

丙肝病毒核心基因靶向性 M1GS 核酶的体外抗病毒活性

张文军^{1,2}, 李喜芳¹, 罗桂飞¹, 黄志文¹, 刘映乐²

¹ 广东药学院病原生物学与免疫学系, 广州 510006

² 武汉大学, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430072

摘要:【目的】丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)是引起病毒性肝炎的重要病原。目前临床 HCV 感染多采用干扰素联合病毒唑进行治疗,但其应答率低且感染易反复,探索新型抗 HCV 治疗策略与药物具有紧迫的现实意义。【方法】基于大肠埃希菌来源的核糖核酸酶 P(RNase P),针对 HCV 核心基因的序列,设计一小段与之互补的外部引导序列(Guide Sequence, GS),通过 PCR 将其共价连接至大肠埃希菌 RNase P 催化性亚基(M1 RNA)的 3'末端,从而构建一种靶向性的核酶——M1GS。【结果】构建的 M1GS-HCV/C₅₂核酶在体外可对靶 RNA 片段产生特异性切割;在 HCV 感染的 Huh7.5.1 细胞,该人工核酶也能够显著抑制 HCV 核心基因的表达,并使培养上清中 HCV RNA 的拷贝数减少约 1500 倍。【结论】本研究构建的 M1GS-HCV/C₅₂核酶具有显著的体外抗病毒活性,从而为 HCV 的治疗研究提供了一条潜在途径。

关键词:丙型肝炎病毒, 核心基因, M1GS 核酶, 抗病毒

中图分类号:Q933 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2013)08-0875-07

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属黄病毒科,是一种单链正 RNA 病毒,其基因组长约 9.6kb,只含一个开放阅读框(ORF),编码至少 11 种蛋白,包括 3 种结构蛋白(C、E1 和 E2)、一种小蛋白(p7)、6 种非结构蛋白(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A、NS5B)和一种由核心基因编码区移码生成的蛋白(F 蛋白)^[1]。HCV 是威胁公众健康的重要病毒之一。据统计,全球范围内 HCV 感染者超过 1.7 亿,大部分急性丙型肝炎感染将发展成为慢性,并最终导致肝硬化、肝衰竭或者肝细胞癌,每年因此死亡的人数成千上万。然而,目前尚缺乏有效的 HCV 疫苗,临床上常采用干扰素联合病毒唑进行治疗,然而应答率较低且易反复。因此,发展新型抗 HCV 治疗

策略及药物显得尤为迫切^[2]。

核糖核酸酶 P(RNase P)是广泛存在于各类生物细胞中的一种天然核酶,其主要功能是参与 tRNA 前体(ptRNA)5'末端的切割^[3]。RNase P 最早发现于大肠埃希菌,由一个含 377 nt 的 RNA 亚基(M1 RNA)和一个约 14 kDa 的蛋白亚基(C5 蛋白)组成。其中,RNA 亚基的结构与功能较为保守,具有催化活性。在体外缺乏 C5 蛋白的情况下,若具备一定浓度的 Mg²⁺ 或 NH₄⁺,M1 RNA 仍具有切割 ptRNA 的活性^[4]。研究表明,RNase P(或 M1 RNA)识别 ptRNA 特定的二级结构,只要具备 5'单链区、双螺旋区和 3'CCA 等结构基序的底物均可被其识别^[5]。因此,对于特定的靶 RNA,可通过设计一段引导序

基金项目:广东省自然科学基金面上项目(S2012010009471);病毒学国家重点实验室开放基金项目(2012008)

作者简介:张文军(1972-),男,江西丰城人,副教授,主要从事抗病毒核酸类药物研究。Tel: +86-20-39352196; Fax: +86-20-89237296; E-mail: tzhangwj@126.com

收稿日期:2013-01-29; **修回日期:**2013-04-09;

列(Guide Sequence, GS)与之互补结合并形成类似于 ptRNA 的上述结构特征,进而被 RNase P(或 M1 RNA)识别并特异性切割,从而抑制该靶基因的表达。由此,发展出一类基于 RNase P 的反义技术。目前,该技术在抗感染及抗肿瘤等研究领域有着较为广泛的报道^[6-8]。

