

特异切割 12-脂加氧酶 mRNA 的核酶 体外活性及动力学研究

刘灿辉 孙仑泉* 田 波**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 根据锤头状核酶(Ribozyme)的作用模式,设计、合成并克隆了特异性切割 12-脂加氧酶(12-LO)mRNA 的核酶基因。以合成的 25 个核苷酸长的 12-脂加氧酶 RNA 片段为底物与转录的核酶 RNA 一起保温检测其体外切割活性。实验结果表明,在 37℃ 保温时,核酶在体外对 12-脂加氧酶具有较高的特异切割活性,其 K_m 值为 1300 nmol/L,其 k_{cat} 值为 0.083/min,在 50℃ 保温时,核酶具有很高的切割活性,其 k_{cat} 值为 0.31/min。

关键词 12-脂加氧酶,锤头状核酶,体外切割,动力学

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0096-03

核酶是小分子 RNA,能特异性地催化切割 RNA 分子,因此具有阻断基因表达的巨大潜力。近年来,利用核酶的这种功能来设计能切割一些病理性 RNAs 的核酶。曾报道有在细胞内切割爱滋病毒 RNA 的核酶^[1]。我们曾得到对 PSTVd 有高度抗性的核酶转基因马铃薯系^[2]。心血管疾病是引起人类死亡的首要原因。血小板型 12-脂加氧酶(12-LO)能将氧分子插入到花生四烯酸的碳-12 上,形成 12-羟基花生四烯酸过氧化物,激活 12-LO 对引起高血压和增加血管紧张素 II 有重要作用。把特异切割 12-LO 的核酶基因转入活细胞中,有可能达到防治心血管病的效果。

1 材料和方法

1.1 特异切割 12-LO mRNA 的核酶的设计

Haseloff 等人^[3]提出锤头状核酶催化切割 RNA 的模式由三部分组成,即包含与切点相邻的保守序列 GUC 的底物 RNA、高度保守的序列构成的核酶二级结构催化区、与底物 RNA 配对的识别区。首先确定与切点相邻的保守序列 GUC 位点,即切割位点区域,我们选择 12-LO 包含第 92 核苷酸处的 GUC 在内的一段序列为靶 RNA,根据靶 RNA 的序列,确定核酶的识别区序列,并加入高度保守的具有切割活性的一段序列,即构成具有切割活性的核酶,

长度为 46 个核苷酸,其 5'端和 3'端的配对长度均为 12 个核苷酸。

1.2 核酶基因的合成及克隆

根据所设计的核酶序列,确定核酶单链脱氧寡核苷酸的序列,利用 Beckman DNA 合成仪合成了该基因的两条寡核苷酸链。通过 T4 多核苷酸激酶的作用,核酶基因两条寡核苷酸链的 5'端磷酸化,退火,得到双链 DNA。以 *Sal*I 酶解 pGEM-3Z(+)成粘端,并用碱性磷酸酶去磷酸化。核酶基因 DNA 与 pGEM-3Z(+)连接的条件为 20mmol/L Tris·Cl (pH = 7.6),10 mmol/L MgCl₂,10 mmol/L DTT,0.6 mmol/L ATP,受体菌为 DH5 α ,感受态细胞的制备采用 CaCl₂ 处理的方法,把连接产物加入到感受态细胞中,置于冰浴中 30 min,42℃ 热击 90 s 后,向其中加入 LB 培养基,37℃ 保温 60min,转化细胞涂布于含氨苄青霉素(100 mg/L)+ X-gal + IPTG 的 LB 平板上,37℃ 培养过夜。挑选白色克隆,提质粒,通过酶切鉴定筛选阳性克隆。由 373A-18DNA 自动测序仪测定 DNA 序列。

1.3 12-LO 底物 RNA 的标记

长度为 25 个核苷酸的 12-LO 底物 RNA,序列为 UCUUCUCCGGGUCGUACAACCGCGU,用 [r -³²P]ATP 标记 5'端,反应体系为:0.5 nmol 底物,5 μ L [r -³²P]ATP,2 μ L T4 Kinase buffer,10 单位

收稿日期:1998-11-11,修回日期:1999-04-12。

* 本室客座研究员,澳大利亚强生药理研究所基因治疗室主任。

** 通讯作者。

RNasin, 10 单位 T4 多核苷酸激酶,加水至总体积 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 min, 酚氯仿抽提, 乙醇沉淀。

1.4 体外转录

大量分离纯化质粒。取适量的质粒(10 μ g)以 HindIII 酶切成线性。大量体外转录反应体积为 200 μ L, 含 40 mmol/L Tris·Cl(pH=7.5), 6 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L Spermidine, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 10 μ g 模板 DNA, 0.5 mmol/L 4 \times rNTP, 60 单位 T7 RNA 聚合酶。37 $^{\circ}$ C 保温 120 min, 反应完毕, 加入 DNaseI, 37 $^{\circ}$ C 保温 15 min 降解模板 DNA, 以等体积的酚氯仿抽提 2 次, 乙醇沉淀。

