

应用核酶体外切割马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因的研究*

郭旭东 哈斯阿古拉 张鹤龄

(内蒙古大学生物系, 呼和浩特 010021)

S432.41

A 提要 针对马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因第 356~358 位点“GUC”, 设计、合成了一种“锤头状”核酶。将核酶基因克隆在体外转录载体 pSPT19 的 SP6 启动子下游; 同时将 PLRV CP cDNA 亚克隆在体外转录载体 pSPT18 的 SP6 启动子下游。利用 SP6 RNA 聚合酶分别体外转录, 获得核酶分子和靶 RNA 序列。在 41℃ 保温进行核酶切割反应, 检测到预期大小且被切开的两个 RNA 短片段。

关键词 核酶, 马铃薯卷叶病毒, 外壳蛋白基因, 体外转录, 体外切割

核酶(Ribozyme)是近十年来受到普遍重视的一类基因调控 RNA, 具有酶的特性, 能够特异性地切割靶 RNA 序列。核酶最初被发现于自然界中广泛存在的 RNA“自剪切”现象^[1]。1988 年, Haseloff 等研究总结了核酶的特征三要素^[2], 为核酶的实际应用奠定了理论基础。从此, 核酶的这种“基因剪刀”作用广泛应用于切割动、植物病原 RNA 的研究。目前, 应用 Ribozyme 在体外已成功切割了许多病毒核酸分子, 如 HIV^[3]、HBV^[4]、PSTV^[5]等。

马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)属黄化病毒组(Luteovirus)^[6], 可侵染马铃薯植株, 引起黄化、矮缩、卷叶等多种症状, 是一种严重影响马铃薯的产量和品质的世界性马铃薯病害^[7]。多年来, 利用常规育种方法培育抗性品种费时费力, 且难以维持稳定的抗性。如果把有效切割 PLRV 的 Ribozyme 基因转入马铃薯染色体, 就可能阻断病毒复制, 达到防治 PLRV 的目的。1990 年 Lamb 等曾报道应用 Ribozyme 体外切割 PLRV 苏格兰分离株(PLRV-S)外壳蛋白基因和复制酶基因的研究结果^[8], 但至今国内尚未见到有关用 Ribozyme 防治 PLRV 的研究报道。我们于 1992 年在国内首次完成了 PLRV 中国分离株(Chinese isolate, PLRV-Ch)外壳蛋白(Coat protein, CP)基因的合成、克隆和全序列分析^[9], 为本研究奠定了基础, 本文即报道我们根据以上设想和条件, 针对 PLRV-Ch CP 基因中的一个“GUC”位点, 设计、合成并克隆了一种“锤头状”核酶。并实现了 PLRV CP 基因转录物的体外切割, 为最终在植物体内应用核酶阻断 PLRV 复制创造了条件。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 PLRV CP cDNA 克隆质粒及菌种

含 PLRV CP cDNA 的重组质粒 pLCP2 及大肠杆菌 *E. coli* JM109 由本实验室提供。

收稿日期: 1996-07-01, 修回日期: 1996-12-02

* 国家自然科学基金资助项目

1.2 核酶寡核苷酸片段合成

核酶的模板寡核苷酸片段 I 和 II 在军事医学科学院二所用 DNA 合成仪(ABI391)合成。

1.3 试剂

限制性内切酶 BamH I、Hind III、Bgl I、EcoR I、DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow)及 T₄ DNA 连接酶为华美生物工程公司产品, T₄ 多核苷酸激酶为 Promega 公司产品, 体外转录试剂盒 Sp₆/T₇ Transcription Kit 购自 Boehringer Mannheim 公司, [α -³²P]dATP、[α -³²P]UTP 为北京亚辉生物医学工程公司产品。

其它常规试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 核酶的克隆与鉴定

将人工合成的两条核酶寡核苷酸片断纯化并确定浓度, 用 T₄ 多核苷酸激酶磷酸化, 等比例混合后, 加热至 65℃ 10 min, 然后缓慢退火至 4℃。pSPT19 质粒用 BamH I/Hind III 酶切, 电泳纯化后经酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀、回溶。按载体与模板 4:3 的比例与上述退火混合物在 15℃ 连接 20 h 以上。65℃ 5 min, 缓慢降温至 16℃, 加 5 u Klenow 酶, 15℃ 保温 60 min。补加 6 u T₄ DNA 连接酶, 继续于 16℃ 保温 2 h。将此连接反应物转化 *E. coli* JM109 感受态菌。

