

双价核酶对烟草花叶病毒的两个靶序列的专一切割作用

李洁 金海翎 张庆琪 宋任涛 许政晔*

(中国科学院上海植物生理研究所植物分子遗传国家重点实验室 上海 200032)

摘要 报道了两个最简单的多价核酶即双价核酶 RZ34 和 RZ13 的构建和体外作用情况。实验结果表明,这两个双价核酶能分别对两个不同的 TMV 底物或其混合物施行专一切割。双价核酶对单个底物的作用效率与其相应的单价核酶相似。还就双价核酶内的单元核酶的相对位置对其专一性和作用效率的影响进行了探索。

关键词 双价核酶,多价核酶,单元核酶,专一切割效率

锤头型核酶含有一个保守茎环结构,两端有两个较短的序列与靶 RNA 被切割位点两侧的序列互补配对,专一切割靶序列内紧接 GUC 下游的磷酸二酯键^[1]。我们根据烟草环斑卫星病毒 RNA 的锤头状核酶序列^[2]组建了 RZ1、RZ3 等核酶^[3](为了与双价、多价核酶区分,RZ1、RZ3 等在本文被称为单价核酶),并研究了这些核酶在体外切割 TMV RNA 底物的情况。在这基础上我们又提出了多价核酶的设计,即把多个分别专一切割不同病毒或同一病毒不同区域核酶(单价核酶)的 cDNA,按相同方向首尾相接克隆在一个转录载体上。转录生成的 RNA(即多价核酶)含有多个单元核酶,它应能切割多个相应的靶序列。为与单价核酶区别,多价核酶内的各个构成核酶部分在本文中被称为单元核酶。

双价核酶是多价核酶中的最简单情况。我们把以 TMV RNA 不同区域为靶的核酶 RZ1 和 RZ4 的 cDNA 分别与 RZ3 cDNA 相连,组成双价核酶 RZ13 和 RZ34 的体外转录载体。

1 材料和方法

1.1 材料

体外转录试剂和 RNA 酶抑制剂(RNasin)为 Promega 公司产品;绿豆酶,碱性磷酸酯酶,T4 DNA 聚合酶,T4 DNA 连接酶,SP6 RNA 聚合酶,T7 RNA 聚合酶,DNA 酶 I(无 RNase)、限制性酶购自 Boehringer 公司;[α -³H]ATP,En³Hance 为 NEN 产品。构建双价核酶载体所需的单价核酶质粒 pGRZ1, pGRZ3^[3]及 TMV RNA 底物体外转录载体 pGT 由本实验室构建;含有 TMV RNA 的 5' 末端 cDNA 的质粒 pT6 由中国科学院微生物研究所方荣祥先生慷慨提供。

国家 863 高技术基金项目。

*: 责任作者。

本文于 1993 年 11 月 9 日收到。

1.2 核酶体外转录载体的构建

1.2.1 单价核酶 RZ4 体外转录载体构建: 核酶 RZ4 的 cDNA 碱基序列设计如下: 5' TGGCATAACACACA CTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCTCCACAGAGCT 3' 其中划线的 23 个碱基为核酶的催化序列^[2]; 在其上游的 13 个碱基与 TMV RNA 第 70 至 82nt^[4]同源; 紧靠其下游的 10 个碱基与 TMV RNA 第 86 至 95nt 同源; 3' 末端的 5 个碱基为部分 SacI 的序列。根据这个序列, 两条互补的 DNA 引物用 Applied Biosystem 公司的 380B 合成仪合成。引物经退火, T4 DNA 聚合酶延伸后得到全长核酶 RZ4 的 cDNA, 再克隆至 pGEM2 体外转录载体 SacI (经 T4 DNA 聚合酶修饰成平头) 和 SmaI 位点, 得到 pGRZ4 (图 1-A)。

