DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.001

文章编号:1000-5404(2000)04-0305-02

论著

丁型肝炎病毒基因组核酶的反式剪切活性

于乐成,顾长海,毛 青,李奇芬,王宇明 (第三军医大学附属西南医院感染病科、全军传染病专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察丁型肝炎病毒2种基因组核酶(HDV genomic ribozyme,g.Rz)是否存在反式剪切活性。方法 合成g.Rz74和g.Rz55的cDNA,克隆入质粒pGEM-4Z,体外转录获取核酶RNA;同时从质粒pRz277B上转录出同源性底物RNA,以α-32p-UTP标志;再将核酶与底物按比例混合,在一定条件下观察是否出现剪切作用。结果 启动反应30 min后,可以观察到剪切产物,90 min后剪切反应更加明显。结论 g.Rz74和g.Rz55均具有反式剪切活性。

关键词:丁型肝炎病毒核酶;反式剪切;基因组;体外转录
中图法分类号:R373.21;R394.2 文献标识码:A

Study of the trans-cleaving activity of hepatitis delta virus genomic ribozyme

YU Yue-cheng, GU Chang-hai, MAO Qing, LI Qi-fen, WANG Yu-ming (Clinical Center of Infectious Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the trans-cleaving activity of 2 genomic ribozymes (g.Rz) of hepatitis delta virus (HDV). **Methods** The cDNA of g.Rz 74 and g.Rz 55 was synthesized and cloned into plasmid pGEM-4Z and g.Rz RNA was obtained through transcription in vitro. Meanwhile, homogenous substrate RNA was transcribed from plasmid pRz277B and labelled with α-32p-UTP. The ribozymes were mixed with the substrate in appropriate proportion under certain conditions to observe whether there existed any trans-cleaving activity. **Results** The products of trans-cleavage were obtained 30 minutes after the initiation of the reaction and the reaction was further intensified 90 minutes later. **Conclusion** Both g.Rz 74 AND g.Rz 55 possess trans-cleaving activity.

Key wrods: HDV ribozyme; trans-cleavage; genome; transcription in vitro

丁型肝炎病毒基因组RNA能于U688-G689之间自我催化剪切(Self-cleavage),具有酶性RNA即核酶活性,这是一种分子内剪切现象(Intramolecular cleavage),又称顺式剪切(Cis-cleavage)。体外研究显示,较短但具有较高自剪切活性的基因组核酶(Genomic ribozyme, g.Rz)是g.Rz1/84(1和84分别为切点5′和3′端碱基数),呈假结样二级结构[1]。国外报道g.Rz也可对长8~13核苷酸(nt)的同源性底物进行分子间剪切(Inter-molecular cleavage),又称反式剪切(Trans-cleavage)[2,3]。本研究旨在探讨g.Rz是否能反式剪切更长的同源性底物RNA,并观察删除茎IV区部分序列后对其活性的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

BamH Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*pst* Ⅰ、*Sau96* Ⅰ、质粒提取纯化盒购自Boehringer Mannheim公司;T7转录盒购自Promega公司;T4连接酶为MBI产品;α-32p-UTP、X光片分别为北京亚辉公司和Kodak公司产品。核酶cDNA由上海Sangon公司合成。

1.2 质粒

g.Rz74相当于g.Rz1/84之第11~84 nt序列,去除其茎Ⅳ区19 nt(相当于g.Rz1/84之第48~56、60~69 nt),即得g.Rz55。将两者的cDNA克隆至pGEM-4Z的BamH Ⅰ与Hind Ⅲ位点间,以获取重组质粒pGRz74、pGRz55。pRz277B由我室与军事医学科学院放射医学研究所共同构建,含277 bp长的重庆地区丁型肝炎病毒核酶区cDNA[4]。

1.3 体外转录

pGRz74、pGRz55经*BamH* Ⅰ线性化,用T7噬菌体RNA聚合酶

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,硕士,主治医师,主要从事病毒性肝炎发病机制及基因治疗方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754000-73116
收稿日期:1999-10-18;修回日期:1999-12-22

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

转录获得核酶 RNA。pRz277B 用 Sau96 Ⅰ线性化，以 α-32p-UTP 标志，转录获取同源性底物 RNA，纯化后测含量。操作按试剂盒说明书进行。

1.4 剪切反应

将核酶与底物按量浓度 100∶1 混合，反应体系 15 μl，在 Tris·HCl 50 mmol/L(pH 7.5)条件下，依次经 95℃3 min、冰浴 10 min、37℃水浴 10 min，再加入 MgCl2 至 20 mmol/L，37℃水浴，于 5、30、90 min 各取出 5 μl 终止反应，最后 12%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(含 7 mol/L 尿素)和放射自显影。

