

文章编号: 0529-6579 (2000) 02-0056-05

粟酒裂殖酵母 Z15 snoRNA 的 鉴定及结构与功能分析*

周 惠, 岳 强, 杜延平, 屈良鹄

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要: 运用计算机及实验的方法, 在粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中发现和鉴定了一个新的、结构特殊的 snoRNA——Z15. 该 snoRNA 由一个独立转录的基因编码, 位于酵母 2 号染色体上. Z15 长达 92 个核苷酸, 属于反义 snoRNA 家族. 它除了具有典型的 boxC/D 结构元素和末端配对区外, 还含有分别与酿酒酵母 Z15 和 Z2 相同的两个反义序列, 反映了粟酒裂殖酵母 Z15 snoRNA 基因可能是通过 2 种 snoRNA 基因的重组而来的. 推测 Z15 除了指导 25S rRNA A849 和 A908 的 2'-氧-核糖的甲基化修饰外, 还可能在 rRNA 构象形成中起作用. 粟酒裂殖酵母 Z15 的发现, 从一个新的角度揭示了 snoRNA 基因结构和功能的复杂性, 并为研究这类 snoRNA 基因的起源和进化提供了重要线索.

关键词: Z15; snoRNA; 粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*); rRNA; 甲基化

中图分类号: Q754 **文献标识码:** A

核仁小分子 RNA (small nucleolar RNA, snoRNA) 的研究是当前真核生物分子生物学的研究热点之一. 大量的实验结果表明它们在真核生物核糖体的生物合成中起重要作用^[1,2]. 根据推算, 一种生物中可能存在许多的 snoRNA 种类. 目前, 在各种真核生物中发现并鉴定的 snoRNA 已超过 240 多个. 如此众多的 snoRNA 在结构和功能及其基因组织等方面都呈现出丰富的多样性. 因此, 继续发现新的 snoRNA, 特别是具有特殊结构和功能的 snoRNA, 对研究 snoRNA 基因的起源, 结构与功能的进化等都具有十分重要的意义.

粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 属酵母科裂殖酵母属, 与酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 有较大的亲缘关系. 但是, 许多研究表明其基因结构和基因的表达调控与酿酒酵母有所不同, 与高等动物却有一定的相似性^[3]. 因此, 在研究真核生物基因的表达和调控方面被认为是一个良好的模式生物. 近年来, 粟酒裂殖酵母基因组计划进展十分迅速, 大量的基因不断地被发现和鉴定. 然而, 对粟酒裂殖酵母的 snoRNA 研究却很少, 迄今为止仅报道了 U3、U14、snR38 和 snR39 4 种与酿酒酵母同源的 snoRNA 基因. 由于大量的粟酒裂殖酵母 DNA 序列积累在数据库中, 为研究粟酒裂殖酵母的 snoRNA 基因提供了良好的基础. 本文报道我们在粟酒裂殖酵母中发现和鉴定了一个新的 snoRNA——Z15, 并对

* 基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (39730300); 国家教育部重点基金资助项目

收稿日期: 1999-10-15 作者简介: 周 惠 (1953~), 女, 副教授.

Z15 的结构与功能进行了分析和讨论.

1 材料与方法

1.1 计算机分析

通过 Internet 联网, 使用 BLAST 和 FASTA 程序, 对 EMBL 和 Genbank 的数据库进行搜索. 核酸分子数据的输入和进一步的序列鉴别、分析均采用 PC gene 6.0 软件包.

1.2 DNA 探针和引物

用于 Z15 snoRNA 逆转录和 Northern 杂交分析的探针和引物 SP15 的序列为 5' TCTCA-GACTGACGTGCAAATCAG 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 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 °C, 180 r/min 在 YEPD 培养基中培养至 $A = 1.0$. 于 4 °C 以 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体. 液氮研磨后, 用酸性异硫氰酸胍一步法提取总 RNA^[4].

