

## S<sub>I</sub> 核酸酶作用与微环 DNA 分子的克隆策略

白艳玲 杨之龙 乔明强 张秀明 周 静 高才昌\*

(南开大学生命科学学院,天津 300071)

**摘 要** 米曲霉来源的 S<sub>I</sub> 核酸酶具有降解单链 DNA 或 RNA 的作用。在适当的条件下,该酶能将不同的环形 DNA 分子从超螺旋转变成开环和线形结构,对质粒 pUC19 的实验证明,S<sub>I</sub> 核酸酶的这种转变作用与加入的酶量呈正相关。在 25 $\mu$ L 总反应体积中,按 100ng DNA 加入 5u 至 17u 的 S<sub>I</sub> 核酸酶,能获得较高比例的线形 DNA。由于微环 DNA 分子太小,单酶切位点的出现率较低,很难用常规方式进行克隆,以 S<sub>I</sub> 核酸酶进行线形化是微环 DNA 克隆的途径。pC3 是已知最小的真核生物线粒体 DNA 类质粒(537bp),经 S<sub>I</sub> 核酸酶线形化后,成功地克隆到 pMD18-T 载体上。

**关键词** S<sub>I</sub> 核酸酶,微环 DNA,线形化,分子克隆

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0240-04

在多数原核生物和一些真核生物中存在主基因组以外的双链环形 DNA 质粒或类质粒<sup>[1-3]</sup>。研究这些额外遗传物质的结构、功能及起源,不仅在探讨遗传物质的构成与生物进化方面有重要的理论意义,而且为生物工程新载体的开发提供可靠的依据和资源。为了研究这些分子的性质,首先必须将其克隆到已知的载体上。通常采用限制性内切酶,将环形目的 DNA 切成线形,然后与适当的载体连接。然而,对于黄瓜线粒体类质粒 pC3 这样的微环 DNA,一方面,核酸分子本身较小,常见限制酶单酶切位点的出现率较低,另一方面,DNA 的二级结构、修饰或其他未知原因对限制性内切酶的活性也有抑制作用,使微环 DNA 难于被消化成线形和进行克隆。所以,在这种情况下需要寻找新的克隆途径。

多年来,米曲霉(*Aspergillus oryzae*)来源的 S<sub>I</sub> 核酸酶对单链 DNA 或 RNA 的降解功能被广泛关注,基于 S<sub>I</sub> 核酸酶的性质开发了 S<sub>I</sub> 核酸酶保护分析法、双链 DNA 末端平滑化等多种分子生物学技术。有文献报道,S<sub>I</sub> 核酸酶能在适当的条件下,随机地在环形超螺旋 DNA 分子上单位点切开单链或双链,使之转变成开环或线形<sup>[4]</sup>。然而,S<sub>I</sub> 核酸酶对超螺旋 DNA 分子的这种作用尚未引起普遍关注,只有少数研究组利用其进行 DNA 形状分析<sup>[5-6]</sup>。

微环 DNA 分子的线形化是其克隆操作中的关键环节。本文以 S<sub>I</sub> 核酸酶对环形 DNA 分子的作用为中心,探索并确定环形 DNA 分子线形化的稳定酶反应条件,为难以被限制性内切酶消化的微环 DNA 分子的克隆建立了一种新的方

法。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

pUC19 为标准质粒,微环 DNA 类质粒 pC3 来源于“津研四号”黄瓜(*Cucumis sativus*)黄化子叶线粒体,所用黄瓜种子由天津市黄瓜研究所提供。

#### 1.2 试剂与酶

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)来源的 S<sub>I</sub> 核酸酶、pMD18-T Vector 及随机引物标记试剂盒购自 TaKaRa Biotechnology 有限公司;dATP、DNA 聚合酶(Taq plus)、X-gal 及 IPTG 购自 Sangon 公司;T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司;三羟甲基氨基甲烷和琼脂糖购自 Promega 公司。

#### 1.3 质粒提取

参照文献[7]碱裂解法大量提取质粒 pUC19;参照文献[8-9]提取黄瓜线粒体总 DNA,样品经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,切下类质粒 pC3 泳带,按文献[10]回收 DNA。

