



作用于 *cip-cel* mRNA 的核糖核酸内切酶的鉴定

吴莎莎, 李苹, 王娜, 许成钢*

山西大学生物技术研究所, 山西 太原 030006

吴莎莎, 李苹, 王娜, 许成钢. 作用于 *cip-cel* mRNA 的核糖核酸内切酶的鉴定. 微生物学报, 2022, 62(5): 1864–1875.

Wu Shasha, Li Ping, Wang Na, Xu Chenggang. Identification of *Ruminiclostridium cellulolyticum* endoribonuclease specific to *cip-cel* mRNA. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1864–1875.

摘要: 【目的】本研究以革兰氏阳性细菌解纤维素梭菌(*Ruminiclostridium cellulolyticum*)为研究对象, 筛选作用于纤维小体编码基因簇 *cip-cel* mRNA 的核糖核酸内切酶。【方法】通过对预测的 4 个假定编码核糖核酸内切酶基因进行基因敲除、体内过表达、体外过表达和活性分析等方法, 分析它们对 *cip-cel* mRNA 剪切位点的剪切能力。【结果】敲除 *rnc* 和 *rnj* 基因, 对 *cip-cel* mRNA 剪切没有任何影响; 体内过表达 RNase 时能够加速 *cip-cel* mRNA 的降解, 而过表达 RNase G 时, 则结果与野生型对照菌株无异; RNase G 基因 *rng* 和 RNase Y 基因 *rny* 的体外活性鉴定分析, 发现 RNase G 对体外转录的包含 *cip-cel* mRNA 剪切位点的 RNA 没有作用, 而 RNase Y 能够对其进行剪切和降解。【结论】RNase Y 是能够作用于 *cip-cel* mRNA 的核酸内切酶。该研究结果对理解革兰氏阳性细菌核糖核酸内切酶的作用机制, 及其在转录后水平的调控基因差异表达等方面具有重大意义。

关键词: 解纤维素梭菌; *cip-cel* 基因簇; 核糖核酸内切酶; RNase Y

基金项目: 国家自然科学基金(31871252, 31571282); 山西省自然科学基金(201901D211195); 2019 年山西省高等学校优秀青年学术带头人项目

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31871252, 31571282), by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (201901D211195), and by the Program for the Innovative Talents of Higher Education Institutions of Shanxi

*Corresponding author. E-mail: xucg@sxu.edu.cn

Received: 30 September 2021; Revised: 23 January 2022; Published online: 3 March 2022

Identification of *Ruminiclostridium cellulolyticum* endoribonuclease specific to *cip-cel* mRNA

WU Shasha, LI Ping, WANG Na, XU Chenggang*

Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China

Abstract: [Objective] In this study, the endoribonuclease processing the *cip-cel* mRNA encoding cellulosome was identified in *Ruminiclostridium cellulolyticum*. [Methods] The activity of four putative endoribonucleases (RNase III, RNase J, RNase G, and RNase Y) in *cip-cel* mRNA cleavage was analyzed via gene knockout by Clostron, overexpression *in vivo*, overexpression *in vitro*, and activity analysis. [Results] Genes (*rnc* and *rnj*) encoding RNase III and RNase J were disrupted and the resulted mutants did not affect the processing in intergenic region (IR) of the *cip-cel* mRNA. Moreover, RNase G and RNase Y were overexpressed and purified *in vitro*. RNase Y could cleave and degrade the mRNA harboring IR of the *cip-cel* mRNA *in vitro*, while RNase G failed to have any effect on that. Furthermore, overexpression of RNase Y *in vivo* could accelerate the degradation of *cip-cel* mRNA. [Conclusion] The *cip-cel* mRNA is potentially processed by RNase Y. The result helps deepen the understanding of the function of RNase Y in Gram-positive bacteria and the enzyme's regulation of differential gene expression at the post-transcription level.

Keywords: *Ruminiclostridium cellulolyticum*; *cip-cel* operon; endoribonuclease; RNase Y

根据文献报道, 在细菌中发现了许多参与 RNA 剪切的核糖核酸内切酶, 如 RNase E、RNase Y、RNase J、RNase III 和 RNase G 等。RNase E 是革兰氏阴性细菌(*Escherichia coli*)中一种必需的核糖核酸内切酶, 作用于富含 A/T 的单链 RNA 区域^[1], 参与稳定 RNA 的成熟和信使 RNA 的降解^[2]。RNase G 与 RNase E 是同源核糖核酸内切酶, 两者具有较高的序列相似性(60%)和大致相同的序列识别特异性^[3], 在作用中优先选择 5'-单磷酸化底物, 因此生成的单磷酸化中间体会快速降解^[4]。值得注意的是, 革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌有着完全不同的核酸内切酶系统。在革兰氏阳性细菌如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中存在两类核糖核酸内切酶, 一类是 RNase J1/J2, 它们不依赖于 RNA 5'末端结构^[5]; 另一类是依赖于 RNA 5'末端的单磷酸化的 RNase Y^[6]。

此外, RNase III 可结合和切割许多关键转录物中的双链 RNA, 因其在处理转录后的 rRNA 前体以释放成熟的 16S 和 23S rRNA 的作用而闻名^[7-8]。

在自然界中, 微生物进化了许多复杂的纤维素酶系统来降解木质纤维素。其中一种非常高效的酶系统是厌氧微生物, 如解纤维梭菌(*Ruminiclostridium cellulolyticum*)分泌的胞外超分子多蛋白亚基的纤维素酶复合体—纤维小体(cellulosome)^[9]。该蛋白复合体是由多种纤维素酶分子分别通过其锚定域(dockerin)与具有非催化活性骨架蛋白(scaffolding)的黏附域(cohesin)相互作用形成的^[10]。纤维小体的骨架蛋白与关键酶亚基编码基因往往成簇存在^[11], 如 *R. cellulolyticum* 中的 *cip-cel* (包含 12 个基因)。我们前期研究发现, *cip-cel* 中的各个基因以一个转录单位的操纵子形式存在, 通过转录

