DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.015

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0410-03

合成寡核苷酸对病毒目标序列特异结合反应及其影响因素研究

王思雄,熊鸿燕,李 莉 (第三军医预防医学系流行病学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察人工合成的反义寡核苷酸(ASON)、三螺旋结构寡核苷酸(TFO)分别对人甲肝病毒(HAV)5′非编码区和鸭乙肝病毒(DHBV)-DNA X/C区目标基因序列特异结合效应及受影响因素作用的变化。方法 在设定条件下,将人工合成的ASON和TFO与目标基因片断混合反应,采用电泳转移印迹技术观察特异结合产物及其产量。结果 所设计的ASON与TFO能与目标基因片段直接特异结合;在结合缓冲液中,ASON与目标片段的结合最佳比例是25~50∶1,TFO与目标片段的结合最佳比例是600∶1;在最适加入剂量比例下,结合反应60 min即有大量TFO的复合物形成,复合物产量随作用时间延长而增加,180~240 min时结合产物完全稳定形成。但ASON的结合复合物大量形成需要180~240 min。结论 本试验所设计的ASON和TFO能与HAV和DHBV的目标基因序列发生特异的结合,ASON和TFO的加入剂量和反应作用时间对特异结合产物的形成有明显影响。

关键词:三螺旋结构寡核苷酸;反义寡核苷酸;鸭乙肝病毒;甲肝病毒
中图法分类号:R373.21;R394-33 文献标识码:A

Specially binding of synthesized oligonucleotide to target viral gene sequences and the influencing factors

WANG Si-xiong, XIONG Hong-yan, Li Li (Department of Epidemiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To observe the reaction and effects of artificial synthesized antisense oligonucleotide (ASON), triple helix forming oligonucleotide (TFO) specially binding to the target gene sequences from 5′-nontranslated region of human hepatitis A RNA and X/C region of duck hepatitis B-DNA. Methods Under designed condition, the artificial synthesized ASON and TFO were mixed with objective gene sequences, and then the outcomes of special linking were detected with gel shift blot assay. Results The designed ASON and TFO combined to the target genes directly. The best proportion of ASON and its target gene was about 25—50∶1, and the TFO and its target gene 600∶1. On suitable proportion conditions, the complex products were increased with the reaction holding time. After holding time was about 60 min, most of the TFO complex formed, and 180—240 min later the TFO complex formed completely. For ASON, most its complex also needed 180—240 min to forming. Conclusion The designed ASON and TFO could specially combine to objective genes of HAV and DHBV respectively. The added doses of artificial synthesized oligonucleotide, the reaction holding times could affect the production of special complex.

Key words triple helix forming oligonucleotide; antisense oligonucleotide; duck hepatitis virus B; hepatitis virus A

反义核酸技术(Antisense nucleic acid technology)是近几年发展起来的旨在选择性地与特定基因结合,并特异地抑制基因的复制、转录和翻译的一种分子生物学技术。反义核酸技术的研究对于从反向遗传学的角度研究特定基因的功能及RNA的剪切、加工和转录、翻译调控等具有重要的理论意义,而且也为建立和开发作用于基因水平上高度特异性病原体检测、抗病毒、抗肿瘤方法和药物开辟了一条新、有着光明前景的道路[1~4]。

为观察人工合成的寡核苷酸对肝炎病毒核酸的特异结合效应,以便进一步研究肝炎病毒的特异检测和特异抑制方法,我们根据病毒核酸的结构特点,按照反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotid, ASON)和三螺旋结构寡核苷酸(Triple helix forming oligonucleotid, TFO)的设计原理,分别针对人甲肝病毒(HAV)-RNA的5′非编码区设计了一20 bp的ASON,针对鸭乙肝病毒(DHBV)-DNA X/C区设计了一20 bp的TFO,并观察了在模拟生理条件下,不同寡核苷酸作用剂量和不同作用时间下,合成寡核苷酸与目标序列的结合效应。

1 材料和方法

1.1 实验所用核苷酸序列的设计及准备

检索Gene bank中的HAV和DHBV基因全序列,按照ASON和TFO的设计原理[5,6,7],以人甲肝病毒(HM-175)-RNA的5′非编码区441~480 nt~40 bp区段为结合目标区,设计了-20 bp的ASON;以DHBV-DNA X/C区中201~240 nt-40 bp多嘌呤区段为结合目标区,设计与之对应的一20 bp TFO序列。40 bp目标核酸序列、20 bp ASON和TFO核酸序列的合成(PEGE纯化)由北京赛百盛生物技术有限公司完成。同时合成的还有非目标随机序列(Foligo):5′-caagggtggcagaattgcaa-3′。