#### 1.4 S<sub>I</sub> 核酸酶作用

以无菌去离子水稀释 S<sub>I</sub> 酶至适当浓度,在 pH 4.6、25 $\mu$ L 总反应体积中含有终浓度 0.03mol/L CH<sub>3</sub>COONa、0.28mol/L NaCl 和 0.01mol/L ZnSO<sub>4</sub>,在 22~23 $^{\circ}$ C 条件下,酶与底物 DNA 反应 15min 后,立即放入冰浴中,并加入 1 $\mu$ L 0.5mol/L EDTA 终止反应。

收稿日期 2002-11-08,修回日期 2002-12-24。

基金项目 国家自然科学基金资助(No.39770414)。

\* 通讯作者。Tel 86-22-23503692;Fax 86-22-23508800;E-mail:gaocc@public.tpt.tj.cn

### 1.5 线形 DNA 的末端加尾

参照文献 [4], 对线形 pC3 进行末端加“ A ”反应。

线形 DNA	2.5 $\mu$ g
10 $\times$ Buffer (含 $Mg^{2+}$ )	5 $\mu$ L
5mmol/L dATP	10 $\mu$ L
(5u/ $\mu$ L) Taq plus	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	加至 50 $\mu$ L

74 $^{\circ}$ C 2h  $\rightarrow$  71 ~ 72 $^{\circ}$ C 2min  $\rightarrow$  酚/氯仿抽提 醋酸钠、无水乙醇沉淀 DNA。

### 1.6 探针标记

依据试剂盒说明, 以纯化的黄瓜线粒体类质粒 pC3 为模板, 按随机引物法合成带  $\alpha$ -<sup>32</sup>P 标记的探针。

### 1.7 Southern 杂交

按标准方法操作。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $S_1$ 核酸酶对 pUC19 的线形化

$S_1$  核酸酶是单链 DNA 或 RNA 的特异性降解酶, 但不同的酶量对底物的作用结果迥然不同, 中等酶量可以在切口或小缺口处切开双链 DNA, 过量的酶可以将双链核酸完全消化<sup>[11]</sup>。在适当的条件下,  $S_1$  核酸酶能将  $\phi$ X174 从超螺旋变成开环和线形<sup>[4]</sup>。为了利用  $S_1$  核酸酶对环形 DNA 的线形化作用, 寻找新的微环 DNA 分子的克隆途径, 我们以 pUC19 为材料, 研究  $S_1$  核酸酶的不同使用量与底物线形化效果的关系, 以确定最佳的  $S_1$  核酸酶对环形 DNA 的线形化条件。

按材料与方法 1.4 中介绍的条件提取 pUC19 DNA, 经酚/氯仿抽提去除蛋白质后将沉淀的核酸溶于无菌水中。在 25  $\mu$ L 总反应体积中, 按每 100ng pUC19 DNA 加入 0.3u 至 17u 不同  $S_1$  核酸酶的酶量进行消化, 样品经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。结果见图 1 所示: 未经任何酶作用的 pUC19 DNA (第 13 泳道) 出现超螺旋和开环两条泳带, 超螺旋的量明显较大。经  $S_1$  核酸酶的作用, pUC19 DNA 的结构发生变化, 在 0.3u 和 0.6u 低酶量组 (第 1 和 2 泳道) 可以观察到超螺旋的量已经减少, 开环结构明显增加, 线形结构隐约可见; 当  $S_1$  核酸酶的酶量加大到 1u 至 17u (第 3 ~ 11 泳道) 时, 随着酶量的加大, 超螺旋逐渐减少, 线形开始显现并逐渐增加, 开环也呈增加趋势, 超螺旋向线形和开环的转变与酶量呈正相关。在每 100ng pUC19 DNA 加入 5u ~ 17u  $S_1$  核酸酶的酶量范围内, 能获得较高比例的线形 DNA。另外, 经  $S_1$  核酸酶作用后所形成的线形 pUC19, 其迁移距离与限制酶消化的线形分子一致, 提示环形 DNA 分子经  $S_1$  核酸酶作用后所形成的线形结构基本保持完整。文献 [4] 根据  $S_1$  核酸酶对  $\phi$ X174 的作用结果指出,  $S_1$  核酸酶先随机地在一个位点切开双链 DNA 中的一条单链, 将超螺旋变成开环, 再在开环的切口处切开另一条单链, 将开环转变成线形<sup>[4]</sup>。这说明经过  $S_1$  核酸酶作用和电泳分离后形成锐带的线形分子, 结构完整, 末端平滑, 回收后可用于克隆。

