生物工程学报12(增刊):40～46,1996
Chinese Journal of Biotechnology

修饰和导入技术对于反义寡核苷酸的影响

周 毅 陆长德*
(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 合成了3′末端三个磷酸二酯键硫代修饰的针对DNA聚合酶α的反义核苷酸ASα,利用[^{3}H]TdR参入方法测定了ASα对于HeLa细胞DNA复制的抑制效力。结果表明,这种修饰明显增强了寡核苷酸在含血清的细胞培养液中的稳定性。Lipofectin能够促进ASα的入胞并且增强其抑制效力。DEAE-Dextran也能提高ASα的效力。

关键词 反义寡核苷酸,稳定性,入胞,代谢,Lipofectin,DEAE-Dextran

反义技术是一门新兴的技术。它利用合成的寡核苷酸与靶RNA结合来抑制靶基因的表达。这项技术的特点在于原理简单,而专一性很强,这一专一性来源于反义核酸与靶RNA结合时碱基配对的高度专一性[1]。只要知道靶基因的序列即可设计出相应的反义寡核苷酸,因此是一种方便而准确地研究细胞内各种过程的分子机理的良好工具,也是一种很有潜力的治疗手段,前景十分广阔。

反义技术应用的时间还很短,仍存在许多问题有待解决。影响反义寡核苷酸效力的一个主要问题是寡核苷酸的稳定性,由于在胞内和细胞培养液中存在各种核酸酶,会将寡核苷酸迅速降解,影响了寡核苷酸的效力[2]。另外一个重要问题是寡核苷酸进入细胞的问题。寡核苷酸必需首先通过细胞膜和溶酶体膜才能到达靶位点。这对于分子量约为7000的寡核苷酸是十分困难的[3]。使用修饰寡核苷酸提高其稳定性和使用特殊的导入技术帮助寡核苷酸进入细胞是提高反义寡核苷酸抑制效力的有效方法。DNA聚合酶α是细胞DNA复制必需的酶,抑制DNA聚合酶α的效果可以很容易地通过[^{3}H]TdR参入来检测。我们利用针对DNA聚合酶α的反义寡核苷酸研究了寡核苷酸的修饰和导入技术对于寡核苷酸的稳定性,入胞,代谢和抑制效力等方面的影响。结果表明,3′末端三个磷酸二酯键硫代修饰可以大大增强寡核苷酸对于3′核酸外切酶的抗性,显著提高寡核苷酸在含5%血清的细胞培养液中的稳定性。Lipofectin可以明显提高寡核苷酸进入HeLa细胞的能力,对于其抑制效力有较大促进作用。DEAE-Dextran也能够促进寡核苷酸的效力。

1 材料和方法

1.1 材料

国家自然科学基金资助项目。
*通讯作者。
本文于1995年12月15日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

HeLa细胞由本所汪垣组惠赠。[^{3}H]TdR购自上海原子核所。[γ-^{32}P]ATP购自Amersham公司。新生小牛血清购自杭州四季青生物制品工程公司。DMEM和Lipofectin购自Gibco-BRL公司。DEAE-Dextran转染试剂盒,DNase Ⅰ,T4 PNK购自Promega公司。其他试剂均为国产分析纯。

闪烁液(%):甲苯　70,Triton-X100　30,PPO　0.5,POPOP　0.03。

1.2　方法

1.2.1　寡核苷酸的设计:根据已经发表的DNA聚合酶α序列[4],按照T_m值高,自身互补少,靶区域mRNA的二级结构弱的原则。合成了针对DNA聚合酶α的反义寡核苷酸ASα(CATGG TCCCG AATCT CCCG * A * T * T, * 处为硫代的位置),另外还合成了在HeLa细胞中无靶位点的对照寡核苷酸C1(AAGGT CCATT AGCTG CAAA * G * A * T)和未修饰的寡核苷酸PO(TTAGG TGACA CTATA)。