后水平的选择性 RNA 剪切和保护机制(selective RNA processing and stabilization, SRPS)控制该操纵子内各基因的差异表达^[12], 使其各个亚基之间维持具有最佳酶活的特定比例即化学计量比(stoichiometry), 其中核糖核酸内切酶在该机制中扮演了重要角色。在该机制中, 操纵子转录的初始 RNA 首先被核糖核酸内切酶在特定的切割位点剪切成多个片段, 然后由于剪切产生的各个 RNA 片段在核糖核酸外切酶的作用下具有不同的稳定性, 造成其丰度的差异^[12] (图 1)。本研究通过对 *R. cellulolyticum* 中 4 个预测的编码核糖核酸内切酶的基因(*rnc*、*rng*、*rnj* 和 *rny*)进行敲除和体内与体外活性鉴定等, 筛选到了能够作用于 *cip-cel* mRNA 的核糖核酸内切酶, 为进一步解析纤维小体化学计量比的控制机制提供了一种理论阐释。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pGEX-6p-1、pMTC6^[13]、pMTC9^[12]

和 pSY6^[14]为本实验室保存; 宿主菌株 *E. coli* DH5 α 、表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)和解纤维素梭菌 *R. cellulolyticum* ATCC 35319 均为本实验室保存。*E. coli* 作为常规宿主菌株在 LB (Luria-Bertani) 培养基(蛋白胨 10.0 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, 氯化钠 10.0 g/L) 37 °C 培养。*R. cellulolyticum* 及突变体在 GS-2 培养基(磷酸二氢钾 1.5 g/L, 磷酸氢二钾 2.9 g/L, 尿素 2.1 g/L, 刃天青 0.000 5%, 酵母提取物 6.0 g/L, L-半胱氨酸 0.5 g/L, MOPS 10.0 g/L, 柠檬酸三钠 3.0 g/L, 纤维二糖 3.0 g/L, pH 7.4) 35 °C 厌氧培养。

*Bam*H I、*Sal* I、*Xho* I、*Bgl* II、*Eco*R I、*Mlu* I 和 *Bsr*G I 限制性内切酶、T4 DNA ligase 均购于宝生物工程(大连 TaKaRa)有限公司; DNA Marker、Protein Marker 以及 *Taq* DNA Polymerase 均购于全式金(北京)生物技术有限公司; 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、红霉素(erythromycin, Em)、异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl thiogalactoside, IPTG)、GST-Sepharose4B 亲和层析柱、胰蛋白酶、酵母粉、NaCl 均购于生物

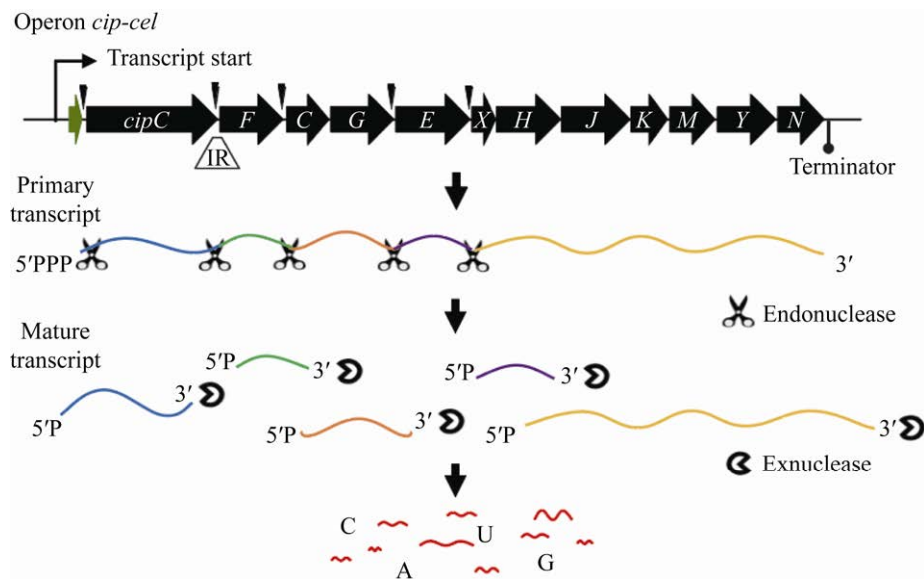


图 1 核酸酶在纤维小体 *cip-cel* 操纵子的转录后调控模式图

Figure 1 The model for regulation of expression of the *cip-cel* operon in the post-transcriptional level.

工程(上海)股份有限公司; PCR 产物纯化试剂盒, DNA 片段胶回收试剂盒, 质粒抽提试剂盒均购于南京诺唯赞生物科技有限公司; HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit 体外转录试剂盒和甲基化酶购自 NEB (NEW ENGLAND BioLabs)公司; Trizol 试剂购于上海翊圣生物科技股份有限公司。

1.2 解纤维素梭菌的电转化

取 0.5 mL *R. cellulolyticum* H10 新鲜菌液接种至 50 mL GS-2 液体培养基中, 35 °C 静置培养 17–24 h 至指数生长中后期($OD_{600}=0.5-0.7$), 置于冰上放置 30 min 使细胞停止生长。在超净工作台将菌液倒入 50 mL 离心管 4 °C、8 000×g 离心 10 min 收集菌体。用冰冷的电转缓冲液(275 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L K_2HPO_4 , pH 6.5)洗涤菌体 2 次, 每次离心 5 min。最后用 1 mL 冰冷的电转缓冲液重悬菌体, 置于冰上备用。在转化解纤维素梭菌之前对构建好的质粒采用 *Msp* I 甲基转移酶进行甲基化。每 200 μ L 感受态细胞加入 1 μ g 甲基化质粒, 充分混匀后转移至 0.2 cm 间隙电转杯中, 冰上放置至少 5 min 后, 设置电转化参数(电压 1.2 kV、电阻 400 Ω 、频率 2 000 Hz)进行电击。随后迅速转移至预热至 35 °C 的无抗生素的 GS-2 培养基中, 静置培养 12 h 后涂布于红霉素(20 μ g/mL)抗性 GS-2 平板, 置于厌氧培养罐中进行倒置培养, 同时放置厌氧产气袋, 培养 5–7 d, 直至长出单克隆。

1.3 突变体构建

通过 Clostron 基因敲除技术^[14], 对 *R. cellulolyticum* 基因组中预测的编码 RNase III、RNase J、RNase Y 和 RNase G 的基因 *rnc* (Ccel_0687)、*rnj* (Ccel_1772)、*rny* (Ccel_0605)和 *rng* (Ccel_1319)进行插入突变。首先在 <http://www.clostron.com/>网站分别设计靶向 4 个基因的特异性内含子引物^[14] (表 1)并委托生工生物工程

