

技术与方法

登革热病毒反义寡核苷酸的合成
及抗病毒活性*王升启 马立人 杨佩英¹⁾ 朱宝珍

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 根据碱基互补原理, 反义寡核苷酸可与特定病毒基因结合从而选择性地抑制该病毒的复制, 这是病毒性疾病治疗的新途径. 基于上述原理设计并合成了 D2-04 RNA 特异的 6 个 5' 末端脂肪链修饰的硫代反义寡核苷酸. 体外抗病毒活性评价显示互补于 5' 端起始密码、3' 端重复序列和末端序列的 3 个反义寡核苷酸呈较强的抗病毒活性.

关键词 反义寡核苷酸, 登革热病毒, D2-04 株, 反义

登革热 (DF) 是由登革热病毒 (DFV) 引起的一种热带及亚热带地区主要传染病之一. 它通过埃及伊蚊及白蚊伊蚊传播, 近年来流行范围不断扩大, 流行频度不断上升^[1]. 目前尚无预防登革热病毒的有效疫苗, 这主要是因为该病毒血清型较差, 且蛋白质免疫原性较多, 因此, 有必要发展特异性抗病毒药物. 登革热病毒属黄病毒科, 这类病毒基因组长约 11 kb, 属正链 RNA, 中间有一长的 ORF, 5' 及 3' 各有一不同长度的非编码区. 反义寡核苷酸能与特定病毒基因互补, 抑制该基因的复制, 转录或翻译, 从而达到抑制或杀灭病毒之目的^[2]. 这类药物是根据核酸杂交原理设计的具有高度的选择性, 近年来正逐渐成为国内外抗病毒药物研究的热门课题. 体外实验结果表明反义寡核苷酸对流感病毒 (IV)、艾滋病病毒 (HIV)、单纯疱疹病毒 (HSV) 及合胞病毒 (RSV) 等多种病毒具有较强的抑制活性^[3~8]. 为探索利用反义寡核苷酸抗 DFV 的可行性, 我们测定了 DFV 的 5' 和 3' 可能参于复制调控的基因组 RNA 序列, 根据此序列合成了 6 种 DFV 特异的脂肪链修饰硫代反义寡

核苷酸并进行了初步的体外抗病毒活性评价.

1 材料和方法

1.1 病毒株

登革热 2 型 04 株, 1985 年从海南省登革热流行高峰期病人血清中分离^[9].

1.2 十四烷氧基亚磷酸酯的合成

在氩气保护下, 将二异丙基乙基胺 (10 mmol, Aldrich) 及 N, N-二异丙基-β-氰乙基亚磷酸氯 (6 mmol, Sigma) 依次加入正十四醇 (5 mmol) 的无水二氯甲烷溶液中, 室温搅拌至薄层色谱 (TLC) 检查反应完全 (10 min). 加入乙酸乙酯 100 ml 稀释反应物, 依次用 5% NaHCO₃ (3 × 25 ml) 及饱和 NaCl (1 × 25 ml) 洗涤后, 分出有机相, 用无水 Na₂SO₄ 干燥过夜, 抽滤, 减压除去溶剂, 残留物溶于 100 ml 环己烷-二氯甲烷-三乙胺 (9:2:1), 加入硅胶 (青岛海洋化工厂) 50 g, 20 min 后滤除硅胶, 滤液减压浓缩至干, 残留

* 解放军总后卫生部“八五”招标重点课题 9205013.

¹⁾ 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100850.

收稿日期: 1996-01-08, 修回日期: 1996-04-12

物真空干燥得到一种粘稠液体, ³¹P-NMR(δ): 147. 72.

