DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.028
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
312 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0312-03

剪切HCV RNA的HDV核酶的设计及活性测定

于乐成,顾长海,毛 青,李奇芬,王宇明,郭焕珍 (第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨丁型肝炎病毒(Hepatitis D virus, HDV)核酶用于抗丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)基因治疗的可能性。方法 以HDV基因组核酶的假结样结构为基础,优化其茎Ⅳ区,改建其底物结合区,获得3种针对HCV RNA的HDV核酶RzC_1、RzC_2和RzC_3。体外转录获取含HCV RNA 5′-非编码区(5′-noncoding region, 5′-NCR)及部分C区在内的底物RNA(HCV RNA 5′-NCR-C),并进行5′端放射性标记。在pH 7.5、37 ℃、Mg^{2+} 20 mmol/L和去离子甲酰胺2.5 mol/L等条件下,将核酶和底物按摩尔比100∶1混合,在不同的时间点观察剪切百分率。结果 RzC_1、RzC_2对底物的剪切百分率随时间延长而递增,90 min时分别达24.9%、20.3%;未观察到RzC_3有剪切活性。结论 经过结构优化的HDV基因组核酶在合适的位点能够剪切异源性RNA分子HCV RNA。

关键词:丁型肝炎病毒;核酶;基因组;丙型肝炎病毒;基因治疗
中图法分类号:R394—33;R345 文献标识码:A

Design and activity assessment of HDV ribozymes to trans-cleave HCV RNA

YU Yue-cheng, GU Chang-hai, MAO Qing, LI Qi-fen, WANG Yu-ming, GUO Huan-zhen (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the probability of using hepatitis D virus (HDV) ribozyme as a kind of anti-hepatitis-C-virus (HCV) gene therapy drugs. Methods The natural HDV genomic ribozyme's stem Ⅳ was optimized and its substrate-binding region reconstructed, thus three recombinant HCV-specific HDV genomic ribozymes RzC_1, RzC_2 and RzC_3 were obtained. HCV RNA 5′-noncoding region and 5′-fragment of C region (HCV RNA5′-NCR-C) were transcribed from plasmid pHCV-neo by T7 phage RNA polymerase *in vitro*, and radiolabelled at its 5′-end. The trans-cleaving reaction was performed by mixing the ribozymes and substrate at mol ratio 100∶1 under conditions as follows: 37℃, pH7.5, Mg^{2+} 20 mmol/L and deionized formamide 2.5 mol/L. Percentage of trans-cleaved products were calculated at different time points and used as the activity indicator of the three ribozymes. Results RzC_1, RzC_2 trans-cleaved more substrate when the time extended, and got to 24.9%, 20.3% after reacting for 90 minutes respectively; RzC_3 was not able to trans-cleave its substrate. Conclusion Recombinant HDV genomic ribozymes have the ability to trans-cleave HCV RNA, but the appropriate target sequence should be selected.

Key words: hepatitis D virus (HDV); ribozyme; hepatitis C virus (HCV); gene therapy

核酶是具有催化活性的RNA分子(Catalytic RNA),能通过碱基配对与底物特异结合并在特定的位点剪切底物RNA分子。大量的实验研究显示锤头状核酶(Hammerhead ribozyme)和发夹状核酶(Hairpin ribozyme)可用于剪切多种病毒RNA、恶性肿瘤相关基因的mRNA等[1,2]。但是,HDV核酶,一种假结样核酶(Pseudoknot ribozyme),是否具有抗病毒等活性,迄今研究鲜见[3,4]。HDV核酶包括基因组核酶(Genomic ribozyme, g.Rz)和抗基因组(即复制中间体)核酶(Antigenomic ribozyme, ag.Rz),本研究拟通过对g.Rz进行结构优化或改建,以探讨其对HCV RNA在分子水平是否具有剪切活性。

