

技术与方法

核酶设计、合成与克隆的一种新方法

赵西林 陈雄伟 陈雅文 刘 戈 孙宝勇 陈德凤

(南开大学分子生物学研究所, 天津 300071)

提 要

介绍了一种设计、合成与克隆人造核酶的新方法. 通过在“锤头结构”模型中非保守性区域引入 Bgl I 切点, 不仅维持了核酶切割活性所必需的二级结构, 而且为核酶克隆的鉴定提供了极为方便的手段. 另外还通过在核酶模板两端引入限制性内切酶半切点, 一步直接将核酶模板连接、聚合、克隆到体外转录载体上, 大大简化了以往核酶克隆的繁琐操作, 省时、省力, 克隆效率也较高.

关键词 核酶, 分子设计, 合成, 克隆

80 年代初, Cech 和 Altman 分别发现 RNA 自身具有生物催化活性^[1,2], 这不仅冲击了以往认为生物催化剂——酶都是蛋白质的传统观点, 而且揭开了 RNA 研究的新篇章. 经过近十年的深入探索, 人们已经在许多种不同生物体系中发现了一系列具有生物催化活性的 RNA 分子并且已命名它们为 ribozyme, (本文译之为核酶). 1987 年, Symons 等在研究、比较了多种植物病原体 RNA 自催化切割反应活性区域的核苷酸序列后, 提出了著名的“锤头结构”(hammerhead) 模型^[3], 随后, Haseloff 等又以此为基础合成了能有效切割 CAT (氯霉素乙酰基转移酶) 转录本 (transcripts) 的人造核酶, 同时还提出了设计、合成序列特异性人造核酶的可行性及几项重要的参数指标^[4], 这为利用核酶技术阻断有害基因表达打下了坚实的理论基础. 从此, 人造核酶应运而生, 许多研究者都已成功地利用人造核酶对 HIV (human immunodeficiency virus)、活化癌基因等有害基因转录本实现了特异性切割^[5-11]. 但是, 由于人造核酶需要完全在体外设计与合成, 并且分子量都较小又常需定向克隆到体外转录载体上去, 所以在模板设计、克隆与鉴定等方

面操作比较繁琐, 限制了人造核酶的推广与应用. 为了弥补这一不足, 本文在总结以往核酶设计与合成方法的基础上, 建立了一种更为方便、有效的核酶克隆与鉴定方法, 大大简化了实验操作, 提高了核酶克隆与鉴定的工作效率, 为进一步利用人造核酶技术造福人类提供了又一便利条件.

1 材料与方 法

1.1 材料

限制性内切酶 Xba I, Hind III, Bgl I, Pst I, Pvu II 及 T4 DNA 连接酶购自中国医学科学院基础医学研究所协和科技开发公司; T4 多核苷酸激酶, *E. coli* DNA 聚合酶 I 大片段 (pol I K) 为 GIBCO-BRL 公司产品; 体外转录试剂盒, dNTP, pSP72 质粒 DNA 购自 Promega 公司; DNA 合成试剂均为 ABI 公司产品; 其它生化、分子生物学试剂均为华美生物工程公司产品; 化学试剂均为国产分析纯; α -³²P-UTP (3000Ci/mmol) 购自福瑞公司.

1.2 方法

1.2.1 核酶模板的设计、合成与纯化 用计算机检索出靶 RNA 上二级结构较少的区域(线性区域),在此区域内选择合适的核酶切割位点(如 GUC);参照 Haseloff 等提出的设计原则^[4],将与靶 RNA 切点序列前后互补的两小段核苷酸序列分别置于核酶保守性核心序列(锤头结构)前后,使核酶与底物能通过反义 RNA 互补配对形式形成典型的活性切割二级

结构(如图 1 所示).本文以针对 T24-ras 活化癌基因转录物的核酶设计为例,核酶模板由 3'端部分互补配对的两条单链 DNA A: 5'CTA-GACCACACCCTGATGAAAGCCTGTACG3'及 B: 5'AGCTGGCGCCGTTTCAAGCCGTA CAGGC3'组成, A, B 用 DNA 合成仪(ABI381A)固相合成,产物经 HPLC 纯化, C18 反向柱色谱脱盐,真空离心干燥,溶于适量水中并测 260nm 紫外吸收确定浓度.

