

DNA-EGS1386 胞内诱导核酶 P 抑制人巨细胞病毒 UL49 基因的表达

崔延伟, 曾志锋, 李弘剑, 李月琴, 周琪, 杨丹, 邹奕, 杨光, 周天鸿

暨南大学生命科学技术学院 基因工程药物国家工程研究中心, 广州 510632

摘要: 外部引导序列(EGSs)是一类与 mRNA 靶序列互补并能引导核酶 P 切割靶 mRNA 的小分子 RNA。本实验构建稳定表达 UL49 基因的 HeLa 细胞系, 设计合成了针对于人巨细胞病毒(HCMV)UL49 基因的 12 nt DNA 性质的 EGS1386, 通过转染稳定表达 UL49 基因的细胞系, 荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测细胞内目的基因 UL49 的表达情况。结果显示在 DNA-EGS1386 作用下 UL49 基因的表达量降低了 50%, 表明 DNA-EGS1386 可以有效引导人的核酶 P 切割目标 mRNA。因此, DNA-EGS 可以发展成为一种新的基因沉默技术和潜在的抗病毒试剂。

关键词: 短的 EGS, 基因沉默, UL49 基因, 核酶 P

DNA-EGS1386 in cells induced RNase P inhibits the expression of human cytomegalovirus UL49 gene

Yanwei Cui, Zhifeng Zeng, Hongjian Li, Yueqin Li, Qi Zhou, Dan Yang, Yi Zou, Guang Yang, and Tianhong Zhou

National Engineering Research Center of Genetic Medicine, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: External Guide Sequences (EGSs) represents a novel nucleic acid based gene interference approach to modulate gene expression. They are oligonucleotides that consist of a sequence complementary to a target mRNA and recruit intracellular RNase P for specific degradation of the target RNA. DNA-based EGS1386 with a size of 12 nt was chemically synthesized to target the mRNA coding for the UL49 gene of human cytomegalovirus (HCMV). The DNA-based EGS1386 molecule efficiently directed human RNase P to cleave the target mRNA sequence *in vitro*. A reduction of more than 50% in the levels of UL49 expression was observed in human cells treated with the DNA-based EGS1386 targeted UL49 assayed by fluorescent quantization PCR and Western blotting. This results showed that the DNA-EGS1386 can effectively guide the RNase P cut the target mRNA. Therefore, DNA-EGS can develop into a new gene silencing technology and potential of the anti-viral reagents.

Keywords: miniEGSs, gene silencing, UL49 gene, RNase P

Received: July 12, 2009; **Accepted:** September 11, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 90608024, 30370776), Key Science and Technology Project of Guangzhou (No. 2006J1-C0111), Planned Science and Technology Project of Guangdong Province(No. 2006B35502002), Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 36703), China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (No. 20080430845).

Corresponding author: Tianhong Zhou. Tel: +86-20-85223087; E-mail: tzth@jnu.edu.cn

国家自然科学基金(Nos. 90608024, 30370776), 广州市科技攻关项目(No. 2006J1-C0111), 广东省科技计划项目(No. 2006B35502002), 广东省自然科学基金重点项目(No. 36703), 中国博士后科学基金资助项目(No. 20080430845)资助。

人巨细胞病毒(HCMV)属于疱疹病毒 β 亚族,在自然界中普遍存在,具有严格的种属特异性^[1-3]。HCMV 的病毒体包含一个二十面体衣核,内有基因组 DNA,外部有一个皮层包裹,最外层是含病毒糖蛋白的脂质双分子层^[4]。HCMV 感染正常机体后,可持续存在或终生潜伏在机体的某些组织或器官,病毒在潜伏期与机体保持相对平衡状态,机体不表现临床症状,一旦平衡状态被破坏,则出现 HCMV 的临床症状^[5]。HCMV 的感染在全世界非常普遍,西方社会人群中血清阳性率为 60%~70%,非洲和亚洲的一些地区血清阳性率达到 100%^[6]。

