

# 针对 I 型及 III 型前胶原基因的三联核酶的构建及体外活性研究

况二胜<sup>1</sup> 杨复华<sup>1\*</sup> 温淑娟<sup>2</sup> 向开军<sup>3</sup>

<sup>1</sup>( 武汉大学生命科学院分子病毒学实验室, 武汉 430072 ) <sup>2</sup>( 第一军医大学南方医院医学基因技术中心, 广州 510515 )

<sup>3</sup>( 中国科技大学生命科学院, 合肥 230027 )

**摘 要** 增殖性瘢痕组织中胶原蛋白的合成显著增加从而导致胶原的过度沉积。利用核酶特异地抑制前胶原基因的表达可减少胶原蛋白的合成, 为瘢痕的研究和防治提供了新的思路。为研究用核酶抑制前胶原基因表达的可能及效果, 设计并构建了针对  $\alpha_1(\text{I})$  型及  $\alpha_1(\text{III})$  型前胶原基因的二个单价核酶串联的三联核酶基因真核表达载体, 并对其体外切割活性进行研究。结果表明该三联核酶的切割效果明显, 均能有效地切割底物, 为进一步研究核酶对前胶原基因表达的抑制作用以及利用核酶防治瘢痕产生打下基础。

**关键词** 前胶原基因, 三联核酶, 体外切割活性

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0327-04

瘢痕形成是创面愈合的必然结果, 创面过度修复产生增生性瘢痕。一般认为瘢痕过度增生是由于创面愈合过程中胶原合成沉积超过降解消除的结果。在增殖性瘢痕组织中 I 型和 III 型胶原 mRNA 表达和产物显著上调, 使胶原过度沉积<sup>[1~5]</sup>。抑制前胶原基因的表达将有助于减少胶原的合成从而防止瘢痕形成, 并已有一些成功的策略<sup>[6,7]</sup>。核酶(Ribozyme)是一类具有催化活性的 RNA 分子, 可序列特异性地结合并切割靶 RNA, 从而抑制其功能<sup>[8~10]</sup>。利用核酶特异切割前胶原基因 mRNA, 抑制胶原蛋白合成是一种更为特异和直接的方法, 可直接研究前胶原基因在增生性瘢痕形成中的作用, 并可能发展出一些新的瘢痕防治策略和治疗药物。为研究用核酶抑制前胶原基因表达的可能及效果, 我们设计并构建了分别针对  $\alpha_1(\text{I})$  型及  $\alpha_1(\text{III})$  型前胶原基因第二外显子(Exon2)区域的 2 个单价核酶串联的三联核酶基因真核表达载体, 并在体外研究了核酶对各自靶 RNA 分子的切割活性及效果, 为将核酶用于体内(*in vivo*)抑制胶原的合成和防治瘢痕形成的研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DeepVent 购自 NEB 公司; 凝胶纯化试剂盒为 Clontech 公司产品, dNTP、Taq 酶、质粒提取试剂盒、

RNA 抽提试剂盒、T7 体外转录试剂盒和 pGEM-T 载体购自 Promega 公司。[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP(10uCi/ $\mu$ L) 购自北京亚辉生物医学工程公司。pCR3.1-T 载体购自 Invitrogen 公司; *E. coli* 菌株 DH5 $\alpha$  由本室保存。

### 1.2 引物

据 D'Alession 及 Chu 等报道<sup>[12,13]</sup>设计并合成  $\alpha_1(\text{I})$  型及  $\alpha_1(\text{III})$  型外显子 2 区域的引物各 3 条, 分别为 P I A、P I B、P I C 和 P III A、P III B、P III C, 与  $\alpha_1(\text{I})$  及  $\alpha_1(\text{III})$  型前胶原基因 Exon2, 部分互补的用以构建核酶基因的引物 P I L/P I R、P III L/P III R(表 1)。

