DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.001
第21卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 21, No. 7
1999年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 1999

锤头状核酶对不同长度 mdrl mRNA 的体外切割*

论著

何 斌** 杨唐俊 金欢胜 王祥卫 刘素英 曾 毅 (第三军医大学附属新桥医院泌尿外科)重庆,400037
金锡御 宋 波 (第三军医大学附属西南医院泌尿外科)重庆,400038

提 要 目的:探讨膀胱癌多药耐药性逆转的新方法。方法:应用计算机对 mdrl mRNA 二级结构进行模拟,设计针对 mdrl mRNA 1 959 位 GUC 的"锤头状"(Hammerhead)核酶(Ribozyme 1,RZ1)基因,定点克隆于质粒 pGEMEX-1 的 *BamH* I 和 *EcoR* I 位点上;将 mdrl cDNA 864 bp 的片段亚克隆于 pGEMEX-1 的 *Hind* Ⅲ 和 *EcoR* I 位点上,mdrl cDNA 1 383 bp 片段亚克隆于 pGEMEX-1 的 *EcoR* I 位点上,在 T3 启动子作用下体外转录成 RZ1、864 nt 和 1 430 nt 的 mdrl mRNA。结果:RZ1 在体外分别将 864 nt 和 1 430 nt 的 mdrl mRNA 切割成两个片段,切割温度在 42 ℃和 52 ℃两个条件下切割效率差异不明显。结论:核酶对底物的体外切割活性取决于核酶切割位点的选择,与底物长度无关。

关键词 多药耐药性;核酶;转基因
中图法分类号 R342.2;R737.14

基因治疗是目前医学领域中的重要课题,特别是以 RNA 为研究对象的基因治疗已取得重要的进展[1]。这种针对 RNA 的基因治疗较常规的药物治疗的潜在优势在于其长期性和无毒副作用。多药耐药基因(mdrl)及其产物 P-糖蛋白(PGP)的异常表达是引起肿瘤细胞出现多药耐药性的重要原因。尽管某些药物可逆转肿瘤细胞的这种多药耐药性,但都存在有极大的局限性和不完全性。本研究应用计算机对 mdrl mRNA 二级结构进行模拟,选择 mdrl mRNA 1 959 位的 GUC 为切割位点,按 Haseloff 和 Gerlach[2]的锤头状核酸结构设计并合成了针对该位点的核酶基因,构建于体外表达载体上,在体外对 864 nt 的 mdrl mRNA 和 1 430 nt 的 mdrl mRNA(其中含 47 nt 的载体部分)分子进行切割,并比较其切割效率的差异。

1 材料和方法

1.1 材料来源

pGEMEX-1,Ribomax T3 RNA 转录试剂盒购自 Promega 公司,α-^{32}P-UTP 购自北京亚辉生物工程公司,克隆所需的酶和 Rapid DNA Ligation Kit 均购自 Boehringer Mannheim 公司。质粒 pHDR5A 由美国 Gottesman M 博士惠赠。

1.2 核酶基因的合成及分子克隆

根据 mRNA 二级结构的模拟,选择 mdrl mRNA 1 959 位 GUC 为切割位点,该位点位于 mdrl mRNA 的环状部位。

核酶 DNA 合成序列为:

模板链 DNA:5′-GATCC CTT GGA AAT GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT CAG TTC AAA TGA G-3′

编码链 DNA:3′-G GAA CCT TTA CAA AGC AGG AGT GCC TGA GTA GTC AAG TTT ACT CTTAA-5′

下划波浪线部分为核酶特异性结合序列,下划单线部分为核酶切割核心,两端分别为 *BamH* I 和 *EcoR* I 的粘性末端。DNA 由上海细胞生物研究所合成,经 PAGE 纯化。上述两条核苷酸链各40 μg,分别加入退火缓冲液(10 mmol/L Tris HCl,pH7.5,100 mmol/L NaCl)混匀,置95℃水浴5 min,缓慢冷却至室温即为核酶1(RZ1)基因片段。pGEMEX-1经 *BamH* I 和 *EcoR* I 双酶切后纯化载体片段,1∶3比例混合总量为100 ng 的载体和RZ1基因片段,按 Rapid DNA Ligation Kit 损伤说明书,加入 T4 DNA 连接酶,室温5 min,$CaCl_2$方法转染入 JM109细菌中。该质粒称之为 pEX-RZ1。

