

157—163

第11卷第2期
1996年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 11 No. 2
Jun. 1996

15972(11)

抗水稻条纹叶枯病毒核酶的设计、克隆及体外活性测定^{*}刘 力¹ 陈声祥¹ 邱并生² 康良仪² 田 波²¹(浙江省农业科学院病毒实验室, 杭州 310021)²(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

S432·41

A

摘要 为探索控制水稻条纹叶枯病毒(Rice stripe virus, RSV)设计合成了特异切割该病毒 RNA 保守区及编码病害特异性蛋白(Disease Specific Protein, DSP)基因的核酶, 核酶基因的长度均为 40 个碱基, 用化学合成方法合成其正链及与其 3'-末端互补的 15 个碱基引物, 用 Tag DNA 多聚酶合成其互补链。双链 DNA 直接插入克隆载体 pGEM3zf(+) 的 SmaI 位点。序列测定表明, 克隆得到的核酶序列与设计的核酶序列完全一致。经 SP6 RNA 多聚酶体外转录得到核酶 RNA。当核酶 RNA 与以同样方法转录得到的靶基因 RNA 混合反应, 可得到预期结果相同的切割片段, 表明两种核酶在体外均具有特异性切割活性。

关键词 水稻条纹叶枯病毒, 病毒核酸保守区, 病害特异性蛋白, 核酶 植物病毒

核酶(Ribozyme)是一类具有酶活性、特异切割核糖核酸(RNA)分子小片段 RNA 的总称。至今自然界中已发现的核酶类 RNA 可分为六个类型。核酶的特异切割功能不断吸引对其应用于控制病害、特别是控制病毒病害的研究。各种类型的核酶的应用探索层出不穷。其中, 一种“锤头状”(Hammer-head)的核酶^[1, 2]因其分子量小、容易操作, 被认为最具潜力在体内控制病毒。这种核酶在植物病毒的卫星 RNA、鳄梨日斑病类病毒及螺旋卫星 DNA 的一种转录产物中都有发现^[3], 在自然界中是一种自我切割性 RNA 分子(同链切割), 但研究表明也能切割异链 RNA。Haseloff 和 Gerlach^[4]详细地研究了切割异链 RNA 的锤头状核酶结构。根据这种结构设计的核酶, 在体外及体内都能特异地切割靶基因 RNA^[5-9]。在应用于动物及人体病毒的研究中, 目前仍然限制于组织培养系统, 对控制植物病毒的研究已有一些转到整体植物中试验^[10, 11]。我国在研究核酶切割植物病毒和类似病原物如马铃薯纺锤块茎类病毒、烟草花叶病毒方面也取得良好的进展^[12-14]。

水稻条纹叶枯病是水稻上的重要病毒病害, 最早记载于本世纪初。我国从 1964 年第一次报道该病发生, 至今多次爆发流行, 对水稻生产构成严重威胁。引起该病的水稻条纹叶枯病毒(Rice stripe virus, RSV)为一类特殊的单链、多组份 RNA 病毒^[15]。该类病毒经由飞虱持久性传播, 并能在介体昆虫内增殖, 经卵传递给下一代介体, 在基因结构及组成上与侵染动物和人体的 Phleboviruses 和 Unkuviruses(Bunyaviridae)病毒相近似^[16]。目前 RSV 的四个 RNA 组份已有三个组份的序列被报道^[17-19]。我国 RSV 株系在血清学、核酸组份、病毒外壳蛋白基因序列等方面性质, 与日本 RSV 的研究结果一致^[20, 21]。因此, 根据已有的序列测定, 结合锤

本文于 1995 年 8 月 10 日收到, 11 月 24 日修回

• 浙江省科委“八五”生物技术项目资助

头状核酶结构, 我们设计了特异性切割 RSV 核酶保守区及编码区的核酶, 并进行了体外活性切割测定, 为在水稻体内切割病毒 RNA 分子, 进而为控制该病害打下了基础。