### 1.3 核酶基因的构建

引物 P I L/P I R、P III L/P III R 在其 3' 端有 13nt 的互补碱基。配对延伸可得到完整的核酶基因(62bp)。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L: 引物各 0.1  $\mu$ g, 50  $\mu$ mol/L dNTP, 10  $\times$  PCR Buffer 5  $\mu$ L, 5u DeepVent 酶 92 $^{\circ}$ C 预变性 40s, 92 $^{\circ}$ C 20s, 40 $^{\circ}$ C 20s, 71 $^{\circ}$ C 20s, 10 个循环。产物于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳回收纯化后 5' 端添加磷酸基团, 然后用 T4 连接酶连接, 以连接产物作模板, P I L/P III R 为引物进行 PCR 扩增(PCR 反应体系为 50  $\mu$ L: 引物各 0.1  $\mu$ g, 50  $\mu$ mol/L dNTP, 10  $\times$  PCR Buffer 5  $\mu$ L, 5u Taq 酶 92 $^{\circ}$ C 变性 50s, 65 $^{\circ}$ C 退火 30s, 71 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 30 个循环)。产物于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳收获 124bp 的 DNA 片段。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The sequence of primers

P I A	5' CCAATCACCTGCGTACAGAAGC 3'
P I B	5' AGACGGGACAGCACTCGCCC 3'
P I C	5' CTTGGTCTCGTCACAGATCAGC 3'
P III A	5' CCTGAAGATGTCCTTGATGTGC 3'
P III B	5' CATCCTCCAGAAGCTGTGTAGG 3'
P III C	5' GAATTTGCTATTTCCCTTCAGCC 3'
P I L	5' AACACCTTGCCGTTGTCGCCACTGATGAGTCCGTGAGGAC 3'
P I R	5' GAGCCCTGCCGGATCTGCCTTCCTCCTCAGGACT 3'
P III L	5' CCTTGAATTCACCTTCATTTCTGATGAGTGCCTGAGGAC 3'
P III R	5' GGCCCTGAAGCTGATGGGTTTCCTCCTCAGCAGCT 3'

#### 1.4 $\alpha_1$ (I)及(III)型前胶原基因第2外显子区靶DNA片段的RT-PCR扩增

取人瘢痕组织抽提总RNA,先用引物P I B、P III B分别进行逆转录反应(RNA 5 $\mu$ L,引物 1 $\mu$ L,5 $\times$  RT buffer 4 $\mu$ L,总体积 20 $\mu$ L,70 $^{\circ}$ C 10min后加逆转录酶 5u,53 $^{\circ}$ C 1h),取其产物 3 $\mu$ L,以相应的引物对(P I A/P I C/P I B或P III A/P III C/P III B)进行半巢式PCR扩增(PCR反应体系为50 $\mu$ L:引物各0.1 $\mu$ g,50 $\mu$ mol/L dNTP,10 $\times$  PCR Buffer 5 $\mu$ L,5u Taq 酶,92 $^{\circ}$ C变性50s,55 $^{\circ}$ C退火40s,71 $^{\circ}$ C延伸40s,30个循环),终产物经2%琼脂糖凝胶电泳回收纯化。

#### 1.5 核酶基因和靶基因片段的克隆及鉴定

核酶DNA片段与pCR3.1-T、靶DNA片段分别与pGEM-T载体连接。转化子分别以引物对T7/P III R、T7/P I C、T7/P III C进行PCR扩增,筛选正向克隆(T7启动子下游的5'-3'方向插入)。PCR反应体系为50 $\mu$ L:引物各0.1 $\mu$ g,50 $\mu$ mol/L dNTP,10 $\times$  PCR Buffer 5 $\mu$ L,5u Taq 酶,93 $^{\circ}$ C变性50s,55 $^{\circ}$ C退火40s,71 $^{\circ}$ C延伸40s,30个循环。

