

# 小鼠 $\beta 2m$ 正义与反义 RNA 表达载体的构建及鉴定

孟 瑛<sup>1</sup>, 李树浓<sup>1</sup>, 余新炳<sup>2</sup>, 黄绍良<sup>3</sup>, 徐 劲<sup>2</sup>, 吴忠道<sup>2</sup>

(中山医科大学 1. 病理生理教研室, 2. 寄生虫学教研室, 3. 孙逸仙纪念医院儿科, 广东 广州 510089)

**摘 要:**【目的】构建小鼠  $\beta 2$  微球蛋白基因( $\beta 2$  microglobulin gene  $\beta 2m$ )正义及反义 RNA 表达载体, 为研究降低细胞 MHC I 类分子的表达作准备。【方法】从小鼠基因组获得的  $\beta 2m$  克隆中以  $\beta 2m$ -pSV2 $\Delta$ HXgpt 为模板, 合成两对引物, 采用常规 PCR 方法分别扩增出  $\beta 2m$  引导区及其下游主要编码区, 即外显子 1 及部分外显子 2, 然后利用重叠延伸法将两条片段拼接起来, 再将其分别正向、反向插入载体 pcDNA3 并进行限制性内切酶酶切鉴定及序列分析。【结果】构建出小鼠  $\beta 2m$  正义和反义 RNA 表达载体 pcDNA3- $\beta 2m$ SN 及 pcDNA3- $\beta 2m$ AN。【结论】克隆的正义及反义  $\beta 2m$  经限制性内切酶酶切鉴定结果正确, 测序分析与文献一致, 从而为下一步降低移植排斥反应的体内外研究奠定了基础。

关键词: 基因; MHC I 类;  $\beta 2$  微球蛋白; 小鼠; 载体

中图分类号: R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)06-0414-04

## Construction and Identification of the Mouse $\beta 2m$ Sense and Antisense RNA

MENG Ying<sup>1</sup>, LI Shu-nong<sup>1</sup>, YU Xin-bing<sup>2</sup>, HUANG Shao-liang<sup>3</sup>, XU Jin<sup>2</sup>, WU Zhongdao<sup>2</sup>

(1. Department of Pathophysiology, 2. Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences  
3. Department of Pediatrics, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:**【Objective】To construct the mouse  $\beta 2$  microglobulin gene ( $\beta 2m$ ) sense and antisense RNA into expression vectors, for further study on downregulating the expression of MHC I molecules.【Methods】The leader segment and the main coding blocks, exon 1 and part of exon 2, were amplified respectively by PCR from the  $\beta 2m$  clone  $\beta 2m$ -pSV2 $\Delta$ HXgpt. They were spliced together by overlap extension, then digested and inserted in sense or antisense orientation into plasmid pcDNA3. The two recombinant plasmids were identified by restriction endonuclease and the inserting genes were sequenced.【Results】The recombinant plasmids of the  $\beta 2m$  sense and antisense RNA, pcDNA3- $\beta 2m$ SN and pcDNA3- $\beta 2m$ AN were obtained.【Conclusion】pcDNA3- $\beta 2m$ SN and pcDNA3- $\beta 2m$ AN cloning vectors are successfully constructed, and the  $\beta 2m$  sequence is identical with that of the previous reports in literature.

**Key words:** genes; MHC class I;  $\beta 2$  microglobulin( $\beta 2m$ ); mouse; vector

早在 20 世纪 40 年代, George Snell 的研究发现, 引起小鼠移植排斥反应的主要抗原是主要组织相容性复合体基因 (major histocompatibility complex gene, MHC) 编码的抗原 MHC。MHC 是一群紧密连锁的基因簇, 其表达产物被称为主要组织相容性抗原或移植抗原, 临床资料的统计学分析及体

内外实验均已证实, 不同种属或同种不同系的动物个体间进行正常组织或肿瘤移植时, 它是引起排斥反应的主要因素<sup>[1]</sup>。为降低移植排斥反应的发生, 人们进行了各种尝试, 包括采用免疫抑制剂降低免疫反应, 或者利用基因敲除技术降低 MHC I、II 类抗原的表达等<sup>[2,3]</sup>。MHC I 类分子是由一条  $\alpha$  肽

