论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2426-04

EBV-LMP1 C端RNA的体外转录合成及其靶脱氧核酶的初步筛选

杨玉成,王祎琴,钱 迪,何 芸,黄江菊,洪苏玲 (重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨用体外转录方法制备EBV-LMP1 C端RNA并用该RNA对其靶脱氧核酶进行初步筛选。**方法** 用巢式PCR方法从绒猴淋巴细胞系B95-8细胞中扩增EBV-LMP1 exon c,重组入pGEM-11zf载体,并用T_7RNA聚合酶对其进行体外转录制备EBV-LMP1 C端RNA。根据该RNA的一、二级结构设计合成3种靶向10~23脱氧核酶,据体外剪切效率筛选高效特异的靶向脱氧核酶。**结果** 成功地构建含EBV-LMP1 exon c基因的重组质粒,用体外转录方法用1 μg质粒转录出40.25 μg高纯度的EBV-LMP1 C端RNA,有1种脱氧核酶DZ1对该RNA体外剪切效率达89%。**结论** 用T_7RNA聚合酶体外转录方法成功制备了高纯度的EBV-LMP1 C端RNA,经体外剪切筛选出高效特异的1种脱氧核酶,为进一步研究奠定了基础。

关键词: 体外转录;EB病毒;潜伏膜蛋白1(LMP1);脱氧核酶

中图法分类号: R373.11;R394-33;R394.3 **文献标识码:** A

EBV-LMP1 carboxy region RNA synthesis *via* transcription *in vitro* and initial selection of targeted DNAzyme

YANG Yu-cheng, WANG Yi-qin, QIAN Di, HE Yun, HUANG Jiang-ju, HONG Su-ling (Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To synthesize highly pure EBV-LMP1 carboxy region RNA by *in vitro* transcription and select its targeted active DNAzyme. **Methods** EBV-LMP1 exon c gene was amplified by nest PCR from the B95-8 cell genomic DNA and cloned into plasmid pGEM-11zf. The cloned DNA sequence was transcribed *in vitro* by T7-RNA polymerase. Three targeted 10-23 DNAzymes were designed and synthesized. The highly active and specific DNAzymes were evaluated by *in vitro* cleavage reaction. **Results** EBV-LMP1 exon c gene recombinant plasmid was successfully constructed and 40.25 μg EBV-LMP1 carboxy region RNA was produced *via* transcription *in vitro* from 1.0 μg lined recombinant plasmid. The cleavage ratio of active DNAzyme DZ1 was 89%. **Conclusion** Highly pure EBV-LMP1 carboxy region RNA was synthesized successfully by *in vitro* transcription. One active targeted DNAzyme was selected by *in vitro* cleavage reaction, paving the way for further research.

Key words: *in vitro* transcription; Epstein-Barr virus; latent membrane protein 1; DNAzyme/Deoxyribozyme

近年来,体外转录技术、脱氧核酶(DNAzymes, deoxyribozyme, DZ)技术已成为一项成熟的分子生物学和细胞生物学技术[1,2],是当今分子生物学研究的热点之一。通过体外转录,除了研究基因表达的调控之外,人们可以有效地转录合成大量的RNA片段,如直接获得RNA病毒基因组、siRNA、核酶、tRNA、探针RNA,还可以获得用于DNAzymes、核酶的剪切底物RNA[3],为RNA结构和功能的进一步研究提供了一个简便可靠的技术平台。

EB病毒(Epstein-Barr virus,EBV)编码的潜伏膜蛋白1(latent membrane protein 1, LMP1)是众多EBV编码基因中被明确证明唯一能够将体外培养的人和啮齿类动物细胞转化成肿瘤细胞系的致瘤基因,因而LMP1基因被列为癌基因[4,5]。LMP1羧基端对于LMP1的功能如介导信号转导等有重要作用,是近年

基金项目:重庆市卫生局资助重点项目(2003)
Supported by the Key Research Project of Chongqing Bureau of Public Health (2003)