核酶重组子的鉴定参照菌落杂交^[10]的方法进行。其中: 用 [α -³²P]dATP 标记模板 I 为探针。探针标记方法为: 10 μ L 体系, 模板 I 96 ng, 100 mmol/L 二甲胍缓冲液(pH6.8), 1 mmol/L CoCl₂, 0.1 mmol/L DTT, 10 u 末端转移酶(TdT), 40 μ Ci [α -³²P]dATP, 37℃ 保温 60 min, 70℃ 保温 10 min。取 0.2 μ L 检测探针的放射性强度, 杂交中探针用量为 10⁶CPM/mL。

选取杂交阳性克隆, 按碱裂解法^[10]提取克隆质粒 pSPRi, 用限制性内切酶 BamH I、Hind III 及 Bgl I 进行酶切鉴定, 检测插入片段及其上酶切位点。并由 ABI 370 A 型 DNA 序列分析仪进行序列测定。

2.2 pLCP₂ 的亚克隆

将 pLCP₂ 中的 CP cDNA 经 EcoR I、Hind III 双酶切后定向克隆到 pSPT18 的 EcoR I/Hind III 位点。亚克隆步骤按质粒载体中克隆的方法^[10]进行, PCR 反应条件及操作步骤参照哈斯等(1992)^[8]的方法进行。

2.3 体外转录

用 EcoR I 使 pSPCP 酶切线性化, 用 Hind III 使 pSPRi 线性化, 两种线性质粒通过电泳纯化、低熔点琼脂糖凝胶回收, 经酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀、回溶于水中备用。体外转录按 Boehringer Mannheim 公司提供的试剂盒进行。转录体系为 40 mmol/L Tris(pH8.0), 0.5 mmol/L 4 \times rNTP, 6 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L Spermidine, 5 mmol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 模板 DNA, 10 u SP6 聚合酶。37℃ 保温 60 min。转录 pSPTCP 时, 加入 10 μ Ci [α -³²P]UTP 进行标记。转录混合物经酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀后, 干燥、回溶于水中。用 5% 聚丙烯酰胺凝胶(7 mol/L 尿素)于 8 V/cm 电泳 6 h, X 光片放射自显影以检测转录产物。

2.4 体外切割

近约 5:1 比例混合核酶与底物分子, 在 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 25 mmol/L MgCl₂ 条件下于 41℃ 保温 60 min。加入等体积的反应终止缓冲液(98% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.1% 溴酚蓝, 0.1% 二甲苯青蓝)^[5], 80℃ 处理 30 s 后, 5% 聚丙烯酰胺凝胶(7 mol/L 尿素)于 8 V/cm 电泳 6 h, X 光片放射自显影 24 h 后观察结果。

结 果

1 特异切割 PLRV 的核酶基因的设计

针对 PLRV CP 基因 5'端起第 6 个“GUC”位点, 根据“锤头状”核酶设计原则^[2], 将与靶 RNA 序列切点(GUC)两侧互补的两段核苷酸序列(左侧长 11 nt、右侧长 9 nt)分别设计在核酶保守核心序列(锤头结构)的两侧(见图 1)。并参照赵西林等的方法^[11], 在核酶保守序列内部

加入一个 Bgl I 酶切位点。核酶的模板是由 3' 端部分互补的两条 DNA 单链 I (5'GAT CCG GCC TCG CTC TGA TGA AAG CCT GTA CGG 3') 和 II (5'AGC TTG GTA CCT TCA GTT CGT TTC AAG CCG TAC AGG 3') 构成, I、II 的 5' 端分别设计有两种半酶切位点粘端 (BamH I、Hind III)(见图 2a)。

