

pRNA 导入型 Ribozyme 的设计和体外转录制备*

周颖^{1,2} 方静² 毛建平^{2**} 祝延^{1**}

(1 安徽医科大学基础医学院 合肥 230032 2 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所 北京 100850)

摘要 目的:枯草杆菌的包装 RNA 分子 pRNA 是新型纳米分子载体,将其同锤头型核酶 Ribozyme 重组可以构建结构稳定、能进入细胞、主动识别结合和剪切基因 RNA 的 pRNA-Ribozyme。由于目前 100 nt 以上的 RNA 分子采用化学合成制备较为困难,实验采用基因重组构建并体外转录制备 170 nt 的 pRNA-Ribozyme。方法:依据 pRNA 序列和 Ribozyme 分子序列,采用 PCR 扩增和克隆重组,将 pRNA-Ribozyme 按照顺式连接开放式结构、和 Ribozyme 嵌入 pRNA 成自身环化闭合型结构,制备其 DNA 质粒;再在体外转录制备 pRNA-Ribozyme 分子。结果:体外生物合成制备 pRNA-Ribozyme 顺式连接开放式结构、和 Ribozyme 嵌入 pRNA 成自身环化闭合型结构 pRNA-Ribozyme 分子,它们能通过自身正确折叠形成聚合体结构。体外鉴定 pRNA-Ribozyme 对其靶 mRNA 均具有切割降解活性,为 pRNA-Ribozyme 分子的细胞内应用和在胞内表达应用打下基础。

关键词 pRNA Ribozyme

中图分类号 Q819

核酶 Ribozyme 具有结合、识别和主动切割基因 mRNA 性能的 RNA 分子,在基因表达干预方面已经成为有前景的工具之一,并已应用于疾病基因治疗中,有的进入了临床试验阶段^[1]。

枯草杆菌 $\phi 29$ 噬菌体的包装 RNA 分子(packaging RNA)即 pRNA 是近年来发现在基因治疗中的新型纳米分子载体,其碱基组成约 120 nt,颗粒大小在 30 nm^[2],具有 ATP 依赖导入细胞能力,容易穿过细胞膜,它能设计成一种理想的非病毒型载体^[3,4]。pRNA 分子载体不会引起免疫反应和排斥现象,是基因治疗中非常有发展前景的理想的分子载体,目前认为它具有安全、高效、靶向性好、能够较长时间作用于效应细胞的特点^[5]。因此,pRNA 已经用于构建 RNAi 的新型纳米 pRNA-RNAi 分子,用于癌症治疗^[6]和疾病基因表达下调^[7],构建 pRNA 引导型适配子已经用于艾滋病的实验治疗^[8]。

对于由 pRNA 分子和 RNAi 和 Ribozyme 分子组成的重组分子,文献中多为化学合成^[8,9]。本实验首次尝试用基因重组方法构建锤头型 Ribozyme 和 pRNA 重组分子,以

探讨体外转录制备 pRNA 导入型 Ribozyme 的方法,同时经验证证实由聚合酶制备的 pRNA 引导 Ribozyme 分子同样能正确折叠和降解靶 mRNA。同时采用分子文库^[10-11]杂交实验筛选基因 mRNA 分子的结合靶点(accessible sites),靶点证实有效时将其互补序列设计成 Ribozyme 的两臂,设计有效 Ribozyme 分子,再采用 T7 启动子构建和 pRNA 重组连接的 pRNA 导入型 Ribozyme 分子的 DNA 克隆,然后体外转录制备。实验中 pRNA 导入型 Ribozyme 分子有两种结构:(1)Ribozyme 连接于 pRNA 的 3'末端成开放型;(2)将 Ribozyme 嵌入 pRNA 形成自身环化闭合型结构^[12]。然后进行鉴定分析。本实验成功地由体外转录制备了两种形式的 pRNA-Ribozyme,并证明了在体外有降解靶向 RNA 的功能。为构建和制备 pRNA 引导的 Ribozyme 新型重组分子进行了尝试,为在细胞内和动物体内靶向失活基因表达,下调基因表达的应用打下了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂及质粒载体

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α (本实验室保存),pEZ-T 克隆质粒购自 GenStar Biosolutions 公司,质粒纯化试剂盒、DH5 α 感受态细菌购自北京 TIANGEN 公司,Taq