作者简介:杨玉成(1974-),男,四川省南江县人,博士,主治医师,讲师,主要从事耳鼻咽喉肿瘤基础与临床方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)89011020

通讯作者:洪苏玲,电话:(023)89011020

收稿日期:2005-12-27;修回日期:2006-05-10

来 LMP1 功能研究的热点。而 LMP1 羧基端由 LMP1 基因第 3 外显子(exon c)编码。本研究通过体外转录技术制备了高纯度的 EBV-LMP1 C 端 RNA,并用该 RNA 经体外剪切筛选出高效特异的靶脱氧核酶,为以后进一步研究 LMP1 的结构、功能奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　细胞株、培养基、质粒和菌株

绒猴淋巴细胞系 B95-8 细胞由中山大学肿瘤研究所惠赠;小牛血清购自杭州四季清公司;RMPI1640 培养基、pGEM-11zf 质粒、大肠杆菌 JM109 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部(省部共建)重点实验室配制或保存。

1.2　试剂和试剂盒

T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ、Ex *Taq* 酶、λ-EcoT14 digest DNA 标准,DL 2000 DNA 标准,RNA 标准 RL 1000,pMD18-T Vector、DNA 胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司(大连)。质粒提取试剂盒、Cycle-pure kit 购自 Omega 公司。RNAClean 试剂盒购自北京天为时代公司。Riboprobe System-T7 试剂盒均购自 Promega 公司。脱氧核酶由上海英骏生物技术有限公司合成及纯化。

1.3　主要仪器

聚合酶链反应(PCR)扩增仪为 PE-Cetus 公司 2400 型,Gel Doc100 凝胶成像仪和 Smart SpecTM plus 全波长分光光度计为 BIO-RAD 公司产品。基因测序仪为 ABI 公司 3100 型。

1.4　细胞培养及 DNA 抽提

B95-8 细胞用含 10% 小牛血清的 RMPI1640 培养基培养,置于 37 ℃、5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱。72 h 后收集细胞,参照 DNA 抽提试剂盒说明提取细胞基因组 DNA 及 EB 病毒 DNA。

1.5　巢式 PCR 扩增合成 EBV-LMP1 exonc 基因片段

依据原型株 B95-8 的基因序列(GenBank NC 01345 或 V01555)设计 PCR 引物:第 1 轮 PCR 以 B95-8 细胞基因组 DNA 为模板,扩增包含 LMP1 基因全长序列(相当于 GenBank NC 01345:168 036 ~ 169 713nt)。1 号上游引物:5′-CGCTTTTCTAACACAAACACACGCT-3′(169 713 ~ 169 689 nt);2 号下游引物:5′-GACAGACAGTGTGGCTAAGGGAGTG-3′(168 036 ~ 168 061 nt)。扩增产物 1 678 bp,连入 pMD18-T 载体(TA 克隆),测序鉴定正确。第 2 轮 PCR 扩增 LMP1 基因的第 3 外显子(exon c)(相当于 GenBank NC 01345:168 163 ~ 168 963 nt)。3 号上游引物(含有 *Eco*R Ⅰ酶切位点):5′-GCCCGAATTCTTAGGTATCTGGATCTACTTATTG-3′(168 963 ~ 168 940 nt)。4 号下游引物(含有 *Xho* Ⅰ酶切位点):5′-GCGCTCGAGTGTCATAGTAGCTTAGCTGAACTG-3′(168 163 ~ 168 186 nt)。由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应液组成:Ex *Taq* 酶(5 U/μl) 0.15 μl, 10 × PCR 缓冲液 2.5 μl,dNTP(各 2.5 mmol/L) 2 μl,上游引物(10 μmol/L)2.5 μl, 下游引物(10 μmol/L) 2.5 μl,模板为重组 T 载体 0.5 μl,加灭菌纯水至 25 μl。PCR 循环参数:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 50 s,55 ℃ 50 s,72 ℃ 55 s,35 个循环;72 ℃ 8 min。扩增目的片段 801 bp。

