

[文章编号] 1000-2200(2010)06-0552-03

· 基础医学 ·

## RNase P 体外靶定切割人巨细胞病毒 UL54 mRNA 片段研究

吕静竹<sup>1,2</sup>, 李月琴<sup>2</sup>, 周天鸿<sup>2</sup>

[摘要] 目的: 观察大肠埃希菌 RNase P 催化亚基 M1 RNA 在细胞外水平上对人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV) DNA 聚合酶 UL54 mRNA 的切割效果, 探讨核酶作为新型抗病毒制剂的应用前景。方法: 针对 HCMV UL54 mRNA 设计特异性的外部引导序列(external guide sequences, EGSs) EGS-T6, 观察其引导 M1 RNA 特异的细胞外切割活性。结果: 在 EGS-T6 引导下, 大肠埃希菌 RNase P 催化亚基 M1 RNA 在细胞外可特异地对靶 mRNA 进行有效切割。结论: EGS-T6 具备引导 M1 RNA 对 UL54 mRNA 特异切割的能力, 可发展成一种新型抗病毒制剂。

[关键词] RNase P; 外部引导序列; 人巨细胞病毒; UL54 mRNA

[中国图书资料分类法分类号] Q 81 [文献标识码] A

*In vitro* targeted cleavage of human cytomegalovirus UL54 mRNA segments by RNase PLÜ Jing-Zhu<sup>1,2</sup>, LI Yue-Qin<sup>2</sup>, ZHOU Tian-Hong<sup>2</sup>

(1. Medical College, Anhui Science and Technology University, Huainan Anhui 232001;

2. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou Guangdong 510632, China)

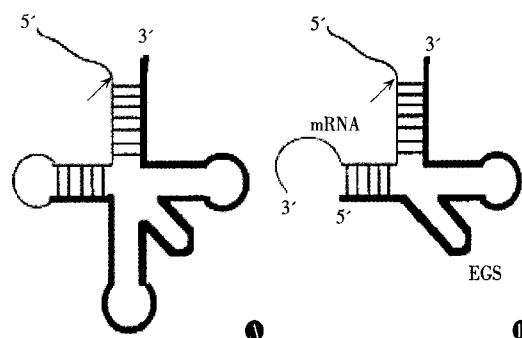
[Abstract] Objective: To study the cleavage effect of M1 RNA, catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli* on UL54 mRNA encoding major DNA polymerase of human cytomegalovirus *in vitro*, and to explore the prospects of ribozyme as a novel antiviral agent.

Methods: An external guiding sequence T6 specific to HCMV UL54 mRNA was designed and synthesized; specific cleavage activity of M1 RNA guided by T6 was observed *in vitro*. Results: With the guidance of EGS-T6, M1 RNA from *Escherichia coli* can block the expression of HCMV UL54 mRNA *in vitro*. Conclusions: EGS-T6 may fulfill the specific cleavage and be developed as a novel antiviral agent.

[Key words] RNase P; external guide sequences; human cytomegalovirus; UL54

反义技术是一种在基础研究及临床治疗中极有应用前景的基因靶定方法。用于靶定基因的制剂可以是传统的反义寡核苷酸、反义催化分子(核酶或酶性 DNA), 也可以通过一段额外的寡核苷酸序列靶定 mRNA 指导内源 RNases(如 RNase L 和 RNase P)降解靶 mRNA<sup>[1]</sup>。RNase P 是一种细胞内广泛存在的核蛋白复合体, 是细胞中活性最高的酶之一, 无显著细胞毒性, 催化前体 tRNA (ptRNA) 5' 端的成熟<sup>[2]</sup>。大肠埃希菌来源 RNase P 包含一个 377 nt 的 RNA 催化亚基(M1 RNA) 和一个约 119 个氨基酸的碱性蛋白(C5)<sup>[3-4]</sup>。在缺乏 C5 的体外环境下, M1 RNA 在高盐溶液中可识别靶 mRNA-外部引导序列(external guide sequences, EGSs)复合物的互补杂交区域和游离 CCA-3' 末端, 具备对底物 mRNA 进行靶定切割的活性<sup>[5]</sup>(见图 1)。理论上说, 只要靶

