

- 亡过程中 P53 与 bcl-2 表达的时序性. 中国生物化学与分子生物学学报 (Chin J Biochem & Mol Biol), 1998, **14** (3): 318~321
- 3 王文恭, 童坦君 (Wang W G, Tong T J). 细胞凋亡过程中 bcl-2 基因的甲基化. 中国生物化学与分子生物学学报 (Chin J Biochem & Mol Biol), 1998, **14** (3): 309~313
- 4 Negrini M, Silini E, Kozak C, *et al.* Molecular analysis of mbcl-2: structure and expression of murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell*, 1987, **49** (4): 455~463
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 1. 40~1. 52
- 6 彭勇, 童坦君, 张昌颖 (Peng Y, Tong T J, Zhang C Y). EGF 对 EGFR 基因和 c-fos, c-myc 原癌基因结合蛋白质的影响. 生物化学杂志 (Chin Biochem J), 1993, **9** (4): 400~405
- 7 Mao Z B, Zhang Z Y, Tong T J. Induction of c-fos/c-myc expression by epidermal growth factor decreases with alteration of their gene binding proteins in senescent fibroblasts. *Chinese Med J*, 1997, **110** (10): 755~759

The DNA Binding Proteins of bcl-2 Regulatory Region in Apoptosis of Mouse Fibroblast. WANG Wen Gong, TONG Tan Jun (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract To explore the DNA binding proteins of mouse mbcl-2 regulatory region in the apoptotic process of mouse fibroblast cell line (C3H 10 T1/2 Cl 8) and its transformed counter part, the mouse bcl-2 (mbcl-2) regulatory region was amplified by PCR. The PCR products were subcloned into pGEM-T vector system and then checked by sequencing. Using the product as probe, DNA binding proteins of mbcl-2's regulatory region in nuclear protein extracts of both cell lines were studied. Southwestern blotting results showed that a 53 ku protein binds with the probe. Its binding signal strengthened after exposing both cells to 5-Fu for 12 h, as another DNA binding protein (100 ku) also binds with the probe though its binding signal weakened after 5-Fu treatment. The results suggested that p53 protein may be the negative regulatory factor of mbcl-2 gene. An unidentified 100 ku protein may be the positive regulatory factor of mbcl-2 gene.

Key words apoptosis, bcl-2, transcription factor

双位点核酶对乙型肝炎病毒 C 基因 体外转录物的剪切作用*

连建奇 周永兴

(第四军医大学唐都感染病院, 西安 710038)

金由辛

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 为探讨双位点核酶对乙型肝炎病毒 C 基因体外转录物的剪切作用, 观察双位点核酶对单一核酶体外剪切的增强作用, 同时比较串联核酶和混合核酶的体外切割作用, 构建了核酶 Rz1, Rz3, Rz1 和 Rz3 的串联核酶 (Rz13) 体外转录载体, 经体外转录后切割靶 RNA. 结果表明: 双位点核酶, 无论是串联或混合核酶均可增强单一核酶的体外切割作用, 串联和混合核酶中的单一核酶可独立发挥作用; 当串联和混合数目为 2 个时, 两者的切割效率差别不大 ($P > 0.05$).

关键词 乙型肝炎病毒 C 基因, 串联核酶, 混合核酶

学科分类号 R575.1

核酶 (ribozyme) 是一类具有催化活性的 RNA 分子, 目前已广泛用于抗病毒基因的治疗. 多位点核酶是新一代核酶分子, 可分别针对靶 RNA 分子不同位点切割并破坏靶 RNA, 从而进一步提高核酶阻断靶基因的效率^[1]. 多位点核酶包括多个核

酶串联和混合的核酶分子, 其简单形式是双位点核酶. 本文观察双位点核酶对单一核酶的增强作用, 同时比较混合和串联核酶的切割效率.

* 国家自然科学基金资助项目 (39570652).