1.6　pGEM-11zf-LMP1c 重组克隆构建与鉴定

含目的片段的 PCR 产物经 Cycle-pure kit 纯化回收后与质粒 pGEM-11zf 用 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切,胶回收酶切产物,混和后用 T_4 DNA 连接酶在 16 ℃连接过夜。连接产物转化感受态 JM109,氨苄青霉素平板粗筛,挑取阳性单克隆,提取质粒进行酶切鉴定及质粒通用引物 PCR 鉴定,经鉴定正确的重组质粒送重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部(省部共建)重点实验室进行序列测定。

1.7　体外转录制备目的 RNA

用内切酶 *Xho* Ⅰ对重组质粒 pGEM-11zf-LMP1c 进行充分酶切,琼脂糖电泳分离回收完全线性化的重组质粒,作为体外转录的模板。体外转录反应 20 μl 体系为:体外转录缓冲液重组 RNA 酶抑制剂 5 × Buffer 4 μl,DTT 100 mmol/L 2 μl,Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl) 1 μl, rNTP (2.5 mmol/L) 4 μl,线性化模板 8 μl(共约 1 μg),T_7 RNA 聚合酶(20 U/μl) 1 μl。37 ℃水浴 2 h。然后加入 RQ1 RNase-Free DNase(1 U/μl) 1.0 μl, 37 ℃水浴 15 min。转录产物按照 RNA 标准 RL1000 使用方法,65 ℃加热 10 min 后,迅速冷却至室温,用 4% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。用 RNAClean 试剂盒进行转录产物 RNA 纯化。取 2 μl 纯化产物溶于 98 μl DEPC 水中,在分光光度计上测定吸光值[D(260)、D(280)],并计算 D(260)/D(280)及 RNA 总量。

1.8　针对目的 RNA 设计合成靶向脱氧核酶

根据重组质粒 pGEM-11zf-LMP1c 的测序结果及 GenBank 提供的相关序列(NC 00135),参考有关资料,用 BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi)分析基因库中各序列的同源性,用 RNAstructure 和 DNAMAN 分析 LMP1-mRNA 二级结构,选择具有高度特异性和高度保守性的环状膨出核苷酸序列为 DNAzyme 靶序列,以 LMP1 mRNA 的 AU 为酶切靶位点。设计合成 3 种针对 EBV-LMP1 C 端 RNA 序列不同位置 AU 靶位点的特异 DNAzyme,包括具酶活性的环状结构和识别靶位点的侧臂结构(各 9 个碱基)。同时设计每种 DZ 相对应的突变体(mutant DNAzyme,mutDZ)及反义寡聚核苷酸(antisense oligonucleotide,ASODN)。突变体为侧臂序列与非突变体相同,仅在环状结构中 1 个碱基突变(T4 被 A4 取代),使其失去酶活性。反义寡聚核苷酸与同一侧臂序列位置处互补(19 个碱基)。为增加 DNAzyme 及寡聚核苷酸的稳定性,侧臂两端各 2 个碱基进行硫代修饰。

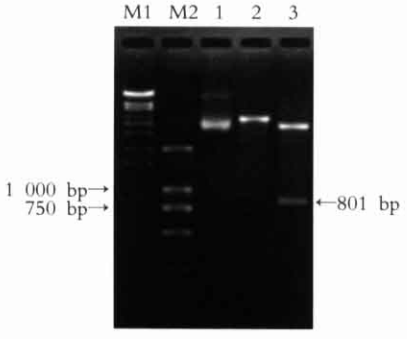
1.9　高效特异的靶向脱氧核酶的体外切割筛选

在接近生理条件下,对设计合成的 DNAzyme 进行切割反应筛选。将纯化后的 5 pmol RNA 底物与 5 pmol DNAzyme 的混合物 95 ℃ 2 min 变性,退火,加入反应缓冲液(pH 7.4 的 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L $MgCl_2$),10 μl 反应体系,37 ℃进行切割反应,反应时间 60 min,加入 0.5 mol/L EDTA 终止反应。琼脂糖甲醛变性凝胶电泳,EB 染色,Gel Doc 100 凝胶成像系统扫描成像,用 GeneTools 软件进行酶切效率分析。

