

## *rnc*基因的高表达及核糖核酸酶Ⅲ的纯化

陈 苏 民

(第四军医大学生物化学教研室 西安)

Court, D. L.

(美国 NIH/NCI-FCRF-BRI 染色体生物学实验室)

根据大肠杆菌中核糖核酸酶Ⅲ(RNaseⅢ)含量很低的原因是RNaseⅢ能作用于自身基因(*rnc*)转录物5'端、负反馈调控其自身合成,设计RNaseⅢ高表达的方案。去除*rnc*基因5'侧能转录生成可被RNaseⅢ降解的RNA结构的序列,保留整个*rnc*基因及其5'侧的天然翻译起始序列,将之置于 $\lambda$  P<sub>L</sub>启动子控制下,所构建的质粒在大肠杆菌中经诱导后高表达出RNaseⅢ,其含量达细胞总蛋白质量的85%以上,并在菌体内形成包涵体。利用RNaseⅢ溶解度变化的特点,在低温、低盐条件中裂菌,并洗涤沉淀,在室温、高盐条件下溶解、过Q-Sepharose FF柱,获得具有良好活性、电泳纯的RNaseⅢ,收获量为10—12 mg/100ml培养液。同时还发现RNaseⅢ具有特异性结合ATP的活性。

**关键词** 核糖核酸酶Ⅲ; *rnc*基因; 基因表达; 蛋白质纯化

核糖核酸酶Ⅲ(RNaseⅢ)是能切断特定结构RNA双链的一种大肠杆菌内切核酶<sup>[1]</sup>,它在rRNA成熟过程的起始步骤中定点切断初始转录物30S RNA<sup>[2]</sup>,并对一些大肠杆菌和噬菌体基因转录物进行加工<sup>[3-7]</sup>,从而在转录后调控基因的表达中起着重要的作用。RNaseⅢ对RNA的作用位点还不清楚,它对不同基因转录物加工调控的机理也正在研究之中,这就需要有纯化的RNaseⅢ供作分析。在野生型大肠杆菌中RNaseⅢ的合成和含量都很低<sup>[8]</sup>,提纯困难。因此我们拟用基因工程手段去获取大量纯RNaseⅢ。

我们已证明RNaseⅢ在大肠杆菌中含量很低的原因是由于RNaseⅢ活性对自身表达的负反馈调节<sup>[8]</sup>。据此我们设计了亚克隆和高表达*rnc*基因(编码RNaseⅢ)的方案,实验得到预期的成功,并由此获得电泳单带纯、活性良好的RNaseⅢ。

## 材 料 和 方 法

### (一)酶和试剂

限制性内切酶和DNA修饰酶购自Bethesda Research Laboratories Inc., New England BioLabs, 和Boehringer Mannheim。DNA序列分析采用U. S. Biochemical Corp. 的Sequenase kit。<sup>32</sup>P标记核苷酸来自Amersham。

### (二)质粒和菌种

*rnc*基因来自质粒pCSB(图1), pCSB为除去质粒pSB<sup>[8]</sup>中两个Nru I切点间的序列再环化而成。表达质粒采用含P<sub>L</sub>启动子的pJL6<sup>[9]</sup>。从pJL6构建pCE12见文献<sup>[8]</sup>。宿主菌用大肠杆菌TAP 106<sup>[8]</sup>。DNA重组和转化采用Maniatis等<sup>[10]</sup>

