

管为外标 (0ppm) 和锁场管, 测其 ^{23}Na NMR 谱. $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+]$ (mol:mol) 分别为 0.000, 0.150, 0.375, 0.600, 0.750 和 0.900 时, ^{23}Na 化学位移 δ 为 -5.42 , -4.67 , -3.54 , -3.14 , -2.74 和 -2.48ppm , ^{23}Na NMR 信号的 δ 随

K^+ 量的增加而向低场移动. 计算机回归得

$$\delta = -5.41 + 5.57 \frac{[\text{K}^+]}{[\text{Na}^+]} - 2.63 \frac{[\text{K}^+]^2}{[\text{Na}^+]^2}$$

这一竞争机理正在探讨中.

人工设计的 Ribozymes 体外切割 HPV16 E6 和 E7 mRNA 的研究*

何玉凯 祁国荣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

关键词 ribozyme, 人乳头状瘤病毒 (HPV), HPV16 E6 和 E7 mRNA

人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一类感染人体的皮肤粘膜并引起乳头状瘤病变的病毒. 目前发现的 HPV 已有 63 型, 不同型的 HPV 引起人体不同部位的病变. HPV 16 主要与生殖系统的肿瘤尤其是子宫颈癌有密切关系. 近年来的实验表明 HPV 16 E6 和 E7 基因在宫颈癌的发生发展中起着非常重要的作用. 体外实验表明 E6 和 E7 基因可以转化宿主细胞 (包括细胞系和初级培养细胞). 而在宫颈癌组织及其细胞系中 E6 和 E7 基因都有高水平的表达. 近两年有实验表明 HPV 16 E6 和 E7 蛋白可以分别与肿瘤抑制基因产物 p53 蛋白及 RB 蛋白结合而抑制其功能. Ribozyme (酶活性 RNA) 是具有催化功能的 RNA 分子. 利用 Symons 提出的锤头状结构, 人们可以设计合成 ribozymes. 我们的工作是通过阻断 HPV16 E6 和 E7 基因的表达而逆转 HPV16 阳性的宫颈癌细胞系的肿瘤表型. 本文报道了人工合成的 ribozymes 体外切割 HPV16 E6 和 E7 mRNA 的研究.

HPV16 E6 和 E7 基因首先被亚克隆到 pTZ19R 质粒的 T7 启动子的下游. 用内切酶

线性化后作为 T7 RNA 聚合酶的模板进行体外转录制备靶 mRNA. 转录时参入 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -UTP. 标记的 HPV16 E6 (568nt) 和 E7 (171nt) mRNA 片段用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化.

Ribozyme 的设计主要参考锤头状结构并考虑到另外两个因素. 1. 在靶 mRNA 上切点及其旁侧序列呈松散结构便于与 ribozyme 结合; 2. Ribozyme 与靶 mRNA 的结合强度要适当. Ribozymes 的合成和纯化类似于 DNA 的合成.

体外切割反应条件如下: 50mmol/L Tris pH7.5, 20 mmol/L MgCl_2 , 20mmol/L NaCl, ribozyme 和靶 mRNA 适量. 结果表明体外切割非常特异, ribozyme HR2 在 597 位 (此序号是采用 HPV16 基因组上 DNA 的序号, 下同) 切割 E7mRNA 产生 86 核苷酸 (简称 nt, 下同) 和 85 nt 两个片段. Ribozyme HR7 在 240 位切割 E6 mRNA 产生 311nt 和 257nt 两个片段 (见图 1). 而 HR2 不能切割 E6 mRNA 片段, 反之 HR7 也不能切割 E7mRNA