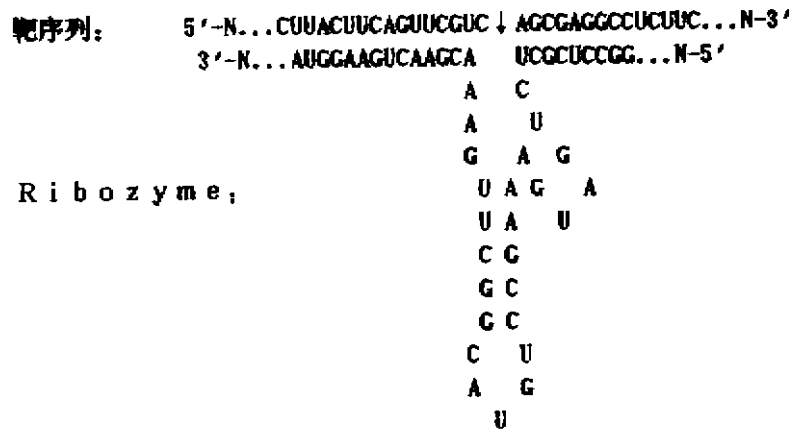


图 1 “锤头状”核酶底物作用模式图

(核酶在底物上的切割位点位于第 358 位核苷酸处,图中用箭头表示)

Figure 1 Ribozyme for cleavage of PLRV-Ch CP gene

Ribozyme cleavage site is indicated by the arrow

2 核酶基因的合成及克隆

首先将 3' 端部分互补的 I、II 链(5'端先经磷酸化)通过两个 5' 端酶切位点连接到载体 pSPT19 的 BamH I/Hind III 酶切粘端上,然后用 DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow)分别反向延长单链模板的两个 3' 端,合成了完整的核酶双链,再将两个 3' 游离端与载体两个 5' 端进行连接(图 2b)。

3 重组克隆 pSPRi 及 pSPCP 的筛选与鉴定

在用核酶序列转化后生长的 *E. coli* 菌中,随机选取了 85 个菌落,通过菌落原位杂交,出现 52 个杂交阳性克隆。从中挑选一个阳性克隆(#57),对质粒进行酶切鉴定表明,该质粒存在 BamH I、Hind III 及 Bgl I 切点。序列分析结果亦表明,全长序列与所设计序列完全一致,证明此克隆质粒即 pSPRi。

pSPCP 亚克隆筛选出几百个菌落。经酶切鉴定,本实验只选择其中一个 pSPCP 质粒进行核酶切割反应。

4 体外转录

pSPRi/Hind III、pSPCP/EcoR I 酶切后,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,两种质粒的电泳图谱均呈单条带型,证明酶切线性化完全。体外转录产物经酚、氯仿抽提,乙醇沉淀、回溶后在 5% 聚丙烯酰胺凝胶(7 mol/L 尿素)中电泳,检测到了符合 PLRV CP 基因大小的、约 627 nt 的 pSPCP 转录物(图 3)。