材料和方法

1 核酶基因的设计与合成 根据 Haseloff 和 Gerlach 的研究^[4], 锤头状核酶特异切割 GUC、GUA 或 GUU 序列, 其结构有核酶核心区及与靶基因形成互补结构的识别区。据此并结合 RSV 核酸序列进行核酶基因的设计, 以 ABI DNA 合成仪合成核酶基因正链及与其 3'-末端互补的 15 个碱基引物, 核酶基因双链 DNA 的合成采用 Taq DNA 多聚酶, 以 PCR 条件反应一个循环, 阻止核酶核心区二级结构对互补链合成的影响。

2 核酶基因的克隆及序列测定 克隆方法基本参照《分子克隆》第二版 (Sambrook 等编, 1989)。克隆载体选用 pGEM3Zf(+) (Promega), 菌株用 DH5α, 限制性内切酶购于各公司。序列测定采用 Pharmacia 的 T7 DNA 多聚酶测序系统。

3 核酶基因的体外转录及核酶活性测定 核酶基因及其靶基因的体外转录采用 Boehringer 公司的 SP6 和 T7 体外转录系统, 转录产物用³²P 标记其 5' 末端。核酶体外活性测定在 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol/L MgCl₂ 条件下经 55 °C 反应 60 min, 反应产物经变性电泳放射性自显影确定效果^[4]。

结果与讨论

1 核酶基因的设计

分析 RSV 的分子结构及病理特性, 选定了 RSV 各条链都具有的保守区及病害特异性蛋

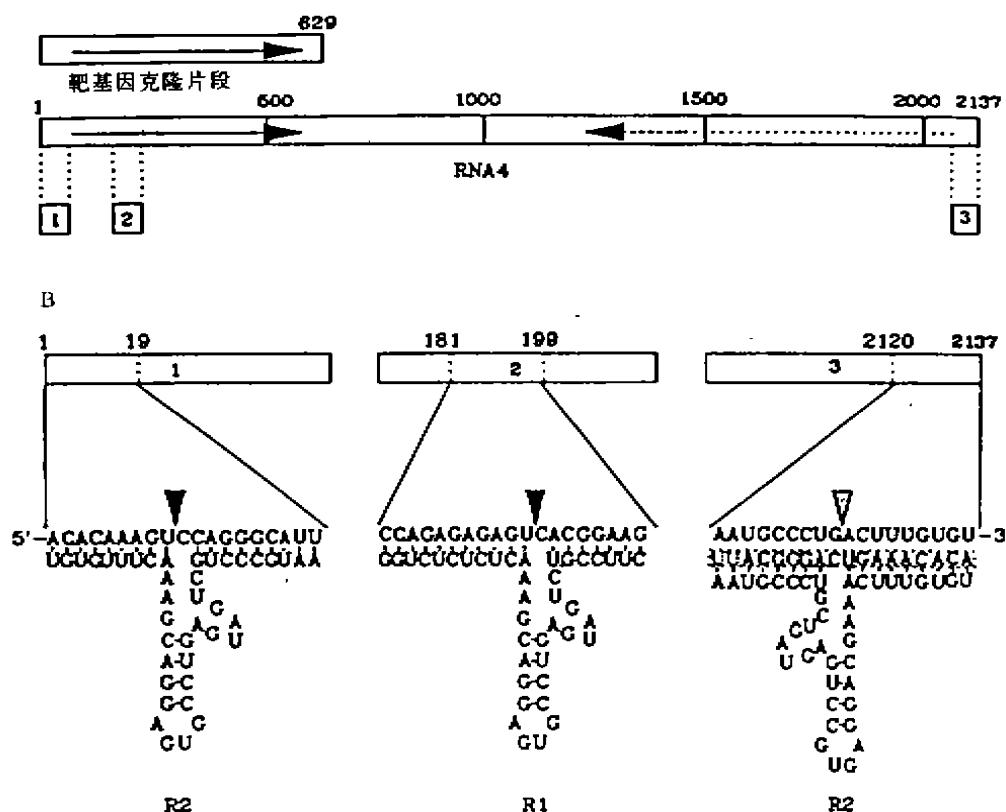


图 1 水稻条纹叶枯病毒 RNA 基因结构和核酶切割位点及靶基因克隆位置

A. RSV RNA4 病毒链示意图。实线箭头为 DSP 编码区, 虚线箭头部分为 32 kD 未知蛋白编码区。B. 核酶切割位点。R1, R2 分别表示切割 DSP 基因和病毒保守序列的核酶。柱形图: RSV RNA4 病毒链示意图。柱形图上面的数字为核苷酸位置, 柱形图内的号码为相应片段。R1: 核酶 1, 切割 DSP 基因; R2: 核酶 2, 切割病毒保守区。

Fig. 1 The diagram of genome structure of rice stripe virus-RNA and the cleavage sites of ribozyme.

A, The schematic drawing of Rsv-RNA4. Real line arrow, the coding region of DSP gene(virus strand). Dotted line arrow, the coding region of 32k unknown protein(complementary strand). B, the cleavage sites of ribozyme. R1 and R2 shows the ribozymes against the DSP gene and the conserved region of RSV, respectively. The digits above the column graph mark the nucleotide sites. the numbers in the column graph indicate corresponding segments of RNA.

白(Disease specific protein, DSP)基因为核酶的靶基因。病毒 RNA 保守区位于各 RNA 链的 5'-末端与 3'-末端。每一条链 5'-末端保守区的核酸序列完全一致, 3'-末端与 5'-末端的序列则几乎全部相同(Takahashi 等, 1990)。一些研究认为, 该区域与病毒 RNA 的识别、复制、装配有关。若用核酶破坏此区域, 病毒的基本增殖循环就会难以进行。而 DSP 为病毒 RNA 4 编码的一种蛋白, 该蛋白在致病过程中出现, 感病品种细胞内多, 而抗病品种细胞中量很少(Hayano 等, 1990)。以核酶切割该基因, 可能会使植物少受损害。选择的核酶作用位点以及据此区域及锤头状核酶结构要求设计出的核酶如图 1。

2 核酶基因的合成、克隆及序列测定

以 ABI DNA 合成仪合成的核酶基因单链 DNA 用聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 回收单一一条带, 以各单链 DNA 3' 末端互补寡核苷酸为引物, 在 Taq DNA 多聚酶作用下, 经 95 °C 30 S, 45 °C 30 S, 72 °C 90 S 合成双链 DNA. 电泳检测可看到一条单一一条带(图 2)。



图 2 体外合成的核酶基因单链及双链 DNA 电泳图谱
(8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳)

1. 核酶 1 双链 DNA; 2. 核酶 1 单链 DNA; 3. 核酶 2 双链 DNA; 4. 核酶 2 单链 DNA

Fig 2 The electrophoresis graph of ribozyme gene ss-and ds-DNAs synthesized *in vitro* (8% polyacrylamide gel).

1. Ribozyme 1 dsDNA; 2. Ribozyme 1 ssDNA; 3. Ribozyme 2 dsDNA; 4. Ribozyme 2 ssDNA.

合成的双链 DNA 克隆到 pGEM3Zf(+)的 SmaI 位点, 经过序列测定, 筛选 到与设计序列完全一致, 不同方向插入到载体中的克隆。两种核酶的核酸序列见图 3。

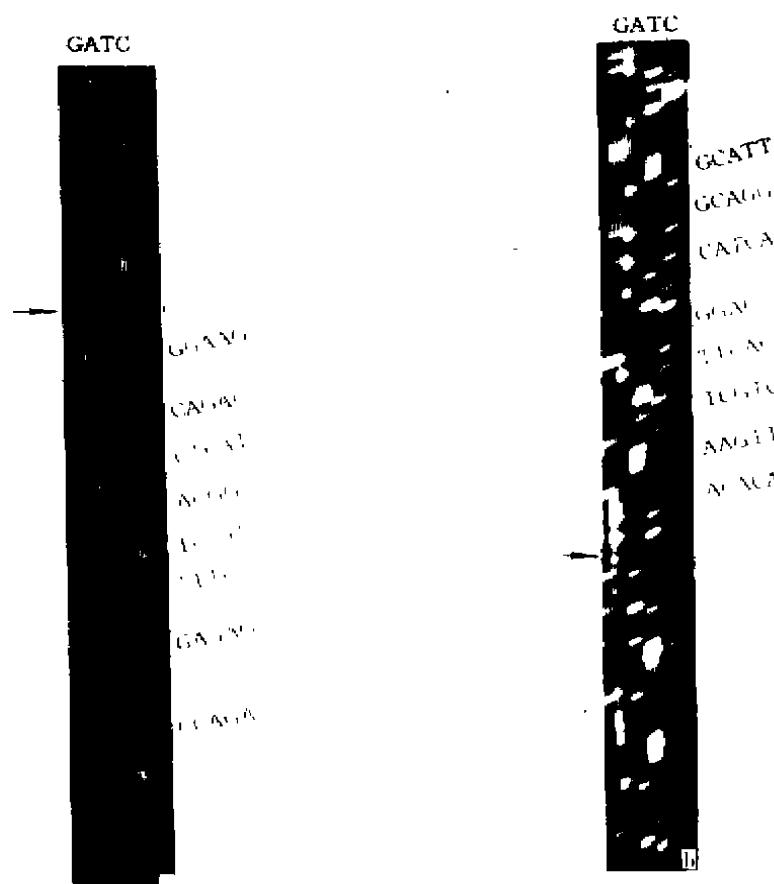


图 3 核酶基因序列测定

a. 核酶 1; b. 核酶 2

Fig 3 Sequence of ribozyme genes

a. ribozyme 1; b. Ribozyme2

3 核酶的体外转录与活性测定

为得到高效的体外转录, 我们试用了 sp6 及 T7 体外转录系统。结果表明, sp6 的转录效果好, 能得到大量的转录产物, 而 T7 系统的转录效果较差。因此最后选定 sp6 转录系统产生两种核酶及靶基因 RNA。

在体外切割反应条件下, 0.5 μl 标记的核酶与 0.5 μl 标记的靶 RNA 混合, 置于 55 ℃ 处理 1 h, 经电泳及放射性自显影, 可见有特异的切割带产生。根据标记物分子量计算, 产生的特异带分子量与预期结果相一致, 表明得到了在体外具有切割活性的核酶(图 4)。

