

酵母 snR72 ~ 78 snoRNA 基因簇的研究^{*}

杜延平, 周 惠, 屈良鹄

(中山大学生物工程研究中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 通过 PCR 分析发现 *Kluyveromyces delphensis* 中存在与酿酒酵母相似的 snR72 ~ 78 snoRNA 基因簇. 对该基因簇进行序列测定并与酿酒酵母比较分析, 发现基因簇中各个 snoRNA 编码区具有一定的保守性, 但是基因间隔区却有完全不同的序列, 这表明 RNase III 对 snoRNA 前体加工的识别信号存在于各 snoRNA 基因间隔区的高级结构中. 进一步对另外 4 种酵母进行 PCR 分析, 结果表明 snR72 ~ 78 snoRNA 基因簇是一种保守的基因组织, 普遍存在于各种酵母中.

关键词: snR72 ~ 78; snoRNA; 基因簇; 酵母

中图分类号: TQ92 **文献标识码:** A

SnoRNA 是一类富集于核仁中的 RNA, 它们在 rRNA 的转录加工过程中起重要的调控作用^[1]. 20 世纪 90 年代以来, 新的 snoRNA 基因的发现及功能的确定取得了重大进展, 对各种 snoRNA 基因组织及表达加工方式的研究正成为当前分子生物学的一个前沿. 现已发现, snoRNA 广泛分布在从单细胞酵母到哺乳动物等各种真核生物中, 其基因组织具有非常丰富的多样性: 大部分酵母 snoRNA 基因是独立转录的, 这些基因具有自身的启动子、终止子和相关其他顺式作用元件; 而大多数新发现的脊椎动物 snoRNA 都是由某些蛋白质基因的一段特殊的内含子序列编码, 它们的表达依赖于宿主基因 (host gene) mRNA 前体的转录和加工^[2]. 最近, 本实验室在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 第 13 号染色体上发现并鉴定了一个新的 snoRNA 基因簇, 命名为 snR72 ~ 78 snoRNA (原为 Z2 ~ Z8) 基因簇. 该基因簇包含 7 个 box C/D 类反义 snoRNA 基因, 在上游一个远端启动子的控制下, 首先转录成一个多顺反子的前体, 然后再由 RNase II 及其他核酸外切酶作用下, 释放出 7 个成熟的 snoRNA^[3].

酵母 snR72 ~ 78 snoRNA 基因簇是一种新的基因组织, 其表达机制及进化过程尚有待深入研究. 该基因簇的表达涉及一系列的 RNA 加工识别过程, 对这一加工过程的识别信号的结构特征与进化规律进行研究, 将有助于认识真核生物基因表达的新机制. 本文就这一特殊的 snoRNA 基因组织在酵母中的分布进行了探索, 发现该基因簇是一种保守的基因组织, 存在于多种酵母中, 并对该 snoRNA 基因簇中编码的 RNA 加工识别信号及其基因组织的进化方式进行了讨论.

1 材料与方法

1.1 酵母菌株

克鲁维酵母 (*Kluyveromyces delphensis* 和 *Kluyveromyces lactis*) 由法国 Branlant 教授惠赠.

* 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: 2000-05-23; 作者简介: 杜延平 (1976 ~), 女, 硕士生; 通讯联系人: 屈良鹄.

粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 由法国 Fauladier 研究员惠赠. 异常汉逊酵母 (*Hansenula anomala*), 热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*), 购于广东省微生物研究所.

1.2 酵母的培养及 DNA 的制备

将酵母细胞接种于 YPD 培养基 ($\rho=1\%$ 酵母粉, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖) 平板上, 于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 从平板上挑取酵母单菌落菌株接种于液体 YPD 中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 190 rpm/min, 水浴振荡培养至 $A_{600}\approx 1.5$, 然后以 4 000 rpm/min 离心收集菌体, 液氮冷冻后磨成粉, 用 SDS/酚-氯仿法提取总 DNA^[4].

1.3 酵母 DNA 的 PCR 扩增

以保守的 snR72~78 snoRNA 编码区设计并合成用于酵母 DNA PCR 扩增的寡核苷酸引物 Pz8: $5'-\text{TTTACAACTAGAGTTTCTGA}-3'$; Pz7: $5'-\text{GTTTCAGCCAGTAATTCCAGCT}-3'$; Pz6: $5'-\text{GATCAGTTGCGCGGGTTTTC}-3'$; Pz5: $5'-\text{GCTTCAGAAAGGCATGAATGGTAAT}-3'$; Pz4: $5'-\text{TCAGACATATGCTTGTCT}-3'$; Pz3: $5'-\text{GCTCAGTACCACGCCCTGT}-3'$; Pz2: $5'-\text{GATCAGACTGACGTGCAAATC}-3'$. *K. delphensis* 的 PCR 扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min, 然后于 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 30 个循环, 其它 4 种酵母的退火温度改为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 其余条件与上相同. PCR 扩增在 DNA Thermal cycler 480 (PE 公司) 上进行.

1.4 分子克隆和 DNA 序列测定及分析

PCR 扩增产物采用 QIAquick PCR purification Kit 进行纯化, 然后以 Klenow DNA 聚合酶对 PCR 产物进行修饰补平, 磷酸化后克隆到 pTZ18 载体的 *Sma* I 位点. 采用 Ampharmacia DNA 测序盒直接测定重组质粒的 DNA 序列, 并用 Pcgene 6.0 软件包进行序列的排列和比较分析.

2 结果和讨论

2.1 *K. delphensis* snR72~78 snoRNA 基因簇的 PCR 分析

根据 snR72~78 snoRNA 基因簇中 7 个 snoRNA 保守的编码区设计 Pz8/Pz2, Pz8/Pz3, Pz8/Pz4, Pz8/Pz5, Pz8/Pz6, Pz8/Pz7 等 7 对基因专一性引物, 以 *K. delphensis* 总 DNA 为模板作 PCR 扩增. 除 Pz8/Pz3 外 (在后面的序列中可以看到 Pz3 与 *K. delphensis* SnR73 snoRNA 编码区存在 5 个核苷酸的差异, 因而以 Pz8/Pz3 引物对进行 PCR 时采取 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火无产物带), 其他 6 对引物均有特异性扩增产物 (结果见图 1), 这一结果表明, *K. delphensis* 中不仅存在与酿酒酵母中相同的 snoRNA 基因, 而且它们的排列次序都与酿酒酵母一致. 从图 1 还可以看出, 引物 Pz2/Pz8 PCR 扩增产物长达 1.9 kp, 比酿酒酵母对应的基因簇序列长 300 多个碱基

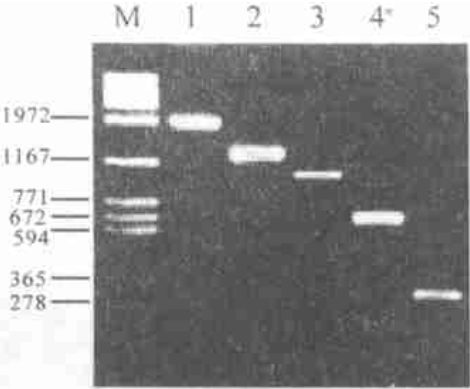


图 1 *K. delphensis* 中 snR72~78 snoRNA 基因簇的 PCR 检验
Fig. 1 PCR amplification of snR72~78 sno RNA gene cluster in *K. delphensis*
M 2 kb marker; 1 Pz8/Pz2; 2 Pz8/Pz4; 3 Pz8/Pz5; 4 Pz8/Pz6; 5 Pz8/Pz7

对, 这表明在 *K. delphensis* snR72~78 snoRNA 基因簇中已产生了大量的突变和插入.

2.2 *K. delphensis* snR72~78 snoRNA 基因簇的克隆及序列分析

为了进一步考察 *K. delphensis* snoRNA 基因簇的变异程度和规律性, 对 *K. delphensis* snoRNA 基因簇进行了序列测定. *K. delphensis* 的 snR72~78 PCR 产物经纯化后, 进行分子克隆, 并采用质粒 PCR 和质粒的 *Eco*RI/*Bam*HI 双酶切筛选得到重组子. 对筛选得到的阳性克隆子进行序列测定, 得到 *K. delphensis* 的 snR72~78 snoRNA 基因簇的 1 946 个核苷酸序列, 从中发现了 7 个 snoRNA 基因序列 (由于引物 Pz2 和 Pz8 分别位于 snR72 和 snR78 snoRNA 编码区序列的 5' 末端和 3' 末端, 所以 snR72 和 snR78 snoRNA 的序列不完全). 与酿酒酵母对应的 snoRNA 进行比较 (图 2), 发现 *K. delphensis* 和酿酒酵母中 snoRNA 基因编码区的序列相似性可达 75% 以上, 而且两者的功能区即与 18S 和 25S rRNA 互补的序列则完全一致. 但是, 2 种酵母中 snR72~78 snoRNA 基因簇的长度相差 300 多个碱基对, 两基因簇中相应的 snoRNA 基因间隔区 (spacer) 的长度和序列也完全不同. 在酿酒酵母中, snR72~78 snoRNA 基因簇首先转录出多顺反子的 snoRNA 前体, 前体被进一步加工才释放出成熟的 snoRNA, 这一过程需要核酸内切酶 RNase II 的参与, 其切割位置发生在 snoRNA

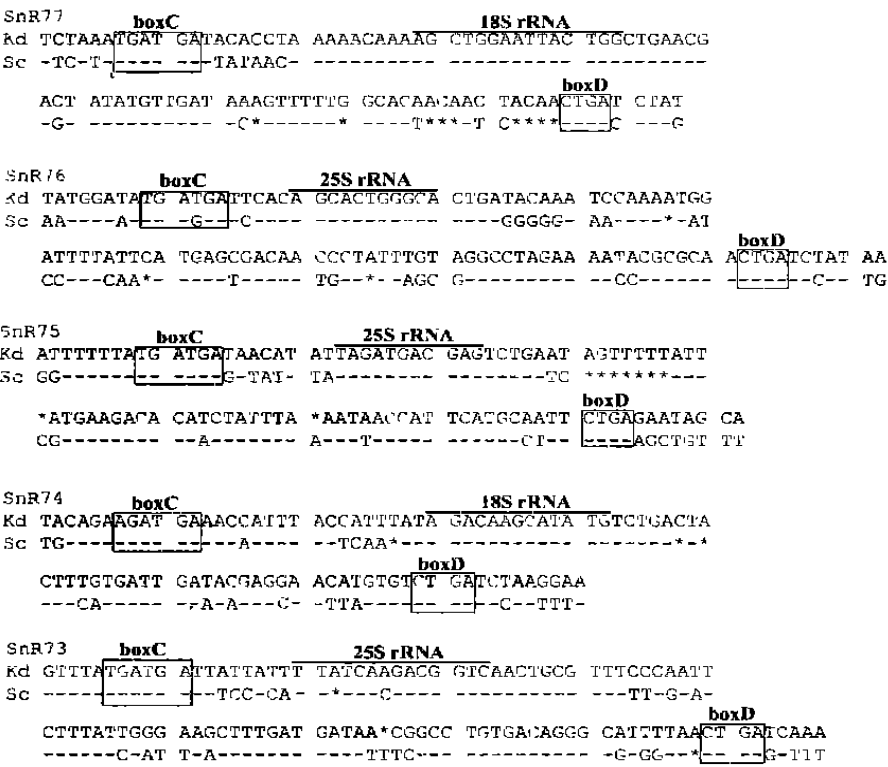


图 2 *K. delphensis* 和酿酒酵母 snR72~78 snoRNA 基因簇 snoRNA 编码区序列比较

Fig 2 Comparison of the snoRNA coding regions of

snR72~78 snoRNA gene cluster from *K. delphensis* and *S. cerevisiae*

基因间隔区^[3]. 通过比较 2 种酵母 snoRNA 基因簇, 发现其间隔区的序列完全不同, 因此有理由推测各 snoRNA 间隔区序列形成了特异的二级结构, 而这种结构能被 RNase III 识别并加工, 即 RNase III 对酵母多顺反子 snoRNA 转录前体进行加工的结构识别信号应该存在于各 snoRNA 间隔区的高级结构中. 对 *K. delphensis* snoRNA 基因簇的基因间隔区的高级结构的研究将可提供进一步的证据.

2.3 snoRNA 基因组织的进化

在已报道的酿酒酵母基因组全序列中已鉴别出 5 个大小不一的 snoRNA 基因簇, snR72~78 snoRNA 基因簇是迄今为止在酵母中发现的最大的 snoRNA 基因簇. 为了进一步探讨该基因簇在不同的酵母中分布情况, 我们选择 *K. lactis*, *H. anomala*, *C. tropicalis*, *S. pombe* 等 4 种酵母进行研究. 以 Pz8/Pz4 和 Pz8/Pz2 两对保守引物对 4 种酵母总 DNA 分别进行 PCR 扩增. 在以 Pz8/Pz2 引物对扩增时 *K. lactis*, *C. tropicalis* 得到 PCR 扩增产物; 以 Pz8/Pz4 引物对进行扩增时, *H. anomala*, *C. tropicalis*, *S. pombe* 有 PCR 扩增产物 (结果见图 3).