反义技术是一种无论在基础研究还是临床应用方面都非常有前景的一种基因打靶技术^[7]。通常的反义寡核苷酸被当作一种抗 HCMV 的因子,抑制 HCMV 生长所必需的一些基因,从而达到抗 HCMV 的作用。外部引导序列(EGSs)是一种能与核酶 P 结合或者与核酶 P 的催化性 RNA 亚单位结合,沉默目的基因表达的寡聚核苷酸^[8-9]。核酶 P 是一个核糖核蛋白复合体,它切割 tRNA 的前体,使其产生 5'端成熟的 tRNA,人的核酶 P 至少含有 9 个多肽和一个 RNA 亚单位^[10-12]。核酶 P 可以识别通常的 tRNAs 结构,催化 tRNA 的前体发生水解反应去掉 5 端引导序列(图 1A)。EGS 可以和目的基因 mRNA 通过碱基配对结合,形成类似于 tRNA 前体的结构(图 1B),引导核酶 P 对目的基因进行切割,达到沉默目的基因的目的。而且这种切割是高度特异性的,不会产生不必要的切割^[8-13]。

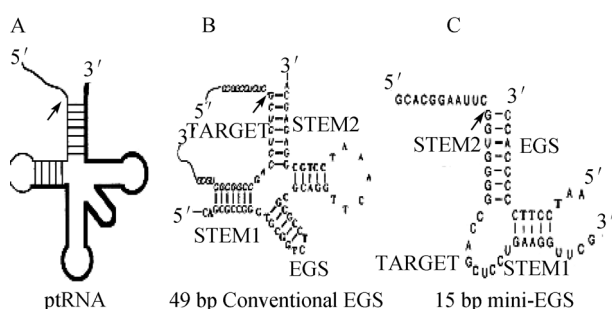


图 1 核酶 P 作用示意图^[8,14]

Fig. 1 Schematic representation of substrates for RNase P^[8,14]. (A) A natural substrate (ptRNA). (B) A hybridized complex of a target RNA (mRNA) and a conventional EGS. (C) A hybridized complex of a target RNA (mRNA) and a mini EGS.

本实验设计的 mini EGSs (图 1C)含有 12~15 个碱基,在培养的细胞中诱导 HCMV UL49 基因的沉默。Liu 等利用 BAC 技术,对 HCMV TOWN 株中 ORF 基因进行分析,结果证明 UL49 基因为 HCMV 生长所必需基因,敲除 UL49 基因后就会抑制 HCMV 病毒的复制、繁殖^[15],但 UL49 基因的功能还没有被完全揭示。因此,本实验选取 UL49 基因作为研究对象,检测 EGSs 在细胞中抑制 UL49 基因的表达情况。

1 材料和方法

1.1 实验材料

质粒 pcDNA3.1、Trizol、LipofectamineTM 2000、DMEM 购自英韦创津公司。*E. coli* DH5a 为本实验室保存。Premix Ex Taq、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、RNA 酶抑制剂、RNase-free DNase I、SYBR Premix Ex TaqTM、dNTPs 均购自大连宝生物公司。质粒提取试剂盒和 PCR 纯化试剂盒购自 Omega 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 pcDNA3.1-UL49-Myc 重组质粒的构建

根据 pcDNA3.1 质粒说明书构建重组质粒 pcDNA3.1-UL49-Myc。根据 HCMV UL49 基因的序列设计 UL49 的上下游引物,UL49A: 5'-CACCGGA TCCATGGCCAGTCGTCGTCTC-3' (下画线的碱基显示 BamH I 酶切位点); UL49B: 5'-CGGTCTCGA GGACATGGGGCAGGCCGTG-3' (下划线的碱基显示 Xho I 酶切位点)。以 HCMV (AD169)基因组为模板,PCR 扩增 UL49 基因,扩增条件: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 60 s, 55°C 退火 40 s, 72°C 延伸 90 s, 30 个循环。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶分离后,用 DNA 凝胶纯化试剂盒对其进行纯化。pcDNA3.1 和 UL49 基因经 BamH I 和 Xho I 双酶切后用 T4 DNA 连接酶连接。

1.2.2 构建稳定表达 UL49 基因的细胞系

HeLa 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,细胞培养 24 h 后细胞生长汇合率约为 80%~90%。6 mg 重组质粒 pcDNA3.1-UL49-Myc 与 100 μ L DMEM 混合,与此同时,8 μ L LipofectamineTM 2000 与 100 μ L DMEM

