

## 截短绿色荧光蛋白突变体反式剪接修复核酶

# Construction of a Trans-splicing Ribozyme for Restoring EGFP Truncation Mutation

李 冰\* 熊宇泉 涂洪斌 刘启才 邹东霆 周问渠 陈耀勇

LI Bing\* , XIONG Yu-Quan , TU Hong-Bin , LIU Qi-Cai , ZOU Dong-Ting , ZHOU Wen-Qu  
and CHEN Yao-Yong

广州医学院实验医学研究中心 广州 510182

Experimental Medical Research Center , Guangzhou Medical College , Guangzhou 510182 , China

**摘 要** I 型内含子核酶经过设计特定的信号引导序列(IGS),可特异地定点剪接目的基因 RNA,从而在 RNA 水平达到修复病变基因的目的。以四膜虫材料,克隆了其 26S rRNA 内含子核酶基因,体外转录证实该 I 型内含子核酶具有完全的自我剪接的功能。为检测该核酶的反式剪接功能,构建了缺失后半段 564bp 基因序列的绿色荧光蛋白(GFP)的截短突变体重组质粒 XYQ5/XYQ10-pEGFP-C<sub>2</sub>,并证实其失去了发射绿色荧光的活性。利用 PCR 和分子克隆技术,构建了以上 EGFP 突变体的反式剪接修复核酶 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub>,该核酶载体以克隆的 26S RNA 内含子为核心,选择 EGFP 编码区 194 位 T-G 为剪接位点,以 188-193 位设计 IGS 序列,核酶 3'端携带 195-890bp 的 EGFP 基因序列,连接于 pRC-CMV<sub>2</sub> 真核表达载体中。体外转录突变 EGFP 的原核表达载体 XYQ5/10-pGEM 和 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub>,以混合转录产物为模板进行 RT-PCR,电泳及测序证实产物中含有反式剪接修复的野生型 EGFP mRNA,从而证实构建的反式剪接核酶具有体外反式剪接功能。将截短突变重组质粒 XYQ5/XYQ10-pEGFP-C<sub>2</sub> 与核酶质粒 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 共转染 HeLa 细胞,用荧光显微镜观察转染结果,发现有少量共转染的 HeLa 细胞发出绿光,RT-PCR 检测出野生型 EGFP mRNA,证明构建的反式剪接核酶具有体内反式剪接的功能,但其反式剪接效率低。

**关键词** I 型内含子核酶 剪接修复载体 绿色荧光蛋白

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0748-06

**Abstract** Special designed group I intron ribozymes can specifically splice objective RNA, repair the mutant gene in RNA level. The specificity of ribozyme is determined by nucleotides specific internal guide sequence(IGS) introduced to the enzyme. In this study, fragment sequence containing *Tetrahymena thermophila* intron I of 26S rRNA gene was cloned and cis-splicing activity of this ribozyme was confirmed by *in vitro* transcription. For evaluating the trans-splicing activity of this ribozyme, a truncated mutant Green Fluorescence Protein(GFP) vector, XYQ5/XYQ10-pEGFP-C<sub>2</sub>, was constructed. This vector deleted the 3' end 564bp fragment of EGFP coding sequence, led to the lost the activity of emitting green fluorescence. Trans-splicing ribozyme plasmids ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> for remedy of the truncated mutant EGFP was constructed by PCR and molecular cloning techniques. This vector utilizing cloned 26S rRNA intron 1 as core enzyme; selecting T-G site at 194bp of EGFP coding sequence as splicing receptor, designed an IGS which is inversely complement to the 188-193nt of EGFP mRNA; the 195-890bp fragment of EGFP

Received: April 8, 2005; Accepted: July 1, 2005.

This work was supported by the grants from the Guangdong Provincial Science and Technology Scheme(No.2002C31206) and Guangzhou City Science and Technology Scheme(No.2001-Z064-01-3).

