

# 对 HCMV *UL54* mRNA 片段特异性切割的 M1GS 构建\*

吕静竹 李弘剑 陈浩军 李月琴 周天鸿\*\*

(暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)

**摘要:** 人巨细胞病毒是一种 DNA 病毒, 在人群中一般呈亚临床感染和潜伏感染。为研究病毒基因沉默工具和抗病毒制剂, 以人巨细胞病毒 *UL54* 基因 mRNA 序列设计互补的外部引导序列, 共价结合到大肠杆菌来源 RNase P 催化核心 M1 RNA 上, 从而构建成 M1GS-T6 核酶。通过对 DNA 聚合酶 *UL54* 基因亚克隆片段转录产物体外切割研究, 证实该核酶具备对 *UL54* mRNA 片段的特异切割能力。

**关键词:** 人巨细胞病毒, *UL54* 基因, RNase P, 外部引导序列

**中图分类号:** R373 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0083-04

## Construction of M1GS for Targeted Cleavage of HCMV *UL54* mRNA Segments\*

LV Jing-Zhu LI Hong-Jian CHEN Hao-Jun LI Yue-Qin ZHOU Tian-Hong\*\*

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632)

**Abstract:** Human cytomegalovirus (HCMV) is a DNA virus and serious opportunistic pathogen for both newborn and immunocompromised individuals. To research technique for gene silence and antiviral agents, ribozyme M1GS-T6 was constructed from external guide sequences (EGSs) that consist of a sequence complementary to HCMV *UL54* gene RNA and M1 RNA, the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. The results showed that M1GS can efficiently cleave the mRNA sequence encoding *UL54* protein in vitro.

**Key words:** Human cytomegalovirus (HCMV), *UL54*, RNase P, External guide sequences (EGSs)

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 属  $\beta$  疱疹病毒亚科, 在自然界广泛存在, 具有严格的种属特异性。在免疫功能正常的人群中, 该病毒仅引起轻微的亚临床感染和潜伏感染, 而在免疫功能低下的人群中则可能导致严重的并发症以及高发病率和高死亡率<sup>[1]</sup>。目前研究发现, HCMV 感染造成的主要危害是引发移植感染、宫内感染, 导致胎儿流产、骨髓发育不良、畸形、智力低下等<sup>[2]</sup>。HCMV 基因组编码多达 208 个开放阅读框 (ORF), 许多基因的功能至今并不清楚。*UL54* 基因编码的 140kD 的 DNA 多聚酶为 HCMV 所必需, 是研究病毒感染机制的重要基因, 同时又可作为抗病毒治疗中良好的药靶<sup>[3]</sup>。

在研究病毒基因功能和药靶中, 人们经常利用基于反义技术的核酶。RNase P<sup>[4]</sup> 是目前发现的自然界中活性最高的核酶之一, 是细胞自身具备的天然核酶, 无显著细胞毒性。大肠杆菌来源 RNase P 包括一个 377nt 的 RNA 催化活性单位 (M1 RNA) 和一个约 119 氨基酸的碱性蛋白 (C5), 二者均为 RNase P 体内活性所必须<sup>[5]</sup>。在缺乏 C5 蛋白的体外环境下, M1 RNA 可以在高盐溶液中具备对底物 RNA 进行催化切割的活性。

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30370776)

广东省自然科学基金重大项目 (No. 36703)

广东省自然科学基金 (No. 021162, 000718)

作者还有: 唐冬生 张欣

\*\* 通讯作者 Tel: 020-85226386, E-mail: tzth@jnu.edu.cn

收稿日期: 2004-07-12, 修回日期: 2004-11-29

针对 HCMV *UL54* 基因设计外部引导序列 (EGS), 共价连接到大肠杆菌来源的 M1 RNA, 构建靶定切割 HCMV *UL54* 基因 mRNA 的 M1GS-T6 核酶, 为研究病毒基因沉默和抗病毒治疗新途径提供实验基础。

## 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 聚合酶、T4 DNA 连接酶、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 购自北京亚辉生物医学工程公司。

大肠杆菌 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 (Fenyong Liu, University of California, Berkeley) 惠赠; 载体质粒 pGEM3z 购自基因有限公司; 基因测序及寡核苷酸片段合成均委托上海基康生物技术有限公司; 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' -GT-GAATTCGG- TGGAGCGCGGGTCATCTAC-3'), 3' primer PU8 (5' -ACTAAGCTT-GCGTCGTCGTCGCC- ATC-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 线性化后成为转录模板。

### 1.3 核酶 DNA 模板的设计与制备

依据 GS 设计的通用原则<sup>[6]</sup>, 在 *UL54* 基因上找到符合要求的序列设计 EGS 序列: tgcaag aaacgta。利用该序列设计分离 M1GS-T6 核酶的 PCR 引物: 5' primer Oli T7 (5' -TAATACGACTCACTATAG-3') 和 3' primer Oli T6 (5' -TCGTGCAAGAAACGT TATGTGGAATTC-3'), 以 pFL117 为模板 PCR 实验得到含 T7 启动子的 M1GS-T6 前体 DNA 模板, 经 T4 DNA polymerase 处理后成为转录模板 DNA。