本文于1991年1月28日收到。

方法。

### (三) RNase III 的诱导表达和纯化

TAP 106(pCR11)在含氨苄青霉素的 LB 培养液中 32℃ 振荡培养到 OD<sub>600nm</sub> 约 0.5, 转入 42℃ 水浴振荡一定时间。冰浴冷却培养液, 离心收集菌体。用 25% 蔗糖-TED 液 (25m mol/L Tris-HCl pH8.0, 1m mol/L EDTA, 1m mol/L DTT) 离心洗涤一次, 再悬浮在 25% 蔗糖-TED 液中, 加溶菌酶至 0.2mg/ml、冰浴放置 20 min。加 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 至 8m mol/L、DNase I 至 2u/ml, RNase A 至 0.5μg/ml, 以及裂菌缓冲液 (终浓度为 1% NP40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 10m mol/L Tris-HCl pH 7.0, 5m mol/L EDTA), 混匀, 冰浴放置 30min, 4℃ 离心 15 000 × g 20min。沉淀在 0—4℃ 用裂菌缓冲液仔细分散悬浮、离心洗涤三次, 再用 TMD 液 (50m mol/L Tris-Cl pH7.0, 5m mol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1mmol/L DTT) 悬浮洗涤两次。沉淀在室温 (20℃) 悬于 8% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50m mol/L Tris-HCl pH 8.0 中, 20℃ 离心 10 000 × g 15min, 上清液上经 50m mol/L Tris-HCl pH8.0 平衡的 Q-Sepharose FF (Pharmacia) 柱, 收集不吸附的穿过峰, 置于 0℃ 中过夜, 0℃ 离心 10000 × g 15 min, 收得白色沉淀为纯 RNase III。在室温溶于 8% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50m mol/L Tris-HCl pH 8.0 中作紫外吸收扫描, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE)<sup>[11]</sup> 鉴定其纯度, 用 Pierce 公司提供的试剂按说明进行蛋白定量。纯化的 RNase III 可在上述溶液中 0—4℃ 保存, 用前暖至室温使絮状沉淀的 RNase III 溶解, 也可在 50% 甘油中 -20℃ 长期储存。

### (四) RNase III 活性检测

根据我们以前研究 RNase III 能作用于

λ 噬菌体 *sib* 转录物<sup>[12,13]</sup>, 按我们报道的方法<sup>[14]</sup> 进行。*sib*-RNA 用体外转录方法合成: 取 λ DNA NdeI (λ DNA 第 27632 位)-Hind III (第 27479 位)<sup>[15]</sup> 15 3bp 片段<sup>[14]</sup> 插入质粒 pGEM4 (Promega) 的多克隆位点的 BamHI-Hind III 中, 采用 Promega 公司的 Riboprobe system 按说明操作, 在 <sup>35</sup>S-ATP (Amersham 提供) 存在下, 体外转录合成 <sup>35</sup>S-RNA, 按 Regnier 及 Portier 方法<sup>[16]</sup> 提取 RNA, 作为 RNase III 的作用底物。

### (五) 核苷酸结合活性测定

方法见以前报道<sup>[17]</sup>。

### (六) 氨基酸序列分析

见以前的报道<sup>[20]</sup>。

## 结 果

### (一) pCR11 和 pCR21 的组建

此二质粒的构建见图 1。两者相同之处是都去除天然的 *rnc* 启动子、将 *rnc* 基因 (包括其 SD 序列) 置于 λ P<sub>L</sub> 启动子的下游; 不同的是 pCR11 含有 *rnc* 基因 5' 侧的序列较长, 直到 Ssp I 位点 (见图 2), pCR21 则只到 Hinc II 位点。将构建的质粒分别转化大肠杆菌 TAP 106。

### (二) *rnc* 基因的诱导表达

TAP 106(pRC21) 经 42℃ 诱导 4 h 后 SDS-PAGE 分析, 可见在相当于 RNase III 分子量 (25kDa) 处出现一条浓带 (图 3 中 I), 作 Western blotting 将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上与抗 RNase III 抗体反应、酶标染色, 证明这蛋白带是 RNase III。凝胶经考马斯亮蓝染色后作光密度定量扫描, 表明这蛋白带量占细胞总蛋白量的 65% 以上。免疫电镜观察, RNase III 在细菌内形成包涵体 (图 4)。对比之下, TAP 106 (pCR11) 经 42℃ 诱导, SDS-PAGE 后