DNA Polymerase 购自北京标凯科技公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Pfu DNA Polymerase、RNase H、T7 RNA Polymerase、RNA 酶抑制剂 RNasin 和 NTP 购自 Promega 公司。RNA 纯化试剂盒和 DNA 分子量标准购自北京天根生化科技公司。变性缓冲液含有 95% 甲酰胺和 20 mmol/L NaOH 及 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 和样本等体积混匀以中止核酸酶解反应。

引物合成与测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。所用化学试剂为进口或国产分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 Ribozyme 的设计 在实验室前期工作基础上^[13],利用 MAST 技术筛选得到的大肠杆菌 16 s rRNA 有效作用靶点 V,设计锤头型 Ribozyme,其左右两臂各

有 9 个核苷酸与 16 s rRNA 靶点 V 互补,保留 Ribozyme 核心 23 个核苷酸序列,该核酶以字母 RzV 命名。

1.2.2 pRNA 顺式连接开放型 Ribozyme 分子的制备 合成系列引物,如表 1,按照 PCR 标准操作进行扩增,设计 5'端一条正链上游 P1 引物 59bp,设计和上游引物互补 20bp 的 59bp 下游引物 M2,可以扩出 98bp 片段;以此片段为模板再用 P0 引物与 59bp 反向互补引物 M3 进行扩增获得 137bp 片段;以此 137bp 片段为模板用 P0 引物与 59bp 反向互补引物 M4 进行扩增获得 176bp 片段;均以互补的 20bp 碱基退火温度进行退火,延伸时间以 60 秒 1000 碱基为单位设定扩增反应。最后以 176bp 片段为模板用 P0 和 M5 引物扩出 pRNA-RzV 全长序列,并连接到 pEZ-T 质粒采用 DH5α 细菌克隆,测序。

表 1 pRNA-Ribozyme 顺式开放型结构的引物设计
Table 1 The primers designed for pRNA-Ribozyme cis-connected open structure

引物名称	序列	目的
P0	taatacgactcactataggg	
P1	taatacgactcactataggggaatgggtacgggtacttccattgtcatgtgtatgttggg	
M2	atcaacaaagtatgtgggctgaactcaatcagggttaatacccaacatacacatgaca	用 P1 和 M2 退火延伸制备片段 1 + 2
M3	cttatcaaatagtcgtgcacttttgcacatgattgacaaccaatcaacaagtatgtggg	片段 1 + 2 为模板用 P0 和 M3 扩出片段 1 + 2 + 3
M4	ggattaaacccctgattgagttcagccacatacttgttgacttatcaaatagtcgtgc	片段 1 + 2 + 3 为模板用 P0 和 M4 扩出片段 1 + 2 + 3 + 4
M5	tgtcatgtgtatgttggggattaaacccctgattga	以片段 1 + 2 + 3 + 4 为模板用 P0 和 M5 扩出全长

设计好的开放型的 pRNA-RzV 单体 DNA 序列用含有 T7 启动子上游引物和其本身的下游引物扩出 T7-pRNA-Rz 的 DNA,依据 Promega 提供的 T7 RNA 聚合酶说明书进行 RNA 转录,制备开放型的 pRNA-RzV 单体。

1.2.3 Ribozyme 嵌入 pRNA 成自身环化闭合型分子的制备 为了保持 pRNA 原始折叠结构,参考文献[12]报道的方法,在 pRNA75 位 G 的 5'位置打开,插入 T7 序列,

构建 T7 - ⁷⁵G pRNA¹¹⁸U-RzV-¹U pRNA⁷²U 的 DNA,设计的引物如表 2 所示,按照 PCR 标准操作进行扩增,产物连接到 pEZ-T 质粒采用 DH5α 细菌克隆,测序。

用含有 T7 启动子上游引物和其本身的下游引物扩出 DNA,依据 Promega 提供的 T7 RNA 聚合酶说明书进行 RNA 转录,制备自身环化闭合结构 pRNA-Rz 单体。

表 2 Ribozyme 嵌入自身环化闭合型 pRNA-Ribozyme 结构的引物设计
Table 2 The primers designed for pRNA-Ribozyme closing inner structure