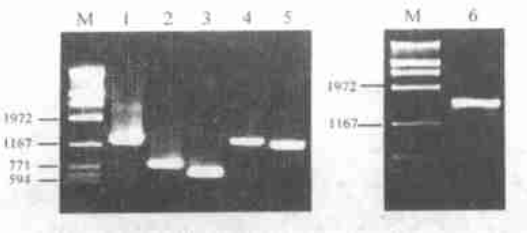


图 3 4 种酵母中 snR72~78 snoRNA 基因簇的 PCR 检验

Fig. 3 PCR amplification of snR72~78 sno RNA gene cluster in four yeasts

M 2 kb marker; 1 *K. lactis*; 2 *S. pombe*; 3 *C. tropicalis*; 4 *H. anomala*; 5 *C. tropicalis*; 6 *K. lactis*
1, 2, 3, 4 引物为 Pz8/ Pz2;
5, 6 引物为 Pz8/ Pz4

以上结果说明这 4 种酵母与 *K. delphensis* 一样都存在着与酿酒酵母 snR72~78 snoRNA 基因簇类似的结构, 这一方面反映了这种 snoRNA 基因簇功能的保守性, 另一方面说明在不同酵母中的 snoRNA 基因簇具有相似的表达机制.

酿酒酵母 snR72~78 snoRNA 基因簇的长度约为 1.4 kp, 本研究表明 *K. delphensis* 等 6 种酵母中 snR72~78 snoRNA 基因簇的长度有较大差异. 进一步的序列测定还表明, 有的酵母如 *C. tropicalis*, *S. pombe* 在包含的 snoRNA 基因种类和数量上也被发现与酿酒酵母有一些不同 (未发表). 说明在不同的酵母中, snR72~78 snoRNA 基因簇虽然具有一定的保守性, 但彼此之间已经积累了大量的变异, 反映出这种基因组织也许有非常古老的起源. 与脊椎动物相比, 单细胞酵母核基因组仅为 1.2×10^7 碱基对, 基因排列紧密, 没有太多的间隔序列和重复序列, 酿酒酵母仅 4% 的基因含有内含子, 大部分基因都是单拷贝的, 它需要较为简单又高效的表达调控方式^[5], 从而保持了由一个启动子控制表达的基因簇这一特殊的基因组织形式, 与原核生物基因操纵子十分相似. 已有研究发现 snoRNA 基因具有移动性, 可在基因内和基因间移动, 该过程也伴随着基因缺失、插入及重组^[9]. 本研究表明, 不同酵母中同源基因簇包含的 snoRNA 基因数量及种类并不是严格保守的, 这反映了 snoRNA 基因在进化过程中具有转座性. 最近, 在粟酒裂殖酵母中发现独立转录的 snR72 snoRNA 基因的同源分子^[6], 这是 snoRNA 基因具有移动性的又一佐证. 所有这些发现为进一步研究真核生物基因结构和表达的多样性提供了重要线索.

参考文献:

- [1] 屈良鹄. 核仁小分子 RNA[J]. 生物工程进展, 1996, 16(5): 21~26.
- [2] MAXWELL E S, ROURNIER M J. The small nucleolar RNAs[J]. Ann Rev Biochem, 1995, 35: 897~934.
- [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]. Molecular And Cellular Biology, 1999, 19(2): 1144~1158.
- [4] 陆勇军, 周惠, 周惟欣, 等. 酿酒酵母一个新的基因簇转录多顺反子的 snoRNA 前体[J]. 中国科学(C 辑), 1999, 29(4): 359~366.
- [5] 屈良鹄, 周惠. 酵母 snoRNA 基因簇启动子的比较分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1): 89~91.
- [6] 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.

snR72~78 snoRNA Gene Cluster in Yeast

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

Abstract: A counterpart of snR72~78 snoRNA gene cluster was found in *K. delphensis* by PCR analysis. The nucleotide sequence of the gene cluster was determined through PCR product cloning. It was shown by comparison that the sequences of intergenic spacers of the gene cluster, in spite of high sequence similarity in snoRNA coding region, are quite divergent between *S. cerevisiae* and *K. delphensis*. This suggests that the signal recognized by RNase III in the processing of polycistronic snoRNA transcript lie in the higher structure, instead of the primary sequence, of the primary intergenic spacer. Further investigation of the gene cluster was carried out by PCR amplification of 4 other yeast species, the result indicated that snR72~78 snoRNA gene cluster is a conserved gene organization widespread in various yeast species.

Keywords: snR72~78; snoRNA; gene cluster; yeast

^{*} Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China