

## 应用扫描隧道显微镜技术观察针对HBsAg 基因转录物的核酶的二级结构

王平<sup>1</sup> 郭军<sup>2</sup> 白春礼<sup>2</sup> 侯云德<sup>1</sup>

**关键词** 扫描隧道显微镜 核酶

核酶 (Ribozyme) 是具有催化RNA切割反应功能的RNA, 它可以特异性地切割RNA[1~3]。最近, 核酶的一级结构已经被证实, 其与底物结合时所形成的二级结构如锤头状 (Hammerhead)、发夹型 (Hairpin) 结构[4~6], 亦得到初步证实。因此, 能够设计并人工合成核酶, 通过特异性破坏RNA, 阻断其功能, 从而有效地阻止病毒的复制和繁殖。这是近年来继反义RNA之后发现的又一个抑制基因表达的有力工具, 开辟了分子生物学的一个新领域。

扫描隧道显微镜 (STM) 是八十年代发展起来的用于物质表面结构分析的新型显微镜, 它是根据量子理论中的隧道效应原理制作的。应用于生物学研究具有许多优点, 如在原子分辨率下能够观察到局域三维结构细节; 可以在不同的环境条件下工作; 从几十埃到几微米尺度的样品范围均可观察, 所需样品量极少, 对样品无损坏, 等等。

自从1988年美国T. Beebe等人获得大气条件下第一张DNA分子双螺旋结构的图像以来[7], 各国研究者纷纷致力于各级形式的核酸分子的研究[8~10]。目前, 对核酸结构观测的热点集中于DNA分子的结构上, RNA则鲜有报道。其原因在于DNA分子具有规整的双螺旋二级结构, 且有一定导电性, 易于STM观测成像。而RNA分子则为单链, 二级结构形式多样, 用于STM观测有一定的困难。目前较适合于对一些结构简单或已为人们熟知的样品分子开展研究。

我们设计了针对乙肝病毒ayw株S区基因转录物的锤头状核酶, 应用自行研制的扫描隧道显微镜CSTM-9000[11]观察, 获得了清晰的灰度形貌图。为探讨核酶的作用机理提供结构上的信息。

首先, 根据HBVayw株的S区基因的314位点附近序列: 5'.....GCCAAAATTCGCA GTCCCCAACCTCCAA.....3', 我们设计了一段寡核苷酸, 序列为: 5'.....AATTCGCA | GTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG | CCCAACCTGGTAC.....3' (注: 两|间为核酶的保守序列), 其中5'.....AATTC为EcoRI的酶切位点, 3'.....CATGG为KpnI的酶切位点。使用美国Abi公司的381A DNA合成仪, 人工合成上述寡核苷酸。将此DNA片段克隆进pSP72体外高效转录载体 (图1), 使用Boehringer Mannheim公司的SP6RNA Polymerase kit, 在体外高效转录核酶。体外转录所得核酶包含99个碱基, 长度估算应在300埃左右, 5'端带有54个碱基长度的Polylinker。本核酶在体外环境中对HBV S区段的RNA具有一定的切割活性。经过常规纯化处理, 将其溶于去离子水中。将上述核酶水溶液滴在新鲜裂解的石墨表面上, -10℃冻干, 在室温和大气环境下观察。

1. 病毒基因工程国家重点实验室, 中国预防医学科学院病毒学研究所

2. 中国科学院化学研究所

收稿日期: 1991年6月5日, 同年7月6日修回。

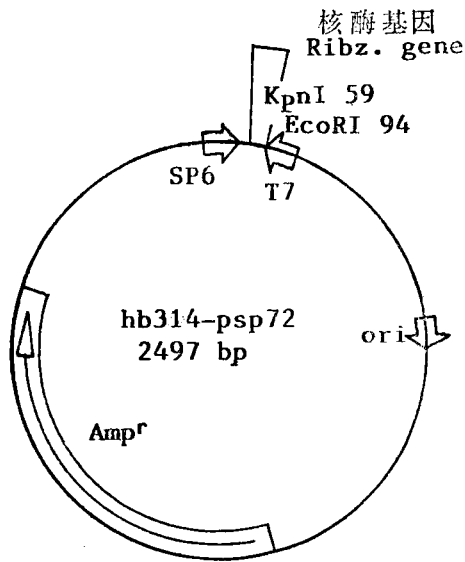


图 1 含有核酶基因的重组pSP72载体  
Fig.1 The recombinant pSP72 vector  
including the ribozyme's gene