引物名称	序列	目的
Pa	taatacgactcactataggggtgattggtgtcatcat	以上述 T7 - 开放型 pRNA-Rz 的 DNA 为模板,用 Pa 和 Ma 制备片段 a
Ma	cgtctcactcaggactcatcaggacgggggctttttatcaaatagtcgtgcacttt	
Pb	cctgatgagtcgctgaggacgaaatcatttgaaaaatcaatgtagtcgtactcc	以上述 T7 - 开放型 pRNA-Rz 的 DNA 为模板,用 Pb 和 Mb 制备片段 b
Mb	agtatgtgggctgaactcaat	

注:以 a 和 b 为模板用 Pa 和 Mb 扩出 pRNA-Ribozyme 自身环化闭合结构全长 DNA

1.2.4 pRNA-Ribozyme 聚合体的形成 体外转录得到的 pRNA-Ribozyme 均为单体,由于其聚合结构的右手 loop 区序列 45 ~ 48 位为 AACC,它与左手 loop 区 82 ~ 85 位 GGUU 相互结合,该类单体命名为 a 类(表 3),a 单体之间可以形成聚合体,两者结合的二聚体,三者结合成三聚体^[12],以及六聚体等。

上述 a 类单体在体外制备过程中可以自然形成聚

合体,采用 8 mol/L 尿素处理可消除聚合体形式。为了考察聚合体形成条件,采用定点突变方式在引物上更改 loop 区结合环碱基,制备多种单体结构如表 3 中 b,c,d,e 等,再将单体进行组合制备聚合体,如 a 类自身聚合、bcd 相互聚合三体、以及 ce 相互聚合二聚体。各单体 loop 区结合环的具体序列如表 3。

表 3 pRNA 单体结合环序列设计

Table 3 The sequence design of pRNA monomer combination loop

类	45 ~ 48 位序列	82 ~ 85 位序列	聚合体模式
a	AACC	GGUU	aa 二聚体, aaa 三聚体等
b	ACGC	TGGC	bed 三聚体
c	GCCA	GTCC	bed 三聚体
d	GGAC	GCGT	bed 三聚体
e	GGAC	TGGC	c 和 e 二聚体

1.2.5 pRNA-Ribozyme 体外对基因 mRNA 切割活性分析 将体外转录得到的 mRNA 用 G50 迷你纯化柱纯化以后,各取 100 ng 分别同时加入 1pmol pRNA-Ribozyme,于 37 ℃作用 10 min 后,同时在各管加入等体积终止液(含 95% 甲酰胺,20 mmol/L NaOH, 20 mmol/L EDTA, pH 8.0)终止反应,另 1 支管只加 RNA 用于空白对照。用 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 RNA 的切割效果。

2 实验结果

2.1 Ribozyme 的设计

设计 16 s rRNA 靶点 V 的 Ribozyme 结构如图 1。野生型 ϕ29 噬菌体 pRNA 单体分子按照图 2 中的结构设计。

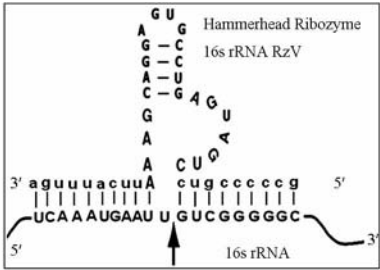


图 1 锤头型 Ribozyme RzV 的结构

Fig. 1 The Structure of Hammerhead Ribozyme-RzV

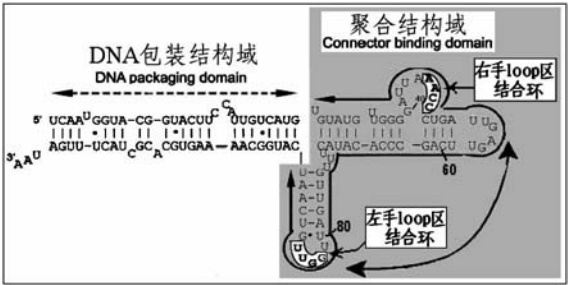


图 2 野生型 ϕ29 噬菌体 pRNA 单体分子结构^[10]

Fig. 2 The monomer molecular structure of wild-type ϕ29 phages pRNA^[10]

2.2 pRNA-Ribozyme 顺式开放型结构的设计

依据锤头 Ribozyme 结构序列(图 1)和 pRNA 结构序列(图 2),设计开环 pRNA-Ribozyme 单体,将 pRNA 序列 3'端直接和 RzV 5'端连接,Ribozyme 在 3'端处于游离状,装配成开放型分子。结构如图 3a 所示,序列图如图 4。