\* Corresponding author. Tel: 86-20-81340202; E-mail: lbfree@21cn.com

广东省科技计划项目(No.2002C31206)和广州市科技计划项目(No.2004-2004-01-3)微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

coding sequence was ligated to the 3'-end of ribozyme core. The fragment containing these components was inserted to a eukaryotic expression vector pRC-CMV<sub>2</sub>. Using linearized XYQ5/XYQ10-pEGFP-C<sub>2</sub> and ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> as templates, truncated EGFP mRNA and the constructed ribozyme vector were transcribed and mixed to evaluate the trans-splicing activity. Analysis of *in vitro* transcription products mix by RT-PCR verified the existence of wild type EGFP mRNA molecule. Co-transfection of XYQ5/XYQ10-pEGFP-C<sub>2</sub> with ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> to Hela cells proved this ribozyme restored green fluorescence within cell, but the efficiency was low.

**Key words** group I introns ribozyme, splicing restoring vector, green fluorescent protein

1982年 Kruger 等<sup>[1]</sup>在嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)发现 26S rRNA 前体的自我剪接(self-splicing)能力,其后类似的活性 RNA 分子不断发现并被命名为核酶(ribozyme)。由于核酶作用的特异性和易于人工改造的特点,其潜在应用价值得到了充分研究。多数研究集中于小分子锤头核酶和发夹核酶的剪切性活性,被设计用于破坏有害的基因转录产物,代表性的有针对乙肝病毒(HBV)和丙肝病毒(HCV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、K-ras 突变的非小细胞肺癌(NSCLs)<sup>[2]</sup>、马凡综合征(MFS)的 FBN-1mRNA<sup>[3]</sup>等。相对而言,对具有独特的剪接功能的 I 型内含子核酶的研究还比较少。

I 型内含子核酶的二级结构都含有 9 个特征性的配对区(P1-P9)<sup>[4]</sup>。其中 P1 结构中的内部引导序列(inner guide sequence, IGS)决定 5'端外显子和内含子间的准确剪接位点。通过设计带有与靶 RNA 互补的特异性 IGS 的核酶,能够在设定的位点(IGS 互补区末端)进行剪切,然后连接上核酶末端所带的任何 3'端 RNA 序列。Lan 等<sup>[5]</sup>利用这种反式剪接功能,将胎儿的  $\gamma$ -珠蛋白 mRNA 剪接进入突变的  $\beta$ -珠蛋白的 mRNA 来纠正镰形细胞贫血。Phylactou 等<sup>[6]</sup>成功地进行了针对引起强直性肌营养不良(DM)的遗传缺陷进行反式剪接修复。Watqanabe 等<sup>[7]</sup>设计的剪接核酶能减少人类肿瘤细胞突变 P53,同时恢复野生型 P53 活性。

反式剪接核酶技术具有进行基因治疗的可行性,但众多因素包括最佳靶位点的选择、核酶稳定性及切割效率、核酶的长程表达等问题的存在限制了该技术的进一步开发。在本研究中,我们利用该截短突变的 pEGFP-C<sub>2</sub> 作为简化的模式突变分子,检验核酶剪接能力和影响因素。利用四膜虫 26S rRNA 前体内含子 I 作为核酶核心,设计的 6 nt 的 IGS 锚定 pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒表达的 194nt 的 U 位点,并参照文献[6]方法,将 IGS 往前延伸,使间隔 3 nt 外的其它 6 nt 与核酶 3'外显子形成第二个配对区,以此互补