收稿日期: 1999-02-25, 修回日期: 1999-05-06

1 材料和方法

1.1 材料

限制性内切酶、T4DNA 连接酶、IPTG、X-gal 购自华美公司, α -³²P-UTP 购自北京亚辉公司, T7RNA 聚合酶, T4DNA 聚合酶购自 BRL. 构建单一核酶质粒 pGEMRz1, pGEMRz3 和双位点核酶质粒 pGEMRz13 所需的联合型核酶 (三个核酶串联) 质粒 pGEMRz123^[2] 由本室构建; pBlue-script II KS (+) 和宿主菌 TG1, JM109 由上海生物化学研究所 408 组保存. pUC19/c-20 (含 HBV C 基因) 由上海生物化学研究所汪垣教授惠赠.

1.2 pGEMRz1, pGEMRz3, pGEMRz13 质粒构建

我们首先根据计算机的设计, 合成了 Rz1、Rz2、Rz3 核酶基因, 并构建质粒 pGEMRz123 即 Rz1、Rz2、Rz3 串联的核酶自剪切质粒^[2]. pGEMRz1 质粒即 Rz1 体外转录质粒可由 pGEMRz123 代替. pGEMRz123 经 *Xba*I、*Cla*I 双酶切去掉 Rz12 基因 (88 bp), Klenow 酶补平, T4DNA 连接酶连接, 即得 pGEMRz3. pGEMRz123 经 *Eco*R I、*Cla*I 双酶切去掉 Rz2 基因 (45 bp), Klenow 酶补平, T4 连接酶连接即得 pGEMRz13. 上述质粒示意图见图 1a.

1.3 靶 RNA 体外转录载体的构建

pUC19/c-20 质粒经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切得到 700 bp 的片段. pBluescript II KS 质粒首先经 *Sac* II 线性化, T4DNA 聚合酶削平后连接形成质粒 pKS', 使 *Bst*X I 位点消失. 再经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切; 纯化后与上述片段 (700 bp 含 *Bst*X I 位点) 连接形成 pKC, 转化 TG1 菌, 小提质粒, *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切鉴定, 扩增纯化. 质粒示意图见图 1b.

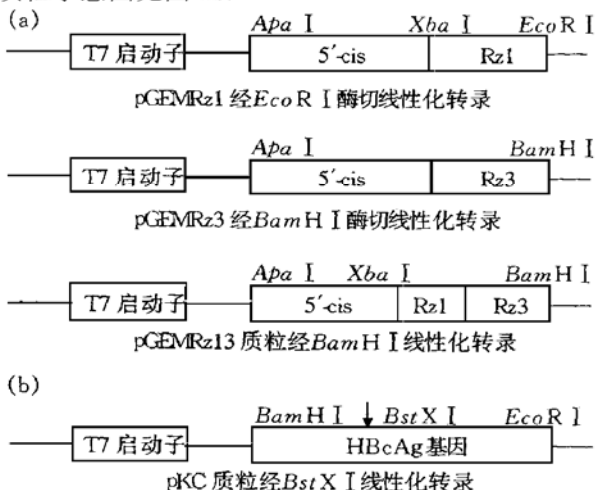


图 1 核酶 (a) 和底物 (b) 体外转录载体的构建和转录

1.4 核酶体外转录和切割产物分析

pGEMRz1, pGEMRz3, pGEMRz13 和 pKC 质粒分别经 *Eco*R I, *Bam*H I, *Bam*H I, *Bst*X I 线性化, T7RNA 聚合酶转录. 底物 RNA 用 α -³²P-UTP 标记, 比较串联和混合核酶的作用时将核酶标记, 观察双串联核酶对单一核酶的增强作用时, 核酶 RNA 不加标记.

上述核酶和靶 RNA 片段经纯化后进行切割反应. 核酶切割反应体系为: 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, 0.02 mol/L MgCl₂, 核酶与底物分子比为 10:1, 总体积为 10 μ l. 首先将底物和核酶变性, 冰浴, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h 时, 终止液 (7 mol/L 尿素, 20 mmol/L EDTA) 终止反应, 10% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (以 15 V/cm 电压电泳 4 h), 作放射自显影, 观察切割结果.

切割率的计算: 放射自显影后割取切割产物条带和对照组条带 (底物) 分别测 cpm 值, 然后计算切割率: 所得切割产物的 cpm 值/对照组条带 cpm 值.