2 结果

2.1 重组克隆 pGEM-11zf-LMP1c 的酶切、PCR 及测序鉴定

第2轮 PCR 获得长度为801 bp 的 EBV-LMP1 exon c 基因片段，构建重组质粒 pGEM-11zf-LMP1c，用 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切，得到801 bp 的 LMP1c 片段，与理论设计相符。见图1。用质粒通用引物 PCR 鉴定阳性克隆，得到约1 000 bp 的片段，与理论设计相符。送重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部（省部共建）重点实验室进行序列测定，鉴定正确。



M1：λ-*Eco*T14 Ⅰ digest 标准；M2：标准（DL 2000）；1：pGEM-11zf-LMP1c 重组质粒；2：pGEM-11zf-LMP1c 重组质粒 *Eco*R Ⅰ单酶切；3：pGEM-11zf-LMP1c 重组质粒 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切

图1 重组质粒 pGEM-11zf-LMP1c 酶切鉴定电泳图

2.2 体外转录产物的鉴定

成功转录出大小约833 nt 的 RNA，在20 μl 体系，1 μg 线形化模板，转录产物稀释50倍后在分光光度计上测量 $D(260)=1.021\ 6$，浓度为2.013 mg/ml，计算得到 $D(260)/D(280)=1.98$，转录产物的量约为40.25 μg。

2.3 靶向脱氧核酶及其突变体和反义寡聚核苷酸

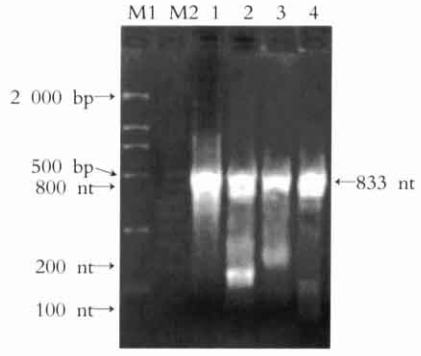
根据 LMP1 mRNA 的二级结构，选择 AU 为靶位点设计合成出3种脱氧核酶及其相对应的突变体和反义寡聚核苷酸，两端各2个碱基进行硫代修饰。见表1。

表1 设计合成的脱氧核酶及其突变体和反义寡聚核苷酸

DZ 名称	LMP1 mRNA 靶点（358～1 158 nt）	DZ 碱基组成	硫代修饰
DZ1	509	5′-caAAGGAGAGGCTAGCTACAACGACAACCAAta-3′	ca-----ta
DZ2	827	5′-agCGGGTCAGGCTAGCTACAACGA GTGGGCCat-3′	ag-----at
DZ3	1 037	5′-tcATGACTA GGCTAGCTACAACGA GACCGCCgc-3′	tc-----gc
mutDZ1	509	5′-caAAGGAGAGGCAAGCTACAACGACAACCAAta-3′	ca-----ta
ASODN1	509	5′-caAAGGAGATCAACCAAta-3′	ca-----ta

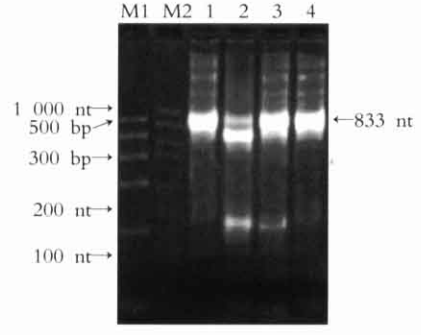
2.4 靶向脱氧核酶的体外切割筛选

3种 DZ 在10 μl 反应体系，37 ℃，切割靶 LMP1 C 端 RNA 60 min 后用2%琼脂糖凝胶电泳（140 V，40 min）结果见图2。筛选出的 DZ1 与其 mutDZ1 和 ASODN1 切割靶 LMP1 C 端 RNA 60 min后，用3%琼脂糖凝胶电泳（140 V，40 min）结果见图3。用 GeneTools 软件进行酶切效率分析，结果显示 DZ1、DZ2、DZ3 对模板 LMP1c RNA 的剪切率分别为63%、36%、5%，而 DZ1、mutDZ1、ASODN1 的剪切率分别为67%、38%、0%，表明突变体有部分剪切活性，而反义寡核苷酸无切割活性。



