

孙文, 张永毅, 陆畅, 等. 猪链球菌 2 型核糖核酸酶 III 的克隆表达及催化特性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 46-55.

SUN W, ZHANG Y Y, LU C, et al. Cloning, expression and catalytic properties of ribonuclease III from *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 46-55.

猪链球菌 2 型核糖核酸酶 III 的克隆表达及催化特性分析

孙文¹, 张永毅¹, 陆畅¹, 朱德文¹, 尹媛媛¹, 徐泉明^{1,2*}, 陈叶^{1*}

(1. 福建农林大学动物科学学院 (蜂学学院), 闽台动物病原生物学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002;

2. 福建警察学院, 福建 福州 350007)

摘要: 为了研究猪链球菌 2 型 (SS2) 核糖核酸酶 III (RNase III) 的催化特性, 利用大肠杆菌 BL21 (DE3) 异源表达猪链球菌 2 型 RNase III (SS-RNase III) 并通过镍柱亲和层析的方法分离纯化。异源表达研究显示, 重组蛋白 RNase III 大部分为可溶性表达; 催化特性研究显示, RNase III 主要依赖 Mg²⁺ 或 Mn²⁺ 发挥催化功能, 并在不同离子浓度和 pH 值环境下具有不同的催化活性; 底物特异性研究显示, RNase III 特异性切割长度为 30 bp 的双链 RNA, 同时对内源性的 *rnc* mRNA 和 5S rRNA 具有良好的特异性。上述结果表明, 相较于其他细菌 RNase III, SS-RNase III 具有独特的催化特性, 为深入理解 RNase III 如何介导 SS2 致病机制奠定了基础。

关键词: 猪链球菌 2 型; 核糖核酸酶 III; 原核表达; 催化特性

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)01-0046-10

Cloning, expression and catalytic properties of ribonuclease III from *Streptococcus suis* serotype 2

SUN Wen¹, ZHANG Yongyi¹, LU Chang¹, ZHU Dewen¹, YIN Yuanyuan¹, XU Quanming^{1,2*}, CHEN Ye^{1*}

(1. Fujian and Taiwan Key Laboratory of Animal Pathogenic Biology, College of Animal Sciences (Institute of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Fujian Police College, Fuzhou 350007, China)

Abstract: In order to identify the catalytic properties of RNase III *Streptococcus suis* serotype 2 RNase III (SS-RNase III), we used *Escherichia coli* BL21 (DE3) to heterologously express RNase III of *Streptococcus suis* serotype 2, and the bacterial RNase III was then isolated and purified by nickel column affinity chromatography. Next, various catalytic properties of SS-RNase III were analyzed. The results were that heterologous expression showed most of the recombinant protein RNase III to be soluble, that the catalytic properties showed RNase III mainly relying on Mg²⁺ or Mn²⁺ to perform catalytic functions with different catalytic activities under different ion concentrations and pH environments, that substrate specific analysis showed RNase III to specifically cleave double stranded RNA with a length of 30bp, with good specificity for endogenous *rnc* mRNA and 5S rRNA. The above results indicated that SS-RNase III had unique catalytic properties, which provided theoretical basis for a deeper understanding of how SS-RNase III mediates the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2; ribonuclease III; prokaryotic expression; catalytic properties

猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 是一种人畜共患的革兰阳性兼性厌氧球菌^[1]。猪链球菌 2 型 (SS2) 是诸多血清型中毒力最强、流行最广、临床分离率较高的一种血清型, 宿主感染后往往呈现脑膜炎、心内膜炎、中毒性休克综合征等临床症状^[2]。

为了快速适应环境的变化, 细菌需要调节特定基因的转录以及某些 RNA 的加工、衰变。有研究报道, 核糖核酸酶 (ribonuclease, RNases) 是细菌转录后调控的关键因子, 可以控制各类 RNA 的降解和稳态水平来维持各项生命活动^[3]。在多种细菌中有对 RNases 催化特性和作用进行探究^[4-6], 其中核糖核酸酶 III (RNase III) 是一类双链特异性核糖核酸内切酶, 广泛存在于原核生物和真核生物中^[7]。细菌 RNase III 可以调节自身 mRNA 的合成以及特定 RNA 的降解和成熟^[8], 在对数期生长的大肠杆菌中, 有超过 10% 的 mRNA 稳态水平受 RNase III 调控^[9], 多核苷酸磷酸化酶 (PNPase) 也是一种具有催化切割

收稿日期: 2023-02-14; 修回日期: 2023-10-30

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2023J01272); 福建农林大学科技创新专项 (CXZX2020061A)

第一作者: 孙文, 男, 硕士

* 通信作者: 徐泉明, 实验师, 研究方向为病原微生物致病机理, E-mail: xquanming@126.com; 陈叶, 副教授, 研究方向为人畜共患病病原菌毒力调控机制, E-mail: fafuchenye@163.com。

RNA 功能的外切核糖核酸酶, 研究发现编码 PNPase 的 *pnp* mRNA 和编码 RNase III 的 *rnc* mRNA 均可被 RNase III 催化降解^[10]。在多种细菌研究中发现, RNase III 的催化活性需要金属离子的辅助, 例如大肠杆菌 RNase III 可在 Mg²⁺ 或 Mn²⁺ 催化下选择性识别并切割双链 RNA (dsRNA)^[11]。RNase III 会根据特异性的切割位点切割 dsRNA^[12], 此外切割位点附近的特定碱基配对模式也可能影响 RNase III 的切割效率^[13]。RNase III 往往特异性催化某些天然或合成的 dsRNA, 细菌 RNase III 将多种前体 RNA, 如 rRNA、tRNA 及 sRNA 等加工成为成熟 RNA^[14]。早期研究发现 *Rc mini RNA* 和 *N44 RNA* 能被大肠杆菌和荚膜红杆菌 RNase III 特异性切割^[15]。同时也有研究表明, RNase III 的活性影响某些致病菌的形态, Maeda 等^[16] 研究发现谷氨酸棒杆菌 RNase III 可以催化降解 *mraZ* mRNA 的编码区来维持细胞形态的稳定。RNase III 的活性还影响某些致病菌的毒力性状, 尤其在沙门菌中, RNase III 参与调控生物被膜形成、对宿主定殖和抗生素的敏感性等^[8]。

在模式细菌大肠杆菌和枯草芽胞杆菌的研究中, RNase III 的催化特性已有很多报道, 然而关于链球菌 RNase III 的研究却鲜有报道^[17-18]。猪链球菌是当前

广受重视的人兽共患病原之一, 目前尚未见关于猪链球菌 2 型 RNase III (SS-RNase III) 的研究报道, 因此挖掘其催化特性具有重要意义。本研究对 SS-RNase III 进行了遗传演化分析和二级结构预测, 通过克隆表达 SS-RNase III 并对其表征, 比较与其他种类细菌 RNase III 在底物催化特性方面的异同, 通过比较差异性, 进一步了解猪链球菌 RNase III 底物催化特异性的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

SS2 野生菌株 (05ZYH33) 由浙江大学冯友军教授馈赠, 质粒 pET28a 由本实验室保存。所用菌株大肠杆菌 Top10 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞、体外转录试剂盒 (T7 高效转录试剂盒, 货号: JT101-0) 和 RNA 纯化回收试剂盒均购自北京全式金生物有限公司。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自 Omega 公司。用于 PCR 扩增和体外转录的 RNA 底物引物序列见表 1, 16 mer ssRNA、30 mer ssRNA 及引物由福州铂尚生物科技有限公司合成。

表 1 引物序列

| 引物名称 | 引物序列 (5'→3') |
|------------------------|---|
| <i>rnc</i> | F: AAGAAGGAGATATACCATGGCGCATCATCATCACATGAAAGATTTACATGCAAAAT (<i>Nco</i> I) R: TGTCGACGGAGCTCGAATTCCTATCCTCTAGCCTCCACAGCA (<i>Eco</i> R I) |
| RNA 1.1 | F: TAATACGACTCACTATAGGGGGGAGTAGAGGGACAAACTCAAGGTCATTCGCAAGAGTGGCCTTTATGATTGACCTTCTT R: AAGAAGGTCAATCATAAAGGCCACTCTTGCGAATGACCTTGAGTTTGTCCCTCTACTCCCCCTATAGTGAGTCGTATTA |
| T7-tRNA ^{Ser} | F: TAATACGACTCACTATAGGGGGAGGATTACCCAAGTCCG R: AGGAGGATGTGGGATTCCA |
| T7-5S rRNA | F: TAATACGACTCACTATAGGGTTAAGTGACGATAGCCTAGGAG R: GCTAAGCGACTACCGTATCTAA |
| T7-tRNA ^{Tyr} | F: TAATACGACTCACTATAGGGGGAGAGATAGCGAAGAGGCT R: TGGAGAGAGGGGATTCCA |
| T7- <i>rnc</i> | F: TAATACGACTCACTATAGGGATGAAAGATTTACATGCAAAATTA R: CTATCCTCTAGCCTCCACAGC |
| T7- <i>mg</i> | F: TAATACGACTCACTATAGGGGTGAGAGACTGGTTAAATTTAGAAA R: TTATTCAGCCTTTTCTTGGTCTA |

注: 下划线为酶切处。

1.2 SS-RNase III 遗传进化及二级结构分析

通过在线生物信息学网站 (https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_scan) 预测 RNase III 潜在的氨基酸修饰位点。使用 NCBI BLAST 对包括猪链球菌在内的革兰阳性菌和革兰阴性菌的 RNase III 氨基酸序列进

行同源性比较, 再经多序列比对, 遗传进化树采用 Mega 软件进行绘制。以超嗜热菌 RNase III 蛋白为模板 (PDB: 1yz9) 进行同源建模, 经 ESPript 3.0 分析处理后得到猪链球菌 RNase III 蛋白的二级结构, 所用参考序列见表 2。

表 2 细菌 RNase III 蛋白参考序列

| 细菌 | 拉丁文学名 | 参考序列号 |
|---------|-----------------------------------|----------------|
| 猪链球菌 | <i>Streptococcus suis</i> | WP_012028264 |
| 大肠杆菌 | <i>Escherichia coli</i> | WP_052937583 |
| 肺炎克雷伯菌 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | WP_110231552.1 |
| 铜绿假单胞菌 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | KWX53370 |
| 肺炎链球菌 | <i>Streptococcus pneumonia</i> | WP_000661507 |
| 化脓性链球菌 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | VGQ28384 |
| 无乳链球菌 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | KXA55036 |
| 嗜热链球菌 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | WP_179972032 |
| 金黄色葡萄球菌 | <i>Staphylococcus aureus</i> | ALH99183 |
| 表皮葡萄球菌 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | WP_202595897 |
| 猪葡萄球菌 | <i>Staphylococcus hyicus</i> | WP_039646095 |
| 超嗜热菌 | <i>Aquifex aeolicus</i> | WP_010880583.1 |

1.3 体外转录合成底物 RNA 及纯化

模式底物 RNA: RNA 1.1 以及细菌内源性底物 RNA: 5S rRNA、tRNA^{lys}、tRNA^{ser}、*rnc* mRNA、*rng* mRNA 均利用表 1 中的相关引物经 PCR 扩增及胶回收获得用于体外转录的 DNA 模板, 再通过体外转录试剂盒获取相关 RNA 产物。体外转录反应体系如下: 1 μg 模板 DNA, 4 μL 5×T7 转录反应缓冲液, 8 μL 10 mmol/L NTP Mix, 2 μL T7 转录酶 mix, 无酶水补至 20 μL。充分混匀后于 37 °C 金属浴中反应 2 h, 随后添加 1 μL DNase I, 37 °C 反应 15 min, 最后添加 1 μL 0.5 mol/L EDTA (pH = 8.0) 终止反应, 利用纯化回收体外转录试剂盒回收纯化 RNA 产物, 最后置于 -80 °C 保存。

1.4 重组质粒 pET28a-*rnc* 的构建与转化

以猪链球菌 05ZYH33 基因组 DNA 为模板扩增 RNase III 编码的 *rnc* 基因, PCR 产物经胶回收得到目的 DNA 片段。用 *Nco* I 和 *Eco*R I 对质粒 pET28a 和目的片段进行双酶切。所用体系为: 质粒 pET28a 或目的片段 6 μL, 酶切 Buffer 1 μL, *Nco* I 和 *Eco*R I 各 0.5 μL, 双蒸水补至 10 μL。于 37 °C 水浴酶切 4 h, 酶切产物分别使用清洁回收试剂盒回收。回收产物连接体系如下: 目的基因片段回收产物 6 μL, 质粒 pET28a 酶切回收产物 2 μL, 连接缓冲液 1 μL, 最后加入 T4 DNA 连接酶 1 μL 于 16 °C 金属浴中连接过夜。连接产物转入大肠杆菌 Top10 感受态细胞中, 轻轻混匀后冰浴放置 30 min, 42 °C 水浴热激 90 s, 继续冰浴 2 min, 随后加入 400 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基, 轻轻混匀后于 37 °C、150 r/min 摇床培养 1 h, 取出菌液以 5 000 r/min 离心 1 min, 吸弃 200 μL 上清液后混匀取适量菌液涂布于含卡那霉素的 LB 平板上, 37 °C 培养箱中倒置培养 16 h, 挑取单

菌落于 600 μL 含卡那霉素 LB 培养基 (终浓度为 50 μg/mL) 中, 37 °C 摇床培养 8 h, 菌液 PCR 鉴定为阳性后提取质粒, 再经双酶切鉴定和 DNA 测序无误后, 将重组质粒转化至表达菌株大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。

1.5 SS-RNase III 诱导表达

将阳性菌落转接于 10 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中, 于 37 °C、180 r/min 摇床培养过夜, 以 1% 接菌量至 200 mL 含有卡那霉素 (终浓度为 50 μg/mL) LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 摇床培养, 待菌液 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 加入诱导剂 IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L), 18 °C、150 r/min 继续诱导培养 16 h, 8 000 r/min 离心 10 min 收获菌体沉淀, PBS 洗涤并重悬沉淀, 重悬液高速离心后弃上清液, 重复洗涤 1 次, 收集菌体保存于 -80 °C。

1.6 SS-RNase III 纯化

诱导表达后的菌体用 40 mL PBS 重悬, 冰浴超声破碎菌体细胞 (200 W, 超声 1 s, 间歇 3 s, 时间 10 min), 8 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清液和沉淀 (沉淀用等量 PBS 重悬), 按照 1 : 5 的比例分别加入 6×Loading Buffer 混匀, 煮沸 8 min 将蛋白变性, 经 SDS-PAGE 进行可溶性分析, 检测目的蛋白分别在上清液和包涵体中的表达情况。使用镍亲和层析柱进一步纯化, 再经超滤管替换、浓缩得到更高纯度的 SS-RNase III 蛋白, 最后用 12.5% 的 SDS-PAGE 检测表达量和纯度。

1.7 SS-RNase III 化学交联反应

设置反应体系为 10 μL, 将纯化后的 SS-RNase III 蛋白与不同浓度 (0, 2.5, 5.0, 10.0 μmol/L) 的乙二醇双丁二酰琥珀酸酯 (EGS) 室温进行交联 60 min, 然后添加 50 mmol/L 甘氨酸终止反应。通过 12.5% 浓度的 SDS-PAGE 以及银染显示结果。

1.8 SS-RNase III体外催化反应

1.8.1 金属离子对 SS-RNase III 催化活性的影响

为了探究金属离子对 SS-RNase III 的辅助催化作用, 配制 10 mmol/L 浓度的不同金属离子 (Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+}) 催化反应体系 (反应体系 10 μ L), 其中包含 30 mmol/L Tris-HCl (pH = 7) 1 μ L, 160 mmol/L NaCl 1 μ L, 0.1 mmol/L DTT 1 μ L 和 500 ng RNA 1.1, 最后加入 1 μ mol/L SS-RNase III, 此时开始计时; 另设置 1 组不添加 SS-RNase III 为对照组。37 $^{\circ}$ C 反应 15 min 和 45 min, 加入 10 \times RNA Loading Buffer 终止反应, 通过 20% (含 7 mol/L 尿素) SDS-PAGE 检测催化效果。同时探究不同金属离子浓度对 SS-RNase III 催化活性的影响, 仅更改催化反应体系中金属离子浓度 (0.1、1、5、10、50 和 100 mmol/L), 其余步骤与上述一致, 最后通过 SDS-PAGE 以及银染染色检测催化效果。

1.8.2 pH 值对 SS-RNase III 催化活性的影响

为探究 pH 值对催化活性的影响, 向反应体系中加入相同浓度 (10 mmol/L) 的金属离子, 催化反应体系 pH 值调整为 5、6、7、8、9、10, 其余步骤与 1.8.1 一致, 采用 SDS-PAGE 以及银染检测催化效果。

1.8.3 SS-RNase III 对不同底物 RNA 的催化反应

确定最适反应体系 pH 值为 7, Mg^{2+} 浓度为 10

mmol/L, 向反应体系施加不同类型 RNA 底物 (16 mer ssRNA、30 mer ssRNA、16: 30 dsRNA、30: 30 dsRNA、tRNA^{ser}、tRNA^{tyr}、5S rRNA、*rnc* mRNA 和 *rng* mRNA), SS-RNase III 对底物 RNA 的催化反应过程与 1.8.2 一致。

2 结果

2.1 SS-RNase III 序列分析

首先通过在线分析网站比对确定猪链球菌 05ZYH33 菌株基因组上的 RNase III 氨基酸序列, 同时结合基因组重测序, 结果发现在 05ZYH33 菌株基因组上的 SSU05_1191 和 SSU05_1192 合并为一个开放阅读框, 共同编码 RNase III 蛋白 (图 1)。进一步利用在线软件 Motif Scan 解析 05ZYH33 菌株 RNase III 的氨基酸序列。结果发现, RNase III 氨基酸序列存在 3 个磷酸化位点, 分别为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (41~44 aa、137~140 aa)、蛋白激酶 C 磷酸化位点 (211~213 aa), 以及 1 个 N-酰基化位点 (13~18 aa), 提示了蛋白质磷酸化可能参与调控 RNase III 的活性。如图 2 的结构分析所示, RNase III 包含 2 个结构域 (催化结构域 R III D 和 dsRNA 结合结构域 dsRBD), 主要通过 11 个 α -螺旋和 3 个 β -折叠连接部分卷曲螺旋的方式形成稳定的二级结构, 其中催化基序由 ERLEFLGDA 共 9 个保守氨基酸组合而成。

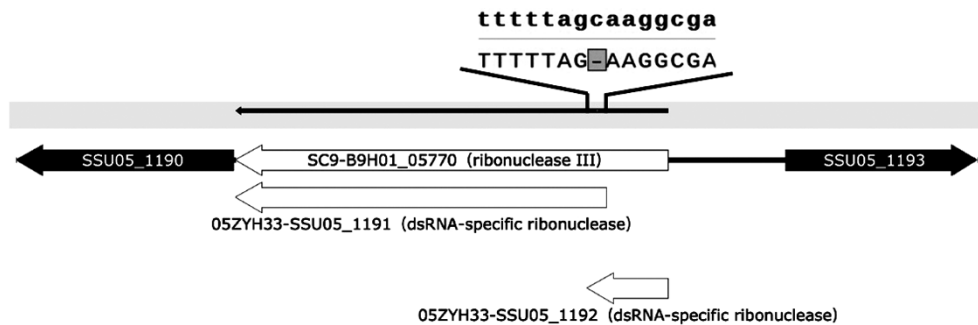


图 1 猪链球菌 05ZYH33 菌株中 *rnc* 基因座示意

2.2 SS-RNase III 同源蛋白比较

选取 3 种链球菌 (无乳链球菌、化脓链球菌、肺炎链球菌)、3 种葡萄球菌 (猪葡萄球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌) 以及 4 种不同的革兰阴性菌 (大肠杆菌、嗜嗜热菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌) 与 SS2 的 RNase III 进行多序列比对分析。

结果显示, 相比于其他细菌, SS2 与 3 种链球菌 RNase III 具有极高的同源性 (图 2)。此外, 遗传进化分析结果显示, SS2 的 RNase III 与所选 3 种链球菌处于相同遗传分支, 其中亲缘关系最近的是肺炎链球菌; 而与选取的 4 种革兰阴性菌亲缘关系最远, 位于不同的遗传分支 (图 3)。

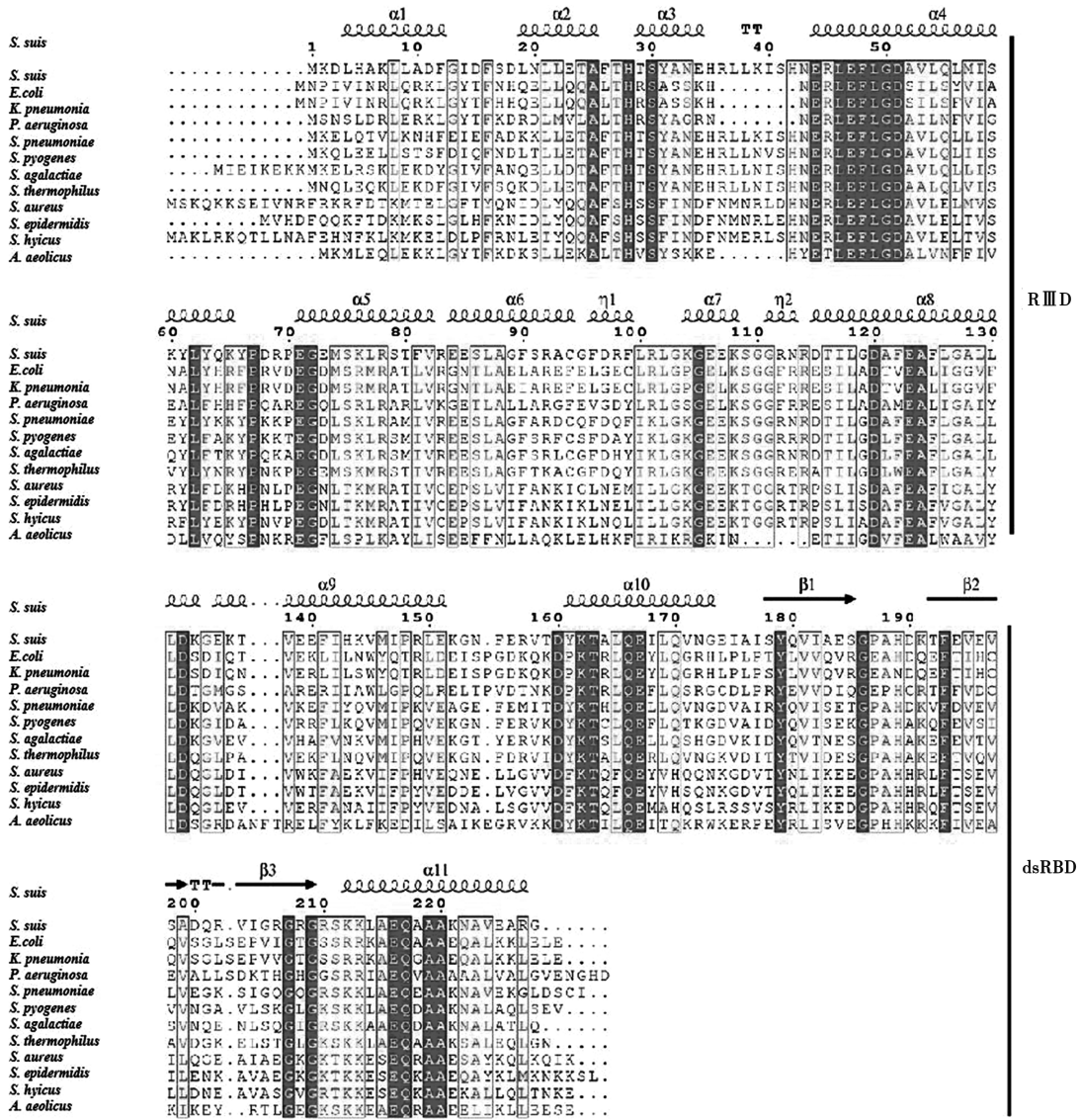
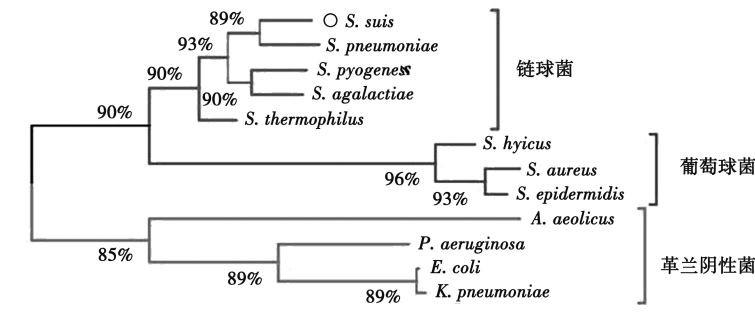


图 2 RNase III 蛋白二级结构分析



注：○为本研究细菌。

图 3 猪链球菌与不同类别细菌的 RNase III 蛋白进化树分析

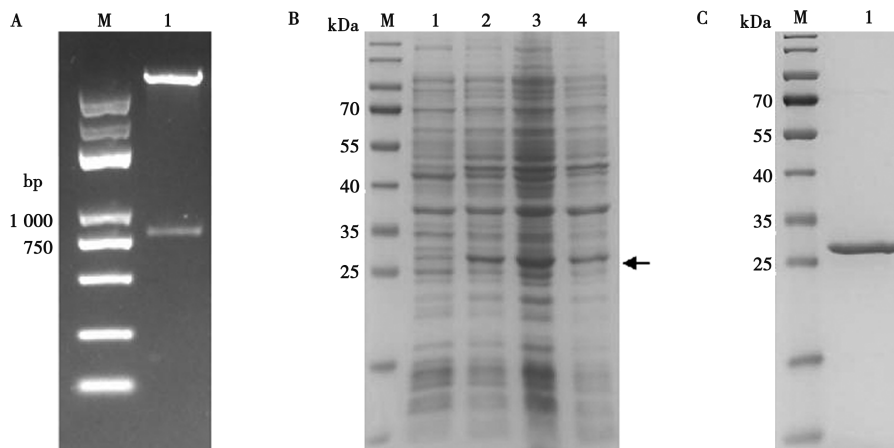
2.3 SS-RNase III 的表达与纯化

通过 PCR 扩增 SS-RNase III 编码的 *rnc* 基因并将其克隆至 pET28a 载体，双酶切 (*Nco* I 和 *Eco*R I) 鉴定，结果条带与预期大小一致 (图 4A)，将该重

组表达载体命名为 pET28a-*rnc*，经 DNA 测序鉴定无误后将该重组表达载体转入表达菌株大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，通过 IPTG 诱导表达 SS-RNase III，SDS-PAGE 分析结果 (图 4B) 显示在 25 kDa 附近出现与

预期蛋白大小一致的差异表达条带。优化表达条件,分析上清液和沉淀,发现在低温且低诱导剂浓度下外源表达的目的蛋白大部分可溶,但仍有部分以包涵体形式存在(图4B)。为了获得纯化的SS-RNase III,利用SS-RNase III蛋白上融合的6×His标签,使用镍

亲和层析柱纯化上清液中的目的蛋白,结合超滤管对纯化的目的蛋白及缓冲液进行浓缩和替换,SDS-PAGE检测显示成功获取高纯度的SS-RNase III(图4C)。

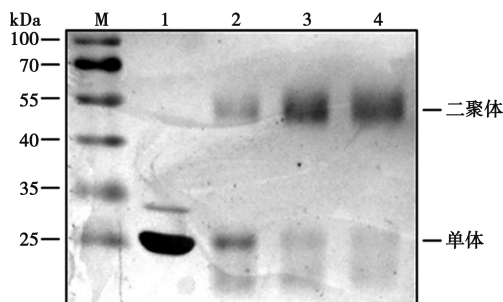


注: A. 对重组质粒 pET28a-rtc 进行双酶切 (*Nco* I 和 *Eco* R I), 其中 M 为 DNA Marker, 1 为重组质粒 pET28a-rtc; B. 重组蛋白 SS-RNase III 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 的诱导表达及可溶性检测, 其中 M 为蛋白 Marker, 1 为未添加 IPTG 条件, 2 为添加 IPTG 并低温诱导条件, 3 为上清液 SS-RNase III 蛋白, 4 为沉淀 SS-RNase III 蛋白; C. 重组蛋白经纯化后 SS-RNase III 的 SDS-PAGE 检测, 其中 M 为蛋白 Marker, 1 为 SS-RNase III。

图4 RNase III的异源表达与纯化

2.4 SS-RNase III的化学交联分析

RNase III内切核糖核酸酶通常作为同源二聚体起作用^[4],为了验证SS-RNase III是否二聚化,将纯化后的SS-RNase III与不同浓度的交联剂EGS共同孵育进行化学交联,SDS-PAGE结果如图5所示,SS-RNase III二聚体会随着EGS浓度的升高而增加,表明SS-RNase III具有与其他RNase III同源物相同的二聚化潜力。



M. 蛋白 Marker; 1. 未添加 EGS; 2. 添加 2.5 $\mu\text{mol/L}$ EGS; 3. 添加 5 $\mu\text{mol/L}$ EGS; 4. 添加 10 $\mu\text{mol/L}$ EGS。

图5 不同浓度 EGS 下 SS-RNase III 的化学交联分析

2.5 SS-RNase III对金属离子的依赖性分析

为了探究SS-RNase III的催化特性,利用在其他

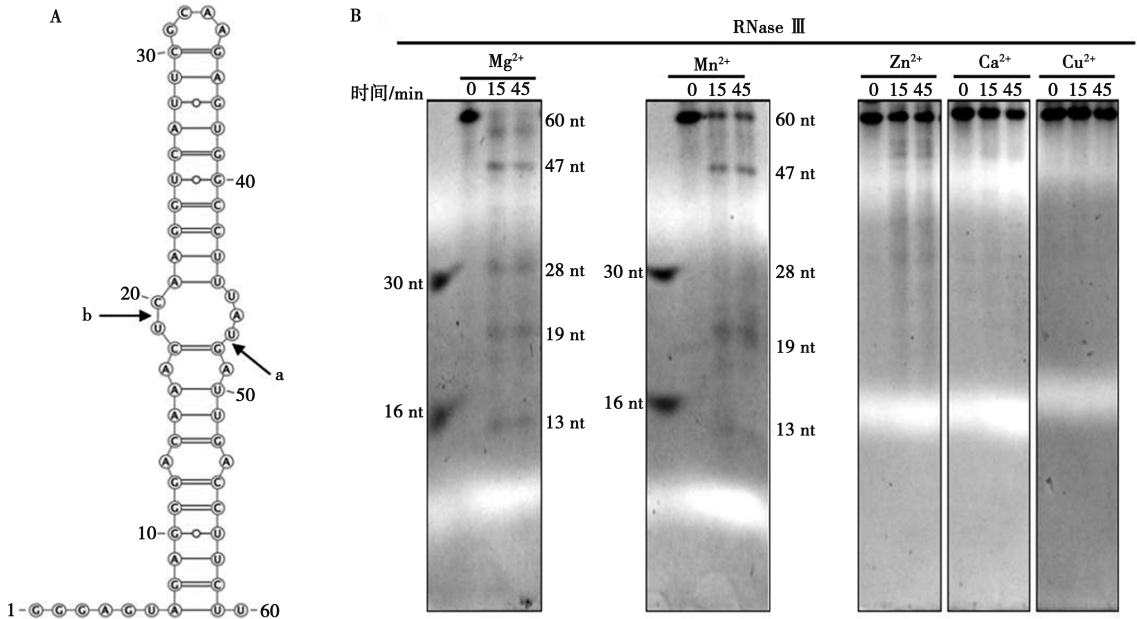
细菌^[4,19]中已有报道的具有双链特性的RNA 1.1作为SS-RNase III的催化底物,如图6A所示,RNA 1.1由1个60 nt大小的RNA分子包含1个不对称(4 nt/5 nt)的内环组成,具有1个一级切割位点(a)和1个二级切割位点(b)。切割a或b单一位点分别产生(13 nt与47 nt)和(19 nt和41 nt)大小的RNA片段,同时切割a和b位点将产生大小为28 nt的RNA片段。

在pH值为7的反应体系中添加10 mmol/L不同的金属离子(Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Cu^{2+})进行催化反应,催化产物经含7 mol/L尿素的20% SDS-PAGE胶检测。结果如图6B所示,仅在添加 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 条件下的SS-RNase III才具有催化活性,能够将完整的60 nt的RNA 1.1切割成不同大小的RNA片段,其中在添加 Mg^{2+} 条件下,出现了大小为28 nt的切割产物,表明 Mg^{2+} 的存在会导致SS-RNase III同时切割RNA 1.1的a和b位点。

进一步通过改变反应体系中 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 的浓度,结果如图7A所示,SS-RNase III的催化切割产物的量会随着 Mg^{2+} 的浓度升高而增多,且浓度达到5 mmol/L时SS-RNase III催化切割活性达到峰值;如图7B所示,SS-RNase III在 Mn^{2+} 存在下的催化切割活性与 Mg^{2+} 类似,在 Mn^{2+} 浓度达到1 mmol/L时其催

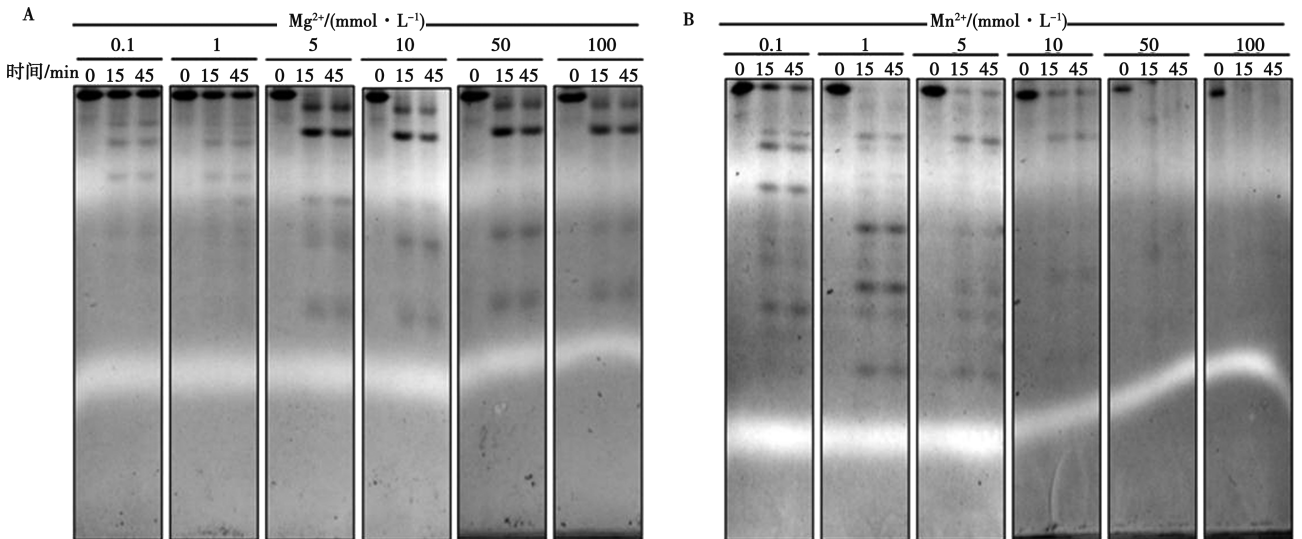
化切割活性达到峰值。对 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 进行比较，发现在 5 mmol/L 同样浓度的 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 体系中，SS-RNase III 催化 RNA 1.1 切割位点不同，产生的小 RNA 片段不同。研究表明，SS-RNase III 作为一

种内切核糖核酸酶发挥作用同样需要金属离子的辅助，而且在不同金属离子体系和反应浓度条件下均显著影响 SS-RNase III 对 RNA 1.1 催化切割位点的偏好性。



注：A. 模式底物 RNA 1.1 二级结构示意图，a 和 b 为 2 个特异性切割位点；B. 添加不同金属离子 (Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+}) 分别作用 0、15、45 min 后检测 SS-RNase III 催化活性变化。

图 6 不同金属离子对 SS-RNase III 催化活性的影响



注：A. 控制反应体系 pH 值不变，添加不同浓度 Mg^{2+} (0.1、1、5、10、50、100 mmol/L) 分别作用 0、15、45 min 后检测 SS-RNase III 催化活性的变化；B. 控制反应体系 pH 值不变，添加不同浓度 Mn^{2+} (0.1、1、5、10、50、100 mmol/L) 分别作用 0、15、45 min 后检测 SS-RNase III 催化活性的变化。

图 7 不同金属离子浓度对 SS-RNase III 催化活性的影响

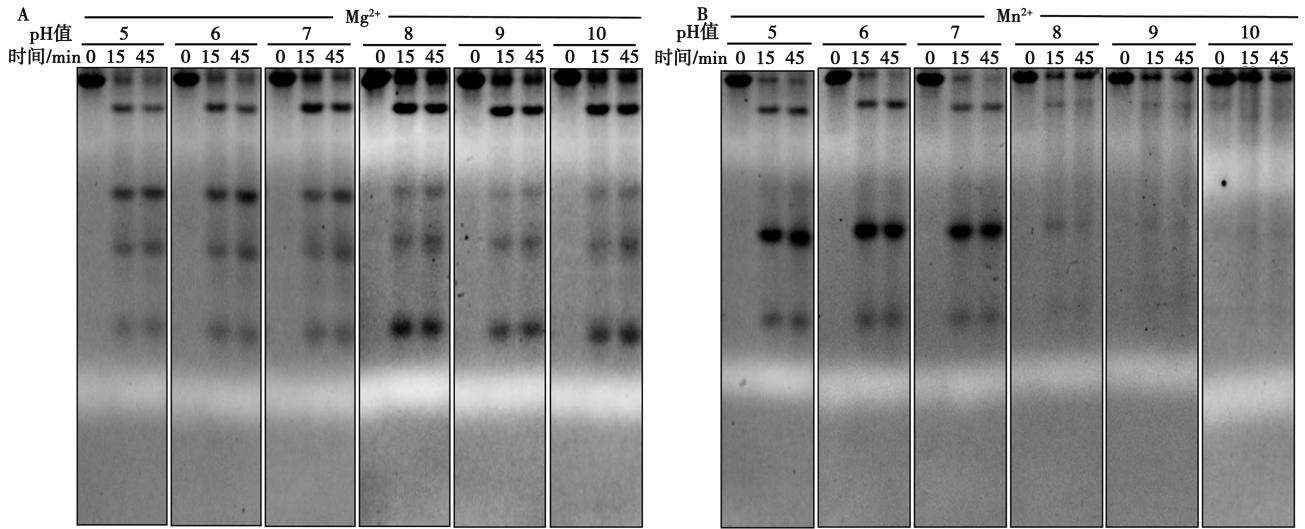
2.6 不同 pH 值对 SS-RNase III 催化活性的影响

在多种细菌研究中发现，不同的 pH 值可以作为

影响 RNase III 催化切割活性的因素，因此我们分析了 SS-RNase III 的催化活性是否也受 pH 值的影响。

结果如图 8A 所示, 在相同浓度 Mg^{2+} (10 mmol/L) 不同 pH 条件下, SS-RNase III 催化切割 RNA 1.1 的位点出现不同。在酸性或中性条件中, SS-RNase III 更倾向于同时切割 RNA 1.1 的 a 以及 b 位点 (28 nt 大小的切割产物条带更明显), 表明在 Mg^{2+} 催化下, 不同 pH 值会影响 SS-RNase III 对底物切割位点的偏好性。然而在相同浓度 Mn^{2+} (10 mmol/L) 不同 pH 值条件下, 如图 8B 所示, SS-RNase III 仅在酸性及中性环境中表现出较高的催化切割活性, 在弱碱性环

境中的催化活性并不突出, 且随着 pH 值升高其催化切割活性逐渐消失。在相同的酸性环境条件下, 比较不同金属离子 Mn^{2+} 与 Mg^{2+} 条件下 RNase III 对 RNA 1.1 的切割位点的偏好, 与添加相同浓度 Mg^{2+} 相比, 在金属离子 Mn^{2+} 催化作用下, SS-RNase III 对 RNA 1.1 的催化切割更偏好 b 位点 (图 8)。研究表明 SS-RNase III 发挥作用时, 不同 pH 值显著影响了 RNase III 对双链特异性 RNA 的催化切割位点的偏好性。

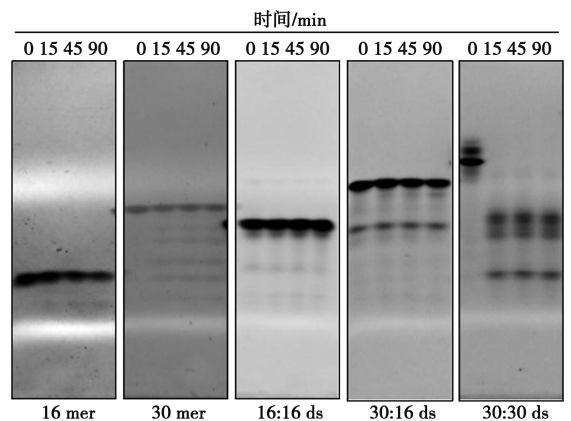


注: A. Mg^{2+} 浓度为 10 mmol/L, 在不同 pH 值 (5、6、7、8、9、10) 下分别作用 0、15、45 min 后检测 SS-RNase III 催化活性的变化; B. Mn^{2+} 浓度为 10 mmol/L, 在不同 pH 值 (5、6、7、8、9、10) 下分别作用 0、15、45 min 检测 SS-RNase III 催化活性的变化。

图 8 不同 pH 值对 SS-RNase III 催化活性的影响

2.7 SS-RNase III 对 dsRNA 的特异性切割作用

为了更深入地探究 SS-RNase III 的催化特征, 利用化学合成单链或双链 RNA 催化底物, 包括 2 个单链 RNA (ssRNA): 16 mer ssRNA 和 30 mer ssRNA, 以及 3 种双链 RNA: 16: 16 dsRNA、30: 16 dsRNA 及 30: 30 dsRNA。在最佳催化反应体系 (10 mmol/L Mg^{2+} , pH = 7) 中添加这 5 种催化底物, 分析 SS-RNase III 催化切割能力。结果如图 9 所示, SS-RNase III 无法催化切割单链 RNA (16 mer ssRNA 和 30 mer ssRNA), 以及底物长度为 16 bp 的 dsRNA (16: 16 dsRNA、30: 16 dsRNA), 但 SS-RNase III 能够充分切割长度为 30 bp 的 dsRNA (30: 30 dsRNA), 并将其切割成特定的分解产物。以上结果表明 SS-RNase III 对 RNA 底物的切割具有双链特异性, 且催化切割 dsRNA 的最小长度要求与已研究报道过的大肠杆菌同源 RNase III 也略有不同。

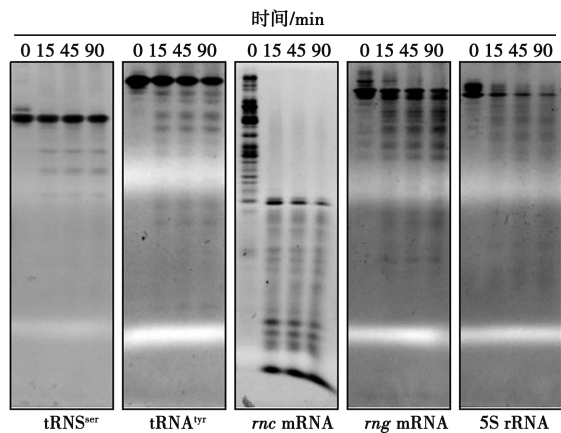


注: 在最适反应条件 (Mg^{2+} 10 mmol/L、pH = 7) 下分别作用 0、15、45、90 min, 检测 SS-RNase III 对不同长度 RNA 底物 (16 mer ssRNA、30 mer ssRNA、16: 16 dsRNA、30: 16 dsRNA、30: 30 dsRNA) 的催化活性。

图 9 针对不同长度单链和双链 RNA 底物催化切割活性分析

2.8 SS-RNase III对不同内源性 RNA 催化切割特性

研究表明细菌 RNase III 具有降解或加工多种内源性 RNA (如 rRNA、tRNA 和 mRNA 等) 的功能^[4]。因此,为了验证 SS-RNase III 对自身编码的内源性 RNA 催化切割特性,本试验通过体外转录的方式获取多种猪链球菌内源性 RNA,包括 1 种 rRNA (5S rRNA)、2 种 tRNA (tRNA^{tyr}、tRNA^{ser}) 以及 2 种 mRNA (*rnc*、*rng*)。结果如图 10 所示,在最适催化条件下 (Mg^{2+} 10 mmol/L、pH = 7),SS-RNase III 对 2 种 tRNA 转录本催化切割效率较弱,可充分催化切割 mRNA (*rnc*),难以切割 mRNA (*rng*),对 5S rRNA 具有一定催化能力。以上结果表明 SS2 多种内源性 RNA 转录本受 SS-RNase III 催化切割能力影响且具有不同的催化效率。



注:在最适反应条件 (Mg^{2+} 10mmol/L、pH = 7) 下分别作用 1、15、45、90 min,检测 SS-RNase III 对 SS2 内源性 RNA (tRNA^{tyr}、tRNA^{ser}、*rnc* mRNA、*rng* mRNA、5S rRNA) 的催化活性。

图 10 SS-RNase III 对 SS2 内源性 RNA 的催化特性分析

3 讨论

近年来,越来越多的研究表明核糖核酸酶 III 作为细菌全局性调控网络的催化因子^[20],具有识别并切割 dsRNA 的功能,在多种细菌中被认为是病原菌致病过程的一种关键因素^[21]。RNase III 作为一种在细菌中广泛存在的金属离子依赖性的双链特异性内切核糖核酸酶,在细菌的生命活动及致病过程中具有重要作用,但只在少数细菌中如大肠杆菌进行了表征和功能研究^[22],并且目前还没有对于猪链球菌 RNase III 的深入研究。本研究对来自猪链球菌 2 型的 RNase III 同源物进行了表征及催化特性分析。

研究发现 SS-RNase III 与已有报道的大肠杆菌 RNase III 催化特性部分相似^[23],只有 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 可以辅助 SS-RNase III 对底物的催化作用,而 Ca^{2+} 同样

不支持催化作用,推测可能与 Ca^{2+} 具有较大的半径和不同的配体配位特性有关^[24]。与苜蓿中华根瘤菌 RNase III^[4] 不同的是,更高浓度 (>5 mmol/L) 的 Mn^{2+} 反而抑制了 SS-RNase III 的催化活性,并且 SS-RNase III 似乎更依赖 Mg^{2+} 的辅助催化作用;而与苜蓿中华根瘤菌 RNase III 类似的是, Mn^{2+} 使得 SS-RNase III 对 b 位点切割更具有专一性。值得注意的是,在其他研究中发现金属离子 (Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 等) 的存在可能会导致非特异性切割位点的产生^[4, 25-26],因此推测,结果中出现的某些非特异性切割产物可能是反应体系中存在的 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 将 RNA 底物片段化所产生的。总体而言,这些发现证实了 SS-RNase III 在模式底物 RNA 1.1 上具有严格金属辅因子依赖性。此外,细胞内 pH 值变化可以影响酶活性,在布鲁菌或芽胞杆菌中,RNase III 只有在 pH 值大于 7 的碱性缓冲液环境中才能表现催化活性^[25, 27],然而在 Mn^{2+} 催化条件下,SS-RNase III 对 RNA 1.1 的催化活性则会随着碱性逐渐加强而消失,因此推测金属离子在不同酸碱环境下调节 SS-RNase III 活性可能有助于细菌应对环境胁迫。此外不同 pH 值催化条件下,SS-RNase III 的底物切割产物也存在差异,因此猜测酸碱环境的变化可能影响了 SS-RNase III 对 RNA 1.1 切割位点的偏好性。RNase III 已被证明能够在体外切割具有双链特征的 RNA,包括细菌自身编码或非编码的 RNA^[28],在大多数细菌如苜蓿中华根瘤菌及大肠杆菌中,RNase III 仅能降解 dsRNA,并且对内源性 RNA 底物表现出不同的偏好^[4],而毛霉菌 RNase III 还可切割单链 RNA^[22]。本研究发现,与大肠杆菌 RNase 类似,SS-RNase III 不能切割外源性的 ssRNA,能够有选择性地催化切割 dsRNA,并且针对不同类型的猪链球菌内源性 RNA (*rnc* mRNA、*rng* mRNA、5S rRNA 和 tRNA) 具有不同的切割效率,表明 SS-RNase III 对内源性的多种 RNA 转录本的加工存在差异性,可为该酶的进一步开发利用提供参考依据。

综上所述,本研究通过克隆纯化得到的 SS-RNase III 具有与其他细菌 RNase III 家族成员相似的催化特征,通常以二聚体的形式存在,具有较严格的金属辅助因子依赖性,能够识别并催化切割部分特定的 dsRNA 结合基序。然而,在催化反应条件或催化 RNA 底物不同时,猪链球菌 RNase III 与其他种类细菌 RNase III 的催化特性存在差异。以上结果为进一步探究 RNase III 在猪链球菌中的调控作用奠定了基础,也为了解 RNase III 在细菌中的催化特性提供了参考依据。

参考文献:

- [1] STAATS J J, FEDER I, OKWUMABUA O, et al. *Streptococcus suis*: past and present [J]. Vet Res Commun, 1997, 21 (6): 381-407.
- [2] OKURA M, OSAKI M, NOMOTO R, et al. Current taxonomical situation of *Streptococcus suis* [J]. Pathogens, 2016, 5 (3): 45.
- [3] SINHA D, FRICK J P, CLEMONS K, et al. Pivotal roles for ribonucleases in *Streptococcus pneumoniae* pathogenesis [J]. mBio, 2021, 12 (5): e0238521.
- [4] SARAMAGO M, ROBLEDI M, MATOS R G, et al. *Sinorhizobium meliloti* RNase III: catalytic features and impact on symbiosis [J]. Front Genet, 2018, 9: 350.
- [5] SHEEHAN L M, BUDNICK J A, FYFFE-BLAIR J, et al. The endoribonuclease RNase E coordinates expression of mRNAs and small regulatory RNAs and is critical for the virulence of *Brucella abortus* [J]. J Bacteriol, 2020, 202 (20): e00240-20.
- [6] DONG Y, TONG H, HU Q, et al. RNase Z oxidative degradation impedes tRNA maturation and is involved in streptococcal translation regulation in response to oxidative stress [J]. Microbiol Spectr, 2021, 9 (2): e0116721.
- [7] DURAND S, CONDON C. RNases and helicases in Gram-positive bacteria [J]. Microbiol Spectr, 2018, 6 (2). DOI:10.1128/microbiolspec.RWR-0003-2017.
- [8] MATOS R G, CASINHAS J, BARRIA C, et al. The role of ribonucleases and sRNAs in the virulence of foodborne pathogens [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 910.
- [9] MOHANTY B K, KUSHNER S R. Enzymes involved in posttranscriptional RNA metabolism in Gram-negative bacteria [J]. Microbiol Spectr, 2018, 6 (2). DOI:10.1128/microbiolspec.RWR-0011-2017.
- [10] BRIANI F, CARZANIGA T, DEHO G. Regulation and functions of bacterial PNPase [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016, 7 (2): 241-258.
- [11] LIM B, SIM M, LEE H, et al. Regulation of *Escherichia coli* RNase III activity [J]. J Microbiol, 2015, 53 (8): 487-494.
- [12] AGUERO-CHAPIN G, PEREZ-MACHADO G, MULL J C, et al. How the protein architecture of RNases III influences their substrate specificity? [J]. Curr Pharm Des, 2016, 22 (33): 5065-5071.
- [13] ALTUVIA Y, BAR A, REISS N, et al. *In vivo* cleavage rules and target repertoire of RNase III in *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46 (19): 10380-10394.
- [14] GONE S, ALFONSO-PRIETO M, PAUDYAL S, et al. Mechanism of ribonuclease III catalytic regulation by serine phosphorylation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25448.
- [15] CONRAD C, EVGUENIEVA-HACKENBERG E, KLUG G. Both N-terminal catalytic and C-terminal RNA binding domain contribute to substrate specificity and cleavage site selection of RNase III [J]. FEBS Letters, 2001, 509 (1): 53-58.
- [16] MAEDA T, TANAKA Y, TAKEMOTO N, et al. RNase III mediated cleavage of the coding region of *mraZ* mRNA is required for efficient cell division in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Mol Microbiol, 2016, 99 (6): 1149-1166.
- [17] LU Y, LEI L, DENG Y, et al. RNase III coding genes modulate the cross-kingdom biofilm of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 957879.
- [18] LE RHUN A, LECRIVAIN A L, REIMEGARD J, et al. Identification of endoribonuclease specific cleavage positions reveals novel targets of RNase III in *Streptococcus pyogenes* [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45 (5): 2329-2340.
- [19] SUN W, JUN E, NICHOLSON A W. Intrinsic double-stranded-RNA processing activity of *Escherichia coli* ribonuclease III lacking the dsRNA-binding domain [J]. Biochemistry, 2001, 40 (49): 14976-14984.
- [20] 孙曼鑫, 葛赛, 卜佳, 等. 大肠杆菌核糖核酸酶调控机制研究 [J]. 生物技术通报, 2022, 38 (3): 234-245.
- [21] AGUADO L C, SCHMID S, MAY J, et al. RNase III nucleases from diverse kingdoms serve as antiviral effectors [J]. Nature, 2017, 547 (7661): 114-117.
- [22] CANOVAS-MARQUEZ J T, FALK S, NICOLAS F E, et al. A ribonuclease III involved in virulence of Mucorales fungi has evolved to cut exclusively single-stranded RNA [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49 (9): 5294-5307.
- [23] SUN W, NICHOLSON A W. Mechanism of action of *Escherichia coli* ribonuclease III. Stringent chemical requirement for the glutamic acid 117 side chain and Mn²⁺ rescue of the Glu117Asp mutant [J]. Biochemistry, 2001, 40 (16): 5102-5110.
- [24] NICHOLSON A W. Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014, 5 (1): 31-48.
- [25] WU C X, XU X J, ZHENG K, et al. Characterization of ribonuclease III from *Brucella* [J]. Gene, 2016, 579 (2): 183-192.
- [26] SUN W, PERTZEV A, NICHOLSON A W. Catalytic mechanism of *Escherichia coli* ribonuclease III: kinetic and inhibitor evidence for the involvement of two magnesium ions in RNA phosphodiester hydrolysis [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33 (3): 807-815.
- [27] YANG L, WANG Y L, DAI J C, et al. Biochemical properties of *Bacillus Calmette Guerin* ribonuclease III [J]. J Basic Microbiol, 2016, 56 (4): 392-404.
- [28] DRUSIN S I, RASIA R M, MORENO D M. Study of the role of Mg²⁺ in dsRNA processing mechanism by bacterial RNase III through QM/MM simulations [J]. J Biol Inorg Chem, 2020, 25 (1): 89-98.