

# 鼠白细胞介素-2受体 $\alpha$ 、 $\beta$ 链基因反义RNA 真核表达质粒的构建

何承伟<sup>1</sup>, 梁念慈<sup>1</sup>, 朱振宇<sup>2</sup>, 何晓顺<sup>2</sup>, 黄洁夫<sup>2</sup>, 马涧泉<sup>2</sup>

(1. 广东医学院生化教研室, 广东 湛江 524023; 2. 中山医科大学, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】构建鼠IL-2R $\alpha$ 与 $\beta$ 链基因的反义RNA真核表达质粒,为反义RNA基因治疗细胞免疫相关疾病作准备。【方法】用限制性内切酶从克隆载体上切下鼠IL-2R $\alpha$ 与 $\beta$ 链cDNA及鼠IL-2启动子,克隆入真核表达质粒pcDNA3的多克隆位点上,用酶切或PCR法鉴定正反连接。【结果】得到4个反向连接的重组质粒:pcAnti-mIL-2R $\alpha$ , pcAnti-mIL-2R $\beta$ , pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$ 及pciAnti-mIL-2R $\alpha\beta$ 。前三者由CMV强启动子指导鼠IL-2R基因反义RNA的表达,后者由CMV启动子与鼠IL-2靶向可诱导型启动子组成的融合启动子指导反义RNA的表达。【结论】成功构建了4个不同类型的鼠IL-2R基因反义RNA真核表达质粒。

**关键词:** 白细胞介素-2; 受体; RNA, 反义

**中图分类号:** R392.11

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-257X(2000)02-0113-04

## Construction of the Mouse Interleukin-2 Receptor $\alpha$ and $\beta$ Chain Gene Antisense RNA Eukaryotic Expression Plasmids

HE Cheng-wei<sup>1</sup>, LIANG Nian-ci<sup>1</sup>, ZHU Zhen-yu<sup>2</sup>, HE Xiao-shun<sup>2</sup>, HUANG Jie-fu<sup>2</sup>, MA Jian-chuan<sup>2</sup>

(1. Department of Biochemistry, Guang Dong Medical College, Guangdong Zhanjiang, 524023;

2. Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangdong Guangzhou 510089, China)

**Abstract:**【Objective】To construct a series of mouse IL-2R $\alpha$  and  $\beta$  chain gene antisense RNA eukaryotic expression plasmids, to make a path for antisense gene therapy for cellular immunity related diseases. 【Methods】Mouse IL-2R $\alpha$ ,  $\beta$  chain cDNA and mouse IL-2 promoter isolated from plasmids were inserted into the multiple cloning site of eukaryotic expression vector pcDNA3. The orientation of ligation was determined by restriction endonucleases or PCR method. 【Results】Four recombinant plasmids were obtained: pcAnti-mIL-2R $\alpha$ , pcAnti-mIL-2R $\beta$ , pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$  and pciAnti-mIL-2R $\alpha\beta$ . The former three plasmids' expression of mouse IL-2R chain gene antisense RNA was controlled by the CMV promoter, and the later one was controlled by the CMV-mIL-2 chimeric promoter. 【Conclusion】Four different kinds of mouse IL-2R gene antisense nucleic acid eukaryotic expression plasmids were successfully constructed.

**Key words:** interleukin-2; receptor; RNA, antisense

反义基因治疗是根据碱基配对原理高度特异地封闭靶基因表达的治疗方法。反义RNA制剂有两种,一种是化学合成的反义寡核苷酸,另一种是构建反义RNA真核表达载体。前者虽然使用起来很方便,但成本高,毒性大,而后者可以导入细胞

内源源不断地转录出反义RNA,并且可以引入适当的基因表达调控元件,达到高效、靶向和可控制性地转录反义RNA的目的。IL-2/IL-2R系统在T淋巴细胞激活过程中起关键作用。已知有许多疾病,如移植排斥反应,自身免疫性疾病及某些淋巴

收稿日期:1999-06-28

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(963003)

(作者简介:何承伟(1972-),男,江西南康人,广东医学院生化教研室,中山医科大学1997年一级博士研究生。E-mail: hewc@medmail.com.cn) http://www.cnki.net

