

# 酵母 *pac-1* 基因的克隆、序列分析和在大肠杆菌中的 高效表达及活性测定

步 威 孙洁霖 杨希才\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 粟酒裂殖酵母 *pac-1* 基因, dsRNA 依赖的核糖核酸酶, 原核表达, CMV-dsRNA

中图分类号 Q783 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0203-04

粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的 *pac-1* 基因于 1991 年 Yuichi Iino 等首次报道。在温度敏感型的酵母突变体中, *pac-1* 基因是一个多拷贝阻遏子, 它使酵母在限制温度培养条件下的减数分裂不受调控, 对酵母的生长过程起着重要的调节作用。该基因有一个编码 364 个氨基酸的开放阅读框, 编码产物的羧基端与大肠杆菌核糖核酸酶 III 有 25% 的同源性。通过酶活性测定, 已经确定它是一类依赖 dsRNA 的核糖核酸酶, 具有降解 dsRNA 的功能<sup>[1, 2]</sup>。由于大多数植物病毒为 RNA 病毒, 因此无论它的基因组是单链还是双链, 在病毒的复制周期过程中都会有一个双链 RNA 的复制中间体。使用植物基因工程技术, 将酵母 *pac-1* 基因转入植物中, 通过干扰和抑制病毒 RNA 复制, 将可能达到控制植物病毒病的目的, 这是获得广谱性抗病植物的新的策略之一。本文报道了来源于中国粟酒裂殖酵母(*S. pombe*) *pac-1* 基因的克隆、序列测定以及它在大肠杆菌中的表达和表达产物的活性测定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种、质粒和试剂

粟酒裂殖酵母 *S. pombe* 由本所中国普通微生物菌种保藏中心提供, 编号为 2.1043, 2.1178, 2.1459, 2.259, 2.994; 质粒 pGEM-7Zf(+), pET-21(a), pRok II; 受体菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , BL21 和黄瓜花叶病毒(CMV)S<sub>52</sub>株系的 ds-RNAs 由本实验室提供; Taq plus II 购自上海生工生物工程公司, 限制酶、T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司, IPTG 和丙烯酰胺等均均为国产试剂, 蜗牛酶购自北京鼎国生物技术发展中心。

### 1.2 寡核苷酸引物的设计

根据已报道的 *pac-1* 基因序列<sup>[1]</sup>, 分别设计其 N 端同源和 C 端互补的 2 个引物。P1: 5'GGG TAC CCG GGC ATA

TGG GAC GGT TTA3', P2: 5'GGG GAT CCT CAT TAA CCG GAC AAC T3'。其中 5'端引物 P1 含有 *Kpn* I、*Sma* I 和 *Nde* I 酶切位点序列。3'端引物 P2 含有 *Bam*HI 酶切位点序列。引物由中科院微生物所生物技术中心用 Beckman oligo1000m/1000 合成仪合成。

### 1.3 酵母基因组 DNA 的提取

酵母菌基因组 DNA 的提取参考 Invitrogen 公司的操作方法<sup>[3]</sup>。从 *S. pombe* 5 个菌株中分别提取出酵母基因组 DNA, 溶解在 TE buffer 中。

### 1.4 PCR 扩增 *pac-1* 基因及其克隆

以提取的酵母 DNA 为模板, 用引物 P1, P2 和 Taq plus II 做 PCR 扩增, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2.5min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2.5min, 30 个循环; 再进行 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。获得的 PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和纯化, 获得一条约 1.1kb 的 DNA 片段。参考分子克隆方法<sup>[4]</sup>。将 PCR 产物用 *Kpn*I/*Bam*HI 双酶解, 克隆到同样酶解的载体 pGEM-7Zf(+ ) 中, 转化 *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-*pac-1*。

### 1.5 DNA 序列测定及分析

以重组质粒 pGEM-*pac-1* 的 T7/SP6 启动子序列为引物, 采用双脱氧链终止法在 377A 全自动测序仪进行双向测定核酸序列, 由北京六合通宝生物公司完成。测定结果用计算机 DNASIS 序列分析软件进行分析。

