

靶向S区和C区基因的M1GS RNA核酶共同抑制HBV的表达

毛涛, 殷凡, 田字彬, 厉海妮, 孔心涓, 刘希双, 张海燕

背景资料
乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是一个世界范围的卫生问题, 但目前抗HBV治疗的药物疗效均不能令人满意。近年来, 由RNase P的催化亚基M1 RNA发展而来的M1GS RNA核酶因其特异性和灵活性受到人们的关注, 在病毒性疾病、肿瘤及遗传病的基因治疗上具有广阔的应用前景。

毛涛, 刘希双, 张海燕, 青岛大学医学院附属医院内镜诊疗科 山东省青岛市 266003
殷凡, 青岛市疾病预防控制中心毒理室 山东省青岛市 266033
田字彬, 厉海妮, 孔心涓, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003
毛涛, 2006年青岛大学医学院硕士生, 主要从事乙型肝炎和消化道肿瘤的基础和临床研究。
通讯作者: 毛涛, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院内镜诊疗科. maotaoqy@163.com
电话: 0532-82911525
收稿日期: 2007-05-27 修回日期: 2007-09-28

Inhibition of HBV replication by M1GS RNA ribozymes targeting the S and C regions of the HBV genome

Tao Mao, Fan Yin, Zi-Bin Tian, Hai-Ni Li, Xin-Juan Kong, Xi-Shuang Liu, Hai-Yan Zhang

Tao Mao, Xi-Shuang Liu, Hai-Yan Zhang, Department of Endoscopic Diagnosis and Therapy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Fan Yin, Department of Toxicology, Qingdao Municipal Centers for Disease Control and Prevention, Qingdao 266033, Shandong Province, China
Zi-Bin Tian, Hai-Ni Li, Xin-Juan Kong, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Correspondence to: Tao Mao, Department of Endoscopic Diagnosis and Therapy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. maotaoqy@163.com
Received: 2007-05-27 Revised: 2007-09-28

Abstract

AIM: To construct two M1GS RNA ribozymes targeting the S region and C region of the HBV genome, and evaluate their inhibitory effect on HBV gene expression.

METHODS: A 294-nt in the S region and a 2333-nt in the C region of HBV genome were selected as sites of cleavage. DNA templates for site-specific M1GS RNA ribozymes targeting the HBV genome were constructed by polymerase chain reaction (PCR) using plasmid pTK117 as

template. Then, the DNA templates were cloned into the eukaryotic expression vector pEGFP-C1. The recombinant vectors pEGFP-GSS and pEGFP-GSC were co-transfected into HepG2.2.15 cells. HBsAg and HBeAg proteins were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and their mRNA levels were analyzed by RT-PCR.

RESULTS: The two ribozymes effectively inhibited the secretion of HBsAg and HBeAg in HepG2.2.15 cells, by 33.2% and 39.1%, respectively. RT-PCR results showed that HBV S and C mRNAs were markedly decreased by 29.7% and 32.5%, respectively. Expression of M1GS RNA ribozyme had no effect on the proliferation of HepG2.2.15 cells.

CONCLUSION: These results demonstrate that vectors with site-specific M1GS RNA ribozymes targeting the S and C regions of HBV can inhibit HBV replication specificity *in vitro*.

Key Words: Hepatitis B virus; Ribozyme; RNase P; Gene therapy; Reverse transcription polymerase chain reaction; Enzyme linked immunosorbent assay

Mao T, Yin F, Tian ZB, Li HN, Kong XJ, Liu XS, Zhang HY. Inhibition of HBV replication by M1GS RNA ribozymes targeting the S and C regions of the HBV genome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 2990-2994

摘要

目的: 研究靶向HBV S区和C区基因的M1GS RNA核酶共同作用对HBV基因表达的影响。

方法: 选择HBV *ayw*亚型S区基因294 nt和C区基因2333 nt为切割位点, 以含有编码M1 RNA的DNA序列的质粒pTK117为模板, 通过PCR扩增得到M1GS RNA核酶的DNA模板, 并将其克隆至真核表达载体pEGFP-C1得到重组质粒pEGFP-GSS和pEGFP-GSC。将2个重组质粒共转染HepG2.2.15细胞, 转染后ELISA法测细

胞培养液中的HBsAg和HBeAg, RT-PCR检测HBV mRNA.

结果: 成功构建了分别靶向HBV S区基因和C区基因的真核表达载体. 共转染HepG2.2.15细胞后, HBsAg和HBeAg的表达分别被抑制了33.2%和39.1%, HBV C mRNA和S mRNA分别被抑制了32.5%和29.7%, 而HepG2.2.15细胞的增殖无明显变化.

结论: 靶向HBV S区和C区基因的M1GS RNA核酶共同作用可特异性抑制HBV S区和C区基因的表达.

关键词: 乙型肝炎病毒; 核酶; 核糖核酸酶P; 基因治疗; 逆转录聚合酶链式反应; 酶联免疫吸附试验

毛涛, 殷凡, 田宇彬, 厉海妮, 孔心涓, 刘希双, 张海燕. 靶向S区和C区基因的M1GS RNA核酶共同抑制HBV的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(28):2990-2994
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2990.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个世界范围的卫生问题^[1-2], 但迄今为止尚未有一种令人满意的治疗方法^[3-4]. 近年来, 由核糖核酸酶P(RNase P)及其催化亚基M1 RNA发展而来的M1GS RNA, 因其特异性和灵活性受到人们的广泛关注^[5-6], 在病毒性疾病^[8]和肿瘤^[9]的基因治疗上具有广阔的应用前景, 是一种极有潜力的基因治疗方法^[10-11]; 前期研究发现, 靶向HBV C区基因3'端保守序列的M1GS RNA核酶, 能明显抑制HepG2.2.15细胞中HBeAg的表达, 但对HBsAg的表达没有影响, 因此, 我们分别构建了靶向HBV C区和S区基因的M1GS RNA核酶真核表达载体, 共转染HepG2.2.15细胞, 研究其对HBV基因表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 *E.coli* JM109购自Promega公司; 含有由T7 RNA聚合酶控制的编码M1 RNA的DNA序列的质粒pTK117由Fengyong Liu教授惠赠; 真核表达载体pEGFP-C1购自Clontech公司; HepG2.2.15细胞购自山东大学医学院免疫研究所; DNA marker, 限制性内切酶EcoR I 和Sal I, T4 DNA Ligase购自宝生物工程(大连)有限公司; Taq DNA聚合酶、dNTP、MgCl₂、10×Buffer等PCR反应试剂购自上海中科开瑞生物工程技术有限公司; PCR引物合成和DNA测序由上海生工生

物工程技术服务有限公司完成; QIAquick PCR Purification Kit购自Qiagen公司; MEM培养基为Gibco公司产品; 胎牛血清为杭州四季青生物公司产品; Lipofectamine TM200为Invitrogen公司产品; G418为Amresco公司产品; RT试剂盒购自Promega公司; 去内毒素质粒小提试剂盒、2×Taq PCR MasterMix为北京天根公司产品; ELISA试剂盒购自上海实业科华公司.

1.2 方法 根据M1 RNA切割位点的选择原则, 如切割位点的3'和5'端分别为鸟嘌呤和嘧啶可获得最佳的切割效率^[12], 同时根据HBV基因的结构与功能, 选择HBV *ayw*亚型S区基因294 nt和C区基因2333 nt为靶位点, 并通过NCBI GenBank Blast确定该序列与人的基因序列没有同源性. 以pTK117质粒为模板, 根据M1 RNA作用底物的特征设计特异性引物, 扩增产物为目的基因即M1GS RNA的DNA模板. 靶向S区基因的3'端引物为: 5'-gcgtcgacGTGGTGTGTCTTGGCCAAAATATGACCATG-3'; 靶向C区基因的3'端引物为: 5'-gcgtcgacGTGGTGAACTACTGTTGTTATATGACCATG-3'; 共同的5'端引物为: 5'-gcgaattcTAATACGACTCACTATAG-3'. 其中3'端引物添加了限制性内切酶Sal I 的酶切位点(小写序列)、与底物结构中3'端的ACCAC序列相对应的序列(斜体序列)和与HBV上切割位点3'端一侧互补的引导序列(下划线序列); 5'端引物添加了限制性内切酶EcoR I 的酶切位点(小写序列). 以质粒pTK117为模板进行PCR反应, 反应条件为: 94℃ 10 min, 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1 min, 共35个循环, 最后72℃延伸10 min. 扩增产物于含溴化乙锭(0.5 mg/L)的10 g/L琼脂糖凝胶中电泳检测, 紫外透射仪下观察电泳结果. 目的基因经鉴定后用QIAquick PCR纯化试剂盒按照说明书进行纯化. 以限制性核酸内切酶Sal I 和EcoR I 双酶切M1GS RNA核酶的DNA模板和真核表达载体pEGFP-C1, 37℃水浴5 h, QIAquick PCR纯化试剂盒纯化回收, 得到具有黏性末端的目的基因和真核表达载体pEGFP-C1. 将上述目的基因和线性化的pEGFP-C1载体按4:1的摩尔比混合, 用T4 DNA Ligase 16℃过夜进行连接反应. 应用1×TSS两步法, 将连接产物转化至新鲜制备的*E.coli* JM109感受态细菌, 在含卡那霉素(浓度35 mg/L)LB平板上培养18-24 h后, 随机挑取转化成功的单个菌落接种于含卡那霉素的LB液体培养基, 应用去内毒素质粒小提试剂盒提取质粒, 将得到的靶向S区和C区的重组质粒分别

研发前沿
M1 RNA核酶是*E.coli*核糖核酸酶P(RNase P)的RNA亚单位, 体内执行核酸内切酶活性. 研究表明把能特异识别底物分子的外源性引导序列(EGS)连接到M1 RNA上, 形成的特异性核酶M1GS RNA可在体内和体外特异性地切割靶RNA.

相关报道
已有学者设计M1 RNA在体外及胞内切割单纯疱疹病毒(HSV-1), 人巨细胞病毒(HCMV)mRNA, 发现病毒的扩增速率及基因的表达水平均明显下降. 在肿瘤治疗方面, Cobaled *et al*以M1 RNA为基础设计特异性的核酶可以抑制慢性粒细胞白血病患者畸形染色体所产生的肿瘤特异性融合基因BCR-ABL的表达.

创新盘点

目前HBV的基因治疗主要是应用反义核苷酸、锤头状核酶、发夹状核酶及RNA干扰技术, 还未见有应用M1 RNA抑制HBV基因表达的报道. 本文分别构建了靶向HBV S区和C区基因的M1GS RNA核酶真核表达载体, 共转染HepG2.2.15细胞, 研究其对HBV基因表达的影响.

应用要点

本文的研究结果表明靶向HBV C区和S区基因的M1GS RNA核酶真核表达载体共转染HepG2.2.15细胞后可以抑制HBV基因的表达, 且较单个核酶作用的抗病毒效果显著, 对进一步体内研究有指导作用, 为研究高效特异性的抗HBV治疗方法奠定了基础.

表 1 核酶对细胞增殖活性和HBsAg和HBeAg表达的影响(mean ± SD)

分组	A_{570} value($n=12$)	HBsAg		HBeAg	
		P/N	抑制率(%)	P/N	抑制率(%)
单纯脂质体	0.957 ± 0.127	16.15 ± 0.59	-	7.37 ± 0.63	-
pEGFP-C1	0.933 ± 0.093	15.03 ± 0.78^a	7.0	7.45 ± 0.57	-
共转染	0.919 ± 0.112	11.49 ± 0.47^b	33.2	5.31 ± 0.69^b	39.1

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 单纯脂质体.

命名为pEGFP-GSS和pEGFP-GSC. *Sal* I 和 *Eco* R I 双酶切重组质粒pEGFP-GSC和pEGFP-GSS以及对对照空质粒, 37℃水浴过夜, 次日各取酶切产物10 μL于10 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 在凝胶成像系统中观察电泳结果. 将重组质粒送上海生物工程技术有限公司测序, 测序引物为合成M1GS RNA的DNA模板所用的引物. 测序结果与M1 RNA的DNA模板序列对比.

1.2.1 细胞培养和转染 HepG2.2.15细胞在37℃、50 mL/L CO₂的条件下培养. 培养基为含G418(380 mg/L)、10 mL/L胎牛血清并加有含青霉素和链霉素50 kU/L的MEM培养液. 转染前24 h, 将HepG2.2.15细胞种入24孔板, 每孔 2×10^5 个细胞, 用Lipofectamine 2000脂质体转染试剂盒将pEGFP-GSS和pEGFP-GSC以1:1的比例共转染入HepG2.2.15细胞, 并设阴性对照(仅转染pEGFP-C1)及空白对照(单纯脂质体). 转染48 h后用倒置荧光显微镜观察绿色荧光, 换液, 再培养48 h后收集细胞和培养液进一步检测.

1.2.2 MTT实验 用胰蛋白酶将细胞消化分散为单个细胞悬液, 细胞计数后将其稀释至 1×10^8 cells/L, 每孔加细胞悬液(2×10^4 个细胞)200 μL接种于96孔板. 48 h后每孔加5 g/L MTT溶液20 μL, 继续培养4 h后, 每孔加入100 μL分析纯DMSO原液, 振荡溶解后, 570 nm处比色测定. 按下式计算药物作用下的细胞存活率: 细胞存活率 = 药物处理孔吸光度值/对照孔吸光度值 × 100%.

1.2.3 HBsAg和HBeAg的检测 分别对转染成功的阳性细胞及空白对照进行细胞计数, 每组 5×10^5 细胞接种于12孔细胞培养板中继续培养, 48 h后收获细胞上清液, ELISA试剂盒检测细胞转染48 h后细胞培养上清液的HBsAg和HBeAg, A 值在 A_{450} 下读取. 结果均以样品孔 A 值/阴性对照孔 A 平均值(P/N值)表示, 抑制率按下式计算: 抑制率 = (对照孔P/N值-实验孔P/N值)/(对照孔P/N值-2.1) × 100%, 同时取每组细胞计数, 检测结果

用细胞数量进行校正, 按 1×10^6 细胞数抗原分泌量进行统计分析.

1.2.4 HBV S mRNA和C mRNA表达的检测 转染后48 h收集细胞, TRIzol试剂提取转染的HepG2.2.15细胞中的总RNA, 以Oligo(dT)作为引物, 在AMV逆转录酶的催化下生成互补DNA, 然后进行PCR扩增S区和C区基因, S区引物P1: 5'-GCGGGGTTTTCTTGTTGA-3', P2: 5'-GGGACTCAAGATGTTGTACAG-3', 产物为585 bp; C区引物P1: 5'-GGCTTTGGGGCATGGAC-3', P2: 5'-ATACTAACATTGAGGTTCC-3', 产物为566 bp. 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 53℃ 45 s, 72℃ 1 min, 共35个循环, 后72℃延伸10 min; 以人源性β-actin作为内参照, 引物P1: 5'-CCCAGATCATGTTTGAGACC-3', P2: 5'-TAGCTCTTCTCCAGGGAGGA-3', PCR反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共30个循环, 后72℃延伸10 min, PCR产物在20 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳. 经电泳及扫描后, 所有PCR产物条带经β-actin标化后由Quantity One 1-D analysis software测定.

统计学处理 实验数据用mean ± SD表示, 采用SPSS10.0进行方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 重组质粒pEGFP-GSS和pEGFP-GSC经*Sal* I 和 *Eco* R I 双酶切后行10 g/L琼脂糖凝胶电泳可分别观察到470 bp和4700 bp的2个条带(图1). 测序结果证实, 重组质粒pEGFP-GSS和pEGFP-GSC中M1GS RNA核酶的DNA片段插入准确无误.

2.2 核酶对HepG2.2.15细胞增殖活性的影响 在显微镜下观察转染后HepG2.2.15细胞形态, 与对照组比较, 无明显可见的形态差别. MTT实验结果表明, 与对照组比较, 共转染pEGFP-GSS和pEGFP-GSC后的HepG2.2.15细胞的增殖活性亦

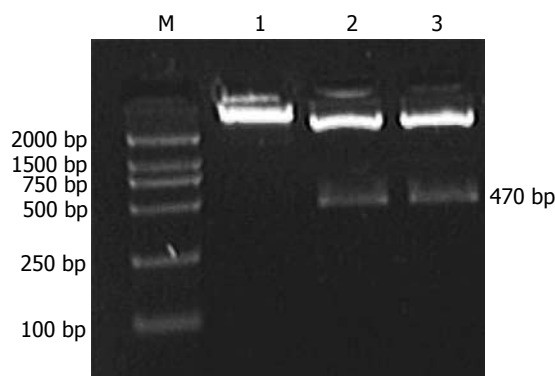


图 1 *Sal*I 和 *Eco*RI 双酶切重组质粒 pEGFP-GSS 和 pEGFP-GSC. M: DNA Marker DL2000; 1: pEGFP-C1; 2: pEGFP-GSS; 3: pEGFP-GSC.

无显著差异(表1).

2.3 M1GS RNA核酶对HBsAg和HBeAg表达的抑制作用 细胞转染48 h后, ELISA法检测培养液中HBsAg和HBeAg含量, 结果表明HepG2.2.15细胞中HBsAg和HBeAg的表达分别被抑制了33.2%和39.1%(表1).

2.4 M1GS RNA核酶对HBV mRNA表达的影响 HBV S mRNA、C mRNA及内参照 β -actin mRNA的RT-PCR扩增产物分别为585 bp、566 bp和361 bp. RT-PCR结果显示, 共转染组HBV S mRNA和C mRNA的表达均降低, 与单纯脂质体组比较分别减少了29.7%和32.5%, 而转染pEGFP-C1的细胞HBV S mRNA和C mRNA与单纯脂质体组相比无明显差别(图2).

3 讨论

随着生命科学的发展, 人们对疾病的认识逐渐深入到分子水平, 基因治疗已成为当前分子生物学最重要的研究领域之一. M1 RNA核酶是 *E. coli* 核糖核酸酶P(RNase P)的RNA亚单位, 在体内执行核酸内切酶活性, 切割tRNA前体(pre-tRNA)和一些小RNA分子的5'端前导序列^[5]. RNase P是一类普遍存在的核糖核蛋白复合体, 在 *E. coli* 中, 其RNA被称为M1 RNA, 大小为375 bp, 蛋白称为C5蛋白^[13]. 如果C5蛋白缺失, M1 RNA可作为催化剂在含高浓度二价金属离子(如 Mg^{2+})的反应体系中裂解底物^[14]. RNase P对底物识别与广泛应用的锤头状或发夹状核酶不同, 其与天然底物之间的相互作用依赖于对底物结构的识别, 而不是某些特殊的序列或核苷酸. 能被M1 RNA识别的底物结构单元包括: 双链RNA区域(类似于pre-tRNA的氨酰基或T茎); 5'端前导序列中4-16个配对碱基和至少一个突

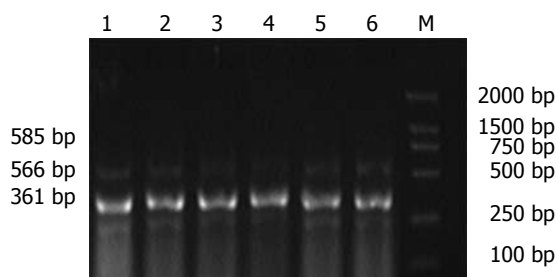


图 2 M1GS RNA核酶对HBV mRNA表达的影响. 1-3: HBV C DNA; 4-6: HBV S DNA; 1, 6: 单纯脂质体组; 2, 5: pEGFP-C1组; 3-4: 共转染组; M: DNA marker DL2000.

出碱基; 3'端未配对的-CCA序列^[15]. 任何符合上述要求的RNA序列, 原则上都可作为M1 RNA的靶基因. Liu *et al*^[16]将特异识别底物分子的外源性引导序列(external guide sequence, EGS)连接到M1 RNA上, 形成具有序列特异性催化活性的M1GS RNA, 研究证实, M1GS RNA核酶在体内及体外都能特异性切割靶RNA^[17]. 已有学者设计了在体外及体内切割单纯疱疹病毒^[7]和巨细胞病毒(HCMV)^[8,18-19] mRNA的M1GS RNA核酶, 发现病毒的扩增速率及基因表达水平均明显下降. 在肿瘤治疗方面, Cobaleda *et al*^[9]以M1 RNA为基础, 设计特异性核酶抑制慢性粒细胞白血病患者畸形染色体所产生的肿瘤特异性融合基因BCR-ABL的表达.

我们的前期研究表明, 靶向HBV C区基因的M1GS RNA核酶作用于HepG2.2.15细胞后, 可特异性抑制HBV C区基因的表达, 对细胞培养上清液中HBV C区基因表达产物HBeAg的抑制率达31.6%; RT-PCR结果显示, 该核酶可以有效抑制HBV C mRNA的表达, 但对HBsAg的表达及空白对照均无统计学差别. 可能因HBV基因组为长约3.2 kb的部分双链环状DNA, 在核内以共价闭合环状DNA(cccDNA)为模板, 在宿主RNA聚合酶II的作用下, 转录成3.5 kb, 2.4/2.1 kb及0.7 kb 3种不同长度的mRNA, 在胞内分别编码生成HBcAg/HBeAg和DNA多聚酶, HBsAg及HBxAg^[20-22]. 靶向HBV C区基因的M1GS RNA核酶可以抑制胞质内的3.5 kb的前基因组mRNA, 进而减少了HBeAg的分泌. 但对其他mRNA无抑制效应, 故并不影响HBsAg的生成. 因此我们设计了2个分别靶向C区和S区基因的M1GS RNA核酶, 将构建的表达载体共转染HepG2.2.15细胞, 研究靶向不同位点的核酶共同作用的效果. HepG2.2.15细胞是整合HBV *ayw*型全基因组的肝癌细胞系, 能够表达各种HBV产物并能分泌

名词解释

M1 RNA核酶: *E. coli*核糖核酸酶P(RNase P)的RNA亚单位, 在体内执行核酸内切酶活性, 切割tRNA前体(pre-tRNA)和一些小RNA分子的5'端前导序列.

同行评价
本文设计合理, 实验技术先进, 所获结果有一定科学价值, 对进一步的体内研究有指导作用。

HBV颗粒, 是一种较为理想的细胞感染模型^[23]。研究结果表明, S mRNA和C mRNA的表达分别减少了29.7%和32.5%, HBsAg和HBeAg的生成也分别被抑制了33.2%和39.1%。且较单个核酶作用的抗病毒效果显著, 具有“鸡尾酒效应”, 为研究高效特异性的抗HBV治疗方法奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S1-3
- 2 Baumert TF, Thimme R, von Weizsacker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 82-90
- 3 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 395-403
- 4 Tillmann HL. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 125-140
- 5 Altman S. Ribonuclease P: an enzyme with a catalytic RNA subunit. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1989; 62: 1-36
- 6 Forster AC, Altman S. External guide sequences for an RNA enzyme. *Science* 1990; 249: 783-786
- 7 Trang P, Kilani A, Kim J, Liu F. A ribozyme derived from the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli* is highly effective in inhibiting replication of herpes simplex virus 1. *J Mol Biol* 2000; 301: 817-826
- 8 Trang P, Lee M, Nepomuceno E, Kim J, Zhu H, Liu F. Effective inhibition of human cytomegalovirus gene expression and replication by a ribozyme derived from the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5812-5817
- 9 Cobaleda C, Sanchez-Garcia I. In vivo inhibition by a site-specific catalytic RNA subunit of RNase P designed against the BCR-ABL oncogenic products: a novel approach for cancer treatment. *Blood* 2000; 95: 731-737
- 10 Raj SM, Liu F. Engineering of RNase P ribozyme for gene-targeting applications. *Gene* 2003; 313: 59-69
- 11 Trang P, Kim K, Liu F. Developing RNase P ribozymes for gene-targeting and antiviral therapy. *Cell Microbiol* 2004; 6: 499-508
- 12 Liu F, Altman S. Requirements for cleavage by a modified RNase P of a small model substrate. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 2690-2696
- 13 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
- 14 Hsu AW, Kilani AF, Liou K, Lee J, Liu F. Differential effects of the protein cofactor on the interactions between an RNase P ribozyme and its target mRNA substrate. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 3105-3116
- 15 Zou H, Chan K, Trang P, Liu F. General design and construction of RNase P ribozymes for gene-targeting applications. *Methods Mol Biol* 2004; 252: 385-398
- 16 Liu F, Altman S. Inhibition of viral gene expression by the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Genes Dev* 1995; 9: 471-480
- 17 Guerrier-Takada C, Li Y, Altman S. Artificial regulation of gene expression in *Escherichia coli* by RNase P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11115-11119
- 18 Trang P, Kilani A, Lee J, Hsu A, Liou K, Kim J, Nassi A, Kim K, Liu F. RNase P ribozymes for the studies and treatment of human cytomegalovirus infections. *J Clin Virol* 2002; 25 Suppl 2: S63-74
- 19 Trang P, Kim K, Zhu J, Liu F. Expression of an RNase P ribozyme against the mRNA encoding human cytomegalovirus protease inhibits viral capsid protein processing and growth. *J Mol Biol* 2003; 328: 1123-1135
- 20 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 21 Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 48-64
- 22 Wang GH, Seeger C. Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *J Virol* 1993; 67: 6507-6512
- 23 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1005-1009

编辑 程剑侠 电编 何基才