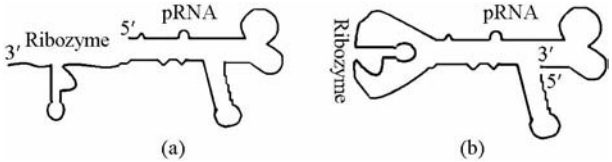


图 3 pRNA 导入型 Ribozyme 分子的两结构

Fig. 3 Two structures of pRNA import-type Ribozyme (a) Ribozyme linked to pRNA's 3' end as a cis-connected open architecture (b) Ribozyme embed pRNA as a closing inner structure

根据上述序列,分段 PCR 扩出 pRNA-Rz 全长 DNA 序列如图 4。

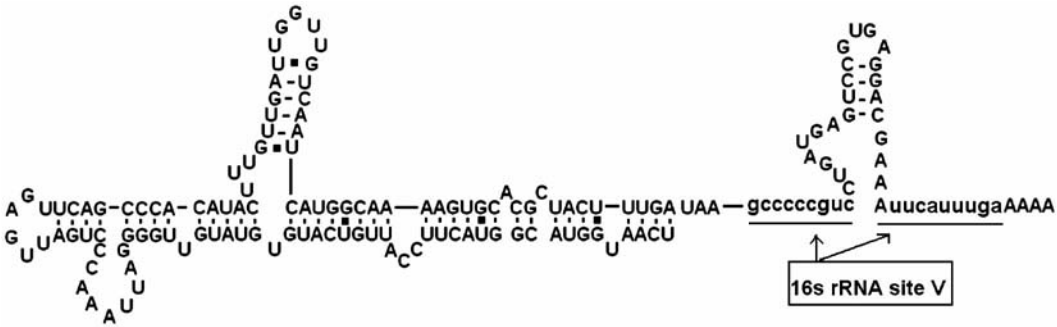


图 4 开放型的 pRNA-Ribozyme 单体

Fig. 4 The sequence of open-type pRNA-Ribozyme monomer

得到 T7-pRNA-Ribozyme 全长序列,克隆入 pEZ-T 载体,筛选出插入 T3 启动子下游的克隆并测序(测序图略),选择序列完全符合图 4 的克隆备用,通过采用 T7 和 Ribozyme 3' 反向引物可以扩增出 T7-pRNA-Ribozyme 全长,并转录得到的开放型 pRNA-Ribozyme 单体(a 类 loop 结合环),见图 5a 中 3 号泳道。

2.3 Ribozyme 嵌入闭合型 pRNA-Ribozyme 结构的设计与制备

依据开放型的 pRNA-Ribozyme 单体序列设计的闭合型 pRNA-Ribozyme 结构如图 3b 所示,序列图如图 6。

通过 PCR 构建并获得了 T7 - ⁷⁵G pRNA¹¹⁸U-RzV-¹U pRNA⁷²U 的 DNA,克隆入 pEZ-T 载体,筛选出插入 T3 启动子下游的克隆并经测序验证正确(测序图略)。通过采用 T7 和 pRNA⁷²U 处反向引物可以扩增出 T7 - ⁷⁵G pRNA¹¹⁸U-RzV-¹U pRNA⁷²U 的 DNA 全长,并转录得到的自身环化闭合型 pRNA-Rz 单体(a 类 loop 结合环),见图 5b 中 1 号泳道。

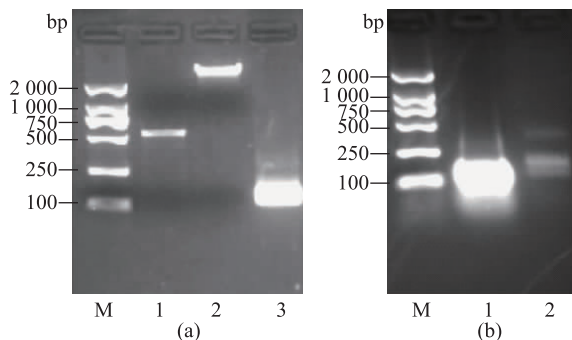


图 5 体外转录得到 pRNA-Ribozyme 电泳图

Fig. 5 The agarose gel electrophoresis of transcribed pRNA-Ribozyme *in vitro*

M: DL2000 marker; (a) No. 3 was the open-type pRNA-Ribozyme (b) No. 1 and No. 2 were the closed-type pRNA-Ribozyme transcribed *in vitro*, No. 1 was the product that the 5' terminal inserted T7 promoter and T7 ended with GGG; No. 2 was the pRNA-RzV that the 5' terminal inserted T7 promoter and T7 ended with one G. (the monomer, the dimer and the trimer showed)