无论作考马斯亮蓝或银染色都看不到RNase III带的出现。

(三)RNase III的纯化

图 3 显示了RNase III 纯化过程的SDS-PAGE 图像。由图 3 可见，TAP 106

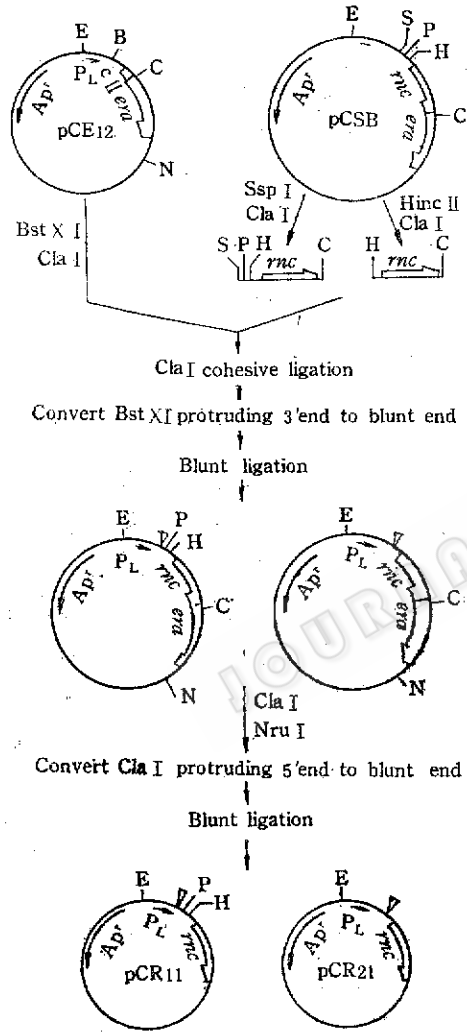


图 1 质粒pCR 11和pCR 21的构建  
Fig. 1 Construction of plasmid pCR11 and pCR21  
B:BstXI, C:Clal, E:EcoRI, H:HincII, N:NruI S:SspI, Δ Restriction sites vanished during DNA recombination

(pCR21)在 42℃诱导 4 h后，低温、低盐

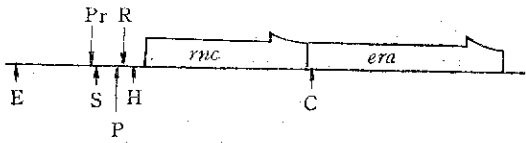


图 2 *rnc*基因附近的酶切位点  
Fig. 2 Enzyme cutting sites of the adjacent region of the *rnc* gene  
E:EcoRI, C:Clal, H:HincII, P:PstI, S:SspI, Pr:Promoter of *rnc* gene, R:sites that RNase III acts on the gene transcript

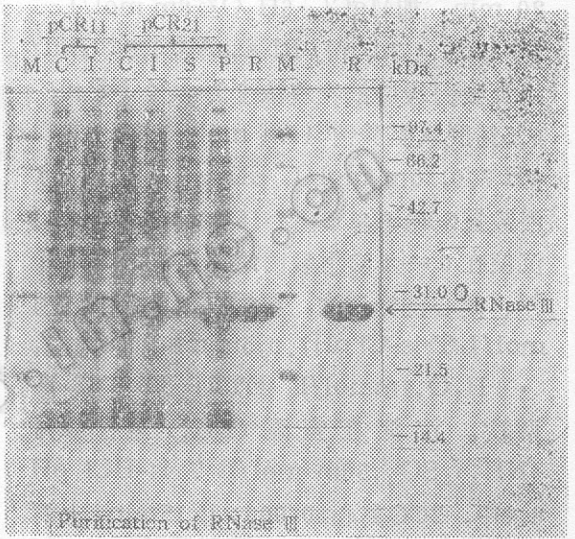


图 3 pCR11及pCR 21在大肠杆菌TAP 106 中的蛋白质表达及RNase III 的纯化  
Fig.3 Expression of proteins by pCR11 or pCR21 in *E.coli* TAP106 and purification of RNase III  
SDS-PAGE in 10% gel following Coomassie blue staining.C.Bacteria grown at 32℃, I. After induced at 42℃ for 4 h, M,Markers for protein molecular weight, S and P. Supernatant and precipitate of the induced bacterial lysate,R.RNase III obtained from washing the precipitate, R'.RNase III gained by further passing through Q-Sepharose FF column

条件下裂菌，绝大部分RNase III 不溶，存在于裂菌液的沉淀部分。沉淀在 0—4℃经裂菌缓冲液几次离心洗涤，再在室温溶于 8% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，就得到在 SDS-PAGE 染色凝胶中只看到单一蛋白带的

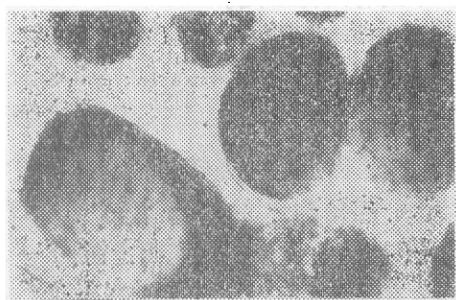


图 4 TAP106 (pCR21) 42°C 诱导 2h 后的免疫电镜图像

Fig. 4 Immuno-electromicroscope of TAP106 (pCR21) after induced at 42°C for 2h.