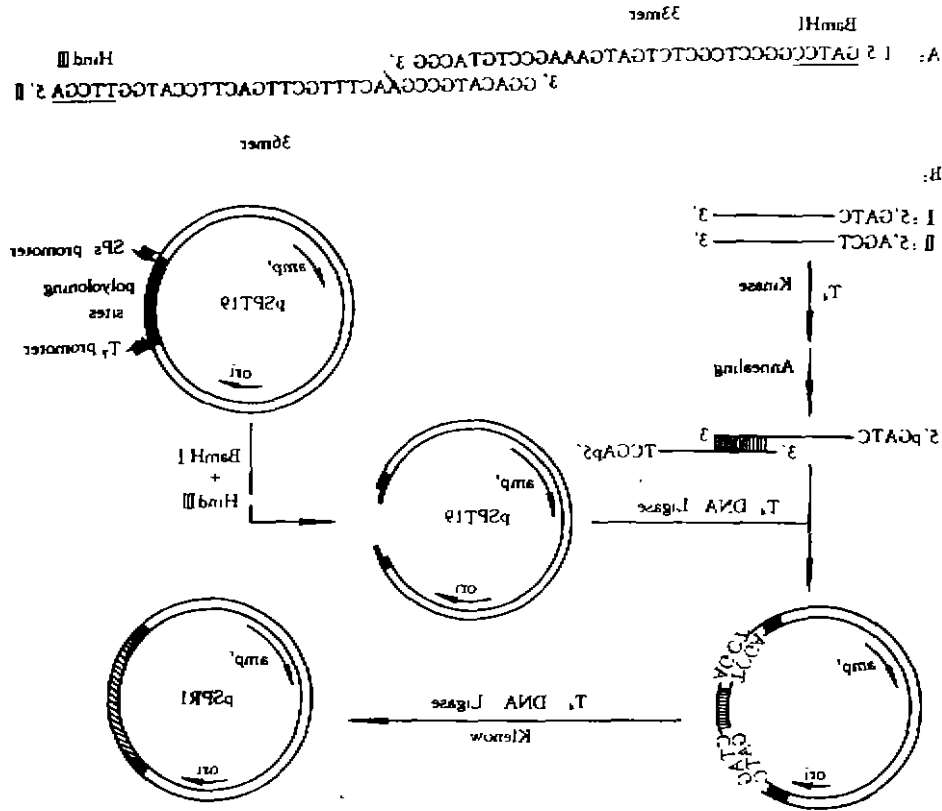


图2 a.人工合成的核酶模板I、II通过3'端互补的结构示意图;b.核酶克隆质粒的构建
Figure 2 a. The synthesized oligonucleotides I and II as templates of ribozyme.
b. Construction of the recombinant plasmid for cloning of ribozyme cDNA.

5 体外切割反应

按照理论推测,如果核酶能够在预先设计位点切开靶RNA序列,将会产生大小分别为358 nt和269 nt两个小RNA片段。体外切割反应后经5%聚丙烯酰胺凝胶(7 mol/L尿素)电泳、X光片放射自显影显示,确实存在与预期大小相符的、靶RNA被切开后的两个小片段(图3)。

讨 论

为获得一个有正常切割活性的核酶,除了必须保证核酶的特征三要素外,靶序列中切割位点的选择也是十分重要的因素。我们在PLRV-Ch CP基因(全长627 nt)区域内的9个“GUC”中,通过基因内二级结构分析、与几个不同分离株的序列保守性比较,及考虑序列中G、C碱基含量等方面,选择了从5'端起第6个“GUC”位点。首先,该位点两侧各有10个碱基序列在不同分离株中基本一致,因此属于稳定的保守区域,利于核酶切割;其次,第6位点两侧的G、C碱基分布均匀,与A、T含量的比例适中,利于核酶的特异性结合;该位点(第358碱基)还接近CP基因的中心,但两边长度(指至基因5'端和3'端长度)又不完全相等(约相差90 nt),便于体

外切割后产物的检测。

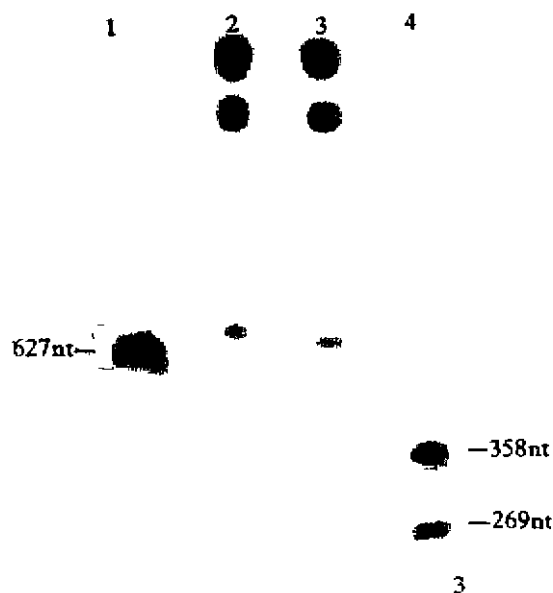


图3 变性聚丙烯酰胺凝胶(7 mol/L 尿素)电泳分析核酶与底物反应结果(凝胶浓度为5%),其中:1.靶序列转录对照;2,3.λ-DNA/Hind III 分子量 Marker;4 核酶与底物反应结果

Fig 3 Analysis of the products of ribozyme cleavage reaction by polyacrylamide gel electrophoresis (5%, 7 mol/L urea).

Lane 1: Target sequence transcript as a control; Lane 2 and 3: λ-DNA/Hind III Marker; Lane 4: Substrate incubated with ribozyme.