M1：标准（DL 2000）；M2：标准（RL 1000）；1：未加 DZ 的 LMP1 C 端 RNA；2－4：分别为 DZ1，DZ2，DZ3 体外剪切60 min

图2 脱氧核酶的体外切割筛选



M1：DNA 标准；M2：标准（RL 1000）；1：未加 DZ 的 LMP1 C 端 RNA；2－4：分别为 DZ1，mutDZ1，ASODN1 体外剪切60 min

图3 脱氧核酶的特异性鉴定

3 讨论

B95-8 的 LMP1 是一个由386个氨基酸残基组成的完整的跨膜蛋白，分为氨基端、跨膜区和羧基端3部分。羧基端位于细胞质内，由200个氨基酸残基组成，介导信号转导。LMP1 基因含3个外显子，外显子 a（exon a）编码 LMP1 氨基端及部分跨膜区，外显子 b（exon b）参与编码 LMP1 的跨膜区，外显子 c（exon c）编码267个氨基酸残基，包括 LMP1 羧基端及部分跨膜区[6]。

我们经过序列对比分析，结果显示 LMP1 exon c 碱基互补序列与 LMP1 mRNA C 端801 bp 完全一致，理论上让我们可以省去复杂的 RT-PCR，用上下游引物调整方向及序列互补性，而直接用 PCR 扩增 LMP1 mRNA 来构建表达质粒。本研究中，我们用巢式 PCR 技术扩增 LMP1 基因 exon c 的 DNA，将该基因片段插入双向体外转录系统 pGEM-11zf 质粒的 T_7 RNA 聚合

酶启动子之后，成功构建重组质粒 pGEM-11zf-LMP1c，经双向测序及序列对比分析，读码框与 LMP1 mRNA C 端 801 bp 完全一致。将质粒线性化之后，在 T_7RNA 聚合酶的作用下，对线性化的重组质粒进行了体外转录，得到 LMP1 exon c 转录的 RNA 即 LMP1 C 端 RNA。1 μg 的 DNA 模板生成了 40.25 μg RNA，得到的 RNA 是 DNA 模板量的 40 倍。以上结果说明我们建立了理想的体外转录体系，并且可以进一步扩大反应体积，制备出我们研究所需要的足量的 LMP1 C 端 RNA。为脱氧核酶在 RNA 水平体外剪切筛选，为 LMP1 主要功能区羧基端在 RNA 水平即在转录、转录后及其与其他蛋白之间直接相互作用等进一步研究奠定了基础。并可标记成 RNA 探针用于原位杂交、Southern blot 或 Northern blot 等更精确的检测。总之为 RNA 结构和功能的进一步研究提供了一个操作简便，可靠的技术平台。

脱氧核酶是利用体外分子进化技术合成的一种具有催化功能的单链 DNA 片段，具有高效的催化活性和结构识别能力。其中应用最广泛的是 10 ~ 23 型 DNAzyme（10 ~ 23 DRz）。它是经过 10 轮扩增第 23 个克隆，得到的一种 DNA 酶[7]。10 ~ 23 DRz 的切割位点位于 RNA 分子上的未配对的嘌呤和配对的嘧啶之间，在接近生理条件下，切割 RNA 后可产生 2′(3′)-环磷酸和 5′-羟基末端的切割产物。通过合理设计 DNA 酶底物识别部位的核苷酸序列，就能对任何含有嘌呤、嘧啶的 RNA 分子进行靶向切割，从而调控蛋白质的表达。与核酶比较，DNAzyme 具有分子量小、稳定性高、特异性强、高效催化性以及价格便宜容易获得等诸多优点。作为一种新型 RNA 水平强效基因灭活因子，DNAzyme 在治疗病毒感染性疾病、肿瘤和心血管等其他相关疾病已较广泛的研究[8]。

近年来，LMP1 的致瘤机制已成为研究的热点。LMP1 可能类似于肿瘤坏死因子受体家族成员 CD40，通过参与细胞内信号传导网络，参与细胞增殖或凋亡的调控。LMP1 的主要功能位于羧基端（C 端）细胞质区，LMP1 C 端的功能结构域主要参与激活 NF-kB、AP-1、JAK-STAT 等信号传递系统及诱导 Notch 信号活化等[9,10]。因此某些研究者认为 LMP1 蛋白的羧基端和/或某些结构域可能是 LMPl 致瘤机制的关键部位。目前关于 LMP1 基因表达调控方面的研究已逐渐成为热点，已有用 RNAi 在 RNA 水平抑制基因表达方面的报道[11]。

本研究针对 LMP1 C 端 RNA，设计合成 3 种靶向性脱氧核酶，对体外转录技术获得的 LMP1 C 端 RNA 进行体外剪切，3 种脱氧核酶 DZ1、DZ2、DZ3 在 10 μl 反应体系，37 ℃，60 min 对该 RNA 的体外剪切率分别为 63%、36%、5%。针对 DZ1 设计的 ASODN1、MutDZ1 在相同条件下剪切率分别为 67%、38%、0%。证实 DZ1 能高效特异的切割靶 LMP1 C 端 RNA，功能区突变的 MutDZ1 有部分剪切活性，反义寡核苷酸无剪切活性。筛选出的高效特异的靶向 DZ1，为进一步研究脱氧核酶在细胞水平、体内水平剪切 LMP1 mRNA，抑制癌基因 LMP1 的蛋白表达奠定了基础，有望应用于 EBV 相关肿瘤如鼻咽癌等的靶基因生物治疗。

［致谢：本研究在重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部（省部共建）重点实验室完成，感谢各位老师无私的指导和帮助！］

参考文献：

[1] 侯　伟，沃健儿，刘克洲. 基因体外转录的应用研究[J]. 医学综述，2005，11(2)：114 - 116.

[2] SCHUBERT S，GUL D C，GRUNERT H P，*et al*. RNA cleaving '10-23' DNAzymes with enhanced stability and activity[J]. Nucleic Acids Res，2003，31(20)：5982 - 5992.

[3] 于乐成，顾长海，毛　青，等. 剪切 HCV RNA 的 HDV 核酶的设计及活性测定[J]. 第三军医大学学报，2001，23(3)：312 - 314.

[4] BURGOS J S. Involvement of the Epstein-Barr virus in the nasopharyngeal carcinoma pathogenesis[J]. Med Oncol，2005，22(2)：113 - 121.

[5] 章晓鹏，贺智敏，陈主初. EB 病毒及其癌基因 LMP1 对上皮细胞的转化作用[J]. 生命的化学，2003，23(2)：143 - 145.

[6] 金　奇. 医学分子病毒学[M]. 第 2 版. 北京：北京科学出版社，2001：763 - 781.

[7] SANTORO S W，JOYCE G F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1997，94(9)：4262 - 4266.

[8] ACHENBACH J C，CHIUMAN W，CRUZ R P，*et al*. DNAzymes：from creation in vitro to application *in vivo*[J]. Curr Pharm Biotechnol，2004，5(4)：321 - 336.

[9] DING L，LI L L，YANG J，*et al*. Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 modulates nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein by activating nuclear factor-kappaB p65 in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Int J Biochem Cell Biol，2005，37(9)：1881 - 1889.

[10] WANG C，AI M，REN W，*et al*. Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 induces TRAF1 expression to promote anti-apoptosis activity *via* NF-kappaB signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin Med J (Engl)，2003，116(7)：1022 - 1028.

[11] LI X P，LI G，PENG Y，*et al*. Suppression Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 by RNA interference inhibits the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun，2004，315(1)：212 - 218.

（编辑　张大春）