1.2.2 双价核酶 RZ34 和 RZ13 体外转录载体构建: 质粒 pGRZ1^[3]用 BamHI 酶解, T4 DNA 聚合酶补平, 再经自连使该 BamHI 切点被破坏, 然后用 SacI 降解, T4 DNA 聚合酶除去其单链末端使其为平头 (保留 3' 末端的残基 G), 再用 XbaI 酶切, 得到含有核酶 RZ1 的 cDNA 片段。载体 pGRZ3 经 BamHI 线性切割, T4 DNA 聚合酶补平 (保留 5' 末端的残基 GATCC), 然后用 XbaI 降解, 碱性磷酸酯酶去末端磷酸, 用 T4 DNA 连接酶使之与含核酶 RZ1 的 cDNA 片段相接构成 pGRZ13 (图 1-A)。在 RZ1 与 RZ3 之间恢复了一个 BamHI 位点 (GGATCC), 质粒 pGRZ3^[3]用 SacI 酶切, T4 DNA 聚合酶处理成平头 (保留 3' 末端残基 G), XbaI 酶切后得到 RZ3 的 cDNA 片段。载体 pGRZ4 经 BamHI 切割, 绿豆酶去除单链末端 (保留 5' 末端的残基 C), XbaI 酶切, 碱性磷酸酯酶去末端磷酸后与 RZ3 片段相连得到 pGRZ34 (图 1-A), 两核酶 cDNA 之间保留了残基 GC。

1.3 TMV RNA 底物的体外转录载体的构建

载体 pGT380 的构建已有报道^[3]; 其转录生成的两条互补 RNA 链被分别用作为单价核酶 RZ1 和 RZ3 或 RZ13 和 RZ34 的底物。

用作核酶 RZ4 和 TMV RNA 底物的转录载体的 cDNA 取自质粒 pT6, 该质粒含有 5' 末端的长约 1.9kb 左右的 TMV 序列。用 PstI, EcoRI 切下带有 5' 末端 270bp 的 cDNA 片段, 亚克隆到经 PstI, EcoRI 切割的体外转录载体 pGEM3 中, 组成 pGT270 (图 1-B)。

1.4 体外转录

经线性化处理的核酶和底物的体外转录载体用 T7 或 SP6 RNA 聚合酶进行转录^[3], 底物 RNA 用 [α -³H] ATP 标记, 核酶 RNA 不加标记。

1.5 核酶反应及产物分析

核酶反应及产物分析条件, 参照文献 [3], 除了指明的以外, 在 5 μ l 的反应液中含有 RNA 底物 1pmole, 核酶与底物 RNA 的分子数比为 1:1。反应液经 65 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟, 然后在 25, 37 或 50 $^{\circ}$ C 分别保温 1 小时, 反应产物经 7mol/L 尿素-8%聚丙烯酰胺电泳分离, 凝胶用 En³Hance 处理后作放射自显影。

2 实验结果

2.1 核酶体外转录载体的构建和体外转录

质粒 pGRZ4, pGRZ34 和 pGRZ13 经 EcoRI (图 1-A 中的空心箭头所示) 切割成线

性, 再被 T7 RNA 聚合酶转录 (图 1-A 中实心箭头表示了转录方向) 得到单价核酶 RZ4, 双价 RZ34 和 RZ13。由于双价核酶载体内的两个核酶 cDNA 之间保留了数个碱基 (见材料和方法部分) 以及核酶两端的载体旁接序列随核酶一起被转录, 因而生成的核酶 RNA 比原设计长, 单价 RZ4 及双价 RZ34 和 RZ13 的长度分别为 103, 159 和 171nt (结果未显示)。

单价 RZ4 专一切割位于 TMV 株系 U1 负链的 6313—6314 号碱基之间的二酯键; 双价 RZ13 专一切割正链 5384—5385 和负链 1214—1215 之间的二酯键; RZ34 则专一作用负链 1214—1215 和 6313—6314 之间的两个二酯键。

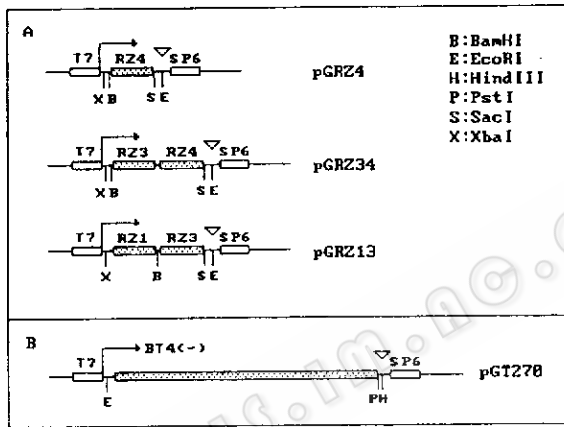


图 1 核酶 (A) 和底物 (B) 体外转录载体的构建和转录

Fig. 1 Construction of *in vitro* transcription vectors

pGRZ4, pGRZ34, pGRZ13 (panel A) and pGT270 (Panel B) for ribozymes RZ4, RZ34/RZ13 and TMV target fragment RNA BT4 (—) for the ribozyme RZ4, respectively. The ribozyme and target cDNA fragments were cloned in the plasmid pGEM. Each vector was linearized by a restriction endonuclease indicated by an open arrowhead and transcribed by T7 RNA polymerase. The solid arrowheads show the transcription directions.