从图2可以得出,核酶的分子尺度计算值基本与理论估计的大小相近。同时还用STM函数显示技术对样品进行了测定和分析,排除了图像是由石墨基底造成的假象的可能性。在未与底物结合前,它在空间是任意舒展的,而不象当初预料的,形成一定的发夹式结构。这可能是因为,核酶的长度仅为99个碱基,在体外自然条件下,当没有合适的底物与其相结合时,其保守区中的8个碱基配对不足以形成稳定的发夹式结构,因为这样形成的结构,其在空间伸展的两臂,对其结构的稳定会有一些影响,分子内张力和空间阻碍等都会使其不稳定。另外,核酶分子在石墨表面与石墨分子的吸附作用对核酶的空间结构的形成和分子的稳定性亦会产生影响。分子在物质表面的吸附作用,使分子趋向于自由能最低的分布。因此,当核酶分子吸附在石墨表面时,其与石墨表面的接触面积越大,其自由能越低,在因氢键作用导致的能量降低小于因吸附作用而导致的能量降低时,核酶分子在石墨表面应是线性伸展的。利用计算机模拟计算核酶与底物结合时的二级结构,与未与底物结合时核酶的二级结构相比较,两者的自由能差别较大,前者自由能低,其空间存在稳定。这从侧面对上述结论亦给出了一定的佐证。

我们应用STM技术第一次观察到核酶的二级结构,这为进一步研究核酶与底物RNA作用时空间结构的变化,揭示核酶作用机制提供了可能。这对指导我们应用核酶技术进行治疗病毒性疾病的研究,尤其是抑制HBV的复制、基因组的表达,进而治疗乙型肝炎的研究,是很有意义的。

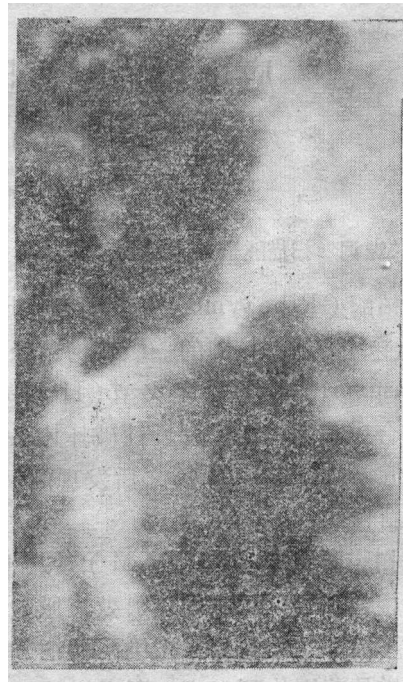


图 2 扫描隧道显微镜下核酶的二级结构  
扫描范围 $382 \times 410 \text{ \AA}^2$ , 长度 $286.8 \text{ \AA}$ , 分子最大宽度  
 $20.0 \text{ \AA}$ ,  $I_t = 1.15 \text{ mA}$ ,  $V_b = 24 \text{ mV}$ 。

Fig.2 The STM image of the ribozyme's  
secondary structure

The molecular length:  $286.8 \text{ \AA}$ . The molecular greatest width:  $20.0 \text{ \AA}$ . Scanning area:  $382 \times 410 \text{ \AA}^2$ .  $I_t = 1.15 \text{ mA}$ ,  $V_b = 24 \text{ mV}$ .

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Forster A et al: Cell, 49: 251, 1987
- [ 2 ] Forster A et al: Cell, 50: 9, 1987
- [ 3 ] Altman S: Adv Enzymol, 62: 1, 1989
- [ 4 ] Hoseloff J et al: Nature, 334: 585, 1988
- [ 5 ] Uhlenbeck O et al: Nature, 328: 596, 1987
- [ 6 ] Cotten M: Trend of Biotechnology, 8: 174, 1990
- [ 7 ] Beebe T et al: Science, 213, 370, 1989
- [ 8 ] Arscott P G et al: Nature, 339: 484, 1989
- [ 9 ] Lee, Arscott P G et al: Science, 244: 475, 1989
- [ 10 ] Bai C et al: Chinese Science Bulletin (Chinese edition), 24: 1341, 1990
- [ 11 ] 白春礼: 科学通报, 34(5): 339, 1989

## OBSERVATION OF THE SECONDARY STRUCTURE OF THE RIBOZYME DESIGNED TO THE TRANSCRIPT OF HBsAg GENE BY SCANNING TUNNELLING MICROSCOPY (STM)

Wang Ping<sup>1</sup> Guo Jun<sup>2</sup> Bai Chunli<sup>2</sup> Hou Yunde<sup>1</sup>

Ribozyme is a kind of RNA which can catalyze cleavage of the sequence-specific RNA. However, there have been no direct evidence for Ribozyme's spatial structure. We applied the technology of Scanning Tunnelling Microscopy (STM) to intend to get some direct information about the spatial structure of the hammerhead-structure Ribozyme, which was artificial synthesized and designed to the transcript of HBsAg gene. The Ribozyme's molecular length and its greatest width was 286.8 Å and 20.0 Å. The Ribozyme molecules stretched out linearly on graphite surface and were not as expected to form a hairpin or other complicated structure.

**Key words:** Scanning tunnelling microscopy (STM) Ribozyme

1. National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, CAPM

2. Institute of Chemistry, Academia Sinica