mRNA 分子上存在 RNase P 的潜在切割位点, 即可使用 EGS 指导 RNase P 对其进行切割。人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是广泛感染人类的重要病原, UL54 基因编码 HCMV 的 DNA 聚合酶, 为 HCMV 复制所必需, 可作为抗病毒的靶点。为研究基因靶定技术, 本研究以 UL54 基因 mRNA 为靶, 设计特异性的 EGS-T6, 通过 M1 RNA 对靶 mRNA 的体外切割实验, 观察 EGS-T6 的引导切割活性, 为利用 RNase P/EGS 反义技术靶定抑制病毒基因表达的研究提供实验基础。



A: RNase P 天然底物 ptRNA; B: 靶 RNA 与 EGS 杂交复合体; 箭头示意切割位点

图 1 RNase P 作用底物结构模式图

[收稿日期] 2009-12-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30370776); 安徽省高等学校省级自然科学基金资助项目(KJ2009B055Z)

[作者单位] 1. 安徽理工大学医学院生化教研室, 安徽淮南 232001; 2. 暨南大学生命科学技术学院, 广东广州 510632

[作者简介] 吕静竹(1977-), 女, 硕士, 讲师。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 T7 RNA polymerase 购自基因有限公司;核酸内切酶、Ex Taq 聚合酶、T4 DNA 连接酶、绿豆芽核酸酶、RNase 抑制剂、DNase I (RNase-free) 购自宝生物工程(大连)有限公司;rNTP、牛血清白蛋白组分 V 购自北京鼎国生物技术有限责任公司; $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP 购自北京市福瑞生物工程公司。

大肠埃希菌 M1 RNA 基因克隆质粒 pFL117, 含 HCMV (strain AD169) UL54 基因的文库筛选片段均由刘奋勇博士 (University of California, Berkeley) 惠赠;载体质粒 pGEM3z 购自基因有限公司;载体质粒 pUC19 为本实验室保存;基因测序及寡核苷酸片段合成均委托上海博亚生物技术有限公司完成;同位素标记 RNA marker 为本实验室制备。

1.2 UL54 基因片段转录模板的克隆与制备 根据 HCMV UL54 基因设计分离基因片段的 PCR 引物, 5' primer PU4: 5'-GTG AAT TCG GTG GAG GCG CGG GTC ATC TAC-3', 3' primer PU8: 5'-ACT AAG CTT GCG TCG TCC GTG CCA TC-3'。以 UL54 全基因克隆质粒 UP54 为模板进行 PCR 实验, 将含有 GS 互补位点的 UL54 基因片段克隆至 pGEM3z, 得到 UP54-D 亚克隆质粒。经 *Hind* III 线性化后成为体外转录模板。

1.3 M1 RNA 核酶转录模板的制备 以含有大肠埃希菌 M1 RNA 基因的克隆质粒 pFL117 为转录模板, 经 *Hind* III 线性化后得到 M1 RNA 核酶的体外转录模板。

1.4 EGS 转录模板的克隆与制备 根据 GS 设计的通用原则<sup>[1]</sup>, 在 UL54 基因上找到符合要求的靶序列设计并合成 EGS-T6 的 DNA 模板: 5'-GTG AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGT G TA ACG GTG CGG TCT CCG CGC GCA GGT TCA AAT CCT GCT CTT GCG CCA AGC TTA GT-3'; 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切后克隆至 pUC19 载体质粒, 得到 pUC19-T6 EGS 克隆质粒。*Hind* III 线性化后, 经绿豆芽核酸酶末端平滑处理成为体外转录模板。

