基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0877-03

# 卡氏肺孢子胸腺嘧啶核苷酸合酶基因 siRNA 表达载体的构建和鉴定

唐滢洽,姚云清,谭 燕,王莉妮,李文桂,刘成伟,陈雅棠
(重庆医科大学附属第一医院感染科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建和鉴定大鼠卡氏肺孢子(Pneumocystis carinii,PC)胸腺嘧啶核苷酸合酶(Thymidylate synthase,TS)基因的 siRNA(Short interfering RNA)表达载体。方法:人工合成针对 PC TS 基因的 1 对 shRNA(Short hairpin RNA)序列并定向克隆到空载体 pTZU6+1 上,构建 siRNA 表达重组质粒 pPC-TS,并采用双酶切产物凝胶电泳和基因测序法鉴定。结果:酶切电泳和基因测序鉴定得到的产物与预期的目的基因一致。结论:成功构建卡氏肺孢子胸腺嘧啶核苷酸合酶基因 siRNA 表达载体。

【关键词】卡氏肺孢子;胸腺嘧啶核苷酸合酶基因;siRNA 表达载体
【中国图书分类法分类号】R730.23 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-08

# Construction and identification of plasmid vector of short interfering RNA on pneumocystis carinii thymidylate synthase gene

*TANG Ying-hui, et al*
(*Department of Infection Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct and identify a plasmid vector of short interfering RNA(siRNA) on pneumocystis carinii (PC) thymidylate synthase. *Methods*: Short hairpin RNA oligonucleotides of thymidylate synthase were chemically synthesized and inserted into plasmid vector pTZU6+1 after annealing. The recombinant plasmid, pPC-TS, transformed into E. coil. TOP10 and amplified, was digested by restriction endonucleases *Hind* Ⅲ and *EcoR* Ⅰ and identified by gel electrophoresis and DNA sequencing. *Results*: Gel electrophoresis and DNA sequencing showed that the recombinant plasmid containing the correct and full shRNA oligonucleotide. *Conclusion*: The siRNA plasmid, pPC-TS, was constructed successfully.

【Key words】Pneumocystis carinii; Thymidylate synthase gene; siRNA expression plasmid

卡氏肺孢子(Pneumocystis carinii,PC)是一种机会性感染病原体,可引起免疫缺陷个体发生卡氏肺孢子肺炎(Pneumocystis carinii pneumonia,PCP),严重者导致患者死亡。随着肿瘤化疗患者、器官移植者及自身免疫性疾病等高危人群的扩大,PCP 的发病率呈明显的上升趋势。特别是自 1981 年发现首例艾滋病以来,PCP 一直是艾滋病患者的主要并发症和死因,因而引起了广泛的关注。尽管 PCP 的预防和治疗近年来取得了一定进展,但仍存在不少问题,如抗病原体治疗效果不够理想,化疗药物副反应较严重等,因此国内外仍在探索新的治疗途径[1]。RNA 干扰技术通过序列特异性的转录后基因沉默机制,可以高效、特异的阻断特定基因的表达,从而发挥治疗作用。为此我们构建了针对 PC 胸腺嘧啶核苷酸合酶(Thymidylate synthase,TS)基因的 siRNA 表达载体,用以转染 PC 来阻断 TS 基因的表达,从而杀灭 PC,最终治愈 PCP 患者。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

大肠杆菌 TOP10 菌株和 siRNA 真核表达载体 pTZU6+1 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室保存;限制性内切酶 *Xba* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、和 *EcoR* Ⅰ,以及 T4DNA 连

作者介绍:唐滢洽(1981- ),女,硕士,
研究方向:感染性疾病的发病机制和治疗。
通讯作者:姚云清,男,教授,主任医师。E-mail:cqyaoyunqing@126.com
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471512),重庆市医学科技计划项目(04-2-100)。

接酶、DNAmarker 购自 TakaRa 公司，柱离心式质粒抽提试剂盒、柱离心式胶回收试剂盒均购自上海华舜公司，高效感受态细胞制备试剂盒购自上海生工公司。shRNA 由上海深工美国 PE 公司 DNA 自动合成仪合成。

1.2 实验方法

1.2.1 siRNA 真核表达载体的构建

1.2.1.1 shRNA-PC-TS 的设计 在 genebank 上找到 PC TS 的序列号为 S77510；针对 TS 基因组的结构编码区在线设计 shRNA 序列，其组成为 5' 端开始为 21 个核苷酸的 siRNA 作用链序列，中间以 4 个核苷酸的 TTCG 间隔形成发夹状结构，最后为 21 个核苷酸的 siRNA 作用链的反向重复序列，3' 末端加有转录终止信号 TTTTT。正义链 5' 末端与反义链 5' 末端分别添加限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ酶切位点。shTS 序列为(288~308)：