1.2.2　寡核苷酸的合成:用亚磷酰胺三酯法在ABI公司391EP型DNA合成仪上进行。磷酸基团上的硫代修饰通过在合成中以硫代试剂硫化代替氧化来实现[5]。

1.2.3　寡核苷酸的纯化:合成产物上DE52柱,以0.2mol/L NH_4HCO_3洗去杂质。寡核苷酸最后用1 mol/L NH_4HCO_3洗脱下来,冷冻抽干至NH_4HCO_3全部挥发,酒精沉淀两次,溶于PBS(%)(KH_2PO_4 0.02, $K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.29, NaCl 0.8, KCl 0.02, pH7.2)中待用。

1.2.4　寡核苷酸的标记:纯化的寡核苷酸用T4 PNK标记5′端:

寡核苷酸　1μl(1μg),10×PNK buffer 1μl, H_2O 7μl, T4 PNK 0.5μl(5u),[γ-^{32}P]ATP 0.1μl(1μ Ci),37℃保温1h。

1.2.5　寡核苷酸的稳定性测定:寡核苷酸用T4 PNK和[γ-^{32}P]ATP标记5′端之后,加入50μlDMEM中。以冷的寡核苷酸补加至终浓度5μ mol/L。加入血清至5%,或者蛇毒磷酸二酯酶(SPD)至100u/ml,或者DNaseI 100u/ml。37℃保温至一定时间,取出10μl与等体积上样缓冲液(98%甲酰胺,10mmol/L EDTA,0.025%二甲苯蓝FF,0.025%溴酚蓝)混合,−20℃冷冻保存。20%聚丙烯酰胺/尿素凝胶电泳,放射自显影。用光密度计扫描X光片确定全长寡核苷酸的量。

1.2.6　细胞培养:HeLa细胞培养于DMEM培养液(含5%血清,10u/ml青霉素,10μg/ml链霉素),在37℃,5% CO_2的培养箱内培养。

1.2.7　寡核苷酸的导入:HeLa细胞用预热的PBS洗涤一次,加入寡核苷酸或者寡核苷酸/Lipofectin或者寡核苷酸/DEAE-Dextran/氯喹混合物(具体浓度见文中说明),37℃温育2h,吸出培养液,加入预热的新鲜DMEM培养液(含5%血清)继续培养。

1.2.8　细胞内寡核苷酸的检测:先用PBS将细胞洗两次,加入预冷的洗脱液(0.2mol/L乙酸,0.5mol/L NaCl, pH2.5)于4℃处理10min[6],再用PBS洗一次。以TES(20mmol/L Tris-HCl pH8.0,10mmol/L EDTA,1%SDS)裂解细胞。将裂解液用氯仿抽提两次,乙醇沉淀后溶解于TE,20%聚丙烯酰胺/尿素凝胶电泳,放射自显影。用光密度计扫描X光片确定全长寡核苷酸的量。

1.2.9　[^{3}H]TdR脉冲标记和参入的测定:HeLa细胞在96孔培养板中培养一定时间后,每孔加入0.1μ Ci[^{3}H]TdR,混匀后,37℃培养1h。吸出培养液、甲醇固定10min、PBS洗

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

涤，10%TCA 固定 3 次(分别为 10,5,5min)，用 100μl 0.3mol/L NaOH，1%SDS 裂解。加入 20μl 1.5mol/L HCl 中和，与 1ml 闪烁液混合。液闪测定 dpm。