#### 1.6 体外转录反应

按体外转录试剂盒使用说明进行。靶RNA的转录放射性标记,核酶的转录反应不标记。所有的质粒在转录前经酶切割成线性分子。反应体系为:

线性DNA 5 $\mu$ L,25mmol/L rNTP 5 $\mu$ L,RNasin 1 $\mu$ L,[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP 4 $\mu$ L,T7 RNA polymerase 5 $\mu$ L,最后加无RNase双蒸水至终体积50 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 2.5h。转录产物用DNase I消化后乙醇沉淀(加5 $\mu$ L 3mol/L的NaAc和150 $\mu$ L预冷的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C沉淀18h)。

#### 1.7 核酶反应

参照有关文献<sup>[4]</sup>适当修改进行。将等量靶RNA与对应的核酶(各4 $\mu$ L)混合并加入缓冲液(终浓度50mmol/L Tris-HCl,pH8.0,15mmol/L MgCl<sub>2</sub>),终体积为30 $\mu$ L。分别在37 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C保温1.5h后加入10 $\mu$ L终止液(98%甲酰胺,5mmol/L EDTA,10mmol/L Tris-HCl,pH8.0)。另外在恒温(37 $^{\circ}$ C)下变换MgCl<sub>2</sub>浓度(10、15、20mmol/L)以观察核酶对靶RNA的切割效应。样品在65 $^{\circ}$ C变性5min,8%聚丙烯酰胺及7mol/L尿素平板凝胶电泳分析。凝胶在-70 $^{\circ}$ C放射自显影24h,X光底片采用Kodak产品。

## 2 结 果

### 2.1 二联核酶的设计

胶原蛋白是细胞生存和粘附所必需的胞外基质成分,故只能大幅度下调而不能完全抑制前胶原基因的表达,因而设计核酶时应优先考虑切割的特异性,切割的转换数可不作严格要求。通过较长的核酶反义臂(核酶的I、III螺旋区)即可达到这一目的。为防止两个单价核酶序列的相互干扰,特将Rz I和Rz III螺旋II区的一对碱基对换,分别为GTCC、GTGC。用DNasis软件对核酶RNA二级结构的计算机模拟表明二个单价核酶之间不会发生相互干扰,各自能独立形成切割所需的二级结构,两侧的载体附加序列也未明显影响核酶的结构。按照设计,靶r I将被切割生成80nt和130nt的两个不同的片段。靶r III将被切割生成69nt和201nt的两个不同的片段。图1表示二联核酶与靶序列的相互作用。

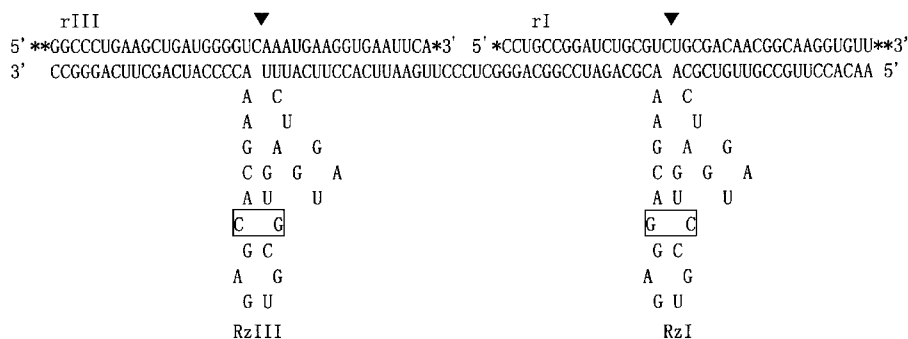


图 1 核酶与靶序列 RNA 相互作用示意图(箭头指示切割位点)

## 2.2 核酶基因及靶序列基因的构建、克隆及鉴定

以引物对 P I L/P III R PCR 扩增得 124bp 核酶基因片段。以 P I A/P I C 引物扩增获得长度约为 129bp 的 DNA 片段, 以 P III A/P III C 引物扩增得到长度约为 189bp 的 DNA 片段, 见图 2A。PCR 鉴定 T7 启动子 5'-3' 方向的正向克隆, 见图 2B; T7 引物测序证实全序列与设计的一致。

