (قسمت ب) که کلون‌های مختلف با شماره نشان داده شده است. V (وکتور اصلی که هضم آنزیمی بر روی آن انجام شده است)، Lad (Ladder) و Undigested (نمونه‌هایی که هضم آنزیمی روی آن انجام نشده است).

جدول ۱. نتایج حاصل از توالی‌یابی ریزRNAهای کلون شده در مقایسه با توالی ژنومیک آن‌ها

hsa-miR148b-3p-F-A305 (22-mer)
CCGGACAAAGTTCTGTGATGCACTGACTCGAGTCAGTGCATCACAGAACTTTGTTTTTTG
clone≠4: probably correct
AAACACCGGACAAAGTTCTGTGATGCACTG
clone ≠7: incorrect
AAACACCGGACAAAGTTCTGTGATGCACTGACTCGAGTCACATCACAGAACTTTGTTTTTTGAATTC
hsa-miR148b-5p-F-A303 (22-mer)
CCGGGCCTGAGTGTATAACAGAACTTCTCGAGAAGTTCTGTTATACACTCAGGCTTTTTG
clone ≠5: correct
CCGGGCCTGAGTGTATAACAGAACTTCTCGAGAAGTTCTGTTATACACTCAGGCTTTTTGAATTC
clone ≠14: correct
CCGGGCCTGAGTGTATAACAGAACTTCTCCAGAAGTTCTGTTATACACTCAGGCTTTTTGAATTC = G
clone ≠15: was supposed to be a hsa-miR-148b-5p clone but appears to be a correct hsa-miR-148b-3p clone
CCGGACAAAGTTCTGTGATGCACTGACTCGAGTCAGTGCATCACAGAACTTTGTTTTTTGAATTC
hsa-miR-148b-3p-F-A305 (22-mer)
CCGGACAAAGTTCTGTGATGCACTGACTCGAGTCAGTGCATCACAGAACTTTGTTTTTTG



شکل ۳. بیان Enhanced green fluorescent protein (eGFP)در سلول‌های Human embryonic kidney-293 (HEK-۲۹۳)
(قسمت الف) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی (قسمت ب)

بحث

برای درک نقش ریزRNAها در فرایندهای طبیعی سلول و بیماری‌های انسانی، به ابزاری جهت افزایش یا کاهش عملکرد و فراوانی این مولکول‌ها نیاز است. بیان RNAهای کوچک اگزوژنوس در سلول از طریق ترانس‌فکشن موقت یا پایدار یا به کمک ترانس‌داکشن ویروسی ترانس‌ژن‌هایی از جمله pri-miRNA، pre-miRNA، miRNA/miRNA* بالغ، RNAهای تداخلی کوچک (siRNA) و یا RNAهای کوتاه با ساختار سنجاق سری امکان‌پذیر است (۱). مهم‌ترین مراحل آماده‌سازی وکتورهای لنتی ویروسی حامل RNAهای کوچک سنجاق سری عبارتند از «طراحی الیگونوکلئوتید مربوط و غربالگری توالی‌های هدف آن، وارد کردن توالی طراحی شده به وکتور، استفاده از سلول‌های بسته‌بندی کننده برای تولید لنتی ویروس‌های محتوی الیگونوکلئوتید و ترانس‌داکشن سلول‌های هدف به کمک لنتی ویروس ساخته شده» می‌باشد (۱۵).