2 结 果

2.1 寡核苷酸的稳定性、入胞及代谢过程

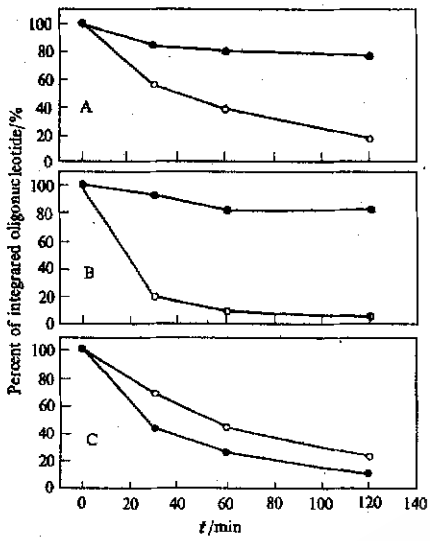

图 1 寡核苷酸的稳定性

Fig.1 Stability of oligonucleotide

A. 5% serum B. SVPD(100u/ml)

C. DNase I(100u/ml)

—●— ASα —○— PO

2.1.1 寡核苷酸的稳定性：我们研究了寡核苷酸在各种条件下的稳定性。图 1A 显示末端修饰的寡核苷酸 ASα 在含有 5% 血清的 DMEM 培养液中基本稳定，在 2h 之内仅少量降解，甚至直至 24h 后仍然有大约 40% 的全长寡核苷酸未降解(结果未出示)。相对来说，未修饰的寡核苷酸 PO 在含血清的培养液中十分不稳定，保温 30min 之后已有大约 50% 被降解，在 2h 之内基本降解完全。这些结果显示寡核苷酸的 3′末端硫代确实显示增强了寡核苷酸在含血清的培养液中的稳定性。

图 1B 显示了寡核苷酸在 3′外切核酸酶(蛇毒磷酸二酯酶 SVPD)存在时的稳定性。在 30min 之内，未修饰的寡核苷酸 PO 已经基本完全降解，而 ASα 经过 2h 处理仍然有 80% 没有降解。这表明寡核苷酸 3′末端硫化使得寡核苷酸对于 3′外切核酸酶的抵抗力大大增加。

图 1C 所示为寡核苷酸在 DNaseI(内切核酸酶)存在时的稳定性。从结果来看，3′末端硫代不能增加寡核苷酸对于内切核酸酶的抵抗力，ASα 和 PO 都在 2h 之内基本完全降解。

有报道称阳离子脂质体能够提高寡核苷酸的胞内稳定性。我们检测了 Lipofectin 对于寡核苷酸是否能够起到保护作用。结果表明，简单地把寡核苷酸与 Lipofectin 混合，由于寡核苷酸只是结合在 Lipofectin 的外表面，不能避免核酸酶的降解(结果未出示)。因此我们推测，寡核苷酸胞内稳定性的提高可能是由于脂质体帮助寡核苷酸迅速离开含有大量核酸

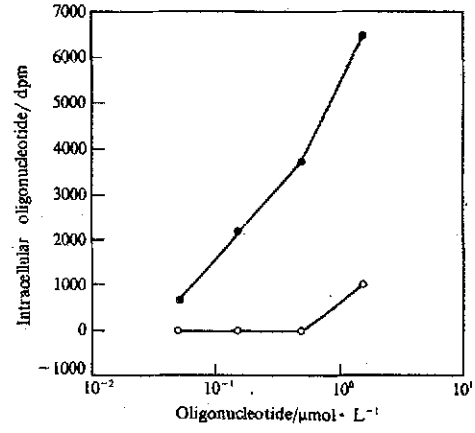

图 2 Lipofectin 对于细胞摄取寡核苷酸的影响

Fig.2 Effect of Lipofectin on the cellular uptake of oligonucleotide

—●— Lipofectin + ASα, —○— ASα

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

酶的溶酶体,减少了寡核苷酸的降解的缘故。

2.1.2 Lipofectin 对于寡核苷酸入胞的影响:图 2 表明,在使用的不同寡核苷酸浓度下,Lipofectin 都能帮助提高寡核苷酸进入细胞的能力。如果不加入 Lipofectin,胞外寡核苷酸浓度即使达到 1.5μ mol/L,胞内的寡核苷酸仍然很少,加入 Lipofectin 后,胞内寡核苷酸的量也逐渐增加。

2.1.3 寡核苷酸的胞内代谢:寡核苷酸导入细胞之后,如果去掉培养液中的寡核苷酸,虽然那些与细胞表面结合的寡核苷酸仍然有可能进入细胞,但胞内的全长寡核苷酸仍然会逐渐减少(见图 3)。一个原因是寡核苷酸会被降解,另一个原因是寡核苷酸可以通过外排作用排出胞外。

