

二价核酶基因构建及对 PLRV 负链靶序列的体外切割研究

张剑峰¹, 张鹤龄², 于嘉林³, 迟胜起¹, 贺秀芳¹, 郝文胜², 杨静华²

(1. 青岛农业大学 农学与植保学院, 山东 青岛 266109; 2. 内蒙古大学 生命科学院, 内蒙古 呼和浩特 010021; 3. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要:根据锤头状核酶的作用模式, 设计、合成并克隆了特异性切割马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus, PLRV)中国分离株(PLRV-Ch)复制酶基因负链 RNA 的二价核酶序列。将该核酶基因克隆到 pGEM-4Z 中, 构建成体外转录载体 pGEM-4ZDR; 同时将包含核酶切割识别位点的 PLRV-Ch 复制酶基因 cDNA 近 5' 端的 874 bp 片段反向插入到 pGEM-4Z 中, 构建了体外转录载体 pGEM-4ZR5。以线性化的重组质粒 pGEM-4ZDR 和 pGEM-4ZR5 为模板, 在 T7 RNA 聚合酶的作用下, 分别转录获得核酶 RNA 和 PLRV-Ch 复制酶基因 5' 端负链 RNA 底物片段。将以上 2 种 RNA 转录物混合并经 37℃ 保温后, 检测结果表明, 所得核酶 RNA 对 PLRV-Ch 复制酶基因负链 RNA 在体外具有较强的特异切割活性。

关键词:二价核酶; 马铃薯卷叶病毒; 复制酶基因; 体外切割

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)02-0012-07

Construction of a Divalent Ribozyme Gene Specific to Potato Leafroll Virus Replicase Gene and Cleavage of Negative Strand RNA *in vitro* by Ribozyme

ZHANG Jian-feng¹, ZHANG He-ling², YU Jia-lin³,

CHI Sheng-qi¹, HE Xiu-fang¹, HAO Wen-sheng², YANG Jing-hua²

(1. College of Agricultural and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qindao 266109, China;

2. Life Science College of Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China; 3. State Key Laboratory of Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Based on the functional model of the hammerhead RNAs, a divalent ribozyme was designed for cleavage of Potato leafroll virus(PLRV) RNA, targeting at two sites on the negative strand of PLRV Chinese isolate replicase gene and cloned in vector pGEM-4Z. The recombinant plasmid pGEM-4ZDR was used for *in vitro* transcription of the ribozyme RNA. The plasmid pGEM-4ZR5 for *in vitro* transcription of the substrate viral RNA was synthesized by cDNA subcloning of a PLRV Chinese isolate(PLRV-Ch) into plasmid pGEM-4Z, in which an 874 bp cDNA fragment at the 5' end of PLRV-Ch replicase gene was reversely inserted downstream of the T7 promoter in pGEM-4Z. By using T7 DNA polymerase, the plasmids of pGEM-4ZDR and pGEM-4ZR5 were linearized with *EcoR* I and used as templates for *in vitro* transcription of the divalent ribozyme or the negative strand RNA of PLRV-Ch replicase gene, respectively. After mixture of the RNA transcripts and incubation at 37℃, results showed that the ribozyme has highly catalytic activity to the PLRV-Ch negative strand RNA *in vitro*.

Key words: Divalent ribozyme; Potato leaf roll virus(PLRV); Replicase gene; *in vitro* cleavage

核酶(Ribozyme)是一种具有催化活性的小分子 RNA, 具有酶的特性, 能够特异性地切割靶 RNA 序

列。核酶最初发现于自然界中广泛存在的 RNA 自剪切现象。1988 年 Haseloff 等研究总结了核酶的特

收稿日期: 2012-01-21

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD49B02-6); 青岛农业大学人才基金(630915)

作者简介: 张剑峰(1964-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 博士, 主要从事分子植物病理学研究。

征三要素^[1],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。由于核酶能在异体情况下剪切 RNA 分子,这就启发人们利用核酶的这种功能来设计切割一些病原性 RNA 的核酶。目前,应用 Ribozyme 在体外已成功切割了许多病毒及其他病原核酸分子^[2-5]。

PLRV 是单链正链 RNA,在寄主细胞内 PLRV 先转录成负链 RNA,再以负链 RNA 为模板合成病毒正链 RNA。因此,如果把能切割 PLRV 复制酶基因负链的核酶序列转入马铃薯,由于转入的核酶能切割 PLRV 复制酶基因负链,中断 PLRV 复制酶基因的合成,从而干扰 PLRV 在马铃薯体内的复制和表达,这样就达到了抗 PLRV 的目的。Lamb 等^[6]曾设计了针对 PLRV 正链 RNA 的核酶,能体外切割 PLRV(苏格兰分离株)的 CP 基因和复制酶基因。