### 1.6 *pac-1* 基因原核表达载体的构建及其诱导表达

重组载体 pGEM-*pac-1* 经 *Nde*I/*Bam*HI 双酶解后, *pac-1* 基因片段插入到同样酶解的原核表达载体 pET-21(a) 中, 酶解鉴定获得重组质粒 pET-*pac-1*。将原核表达载体 pET-21(a) 作为对照, 和重组质粒 pET-*pac-1* 分别转入到受体表达菌 BL-21 中, 提取质粒进行鉴定<sup>[5]</sup>。

收稿日期 2000-08-11, 修回日期 2000-12-28。

基金项目 国家高技术发展与计划项目(101-01-02-04) 和自然科学基金(39870465) 资助

\* 通讯作者。 Tel: 86-10-62554398, Fax: 86-10-62560912, 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

含有 pET-*pac-1* 和对照质粒的 BL-21 于 37°C 活化过夜,按照 1% 接种量转接到 50mL LB 培养基(含 100 $\mu$ g/mL Amp)中继续培养至对数生长期( $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$ ),加入 IPTG 到终浓度 1mmol/L,诱导培养 4~6h,收集菌体。一部分菌体直接加入蛋白上样缓冲液(40mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 10% 甘油, 2% SDS, 5% 巯基乙醇, 0.1% 溴酚蓝),煮沸 10min,进行 SDS-PAGE 分析。其余的菌体用无菌水洗涤后,悬浮在缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 100mmol/L KCl 和 0.1mmol/L DTT)中,用超声波方法破碎菌体,处理 6 次,每次不超过 30s, 12 000r/min 离心 15min,用获得的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析。菌体的上清用于酶活性测定。

### 1.7 表达产物的酶活测定

经超声波处理的菌体上清测定其蛋白浓度后,取相同蛋白量(约 0.27 $\mu$ g)与适量黄瓜花叶病毒(CMV)dsRNAs 混合,加入 MgCl<sub>2</sub> 至终浓度 30mmol/L,总体积 50 $\mu$ L,在 37°C 分别保温 5, 10, 15, 30 和 60min。反应样品用酚/氯仿抽提和 3 倍体积乙醇(含 1/10 体积的 3mol/L NaAc)沉淀核酸,用 6% PAGE 和银染色检测 dsRNA,根据降解 dsRNA 的效果确定表达产物的酶活性。

## 2 结 果

### 2.1 酵母 *pac-1* 基因的克隆

蜗牛酶是降解酵母细胞壁的常用试剂。在 37°C 酶解破坏细胞壁后,通过低速离心,弃掉上清中可溶的蛋白,再用苯酚抽提沉淀物,可以获得纯度较高的核酸样品。应用上述较温和的改良方法从本所菌种保藏中心提供的 5 株 *S. pombe* 酵母菌(编号为 2.1043, 2.1178, 2.1459, 2.259, 2.994)中分别提取到酵母基因组 DNA,作为模板通过 PCR 扩增,均获得约 1.1kb 的 DNA 片段。以编号 2.1043 菌株扩增的 DNA 片段作为进一步研究。由于在引物设计上考虑到目的基因(PCR 产物)片段的正确方向及其将它分别插入到克隆载体 pGEM-7Z(+),原核表达载体 pET-21(a)和植物表达载体 pRok II 中,在引物 P1 的 5' 端设计了 *Kpn*I、*Sma*I 和 *Nde*I 3 个限制性酶切位点序列,在引物 P2 的 5' 端设计了 *Bam*HI 1 个限制性酶切位点序列。应用这一对引物进行 PCR 扩增并经过纯化的目的基因片段就能够定向插入克隆表达载体 pGEM-7Z(+),原核表达载体 pET-21(a)和植物表达载体 pRok II 中。图 1 显示 *pac-1* 基因的 PCR 扩增产物和重组质粒 pGEM-*pac-1* 的 *Kpn*I/*Bam*HI 双酶切产物的检测。图 2 为原核表达载体 pET-*pac-1* 和植物表达载体 pRok-*pac-1* 的构建图谱。为了进一步鉴定克隆到载体上的 PCR 片段。依据已发表序列和克隆载体上的限制性酶切位点,对重组质粒进行 7 种不同处理的双酶切检测。证明克隆的 PCR 片段为目的 *pac-1* 基因。