寡核苷酸导入细胞后,出现一些分子量大大增加的产物,这些产物随着时间的延长越来越多(见图 3)。如果是同位素参入胞内的分子一般不会形成均一的少数几个带。从分子量来看,它们接近于寡核苷酸的多聚体,可能是寡核苷酸连接成的二聚体和三聚体以及环状分子。有一部分同位素参入到分子量很大的条带中,电泳之后停留在上样孔附近,这可能是寡核苷酸的降解产物重新参入到细胞的核酸之中形成的。另外,寡核苷酸标记之后虽然经过乙醇

图 3　寡核苷酸的胞内代谢

Fig. 3　Intracellular metabolism of oligonucleotide

ASα (0.1μ mol/L) and Lipofectin (10 μ g/ml) were mixed and added to cell, after 2 h, medium was replaced with DMEM (5% serum). Intracellular oligonucleotide was extracted at the indicated time and analysed. The incubation time for lane 1 ~ 4 were: 1, 5, 10, 20 h.

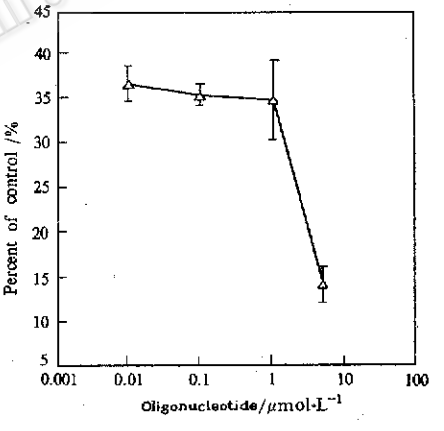

图 4　Lipofectin 对 ASα 抑制活性的影响

Fig. 4　Effect of Lipofectin on AS α inhibitory activity

HeLa cell was serum starved for 24 h, ASα and Lipofectin (20 μ g/ml) were mixed and added to cell. After 2 h, the medium was replaced with prewarmed DMEM (5% serum). Cell was incubated for an additional 16 h and the [^{3}H]TdR incorporation was measured. The control is ASα (without Lipofectin) at the same concentration. Set the [^{3}H]TdR incorporation amount of control as 100%.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

沉淀,仍然存在少量尚未参入的[γ-^{32}P]ATP,这些 ATP 也会进入细胞并参与细胞的代谢,使^{32}P 参入大分子中。

这种出现多聚体的情况已有报道。当 5′端为羟基的硫代寡核苷酸导入小鼠体内之后,也能发现这种现象[7]。这表明胞内存在某种多核苷酸激酶和连接酶,可将寡核苷酸末端磷酸化并连接起来。但是这与 5′端已有磷酸基团的寡核苷酸的连接速度有多大差异目前尚不清楚,因此可能 5′端用^{32}P 标记的寡核苷酸并不能很准确地反映寡核苷酸在细胞内的存在状态,这个问题还有待进一步研究。

2.2 导入技术对于寡核苷酸抑制效力的影响

2.2.1 Lipofectin 对 ASα 抑制效力的影响:在寡核苷酸浓度较低(<1 μ mol/L)时,由于 Lipofectin 的存在使得细胞的 DNA 合成比对照(无 Lipofectin)降低 60%左右(见图 4),这可以归因于 Lipofectin 的细胞毒性,因为此时寡核苷酸浓度太低,不具有抑制 DNA 合成的能力。在寡核苷酸浓度较高(>1μ mol/L)时,有 Lipofectin 比没有 Lipofectin 时的 DNA 合成降低 90%,这不能仅仅归因于 Lipofectin 的毒性,这表明在 Lipofectin 的帮助下,寡核苷酸表现出抑制活力。

