粟酒裂殖酵母 snR41 snoRNA 的鉴定及其结构进化的意义*

岳 强, 周 惠, 屈良鹄
(中山大学 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 采用计算机分析和分子生物学实验的方法, 在粟酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中发现和鉴定了一种新的反义 snoRNA, 命名为 snR41. 与酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* snR41 同源分子比较, 粟酒裂殖酵母 snR41 只具有一个指导 rRNA 核糖甲基化的反义序列. 这一发现进一步揭示了反义 snoRNA 同源分子在一级结构上的多样性, 为研究反义 snoRNA 结构及进化提供了新的线索.

关键词: 粟酒裂殖酵母; snR41; 进化
中图分类号: Q752 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2001) 03-0060-03

snoRNA 基因的移动性及其基因组织的多样性为研究 RNA 基因的起源和进化提供了良好的模式[1]. 反义 snoRNA 同源分子在反义序列的数目和位置的不同, 使得反义 snoRNA 在一级结构上也具有丰富的多样性. 我们曾报道了酵母 Z15 snoRNA 同源分子在结构上的特殊差异, 发现同源 snoRNA 分子之间在指导核糖甲基化位点的反义序列上发生变化, 并指出这种变化可能是 snoRNA 基因重组的结果[2]. 这一现象是否具有普遍性, 则有待对新的 snoRNA 的结构进一步研究. 本文报道我们在粟酒裂殖酵母中发现和鉴定了一个新的反义 snoRNA, 并对这个反义 snoRNA 结构及其进化的意义进行了分析和讨论.

1 材料和方法

1.1 计算机分析

使用 BLASTA 和 FASTA 程序, 对 EMBL 和 Genbank 数据库进行搜索; 再采用 PC gene 6.0 软件包进行进一步的序列鉴别和分析[3].

1.2 DNA 探针和引物

用于 snR41 snoRNA Northen 杂交和逆转录分析的探针和引物的序列为:

SP41: 5′—GATCAGACAAGGCTGAAACTTA— 3′,

探针和引物的 5′端以 γ-^{32}P ATP (北京亚辉公司) 标记.

1.3 酵母总 RNA 的制备

粟酒裂殖酵母菌株 PO27 (SP1) 为本实验室收藏. 酵母于 30 ℃, 在 YEPD 培养基中以 180 r/min 培养至 $A=1.0$, 在 4 ℃以 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体; 经液氮研磨后, 用酸性异硫氰酸胍一步法提取总 RNA.

1.4 总 RNA 的 Northen 杂交和逆转录分析

将 30 μg 酵母总 RNA 以 $\varphi=8\%$ 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至尼龙膜 (amersham) 上, 经紫外交联后用标记的探针进行 Northern 杂交检测. 在逆转录反应的 20 μL 反应体积中, 含有 30 μg 酵母总 RNA、20 ng ^{32}P 标记的引物和 200 μmol/L dNTP. 将反应液于 65 ℃保温 5 min, 冷至 42 ℃后, 加入 200 单位的 MLV 逆转录酶 (GIBCO) 进行 30 min 延伸反应, 产物用 $\varphi=8\%$ 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离.

2 结 果

以计算机对粟酒裂殖酵母基因组数据库进行搜索分析, 在已公布的核酸数据中, 发现了一个 snoRNA 基因候选序列, 命名为 snR41. SnR41 基因候选序列具有 boxC/D 类反义 snoRNA 典型的结构元素 (图 1), 即 5′端含有一个 box C 序列元件 (TGATGA), 3′端含有一个 box D 序列元件 (CTGA). 在 boxC 的上游和 boxD 的下游, snR41 有 6 个核苷酸的反向重复序列 (图中以箭头指示), 可使这个 snoRNA 末端形成较为稳定的二级结构. 此外, 在这个 snoRNA 基因内部还发现有 boxC′和 boxD′结构元素. 在 snR41 snoRNA 基因 3′

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970171); 广东省自然科学基金资助项目 (990242)
收稿日期: 2001-02-10; 作者简介: 岳强 (1968—), 男, 硕士, 讲师; 通讯联系人: 屈良鹄.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

端有一个长度为 17 个核苷酸的反义序列，该反义序列可与 18S rRNA 中一段保守的核苷酸序列互补．根据反义 snoRNA 结构与功能的关系，可推测粟酒裂殖酵母 snR41 snoRNA 具有指导 18S rRNA G1142 核糖甲基化的功能．通过对已知 snoRNA 数据库的比较[4]，发现该反义序列与酿酒酵母 snR41 相同，因而将其命名为粟酒裂殖酵母 snR41 snoRNA．

进一步比较两种酵母 snR41 snoRNA 的序列发现，粟酒裂殖酵母 snR41 序列较短，而且与酿酒酵母 snR41 有很大的差异．特别是，酿酒酵母 snR41 具有两个与 18S rRNA 互补的反义序列，分别指导 18S rRNA A541 和 G1123 的核糖甲基化，而粟酒裂殖酵母 snR41 仅有一个与 18S rRNA 互补反义序列，即指导 18S rRNA G1142 (为酿酒酵母 A1123 的同源位点) 的核糖甲基化 (图 2)．

