

反义 RNA 和 DNA

Antisense RNA and DNA

赵利淦等编著



武汉大学
出版社

反义 RNA 和 DNA

赵利淦 Leo M. Lee 周世宁 向近敏 编著

国 家 卫 生 部 资 助 项 目
湖北省科委和自然科学基金



武汉大学出版社

反义 RNA 和 DNA

赵利淦等 编著

※

武汉大学出版社出版发行

(430072 武昌珞珈山)

湖北省计委印刷厂印刷

※

850×1168 毫米 1/32 8.875 印张 222 千字

1993 年 4 月第 1 版 1993 年 4 月第 1 次印刷

印数:1—3000

ISBN7-307-01491-2/Q·42

定价:5.30

内 容 简 介

反义 RNA 和 DNA 是近几年发展起来的生命科学领域内,对基因乃至许多生命现象进行调节和控制的一门最新的科学。本书对反义 RNA 和 DNA 的来龙去脉、作用原理、调控机制,特别对反义技术在生命科学各领域,如抗病毒作用、抗寄生虫作用、抗癌作用,以及在农作物改良、遗传病的防治、基因表达的调控方面的具体应用,作了大量的介绍,是到目前为止国内难得的一本有关反义 RNA 和 DNA 内容的参考书。

本书内容丰富,在研究生命现象,特别是研究基因及其产物的表达、调节和控制方面,提供了理论根据和切实可行的工具和方法。可供生命学科各领域的研究和教学人员、以及大专院校的研究生、大学生和有志于生命科学研究的青年学习参考。

序 言

反义 RNA 技术是分子生物学在 80 年代的新发展。反义 RNA 天然存在于原核和真核细胞中,自然调控基因表达。以反义 RNA 技术组建基因工程反义 RNA 或人工合成反义寡核苷酸,特异性地阻断基因的转录、转译和表达,可作为高度专一性的基因调控工具,已引起广大基因工程科技工作者的重视。用于肿瘤、病毒、微生物和寄生虫感染的基因治疗研究,或调控动、植物和其他生物的基因表达,有深远的意义和广阔的前景。

赵利淦等教授主编“反义 RNA 和 DNA”一书,详细介绍其研究基础和应用途径。全书二十一章每章列出文献出处。可供生物学、分子生物学和医药学科技工作者和大专院校师生参考。

陈鸿珊

1993 年 4 月 2 日

编者的话

反义 RNA 的发现,是生命科学中的一项重大突破。原来以为它只有干扰信使 RNA(m RNA)的翻译,可能有对抗病毒的感染作用。实际上,现在知道反义 RNA 是核酸翻译、复制和转录的调节因子,打破了细胞调控因素都是蛋白质的概念。反义 RNA 的调控功能,同 RNA 的酶解活性,都是对蛋白质功能的重大挑战。国外对反义 RNA 的兴趣,不只在抗病毒感染中探索实际应用的可能性;在抗肿瘤,在遗传性疾病的防治等方面,也在进行开拓性的研究。他们对反义 RNA/DNA 这一崭新领域的重视,从近年来应用反义技术在植物、动物、寄生虫、微生物、基因调控、遗传疾病、肿瘤疾病取得的成果,以及发表的论文的数量和质量方面得到最好的说明。短短几年内,在国际学术界就有几部有关反义 RNA/DNA 的专著问世,它们是:1988 年《基因》杂志为反义 RNA/DNA 出了一期专刊;同年在美国哈佛大学出版了反义 RNA/DNA 学术讨论会的论文集;1990 年,美国国立卫生研究院的 J. S. Cohen 博士出版了第三本,也是正式的反义 RNA/DNA 的专著;1991,1992,欧洲、美国又有两本正式专著出版。我们编著的这本《反义 RNA 和 DNA》目的在于系统地介绍这一新领域,并使我国更多的学者掌握反义技术这一崭新的工具和武器,为我们尚未解决的生命科学领域的难题:肿瘤、病毒、遗传性疾病、基因的表达和调控的研究,开辟一个切实可行的新领域和新的研究方法。为最终攻克这些难题铺平道路。

在编写这本小册子的时候得到了国家卫生部、湖北省科委和

自然基金的资助和支持。我国著名的医药生物学家、中国医学科学院医药生物技术研究所的陈鸿珊教授为本书写了序言。湖北医科大学李辉奉教授、陈锡昌教授给了我们很大的鼓励。武汉大学出版社编辑李群副教授对我们的原稿给予了仔细、有时甚至是不顾情面的审校。宋翠琰、张美英同志为本书的出版做了大量的工作。由于他(她)们的努力,我们才能看到这本小册子摆在我们的眼前。