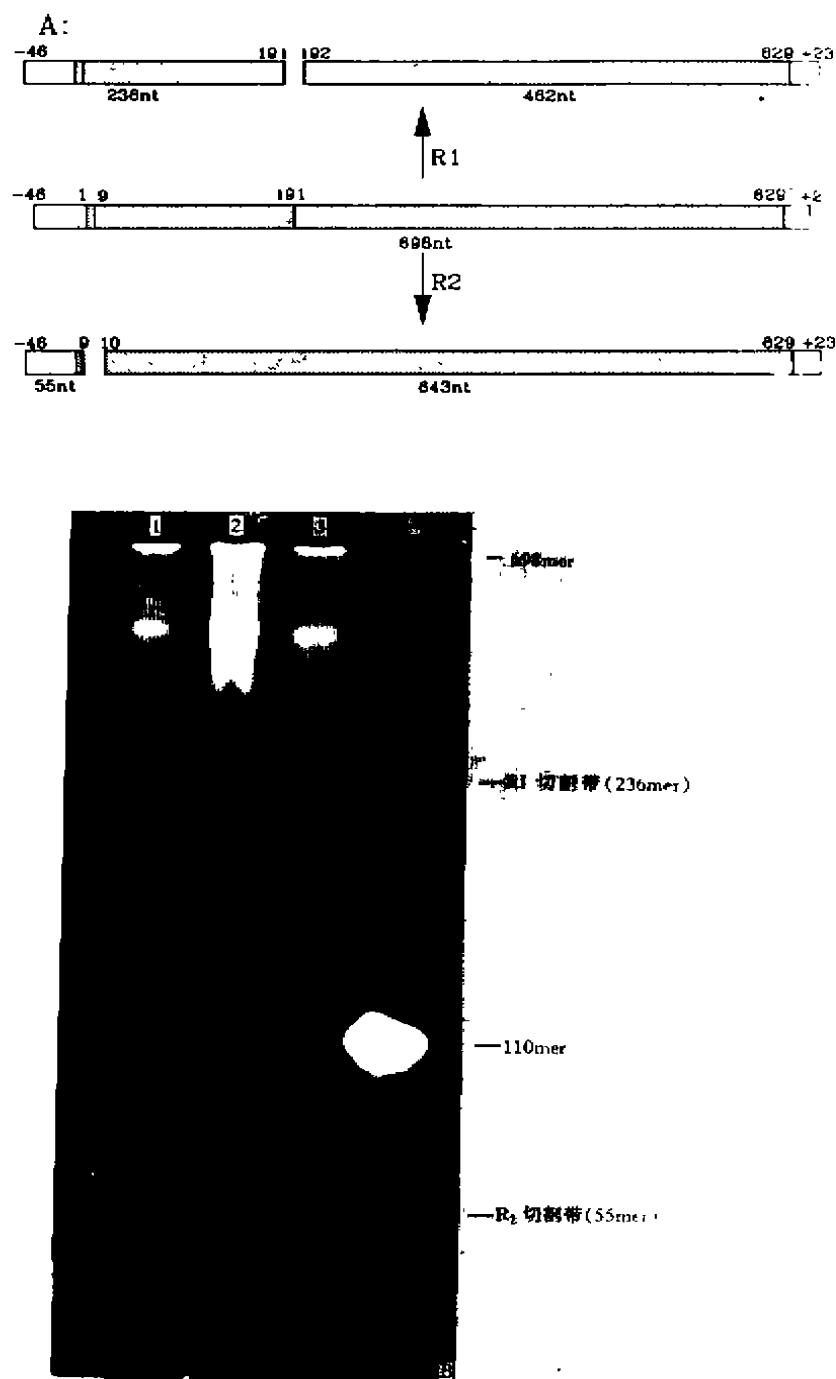


图4 两种核酶对病毒靶基因的切割。R1:核酶1, R2:核酶2。A:切割片段示意图 中空区示体外转录时一同转录下来的载体片段,点区示病毒RNA4片段,柱形图上的数字为转录产物的碱基位置,以RNA4第一个碱基为1,柱形图下面的数字为转录产物或切割片段的碱基数量。B:核酶切割产物电泳及放射性自显影结果。1.³²P标记的靶基因转录产物。2.³²P标记的靶基因转录产物加核酶1转录物。3.³²P标记的靶基因转录产物加核酶2转录物。4.³²P标记的核酶转录产物。

Fig. 4 The cleavage of two ribozyme to virus target genes. R1: ribozyme 1. R2: ribozyme 2. A; Illustrate the cleavage seg-

ments. Space regions indicate the transcript segments of vector during *in vitro* transcription. dotted regions indicate virus segments of RNA4. The digits above column graphs are nucleotide sites of transcript products, the first nucleotide of RNA4 is assigned as No. 1. The figures below the column graphs are the numbers of transcript products of cleavage segments. B: The results of electrophoresis and autoradiography of ribozyme cleavage products. 1.³²P labeled target gene transcripts. 2.³²P labeled target gene transcripts plus ribozyme 1 transcript. 3.³²P labeled target gene transcripts plus ribozyme 2 transcript. 4.³²P labeled ribozyme transcripts.

