

特异切割苹果锈果类病毒的核酶基因的克隆 和转录物的体外活性测定

周 丽 孙洁霖 杨希才*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 根据锤头型核酶的作用模式,设计、合成和克隆了特异切割苹果锈果类病毒 ASSVd 正链(194-196 位点)或负链(89-91 位点)RNA 的 2 个短臂锤头型核酶基因:42nt 的 Rz ASSVd(+)和 40nt 的 Rz ASSVd(-)。经转录获得核酶转录物和³²P 标记的 ASSVd 正、负链转录物。将核酶与 ASSVd 混合,50℃ 或 37℃ 保温 3-4h,进行 8% PAGE(含 8mol/L 尿素)和放射自显影分析。体外切割检测表明:2 个核酶均具有特异切割活性,其中 RzASSVd(-)对 ASSVd 负链的切割活性较高,对 ASSVd 正链不起作用。RzASSVd(+)对 ASSVd 正链的切割活性较弱,对 ASSVd 负链亦不起作用。在此基础上,构建得到双价核酶基因 pGEMRzASSVd(±)。

关键词 苹果锈果类病毒,锤头型核酶,转录,体外切割活性

中图分类号 Q783 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0025-05

类病毒(Viroid)是一种最小的具有传染性的致病病原,它是由 247~375 核苷酸组成的单链、共价闭合的环状 RNA,能引起许多经济作物产生严重病害^[1]。苹果锈果类病毒(Apple scar skid viroid, ASSVd)^[2,3]的侵染寄主是苹果和梨。感病的苹果因品种和环境条件的变化表现出 5 种显性病征:锈果型、花脸型、锈果-花脸型、环斑型和绿点型^[4],感病的梨大多数表现为隐性,少数为畸形果。由于类病毒在寄主植物细胞核中复制和累积,在感病寄主的叶、茎、皮、砧木,以及果实的表皮、果肉和种子中均可检测出类病毒^[5,6]。因此,感染类病毒的果树终生带毒,并通过嫁接和修剪工具传染的途径使类病毒蔓延。许多国家的苹果树和梨树中均发现 ASSVd 的危害,我国东北、西北、华北,以及江苏、安徽、山西和山东等地亦有发生。在果树抗病育种和生产中类病毒病是很难控制的病害之一。核酶是 80 年代初发现的具有生物催化活性的小分子 RNA,具有酶的作用,能特异性切割靶子 RNA。迄今发现了 7 类不同结构类型的具有催化活性的 RNA:RNaseP、Group I intron、Group II intron、发夹型核酶、斧头型核酶(HDV)、Neurospora Varkud 卫星 RNA 核酶和锤头型核酶^[7]。其中,Haseloff 和 Gerlach^[8]报道的锤头型核酶的结构模式是研究较为广泛的一类核酶。本

文报道以 ASSVd 为靶子 RNA,构建特异切割 ASSVd 正链和负链 RNA 的锤头型核酶,通过基因克隆、序列分析和转录,分析转录物对模板的体外切割活性。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种、质粒和试剂

质粒 pGEM7ZI(+),受体菌 *E. coli* DH5 α 、苹果锈果类病毒(ASSVd)cDNA 克隆 pGEM3Z-ASSVd 由本实验室提供;Taq plus II 购自上海生工生物公司,限制酶、T4DNA 连接酶购自华美生物工程公司。T7DNA 聚合酶序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司,SP6/T7 Transcription Kit 购自 Boehringer 公司,Xgal、IPTG 和丙烯酰胺等均为国产试剂。

1.2 核酶和寡核苷酸引物的设计与合成

根据 Haseloff 和 Gerlach^[8]报道的锤头型核酶的结构模式,选择病原物苹果锈果类病毒(ASSVd)正、负链 RNA 中的 GUC 碱基作为切割位点,以 GUC 两端的 8~10 个碱基为核酶的互补序列,设计 2 个锤头型核酶的单链 DNA 序列及其引物。分别是:RzASSVd(-)为 5'AGT CGA GCG CTG ATG AGT CCC TGA GGA CGA AAC TCC GGG T3'。引物 P1:5'GCT CTA GAG TCG AGC3',P2:5'GGG TAC CCA CCC GGA G3'。P1, P2 分别含 *Xba*I 和 *Kpn*I 限制酶位点。