### 1.4 体外转录与产物纯化

参考基因有限公司 T7 RNA polymerase 相关说明, 转录 M1GS-T6 核酶和 *UL54* 基因 RNA 底物片段。转录完毕产物用 DNase I 消化 30min, 苯酚氯仿抽提 1 次, 乙醇沉淀 2 次。纯化产物保存于 80% 乙醇中待用。

### 1.5 体外切割反应

$\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP 标记的底物 RNA 加入大致等量 M1GS-T6 RNA, 空白对照不加核酶。两组样品均在反应 buffer B (50 mmol/L Tris pH 7.5, 100mmol/L NH<sub>4</sub>Cl, 100mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 中 37℃ 反应 30min, 加入等体积终止液<sup>[7]</sup> 终止反应, 用含 3% ~ 8% PAGE 的 7mol/L Urea 变性凝胶电泳分离, 放射自显影 2 ~ 8h。

## 2 结果

### 2.1 *UL54* 基因片段转录模板和核酶 DNA 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 GS 互补位点的 *UL54* 基因片段克隆至质粒 pGEM3z, 得到 UP54-D 亚克隆质粒。对重组质粒分别进行 PCR 和双酶切验证, 产物片段大小为 721bp, 与预期相符 (图 1A)。以 pFL117 质粒为模板, 5' primer Oli T7 和 3' primer Oli T6 为引物, PCR 实验得到含 T7 启动子-M1 RNA-GS 的

MIGS-T6 核酶 DNA 模板, 经 T4 DNA polymerase 处理后成为转录模板 DNA。对 PCR 产物电泳验证, 产物片段大小为 513bp, 与预期相符 (图 1B)。

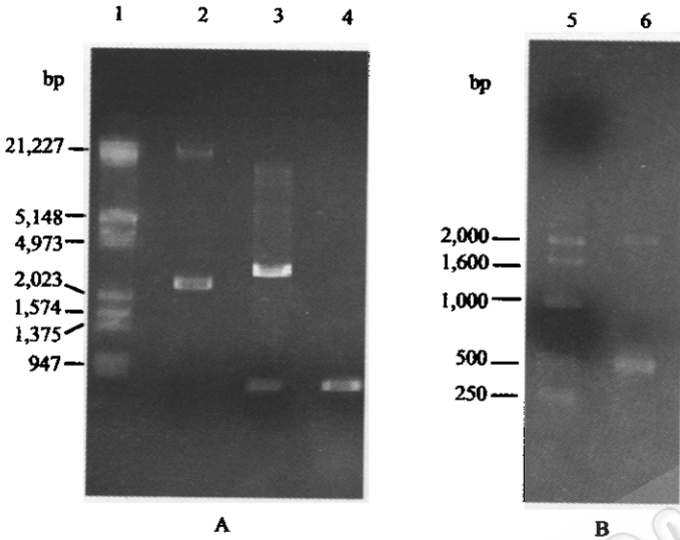


图 1 UP54-D DNA 模板与核酶 MIGS-T6 模板琼脂糖电泳鉴定图

- A: 1 λDNA/EcoRI + HindIII Marker, 2 UP54 - D 重组质粒,
- 3 UP54 - D EcoRI + HindIII 双酶切, 4 UP54 - D PCR 产物
- B: 5 DGL - 2000 Marker, 6 MIGS - T6 核酶模板 PCR 产物

### 2.2 核酶与底物的体外转录

按实验方法体外转录核酶和反应底物, 用 3% ~ 8% 的 7mol/L Urea 变性凝胶电泳分析转录产物, 经银染色可见体外转录所得 RNA 产物均为单一纯净电泳条带, 各片段大小与预期一致, 其中底物 UP54 - D RNA 长度为 726nt (图 2A), 长度为 495nt 的 MIGS - T6 RNA 含有 M1 RNA 和与 HCMV UL54 mRNA 互补的 EGS 序列 (图 2B)。