我们首次采用该技术对 HCV 进行研究。衣壳蛋白靶向病毒灭活(capsid-targeted viral inactivation)是抗病毒研究的重要策略之一^[9]。业已证实,HCV 核心基因相对保守,其编码蛋白除装配形成病毒衣壳外,还可直接与多种细胞蛋白及通路相互作用,在病毒生命周期中起重要作用^[10],因此可作为抗 HCV 研究的理想靶标。本文针对 HCV 基因组核心基因编码区,设计一段 GS 序列,进一步将其共价连接于 M1 RNA 的 3'末端,成功构建一种新型靶向性核酶(M1GS-HCV/C₅₂),并对其体外的抗病毒活性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒及核苷酸片段: pGEM-3z、pFL117 质粒由暨南大学周天鸿教授惠赠;pUC19 质粒、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 菌株购于北京鼎国生物技术有限公司;pGEM-HCV/core 重组质粒由本室构建;引物由英潍捷基生物技术有限公司合成。

1.1.2 主要试剂:限制性内切酶 *EcoR*I 和 *Hind* III、绿豆芽核酸酶、T4 DNA 连接酶、T7 RNA 聚合酶、DNase I 购于宝生物工程有限公司。质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒、PCR 清洁试剂盒购于 BIOMIGA 公司;脂质体(Lipofectamine2000)、HCV 核酸定量检测试剂盒购于上海科华生物工程有限公司。

1.1.3 细胞及病毒:人肝癌细胞系 Huh7.5.1 和 HCV 病毒株(JFH-1),由武汉大学吴建国教授惠赠。

1.2 M1GS-HCV/C₅₂重组质粒构建

1.2.1 GS 的设计:依据参考文献[11],候选靶位至少应具备以下序列特征:①切割位点的 3'和 5'分别是一个鸟嘌呤(G)和一个嘧啶(U/C);②切割位点下游第八位是尿嘧啶(U);③靶位处二级结构应相对简单,以利于 GS 与之结合。通过 DNAMAN 与 RNA Structure4.5 软件对 HCV 核心基因编码区的序列及结构进行分析,发现 AUG 起始密码下游第 52 位胞嘧啶(C)为潜在的切割位点(C₅₂)。基于 C₅₂位点两侧的序列,GS 序列设计为:5'-GCCCCACAGGACGT-3'(表 1 和图 7)。

1.2.2 桥序列(bridge sequence)的设计:文献报道^[12],M1GS 核酶中 GS 与 M1 RNA 之间的一段连接桥序列对于酶活性至关重要。我们曾对桥序列的长度与酶活性之间的关系进行过研究,发现桥序列不应小于 20nt^[13]。因此,本文构建针对 C₅₂靶位的 M1GS 核酶时,引入一段 24nt 的桥序列。与此同时,构建一个不含桥序列的相应 M1GS 核酶作为对照组。

1.2.3 M1GS 核酶基因克隆:以含 M1 RNA 基因的 pFL117 质粒为模板,通过 PCR 扩增,可获得含 M1GS 核酶的基因片段。引物 P1 含有 *EcoR* I 识别位点和 T7 启动子序列,引物 P2 含有限制酶 *Hind* III 识别序列、GS 及桥序列,引物 P3 仅比引物 P2 缺少桥序列(表 1)。引物 P1 和 P2 的 PCR 扩增产物为含有桥序列的 M1GS 核酶基因片段;而引物 P1 和 P3 的 PCR 扩增产物则为不含桥序列的 M1GS 核酶基因片段。进一步将上述 M1GS 核酶基因片段克隆至 pUC19 载体的多克隆位点(*EcoR* I 和 *Hind* III 之间),构建两种 M1GS 核酶基因克隆,分别以 M1GS-HCV/C₅₂ 和 M1GS-HCV/C₅₂* 表示。

表 1. 引物序列

Table 1. Sequences of the primers

Primer	Sequence(5'→3')	Restriction site
P1	CG GAATTCGAAGCTGACCAGACAG	<i>EcoR</i> I
P2	CCC AAGCTTGGTGCCCACAGGACGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGTGAAACTG	<i>Hind</i> III
P3	CCC AAGCTTGGTGCCCACAGGACGTAGGTGAAACTG	<i>Hind</i> III

The protective bases are marked with greybody; The recognition sequence of restriction enzymes are showed in italics; The guide sequences are showed in bold; The bridge sequence is marked with double underline; The T7 promoter sequence is marked with straight underline; The complementary sequences of 3' terminal of M1 RNA gene are marked with wave underline.