编 者

一九九二·元月·十

目 录

序言	1
编者的话	3
第一章 反义 RNA 和 DNA 简介	1
第二章 天然存在的反义 RNA 调控	12
第三章 RNA 的结构和功能	24
第四章 反义 RNA 的结构、功能和作用机制	34
第五章 原核细胞的反义 RNA 调节	50
第六章 插入序列 IS10 的反义调节作用	60
第七章 真核细胞的反义 RNA/DNA 调节	70
第八章 反义 RNA 与基因表达的关系	87
第九章 反义 RNA 在基因调节中的应用	97
第十章 基因外重复回文序列对基因表达的影响	108
第十一章 反义寡聚核苷酸的特性	122
第十二章 反义寡聚核苷酸的作用机制	145
第十三章 反义寡聚核苷酸靶序列的选择和检测	162
第十四章 反义寡聚核苷酸的药物动力学	171
第十五章 反义寡聚核苷酸的合成方法	190
第十六章 硫代磷酸化的反义寡聚核苷酸	201
第十七章 甲基化寡聚核苷酸与聚酰胺核酸	213
第十八章 反义 RNA 的抗病毒作用	219
第十九章 反义技术与动物体目寄生虫的防治	230

第二十章	反义 RNA 抗聚乳糜酶作用的意义	238
第二十一章	反义技术与反求遗传学对人类基因组 计划蓝图的贡献.....	247
	附录.....	257

第一章 反义 RNA 和 DNA 简介

所谓反义 RNA 或 DNA, 实际上是能够与 mRNA (信使核糖核酸) 的碱基对互补, 并且能阻止其翻译成蛋白质的短小 RNA 或 DNA。这种短小的 RNA 或 DNA, 有人叫它为反义 RNA 和 DNA (Antisense RNA or DNA); 有人叫它信使干扰互补 RNA 或 DNA (MIC RNA or DNA)^(1,2)。这是 1984 年以前的定义。后来发现, 反义 RNA 或 DNA 可以干扰复制和转录。因而, 现在的定义应包括阻止复制和转录的内容。由于它们能够选择性地关闭基因, 因此, 它已成为一种极有价值的研究工具, 是被科学家们广泛用来同病毒性疾病、癌症、寄生虫和遗传性疾病作斗争的最引人注目的新武器; 是科学家们用来调节基因表达和观察基因表达的最有效的手段和方法。

为了正确理解反义 RNA 或 DNA 究竟是怎么回事, 我们首先需要复习一下基因的结构和表达的基本原理。所谓基因, 实际上就是编了码的蛋白质的“祖先”。密码记录着组成蛋白质祖先的 DNA 中四核苷酸碱基井井有条的排列顺序。这四个碱基是腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)。这四种碱基除了参加纵向顺序, 牢固连接成股外, 横向两股之间的碱基必须满足 A-T 配对和 G-C 配对的严格要求。并且, 一字不漏地只许 A-T 或 G-C 横向携手, 纵向则按序列顺序延伸。最后, 两股 DNA 卷曲组成双螺旋结构。

DNA“祖先”如何产生蛋白质“子孙”呢? 它不是直接产生的。它需要制造一个中介分子——信使核糖核酸分子(mRNA)。这个

中介分子与 DNA 的组成仅“两字”之差：(1)组成 DNA 的四个碱基是 A、T、C 和 G，而组成 RNA 的四个碱基是 A、U、C 和 G。并且，这个 U 也能与 A 配对。(2)组成 DNA 的戊糖是脱氧核糖，而组成 RNA 的戊糖则是核糖。众所周知，在 DNA 复制时，基因的有义的那一股和它的配对股，即无义的那一股分开，形成复制泡。引发体在解开的两股 DNA 链上就位后，由引发酶阅读两股 DNA 模板，合成 RNA 引物。再由 DNA 聚合酶阅读模板，合成冈崎片段。最后，几乎同时完成两股 DNA 的复制任务。但转录过程则完全是另一回事。首先是基因的有义的那一股和它的无义的那一股配偶体分开；然后，由酶装配成一个和无义股上的顺序互补的 RNA 分子。这个 RNA 分子就是“信使”RNA 分子。这个分子一旦形成，最终要转移到细胞的核糖体上去，在那里让核糖体读出编了码的“祖先”的信息。并以这个信息指导氨基酸串连在一起，形成编了码的蛋白质。因此，基因中的无义股是信使 RNA 的模板。这个道理在 1981 年以前就知道了。基因中的有义股将产生什么呢？当然，现在早已知道是产生反义 RNA。但是，这在 1981 年前第一个作出这个肯定答复是很不容易的。