1.3 质粒 pMDR-864的构建及克隆

pHDR5A,pGEMEX-1均经 *EcoR* I 和 *Hind* Ⅲ 双酶切,0.8%琼脂糖回收864 bp 的 mdrl cDNA 片段和3944 bp 的 pGEMEX-1载体片段,1∶3比例混合总量为100 ng 的载体和864 bp 的 mdrl cDNA,加入 T4 DNA 连接酶,定向将864 bp mdrl cDNA 基因片段克隆于 pGEMEX-1上,称之为 pMDR-864。

1.4 质粒 pMDR-1383(+5)的构建及克隆

pHDR5A 经 *EcoR* I 酶切,0.8%琼脂糖回收1383 bp 的 mdrl cDNA 片段,pGEMEX-1经 *EcoR* I 酶切,酚∶氯仿纯化,CIAP 脱磷酸化后,按1∶3比例 混合总量为100 ng 的 pGEMEX-1载体和1383 bp 的 mdrl cDNA,加入 T4 DNA 连接酶,常规 $CaCl_2$方法导入 JM109细菌中,小量提质粒,经 *Hind* Ⅲ 酶切鉴定插入方向,筛选出正向插入的克隆,称之为 pMDR-1383(+5)。

1.5 RZ1及其864 nt、1430 nt 的切割底物的体外转录

pEX-RZ1、pMDR-864用 *Hind* Ⅲ 线性化,pMDR-1383(+5)用 *BamH* I 线性化,经酚、氯仿抽提纯化后作为转录模板。按 Ribomax 转录试剂盒操作,在 T3 RNA 聚合酶作用下,37℃反应4 h,然后加 RQ1 RNase-free DNase 去除模板 DNA。转录底物时加入0.37 mbq 的 α-^{32}P-UTP。总反应体积为20 μl。

1.6 RZ1对864 nt 和1430 nt 底物的体外切割反应

取底物转录物3.5 μl,加入10×buffer (0.5 mol/L Tris HCl,10 mmol/L EDTA,pH8.0)1 μl,0.2 mol/L $MgCl_2$1 μl,95℃水浴2 min 后迅速置于冰浴中10 min,然后加入 RZ1转录物及 RNAsin 0.5 μl(20 U),DEPC 水补足至10 μl,42℃(或者

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670824
** 何 斌,男,35岁,主治医师,博士

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

52℃)×2 h，反应完成后加入10 μl 甲酰胺，55℃×5 min，8% PAGE 8 mol/L 尿素电泳，(切割1430 nt 底物时用4%PAGE 8 mol/L 尿素电泳)300 V×1.5 h，凝胶用保鲜膜包裹后进行放射自显影，常温下曝光4 h，X 光片为国产乐凯胶片。

2 结果

2.1 重组 pEX-RZ1克隆的酶切鉴定，见图1

连接混合物常规 $CaCl_2$ 方法导入大肠杆菌 JM109，得到4个转化子，取其中之一大量扩增，提取质粒，经 *BamH* Ⅰ 和 *EcoR* Ⅰ 各酶切6 h，然后加入等体积的甲酰胺，55℃×5 min，8% PAGE 8 mol/L 尿素，电泳结果见图1，双酶切后的片段长为48 bp。

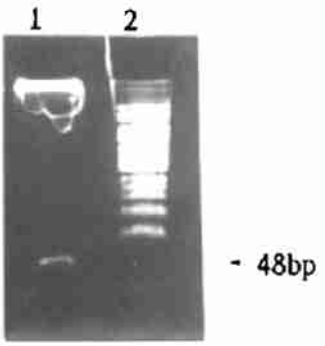


图 1 重组质粒 pEX-RZ1的酶切分析

Fig 1 Restrictive digestion analysis of pEX-RZ1

1：pEX-RZ1＋*BamH* Ⅰ＋*EcoR* Ⅰ

2：pGEM-7Zf(＋)/*Hae* Ⅲ marker

2.2 重组 pMDR-864克隆的酶切鉴定

经 Amp 筛选的转化子，大量扩增，提取质粒，限制性片段分析结果见图2，重组子经 *Hind* Ⅲ 和 *EcoR* Ⅰ 双酶切的片段为 864 bp。



图 2 重组质粒 pMDR-864的酶切分析

Fig 2 Restrictive digestion anulysis of pMDR-864

1：λDNA/*Hind* Ⅲ＋*EcoR* Ⅰ marker；2：pMDR-864＋*EcoR* Ⅰ；3：pMDR-864＋*Hind* Ⅲ；4：pMDR-864＋*Hind* Ⅲ＋*EcoR* Ⅰ；5：pMDR-864