本研究设计、合成并克隆了针对 PLRV 中国分离株(PLRV-Ch)复制酶基因序列^[7],特异切割 PLRV 复制酶基因负链 RNA 的双价核酶序列。以增加核酶对靶 RNA 的切割效率,希望通过对 PLRV 复制酶基因负链 RNA 的体外切割,为最终在植物体内应用核酶阻断或干扰 PLRV 的复制和基因表达创造条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 马铃薯卷叶病毒中国分离株(PLRV-Ch)的复制酶基因 cDNA 克隆 pPLR5 由张鹤龄教授提供,由 PLRV-Ch 复制酶基因近 5'端 cDNA 片段(约 1.2 kb)插入质粒载体 pUC19 的 *Bam*H I 和 *Sma* I 多克隆位点后构建而成^[8];质粒 pGEM-4Z 购自 Promega 公司。

1.1.2 试剂 内切酶 *Eco*R I、*Hind* III、*Bam*H I、*Sac* I, RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems - Sp6 and T7 Kit 购自 Promega 公司。T₇ DNA

Polymerase, T₄ DNA ligase, DNA 回收试剂盒,购自 TaKaRa 公司; Dig-High prime DNA labeling and Detection starter Kit I 购自 Roche 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 购自 Promega 公司。

1.1.4 寡核苷酸引物 包括了核酶切割活性区域及 PRLV 复制酶基因结合序列的核苷酸引物 F1 和 F2 由上海博亚(Bioasia)公司合成 2 个引物片段的 3'端之间有 10 nt 的重叠互补区(反黑区域) 5'末端分别含有 *Bam*H I 和 *Sac* I 位点(下划线区域):

F1: 5'-AGCTTGGATCCGACATCCCCCTGATGAG

*Bam*H I

TCCGTGAGGACGAAACGCCGCTA CAAGCGCACC-3'

(F1:61nt 包含与 PLRV 复制酶基因负链 RNA

169 ~ 198 区域互补)

F2: 5'-GATCCGAGCTCCGACCATTTTGTTCCTC

Sac I

CTCACGGACTCATCAGCATTGGT GGTCCGCTTG-3'

(F2:62 nt 包含与 PLRV 复制酶基因负链 RNA

199 ~ 218 区域互补)

1.2 方法

1.2.1 双价核酶基因的设计 根据锤头状核酶结构的特点及选择底物切割位点,以 PLRV 中国分离株(PLRV-Ch)复制酶基因作靶序列设计核酶。选择病毒 RNA ORF2b 近 5'端第 179 ~ 181 和 206 ~ 208 核苷酸的负链 2 个 GUC 位点作为切割靶位点,设计一个双价锤头结构的核酶,称为双价核酶(Divalent ribozyme, DR)。其中,对应负链第 182 ~ 205 序列与 2 个锤头结构之间的序列互补配对,间隔互补区为 24 nt;第 169 ~ 178 之间序列为双价核酶 5'端互补配对区(臂长为 10 nt),第 209 ~ 218 之间序列为双价核酶 3'端配对区(臂长为 10 nt)。双价核酶全长 103 个核苷酸(nt),图 1 为所设计的含有切割 2 个位点的锤头状双价核酶核苷酸序列。

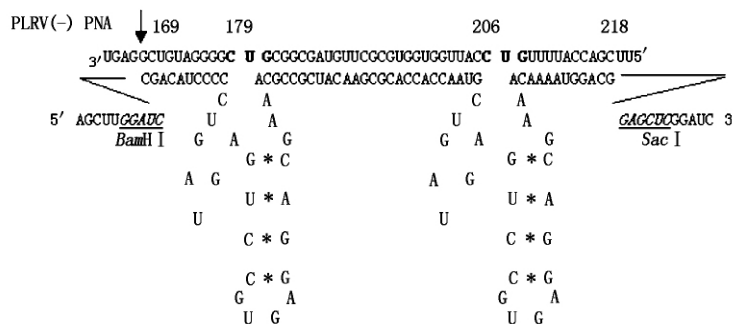


图 1 双价核酶与其互补的靶序列的结构

Fig. 1 Structure of divalent ribozyme containing two cleavage sites and its target RNA