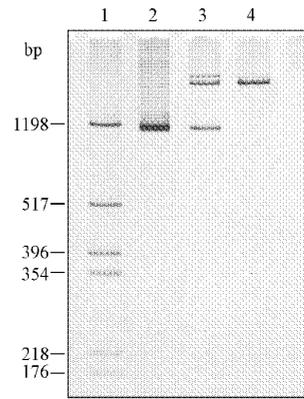


图 1 酵母 *pac-1* 基因的 PCR 产物和重组质粒 pGEM-*pac-1* 的酶切检测

Fig. 1 PCR product of *S. pombe pac-1* gene and detection of recombinant pGEM-*pac-1* digested by restriction endonuclease in PAGE

1. DNA molecular markers 2. PCR product; 3. pGEM-*pac-1*/*Kpn*I + *Bam*HI 4. pGEM-7Z(+)/*Kpn*I + *Bam*HI

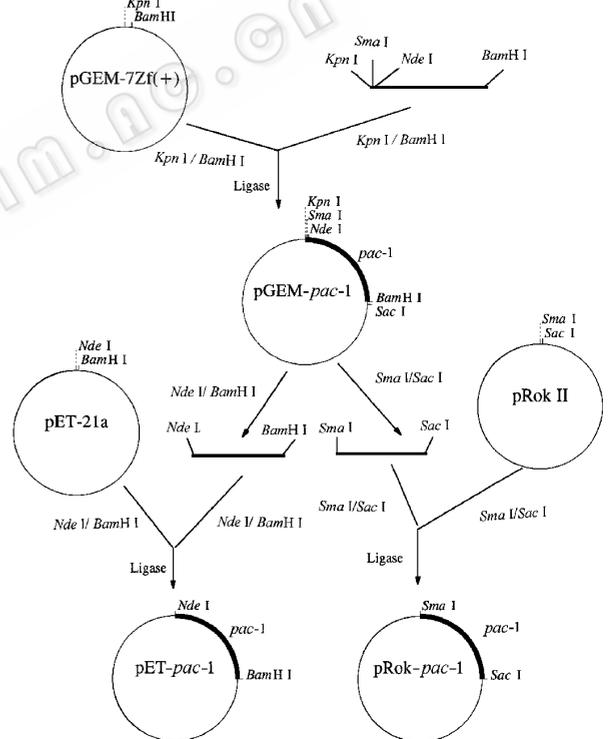


图 2 原核表达载体 pET-*pac-1* 和植物表达载体 pRok-*pac-1* 的构建

Fig. 2 Construction of prokaryotic expression vector pET-*pac-1* and plant expression vector pRok-*pac-1*

### 2.2 *pac-1* 基因的序列测定结果

对重组质粒 pGEM-*pac-1* 的插入片段进行全序列测定。结果显示,克隆片段全长 1095bp,与已发表序列<sup>[1]</sup>相比较,两者的碱基数目完全相同,核苷酸序列的同源性为 99.5%,仅有 5 个核苷酸的差异:即 T<sub>218</sub>→C, G<sub>430</sub>→A, A<sub>678</sub>→G, C<sub>744</sub>→T 和 C<sub>1032</sub>→T。对基因编码蛋白序列比较,蛋白序列的同源性为 99.7%,仅有 1 个氨基酸的差异:即 Glu<sub>144</sub>→Lys。根据序列测定结果表明,从中国的 *S. pombe* 菌株(分离源,茅