正义链

5-TCGAGCCACATATAGTCAGTTTTATGTTCGCATAAA ACTGACTATATGTGGTTTTT-3',

反义链

5'-CTAGAAAAACCACATATAGTCAGTTTTATGCGAAC ATAAAACTGACTATATGTGGC-3'。

1.2.1.2 单链 shRNA-PC-TS 退火形成双链并纯化 分别用 33 μl 退火缓冲液充分溶解正义链与反义链各 1OD(33 μl)，正义和反义寡核苷酸溶液各取 10 μl 混匀。退火条件：94℃孵育 4 min，85 ℃孵育 4 min，72 ℃孵育 4 min，37℃孵育 4 min，25 ℃孵育 4 min，然后置于冰上；加二倍退火反应体积无水乙醇、3 mmol /L 乙酸钠溶液 2 μl 溶解退火 DNA 片段，置 -20 ℃过夜，14 500 r/min 离心 20 min，弃上清，沉淀用 75%乙醇清洗，离心弃上清，重复 2 次，自然挥发后加入 40 μl 双蒸水溶解，于 -20 ℃保存备用。

1.2.1.3 定向克隆 反应体系如下：退火寡核苷酸 6 μl、10×T4 DNA 连接酶缓冲液 1.5 μl、线性 pTZU6+1 质粒 2 μl 和 T4 DNA 连接酶 1 μl，补足双蒸水至 15 μl；反应条件为 16 ℃孵育过夜，置 -20 ℃保存。

1.2.1.4 重组质粒 pPC-TS 转化感受态 TOP10 和转化克隆挑选

1.2.1.4.1 感受态 TOP10 的制备 将菌株 TOP10 在 LB 平板上划线，37 ℃培养过夜获得合适的克隆；挑单克隆至 2 ml-SOB 培养基中摇菌过夜；将过夜培养的菌液接种到 50 ml 的 SOB 培养基中，37 ℃摇菌至 $A_{600}$ nm，在冰上放置 10 min；然后按照上海生工公司高效感受态细胞制备试剂盒的说明进行操作。

1.2.1.4.2 转化 分 2 组，取亦分装好的感受态细菌 2 管，分别加入上述连接液各 10 μl，在第 2 管中加入质粒；混匀后先在冰上放置 30 min，然后 42℃孵育 90 s，最后在冰上放置 20 min；每管加入 1 ml LB 培养液，于摇床上 37℃振荡(180 r/min) 培养 1 h；最后将其涂于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养平板上，37℃培养 12 h。

1.2.1.4.3 转化克隆挑选 生长约 16 h 后发现均有克隆生长，每管各挑取比较大的分散的单个克隆分别置于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中，37℃振荡培养约 14 h，质粒的提取采用上海华舜公司试剂盒，按说明书操作。

1.2.2 siRNA 表达重组质粒 pPC-TS 的鉴定

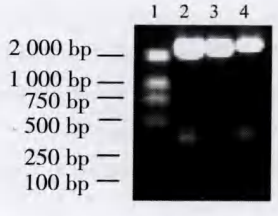
1.2.2.1 双酶切鉴定转化菌 用 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切重组质粒 pPC-TS 和 pTZU6+1 空载体，用空载体作对照。反应体系为 *Hind* Ⅲ 1 μl、*EcoR* Ⅰ 1 μl，pPC-TS 或 pTZU6+1 24 μl，10×Mbuffer3 μl，补足双蒸水至 30 μl，37℃酶切 3 h；取 6 μl 反应产物与 2 μl 10×loading buffer 混匀后进行 1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪照像。

1.2.2.2 测序鉴定转化菌 重组质粒由重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室测序鉴定。

## 2 结 果

### 2.1 重组质粒酶切后凝胶电泳鉴定

用 *Hind* Ⅲ和 *EcoR* Ⅰ双酶切重组质粒 pPC-TS 后产生 2 800 bp 与 408 bp 片断，而空载体 pTZU6+1 双酶切后产生 2 800 bp 与 352 bp 片断，凝胶电泳结果与预期相符，初步证明 shRNA-PC-TS 已被插入到 pTZU6+1 载体中，见图 1。




1. marker(DL2000)；2. 空载体 pTZU6+1 双酶切；
3. 重组的未酶切的质粒；4. 重组质粒双酶切

**图 1 重组质粒 pPC-TS 双酶切后凝胶电泳成像**

### 2.2 重组质粒的测序和鉴定

送检的重组质粒测序结果显示含有正确的目的寡核苷酸片段 shTS，与设计 DNA 片断序列完全一致，见图 2。

## 3 讨 论

目前卡氏肺孢子感染的治疗仍以复方磺胺嘧啶(SMZ-TMP) 和喷他脒化疗为主。喷他脒疗效肯定，但有严重的肝、肾毒性，并已有耐药病例报道。磺胺类药物目前被列为首选药物，但毒副反应较多，尤其是用于艾滋病患者并发卡氏肺孢子肺炎时，其毒副反应率高达50%~70%。因此寻求新的高