1.3 M1GS 核酶 RNA 及靶 RNA 片段制备

M1GS 核酶克隆质粒以限制酶 *Hind* III 线性化,

再以绿豆芽核酸酶进行末端平滑,然后在 T7 RNA 聚合酶的催化下进行体外转录,可制备获得 M1GS

核酶。具体转录方案参照说明书。转录后的产物分别以 DNase I 消化 30 min、苯酚氯仿抽提 1 次、乙醇沉淀 2 次,保存于 80% 乙醇中备用。

pGEM-HCV/core 质粒包含 HCV 基因组 5' 末端的部分片段(nt 1 - 584)^[14]。以该质粒作为转录模板,具体操作方案除向体系中添加³²P-UTP,其余的步骤与上述 M1GS 核酶 RNA 的制备方法相同,从而获得放射性核素标记的靶 RNA 片段。

1.4 胞外切割试验

³²P 标记的靶 RNA 片段首先经 80℃ 热变性 3 min,冰浴 1 min,然后加入等摩尔的 M1GS 核酶 RNA。切割反应体系参照文献[15]。37℃ 切割 30 min后,加入等体积终止液(含 9mol/L 尿素、0.05% 溴酚蓝及 0.05% 二甲苯蓝)终止反应。以 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(含 7 mol/L 尿素)对切割产物分离,并以 X 光胶片进行放射自显影。

1.5 胞内抗病毒作用测定

以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 Huh7.5.1 细胞。在六孔板中,待细胞生长至 80% - 90% 丰度时,以 HCV 病毒株(JFH1)感染,MOI 为 1.0。HCV 感染 2 h 后,细胞以无血清培养基洗涤 2 次,然后以 Lipofectamine 2000 将 M1GS 核酶 RNA 转染 HCV 感染的细胞。转染的具体步骤参照说明书。M1GS 核

酶 RNA 转染 48 h 后,抽提细胞总蛋白,再以 Western Blot 检测 HCV 核心蛋白。同时设立转染 M1GS-HCV/C₅₂核酶的实验组,转染 M1GS-HCV/C₅₂ * 核酶和 M1GS-HCMV/UL97 核酶的对照组,以及不转染 M1GS 核酶的空白组。

此外,在 24 孔板中,以 HCV 感染 Huh7.5.1 细胞(MOI 为 1.0)。感染 2 h 后,细胞以脂质体转染 M1GS 核酶 RNA。分别收获感染 4 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 后的细胞培养上清,通过荧光定量 PCR 检测上清液中 HCV RNA 的拷贝数,具体操作方案参照丙肝病毒核酸定量检测试剂盒的说明书。

2 结果

2.1 M1GS 核酶基因

由于引物 P1 与 pFL117 质粒中 M1 RNA 基因上游的 T7 启动子序列结合,引物 P2 或 P3 则与分别 pFL117 质粒中 M1 RNA 基因 3' 末端的序列结合。因此,引物 P1 与 P2 PCR 扩增产物为 M1GS-HCV/C₅₂核酶的基因片段,引物 P1 与 P3 PCR 扩增产物为 M1GS-HCV/C₅₂ * 核酶的基因片段。其结构如图 1 所示。