参 考 文 献

- 1 Forster A C, Symons R H. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 1987a; 49: 211~220
- 2 Forster A C, Symons R H. Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* 1978b; 50: 9~16
- 3 Bruening G. Compilation of self-cleaving sequences from plant virus satellite RNAs and other sources. *Methods Enzymol*, 1989; 180: 546~558.
- 4 Haseloff J, Gerlach W L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, 1988; 334: 585~591
- 5 Cantor G H, McElwain T T, Birkebak T A, et al. Ribozyme cleaves REX/TAX mRNA and inhibits bovine leukemia virus expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 10932~10936.
- 6 Cameron F H, Jennings P A. Specific gene suppression by engineered ribozymes in monkey cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 9139~9143
- 7 Cotten M, Birnstiel M L. Ribozyme mediated destruction of RNA *in vivo*. *EMBL J*, 1989; 8: 3861~3866
- 8 Lamb J W, Hay R H. Ribozymes that cleave potato leafroll virus RNA within the coat protein and polymerase genes. *J Gen Virol*, 1990; 71: 2257~2264.
- 9 Sarver N, Cantin E M, Chang P S, et al. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, 1990; 247: 1222~1225
- 10 Atkins D, Young M, Uzzell S, et al. The expression of antisense and ribozyme genes targeting citrus exocortis viroid in transgenic plants. *J Gen Virol*, 1995; 76: 1781~1790
- 11 Symons R H. Ribozymes. *Current opinion in structural biology*, 1994; 4: 322~330
- 12 叶寅, 刘怡之, 赵丰, 等. 特异切割马铃薯纺锤块茎类病毒的 Ribozyme 的体外活性检测. *中国科学(B辑)* 1992; 5: 491~496
- 13 许政魁, 李洁, 张庆琪, 等. 核酶的体外完成及对烟草花叶病毒 RNA 鞣的作用. *中国科学(B辑)*, 1992; 1: 47~53。
- 14 李洁, 金海翎, 张庆琪, 等. 双价核酶对烟草花叶病毒的两个靶序列的专一切割作用. *生物工程学报*, 1995; 11(1): 20~26
- 15 刘力, 陈声祥, 陈光育, 等. 我国水稻条纹叶枯病病原性质研究. *病毒学杂志*, 1990; 3: 306~311
- 16 Kakutani T, Hayano Y, Hayashi T, et al. Ambisense segment of rice stripe virus: possible evolutionary relationship with phleboiruses and bunyaviruses(Bunyaviridae). *J Gen Virol*, 1990; 71: 1427~1432.
- 17 Takahashi M, Toriyama S, Hamamatsu C, et al. Nucleotide sequence and possible ambisense coding strategy of rice stripe virus RNA segment 2. *J Gen Virol*, 1993; 74: 769~773.
- 18 Zhu Y, Hayakawa T, Toriyama S, et al. Complete nucleotide sequence of RNA 3 of rice stripe virus: An ambisense coding strategy. *J Gen Virol*, 1991; 72: 763~766
- 19 Zhu Y, Hayakawa T, Toriyama S. Complete nucleotide sequence of RNA 4 of rice stripe virus isolate T, and comparison with maize stripe virus. *J Gen Virol*, 1992; 73: 1309~1312
- 20 刘力, 陈声祥, 邱井生等. 应用 PCR 技术快速克隆水稻条纹叶枯病毒病理特异性蛋白基因及病毒保守区核酸序列. (印刷中)
- 21 Hayano Y, Kakutani T, Minobe Y. Coding strategy of rice stripe virus: Major non-structural protein is encoded in viral RNA segment 4 and coat protein in RNA complementary to segment 3. *Virology*, 1990; 177: 372~374

Effect of Ribozymes Cleaving Conserved and Coding Region of Rice Stripe Virus RNA

Liu Li¹ Chen Shengxiang¹ Qiu Bingsheng² Kang Liangyi² Tian Bo²

¹(*Laboratory of Virology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021*)

²(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Rice stripe virus(RSV) genome is composed of four ssRNA species. The 5'-and 3'-terminal sequences of about 20 bases of each ssRNA were almost completely complementary to each other and the 5'-terminal sequences of all four ssRNA have the same sequence of 11 nucleotides. Those conserved sequences were proposed to be involved in the replication, transcription or assembly of RNAs into the particles. If those sequences are cleaved the virus would be lack of recognition sites so that its reproduction will be destroyed. On the other hand, the disease-specific protein (DSP) is related to the disease severity. Inhibition of its expression may reduce the disease severity. Based on those considerations and the structure requirements of the hammer-head ribozymes, two ribozymes were designed, one was to cleave the conserved region of the 5'-terminal of the viral sequence of RNA 4 or even all the regions of the 5'-terminals of the eight viral and viral complementary sequences of the virus, and the another to cleave the DSP gene region.

The first-strand cDNA of the ribozymes (each containing 40 nucleotides) and their 3'-terminal complementary primers were chemically synthesized. The second-strand was made by Taq DNA polymerase. The blunt-ended ds-DNAs were purified by PAGE and separately inserted into the Sma I site of pGEM 3zf(+). Sequencing of the plasmids containing the insertions showed the sequences of both ribozyme genes cloned were identical to the sequences designed. With the Sp6 RNA polymerase the two ribozymes were transcribed and mixed with transcript of the DSP gene and the 5'-terminal sequence of RNA 4. The results showed that both specific cleavage reaction of the ribozymes *in vitro* were efficient which created the same fragments as expected.

Key words Rice stripe virus, Conserved sequences of RNA, Disease-specific protein, Ribozyme