* 本工作是 863 和国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1992-06-19

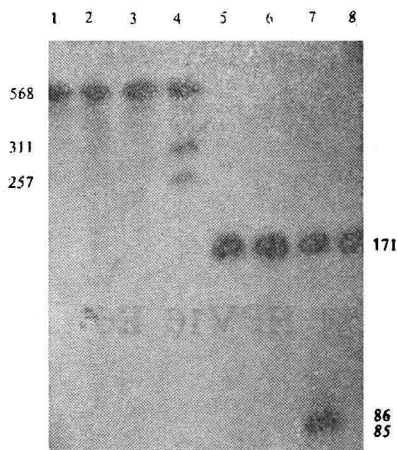


图1 Ribozymes 对 HPV16 E6 和 E7 mRNA 的切割作用

1—4: HPV16 E6 mRNA; 5—8: HPV16 E7 mRNA;
1,5: 没有加 ribozyme 的对照; 2,6: ribozyme HR1;
3,7: ribozyme HR2; 4,8: ribozyme HR7

片段,这与实验设计的预期结果完全一致。但是,ribozyme HR1 不能切割底物 E6 mRNA,与实验设计不一致。原因可能是 HR1 的旁侧序列与 E6 mRNA 结合的不够稳定。

实验结果还显示 Mg^{2+} 对切割反应有重要的影响。切割反应速度随着 Mg^{2+} 浓度的增加而增加。随着温度的升高切割反应速度也增加,ribozyme HR2 催化 E7 mRNA 水解最佳温度接近 ribozyme 与底物 mRNA 形成的双螺旋的 T_m 值,而 HR7 的最佳反应温度比 HR7-E6 mRNA 复合物的 T_m 值要大。这可能与 E6 mRNA 分子比较大形成二级结构影响 HR7 与切割位点的结合。Ribozyme HR2 和 HR7 的 K_m , K_{cat} 分别是 $0.455 \mu\text{mol/L}$, $0.145/\text{min}$ 和 $0.381 \mu\text{mol/L}$, $0.112/\text{min}$ 。

我们还发现同一个 ribozyme 切割不同长度的靶 RNA 片段(这些 RNA 均含有 ribozyme 的作用位点)时其切割活性可以相差很多。靶 RNA 长则 ribozyme 对它的切割作用减弱甚至不切。这可能与 RNA 的二级结构有关。反应前先将靶 RNA 片段变性则可以被相应的 ribozyme 所切割,这也说明靶 RNA 的二级结构在 ribozyme 的切割反应起着重要作用。

科技信息服务

提取辣椒红色素可行性简析

- 1 技术种类: 实用技术。
- 2 项目研制单位: 北京市星火技术研究所。
- 3 市场近况: 目前供不应求, 价值 40 万元/吨, 近几年一直从西德、日本等国进口, 红色辣椒粉则由各省外贸公司组织出口。
- 4 产品主要性能: 价格昂贵、原料丰富, 投资少、周期短, 无三废, 可替代现在禁止使用的合成色素。
- 5 适用范围: 饮食加工业、医药制造业及化妆品制造业等。
- 6 主要原料: 鲜辣椒、干辣椒、溶剂及辅助原料。
- 7 厂房及人员 土法: 厂房 100m^2 , 工人 6 人; 小型: 厂房 200m^2 , 工人 10 人; 中型: 厂房 600m^2 , 工人 36 人。
- 8 投资实施条件:

	厂房及动力	设备	设备安装	流动资金
土法	约 1 万元	约 1 万元	0.1 万元	视规模
小型	约 2 万元	约 2 万元	0.5 万元	约 1 万元
中型	约 15 万元	约 20 万元	2 万元	约 20 万元

9、效益分析:

	原料	综合成本	产值	利润
土法	鲜辣椒 15 吨	6 万元	14.7 万元	6.6 万元/季
小型	干辣椒 20 吨	31 万元	53.8 万元	26 万元/年
中型	干辣椒 100 吨	130 万元	211 万元	80 万元/年

10、技术转让费用:

函授: 9000 元, 提供资料, 常年免费咨询。

面授: 2.6 万元, 提供技术资料, 现场实际操作, 包出产品。协助建厂, 费用面议。

[100024 北京 867 信箱 20816 组 李群 (电话 5762127, 5762194)]