

丙型肝炎病毒 RNA 特异性核酶的切割活性研究

刘立忠¹⁾ 王升启 朱宝珍 孙志贤

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 针对丙型肝炎病毒 RNA (HCV-RNA) 的 5' 非编码区和部分 C 区的二级结构, 设计并合成了四个不同的锤头型核酶 (ribozyme A, ribozyme B, ribozyme C₁, ribozyme C₂). 首先应用体外切割实验筛选出作用于 HCV-RNA 起始密码子上游 GTA ↓ 位点的核酶 RzA 有较好的活性. 为初步验证核酶 RzA 在细胞内的切割活性, 经脂质体介导, 将 RzA-RNA 与另一携带该核酶靶基因的质粒表达载体 pCf-neo-luciferase (载体中荧光素酶基因受核酶靶基因的调控) 共转染 HepG₂ 细胞. 通过测定荧光素酶基因的表达证实了核酶在细胞内有较好的切割活性. 在此实验基础上, 把 RzA 基因克隆至 pCf-neo 质粒表达载体中, 再次经脂质体介导, 将重组的表达载体 pCf-neo-RzA 与携带该核酶靶基因的质粒表达载体 pCf-neo-luciferase 共转染 HepG₂ 细胞, 获得了更好的切割效果.

关键词 锤头型核酶, 丙型肝炎病毒, 基因治疗

学科分类号 R512.6, Q55

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒 (HCV) 引起的一种严重的肝脏疾病, 它是一种以血液传播为主并辅以其他多途径传播的传染病, 呈世界性分布. 因其发病率和慢性化程度较高, 现已成为严重威胁人类健康的疾病. 现在尚无防治丙型肝炎的有效办法, 所以攻克丙型肝炎已成当务之急. HCV 基因为单股正链 RNA, 全长 9 000 多碱基^[1], 只有一个长的开放阅读框架 (ORF), 编码一条 3 000 多个氨基酸残基的多肽链. HCV-RNA 5' 端有一 341 个核苷酸的非编码区 (5'-UTR), 它与 C 区 (core region) 的保守性都很强. 另外, 5'-UTR 还有几个上游起始密码子, 且高度有序, 并有公认的发夹型结构, 为核糖体进入位点. 5'-UTR 的 3' 端很少的碱基缺失就会丧失对翻译的促进作用, 说明 5'-UTR 还具有调控功能^[2]. 如果 5'-UTR 和 core region 这两个区域遭到破坏, HCV-RNA 将失去表达功能.

本实验针对 HCV-RNA-5'-UTR 和部分 core region 的二级结构, 设计并合成了四个不同的锤头型核酶, 通过体外和细胞内切割试验, 筛选出一种有较好切割活性的核酶 RzA, 其作用结果可能会使 HCV-RNA 失去表达活性. 这

给研究 HCV-RNA 的结构与功能和以后临床上治疗丙型肝炎打下了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

HCV 病人血清由河北石家庄和平医院传染科孙晓彦大夫提供; 逆转录酶, Taq DNA 聚合酶, 体外转录试剂盒, 荧光素酶检测试剂盒, pGEM-4z, pCf-neo, T-vector 质粒及所有内切酶购自 Promega 公司; 测序试剂盒购自 Pharmacia 公司; α -³²P-dATP, α -³²P-UTP 购自福瑞公司; HepG₂ 肝癌细胞和受 HCV 一段基因 (核酶靶基因) 调控的荧光素酶基因质粒表达载体 pCf-neo-luciferase 由第三军医大学王小红博士惠赠; JM109 细菌由本室邢瑞云技师提供.

1.2 方法

1.2.1 HCV-RNA 特异性核酶的设计与制备: 用计算机软件模拟 HCV-5'-UTR 和相邻部分 core region 的序列 (靶序列) 的二级结构, 找出

¹⁾ 空军总医院空军临床分子生物学研究中心, 北京 100036.

收稿日期: 1997-07-17, 修回日期: 1998-01-16

四个可能的核酶作用位点^[3]，再将核酶的序列与靶序列共同输入计算机，模拟它们在体外条件下相互作用的二级结构。设计的核酶编号为 RzA、RzB、RzC₁ 和 RzC₂。四个核酶的基因均由 DNA 合成仪合成，每种核酶基因的两条链均合成其 5' 端部分，且在合成的两条链的 3' 端有 15~ 16 个碱基互补配对，通过 PCR 反应 (94℃ 30 s, 72℃ 30 s, 56℃ 30 s, 15 个循环)，两条单链 3' 端碱基互补退火，然后延伸，扩增出完整的核酶基因^[4]。RzA、RzC₁、RzC₂ 三个核酶基因 5' 端加有 T7 启动子序列，纯化后直接用于转录。RzB 基因较长 (RzB 被设计成具有 ATG 上游 RzA 的 GTA↓位点和 ATG 下游 GTC↓两个酶切位点并带有一段跨过 ATG 的反义核酸的核酶)，PCR 扩增后直接克隆至 T-vector 开环处^[5]，并转化 JM109 细菌。采用菌落 PCR 对菌落进行克隆筛选和定向 (上游引物 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'，下游引物为 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3')。摇菌提质粒后依 Sanger 法测序，具体按试剂盒说明书 (Pharmacia 公司) 进行测序。四个核酶的基因序列如下所示：