方式将核酶 3'端连接的 EGFP mRNA 进一步锚定于剪接部位(设计图见 Fig.1),通过荧光观察直接反映剪接效率。

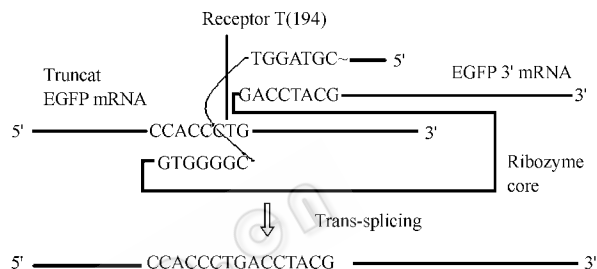


图 1 绿色荧光蛋白反式剪接核酶 IGS 的设计

Fig.1 Design of EGFP trans-splicing ribozyme IGS

194T was selected as the receptor nucleotide for G attack. 6nt GGGGTG was designed to match the 6nt before 194T as IGS. For better splicing specificity, another 6nt CGTAGGT was added to the 5' of IGS. Two nucleotides AT is not been.

## 1 材料和方法

### 1.1 四膜虫 26S rRNA 前体核酶基因的克隆与鉴定

嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)由华东师范大学侯连生老师赠送。在无菌条件下将四膜虫接种于灭菌的 PG 培养液内,在 37℃ 的条件下培养。四膜虫 DNA 的提取采用 EZNA Blood DNA Kit (OMEGA Guangzhou) 进行。

利用 PCR 扩增四膜虫 26S rRNA 前体核酶基因片段,引物 LB76、LB77 设计于外显子 1 和外显子 2 之内(Tab.1)扩增反应在 50 $\mu$ L 反应体系中采用 Pfu DNA 聚合酶按标准方法进行,反应程序:95℃ 变性 2min,95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s 共 30 个循环。获得的 DNA 片段经琼脂糖凝胶电泳分析,利用 Nucleo Trap Gel Extraction Ki(CLONTECH)回收,按照试剂盒说明克隆于 pGEM-T-VectoI(Promega)。获得的阳性克隆用 3S Plasmid Miniprep Kit Version 3.1(上海博彩)提取质粒,Dra I 酶酶切鉴定重组 pGEM-T-rib 质粒的插入方向,并分别测序验证。<http://journals.im.ac.cn>

表 1 研究中所用的引物及其序列  
Table 1 Primer sequences used in this study

Primer	Sequenc( 5'-3' )	Description
LB76	ccgacgcaattcaaccaagcgc	Sense for 26S RNA
LB77	taggtaccaatccattcatgcgcgtcac	Antisense for 26S RNA
XYQ5	gcaccaaaatcaacgggact	Sense for truncat EGFP
XYQ10	ggtctttagnttgcctcgt	Antiense for truncat EGFP
XYQ11	cgtaggtatcggggtgaaaagtattcaggcatgcacctg	Sense for intron I with IGS replaced by EGFP match
XYQ12	cactgcacgccgtaggtccgagtactccaaaactaatcaat	Antisense for intron I 3'-flanking with EGFP 3' sequence
XYQ13	attgattagtttggagtactcggacactacggcgtgcagtg	Sense for EGFP 5'-flanking with intron I sequence ( XYQ12 reverse complementry sequence )
XYQ14	ggaggtgtggagggttttt	Antisense for 3' EGFP

## 1.2 转录核酶的顺式剪接活性鉴定

利用 *Sal* I 酶切线性化 pGEM-rib 质粒,产生体外转录模板。体外转录 26S RNA 前体核酶:在 20 $\mu$ L 的反应体系中加入如下组分:4 $\mu$ L 5 $\times$  Transcription Buffer, 2 $\mu$ L T7 RNA 聚合酶, 1 $\mu$ L NTP( 25nmol/L ), 0.5 $\mu$ L RNase Inhibitor, 8 $\mu$ L 线性化 pGEM-rib 质粒 DNA 模板 A. 5 $\mu$ L 灭菌 ddH<sub>2</sub>O. 37 $^{\circ}$ C 温浴 2 h。

正反向转录反应产物加入 5 $\mu$ L 上样缓冲液,上样于 5% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳并记录 RNA 带型,分析获得的 RNA 是否剪接。

