

# 专一切割苹果锈果类病毒多体自切割核酶的克隆 和转录物的体外活性测定

孙洁霖 张朝春 周 丽 杨希才\*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘 要** 将苹果锈果类病毒的 1 个 14nt 的靶序列连接在锤头型核酶的 3' 末端, 构成自切割核酶。经人工合成和 PCR 扩增, 克隆在转录载体 pGEM7Z(+ ) 的 *Xho* I - *Hind* III 位点。利用限制酶 *Xho* I 与 *Sal* I 的连接, 消失其识别位点序列, 将自切割核酶片段插入到重组质粒中, 经连续 5 次亚克隆, 分别获得 2、4、6、8、10 和 12 拷贝的多体自切割核酶。在 T7RNA 聚合酶作用下, 线性化重组质粒转录的多体自切割核酶通过内部的顺式切割释放出较多数量的核酶分子, 提示在转录水平能够提高核酶转录物的浓度。用相同摩尔浓度的单体和 12 体自切割核酶分别对<sup>32</sup>P 标记的靶 ASSVd 进行反式切割, 核酶与靶 RNA 摩尔浓度比为 1:1。放射自显影结果表明: 多体自切割核酶对靶 ASSVd 的切割效率明显高于单体自切割核酶。我们推测多体自切割核酶在体内系统中可能具有更好的应用价值。

**关键词** 多体自切割, 核酶, 苹果锈果类病毒, 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)05-0588-05

核酶是一种具有内部核糖核酸酶活性的催化性小 RNA 分子。在烟草环斑病毒( TRV )卫星 RNA 中发现的锤头型核酶<sup>[1,2]</sup>以其分子结构的简单性, 得到了广泛的报道及研究。锤头型核酶包含两个区域: 催化区 Helix II 能够引起靶位点的切割; 反义区 Helix I 和 Helix III 负责识别及结合靶 RNA, 对反义区域的改变可以重新定向核酶的专一性而不影响核酶的催化活性<sup>[3]</sup>。对已知靶序列并含有 GUC 位点的基因设计专一性核酶, 通过对其 mRNA 的切割达到抑制该基因的表达。近年来应用核酶控制 RNA 病毒基因表达的研究已取得很大进展<sup>[4,5]</sup>。

许多研究表明, 在体外切割反应中, 核酶分子与靶分子的浓度比是影响核酶催化活性的重要因素。参与反应的核酶浓度越高, 对靶 RNA 的催化效果越明显。要得到对靶 RNA 有效的切割效果, 反应体系中核酶浓度往往需要高于靶子浓度的 10~100 倍<sup>[6-8]</sup>。Rui<sup>[9]</sup>等构建了针对 HBV 核心区域 GUC 位点的 5 体自切割核酶, 通过顺式切割反应释放出数量较多的单体核酶, 提高了核酶的浓度, 自切割的单体核酶具有比非自切割的单体核酶更高的活性。

本文报道了利用 *Xho* I 和 *Sal* I 两种内切酶相互连接的方式构建的针对苹果锈果类病毒( ASSVd )负链的 12 体自切割核酶, 并检测了多体自切割核酶体外对靶 ASSVd 负链 RNA 的反式切割效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、质粒

质粒 pGEM7Z(+ ) 受体菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、苹果锈果类病毒( ASSVd )的全长 cDNA 克隆 pGEM3Z-ASSVd 由本实验室提供。

### 1.2 试剂

Kloenow 酶, Taq plus II 购自上海生工生物工程有限公司, 限制酶 *Hind* III, *Xho* I, *Sal* I、T4 DNA 连接酶和 SP6/T7 Transcription Kit 购自 TaKaRa 公司, Xgal、IPTG 和丙烯酰胺等均为国产试剂。

### 1.3 自切割核酶和引物的设计、合成和扩增

根据 Haseloff 和 Gerlach<sup>[1]</sup>报道的锤头型核酶的结构特点, 选择病原物苹果锈果类病毒( ASSVd )负链 RNA89-91 的 GUC 碱基作为切割位点。同时, 在锤头型核酶下游增加一段核酶靶序列构成自切割核

酶,全长 57nt(不包含酶切位点序列)。其 DNA 序列如下:

```
5'  CTCGAGCGCTGATGAGTCCCGTGAGGACGAAACTCCGGTGG
      a      b      c      d
AATTCCGGA [GTC]CGCTCGTCGACAAGCTT 3'
      e      f
```

a 为 *Xho* I 限制性酶切位点, f 为 *Sal* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点, b 和 d 分别是锤头型核酶的两翼配对区域 Helix I 和 Helix III, c 为锤头核酶的核心催化序列, e 为锤头核酶自切割的靶序列,其中, GTC 为核酶作用的靶位点。