تاکنون وکتورهای لنتی ویروسی بیان کننده‌ی RNAهای سنجاق سری برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو و سرطان ارزیابی شده‌اند (۱۶). آزادسازی RNAهای سنجاق سری به کمک ذرات ویروسی، فرایند بلوغ این مولکول‌ها را در سلول ممکن می‌سازد. بنابراین، این نوع روش آزادسازی، احتمال بیان پایدار و کارامد این ساختارها را فراهم می‌آورد (۱). یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر نشان دادکه microRNA-148b به طور موفقیت‌آمیزی وارد شاتل لنتی ویروسی گردید. پس از طراحی پرایمرهای مناسب برای رشته‌های بالغ miR-148b، کلون کردن آن‌ها در شاتل وکتور لنتی ویروسی انجام شد. با توجه به این که غلظت قطعات ریزRNA در مقایسه با وکتور بالاتر بود، احتمال ورود قطعه به وکتور افزایش یافت؛ در حالی که اگر مقدار ریزRNA در مقایسه با مقدار وکتور کمتر باشد، احتمال خودترکیبی وکتور افزایش می‌یابد. کارایی ترانس‌داکشن ویروس‌های ساخته شده نیز حاکی از ساخت موفقیت‌آمیز آن‌ها بود. در تحقیق حاضر از miR-148b که عضوی از خانواده‌ی miR-148/152 می‌باشد، استفاده شد. این خانواده سه عضو شناخته شده‌ی miR-148a، miR-148b و miR-152 دارد (۱۷). اعضای این خانواده ساختار ساقه- لوپ دارند که پس از پردازش، به ریزRNA بالغ به طول ۲۲-۲۱ نوکلئوتید تبدیل می‌شوند. بافت‌های طبیعی و توموری مختلفی اعضای این خانواده را طی رشد، تکامل و تشکیل تومور بیان می‌کنند (۱۸-۱۷). بیان اعضای این خانواده در بیماری‌های توموری و غیر توموری متفاوت است. بنابراین، این گروه از ریزRNAها می‌توانند به عنوان زیست نشانگرهای مهمی جهت تشخیص اولیه‌ی برخی از سرطان‌ها استفاده گردد. نتایج اغلب مطالعات نشان داده‌اند که اعضای این خانواده به عنوان انکوژن و سرکوب کننده‌ی تومور عمل می‌نمایند. همچنین، نقش مهمی در بیماری‌های غیر توموری مانند دیابت نوع یک و ضایعات آرترواسکلروزی ایفا می‌کنند (۱۷).

با پیشرفت‌های قابل توجه صورت گرفته طی چند سال اخیر در حوزه‌ی پزشکی ترمیمی، ریزRNAهای جدیدی در بافت استخوانی و مفاصل شناسایی شده‌اند (۶). با توجه به کارکردهای مهم این مولکول‌ها، می‌توان از آن‌ها در ترمیم و پیوند اندام پستانداران استفاده نمود. از طرف دیگر، این مولکول‌ها به عنوان اهداف درمانی جدیدی برای بیماری‌های مختلف مانند سرطان‌ها در نظر گرفته می‌شوند. در مجموع، درک عملکرد این مولکول‌ها در فرایندهای زیستی مختلف، روش‌های نوینی را در پزشکی ترمیمی ایجاد می‌کند.

با طراحی مناسب ریزRNAها و به دنبال آن وارد کردن آن‌ها در حاملین مناسب، می‌توان از آن‌ها برای درمان بیماری‌های مختلفی از جمله اختلالات استخوانی استفاده نمود. ضمن این که می‌توان از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان میزبان‌هایی برای بیان این دسته از الیگونوکلئوتیدها در ترمیم استخوان استفاده کرد (۴). علاوه بر این، ریزRNAها می‌توانند به طور موضعی و سیستمیک به عنوان عوامل درمانی در آینده استفاده شوند (۱۹).

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری تخصصی دانشگاه علوم پزشکی مشهد با شماره‌ی طرح ۹۱۰۷۸۸ می‌باشد که با حمایت مالی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله نویسندگان از اعضای آزمایشگاه کاردیولوژی و مرکز پزشکی دانشگاه Leiden هلند به جهت همکاری در انجام مراحل کلون کردن، تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

