

研究快报

抗 BmNPV 即刻早期蛋白三联 ribozyme
在家蚕细胞中的表达*

张晓岚 陈农安 陆长德 祁国荣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 为了阻断家蚕核多角体病毒 (BmNPV) 的基因表达, 以 BmNPV 的即刻早期蛋白基因 (IE) 为靶序列, 设计了三联 ribozyme. 体外切割反应表明, 该 ribozyme 能特异地切割靶序列的 mRNA; 细胞实验表明, 细胞中表达的 ribozyme 也能够特异地切割靶序列, 从而使受 BmNPV 感染的 Bm-N 细胞中的多角体减少约 30%.

关键词 三联 ribozyme, 家蚕核多角体病毒即刻早期蛋白, Bm-N 细胞

Ribozyme 是具有催化 RNA 切割反应功能的 RNA 分子, 它可以有效地和序列特异地切割 RNA 分子, 从而阻断基因表达和阻止病毒的复制和繁殖. 我们以家蚕核多角体病毒即刻早期蛋白基因 (BmNPVIE) 为靶序列, 设计了特异的 ribozyme, 构建了 ribozyme 表达质

粒, 并对它的体外切割以及在家蚕细胞中的表达进行了研究.

以 BmNPVIE 为靶序列, 设计了 3 个切割 IE mRNA 上不同位点的 ribozyme: R47、R208 和 R687. 它们的基因序列分别为:

R47: AACTGACTGATGAGGCGGTGACGCCGAAACAATATTCTATCGATCGACGT

R208: AATTCAAAGTATGATGAGCCCGTGAGGGCGAAAGTCGTTAC

R687: CTAGAAAATCATCTGATGAGGCGGTGAGGCCGAAAGTAAAATGT

为了提高 ribozyme 切割靶序列的效率, 把 3 个 ribozyme 串联在一起形成联合型的 ribozyme (R426). 为使 ribozyme 之间不相互影响, 通过核酸二级结构的计算机模拟, 改变了茎区 II 的碱基序列. 为了减少长的侧翼序列对 R426 的影响, 在 R426 基因两侧装上 *cis*-ribozyme, 在转录过程中 *cis*-ribozyme 发生自身剪切, 释放出具有短的侧翼序列的 R426 分子. 将两侧带有 *cis*-ribozyme 的 R426 基因克隆到 T7 启动子下游, 用限制性内切酶线性化后作为 T7 RNA 聚合酶的模板进行体外转录

制备 R426 分子. 体外转录和切割实验表明, R426 两侧的 *cis*-ribozyme 的切割效率非常高, 释放出的 R426 分别能够特异地切割转录和合成的靶序列. 表明我们设计的 3 种 ribozyme 的“催化中心”使得 3 个 ribozyme 能不相互干扰, 各自独立发挥切割作用, 也不影响其两端的 *cis*-ribozyme 的切割活性. 因此这种设计是非常成功的.

构建了 R426 在家蚕细胞 (Bm-N) 中的瞬

* 国家“863”生物高技术 (863-102-19-6) 资助项目.

收稿日期: 1995-09-13, 修回日期: 1995-10-23

时表达质粒 pGL2Rz. 在两侧带有 *cis*-ribozyme 的 R426 基因前组装了 BmNPVIE 基因的启动子. 由于 IE 基因在病毒感染的极早期表达, 它的表达不需要其他病毒基因产物的存在, 因而在未感染病毒的多种家蚕细胞中 IE 启动子具有转录活性, 为了检测的方便, 在启动子和 ribozyme 基因之间装入了荧光素酶报告基因. 细胞实验的结果表明, 细胞培养上清中没有检测到荧光素酶的活性; 在细胞抽提液中, 转染 24 h 就有荧光素酶的表达, 36 h 荧光素酶的表达量最高, 在对照细胞的培养上清和细胞抽提液中均检测不出荧光素酶的活性. 将提取的细胞总 RNA 中分出与 R426 大小一致的部分加入反应管中与靶 RNA 保温 60 min, 经 6% PAGE 电泳鉴定其切割反应, 结果表明在 Bm-N 细胞中瞬时表达的 R426 中的单体 R47 和 R208 均能特异切割 ^{32}P 标记的体外转录靶 RNA, 产生切割条带; 单体 R687 没有相应的切割条带. 据分析, 可能是存在某些抑制因素 (如其他 RNA 等). 对切割反应的分析表明, 在 10^6 个 Bm-N 细胞中瞬时表达 (36 h) 的有活性的 ribozyme 量约为 1.55 pmol.

用不同稀释浓度的野生型的 BmNPV 感染瞬时表达 ribozyme 的家蚕细胞, 3 d 以后置于光学显微镜下观察细胞中多角体的形成情况. 在病毒滴度为 2×10^5 时, 瞬时表达荧光素酶和 R426 的 Bm-N 细胞比仅表达荧光素酶的 Bm-N 细胞中的多角体减少了约 30%. 表明我

们构建的 ribozyme 表达系统对抑制病毒的正常生长可能是有效的, 对这方面的研究仍在不断深入.

致谢 感谢吴祥甫和宓怡德在本研究的细胞试验中给予的帮助.

Expression of Triplet Ribozyme Targeting *Bombyx Mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) Immediate Early Gene mRNA in Bm-N Cell. Zhang Xiaolan, Chen Nongan, Lu Changde, Qi Guorong (*Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract In order to evaluate the effect of ribozymes on suppressing BmNPV, triplet ribozyme (R426) targeting the BmNPV immediate early gene (IE) was designed. *In vitro* cleavage experiment showed that R426 transcript was able to cleave the target sequence specifically. Expression experiment indicated that R426 extracted from Bm-N cell can also cleave the target specifically and cause about 30% reduction of BmNPV polyhedra in transfected cell.

Key words triplet ribozyme, BmNPV IE, Bm-N cell