## 1.3 截短突变 pEGFP-C<sub>2</sub> 的质粒构建

以 pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒为模板,设计引物对 XYQ5/XYQ10 进行 PCR,回收产物后连接 pMD18-T 载体,获得 XYQ5/10-pMD18 质粒,以 *Hind* III 酶酶切鉴定正反向后以 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切 XYQ5/10-pMD18 质粒和 pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒,回收酶切片段后连接转化获得突变的 XYQ5/10-pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒。将突变的 XYQ5/10-pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒测序鉴定。

## 1.4 截短突变 GFP 反式修复核酶质粒 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 的构建 (见图 2)

构建流程中包括 (1) 以 pGEM-rib 质粒为模板, XYQ11/XYQ12 为引物,扩增含有与截短 EGF 基因序列互补的特异性 IGS 序列的,并具有部分 EGF 基因 3' 端的核心核酶片段 rib-XYQ11/XYQ12; 以 pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒为模板, XYQ13/XYQ14 为引物,扩增按 EGF 基因 3' 端的序列全长 pEGFP-C<sub>2</sub>-XYQ13/XYQ14。(2) 以上纯化的 PCR 产物等量混合为模板, XYQ11/XYQ14 为引物,扩增产生 GFP 特异反式修复核酶基因 trans-rib-GFP。(3) 产物连接于 pMD18-T 载体,以 *Hind* III 酶酶切鉴定插入方向,并通过序列测定验证序列的正确性。(4) 以上插入片段通过 *Hind* III,

*Xba* I 酶切位点亚克隆于 pRC-CMV<sub>2</sub> 质粒中,获得 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 质粒,序列测定验证。

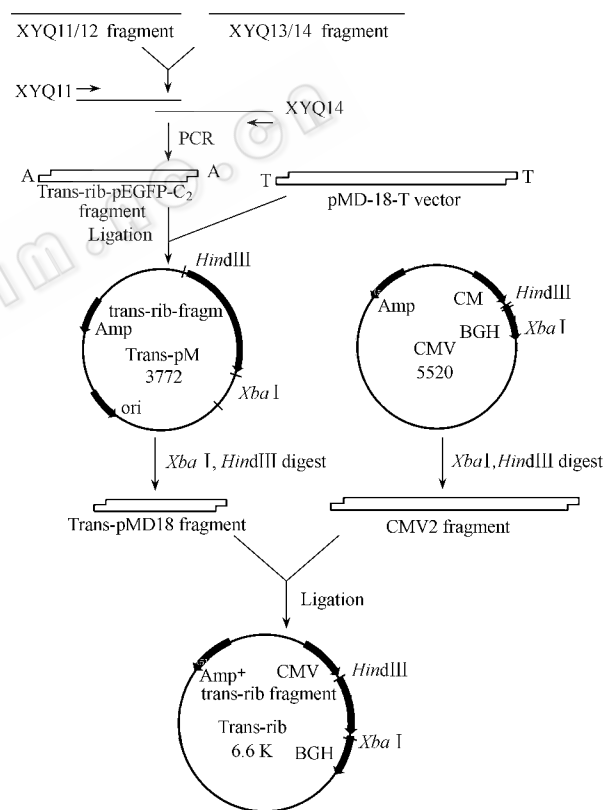


图 2 反式剪接核酶质粒 Trans-rib CMV<sub>2</sub> 的构建流程

Fig.2 Construction of recombination plasmid Trans-rib CMV<sub>2</sub>

## 1.5 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 反式剪接核酶的体外转录产物修复效果检测

以 *Spe* I 酶酶切线性化 XYQ5/10-pGEM 质粒,以 *Xba* II 酶酶切线性化 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 并回收纯化。分别以 XYQ5/10-pGEM 质粒和 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 质粒回收产物为模板按 1.2 方法进行转录反应。反应完成后立即将产物混合并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min,进行