2.2 TMV RNA 底物转录载体的转录

底物 BT2 (+) 和 BT2 (-) 的转录在它文中已有叙述^[3]。体外转录载体 pGT270 用 HindIII 线性化 (图 1-B 中空箭头所示), 经 T7 RNA 聚合酶转录 (实心箭头表示转录方向) 而生成核酶 RZ4 的底物 BT4 (-), 它与 TMV 正链 RNA 的 5' 末端 (1-270nt) 互补。底物 BT2 (+), BT2 (-) 和 BT4 (-) 分别含有单价 (或单元) 核酶 RZ1, RZ3 和 RZ4 的靶序列, 分别相当于 TMV 基因组正链 RNA 上的 5081—5460nt, 负链 RNA 上的 935—1314nt 和 6125—6395 号碱基间的序列。因为转录的 RNA 包括了部分载体的序列, 底物 BT2 (+), BT2 (-) 和 BT4 (-) 的长度分别约为 450, 470 和 300nt。由于在构建底物转录载体过程中引入了长度约为 25bp 的 A (n) 序列^[3], 因而在用 (α -³H)ATP 掺入标记底物时这一部分的被标记量相对很强, 在图 2 (A)、图 2 (B)、图 3 和图 4 中的小片段 (103/100nt) 正好含有这一序列, 于是其信号反而比大片段 (370nt) 强得多。

2.3 单价核酶 RZ4 专一切割底物 BT4 (-)

如图 2 (A) 所示, 长约 300nt 的底物 BT4 (-) 大部分被单价 RZ4 切割生成长度分别为 100nt 和 200nt (第 2 列), 还有近 10% 的底物未被完全切割。与此相反, 用 BT2

(-) 长度为 470nt 作为底物时, RZ4 则完全没有作用 (第 8 列)。

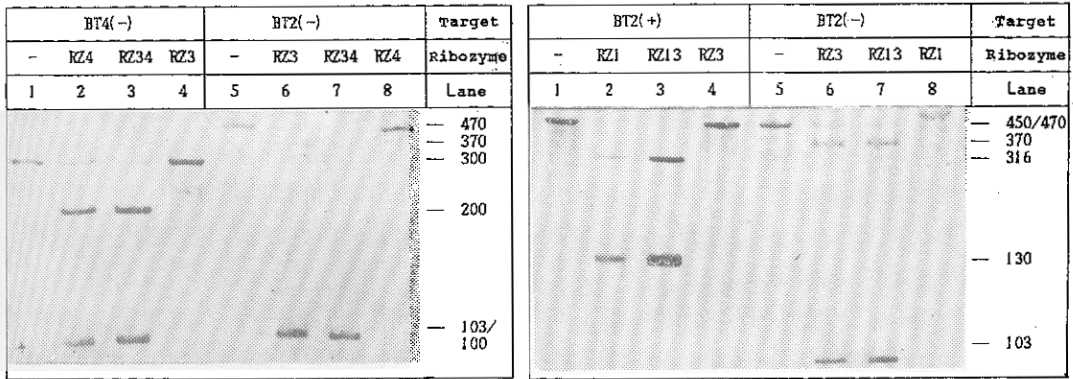


图 2 (A) 双价核酶 RZ34 对底物 BT4 (-) 和 BT2 (-) 的专一切割作用

Fig. 2 (A) Specific cleavages of target RNA BT4 (-) and BT2 (-) by ribozyme RZ34.

The sizes of the targets and their cleavage products are indicated by the nucleotide numbers shown on the right side .

图 2 (B) 双价核酶 RZ13 对底物 BT2 (+) 和 BT2 (-) 的专一切割作用

Fig. 2 (B) Specific cleavages of BT2 (+) and BT2 (-) by ribozyme RZ13

The sizes of the targets and their cleavage products are indicated by the nucleotide numbers shown on the right side .