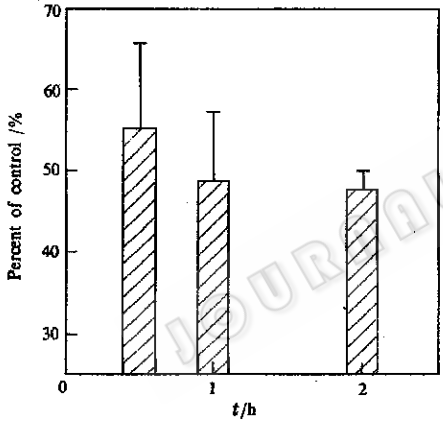

图 5 转染时间对于 ASα 抑制活性的影响

Fig. 5 Effect of treatment time on ASα inhibitory activity

HeLa cell was serum starved for 24 h, ASα (5 μ mol/L) and Lipofectin (20 μ g/ml) were mixed and added to cell. After the treatment, the medium was replaced with prewarmed DMEM(5% serum). Cell was incubated for an addtional 16 h and the [^{3}H]TdR incorporation was measured. The control is Lipofectin + C1. Set the [^{3}H]TdR incorporation amount of control as 100%.

2.2.2 转染时间对于抑制效果的影响:转染时间较短(0.5h),则抑制较弱(大约 45%),这表明 Lipofectin 的入胞也是需要一定时间的(见图 5)。但这个时间很短,大约 2h 已经基本足够(抑制大约 50%),说明 Lipofectin 介导的寡核苷酸入胞十分迅速,这与 Bennett 等人的结果一致[3]。

2.2.3 Lipofectin 的浓度对于抑制效果的影响:Lipofectin 的浓度高,抑制较强(见图 6)。但 Lipofectin 对细胞有一定毒性,浓度过高会导致细胞大量死亡。另外,Lipofectin 浓度继续提高,抑制效果的提高并不十分明显。

2.2.4 DEAE-Dextran 对 AS α 抑制效力的影响:DEAE-Dextran 能够促进 DNA 进入细胞,已被用于 DNA 的转染。我们也研究了其促进反义寡核苷酸抑制活力的能力,发现 DEAE-Dextran 与 Lipofectin 一样,也能促进反义寡核苷酸的抑制活力(比较图 4 和图 7)。从结果来看,DEAE-Dextran 也有一定的毒性(使细胞 DNA 合成下降 60%)。另外,两种导入方式的最大抑制效力大约都在 80%到 90%左右,这可能表明单个寡核苷酸不可能完全抑制靶基因的表达。不过,线粒体 DNA 的复制会导致[^{3}H]TdR 参入,因此抑制也不可能是十分完全的。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

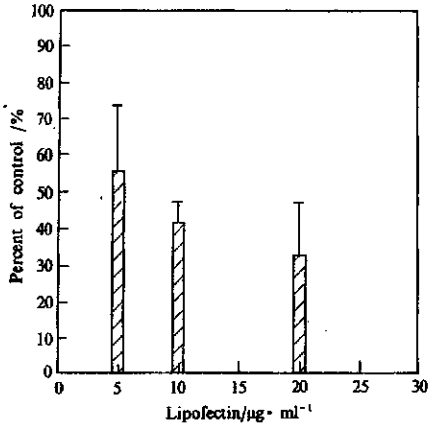

图 6　Lipofectin 浓度对 AS α 抑制活性的影响

Fig. 6　Effect of lipofectin concentration on ASα inhibitory activity

HeLa cell was serum starved for 24 h, ASα (5μ mol/L) and Lipofectin were mixed and added to cell. After 2 h, the medium was replaced with prewarmed DMEM (5% serum). Cell was incubated for an additional 16 h and the [^{3}H]TdR incorporation was measured. The control is Lipofectin + Cl. Set the [^{3}H]TdR incorporation amount of control as 100%.