1.3 5'-烷基硫代反义寡核苷酸的合成

所有反义寡核苷酸均在 DNA 合成仪 (391A PCRMATE EP, ABI) 上合成, 除特别说明外所用试剂均是 ABI 产品. 合成时用 0. 5 mol/L TETD (tetramethylthioranm) 乙腈溶液为硫化剂代替氧化剂 I₂^[10]; 用上述合成的十四烷氧基-β-氰乙基亚磷酸酯在寡核苷酸 5' 末端加一个十四碳脂肪链. 硫代产物采用 ABI 推荐的合成程序; 在连接十四碳脂肪链时程序稍加改进, 使十四烷氧基-β-氰乙基亚磷酸酯及四唑在柱中保留时间及其进柱次数均延长 1 倍. 合成完毕用浓氨水 55℃ 脱保护 15 h, 真空离心浓缩后用 HPTLC 法纯化^[11], 展开剂为异丙醇-浓氨水-水 (65: 25: 10), 洗脱剂为甲醇-水 (1: 4). 洗脱液真空离心干燥, 薄层扫描定量^[12]后备用.

1.4 ASON 准备

加 50 μl 70% 乙醇于内盛反义寡核苷酸干粉的 Eppendorf 离心管内, 密闭放置 30 min 并不时旋转离心管使其内壁与酒精充分接触, 然后在超净台内打开离心管通风使酒精挥发干, 用培养液将其稀释成不同的浓度.

1.5 实验分组

实验共分四组: a. ASON 组, 共 6 个样品, 每个样品用 0. 3 μmol/L, 3 μmol/L 及 15 μmol/L 三个浓度, 每个浓度重复三次; b. 随机对照组, 碱基组成与 ASON 相同但不与 D2-04 RNA 互补; c. 病毒对照组, 感染病毒但不给 ASON; d. 细胞对照组, 仅含 C6/36 细胞.

1.6 病毒培养

采用 96 孔板, 培养液为 RPMI1640, 含 10% 小牛血清, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml. 每孔含培养液 200 μl, C6/36 细胞 3. 2×10⁴. 接种病毒 (D2-04) 稀释度为 1×10⁻¹. 培养板置湿盒内, 放 5% CO₂ 培养箱中, 37℃ 培养 6 d.

1.7 活性评价

采用两种方法对 ASON 病毒抑制活性进行定性评价. a. 显微镜下观察各组细胞出现病变时间及严重程度; b. RT-PCR 直接检测各组病毒培养液 (80 μl) 裂解物中的病毒 RNA.

2 结 果

2.1 反义寡核苷酸序列的选择

根据登革热病毒基因组 5' 和 3' 末端序列分析结果设计了 6 个反义寡核苷酸, 其位置及核酸序列见表 1. 此外, 为证明反义核酸的序列特异性, 合成了一个随机链做对照.

表 1 D2-04 病毒 RNA 反义寡核苷酸的序列

编号	区域	位置	序列 (5'→3')
RDS-51	5'-NC	1~ 20	GTCCACGTAGACTAACAACT
RDS-52	5'-NC	29~ 48	AGCTCCCTCAAAGAATCTGT
RDS-53	5'-NC+ C	87~ 106	GGTTATTCATCAGAGATCTG
RDS-31	NS5+ 3'-NC	10245~ 10264	TTACCTTCTACCACAGGACA
RDS-32	3'-NC	10585~ 10604	GGGCTCTCCTCTAACCTCTA
RDS-33	3'-NC	10704~ 10723	AGAACCTGTTGATCAACAGC
CR	随机对照		CAGTCAGTCSGT CAGTCSGT

2.2 反义寡核苷酸修饰方法的选择

由于细胞内存在大量核酸酶, 使寡核苷酸极易被降解, 为增加反义寡核苷酸的核酸酶抗

性, 在合成反义核酸时将磷原子上的氧换成了硫 (图 1). 为解决反义寡核苷酸的膜透性问题, 合成了 β-氰乙基-十四醇亚磷酸酯 (图 2),

³¹P-NMR 确证了其结构 (图略), 通过 DNA 合成仪使该化合物与硫代反义寡核苷酸反应,

在寡核苷酸的 5' 末端连接一十四碳脂肪链 (图 3).