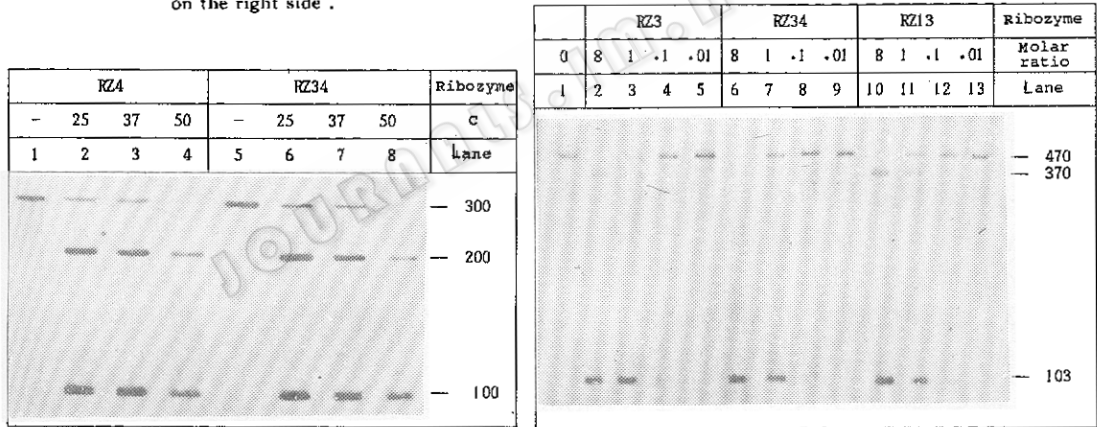


图 3 双价核酶 RZ34 与单价核酶 RZ4 在不同温度下对底物 BT4(-) 专一切割作用的比较

Fig. 3 Cleavage of the target BT4 (-) by the ribozymes RZ34 and RZ4 at various temperatures

The sizes of the target and its cleavage products are indicated by the nucleotide numbers shown on the right side.

图 4 不同浓度的核酶 RZ3、RZ34 和 RZ13 对底物 BT2 (-) 的作用

Fig. 4 Cleavage of 1 pmole of target BT2 (-) by ribozyme RZ3, RZ34 and RZ13 at various molar ratios of ribozyme to target.

The sizes of the target and its cleavage products are indicated by the nucleotide numbers shown on the right side.

单价核酶 RZ1 和 RZ3 对底物 BT2 (+) 和 BT2 (-) 的专一作用已报道过, 见文献 [3]。

2.4 双价核酶在体外的切割作用

2.4.1 RZ34 和 RZ13 分别专一切割底物 BT2 (-), BT4 (-) 和 BT2 (+), BT2

(一)。从图 2 (A) 中可以看出, 单价 RZ4 (第 2 列) 能把大部分底物 BT4 (一) 专一切割成长度为 200nt 和 100nt 的两个片段, 而单价 RZ3 (第 4 列) 对底物 BT4 (一) 完全没有作用。然而, 双价核酶 RZ34 (第 3 列) 则能切割底物 BT4 (一), 切割的产物与单价 RZ4 的完全一样。虽然 RZ34 对底物没有切割完全, 但其效率并不比单价 RZ4 差。与此相反, 对于底物 BT2 (一), 单价 RZ4 (第 8 列) 完全不能作用, 而单价 RZ3 (第 6 列) 则能专一地但不完全作用, 生成 370nt 和 103nt 两个片段, 双价核酶 RZ34 (第 7 列) 也可以专一地切断 BT2 (一), 生成的片段 (370nt 和 103nt) 与单价核酶作用产物完全一样, 而且它的催化效率也与 RZ3 一致。

由 RZ1 和 RZ3 组成的双价核酶 RZ13 对 BT2 (+) 和 BT2 (-) 的作用结果如图 2 (B) 所示。单价核酶 RZ1 能专一切割 BT2 (+) (450nt), 生成 316nt 和 130nt 两个片段 (第 2 列), 而单价 RZ3 则不能 (第 4 列), 双价核酶 RZ13 对 BT2 (+) 能够作用 (第 3 列), 从产物片段大小与切割是否完全看, 它与单价 RZ1 无异。对于底物 BT2 (-), 单价 RZ1 (第 8 列) 完全不作用, 而单价 RZ3 (第 6 列) 则能作用生成 370nt 和 103nt 两个片段, 双价 RZ13 (第 7 列) 与 RZ3 一样, 能专一而不完全地切割 BT2 (-), 其专一性和切割效率与单价 RZ1 相似。

