DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.03.001

论著

锤头状核酶RCP对HBV的P基因体外转录物的作用*

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

提 要 本文根据Haseloff和Gerlach发表的锤头状核酶结构,设计合成了针对HBV ayw株P基因5′-端2360位点(GUC)的核酶RCP,其作用底物为HBV ayw 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的切割活性,结果表明,RCP在体外成功地切割了长为340个核苷酸的靶RNA分子,这一工作为我们进一步在细胞内评价RCP抑制HBV全基因组复制及其基因表达的研究创造了条件。

关键词 锤头状核酶;乙肝病毒;体外切割
中图法分类号 Q75

嗜肝DNA病毒基因组DNA的复制是经过前基因组RNA的逆转录而进行的。其负链DNA是在依赖RNA的DNA聚合酶(逆转录酶)催化下以前基因组RNA为模板合成,其正链DNA是在依赖DNA的DNA聚合酶催化下以负链DNA为模板合成。由此可见,嗜肝DNA病毒编码的双功能DNA聚合酶是其基因组复制的关键酶[1],这成为设计抗HBV药物理想的靶点。王平[2]等运用反义RNA的技术业已证明,在HBV基因组的不同区段中,以其P基因的5′-端及其非编码区的反义RNA对HBV基因表达和复制的抑制作用最佳,这为我们设计核酶时靶位点的选择提供了理论依据。

在上述反义RNA的工作基础之上,针对反义RNA作用的理想靶位点——P基因的翻译起始区,按Haseloff和Gerlach发表的锤头状核酶结构[2],设计并合成了针对HBV ayw株P基因5′-端2360位点(GUC)的核酶RCP,结果表明,RCP在体外成功地切割了长为340个核苷酸(Nucleotide,nt)的靶RNA底物分子。

1 材料和方法

1.1 化学试剂与酶

pGEM-3Zf(－)购自Promega公司,SP6/T7转录试剂盒购自Boehringer Mannheim公司;[α-^{32}P]-UTP购自Amersham公司;克隆所需的酶均购自Biolab公司;质粒pUC-18/HBV-ayw由王平提供。

1.2 核酶RCP及其作用底物的分子克隆

首先,设计并合成了针对HBV ayw株P基因5′-端2360位点(GUC)的核酶RCP基因,将其分为两段部分互补的寡聚核苷酸片段,采用ABI公司的381A DNA合成仪合成,其序列为:

Sac I　　Klenow酶

5′-CAAGAGCTCGAGGCAGGTTTCGTCCTCACGGA·····-3′
3′-·····GGAGTGCCTGAGTAGTCGGGATCTTGACGTCATG-5′
Pst I

两片段退火后,用Klenow酶补平两端,经Sac I/Pst I酶切后克隆在体外转录载体pGEM-3Zf(－)质粒的SP6启动子下游。

核酶RCP的作用底物来自HBV ayw P基因的翻译起始区2140－2422区段(含2360位点)。将HBV ayw DNA经Xba I/Bgl Ⅱ(2140－2422)双酶切后,插入pGEM-3Zf(－)质粒的SP6启动子下游。

1.3 体外转录与切割

核酶基因RCP及其底物的克隆均用EcoR I线性化后,按Boehringer Mannheim公司的转录试剂盒所提供的方法,在SP6 RNA聚合酶催化下分别转录出核酶及底物RNA分子,以供体外切割反应使用。在底物的转录体系中加入了[α-^{32}P]-UTP作标记,以便观察切割反应的情况。

核酶的体外切割反应是在50 mmol/L Tris·HCl(pH8.0),1 mmol/L EDTA及Mg^{++}存在的体系中,同时加入核酶及其底物的转录产物RNA分子,于42℃,反应2 h。反应完毕,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),配合放射自显影方法,观察切割反应的情况。

2 结果与讨论

2.1 核酶RCP及其作用底物的分子克隆(见图1、2)

* 全军"八·五"青年科学基金资助项目
** 第三军医大学免疫学教研室
*** 中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室,北京100052