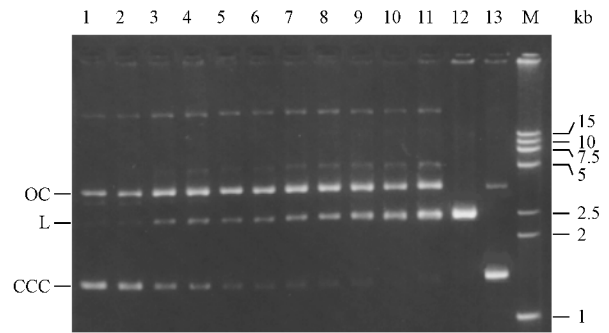


图 1  $S_1$  核酸酶对 pUC19 的作用结果

Fig. 1  $S_1$  nuclease digestion of pUC19 DNA molecules

Electrophoresis was done with 1.2% agarose gel. Lanes 1 ~ 11 were loaded with DNA samples after  $S_1$  nuclease digestion. The amount of enzyme added per 100ng DNA was 0.3u, 0.6u, 1u, 1.5u, 2u, 2.5u, 3u, 4u, 5u, 11u and 17u, respectively. Lane 12 was loaded with DNA sample after *EcoR*I digestion. Lane 13 was loaded with DNA sample not treated with any enzymes. M was DNA marker. CCC, OC and L represents covalently closed circle, open circle and linear conformation, respectively

### 2.2 黄瓜线粒体类质粒 pC3 的线形化

上述结果表明, 在适当的酶量范围内,  $S_1$  核酸酶能将微环 DNA 从超螺旋转变成线形结构。黄瓜线粒体类质粒 pC3 为 550bp 左右的双链环形 DNA 分子, 是目前已知最小的真核生物线粒体 DNA 类质粒<sup>[3, 5, 10]</sup>。由于类质粒 pC3 的分子较小以及未知的二级结构和其他因素的影响, 本研究室曾对纯化的 pC3 进行了大量的限制酶单酶切实验, 均未成功, 所以无法进行常规的克隆。因此, 选择  $S_1$  核酸酶对 pC3 进行线形化。参考  $S_1$  核酸酶作用 pUC19 的反应条件, 在 25  $\mu$ L 总反应体积中, 含有约 200ng 的超螺旋 pC3, 加入 45u 和 15u  $S_1$  核酸酶分别进行实验。图 2 显示, 在 15u  $S_1$  核酸酶实验组中, 超螺旋主要转变成线形, 但仍可见少量开环。在 45u  $S_1$  核酸酶实验组中, 超螺旋和开环完全消失, 只可见少量的线形结构, 说明酶量有些偏大, 经  $S_1$  核酸酶作用形成的线形带很锐, 表明在这个泳带中的 DNA 长度均一, 可以直接克隆这种线形 pC3。

### 2.3 pC3 克隆

超螺旋 pC3 经过  $S_1$  核酸酶线形化作用后, 以 2.5% 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 回收线形 DNA。为了有效地将线形 pC3 与载体连接, 按方法 1.5 对线形 pC3 进行加“ A ”。连接反应按 pMD18-T Vector 产品说明进行。以 *E. coli* JM109 为受体菌, 蓝白斑筛选重组子, 使用限制酶 *EcoR*I 和 *Pst*I 双酶切重组子, 酶切下的插入片段带有 45bp 的一段载体序列, 图 3a 的电泳结果显示, 插入片段的迁移位置与预计的相符。为了进一步鉴定阳性克隆, 以纯化的黄瓜线粒体 pC3 为模板合成探针, 进行 Southern 杂交。图 3b 显示, 酶切的插入片段被探针杂交, 表明克隆的外源片段是 pC3, 核酸序列测定其长度为 537bp, 也与预期结果一致。pC3 的序列已被 GenBank 收录 (收录号: AF522195)。