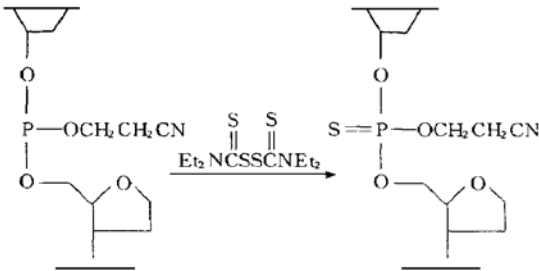


图 1 硫代反义寡核苷酸的合成

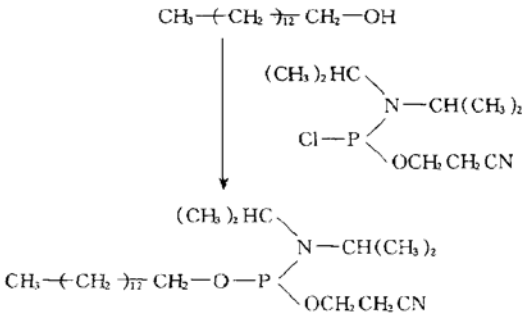


图 2 β -氰乙基-十四醇亚磷酸酯的合成

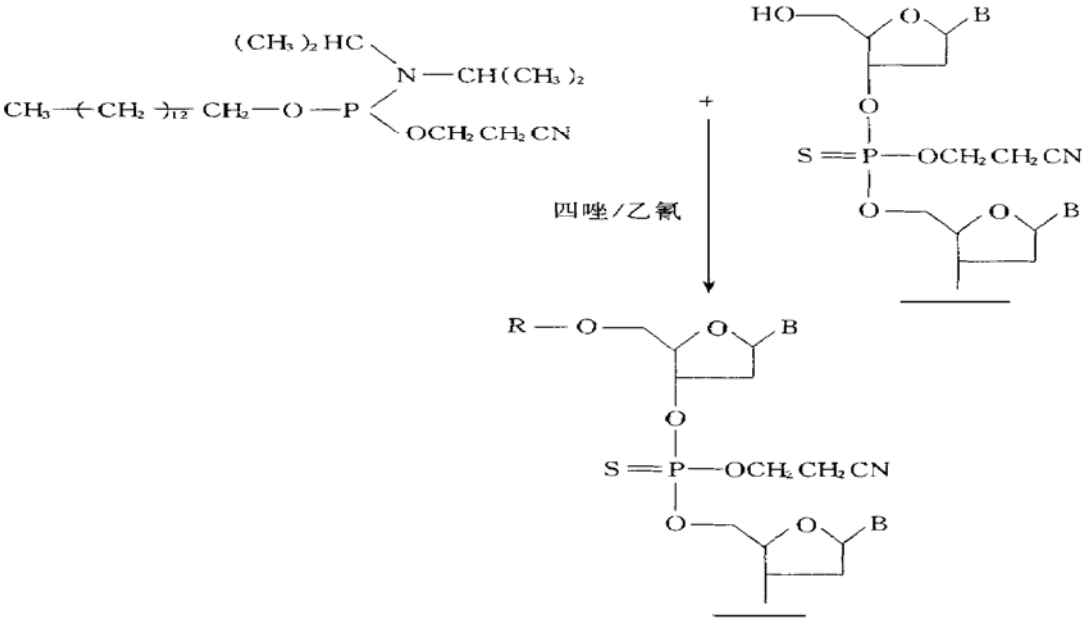


图 3 5' 末端十四烷基脂肪链修饰硫代反义寡核苷酸的合成

2.3 ASON 对感染细胞的保护作用

显微观察结果显示互补于 5' 端蛋白质翻译起始区的 RDS-53, 3' 端非编码区重复序列的 RDS-32 及终末序列的 RDS-33 具有显著的细胞感染保护作用. 病毒及随机对照组第 3 天即有明显病变, 而给药组第 6 天才略有轻微病变. 互补于 5' 帽区的 RDS-51、杆区的 RDS-52 及 3' 蛋白质翻译终止区的 RDS-31 均无明显抑制作用 (表 2).

细胞感染保护作用只能间接反映病毒的存在, 为直接检测培养液中病毒核酸的存在, 我们采用了 RT-PCR 方法, 对培养液中病毒 RNA 进行扩增检测, 实验结果显示 (表 2), ASON 组的 RDS-53、RDS-32 及 RDS-33 除低浓度 ($0.3 \mu\text{mol/L}$) RDS-33 有一孔扩增阳性外, 其他均为阴性; ASON 组的 RDS-51、RDS-52 及 RDS-31, 除中浓度 ($3 \mu\text{mol/L}$) RDS-51 有 1 孔, 高浓度 ($15 \mu\text{mol/L}$) RDS-52

有 2 孔扩增阴性外其他均为阳性. 病毒及随机对照组均检出阳性. 细胞对照组未检出阳性.

