

靶向 *mdr1* 基因 shRNA 真核表达载体的构建及鉴定

干惠珠¹, 张桂珍², 张凤春³, 卜丽莎², 杨绍娟², 高 申², 郑德明²

[摘要]目的:设计并构建靶向 *mdr1* 基因 shRNA 真核表达质粒。方法:以 *mdr1* 为靶基因设计具有短发夹结构的模板寡核苷酸,退火形成互补双链结构,再克隆至 *pSilencerTM 3 FH1 neo* 载体,构建重组的短发夹 shRNA 表达载体。采用酶切法和测序法鉴定。结果:经限制性内切酶酶切电泳后显示有 66 bp 模板寡核苷酸片段和 4.3 kbp 的线性化的 *pSilencerTM 3 FH1 neo* 载体片段。重组子测序结果与 Genbank 中的 *mdr1* 基因 cDNA 序列相符。结论:重组靶向 *mdr1* 基因 shRNA 表达载体构建正确,为进一步转染耐药的肿瘤细胞逆转肿瘤耐药研究奠定了基础。

[关键词] *mdr1* 基因; RNA 干扰; shRNA 表达载体

[中国图书资料分类法分类号] R 73-3 [文献标识码] A

Construction and identification of *pSilencerTM 3 FH1 neo mdr1 short hairpin RNA expression vectors*

GAN Hui zhu¹, ZHANG Gui zhen², ZHANG Feng chun³, BU Li sha², YANG Shao juan², GAO Shen², ZHENG De ming²

(1 Department of Oncology; 2 Central Laboratory, China Japan Union Hospital Jilin University, Changchun 130031

3 Department of Oncology Renji Hospital Shanghai Jiaotong University Shanghai 200004 China)

[Abstract] **Objective** To study the construction of *pSilencerTM 3 FH1 neo mdr1 short hairpin RNA expression vectors*. **Methods** Two different shRNA targets designed to be homologous to the P-glycoprotein (P-gp) encoding *mdr1* mRNA consensus sequence were annealed and ligated into the *Bam*HI and *Hind*III site of linearized *pSilencerTM 3 FH1 neo* vector. The recombinant named as *pSilencerTM 3 FH1 neo mdr1-A* and *mdr1-B shRNA expression plasmids* was identified by restrictive enzyme digestion and sequencing. **Results** The fragments of 66 bp and 4.3 kbp were shown after digestion by *Bam*HI and *Hind*III and agarose gel electrophoresis. The DNA sequences of *pSilencerTM 3 FH1 neo mdr1-A* and *mdr1-B shRNA expression plasmids* were proved to be identical to the data of *mdr1* in Genbank. **Conclusions** *pSilencerTM 3 FH1 neo mdr1 shRNA expression vectors* has been constructed successfully.

[Key words] *mdr1* gene; RNA interference; shRNA expression vector

多药耐药 (MDR) 是指肿瘤细胞不单对原来使用过的药物产生耐药,同时对与之结构、作用机制完全不同的药物也产生交叉耐药^[1]。肿瘤产生 MDR 的分子机制最重要的是跨膜药泵基因 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) *mdr1* 的扩增或过表达。MDR 已成为恶性肿瘤治疗的难点。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是通过转录后基因沉默抑制目的基因表达的一种新技术。RNAi 与反义寡核苷酸和反义 RNA 技术相比具有较大优点,国外曾有利用 RNAi 技术抑制 *mdr1* 基因表达的报道^[2,3]。为进一步逆转肿瘤多药耐药性,本研究采用体内转录合成法,构建 2 个靶向 *mdr1* 发夹 shRNA 表达载体,转染耐药的肿瘤细胞,为探讨逆转肿瘤多药耐药的新方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株 *pSilencerTM neo 3 FH1 shRNA* 表达载体购自美国 Ambion 公司。大肠埃希菌 JM109 由吉林大学中日联谊医院中心研究室提供。