混合。两个混合物轻轻地混到一起, 室温孵育 20 min, 然后加到 6 孔板中, 在细胞培养箱中培养 6 h 后换成常规细胞培养基继续培养。pcDNA3.1 含有新霉素 (Neo) 抗性基因, 用 G418 对其进行筛选。HeLa 细胞在含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、100 U/mL 青霉素和 G418 (100 mg/mL) 的 DMEM 培养基中, 37°C、5% CO_2 饱和湿度培养箱培养。

1.2.3 DNA 性质 miniEGSs 的设计

miniEGSs 模型可以简化为两部分序列: 5'端序列(5'引导部分和 5'端接受茎序列)和 3'端序列(3'端接受茎序列和剩下的相似 tRNA 序列)(图 1B、1C)。miniEGS 邻近于 UUCR 序列的 stem 1 可以和 mRNA 杂交配对, stem 1 的长度大约是 5~6 个碱基。每个 EGS 都有 stem 2, stem 2 的 G 碱基是 3'切割位点, stem 2 含有 7~8 个碱基。本实验设计的 UL49-miniEGS 位于 UL49 基因的 1386 位, 1386~1410: GCCGTGTACGATCACCGGCTGGCT; UL49-miniEGS sequence: 5'-AGCCAGCACGGC-3'。同时设计了另外 2 个 DNA 性质的 miniEGSs: TK1-miniEGS 序列为 5'-CCTGCGGAGAGC-3', 突变的 miniEGS 序列为 5'-AGCCAGCACCCG-3'。这两个 miniEGSs 用来验证 miniEGSs 是否能正确的引导核酶 P 切割 UL49 基因的 mRNA。

1.2.4 miniEGSs 的转染效率

稳定表达 UL49 基因的 HeLa 细胞系建立以后, 把 HeLa 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 调整细胞浓度为 $7 \times 10^4/\text{孔}$ 。培养 48 h 后, 用 2 mL PBS 清洗细胞, 然后加入 1 mL 新鲜的细胞培养基, LipofectamineTM 2000/miniEGS 与 DMEM 的混合物加入到 6 孔板中, 细胞培养 3~5 h 后, 弃去上层液体, 加入 2 mL DMEM 培养基培养 24 h。用流式细胞仪检测 miniEGS 的转染效率, miniEGSs 合成时加上了 FITC 标签。

1.2.5 荧光定量 PCR

根据 Trizol 试剂的使用说明提取总 RNA, 然后用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。总 RNA 提取以后用 MML-V 反转录酶反转录为 cDNA。使用 ABI7300 荧光定量 PCR 仪对目的基因 UL49 进行荧光定量, 每个样品 4 个重复, ABI7300 软件自动生成目的基因的相对表达量, 内

参选用 β -actin 基因。UL49 上游引物: 5'-CGTTCTTGCGTCCTTCATCT-3', UL49 下游引物: 5'-CACAAAGTAGGGCTTGGTCAT-3'。 β -actin 上游引物: 5'-TCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG-3', β -actin 下游引物: 5'-ACTGCTGTACCTTCACCGTTCC-3'。荧光定量 PCR 反应条件: 94°C 变性 40 s, 52°C 退火 40 s, 72°C 延伸 40 s, 40 个循环。

1.2.6 Western blotting 分析

6 孔板中的细胞用 PBS 清洗 2 次后, 用 100 μL ~150 μL 细胞裂解缓冲液裂解细胞, 然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。分离完以后电转到 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 PVDF 膜, 4°C 封闭过夜。然后用 TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 然后加入一抗 (1:1000 Anti-Myc)。室温孵育 3 h 后用 TBST 清洗 3 次, 每次 15 min, 然后与二抗 (1: 5000 anti-mouse IgG-HRP) 孵育 50 min。内参使用 β -actin (1:200) 抗体。

2 结果与分析

2.1 稳定表达 HCMV UL49 的 HeLa 细胞系的建立

重组质粒 pcDNA3.1-UL49-Myc 经过双酶切和 PCR 鉴定, 测序。测序结果显示 UL49 基因成功插入 pcDNA3.1 载体中。pcDNA3.1-UL49-Myc 转染 HeLa 细胞后, 用新霉素对其进行筛选, 培养 4 周后采用 RT-PCR 和 Western blotting 对目的基因 UL49 进行分析。