收稿日期:2001-07-23,修回日期:2001-10-26。

基金项目:国家自然科学基金项目资助(No.39870465)。

* 通讯作者: Tel:86-10-62554398; Fax:86-10-62560912; E-mail:yangxc@sun.im.ac.cn

RzASSVd(+)为5'CGC AGC GGC GCT GAT GAG TCC GTG AGG ACG AAA CAG GGC CTC3'。引物 P3:5'GGG TAC CGC AGC GGC3',P4:5'GGA GCT CGA GGC CCT GT3'。P3,P4 分别含有 *KpnI* 和 *SacI* 限制酶位点。核酶的单链 DNA 和引物 P1-P4 由中科院微生物所生物技术中心用 Beckman oligo 1000m/1000 合成仪合成。

1.3 PCR 扩增核酶基因及其克隆

以合成的 RzASSVd(-)和 RzASSVd(+)单链 DNA 为模板,分别用引物 P1-P2;P3-P4 和 Taq plus II 做 PCR 扩增。反应条件:94℃ 3min;94℃ 30s,34℃ 30s,72℃ 30s,5 个循环;94℃ 30s,50℃ 40s,72℃ 40s,35 个循环;72℃ 10min。获得的 PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和纯化。参照分子克隆方法^[9],将 Rz ASSVd(-)、Rz ASSVd(+)PCR 产物分别用 *XbaI/KpnI*,*KpnI/SacI* 双酶切,分别克隆到转录载体 pGEM7Zf(+)中,转化感受态 *E. coli* DH5 α ,通过菌落筛选和限制酶酶切鉴定,得到重组质粒 pGEM-Rz ASSVd(-)、pGEM-Rz ASSVd(+)。

1.4 重组质粒序列测定

以质粒 pGEM7Z 的 T7 启动子序列为引物,采用双脱氧链终止法,按照 T7DNA 聚合酶序列分析试剂盒操作步骤分别测定重组质粒 pGEM-RzASSVd(-)和 pGEM-RzASSVd(+)DNA 序列。

1.5 双价核酶的构建

重组质粒 pGEM-RzASSVd(+)用 *KpnI/SacI* 双酶切,6% PAGE 回收 RzASSVd(+)片段。定向插入到同样酶解的重组质粒 pGEM-RzASSVd(-)中。

1.6 核酶和靶子 ASSVd 的体外转录

含有核酶基因的重组质粒 pGEM-Rz ASSVd(-)和 pGEM-Rz ASSVd(+)分别用内切酶 *SacI* 处理,2 个含有 ASSVd 全长 cDNA 正反序列方向克隆的 pGEM3Z-ASSVd 分别用 *SacI* 处理。线性化的载体经 1% agarose 电泳检测后回收纯化,作为转录模板。转录反应按照 SP6/T7 Transcription Kit 的操作步骤进行。其中,在 T7 RNA 聚合酶的作用下,掺入 α -³²P-UTP 的核酶转录物用于鉴定其转录的质量,未掺入同位素的核酶转录物用于测定对靶子 ASSVd 的切割活性。线性化的 pGEM3Z-ASSVd 在 T7 RNA 聚合酶的作用下,分别获得³²P 标记的 ASSVd 负链或正链的全长 RNA 转录物。转录样品液用等体积酚/氯仿(1:1)抽提,加入终浓度 0.5mol/L NaAc 和 3 倍体积冷乙醇,-20℃放置过夜,12 000r/min 离心 20min,沉淀物用 85% 乙醇洗涤 1 次,悬浮在适量的无 RNase