## 2.3 核酶和靶 RNA 的体外转录

靶序列转录载体经 *Sal*I 线性化后在靶基因转录产物的两端保留了共 81bp 的附加序列, 以及插入的  $\alpha_1$ (I 型及 III 型) 前胶原基因第二外显子 (Exon2) 片段本身的大小分别为 129bp 和 189bp, 故转录后生成的靶 RNA (r I, r III) 分别为 210nt 和 270nt。由于同样的原因核酶转录载体经 *Eco*RV 线性化后转录产物在其两端将增加共 98nt。核酶基因本身的大小为 124bp, 故转录后生成的核酶为 222nt。

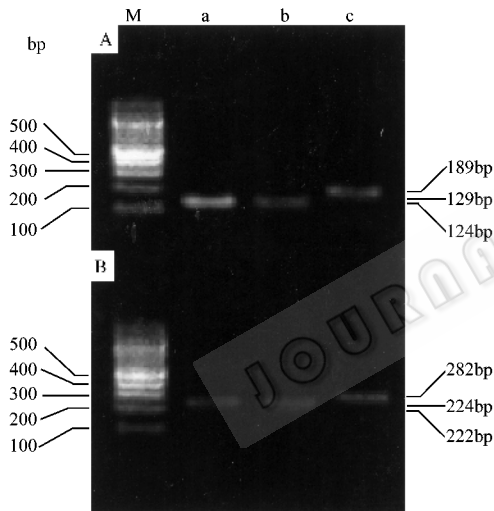


图 2 PCR 扩增产物 (A) 和 T7 正向鉴定 (B)

Fig.2 The products of PCR (A) and T7 promoter direction analysis (B)

A. a, b, c were dual-ribozyme, substrate DNA I and III; B. a, b, c were their PCR products of T7 promoter direction analysis, respectively; M. 100bp ladder marker. (bp, base pair)

## 2.4 核酶对其靶 RNA (r I, r III) 的切割作用

实验结果与预期的相符 (见图 3) 2 个单价核酶能各自独立发挥作用, 在不同温度下 (37℃, 42℃, 50℃) 核酶均能有效切割靶 RNA。Mg<sup>2+</sup> 浓度虽对核酶活性是必需的, 但要求不甚严格, 10mmol/L、15mmol/L、20mmol/L 的 Mg<sup>2+</sup> 浓度切割效率无明显差别。由于核酶的反义臂较长, 适当提高反应的温度有利于提高反应的转换率, 图 3 所示即为 50℃、15mmol/L Mg<sup>2+</sup> 条件下的切割产物。

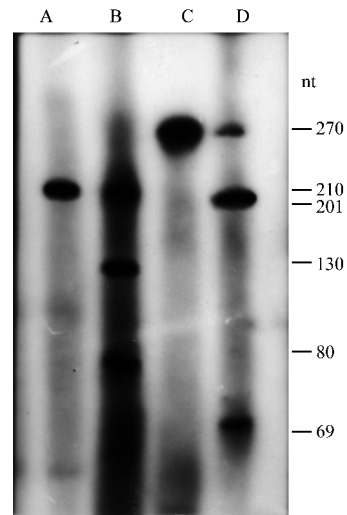


图 3 核酶切割产物的 PAGE 变性电泳放射自显影结果

Fig.3 The autoradiographic analysis of in vitro cleavage

of the target RNAs by the dual-ribozyme

A, C were the substrates RNA r I, r III from in vitro transcription and B, D were the cleavage products of RNA r I, r III. The transcription reaction was carried out in transcription buffer at 37℃ for 2.5h. And the cleavage were at 50℃, 15mmol/L MgCl<sub>2</sub> for 1.5h. The cleavage products were assayed by 8% PAGE-7mol/L Urea. (nt, nucleotide residue)