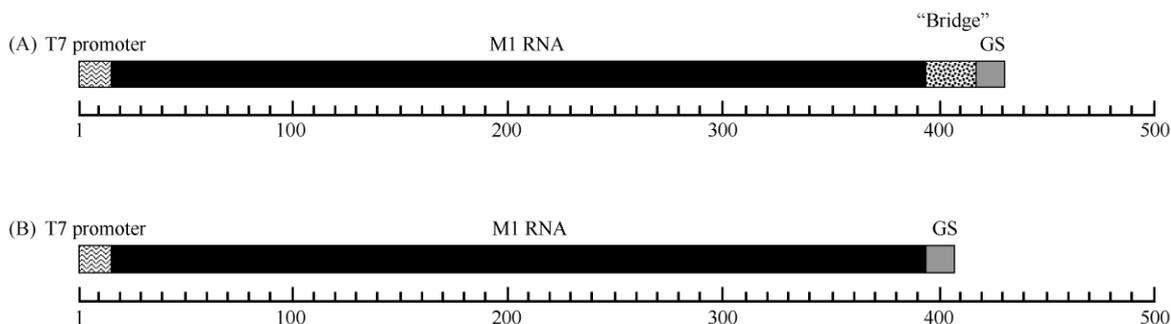


图 1. M1GS 核酶基因的结构

Figure 1. Schematic structure of the gene coding for the M1GS ribozyme. A: The gene of M1GS-HCV/C₅₂ ribozyme; B: The gene of M1GS-HCV/C₅₂ * ribozyme.

2.2 M1GS 核酶基因克隆的鉴定

采用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 对克隆的质粒进行双酶切鉴定,结果 M1GS-HCV/C₅₂ 和 M1GS-HCV/C₅₂ * 质粒均可被切割产生两个片段,大片段为 pGEM3z 载体,小片段则分别为 M1GS-HCV/C₅₂ * 和 M1GS-HCV/C₅₂ 核酶基因片段,与预期大小 411 bp 和 435 bp 相当(图 2,泳道 2、3)。此

外,进一步对 M1GS-HCV/C₅₂ 基因克隆进行 PCR 鉴定,结果扩增出一条明显的特异性条带,该条带大小与双酶切切出核酶基因片段大小相当(图 2,泳道 1)。上述结果表明,构建的两种 M1GS 核酶基因均已成功克隆。

2.3 体外转录产物鉴定

体外转录的产物分别以 8% 聚丙烯酰胺电泳

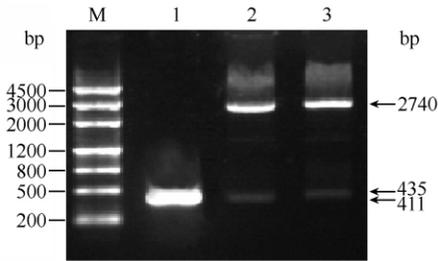


图 2. M1GS 核酶基因重组质粒的鉴定

Figure 2. Determination of the recombination plasmids that contain the gene of M1GS ribozyme. M, DNA Marker III; lane 1, the PCR product using M1GS-HCV/C₅₂ plasmid as the template; lane 2, M1GS-HCV/C₅₂ * digested by *EcoR* I and *Hind* III; lane 3, M1GS-HCV/C₅₂ digested by *EcoR* I and *Hind* III.

(含 7mol/L 尿素) 分离并经银染显色 (图 3)。结果显示: 两种 M1GS 核酶 RNA 和 HCV 靶 RNA 均只形成一条明显条带。这表明该反应体系的转录产物纯度高。此外, 理论上 M1GS-HCV/C₅₂ 核酶和 M1GS-HCV/C₅₂ * 核酶的大小分别为 435 nt 和 411 nt, HCV 靶 RNA 片段大小则为 590 nt。从泳动位置看, 各转录产物条带的大小分别与预期相符。因此, 转录的特异性亦较好。

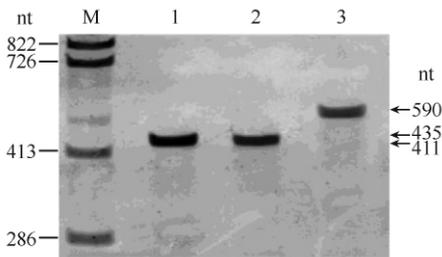


图 3. 银染鉴定体外转录产物

Figure 3. Determination of the *in vitro* transcription products (silver staining). M, RNA marker; lane 1, transcripts of the M1GS-HCV/C₅₂ ribozyme; lane 2, transcripts of the M1GS-HCV/C₅₂ * ribozyme; lane 3, transcripts of the substrate RNA.

