维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2004)03 - 0269 - 04

DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体的构建及序列分析

陈道荣[1], 王丕龙[1], 黄爱龙[2]

(1.重庆医科大学临床学院消化内科,重庆 400016;2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:本研究利用 RNA 干扰(RNA interfering,RNAi)技术,以 DNMT1(DNAmethyltransferase 1)为靶基因,设计构建重组体,并进行序列分析,为下一步探索肿瘤基因治疗的新途径打好基础。方法:设计有小发夹结构的两条 DNA 序列,经退火成互补双链,再克隆至载体 pTZU6 + 1 中构建重组体,转化 JM109 菌株,提取质粒行酶切鉴定后,进行测序分析。结果:将合成的 DNA 序列退火后克隆到载体上,经测序鉴定确实为所需序列。结论:DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体的成功构建和序列分析,可进一步利用克隆所得的小 RNA 序列干扰 DNMT1 的 mRNA 转录,从而达到治疗肿瘤的目的。

【关键词】DNMT1;RNA 干扰;重组体;序列分析

【中国图书分类法分类号】R734 【文献标识码】A 【收稿日期】2003 - 09 - 01

Cloning and sequence analyzing of the recombinant plasmid affecting gene DNMT1 translation by RNA interfering

CHEN Daorong, et al

(*Department of Gastroenterology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone the recombinant plasmid affecting gene DNMT1 translation by RNA interfering and analyze the nucleic acid sequence of the recombinant for further searching new gene therapy method of tumor. *Methods*: Two DNA sequences containing small hairpin structure were designed and synthesized. The complement form was obtained by annealing and inserted into vector pTZU6 + 1, and the recombinant plasmid was transformed into Jm109 strain. Finally the plasmid identified by restriction enzyme was used for sequence analysis. *Results*: The recombinant was cloned and the aim sequence was obtained. *Conclusion*: Successful cloning of the recombinant helps to search new gene therapy method of tumor.

【Key words】DNMT1; RNA interfering; Cloning; Sequence analysing

部分基因启动子区域的超甲基化状态严重影响了该基因的表达,尤其是一些抑癌基因的失活在肿瘤的发生起着极其关键的作用,这已得到了国内外学者的公认[1]。而特异性 DNA 甲基转移酶就负责往 DNA 启动子区域的特定胞嘧啶残基上添加甲基。因此本实验准备通过抑制 DNA 甲基转移酶基因的表达,减少启动子区域甲基化,从而使一些抑癌基因重新激活,达到治疗肿瘤的目的。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

克隆用大肠杆菌 Jm109 和载体 pTZU6 + 1 由重庆医科大学第二临床学院病毒性肝炎研究所保存。

1.2 主要试剂

1.2.1 shRNA 结构 DNA 序列

根据 Genbank 中报道的 DNMT1 的核苷酸序列(No NM001379),参考 siRNA 的设计策略,分别设计三对 shRNA 序列如下(正义链带有 Sal Ⅰ 的酶切位点,反义链带有 Xba Ⅰ 的酶切位点):

序列 1:

正义链:5' - TCGAGCAGGCGGCTCAAAGATTTGTTCGCAAATCTTTGAGCCGCCTGCTTTTT - 3'

反义链:5' - CTAGAAAAAGCAGGCGGCTCAAAGATTTGCGAACAAATCTTTGAGCCGCCTGC - 3'

序列 2:

正义链:5' - TCGAGTGAATGGACGTCTAGAAACCACCTTTCTAGACGTCCATTCACTTTTT - 3'

反义链:5' - CTAGAAAAAGTGAATGGACGTCTAGAAACCACCTTTCTAGACGTCCATTCAC - 3'

作者介绍:陈道荣(1973 -),女,博士生,
主要研究方向:消化系统疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

序列 3:

正义链:5' - TCGACCGTGAATGGACGTCTAGAAAC CACCTTTCTAGACGTCCATTCACTTTTTGA - 3'

反义链:5' - CTAGTCAAAAAGTGAATGGACGTCTA GAAACCACCTTTCTAGACGTCCATTCACGG - 3'

1.2.2 其它试剂

限制性内切酶 Sal Ⅰ、*Hind* Ⅲ、EcoR Ⅰ、Xba Ⅰ、T_4DNA 连接酶均为 Promega 公司产品,购自北方同正公司;核酸分子量标准、酚/氯仿购自上海生工公司;柱离心式质粒抽提试剂盒、以及柱离心式胶回收试剂盒均购自上海华舜公司。

1.3 实验仪器和设备

核酸电泳仪(DYY - 3 北京六一仪器厂);凝胶成像仪(Gel doc 100 BIO - RAD);恒温空气浴摇床(ROSI 1000 France);隔水式电热恒温培养箱(PHX - DHS - 40 × 50 - BS 上海跃进医疗器械厂);台式高速冷冻离心机(Biofuge 22R Heraeus);紫外分光光度计(Du Series 600 BECKMAN)。

1.4 实验方法

1.4.1 技术路线:见图 1。

1.4.2 方法

1.4.2.1 退火

用退火缓冲液溶解 DNA 单链片段,将要退火的两条片段等摩尔数混合,加热至 95℃ 2min,然后缓慢冷却到室温,用乙醇脱盐纯化。

1.4.2.2 酶切

将载体 pTZU6 + 1 用 Sal Ⅰ 和 Xba Ⅰ 双酶切,再用胶回收试剂盒回收酶切片段[2]。

1.4.2.3 连接反应

将退火产物和酶切后的载体按摩尔比 3:1 的比例进行连接反应,置 4℃ 冰箱过夜[2]。下文将序列 1 的重组质粒称为 pTZU6 + 1 - 1;序列 2 的重组质粒称为 pTZU6 + 1 - 2;序列 3 的重组质粒称为 pTZU6 + 1 - 3。

1.4.2.4 转化

采用氯化钙转化方法,将重组质粒和空质粒分别转入大肠杆菌 Jm109 中[3]。

1.4.2.5 重组质粒筛选

首先使用蓝白斑法[2],挑白色菌落接种 LB 液体培养基,使用华舜公司的小量质粒提取试剂盒提取可能的菌落的质粒(具体步骤参见华舜公司的小量质粒提取试剂盒的使用说明书)。

1.4.2.6 重组质粒鉴定

将重组质粒和空质粒分别进行限制性内切酶消化鉴定,为确保重组质粒正确,此步共分成 3 组:第 1 组用 Sal Ⅰ 单酶切;第 2 组用 Sal Ⅰ 和 EcoR Ⅰ 双酶切;第 3 组用 *Hind* Ⅲ 和 EcoR Ⅰ 双酶切。酶切产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳检查[2]。

1.4.2.7 重组质粒进行测序鉴定

将鉴定证实后的细菌培养扩增,每 0.8ml 过夜培养细菌(摇至对数晚期)加无菌甘油 0.2ml,混匀后放入 - 70℃ 冰箱冻存。取 1 管冻存菌液送上海申友公司测定。

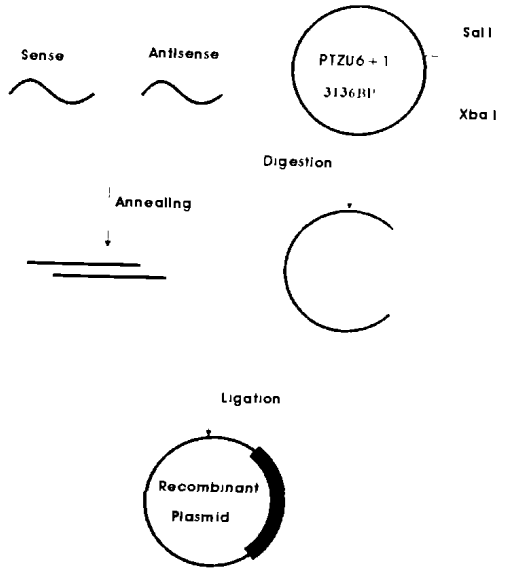


图 1 构建重组表达质粒技术路线图

2 结 果

2.1 载体酶切鉴定

将载体用 Sal Ⅰ和 Xba Ⅰ双酶切,回收产物行电泳检查,发现环状质粒已被切开,大片段约为 3.15kb,而小片段因太小而检测不出来(见图 2)。

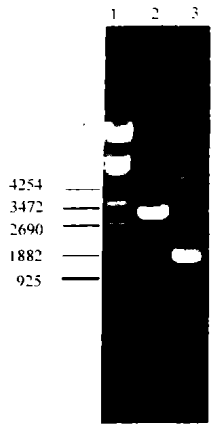


图 2 pTZU6 + 1 双酶切图

1 为 Marker;2 为 pTZU6 + 1 经 Sal Ⅰ 和 Xba Ⅰ 双酶切;3 为 pTZU6 + 1 未酶切

2.2 重组质粒筛选

2.2.1 蓝白斑法筛选重组质粒

所涂平板均有菌落形成,多数为白色菌落,少数为蓝色菌落。取平板上生长的白色菌落分别接种于 3ml LB 中 250r/min 振摇过夜。按照小量质粒抽提

维普资讯 http://www.cqvip.com

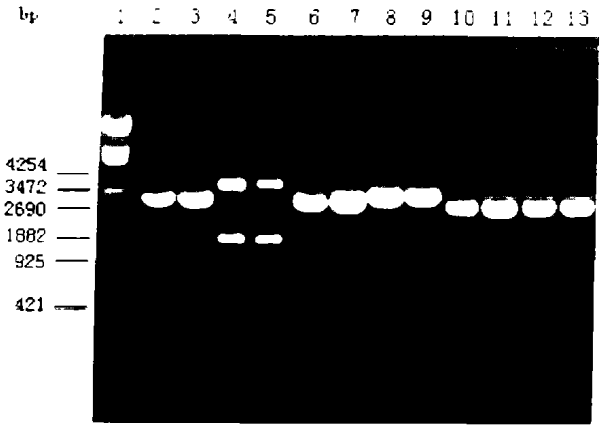


图 3 重组体酶切鉴定图

1:Marker;2－5:Sal Ⅰ酶切图;6－9:Sal Ⅰ和 EcoR Ⅰ酶切图;10－13:Hind Ⅲ和 EcoR Ⅰ酶切图。2,6,10 为 pTZU6＋1;3,7,11 为 pTZU6＋1－3;4,8,12 为 pTZU6＋1－1;5,9,13 为 pTZU6＋1－2。

试剂盒的说明书抽提出质粒。

2.2.2 酶切鉴定重组质粒

第一组经 Sal Ⅰ单酶切后，pTZU6＋1 和 pTZU6＋1－3 因有 Sal Ⅰ酶切位点可由环状变为线状，而 pTZU6＋1－1 和 pTZU6＋1－2 无 Sal Ⅰ酶切位点故仍保持环状：第二组经 Sal Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切后，pTZU6＋1 和 pTZU6＋1－3 均被切成两个片段，而 pTZU6＋1－1 和 pTZU6＋1－2 被切成一个片段；第三组经 Hind Ⅲ和 EcoR Ⅰ双酶切后，均为两个片段，但重组质粒因加入了一段 DNA 序列，故小片段较空质粒大(见图 3)。

2.3 重组质粒序列测定

将重组质粒 pTZU6＋1－1、pTZU6＋1－2、pTZU6＋1－3 送上海申友公司测序，所用引物为 M13F。测序结果均与目的序列相同。测序结果如下：

pTZU6＋1－1

CTAGTAAAAAGCGGACCGAAGTCCGCTCTAGAAAAAGCAGGCGGCTCAAAGATTTGCGAACAAATCTTTGAGCCGCCTGCCGGTGTTTCGT
CCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAAC
TGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTC
TAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCGACCTTGGATCCCCGGGTACCGAGCTCG
AATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATA
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCG
GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA

pTZU6＋1－2

CGCAGGTCCTAGTAAAAAGCGGACCGAAGTCCGCTCTAGAAAAAGTGAATGGACGTCTAGAAACCACCTTTCTAGACGTCCATTCACCGGT
GTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATT
TTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATT
ATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCGACCTTGGATCCCCGGGTACC
GAGCTCGAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA
CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT
TCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA

pTZU6＋1－3

ATGTTCGCAGGTCCTAGTAAAAAGCGGACCGAAGTCCGCTCTAGTCAAAAAGTGAATGGACGTCTAGAAAGGTGGTTTCTAGACG
TCCATTCACGGTCGACGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAG
TCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTAC
AGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCGA
CCTTGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTT
ATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG
TTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA

3 讨 论

国内外近来研究表明：DNA 甲基化可以在转录水平调控基因表达(主要是在转录起始阶段)，通过基因启动子及其附近区域内 CpG 岛胞嘧啶的甲基化关闭某种组织或细胞不必需的基因，而去甲基化作用则可指导组织特异性或阶段特异性基因的活

维普资讯 http://www.cqvip.com

化,使基因表达具有时空特点。正常组织细胞中,广泛表达的基因启动子区域 CpG 岛常处于非甲基化状态,肿瘤细胞中,这些 CpG 岛常变为甲基化状态,其相关基因的表达亦被关闭。对许多基因的研究也证实了这一点,其中包括:肿瘤抑制基因、细胞周期凋亡调节基因、抑制肿瘤转移和浸润基因、DNA 修复基因、激素受体基因、抑制血管形成基因等[3]。

因此,研究者们都锁定这一课题:如何通过控制 DNA 甲基化的表达来达到治疗的目的? DNA 甲基化状态主要是由 DNA 甲基转移酶和去甲基酶的活性来相互调节的。现应用较多的是 DNA 甲基转移酶抑制剂,如 5' - Aza - 2' - deoxycytidine 等。但据临床的研究发现其毒副作用和耐药性明显,患者的耐受性及依从性较差,故未得到普遍应用[4]。因此本实验希望从基因水平入手,减少 DNA 甲基转移酶产量,控制基因启动子区域的甲基化状态,使一些因超甲基化而沉默的基因重新激活,发挥其应有的抑制肿瘤功能。

编码 DNA 甲基转移酶的基因主要有:DNMT1、DNMT2、DNMT3。其中,DNMT1 主要是维持 DNA 的甲基化;DNMT2 可与 DNA 上特异性位点结合,但其具体作用尚不清楚;DNMT3 主要参与 DNA 的从头甲基化。本实验选择 DNMT1 作为研究对象。

现在抑制基因表达的方法比较多,现在最热门的是 RNA 干扰法,尤其是 siRNA[5,6]。许多研究表明在哺乳动物细胞中用 siRNA 能高效阻断某个特定基因的表达。它与正义、反义 RNA 基因干涉相比,具有效果最强;持续时间长,甚至可持续到下一代;具有基因序列特异性:不受注射部位的影响等优点。因此,应用 RNAi 抑制目的基因的表达将用于疾病的治疗成为新的热点。

本实验已经成功地构建了阻断 DNMT1 基因表达的 RNAi 序列,并已克隆至载体 pTZU6 + 1 中,为下一步的实验研究打好坚实基础,从而为肿瘤的基因治疗在细胞水平、分子水平、整体水平上提供新的方法。

参 考 文 献

[1] Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer[J]. Lancet Oncol, 2003; 4(6): 351 - 358.

[2] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯, 主编. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版, 科学出版社, 1999; 16 - 340.

[3] Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, et al. Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21 (Cipl) promoter[J]. Mol Cell Biol, 2003; 23(12): 4056 - 4065.

[4] Sigalotti L, Altomonte M, Colizzi F, et al. 5 - Aza - 2' - deoxycytidine(decitabine) treatment of hematopoietic malignancies: a multimechanism therapeutic approach[J]? Blood, 2003; 101(11): 4644 - 4646; discussion 4645 - 4646.

[5] Kantarjian. HM, O'Brien SM, Estey E, et al. Decitabine studies in chronic and acute myelogenous leukemia [J]. Leukemia. 1997; 11 Suppl 1: S35 - 36.

[6] Czauderna F, Fechtner M, Dames S, et al. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells[J]. Nucleic Acids Res, 2003; 31(11): 2705 - 2716.

内脏型黑热病 1 例

夏 红[1], 周 智[2], 张全海[2], 黄 英[2], 张大志[2], 任 红[2]

(1. 重庆市大足县人民医院内二科, 重庆 402360; 2. 重庆医科大学第二临床学院感染病科, 重庆 400010)

黑热病是由利什曼原虫引起的慢性地方性传染病,分布遍及亚、非、欧、美各洲,我国建国前在长江以北 16 个省、市、自治区的广大农村有流行,1958 年在我国范围内已接近消失。近年来于由于人口流动性增大、局部环境和生态的变化,黑热病发病率有上升趋势,临床表现不典型,给诊断和治疗带来困难。本例患者发病前先后到甘肃汶县,新疆塔城打工,3 月后出现发热、脾大和贫血,先后到国内多家大医院就诊,未明确诊断,最后经骨髓穿刺涂片和免疫学检测得以确诊,报道如下。

1 临床资料

患者男性,重庆江津县人,24 岁,因不规则发热、贫血和肝脾肿大 1 年入院,起病前先后在甘肃新疆打工。1 年前患者出现持续性不规则发热,体温 38.5 度 ~ 39.7 度,后为间断发热(T37.5 ~ 38.5 度),共计 4 月,伴消瘦、乏力、食欲不振,头晕、冷汗、鼻衄等,在外先后用多种抗菌素及纠正贫血等对症治疗,症状似有改善,其后 8 月,自觉症状消失,基本恢复正常生活,但易疲倦,夜间多汗。此次因腹胀,乏力明显加重,出现巨脾、低热 1 月入院。查体:神志清、(下转第 287 页)