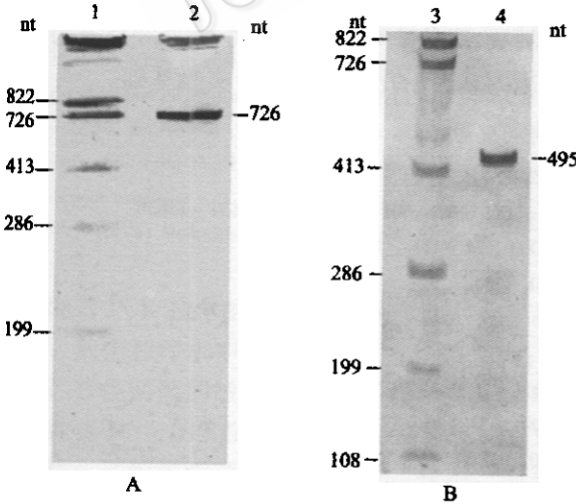


图 2 底物及核酶体外转录产物鉴定

- A: 1 RNA marker, 2 UP54-D RNA
- B: 3 RNA marker, 4 MIGS-T6

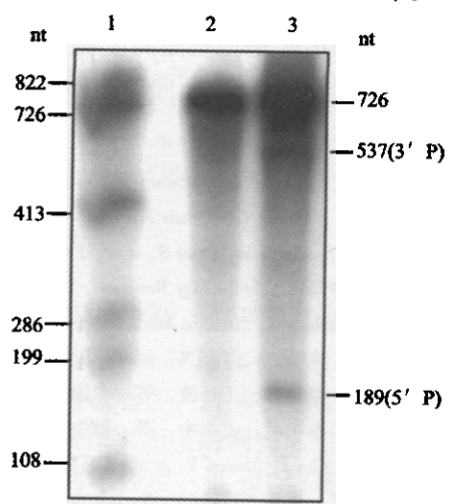


图 3 核酶 MIGS - T6 对 UP54 - D 体外转录产物特异切割放射自显影结果

- 1 RNA marker, 2 UP54 - D 空白对照,
- 3 UP54 - D + MIGS - T6

### 2.3 M1GS-T6 核酶对底物的体外切割

将 M1GS-T6 和 UP54-D 体外转录 RNA 进行体外切割反应, 切割产物用 5% PAGE 的 7mol/L Urea 变性凝胶电泳分离, 放射自显影 4h。结果显示 (图 3), 加入 M1GS-T6 的反应样品经 37℃/30min 切割后产生了两个产物片段, 其中 5' 产物 (5' P) 长度为 189nt, 3' 产物 (3' P) 长度为 537nt, 说明 M1GS-T6 在 GS 引导下对底物 RNA 产生了特异性切割。

### 3 讨论

HCMV 是广泛感染人类的重要病原之一, 几乎感染所有器官。过去几十年由于器官移植、肿瘤患者、艾滋病患者的大量增加使 HCMV 感染更为普遍, 并且感染致死率也明显上升。目前该病毒被认为与众多疾病的发生有关, 因此 HCMV 的感染已引起人们的极大关注。HCMV 病毒的大部分基因尚未知道功能<sup>[8]</sup>, 寻找合适的基因沉默技术是研究病毒基因功能的一个重要方面。本文以 *UL54* 基因为靶基因, 尝试基于 RNase P 核酶的基因沉默技术, 实验针对 HCMV *UL54* mRNA 片段切割的 M1GS-T6 核酶, 体外切割实验证明其具备切割活性与序列特异性。从图 3 的 3 泳道可以看出, 底物片段没有完全切开, 这是由于 M1 RNA 本身结构以及体外的条件限制, 难以达到 100% 的切割效率, 但该实验结果为体内的 Knockdown 技术提供强有力的基础, 这对研究病毒必需基因的功能是极为有利的。不过对于研究抗病毒制剂, 效率不高则需要进一步的改进, 最近有人利用 M1 RNA 的突变和二级结构的筛选, 证实可增加 M1 RNA 作用效率, 并有效地抑制 HSV 病毒的 TK 基因的表达和病毒的复制<sup>[9]</sup>, 因此可通过相应的改构来提高 M1GS-T6 的作用效率, 满足抗病毒制剂的要求。另外锤头状核酶与发夹状核酶等能对 HIV mRNA 进行切割并抑制病毒繁殖<sup>[10]</sup>, 但由于其效率和特异性都有一定的局限性, 使用基于 M1GS 核酶原理, 针对 HCMV 病毒 *UL54* 基因 mRNA 片段体外切割的靶向切割特性对于研制基因药物新途径有着特殊的意义。我们的研究结果显示, 针对 HCMV *UL54* 基因构建高度特异性与切割效率的 M1GS 核酶是可行的, 为胞内抑制 HCMV 复制及 M1GS 靶向抑制病毒基因表达的基因治疗策略奠定了实验基础。

### 参 考 文 献

- [1] Phong T, Manfred L, Edward N, et al. PNAS, 2000, 97 (11): 5812 ~ 5817.
- [2] Walter D, Phong T, Umair K, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (26): 14831 ~ 14836.
- [3] Markus W, Detlef M, Peter S, et al. J of Virology, 2000, 74 (22): 10729 ~ 10736.
- [4] Strid S. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23: 391 ~ 406.
- [5] Liu F, Sidney A. Nucleic Acids Research, 1996, 24 (14): 2690 ~ 2696.
- [6] Diane K, Wang J, Yan Y, et al. RNA, 1998, 4: 1397 ~ 1406.
- [7] 何华坤, 李月琴, 王波, 等. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12 (2): 8 ~ 10.
- [8] 韩俊, 李艳秋, 姜水中, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (2): 87 ~ 90.
- [9] Zhou T, Kim J, Ahmed F, et al. J of Biol Chem, 2002, 277 (33): 30112 ~ 30120.
- [10] Phong T, Amy W, Liu F. Nucleic Acids Research, 1999, 27 (23): 4590 ~ 4597.