表 2 ASON 对感染细胞的保护作用

浓 度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞病变 (3 d)			RT-PCR (3 d)		
	0.3	3	15	0.3	3	15
细胞对照组	-	-	-	-	-	-
病毒对照组	+	+	+	+	+	+
随机对照组	+	+	+	+	+	+
RDS-51	+	+	+	+	+	+
RDS-52	+	+	+	+	+	+
RDS-53	-	-	-	-	-	-
RDS-31	+	+	+	+	+	+
RDS-32	-	-	-	-	-	-
RDS-33	-	-	-	+	-	-

+ : 表示有细胞病变及 RT-PCR 检测阳性; - : 表示无细胞病变及 RT-PCR 检测阴性; + - : 表示有部分孔 RT-PCR 阳性.

3 讨 论

长期以来病毒性疾病的化学治疗一直是一个棘手的课题, 根本原因在于病毒往往利用宿主的一些酶进行复制, 因此能抑制病毒繁殖的药物对宿主也有害. 反义寡核苷酸是根据核酸杂交原理设计的, 它能选择性地与病毒基因特定功能位点结合 (杂交) 从而影响该基因的表达, 达到抑制或杀灭病毒而不影响宿主正常功能的目的.

由于反义核酸作用靶基因序列的高度特异性, 因此在设计和合成反义核酸时必须对靶基因结构和功能有一定的认识. 同时由于机体富含降解核酸的核酸酶, 因此还要考虑如何对反义核酸进行适当的化学修饰以增加其核酸酶抗性, 延长作用时间, 另一个不容忽视的问题是如何增加细胞对反义寡核苷酸的摄取即生物利用度.

基于上述考虑, 我们以登革热病毒为模型进行了反义寡核苷酸抗病毒研究方法和途径的探讨, 建立了从靶基因分离, 序列分析到反义寡核苷酸的设计, 化学合成, 核酸酶抗性

膜性修饰等一系列措施, 并将该措施直接应用于反义寡核苷酸抗登革热病毒的研究.

从上述实验结果可以看出, 互补于 D2-04 病毒 RNA 基因组 5' 起始密码, 3' 重复及终末序列的反义寡核苷酸对病毒的抑制活性较好, 可能与这此些区域的病毒靶序列参与病毒蛋白质的翻译 (5' 端起始密码) 和/或复制 (3' 端重复序列及杆序列) 调控有关. 根据作用环节不同将两种以上 ASON 联合使用可能会观察到更强的抗病毒活性. 这方面更深入的作用机理有待进一步的分子水平上的研究工作证实.

参 考 文 献

- 1 Halstead S B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology, *Science*, 1988, **239**: 476~ 481
- 2 王升启, 马立人. 反义核酸技术及其应用·反义寡核苷酸, 军事医学科学院院刊, 1991, **15** (3): 191~ 196
- 3 Leiter J M E, Agrawal S, Palese P *et al.* Inhibition of influenza virus replication by phosphorothioate oligodeoxynucleotides, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 3430~ 3434
- 4 Zerial A, Thuong N T, Helene C. Selective inhibition of the cytopathic effect of type A influenza viruses by oligodeoxynucleotides covalently linked to an intercalating agent, *Nucleic Acids Research*, 1987, **15** (23): 9909~ 9919
- 5 Goodchild J, Agrawal S, Civeira M P *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus replication by antisense oligodeoxynucleotides, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 5507~ 5511
- 6 Letsinger R L, Zhang G, Sun D K *et al.* Choesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 6553~ 6556
- 7 Zamecnik P C, Stephenson M L. Inhibition of rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide, *Biochemistry*, 1978, **17** (1): 280~ 284
- 8 Draper K G, Ceruzzi M, Kmetz M E *et al.* Complementary oligonucleotide sequence inhibits both Vmw65 gene expression and replication of herpes simplex virus, *Antiviral Research*, 1990, **13**: 151~ 164
- 9 杨佩英, Lam S K. 我国登革 2 型病毒 04 株包膜蛋白基因的核苷酸及其相应的氨基酸序列, 军事医学科学院院刊, 1991, **15** (3): 182~ 185
- 10 Vu H, Hirschbein B L. Internucleotide phosphite sulfurization with tetraethylthioram disulfide. Phosphorothioate oligonucleotide synthesis via phosphoramidite chemistry, *Tetrahedron Letters*, 1991, **32** (26): 3005~ 3008