1.5 核酶的体外活性测定

少量核酶与过量 12-LO 底物 RNA 混合, 缓冲液为 50 mmol/L Tris·Cl(pH = 8.0), 10 mmol/L MgCl₂, 于 37 $^{\circ}$ C 或 50 $^{\circ}$ C 保温适当的时间, 保温完毕, 加入等体积的终止缓冲液(98% 甲酰胺, 10mmol/L EDTA, 0.1% 溴酚蓝, 0.1% 二甲苯蓝), 于 80 $^{\circ}$ C 处理 30s 后, 聚丙烯酰胺凝胶(8 mol/L 尿素, 20%)电泳, 以放射自显影检测。

2 结果与讨论

2.1 特异性切割 12-LO 的核酶基因的设计和合成

分析 12-LO mRNA 序列, 确定 GUC 的位置。孙仑泉等^[4]认为将核酶切割底物的靶位点设计于起始密码子附近, 所构建的核酶在体内将有较高的活性。我们在 12-LO 上找出离 AUG 最近的 GUC 位点(92 位), 以此为核酶最佳切割位点, 使其能最有效地切割 12-LO, 阻断 12-LO 的表达。核酶识别区碱基配对的长度及类型(G-C 或 A-T 配对)直接影响到核酶的特异性。因此设计核酶时, 适当加长识别区两侧侧臂碱基配对的长度, 图 1 示所设计的核酶(Rz)及其在 12-LO mRNA 作用的位点。通过 Rz 催化中心 20 位的 G 改变为 U, 作为没有切割活性的突变核酶(mRz), 以之为对照(图 1)。

2.2 核酶基因的克隆

通过粘端连接将核酶插入到 pGEM-3Zi(+)的 SalI 位点。酶切鉴定筛选出阳性克隆。挑选出几个重组质粒进行序列测定。筛选出特异性切割 12-LO mRNA 的核酶基因克隆(pGEMRz)。其全长序列与设计的序列一致, 处于 T7 启动子下游。

2.3 核酶体外活性测定

核酶对 12-LO mRNA 的体外切割活性测定表明在生理温度 37 $^{\circ}$ C 下, 100 nmol/L 核酶与过量的不同浓度的底物混合, 保温 1 h(见图 2)。核酸能有效

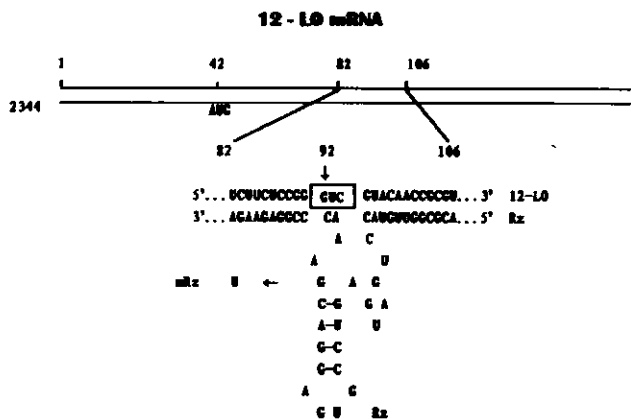


图 1 锤头状核酶与 12-LO mRNA 作用模式图

Fig.1 Construction of anti-12-LO ribozyme

地切割 12-LO RNA 片段, 且随着底物浓度的增加, 切割产物也随之增加, 而底物自身保温(图 2-1)及底物和 mRz 混合保温(图 2-8)无任何切割物产生。

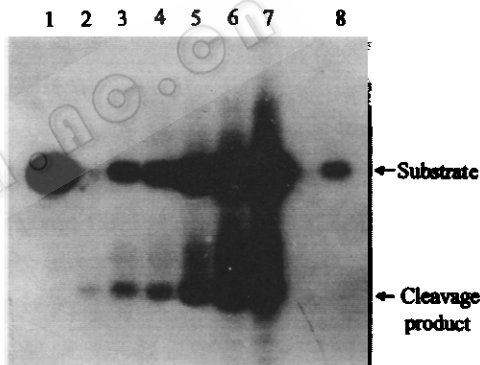
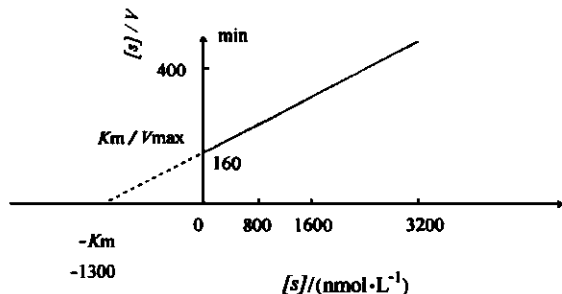


图 2 100 nmol/L 核酶在 37 $^{\circ}$ C 下与不同浓度的底物反应的结果

Fig.2 *In vitro* cleavage of 12-LO RNA by 100 nmol/L ribozyme with different concentrations of substrate at 37 $^{\circ}$ C for 1h. 1. Substrate incubated alone; 2~7. Ribozyme incubated with 100 nmol/L, 200nmol/L, 400nmol/L, 800nmol/L, 1600nmol/L, 3200nmol/L substrate respectively; 8. mRz incubated with substrate.