(上海)股份有限公司合成, 然后通过 SOE PCR 获得目标内含子基因片段, 最后通过 *Xho* I 和 *Bsr*GI 酶切位点将该片段分别克隆至 pSY6 相应的酶切位点处, 构建敲除质粒 pSY6-*rnc/rnj/rny/rng*。将敲除质粒电转化到 *R. cellulolyticum* 中并涂布于含有 20 μ g/mL 红霉素抗性的 GS-2 固体培养基 35 °C 培养 5–7 d, 转化子用内含子插入位点基因两侧的引物进行 PCR 验证内含子的插入, 突变体相对野生型会变大 900 bp。

1.4 RNase 的体内过表达

以 *R. cellulolyticum* H10 基因组为模板, Ccel_0605_F (*Mlu* I)/Ccel_0605_R (*Bam*H I)和 Ccel_1319_F (*Mlu* I)/Ccel_1319_R (*Bam*H I)为引物(表 1)对编码 RNase Y (Ccel_0605)和 RNase G (Ccel_1319)的基因分别 PCR 扩增获取 *rny* 和 *rng* 基因片段。然后将 PCR 扩增的基因产物分别通过 *Mlu* I 和 *Bam*H I 双酶切克隆至带有 *thl* 强启动子的 pMTC6 载体中, 分别命名为 pMTC6-*rny* 和 pMTC6-*rng*。并将测序正确的表达质粒分别电转化到 *R. cellulolyticum* H10 中, 转化成功的转化子即为体内过表达 RNase Y 和 RNase G 的菌株。

1.5 蛋白过表达与纯化

对 *R. cellulolyticum* H10 中 RNase Y 基因 *rny* (Ccel_0605)和 RNase G 基因 *rng* (Ccel_1319)进行了体外过表达。首先以 *R. cellulolyticum* H10 基因组为模板, Ccel_0605_F/R 和 Ccel_1319_F/R 为引物(表 1)分别 PCR 扩增获取 *rny* 和 *rng* 基因片段。然后将 PCR 扩增基因产物分别通过 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切克隆至 pGEX-6p-1 原核表达载体中, 分别命名为 pGEX-6p-1-*rny* 和 pGEX-6p-1-*rng*。并将测序正确的表达质粒分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)中涂布于 LB 固体培养基上, 挑取单菌落至 5 mL LB 液体培养基(25 mg/L 氨苄青霉素)过夜培养, 将过夜培养菌液以

表 1 本研究所用的引物

Table 1 The primers used in this study

Primers	Primer sequences (5'→3')	References
Ccel_0687_IBS	CCGCTCGAGATAATTATCCTTATTTTCCCATACAGTGCGCCCAGA TAGGGTG	To construct a targeting region for Ccel_0687 by SOE PCR.
Ccel_0687_EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTGAAAATCGATAGAGGAAA GTGTCT	
Ccel_0687_EBS1d	AGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCATACAATTAA CTTACCTTTCTTTGT	
Ccel_1772_IBS	CCGCTCGAGATAATTATCCTTAGTTGCCTTAGCAGTGCGCCCAG ATAGGGTG	To construct a targeting region for Ccel_1772 by SOE PCR.
Ccel_1772_EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTGCAACTCGATAGAGGAAA GTGTCT	
Ccel_1772_EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTTAGCAATTA ACTTACCTTTCTTTGT	
EBS universal primer	CGAAATTAGAACTTTCGTTTCAGTAAAC	
Ccel_0605_F (<i>Mlu</i> I)	CGACGCGTGTGTGTAATAATAATAGTTA	To amplify the gene Ccel_0605
Ccel_0605_R (<i>Bam</i> H I)	CGGGATCCTTATTTTGCATATTCAAT	
Ccel_1319_F (<i>Mlu</i> I)	CGACGCGTATGGTTAATGAGATTATAGTAGATG	To amplify the gene Ccel_1319
Ccel_1319_R (<i>Bam</i> H I)	CGGGATCCCTAATCAGTGTCAATGTCTTTAATT	
Ccel_0687_F	GTGTGTAATAATAATAGTTAA	To validate the mutant of Ccel_0687
Ccel_0687_R	TTATTTTGCATATTCAATAGC	
Ccel_1772_F	GTGTCAAAAAGCAAAAAAA	To validate the mutant of Ccel_1772
Ccel_1772_R	TTATATTTCCATTATAATAGGT	
Ccel_0605_F (<i>Bam</i> H I)	CGGGATCCGTGTGTAATAATAATAGTTA	To amplify the gene Ccel_0605
Ccel_0605_R (<i>Sal</i> I)	GCGTCGACTTATTTTGCATATTCAAT	
Ccel_1319_F (<i>Bam</i> H I)	CGCGGATCCATGGTTAATGAGATTATAGT	To amplify the gene Ccel_1319
Ccel_1319_R (<i>Sal</i> I)	ACGCGTCGACCTAATCAGTGTCAAT	
IR_F (<i>Bgl</i> II)	GGAAGATCTTTATTGAATTTAAATTTTCC	To amplify the DNA fragment of IR
IR_R (<i>Eco</i> R I)	CCGGAATTCTTTACACCTTCCTTATTCTT	
T7 promoter-fbfp_F	TAATACGACTCACTATAGGGATGATAAATGCAAACTTCTTCAGC	To amplify the DNA fragment of <i>fbfp-IR-mcherry</i>
mcherry_R	TTATTTATAAAGTTCATCCATTCCT	
fbfp_F	ATGATAAATGCAAACTTCT	To prepare probe for <i>fbfp</i>
fbfp_R	GCTATACCAGGCTGATCATG	
cipC_F	ATGCGTAAAAAGTCTTTAGCATTTTT	To prepare probe for <i>cipC</i>
cipC_R	TCTGCCAAGTTGATTGGTGAA	

1:100 转接于含 25 mg/mL 氨苄青霉素的 100 mL 液体 LB 中, 180 r/min、37 °C 振荡培养至 $OD_{600}=0.6-0.7$ 。加入 IPTG 16 °C 诱导表达 12 h, 8 000 r/min 离心收集菌体。用 30 mL pH 7.3 PBS 缓冲液重悬菌体, 冰上超声裂解菌体, 13 000 r/min 离心 30 min, 收集上清并上样至经

pH 7.3 PBS 溶液平衡好的 GST-Sepharose4B 亲和层析柱, 用 5-10 倍柱体积的 PBS 平衡缓冲液洗涤, 转用 20 mL 洗脱缓冲液(10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)洗脱目的蛋白。以 12% (质量体积百分比, g/mL) SDS-PAGE 分析, 检测目的蛋白。将目的蛋白

置于透析缓冲溶液 (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0) 中进行脱盐处理, 最后将目的蛋白经超滤浓缩管浓缩并过滤除菌后保存于 -80°C 。