自切割核酶 cDNA 分 A、B 两链合成,分别为 38 和 32 个碱基。A 链 3'端与 B 链 3'端有 13 个碱基互补。经退火、补平后得到双链 cDNA。

以双链 cDNA 为模板,加入适量引物进行 PCR 扩增。引物 1:5' CCTCGAGCGCTGATGAGTC 3'; 引物 2:5' AAAGCTTGTGCGACGAGCGGACTC 3'; 反应条件:94℃ 3min;94℃ 30s,45℃ 30s,72℃ 30s,5 个循环;94℃ 30s,50℃ 40s,72℃ 40s,40 个循环;72℃ 10min。核酶的单链 DNA 序列和引物 1、2 由上海生工公司合成。

#### 1.4 自切割核酶基因的克隆

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,将产物及载体 pGEM7ZK(+) 分别用 *Xho* I / *Hind* III 双酶切,经连接,转化感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 通过菌落蓝白斑筛选和限制酶酶切鉴定,得到重组质粒 pGEM-1Rz。我们采用能产生相同粘性末端的 *Xho* I 和 *Sal* I 两种限制酶来获得自切割核酶多体的串联体。具体步骤为:将克隆有单体自切割核酶的载体用 *Sal* I / *Hind* III 双酶切,与用 *Xho* I / *Hind* III 酶解过的 PCR 产物连接获得 pGEM-2Rz。待进一步克隆的载体可通过用 *Sal* I / *Hind* III 酶解制备,通过 *Xho* I / *Hind* III 双酶解 pGEM-2Rz 获得待插入的 2Rz 基因片段。经过连续 5 次亚克隆,获得连有 12 拷贝的 pGEM-12Rz。

#### 1.5 重组质粒序列测定

重组质粒 pGEM-4Rz 的测序工作由 TaKaRa 公司完成。

#### 1.6 自切割核酶和靶子 ASSVd 的体外转录

含有自切割核酶基因的重组质粒 pGEM-1Rz、pGEM-4Rz、pGEM-8Rz 和 pGEM-12Rz 分别用内切酶 *Hind* III 处理,靶 ASSVd 克隆的 pGEM3Z-ASSVd 用 *Sac*I 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。在 T7 RNA 聚合酶的作用下,获得掺入  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP 的 ASSVd 转录物用于分析自切割核酶的切割活性。核酶转录物不掺入同位素,转录物经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀,沉淀物用 85% 乙醇洗涤 1 次,悬浮在 20 $\mu$ L 无 RNase 的无菌水中。取 2 $\mu$ L 核酶转录物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶(含 8mol/L 尿素)上电泳检测,银染方法染色<sup>[10]</sup>。

#### 1.7 自切割多体核酶体外切割活性测定

参考邓文生等<sup>[11]</sup>叙述的方法,取 5pmol 的 1Rz 和 5pmol 的 12Rz 转录物,分别与 <sup>32</sup>P 标记的 ASSVd 负链转录物在 40 $\mu$ L 反应体系(含 50mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 25mM MgCl<sub>2</sub>) 中混和(核酶与靶 RNA 的摩尔比为 1:1),95℃ 变性 3min,冰浴骤冷。37℃ 保温 3 h 后,加入终止缓冲液(98% 甲酰胺,10mmol/L EDTA, 0.2% 溴酚蓝),取 1/2 体积上样,8% 聚丙烯酰胺凝胶(含 8mol/L 尿素)电泳,进行放射自显影。

## 2 结果

### 2.1 自切割核酶基因的设计、克隆和鉴定

为在转录水平获得较高浓度的核酶转录物,将苹果锈果类病毒 ASSVd 负链 RNA84-97 的 14nt 靶序列连接在锤头型核酶催化区 3'端。图 1 显示经计算机分析预测自切割核酶的二级结构,中间包含 8nt 随机序列的茎环结构,有利于核酶与靶序列的解离。