通过 Hanes 作图法, 求得 K_m 值为 1300 nmol/L (下图)。



我们用 100 nmol/L 核酶与过量底物混合测定了不同时间下, 核酶对底物的切割作用(见图 3)。根据

$k_{cat} = V_{max}/[Rz]$ 得到 $k_{cat} = 0.083/\text{min}$ 。

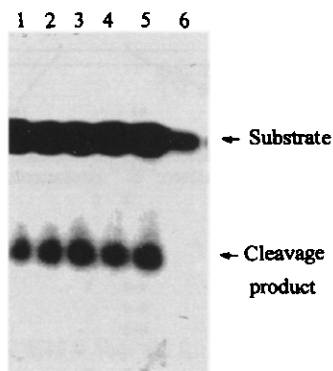
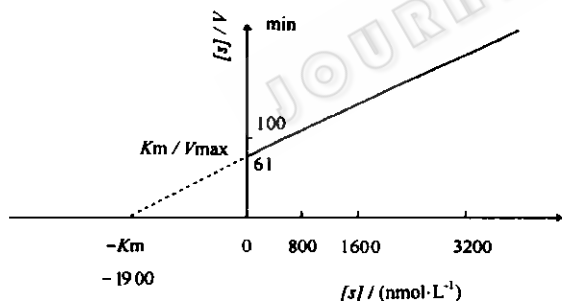


图3 100nmol/L核酶在37°C不同时间对12-LO mRNA的切割

Fig. 3 Time course of *in vitro* cleavage of 12-LO RNA by 100 nmol/L ribozyme with 10 $\mu\text{mol/L}$ substrate at 37°C. Ribozyme was incubated with its substrate for 5 (lane 1), 10 (lane 2), 20 (lane 3), 40 (lane 4), 60 (lane 5) min respectively, lane 6, substrate incubated alone.

我们试验了100 nmol/L核酶与过量的不同浓度的底物混合,检测了所设计的核酶在50°C对12-LO mRNA的切割活性。图4显示的结果表明,50°C时的Rz切割活性比37°C时高得多,通过Hanes作图法(下图),求得Rz在50°C时的 K_m 值=1900 nmol/L, k_{cat} = 0.31/min。



Ribozyme Which Specifically Cleave 12-lipoxygenase mRNA: *In vitro* Activity and Its Dynamics

LIU Can-hui SUN Lun-quan TIEN Po

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The ribozyme gene which specifically cleaved 12-lipoxygenase mRNA was designed, synthesized and cloned according to hammer-head ribozyme model. A 25-bp-long segment of 12-lipoxygenase mRNA was chemically synthesized as substrate, which was incubated with transcribed ribozyme RNA to detect its cleavage activity *in vitro*. The results showed that the ribozyme had a relatively high cleavage activity against 12-lipoxygenase mRNA segment at 37°C. Its k_{cat} value and K_m value was 0.083/min and 1300 nmol/L respectively. The ribozyme had a very high activity at 50°C and its k_{cat} value was 0.31/min.

Key words 12-lipoxygenase, hammer-head ribozyme, *in vitro* cleavage activity, dynamics

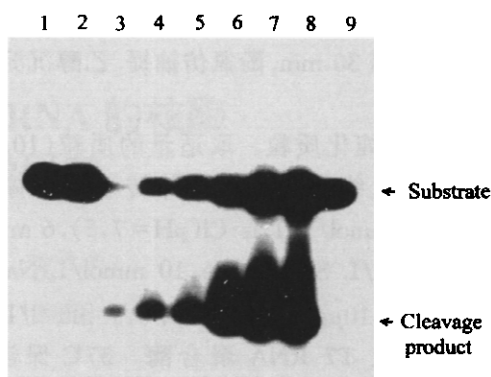


图4 50°C 100nmol/L核酶与不同浓度的12-LO mRNA反应1h的结果

Fig. 4 *In vitro* cleavage of 12-LO RNA by 100 nmol/L ribozyme with different concentrations of substrate at 50°C for 1h.

1~2. Substrate incubated alone; 3~8. Ribozyme incubated with 100 nmol/L, 200 nmol/L, 400 nmol/L, 800 nmol/L, 1600 nmol/L, 3200 nmol/L substrate respectively; 9. mRz incubated with substrate

以上结果表明,我们所设计的核酶具有极高的在外切割活性。目前我们已将该核酶连接到pSV2质粒上,并试图导入红白血病细胞(HEL),以检测其体内切割活性。

致谢 衷心感谢王小凤研究员和庄蔚华小姐在准备本文中给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] Sarver N, Cantin E M, Chang P S *et al.* *Science*, 1990, 247: 1222~1225
- [2] Yang X C, Yie Y, Zhu F *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 4861~4865
- [3] Haseloff J, Gerlach W L. *Nature*, 1988, 334: 585~591
- [4] Sun L Q, Wang L, Gerlach W L *et al.* *Nucl Acid Res*, 1995, 23: 2909~2913