DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.008

论著

文章编号:1000-5404(2000)03-0220-04

能与HBV-DNA C启动子结合成三链结构的寡核苷酸的设计与筛选

光丽霞[1],李为明[1],顾长海[2],袁发焕[3],陈国致[2],奚 敏[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院小儿科,重庆 400037;[2]附属西南医院感染病科、全军传染病专科中心,重庆 400038;[3]附属新桥医院肾内科,重庆 400037)

提 要 目的:筛选出能与HBV-DNA C启动子形成三链结构的高亲和力寡核苷酸。方法:以体外合成的^{32}P标记的HBV-DNA C启动子区序列(1 734~1 754)为靶序列,合成5种有可能与该靶序列形成三链结构的寡核苷酸链(TFO),同时设计对照靶序列和对照TFO,用凝胶滞留试验、酶足迹试验等方法对比分析这些TFO与靶序列是否形成三链结构及其结合的亲和性、特异性。结果:在37℃、pH7.4条件下,CT-TFO和GT-TFOp与^{32}P-靶序列DNA结合的亲和力十分微弱,其Kd均>10^{-6}mol/L;GT-TFOap和AG-TFOs与靶序列DNA结合的亲和力较高,Kd分别为5×10^{-7}mol/L和2.5×10^{-8}mol/L;AG-TFO1与靶序列结合的亲和力最高,Kd为3×10^{-9}mol/L,而且两者的结合具有序列特异性。结论:含AG或GT的TFO可与HBV C启动子区类同聚嘌呤链逆平行方向结合成三链DNA,其中AG-TFO1与靶序列结合的亲和力最高,反应完全,可使靶双链DNA均转变成三链DNA,经一定修饰后,可试用于HBV基因转录抑制实验。

关键词 乙型肝炎病毒;三链DNA;寡核苷酸;启动子
中图法分类号 R373.21;R394 文献标识码 A

Design and screening of oligo-nucleotides forming triplex through binding with homopurine in HBV-DNA core promoter

GUANG Li-xia, LI Wei-min, GU Chang-hai, YUAN Fa-huan, CHEN Guo-zhi, XI Min (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract **Objective**: To find oligodeoxyribonucleotides that can bind with HBV core promoter target site with high affinity and specificity. **Methods**: Similar homopurine domain (1 734~1 754) in HBV core promoter was chosen as the target sequence. Several corresponding oligodeoxyribonucleotides were synthesized. The binding affinity and specificity of the nucleotides were tested by electrophoretic mobility shift and DNase 1 footprinting assay. **Results**: At 37℃ and pH7.4, CT-TFO and GT-TFOp could not bind with the target sequence with Kd values>10^{-6} mol/L. GT-TFOap and AG-TFOs could bind with the target sequence with Kd values of 5×10^{-7} mol/L and 2.5×10^{-8} mol/L respectively. AG-TFO1 had the highest affinity among the 5 kinds of oligodexyribonucleotides with a Kd value of 3×10^{-9} mol/L in a sequence-dependent manner. **Conclusion**: TFO containing AG or GT can bind with antiparallel homopurine in HBV core promoter to form triple helix. AG-TFO1 might be the best candidate among all the oligodeoxyribonucleotides designed in this study to inhibit HBV gene transcription.

Key words hepatitis B virus; triplex DNA; oligonucleotide; promotor

某些寡核苷酸不仅能与其互补的单链核酸结合成双链结构,还能与双链核酸中含丰富嘌呤碱基的区域(同聚嘌呤区),以序列特异方式结合成三链结构。这种能形成三链结构的寡核苷酸(Triple helix-forming oligonucleotide, TFO)通过Hoogsteen或逆Hoogsteen氢键与双链靶DNA同聚嘌呤区相互作用,缠绕于DNA的深沟内,并可阻止靶DNA与核酸聚合酶、转录因子等蛋白结合,抑制靶基因复制和表达[1]。TFO使人工调控特定基因表达成为可能,为难治性DNA病毒感染的治疗展示了一个新的方向。鉴于目前尚无根治乙型肝炎病毒感染的理想药物,本实验设计多种理论上有可能与HBV-DNA C启动子区序列形成三链结构的TFO,观察其与HBV-DNA C启动子区序列结合的亲和性、特异性、筛选最佳TFO,为进一步的HBV基因转录抑制实验奠定基础,探索治疗HBV感染的新方法。