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

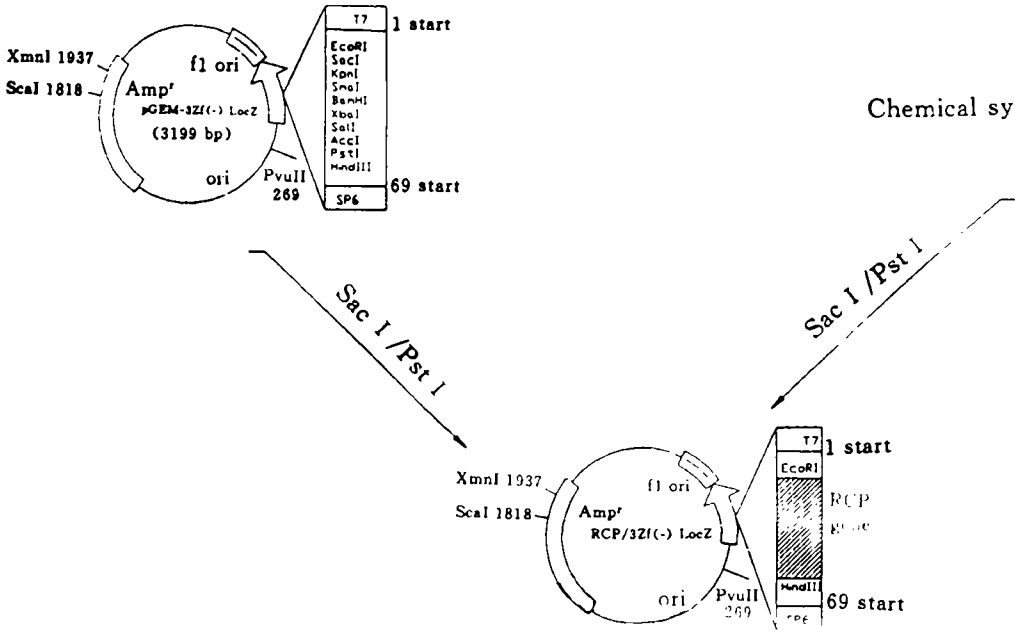


图1 锤头状核酶 RCP 基因克隆

Fig 1 Construction of hammerhead ribozyme (RCP) gene clone and its invitro transcription

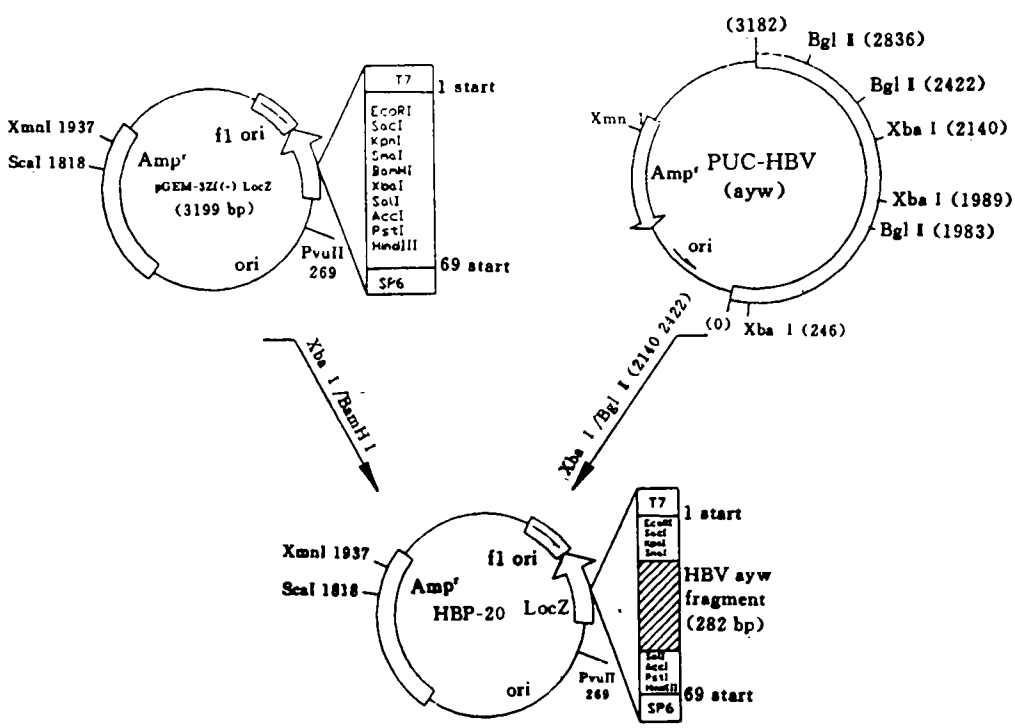


图2 底物(HBP-20)基因克隆

Fig 2 Construction of substrate (HBP-20) gene clone and its invitro transcription

2.2 RCP 活性的体外分析结果

核酶基因克隆 PCR/3zf(－)及其底物克隆 HBP－20均用 E. coR I 线性化后，用 SP_6 RNA 聚合酶转录出相应的 RNA 分子，然后 RCP 及其作用底物的体外

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



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