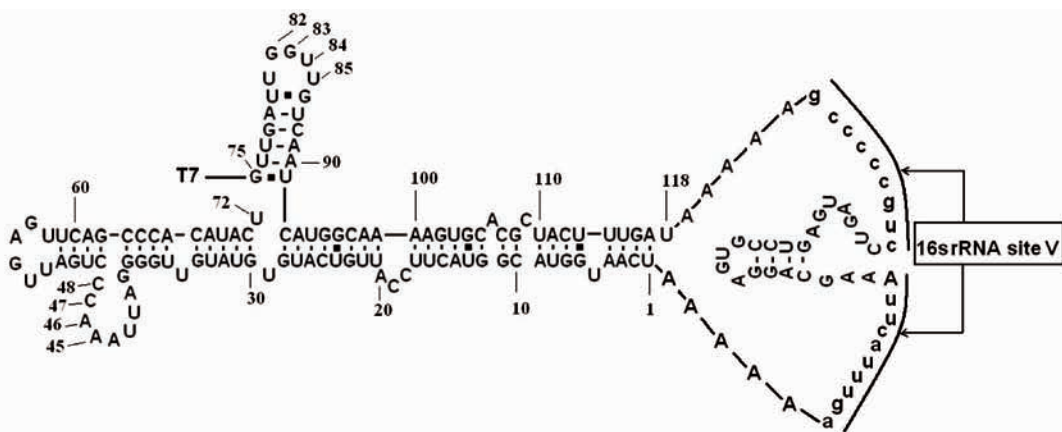


图 6 Ribozyme 嵌入闭合型的 pRNA-Ribozyme 单体

Fig. 6 The ribozyme harbored in pRNA as embedded closed-type pRNA-Ribozyme monomer

通过重组获得 bcd 3 类 loop 结合环开放型 pRNA-RzV 单体 DNA 克隆 3 个(测序图略)。获得 ce 两类 loop 结合环开放型 pRNA-RzV 单体 DNA 克隆 2 个(测序图略)。

2.4 pRNA-Ribozyme 聚合体分析

通过 PCR 构建并获得了含有 T7 启动子 pRNA-RzV 的 DNA 转录得到了 pRNA-RzV 产物,通常制备产物在凝胶中显示单体形式,如图 5a 的第三道和图 5b 的第二道。

如用 DNAase I 处理,可以见到 pRNA-RzV 无论开放型还是闭合型,都能形成 2 聚体和 3 聚体,图 7a 第三道、7b 中 3 号和 5 号泳道。加入变性剂可以见到开放

型 pRNA-RzV 能形成 2 聚体和 3 聚体,图 7c 中 3 号泳道,在三种 RNA 模板不对称的情况下,如果去除 DNA 纯化 RNA,能看到 RNA 是多条带型的情况。

2.5 pRNA-Ribozyme 体外切割活性分析

pRNA-Ribozyme 对靶 mRNA 分子的体外切割结果见图 8。体外制备出 pRNA-RzV 和体外转录制备的 16 s rRNA 在 37 °C 孵育,开放式 pRNA-RzV 对 RNA 切割 30 min 基本降解完成(图 8a),而自身环化闭合型 pRNA-Rz 在提高用量的情形下对 RNA 切割 30 min 同样对 RNA 降解基本完成(图 8b)。