1.2.2 双价核酶基因的合成 采用 F1 和 F2 这 2 条寡核苷酸单链互为模板的方案合成全长双价核酶 cDNA, 其中 F1 链、F2 链分别为 61 和 62 个碱基, 二者间的 3' 末端有 10 个碱基互补, 5' 端分别含有酶切位点 *Bam*H I 和 *Sac* I。

将人工合成的寡核苷酸片段 F1 和 F2 各 5 μ L (10 pmol/ μ L) 等量混合, 加 ddH₂O 10 μ L, 65 $^{\circ}$ C 10 min, 然后缓慢降温至 4 $^{\circ}$ C。加 10 \times Buffer (500 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 100 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L DTT) 3 μ L, 2.5 mmol/L /each 4 \times dNTP 2 μ L, 10 U Klenow 酶, ddH₂O 补齐到 30 μ L, 16 $^{\circ}$ C 反应 15 h 后 80 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 终止反应。经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测合成的核酶基因片段, 回收 100 bp 左右产物片段。

1.2.3 核酶基因的克隆 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切质粒载体 pGEM-4Z 和回收线性核酶 DNA, 将酶切纯化的 DNA 片段与 pGEM-4Z 载体按以下方法连接: pGEM-4Z 质粒 DNA (*Bam*H I / *Sac* I) 1 μ L (100 ng/ μ L), 核酶片段 (*Bam*H I / *Sac* I) 1 μ L (100 ng/ μ L), 10 \times 连接缓冲液 2 μ L, T4 DNA 连接酶 (6 U/ μ L) 1 μ L, Total volume 20 μ L, 12 $^{\circ}$ C 保温 16 h, 连接到 pGEM-4Z 的 T7 启动子下游。

连接混合物转化大肠杆菌 JM109, 在含 Amp, X-gal, IPTG 平板进行蓝白斑筛选重组子。

1.2.4 核酶基因重组质粒的鉴定 按照 (Cracking) 快速鉴定重组质粒, 并小量提取质粒进行酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小, 同时将重组质粒进行测序鉴定。

1.2.5 PLRV-Ch 复制酶基因 5' 端反义链 RNA 体外转录表达载体的构建 将 pPLR5 中的 PLRV-Ch 复制酶基因片段的 cDNA 序列, 用 *Sac* I 和 *Hind* III 分别酶切 pPLR5 和 pGEM-4Z 质粒, 凝胶电泳回收纯化 pPLR5 酶切产生的 0.8 kb 片段和线性质粒载体 pGEM-4Z, 将双酶切 pGEM-4Z 质粒与复制酶基因片段 0.8 kb 进行连接 (方法同上), 使 PLRV 复制酶基因片段反向插入体外转录载体 pGEM-4Z 中, 重组质粒转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。蓝白斑筛选重组子, 并对重组质粒测序。

1.2.6 核酶及靶序列 RNA 的体外转录 提取已构建的核酶基因和 PLRV 复制酶反义链 RNA 片段体外转录表达载体, 分别用 *Eco*R I 或 *Sac* I 酶切, 回收线性化 DNA, 在 T7 RNA 聚合酶作用下转录核酶和模板 RNA 体外转录反应体系: 10 \times T7 RNA Polymerase Buffer 2 μ L, DTT (50 mmol/L) 2 μ L, NTP Mixture (each 2.5 mmol/L) 4 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, 质

粒 DNA 500 ng, T7 RNA Polymerase 10 ~ 50 U, DEPC 水至 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。加入 10 U 的 *DNase* I (RNase free)。反应。苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 和氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提。乙醇沉淀, 真空干燥。溶于 20 μ L ddH₂O (DEPC 处理) 中。