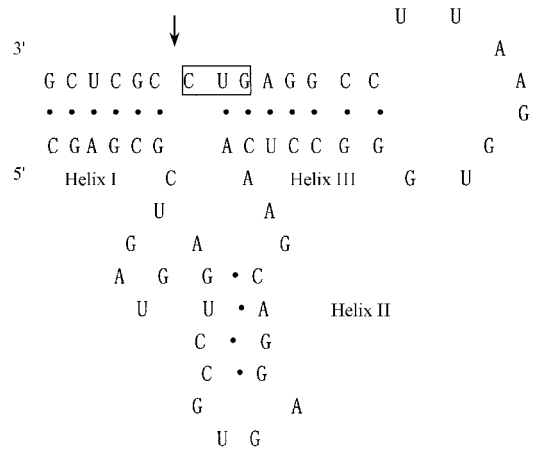


图 1 自切割核酶二级结构

Fig. 1 Secondary structure of self-cleavable ribozyme via computer analysis

核酶 5'端的引物 P1 附加 *Xho* I 酶切位点序列, 3'端引物 P2 附加 *Sal* I 和 *Hind* III 酶切位点序列。经 PCR 扩增的核酶片段用 *Xho* I / *Hind* III 双酶切,克隆到转录载体 pGEM7zK(+) 的 *Xho* I - *Hind* III 位点中。重组质粒用 *Sal* I / *Hind* III 双酶切,插入 *Xho* I /

*Hind*III 双酶切的核酶片段,获得 2 体自切割核酶(2Rz)。经连续 5 次亚克隆,获得一系列的 4、6、8、10 和 12 体自切割核酶。重组质粒分别定名为 pGEM 1Rz 至 pGEM 12Rz。图 2 显示多体自切割核酶的构建图谱。经内切酶酶切鉴定(图 3),得到的上述重组质粒分别含有 62bp(单体)至 744bp(12 体)的核酶基因片段。

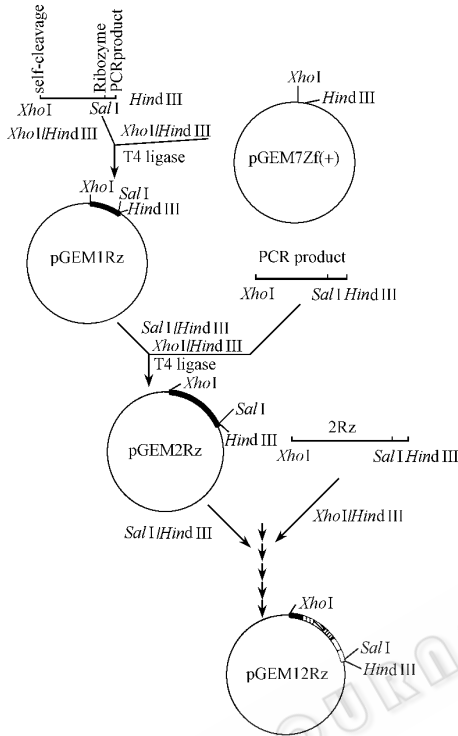


图 2 多体自切割核酶基因的构建图谱

Fig.2 Construction process of recombinant multimeric self-cleavable ribozyme

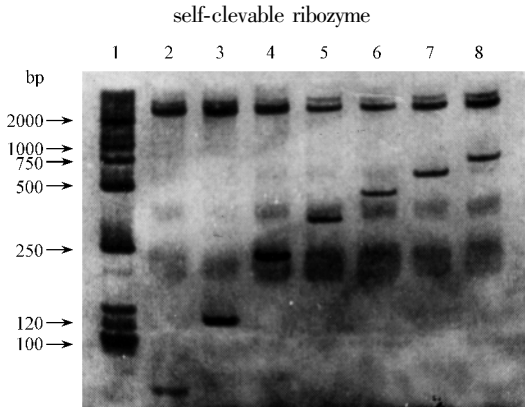


图 3 单体及多体自切割核酶重组子的酶切鉴定

Fig.3 Restriction endonuclease analysis of recombinant pGEM-1Rz ~ 12Rz

1. Marker
2. pGEM-1Rz / *Xho*I + *Hind*III
3. pGEM-2Rz / *Xho*I + *Hind*III
4. pGEM-4Rz / *Xho*I + *Hind*III
5. pGEM-6Rz / *Xho*I + *Hind*III
6. pGEM-8Rz / *Xho*I + *Hind*III
7. pGEM-10Rz / *Xho*I + *Hind*III
8. pGEM-12Rz / *Xho*I + *Hind*III

4 体自切割核酶的序列测定表明:克隆的核酶基因序列与设计序列完全一致。

2.2 自切割核酶基因的体外转录

不同拷贝数的自切割核酶载体经 *Hind* III 酶切线性化后作为模板,在 T7 RNA 聚合酶作用下进行转录。由于转录系统中存在一定浓度的  $Mg^{2+}$ ,单体及多体核酶的转录物即能发生自切割反应。单体核酶转录物(附加 37nt 的载体序列)产生 94nt(发生自切割)和 106nt 的两个片段(图 4:1);多体核酶的自切割是随机发生的,4 体、8 体和 12 体核酶转录物产生了一系列不同大小的核酸片段(图 4:2-4),与预期的结果相符。表明多体自切割核酶在转录水平上能够提高核酶分子的浓度。

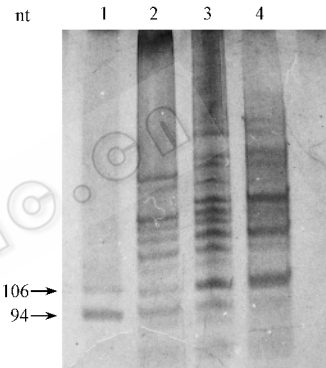


图 4 单体和多体自切割核酶转录物分析

Fig.4 Analysis of monomeric and multimeric self-cleavable ribozyme transcripts

1. pGEM-1Rz transcript
2. pGEM-4Rz transcript
3. pGEM-8Rz transcript
4. pGEM-12Rz transcript

2.3 自切割核酶体外切割活性分析

在体外切割反应中,取 5 $\mu$ mol 的单体自切割核酶和 5 $\mu$ mol 的 12 体自切割核酶分别与  $^{32}$ P 标记的靶 ASSVd 混合,核酶与靶 ASSVd 的摩尔浓度比为 1:1。37 $^{\circ}$ C 温浴 3h 后,分别取 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,分析单体自切割核酶和 12 体自切割核酶对靶 ASSVd 的切割活性。理论上 ASSVd 负链转录物(373nt)经核酶切割产生 163nt 和 210nt 的 2 个片段(图 5B)。放射性自显影结果(图 5A)可以看出,单体和 12 体自切割核酶都能将靶 ASSVd 切割成相关的 2 个片段,片段大小与理论预测的大小一致。12 体自切割核酶对靶 ASSVd 的切割(图 5A:4-5)明显高于单体自切割核酶(图 5A:2-3)。尽管两种核酶的克分子浓度相同,由于 12 体核酶能释放出更多的核酶分子,显示出对靶 ASSVd 更高的切割活性。

根据 12 体核酶与单体核酶在相同条件下对靶 ASSVd 的切割活性的比较, 我们推测多体自切割核酶将具有潜在的应用价值。

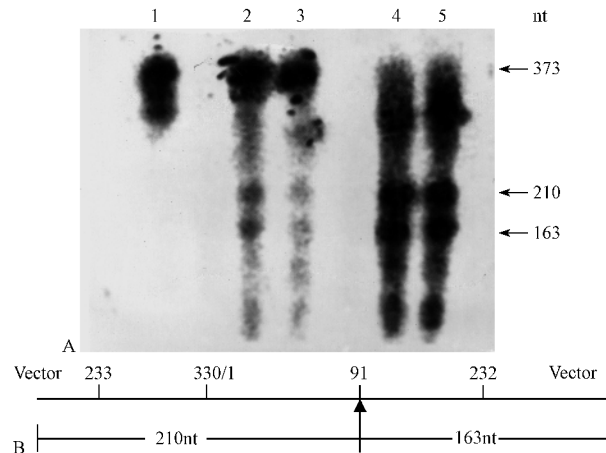


图 5 自切割核酶对靶 ASSVd(-) 反式切割的放射自显影

Fig.5 Autoradiogram showing the result of the trans-cleavage reaction between self-cleavable ribozyme and target ASSVd negative strand RNA

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

1. Target ASSVd(-); 2~3. ASSVd(-) + monomeric ribozyme; 4~5. ASSVd(-) + 12-monomer ribozyme;

B. Schematic diagram describing the expected size of cleavage products

### 3 讨论

核酶拥有设计的简单性及作用的专一性等优点, 已经逐渐在农业及临床方面作为一种很有潜力的工具而被广泛使用<sup>[12-15]</sup>。然而, 仍有许多影响核酶催化活性的技术问题正待解决。由于靶 RNA 及核酶的二级结构或核酶的非正确折叠影响了核酶分子对靶序列的识别<sup>[16,17]</sup>, 所以, 通常需要核酶浓度远远高于靶子浓度, 核酶才能较好地发挥作用。