## EGFP 的 mRNA 修复。

修复反应产物采用 RT-PCR 鉴定全长 EGFP 的存在。采用 Promega 公司的 RT-PCR 试剂盒并按其说明书进行,PCR 引物为 XYQ5、XYQ10 反应程序:48℃ 5min,94℃ 2min,继续循环程序 94℃ 30s,55℃ 1min,68℃ 2min 共 34 个循环,冷却至 4℃ 后取 30 $\mu$ L RT-PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 反式剪接核酶细胞内反式剪接效果检测

用含 10% 小牛血清培养 HeLa 细胞,细胞密度为  $4 \times 10^5$  种植于六孔板,待细胞长至对数生长期后,按试剂说明以脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) 将 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 与 XYQ5/10-pGFP-C<sub>2</sub> 共转染,pRC-CMV<sub>2</sub> 与 XYQ5/10-pGFP-C<sub>2</sub> 共转染作为阴性对照。细胞转染的 DNA 量为 1.6 $\mu$ g/孔。在转染 20~48h 后荧光显微镜下观察转染细胞的绿色荧光蛋白表达情况。细胞内总 RNA 用 TriZol 试剂提取,RT-PCR 鉴定产物野生型 EGFP mRNA。

## 2 结果与分析

### 2.1 四膜虫 26S rRNA 前体核酶基因的克隆与鉴定

根据嗜热四膜虫 26S rRNA 前体基因序列设计 PCR 引物 LB76 及 LB77,分别位于外显子 1 和外显子 2 中,扩增的片段大小应该为 516bp,电泳结果显示 PCR 产物与预计长度一致 (Fig. 3-A)。该片段用 T 载体克隆,可能产生不同方向的插入,利用片段中含有 *Dra* I 酶酶切位点,可区分正向(19bp,692bp,23bp,1641bp,1140bp)和反向(19bp,692bp,23bp,1408bp,1373bp)重组 pGEM-rib 质粒 (Fig. 3-B)。将正向重组质粒 pGEM-rib-1 测序后的结果在 GenBank 数据库中利用 BLAST 进行比较,其序列于嗜热四膜虫核酶序列完全一致。

具有自我剪接的功能,由于扩增的 26S rRNA 前体基因片段中含有 100bp 外显子,转录后自我剪接产生长约 400nt 的内含子。将转录产物进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,可见正向重组 pGEM-rib 质粒转录产物为长约 100nt 及 400nt 的片段,反向重组 pGEM-rib 质粒转录产物为长约 500nt (Fig. 3-C)。证明 pGEM-rib 质粒表达的核酶具有自我剪接功能。

### 2.2 截短突变的 EGFP 表达质粒 XYQ5/10-pGFP-C<sub>2</sub> 构建

引物 XYQ5 和 XYQ10 的设计位点分别位于 pEGFP-C<sub>2</sub> 的第 466bp 和 939bp,PCR 产物长约 473bp,包含有 EGFP 编码区 347 个碱基并在 3'-末端导入了一个 *Hind* III 酶酶切位点。该片段克隆至鉴

定 pMD18-T 载体后以 *Nhe* I 酶, *Hind* III 酶双酶切 XYQ5/10-pMD18 质粒和 pGFP-C<sub>2</sub> 质粒,回收酶切片段后连接转化获得截短突变的 XYQ5/10-pGFP-C<sub>2</sub> 质粒,质粒表达缺少 C 末端 130 个氨基酸残基。测序结果与设计一致,转染 HeLa 细胞证明突变的 EGFP 丧失了产生绿色荧光的能力。

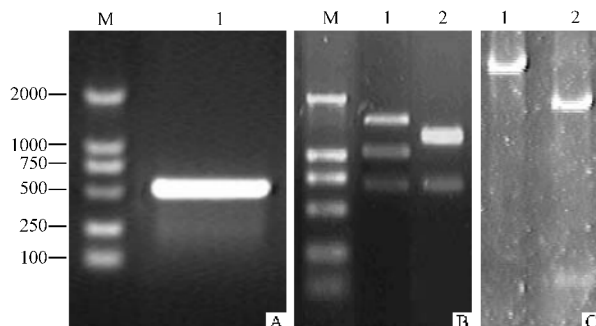


图 3 四膜虫核酶的克隆和顺式剪接活性鉴定

Fig. 3 Cloning and cis-splicing activity characterization of *Tetrahymena* ribozyme