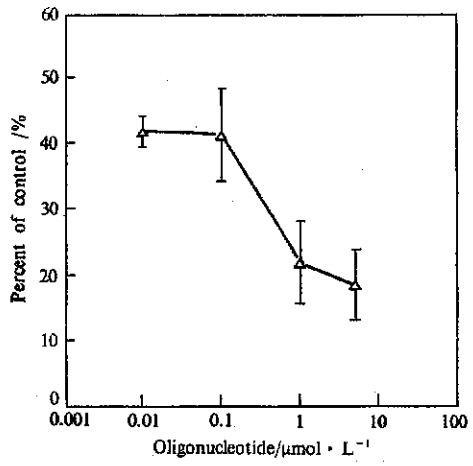

图 7　DEAE-葡聚糖对 AS α 抑制活性的影响

Fig. 7　Effect of DEAE-dextran on AS α inhibitory activity

HeLa cell was serum starved for 24 h AS α and DEAE-Dextran (250 μg/ml)/chloroquine (100 μ mol/L) were mixed and added to cell. After 2 h, the medium was replaced with prewarmed DMEM(5% serum). Cell was incubated for an additional 16 h and the [^{3}H]TdR incorporation was measured. The control is AS α (without DEAE-Dextran) at the same concentration. Set the [^{3}H]TdR incorporation amount of control as 100%.

3　讨论

我们对于寡核苷酸在应用当中遇到的各种问题进行了一些研究,取得了一些有用的结果。

寡核苷酸的稳定性对于其抑制效力有显著影响。天然寡核苷酸很容易被降解,因此效力较差。硫化寡核苷酸的稳定性很强,但是全部硫代的寡核苷酸可能产生一些非专一的抑制效应。血清中的核酸酶主要是 3′外切核酸酶[8],我们的结果表明,寡核苷酸 3′末端的硫化能够明显增强寡核苷酸在含血清的培养液中的稳定性。

据报道,阳离子脂质体如 Lipofectin 可以提高寡核苷酸进入细胞的速度,改变寡核苷酸在细胞内的分布,并能增强寡核苷酸的稳定性,从而大大提高寡核苷酸的抑制效力[3]。我们在 HeLa 细胞中研究了 Lipofectin 对 AS α 的导入作用。结果表明,利用 Lipofectin 导入寡核苷酸,使得寡核苷酸的胞内浓度大大增加。另外,ASα 的抑制细胞 DNA 合成的能力也是与 Lipofectin 密切相关的。这表明 Lipofectin 是一种有效的寡核苷酸导入试剂。但其细胞毒性很明显,价格很高,血清也会影响导入效果[9],这些因素都限制了它的应

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

用。

我们也证明 DEAE-Dextran 能够提高 AS α 的抑制效力。因此，DEAE-Dextran 也可以作为一种寡核苷酸导入试剂。

寡核苷酸导入技术能够明显提高反义寡核苷酸的抑制效力，减少寡核苷酸的用量，显著降低反义寡核苷酸应用时的成本，具有重要的实际意义。

参 考 文 献

[1]Wagner R W. Nature, 1994, **372**: 333～335.

[2]Hoke G D, Draper K, Freier S M. *et al*. Nucleic Acids Res. 1991, **19**: 5743～5748.

[3]Bennett C F, Chiang M Y, Chan H *et al*. Mol Pharmacol. 1992, **41**: 1023～1033.

[4]Pearson B E, Nasheuer H P, Wang T S F. Mol Cell Biol. 1991, **11**: 2081～2095

[5]Iyer R P, Phillips L R, Egan W *et al*. J Org Chem. 1990, **55**: 4693～4699.

[6]Lappalainen K, Urtti A, Soderling E *et al*. Biochim Biophy Acta, 1994, **1196**: 201～210.

[7]Agrawal S, Temsamani J, Tang J Y. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, **88**: 7595～7599.

[8]Shaw J P, Kent K, Bird J *et al*. Nucleic Acids Res. 1991, **19**: 747～750.

[9]Felgner P L, Gadek T R, Holm M *et al*. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84**: 7413～7418

Effect of Modification and Delivery Technology on Antisense Oligonucleotide

Zhou Yi Lu Changde

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai* 200031)

Abstract We have synthesized an antisense oligonucleotide, AS α, containing three phosphorothioate linkages at the 3′end, and measured its activity to inhibit DNA replication in HeLa cell using [^{3}H] TdR incorporation method. The results showed that this modification can significantly increase the stability of oligonucleotide in cell culture medium containing serum. Lipofectin can considerably enhance the cellular uptake and inhibitory activity of ASα. DEAE-Dextran can also enhance the activity of ASα.

Key words Antisense oligonucleotide, stability, cellular uptake, metabolism, lipofectin, DEAE Dextran

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn