

# 核酸酶 BN 及 SN 基因的克隆和序列分析

刘玉乐 叶寅 魏征宇 李胜国 康良仪 田波

(中国科学院微生物所, 北京 100080)

**摘要** 分别从解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 中提取染色体 DNA, 经 HindIII 酶解后 PCR 扩增获得 Barnase (核酸酶 BN) 基因和 Staphylococcal Nuclease (核酸酶 SN) 基因, 并克隆到质粒 pGEM7Z-I(+ ) 上。序列分析表明, 核酸酶 BN 的核苷酸序列与已发表的序列有 99.3% 的同源性, 而与据此推测的氨基酸序列完全一致。核酸酶 SN 基因的核苷酸序列与已发表的序列有 99.1% 的同源性, 与据此推测的氨基酸序列有 99.3% 的同源性。该工作为利用核酸酶的特异表达或激活获得雄性不育植物及探索新的抗病毒策略打下了基础。

**关键词** 核酸酶 BN; 核酸酶 SN; 克隆; 序列分析

核酸酶 BN 是一种高活力的 RNase, 来源于 *B. amyloliquefaciens*, 由 110 个氨基酸组成<sup>[1]</sup>。利用核酸酶 BN 基因在花粉小孢子形成

早期的定时定位表达, 而将细胞内 RNA 降解导致花粉败育以获得雄性不育<sup>[2]</sup>。这一工作利用杂交优势开辟一条新的途径。

核酸酶 SN 是一种受  $\text{Ca}^{2+}$  调控的核酸酶, 由 149 个氨基酸组成, 来源于 *S. aureus*, 既能降解 DNA 又能降解 RNA<sup>[3]</sup>。

目前普遍采用的抗病毒植物基因工程策略各有不同程度的抗病毒效果, 但其抗性仍有待进一步提高, 需探索新的更有效的抗病毒策略, 将病毒的外壳蛋白与核酸酶形成融合蛋白, 使之既能参与病毒核酸的包被, 又可在特定条件下降解病毒核酸, 这种思路有可能成为新的抗病毒基因工程策略, 核酸酶 SN 被认为是该策略中最佳选择的核酸酶<sup>[4]</sup>。

现在我们正在开展以植物基因工程手段获得雄性不育植株和新的抗病毒策略的研究, 这里我们报道核酸酶 BN 和 SN 基因的克隆与序列分析。

## 材料和方法

### (一) 菌株、质粒及引物

1. 菌株: *Bacillus amyloliquefaciens* (1.1099), *Staphylococcus aureus* (1.89) 和 *E. coli* DH5 $\alpha$  来自于中科院微生物所。

2. 质粒: pGEM7Z-f(+) 来自华美生物工程公司。

3. 引物: 根据资料<sup>[1,3]</sup>, 采用 Applied Biosystem 381 A 型 DNA 合成仪合成引物。

BN-5'-primer 5'-GGAAGCTTATGGC-ACAGGTTATCAACACG-3'

BN-3'-primer 5'-GGAAGCTTTTATC-TGATCTTTGTAAACCT-3'

SN-5'-primer 5'-GCCTCGAGATGGCA-ACTTCAACTAAAAAATTA-3'

SN-3'-primer 5'-TTATTGACCTGAAT-CAGCG-3'

### (二) *B. amyloliquefaciens* 和 *S. aureus* 染色体 DNA 的分离

取 *B. amyloliquefaciens* 和 *S. aureus* 的过夜培养物各 3ml 低速离心, 收集菌体。将 *B. amyloliquefaciens* 的菌体溶于 400  $\mu$ l TE buffer 中, 加溶菌酶到终浓度 1  $\mu$ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟, 加 SDS 和蛋白酶 K 分别至终浓度

1.2% 和 50  $\mu$ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟, 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1) 抽提三次, 加 NaAc (pH 5.2) 及二倍体积无水乙醇沉淀 DNA; 将 *S. aureus* 菌体加液氮后研磨, 溶于 400  $\mu$ l TE buffer 中, 按提取 *B. amylolifaciens* 染色体 DNA 的方法提取 *S. aureus* 染色体 DNA。

### (三) PCR 法获得核酸酶 BN 及 SN 基因

将 *B. amylolifeciens* 和 *S. aureus* 染色体 DNA 分别用 HindIII 部分酶解, 吸取酶解混合物(约 100ng DNA) 在 100  $\mu$ l 的总体积中进行 PCR 反应, 其反应条件为: 10mmol/L Tris-Cl, 50mmol/L KCl, 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.01% (W/V) 明胶以及各自基因的 5'-primer 及 3'-primer 各约 40pmol。每种 dNTP 200  $\mu$ mol/L (pH8.3), 2.5U Taq DNA 聚合酶。每个循环的条件是 94, 52 和 72 $^{\circ}$ C/30s, 循环 30 次。PCR 产物按文献[5]纯化后, 溶于双蒸水中。

### (四) 核酸酶 BN 和 SN 基因的克隆

将核酸酶 BN 的 PCR 产物经 HindIII 酶解后, 与 HindIII 酶切的 pGEM7Z-f(+) 在 BRL 公司的连接系统 22 $^{\circ}$ C 连接过夜。将核酸酶 SN 的 PCR 产物用 XhoI 酶切, 并与纯化的 XhoI 和 SmaI 双酶切的 pGEM7Z-f(+) 在 BRL 公司的连接系统中 22 $^{\circ}$ C 连接过夜。分别将这两种连接混合物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 并在含有 40  $\mu$ g/ml X-gal, 0.5 mmol/L IPTG 和 50  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选。挑选白色克隆, 提取质粒, 用 XbaI 和 BamHI 酶解, 筛选阳性克隆。

### (五) DNA 序列分析

据酶切分析结果, 挑选阳性克隆用煮沸法提取质粒, 以双脱氧终止法进行质粒 DNA 双向测序<sup>[6]</sup>。

## 结果与讨论

### (一) 染色体 DNA 的提取

我们试用了溶菌酶, SDS 及超声波等手段破碎 *S. aureus*, 但都没有得到满意的结果, 最后采用了液氮冻融及研磨的方法破壁然后提取 DNA, 获得了高质量的染色体 DNA。

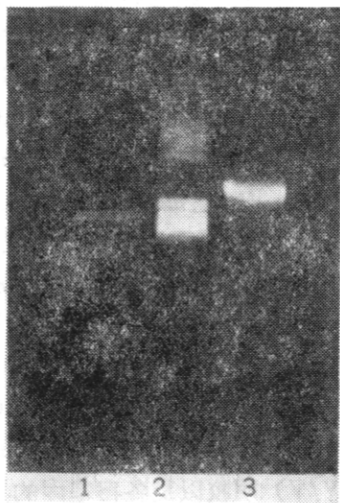


图1 核酸酶 BN 和 SN PCR 产物电泳图  
1,3 为核酸酶 SN 和 BN 的 PCR 产物  
2 为 pBR322 Hae III marker

## (二) 核酸酶 BN 及 SN 基因的 PCR 扩增与克隆

以限制性内切酶 HindIII 酶解染色体 DNA,使 DNA 长度变短,易于变性。我们采用煮沸法使其变性后 PCR 扩增,得到了非常满意的结果(见图1)。为了使核酸酶 BN 和 SN 基因能在植物中表达,在实验设计时,我们在核酸酶基因前加了起始密码 ATG。同时,我们在核酸酶 BN 基因的两端加上了 HindIII 位点,PCR 扩增后经 HindIII 酶切与 HindIII 酶切的 pGEM7Z-f(+) 相连,转化 *E. coli*,得到插入有 BN 基因阳性克隆;在核酸酶 SN 基因 5' 端加上了 XhoI 位点,成功地克隆到 pGEM 7Z-f(+) 中。

## (三) 核酸酶 BN 基因及 SN 基因的序列分析

我们采用双脱氧直接进行质粒 DNA 测序,其核酸酶 BN 及核酸酶 SN 基因的核苷酸序列如图2

我们获得的核酸酶 BN 基因与已报道的核酸酶 BN 基因序列<sup>[1]</sup>相比,有两个核苷酸不同,同源性达 99.3%,但核苷酸的变化并不导致氨

### 核酸酶 BN:

```
GCACAGTTATCAACAGTTTGACGGGGTTGGGATTATCTTCAGACATAT
CATAAGCTAAGTATTAATACATTACAAAATCAGAAGCAAGGCGTGGG
TGGGTGGCATCAAAAGGGAAGCTTCAGAGCTGGCTCGGGGAAAGCATC
GGGGAGACATCTTCTCAACAGGGAAGGCAAACTCCGGGCAAAAGCGGA
CGAATATGGGTGAAGCGGATATTAACTATACATCAGGCTTCAGAAATTCA
GACCGGATTCTTTACTCAAGGAGCTGGCTGATTTACAAAACAGGAGCAT
TATCAAACTTTACAAAGTCAGATAA
```

### 核酸酶 SN:

```
GCAACTTCACTAAAAAATTACATAAAGAACTGGAGCTTAATTAAGGG
ATAGATGGTGATACGGTTAAATTAATGACAAAGTCAACCAATGACATTC
AGACTATTATGGTTGATACACTGAAACAAAGCATCTAAAAAGGTGTA
GAGAAATATGGTCTGAAGCAAGTGCAATTTACGAAAAAATGGTAGAAAT
GCAAAGAAAAATTGAAGTGAAGTTGACAAAGGTCAAGAACTGATAAATAT
GGAGCTGGCTTAGGGTATATTTATGCTGATGGAATAATGGTAAAGAGCT
TTAGTTGGTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTACAAOCTAACAAT
ACACATGAACAACCTTTTAAGAAAAAGTGAAGCACAAGCAAAAAAGAGAAA
TTAAATATTGGAGGAGGAGCAAGCTGATTCAGGTCAATAA
```

图2 核酸酶 BN、SN 基因的核苷酸序列

基的改变;获得的核酸酶 SN 基因与已报道的序列<sup>[3]</sup>相比有 4 个核苷酸不同,同源性为 99.1%,其中一个差异导致 His(CAT) → Leu(CTT),氨基酸同源性为 99.3%。

目前,我们已将核酸酶 BN 基因克隆到具有时空特异性的启动子序列——花药特异蛋白启动子的下游,并转化烟草,以构建雄性不育系;将核酸酶 SN 基因分别连接到 TMV 外壳蛋白基因的 5' 端与 3' 端构建成融合蛋白基因并已转化烟草,检测工作正在进行中。

## 参考文献

1. Paddon C J and Hartley R W: *Gene*, 40: 231—239, 1986.
2. Celestina Mariani et al.: *Nature*, 247: 737—741, 1990.
3. David Shortle: *Gene*, 22: 181—189, 1983.
4. Georges Natsoulis and Jef D. Boeke: *Nature* 352: 632—635, 1991.
5. Sambrook J. et al.: *Molecular cloning—A laboratory manual*, second edition 1989.
6. 叶寅等: *科学通报*, 36: 1340—1344, 1991.

## CLONING AND SEQUENCING OF THE NUCLEASE BN AND SN GENE

Liu Yule Ye Yin WeiZhengyu Li Shengguo Kang Liangyi Tian Bo

(*Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing 100080*)

Total DNA of *B. amyloliquefaciens* and *S. aureus* were isolated and cut partially with Hind III Separately, The genes for barnase and for staphylococcal nuclease were obtained by PCR and cloned into pGEM7Z-f(+), The sequencing show that the nucleotide (nt) sequence of the barnase is 99.3% homologous with the previously determined sequence<sup>(1)</sup> and the deduced amino acid (aa) sequence found to correspond precisely to the previously determined sequence; the nucleotide (nt) sequence of the staphylococcal nuclease is 99.1% homologous with the previously determined sequence<sup>(3)</sup> and the deduced amino acid (aa) sequence 99.3% homologous with the previously determined sequence.

These have built basis of making use of special expression or activation of nuclease to produce the male sterility plant by plant gene engineering and to explore new antiviral strategy.

**Key words** Nuclease BN; Nuclease SN; Cloning; Sequencing