2.3 重组 pMDR-1383(＋5)克隆的筛选及酶切鉴定

挑选经 Amp 筛选的7个转化子，小量扩增，提取质粒，用 *Hind* Ⅲ 酶切鉴定插入方向，结果见图3，转化子5、7经 *Hind* Ⅲ 酶切片段长为570 bp(519 bp＋51 bp 载体)和4808 bp，为正向插入，转化子1、2、6为反向插入，转化子3、4为双载体大环，pMDR-1383(＋5)经大量扩增，限制性酶切分析结果见图4。

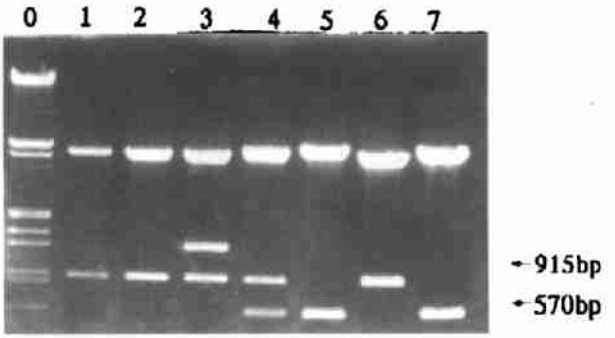


图 3 pMDR-1383(＋5)克隆的筛选

Fig 3 Clone screening of pMDR-1383(＋5)

0：λDNA/*Hind* Ⅲ＋*EcoR* Ⅰ marker

1、2、6：clone 1、2、6

3、4：clone 3、4

5、7：clone 5、7

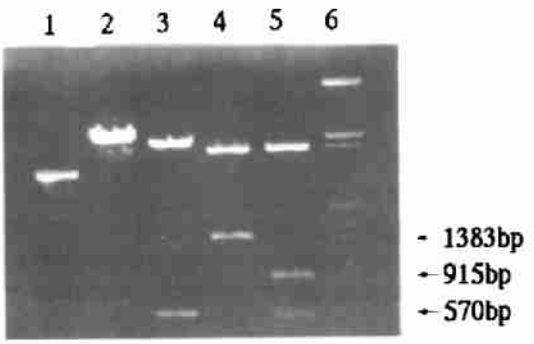


图 4 pMDR-1383(＋5)的限制性酶切分析

Fig 4 Restrictive digestion analysis of pMDR-1383(＋5)

1：pMDR-1383(＋5)

2：pMDR-1383(＋5)＋*BamH* Ⅰ

3：pMDR-1383(＋5)＋*Hind* Ⅲ

4：pMDR-1383(＋5)＋*EcoR* Ⅰ

5：pMDR-1383(＋5)＋*EcoR* Ⅰ＋*Hind* Ⅲ

6：λDNA/*Hind* Ⅲ＋*EcoR* Ⅰ marker

2.4 RZ1对864 nt 底物的体外切割反应

见图5，5为864 nt 的底物，未加入 RZ1，1、2、3、4为不同比例的 RZ1和不同反应温度条件下 RZ1对底物的切割结果，可以看出 RZ1明显的将底物切割成83 nt 和781 nt 的两条带，用密度扫描仪对切割条带进行扫描，切割效率达94%。