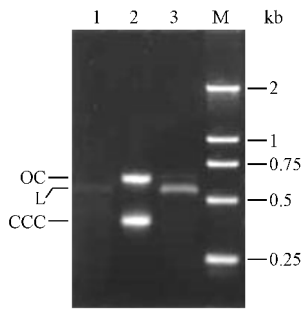


图 2  $S_1$  核酸酶对 pC3 的作用

Fig. 2 Digestion of pC3 DNA by  $S_1$  nuclease

Samples were analyzed by 2.5% agarose gel electrophoresis. 1 and 3. Samples digested with 45u and 15u  $S_1$  nuclease, respectively; 2. sample not treated with any enzymes; M. DNA marker. CCC, OC and L represents covalently closed circle, open circle and linear conformation, respectively

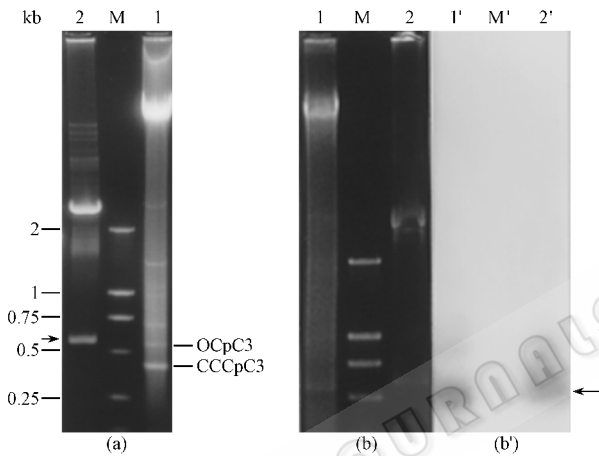


图 3 pC3 重组子鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant pC3 DNA clone

Electrophoresis was done with 1.2% agarose gel. Lane 1 in (a), (a) and (b') are all loaded with the total DNA of cucumber mitochondrium. Lane 2: recombinant pC3 sample after digestion with  $EcoR$ I and  $Pst$ I. The arrow indicates the inserted fragment cut down by restriction enzymes. b' is the Southern hybridization result of b. M: DNA marker (DL2000). CCC and OC represents covalently closed circle and open circle conformation, respectively

根据测定的核酸序列,用已知的单切点限制酶消化类质粒 pC3,仍未切开该分子。序列分析表明 pC3 分子上存在大

量重复序列,这提示 DNA 的二级结构以及可能存在的某些未知修饰抑制了限制性内切酶的作用,使以限制性内切酶线性化为基础的分子克隆无法实施。对于难以用内切酶线性化的双链微环 DNA 分子,尤其是像线粒体类质粒那样需纯化的少量样品,采用以  $S_1$  核酸酶线性化为基础进行克隆是省时而有效的途径。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Hoflack L, Seurinck J, Mahillon J. Nucleotide sequence and characterization of the cryptic *Bacillus thuringiensis* plasmid pGI3 reveal a new family of rolling circle replicons. *J Bacteriol*, 1997, **179**( 6 ): 5000 - 5008
- [ 2 ] Gobbi E, Carpanelli A, Firrao G *et al.* The *Cryphonectria parasitica* plasmid pUG1 contains a large ORF with motifs of family B DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**( 16 ): 3275 - 3280
- [ 3 ] Bengtsson B O and Andersson H. The population genetics of plant mitochondrial plasmids. *J Theor Biol*, 1997, **188**: 163 - 176
- [ 4 ] Wiegand R C, Godson G N and Radding C M. Specificity of the  $S_1$  nuclease from *Aspergillus oryzae*. *J Biol Chem*, 1975, **250**( 22 ): 8848 - 8855
- [ 5 ] Levings III G S, Vasil I K. *The Molecular biology of plant mitochondria*. Netherland: Kluwer Academic, 1995, pp. 61 - 91
- [ 6 ] Goblet J P, Boutry M, Duc G *et al.* Mitochondrial plasmid-like molecules in fertile and male sterile *Vicia faba* L. *Plant Molecular Biology*, 1983, **2**: 305 - 309
- [ 7 ] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. 3<sup>rd</sup> ed, John Wiley & Sons, Inc, 1995
- [ 8 ] Kemble R J, Gunn R E, Flavell R B. Classification of normal and male sterile cytoplasm in maize II. electrophoretic analysis of DNA species in mitochondria. *Genet*, 1980, **95**: 451 - 458
- [ 9 ] Wilson A J, Chourey P S. A rapid inexpensive method for the isolation of restrictable mitochondrial DNA from various plant sources. *Plant Cell Reports*, 1984, **3**: 237 - 239
- [ 10 ] BAI Y I (白艳玲), YANG ZH I (杨之龙), YU G W (于国武) *et al.* Isolation and identification of plasmid-like DNAs in cucumber mitochondria. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis* (南开大学学报), 2002, **35**( 2 ): 97 - 100
- [ 11 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*, A laboratory manual 2<sup>nd</sup> ed, 1989