A. PCR product of *Tetrahymena* ribozyme gene fragment (M: DNA marker, 1: PCR product). B. Restriction digestion pattern of recombinant plasmid pGEM-rib (1: forward insert plasmid cut by *Dra*I, 2: reverse insert plasmid pGEM-rib). C. Transcription product of linearized recombinant plasmid pGEM-rib (1: transcription product of reverse insert plasmid pGEM-rib, 2: transcription product of forward insert plasmid pGEM-rib).

### 2.3 EGFP 反式剪接修复核酶质粒的构建

引物 XYQ11 和 XYQ12 的设计位点分别为四膜虫核酶的 78 nt 和 465 nt 处,前者在引物序列中将 26S RNA 前体外显子 1 对应的 IGS 序列更换为与 EGFP 编码序列第 194 位对应的 IGS;后者包括核酶 3'端剪接位点以及部分 EGFP 3'端编码序列。扩增出的 400bp 片段含有定位 EGFP mRNA 剪接位点的 IGS 和核酶核心。引物 XYQ13 和 XYQ14 的设计位点分别为 pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒的 807 bp 和 1481 bp 处,XYQ13 序列为 XYQ12 的反向互补,PCR 结果应约为 680 bp。以上 PCR 产物混合作为模板,XYQ11 和 XYQ14 为引物进行的 PCR 结果产生长度为 1080 bp 的 EGFP 剪接修复核酶基因。该基因插入 pRC-CMV<sub>2</sub> 载体,插入核酶测序结果见图 4。序列符合设计,其中 1~16 位为 EGFP 剪接修复核酶的内部导引序列组合,包括 1~6 位的 IGS 和 12~16 位的延伸定位序列;17~403 位为四膜虫 26S RNA 一号内含子,即核酶核心部分;404~1078 位是 EGFP 的 3'端序列,用于剪接替代异常 EGFP 的 3'端序列。

### 2.4 利用截短的 EGFP 验证核酶的剪接修复作用

细胞外反式剪接验证通过体外转录截短的 XYQ5/10-pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒和剪接修复核酶质粒 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 进行。混合以上转录产物,以 XYQ5/XYQ14 为引物进行 RT-PCR,扩增到约 1000bp 的产

物,符合 EGFP 全长的分子量( Fig. 4 )。为证明剪接位点的正确性,将 PCR 产物连接 pGEM-T 载体后测序,结果符合野生型 EGFP 序列。

```

1      CGTAGGTATCGGGTGAaaagtatcagcgatgcacctggtagctagtctttaaaccaatagattgcatcggtttaaaag 80
81     gcaagaccgtcaaattgctgggaaagggtcaacagcgttcagtaccaagtctcaggggaaaccttgagatggccttgca 160
161    aagggtatgtaataagctgacggacatggtcctaaccacgcagccaagtcctaagtcacacagatcttctgtgatatgg 240
241    atgcagttcacagactaaatgctcggtcggggaagatgtattctctcataagatatagtcggacctctccttaatgggag 320
321    ctacgggatgaagtgatgcaacactggagccctggaactaatttgtatgcaagatattgattagttttggagtac 400
401    tcgGACCTACGGCTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCG 480
481    AAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC 560
561    GACACCTCGGTGAACCGCATCGAGTCAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTA 640
641    CAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGGCATCAAGTGAATTCAGATCCGCCACA 720
721    ACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGCTGCTGCTGCC 800
801    GACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTT 880
881    CGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGCCGACTCAGATCTCGAGTCAAGCTTCG 960
961    AATTCTGCAGTCAGCGTACCCGCGGGCCGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCAATTTGT 1040
1041   AGAGGTTTTACTTGGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCC 1078

```

图 4 构建完成的核酶基因序列

Fig.4 Constructed ribozyme gene sequence

1 ~ 6 : extension sequence reversely matched to 405-411, which is following the G3'-splicing site. 12 ~ 16( Bold ) the IGS sequence reversely matched to 189-194nt of EGFP mRNA. 17 ~ 40( lowercase ) 26S rRNA intron I. 404 ~ 1078( capital ) 3'-sequence of EGFP.