2.4 M1GS 核酶体外切割活性

与对照组相比, M1GS-HCV/C₅₂ 核酶可明显切割 HCV 靶 RNA, 产生两条新的电泳条带 (图 4, 泳道 4)。理论上, 若该切割发生在 C₅₂ 位点, 5' 切割产物大小约 390 nt, 3' 切割产物大小约 200 nt。根据条带泳动位置分析, 切割产物片段的大小符合预期。而在对照组, 非 HCV 靶向性核酶 (M1GS-HCMV/UL97) 以及缺乏桥序列的 M1GS 核酶 (M1GS-HCV/C₅₂ *) 则均不产生明显切割 (图 4, 泳道 2 和 3)。上

述结果提示, M1GS-HCV/C₅₂ 核酶对底物 RNA 产生的切割是一种靶向的定点切割。与此同时, 该结果也进一步证实桥序列对于 M1GS 核酶活性的重要性。此外, 由于 M1GS-HCV/C₅₂ * 核酶与 M1GS-HCV/C₅₂ 核酶具有完全相同的引导序列 (GS), 其靶向性应相同, 但却不具切割活性, 因此可作为 M1GS-HCV/C₅₂ 核酶胞内抗病毒研究的一种内对照。

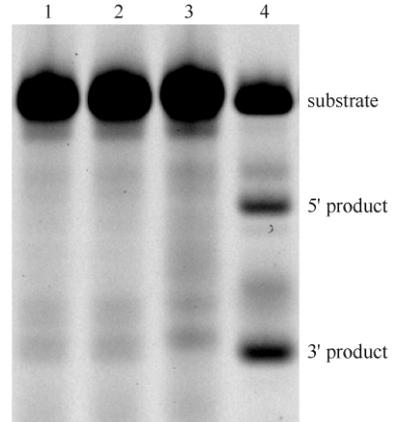


图 4. M1GS 核酶体外切割活性的测定

Figure 4. Determination of the *in vitro* cleavage activities of M1GS ribozymes. Lane 1, Blank control that absent with M1GS ribozyme; Lane 2. Control that added with the M1GS HCMV/UL97 ribozyme; Lane 3. Control that added with the M1GS HCV/C₅₂ * ribozyme; Lane 4. Test group that added with the M1GS HCV/C₅₂ ribozyme.

2.5 M1GS 核酶胞内抗病毒作用

Western blot 结果表明: 相对于不转染 M1GS 核酶的空白对照, 转染 M1GS-HCV/C₅₂ 核酶的 Huh7.5.1 细胞, HCV 核心蛋白的表达显著降低 (减少约 80%, $P < 0.05$); 而转染 M1GS-HCV/C₅₂ * 核酶的对照组, HCV 核心蛋白的表达量则无明显减少 (图 5-A, B)。

进一步测定 M1GS 核酶对 HCV 增殖的影响 (图 5-C)。结果发现, M1GS-HCV/C₅₂ 核酶可极显著地抑制 HCV 病毒的增殖 ($P < 0.01$)。在感染 1 d 后, 可使培养上清液中 HCV RNA 的拷贝数降低约 1500 倍。而在对照组, M1GS HCV/C₅₂ * 核酶尽管可一定程度上抑制 HCV 病毒的增殖, 但却无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