台酒酯)克隆出完整的 *pac-1* 基因。

### 2.3 *pac-1* 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

重组质粒 pGEM-*pac-1* 用 *Nde* I/*Bam* HI 双酶解后,将 *pac-1* 基因片段定向插入到原核表达载体 pET-21(a)中,获得重组子 pET-*pac-1*。将重组子转到表达宿主菌 *E. coli* BL21 中,通过加入 IPTG 诱导 *pac-1* 基因表达。12% SDS-PAGE 分析结果(图 3)表明,经 IPTG 诱导的工程菌(含 pET-*pac-1*)获得表达(图 3 3~5),产生约 42kD 的特异蛋白条带,而经诱导的对照菌(含 pET-21(a))和未经诱导的工程菌没有相应的蛋白条带(图 3 2,6),说明 *pac-1* 基因得到正确表达。在原核细胞中表达真核基因的蛋白,由于原核细胞的转录和翻译过程是耦联的,且表达过快使多数蛋白来不及折叠而极易形成包涵体。通过超声波方法破碎菌体细胞,分别收集上清和沉淀进行电泳分析,从而确定表达产物在宿主细胞中是否以可溶的形式存在。图 4 结果显示,经超声波处理的菌体上清和沉淀中都有目的蛋白存在。由于上清中的表达蛋白是以可溶性的天然形式存在,将有利于使用上清中的表达蛋白测定其酶活性。

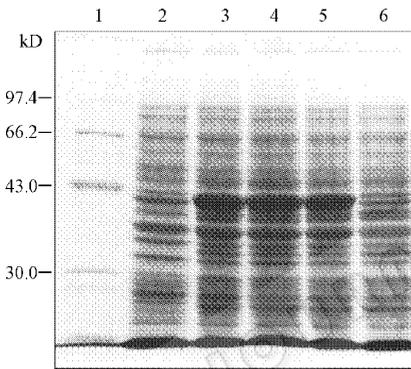


图 3 表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶检测分析  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the pET-*pac-1* expressed product in *E. coli* BL21

1. Protein MW markers 2. Control pET-21(a) induced with IPTG ;  
3~5. pET-*pac-1* induced with IPTG 6. pET-*pac-1* induced without IPTG

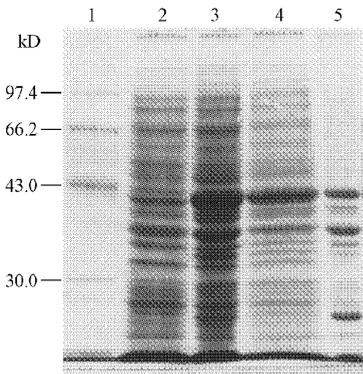


图 4 表达产物在 *E. coli* BL21 菌体中的分布分析

Fig. 4 Distribution of pET-*pac-1* expressed product in *E. coli* BL21 cell  
1. Protein MW markers ;  
2. Total protein of host cell containing pET-21(a) by boiling directly ;  
3. Total protein of host cell containing pET-*pac-1* by boiling directly ;  
4. Supernatant of host cell containing pET-*pac-1* prepared by ultrasonic wave ;  
5. Precipitant of host cell containing pET-*pac-1* prepared by ultrasonic wave

### 2.4 *pac-1* 基因表达产物降解 CMV-dsRNAs 的酶活性检测

以黄瓜花叶病毒 (CMV) S<sub>52</sub> 株系 (含有卫星 RNA) 的 ds-RNAs 为底物,测定 *pac-1* 基因表达产物(上清部分)降解 dsRNA 的酶活性。使用转入空载体 pET-21(a)的 BL21 菌体,受同样的诱导条件和超声波处理后的菌体上清蛋白为对照,分别加入相同的蛋白量与相同的底物 CMV-dsRNAs,在 37°C 分别保温不同时间后,检测底物 dsRNAs。图 5 结果说明了 *pac-1* 基因表达产物有相当高的降解 CMV-dsRNAs 的酶活性。当底物 CMV-dsRNAs 与 *pac-1* 基因表达产物混合保温 5min 时,底物已被降解,而底物 CMV-dsRNAs 与对照菌体上清蛋白混合保温 60min 时,底物仍未被降解。