系统肿瘤与 IL-2R 的过表达密切相关<sup>[1]</sup>, 因此 IL-2/IL-2R 系统很可能是治疗这些疾病的有效新靶点。本课题试图用反义 RNA 基因治疗的方法在这方面作一些探讨。现将阶段性结果报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 质粒和菌种 分别含鼠 IL-2R (mIL-2R)  $\alpha$ 、 $\beta$  链 cDNA 的质粒 pcEXV-mIL-2R8 及 pmIL2R $\beta$ 26 由法国巴士德研究所 J.Theze 教授和 P.Chastagner 教授赠送; 含鼠 IL-2(mIL-2) 启动子序列的质粒 pmIL-2-321luc 由日本东京大学医学科学研究所 L.Tsuruta 教授赠送。pcDNA3 是高效真核表达质粒, 含巨细胞病毒(CMV) 立即早期启动子/增强子序列, 由中山医科大学微生物教研室晏辉军老师赠送。E. coli DH5  $\alpha$  菌株由中山医科大 学生生化教研室杨洁博士赠送。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, 牛胰碱性磷酸酶, Taq DNA 聚合酶试剂盒等, 均购自宝灵曼或 Gibco BRL 公司。大肠杆菌 DNA 聚合酶 klenow 片断购自华美生物工程公司。其它常用化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物合成 mIL-2  $\alpha$  链 cDNA 3'端引物: 5' CTCGAATTCTGTAGAGCCTTGTATC 3'; mIL-2R $\beta$  链 cDNA 5'端引物: 5' CTCCTTAAGATGGC-CGTGGACTCAA 3'; mIL-2R $\beta$  链 cDNA 3'端引物: 5' CTCCCTAGGATGGTTCAATGTAGTG 3'; mIL-2 启动子 5'端引物: 5' AGTTACTTTTGT-GTCTCCAC 3'; mIL-2 启动子 3'端引物: 5' CTGCAGGACTTGAGGTCAC 3'; T7 启动子引物: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'。以上各引物由上海 Sangon 公司合成。

### 1.2 方 法

1.2.1 常规技术 酶切、连接、转化、质粒提取及琼脂糖凝胶电泳实验方法参照文献[2]有关章节。

1.2.2 PCR 反应体系及条件 10 ng 模板, 引物各 100 pmol, 10 nmol dNTP, 3  $\mu$  Taq DNA 聚合酶, 5  $\mu$ L 10 $\times$ Buffer, 总体积 50  $\mu$ L。反应条件设置: 93  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 共 30 个循环, 最后一个循环 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

## 2 结 果

### 2.1 pcAnti-mIL-2R $\alpha$ 的构建

含 mIL-2R $\alpha$  链全长 cDNA 的质粒 pcEXV-mIL-2R8<sup>[3]</sup>经 EcoR I 与 Hind III 双酶切后, 用 10 g/L 低熔点琼脂糖凝胶回收 1.1 kb 的片断。该片断含 mIL-2R $\alpha$  链 cDNA 全部 5'端调控系列及编码系列, 部分 3'端编码系列。分别用酚, 酚: 氯仿, 氯仿抽提纯化后, 定向克隆入经 EcoR I 和 Hind III 酶切的 pcDNA3 真核表达质粒中, 得到反向插入的重组质粒 pcAnti-mIL-2R $\alpha$ 。琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示, 酶切鉴定结果如图 2 所示, 与预期结果相符, 表明克隆成功。



图 1 重组质粒电泳

Fig.1 Electrophoresis of recombinant plasmids

1.  $\lambda$  DNA/ Hind III + EcoR I Marker, 2. pcDNA3, 3. pcAnti-mIL-2R $\alpha$ , 4. pcAnti-mIL-2R $\beta$ , 5. pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$



图 2 重组质粒酶切

Fig.2 Enzymatic electrophoresis photograph of recombinant plasmids

1.  $\lambda$  DNA/ Hind III + EcoR I Marker, 2. pcAnti-mIL-2R $\alpha$ / Hind III + EcoR I, 3. pcAnti-mIL-2R $\beta$ / EcoR I, 4. pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$ / Hind III + Xho I

### 2.2 pcAnti-mIL-2R $\beta$ 的构建

用 EcoR I 酶切含部分 mIL-2R $\beta$  链 cDNA 的质粒 pmIL2R $\beta$ 26<sup>[4]</sup>, 回收 925 bp 的片段, 该片段含全部 5'端调控系列及部分编码系列。克隆入经

*EcoR* I 酶切的 pcDNA<sup>3</sup> 中,用 *Hind* III 及 *Xho* I 酶切重组质粒,得一条 950 bp 的片段,与预期结果相符(图 2)。非定向连接有正向与反向两种连接方式。由于没有合适的酶切位点用于鉴定,故设计 3 条引物,用 PCR 鉴定正反连接:如果 T7 启动子引物与 IL-2R $\beta$  链 5' 端引物能扩增出 950 bp 的片段,证明是反向连接;如果 T7 启动子引物与  $\beta$  链 3' 端引物能扩增出 600 bp 的片段,证明是正向连接(图 3)。将反向连接重组子命名为 pcAnti-mIL-2R $\beta$ 。