1.6 RNase 体外活性鉴定

为了鉴定核糖核酸内切酶的活性, 我们首先以 *R. cellulolyticum* H10 基因组为模板, IR_F/R 为引物(表 1) PCR 扩增获取 *cip-cel* 操纵子中包含剪切位点的 *cipC* 和 *cel48F* 的基因间隔区(intergenic region, IR)基因片段, 然后将 PCR 扩增基因产物通过 *Bgl* II 和 *EcoR* I 插入到双荧光蛋白报告系统 *fbfp* (编码绿色荧光蛋白) 和 *mcherry* (编码红色荧光蛋白) 之间, 构建成功的重组质粒即 pMTC9-IR。在该系统中, 转录一个 *fbfp*-IR-*mcherry* 的双顺反子 mRNA。然后以 pMTC9-IR 质粒为模板, T7 promoter-*fbfp*_F/*mcherry*_R 为引物(表 1) PCR 扩增获取包含 T7 启动子的 T7-*fbfp*-IR-*mcherry* DNA。取 0.1–0.5 μg 该 DNA 片段为模板, 通过 T7 RNA 聚合酶 (HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit) 进行体外转录。将 4 μg 转录产物在 100°C 下短暂加热 30 s, 然后置于冰上。RNA 在剪切反应缓冲液 (30 mmol/L Tris, 160 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT) 中稀释, 总反应体积为 20 μL 。在添加 0.7 μg GST-RNaseG/GST-RNaseY 蛋白之前加入 10 mmol/L MgCl_2 (终浓度), 并在 37°C 条件下孵育 15 min, 添加 6 \times RNA Loading Buffer (含 40 mmol/L EDTA) 以终止剪切反应。最后将不同的反应混合物通过 Northern blotting 和 6% 尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.7 Northern blotting

取 5 μg *R. cellulolyticum* 总 RNA 或 4 μg 体外剪切反应混合物通过 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析, 然后使用 NorthernMax 试剂盒

(Life Technologies) 将其印迹到带正电荷的尼龙膜 (GE HealthCare) 上并通过紫外交联固定。并采用地高辛-dUTP 随机引物 DNA 标记 (Roche) 的方法制备了靶向 *fbfp* 和 *cipC* 的 DNA 探针, 最后按照说明书利用该探针对 RNA 剪切进行检测。

2 结果与分析

2.1 解纤维素梭菌的核糖核酸内切酶基因预测

以 *E. coli* 为代表的革兰氏阴性细菌中, 主要的核糖核酸内切酶是 RNase E 和 RNase III (图 1A)。以 *B. subtilis* 为代表的革兰氏阳性细菌中, 主要的核糖核酸内切酶是 RNase Y、RNase III 和 RNase J (图 2A)。在对 *R. cellulolyticum* 基因组 BLAST 分析后发现该菌的基因组中存在 4 个核糖核酸内切酶基因 Ccel_0687、Ccel_1772、Ccel_1319 和 Ccel_0605 (图 2B), 分别编码与 RNase III、RNase J、RNase G 和 RNase Y 同源的蛋白质 (相似度分别为 65%、72%、60% 和 80%), 因此分别命名为 *rnc*、*rnj*、*rng* 和 *rny*。

2.2 基因 *rnc* 和 *rnj* 的插入突变

为了筛选能够作用于 *cip-cel* mRNA 的核糖核酸内切酶, 我们首先基于 Clostron^[14] 技术分别构建了靶向插入突变这 4 个基因的重组质粒 (图 3A) 并成功转入到 *R. cellulolyticum* H10 中。由于 Clostron 将在目的基因的靶点处插入约 900 bp 的内含子, 因此我们通过 PCR 分别对这 4 个转化子进行了突变体筛选。结果发现, 只有 *rnc* 和 *rnj* 突变转化子靶点有 PCR 片段比野生型对应 PCR 片段多出大约 900 bp 的克隆存在, 说明在这些克隆目的基因中插入了 Clostron 内含子 (图 3B 和 C)。因此, 我们成功构建了 *rnc* 和 *rnj* 的插入突变体, 分别命名为 H10 Δ *rnc* 和 H10 Δ *rnj*。另一方面, 尽管我们成功构建了靶向

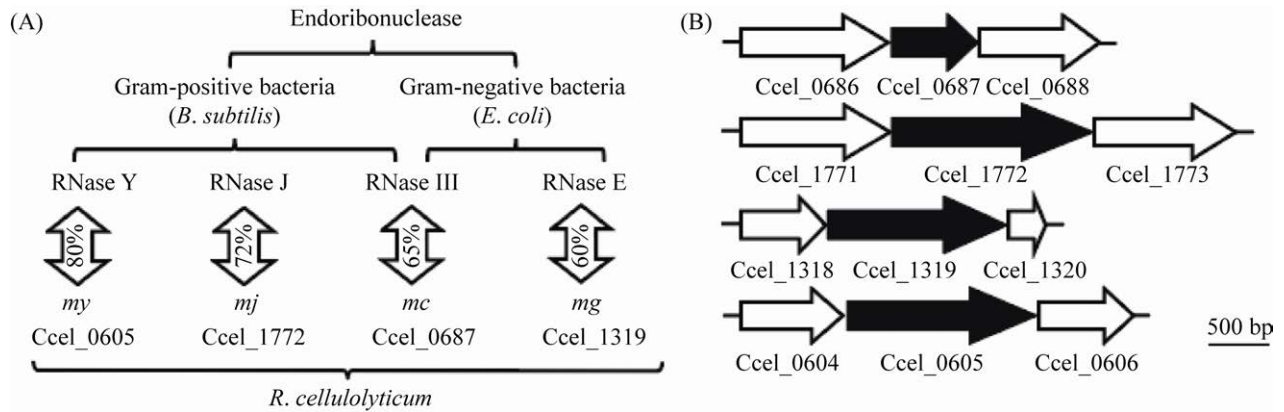


图 2 *R. cellulolyticum* 的核糖核酸内切酶基因预测

Figure 2 Prediction of endonuclease genes of *R. cellulolyticum*. A: bacterial endoribonucleases; B: predicted *R. cellulolyticum* endoribonuclease genes.

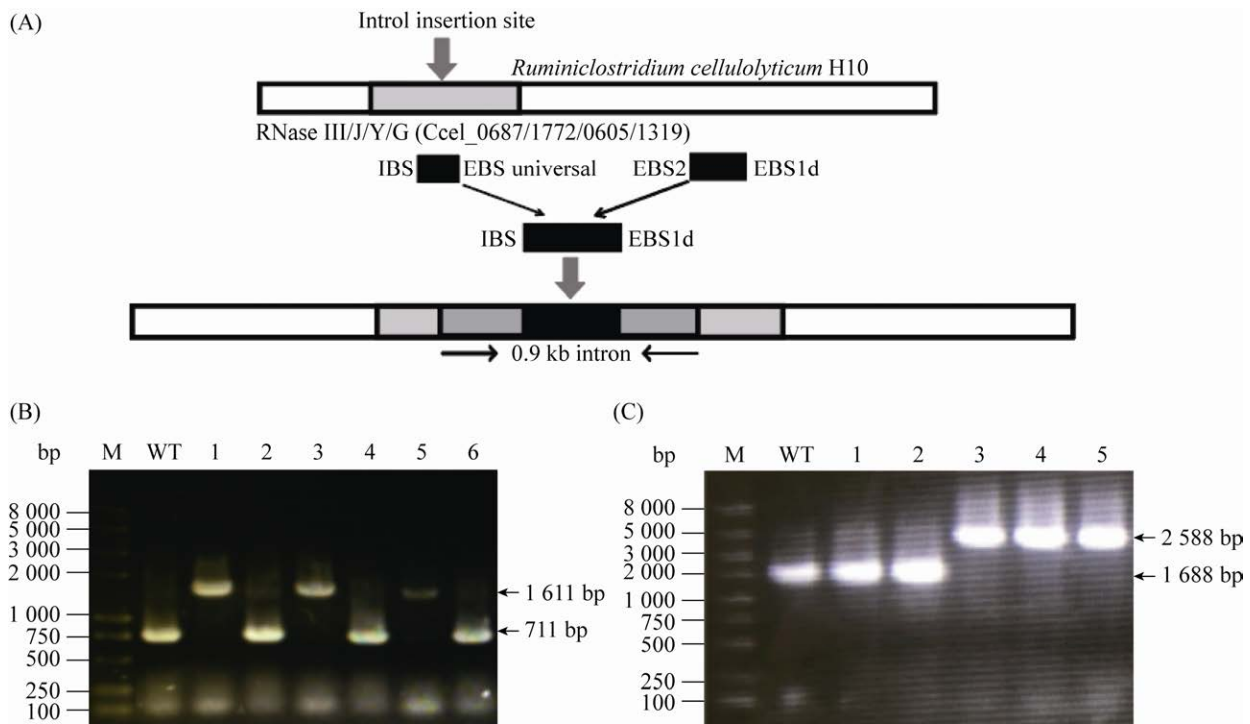


图 3 核糖核酸内切酶的 Clostron 插入突变

Figure 3 Clostron insertion mutation of endoribonuclease genes. A: schematic diagram of Clostron gene knockout; B, C: screening of H10 Δ *rnc* and H10 Δ *rnj* mutants.

rng 和 *rny* 重组质粒, 并将其成功转化至细胞中, 但是无法筛选到 *rng* 和 *rny* 的插入突变体, 我们推测 *rny* 和 *rng* 可能是 *R. cellulolyticum* 的必需基因。

2.3 *rnc* 和 *rnj* 突变体表型分析

在成功构建 *rnc* 和 *rnj* 突变体的基础上, 我们对其是否作用于 *cip-cel* mRNA 进行了功能验证。将含有剪切位点 IR 的重组质粒 pMTC9-IR

(图 4A)导入 *R. cellulolyticum* H10, H10 Δ *rnc* 和 H10 Δ *rnj*。通过 Northern blotting 分析发现, 当使用 *fbfp* 探针分别对野生型菌株的 pMTC9 和 pMTC9-IR 转化子进行检测时, 发现当插入 IR 时, 不仅可以检测到 *fbfp-mcherry* 双顺反子的转录本, 而且还可以检测到发生剪切后的 *fbfp* 单顺反子转录本; 而不含有 IR 的对照中, 仅检测到 *fbfp-mcherry* 双顺反子的转录本(图 4B)。该结果说明 *R. cellulolyticum* 中含有能够剪切 IR 序列的核糖核酸内切酶。另一方面, 在对 H10 Δ *rnc* 和 H10 Δ *rnj* 的 pMTC9 和 pMTC9-IR 转化子进行探测时, 发现它们的实验结果与野生型一致(图 4B)。这说明敲除 *rnc* 和 *rnj* 基因时, 对 IR 序列不发生剪切作用, 即在该间隔区发挥剪切作用的核糖核酸内切酶并不是 RNase III 和 RNase J。

2.4 RNase Y 和 RNase G 的体内过表达分析

我们无法通过 Clostron 技术对 RNase Y 和 RNase G 的编码基因 *rny* 和 *rng* 进行敲除, 因此推测 *rny* 和 *rng* 可能是 *R. cellulolyticum* 的必需基因。为了分析它们的功能, 我们在 *R. cellulolyticum* 体内分别过表达 RNase Y 和 RNase G。首先, 将重组质粒 pMTC6-*rny* 和 pMTC6-*rng* (图 5A)

分别导入 *R. cellulolyticum* H10, 然后通过靶向 *cipC* 的探针对重组菌株进行 Northern blotting 分析。结果显示, 当过表达 RNase G 时, 不仅可以检测到 *cipC-celF* 双顺反子的转录本, 同时也能检测到发生剪切后的 *cipC* 单顺反子转录本, 结果与野生型对照菌株完全一致, 说明 RNase G 过表达对 *cip-cel* mRNA 的剪切无明显影响。而当过表达 RNase Y 时, *cipC-celF* 双顺反子和 *cipC* 单顺反子的转录本条带几乎检测不到, 说明 RNase Y 能够作用于 *cip-cel* mRNA, 其过表达加速了 *cip-cel* mRNA 的降解(图 5B)。

2.5 RNase Y 和 RNase G 的重组表达与纯化

为了进一步在体外验证 RNase Y 和 RNase G 的功能, 我们将这 2 个基因分别克隆至重组表达载体 pGEX-6p-1 中进行了过表达和纯化。通过对重组 RNase Y/RNase G 蛋白表达条件的优化, 分别在 0.5 mmol/L IPTG, 16 °C 诱导 8–12 h 的条件下获得了可溶性表达。并通过 GST-Sepharose4B 亲和层析分别对其进行纯化(图 6A 和 B), 结果表明重组 RNase Y 蛋白的分子量约为 83 kDa, 重组 RNase G 蛋白的分子量约为 80 kDa, 目的条带的大小与预测相符。