2 结 果

2.1 核酶体外转录质粒构建和体外转录

pGEMRz1, pGEMRz3, pGEMRz13 质粒经 *Eco*R I, *Bam*H I, *Bam*H I (图 1a) 酶切线性化, T7RNA 聚合酶转录 (图 1a) 得到 Rz1, Rz3 单一核酶和 Rz13 双位点核酶. 由于我们在设计核酶时引入了自剪切核酶, 因此上述质粒转录后先发生自剪切^[2], 得到 5'-顺式核酶 (64 nt) 和 50 nt、54 nt、97 nt 的 Rz1、Rz3、Rz13 核酶片段 (结果未显示). 此外核酶 Rz3 和 Rz13 质粒在构建时在自剪切核酶和 Rz3 之间, 核酶 Rz1 和 Rz3 之间保留了数个碱基, 因而得到的核酶 Rz3 和 Rz13 比原设计长.

2.2 靶 RNA 体外转录

因长片段 RNA 易降解, 不易操作, 用 *Bst*X I 线性化可缩短靶 RNA 长度. 由于靶 RNA 含有唯一 *Bst*X I 位点, 而质粒 pBluescript II KS 质粒也含有 *Bst*X I 位点, 因此质粒首先经 *Sac* II (和 *Bst*X I 共用数个碱基) 线性化, T4DNA 聚合酶削平后使质粒上 *Bst*X I 位点消失, pKS' 质粒经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切插入靶基因形成质粒 pKC. 然后经 *Bst*X I 酶切线性化, 再经 T7RNA 聚合酶转录出 α -³²P 标记的 HBV C 基因部分靶 RNA 片段, 长度为 267 nt, 可用于体外切割的靶基因.

2.3 双串联核酶对单一核酶的增强作用

多位点核酶最简单形式是两个核酶的串联或混合使用. 我们首先比较核酶 Rz1、Rz3、Rz13 (Rz1 和 Rz3 的串联核酶) 对靶 RNA 的切割作用. 从图 2 可以看出核酶 Rz1、Rz3、Rz13 (核酶未用 α -³²P-UTP 标记), 均可切割靶 RNA, Rz1 切割靶 RNA 可得到 165 nt、102 nt 片段, Rz3 得到 223 nt 和 44 nt 片段 (44 nt 片段小未观察到). 与理论预测值相一致. 核酶 Rz1 的切割效率大于 Rz3, 而 Rz13 中 Rz1 和 Rz3 不仅可单独切割, 而且可联合切割产生了 121 nt 的新条带, 且 Rz13 的切割效率明显大于 Rz1 和 Rz3. 说明双串联核酶可增强单一核酶的体外切割作用.

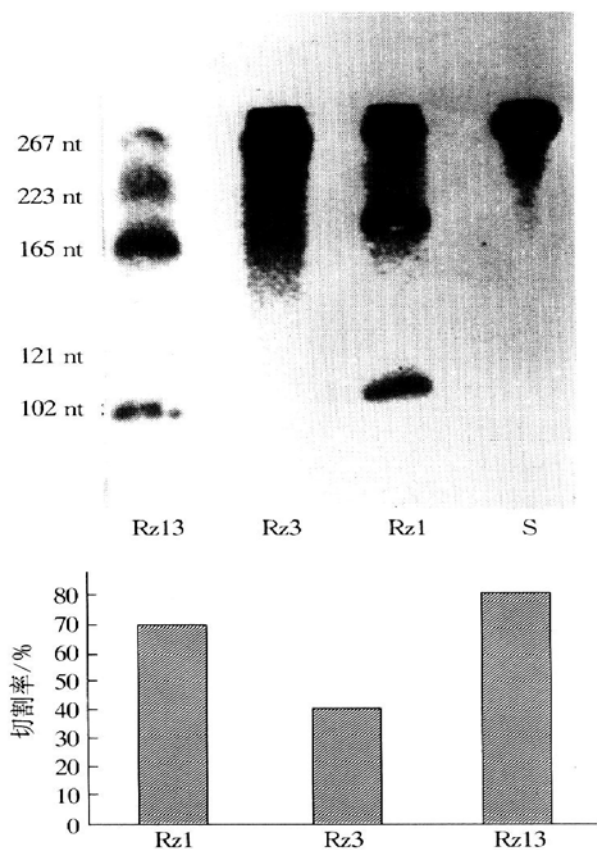


图 2 双串联核酶对单一核酶剪切的增强作用

2.4 串联和混合核酶切割作用比较

为比较串联和混合核酶切割作用, 体外转录核酶时用 α -³²P-UTP 标记, 分别转录出 Rz1 (50 nt)、Rz3 (54 nt) 和 Rz13 (97 nt)^[2]. 从图 3 可以看出, 与单一 Rz3 比较, 无论 Rz1 和 Rz3 串联或混合, 其切割效率均高于 Rz3 的作用, 而串联和混合核酶 ($n = 2$) 切割效率没有差别 ($P > 0.05$). 图 3 的结果也说明无论是串联或混合核酶, 均不影响

其中单一核酶的切割作用.

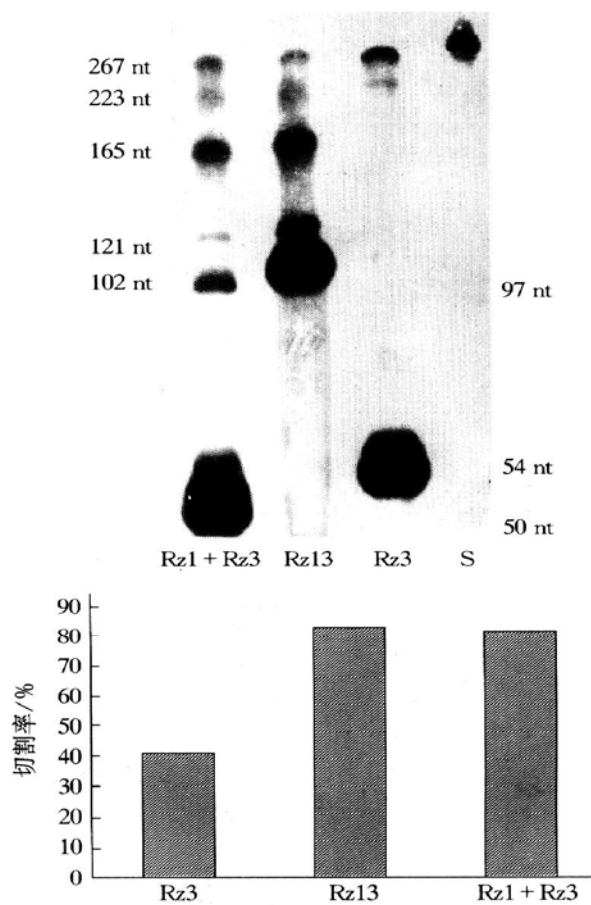


图 3 双串联和混合核酶剪切作用比较

3 讨 论

本研究成功地构建了双位点核酶体外转录载体, 观察了双位点核酶对单一核酶体外剪切的增强作用, 比较了串联和混合核酶的切割效率. 结果表明多位点核酶可增强单一核酶的切割效率, 串联和混合核酶中的单一核酶可独立发挥作用.

核酶能高度专一切割靶 RNA, 但与酶蛋白比其作用效率很低^[3]. 而利用多位点核酶可提高单一核酶的切割作用. 多位点核酶包括串联和混合核酶^[4], 本研究用多位点的最简单形式, 即双位点核酶观察其对单一核酶的增强作用, 结果表明无论是串联或混合核酶均可增强单一核酶的切割效率, 与文献报道一致^[5]. 同时结果表明串联核酶和混合核酶中的单一核酶保持了原有的特性且能联合作用. 因此可以认为单一核酶串联或混合后不会因核酶及靶 RNA 空间结构的作用影响核酶的切割作用.

研究表明核酶串联后, 当串联数大于 3 时, 其切割效率不再增加, 而用混合核酶可增加核酶的切

切割作用, 而且混合数目越多, 切割率越高^[6]. 我们比较了两个核酶串联和混合的切割作用, 结果切割效率基本相同, 可能与我们混合核酶数目较少有关. 目前我们已构建了三个核酶串联和混合核酶载体, 进一步的结果将另文发表.