RNase P 主要生物学功能是参与 tRNA 的 5' 末

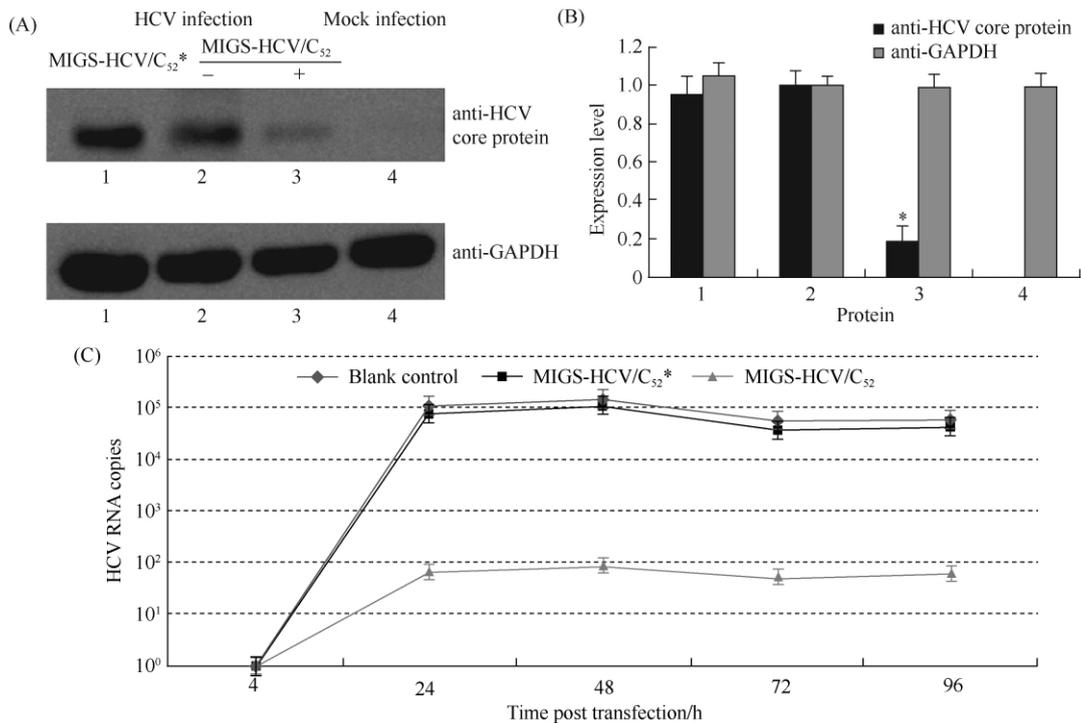


图 5. M1GS 核酶的胞内抗 HCV 效应

Figure 5. The intracellular anti-HCV effect of M1GS ribozyme. A: The expression alteration of HCV core protein in JFH1-infected Huh7.5.1 cell which separately transfected with different M1GS ribozymes by western blotting assay; B: The column diagram which reflects the expression level of HCV core protein; C: The dynamic change of HCV RNA copies in the cell culture supernatant that treated with different M1GS ribozymes. These values are the means from triplicate experiments. The standard deviation is indicated by the error bars.

端成熟,其在细胞内含量高、活性强^[8]。业已证实, RNase P 识别底物特定的高级结构而非一级结构序列,底物 RNA 中发生个别突变,但只要不影响其特定的结构基序,仍可被 RNase P 识别并特异性切割^[5]。因此,基于 RNase P 的反义技术针对一些易变异病毒,具有其独特优势。目前,基于该反义技术主要有外源引导序列 (External Guide Sequence, EGS) 和 M1GS 核酶这两大类型^[11]。众所周知, HCV 变异迅速,属于准种病毒^[16]。我们采用 M1GS 技术对 HCV 进行研究,将 HCV 的抗病毒治疗开辟一条极具潜力的新途径。本研究所构建 M1GS 核酶是针对 HCV 核心基因编码区一种靶向性人工核酶,其结构与作用原理如图 6 所示。

相较于 EGS 技术, M1GS 核酶 3' 端的 GS 可通过与相应靶 RNA 结合,并可直接引导与其相连的 M1 RNA 对底物进行切割,因此理论上切割效率更高。实验表明,我们构建的 M1GS-HCV/C₅₂ 核酶不仅可在胞外对 HCV 核心基因编码区 AUG 起始密码下游第 52 位胞嘧啶 3' 侧产生明显的切割作用(图

4),而且能够使 HCV 感染的 Huh7.5.1 细胞内核心蛋白表达量降低约 80% (图 5-A, B),并对病毒的增殖具有显著抑制作用,使细胞培养上清液中 HCV RNA 拷贝数减少约 1500 倍(图 5-C)。因此, M1GS-HCV/C₅₂ 核酶的构建为抗 HCV 研究提供了一种极具潜力的反义分子。

除 M1GS-HCV/C₅₂ 核酶外,我们同时构建了另一个 M1GS 核酶 (M1GS-HCV/C₅₂*)。该核酶与 M1GS-HCV/C₅₂ 具有完全相同的引导序列 (GS), 然而其 GS 与 M1 RNA 之间不含一段长 24 nt 的连接桥序列。结果发现 M1GS-HCV/C₅₂* 核酶不仅在体外缺乏明显切割活性(图 4),而且在宿主细胞亦不能显著抑制 HCV 的基因表达与病毒增殖(图 5)。这一方面进一步证实桥序列对于 M1GS 核酶的活性至关重要^[13],另一方面也提示缺乏桥序列的 M1GS 核酶可作为胞内抗病毒研究的一种理想内对照。