1981 年，美国国立卫生研究院的科学家们在研究一种叫做 ColE1 的质粒的复制时意外地踏进了反义 RNA 的陌生领域⁽³⁾。他们发现，在质粒 DNA 的复制过程中，由质粒遗传物质形成的拷贝数取决于细胞内可得到的 RNA 的引物数。进一步的研究还发现，这种 RNA 引物的可获得性并不受控于它的总浓度，而受控于一种特异性的抑制分子与引物的比例。最后发现，这种抑制性的分子就是基因的有义 RNA 股的反义转录产物。即这些抑制性分子是由产生此引物的 DNA 互补的那股 DNA 转录而成的 RNA 分子(图 1)。

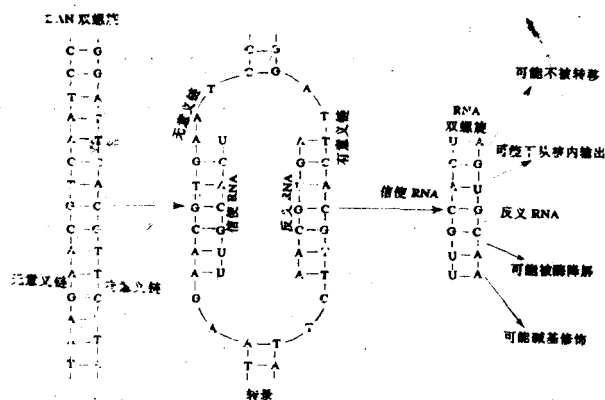


图 1. 在转录过程中,信使 RNA 只是大多数基因的转录物,有些基因却被转录为反义 RNA 去调节基因的表达。

正如 DNA 的有义股和无义股是互补的那样,无义股产生的 RNA 引物和反义的抑制性分子也是互补的。因此,有义的 DNA 和反义的 RNA 能相互杂交,使螺旋状态下的 RNA 引物不足以启动 DNA 的复制。因为只有在 RNA 引物的作用下打开螺旋后才会启动 DNA 复制的进行。

实际上,反义 RNA 的功能远远不只限于 DNA 的复制的调

节,它还调节转录过程。1983年,一位哈佛大学的学者研究细菌中的反义 RNA 是怎样控制转位酶合成时,发现在转录过程中,转位酶信使 RNA 是由转位酶基因产生的。在转位酶基因有义的那一股转录成反义 RNA 时,这个反义的 RNA 就和无义的信使 RNA 特异地结合,使核糖体不能把编了码的信息翻译成蛋白质。

显然,反义 RNA 能抑制基因的转译,钝化基因,并且其选择性远远胜于突变。因此,如何去生产这种反义 RNA 是我们大家很关心的一个实际问题。要解决这个有趣的问题,我们还得利用重组基因工程,去制造一个表达载体。如果能把这个载体注入细胞,定能制造出反义 RNA。

现在,科学家们可以在实验室里用 DNA 双螺旋设计出能制造反义 RNA 的表达载体。把这个载体引进细胞以后,这个细胞便可源源不断地制造人类理想的反义 RNA。方法是:首先分离和提纯信使 RNA。获得信使 RNA 后,用逆转录酶将信使 RNA 逆转录为互补 DNA(cDNA)。反过来,这股 DNA(即 cDNA)也能够作为供制造 DNA 有义股和制造 DNA 双螺旋之用的模板。于是,一个含有有义股和它的配对物——反义 DNA 股的双股 DNA 片段出现在我们的眼前。这时,我们按需要选择某个质粒,用同一种内切酶切割这个质粒和上面组合的双股 DNA 片段,在连接酶的作用下,将那个组合的、含有反义 DNA 的双股 DNA 片段组进同一内切酶切开的质粒的切口内,形成一个共同组合的重组质粒。值得强调的是,原质粒被切开的切口应选择在质粒启动区的附近,便于上述形成的重组质粒成为一个特殊的表达载体,并可在细胞内任意检测这一表达载体的存在。当这个启动子启动转录时,这个表达载体就会制造出原来的信使 RNA 的拷贝。我们的目的不仅如此,我们还想用限制性内切酶把刚才重组的质粒上的添加上去的 DNA 片段(含有反义 DNA)切下来,那么,它能够把自己以相反的方向重新插进刚被切开的质粒的环内。这个表达载体诞生以后,如果引进细胞内,它就能源源不断地制造出大量的反义 RNA(图 2)。