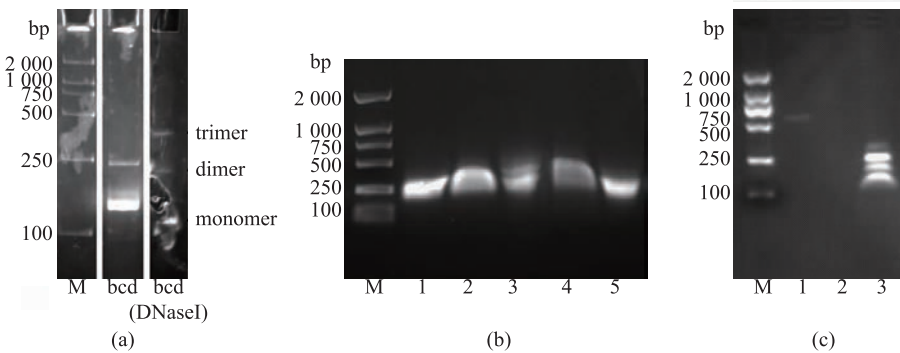


图 7 体外转录得到 pRNA-Ribozyme 的聚合体形式

Fig. 7 The multimer of pRNA-Ribozyme transcribed *in vitro*

M: DL2000 marker; (a) The open-type pRNA-RzV(bcd) transcribed under the condition of the templates of b, c and d was 1, 2 and 4 times respectively, without DNaseI treatment or adding DNaseI treatment (b) The open-type pRNA-RzV(bcd) transcribed under the condition of the templates of b, c and d was 1, 2 and 4 times respectively, No. 1 was untreated, No. 2 was treated by DNaseI, No. 3 was treated by kit purification; The open-type pRNA-RzV(bcd) transcribed under the condition of the same quantity templates of b, c and d, No. 4 was treated by DNaseI, No. 5 was purified by kit (c) The open-type pRNA-RzV(bcd) transcribed under the condition of the same quantity templates of b, c and d, untreated

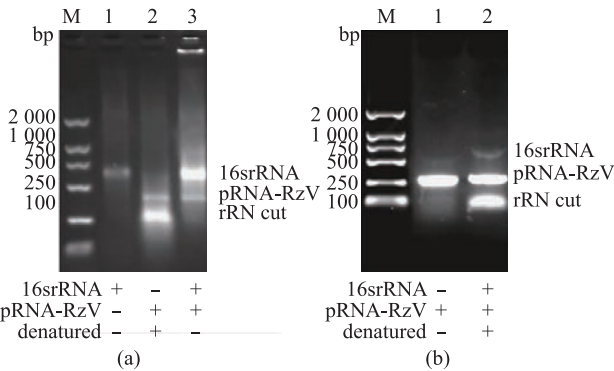


图 8 pRNA-RzV 体外切割 *E. coli* 16 s rRNA 的结果

Fig. 8 The result of pRNA-RzV cutting *E. coli* 16 s rRNA *in vitro*

(a) M: DL2000 marker; No. 1 was 16 s rRNA transcribed *in vitro*; No. 2, the products that 16 s rRNA and the open-type pRNA-RzV were transcribed together *in vitro* and treated by the termination solution; No. 3, the products that 16 s rRNA and the open-type pRNA-RzV were transcribed together *in vitro* but untreated by the termination solution; (b) M: DL2000 marker; No. 1, the closed-type inner pRNA-RzV; No. 2 was the products that 16 s rRNA and the closed-type inner pRNA-RzV were transcribed together *in vitro* and treated by the termination solution after 30 min incubation

3 讨论

枯草杆菌的包装 RNA 分子 pRNA 是新型纳米分子载体,将其同锤头型核酶 Ribozyme 重组可以构建结构稳定、能进入细胞、主动识别结合和剪切基因 RNA 的

pRNA-Ribozyme,由于 100 nt 以上的 RNA 分子化学合成较为困难,本实验采用分子生物学方法通过基因重组构建并制备 170 nt 的 pRNA-Ribozyme,并证实转录产生的 pRNA 引导 ribozyme 分子折叠性能和降解靶 mRNA 的性质。

如图 2 所示,pRNA 二级结构中左手 loop 结合环(L 环)与右手 loop 结合环(R 环)可以相互进行碱基配对,结合形成聚合体。如表 3 所示,本实验按需要改变其 loop 结合环序列即可控制和操纵 pRNA 形成稳定的二聚体和三聚体甚或六聚体。聚合体的形成使得外源性 RNA 分子将被保护而不受细胞内核酸外切酶的降解,由于新生的 RNA 的 3'和 5'末端埋藏于 RNA 分子之内而避免被降解。尤其是自身环化闭合型 pRNA-Rz 分子独具优势,将 pRNA 作为 Ribozyme 的基因靶定运输载体^[3]具有潜在应用价值。