总之,本研究成功构建的 M1GS-HCV/C₅₂ 核酶为新型抗 HCV 药物及反义治疗的研究奠定了基础。然而,它在动物模型中是否同样具有抗病毒效应,尚

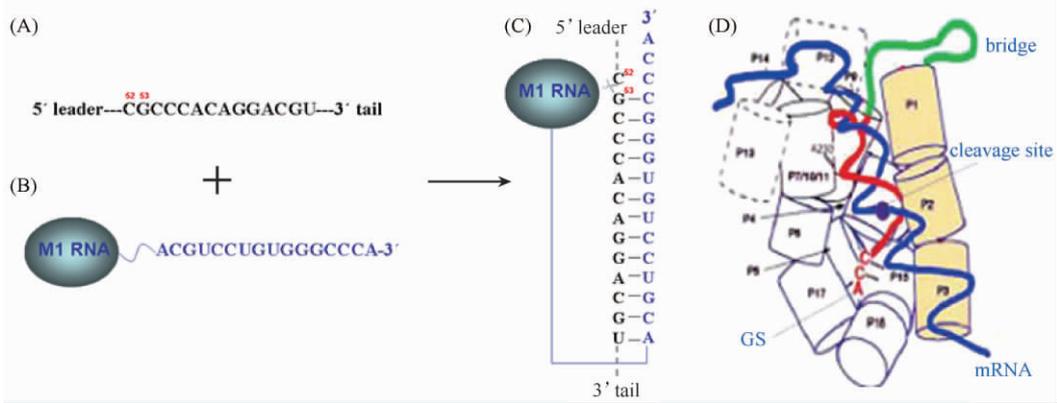


图 6. M1GS 核酶与底物的相互作用

Figure 6. Interaction between the M1GS ribozyme and its substrate RNA. A: The flanking sequence of C₅₂ cleavage site; B: Schematic structure of the M1GS-HCV/C₅₂ ribozyme; C: Schematic structure of the complex which is composed of the M1GS-HCV/C₅₂ ribozyme and its target RNA. The cleavage site is indicated with the scissors-shaped symbol; D: Three-dimensional structure of M1GS ribozyme-substrate RNA complex.

有待证实。此外,有必要对该 M1GS 核酶进行适当的化学修饰(如硫代化、烷基化及胆固醇化等),以提高其稳定性及细胞透过性,并在此基础上对 M1GS 核酶胞内或体内的毒性及代谢动力学进行深入探讨。

参考文献

- [1] Hengli T, Henry G. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clinical Science*, 2009, 117: 49-65.
- [2] Levesque MV, Levesque D, Briere FP, Perreault JP. Investigating a new generation of ribozymes in order to target HCV. *PLoS One*, 2010, 5(3):e9627.
- [3] Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 1983, 35: 849-857.
- [4] Kirsebom LA. RNase P RNA-mediated cleavage. *SIUBMB Life*, 2009, 61(3):189-200.
- [5] Kirsebom LA. RNase P RNA mediated cleavage: Substrate recognition and catalysis. *Biochimie*, 2007, 89: 1183-1194.
- [6] Ko JH, Izadjoo M, Altman S. Inhibition of expression of virulence genes of *Yersinia pestis* in *Escherichia coli* by external guide sequences and RNase P. *RNA*, 2008, 14: 1656-1662.
- [7] Jiang X, Chen YC, Gong H, Trang P, Lu S, Liu FY. Ribonuclease P-mediated inhibition of human cytomegalovirus gene expression and replication induced by engineered external guide sequences. *RNA Biology*, 2012, 9(9):1186-1195.
- [8] Liu F, Altman S. RNase P// Atassi MZ. Protein Reviews. Houston, Texas: Springer Science + Business Media, 2010:266-271.
- [9] Pang R, He DN, Zhou B, Liu K, Zhao J, Zhang XM, Chen PY. *In vitro* inhibition of Japanese encephalitis virus replication by capsid-targeted virus inactivation. *Antiviral Research*, 2013, 97(3):369-375.
- [10] McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *Journal of Viral Hepatitis*, 2000, 7:2-14.
- [11] Lundblad EW, Altman S. Inhibition of gene expression by RNase P. *New Biotechnology*, 2010, 27(3): 212-219.
- [12] Zhang WJ, Li HJ, Li YQ, He HK, Tang DS, Zhang X, Zhou TH. Construction of an effective M1GS ribozyme targeting HCMV UL97 mRNA segment *in vitro*. *Yi Chuan Xue Bao*, 2005, 32(11):1205-1212.
- [13] Zhang W, Li Y, Li H, Jia X, Zhang X, Zhou T. The influence of bridge sequence on the *in vitro* cleavage activities of M1GS ribozyme. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2006, 22(5):537-540. (in Chinese)
张文军, 李月琴, 李弘剑, 贾雪芳, 张欣, 周天鸿. Bridge sequence 对 M1GS 核酶体外切割活性的影响. *广东药学院学报*, 2006, 22(5):537-540.
- [14] Ning R, Zhang W, Li H. Construction of a pGEM-HCV/core plasmid containing the core gene of HCV. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2008, 24(2): 185-190. (in Chinese)
宁容, 张文军, 李红枝. 丙肝病毒核心基因克隆载体 pGEM-HCV/core 的构建. *广东药学院学报*, 2008, 24