参 考 文 献

- 1 连建奇, 周永兴 (Lian J Q, Zhou Y X). 核酶及其抗病毒作用的研究进展. 国外医学: 流行病学和传染病学 (Foreign Medical Sciences: Epidemiology and Infectious Diseases), 1995, **22** (5): 212~ 216
- 2 连建奇, 周永兴, 金由辛 (Lian J Q, Zhou Y X, Jin Y X). 抗 HBV C 基因核酶自剪切转录载体的构建. 第四军医大学学报 (Journal of the Forth Military Medical University), 1997, **18** (4): 376~ 377
- 3 李 洁, 金海翎, 张庆琪, 等 (Li J, Jin H L, Zhang Q Q, et al). 双价核酶对烟草花叶病毒的两个靶序列的专一切割作用. 生物工程学报 (Chin J Biotech), 1995, **11** (1): 20~ 26
- 4 Chen C J, Banerjee A C, Harmison G G, et al. Multi-target-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates. Nucleic Acid Res, 1992, **20** (1): 4581~ 4589
- 5 陈 桦, 陆长德, 祁国荣 (Chen H, Lu C D, Qi G R). 混合 Ribozyme 联合切割小鼠腺苷脱氨酶 mRNA 研究. 生物化学与生物物理学报 (Acta Biochimica et Biophysica Sinica), 1994, **26** (6): 603~ 607
- 6 Ohkawa J, Yuyama N, Takebe Y, et al. Importance of independence in ribozyme reactions: kinetic behavior of trimmed and of simply connected multiple ribozymes with potential activity against human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90** (23): 11302~ 11306

Two-unit Ribozyme Mediated Cleavage Against Hepatitis B Virus. LIAN Jian-Qi, ZHOU Yong-Xing, JIN Your-Xin¹⁾ (Tangdu Infectious Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an 710038, China; ¹⁾ Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract To detect cleavage activity of anti-HBV two-unit ribozyme and single ribozyme, and compare two connected ribozyme cleavage efficiency with two mixed ribozymes, firstly, Rz1, Rz3 and Rz13 ribozymes transcription vectors were constructed, then cleavage activity of Rz1, Rz3 and Rz13 ribozymes on target RNA were observed. The results showed that antiviral activity of two-unit ribozyme, whether connected (Rz13) or two mixed ribozymes, has higher cleavage efficiency than single ribozyme. Cleavage efficiency has no difference between connected (Rz13) and two mixed ribozymes ($n = 2$, $P > 0.05$).

Key words hepatitis B virus C gene, connected ribozyme, mixed ribozymes

PKC_v 过表达诱导 C₃H₁₀T_{1/2} 细胞生长失控的初探*

赵 霞 柳惠图¹⁾

(北京师范大学生物系, 细胞增殖及调控生物学开放实验室, 北京 100875)

摘要 通过 DNA 重组构建蛋白激酶 C_v (PKC_v) 亚类的重组质粒并经基因转染技术和 DNA 印迹、蛋白质印迹与 PKC 活性分析, 获得了过表达 PKC_v 的 C₃H₁₀T_{1/2} 细胞——NCP4. NCP4 细胞生长速率提高, 流式细胞光度术检测表明, NCP4 细胞 G1 期百分率下降, S 期和 G2+ M 期百分率升高, 与对照组细胞相比, 血清依赖性明显下降, 贴壁依赖性降低, 在软琼脂中形成小集落, 出现部分转化表型. 进一步检测, 首次观察到 NCP4 细胞中癌基因 c-sis 表达明显增强, 这可能是 NCP4 细胞血清依赖性下降的分子机理之一. 实验表明, 在正常 C₃H₁₀T_{1/2} 细胞中 PKC_v 的过表达可直接导致细胞增殖加速并可诱导出现部分转化特征.

关键词 蛋白激酶 C_v, C₃H₁₀T_{1/2} 细胞, 增殖与转化

学科分类号 Q28

* 国家自然科学基金资助项目 (9388002、39200024 和 39430080). ¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-09-15, 修回日期: 1999-01-19