## The Action of $S_1$ Nuclease and a Cloning Strategy for Microcircular DNAs

BAI Yan-Ling YANG Zhi-Long QIAO Ming-Qiang ZHANG Xiu-Ming ZHOU Jing GAO Cai-Chang\*

( College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071 )

Received: 11-08-2002

This work was supported by Grant from NSF( No.39770414 ).

\* Corresponding author: Tel: 86-22-23503692; Fax: 86-22-23508800; E-mail: gaoc@public.tpt.tj.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

**Abstract**  $S_1$  nuclease ( from *Aspergillus oryzae* ) is a specific enzyme to degrade single stranded DNA or RNA molecules . It has been reported to be able to convert superhelical circular DNA molecules into open circle or linear forms under certain conditions , but this function has not been well explored .

In order to use the action of  $S_1$  nuclease to linearize circular DNA and develop a novel way of cloning microcircular DNAs , the pUC19 was used to investigate the relationship between the linearization efficiency of  $S_1$  nuclease and the amount of enzyme used . By this way the optimal conditions for linearization of circular DNAs by  $S_1$  nuclease would be determined .

0.3u to 17u  $S_1$  nuclease per 100ng pUC19 DNA was added into a  $25\mu\text{L}$  system , respectively , to perform the reaction . The effectiveness of enzyme digestion was realized by electrophoresis in a 1.2% agarose gel . The results showed that along with the increase in enzyme amount from 0.3u to 17u a gradual decrease in the superhelical form , a gradual increase in the linear form and then in the circular form was obvious . The conversion from superhelical form to linear and circular form was directly related to the enzyme amount used . A higher proportion of linear DNA molecules was achieved by using 5 to 17u  $S_1$  nuclease per 100ng DNA . Besides , electrophoretic mobility of the  $S_1$  nuclease-linearized pUC19 was the same as that of the linear form produced by restriction enzyme digestion . According to the result of  $\phi\text{X174}$  digested by  $S_1$  nuclease it has been proposed that the enzyme cleaves first randomly on one site of one strand , thus converting the superhelical molecules into open circle form , and then on the same site of the complementary strand to produce the linear form . Therefore , the  $S_1$  nuclease-linearized DNA molecules are intact in the sense of their length and can be used for cloning .

The plasmid-like DNA pC3 from cucumber mitochondria is a double stranded circular DNA molecule with about 550bp and the smallest known plasmid-like DNA in eukaryotic mitochondria . Many attempts have been made to linearize the molecule by using restriction enzymes but failed . Therefore ,  $S_1$  nuclease was used to linearize pC3 based on the results obtained with pUC19 . The linearized pC3 DNA molecules formed a very sharp band in a 2.5% agarose gel after electrophoresis . They were then recovered from the gel , added an " A " tail and ligated with T-vector . After transformation into *E. coli* JM109 cells , the positive clones were screened by the blue-white selection . The insert was then cut using restriction enzymes *EcoR* I and *Pst* I . The result of electrophoresis shows that the electrophoretic mobility of the insert is just the same as that predicted . A  $^{32}\text{P}$ -labeled probe was synthesized using pC3 as the template and Southern blot analysis was carried out . The result shows that the inserted DNA is hybridized to the probe , which indicates that the cloned DNA fragment is from pC3 . The sequence information of the insert shows that the plasmid-like DNA pC3 was 537bp in length . The nucleotide sequence was deposited in the GenBank ( the accession number is AF522195 ) .

**Key words**  $S_1$  nuclease , microcircular DNA , linearization , molecular cloning