(2):185-190.

- [15] Zhang W, Ning R, Zhang X, Li H. *In vitro* cleavage activities of an artificial HCV-specific M1GS ribozyme. *China Biotechnology*, 2008, 28(9):99-103. (in Chinese)
张文军, 宁容, 张欣, 李红枝. HCV 特异性 M1GS 核酶

的构建及体外切割活性研究. 中国生物工程杂志. 2008, 28(9):99-103.

- [16] Farci P. New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization. *Seminars in Liver Disease*, 2011, 31(4):356-374.

Determination of the *in vitro* antiviral activity of an engineered M1GS ribozyme that targets to the core gene of hepatitis C virus

Wenjun Zhang^{1,2*}, Xifang Li¹, Guifei Luo¹, Zhiwen Huang¹, Yingle Liu²

¹ Department of Pathogen Biology and Immunology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

² The State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: [**Objective**] Hepatitis C virus (HCV) is one of the major pathogens that lead to viral hepatitis. At present, Interferon treatment in combination with ribavirin is the first line clinical therapeutic approach. However, the responses are usually poor and the viral infection reoccurs. Therefore, exploring new antiviral agents and therapies is under urgent needs. [**Methods**] The sequence and structure of the core coding region of HCV genome were analyzed through the two computer software, DNAMAN and RNA Structure. The cytosine 52 nt downstream of the AUG initiation triplet was identified as the optimal target cleavage site. Based on the flanking sequence of this assumed cleavage site, a guide sequence (GS) was designed and covalently linked to the 3 prime terminus of the M1 RNA, which is catalytic subunit of the RNase P derived from *Escherichia coli* using PCR. We named this new targeting ribozyme M1GS-HCV/C₅₂ and its antiviral activities were analyzed in cultured cells. [**Results**] In the *in vitro* cleavage assay, M1GS-HCV/C₅₂ ribozyme could effectively cleave the HCV target RNA into two fragments at the specific cleavage site. Moreover, comparing to the blank control, this engineered M1GS ribozyme could reduce the core protein expression of more than 80% in the HCV-infected host cell and lead to a 1500-fold reduction of HCV RNA copies in the culture supernatant. An another M1GS ribozyme, M1GS-HCV/C₅₂*, which has the same guide sequence but does not contain a 24nt-long bridge sequence, did not exhibit apparent inhibition for the expression of HCV core gene and viral proliferation in our paralleled assay. [**Conclusion**] We successfully constructed an M1GS ribozyme showing affective and specific cleavage of target viral RNA. Further results showed that the engineering ribozyme had notably antiviral activity in cultured cells, thus provided a new promising approach for clinical anti-HCV therapeutic strategy.

Keywords: Hepatitis C virus (HCV), core gene, M1GS ribozyme, antiviral

(本文责编:王晋芳)