收稿日期: 2000-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39800134); 广东省青年科学基金资助项目(980681); 中山医科大学“211 工程”重点课题基金资助项目(201102-1105)

作者简介: 孟 瑛(1965-), 女, 河北石家庄人, 讲师, 博士生

链及一条  $\beta 2$  微球蛋白 ( $\beta 2m$ ) 肽链组成, 它分布于几乎所有的有核细胞表面。  $\beta 2m$  不是由 MHC 编码, 但是它对于  $\alpha$  链在细胞表面的表达、I 类分子正常功能的维持都是必需的,  $\beta 2m$  或  $\beta 2m$  肽链缺陷细胞将不能表达 MHC I 类分子<sup>[4]</sup>。为了达到降低移植排斥反应的目的, 我们采用重叠区扩增基因拼接法 (gene splicing by overlap extension, gene SOE) 构建小鼠  $\beta 2m$  正义和反义 RNA 表达载体, 以期降低细胞 MHC I 类分子的表达, 为降低移植排斥反应的体内外研究提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

从小鼠基因组获得的  $\beta 2m$ -pSV2 $\Delta$ HXgpt 由美国斯坦福大学 Pames 教授惠赠; 质粒 pcDNA3 为本校寄生虫教研室保存; Pfu *Taq* 酶及 dNTP 为 Gen-Da 公司产品; T4DNA 连接酶购自 Promega; *Bam*HI、*Xba*I 和 *Xho*I 限制性内切酶为 New England BioLabs 产品; DNA marker 为 TAKARA 产品; 琼脂糖购自 Sigma 公司; 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; 引物是由上海生物工程公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据文献[5]小鼠  $\beta 2m$  cDNA 序列分别设计引物以合成外显子 1 区 (L1) 及其下游部分外显子 2 区 (L2) 1~414 bp。

扩增 L1 的引物是 P1 和 P2; 上游引物 P1: 5'-GCTCTAGAGGATCCCGGTCGCTTCAGTCGTC-A-3', 5'端引入 *Xba*I、*Bam*HI 酶切位点和保护碱基 GC; 下游引物 P2: 5'-GACGAAACAGAGCT-CAGCTAAGGAGAACRAAAAAT-3', 5'端 18 个碱基与外显子 2 的前 18 个碱基互补。

扩增 L2 的引物是 P3 和 P4; 上游引物 P3: 5'-GCATTAAATTTTTAGTTCTCCTTAGCTGAG-CTCTGTTTTCTG-3', 其前 25 个碱基与外显子 1 的后 25 个碱基序列相同; 下游引物 P4: 5'-GCCTCGAGCTCTGCAGCGTATGTATCAG-3', 5'端引入 *Xho*I 酶切位点和保护碱基 GC。

1.2.2 目的基因片段的扩增 首先利用已纯化  $\beta 2m$ -pSV2 $\Delta$ HXgpt 为模板, 常规 PCR 方法<sup>[6]</sup>进行目的片段 L1 及 L2 扩增; 然后采用重叠延伸法将 L1 与 L2 拼接成一个片段 (L), 方法是: 将 L1 及 L2 PCR 产物纯化后, 各取 1  $\mu$ L 混合, 加入 5  $\mu$ L 10

$\times$  *Taq* DNA 聚合酶缓冲液、2.5  $\mu$ L dNTP 和 1  $\mu$ L Pfu *Taq* 酶, 在 50  $\mu$ L 反应体系中以 94  $^{\circ}$ C 1 min, 52  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 扩增 10 个循环; 然后补加引物 P1、P4 及 Pfu *Taq* 酶; 97  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后 96  $^{\circ}$ C 1 min, 56  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 28 次循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 1.3 重组质粒的构建和鉴定

利用酚-氯仿/异戊醇抽提目的基因, 无水乙醇沉淀后, 溶于水, 然后用 *Bam*HI + *Xho*I 双酶切纯化 PCR 产物作为正义片段, 用 *Xho*I + *Xba*I 双酶切作为反义片段, 载体 pcDNA3 也分别用上述方式进行双酶切; 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 以胶回收试剂盒回收目的片段及载体; 用 T4DNA 连接酶连接载体与目的片段, 经转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞后, 涂布于氨苄抗性琼脂平板, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 随机挑取 4 个克隆, 转种氨苄抗性的 LB 培养液中振荡增菌。快速酚法提取质粒 DNA, 电泳粗筛阳性克隆, 分别用 pcDNA3- $\beta 2m$ SN、pcDNA3- $\beta 2m$ AN 作为正、反义核酸重组质粒的标记, 对可能的正反义重组质粒分别进行 *Bam*HI + *Xho*I、*Xho*I + *Xba*I 双酶切, 对能切出预期大小片段的重组质粒做进一步 PCR 扩增, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.4 序列分析