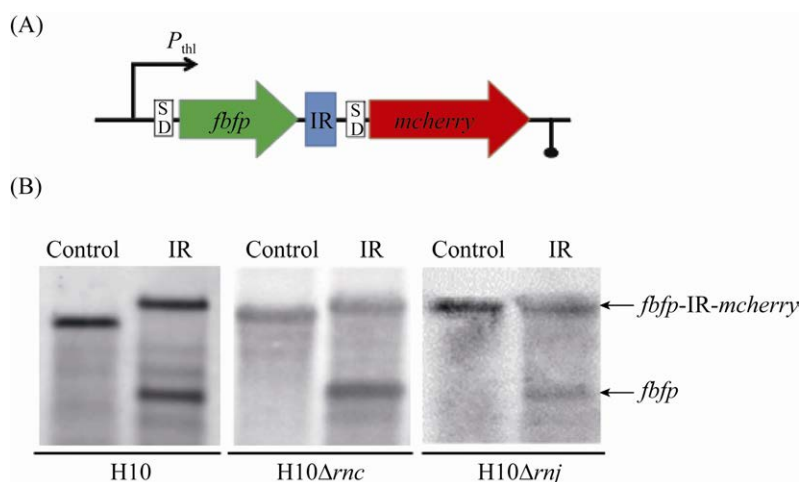


图 4 H10 Δ *rnc* 和 H10 Δ *rnj* 表型分析

Figure 4 Phenotype analysis of H10 Δ *rnc* and H10 Δ *rnj*. A: IR reporting system; B: northern blotting analysis.

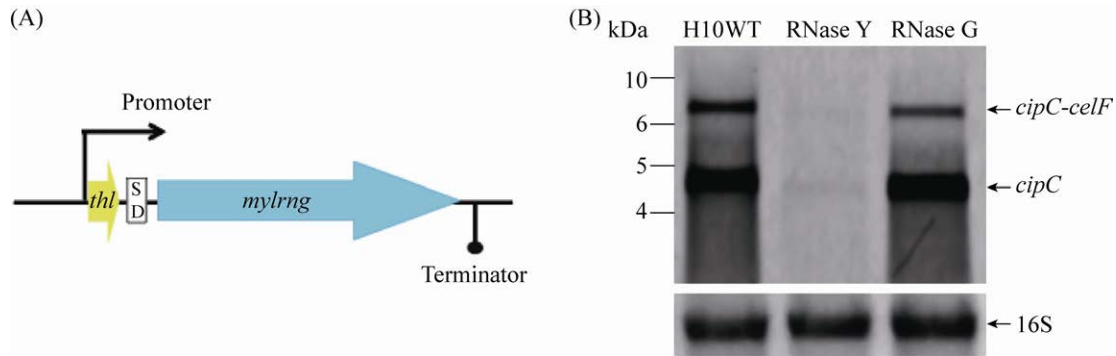


图 5 RNase 的体内过表达表型分析

Figure 5 Phenotype analysis of RNase overexpressed *in vivo*. A: schematic diagram of RNase overexpressed *in vivo*; B: northern blotting analysis.

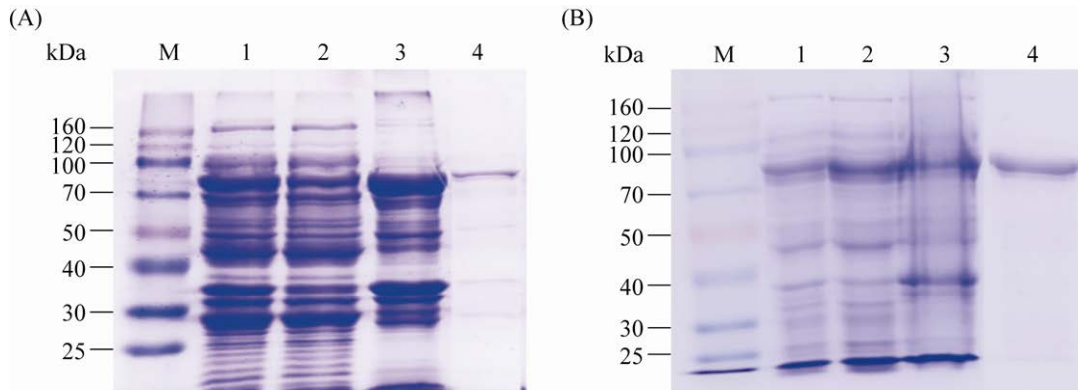


图 6 12% SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达与纯化

Figure 6 12% SDS-PAGE analysis of expression and purification of recombinant protein. A: expression and purification of RNase Y; B: expression and purification of RNase G. M: protein maker; 1: expression products; 2: supernatant; 3: precipitation; 4: elution fraction.

2.6 重组 RNase 的体外活性分析

在实现 RNase Y 和 RNase G 表达纯化的基础上,我们对其进行体外 RNA 剪切实验。首先,通过 T7 启动子体外转录获得了 *fbfp-IR-mcherry* RNA (图 7A), 1% 甲醛变性凝胶电泳显示其大小正确(图 7B)。然后将其分别与纯化的重组 RNase Y/RNase G 孵育, 体外分析其剪切效果。RNase G 的 Northern blotting 结果显示, 仅有一个大约 1.2 kb *fbfp-IR-mcherry* 全长转录本被检测到, 与对照实验的结果一致, 说明 RNase G 在体外对转录的 IR RNA 也没有作用(图 7C)。而 RNase Y 的 Northern blotting 结果显示, 不仅可以检测到

双顺反子 *fbfp-IR-mcherry* 的全长转录本还能检测到单顺反子 *fbfp* 转录本即剪切条带, 这表明 RNase Y 对 IR RNA 有剪切活性即具有内切酶活性。另一方面, 随着孵育时间的增加 *fbfp-IR-mcherry* RNA 条带逐渐变弱, 这表明 RNase Y 对 *fbfp-IR-mcherry* RNA 也具有外切酶活性(图 7D)。同时, 我们将 RNase Y 与 *fbfp-IR-mcherry* DNA 孵育, 结果显示 *fbfp-IR-mcherry* DNA 的条带没有任何变化(图 7E), 说明 RNase Y 是仅能够作用于 RNA 位点的特异性核酸内切酶。此外, 我们还发现当在反应体系中加入 Mg^{2+} 时, 能够促进 RNA 的快速剪切和降解(图 7F)。