根据粟酒裂殖酵母 snR41 snoRNA 基因序列，设计合成了一个专一性的寡核苷酸探针和引物

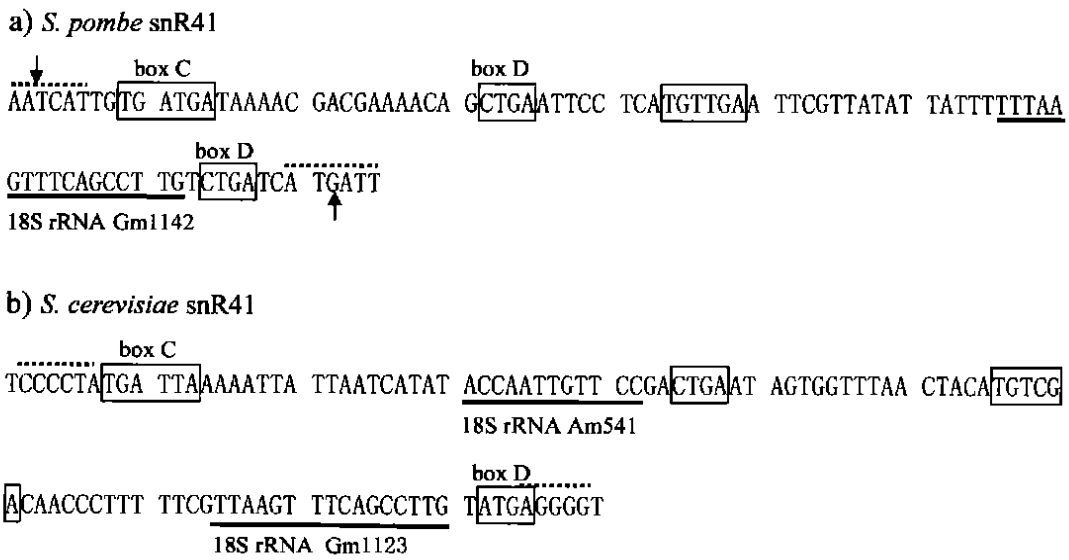

图 1　酵母 snR41 snoRNA 基因序列及结构特征

Fig. 1　The sequence and structural motifs of yeast snR41 gene

指导 rRNA 甲基化的反义序列以下划线标出，末端配对序列以虚线表明，箭头指出粟酒裂殖酵母 snR41 snoRNA 的 5′和 3′末端

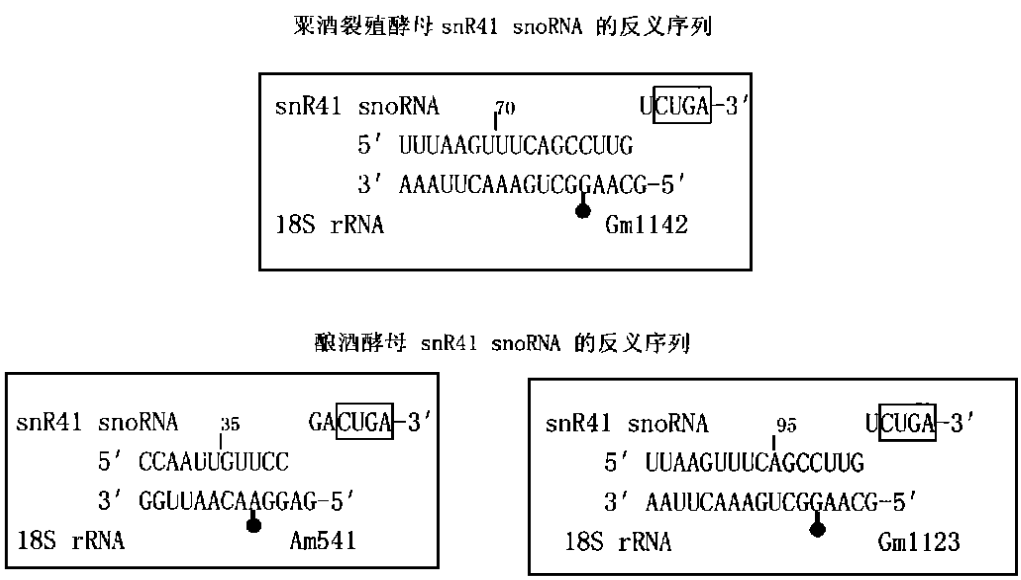

图 2　酵母 snR41 snoRNA 的反义序列及其指导的 rRNA 甲基化位点

Fig. 2　The antisense sequences of yeast snR41 and its methylation targets in rRNA

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

SP41, 对粟酒裂殖酵母 snR41 snoRNA 分子进行实验验证. Northen 杂交结果表明: snR41 snoRNA 分子在粟酒裂殖酵母中稳定存在, 长度为 90 个核苷酸 (图 3a); 用 SP41 引物对酵母总 RNA 进行逆转录分析, 得到唯一 cDNA, 长度为 87 个核苷酸 (图 3b), 表明粟酒裂殖酵母 snR41 snoRNA 具有均一的 5′末端. 同时, 也可以确定 snR41 snoRNA 分子的 5′末端位于 boxC 上游的第 6 个核苷酸处; 而 3′末端则位于 boxD 下游的第 5 个核苷酸处 (见图 1).