1 材料与方法

1.1 寡核苷酸的合成

在Gibco BRL公司以亚磷酰胺三脂固相法合成图1所示的脱氧寡核苷酸,经C-18反相柱、聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800128)

作者简介:光丽霞(1956.4),女,湖北省丐阳市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事乙肝防治方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68755023

收稿日期:1999-07-06;修回日期:1999-12-22

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

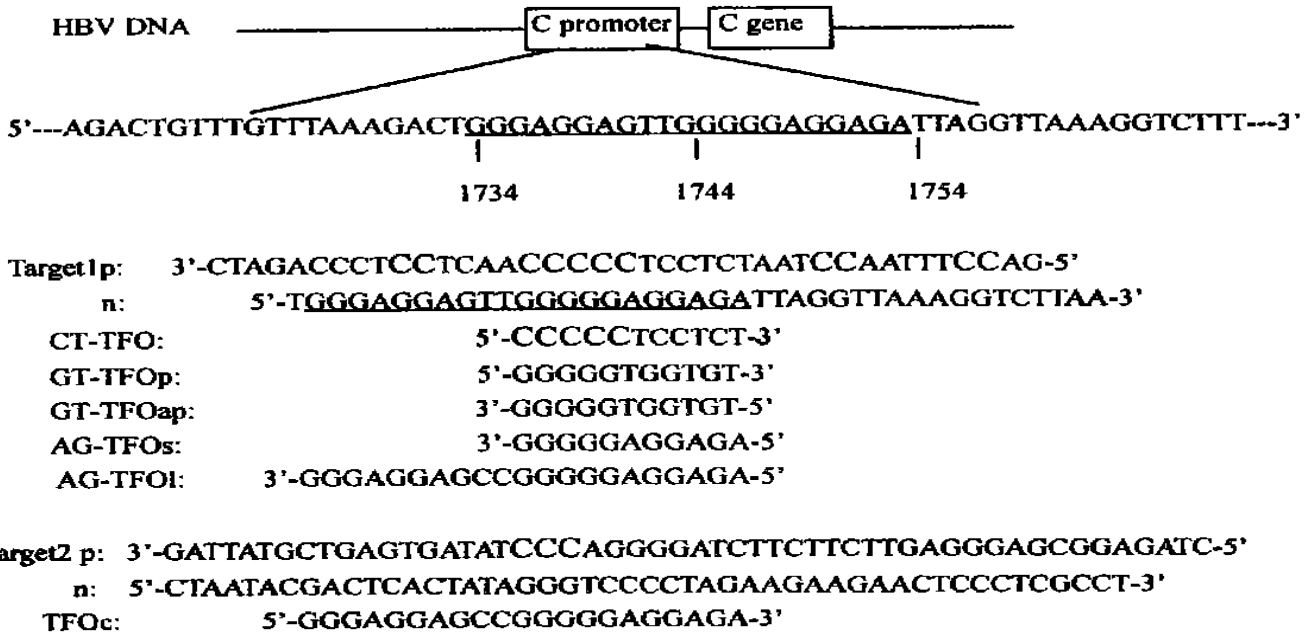


图 1　靶序列和寡聚核苷酸序列

Fig 1　The sequence of targets and TFOs

1.2　靶 DNA 片段的标记和纯化

分别取两对上述合成的互补寡核苷酸(Target1 和 Target2)的正链和副链各 500 pmol, 混合, 加 5 mol/L NaCl 4 μl、无菌超纯水 84 μl, 75°C 水浴 12 min, 逐渐冷至 25°C, 使互补的寡核苷酸杂交成双链靶 DNA, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测证实杂交完全。然后以 3′末端填充法标记靶 DNA: 取靶 DNA 40 pmol, 加 20 μCi[α-^{32}P] dCTP(~3 000 Ci/mmol), 10 mmol/L dATP、dGTP、dTTP 各 1 μl, 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I klenow 片段 10 U, 补充无菌超纯水使反应总体积达 20 μl, 30°C 温育 30 min, 加 0.5 mol/L EDTA 1 μl 终止反应, 然后以 Sephadex G-50 柱层析纯化标记的靶 DNA 片段, 并以荧光分光光度法测标记靶 DNA 浓度, 用 FH 液体闪烁计数器测其放射活性, 估算靶 DNA 放射比活性。