1.4 RNA 分析

将 30 μ g 酵母总 RNA 以 $\rho = 8\%$ 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探针进行杂交检测. 在逆转录反应的 20 μ L 反应体积中, 含有 30 μ g 总 RNA, 20 ng 32 P 标记的引物和 200 μ mol/L dNTP. 将反应液于 65 °C 保温 5 min, 冷至 42 °C 后, 加入 200 个单位 MLV 逆转录酶 (GIBCO) 进行 30 min 延伸反应. 产物用 $\rho = 8\%$ 变性聚丙烯酰胺凝胶分离. 纯化的 cDNA 以末端转移酶 (promega) 对其 3' 末端加 G 尾, 然后以 polyC16 和 SP15 为引物进行 PCR 扩增. 扩增产物经分离纯化后, 用 Klenow DNA 聚合酶补平, 再克隆至 pTZ19 载体上. 以标记的 SP15 和 polyC16 为探针对克隆子进行原位杂交和质粒杂交鉴定. 采用 Pharmacia DNA 测序试剂盒和 35 S-dATP 标记方式, 直接测定重组质粒的 DNA 序列.

2 结 果

运用计算机对国际基因数据库进行搜索分析, 我们在粟酒裂殖酵母 2 号染色体上发现 1 个 snoRNA 基因候选序列, 命名为 Z15 DNA (图 1).

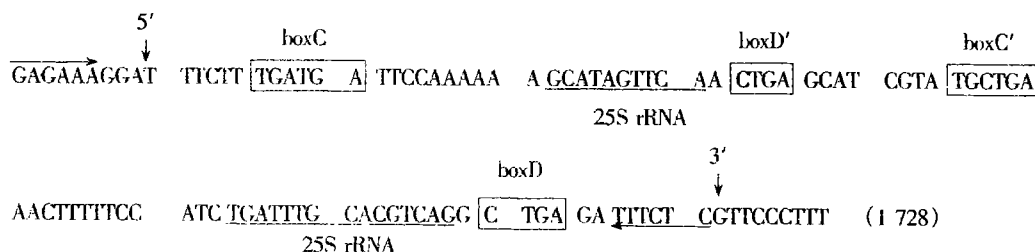


图 1 Z15 snoRNA 基因序列及结构特征

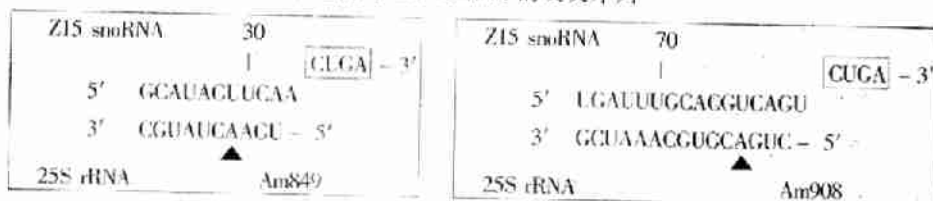
Fig.1 The sequence and structural motifs of Z15 snoRNA gene

Z15 snoRNA 的编码区以箭头指出, 括号中的数字为粟酒裂殖酵母第 2 号染色体的 cosmid CID7 的序号号

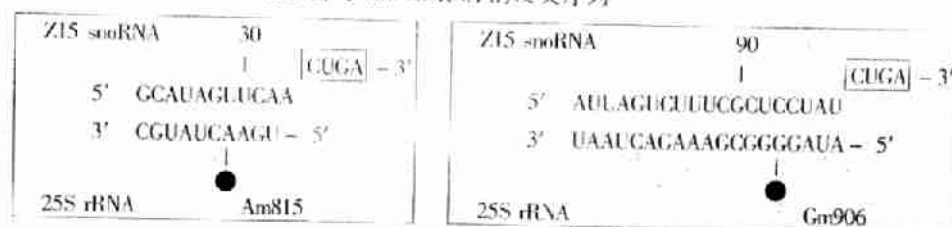
该序列位于 2 个转录方向相反的蛋白质基因之间的 1.2 kb 间隔区中. 同时, 在 snoRNA 编码区上游 60 个核苷酸处有一个 TATA box 元素, 因此有可能为一独立转录的基因. Z15 DNA 具有典型的 boxC/D 类 snoRNA 基因结构元素和末端配对区; 即 5'端含有一个 boxC

(TGATGA), 3'端含有一个 boxD (CTGA), 在 boxC 的上游和 boxD 的下游分别有一段长 6 个核苷酸的反向重复序列(以箭头指示), 可以使该基因的转录产物形成较为稳定的二级结构。Z15 DNA 具有的一个特别的结构为: 在序列中部还含有一个 boxD' (CTGA) 和 boxC' (TGCTGA), 在 boxD' 和 boxD 的上游都有一段与 25S rRNA 互补的反义序列, 其长度分别为 10 和 15 个核苷酸。由于该 snoRNA 5'端的反义序列与酿酒酵母 Z15 完全相同(图 2)^[5,6], 因此命名为粟酒裂殖酵母 Z15 snoRNA。