对于核酶本身结构来说,两侧与靶 RNA 互补序列(即核酶的两臂)的长度也十分重要。有实验证实,两臂长度与核酶的切割效率直接相关,当把两臂长度从 20 nt 减少到 12 nt 时,反应速度可提高 10 倍^[12]。Lamb 等^[8]体外切割 PLRV-CP 基因时,将核酶两臂长度设计为 10/9 nt,取得了较好的效果;而 1992 年 Peter Steinecke 等^[13]在植物体内切割 npt 基因时,所设计核酶的两臂长度为 12/10 nt,也获得了切割效率较高的核酶。本实验参考其结果,将两臂长度设计为 11/9 nt,体外切割取得了较好的效果。

参考赵西林等的方法^[11],在核酶保守区加入的 Bgl I 酶切位点,为核酶克隆的鉴定提供了有力的证据。实验证明,该位点不仅没有对核酶的活性产生不利影响,而且通过其特有的“茎环结构”起到了稳定核酶二级结构的作用。

用 SP₆/T₇ 转录试剂盒体外转录后获得的核酶分子,经 DNase I (RNase free)处理 DNA 模板后,切割活性较好;另外,据对照实验发现,转录后的核酶和靶序列不经酚、氯仿抽提纯化而直接进行切割反应,结果检测不到切割产物。以上实验结果表明,当在 41 ℃ 保温时,该核酶具有较高的,体外切割 PLRV-CP 基因转录物的活性。目前正试图在体外适宜条件下切割 PLRV 全基因组,以及通过三亲融合试验将核酶基因导入马铃薯植株检测其体内活性。

参 考 文 献

- 1 Cech T R. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzyme. *Science*, 1987, 236:1532-1539
- 2 Haseloff J, Gerlach W L. Simple RNA enzyme with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, 1988, 334: 585-591
- 3 Sarver N, Cantin E M, Chang P S. Ribozyme as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, 1990, 247:1222-1225
- 4 王平,徐炜,曾力宇等.核酶 Ripc 对 HBV 基因体外转录物的作用. *病毒学报*, 1993, 9(3):278-279

- 5 叶寅, 刘怡之, 赵丰等. 特异切割马铃薯纺锤形块茎类病毒的 Ribozyme 的体外活性测定. 中国科学(B辑), 1992, 5:491~496
- 6 Matthews R E F. Classification and nomenclature of viruses. Intervirology, 1982;17:1~199
- 7 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒研究进展. 马铃薯, 1983, 2:34~39
- 8 Lamb J W, Hay R T. Ribozymes that cleave potato leafroll virus RNA within the coat protein and polymerase gene. Journal of General Virology, 1990, 71:2257~2264
- 9 哈斯阿古拉, 施一棠, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因的合成、分子克隆和全序列分析. 中国病毒学, 1992, 7(4):432~435
- 10 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版). 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京, 科学出版社, 1992, 19, 61
- 11 赵西林, 陈雄伟, 陈雅文等. 核酶设计、合成与克隆的一种新方法. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(5):376~380
- 12 John J R. Ribozyme. Current Opinion in Biotechnology, 1992, 3:3~7
- 13 Sternecke P, Herget T, Schreier P H. Expression of a chimeric ribozyme gene results in endonucleolytic cleavage of target mRNA and a concomitant reduction of gene expression *in vivo*. The EMBO Journal, 1992, 11(4):1525~1530

Study on the Cleavage of Potato Leafroll Virus Coat Protein Gene *in vitro* by Ribozyme

Guo Xudong Hasi Agula Zhang Heling

(Department of Biology, Inner Mongolia University, Huhhot 010021)

A hammerhead structure ribozyme was designed and synthesized to potato leafroll virus Chinese isolate (PLRV-Ch) genome within 356 to 358 nt "GUC" in coat protein (CP) gene. DNA sequence encoding the ribozyme was inserted into the position downstream from SP₆ promoter of *in vitro* transcription vector pSPT19. The target PLRV CP gene cDNA was subcloned in vector pSPT18. The RNA molecules of ribozyme and target sequence were generated by transcription with SP₆ RNA polymerase *in vitro*. After cleavage reaction at 41 °C, two expected short RNA fragments were observed.

Key words Ribozyme, Potato leafroll virus, Coat protein gene, Transcription *in vitro*, Cleavage reaction *in vitro*