## 3 讨论

本研究的目的在于构建体外具有  $\alpha_1$ (I 型) 及  $\alpha_1$ (III 型) 前胶原基因 mRNA 特异切割活性的二联核酶, 为应用核酶研究和防治增生性瘢痕的形成奠定基础。对  $\alpha_1$ (I 型) 及 (III 型) 前胶原基因序列分析发现其第二外显子 (Exon2) 区都有 GUC 位点, 因而设计并构建了针对  $\alpha_1$ (I 型) 及 (III 型) 前胶原基因的第二外显子 (Exon2) 区的 2 个单价核酶串联的二联核酶。所设计的核酶反义臂较长, 以核酶加反义 RNA 的形式发挥作用, 以期大幅度下调而非完全失活前胶原 mRNA 的表达。计算机模拟和切割实验表明该二联核酶的 2 个单价核酶能各自独立发挥切割作用。利用构建的锤头状核酶及其相应的  $\alpha_1$ (I 型) 及 (III 型) 前胶原基因第二外显子 (Exon2) 的靶基因片段, 研究不同条件下二联核酶对靶 RNA 的体外切割活性, 结果表明核酶的体外切割活性对温度和 Mg<sup>2+</sup> 的要求范围较宽。在温度为 37~50℃ 以及 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 10~20mmol/L 的条件下, 核酶均能有效地发挥作用。

一般认为核酶的反义臂的长度影响核酶切割反应的特异性和转换数, 反义臂较长时转换数较低<sup>[10]</sup>。本实验中所设计的核酶反义臂较长, 其体外

切割活性受到一定影响,本实验条件下未能完全切割底物。但在细胞内环境中很多尚不清楚的因素影响核酶的活性。现有的研究表明在细胞内环境中核酶反应的限速反应步骤并不总是切割步骤,核酶的稳定性对核酶的细胞内切割效率更为重要;有实验表明较长反义臂的锤头状核酶在细胞内比短臂核酶更为有效<sup>[11]</sup>。并且长臂很明显比短臂更能有效地结合长底物 mRNA。因此本实验中的核酶既可以反义 RNA 形式与前胶原基因 mRNA 结合,又可以特异切割前胶原基因 mRNA,不可逆地使其失去作用。加之其固有的二级结构在胞内能抵御核酸酶降解,使其较之单纯的反义 RNA 有更高的抑制能力<sup>[9]</sup>。但单一核酶易受多种因素影响失去对靶 RNA 的切割作用,并且仅提高单一核酶分子的拷贝数并不能明显提高核酶在细胞内的切割活性<sup>[14]</sup>。采用二联核酶则可以同时针对 I、III 型前胶原基因 mRNA,更有效地抑制胶原蛋白的合成。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Sato M, Ishikawa O, Miyachi Y. Distinct patterns of collagen gene expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture. *Br J Dermatol*, 1998, **138**( 6 ) 938 ~ 943
- [ 2 ] Zhang K, Garner W, Cohen L *et al.* Increased types I and III collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA and protein in hypertrophic burn scar. *J Invest Dermatol*, 1995, **104**( 5 ) 750 ~ 754
- [ 3 ] Zhang L Q, Laato M, Muona P *et al.* Normal and hypertrophic scars: quantification and localization of messenger RNAs for type I, III and VI collagens. *Br J Dermatol*, 1994, **130**( 4 ) 453 ~ 459
- [ 4 ] Friedman D W, Boyd C D, Mackenzie J W *et al.* Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *J Surg Res*, 1993, **55**( 2 ) 214 ~ 222
- [ 5 ] Ghahary A, Shen Y J, Scott P G *et al.* Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-beta 1 type I and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues. *J Lab Clin Med*, 1993, **122**( 4 ) 465 ~ 473
- [ 6 ] Kauh Y C, Rounda S, Mondragon G *et al.* Major suppression of pro-alpha 1(I) type I collagen gene expression in the dermis after keloid excision and immediate intrawound injection of triamcinolone acetonide. *J Am Acad Dermatol*, 1997, **37**( 4 ) 586 ~ 9
- [ 7 ] Low S Q, Moy R L. Scar wars strategies. Target collagen. *J Dermatol Surg Oncol*, 1992, **18**( 11 ) 981 ~ 986
- [ 8 ] Forster A C, Symons R H. Self-cleavage of plus and minus RNAs of virusoid and a structural model for the active sites. *Cell*, 1987, **49**: 211 ~ 220
- [ 9 ] Haseloff J, Gerlach W. Simple RNA enzyme with new and highly special endoribonuclease activity. *Nature*, 1988, **334**( 6183 ) 585 ~ 590
- [ 10 ] Bramlage B, Luzzi E, Eckstein F. Designing ribozymes for the inhibition of gene expression. *Tibtech*, 1998, **16** 434 ~ 438
- [ 11 ] Zhou D M, Taira K. The hydrolysis of RNA: From theoretical calculations to the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of RNA. *Chem Rev*, 1998, **98** 991 ~ 1026
- [ 12 ] D'Alessio M, Bernard M, Pretorius P J *et al.* Complete nucleotide sequence of the region encompassing the first twenty-five exons of the human pro alpha 1(I) collagen gene (COL1A1). *Gene*, 1988, **67**( 1 ) : 105 ~ 115
- [ 13 ] Chu M L, Weil D, Wet W *et al.* Isolation of cDNA and genomic clones encoding human pro-alpha 1(III) collagen. Partial characterization of the 3' end region of the gene. *J Biol Chem*, 1985, **260**( 7 ) 4357 ~ 4363
- [ 14 ] ZHANG X I( 张晓岚 ), CHEN N A( 陈农安 ), QI G R( 祁国荣 ) *et al.* Design and property of triplet ribozyme targeting Bombyx Mori Nuclear Polyhedrosis Virus( BmNPV ) immediate early gene. *Chinese Journal of Virology*( 病毒学报 ), 1996, **12**( 4 ) 374 ~ 380