1.2 主要试剂和设备 T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司; *Bam*HI 和 *Hind*III 内切酶购自大连宝生物工程公司; 去核酸酶水购自美国 Promega 公司; 琼脂糖购自美国 Sigma 公司; DNA purification system Wizard[®] plus SV MiniPreps 购自美国 Promega 公司; 琼脂粉购自上海化学试剂厂; DNA Maker DL2000 购自大连宝生物工程公司。主要仪器: 低温高速离心机 (Hitachi 公司); U-3410 型紫外分光光度仪 (日本日立公司); Gene Amp PCR System 9700 (美国 PE 公司); AEL-40S 型电子分析天平 (日本岛津公司); DYY-28A 型转移电泳仪 (北京六一仪器厂); GE 2008 凝胶图像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

1.3 *mdr1* 基因 shRNA 模板寡核苷酸的设计和合成 根据 Genbank P-gp 编码基因 *mdr1* cDNA 的已知序列,参照文献^[2,3],在核苷酸 2745-2765、3563-3583 之间选择 2 个 19 bp 的 shRNA 特异性靶位点

[收稿日期] 2006-09-25

[基金项目] 国家自然科学基金 (No. 30171064) 及吉林大学创新基金 (2003CX045) 资助项目

[作者单位] 吉林大学中日联谊医院 1 血液肿瘤科, 2 中心研究室, 吉林 长春 130031; 3 上海交通大学医学部附属仁济医院 肿瘤科, 上海 200001

[作者简介] 干惠珠 (1972-), 女, 博士, 主治医师。

序列(基因编号 AF016535)。经搜索 BLAST 数据库未发现其它基因与此序列有同源性。互补的寡核苷酸模板编码针对所设计的 *mdr1* mRNA 靶位点, 2 个互补的反向重复序列之间插入 9 bp 非同源序列 TTCAAGAGA。发夹 shRNA 模板寡核苷酸的 3' 末端 2745-2765

<i>Bam</i> HI	Sense Strand	Loop	Antisense Strand	Terminate <i>Hind</i> III
	5'GATCCG-AATGTTGCTCGACAAGCA-TTCAAGAGA-TGCTTG TCCAGACAACATF TTTTTT-GGAAA3'			
	3'GG-TTACAACAGACCTGTTCGF-AAGTTCTCT-ACGAACAGGCTGTGTGTA-AAAAA-CCTTTCGA5'			
3563-3583	RNA PoIII			

<i>Bam</i> H1	Sense Strand	Loop	Antisense Strand	Terminate <i>Hind</i> III
	5'GATCCG-AGGAGGCCAACATACATGG-TTCAAGAGA-GCATGTA TGTTGTCCTCCT-TTTTTT-GGAAA3'			
	3'GG-TCCTCCGTTGTA TGTAGC-AAGTTCTCT-CGTACATA CAACCGGAGGA-AAAAA-CCTTTCGA5'			

将一段反向重复序列插入到 H1 启动子上游, 每个模板由对应于靶基因编码区的 21 个核苷酸组成, 形成反向重复序列的两个模板间隔了 9 个核苷酸, 在反向重复序列的 3' 末端加上 5 个胸腺嘧啶作为转录终止信号; 载体被导入细胞内, 产生的 sRNA 自身反折形成发夹状 dsRNA。

1.4 *mdr1* 发夹 shRNA 模板寡核苷酸退火 装配 50 μ l 退火混合物; 2 μ l 正义 shRNA 模板寡核苷酸, 2 μ l 反义 shRNA 模板寡核苷酸, 46 μ l 1 \times DNA 退火溶液; 加热混合物至 90 $^{\circ}$ C 3 min 冷却至 37 $^{\circ}$ C, 孵化 1 h

1.5 连接退火的 *mdr1* shRNA 模板寡核苷酸和线性化的 pSilencerTM 3-H1 neo sRNA 表达载体 用 45 μ l 去核酸酶水稀释 5 μ l 退火 shRNA 模板寡核苷酸, 终浓度为 8 μ g μ l⁻¹ 建立 10 μ l 连接反应体系: 稀释退火的 shRNA 模板寡核苷酸 1 μ l 去核酸酶水 6 μ l 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μ l pSilencerTM 3-H1 neo sRNA 载体 1 μ l 5 u μ l T4 DNA 连接酶 1 μ l 设 1 个阴性对照, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

1.6 连接产物转化大肠埃希菌 取新鲜制备的 M109 感受态细胞 200 μ l 加入质粒各 1 μ l 冰上放置 30 min; 42 $^{\circ}$ C 90 s 迅速冰浴 2 min; 每管加无抗生素的普通 LB 培养基 800 μ l; 37 $^{\circ}$ C 150 r/min 振荡 45~90 min; 用无菌弯头玻璃铺菌器将 200 μ l 菌液铺于含氨苄青霉素的琼脂平板表面, 室温平放 30 min; 倒置, 37 $^{\circ}$ C 孵箱中培养过夜。挑取单菌落, 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 摇菌过夜。

1.7 质粒小量快速提取 取过夜培养的 5 ml 重组菌液, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min 用 250 μ l 细胞悬浮液重悬重组菌, 转移悬浮细菌到一个无菌微量离心管中; 加入 250 μ l 细胞分裂液, 室温放置 1~5 min; 加入 10 μ l 碱性蛋白酶液, 室温放置 5 min; 加入 350 μ l 中和液, 室温 10 min 高速离心取上清; 将

是 5 个胸腺嘧啶 (T), 作为 RNA poIII 的终止信号; 其 5', 3' 末端分别是 *Bam*HI 和 *Hind* III 的限制性酶切位点。采用化学合成法合成单链 *mdr1* shRNA 模板寡核苷酸。稀释发夹 shRNA 模板寡核苷酸至终浓度为 1 μ g μ l⁻¹ shRNA 模板寡核苷酸序列分别如下:

RNA PoIII

<i>Bam</i> HI	Sense Strand	Loop	Antisense Strand	Terminate <i>Hind</i> III
	5'GATCCG-AATGTTGCTCGACAAGCA-TTCAAGAGA-TGCTTG TCCAGACAACATF TTTTTT-GGAAA3'			
	3'GG-TTACAACAGACCTGTTCGF-AAGTTCTCT-ACGAACAGGCTGTGTGTA-AAAAA-CCTTTCGA5'			
3563-3583	RNA PoIII			

上清倒入层析柱中, 室温 13 000 r/min 离心 1 min 丢弃流到收集管中的液体, 将柱子再插入收集管; 加入 750 μ l 洗液, 沉淀用 70% 乙醇洗涤两次, 室温 13 000 r/min 离心 1 min 将柱子再次插入收集管; 用 250 μ l 洗液重复上述步骤, 室温 13 000 r/min 离心 2 min; 将柱子插入一个无菌的微量离心管中, 加入 100 μ l 去核酸酶水, 室温 13 000 r/min 离心 1 min 质粒 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.8 重组质粒的酶切鉴定 取少量提取的重组质粒 DNA 10 μ l 进行 *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切鉴定。酶切反应体系: 10 \times Buffer 2 μ l *Bam*HI 1 μ l *Hind* III 1 μ l 质粒 DNA 10 μ l 双蒸水补至 20 μ l 混合后 37 $^{\circ}$ C, 2 h 取 10 μ l 酶切产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 并以 DL2000 为分子量标准, 在 1 \times TBE 缓冲液中, 80~100 V 电泳 1 h 凝胶成像系统紫外照相并进行扫描分析。

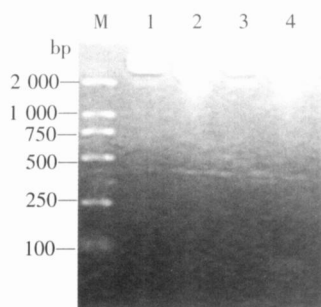
1.9 重组质粒的测序 由上海生工生物工程公司对重组质粒进行测序。5' 末端测序引物: 5'-GTTTCCAGTCACGAC-3' (M13 正向测序引物); 3' 末端测序引物: 5'-GAGTTAGCTACTCATTAGG-3'。

1.10 重组质粒的纯化 将质粒加入 200 μ l TE 液中, 37 $^{\circ}$ C 缓慢摇动 20 min; 加入等体积的饱和酚, 4 $^{\circ}$ C 6 000 r/min 离心 5 min; 加入等体积的苯酚 氯仿 异戊醇 (25:24:1), 4 $^{\circ}$ C 6 000 r/min 离心 5 min; 加入等体积的氯仿 异戊醇 (24:1), 4 $^{\circ}$ C 6 000 r/min 离心 5 min; 加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇 -20 $^{\circ}$ C 30 min; 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 10 min; 70% 乙醇洗两遍, 抽真空干燥; 用 20 μ l 无菌的 TE 或 ddH₂O 溶解; 取 5 μ l 稀释至 2 ml 紫外分光光度计测定, 在 260 nm 和 280 nm 的 OD 值计算 DNA 的含量; 用无菌的 TE 或 ddH₂O 稀释至 1 μ g μ l⁻¹ -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2 结果

2.1 靶向 mdr1 基因 shRNA 表达质粒的酶切鉴定

将阳性克隆的重组质粒用 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进一步鉴定脱落片段为 66 bp, 与设计的 mdr1 基因模板寡核苷酸片段相符, 证实有阳性重组子, 结果见图 1。



M:DL2000 DNA marker 1:p*Silencer*TM 3.1-H1 neo mdr1-A shRNA 表达质粒 2:p*Silencer*TM 3.1-H1 neo mdr1-A shRNA *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切表达质粒 3:p*Silencer*TM 3.1-H1 neo mdr1-B shRNA 表达质粒 4:p*Silencer*TM 3.1-H1 neo mdr1-B shRNA *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切表达质粒

图1 mdr1 基因 shRNA 表达质粒酶切鉴定

2.2 靶向 mdr1 基因 shRNA 表达质粒的序列测定

将阳性重组子进行 DNA 序列测定, 测序结果与文献^[2,3]及 Genebank 中的 mdr1 基因 cDNA 序列相符, 证实 mdr1-A、mdr1-B 模板寡核苷酸和 p*Silencer*TM 3.1-H1 neo siRNA 表达载体连接反应正确, 结果见图 2。

2.3 mdr1 基因 shRNA 表达质粒的纯度及含量测定

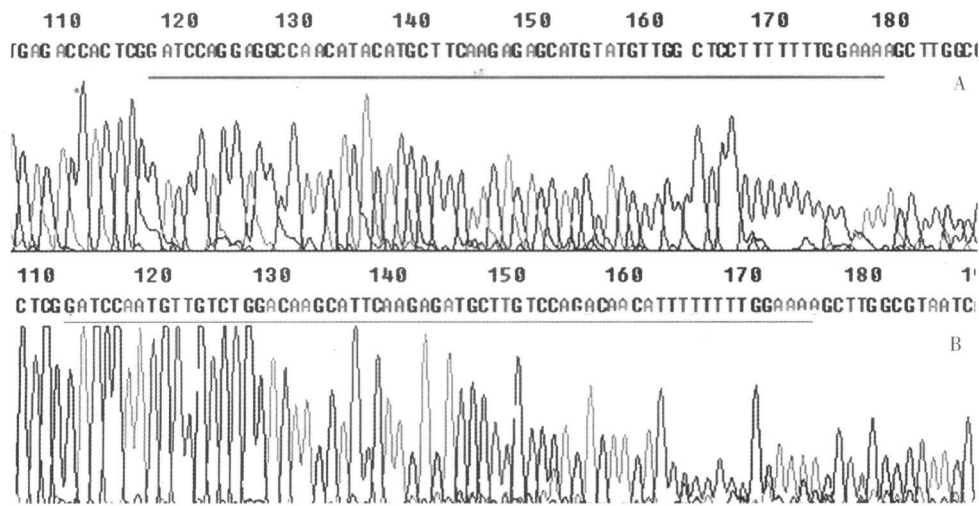
质粒 DNA 溶液吸收紫外光, 并且在 260 nm 波长吸收最大。吸收与波长之间的关系可用下列关系式表示, 并以此计算质粒 DNA 溶液的浓度。质粒 DNA (mg/ml) = $OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$, OD_{260} 是质粒 DNA 溶液在 260 nm 测得的吸收峰值。

p*Silencer*TM 3.1-H1 neo mdr1-A shRNA 表达质粒的浓度 (mg/ml) = $OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数} = 0.1435 \times 50 \times 400 = 2.870 \text{ mg/ml}$

p*Silencer*TM 3.1-H1 neo mdr1-B shRNA 表达质粒的浓度 (mg/ml) = $OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数} = 0.1106 \times 50 \times 400 = 2.212 \text{ mg/ml}$

3 讨论

1976年 Ju liano等^[4]证实具有MDR表型的中



A:p*Silencer*TM 3.1-H1 neo mdr1-A shRNA 表达质粒测序 B:p*Silencer*TM 3.1-H1 neo mdr1-B shRNA 表达质粒测序

图2 mdr1 基因 shRNA 表达质粒测序

国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 膜上有一种分子量为 170 kDa 的 P-gp 过度表达, 此耐药细胞对药物的摄入与亲代细胞无差异, 而药物外排能力却明显增加, 并成功地克隆了 P-gp 编码基因 mdr1。P-gp 属于 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白超家族成员之一, 可利用 ATP 提供能量转运特异的底物, 具有能量依赖性“药泵”的功能, 它能将抗癌药和其它疏水性化合物主动转运出细胞^[5], 使细胞内药物浓度下降, 而产生 MDR。研究显示初治原发性恶性肿

瘤 P-gp 表达明显低于转移复发性恶性肿瘤。几乎所有的人类肿瘤细胞均有不同程度的 mdr1/P-gp 表达, 但是那些对化疗不敏感或疗效差的肿瘤往往有较高的 mdr1 基因表达^[6]; 且 P-gp 表达量的增加与 MDR 细胞株的耐药程度呈正相关。

MDR 已成为恶性肿瘤治疗的难点, 对 MDR 及其逆转的研究已成为目前肿瘤基因治疗研究的一大热点。虽然 MDR 逆转剂可通过抑制 P-gp 药泵的功能而逆转 mdr1 基因介导的经典耐药途径, 但这些逆

转剂或化学增敏剂往往由于逆转耐药所需剂量大,毒副作用大而限制了临床应用。因此,有必要寻找有选择性、低毒高效的方法逆转肿瘤 MDR。从理论上讲,在基因水平逆转 MDR 将是解决问题的关键。

RNAi 是近年来兴起的分子生物学技术,由 dsRNA (double stranded RNA) 介导的基因阻抑现象,通过在多种生物细胞内导入外源或内源的 dsRNA,可以特异性阻滞基因的表达功能,使内源性 mRNA 发生特异性降解,从而引起转录后的基因沉默 (post transcriptional gene silencing PTGS)。由于这是一种在 RNA 水平的基因表达抑制,故称为 RNA 干扰,简称 RNAi。RNAi 现象是在研究反义 RNA 作用过程中发现的,首先在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中证实^[7]。因为如果直接将长链 dsRNA 导入哺乳动物细胞,能够激活干扰素途径,引起非特异性的 mRNA 降解,蛋白翻译的广泛抑制;人们一度认为哺乳动物细胞不能产生特异性的 RNAi,但 Wianny^[8]、Svoboda^[9]、Elbashir^[10] 以及 Yu 等^[11] 的实验改变了上述观点。Elbashir 等^[10] 将人工合成的 21nt dsRNA 导入到人胚肾细胞 (293) 和 HeLa 细胞产生了特异性的 RNAi,证实 RNAi 技术可以应用到哺乳动物细胞中。这种短链 dsRNA (21-23nt) 被称为 siRNA (small interfering RNAs)。多次细胞分裂后, siRNA 引起的 RNAi 效应仍然保留。siRNA 可以体外制备。

靶位点的选择是 RNA 干扰技术的关键,基因抑制的有效性很大程度取决于目的基因序列的选择。目的序列可以随机选择,也可以通过在目的基因的不同区域上测试不同的序列以决定何种序列是最有效的。靶位点的选择原则为:从转录起始密码 AUG 开始,搜寻下游 AA 序列,记录跟每个 AA 3'端相邻的 19个核苷酸作为候选的 siRNA 靶位点;研究显示 GC 含量在 30%~50%左右的 siRNA 要比那些 GC 含量偏高的更为有效;siRNA 靶位点不要选择针对 5'和 3'端的非编码区;并进行序列同源性分析:搜索 BLAST 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST),将潜在的序列和相应的基因组数据库(人,或者小鼠、大鼠等)进行比较,排除那些和其它编码序列 EST 同源的序列。

本研究选用体内转录合成法,构建短发夹 shRNA 表达载体。由于有报道 H1 启动子优于 U6 启动子,故选用 pSilencerTM-3.1 H1 neo 表达载体。首先根据有关 mdr1 基因的相关研究^[2,3]和靶位点的选择原则,从人 mdr1 基因的 2个不同区域选择 19 bp 的靶位点,其中一个靶位点是锤头状核酶的切割位点,2个靶位点的 GC 含量分别为 38%和 47.6%,并进行 BLAST 数据库同源性搜索。由于文

献^[2,3]证实所选用靶位点具有干扰效果,故本研究选用 2条模板寡核苷酸进行研究,合成 2个发夹 shRNA 插入模板寡核苷酸,分别含有 MDR1 基因 19 bp 正义和反义的序列。有报道 9 bp 间隔的 shRNA 结构可产生最有效的基因沉默影响^[12],所以我们建立了在 hH1 启动子控制下可产生含有 9 bp 间隔发夹 shRNA 结构的表达载体。shRNA 模板寡核苷酸的 3'末端是 5个胸苷嘧啶 (T),作为 RNA 聚合酶 III 的终止信号;其 5'、3'末端分别是 *Bam*HI 和 *Hind*II 的限制性酶切位点。载体被导入细胞内,产生的 siRNA 自身反折形成发夹状 dsRNA。通过 *Bam*HI 和 *Hind*II 限制性内切酶消化和测序方法证实发夹 shRNA 寡核苷酸插入片段和线性化的 pSilencerTM-3.1 H1 neo 载体连接正确,成功构建 mdr1 shRNA 表达载体,为下一步 mdr1 基因的相关沉默研究奠定了坚实的基础,从而将为逆转肿瘤 MDR、改善依赖化疗的肿瘤患者的预后开辟一条新的途径。

[参 考 文 献]

- [1] Lage H, Diegel M. Multiple mechanisms confer different drug resistant phenotypes in pancreatic carcinoma cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128(7): 349-357.
- [2] Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug resistant cancer cells [J]. *Cancer Res* 2003; 63(7): 1515-1519.
- [3] Nieth C, Priebisch A, Stege A, et al. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi) [J]. *FEBS Lett* 2003; 545(2-3): 144-150.
- [4] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455(1): 152-162.
- [5] Dandner PJ, Ciolino HB, Pluzek CA, et al. Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF7 cells [J]. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53(3): 229-240.
- [6] Goldstein LJ, Galski H, Fojta A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers [J]. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81(2): 116-124.
- [7] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature* 1998; 391(6669): 806-811.
- [8] Wianny E, Zemicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double stranded RNA in early mouse development [J]. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2): 70-75.
- [9] Svoboda P, Stein B, Hayashi H, et al. Selective reduction of dominant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference [J]. *Development* 2000; 127(19): 4147-4156.
- [10] Elbashir SM, Harborth J, Lendecke W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature* 2001; 411(6836): 494-498.
- [11] Yu JK, DeRuiter SL, Tumer DL. RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(9): 6047-6052.
- [12] Bammertkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science* 2002; 296(5567): 550-553.