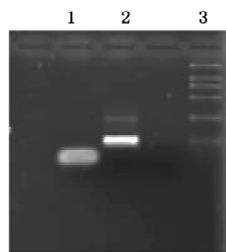
1.2.7 体外切割实验 将体外转录所得到的核酶 RNA 分子与底物 RNA 分子在 50 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L MgCl₂ 中混合, 核酶与底物 RNA 分子的摩尔数比约为 5: 1 (通过测定转录产物产量及 RNA 分子的大小, 近似计算得摩尔数)。切割反应体系: 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 2 μ L, 0.1 mol/L MgCl₂ 5 μ L, 核酶转录物 (1 nmol/ μ L) 5 μ L, 底物转录物 (1 nmol/ μ L) 1 μ L, ddH₂O (DEPC 处理) 6 μ L, Total 20 μ L。在 37 $^{\circ}$ C 下保温作用 1.5 h 后, 于 80 $^{\circ}$ C 处理 1 min, 经乙醇沉淀, 3.0% 的变性琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8 Northern 杂交 DIG 探针的标记: 按照 Dig High prime DNA labeling and Detection starter Kit I 试剂盒 (Roche) 提供的方法标记 PLRV 复制酶基因片段特异性探针。取 PLRV 复制酶基因片段 cDNA 2 μ L (0.5 μ g/ μ L), 加入无菌重蒸水 14 μ L, 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 迅速转移至冰上冷却, 在冰浴中加入 5 \times DIG-High Prime 4 μ L, 混匀离心。37 $^{\circ}$ C 保温 2 h 后, 加 0.25 mol/L EDTA 1.6 μ L 或 75 $^{\circ}$ C 10 min 终止反应。

2 结果与分析

2.1 人工合成双价核酶片段的测定

用 2.5% 琼脂糖凝胶检测以寡核苷酸片段 F1 和 F2 互为引物合成的基因片段 (DR), 结果可见产物中有一条明显的 100 bp 左右条带, 与笔者设计双价核酶基因大小相符 (图 2)。



1. F1 (61 nt) 寡核苷酸片段; 2. 人工合成的核酶基因 (DR) 片段; 3. Marker (DL2000: 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp)。
1. F1 (61 nt) oligodeoxynucleotides; 2. Synthesized ribozyme gene (DR) fragment; 3. Marker (DL2000: 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp)。

图 2 核酶片段的电泳检测

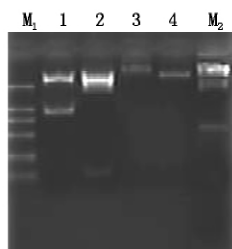
Fig. 2 Synthesized ribozyme fragment analyzed by agarose electrophoresis

2.2 核酶基因的克隆

将 100 bp 左右的条带的琼脂糖凝胶回收、纯化后, 用 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切该片段, 再用 T4 DNA 连接酶将其与线性化的 pGEM-4Z 载体连接, 构建获

得重组质粒 pGEM-4ZDR。

用重组质粒转化 *E. coli* JM109, 采用蓝/白斑和 Cracking 筛选重组子方法, 挑取白斑克隆菌培养过夜, 所提取的质粒经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切后, 凝胶电泳进一步鉴定阳性克隆。重组质粒双酶切产物在 2.5% 琼脂糖凝胶电泳中可见有核酶相应大小的片段(图 3 - 泳道 2)。



M1. Marker (DL2000: 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp); M2. Marker (λ -DNA/*Hind* III); 1. 重组质粒 pGEM-4ZR5/*Sac* I + *Hind* III; 2. 重组质粒 pGEM-4ZDR/*Sac* I + *Bam*H I; 3. 重组质粒 pGEM-4ZR5; 4. 重组质粒 pGEM-4ZDR。

M1. Marker (DL2000: 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp); M2. Marker (λ -DNA/*Hind* III); 1. Recombinant pGEM-4ZR5/*Sac* I + *Hind* III; 2. pGEM-4ZDR/*Sac* I + *Bam*H I; 3. pGEM-4ZR5; 4. pGEM-4ZDR。

图 3 重组质粒 pGEM-4ZR5/DR 酶切分析

Fig. 3 Restriction endonuclease analysis

进一步选择酶切阳性克隆提取质粒 DNA 进行序列分析。以 T7 和 SP6 引物双向测序结果表明, 在质粒 pGEM-4ZDR 中确实含有长度为 103 bp 的核酶序列如下:

1 GGATCCGACA TCCCCCTGAT GAGTC-
CGTGA GGACGAAACG CCGCTACAAG CG-
CACCACCA

61 ATGCTGATGA GTCCGTGAGG ACGAAA-
CAAA ATGGTCCGAG CTC

1	GAGCTCGGTA	CCCATGGGAT	TACGGTCTGG	AGAGAGAGGC	TGCAACAAAT	GCGCCCGCAG
61	AGAAAAGTGC	TCAAACAAAC	TCAGCAGAGA	AGACTGCTCC	GCCAACTTCA	GCAGAGAAAA
121	CTGCTCCAAC	AAACAAGCCT	TTAAATGGGC	AAGCGGCACC	GTCCGCCAAA	ACAAACGGCA
181	ACTCCGACAT	CCCCGACGCC	GCTACAAGCG	CACCACCAAT	GGACAAAAATG	GTGCAACAGA
241	TCATCACAGC	TATGGTGGGG	AGAATCAATC	TCTCGGAGAT	AGAGGAGAAG	ATAGTGAGCA
301	GGGTGTCTCA	GAAAGCCCTG	CAGAAGCCCA	AACAAAAGAA	GCGCGGAAGG	CGTGGAGGGA
361	AGAACAAGCC	AAACAGTTCA	CCTCCTACTT	CAACGCAATC	TACAAGTGGG	GCGCCCAAGA
421	AGGAGGCTGC	CCCCAGGCT	TCAGGAAGTG	CGGGCACATC	CCGCGCTACT	ACCACCCCGG
481	CACCAGAGGC	GAAACCCAGT	GGGGGCAAAA	ACTCTGCCAA	GTTCATCCCG	AGCTGGCGGA
541	GAAAACAGCA	GGATTGGGCT	GGCCAAAAGC	CGGATCTGAA	GCTGAACTCC	AAAGCCTGGA
601	TCTACAGGCT	GCCAGGTGGC	TCCAACGCGC	GGAGTCGGCC	ACTATCCCTG	GCGCAGAAGC
661	AAGAAAGCGC	GTGATTGAGA	AAACAGTGGA	GGCATACAGA	AATTGTGTAA	CTAACGCCCC
721	ACTGTGCTCC	CTAAATCCA	AACTGGATTG	GGCTGGCTTT	CAACAAGATA	TCCGTGAAGC
781	AGTCCAGTCC	CTTGAGCTAG	ACGCTGGTGT	AGGCATTCCC	TATATCGCGT	ATGGCCTCCC
841	CACACACCGA	GGATGGGTTG	AGGACCATAA	GCTT		

图 5 重组质粒 pGEM-4ZR5 插入的 PLRV 片段反义链序列

Fig. 5 The antisense sequence of PLRV replicase fragment inserted in pGEM-4ZR5

以 SP6 和 T7 启动子引物进行双向测序的结果表明, 重组质粒 pGEM-4ZR5 的多克隆位点 *Sac* I 和

其中内切酶识别序列用底线标出, 与原设计相符。这些结果证明, 插入的双价核酶基因被连接于 T7 启动子下游, 经内切酶处理线性化后可作为模板进行体外转录。

2.3 PLRV-Ch 复制酶基因片段反义链 RNA 体外转录表达载体 pGEM-4ZR5 的构建

为获得核酶切割的靶序列, 用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Sac* I 对质粒 pPLR5 进行酶切, 凝胶电泳回收纯化得到 PLRV 复制酶基因的小片段(约 0.8 kb), 与载体 pGEM-4Z 连接, 转化, 筛选转化子, 重组质粒用 *Sac*I 和 *Hind* III 进行酶切鉴定(图 3 - 泳道 1), 可见 1 条约 0.8 kb 的片段, 与预期结果相符, 由此获得重组质粒 pGEM-4ZR5。亚克隆构建策略见图 4。

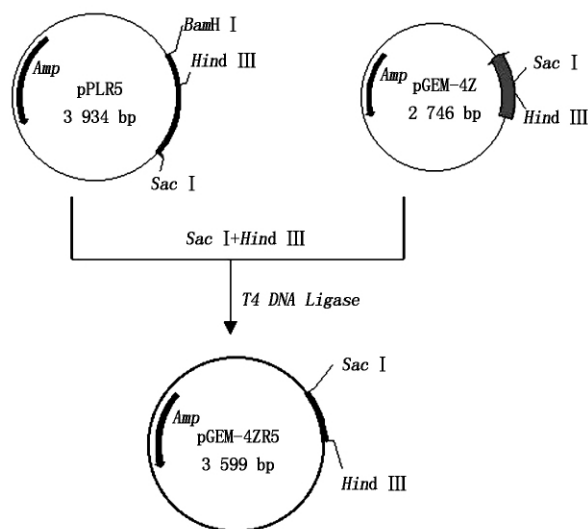


图 4 重组质粒 pGEM-4ZR5 的构建

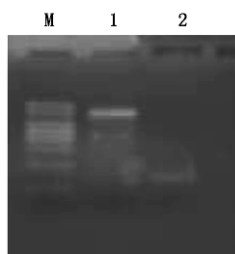
Fig. 4 Construction of recombinant pGEM-4ZR5

Hind III (图 5, 划底线序列) 之间反向插入了一段 PLRV 复制酶基因片段, 长度为 874 个核苷酸(图 5)。

在载体中 T7 启动子驱动下可能转录产生 PLRV 负链 RNA, 其中含有与 DR 双价核酶识别区互补的序列及相应的核酶切割位点(GAC), 可用作测定核酶体外切割活性的靶序列模板。

2.4 核酶及底物 RNA 的体外转录

质粒 pGEM-4ZDR 和 pGEM-4ZR5 经 *EcoR* I 完全线性化后, 在 T7 RNA 聚合酶的作用下进行体外转录。转录物经酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶解后用 3.5% 琼脂糖凝胶电泳 60 min, 电泳结果表明, 转录的核酶和底物 RNA 都显示相应的条带(图 6)。与预期 874 nt 或 103 nt 的底物或核酶 RNA 分子大小相符, 说明转录得到了底物和核酶 RNA。



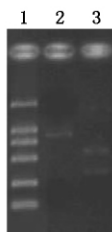
M. Marker DL1000(1 000 800 600 500 400 300 200 100 bp);
1. pGEM-4ZR5 体外转录产物; 2. pGEM-4ZDR 体外转录产物。
M. Marker DL1000(1 000 800 600 500 400 300 200 100 bp);
1. *In vitro* transcripts of pGEM-4ZR5;
2. *In vitro* transcripts of pGEM-4ZDR.

图 6 核酶及其作用底物的体外转录

Fig. 6 *in vitro* transcription of ribozyme and target RNA

2.5 核酶的体外切割活性测定

按照约为 5:1 的分子当量比加入核酶与底物 RNA, 反应完毕后, 产物再经乙醇沉淀, 3.5% 琼脂糖凝胶电泳。由图 2~8 所示电泳结果可见, 经与核酶共同保温后, 底物 RNA 由一个较大的分子产生出 2 个新的较小的 RNA 分子, 而未加核酶的底物在同样的条件下没有新带产生。用于体外切割的靶序列 RNA 转录物全长理论上应在 881 nt(包括来源于载体的 24 个核苷酸)。图 7 的结果显示, 2 个新的 RNA 分子的大小分别大约在 250 nt 和 600 nt 左右, 说明所设计的核酶能成功切割其靶序列。



1. Marker (DL2000: 2 000 1 000 750 500 250 100 bp); 2. pGEM-4ZR5 转录产物未加核酶; 3. pGEM-4ZR5 转录产物加核酶。
1. Marker(DL2000: 2 000 1 000 750 500 1250 100 bp); 2. Transcripts of pGEM-4ZR5 no treated by ribozyme; 3. Transcripts of pGEM-4ZR5 treated by ribozyme.

图 7 核酶对 PLRV-Ch 复制酶基因负链的切割

Fig. 7 Cleavage of negative strand RNA of PLRV-Ch replicase gene

另外, 从图 7 还可以看到, 经与核酶保温后, 全长的底物条带基本消失, 表明所设计的特异切割 PLRV-Ch 复制酶基因负链的核酶体外切割活性较高。

图 8 所示结果为底物 RNA 经保温切割和变性电泳后的 Northern 杂交的结果, 所使用的探针为与亚克隆 pGEM-4ZR5 相同的 PLRV 复制酶基因 874 bp cDNA 片段。由此证明, 在加有核酶的底物中, 新形成的 2 个片段确实来源于 PLRV 复制酶基因负链的底物 RNA, 大小也与切割位点所生成的片段相符。根据信号强度可以看出, 底物被切割的非常彻底, 且没有出现其他的产物带, 进一步说明核酶在体外具有较高的特异切割活性。



1. pGEM-4ZR5 转录产物加核酶; 2. pGEM-4ZR5 转录产物未加核酶。
1. Transcripts of pGEM-4ZR5 treated by ribozyme; 2. Transcripts of pGEM-4ZR5 no treated by ribozyme.

图 8 Northern 检测核酶对 PLRV-Ch 复制酶基因负链 RNA 的切割

Fig. 8 Cleavage of negative strand RNA of PLRV-Ch replicase gene analyzed by Northern Blot

3 讨论

对于锤头核酶来说, 要有正常的切割活性, 除必须保证核酶的识别序列(如靶 RNA 的 GUC 位点)、锤头结构的保守区以及核酶与切割位点两侧的互补序列三要素外, 靶序列中切割点的选择也是十分重要的因素。本研究针对 PLRV 中国分离株(PLRV-Ch)复制酶基因序列, 选择病毒 RNA ORF2 近 5'端对应负链(3'-5')第 179~181 和 206~208 核苷酸处的 2 个 GUC 位点作为靶位点, 设计了一个双价锤头结构的核酶。目的是试图使核酶同时对应 2 个切割位点, 可能在 2 个位点同时切割, 或在其中任意一个位点单独切开, 以增强核酶的选择范围和切割几率。选择位点靠近 ORF2 的 5'端, 以使病毒在起始转录复制酶基因时即被阻断。

在针对 PLRV-Ch 复制酶基因负链设计双价核酶时, 考虑到靶位点附近序列在 PLRV 各株系中应该具有高度保守性。比较了 4 个国外报道的 PLRV 分离株(PLRV-S^[9], PLRV-N^[10], PLRV-C, PLRV-A^[11])结果表明, 它们与 PLRV-Ch 在这一区域具有很高的同源性, 因此, 可减少由于基因突变而使病毒 RNA 逃避被核酶识别的可能性。

Lamb 等^[6]利用核酶在体外剪切 PLRV CP 基因和复制酶基因时,从 PLRV CP 基因的一百多个“GUC”中,选择了 2 个代表性的位点做剪切目标。第一个位点位于复制酶基因区的 3 968 nt(Mayo 分离株)^[9];第二个位点位于高度保守的 CP 基因的 3 968 nt。在黄症病毒科其他成员的基因组之间,这些区域具有较高的同源性,据此设计的核酶,不仅能在体外准确切开两个克隆的靶序列,而且也能将 PLRV 总 RNA 在 CP 基因区切开。同样,在针对 PLRV-Ch CP 基因设计核酶时,在 PLRV-Ch CP 基因(全长 627 个核苷酸)9 个“GUC”中,选择了从 5' 端起第 6 个“GUC”位点,获得了较好的切割结果^[12]。

针对病毒设计核酶时,选择敏感的靶位点也是十分重要的,一方面病毒核酸的二级结构经常会掩盖选定的剪切位点,使核酶不能识别;另一方面有些核酸序列具有天然的结合蛋白,使某些位点处于封闭状态。本试验在设计核酶的 2 个切割靶序列位点时,首先对切割靶位点附近序列位及周围区域 RNA 的二级结构进行了分析,所选择的区域应较利于核酶的结合。

本试验所设计的针对 PLRV-Ch 复制酶基因负链的双价核酶是一个由 2 个相距较近的锤头组成的分子,针对同一底物分子上相邻 24 nt 的 2 个 GUC 切点。即相当于同时切割 2 个 GUC 位点的双价核酶。从体外切割试验结果分析,由于底物的 2 个靶位点相距很近,电泳及杂交结果都无法区分究竟是 2 个位点同时发生了切割,还是仅有其中的某一个位点单独发生了切割,以及具体是哪一个位点发生了作用。但是从切割效果来看,合成所得双价核酶的活性及特异性还是非常高的,可能与其切割模板的机会较多有关。

研究切割 PSTVd 负链 RNA 不同区域位点的多价锤头型核酶基因,为了增加切割机会,采用了人工构建的含有 2 个靶区域的 762 nt 双体底物,其中用双价核酶切割底物出现 3 个片段。而在试验中设计的双价核酶体,在体外切割单一靶区域的 PLRV 复制酶负链底物时同样取得了较好的结果^[13]。

而在设计切割 PLRV-Ch 复制酶基因负链单点核酶时,核酶的识别区 5' 端配对长度为 10 个核苷酸,3' 端为 12 个核苷酸,结果得到较高的剪切活性^[14]。

本试验针对 PLRV 复制酶基因对应负链靶序列的 179 ~ 180 和 206 ~ 208 处的 2 个 GUC 位点 2 个锤头结构,两端互补区为 10 nt。在 37℃ 体外切割试验表明,切割活性很高,说明 24 nt 中间互补区的长

度没有影响核酶的切割活性。周颖等^[15]利用核酶体外切割 30 min 降解基本完成。但是,在表达核酶的转基因马铃薯植株中,最佳的核酶识别区的配对长度尚须经过实验而定,这也是本研究后续工作要解决的问题。

核酶对靶 RNA 的体外切割活性常被用来预测其是否能够起到抗病毒的作用。Bertrand 等^[16]曾报道,长度为 950 bp 长度的底物较 60 bp 的底物慢 3 ~ 15 倍,核酶对不同长度底物的切割活性出现明显差异是由于长底物在体外极易形成二级结构,使核酶不易与底物结合,因而切割活性明显下降,所以一般做体外切割反应时应使用长度较短的底物。本研究所采用的底物总长度近 881 nt(包括来自于载体质粒的 24 个碱基),经双价核酶进行切割后,杂交信号显示切割效率很高,可能是由于我们设计的核酶所切割底物的位点较易暴露的原因。然而,有试验报道^[17]在使用核酶对耐药性基因 *mdr1* mRNA 进行体外切割时,切割位点位于总长度为 1 430 nt 的 *mdr1* 基因体外转录物的中间部位,理论上极易被二级结构遮盖,但结果显示,该底物也能够被完全切割成 2 个片段,切割效率在 90% 以上。同样条件下,另外一个位点针对 *mdr1* mRNA 核酶,对上述 2 个底物进行切割,结果该核酶对 2 底物切割效率均极低^[18],可见,位点的选择对核酶活性非常重要。

参考文献:

- [1] Haseloff J, Gerlach W L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities [J]. *Nature* 1988, 334: 585 - 591.
- [2] Giordano V, Jin D Y, Rekosh D *et al.* Intravirion targeting of a functional anti-human immunodeficiency virus ribozyme directed to pol [J]. *Virology* 2000, 267: 174 - 184.
- [3] Welch P J, Tritz R, Yei S. *et al.* Intracellular application of hairpin ribozyme genes against hepatitis B virus [J]. *Gene Ther* 1997, 4: 736 - 743.
- [4] Yang X, Yie Y, Zhu F *et al.* Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 4861 - 4865.
- [5] 毛建平, 袁国刚, 王全会. 大肠杆菌 16 S rRNA 的核酶设计和初步应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28 (11): 48 - 52.
- [6] Lamb J W, Hay R T. Ribozymes that cleave potato leafroll virus RNA within the coat protein and polymerase gene [J]. *J Gen Virol* 1990, 71: 2257 - 2264.
- [7] 张鹤龄, 梁成罡, 张 彤 等. 马铃薯卷叶病毒中国株 (PLRV-Ch) 复制酶基因结构研究 [J]. *中国病毒学*,

- 2000(15) : 255 – 263.
- [8] 梁成罡, 张 彤, 哈斯阿古拉, 等. 马铃薯卷叶病毒复制酶基因 5'端克隆及序列分析[J]. 病毒学报, 1998 (14) : 377 – 382
- [9] Mayo M A, Robinson D J, Jolly C A. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA [J]. Journal of General Virology, 1989, 70: 1037 – 1051.
- [10] Van der Wilk F, Huisman M J, Cornelisen B J *et al.* Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA [J]. FEBS Lett, 1989, 245: 51 – 56.
- [11] Keese P, Martin R R, Kawchuk L M. Nucleotide sequence of an Australian and a Canada isolate of potato leafroll virus and their relationships with two European isolates [J]. Journal of General Virology, 1990, 71: 719 – 724.
- [12] 郭旭东, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 应用核酶体外切割马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因的研究 [J]. 中国病毒学, 1999, 12(2) : 149 – 154.
- [13] 邓文生, 杨希才, 康良仪, 等. 特异切割马铃薯纺锤形块茎类病毒负链的多价核酶的构建和体外活性测定 [J]. 病毒学报, 2000, 16(4) : 370 – 373.
- [14] 杨静华, 哈斯阿古拉, 梁成罡, 等. 特异切割马铃薯卷叶病毒复制酶基因负链的核酶研究 [J]. 病毒学报, 1998, 14(2) : 158 – 164.
- [15] 周 颖, 方 静, 毛建平, 等. pRNA 导入型 Ribozyme 的设计和体外转录制备 [J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(6) : 99 – 105.
- [16] Brand E, Pictet R, Grange T *et al.* Can hammerhead ribozyme by efficient tools to inactivate gene function [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 293.
- [17] 何 斌, 杨唐俊, 金欢胜, 等. 锤头状核酶对不同长度 mdrl mRNA 的体外切割 [J]. 第三军医大学学报, 1999, 21: 465 – 468.
- [18] Holm P S, Dietel M, Krupp G. Similar cleavage efficiencies of an oligoribonucleotide substrate and a mdrl mRNA segment by a hammerhead ribozyme [J]. Gene, 1995, 167: 221 – 225.