## Construction and *in vitro* Activity of Specific Dual-ribozyme Against $\alpha_1$ ( I ) and ( III ) Procollagen Genes

KUANG Er-Sheng<sup>1</sup> YANG Fu-Hua<sup>1\*</sup> WEN Shu-Juan<sup>2</sup> XIANG Kai-Jun<sup>3</sup>

<sup>1</sup>( College of life science, Wuhan University, Wuhan 430072, China )

<sup>2</sup>( Gene Technique Center of Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China )

<sup>3</sup>( College of life science, University of Science & Technology of China, Hefei 230027, China )

**Abstract** Overexpression of procollagen gene can cause the extraordinary increase of collagen's synthesis and therefore lead to the keloid and hypertrophic scar. To utilize ribozyme to suppress the expression of procollagen genes, a eukaryotic expression recombinant plasmid containing a dual-ribozyme gene against  $\alpha_1$ ( I ) and  $\alpha_1$ ( III ) procollagen genes was constructed. The ribozyme from *in vitro* transcription was incubated with target transcripts from recombinant plasmids which separately contained the fragments of the second exons of pro $\alpha_1$ ( I ) and pro $\alpha_1$ ( III ) collagen genes under various experimental conditions. The results showed that the dual-ribozyme could efficiently catalyze the specific cleavage of the target RNAs at 37°C, 42°C, 50°C and Mg<sup>2+</sup> concentration from 10mmol/L to 20mmol/L. This work provided a basis for further study on the ribozyme to suppress the expression of procollagen genes and control the cicatrization.

**Key words** pro $\alpha_1$ ( I ) collagen, pro $\alpha_1$ ( III ) collagen, ribozyme, *in vitro* activity