1.3　三链 DNA 形成及凝胶滞留试验

^{32}P 标记靶 DNA 片段 1 pmol(1 300 cpm)与不同终浓度的各种 TFO 混合于三链 DNA 结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 10 mmol/L $MgCl_2$, 10%蔗糖)中, 反应总体积 10 μl, 37°C 水浴过夜。结合反应产物点样于 15%聚丙酰胺凝胶(丙烯酰胺:亚甲双丙烯酰胺= 19∶1)上, 用 TEM_{10} 电泳缓冲液(89 mmol/L Tris-硼酸 pH8, 10 mmol/L $MgCl_2$), 在 4°C 环境中电泳(9 V/cm)过夜。然后进行凝胶放射自显影, 并用薄层扫描仪测 X 线显影带的光密度。

1.4　三链 DNA 解离常数的计算

参照文献[2], 按下列公式计算三链 DNA 解离常数(Kd):

$$K\mathrm{d}=\frac{[\text{duplex}]\,[\text{TFO}]}{[\text{triplex}]}$$

式中 triplex 为三链 DNA, duplex 为双链 DNA, [ ] 表示终浓度, 当寡核苷酸与靶序列结合, 反应体系中[triplex] = [duplex]时(即薄层扫描显示 X 线片中三链 DNA 与双链 DNA 条带的光密度值相等), Kd = [TFO], 由于反应体系中[TFO] >> [triplex], 反应平衡后的 TFO 的终浓度的近似于其反应初浓度, 故 Kd 值约等于反应体系中所加入的 TFO 浓度。

参照 Olivas 的方法[3], 以本实验体系最好的 TFO 为参考基准, 计算各 TFO 与靶序列结合的相对亲和力(Relative affinity):

$$\text{Relative affinity}=\frac{K\mathrm{d.\ best\ TFO}}{K\mathrm{d\ exp\ TFO}}$$

式中 Kd best TFO 为本实验体系中筛选出的最好的 TFO 与靶序列杂交形成的三链 DNA 的解离常数, Kd exp TFO 为本实验所测各 TFO 与靶序列杂交形成的三链 DNA 的解离常数。

1.5　酶足迹试验

三链 DNA 结合反应方法同凝胶滞留试验, 取结合反应产物 8 μl, 加 DNase 1(终浓度 15 U/ml)、消化 1 min, 加 98%去离子甲酰胺— 10 mol/L EDTA-0.25%二甲苯青 FF 液 5 μl 终止反应, 90°C 水浴变性 5 min, 点样于 12%变性聚丙酰胺凝胶上, 以 1 800 V 恒电压, 电泳 2 h, 抽干凝胶, 进行放射自显影。同时按快速 Maxam-Gilbort 测序法测靶 DNA 的 A+G 序列。

2　结果

2.1　靶序列的选择与寡核苷酸的设计

本研究寡核苷酸设计满足以下两个条件: ① 位于基因调控区(HBV C 启动子); ② TFO 的靶序列类似于同聚嘌呤序列(1734~1754)。

设计 TFO 时我们注意到了碱基配对方式对碱基三联体稳定性的影响, 为避免非典型三联体形成, 我们针对纯同聚嘌呤区(1 744~1 754), 以碱基配对标准方式, 合成了 4 条 11 nt 寡核苷酸; 为了考察增加 TFO 长度对三链 DNA 形成的影响, 还合成了 1 条 21 nt 寡核苷酸, 为排除 TFO 与双链 DNA 非特异性结合的可能性, 同时合成无关靶序列 2 和 TFOc 作为对照,