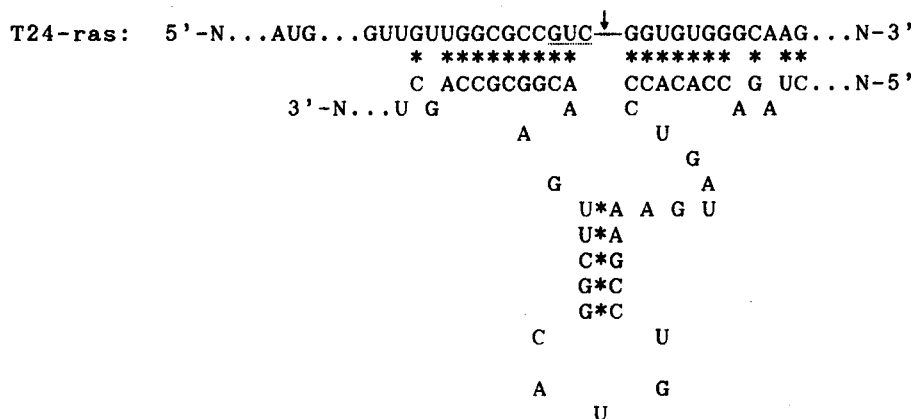


图1 核酶-底物“锤头结构”模型示意图

1.2.2 核酶的克隆与筛选 如图2所示,

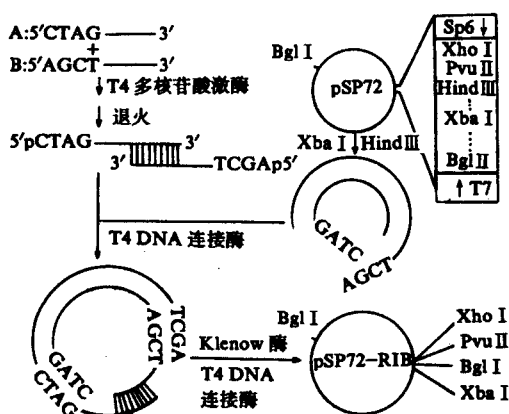


图2 核酶克隆构建过程示意图

将纯化好的 A, B 模板 DNA 用 T4 多核苷酸激酶磷酸化,然后等摩尔比混合,加热至 65℃ 10min,缓慢退火至 4℃. pSP72 质粒 DNA 分别

用 Hind III 和 Xba I 酶切,经酚、氯仿抽提,乙醇沉淀纯化后按适当比例(载体与模板分子数比小于 1:4)与上述 A, B 退火混合物于 4℃ 连接 48h, 65℃ 5min, 缓慢降温至 16℃, 加 pol I K 保温 1h, 补加少量 T4 DNA 连接酶,继续于 16℃ 保温 2h. 连接混合物转化 *E. coli* HB101, 用氨苄青霉素(Amp)筛选出转化子,碱裂解法^[12]提取质粒 DNA,以 Bgl I 酶切鉴定筛选出的重组子克隆. 用 Xba I, Hind III, Bgl I 等多种酶进一步酶切鉴定重组子 DNA,以确保核酶模板正确插入 pSP72 载体.