粟酒裂殖酵母 Z15 snoRNA 的反义序列



酿酒酵母 Z15 snoRNA 的反义序列



酿酒酵母 Z2 snoRNA 的反义序列

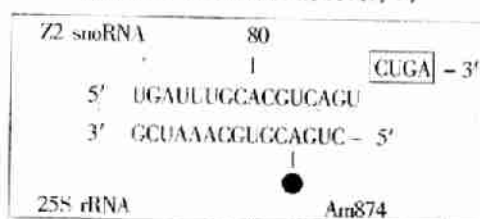


图 2 snoRNA 的反义序列指导的 rRNA 甲基化位点

Fig.2 rRNA methylated sites guided by snoRNA gene antisense sequences

然而, 进一步的结构分析表明该 snoRNA 3'端的反义序列与酿酒酵母的 Z15 并不相同, 却与酿酒酵母中的另一种 snoRNA (Z2) 完全一样^[7]。这一结果表明, 粟酒裂殖酵母 Z15 snoRNA 基因在结构上的独特性。根据 Z15 DNA 的序列, 设计合成一个长 21 个核苷酸的专一性探针或引物 SP15, 对酵母总 RNA 进行分析。Northern 杂交结果显示: 在严格的条件下, SP15 能与一个大小为 92 个核苷酸的 RNA 稳定杂交(图 3a), 因此确定 Z15 snoRNA 的长度为 92 个核苷酸。以引物 SP15 进行酵母总 RNA 逆转录分

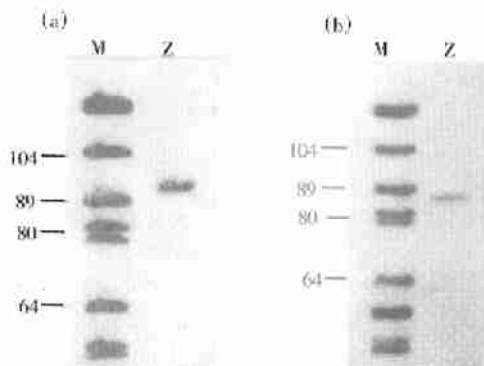


图 3 Z15 snoRNA 的鉴定

Fig.3 Identification of Z15 snoRNA

a Northern 杂交; b 逆转录分析;

M 相对分子质量标准; Z 粟酒裂殖酵母总 RNA

析, 得到唯一一条长为 86 个核苷酸的 cDNA, 表明该 snoRNA 有均一的 5' 末端 (图 3b), 位于 boxC 上游第 6 个核苷酸处。因此, 该 snoRNA 的 3' 末端可定位于 boxD 下游的第 8 个核苷酸处。将逆转录获得的 cDNA 进行克隆及序列测定, 结果与数据库中的 DNA 序列完全一致 (图 4), 进一步证明 Z15 snoRNA 是由 Z15 DNA 编码的。

3 讨 论

虽然粟酒裂殖酵母 rRNA 中的甲基化位点尚未有实验数据, 但是按照反义 snoRNA 结构和功能的关系, 粟酒裂殖酵母 Z15 的 2 个反义序列可以分别指导 25S rRNA A849 和 A908 的核糖甲基化修饰 (图 2)。这两个核苷酸与酿酒酵母中已鉴定的 Am815 和 Am874 是同源的, 并保守的存在于植物和高等动物 rRNA 序列中。值得注意的是粟酒裂殖酵母 Z15 的两个反义序列, 分别与酿酒酵母 Z15 和 Z2 相同, 这类似一种镶嵌的结构, 在 snoRNA 基因中是十分罕见的。它反映粟酒裂殖酵母 Z15 snoRNA 基因可能发生过重组, 即该 snoRNA 可能由 2 个不同的 snoRNA 基因重组而产生的。最新研究表明, 酿酒酵母 Z2 基因具有移动性 (屈良鹤, 待发表)。这种移动性也可以看成是基因重组的结果, 这在某种程度上支持了以上推测。现已发现 snoRNA 基因结构或组织具有丰富的多样性^[8], 看来, 这一多样性与基因重组有密切关系。