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

见图1。

2.2 TFO与靶序列结合情况及亲和力

在37℃、pH7.4环境中，分别将5种TFO以渐增浓度(0，5×10^{-11}，2.5×10^{-10}，5×10^{-10}，2.5×10^{-9}，5×10^{-9}，2.5×10^{-8}，5×10^{-8}，2.5×10^{-7}，5×10^{-7}，2.5×10^{-6}，5×10^{-6} mol/L)与1 pmol ^{32}P标记靶序列(target1)杂交，用聚丙酰胺凝胶电泳分离，然后进行放射自显影。结果：①CT-TFO、GT-TFOp在本实验所设计的浓度范围内均不能与靶序列结合{只见双链靶DNA带(duplex)，无三链DNA带出现}；②GT-TFOap达5×10^{-8}、AG-TFOs在2.5×10^{-9}、AG-TFO1达2.5×10^{-9} mol/L以上时，即能与^{32}P-靶DNA结合{在双链靶DNA带后方，出现三链DNA带(triplex)}；③当GT-TFOap和AG-TFOs浓度达最高值时，三链DNA带前方仍然存在双链DNA带；④当AG-TFO1浓度达2.5×10^{-8} mol/L时，双链DNA带消失，只有三链DNA带存在，见图2。



图2 凝胶滞留试验结果

1道：对照^{32}P-靶序列2，无TFO；2道：对照^{32}P-靶序列2与5×10^{-6} mol/L的AG-TFO1杂交；3道：^{32}P-靶序列1与TFOc杂交；4道：^{32}P-靶序列1，无TFO；5～11道：^{32}P-靶序列1与渐增浓度(5×10^{-11}，2.5×10^{-10}，5×10^{-10}，2.5×10^{-9}，5×10^{-9}，2.5×10^{8}，5×10^{8} mol/L)的AG-TFO1杂交

Fig 2 The results of gel mobillty shift assay

Lane 1: ^{32}P-labeled target 2(1pmol) without TFO. Lane 2: ^{32}P-labeled target 2(1pmol) were hybridized with AG-TFO1(5×10^{-6} mol/L). Lane 3: ^{32}P-labeled target 1(1pmol) were hybridized with TFOc. Lane 4: ^{32}P-labeled target 1 (1pmol) without TFO. Lane 5～11: ^{32}P-labeled target 1 (1pmol) were hybridized with increasing molar concentration (5×10^{-11}, 2.5×10^{-10}, 5×10^{-10}, 2.5×10^{-9}, 5×10^{-9}, 2.5×10^{-8}, 5×10^{-8} mol/L) AG-TFO1

用薄层扫描仪分析X线片显影带的光密度，按前述方法计算出各TFO与靶序列形成三链DNA的解离常数及相对亲和力，见表1。结果显示，在37℃、pH7.4条件下，CT-TFO、GT-TFOp与^{32}P-靶DNA结合的亲和力十分微弱，其*K*d均>>10^{-6}mol/L，即使寡核苷酸浓度高达10^{-6}mol/L，仍不能与靶序列结合成三链DNA。在相同条件下，GT-TFOap、AG-TFOs与靶序列结合的亲和力较高；*K*d分别为5×10^{-7}mol/L，2.5×10^{-8}mol/L。四条短寡核苷酸中AG-TFOs的*K*d值最低，提示其与靶序列结合的亲和力相对较高。与短AG寡核苷酸相比，21 ntAG寡核苷酸与靶序列结合的亲和力更高，*K*d为3×10^{-9} mol/L。

表1 三链DNA解离常数值和TFO与靶序列的相对亲和力

Tab 1 Triplex *K*d values and relative affinity

TFO	*K*d(mol/L)	Relative affinity
CT-TFO	>>5×10^{-6}	<<0.0006
GT-TFOp	>>5×10^{-6}	<<0.0006
GT-TFOap	5×10^{-7}	0.006
AG-TFOs	2.5×10^{-8}	0.12
AG-TFO1	3×10^{-9}	1

2.3 TFO与靶序列结合的特异性

凝胶留滞试验结果显示(见图2)，对照寡核苷酸不能与靶序列(target1)杂交成三链DNA(lane 3)；5×10^{-6}mol/L AG-TFO1也不能与对照靶序列(target 2)杂交成三链DNA(lane 2)。对AG-TFO1与靶序列形成的三链DNA作酶足迹试验，经DNA酶切后电泳，放射显影结果显示见图3。在靶序列纯同聚嘌呤区，随着AG-TFO1浓度增高，逐渐形成一清晰的足迹(无DNA条带)，但在三链DNA中部的两个非典型碱基三联体处仍可见DNA条带；对照寡核苷酸则无足迹效应(有DNA条带)。