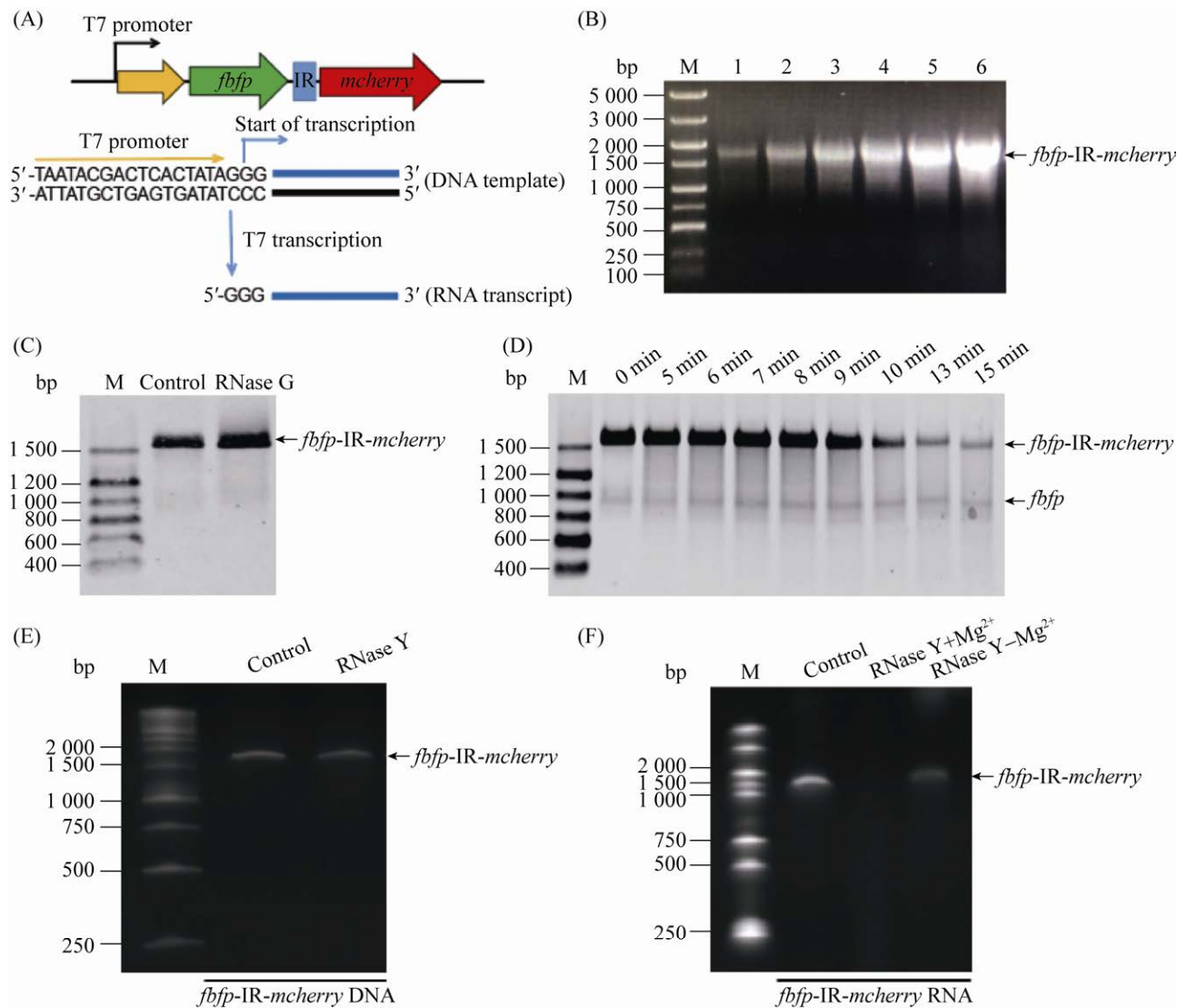


图 7 重组 RNase 的体外活性分析

Figure 7 Activity analysis of recombinant RNases *in vitro*. A: schematic diagram of transcription of *fbfp-IR-mcherry* RNA *in vitro*; B: analysis of transcribed mRNA with different concentrations by formaldehyde denaturing gel electrophoresis; C: northern blotting analysis of cleavage activity of RNase G on *fbfp-IR-mcherry* RNA; D: northern blotting analysis of cleavage activity of RNase Y on *fbfp-IR-mcherry* RNA; E: the effect of RNase Y on *fbfp-IR-mcherry* DNA; F: effect of Mg²⁺ on the activity of RNase Y.

3 讨论与结论

本研究中,我们以 SRPS 调控 *R. cellulolyticum* 的 *cip-cel* 操纵子为切入点,筛选了能够作用于 *cip-cel* mRNA 的核糖核酸内切酶。首先,通过与来源 *E. coli* 为代表的革兰氏阴性细菌和 *B. subtilis*

为代表的革兰氏阳性细菌的核糖核酸内切酶进行序列比对,发现 *R. cellulolyticum* 基因组存在 4 个假定编码核糖核酸内切酶的基因(*rnc*、*rnj*、*rny* 和 *rng*)。利用 Clostron 技术成功获得 *rnc* 和 *rnj* 基因的插入突变体,通过对 H10Δ*rnc* 和 H10Δ*rnj* 表型分析发现 RNase III 和 RNase J 不

作用于 *cip-cel* mRNA。对于基因 *rng* 和 *rny* 编码的 RNase Y 和 RNase G, 通过体外 RNA 剪切实验发现 RNase G 对 *cip-cel* IR 没有任何作用, 而 RNase Y 能够作用于 *cip-cel* IR, 且 Mg^{2+} 能够促进其快速剪切和降解。另外, 在 *R. cellulolyticum* 体内过表达 RNase Y 能够加速 *cip-cel* mRNA 的降解, 而过表达 RNase G 却没有明显变化。因此, 可以认为 RNase Y 是专一性剪切加工 *cip-cel* mRNA 的核糖核酸内切酶。

