DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.022

with emphysema were determined with a model 6200 Autobox DL plethysographer and then the results were compared with one another. **Results:** DLCO was significantly correlated with the sex, age and body height of the subjects ($P < 0.01$). The calculation of the regression formula of DLCO showed that: (1) DLCOs in patients with asthma was normal but the ventilation function declined; (2) DLCO in patients with ILD was significantly decreased and ventilation limited; 3). DLCO in patients with chronic bronchitis complicated with emphysema was remarkably decreased with exacerbation of emphysema. **Conclusion:** The measurement of DLCO is of great significance in the assessment of severity of asthma, ILD and emphysema.

Key words lung diffusion; chronic obstructive pulmonary disease; interstitial lung disease

锤头状核酶的设计、构建及与反义RNA在阻断HBV基因表达中的比较研究*

Design and construction of hammerhead ribozyme and comparative study of its blocking effect on HBV gene expression with the antisense RNA technique

甘立霞 朱锡华** (第三军医大学基础部生物化学教研室) 重庆, 630038

根据 Haseloff和 Gerlach报道的锤头状核酶结构,设计合成了针对 HBVayw株 P基因5′-端2360位点(GUC)的核酶 RCP,其作用底物为 HBVayw P基因的翻译起始区(2140-2422区段),运用基因克隆结合体外转录的方法,评价了 RCP核酶的体外切割活性。同时进一步将该核酶基因重新克隆到能在真核细胞表达的载体 pSVL上,利用脂质体介导的 DNA转染技术,将该核酶基因引入到 HepG2215细胞(HepG2215细胞系是由头尾相接的 HBV双拷贝基因组转染肝癌细胞系 HepG2而建立的一株能稳定分泌 HBV各种抗原和完整病毒颗粒的细胞系),观察了在这一暂时性表达外源基因的系统中核酶在细胞水平上对 HBV抗原表达和 DNA复制的作用。同时为了与反义 RNA的作用做一有意义的观察和比较。本实验还选择了含 P基因5′-端及其非编码区的 HBV-DNA片段 [BamHI(2903-BamHI(1399)]克隆到 pSVL的 SV40启动子下游,构建了能在真核细胞中表达这一区段的反义 RNA重组质粒。实验结果如下:

(1)设计并构建了针对 HBV P基因5′-端2360位点(GUC)的锤头状核酶 RCP,通过基因克隆技术,建立了核酶 RCP及其作用底物的基因克隆,并分别构建在体外克隆及转录载体 pGEM-3Zf(-)质粒的 SP6启动子下游,通过筛选鉴定获得了正确的核酶 RCP基因重组质粒 RCP/3Zf(-)及其作用底物的基因片段的重组质粒 HBP-20。

(2)运用体外转录的方法,将重组质粒 RCP/3Zf(-)及 HBP-20分别经 EcoRI 酶切线性化后,用 SP6 RNA聚合酶转录出核酶及底物的 RNA分子,然后在反应系统中将两种产物(RNA)混合进行核酶的体外切割反应,经聚丙烯酰胺凝胶电泳配合放射自显影转录方法观察了核酶的体外催化裂解活性,结果表明:核酶 RCP成功地切割了底物(340 nt)的 RNA分子,按切割位点的位置产生出了 257 nt和 83 nt两个特异的带型。

(3)实验表明核酶 RCP的体外切割活性有随 Mg^{2+} 浓度增加而增大的趋势。在反应系统中,将 Mg^{2+} 浓度从0, 10, 20, 30, 40至 50 mmol/L加入,结果以 Mg^{2+} 浓度为50 mmol/L时切割产物最多,但从 Mg^{2+} 浓度为20 mmol/L时已能观察到切割产物。当反应体系中不含 Mg^{2+} 时,核酶无切割活性。

(4)进一步构建了能在真核细胞中暂时性表达核酶 RCP及 HBV-DNA P基因5′-端及非编码区段 [BamHI(2903)-BamHI(1399)]的反义 RNA的重组质粒,通过分子克隆及筛选鉴定,获得了正确的重组体 RCP/pSVL及 ANP/pSVL。

(5)运用核酸分子杂交技术,以地高辛标记的 HBV-DNA为探针,提取转染了重组质粒的 HepG2215细胞中的 DNA,进行斑点杂交分析,观察在这种暂时表达系统中,反义 RNA及核酶对 HBV复制是否产生影响。结果表明:无论是表达核酶还是反义 RNA的 HepG2215细胞中,HBV-DNA的量并未减少,表明它们对 HBV基因组的复制并未产生抑制作用。

(6)运用脂质体介导的 DNA转染技术将重组质粒引入到 HepG2215细胞,并通过固相放射免疫测定方法检测培养上清的 HBsAg及 HBeAg分泌情况,以此观察核酶及反义 RNA对 HBV基因表达的影响,结果表明:在这种暂时性表达系统中,针对 P基因5′-端及其非编码区的反义 RNA只对 HBeAg的表达有抑制作用;而针对 P基因5′-端的核酶 RCP则对 HBeAg和 HBsAg的表达都有一定程度的抑制作用。这一实验结果还在应用抗 HBs单克隆抗体对转染细胞中的 HBsAg免疫细胞化学染色观察中得到了印证。

关键词 锤头状核酶;反义 RNA;HBV基因表达;脂质体;基因转染

中图法分类号 Q78; R373

(收稿: 1996-12-01;修回: 1997-01-10)

(编辑 王 红、沈锡庚)

* 全军"八五"青年基金资助项目

** 免疫学教研室 重庆, 630038

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