RT-PCR 结果显示转染了重组质粒 pcDNA3.1-UL49-Myc 的细胞出现了比较强的 UL49 电泳条带, 而转染了空载体 pcDNA3.1 的细胞没有检测到任何条带, β -actin 作为内参(图 2A)。Western blotting 结果显示转染了重组质粒 pcDNA3.1-UL49-Myc 的细胞可以检测到 UL49 蛋白的表达, 而转染了空载体 pcDNA3.1 的细胞检测不到 UL49 蛋白的表达(图 2B), β -actin 作为内参。

2.2 DNA 性质的 miniEGSs 的设计

本实验设计的 DNA 性质的 miniEGS 作用位点位于 1.7 kb UL49 mRNA 的 1386, 1386~1410: GCCGTGTACGATCACCGGCTGGCT(图 3A)。UL49-miniEGS 序列: 5'-AGCCAGCACGGC-3'(图 3B), UL49-miniEGS

与 UL49 mRNA 通过碱基配对形成二级结构类似于 tRNA 的前体(图 3C)。实验另外设计了针对于 UL49 突变的 miniEGS, 把 UL49-miniEGS 序列中的 GGC 突变成 GTG (图 3 E), 它与 UL49 的 mRNA 部分配对(图 3D)。实验中还设计了针对于其他基因 HSV-1 TK 的 miniEGS(命名为 TK-1), 以验证 EGS 的特异性(图 3F)。

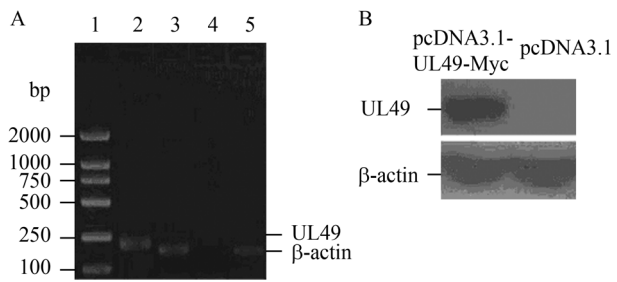


图 2 稳定表达 UL49 基因细胞系的建立
Fig. 2 Stable expression of UL49 in HeLa cells. (A) RT-PCR assay detected the UL49 gene in transfected HeLa cells. 1: DNA ladder DL2000; 2-3: UL49 and β-actin were amplified by RT-PCR assay. 4-5: negative control. (B) Western blotting assay of the expression of HCMV UL49 protein in transfected HeLa cells. Cells lysates were analyzed for UL49 by Western blotting with anti-Myc antibody or with anti-actin antibody as a normalizing control.

2.3 DNA 性质的 miniEGSs 抑制 UL49 基因的表达

化学合成的 DNA 性质的 miniEGSs(40 nmol/L) 与 Lipofectamine™ 2000 混合后转染 HeLa 细胞, 流式细胞仪检测 miniEGSs 转染效率达到 97.9% (图 4 A 和 B)。另外 2 种 miniEGSs 的转染效率分别达到了 97.6% 和 97.7%。

ABI 7300 SDS 软件自动生成目的基因的表达情况, 40 nmol/L 的 UL49-miniEGS 转染 HeLa 细胞后抑制 51% UL49 mRNA 的表达(图 5A), 40 nmol/L TK1-miniEGS 抑制 UL49 mRNA 的表达量为 10%左右(图 5A)。

同时, 实验用 Western blotting 检测 UL49 蛋白的表达水平, β-actin 作为内参。在转染 UL49-miniEGS 的 HeLa 细胞中目的蛋白 UL49 的相对表达量降低了 50%, 在 TK1 转染的 HeLa 细胞中 UL49 蛋白的表达量与阳性对照相比变化量很小(图 5B)。因此, 本实验设计的 DNA 性质的 UL49-miniEGS 可以有效地在 HeLa 细胞中抑制 UL49 mRNA 和蛋白的表达。