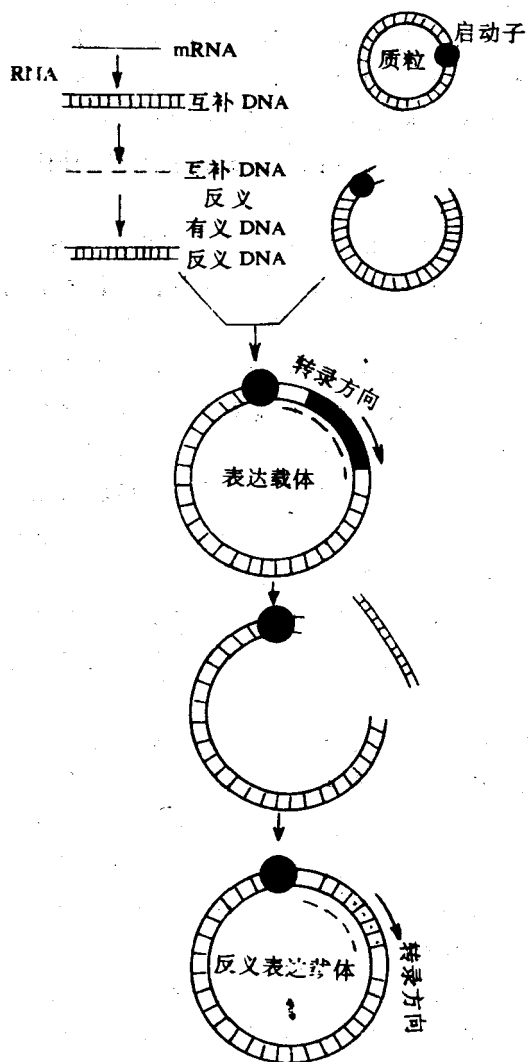


图 2. 实验室组建反义 RNA 的过程。分离 mRNA 后, 制成 cDNA, 并以此作为模板制成一个 DNA 双螺旋。并重组进质粒中, 以产生一个表达载体, 并可以在细胞内测试这个载体, 是原来的 mRNA。用内切酶切下这一重组体添加上去的 DNA, 就能把自身以相反方向重新重组进环内, 新的载体将产生反义 DNA。

按照上述方法,美国西雅图 Fred Hutchinson 癌症研究中心的 H. M. Weintraub 选择取自单纯疱疹病毒(HSV)编码胸苷激酶(TK)的基因作为试验基因。这种酶能够使 DNA 中碱基 T 的分子前体——胸苷具有能加到正在增长的 DNA 股上去的能力。如果能找到一种细胞有一个突变的 TK 基因,并能把胸苷整合到正在复制的 DNA 中去,那么,把含有 TK 基因的表达载体注入这些细胞时,这些细胞就开始正常地整合胸苷。

Weintraub 的实验是从克隆化的编码的 HSV-TK 基因着手的。他们设计了反义 TK-RNA 的表达载体。当从双股表达载体上切下这个 TK 基因时,如果把它随机地插入载体,那么有半数的 TK 基因按其原来的取向重新进入载体,而另一半基因则反向进入载体成为反义产物。他们还发现,有义的 TK 顺序插入了原来含有反义 TK 顺序的那一股,而反义的 TK 顺序则插入了原来含有有义 TK 顺序的那一股,他们确信,这样改变了的表达载体理应转录出反义的 TK-RNA,而不应产生信使 TK-RNA。果然不出所料,当这些反义的表达载体注入曾接种过 HSV-TK 表达载体的细胞后,这些细胞整合胸苷的能力大大减弱了。这表明反义表达载体的存在可以抑制有义载体的活性。特异性反义 RNA 能抑制克隆的靶基因的活性。

反义 RNA 能够关闭内源的细胞基因是通过研究编码肌动蛋白的基因而达到的。肌动蛋白是细胞骨架的结构成分,能帮助细胞运动和保持细胞外形。当把反义的肌动蛋白 RNA 的表达载体注入细胞后,这些细胞便变成了发育不健全的细胞,即变成了既不能运动又不成形的扁平细胞。由于肌动蛋白是一种必须的蛋白质,所以不表达肌动蛋白的细胞不久全都死亡了。

反义 RNA 关闭内源细胞基因可借助“可诱导性启动子”来解决。由于启动子是基因的一部分,能控制基因产物的转录启动。因此,只要把一个可诱导的启动子加到一个反义表达载体上,人们可以在任何时候、任意地利用给予或不给予诱导因子的方法去启