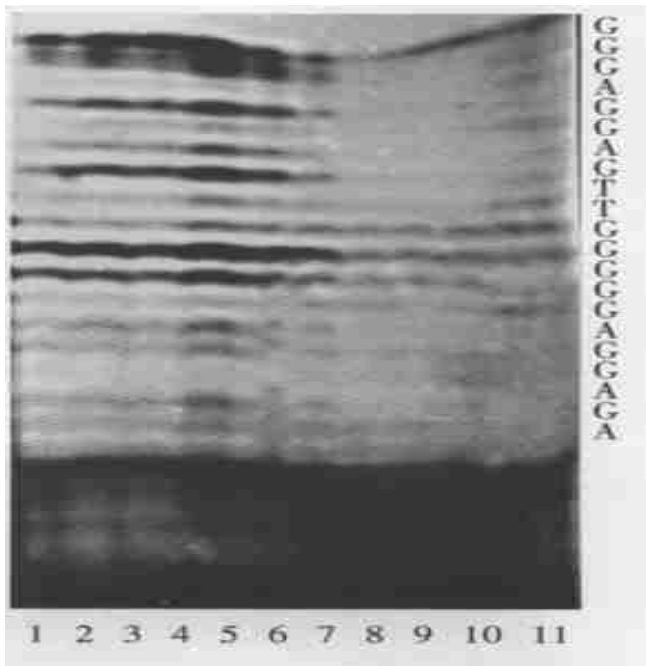


图3 酶足迹试验结果

1道：^{32}P-靶序列1与对照TFOc杂交；2道：^{32}P-靶序列1，无TFO；3～9道：^{32}P-靶序列1与渐增浓度(5×10^{-11}，2.5×10^{-10}，5×10^{-10}，2.5×10^{-9}，5×10^{-9}，2.5×10^{-8}，5×10^{-8} mol/L)的AG-TFO1杂交；10、11道：^{32}P-靶序列1的A+G序列

Fig 3 The results of DNase 1 footprinting analysis

Lane 1: ^{32}P-labeled larget 1 (1pmole) were hybridized with TFOc Lane2: ^{32}P-labeled target 1(1pmole) without TFO. Lane 3～9: ^{32}P-labeled target 1(1 pmole) were hybridized with increasing molar concentration (5×10^{-11}, 2.5×10^{-10}, 5×10^{-10}, 2.5×10^{-9}, 5×10^{-9}, 2.5×10^{-8}, 5×10^{-8} mol/L) AG-TFO1 Lane 10 and 11: A+G sequence of ^{32}P-labeled target 1

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

3 讨论

HBV C 启动子负责调控前基因组 RNA 和前 C mRNA 的转录, 而前基因组 RNA 不仅是翻译 HBV 核壳蛋白, HBV-DNA 多聚酶的信息 RNA, 也是逆转录复制 HBV 的模板, 阻断该区可阻止 HBV-DNA 的转录和复制, 故我们选择此区类似同聚嘌呤序列(1 734 ~1 745)为靶位点。

本实验合成的寡核苷酸分为二类, 嘧啶型寡核苷酸(CT-TFO)和嘌呤型寡核苷酸(AG-TFO 和 GT-TFO)。理论上, 嘧啶型寡核苷酸能与靶序列嘌呤链中的嘌呤间形成 Hoogsteen 氢键而形成三链 DNA; 但本实验结果表明, 在生理温度和 pH 范围内, CT-TFO 不能与靶序列结合, 可能与本实验的 pH 值高于该类寡核苷酸所要求的酸性环境有关[5], 说明未经改造或修饰的 CT-TFO 不适用于生理条件下的 HBV 转录抑制实验。本实验两条 GT-TFO (GT-TFOp, GT-TFOap) 所含碱基数目和碱基排列顺序完全相同, 但方向相反, GT-TFOp 与靶链的方向平行, GT-TFOap 与靶链的方向逆平行; 理论上, 含 GT 的 TFO 能通过 Hoogsteen 或逆 Hoogsteen 氢键平行或逆平行地与靶序列嘌呤链结合; 但本实验结果显示, GT-TFOap 能与靶序列结合, 而 GT-TFOp 则否, 可能与这两条 GT-TFO 含成串的 G 有关, 因含成串 G 的 TFO 易与靶序列同聚嘌呤链逆平行方向结合[1]。本研究表明, AG-TFOs 亦可与靶序列结合。比较 AG-TFOs 和 GT-TFOap 这两条 11 nt 寡核苷酸与靶序列的亲和力, AG-TFOs 高于 GT-TFOap, 说明在四种短 TFO 中, 以 AG-TFOs 最好。