2 结果

2.1 质粒构建

质粒 pGRz74、pGRz55 中 BamH Ⅰ、Hind Ⅲ位点重建，pst Ⅰ位点被切去，故能被 BamH Ⅰ、Hind Ⅲ切开，而不能被 pst Ⅰ切开，提示重组质粒构建成功；送上海基康生物公司测序证实插入序列正确。

2.2 核酶对底物的反式剪切作用

底物 RNA 长 87 nt，其 5′端 53 nt 系载体序列，3′端 24 nt 为 HDV 基因组 RNA 第 665～698 nt，其中 U688-G689 为预计剪切位点，相当于 g.Rz1/84 的自剪切位点。理论上底物应能被 g.Rz74 或 g.Rz55 切成 77 nt 和 10 nt 2 个片段，实际结果与此相符，其中 10 nt 因较短，电泳出胶；30 min 时可以观察到剪切产物，90 min 时剪切效果更明显，见图 1。



图 1 核酶 g.Rz74 和 g.Rz55 对同源性底物的反式剪切
A1：不加核酶底物 RNA；A2：不加核酶底物 RNA 在反应体系中；B1～B3：g.Rz74 在 5、30、90 min 时点的剪切效果；C1～C3：g.Rz55 在 5、30、90 min 时点的剪切效果

Fig 1 Homogenous substrate trans-cleave by g.Rz74 and g.Rz55

Lane A1: Substrate (without ribozyme); Lane A2: Substrate in the reaction system without ribozyme; Lane B1～B3: Trans-cleaving activity of g.Rz74 at 5、30 and 90 min points respectively; Lane C1～C3: Trans-cleaving activity of g.Rz55 at 5、30 and 90 min points respectively

3 讨论

研究表明，自剪切 HDV 核酶 g.Rz1/84 的假结样结构包括 4 个双链区(茎Ⅰ～Ⅳ)、2 个环状区(L_3、L_4)和 3 个连接区($J_{1/4}$、$J_{2/4}$、$J_{1/2}$)，其中茎Ⅲ、L_3、$J_{1/4}$、$J_{2/4}$区可能共同构成活性中心，而茎Ⅱ、茎Ⅳ主要起稳定核酶结构的作用；茎Ⅰ区的 G·U 摆动配对(Wobble pair)对核酶活性至关重要，不可更替，其余 6 bp 的序列可以变动但必须保持 Wastson-Crick 配对。1996 年 Kawakami 等[2]将具有自剪切活性的 g.Rz 分割为茎Ⅰ区 3′侧和 5′侧 2 个部分，在适宜 Mg^{2+}浓度及 pH 等条件下将两者重先混合后可出现“核酶”(即茎Ⅰ区 3′侧序列)对“底物”(茎Ⅰ区 5′侧序列，长 13 nt)的反式剪切；1997 年 Fauzi 等[3]进一步将此核酶的茎Ⅳ区减至 5 bp，发现也能反式剪切长 13 nt 的同源性底物。我们的研究表明：①g.Rz 可以反式剪切更长的同源性底物 RNA；②茎Ⅳ区去除了 19 nt，只保留根部 4 bp 的 g.Rz55 也具有反式剪切活性。

另一方面，由于 g.Rz 底物结合区(茎Ⅰ区)的 6 个 Wastson-Crick 碱基配对序列可以有一定程度的变动，故通过改变此区序列以与不同的底物结合、在不同的位点剪切底物就成为可能。而且，丁型肝炎病毒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内的核酶，其在哺乳动物细胞内的定位及活性发挥可能优于锤头状或发夹状核酶，因此，它有可能发展成为一种新型有效的核酸工具酶，以用来剪切其他肝炎病毒 RNA 等异源性 RNA 分子[5,6]。由于 g.Rz55 长度较短，可作为下一步研究工作的基础。

参考文献：

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

[2] Kawakami J, Yuda K, Suh A, et al. Constructing an efficient trans-acting genomic HDV ribozyme[J]. FEBS Lett, 1996, 394(2): 132—136.

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

[4] 毛 青，王升启，李奇芬，等. 重庆地区丁型肝炎病毒基因组中核酶活性区的克隆及系列分析[J]. 中华微生物和免疫学杂志，1995, 15(4): 247—250.

[5] Roy G, Anavoranich S, Pereault J P. Delta ribozyme has the ability to cleave in trans an mRNA[J]. Nulei Acids Res, 1999, 27(4): 924—948.

[6] 于乐成，顾长海，李奇芬. 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.

(编辑 薛国文)

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