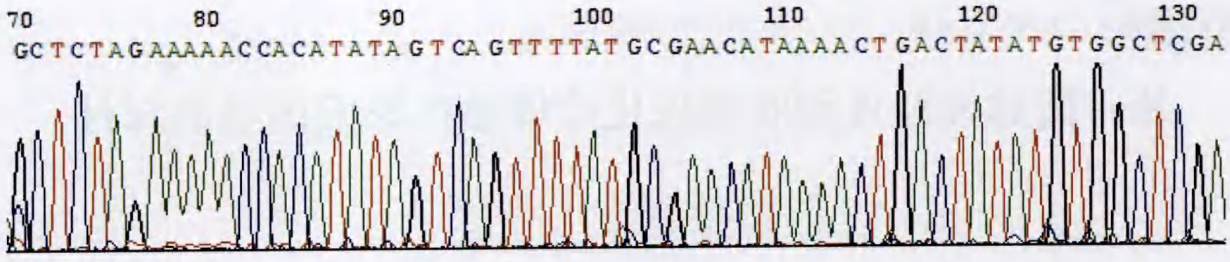



图 2 pPC-TS 测序结果

效低毒的抗肺孢子途径成为研究焦点之一。随着分子生物学技术在生物医学领域的广泛应用，人们对 PC 的研究由早期形态学观察发展到分子克隆和基因组核苷酸序列分析。RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是目前比较热门的一项研究，在 2001 年曾被列为科学十大突破之一，2002 年被 SIENCE 评为最重要的科研成果之一。随着对 RNAi 现象研究的深入，人类感染性疾病的动物模型的成功建立充分表明，在哺乳动物体内应用 RNAi 技术发挥抗病毒作用是可以实现的[2]。

RNAi 是细胞质中基因异常表达的监视系统，发生于真核生物细胞质中，识别成熟 mRNA 并导致基因沉默。一般情况下生物体内不会产生双链 RNA（Double stand RNA，dsRNA），只有当病毒、转座子入侵和转录异常时才会产生异常 dsRNA。当外源性基因整合到宿主细胞基因组，核酸内切酶 Dicer 可将转录产生的 dsRNA 切割成 3'端具有 2 个突出 TT 末端的大小约 22 碱基（21~23 bp）的小干扰 RNA（Small interfering RNAs，siRNAs）。siRNA 与多组分核酸酶结合形成 RNA 诱导沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC），RISC 活化后解旋酶释放 ATP 解开 siRNA 双链，使其反义链互补结合到靶 mRNA 上与之相匹配的特异性序列，RISC 中的核酸酶降解 mRNA，降解的 mRNA 随后迅速地被细胞其他 RNA 酶所降解，最终使目的基因沉默，产生 RNAi 现象。

在所有的真核、原核生物中，TS 是一磷酸脱氧胸腺嘧啶核苷酸（dTMP）合成途径的一个关键酶，dTMP 是一磷酸脱氧尿嘧啶核苷酸（dUMP）的甲基化产物；在 dTMP 的合成过程，TS 催化 dUMP 甲基化生成 dTMP，是 DNA 合成和修复必要的酶[3-5]。在卡氏肺孢子遗传特性的比较中 TS 基因研究较多，其 PCR 反应引物确定，基因序列明确，且发现某些治疗药物对该基因有影响，例如我们实验室里陈雅棠教授等研究发现青蒿素衍生物作用 PC 后其 TS 基因扩增结果呈阴性，提示该类药物对 TS 基因有破坏作用。因此，在本实验中我们选择 PC TS 基因作为靶基因，构建 shRNA 的真核表达载体，拟转染 PC，从而干扰 TS 基因使 TS 生成受阻，dTMP 合成障碍，DNA 复制及 RNA 转录受阻，PC 的繁殖与存活将受到抑制，最终导致 PC 死亡。

各领域的学者们对 RNAi 机制进行了深入的研究，就目前来说 RNAi 主要用于抗病毒及抗肿瘤研究，本实验针对 PC TS 基因设计同源序列，用含有 RNA 聚合酶启动子Ⅲ（RNA pol Ⅲ）的转录载体 pTZU6+1 成功构建能产生 siRNA 的重组质粒 pPC-TS，为下一步用 RNAi 技术治疗 PCP 打下基础，并为 RNAi 在基因功能研究和疾病的基因治疗方面奠定基础。

## 参 考 文 献

[1] Clarkson A B Jr，Turkel-Parrella D，Willams JH，et al. Action of deferoxamine against Pneumocystis carinii [J]. Antimicrobial Agents and chemotherapy，2001，45(12)：3560-3565.

[2] Gadkari DA. RNA interference&inhibition of viruses[J]. Indian J Med Res，2005，121(3)：147-150.

[3] Andersona AC，Perry KM，Freymann DM，et al. The crystal structure of thymidylate synthase from Pneumocystis carinii reveals a fungal insert important for drug design [J].Journal of Molecular Biology，2000，297(3)：645-657.

[4] Newby Z，Lee TT，Morse RJ，et al. The role of protein dynamics in thymidylate synthase catalysis：variants of conserved 2'-deoxyuridine 5'-monophosphate(dUMP)-binding Tyr-261[J]. Biochemistry，2006，45(24)：7415-7428.

[5] Voeller D，Rahman L，Zajac-Kaye M，et al. Elevated levela of thymidylate synthase linked to neoplastic transformation of mammalian cells[J]. Cell Cycle，2004，3(8)：1005-1007.

（责任编辑：关蕴良）