在从 4 条 11 nt 寡核苷酸中筛选出最好的 AG-TFOs 的基础上, 我们进一步延长 AG-TFOs 长度至 21 nt, 以探讨 TFO 长度对 TFO 与靶序列结合的亲和力和特异性的影响, 结果表明 21 nt AG-TFO 与靶序列结合的亲和力相当于 11 ng AG-TFOs 的 8.3 倍, 提示在一定范围内, 增加 TFO 链长度, 有助于提高 TFO 与靶序列结合的亲和力。

对 AG-TFO1 与靶序列形成的三链 DNA 作酶足迹试验结果显示, 在纯同聚嘌呤区有清晰的足迹(无 DNA 条带), 说明此段三链 DNA 中的典型碱基三联体结合牢固, 从而保护靶链, 不为 DNA 酶所切开; 但在靶序列中部的两个胸腺嘧啶处, 却无足迹形成(有 DNA 条带), 说明此处的非典型碱基三联体($C^{*}TA$)结合松散, 对 DNA 酶抵抗力弱, 不能保护靶链, 尽管我们选择了在非典型碱基三联体中最稳定的胞嘧啶与胸腺嘧啶的配对方式[4]。提示在设计 TFO 时, 应权衡增加 TFO 长度的利弊, 所选靶序列中嘧啶碱基的量越多, 三链 DNA 的稳定性将越差。

本研究凝胶留滞试验结果显示, 对照寡核苷酸不能与靶序列杂交成三链 DNA, 高浓度 AG-TFO1 也不能与对照靶序列杂交成三链 DNA; 酶足迹试验结果显示对照寡核苷酸无足迹效应。说明 AG-TFO1 与靶序列 DNA 结合成三链 DAN 具有高度的特异性。

本实验中, 我们还观察到 11 nt AG-TFOs 和 11 nt GT-TFOα 的浓度达最高值时, 反应体系中仍有双链 DNA 存在, 可能是因为这两种寡核苷酸中的 G 易形成自身相关结构, 如 G 四聚体、二聚体等, 降低了 TFO 与靶序列结合的有效浓度所致[5]。21 nt AG-TFO 与靶序列结合较完全, 当反应体系中 TFO 浓度达一定值时, 双链 DAN 几乎均转变成三链 DNA。21 nt AG-TFO 同样含丰富的鸟嘌呤, 为什么能与靶序列结合完全, 其机制有待深究。

本实验证实, 含 AG 或 GT 的 TFO 可与 HBV C 启动子区类同聚嘌呤链逆平行方向结合成三链 DNA, 其中 21 nt AG-TFO 与靶序列结合的亲和力最高, 反应完全, 可使双链靶 DNA 均转变成三链 DNA, 且具有高度特异性, 经一定修饰后, 可试用于 HBV 基因转录抑制实验。

参考文献

[1] Radhakrishnan I, Patel J. DNA triplex: solution structures, hydration sites, energetics, interactions, and function[J]. Biochemistry, 1994, 33(38): 11 405－11 416.

[2] Rando R F, Paolis L D, Durland R H, *et al*. Inhibition of T7 and T3 RNA polymerase directed transcription elongation in vitro[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(4): 678－685.

[3] Olivas W M, Maher L J. Overcoming potassium-mediated triplex inhibition[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(11): 1 936－1 941.

[4] Chandler S P, Fox K R Specificity of antiparallel DNA triple helix formation[J]. Biochemistry, 1996, 35(47): 15 038－15 048.

[5] Faruqi A F, Krawczyk S H, Matteucci M D, *et al*. Potassium-resistant triple helix formation and improved intracellular gene targeting by oligodeoxyribonucleotides containing 7-deazaxan- thine[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(3): 633－640.

(编辑　王　红)

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