在实验中可见无论是开放型还是闭合型 pRNA-Rz 分子均可生成聚合体形式,只是在制备过程由于合成量较大,分子浓度较高的时候可能与模板 DNA 有相互作用凝胶显示似乎为单体形态(图 5b,图 7b),这种表现常会误认为没有折叠形成其理论结构而聚合,通过将 DNA 模板进行成倍比较制备 RNA 以及同时通过加入 DNA 酶去除 DNA 处理,则可见聚合体形式,说明 DNA 影响了 RNA 的聚合体形成。实验还显示在 DNA 模板较少的情况下(图 7c)可见 pRNA-Rz 分子聚合体形式。证明 pRNA-Rz 分子可以在制备中形成理论上的正确折叠结构。

T7 末端的 3 个碱基 GGG 对聚合酶的结合和正常转录效率很重要,实验证明在 T7 启动子序列上将其末端 3 个 G 减少为一个 G,会导致制备出 RNA 含量较少,但是在此种情况下,制备得到 pRNA-Rz 分子会自动显示出聚合体形式(图 5b 第二道所示)。

Ribozyme 装配在 pRNA 单体上可以形成 RNA 纳米颗粒,能保持干预分子 Ribozyme 分子稳定结合,同时通过右手和左手 RNA 环的相互作用,把带有 Ribozyme 的 RNA 单体装配成聚体。已有实验表明 pRNA-Ribozyme 通过 pRNA 载体可以被运输进入细胞、加上主动识别、主动切割 mRNA 能阻断靶向基因表达,从而发挥 Ribozyme 的功能^[12]。本实验在体外表明 pRNA-Rz 分子能降解靶向 16 s rRNA 分子(图 8),开放型 pRNA-Rz 分子对靶向 RNA 切割效率较高,可能还与封闭环化 pRNA-Rz 分子中 Ribozyme 的结合性能稍有降低,以后实验需要进一步优化其连接序列。

Ribozyme 药物研发有两个难点,其一是高效结合 Ribozyme 的筛选。它决定于基因 mRNA 的结构靶点的确认,如何选择 RNA 分子的适当部位序列作为靶点(target site),而本文应用的 MAST 方法是一种液相实测技术,对接近天然状态 mRNA 进行筛选,提供了较好的技术条件。其二是 Ribozyme 的递送问题。目前,体外将合成的 Ribozyme 递送进细胞内常用脂质体介导的转染和电穿孔方法。然而,这两种方法的递送效率和要转染的细胞类型以及被转染的核酸密切相关。近年来脂质体转染、电穿孔操作等物理化学方法都在尝试应用。而 pRNA 则是近年来发现易穿过细胞膜,既具备核酸的结构特性,也具有类似蛋白质的功能,其分子小,作为生物学纳米颗粒对携带相关分子具有独特的优越性。pRNA 分子载体还安全,不会引起免疫反应和排斥现象,是基因治疗中非常有发展前景的理想的分子载体^[5],为 Ribozyme 的应用进一步打下了技术基础。

本实验采用分子生物学方法通过基因重组构建并制备 170 nt 的 pRNA-Ribozyme,表明体外转录制备可行;并证实了构建表达质粒在细胞内自主转录产生的 pRNA 引导 ribozyme 分子折叠正确且具备降解靶 mRNA 的性质。开放型 pRNA-Ribozyme 单体,体外转录可成功制备,但由于 Ribozyme 游离于 pRNA 载体,不能有效被 pRNA 载体保护,在体内较容易被降解。因此自身环化闭合结构的 pRNA-Ribozyme 单体使 Ribozyme 能更稳定地在细胞内发挥作用,本实验成功

确定 pRNA-Ribozyme 制备中环化折叠形成聚合体的作用,也证明了体外降解靶向 RNA 的功能。在细胞内和动物体内靶向失活基因表达,下调基因表达还需要后续实验验证。