动或制止反义 RNA 及其影响的基因产物的表达。

反义 RNA 抑制基因表达不仅可以通过表达载体的方法,而且还可以在实验室里合成反义 RNA 股后把它们直接注入细胞,使这种合成的反义 RNA 在细胞内发挥抑制作用。1985 年,哈佛大学的科学家和西雅图的科学家同时证明反义 RNA 直接注入蛙卵细胞后,能抑制事先注进的相应的有义 RNA 的转译。同样,将反义肌动蛋白 RNA 注入细胞也能抑制细胞骨架的形成,这种结果同前面述及的注入反义表达载体的抑制结果非常相类似。

1985 年,一项更先进的制造反义 RNA 的方法问世了。这种方法是把反义表达载体连接到编码必需酶的基因上,再把这个重组载体插进细胞内,由于这个必需酶在被细胞合成后可以很容易地被识别,因此,利用该酶的抑制剂在其以后的传代细胞里很容易选择出增殖这个酶基因和这个表达载体的细胞后代。于是,这些被选出的细胞就可大量制造人类所必须的反义 RNA 了。自此以后,反义 RNA 研究进入了一个新阶段。

现在,我们已经知道不仅反义 RNA 能够“抓住”信使 RNA,阻止其翻译成蛋白质。而且,还知道 DNA 短的互补股也能和 mRNA 杂交,阻止其翻译成蛋白质的作用。反义寡聚核苷酸(16 个碱基)引入细胞后可起到同样效果的反义 RNA 的抑制作用。最先发现这种作用的科学家是将反义 DNA 寡聚核苷酸去抑制 Rous 肉瘤病毒(RSV),使其不能把培养的雏鸡细胞转化为癌性细胞而闻名于世的。由于这项工作的创举,人类开始了抗病毒研究的新纪元。反义寡聚核苷酸现在已经在组织培养试验里抑制了疱疹病毒、流感病毒和艾滋病毒的增殖。在作者的实验室,还成功地抑制了我国流行最广、引起死亡率很高的一种烈性病毒——流行性出血热病毒的增殖。而且,在动物体内也表现同样的抗流行性出血热病毒的作用。但是不尽令人满意的是,未加改构的寡聚核苷酸,如果让其自发进入细胞,发现其进入能力不如改构的容易。因而,近年来研究未变构的糖-磷酸盐大分子,硫代磷酸寡聚核苷酸以及甲基磷酸化

的寡聚核苷酸对细胞的穿膜及防止酶水解作用已成为时髦的课题。近年,进一步将某个化学基团连接到反义寡核苷酸上去,以增强反义寡聚核苷酸的诸方面的作用能力也引起了广泛的注意。

反义寡聚核苷酸的功能是多方面的,下面将继续介绍除了病毒以外,寡聚核苷酸在生命科学其它领域的一些应用的例子。

在抗寄生虫方面,法国科学家把一个吡啶连接到一个反义寡聚核苷酸上,增加了能量,使反义分子能利用此能量更有效地结合寄生虫的 mRNA 靶子。经过实验,他们在细胞培养水平上用反义寡聚核苷酸杀死了布氏锥虫这一人类较棘手的瘟神^(4,5)。

在抗癌实验方面,美国科学家对众多的癌基因进行了反义寡聚核苷酸及反义 RNA 方面的研究。值得一提的一个例子是用 Src 基因进行的研究。Src 基因是某些病毒里以突变形式存在的一个细胞促生长基因。它编码的蛋白质对其它蛋白质进行化学修饰作用,从而抑制其它蛋白质的活性,Rous 肉瘤病毒之所以能转化雏鸡细胞,也与这种异常的 Src 基因的存在有关。对其它的癌基因,如 fos、ras、sis、ets 等等也进行了反义寡聚核苷酸的广泛研究。

在改良植物优良品种方面,现在已经可以把反义表达载体注进矮牵牛花以抑制一种生产花色素的酶,处理过的植物能开出与原来花色完全变异的花朵。在西红柿良种改造方面,经过反义 RNA 的处理,使容易成熟软化的西红柿变成不易软化腐烂的西红柿,这就大大有利于西红柿的远距离运输而不易受损。其它的植物,如培养抗植物病毒的菸草及土豆等都预示着反义 RNA 可使大田经济作物增产的可喜的苗头⁽⁶⁻¹¹⁾。

在遗传性疾病的研究方面,现在发展起来的一项“目标确定的同源重组”技术可以把含有靶基因突变的考贝的克隆化 DNA 引进细胞。这种 DNA 能通过某种方式找到细胞核内的病态靶子并在该靶子正常的染色体活动过程中取而代之。现在,科学家们可以运用遗传工程的方法去处理克隆化的基因,使其在细胞内过度表达自己,从而产生供基因功能表型的线索。在脂肪细胞,现在还能