References

1. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. Gene Ther 2011; 18(12): 1104-10.
2. Collino F, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. MicroRNAs and mesenchymal stem cells. Vitam Horm 2011; 87: 291-320.
3. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell 2005; 120(1): 15-20.
4. Taipaleenmaki H, Bjerre HL, Chen L, Kauppinen S, Kassem M. Mechanisms in endocrinology: micro-RNAs: Targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation. Eur J Endocrinol 2012; 166(3): 359-71.
5. Hassan MQ, Gordon JA, Beloti MM, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, et al. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(46): 19879-84.
6. Dong S, Yang B, Guo H, Kang F. MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis. Biochem Biophys Res Commun 2012; 418(4): 587-91.
7. Kim KM, Lim SK. Role of miRNAs in bone and their potential as therapeutic targets. Curr Opin Pharmacol 2014; 16: 133-41.
8. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. Nat Rev Endocrinol 2012; 8(4): 212-27.
9. Kapinas K, Delany AM. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. Arthritis Res Ther 2011; 13(3): 220.
10. Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. J Control Release 2013; 172(3): 962-74.
11. Singer O, Verma IM. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. Curr Gene Ther 2008; 8(6): 483-8.
12. Segura MM, Mangion M, Gaillet B, Garnier A. New developments in lentiviral vector design, production and purification. Expert Opin Biol Ther 2013; 13(7): 987-1011.
13. Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Force AS, et al. Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells. PLoS One 2009; 4(5): e5605.
14. Zavar-Reza J, Khaleghi N, Hatami A, Heidari M, Mansuri-Majumerd R, Shekhha MH, et al. Cloning and expression of truncated protein of epidermal growth factor-1 (EGFR-1) in Pichia pastoris yeast host. J Isfahan Med Sch 2016; 33(364): 2232-8. [In Persian].
15. Song H, Yang PC. Construction of shRNA lentiviral vector. N Am J Med Sci 2010; 2(12): 598-601.
16. Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(9): 732-45.
17. Chen Y, Song YX, Wang ZN. The microRNA-148/152 family: multi-faceted players. Mol Cancer 2013; 12: 43.
18. Song YX, Yue ZY, Wang ZN, Xu YY, Luo Y, Xu HM, et al. MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. Mol Cancer 2011; 10: 1.
19. Weilner S, Grillari-Voglauer R, Redl H, Grillari J, Nau T. The role of microRNAs in cellular senescence and age-related conditions of cartilage and bone. Acta Orthop 2015; 86(1): 92-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 01.03.2017
Vol. 35, No. 434, 2nd Week, August 2017
Accepted: 17.04.2017

Production of Lentiviral Vector Expressing MicroRNA-148b

Samaneh Mollazadeh[1], Vajiheh Neshati[1], Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz[2], Majid Mojarrad[3], Mohammad Amin Kerachian[3]

Original Article

Abstract

Background: Micro (mi)RNAs are non-coding endogenous RNAs which regulate gene expression by hybridization to specific binding sites in target mRNA sequences. Since several miRNAs are involved in proliferation and differentiation, miRNA-based therapies could be promising approach in regenerative medicine. Among different vehicles, lentiviral vector system is suitable for miRNA delivery. Besides, it is shown that miRNA-148b is involved in osteogenic differentiation. In this study, designing and cloning of miR-148b to lentiviral vector were investigated.

Methods: We introduced miRNA-148b-3p/-5p into lentiviral vector through cloning producers. The sequences of lentiviral vectors carrying miRNA-148b were checked via analytical digestion as well as Sanger DNA sequencing. In the following, produced lentiviral vectors were used for mesenchymal stem cells transduction.

Findings: Designed miR-148b-3p/-5p successfully cloned to the shuttle. Correctness and absence of any unintended mutations of lentiviral shuttle carrying miRNA-148b3p/-5p were confirmed followed by lentiviral production. Expression of enhanced green fluorescent protein (eGFP) demonstrated high efficiency of transfection as well as transduction.

Conclusion: Viral vectors constructed in this study could be used for investigation of osteogenesis.

Keywords: Cloning, MicoRNA, MiR-148b, Shuttle vectors, Lentivirus

Citation: Mollazadeh S, Neshati V, Fazly Bazzaz BS, Mojarrad M, Kerachian MA. **Production of Lentiviral Vector Expressing MicroRNA-148b.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(434): 701-6.

1- PhD Candidate, Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2- Professor, Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3- Assistant Professor, Medical Genetics Research Center AND Department of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Corresponding Author: Bibi Sedigheh Fazly Bazzaz, Email: fazlis@mums.ac.ir