的无菌水中。

1.7 核酶体外活性测定

参考叶寅等^[10]和邓文生等^[11]叙述的方法。适量的未标记的 RzASSVd(+)和 RzASSVd(-)转录物分别与底物 α -³²P 标记的 ASSVd 正链和负链转录物在 50 μ L 反应体系(含 50mmol/L Tris-Cl pH8.0,20mmol/L MgCl₂)中混和,在 50℃ 或 37℃ 保温 3~4h 后,加入终止缓冲液(98% 甲酰胺,10mmol/L EDTA,0.2% 溴酚蓝),65℃ 变性 5min,在 8% 聚丙烯酰胺凝胶(含 8mol/L 尿素)中电泳,并进行放射自显影。

2 结 果

2.1 核酶基因的设计、克隆和鉴定

病原物 ASSVd 基因含 330nt 核苷酸,ASSVd 中国分离物^[2]与 ASSVd 日本分离物^[3]仅有 3 个核苷酸的差异,其序列同源性为 99%。分析 ASSVd 核苷酸序列,其中,ASSVd 正链 RNA 含有 5 个 GUC 区域位点(81-83,84-86,87-89,194-196 和 231-233),ASSVd 负链 RNA 含有 4 个 GUC 区域列位点(46-48,89-91,198-200 和 238-240)。我们选择 ASSVd 正链 194-196 和负链 89-91 的 GUC 作为靶子切割点,分别以切割点两边的 8~10 个核苷酸作为核酶左、右臂的互补序列,中间插入锤头型核酶的中心保守序列,设计出 2 个锤头型核酶(图 1)及其引物的 DNA 序列。通过 PCR 扩增,获得核酶基因的双链 DNA 片段。经限制酶酶切,分别插入到原核转录载体 pGEM7Zf(+)中。获得的重组质粒定名为 pGEM RzASSVd(+)和 pGEM Rz ASSVd(-)。序列测定表明:克隆的核酶基因序列与所设计的核酶序列完全一致。通过定向亚克隆技术获得双价核酶的重组质粒定名为 pGEM Rz ASSVd(\pm)。图 2 是核酶的构建图谱。2 个单价核酶的 PCR 产物分别为 55bp 和 51bp,酶切产物为 51bp 和 45bp。双价核酶的酶切片段为 96bp。图 3 是含有单价核酶和双价核酶的重组质粒的酶切分析。

2.2 靶子 ASSVd 基因和核酶基因的体外转录

pGEM3Z-ASSVd 是由 ASSVd 的 RT-PCR 产物的 5'、3'两端连接 *EcoRI* adaptor 后克隆到原核转录载体 pGEM3Z 中,获得 2 个序列方向相反的重组质粒。因此,将这 2 个重组质粒分别用 *SacI* 酶切线性化,在 T7RNA 聚合酶作用下,掺入适量的 α -³²P-UTP,分别转录出 373nt 的³²P 标记的 ASSVd 正链和负链 RNA(附含 43nt 质粒序列核苷酸,图 4-1,2)。pGEM-Rz ASSVd(+)和 pGEMRz ASSVd(-)分别用 *SacI* 和

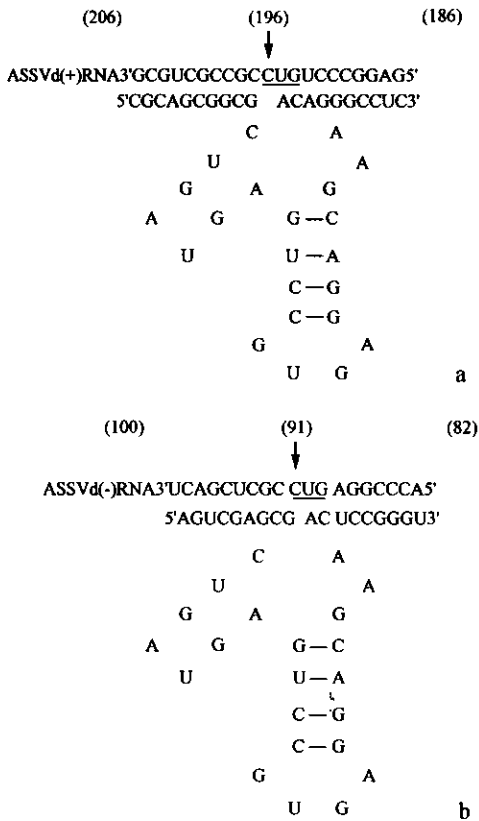


图1 核酶与 ASSVd 靶序列结合的二级结构
Fig.1 Secondary structure of hammerhead ribozyme and ASSVd target sequence
a. RzASSVd(+) ; b. RzASSVd(-)

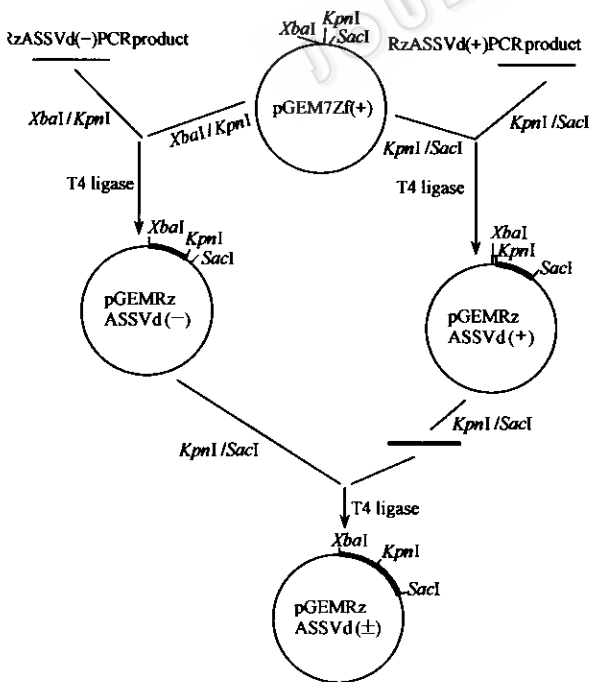


图2 核酶基因的构建

Fig.2 Construction of recombinant pGEMRz ASSVd(+), pGEMRz ASSVd(-) and pGEMRz ASSVd(±)

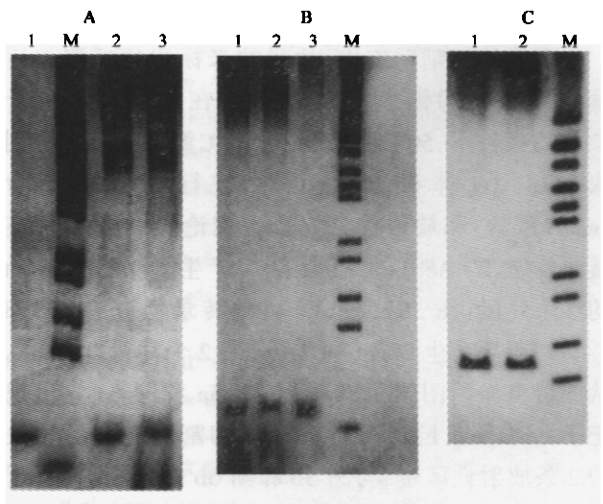


图3 单、双价核酶重组子的酶切鉴定

Fig.3 Detection of recombinant pGEMRz ASSVd(+), pGEMRzASSVd(-) and pGEMRz ASSVd(±) digested by restriction endonuclease in PAGE

A. 1. PCR product; 2, 3. pGEMRz ASSVd(+)/KpnI + SacI;
B. 1, 2. pGEMRz ASSVd(-)/XbaI + KpnI; 3. PCR product;
C. 1, 2. pGEMRz ASSVd(±)/XbaI + SacI; M. pGEM7Zf(+)/Hae III marker

HindIII酶切线性化,在T7 RNA聚合酶作用下,亦能转录出95nt的Rz ASSVd(+)和90nt的Rz ASSVd(-),这2个转录物分别附含53nt和50nt的质粒序列核苷酸(图4-3,4)。图4是³²P标记的ASSVd正、负链转录物和2个核酶转录物在8%PAGE(含8mol/L尿素)中放射自显影的RNA质量检测。

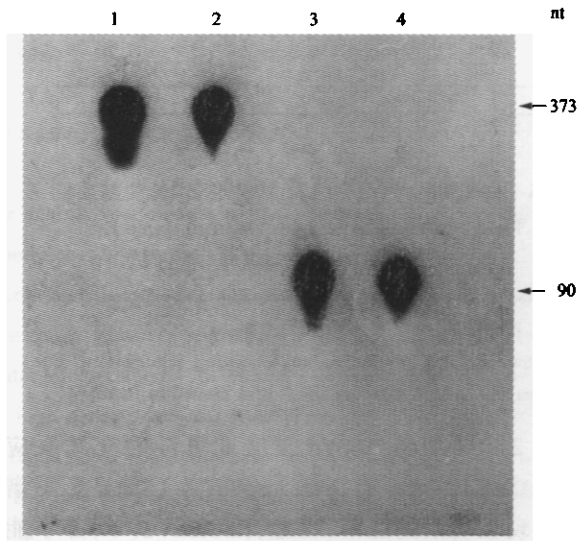


图4 ³²P标记的核酶与ASSVd转录物的质量分析

Fig.4 ³²P labeled transcript products of hammerhead ribozyme and ASSVd

1. ASSVd negative strand RNA; 2. ASSVd positive strand RNA;
3. Rz ASSVd(+); 4. RzASSVd(-)

2.3 核酶体外切割活性测定

在体外切割反应中,适量的未标记的核酶与适量的³²P标记的靶子 ASSVd 混合,在含有 Mg²⁺ 离子参与的条件,50℃温浴 3h 或 37℃温浴 4h 后,分别取 1/3 ~ 1/2 体积的反应样品进行 8% PAGE(含 8mol/L 尿素)和放射性自显影。理论上 ASSVd 正链转录物被 Rz ASSVd(+)切割后产生 119nt 和 254nt 的 2 个片段(图 5b);ASSVd 负链转录物被 RzASSVd(-)切割后产生 163nt 和 210nt 的 2 个片段(图 6b)。从放射自显影图谱可以看出,图 5a 和图 6a 均出现靶子 ASSVd 正链或负链被核酶切割后产生的相关的 2 条放射性区带,与图 5b 和图 6b 的理论值相似,靶子 ASSVd 区带的放射性强度降低或消失。重复的体外切割活性测定表明:Rz ASSVd(-)对靶子 ASSVd 负链转录物作用后的切割产物显示了清晰的放射性区带,而 RzASSVd(+)对靶子 ASSVd 正链转录物作用后的切割产物的放射性区带较弱。不同温度处理获得的结果基本相似。

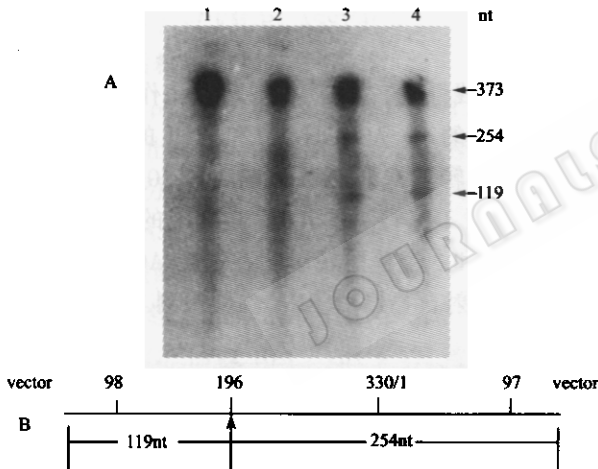


图 5 核酶 Rz ASSVd(+)对 ASSVd(+)的切割反应

Fig.5 Cleavage reaction between ribozyme Rz ASSVd(+) and ASSVd positive strand RNA

A. Autoradiogram of 8% polyacrylamide denature gel electrophoresis (8mol/L Urea) after cleavage reaction.

1. Substrate; 2. Substrate + buffer; 3, 4. Ribozyme + substrate;

B. Product size of ASSVd positive strand RNA cleaved by RzASSVd(+)

在 2 个核酶与 ASSVd 正链或负链的交叉反应中,Rz ASSVd(-)不能切割 ASSVd(+),自显影图谱中未出现被切割的区带;反之,Rz ASSVd(+)亦不能切割 ASSVd(-),这说明核酶具有对底物 ASSVd 的特异性切割活性。

3 讨 论

具有自我催化切割的锤头型核酶是在类病毒

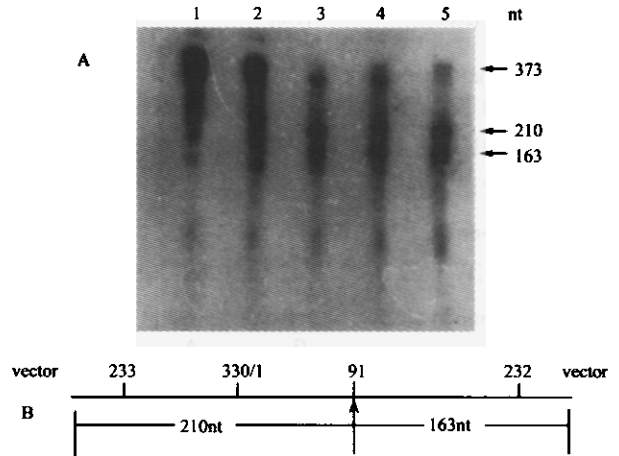


图 6 核酶 RzASSVd(-)对 ASSVd(-)的切割反应

Fig.6 Cleavage reaction between ribozyme RzASSVd(-) and ASSVd negative strand RNA

A. Autoradiogram of 8% polyacrylamide denature gel electrophoresis (8mol/L Urea) after cleavage reaction. 1. Substrate; 2. Substrate + cleavage reaction buffer; 3 ~ 5. Ribozyme + Substrate;

B. Product size of ASSVd positive strand RNA cleaved by RzASSVd(-)

(ASBVd)、2 种线状的卫星 RNA (sBYDV、sTRSV), 4 种环状的卫星 RNA (称之为拟病毒, vLTSV、vSNMV、vSCMoV、vVTMoV) 和 蝶 蛭 卫 星 II DNA 的 RNA 转录物中发现的。它是最小的一类核酶,由 3 个螺旋和其包围的 15 个保守核苷酸的中心环组成。3 个螺旋 (Stem I、II、III) 的碱基可变性较大,中心环的保守碱基不能形成 Watson-Crick 配对,而是形成更复杂的结构来介导 RNA 折叠和催化。自我切割反应不可逆,其切割位点均为 GUC ↓^[12]。锤头型核酶对靶子 RNA 的切割三联体可为 NUH (N 代表任意碱基, H 代表 A、U、C)。Shimayama^[13] 等对各种 NUH 的 *K_m*、*K_{cat}* 深入研究,发现最佳的切割位点及切割效率最高的切割三联体为 GUC。Lieber 和 Strauss^[14] 分析底物与核酶结合的两臂 (Stem I、III) 的碱基链组成的长度。臂太长,核酶在切割后与底物离解的速度慢,臂太短则底物与核酶结合的特异性和稳定性都差。研究表明 7、8 个碱基能达到最佳切割效果。病原物 ASSVd 的正、负链 RNA 分别含有 4 ~ 5 个 GUC 三联体碱基。选择用哪一个 GUC 作为切割位点,考虑到已克隆的 ASSVd 全长 cDNA 基因序列的排列为: C₉₈-C₃₃₀-G₁-G₉₇。为了使其转录物作为好的靶子 RNA,本文设计核酶序列选择了 ASSVd 正链 194 - 196 和负链 89 - 91 的 GUC 作为切割点, (分别位于 ASSVd 二级结构序列的 T_R 和中央保守区), 并以 GUC 两边 8 ~ 10 个核苷酸作为核酶左、右臂的互补序列。

综合上述因素,我们构建了针对 ASSVd 正链和负链为靶子 RNA 的 2 个短臂锤头型核酶基因。通过体外活性测定,表明它们都具有切割 ASSVd 正、负链特定位点的酶活性。这 2 个核酶串联为双价核酶(见图 2),由于它能切割 ASSVd 正链和负链的靶位点,将使 ASSVd 滚环复制受到抑制。拟将单价和双价核酶分别构建到植物表达载体中,通过农杆菌介导技术转化苹果或梨,进一步检验核酶在转基因苗体内的表达和对 ASSVd 感染的抗性。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Diener T O. Potato spindle tuber "Virus": a replicating low molecular weight RNA. *Virology*, 1971, **45**(1): 411 ~ 428
- [2] Yang X C, Hadidi A, Hammond RW. Nucleotide sequence of apple scar skin viroid reverse transcribed in host extracts and amplified by the polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae*, 1992, **309**: 305 ~ 309
- [3] Junji Hashimoto, Hiroki Koganezawa. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. *Nucleic Acids Research*, 1987, **15**(17): 7045 ~ 7052
- [4] LU P K(吕佩珂), PANG Z(庞震), LIU W Z(刘文珍) *et al.* Self-coloured pictures of fruit trees suffered from plant diseases and insect pests in China(中国果树病虫原色图谱), Beijing: HUAXIA Publication Press(华夏出版社), 1993, pp. 36 ~ 37
- [5] Hadidi A, Yang X C. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J Virol Methods*, 1990, **30**: 261 ~ 270
- [6] Hadidi A, Hansen A J, Parish C J *et al.* Scar skin and dapple apple viroids are seed-borne and persistent in infected apple trees. *Res Virol*, 1991, **142**: 289 ~ 296
- [7] Doherty E A, Doudna J A. Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 597 ~ 615
- [8] Haseloff J, Gerlach M L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activity. *Nature*, 1988, **334**: 585 ~ 591
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [10] YE Y(叶寅), LIU Y Z(刘怡之), ZHAO F(赵丰) *et al.* Detection *in vitro* of Ribozyme gene targeting against potato spindle tuber viroid. *Science in China (series B)*(中国科学(B辑)), 1992, **5**: 491 ~ 496
- [11] DENG W S(邓文生), YANG X C(杨希才), KANG L Y(康良仪) *et al.* Gene Construction and Activity Detection of the Ribozyme Multi-targeting against Negative Strand of Potato Spindle Tuber Viroid *in vitro*. *Chinese Journal of virology*(病毒学报), 2000, **16**(4): 370 ~ 373
- [12] Symons R H. Small catalytic RNAs. *Annu Rev Biochem*, 1992, **61**: 641 ~ 671
- [13] Shimayama T, Nishikawa S, Taira K. Generality of the NUX rule-kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes. *Bio Chemistry*, 1995, **34**: 3649 ~ 3654
- [14] Lieber A, Strauss M. Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library. *Mol Cell Biol*, 1995, **15**: 540 ~ 551

The Construction of the Hammerhead Ribozyme Genes Targeting Against Apple Scar Skid Viroid and Its Activity Detection *in vitro*

ZHOU Li SUN Jie-Lin YANG Xi-Cai*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The genes of short armed hammerhead ribozyme targeting against two sites on positive strand (194 - 196) and negative strand (89 - 91) of ASSVd were designed, synthesized and cloned according to the action manner of hammerhead ribozyme. The full lengths of the genes are 42bp (RzASSVd(+)) and 40bp (RzASSVd(-)). After transcription *in vitro*, the ASSVd positive and negative RNA labeled with ³²P were mixed with the ribozyme transcript and incubated 3 ~ 4 h at 50°C or 37°C. The results were assayed on 8% PAGE (containing 8mol/L urea) and autoradiogrammed. As predicted, the transcript of the active RzASSVd(-) could cleave the ASSVd negative strand RNA with a high activity but had no cleavage effect on the ASSVd positive strand. The transcript of the RzASSVd(+) gene could cleave the ASSVd positive strand but its cleavage activity was very low. As the same, it cannot cleave the negative strand either. On the base of the result, we construct dimmer ribozyme gene pGEMRzASSVd(±) containing both RzASSVd(+) and RzASSVd(-).

Key words apple scar skid viroid, hammerhead ribozyme, transcription, cleavage activity *in vitro*

Received: 07-23-2001

This work was supported by grant from National Natural Science Foundation of China (No. 39870465).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62554398; Fax: 86-10-62560912; E-mail: yangxc@sun.im.ac.cn