核酶 *Helix I* 和 *Helix III* 末端附加的额外序列 (来源于转录载体) 影响核酶催化活性, 导致核酶在体外切割反应中影响甚至丧失对靶 RNA 的切割活性<sup>[15]</sup>。为了解决核酶浓度及额外序列这两种可能影响核酶活性的情况, Ohkawa 等人设计了相互连接的多体核酶, 在每个反式作用核酶的两端插入另一个可以顺式切割的核酶, 构成 shot-gun 型核酶<sup>[18]</sup>。我们对 shot-gun 模型的核酶进行了改进, 设计了同时具有顺式和反式切割活性的自切割核酶基因, 能够在增加反应体系中核酶分子浓度的同时产生附加很少额外序列的单体核酶分子。

为了得到自切割核酶的串联体, 我们选择能产

生相同粘性末端的限制酶 *Xho I* 和 *Sal I* 位点序列, 将核酶 5' 端的 *Xho I* 酶序列与其 3' 端的 *Sal I* 酶序列连接。这样不仅很容易克隆多个片段的单体核酶, 而且也保证了每个拷贝核酶连接方向的正确性。将一个拷贝克隆到另一个拷贝后面即意味着每一个核酶分子均被靶识别位点包围。实际上, 这种设计可以使核酶通过顺式切割转录产物, 从而释放出具有很少额外序列的单体分子<sup>[11]</sup>。自切割多体核酶通过自切割反应, 极大的加强了反应体系中单体核酶的浓度。通过对转录产物的检测可以显示, 多体自切割核酶的顺式切割反应在转录的过程同步发生, 释放的单体核酶的浓度随着保温时间的延长而增加。

核酶只有和底物碱基配对结合成复合物后, 才能发生切割反应, 因此底物与核酶配对区长度直接影响复合物生成速率并影响整个反应速度。因此核酶两臂的长度是影响核酶催化活性的重要因素。Hendry<sup>[19]</sup> 等认为具有短 *Helix I* 和长 *Helix III* 的核酶比等臂的核酶具有更高的切割活性。本实验设计了 *Helix I* 为 6bp, *Helix III* 为 10bp 的核酶基本单位作为反式切割核酶, 在反式核酶下游附加部分靶序列构成了顺式核酶, 顺式核酶的 *Helix III* 为 7 bp。顺式核酶的自切割反应在与靶 RNA 存在竞争时也处于有利状态, 因为顺式核酶的 *Helix III* 短于反式核酶, 不仅更有利于它二级结构的折叠, 自然界也总是倾向于形成自身折叠和内部的切割反应<sup>[9]</sup>。即使在体内靶 RNA 同时存在时也不会影响顺式核酶发生自切割反应而释放出较多数量的单体核酶分子。

本文中对自切割核酶转录物的检测采取了改进的聚丙烯酰胺凝胶银染法检测<sup>[10]</sup>, 在染色过程中用双蒸水充分漂洗凝胶, 显色液中将甲醛的浓度降低到 0.4mL/L, 可降低背景显色, 使得核酸带很清晰。用此方法可代替传统的掺入同位素的方法来检测小分子核酶转录物。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Prody GA, Bakos JT, Buzayan *et al.* Autolytic processing of dimeric plants virus satellite RNA. *Science*, 1986, **231**, 1577 ~ 1580
- [2] Buzayan J M, Gerlach W L, Bruening G. Satellite tobacco ringspot virus RNA: A subset of the RNA sequence is sufficient for autolytic processing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 8859 ~ 8862
- [3] Haseloff J, Gerlach W L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, 1988, **334**: 585 ~ 591
- [4] Sarver W, Cantin E M, Chang DS *et al.* Ribozymes as potential an-

- [ 5 ] Atkins D , Yung M , Uzzel S *et al.* The expression of antisense and ribozyme genes targeting citrus exocortis viroid in transgenic plants. *Journal of General Virology* , 1995 , **76** : 1781 ~ 1790
- [ 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 ] Cotton M , Birstiel M L. Ribozyme mediated destruction of RNA in vitro. *EMBO J* , 1989 **8** : 3861 ~ 3866
- [ 8 ] Cotton M , Schaffner G , Birstiel M L. Ribozyme , antisense RNA , and antisense DNA inhibition of U7 small nuclear ribonucleoprotein-mediated histone pre-mRNA processing *in vitro*. *Mol Cell Biol* , 1989 , **9** : 4479 ~ 4487
- [ 9 ] Juan Ruiz , Catherine H Wu , Yoshinori I *et al.* Design and preparation of a multimeric self-cleaving hammerhead ribozyme. *Biotechniques* , 1997 , **22** : 338 ~ 345
- [ 10 ] YANG Q X( 杨庆源 ) , LU Y I( 陆应麟 ) , GE X M( 葛学铭 ) *et al.* Detection of c-myc specific hammerhead ribozyme activity by silver-stained polyacrylamide gels. *Bull Acad Mil Med Sci( 军事医学科学院院刊 )* , 1998 , **22** ( 3 ) : 221 ~ 224
- [ 11 ] DENG W S( 邓文生 ) , ZHANG F X( 张奉学 ) , YANG X C( 杨希才 ) *et al.* Preparation of self-cleavable hammerhead ribozyme with 10 copies targeting the simian immunodeficiency virus 3' LTR region and kinetic analysis of its catalytic activity *in vitro*. *Chin J Biochem Mol Biol( 中国生物化学与分子生物学报 )* 2000 , **16** ( 3 ) : 363 ~ 367
- [ 12 ] Bratty J , Chartrand P , Ferbeyre G *et al.* The hammerhead RNA domain , a model ribozyme. *Biochim Biophys Acta* , 1993 , **1216** : 345 ~ 359
- [ 13 ] Christoffersen R E , Marr J. Ribozymes as human therapeutic agents. *J Med Chem* 1995 , **38** : 3861 ~ 3866
- [ 14 ] Natalia D , James C , Valerie S *et al.* Self-cleaving-ribozyme-mediated reduction of  $\beta$  APP in human Rhabdomyosarcoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 2001 , **387** ( 2 ) : 223 ~ 232
- [ 15 ] Ventura M , Wang P , Ragot T *et al.* Activation of HIV-specific ribozyme activity by self-cleavage. *Nucleic Acids Research* , 1993 , **21** ( 14 ) : 3294 ~ 3255
- [ 16 ] Fedor M J , Uhlenbeck O C. Substrate sequence effects on " hammerhead " RNA catalytic efficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1990 , **87** : 1668 ~ 1672
- [ 17 ] Wang J H , Usman N , Chartrand P *et al.* Quantitative evaluation of intracellular sense : antisense RNA hybrid duplexes. *Nucleic Acids Res* , 1993 , **21** : 4383 ~ 4391
- [ 18 ] Ohkawa J , Yuyama N , Takebe Y *et al.* Importance of independence in ribozyme reactions kinetic behavior of trimmed end of simply connected multiple ribozymes with potential activity against human immunodeficient virus. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1993 , **90** : 11302 ~ 11306
- [ 19 ] Hendry P , Mccall M. Unexpected anisotropy in substrate cleavage rates by asymmetric hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res* , 1996 , **24** : 2679 ~ 2684

## Design and Preparation of the Multimeric Self-cleavable Hammerhead Ribozyme Targeting Apple Scar Skid Viroid and Its Activity Detection *in vitro*

SUN Jie-Lin ZHANG Chao-Chun ZHOU Li YANG Xi-Cai\*

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

**Abstract** A self-cleaving hammerhead ribozyme gene containing a 14nt target sequence of ASSVd at the 3' end of hammerhead ribozyme was synthesized, amplified and cloned at the *Xho* I-*Hind* III site of pGEM7Z(+). The ends produced by *Xho* I or *Sal* I can link together, thus the recognition sites of both enzymes vanish and can't be cut by either one. We used this property to get the recombinant plasmid bearing 2, 4, 6, 8, 10 and 12 copies of self-cleavable ribozyme respectively after successively sub-cloning five times. Linearized recombinant plasmid model catalyzed by T7 RNA polymerase was transcribed *in vitro*. The multimeric ribozyme molecules efficiently self-cleaved via cis-acting to release many ribozyme molecules. It indicates that the concentration of ribozyme transcripts has been enhanced during transcription. Trans-cleavage reaction was carried out by incubating monomeric and multimeric ribozymes with same mol concentration and  $^{32}$ P labeled target ASSVd. Both ribozymes and target transcripts were mixed in 1:1 ratio. Autoradiograms showed the transcripts of multimeric ribozyme were substantially more effective against the ASSVd target RNA than the monomeric ribozymes. We confer that the multimeric self-cleavable ribozyme is likely to provide more valuable application *in vivo*.

**Key words** multimeric self-cleavable , ribozyme , apple scar skid viroid , transcription , cleavage activity *in vitro*

Received : 03-19-2002

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

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62625603 ; E-mail : yangxc@sun.im.ac.cn. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>