RzC₁
5'-ATAATACGACTCACTATAGGGTCTACGACTGAT
GAGTCCGTGAGGACGAAACCTCCCGTG-3'

5'-CTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACGGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGC
CATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTG
GTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAAC
CCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCACGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGT
CGCGAAAGGCCTTGTGCTACTGCCTGATAGGGTGCCCCGGGAGGTC↓TCGTA↓GACCGTGC
ACC ATGAGCACGAATC↓CTAAACCTCAAAGAAAACCAAACGTAACACCAACCGCGCCAC
AGGACGTC↓AAGTTCGCGGTGGTGGT-3'

图 1 测序所得核酶靶基因的序列

四个核酶的切点如箭头所示，从 5' 到 3' 的核酶依次为 RzC₁、RzA、RzC₂ 和 RzB，划线碱基为起始密码子。

1.2.3 体外切割：首先进行体外转录。用 *pSt* I 内切酶分别将携带核酶靶基因的质粒 pGEM-4z 和携带 RzB 基因的质粒 T-vector 分别线性化，并纯化。同上面纯化的三个核酶的

RzA
5'-ATAATACGACTCACTATAGGGGACGGTCCTGATG
AGTCCGTGAGGACGAAACGAGACCTG-3'

RzC₂
5'-ATAATACGACTCACTATAGGGAGGTTTAGCTGAT
GAGTCCGTGAGGACGAAATTCGTGCTTG-3'

RzB
5'-CACCCGGGAAGTCTGTGATGAGTCCGTGAGGACGAA
ACGTCTGTGGGCGGTGCTCATGGTGACGGTCCTG
ATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGACCTG-3'

1.2.2 HCV-RNA 特异性核酶体外切割模板的制备：采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法从 HCV 病人血清中提取 HCV-RNA。设计并合成两套引物：

外 1 5'-GCCAGCCCCGATTGGGGCGACACTCCACCA-3'
外 2 5'-GTCTTCTAGTCGCGCGCACACCCA-3'
内 1 5'-CTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGA-3'
内 2 5'-ACCACCACCCGGAAGTGTGACGTCC-3'

由引物外 2 做反转录后 (42℃, 45 min)，加入引物外 1、外 2 做第一次 PCR，以第一次 PCR 产物为模板，加入引物内 1、内 2 做第二次 PCR (PCR 条件均为 94℃ 30 s, 72℃ 30 s, 55℃ 30 s, 30 个循环)，从而扩得核酶的靶序列。经 Klenow 补平等处理后，将其克隆至 pGEM-4z 质粒的 *Hinc* II 位点，然后转化 JM109 细菌。用上面的方法同样对菌落进行阳性筛选、方向筛选和测序 (图 1)，确定靶序列的正确性^[7]。

基因一起用体外转录试剂盒进行体外转录 (靶基因转录时有 α-³²P-UTP 的参与)。转录出的 RNA 可直接用于体外切割 (核酶与靶的分子比为 100: 1，在 Tris·HCl pH 8.0, 10 mmol/L

MgCl₂ 条件下于 90℃ 变性 120 s 后再于 37℃ 保温 3 h), 切割产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、放射自显影后展示了 RzA 有较好的切割活性。进一步用聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化靶与 RzA (将含有目的 RNA 的胶块切下后于含有 0.3 mmol/L NaAc, 2 mmol/L EDTA, 0.1% SDS 的洗脱液中洗脱过夜, 然后用乙醇沉淀的方法纯化), 再以同样的方法进行体外切割, 可更好地观察到 RzA 的切割效果。

1.2.4 细胞内切割: 重新合成 RzA 基因的两条链 (全链合成), 其两端带有 *EcoR* I 和 *Xba* I 内切酶序列。RzA 基因的两条链在 pH 8.0 Tris·HCl, 10 mmol/L MgCl₂ 缓冲液中退火即得核酶基因。真核质粒表达载体 pCl-neo 经 *EcoR* I 和 *Xba* I 内切酶处理后即可插入 RzA 基因。然后用 PCR 扩增、双酶切的方法鉴定重组质粒的正确性。在 24 孔板上经脂质体介导^[13,14], 将 RzA-RNA 和重组质粒表达载体 pCl-neo-RzA 分别与另一重组质粒表达载体 pCl-neo-luciferase (携带受 RzA 靶基因调控的荧光素酶基因的质粒) 共转染 HepG₂ 细胞。细胞培养 12 h 后 (每孔大约 5×10^4 细胞) 用荧光计测定荧光素酶基因的表达情况, 以判断 RzA 在细胞内的切割活性。