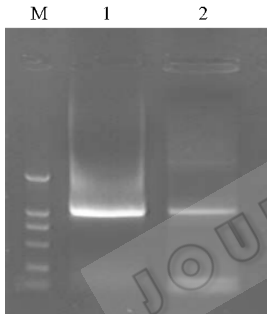


图 5 RT-PCR 鉴定 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 的反式剪接活性

Fig.5 Assay of the trans-splicing activity of ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> by RT-PCR

M : 2.0kb DNA ladder ; 1 : RT-PCR product amplified from *in vitro* transcribed truncat EGFP mRNA and ribozyme mixture. 2 : RT-PCR product amplified using total RNA from cells co-transfected with XYQ5/10-pEGFP-C<sub>2</sub> and ptrans-rib-CMV<sub>2</sub>.

将 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 和 XYQ5/10-pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒共转染 HeLa 细胞,提取总 RNA 以 XYQ5/XYQ14 为引物进行 RT-PCR,检测反式剪接核酶细胞内反式剪接效果,结果证明细胞内同样具有野生型 EGFP 表达( Fig. 5 ),说明在细胞内有反式剪接作用。

通过荧光显微镜观察转染细胞的绿色荧光,可见转染野生型 pEGFP-C<sub>2</sub> 细胞 50% 具有强烈的荧光,而转染截短突变质粒 XYQ5/10-pEGFP-C<sub>2</sub> 者细胞未见任何荧光,说明突变 EGFP 已经失去了发射绿色荧光的能力。细胞共转染 XYQ5/10-pEGFP-C<sub>2</sub> 和 ptrans-rib-CMV<sub>2</sub> 后,绝大多数细胞没有发现绿色荧光出现,但在极少数细胞内可以检测到荧光,其比例低于 1%,且强度较弱( Fig. 6 )。

图 6 荧光显微镜观察转染 HeLa 细胞中反式剪接活性

Fig. 6 Fluorescent observation of trans-splicing activity by transfecting HeLa cells  
 Left : transfected with pEGFP-C<sub>2</sub> plasmid ; Middle : transfected with mutant pEGFP-C<sub>2</sub> plasmid ;  
 Right : co-transfected with mutant pEGFP-C<sub>2</sub> plasmid and ptrans-rib plasmid.

### 3 讨论

基因治疗方法由于受到诸多因素的影响,在临床实践中的效果尚不尽如人意,但对于其基础技术的研究与探讨是酝酿突破的根本途径。剪接型核酶能够在清除有害突变基因产物的同时恢复其正常功能的生物活性分子,作用的靶分子和靶位点由简单的碱基互补关系决定,易于认为改造设计,具有重要的潜在应用前景<sup>[8]</sup>。本研究以典型的四膜虫 I 类内含子核酶为基础材料,利用其核酶核心,以截短的 EGFP mRNA 为靶分子,探讨获得高活性修复核酶的设计与构建方法,获得了具有一定活性的特异性核酶载体。

剪接修复的原理是定点置换出 3'端 mRNA。绿色荧光蛋白在人类细胞不存在,导入细胞后能够通过荧光显微镜检术直接判断活性蛋白的存在,因而被选用作为检验核酶剪接能力的模板。本实验设计的突变 pEGFP-C<sub>2</sub> 缺失了编码区 347bp 至 890bp 的片段而不能表达正常 EGFP,作为修复模式分子能够方便地提供检测手段。