可以看出, 双价核酶同一分子内的两个单元核酶能够独立地行使切割作用, 互不影响, 其专一性和切割效率也没有改变。

2.4.2 双价核酶同时对两个靶的切割作用: 底物 BT2 (-) 和 BT4 (-) 的混合物被选来用于研究双价 RZ34 的作用, 结果表示在图 5 中。作为对照, 双价 RZ34 分别专一作用 BT4 (-) (第 2 列) 和 BT2 (-) (第 4 列), 生成各自相应的两个片段 (200/100nt 和 370/103nt)。底物混合物 BT4 (-) 和 BT2 (-) 被 RZ34 切割后生成了 4 个片段 (第 3 列), 它们与上述对照的产物两两对应, 作用的效率也无差异。这个结果表明双价核酶不仅能分别作用于两个靶序列, 还能在一个反应系统中同时对这两个靶进行切割。

2.4.3 温度对核酶作用的影响: 为了观察温度对双价核酶的影响, 双价 RZ34 和单价 RZ4 分别在 25℃, 37℃, 50℃ 与底物 BT4 (-) 作用 1 小时 (图 3)。在 25℃ (第 2, 6 列), 37℃ (第 3, 7 列) 时有将近 10% 的底物未被切割; 在 50℃ (第 4, 8 列) 时底物被作用完全。温度对双价 RZ34 (第 6, 7, 8 列) 的影响与对单价 RZ4 的影响似无差异。适当升高温度能提高双价和单价核酶的活性。

2.4.4 单元核酶在双价核酶中的位置对底物作用的影响: 双价核酶 RZ34 和 RZ13 中都有 RZ3, 但由于构建方法略有不同, RZ3 与另一个核酶相对位置和间隔碱基数有所不同, 在双价 RZ34 内, 单元 RZ3 在单元 RZ4 的上游, 两者之间只间隔了 2 个碱基 (GC); 在双价 RZ13 中的单元 RZ3 处在下游, 与单元 RZ1 相隔一个 BamHI 切点 (GGATCC) (图 1-A)。我们比较了 RZ3 以不同方式连接到 RZ34 和 RZ13 中以后对其底物 BT2 (-) 的催化活性 (图 4), 不同量的双价 RZ34 和 RZ13 以及作对照的单价 RZ3 分别与定量的底物 BT2 (-) 在 37℃ 作用 1 小时。当核酶与底物分子数之比为 8 : 1 时, 双价 RZ13 (第 10 列), RZ34 (第 6 列) 和单价 RZ3 (第 2 列) 都能完全切割底物; 切割产物 (370nt, 103nt) 都明显可见; 在 1 : 1 时, RZ13 (第 11 列) 和 RZ34 (第 7 列) 以及 RZ3 (第 3 列) 不能完全切割底物, 但切割产物清晰可见; 当以 0.1 : 1 之比混合时, 双价 RZ13

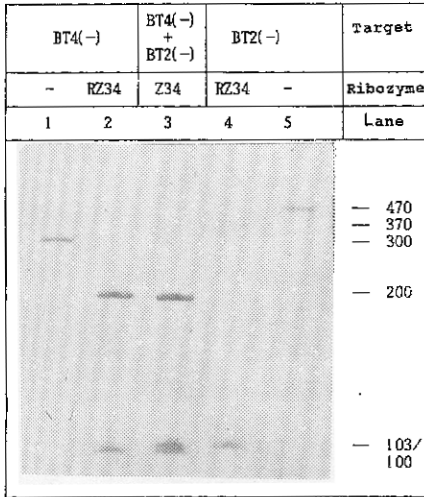


图5 双价核酶 RZ34 对 BT4 (-) 或 BT2 (-) 单底物以及混合底物作用的比较

Fig. 5 Comparison of the function of ribozyme RZ34 on single target BT4 (-) or BT2 (-) or the mixture of the two targets.

The sizes of the targets and their cleavage products are indicated by the nucleotide numbers shown on the right side.