HAV-RNA目标序列:5′-gagatgcttggataggtaacagcggcggatattggt-ga-3′;ASON:3′-aacctatcccattgtcgccg-5′

DHBV-DNA目标序列:5′-aatccaggtggctcagggaggcagaaaaacaact-acgggt-3′和3′-ttaggtccaccgagtccctccgtctttttgttgatgcccca-5′

TFO:5′-gagggagggagaaaaagaag-3′

1.2 特异结合反应

1.2.1 ASON的特异结合效应观察 将针对HAV合成的目标单链片段与ASON按照1∶50的比例(7.00 pmol∶0.35 nmol)加入22(1结合缓冲反应液(20 mmol Tris, 20 mmol HEPES, 10 mmol $MgCl_2$, pH 7.2~7.6)中,充分混匀,在37 ℃下孵育3~4 h,取反应液20μl进行20% PAGE电泳(40 V,4~5 h),按照常规Southern杂交技术[8],将凝胶作硝酸纤维膜(NF膜)的转膜处理(毛细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870693);全军"九五"科技课题基金资助项目(98M096)
作者简介:王思雄(1973—),男,四川省泸州市人,硕士,助教,主要从事消毒学和分子流行病学方面的研究。电话:(023)68752286
收稿日期:2001-11-17;修回日期:2002-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

管转膜法), 将 NF 膜进行变性, 预杂交, 杂交, BCIP/NBT 染色, 观察阳性染色带, 判断 ASON 与目标片段的结合情况。试验所用探针为与 ASON 互补序列(5′-ttggatagggtaacagcggc-3′), 由北京赛百盛生物技术有限公司合成(PEGE 纯化)。探针标记及显色方法按 Boehringer Mannheim 公司提供的地高辛随机标记试剂盒内说明书进行。对照样本以随机序列代替 ASON, 其它反应条件和处理方法与试验样本完全相同。为观察 ASON 的剂量与反应时间的影响作用, 在以上反应和处理的条件下分别调整 ASON 的加入剂量(0.175 nmol, 0.35 nmol, 0.7 nmol)和反应作用时间(30、60、120、180、240 min), 观察结合的强度变化。

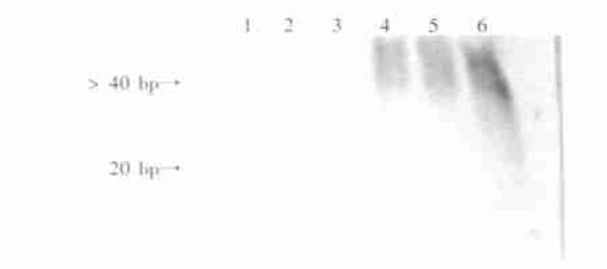
1.2.2　TFO 的特异结合效应观察　　将对 DHBV 合成的目标双链片段与 TFO 按照 1∶200 的比例(7 pmol∶1.4 nmol)加入 22 μl 标准结合反应缓冲液中, 结合反应的观察同 1.2.1。试验所用探针为与 TFO 互补的 20 bp 寡核苷酸(5′-cttcttttctcccctcccctc-3′)。

为观察 TFO 的剂量与反应时间的影响作用, 在以上反应和处理的条件下分别调整 TFO 的加入剂量(0.35 nmol, 0.70 nmol, 1.40 nmol, 2.80 nmol, 5.60 nmol)和反应作用时间(60、120、180、240 min), 观察结合的强度变化。

2　结果

2.1　ASON 和 TFO 对目标序列的特异结合作用

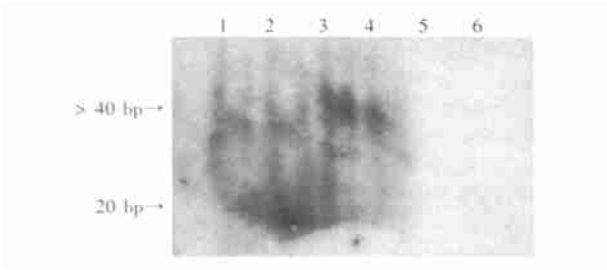
通过设定的反应条件后, 从电泳转移印迹图可见, 在近 40 bp 处, 加入 ASON 和 TFO 的反应样品有明显的标记印迹带, 而加入随机序列的对照样品在该处无明显的阳性印迹, 说明人工合成的 ASON 和 TFO 分别能与 DHBV 和 HAV 的目标核酸片段发生特异性的结合, 图 1, 2。



1: DNA marker; 2, 3: Random sequences; 4—6: TFO samples

图 1　TFO 结合样本的 8% PAGE 电泳转移杂交印迹

Fig 1　Electrophorosis of TFO binding sample on 8% polyacrylamide gel



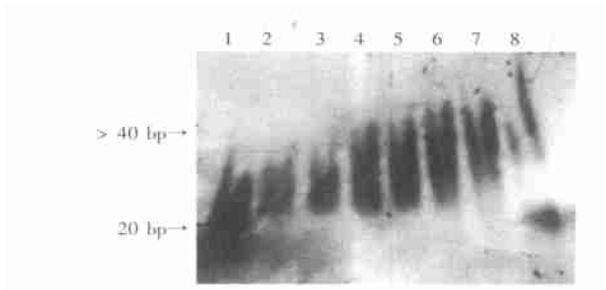
1—4: ASON samples; 5—6 Random sequences

图 2　ASON 结合样本的 20 % PAGE 电泳转移杂交印迹

Fig 2　Electrophorosis of ASON binding sample on 20% polyacrylamide gel

2.2　ASON 和 TFO 的作用剂量对特异结合反应的影响

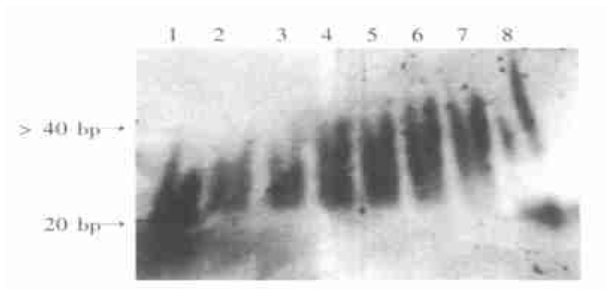
从电泳转移印迹图, 见图 3, 图 4。当目标序列与 ASON 的比例为 1∶25～50 时, 特异结合产物浓度最高, 继续增加 ASON 比例增加至 1∶100 后, 结合产物无明显的增加; 而 TFO 的结合反应与之不尽相同, 随着 TFO 含量的增加, 三聚体产物显著增加。在目标基因序列与 TFO 的比例为 1∶600 时三聚体含量最高。但当比例进一步增加时三聚体产物增加不明显。



1: DNA marker; 2—8: Ratios of TFO to the target sequence from DHBV—DNA are 0, 50, 100, 200, 400, 600, and 800 to 1 respectively

图 3　不同剂量 TFO 结合样本的 8 % PAGE 电泳转移杂交印迹

Fig 3　Electrophorosis of TFO binding samples from different doses of TFO on 8% polyacrylamide gel



1—3: Ratios of ASON to HAV—RNA sequence are 25, 50, and 100 to 1 respectively

图 4　不同剂量 ASON 结合样本的 20 % PAGE 电泳转移杂交印迹

Fig 4　Electrophorosis of ASON binding products from different ratios of ASON on 20% polyacrylamide gel

2.3　不同作用时间对特异结合反应的影响

从电泳转移印迹图, 见图 5, 图 6。一定的作用时间对 ASON 和 TFO 的特异产物的形成是非常有利的。在恰当的寡核苷酸加入比例下, 60 min 的作用时间可产生大量 TFO 复合产物, 180～240 min 的作用时间可使 TFO 完全与目标结合; 180～240 min 的作用时间可使 ASON 产生大量的特异复合物。



1—4: For 60, 120, 180, and 240 min repectively

图 5　不同作用时间 TFO 结合样本的 10 % PAGE 电泳转移杂交印迹

Fig 5　Electrophorosis of TFO binding samples under different reaction times on 8% polyacrylamide gel

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



1—5: For 30, 60, 120, and 180 min repectively

图 6 不同作用时间 ASON 结合样本的 20% PAGE 电泳转移杂交印迹

Fig 6 Electrophorosis of ASON binding samples under different reaction times on 20% polyacrylamide gel

3 讨论

HAV 为单链、正链 RNA 病毒，7478 bp，由 5′非编码区、编码区和 3′非编码区组成。5′非编码区(1～733 nt)虽然不编码蛋白质，但其序列是病毒蛋白质合成时核糖体的进入位点，与蛋白质合成有明显的关系，而且，其序列较为保守，是制作探针，进行核酸杂交快速诊断 HAV 的设计区段。

DHBV 是 HBV 的替代实验病毒，近年来被国内外研究者广泛用于抗 HBV 的研究[9,10]。DHBV-DNA X/C 基因区与 DHBV 的转录、复制以及病毒颗粒的成熟密切相关，设计与之直接结合的 TFO 对探讨利用反义基因技术抑制 HBV 的方法以及进一步研究基因定位突变，以达到彻底破坏病毒核酸结构有着重要意义。

基因的诊断和治疗技术的水平与很多因素有关，设计位点、寡核苷酸长度、介入组织和细胞的方法、反应环境、作用剂量、作用时间等均显著影响特异结合效应，因此研究相关的影响因素，了解相关反应的规律，以指导和设计进一步的实验技术和方法是非常必要的。虽然人工模拟的病毒目标基因及其与 ASON 和 TFO 的特异结合反应与组织和细胞中病毒基因的相关反应还存在一定的距离，但人工模拟基因及其反应试验相对简便、快速，受到的影响因素少，容易帮助研究者了解和掌握试验的基本信息和条件，是研究者进行反义基因技术的必经之“途径”。而且，人工模拟基因及其反应试验可直接指导一些基因检测技术。

ASON 与 TFO 与目标结合的方式完全不同，ASON 的设计相对较为简单，可针对人为的任何目标序列进行设计，ASON 与目标链的结合是以 Watson-Crick 氢键，按照碱基互补的原则进行结合，形成双股螺旋结构；TFO 的设计也很简单，但其设计的位置受到一定的限制，一般要求设计位置在有多嘧啶或多嘌呤的“串”状序列结构部位。TFO 与目标序列(双链)的结合是以 Hoogsteen 氢键进行结合的，不一定按照碱基互补的原则，其复合物为三股螺旋结构。本实验的观察发现，在单纯的核酸悬液缓冲液中，特异结合反应的作用时间和作用剂量对 ASON 和 TFO 的影响是不尽一致的，虽然两者均需要 180～240 min 的作用时间才能够达到较为完全的结合，但当作用时间为 60 min 时，TFO 与目标序列已有大量的复合产物产生，而 ASON 的复合产物却很低；ASON 的化学反应剂量明显低于 TFO，在 25∶1 时即可与目标序列形成最佳的结合，而 TFO 要达到 600∶1 时才能达到最佳结合效应。这些结果可能有两种原因，其一，提示，在细胞外，在针对基因水平的结合方法中，由于结合方式的不同，使 TFO 的化学剂量要求高于 ASON，但结合反应时间短于 ASON。其二，本实验所设计的 TFO 和 ASON 序列分别针对的是两种病毒的目标序列，碱基结构不同，复合物的结合效应有可能不同。

本实验的目标序列为人工合成的片段，实验的结果不能直接阐明组织和细胞中 TFO 和 ASON 特异结合物及其反应效应，但对进行 HAV 和 DHBV 特异诊断和抑制的研究的深入进行有着重要的指导意义。

参考文献：

[1] Berger F, Gambhir S S. Recent advances in imaging endogenous or transferred gene expression utilizing radionuclide technologies in living subjects: applications to breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2001, 3(1): 28—35.

[2] Kusunoki A, Miyano-Kurosaki N, Kimura T, *et al*. Antisense phosphorothioate oligonucleotides targeted to the human chemokine receptor CXCR4 [J]. Nucleosides-Nucleotides-Nucleic-Acids, 2000, 19(10—12): 1 709—1 719.

[3] Hiratou T, Tsukahara S, Miyano-Kurosaki N, *et al*. Anti-HIV-1 activity by a triple-helix forming oligonucleotides targeted to polypurine tract on viral RNA[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2000, 19(10—12): 1 721—1 734.

[4] Winters T A. Gene targeted agents: new opportunities for rational drug development[J]. Curr Opin Mol Ther, 2000, 2(6): 670—681.

[5] 肖清华, 欧阳颗. 病毒性肝炎的基因治疗[J]. 国外医学: 流行病学传染病学分册, 1999, 26(1): 18—21.

[6] Giovannangeli C and Helene C. Progress in developments of triplex-based strategies[J]. Antisense Nucleic Acid Dev, 1997, 7(4): 413—421.

[7] 熊鸿燕. 三螺旋结构寡核苷酸的研究进展[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 2000, 22(4): 243—247.

[8] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯 主编. 金冬梅, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996. 474—672.

[9] 何丽芳, 吴祥甫, 陈常庆, 等. 反义寡脱氧核苷酸在鸭体内抑制鸭乙型肝炎病毒[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1998, 1(1): 1—4.

[10] Shead A, Vickery K, Pajkos A, *et al*. Effects of phyllanthus plant extracts on duck hepatitis B virus in vitro and *in vivo*[J]. Antiviral Research, 1992, 18: 127—131.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net