图 3 PCR 法鉴定 mIL-2R $\beta$  链 cDNA 与 pcDNA<sup>3</sup> 连接的方向

Fig.3 Identification of orientation of IL-2R $\beta$  chain cDNA insertion into pcDNA<sup>3</sup> by PCR method

1.  $\lambda$  DNA/ *Hind* III + *EcoR* I Marker, 2. 4. T7 promoter primer/  $\beta$  chain 5' primer, 3. 5. T7 promoter primer/  $\beta$  chain 3' primer

### 2.3 pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$ 的构建

如上述方法回收 925 bp 的  $\beta$  片段,插入经 *EcoR* I 酶切的 pcAnti-mIL-2R $\alpha$  质粒。用 *Hind* III 及 *Xho* I 酶切重组质粒,得一条 2.0 kb 的片段(图 2)。PCR 鉴定正反连接:如果  $\alpha$  链 3' 端引物与  $\beta$  链 5' 端引物可扩增出 1.5 kb 的片段,证明该重组子为反向连接,如果  $\alpha$  链 3' 端引物与  $\beta$  链 5' 端引物可扩增出 1.1 kb 的片段,证明是正向连接(图 4)。将反向连接重组子命名为 pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$ 。

### 2.4 pciAnti-mIL-2R $\alpha\beta$ 的构建

用 *Hind* III 及 *Xho* I 酶切 pmoIL-2-321luc 质粒<sup>[5]</sup>,回收 370 bp 的 mIL-2 启动子,Klenow 酶补平后插入经 *Hind* III 酶切,Klenow 酶补平,碱性磷酸酶处理的 pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$  质粒。如图 5 所示,



图 4 PCR 法鉴定 mIL-2R $\beta$  链 cDNA 与 pcAnti-mIL-2R $\alpha$  连接的方向

Fig.4 Identification of orientation of IL-2R $\beta$  chain cDNA insertion into pcAnti-mIL-2R $\alpha$  by PCR method

1.  $\lambda$  DNA/ *Hind* III + *EcoR* I Marker, 2. 4.  $\alpha$  chain 3' primer/  $\beta$  chain 5' primer, 3. 5.  $\alpha$  chain 3' primer/  $\beta$  chain 3' primer

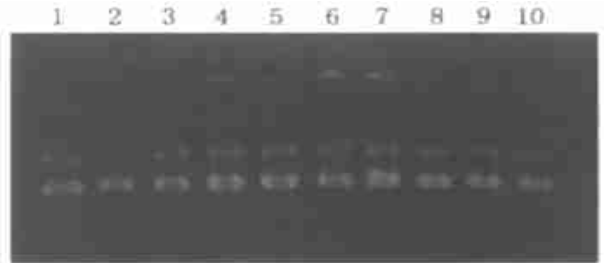


图 5 插入 mIL-2 启动子的 pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$  重组质粒电泳

Fig.5 Electrophoresis of pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$  inserted with mIL-2 promoter

1. pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$ , 2~10. Positive clones of pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$  inserted with mIL-2 promoter

重组质粒分子较 pcAnti-mIL-2R $\alpha\beta$  略大,初步说明连接成功。PCR 鉴定正反连接:如果用 mIL-2R $\alpha$  链 5' 端引物与 mIL-2 启动子 5' 端引物可扩增出 1.5 kb 的片段,证明为正向连接(图 6)。将该重组质粒命名为 pciAnti-mIL-2R $\alpha\beta$ 。分别用 mIL-2 启动子 5' 端引物和 3' 端引物作 PCR,排除了 mIL-2 启动子串联连接的可能性。

## 3 讨论

根据 IL-2R 特征及基因表达调控原理,本文作者成功构建了 4 个不同类型的 mIL-2R 基因反义 RNA 真核表达质粒,为进一步比较它们抑制 mIL-2R 基因表达及 T 淋巴细胞活化的效率奠定了基

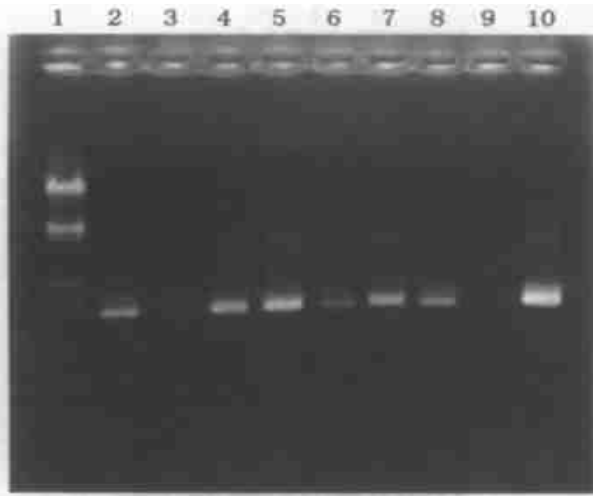


图6 PCR法鉴定 mIL-2 启动子与 pcAnti-mIL-2R  $\alpha\beta$  连接的方向

Fig.6 Identification of orientation of mIL-2 promoter insertion into pcAnti-mIL-2R  $\alpha\beta$  by PCR method

1.  $\lambda$  DNA/ *Hind* III + *Eco*R I Marker, 2~10. PCR product of mIL-2 promoter 5' primer and mIL-2R  $\alpha$  chain 5' primer

础。IL-2R 由  $\alpha$ 、 $\beta$  及  $\gamma$  三个亚基组成<sup>[6]</sup>， $\beta$  与  $\gamma$  亚基结合后形成中等程度亲合力的复合物并能传递 IL-2 信号， $\alpha$ 、 $\beta$  及  $\gamma$  三者形成高亲和力复合物，是发挥 IL-2 作用的主要形式，而  $\alpha\beta$  复合物和  $\alpha\gamma$  复合物则不能传递 IL-2 信号。因此，同时抑制 2 个或 2 个以上亚基表达可能比单纯抑制一个亚基的表达阻断 T 淋巴细胞活化的效率高。但考虑到  $\gamma$  亚基同时是其它生长因子受体(IL-4, IL-7 及 IL-15)<sup>[7]</sup> 的组成成份，文献报道缺失 IL-2R $\gamma$  亚基的小鼠表现为严重的免疫缺陷症状。为防止引起副作用，作者选择构建了  $\alpha$  与  $\beta$  亚基嵌合基因反义 RNA 表达质粒。

目的基因在特定组织细胞中的高效、靶向和可控制性表达是基因治疗研究的重要内容。真核表达质粒中，常用的 CMV 立即早期启动子是一个高效广谱的启动子，而一些组织细胞特异性的启动子又有表达效率低的缺点。为解决这一矛盾，有些作者将 CMV 启动子与组织细胞特异性的启动子连接形成嵌合启动子，获得了高效和靶向性表达双重优点的重组质粒<sup>[8,9]</sup>。IL-2 主要由激活的 T 淋巴细胞表达，因此 IL-2 启动子是一个靶向和可诱导性的启动子，但表达效率偏低。作者将 CMV 启动

子与 mIL-2 启动子连接形成嵌合启动子，指导 mIL-2R  $\alpha$ 、 $\beta$  嵌合基因反义 RNA 的转录，以期达到能在 T 淋巴细胞中高效、靶向和可诱导性表达的目的。另外，作者在实验中发现，分子克隆过程中，当找不到其它合适的方法用于鉴定重组质粒时，PCR 确实是一种省时省力的有效方法，有时甚至是唯一的方法。

上述各重组质粒的生物活性研究正在紧张进行之中。

#### 参考文献:

- [1] Waldmann T A. The IL-2/IL-2receptor system: a target for rational immune intervention [J]. *Immunol Today*, 1993, 14(6):264.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992. 16, 42, 55, 256, 304.
- [3] Miller J, Malek T R, Leonard W J, *et al*. Nucleotide sequence and expression of mouse interleukin-2 receptor cDNA [J]. *J Immunol*, 1985, 134(6): 4212.
- [4] Kono T, Doi T, Yamada G, *et al*. Murine interleukin-2 receptor  $\beta$  chain: dysregulated gene expression in lymphoma line EL-4 caused by a promoter insertion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1806.
- [5] Novak T J, White P M, Rothenberg E V. Regulatory anatomy of the murine interleukin-2 [J]. *Gene*, 1990, 18(15): 4523.
- [6] Theze J, Alzari P M, Bortoglio J. Interleukin-2 and its receptor: recent advances and new immunological functions [J]. *Immunol Today*, 1996, 17(10):481.
- [7] DiSanto J P, Certain S, Wilson A, *et al*. The murine interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain gene: organization, chromosomal localization and expression in the adult thymus [J]. *Eur J Immunol*, 1994, 24: 3014.
- [8] Yew N S, Wysokenski D M, Wang K X, *et al*. Optimization of plasmid vectors for high-level expression in lung epithelial cells [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8: 575.
- [9] 贺平, 叶胜龙, 汤钊猷. 甲胎蛋白增强子-白蛋白启动子联合转录调控序列的克隆[J]. *中国肝脏病学杂志*, 1998, 6(3):136.

(编辑 张敏瑞)