- 11 王升启, 马立人. 高效薄层色谱法纯化合成寡核苷酸及其衍生物, 生物化学与生物物理进展, 1993, 20 (3): 234~ 237
- 12 王升启, 马立人. 薄层扫描法测定寡核苷酸含量, 生物化学与生物物理进展, 1993, 20 (2): 130~ 132

Synthesis of Antisense Phosphothioate Oligodeoxynucleotides of Dengue Fever Virus and Their Anti-viral Activity. WANG Shengqi, MA Liren, YANG Peiying (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Antisense oligonucleotides can bind to

a specific viral RNA, and hence inhibit the reproduction of virus selectively. Six tetradecyl modified antisense phosphothioate deoxyoligonucleotides were synthesized, antiviral assay showed that RDS-53, RDS-32 and RDS-33 targeting to the translation initiation site, 3'-repeated and 3'-terminal sequences of D2-04 RNA had fairly strong inhibitory activity.

Key words antisense, antiviral drug design, antisense oligodeoxynucleotide, dengue fever virus

用有限酶切法分析蛋白质的氨基酸序列^{*}

王 台

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

门仓宏 依田幸司 山崎真狩

(日本国东京大学生物工学系, 东京 113)

摘要 报道了一个通过有限酶切蛋白质产生多肽片段的方法. 蛋白质经单向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离和用考马斯亮蓝短暂染色后, 切下所需的蛋白质带, 将其放入另一个 SDS-PAGE 凝胶的样品槽内, 在电泳过程中该蛋白质被蛋白酶如蛋白酶 V8 降解, 所产生的多肽片段随之被分离. 电泳结束后, 将多肽片段电印迹至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上. 这些多肽片段从 PVDF 膜上切下后可以直接被用于分析氨基酸序列. 该方法能广泛适用于分析一般蛋白质和 N 端被修饰蛋白质的氨基酸序列.

关键词 有限酶切法, N 端被修饰蛋白质, SDS-PAGE, 电印迹, 多肽片段, 氨基酸序列

蛋白质的氨基酸序列分析在分子生物学的研究中有着重要的作用. 当鉴定出一个 (些) 与某发育过程或代谢环节等相关连的蛋白质时, 在不知其分子特性和生物学功能的情况下, 最常用的策略是分析蛋白质的氨基酸序列. 根据氨基酸序列, a. 可以预测蛋白质的结构特征; b. 通过检索数据库确定该蛋白质是否有同源性蛋白质存在, 由此预测蛋白质的功能; c. 合成简并性的寡核苷酸探针, 克隆蛋白质的编码基因.

Matsudaira^[1] 的方法可以测定皮摩尔 (pmol) 蛋白质的 N 端氨基酸序列. 此方法的特点是易于操作, 不需纯化蛋白质. 蛋白质混合物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-

PAGE) 或双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (双向电泳) 分离后, 电印迹至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上, 切下所需的蛋白质带或点, 即可用序列分析仪分析氨基酸序列.

如果蛋白质 N 端的 α 氨基被化学修饰后, 这个蛋白质对 Edman 降解不敏感, 无法直接测定其 N 端氨基酸序列. 此时, 需要用蛋白酶或化学试剂 (如 CNBr) 将蛋白质切成多肽片段, 然后分析多肽片段的氨基酸序列. 这些方法需要纯的蛋白质和采用逆向 HPLC 分离

^{*} 本工作得到日本政府、联合国教科文组织和国际细胞学联合会资助.

收稿日期: 1996-01-31, 修回日期: 1996-06-02