迄今为止, 无论是在酵母还是在高等生物中, 大部分反义 snoRNA 只具有一个反义序列, 只有少部分 snoRNA 才具有两个反义序列。其中 U14、U24、U45、U50、snR41、snR48、Z15 (snR60) 和 粟酒裂殖酵母 Z15 的两个反义序列只针对一种 rRNA (18S rRNA 或 25~28S rRNA)。而 U32、U36、snR40、snR47、snR51 和 Z13 (snR52) 却具有与 18S rRNA 和 25~28S rRNA 分别互补的反义序列。在酿酒酵母中具有 2 个反义序列的 snoRNA 占已发现的 41 个反义 snoRNA 的 1/4 左右^[6]。如果仅考虑反义 snoRNA 对核糖的甲基化修饰, 具有一个反义序列的 snoRNA 显然更为有效, 因为它不需要考虑 rRNA 前体复杂的空间结构。在生物体中, 为什么会出现具有 2 个反义序列的 snoRNA? 这预示着一个反义序列的 snoRNA 与含有两个反义序列的 snoRNA 在功能上可能会存在一些差异。目前, 虽然还不知道此类 snoRNA 的两个反义序列是同时作用于 rRNA, 还是待修饰完一个甲基化位点后再去作用于另外一个。但从 rRNA 前体转录时即发生折叠, 且 rRNA 核糖甲基化在 rRNA 前体转录结束之前就已发生, 加之两个甲基化修饰位点在一级结构的距离一般较远来看, 此类 snoRNA 极有可能是同时作用于 rRNA 的。所以, 具有两个反义序列的 RNA 除了指导核糖的甲基化修饰以外, 还可能在 rRNA 高级结构的形成上起作用 (即 RNA Chaperon)。

粟酒裂殖酵母 Z15 的发现和鉴定, 从一个新的角度揭示了 snoRNA 基因结构和功能的复杂性, 并为我们研究这类 snoRNA 基因的起源和进化提供了重要线索。



图 4 Z15 cDNA 序列测定结果

Fig.4 The sequence analysis of Z15 cDNA

粟酒裂殖酵母 Z15 snoRNA 基因序列已被国际基因库 EMBL 收录, 编号为 Aj223844.

参考文献:

- [1] MAXWELL E S, FOURNIER M J. The small nucleolar RNAs[J]. Annu. Rev. Biochem, 1995, 35: 897 ~ 934.
- [2] SMITH C M, STEITZ J A. Sno storm in the nucleolus; new roles for myriad small RNPs[J]. Cell, 1997, 89: 669 ~ 672.
- [3] FORSBURG A W, NURSE P. Cell cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Annu Rev Cell Biol, 1991, 7: 300 ~ 319.
- [4] CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162: 732 ~ 735.
- [5] ZHOU H, QU L H. Identification of novel snoRNAs from yeast[DB]. EMBL accession number Aj223035, 1997.
- [6] LOWE T M, EDDY S R. A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast[J]. Science, 1999, 283: 1168 ~ 1170.
- [7] 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 Rat1 and RNase III in yeast[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19: 1144 ~ 1158.
- [8] 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.

Identification and Characterization of Z15 snoRNA from *Schizosaccharomyces pombe*

ZHOU Hui^{*}, YUE Qiang, DU Yan-ping, QU Liang-hu

Abstract: A novel small nucleolar RNA, termed Z15, was identified and characterized by the analysis of computer and experiments. Z15 snoRNA, encoded by an independent-transcribed gene on chromosome II of *S. pombe*, is 92nt in length and belongs to the antisense snoRNA family in possessing boxC/D motif and terminal stem-forming sequences. In particular, the Z15 snoRNA has two antisense sequences identical to that of *Saccharomyces cerevisiae* Z15 and Z2 snoRNA respectively, this mosaic structure implies that *S. pombe* Z15 originated probably from two different snoRNAs by gene recombination. According to the structural analysis, *S. pombe* Z15 is presumed not only to function as a methylation guide for 25S rRNA at position A849 and A908, but also as a RNA chaperon for rRNA conformation.

Keywords: Z15; snoRNA; *Schizosaccharomyces pombe*; rRNA; methylation

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China