有效剪接修复核酶须保证剪接产物 mRNA 的正确性和达到一定的剪接效率。准确性的关键在于准确的剪接位点、相关的 IGS 序列的设计<sup>[9]</sup>。本实验在设计时,通过分析 GFP mRNA 的二级结构,将 6 nt 的 IGS 锚定在 pEGFP-C<sub>2</sub> 质粒的 194nt 的 U 位点,并采用第二个配对区,将核酶 3'端连接的 EGFP mRNA 进一步锚定于剪接部位,获得的产物序列符合要求并在细胞内观察到了荧光。说明剪接型核酶的设计是正确的。

实验结果未能得到高效率的修复 GFP 的表达。细胞内核酶剪接修复涉及多种因素的影响,包括有靶细胞的转染效率、核酶载体在细胞内的表达效率和剪接位点募集的有效核酶产物浓度等重要指标。实验中需要共转染两个质粒载体,难以对细胞内的靶分子和核酶有效浓度进行准确控制,是一个重要的原因,尤其是在进行体内实验时,需要更高的转染效率的基因导入载体。绿色荧光蛋白表达效率可以检测,但核酶载体的有效浓度未知,为研究核酶表达效率对靶分子修复的影响,可能需要建立有效的表

达效率检测手段,进一步实验中应对表达的核酶进行特异性标记,准确反映核酶在细胞内的有效浓度,探讨表达产物量与修复效率的关系。另外虽然设计 IGS 序列和延伸互补序列能够准确定位剪接位点并获得修复的靶基因产物,但由于靶 mRNA 位点附近二级结构的干扰<sup>[10]</sup>,可能所选择的位点并非具有最佳的核酶募集效率。可选的方案是利用兼并的 IGS 文库<sup>[11]</sup>,针对较大范围的靶序列进行筛选,获得高效结合位点后再根据情况设计特异的延伸互补序列,提高靶位点底物-核酶的有效结合。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ *et al.* Self-splicing RNA : autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 1982, **31**( 1 ):147 - 157
- [ 2 ] Phylactou LA. Ribozyme and peptide-nucleic acid-based gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, **44**( 2-3 ):97 - 108
- [ 3 ] Kilpatrick MW, Phylactou LA. Towards an RNA-based therapy for Marfan syndrome. *Mol Med Today*, 1998, **4**( 9 ):376 - 381
- [ 4 ] Hanna R, Doudna JA. Metal ions in ribozyme folding and catalysis. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, **4**( 2 ):166 - 170
- [ 5 ] Lan N, Howrey RP, Lee SW *et al.* Ribozyme-mediated repair of sickle  $\beta$ -globin mRNA in erythrocyte precursors. *Science*, 1998, **280**:1593 - 1596
- [ 6 ] Phylactou LA, Darrah C, Wood MJ. Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat Genet*, 1998, **18**( 4 ):378 - 381
- [ 7 ] Watanabe T, Sullenger BA. Induction of wild-type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**( 15 ):8490 - 8494
- [ 8 ] Phylactou LA, Kilpatrick MW, Wood MJ. Ribozymes as therapeutic tools for genetic disease. *Hum Mol Genet*, 1998, **10**:1649 - 1653
- [ 9 ] Jones JT, Sullenger BA. Evaluating and enhancing ribozyme reaction efficiency in mammalian cells. *Nat Biotech*, 1997, **15**:902 - 905
- [ 10 ] Zaug AJ, Grosshans CA, Cech TR. Sequence-specific endoribonuclease activity of the *Tetrahymena* ribozyme: enhanced cleavage of certain oligonucleotide substrates that form mismatched ribozyme-substrate complexes. *Biochemistry*, 1988, **27**( 25 ):8924 - 8931
- [ 11 ] Jones JT, Lee SW, Sullenger BA. Tagging ribozyme reaction sites to follow trans-splicing in mammalian cells. *Nat Med*, 1996, **2**:643 - 648