2 结果与讨论

通过体外切割实验, 筛选出 RzA 活性较好, 37℃ 即有令人满意的切割效果, 将靶 RNA (441 b) 切成 338 b 和 103 b 两个片段, 切割效率在 90% 以上 (如图 2 所示, 因 103 b 片段参入的放射性尿嘧啶较少, 故信号很弱)。细胞内实验表明 RzA-RNA 在胞内也有一定的切割效果 (与对照相比, 导入 20 μg RzA-RNA 后可将荧光素酶基因的表达抑制 50% 左右, 表 1), 而重组质粒 pCl-neo-RzA 的切割效果更好 (与对照相比, 导入 2 μg 重组质粒 pCl-neo-RzA 后可将荧光素酶基因的表达抑制 90% 左右), 如表 2 所示。这可能是因为重组质粒 pCl-neo-RzA 在细胞内相对比较稳定, 其抵抗核酸酶降解的能力要比 RNA 好, 另外, 携带

核酶基因的重组质粒还可在细胞内以自身为模板持续不断地转录出核酶 RNA。

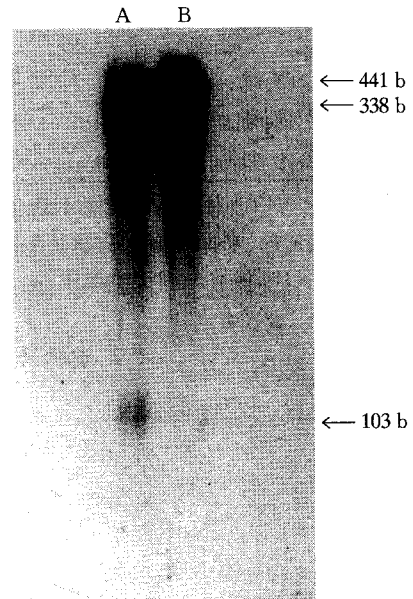


图 2 RNA 经聚丙烯酰胺凝胶纯化后, 核酶 RzA 体外切割的放射自显影

A: RzA + St2; B: St2.

核酶可在细胞内特异地切割靶 RNA, 抑制后者的功能, 但直接检测核酶的切割产物是特别困难的, 这可能是由于细胞内核酸酶的作用使 RNA 片段迅速降解的缘故。因此, 目前一般采用间接检测核酶催化活性的方法, 如设立突变核酶对照和反义对照、PCR 扩增、RNA 印迹等来检测切割产物。本实验则通过检测报告基因 (荧光素酶基因) 的表达来观察 RzA 在细胞内的切割。细胞内 RzA 作用的靶序列基因存在于 pCl-neo-luciferase 质粒表达载体中 (在荧光素酶基因的上游连有一段 HCV RNA 序列-核酶靶基因, 并将连好的两段基因序列插入到由 *Nhe* I、*Xba* I 切割后的 pCl-neo 质粒载体中), 使荧光素酶基因的表达受这段基因的影响。若核酶在细胞内发生切割作用, 荧光素酶基因的表达将会减少, 应用化学发光仪检测时, 加入荧光素酶的底物, 荧光素酶就会将底物分解, 发出荧光, 通过荧光的强度就可以判断核酶的切割效果。

表 1 RzA-RNA 导入细胞后荧光素酶基因的表达

							mV
	细胞	模板	加 RzA (4.2 g/L)				RNA 对照
	对照	对照	1.0 μl	2.0 μl	5.0 μl	10.0 μl	2.0 μl (6 g/L)
平均	0.15	5 793.00	4 258.00	3 522.00	2 908.00	2 124.00	5 149.00
	0.45	6 101.00	4 431.00	3 703.00	2 574.00	1 876.00	5 549.00
	0.30	5 947.00	4 344.50	3 612.50	2 741.00	2 000.00	5 349.00

注: 细胞对照: 不加任何核酸的细胞本底的荧光强度; 模板对照: 单加 pCf-neo-luciferase 质粒的荧光强度; 加 RZA: 核酶 RNA/pCf-neo-luciferase 质粒共转染细胞后的荧光强度; RNA 对照: HBV 的一段 RNA/pCf-neo-luciferase 质粒共转染细胞后的荧光强度。