1 材料与方法

1.1 材料

核酶cDNA由上海Sangon生物工程公司合成。PCR试剂购自Promega公司,Klenow酶购自华美生物工程公司,琼脂糖凝胶电泳DNA纯化回收试剂盒、牛小肠碱性磷酸酶(CIP)、T4聚核苷酸激酶为Boehringer Mannheim公司产品,γ-^{32}P-ATP(37×10^4 Bq/μl)和X胶片分别购自北京亚辉公司和KODAK公司。质粒pHCV-neo由我所王小红博士后构建,含全长HCV 5′-NCR(341 nt)及包括翻译起始密码子在内的C区5′端部分cDNA序列(90 nt),测序分析已证实与毕胜利等[5]报道的中国人HCV 5′-NCR及C区5′端序列一致,其上游存在T7启动子序列。凝胶成像分析仪为Bia-Rad公司Gel Doc™ 2000型产品。

1.2 方法

1.2.1 底物的转录模板 由于pHCV-neo中HCV cDNA序列的尾端缺乏合适的常用限制性内切酶酶切位点,因此以PCR法制备底物转录模板。

1.2.1.1 PCR引物设计、扩增 上游引物为T7启动子序列:5′-TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3′;下游引物含HCV基因组第413~383 nt,其5′端设计*BamH*Ⅰ切点(便于将来克隆用):5′-GCGGGATCC CCG GAA CTT GAC GTC CTG-3′。采用常规三步PCR法进行扩增。

1.2.1.2 PCR产物纯化和末端处理 采用琼脂糖凝胶电泳DNA纯化回收试剂盒回收PCR产物,用Klenow酶削平PCR产物的3′突出端,操作均按说明书进行。最后常规酚(pH 8.0)/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)抽提,乙醇沉淀,适量无RNA酶水重溶。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600031)
作者简介:于乐成(1970—),男,江苏省姜堰市人,博士研究生,主治医师,主要从事病毒性肝炎发病机制及生物治疗方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754147
收稿日期:2000-07-05;修回日期:2001-02-06

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

1.2.2　核酶的设计　　采用我们先前设计的核酶 g. Rz55 的基本结构[6], 但其茎Ⅳ区改用核酶 TdS4(Xho)的对应结构[7]。剪切靶位符合如下基本要求: ①位于重要的功能区, 例如内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES)和翻译起始密码子; ②符合 HDV 基因组核酶对底物序列的要求, 即第 1 对碱基必须是 G·U 摆动配对; 剪切位点 5′ 端第一个碱基不能为 G, 最好是 U; 紧靠剪切位点 5′ 端避免有 2 个以上的 C 连续排列; ③与核酶结合的 7 nt 靶区域中, G 和 C 含量尽可能多; ④避开 HCV RNA 5′-NCR 中形成较长分子内碱基配对的区域。入选的 3 个靶位的序列及所在位置, 见表 1。

表 1　入选的靶位序列及所在位置

Tab 1　The target sequence and their number in HCV RNA 5′-NCR-C

Target sequence	Number of target sequence binding the ribozymes	Ribozyme
5′ …CGU↓GCAGCCU…3′	107~113 nt	RzC_1
5′ …GUU↓GGGUCGC…3′	268~274 nt	RzC_2
5′ …CAU↓GAGCACG…3′	345~351 nt	RzC_3

1.2.3　核酶转录模板的制备　　采用 PCR 法制备核酶转录模板。PCR 模板为先前在上海 Sangon 生物工程公司合成的 3 种核酶的双链 cDNA, 它们除底物结合区序列不同(分别与表 1 中的 3 组序列互补)外, 其余序列均相同。上游引物含 T7 启动子序列: 5′ TAATACGACTCACTATAGGGCGA TCTAGAGTCCCAGCCTCCTCGC TGGC 3′; 下游引物: 5′ CTCGGATCCGTCCCATTCGCCATTCCGAAGAATG TTGCCC 3′。PCR 扩增过程按常规进行。PCR 产物的纯化和末端处理同上。