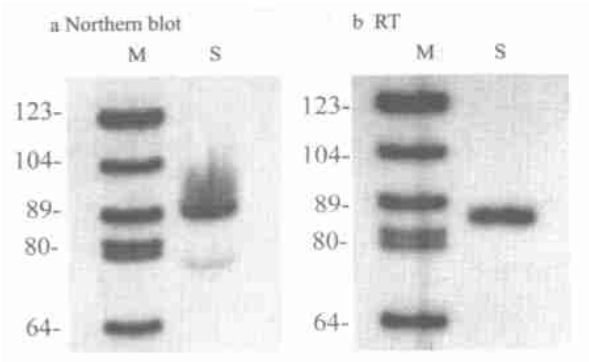

图 3 snR41 snoRNA 的鉴定

Fig. 3 Identification of snR41 snoRNA

M 相对分子质量标准;

S 粟酒裂殖酵母总 RNA

3 讨 论

真核生物 rRNA 中存在大量转录后化学修饰, 2′-O-核糖甲基化是最常见的一种. 2′-O-核糖甲基化大部分发生在十分保守的 rRNA 序列中, 从而可推导出这些位点及其指导这些位点的 snoRNA 的重要性和进化中的保守性. 然而, snoRNA 基因的进化方式, 使得在不同生物中鉴别 snoRNA 同源基因有一定困难. 我们曾报道, 酿酒酵母 Z15 snoRNA 具有两个反义序列, 粟酒裂殖酵母 Z15 也具有两个反义序列, 其中仅有 3′端的反义序列是两种酵母中共有的. 而粟酒裂殖酵母 snR41 虽然与酿酒酵母 snR41 也共有一个 3′端相同的反义序列, 但是 5′端却不存在与 rRNA 配对的反义序列, 即粟酒裂殖酵母 snR41 仅具有一个指导 rRNA 甲基化的功能序列. 这一结果进一步揭示出不同酵母中同源反义 snoRNA 结构上的多样性. 这一多样性的产生不是由于非功能序列的突变积累所造成, 而很可能是由于不同的 snoRNA 基因之间发生重组所致. 因为只有基因重组才可能产生 snoRNA 同源基因中各种反义序列的组合. 最近, 我们在拟南芥和水稻中发现了大批新的反义 snoRNA, 其中也有一些与酵母同源的 snoRNA. 比较分析指出, 在这些同源 snoRNA 中也存在着各种反义序列的组合, 呈现出高度的结构和功能的多样性[5]. 我们推测, snoRNA 基因可能是一种古老的基因, 重组是 snoRNA 基因进化的一种主要方式. 粟酒裂殖酵母 snR41 的鉴定, 进一步揭示了酵母反义 snoRNA 同源分子在一级结构上的多样性, 为研究反义 snoRNA 基因的起源与结构进化提供了新的线索.

参考文献:

[1] 屈良鹄. SnoRNA 基因组织的多样性[A]. 第三届生命科学青年学者学术研讨会[C]. 西安: 第四军医大学出版社, 1998. 8.

[2] 周惠, 岳强, 杜延平, 等. 粟酒裂殖酵母 Z15 snoRNA 的鉴定及结构与功能分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(2): 56—60.

[3] QU L H, HENRAS A, LU Y J, et al., Seven novel methylation guide small nucleolar RNAs are processed from a common polycistronic transcript by Rat1p and RNase III in yeast[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19: 1144—1158.

[4] 岳强, 周惠, 屈良鹄. 酿酒酵母反义 snoRNA 一级结构的分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(1): 68—72.

[5] QU L H, MENG Q, ZHOU H, et al. Identification of ten novel snoRNA gene clusters from *Arabidopsis thaliana*[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(7): 1623—1630.

Identification of snR41 snoRNA from *Schizosaccharomyces pombe*

YUE Qiang, ZHOU Hui, QU Liang-hu

(Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A novel box C/D snoRNA, termed snR41, were identified and characterized from *Schizosaccharomyces pombe*. It was showed by sequence analysis that *S. pombe* snR41 snoRNA shared only a single antisense sequence, which is methylationguide element to 18S rRNA, with its counterpart of *S. cerevisiae*. This result provided further the evidence for the diversity of structure of snoRNA homologues between different yeasts. Gene recombination and its possible role for structural evolution of snoRNA gene were suggested.

Keywords: *Schizosaccharomyces pombe*; snR41; evolution

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net