The black spots are colloid-gold grains which show that RNase III concentrated in inclusion bodies

RNase III (图 3 中 R)。但这 RNase III 溶液在紫外 260nm 处有较高的吸收值, 表明其中混有核酸类的物质, 通过 Q-Sepharose FF 柱, 260 nm 吸收峰物质以及残留的杂蛋白吸附在柱上, RNase III 不被吸附而穿过。由此得到纯 RNase III, 呈现典型的蛋白质溶液紫外吸收光谱。图 3 是用 Bio-Rad 公司提供的 MiniProtein II 电泳装置所作的 SDS-PAGE, 凝胶厚 0.7mm、齿槽宽 3mm, 每槽加入样品 1μl 含 RNase III 0.02 μg, 电泳后染色已见十分清楚的 RNase III 区带; 图 3 中 R' 加样量为 3μl 含纯 RNase III 1.85μg, 未能见有 RNase III 以外的蛋白带; 即使加载过量的样品达 5μg, (此时电泳见拖尾), 无论用考马斯亮蓝或银染色都看不到杂蛋白的污染。每 100 ml 培养液能收得纯 RNase III 10—12mg。测定所纯化的 RNase III 蛋白 N 端 30 个氨基酸残基序列, 与从 *rnc* 基因推得的蛋白质序列<sup>[18]</sup>完全相同。

#### (四) 酶活性检测

图 5 显示 *sib* 转录物与纯化的 RNase III 保温后作 7mol/L 尿素-PAGE 放射自显影图像。我们早先研究 RNase III 作用于 *sib*-

RNA 的位点见图 6<sup>[18,14]</sup>, 即 RNase III 水解 *sib*-RNA 应产生 24 核苷酸的特征片段。图 5 的 4 及 5 列都能清楚地看到 24 和 96 多核苷酸的片段, 后者为转录物从 5' 端到被 RNase III 切断的第一个位置(图 6)间的长度。这就证明所纯化的蛋白质具有 RNase III 的特异酶活性。将大肠杆菌的 tRNA, 酵母 tRNA、质粒 DNA、或 M13 单链 DNA 与所纯化的 RNase III 保温都未能测出非特异性 RNase 或 DNase 活性。

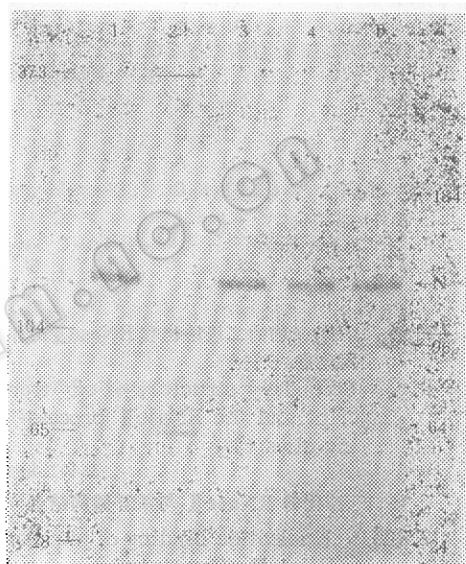


图 5 <sup>35</sup>S-*sib* 转录物与 RNase III 保温后 7mol/L 尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳的放射自显影图像

Fig. 5 Autoradiography of <sup>35</sup>S-*sib* transcript incubated with RNase III followed 7 mol/L urea-polyacrylamide electrophoresis.

1. The transcript alone, 2. Molecular weight standards, 3. The transcript incubated at 37°C for 15 min, 4 and 5. The transcript added RNase III and incubated at 37°C for 15 min. Nucleotide numbers of different fragments are showed along side. N, other transcript of the plasmid.