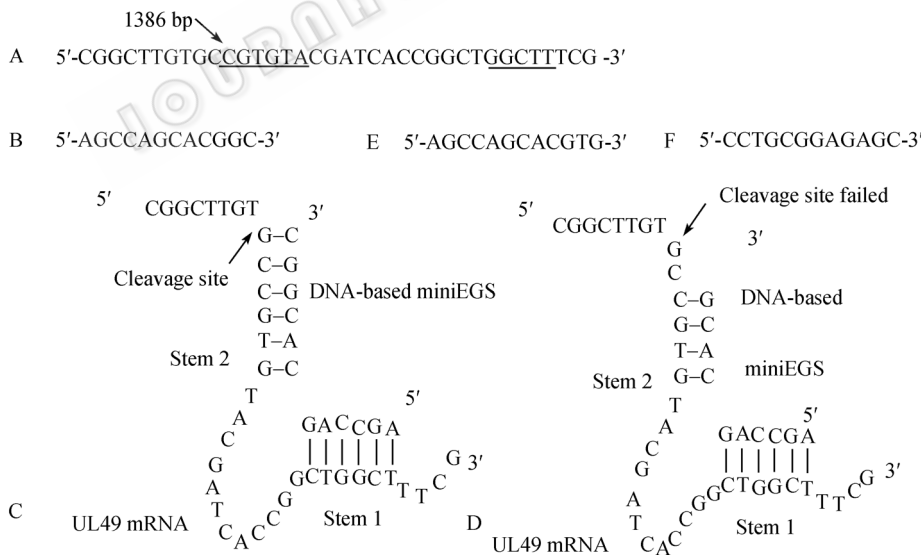


图 3 DNA 性质 miniEGSs 序列
Fig. 3 DNA-based miniEGS targeted UL49 mRNA. (A) UUCA motif and putative RNase P cleavage site. (B) Anti-UL49 DNA-based miniEGS (UL49-miniEGS). (C) Secondary structure formed by UL49 mRNA and miniEGS. (D) Secondary structure formed by UL49 mRNA and a mutational miniEGS. (E) Anti-UL49 DNA-based mutational miniEGS. (F) Anti-TK1 DNA-based miniEGSs (TK-1). The site of cleavage by RNase P is marked with an arrowhead.

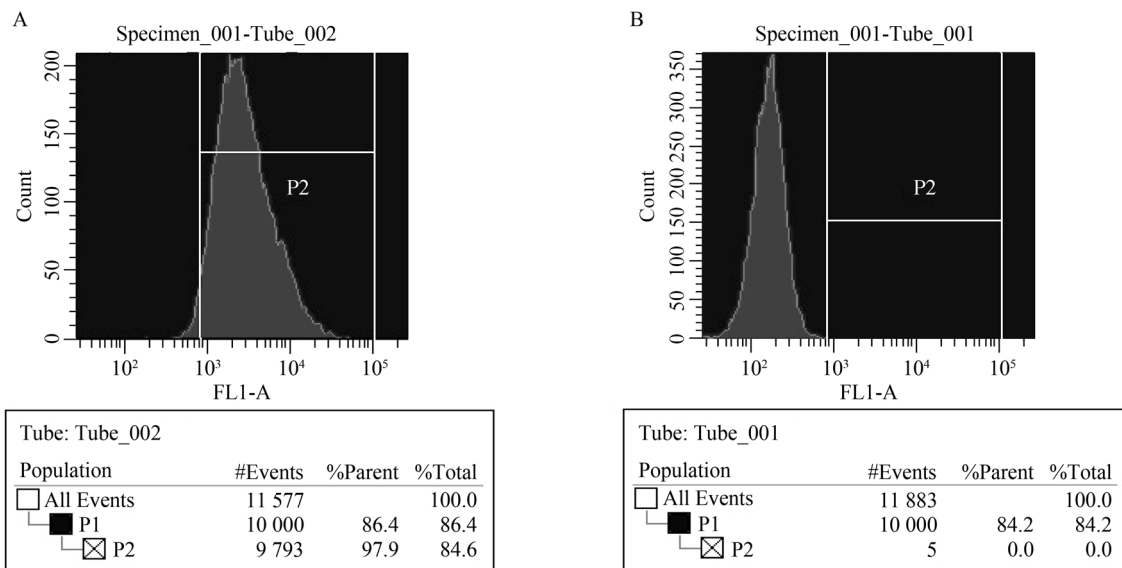


图 4 UL49-miniEGS 的转染效率

Fig. 4 Transfection efficiency of UL49-miniEGS. (A) The transfection efficiency of UL49-miniEGS is 97.9%. (B) Control.

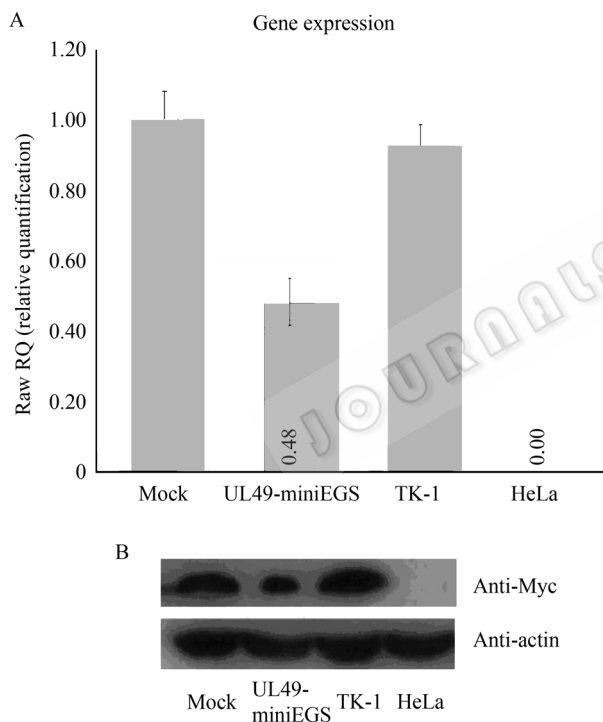


图 5 miniEGSs 转染细胞后抑制 UL49 表达情况

Fig. 5 Expression of UL49 mRNA and protein in DNA-based miniEGSs treated cell. (A) Fluorescent Quantitation PCR assay UL49 mRNA level treated with miniEGSs. (B) Western blotting assay the expression of UL49 gene treated with miniEGSs (40 nmol/L). The UL49-Myc protein and β -actin were analyzed by Western blotting with anti-Myc antibody or with anti-actin antibody as a normalizing control.

2.4 DNA 性质的 miniEGS 抑制作用依赖于核酶 P

为了进一步验证 miniEGS 抑制 UL49 的表达是

否依赖于序列特异性和核酶 P 的特异性切割, 本实验设计了一个突变的 miniEGS, 把核酶 P 作用位点对应的 miniEGS 定点突变, 然后转染稳定表达 UL49 的 HeLa 细胞(40 nmol/L)。采用荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测目的基因 UL49 的表达情况。结果显示目的基因 UL49 的相对表达量下降了不到 10%(图 6A、6B)。这个结果显示当核酶 P 对应的作用位点发生突变时, miniEGS 就不能有效地引导核酶 P 切割目的基因的 mRNA。miniEGS 的 3'端是非常重要的, 而且 miniEGS 抑制目的基因的表达是依赖于核酶 P 的。

2.5 DNA 性质的 miniEGS 抑制作用的剂量依赖性

为了进一步研究 miniEGS 抑制 UL49 的表达是否具有剂量依赖性, 本实验在稳定表达 UL49 的细胞系中转染了不同浓度的 UL49-miniEGS, 分别为: 10 nmol/L、20 nmol/L、40 nmol/L、80 nmol/L、160 nmol/L 和 320 nmol/L。荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测目的基因 UL49 的表达情况, 结果显示当 UL49-miniEGS 的浓度为 10 nmol/L 时, 抑制 UL49 的效率是 14%, 随着 UL49-miniEGS 浓度的升高, 抑制效率逐渐升高, 当 UL49-miniEGS 的浓度为 160 nmol/L 时, 抑制效率达到最高 80%, 此时浓度再升高, 抑制效率不变(图 7A、7B)。这个结果说明抑制 UL49 基因的表达具有 UL49-miniEGS 剂量依赖性。