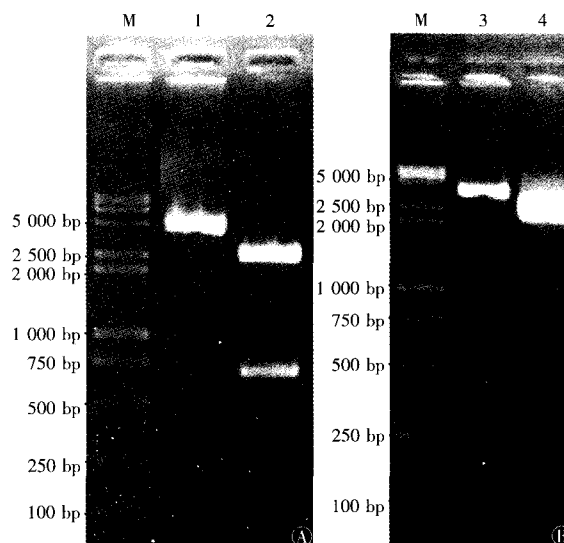
1.5 体外转录与产物纯化 参考 T7 RNA polymerase 相关说明, 分别体外转录底物片段 UL54 基因 RNA、M1 RNA 和 EGS-T6 RNA。其中转录底物 RNA 时掺入  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP 同位素用以标记。转录完毕产物用 DNase I 消化 30 min, 苯酚氯仿抽提 1 次, 乙醇沉淀 2 次。纯化产物保存于 80% 乙醇 -20 °C 待用。

1.6 体外切割反应 含  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP 标记底物 RNA 的反应样品中加入 2 倍浓度的 M1 RNA 核酶和 5 倍浓度的 EGS-T6, 空白对照不加 M1 RNA 核酶和 EGS-T6。两组样品均在反应 Buffer B [50 mmol/L Tris pH 7.5, 100 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl, 100 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 4% (质量分数) PEG 6000] 中 37 °C 反应 1 h, 加入等体积终止液<sup>[6]</sup> 终止反应, 用含 8% PAGE 的 7 mol/L Urea 变性凝胶电泳分离, 放射自显影 1 h。

## 2 结果

2.1 UL54 基因片段体外转录模板的制备 以 UL54 全基因克隆质粒 UP54 为模板进行 PCR 反应, 将含有 EGS-T6 靶位点的 UL54 基因片段克隆至质粒 pGEM3z, 得到 UP54-D 重组质粒 (见图 2A)。

2.2 pUC19-T6EGS 体外转录模板的制备 将合成的 EGS-T6 DNA 模板克隆至质粒 pUC19, 得到 pUC19-T6EGS 重组质粒 (见图 2B)。



M:Marker;1:UP54-D 质粒;2:*Eco*R I + *Hind* III 酶切 UP54-D;  
3:pUC19-T6EGS 质粒;4:*Eco*R I + *Hind* III 酶切 pUC19-T6EGS

图 2 底物及 EGS DNA 模板电泳鉴定

2.3 底物、核酶与 EGS-T6 的体外转录 按实验方法体外转录底物、核酶与 EGS-T6, 以含 8% PAGE 的 7 mol/L Urea 变性凝胶电泳分析转录产物, 可见体外转录所得 RNA 产物均为单一纯净电泳条带, 各片段大小均与预期一致, 其中底物 UP54-DRNA 长度为 726 nt (见图 3A), EGS-T6 RNA 长度为 50 nt (见图 3B), 核酶转录产物 RNA 长度为 383 nt (见图 3C)。

2.4 EGS-T6 引导下 M1 RNA 核酶对底物的体外切割 将 UP54-D RNA、M1 RNA 和 EGS-T6 RNA 在一定反应体系中混合进行体外切割反应 1 h, 切割产物

用含 8% PAGE 的 7 mol/L Urea 变性凝胶电泳分离,放射自显影 1 h。结果显示,加入 M1 RNA 和 EGS-T6 RNA 的反应样品经 37 °C/1 h 切割出现 2 个产物片段——3'产物(3'P),其长度为 537 nt;5'产物(5'P)其长度为 189 nt。切割实验结果显示,M1 RNA 在 EGS-T6 引导下对 UP54-D 底物 RNA 产生了特异性切割(见图 4)。