表 2 RzA 基因导入细胞后荧光素酶基因的表达

mV				
加 pC1 neoR RzA 质粒 (1 g/L)				质粒对照
0.25 μl	0.5 μl	1.0 μl	2.0 μl	2.0 μl (1 g/L)
3 878.00	2 896.00	1 675.00	441.00	5 689.00
4 000.00	2 862.00	1 716.00	332.00	6 100.00
平均 3 939.00	2 879.00	1 695.00	386.00	5 893.00

注: 加 pCf-neo-RzA 质粒: pCf-neo-RzA 质粒/pCf-neo-luciferase 质粒共转染细胞后的荧光强度; 质粒对照: 含 HBV 一段基因的 PGEM-4z 质粒/pCf-neo-luciferase 质粒共转染细胞后的荧光强度。

参考文献

- ## 参 考 文 献
- 1 Han J H, Shyamala V, Richman K H *et al.* Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequence in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc Natl Sci Acad USA*, 1991, **5** (88): 1711~ 1715
 - 2 Brown E A, Zhang K H, Ping L H *et al.* Secondary structure of the 5' non-translated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucl Acid Res*, 1992, **20** (19): 5041~ 5045
 - 3 Haseloff J, Gerlach W L. Simple RNA enzyme with new and highly specific endo-ribonuclease activities. *Nature*, 1988, **334** (18): 585~ 591
 - 4 Levitz R, Jian-Ying W, Sioud M *et al.* Expression of function ribozymes in bacteria. *Method: A Companion to Methods in Enzymology*, 1993, **5** (1): 29~ 35
 - 5 Hengen P N. Cloning PCR products using T-vectors. *Trends in Biochem Sci*, 1995, **20** (2): 85~ 86
 - 6 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analy Biochemistry*, 1987, **162** (1): 156~ 159
 - 7 毕胜利, 白宪鹤, 丛勉尔等 (Bi S L, Bai X H, Cong M E *et al.*). 中国人丙型肝炎病毒基因组的一级结构及其变异. *病毒学报 (J virus)*, 1993, **9** (2): 114~ 127
 - 8 Ronald R, Breaker, Joyce G F. Inventing and improving ribozyme function: rational design versus iterative selection methods. *Trends in Biotechnology*, 1994, **12** (7): 268~ 275
 - 9 Shimayama T, Nishikawa S, Taita K. Extraordinary enhancement of the cleavage activity of a DNA-armed hammerhead ribozyme at cleavage concentration of Mg^{2+} ions. *FEBS*, 1995, **368** (2): 304~ 306
 - 10 Palfner K, Kneba M, Hiddemann W *et al.* Improvement of hammerhead ribozymes cleaving *mdr-1* mRNA. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1995, **376** (5): 289~ 295
 - 11 Sigurdsson S T, Eckstein F. Structure-function relationship of hammerhead ribozyme: from understanding to applications. *Trends in Biotechnology*, 1995, **13** (8): 286~ 289
 - 12 Ruffner D, Stormo G D, Uhlenbeck O C. Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry*, 1990, **29** (47): 10695~ 10702
 - 13 Felgner J, Bennett F, Felgner P L. Cationic lipid-mediated delivery of polynucleotide. *Method: A Companion to Method in Enzymology*, 1993, **5** (1): 67~ 75
 - 14 Sullivan S M. Liposome-mediated uptake of ribozymes. *Method: A Companion to Method in Enzymology*, 1993, **5** (1): 61~ 66
- ## Study on Cleavage of Hepatitis C Virus RNA by Specific Ribozymes. LIU Li-zhong, WANG

Sheng - qi , ZHU Bao - zhen , SUN Zhi - xian
(*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing* 100850, China).

Abstract Four kinds of different hammerhead ribozymes (ribozymeA, ribozymeB, ribozymeC₁, ribozymeC₂) were designed and synthesized according to the secondary structure of HCV-RNA 5'-untranslated region and part of the neighbour C-region. Firstly, the cleavage of the four Rzs were tested *in vitro*, and only the ribozyme with GTA ↓ motif at-11nt site of HCV-RNA showed cleavage activity. RzA-RNA and the combined pCf-neo-luciferase in which a luciferase gene were ligated downstream the tar-

get sequence were then co-transfected into HepG₂ cell lines with lipofectine. The cleavage of RzA-RNA was tested by determined the expression of luciferase gene. Therefore, the gene of RzA was ligated into expression vector pCf-neo. This pCf-neo-RzA and the vector pCf-neo-luciferase were co-transfected into HepG₂ cell lines again with lipofectine. Since the pCf-neo-RzA was more stable than RzA-RNA *in vivo* and could produce RzA-RNA continuously, it showed better cleavage activity.

Key words hammerhead ribozyme, hepatitis C virus, gene therapy