重组质粒 pcDNA3- $\beta 2m$ SN 和 pcDNA3- $\beta 2m$ AN 用 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377XL 型测序仪测序和读序 (测序工作由大连宝生物工程公司进行), 测序结果与 GeneBank 已公布的序列进行比较。

## 2 结果

### 2.1 L1、L2 及 L 的扩增和鉴定

以  $\beta 2m$ -pSV2 $\Delta$ HXgpt 为模板, P1 和 P2、P3 和 P4 为引物, 按常规方法分别扩增出 L1、L2, 然后用重叠延伸技术将其连接成 L (图 1), 琼脂糖电泳分析表明, L1、L2 以及 L 的片段长度分别约是 137, 277 和 414 bp, 结果符合预期的长度 (图 2)。

### 2.2 重组质粒的构建和鉴定

将 L 分别正向、反向与 pcDNA3 载体连接, 转化感受态 DH5 $\alpha$ , 阳性克隆经双酶切的结果可以看出, 重组质粒 pcDNA3- $\beta 2m$ SN、pcDNA3- $\beta 2m$ AN 分别经 *Bam*HI + *Xho*I 和 *Xho*I + *Xba*I 双酶切的片段与 PCR 产物大小一致 (图 3)。

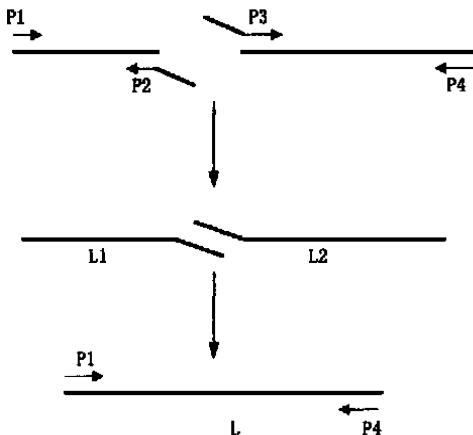


图 1 重叠延伸法扩增小鼠  $\beta 2m$  策略

Fig. 1 Schematic representation of the amplification of the mouse  $\beta 2m$  by overlap extension

P1~P4: primers; L, L1, L2: amplification fragments

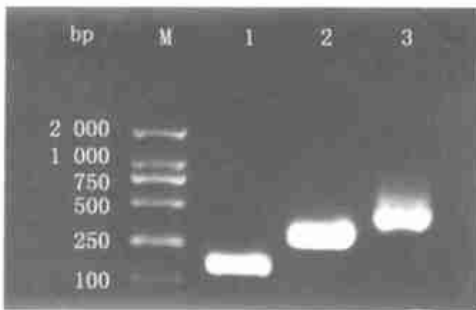


图 2 小鼠  $\beta 2m$  PCR 产物的 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Electrophoresis of the mouse  $\beta 2m$  by PCR in 12 g/L agarose gel

M: DL2000 marker; 1: exon 1 (L1); 2: exon 2 (L2); 3: spliced segment (L)



图 3 pcDNA3- $\beta 2m$ SN 和 pcDNA3- $\beta 2m$ AN 双酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant plasmids pcDNA3- $\beta 2m$ SN and pcDNA3- $\beta 2m$ AN

1:  $\lambda$ DNV/*Hind* III marker; 2: pcDNA3- $\beta 2m$ SN digested by *Bam*HI + *Xho* I; 3: pcDNA3- $\beta 2m$ AN digested by *Xho* I + *Xba* I; 4: DL2000

### 2.3 $\beta 2m$ 正、反义核苷酸序列的测定及分析

对  $\beta 2m$  正义与反义重组质粒的序列测定结果表明, 正义基因序列与 GeneBank 已公布的  $\beta 2m$  cDNA 序列一致, 由 414 个核苷酸组成; 反义基因序列也与  $\beta 2m$  cDNA 序列组成相同, 由 414 个核苷酸组成, 但是方向与正义序列相反(图 4)。

```

CGG TCG CTT CAG TCG TCA GCA TGG CTC GCT CCG TGA CCC TGG TCT TTC TGG TGC TTG
TCT CAC TGA CCG GCC TGT ATG CTA TCC AGA GTG AGT GCC TCT TTC CCC TCT CTT GGC
ATT AAA TTT TTA GTT CTC CTT AOC TGA GCT CTG TTT TGG TCT GTC TTC CCG TGT GGC CCT
CAG AAA CCC CTC AAA TTC AAG TAT ACT CAC GCC ACC CAC CCG AGA ATG OGA AGC CGA
AGA TAC TGA ACT GCT ACG TAA CAC AGT TCC ACC CCG CTC ACA TTG AAA TCC AAA TGC
TGA AGA ACG OGA AAA AAA TTC CTA AAG TAG AGA TGT CAG ATA TGT CCT TCA GCA AGO
ACT GGT CTT TCT ATA TCC TGG CTC ACA CTG AAT TCA CCC CCA CTG AGA CTG ATA CAT
ACG CCT GCA GAG

CTC TGC AGG CGT ATG TAT CAG TCT CAG TGG GGG TGA AIT CAG TGT GAG CCA GGA TAT
AGA AAG ACC AGT CCT TGC TGA AGG ACA TAT CTG ACA TCT CTA CTT TAG GAA TTT TTT
TCC CGT TCT TCA GCA TTT OGA TTT CAA TGT GAG CCG GGT GGA ACT GTG TTA GGT AGC
AGT TCA GTA TGT TCG GCT TCC CAT TCT CCG GTG GGT GGC GTG AGT ATA CTT GAA TTT
GAG GCG TTT CTG AGG GCC ACA GGG GAA GAC AGA CGA AAA CAG AOC TCA OCT AAB
GAG AAC TAA AAA TTT AAT GCC AAG AGA OGG GAA AGA GGC ACT CAC TCT OGA TAG CAT
ACA GGC CCG TCA GTG AGA CAA GCA CCA GAA AGA CCA GGG TCA CCG AOC GAG CCA TCG
TGA CGA CTG AAG CGA CCG

```

图 4 小鼠  $\beta 2m$  正反义核苷酸序列

Fig. 4 Sense and antisense sequences of the mouse  $\beta 2m$  nucleotide

### 3 讨论

临床资料的统计学分析及体内外实验研究均已证实, 主要组织相容性复合体在移植排斥反应中具有重要作用。供、受者之间 MHC 不同是诱发排斥反应、导致移植失败的主要原因。移植排斥反应也是一种免疫应答。临床降低移植排斥反应的方法主要有免疫抑制剂或生物制剂, 例如环孢素 A、抗 CD3 单克隆抗体等, 但是其作用不持久, 毒副作用大, 特别是药物的特异性差, 因而特异性降低 MHC I 类、II 类抗原的表达一直是移植免疫的主要研究课题。目前比较理想的方法是利用基因敲除技术使靶基因 MHC I 类、II 类抗原破坏, 这样虽然可能从根本上破坏靶基因的表达, 但是此方法不但技术难度大, 而且还存在遗传富余的可能性, 即两种基因行使相似的功能, 当敲除其中一个基因, 另一个基因“遮盖”缺失的基因, 维持原有的功能, 因而经常会出现 ES 敲除靶基因之后, 其发育个体的表型不改变。此外还存在这样的可能性, 由于靶基因在胚胎发育过程中作用至关重要, 因而在敲除以后, 胚胎不能存活。目前还有一种方法即反义核酸技术, 反义核酸为一段天然或人工合成的核酸序列, 它包括反义 DNA 和反义 RNA, 它通过碱基配对与细胞内基因或 mRNA 结合, 封闭基因的转录或降低 mRNA 的表达, 许多实验证实, 互补于靶

RNA 5'端及主要的编码区的反义 RNA 的作用效果最好。反义核酸的优点包括:①特异性强:在细胞内通过特异识别靶序列,从 RNA 水平阻断靶基因的表达;②靶基因范围广:不论是内源性基因还是整合入细胞染色体的外源基因,不论该基因是否被翻译成蛋白质,都可被反义 RNA 封闭<sup>[7,8]</sup>;③技术难度小,制备简单:反义 RNA 只需知道靶基因的一部分关键序列就可以设计针对改序列的相应反义 RNA 进而达到封闭整个基因表达的目的,避免了基因敲除使用冗长基因组的缺点;④人为可控性好:反义 RNA 载体加上可诱导的启动子、增强子等调控元件,可对表达时间和表达量进行控制<sup>[9]</sup>;⑤对细胞几乎无害:与其它药物相比,由于药物剂量而引起的副作用可以忽略;⑥后代可遗传性:与反义寡核苷酸相比,反义 RNA 可以形成稳定持续的转染细胞系,可使动物后代具有可遗传性<sup>[10]</sup>。

根据反义核酸原理,我们构建  $\beta 2m$  反义 RNA 表达载体 pcDNA3-AN,目的是封闭  $\beta 2m$  mRNA 的起始区及其下游的主要表达区,以期降低 MHC I 类抗原的表达。通常构建类似载体的方法是以为基因为模板,采用 RT-PCR 技术得到 cDNA,然后与载体反向连接;或者以 DNA 为模板,利用 PCR 技术分段扩增出起始区和下游的主要表达区,再用 T4 连接酶将其连接起来。我们则利用已有的  $\beta 2m$ -pSV2 $\Delta$ HXgpt 为模板,将定点突变技术——重叠延伸法应用于本实验,构建了  $\beta 2m$  正义与反义 RNA 表达载体 pcDNA3- $\beta 2m$ SN 和 pcDNA3- $\beta 2m$ AN,既避免了 RT-PCR 获得 cDNA 的麻烦,又防止了片段之间人为造成的限制性内切酶位点,测序分析证实我们达到了预期的目的。

我们拟将 pcDNA3- $\beta 2m$ SN 和 pcDNA3- $\beta 2m$ AN 导入小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, ES),ES 细胞是未分化的多潜能干细胞,能定向分化成各种细胞类型,ES 细胞为组织和器官移植提供了良好途径,但是移植来自 ES 细胞系的活细胞和组织,涉及免疫应答。反义核酸导入 ES 细胞,封闭细胞  $\beta 2m$  的引导区及主要编码区,目的就通过反义 RNA 对  $\beta 2m$  的抑制作用,降低移植排斥反应,这一方法的运用为动物组织和器官移植开创了

新的研究领域,迄今为止国内外还未见类似报道。我们还计划将此研究结果与  $\beta 2m$  打靶载体对 ES 细胞打靶的结果作一比较,为探讨降低 MHC 抗原的表达、诱导移植耐受的机理,进而为临床克服器官移植排斥反应提供理论和实践方法和依据。

#### 参考文献:

- [1] Bjorkman P J, Parham P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules [J]. *Ann Rev Biochem*, 1990, 59: 253.
- [2] Koller B H, Smthies O. Inactivating the  $\beta 2$  microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86 (22): 8932.
- [3] Grusby M J, Johnson R S, Glimcher L H. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice [J]. *Science*, 1991, 253 (5026): 1417.
- [4] Seong R H, Clayberger C A, Parnes J R. Rescue of Daudi cell HLA expression by transfection of the mouse  $\beta 2$  microglobulin gene [J]. *J Exp Med*, 1988, 167(2): 288.
- [5] Parnes J R, Seldman J G. Structure of wild-type and mutant mouse  $\beta 2$  microglobulin genes [J]. *Cell*, 1982, 29(2): 661.
- [6] Sambrook J, Fritschn M F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 672~692.
- [7] Zhang W W, Roth J A. Anti-oncogeng and tumor suppressor gene therapy-examples from a lung cancer animal model [J]. *In Vivo*, 1994, 8(5): 755.
- [8] Carter G, Lemoise N R. Antisense technology for cancer therapy: does it make sense [J]? *Br J Cancer*, 1993, 67(5): 869.
- [9] Kopper L, Kovalszky I. Antisense tumor therapy: a dream under construction [J]. *In Vivo*, 1994, 8(5): 781.
- [10] Weiss B, Davidkova G, Zhou L W. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(3): 334.

(编辑 张敏瑞)