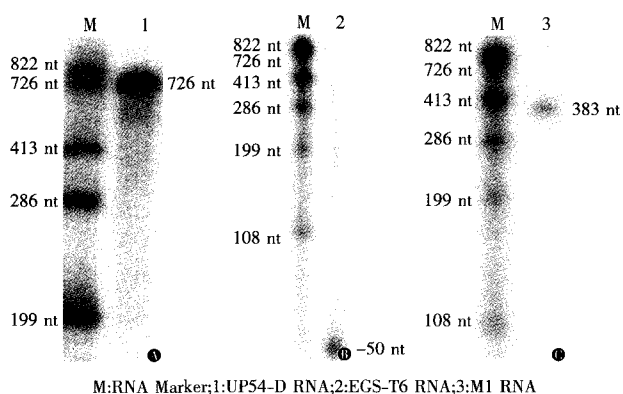


图 3 底物、EGS 及核酶体外转录产物鉴定

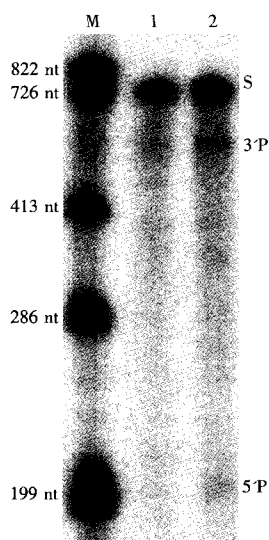


图 4 EGS-T6 引导 M1 RNA 核酶对 UP54-D RNA 特异切割

### 3 讨论

一些核酶如锤头状核酶与发夹状核酶已被广泛应用于切割特定 mRNA 并取得一定成效。但由于其效率和特异性都存在一定的局限性,利用 RNase P/EGS 反义技术靶定切割 HCMV UL54 基因 mRNA 片段的研究对于研制基因药物新途径有着特殊的意

义。本研究以 HCMV UL54 基因为靶,尝试基于 RNase P/EGS 联用的反义技术。通过 EGS 引导 M1 RNA 核酶体外切割 HCMV UL54 mRNA 片段的实验,证明其具备切割活性与序列特异性。但研究结果显示,底物片段没有完全切开,这是由于靶 mRNA 与 M1 RNA 之间微弱的结合力限制了二者之间的紧密结合,M1 RNA 本身难以达到 100% 的切割效率,加之体外条件下缺乏 C5 稳定 M1 RNA 的结构,因此切割效率还有待进一步提高。此外,体外条件下小片段 EGS RNA 的不稳定性也是影响切割效率的重要因素。但该实验结果为利用 EGS 这种新型基因靶定制剂特异性抑制病毒基因的表达,及其潜在的抗病毒治疗价值提供了实验依据。在此基础上,尚须进一步优化体外切割条件,或通过化学修饰增加 EGS 的稳定性以提高其特异性切割效率。有研究<sup>[7]</sup>显示,经过甲基化修饰的具有更长半衰期的新型 EGS 可成功抑制膀胱癌细胞内 PKC- $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达,为通过提高 EGS 稳定性增强切割效率提供了实验依据。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Zeng Z, Li H, Li Y, *et al.* Effective inhibition of human cytomegalovirus gene expression by DNA-based external guide sequences[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009, 41 (5):389-398.
- [2] Li H, Trang P, Kim K, *et al.* Effective inhibition of human cytomegalovirus gene expression and growth by intracellular expression of external guide sequence RNA[J]. *RNA*, 2006, 12 (1):63-72.
- [3] Soler Bistué AJ, Ha H, Sarno R, *et al.* External guide sequences targeting the aac(6')-Ib mRNA induce inhibition of amikacin resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51 (6):1918-1925.
- [4] Kazantsev AV, Pace NR. Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4 (10):729-740.
- [5] Yang YH, Li H, Zhou T, *et al.* Engineered external guide sequences are highly effective in inducing RNase P for inhibition of gene expression and replication of human cytomegalovirus[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2):575-583.
- [6] 吕静竹,李弘剑,陈浩军,等.对 HCMV UL54 mRNA 片段特异性切割的 M1GS 构建[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(2):83-86.
- [7] Ma M, Benimetskaya L, Lebedeva I, *et al.* Intracellular mRNA cleavage induced through activation of RNase P by nuclease resistant external guide sequences[J]. *Nature Biotechnol*, 2000, 18 (1):58-61.

本刊已开通网络在线投稿: <http://xuebao.bbmc.edu.cn>, 欢迎投稿。