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

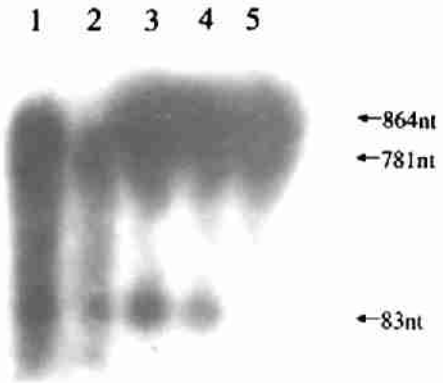


图 5　RZ1对864 nt 底物的体外切割图

Fig 5　Autoradiograph of cleaving 864 nt substrate with ribozymes

1：Substrate＋RZ1(substate：ribozyme＝7：1)，52℃

2：Substrate＋RZ1(substate：ribozyme＝14：1)，52℃

3：Substrate＋RZ1(substate：ribozyme＝7：1)，42℃

4：Substrate＋RZ1(substate：ribozyme＝14：1)，42℃

5：Substrate only

2.5　RZ1对1430 nt 底物的体外切割反应

见图6，1为1430 nt 的底物，未加入 RZ1，2、3为不同比例的 RZ1对底物的切割结果，可以看出 RZ1明显的将底物切割成 631 nt 和799 nt 的两条带，用密度扫描仪对切割条带进行扫描，切割效率达98%。

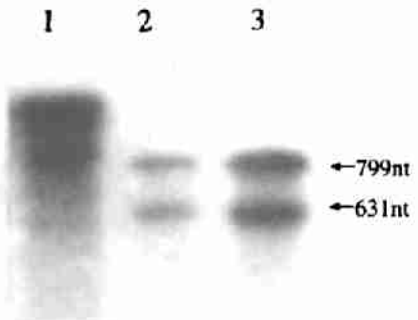


图 6　RZ1对1430 nt 底物的体外切割图

Fig 6　Autoradiograph of cleaving 1430 nt substrate with ribozymes

1：Substrate only；2：Substrate＋RZ1，52℃；3：Substrate＋RZ1，42℃

3　讨论

核酶对靶 mRNA 的体外切割常被作为判定该核酶是否能起到治疗目的的预测[3]。Bertrand 等[4]报道950 bp 长度的底物较60 bp 慢3～15倍，RZ 对不同长度底物切割活性出现明显差异是由于长底物在体外极易形成二级结构，使 RZ 不易与底物结合，因而 RZ 对长底物的切割活性明显下降，所以一般做体外切割反应时应使用短长度的底物。我们首先用 RZ1对864 nt 的底物进行切割，切割效率达90%以上，由于 RZ1的切割位点位于864 nt 底物的下游83 nt 处，切割位点较易暴露，为进一步验证 RZ1对 mdrl mRNA 的体外切割是否受长度的影响，我们将1383 bp mdrl cDNA 片段亚克隆于体外表达载体上，RZ1切割位点位于1430 nt 的中间部位，理论上极易被二级结构遮盖，但结果 RZ1也完全将1430 nt 的底物切割成两个片段，切割效率并不低于其对864 nt 的底物的切割效率。我们曾构建另外一个核酶，同样条件下对上述两个底物进行切割，结果该核酶对两底物切割效率均极低。我们认为作核酶体外切割反应时只要对底物进行彻底的变性，完全可以避免二级结构的影响，底物长度不是影响核酶体外切割活性的主要因素，而位点的选择是决定核酶活性的重要因素之一[5,6]。

参考文献

1 Rossi J J. Therapeutic antisense and ribozyemes. Br Med Bull，1995，51(1)：217

2 Haseloff J，Gerlach W L. Simple RNA enzyme with new and highly specific endoribonuclease activities. Nature，1988，334(618)：585

3 Hiroyuki K，Thambi D，Holland J F，*et al*. Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by a mdrl (PGY1) ribozyme. Cancer Res，1994，54(5)：1271

4 Bertrand E，Pictet R，Grange T，*et al*. Can hammerhead ribozyme by efficient tools to inactivate gene function? Nucleic Acids Res，1994，22(3)：293

5 Holm P S，Dietel M，Krupp G. Similar cleavage effciencies of an oligoribonucleotide substrate and a mdrl mRNA segment by a hammerhead ribozyme. Gene，1995，167(2)：221

6 何　斌，金锡御，杨唐俊，等. 位点选择对核酶体外切割活性的影响. 免疫学杂志，1998，14(3)：149

（收稿：1998-12-25；修回：1999-03-31）

（编辑　刘　鹏）

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

Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of mdrl mRNA with different length*

He Bin, Jin Xiyu, Yang Tangjun, Jin Huanshen, Wang Xiangwei, Liu Suying, Zeng Yi, Song Bo (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To explore the new methods to reverse the multidrug resistance of bladder cancer. Methods: A hammerhead ribozyme was designed to cleave the GUC sequence at codon 1959 of mdrl mRNA after the analysis of the secondary structure of mdrl mRNA by computer. The hammerhead ribozyme 1 gene was synthesized and cloned into the *BamH* I /*EcoR* I sites of pGEMEX-1 called pEX-RZ1. The 864 bp fragment of mdr1 cDNA was subcloned into the *Hind* Ⅲ/*EcoR* I sites of pGEMEX-1 called pMDR-864. The 1383 bp fragment of mdr1 cDNA was subcloned into the *EcoR* I site of pGEMEX-1 called pMDR-1383 (+5). The pEX-RZ1 and pMDR-864 were lineralized with *Hind* Ⅲ while the pMDR-1383(+5) was lineralized with *BamH* I and these lineralized plasmids were transcribed with T3 promotor *in vitro*. Results: The ribozyme 1 showed strong cleavage activity after heing mixed with the transcribed RZ1 and its substrates for 2 hours at 42℃ and 52℃. Conclusion: The designed ribozyme can be used as a tool to reverse the multidrug resistance of bladder cancer. the cleavage activity of the ribozyme is not associated with the length of its substrate but depended on the location of the cutting site.

Key words multidrug-resistance gene; ribozyme; gene transfer; bladder cancer

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670824

个案与短篇

成功救治脑干出血1例

A case report for curing hemorrhage of brain stem successfully

张映琦* 周华东 王 敏 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所脑血管病二科) 重庆, 400042

患者，男，68岁，因烦躁，谵妄1 d于1998年5月18日入院。患者于4 d前早上散步时突发意识障碍倒地，右额部跌伤，当地医院予脱水、止血、补液等对症治疗。1 d前，患者出现烦躁、谵妄，意识呈昏睡状态，为进一步救治，转入我院。既往无高血压史。查体：血压16/9 kPa，昏睡状态，双侧瞳孔不等大，右侧约3 mm，左侧约2 mm，光反射灵敏。心、肺(－)。四肢肌张力正常，肌力Ⅴ级。腱反射(++)，巴氏征(－)。头颅CT两个层面示中脑被盖部中线左侧血肿，大小约1.2 cm×0.9 cm，双侧额颞部硬膜下积液。查血常规：白细胞11.1×10^9/L，N 90%，L10%。红细胞4.92×10^{12}/L，血色素149 g/L，血小板191×10^9/L。生化肾功能正常，血糖7.2 mmol/L。患者病情危重，入院后意识障碍逐步加重，入院后第2天呈昏迷状态。患者入院时血压偏低为16/9 kPa，此后血压渐下降，波动于9.33～12/4.67～7.33 kPa，积极予多巴胺，阿拉明升血压并加大补液量，输血浆等治疗。第5天后患者血压平稳，波动于13.3～16/8～9.33 kPa。患者于入院后第3天出现持续高热，体温波于39～40.8℃。血常规：白细胞24.0×10^9/L，N90%，L10%。胸片示右上肺大叶性肺炎，予舒普深抗炎3 d，病情无明显好转，痰检见霉菌，未找到抗酸杆菌，换用泰能抗感染，并应用大蒜素抗霉菌等治疗3 d，病情好转，继续用罗氏芬抗炎等治疗4 d，患者病情明显好转，无明显发热，复查血常规正常，胸片示右上肺浸润性肺结核，血沉97 mm/h，进一步查胸部CT示右上肺浸润性肺结核，部分纤维化。遂加用口服抗痨药治疗。患者入院后多次测血糖均高于正常值，最高达14.64 mmol/L。经予胰岛素治疗后，血糖基本控制在正常范围。经积极脱水、补液、升压、抗感染及加强营养支持等综合治疗下，患者病情逐渐好转，意识障碍减轻，于第7天呈嗜睡状态，12 d以后逐渐恢复清醒。治疗43 d后病情明显好转，能扶床下地行走，遂出院带药治疗。

讨论

脑干出血在临床上较为常见，是危险性、死亡率高的疾病之一。有报道，若血肿直径大于脑干横径的50%或直径大于2 cm则预后不良。本例患者头颅CT两个层面示中脑被盖部中线左侧血肿，大小约1.2 cm×0.9 cm，双侧额颞部硬膜下积液，诊断明确，且年龄大，合并糖尿病、肺结核及硬膜下积液，使病情变得复杂，增加了治疗上的困难，有一些救治经验值得总结[2]。

* 张映琦，女，24岁，硕士研究生

(下转471页)

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