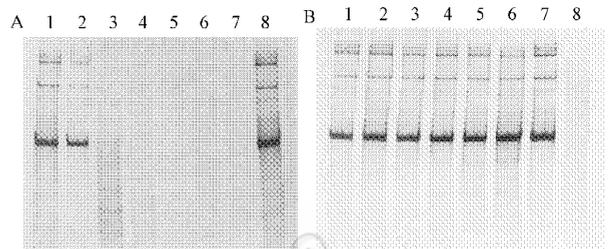


图 5 *pac-1* 基因表达产物降解 CMV-dsRNAs 的酶活性检测  
Fig. 5 Detection of the biological activity of pET-*pac-1* expression product digested CMV-dsRNAs

A 1. Total viral dsRNAs of CMV-S<sub>52</sub> strain ;  
2~7. CMV-dsRNAs treated with enzyme for 0.5 ,10 ,15 ,30 and 60 minutes respectively at 37°C in reaction buffer ;  
8. CMV-dsRNAs incubated at 37°C in reaction buffer for 60minutes  
B 1. Total viral dsRNAs of CMV-S<sub>52</sub> strain ;  
2~6. CMV-dsRNAs trated with supernatant of host cell for 5 ,10 , 15 ,30 and 60 minutes respectively at 37°C in reaction buffer ;  
7. CMV-dsRNAs incubated at 37°C in reaction buffer for 60 minutes ;  
8. Sample of enzyme

## 3 讨论

从来源于中国的粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*) 基因组 DNA 中,通过 PCR 扩增,获得有降解 dsRNA 酶活性的 *pac-1* 基因。通过对该基因的序列测定和与 Yuichi Lino 等报道的 *pac-1* 序列<sup>[1]</sup>相比较,发现两者有高度的核苷酸序列的同源性。尽管其中有 5 个核苷酸的不同,但仅有 1 个核苷酸的变化 (G<sub>430</sub>→A) 导致所编码氨基酸的变化 (Glu<sub>144</sub>→Lys), 两者的氨基酸序列同源性为 99.7%。*pac-1* 基因编码产物的羧基端与大肠杆菌核糖核酸酶 III 有 25% 的同源性,通过酶活性测定,已确定它是一类依赖 dsRNA 的核糖核酸酶。通过对能够与 dsRNA 结合的蛋白的结构学研究,发现在 dsRNA 依赖的蛋白激酶 pKR、果蝇 *staufen* 蛋白、大肠杆菌 RNase III 和真核 RNaseH 的 N 端等蛋白存在着 1 个与 dsRNA 结合的结构域 dsRBD (double-stranded RNA-binding domain), 这个区域对 dsRNA 结合是特异性的,没有或是有很低的结合 ss-RNA、dsDNA 或 ssDNA 的能力。在 dsRBD 结构域中的 C 端,存在一个保守序列 AAAXXALXXL。在大肠杆菌 RNase III

III 中, 这个保守序列前端的第 3 个氨基酸是 Glu, 而不是共同序列的 Lys。这个 Glu 位置与 RNaseH 中的结合金属离子并参与催化的 Lys 相对应。对我们克隆的能催化 dsRNA 降解的 *pac-1* 基因分析, 发现在它的 C 端第 346 个氨基酸开始同样存在类似的保守序列结构: AAMQALQVL, 但是与其他结合 dsRNA 的蛋白不同的是, 在保守序列前的第 3 个氨基酸为 Gly, 并非是 Glu 或 Lys。