1.2.4　体外转录　　各转录体系均为 20 μl, 含转录模板约 1.5 μg, rNTPs(贮存浓度各 25 mmol/L)6 μl, 5× 转录缓冲液 4 μl, T_7 RNA 聚合酶 2 μl(1 U/μl), 37 ℃× 4 h。转录模板的去除、转录产物的纯化、定量等按试剂盒说明书进行。

1.2.5　底物 RNA 的 5′ 端放射性标志　　先用 CIP 去除底物 RNA 5′ 端磷酸基, 继用 T_4 聚核苷酸激酶和 γ-^{32}P-ATP 对其进行 5′ 端放射性标志, 最后常规酚(pH 4.5)/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)抽提纯化, 测浓度, −20 ℃冰箱冻存备用。操作按产品说明书进行。

1.2.6　剪切反应及时效观察　　各设 15 μl 初始反应体系, 含放射性标志底物 50 nmol/L, 核酶 5 μmol/L, 酶与底物摩尔比 100∶1, Tris·HCl(pH 7.5)50 mmol/L, 去离子甲酰胺 1.5 μl(终浓度 2.5 mol/L), 依次经 95 ℃× 3 min→冰浴 10 min→37 ℃水浴 10 min→加入 $MgCl_2$ 至终浓度 20 mmol/L→37 ℃水浴→分别于 10、30、90 min 取出 5 μl 终止反应→8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(含 7 mol/L 尿素)→−70 ℃放射自显影 24 h(X 线片经 0.5 ms 预曝光处理)→在凝胶成像分析仪上测定各条带光密度值, 推算剪切百分率。

$$\text{剪切百分率}(\%)=\frac{\text{剪切产物 } D_\lambda}{\text{未剪切产物 } D_\lambda+\text{剪切产物 } D_\lambda}\times 100\%$$

2　结果

2.1　核酶和底物 RNA 的制备

2% 琼脂糖凝胶电泳证实成功制备 3 种 HDV 基因组核酶 RzC_1、RzC_2、RzC_3 和底物 HCV RNA 5′-NCR-C 的体外转录模板; 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳证实获得了核酶和底物 RNA(资料未展示)。

2.2　核酶对底物 RNA 剪切的时效性

根据设计, RzC_1 可将 HCV RNA 5′-NCR-C 剪切成 5′ 端 106 nt 和 3′ 端 324 nt 两个片段, RzC_2 可将 HCV RNA 5′-NCR-C 剪切成 5′ 端 267 nt 和 3′ 端 163 nt 两个片段, RzC_3 可将 HCV RNA 5′-NCR-C 剪切成 5′ 端 344 nt 和 3′ 端 86 nt 两个片段。实际结果表明, 在所设条件下 RzC_1、RzC_2 可以剪切其底物, 产物大小与预计相符, 剪切效果随时间的延长而升高, 见图 1、2; 在各时点均未观察到 RzC_3 对底物 RNA 有明显剪切活性(图片未展示)。

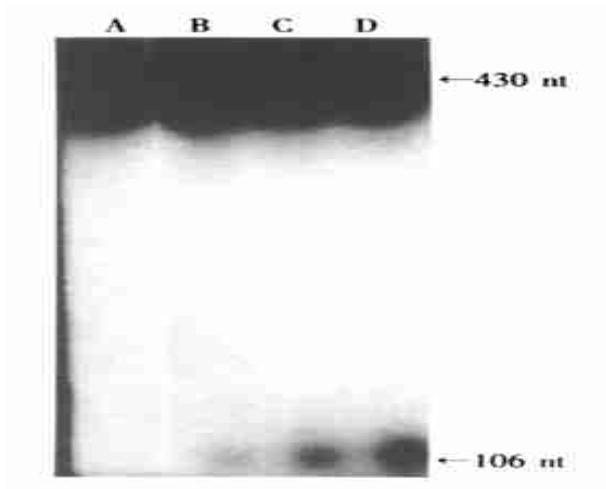


图 1　RzC_1 在不同时点对 HCV RNA 5′-NCR-C 的剪切结果

Fig 1　Results of HCV RNA 5′-NCR-C trans-cleaved by RzC_1 at different time points

A: HCV RNA 5′-NCR-C in the system without ribozymes; B, C, D: Results of HCV RNA 5′-NCR-C trans-cleaved by RzC_1 at 10, 30, 90 min time points respectively

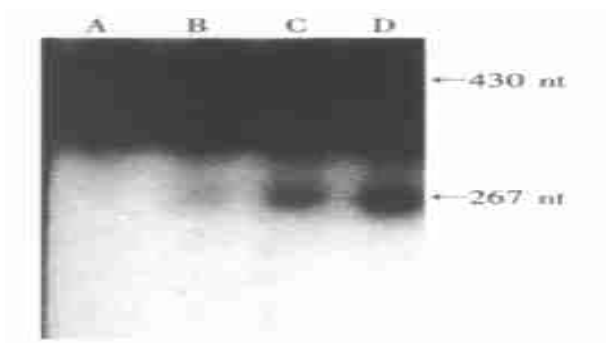


图 2　RzC_2 在不同时点对 HCV RNA 5′-NCR-C 的剪切结果

Fig 2　Results of HCV RNA 5′-NCR-C trans-cleaved by RzC_2 at different time points

A: HCV RNA 5′-NCR-C in the system without ribozymes; B, C, D: Results of HCV RNA 5′-NCR-C trans-cleaved by RzC_2 at 10, 30, 90 min time points respectively

2.3　核酶在各时点对底物 RNA 的剪切百分率

应用凝胶成像分析系统推算而得的 RzC_1、RzC_2 在各时点对底物 RNA 的剪切百分率, 见表 2。

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

表2 RzC_1、RzC_2 对 HCV RNA 5'-NCR-C 的剪切百分率(%)

Tab 2 Cleaving percentage of HCV RNA 5'-NCR-C by RzC_1, RzC_2

	10 min	30 min	90 min
RzC_1	6.1	14.0	24.9
RzC_2	4.6	11.7	20.3

3 讨论

关于 HDV 核酶,最初发现的是其自我剪切活性(Self-cleavage)或称顺式剪切活性(Cis-cleavage),是一种发生于同一分子内部的剪切反应(Intramolecular cleavage)。研究表明自然序列较短但仍能保持较高自我剪切活性的核酶是 g.Rz1/84 和 ag.Rz1/84(1 和 84 分别为自我剪切位点 5' 和 3' 端的碱基数),其假结样二级结构由茎Ⅰ-茎Ⅳ、3 个单链连接区($J_{1/2}$、$J_{1/4}$、$J_{2/4}$)和 2 个单链发夹环区(L_3、L_4)构成;茎Ⅲ、L_3、$J_{1/4}$、$J_{2/4}$可能共同构成活性中心,茎Ⅱ、茎Ⅳ主要起稳定核酶结构的作用,其中茎Ⅳ可适当缩短;茎Ⅰ区(底物结合区)的 G·U 摆动配对(Wobble pair)不宜改变,而其余 6 对 Watson-Crick 碱基配对的碱基组成和排列顺序可作一定的变动[3,4]。这是可以对其茎Ⅳ区进行优化、对底物结合区进行改建的分子基础。后来发现,HDV 核酶可对同源性底物 RNA 进行分子间剪切(Intermolecular cleavage),又称反式剪切(Trans-cleavage),相应的 HDV 核酶就称为反式 HDV 核酶[7~10];这是可应用 HDV 核酶来剪切异源性 RNA 分子的一个必备前提条件。

Roy 等[11] 于 1999 年报道茎Ⅳ和底物结合区经过改建的 ag.Rz 可在多个位点有效剪切编码 HDAg 的长约 814 nt 的 mRNA,对某些位点的剪切率可达到 79%。他们用寡核苷酸结合移位分析法和核酸酶 H 水解分析法等手段研究显示,HDV mRNA 上可被 ag.Rz 反式剪切的靶位序列可能是 5' …C/U ↓GN6 (N=A、U、C 或 G) …3';进一步研究表明符合 5' …R-4 R-3 R-2 Y-1 ↓G1 N2 N3(A/C/U)4 N5 N6 N7…3'(其中 R=A 或 G,Y=U 或 C)特征的位点最有可能被反式 ag.Rz 切开。这一研究结果对设计反式 g·Rz 也具有重要的参考意义。