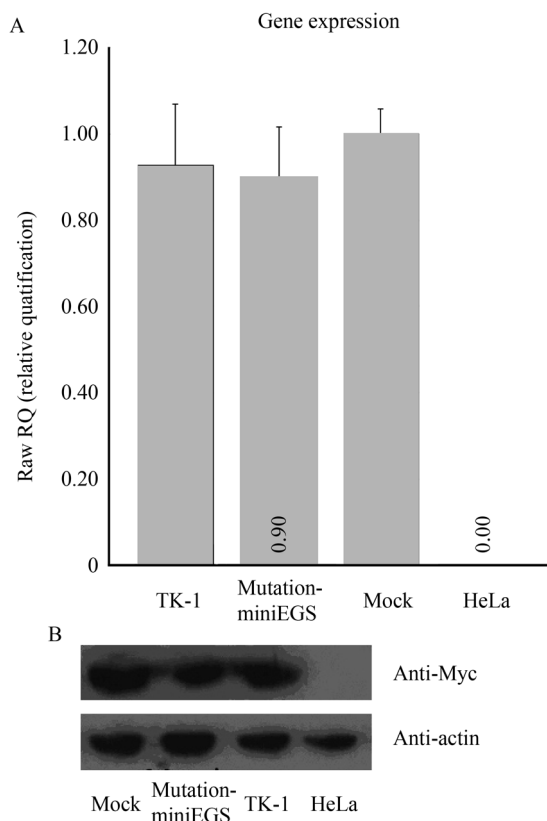


图 6 突变 miniEGS 的抑制效率

Fig. 6 Inhibition efficiency of mutational miniEGS in 40 nmol/L. (A) Fluorescent Quantitation PCR assay UL49 mRNA level treated with 40 nmol/L mutational miniEGS. (B) Western blotting assay the expression of UL49 gene treated with 40 nmol/L mutational miniEGS.

3 讨论

人巨细胞病毒在健康成人体内终身潜伏,不表现出症状。但是在新生儿和免疫妥协个体中经常出现高发病率和死亡率高。到目前为止,对 HCMV 的感染还未有理想的治疗药物和方法,目前临床上所使用的药物主要有更昔洛韦、膦甲酸和西多福韦等。这些药物主要是抑制病毒 DNA 的复制,更昔洛韦和西多福韦是核苷类似物,它们作为 DNA 链的终止剂,而膦甲酸通过焦磷酸酯结合位点抑制病毒 DNA 聚合酶的活性^[16]。这些药物被证实具有一定的抗病毒作用,但是这些药物的毒副作用大,而且近年来耐药毒株的出现,使得这些药物对 HCMV 感染的治疗效果非常有限^[17]。目前,反义治疗的研究在抗病毒研究方面开展的非常活跃,因此本实验采用外部引导序列(EGS)沉默 UL49 基因,以达到抗 HCMV 病毒

的作用。通常的 EGS 含有 50 nt 左右的碱基,而本实验设计的 miniEGSs 仅含有 12 nt 碱基,大大降低了成本,而抑制效率与 50 nt 左右的 EGS 相比并没有减弱,反而有所增强^[18]。

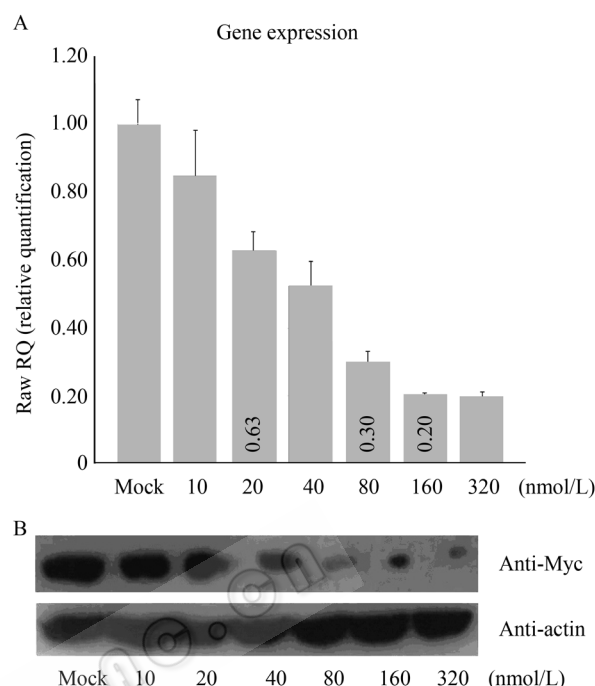


图 7 DNA 性质的 miniEGSs 抑制作用的剂量依赖性

Fig. 7 Inhibition directed by DNA-based miniEGSs is dose-dependent. (A) Fluorescent Quantitation PCR assay UL49 mRNA level treated with different dose UL49-miniEGSs. (B) Western blotting assay the expression of UL49 gene treated with different dose UL49-miniEGSs.