#### (五) 特异性 ATP 结合活性

当我们测定纯化的 Era 蛋白特异性结合核苷酸的活性<sup>[17]</sup>时, 用纯化的 RNase III 作对照, 无意中发现 RNase III 具有与



显示: 10%的蛋白质的生成升高或降低。外源基因引入大肠杆菌中, 其表达也可能受到RNase对转录后调控的作用, 如得不到预期的高表达, RNase作用也是一个应考虑方面; 或需针对性地加以解决。本文研究结果就是一个例子。大肠杆菌中基因

高表达的产物, 常在菌体内形成包涵体, 可能有多方面的原因<sup>[17]</sup>。RNaseⅢ具有特异性结合ATP的活性, 在其他文献中还未见有报道, 其对RNaseⅢ的功能有何作用尚不清楚。

### 参 考 文 献

- [1] Gegenheimer, P., and Apirion, D., *Microbiol. Rev.*, 45:502, 1981.
- [2] Sirdeshmukh, R., and Schlessinger, D., *Nuc. Acid. Res.*, 13:5041, 1986.
- [3] Takata, R. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 209:28, 1987.
- [4] King, T. C. et al., *Microbiol. Rev.*, 163:1060, 1986.
- [5] Hughes, J. A. et al., *Nuc. Acid. Res.*, 15:717, 1987.
- [6] Hyman, H. C. and Honigman, A., *J. Mol. Biol.*, 189:131, 1986.
- [7] Portier, C. et al., *EMBO J.*, 6:2165—2170, 1987.
- [8] 陈苏民、Court, D. L., 生物化学杂志, 7(5):518, 1991.
- [9] Lautenberger, J. A., *Gene*, 23:171, 1983.
- [10] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [11] Silhavay, T. J. et al., *Experiments with Gene Fusion*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1984.
- [12] Montanez, C. et al., *J. Mol. Biol.*, 191:29, 1986.
- [13] Court, D. L. et al., *J. Mol. Biol.*, 166:233, 1983.
- [14] Schmeissner, U. et al., *J. Mol. Biol.*, 176:39, 1984.
- [15] Hendrix, R. W. et al., *Lambda I*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 595—596, 1983.
- [16] Regmier, P. and Portier, C., *J. Mol. Biol.*, 187:23, 1986.
- [17] 陈苏民、Court, D. L., 生物化学杂志, 8(1):38, 1992.
- [18] March, P. E. et al., *Nucleic Acids Res.*, 13:4677—4685, 1985.
- [19] Gegenheimer, P. and Apirion, D., *Microbiol. Rev.*, 45:502—541, 1981.
- [20] 陈苏民、Court, D. L., 生物工程学报, 7(3):201, 1991.
- [21] Nilsson, G. et al., *Nature* 312:75—77, 1984.

## Overexpression of *rnc* Gene and Purification of RNase Ⅲ

Chen Sumin

(Department of Biochemistry, The Fourth Military Medical University, Xian)

Court D. L.

(Laboratory of Chromosome Biology, NIH/NCI-FCRF-BRI, Frederick, Maryland, U.S.A.)

The reason for low content of RNaseⅢ in *E. coli* is that RNaseⅢ has a negative feedback action on itself synthesis by cutting the transcript of itself gene, *rnc*, at 5'-terminal. On these grounds, the scheme for

overproduction of RNase III was designed. The 5'-flank sequence of *rnc* gene which transcript forms a secondary structure cutting by RNase III was removed, and the whole coding sequences including the translational initiation signal was reserved and put under the control of P<sub>L</sub> promoter. The constructed plasmid, pCR21, with the recombined *rnc* gene overproduces RNase III which occurs over 65% of total cell protein and forms inclusion body in *E. coli* after 42°C induction. By utilizing the characteristics of solubility of the protein, electrophoretic pure RNase III has been obtained with a simple procedure including lysed the bacterial cell and washed precipitate of the lysate repeatedly at low temperature and low salt concentration, dissolved and passed through Q-Sepharose FF column in high salt concentration and room temperature. Purified RNase III yielded 10—12mg per 100ml culture and cut  $\lambda$  *sib* transcripts at special sites. RNase III with an activity on binding ATP specifically has been found.

#### Key words

RNase III; *rnc* gene; gene expression; protein purification