本研究首次设计反式 HDV 基因组核酶 RzC_1、RzC_2 和 RzC_3 来剪切异源性 RNA 分子 HCV RNA,结果表明 RzC_1、RzC_2 对底物有剪切活性;在所设定的反应条件下,90min 时剪切百分率分别达 24.9% 和 20.3%。RzC_1 和 RzC_2 对底物的剪切活性偏低,RzC_3 则基本上未观察到剪切活性,可能原因有:①靶序列较长,所形成的特殊二级结构妨碍核酶活性发挥;② 靶位的选择仍有待优化;③在核酶和底物结合区有 A-U 或 U-A 配对与 C-G 或 G-C 配对杂合存在的情况下,若 A-U 或 U-A 配对紧邻 G·U 摆动配对时,核酶的活性可能不易发挥;④核酶两端的非载体序列对核酶活性的影响。适宜浓度的变性剂如去离子甲酰胺可减少底物二级结构的形成,从而可以在一定程度上提高核酶的剪切效率;Mg^{2+} 等二价金属阳离子可与核酶 RNA 带负电荷的磷酸戊糖骨架相互作用,有助于核酶折叠并可能参与催化剪切反应。

选择 IRES 和病毒翻译起始密码子作剪切靶位,主要是考虑到这些序列不仅是重要的功能区,而且在各 HCV 变异株均很保守[4,5],因而有可能对这些变异株均有剪切作用。由于 HDV 核酶是目前发现的唯一可于自然状态下存在于哺乳动物细胞特别是人肝细胞内的病毒核酶,其在细胞内的定位及活性发挥可能优于锤头状核酶或发夹状核酶[12];因此,在细胞水平进一步评价其剪切 HCV RNA 5'-NCR-C 的能力很有必要。

参考文献:

[1] Tanner N K. Ribozymes: The characteristics and properties of catalytic RNAs[J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 23(3): 257-275.

[2] 于乐成,顾长海,毛 青,等.核酶抗肝炎病毒研究现状[J].中华肝脏病杂志,1999,7(增刊):66-67.

[3] Been M D, Wickham G S. Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA[J]. Eur J Biochem, 1997, 247(3): 741-753.

[4] 于乐成,毛 青,顾长海,等.HDV 核酶研究近况[J].国外医学:分子生物学分册,2000,21(5):314-317.

[5] 毕胜利,白宪鹤,丛勉尔,等.中国人丙型肝炎病毒基因组一级结构及其变异[J].病毒学报,1993,9(2):114-127.

[6] 于乐成,顾长海,毛 青,等.丁型肝炎病毒基因组核酶的反式剪切活性[J].第三军医大学学报,2000,22(4):315-316.

[7] Fauzi H, Kawakami J, Nishikawa F, *et al*. Analysis of the cleavage reaction of a trans-acting human hepatitis delta virus ribozyme[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(15): 3 124-3 130.

[8] Kawakami J, Yuda K, Suh Y A, *et al*. Constructing an efficient trans-acting genomic HDV ribozyme[J]. FEBS Lett, 1996, 394(2): 132.

[9] Nishikawa F, Roy M, Fauzi H, *et al*. Detailed analysis of stem I and its 5' and 3' neighbor regions in the trans-acting HDV ribozyme[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(2): 403-441.

[10] Perrotta A T, Been M D. Cleavage of oligoribonucleotides by a ribozyme derived from the hepatitis delta virus RNA sequence[J]. Biochemistry, 1992, 31(1): 16-21.

[11] Roy G, Ananvoranich S, Perreault J P. Delta ribozymes has the ability to cleave in transan mRNA[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(4): 942-948.

(编辑 王 红)

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