EGSs 技术在基因沉默方面代表了一个有魅力的途径,因为它引导内源性的核酶 P 高效地切割目的基因 mRNA,此外,EGSs 引导核酶 P 切割目的 mRNA 是高度特异性的,不会产生无关的切割^[19]。本研究采用外源给药的方式使 DNA 性质的 miniEGSs 引导内源核酶 P 切割 HCMV UL49 mRNA,达到抑制 UL49 基因的目的。实验结果显示 miniEGSs 在体外可以直接切割 HCMV UL49 mRNA 序列,抑制 UL49 的作用达到了 51%,而转染突变 miniEGS 或 TK1-miniEGS 抑制 UL49 的作用不到 10%。以上结果说明 miniEGSs 的抑制作用主要归功于核酶 P 的定点切割。此外,结果还显示 miniEGSs 可以容易地转染培养的人细胞,并且细胞在经过 EGS 处理后,并没有出现显著的毒性。

开发 EGSs 使其作为常规药物,最重要的是找

到最有效和最经济的寡核苷酸。本研究进一步促进了短的 EGSs 技术在基因打靶方面的应用, miniEGSs 技术无论在基础研究还是在临床治疗上, 包括 HCMV 感染的治疗上都将有广阔的发展前景。

REFERENCES

- [1] Martin S, Hans WD, Jindrich C. Human cytomegalovirus retinitis: pathogenicity, immune evasion and persistence. *Trends Microbiol*, 2003, **11**: 171–178.
- [2] Martin M, Hans WD, Jindrich C. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia*, 2009, **11**(1): 1–9.
- [3] Andrew JD, Aidan D, Parvis A, *et al.* The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*, 2003, **84**: 17–28.
- [4] Chee MS, Bankier AT, Beck S, *et al.* Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990, **154**: 125–169.
- [5] Teresa C. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol*, 2004, **14**: 5–9.
- [6] Mariana GB, Stephen SJ. Human cytomegalovirus infection of cells of hematopoietic origin: HCMV-induced immunosuppression, immune evasion, and latency. *Exp Hematol*, 2006, **34**: 555–570.
- [7] Diane KW, Wang J, Yuan Y, *et al.* Inhibition of viral gene expression by human ribonuclease P. *RNA*, 1998, **4**: 1397–1406.
- [8] Walter D, Phong T, Umair K, *et al.* RNase P-mediated inhibition of cytomegalovirus protease expression and viral DNA encapsidation by oligonucleotide external guide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 14831–14836.
- [9] Michael M, Lyuba B, Irina L, *et al.* Intracellular mRNA cleavage induced through activation of RNase P by nucleaseresistant external guide sequences. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(1): 58–61.
- [10] Yuan Y, Eun-seong HW, Sidney A. Targeted cleavage of mRNA by human RNase P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 8006–8010.
- [11] Zhou TH, Joseph K, Ahmed FK, *et al.* In vitro selection of external guide sequences for directing RNase P-mediated inhibition of viral gene expression. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 30112–30120.
- [12] Günter K, Rebeca G, Gina S, *et al.* External guide sequences Cross-clade inhibition of HIV-1 replication and cytopathology by using RNase P-associated. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 3406–3411.
- [13] Yang YH, Li HJ, Zhou TH, *et al.* Engineered external guide sequences are highly effective in inducing RNase P for inhibition of gene expression and replication of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**: 575–583.
- [14] Martina W, Eddie R, Jeffrey L, *et al.* Short oligonucleotides as external guide sequences for site-specific cleavage of RNA molecules with human RNase P. *RNA*, 1998, **4**: 847–855.
- [15] Walter D, Cassie C, Li H, *et al.* Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(24): 14223–14228.
- [16] Arianna L, Roberto R, Mary M, *et al.* Inhibition of human cytomegalovirus DNA polymerase by C-terminal peptides from the UL54 subunit. *J Virol*, 2003, **77**: 8336–8344.
- [17] Ohta H, Matsuda Y, Tokimasa S, *et al.* Foscarnet therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus retinitis after stem cell transplantation: effective monitoring of CMV infection by quantitative analysis of CMV mRNA. *Bone Marrow Transplant*, 2001, **27**: 1141–1145.
- [18] Zhang WJ. Inhibiting the expression of UL94 gene and the viral replication of HCMV by EGS. Guangzhou: Jinan University, 2006.
张文军. EGS 抑制 HCMV UL49 基因表达及病毒复制的研究. 广州: 暨南大学, 2006.
- [19] Su YZ, Li HJ, Li YQ, *et al.* In vitro construction of effective M1GS ribozymes targeting HCMV UL54 RNA segments. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, **37**(3): 210–214.