与靶分子比达到 1 : 1 以上的条件下核酶才能完全切割底物 RNA。这种较低的效率显然不利于把核酶应用于抗 TMV 病毒。我们曾提出的多价核酶的理想^[7]就是一种提高核酶对底物 TMV RNA 切割破坏作用的较为方便的方法。虽然各个单元核酶仍然只能专一作用于一个靶序列(这种专一性是应当被保持的)而且作用效率仍然较低,但在整体上,一个多价核酶能够切割底物上多个靶序列,从而增加了对 TMV RNA 专一作用的靶序列。在破坏 TMV 生物功能使之丧失感染能力的意义上,一个多价核酶的作用效率应大大高于一个相应的单价核酶。本文以最简单的多价,即双价核酶作为模型,对其作用的专一性、效率等作了研究,结果表明双价核酶具有与相应的两个单价核酶相似的对靶 RNA 的作用效率并兼备了该两个单价核酶对靶 RNA 的高度专一性。近来,在利用核酶抗 HIV 病毒病的研究中有人^[8]报道了多价核酶的合成,他们在体外和体内所做的多价核酶对 HIV 切割作用的实验结果也表明多价核酶是可以大大提高核酶对病毒 RNA 的破坏作用效率。从我们的结果来看,单元核酶在双价核酶所处位置似乎与作用效率和专一性无关。但单元核酶在三价以上的核酶中的位置是否会影响其作用专一性和效率?随着多价核酶的价数升高其作用的位点也在增多,然而底物 RNA 复杂的空间结构是否会限制多价核酶的作用效率?另外,多价核酶含有多个相同的催化序列(长 24 个碱基),这些重复序列,随着多价核酶的价数升高而增多,在体内情况下,这是否会发生重组交换而影响作用专一性和效率?对于其中一些问题的研究我们将另文发表。

(第 12 列)或 RZ34(第 8 列)以及单价 RZ3(第 4 列)仅能切割少量的底物,长 103 个碱基的片段依然可看到,另一片段(370nt)则基本上观察不到;当比例降到 0.01 : 1 时,无论是双价(第 13, 9 列)还是单价(第 5 列)核酶对底物几无作用。尽管不同的比例对各个核酶的切割作用有一定的影响,但两个双价核酶中的单元核酶 RZ3 的切割作用始终与对照的单价核酶 RZ3 相似,看来单元核酶在双价核酶中与另一个单元核酶的相对位置和间隔距离对其专一催化作用无甚影响。

3 讨论

核酶能高度专一地切割 RNA 底物内的靶序列,它具有类似于酶蛋白的催化活性,但与酶蛋白相比其作用的效率很低^[5,6]。根据我们所做的体外^[3]和体内(未发表)实验结果也表明所设计的核酶虽然能高度专一地切割其 TMV RNA 底物内的靶序列,但催化效率都比较低,在核酶

参 考 文 献

- [1] Zang A J *et al.* *Nature*, 1986, **324**: 429—433.
- [2] Haseloff J and Gerlach W L. *Nature*, 1988, **334**: 585—591.
- [3] 许政昭等. *中国科学 (B辑)*, 1992, **1**: 47—53.
- [4] Geoclet P *et al.* *Pro Natl Acad Sci*, 1982, **79**: 5818—5822.
- [5] Been M D and Cech T R. *Science*, 1988, **239**: 1412—1415.
- [6] Forster A C and Altman, S. *Science*, 1990, **249**: 783—786.
- [7] 李 清等. *植物分子遗传国家重点实验室年报*, 1989/1990, 18.
- [8] Chen C J *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1992, **20**: 4581—4589.

Di-component Ribozyme Can Function as two Independent Ribozymes on Tobacco Mosaic Virus RNA

Li Jie Jin Hailing Zhang Qingqi Song Rentao Xu Zhengkai

(*National Laboratory of Plant Molecular Genetics, Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032*)

Abstract In this report, we constructed two di-component ribozymes RZ34 and RZ13, the simplest form of multi-component ribozyme, by ligating two single ribozyme RZ3 and RZ4, and RZ1 and RZ3, respectively. The *in vitro* results indicated that each two-component ribozyme was able to cleave two different TMV transcripts, with the specificity and efficiency similar to its single ribozyme counterpart. Possible effects on the specificity and efficiency due to the position of the unit-ribozyme in these two-component ribozymes were discussed.

Key words Di-component ribozyme, multi-component ribozyme, unit-ribozyme, ribozyme, *in vitro* cleavage