参考文献

- [1] 周颖,毛建平. Ribozyme 和 DNAzyme 的基因治疗实验应用进展. 中国生物工程杂志 2010. 30(6):122-129.
Zhou Y, Mao JP. China Biotechnology, 2010, 30(6): 122-129.
- [2] 周辉,卢向阳,田云. pRNA 的结构、功能及其研究近况. 遗传, 2006, 28(9): 1180-1184.
Zhou H, Lu X Y, Tian Y. Hereditas, 2006, 28(9): 1180-1184.
- [3] 刘小卓,杨洁. pRNA-纳米技术在分子基因治疗中的应用. 世界临床药物, 2006, 27(3): 182-187.
Liu X Z, Yang J. World Clinical Drugs, 2006, 27(3): 182-187.
- [4] Shu Y, Cinier M, Shu D, et al. Assembly of multifunctional phi29 pRNA nanoparticles for specific delivery of siRNA and other therapeutics to targeted cells. Methods. 2011 Feb 12. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.01.008.
- [5] 徐凤萍,杨君,冯雪松. pRNA: 一种安全、稳定、大容量的基因治疗分子载体. 中国生物工程杂志, China Biotechnology, 2007, 27(6): 96-100.
Xu F P, Yang J, Feng X S. China Biotechnology, 2007, 27(6): 96-100.
- [6] Shu Y, Cinier M, Fox SR, et al. Assembly of therapeutic pRNA-siRNA nanoparticles using bipartite approach. Mol Ther. 2011 Apr, 5. doi:10.1038/mt.2011.23.
- [7] Tarapore P, Shu Y, Guo P, et al. Application of phi29 motor pRNA for targeted therapeutic delivery of siRNA silencing metallothionein-IIA and survivin in ovarian cancers. Mol Ther, 2011, 19(2):386-394.
- [8] Zhou J, Shu Y, Guo P, et al. Dual functional RNA nanoparticles containing phi29 motor pRNA and anti-gp120 aptamer for cell-type specific delivery and HIV-1 Inhibition. Methods, 2011, 53(1):73-79.
- [9] Abdelmawla S, Guo S, Zhang L, et al. Pharmacological characterization of chemically synthesized monomeric phi29 pRNA nanoparticles for systemic delivery. Mol Ther, 2011, Apr 5. doi: 10.1038/mt.2011.35.
- [10] Zhang H, Mao J, Zhou D, et al. mRNA accessible site tagging (MAST): a novel high throughput method for selecting effective antisense oligonucleotides. Nucleic Acids Research, 2003, 31(14): e72.

- [11] 毛建平,王全会,施水兰,等. 绿色荧光蛋白(GFP)基因 mRNA 反义核酸的筛选和应用. 中国生物化学与分子生物学学报, 2005,21(3):529-536.
- Mao J P, Wang Q H, Shi S L, et al. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005,21(3):529-536.
- [12] Liu H,Guo S, Roll R, et al. Phi29 pRNA vector for efficient escort of hammerhead ribozyme targeting survivin in multiple cancer cells. Cancer Biology & Therapy, 2007, 6(5):697-704.
- [13] 毛建平,袁国刚. 大肠杆菌 16SrRNA 的核酶设计和初步应用. 中国生物工程杂志, 2008, 28(11):48-52.
- Mao J P, Yuan G G. China Biotechnology, 2008, 28(11):48-52.

The Design and *in vitro* Transcription of pRNA-Ribozymes

ZHOU Ying^{1,2} FANG Jing² MAO Jian-ping² ZHU Yan¹

(1 Basic Medicine College, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

(2 Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Objectives: pRNA, the packaging-RNA molecule of *Bacillus subtilis* is a new nanometer-molecular carrier. The recombination of pRNA and the hammerhead Ribozyme can be used to construct stable, self-deliverable pRNA-Ribozymes for entering cells and actively binding and cutting RNA. However, it is technically difficult to synthesize RNA molecules longer than 100 nt by chemistry. Therefore, 170 nt pRNA-Ribozyme was prepared by genetic recombination and *in vitro* transcription. Methods: The DNA of pRNA and Ribozyme were amplified by PCR before recombination according to their molecule sequences. The pRNA-Ribozyme was reconstructed in two forms: the chimeric ribozyme linked to pRNA vector as a cis-connected open structure, and the chimeric ribozyme harbored in pRNA vector as a closing inner structure. The pRNA-Ribozymes were obtained by *in vitro* transcription. Results: The pRNA-Ribozyme of cis-connected open structure and the embedded inner structure were prepared by *in vitro* transcription. Both molecules could form the polymer structure *in vitro* through correct folding. The pRNA-Ribozyme had the activity for binding and cutting its target mRNAs, which provides the foundation for further application of pRNA-Ribozyme in intracellular.

Key words pRNA Ribozyme