RNase Y 不仅在我们发现的 *R. cellulolyticum* *cip-cel* 操纵子中发挥功能, 同时负责对许多其他革兰氏阳性菌 mRNA 的剪切加工, 其剪切位点被认为在靠近某些二级结构的富含 AU 的单链区域进行切割^[15]。在 *B. subtilis* 中, RNase Y 在 *gapA* 操纵子 mRNA 的 *cggr* 和 *gapA* 基因间隔区进行切割^[16]; 同时, RNase Y 还在核酸外切酶的模式下与 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)依赖性核糖开关的转换有关^[17]。在 *Staphylococcus aureus* 中, 发现 RNase Y 偏好在鸟苷(G)下游切割 mRNA^[18]且依赖于 RNA 的二级结构^[17], 如在编码毒力调节系统的 *saePQRS* 基因序列中发现 RNase Y 的剪切位点, 该位点位于 *saeP* 和 *saeQ* 之间的基因间隔区且 RNase Y 对其的剪切依赖于剪切位点下游 6 nt 处的一个二级结构^[19]。另外, *Clostridium perfringens* 中编码 *virR-virS* 基因调节子的 mRNA 也可以被 RNase Y 加工和降解^[20]。另一方面, 我们的研究表明, *R. cellulolyticum* RNase Y 不仅具有对特定定位点的专一性内切核酸酶功能, 还具有 5'单磷酸的核酸外切酶功能, 这与报道的 RNase J1 的功能类似, *B. subtilis* RNase J1 在 *thrS* 基因的前导区进行切割使得 *thrS* mRNA 稳定性增加^[21], 其 5'→3'核糖核酸外切酶活性是由 5'单磷酸化底物刺激^[22], 而核糖核酸内切酶活性与序列特异性相关^[23], RNase J1 的这两种活性也被证明对 16S rRNA^[22]

和 scRNA^[24]的稳定加工很重要。同时我们发现 Mg^{2+} 能够促进 RNase Y 对 RNA 的快速剪切和降解, 这在 *B. subtilis* 中 RNase Y^[17]和 *E. coli* 中 RNase III^[8]的切割中也观察到这种现象。

本研究发现 RNase Y 能够作用于纤维小体 *cip-cel* mRNA, 这将有助于我们进一步解析 *cip-cel* 选择性 RNA 剪切和稳定机制, 同时丰富我们对细菌尤其是革兰氏阳性细菌的核糖核酸内切酶的转录后调控角色的认识。

参考文献

- [1] McDowall KJ, Kaberdin VR, Wu SW, Cohen SN, Lin-Chao S. Site-specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops. *Nature*, 1995, 374(6519): 287–290.
- [2] Kushner SR. mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(17): 4658–4665.
- [3] Lee K, Bernstein JA, Cohen SN. RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1445–1456.
- [4] Mackie GA. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature*, 1998, 395(6703): 720–724.
- [5] Commichau FM, Rothe FM, Herzberg C, Wagner E, Hellwig D, Lehnik-Habrink M, Hammer E, Völker U, Stülke J. Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2009, 8(6): 1350–1360.
- [6] Lehnik-Habrink M, Schaffer M, Mäder U, Diethmaier C, Herzberg C, Stülke J. RNA processing in *Bacillus subtilis*: identification of targets of the essential RNase Y. *Molecular Microbiology*, 2011, 81(6): 1459–1473.
- [7] King TC, Sirdeshmukh R, Schlessinger D. RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of *Escherichia coli* pre-23S rRNA. *PNAS*, 1984, 81(1): 185–188.
- [8] Gordon GC, Cameron JC, Pflieger BF. RNA sequencing identifies new RNase III cleavage sites in *Escherichia coli* and reveals increased regulation of mRNA. *mBio*, 2017, 8(2): e00128–e00117.
- [9] Agapakis CM, Boyle PM, Silver PA. Natural strategies

- for the spatial optimization of metabolism in synthetic biology. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(6): 527–535.
- [10] Fierobe HP, Pagès S, Bélaïch A, Champ S, Lexa D, Bélaïch JP. Cellulosome from *Clostridium cellulolyticum*: molecular study of the dockerin/cohesin interaction. *Biochemistry*, 1999, 38(39): 12822–12832.
- [11] Bayer EA, Lamed R, White BA, Flint HJ. From cellulosomes to cellulosomes. *The Chemical Record*, 2008, 8(6): 364–377.
- [12] Xu C, Huang R, Teng L, Jing X, Hu J, Cui G, Wang Y, Cui Q, Xu J. Cellulosome stoichiometry in *Clostridium cellulolyticum* is regulated by selective RNA processing and stabilization. *Nature Communications*, 2015, 6: 6900.
- [13] Cui GZ, Hong W, Zhang J, Li WL, Feng YG, Liu YJ, Cui Q. Targeted gene engineering in *Clostridium cellulolyticum* H10 without methylation. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 89(3): 201–208.
- [14] Shao L, Hu S, Yang Y, Gu Y, Chen J, Yang Y, Jiang W, Yang S. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*. *Cell Research*, 2007, 17(11): 963–965.
- [15] Laalami S, Zig L, Putzer H. Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2014, 71(10): 1799–1828.
- [16] Meinken C, Blencke HM, Ludwig H, Stülke J. Expression of the glycolytic *gapA* operon in *Bacillus subtilis*: differential syntheses of proteins encoded by the operon. *Microbiology: Reading, England*, 2003, 149(Pt 3): 751–761.
- [17] Shahbadian K, Jamalli A, Zig L, Putzer H. RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, 2009, 28(22): 3523–3533.
- [18] Khemici V, Prados J, Linder P, Redder P. Decay-initiating endoribonucleolytic cleavage by RNase Y is kept under tight control via sequence preference and sub-cellular localisation. *PLoS Genetics*, 2015, 11(10): e1005577.
- [19] Marincola G, Wolz C. Downstream element determines RNase Y cleavage of the *saePQRS* operon in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(10): 5980–5994.
- [20] Obana N, Nakamura K, Nomura N. Role of RNase Y in *Clostridium perfringens* mRNA decay and processing. *Journal of Bacteriology*, 2016, 199(2): e00703–e00716.
- [21] Mäder U, Zig L, Kretschmer J, Homuth G, Putzer H. mRNA processing by RNases J1 and J2 affects *Bacillus subtilis* gene expression on a global scale. *Molecular Microbiology*, 2008, 70(1): 183–196.
- [22] Mathy N, Bénard L, Pellegrini O, Daou RL, Wen TY, Condon C. 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell*, 2007, 129(4): 681–692.
- [23] Masuda H, Inouye M. Toxins of prokaryotic toxin-antitoxin systems with sequence-specific endoribonuclease activity. *Toxins*, 2017, 9(4): 140.
- [24] Yao SY, Blaustein JB, Bechhofer DH. Processing of *Bacillus subtilis* small cytoplasmic RNA: evidence for an additional endonuclease cleavage site. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(13): 4464–4473.

(本文责编 李磊)