1.2.3 体外转录与核酶活性的测定 用 Pvu II 分别切开 pGEM4Z-T24-ras 及两个核酶克隆质粒 DNA, 用 T7 RNA 聚合酶在 40mmol/L Tris pH8.0, 0.5mmol/L ATP, GTP, CTP, 60μmol/L UTP, 200μCi α-³²P-UTP (3000Ci/mmol), 6mmol/L MgCl₂, 2mmol/L

L 亚精胺, 5m mol/L NaCl 条件下进行体外转录. 转录混合物经酚、氯仿抽提纯化后乙醇沉淀, 离心, 抽干乙醇, 沉淀溶于适量水中. 按约1:2比例混合核酶与底物 RNA 分子, 在50m mol/L Tris pH8.0, 25m mol/L $MgCl_2$ 条件下于50℃保温2h, 加十分之一体积0.5 mol/L EDTA 终止反应. 样品加等体积甲酰胺, 65℃保温10min, 加适量 RNA 上样缓冲液, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 放射自显影观察结果.

2 结果与讨论

我们从12个转化子中经 Bgl I 酶切分析筛选到两个重组子克隆, 酶切电泳结果如图3所示. 从图2中可见: 由于 pSP72载体中有一



图3 核酶克隆筛选酶切电泳图谱

1. λ DNA/Hind III 分子量标准
 - 2—13. 分别为不同转化子 DNA Bgl I 酶切样品
- [0.8%琼脂糖, 1×TAE (0.04mol/L Tris-HAC, 0.002mol/L EDTA pH8.0); 5V/cm, 6h]

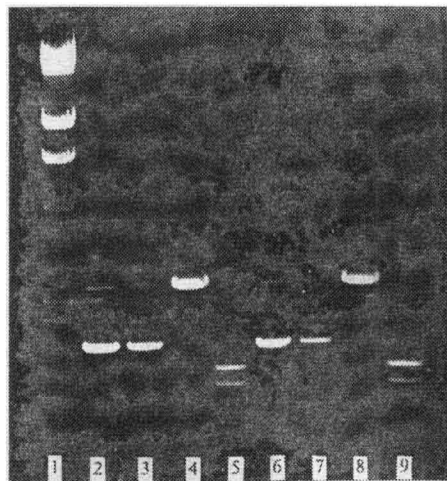


图4 核酶克隆酶切鉴定电泳结果

1. λ DNA/Hind III 分子量标准
 - 2, 6. 分别为两种重组子质粒 DNA
 - 3, 7. 分别为两种重组子 DNA Hind III 酶切样品
 - 4, 8. 分别为两种重组子 DNA Xba I 酶切样品
 - 5, 9. 分别为两种重组子 DNA Bgl I 酶切样品
- [0.8%琼脂糖, 1×TAE (0.04mol/L Tris-HAC, 0.002mol/L EDTA, pH8.0). 5V/cm, 6h]

DNA 都可被 Bgl I 切成两条略大于1kb 的电泳区带, 同时由于核酶模板的插入破坏了原有的 Hind III 切点而保留了完整的 Xba I 识别序列, 因此二者均可被 Xba I 切成一条2.5kb 左右的线性化带却都不能再被 Hind III 切开. 上述结果表明: 利用这种简便方法, 我们成功地获得了符合设计要求的核酶克隆. 经体外转录获得核酶分子后, 我们将二者与对应底物 RNA 分子在 Mg^{2+} 存在条件下保温, 初步结果表明: 两个核酶克隆均能显示出切割活性 (见图5).

核酶研究是目前分子生物学领域的热点之一, 它不仅可望在近期内为基因治疗开辟出一条简便易行的崭新途径, 而且还将为研究基因表达与调控、生命起源与进化等尖端问题提供良好的手段和素材, 人造核酶的兴起已经为许多不治之症提供了治愈的希望. 本文针对核酶克隆过程过于繁琐这一弊端进行了适当改进,

个 Bgl I 切点, 而我们在设计核酶模板时又在其中引入了一个新的 Bgl I 切点, 所以重组 DNA 经 Bgl I 酶切出现两条带, 而载体自连产物只出现一条带 (图3). 以 Bgl I, Hind III 及 Xba I 酶切两种重组子 DNA, 电泳结果如图4所示. 正如我们预期的一样, 两种重组子质粒

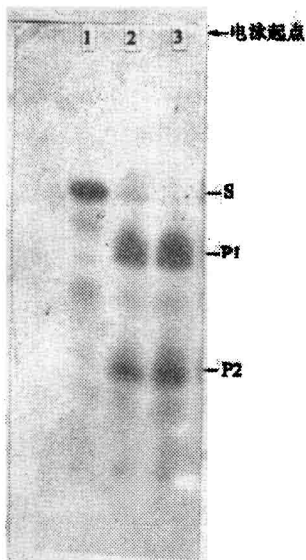


图5 核酶活性测定放射自显影结果

1. 底物对照: 2, 3. 底物+核酶分子.

S: 底物 RNA 分子; P1: 产物 RNA 片段1;

P2: 产物 RNA 片段2.

[15%PAGE, 1×TBE (0.045 mol/L Tris-硼酸,
0.002mol/L EDTA pH8.0), 8mol/L 尿素,
8V/cm, 5h]

不仅免去了多步中间产物的纯化步骤,而且还使磷酸化、连接、聚合、连接等多步克隆过程在同一体系内一步完成,这就大大简化了核酶的克隆步骤.由于核酶分子序列保守性较强,特别是不能随机引入能形成自身二级结构的迴文结构序列,所以在核酶模板内部不宜随便设置限制性内切酶切点;而核酶片段往往又比较短,不便直接从分子量大小上区分重组子与自连载体,所以核酶克隆过程中转化子的鉴定难度较大,即使在核酶模板两端设计了限制性内切酶切点,也必需在大量提取、酶切转化子 DNA 后,经聚丙烯酰胺凝胶电泳方能准确检出重组子克隆.而要证明重组子克隆为符合设计要求的核酶克隆往往还需要进行序列分析.本文巧妙地将 Bgl I 切点设计到了核酶分子中间,不仅不影响核酶对底物的切割活性,而且还起到了稳定、维持“锤头结构”模型的作用,同时又使克隆过程中转化子的鉴定大大简化,只需少量提取转化子 DNA 并以 Bgl I 酶切分析,琼

脂糖凝胶电泳后便可筛选出重组子.重组子 DNA 一般只经酶切分析和 PAGE 确定克隆片段大小后便可证明是否为符合设计要求的核酶克隆.

我们对图3中10个非重组子也进行了分子量大小及酶切分析鉴定,结果表明:这10个转化子全部为单酶切载体自连产物,可见在无法检测第二酶切效果时,确保第二种酶能有效切割载体分子是提高重组效率的关键.此外,本文还对部分配对的核酶模板及双酶切载体先行补平,再做连接,并与本文建立的部分双链直接连接法进行对比发现:前者转化率极低,仅有的几个转化子也都为载体自连产物.可见本文建立了一种行之有效的核酶克隆方法.

参 考 文 献

- 1 Cech T R, Zaug A J, Grabowski P J. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Nature*, 1981;27:487
- 2 Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T *et al.* The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 1983;35:849
- 3 Forster A C, Symons R H. Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell*, 1987;50:9
- 4 Haseloff J, Gerlach W L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, 1988;334:585
- 5 Lorentzen E U, Wiel U, Kuhn J E *et al.* *In vitro* cleavage of HIV-1 vif RNA by a synthetic ribozyme. *Virus Genes*, 1991;5:17
- 6 Goodchild J, Vipin Kohli. Ribozymes that cleave an RNA sequence from human immunodeficiency virus: The effect of flanking sequence on Rate. *Arch Biochem Biophys*, 1991;284:386
- 7 Lamb J W, Hay R T. Ribozymes that cleave potato leafroll virus RNA within the coat protein and polymerase genes *J Gen Virol*, 1990;71:2257
- 8 Ruffner P E, Dahm S C, Uhlenbeck O C. Studies on the hammerhead RNA self-cleaving domain. *Gene*, 1989;82:31
- 9 Koizumi M, Iwai S, Ohtsuka E. Construction of a series of several self-cleaving RNA duplexes using synthetic 21-mers. *FEBS lett*, 1988;239:285

- 10 Saxena S K, Ackerman E J. Ribozymes correctly cleave a model substrate and endogenous RNA *in vivo*. *J Biol Chem*, 1990;265:17106
- 11 Sarver N, Cantin E M, Chang P S *et al*. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, 1990; 247:1222
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning — A Laboratory Manual*. 2nd edition, New York: CSH Laboratory Press, 1989; 1. 25. 1. 38

蔗糖酶在尼龙丝上的固定化及酶管性能研究*

胡伟平 张先恩 李翔 张治平 张晓梅 张兴

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉430071)

提 要

利用盐酸水解法处理尼龙丝表面, 采用戊二醛交联法将蔗糖酶固定在尼龙丝上, 制成酶丝, 进而制成酶管。该酶管可用于蔗糖的测定, 蔗糖通过酶管分解成葡萄糖, 再用葡萄糖氧化酶(GOD)电极测糖。酶管的最适pH为5—6, 最适温度范围: 30—40℃。溶液的流速对酶管的转化效率有显著影响。流速为1.3ml/min时, 蔗糖浓度在0—5mmol/L范围内, 酶管的转化效率基本恒定, 约为28.5%。用同一浓度的蔗糖溶液重复实验, 酶管的重复性很好, $CV < 1\%$ 。酶管活力至少稳定8d(天)以上。

关键词 蔗糖酶, 固定化, 酶丝, 酶管, 蔗糖测定

发酵工业迫切需要快速的蔗糖测定方法。蔗糖属非还原性糖, 主要测定方法为比重法和旋光法。测定精度较差, 且为手工操作, 近些年来, 固定化酶技术已开始用于连续流动分析过程^[1-5]。如果能将样品通过固定化蔗糖酶管, 使蔗糖酶解成葡萄糖, 再经葡萄糖氧化酶(GOD)电极测定葡萄糖含量, 便可反推出蔗糖含量。本研究重点放在酶管的研制并就其应用的可能性进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

蔗糖酶[invertase (INV), EC 3.2.1.26, Sigma, 825 IU/mg]溶于0.04mol/L磷酸缓冲液(pH7.0), 浓度为1—2mg/ml; 戊二醛[上海化学试剂分装厂, 进口分装, 25%(W/V)], 用0.2mol/L硼酸缓冲液(pH8.5)稀释至12.5%; 甲液: 18.6%CaCl₂—18.6%—甲醇—水溶液^[4]; 乙液: 18.6%CaCl₂—18.6%水—甲醇溶液^[1]。

尼龙丝: NF1(1.5号尼龙鱼线, $\phi = 0.205\text{mm}$, 日本进口), NF2(2号尼龙丝, Pal 21, 日本进口), NF3(尼龙丝, $\phi = 0.4\text{mm}$, 加拿大进口)。尼龙-6颗粒: NG(湖南岳阳化工厂, 1×3mm)。

1.2 酶管制作

1.2.1 方法A^[6]

1.2.1.1 将4根1m长的尼龙丝合在一起绕成线圈, 在18.6%CaCl₂—18.6%甲醇—水溶液中50℃水浴处理20min, 水洗后再用3.65mol/L盐酸在45℃水浴处理20min(NF1<2min), 然后用冰水洗去HCl至中性。

1.2.1.2 展开线圈, 塞到 $\phi = 1 \times 2\text{mm}$ 的Teflon管中, 4℃下用12.5%的戊二醛环流45min, 再通入冰水洗去游离戊二醛, 立即进行

* 本文属国家自然科学基金项目(39070017)及国家八五攻关生物技术: 重要传感器的研制专题。

收稿日期: 1992-07-01 修回日期: 1992-09-15