根据经验, 从健康的植物组织中未提取出 dsRNA, 而从受病毒(包括类病毒)和其他病原体感染的植物组织中均能够提取出病原体 dsRNA。应用先进的生物技术, 将能够降解病原体 dsRNA 的 *pac-1* 基因转入到植物中, 使其受适合的启动子调控表达, 将能够抑制或阻断病原体的复制循环, 达到抗病育种的目的。由于 *pac-1* 基因表达产物对 dsRNA 的降解没有特异性, 对任何的病毒 dsRNA 的降解具有广谱性, 因此有可能控制多种植物病毒引起的病害, 这是近年来获得抗病毒植物的新策略之一。当然, *pac-1* 基因在植物体内的功能性, 以及是否影响植物的遗传性状等, 有待于深入探讨和研究。

#### REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Yuichi Lino, Asako Sugimoto, Masayuki Yamamoto. *S. pombe*

*pac1<sup>+</sup>*, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III-like RNase, *EMBO J.* 1991, **10**(1): 221~226

[ 2 ] Watanabe Y, Ogawa T, Takahashi H *et al.* Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease. *FESB Lett.* 1995, **372**: 165~168

[ 3 ] Invitrogen: Products for Gene Expression and Analysis. Pichia Expression Kit, Version E. Instruct on Manua.

[ 4 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *Molecular Cloning, the Science Publishing Company, the Second Edition*, 1996.

[ 5 ] LI YM(李永明), ZHAO YQ(赵玉琪) *et al.* Practical Methods Manual of Molecular Biology(实用分子生物学手册), the Science Publishing Company, 1998

[ 6 ] YANG XC(杨希才), QIN BY(覃秉益), LIANG XX(梁锡娴) *et al.* Satellite RNA as a biological control agent of diseases caused by cucumber mosaic virus, *Acta Microbiologica sinica*(微生物学报), 1986, **26**(2): 120~126

[ 7 ] Abelhakim Kharrat, Macia J, Macias, Toby J Gibson *et al.* Structure of the dsRNA Binding Domain of *E. coli* RNase III, *EMBO J.* 1998, **14**: 3752~3758

[ 8 ] Cynthia S Winkley, Martha J Keller, Judith A Gehring. A multi-component mitochondrial RNA polymerase from *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem* 2000, **260**(26): 14214~14223

## Cloning, Sequence Analysis and High-level Expression in *Escherichia coli* and Activity Assay of *pac-1* Gene from *Schizosaccharomyces pombe*

BU Wei SUN Jie-Lin YANG Xi-Cai\*

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

**Abstract** The *Schizosaccharomyces pombe pac-1* gene product is a kind of dsRNA dependent ribonuclease, which has potential to degrade the dsRNA viral genome, the replication form of ssRNA viral genome and viroid genome. Therefore, to introduce the *pac-1* gene into plants conferring them resistance to viruses is a new method of establishing the anti-virus transgenic plant. The *pac-1* gene from the *S. pombe* genome DNA isolated from China was cloned by means of PCR amplification. The *pac-1* gene was inserted into the cloning vector pGEM-7ZK(+) by using restriction endonuclease *Kpn* I/*Bam*HI. Sequencing analysis shows that it is a complete gene with 1095 nucleotides. Compared to the reported *pac-1* gene, its homology is significant, but with 5 nucleotides differences leading to only one amino acid difference. *Pac-1* gene was inserted into the prokaryotic expression vector pET-21(a) by using the restriction endonuclease *Nde* I/*Bam*HI. It was induced by the IPTG in *E. coli* BL21 harbouring the recombinant vector pET-*pac-1*. The *pac-1* gene product is analyzed by the SDS-PAGE. The result shows the product of *pac-1* gene exists in the supernatant part as soluble form and in the precipitant part as inclusion bodies after the cells were lysed by ultrasonic wave. The supernatant was applied to detect the enzyme activity of *pac-1* gene product. We concluded that *pac-1* gene has the biological activity of degrading the CMV-dsRNA.

**Key words** *S. pombe pac-1* gene, dsRNA dependent ribonuclease, prokaryotic expression, CMV-dsRNA

Received: August 11, 2000

This work was supported by the National High Technology Program (101-01-02-04) and by National Natural Science Foundation of China (39870465).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62554398; Fax: 86-10-62560912. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn