

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0043-48

水稻 Hsp70 基因第一个内含子中 snoRNA 基因簇的保守性及分布特点^{*}

钟 翎, 王诚炳, 屈良鹄

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 对水稻、野生稻和茭白 Hsp70 基因第一个内含子进行 PCR 分析及部分序列测定, 分析结果表明植物 Hsp70 基因内含子编码多个 snoRNA 的基因组织具有一定的保守性和分布范围, 揭示了植物内含子编码的 snoRNA 在进化过程中具有比脊椎动物和酵母更加丰富的多样性和移动性.

关键词: 稻属, 茭白属, Hsp70 基因, 内含子, snoRNA 基因簇

分类号: Q 754 **文献标识码:** A

核仁小分子 RNA (snoRNA) 的研究是目前真核生物分子生物学的研究热点之一, 大量的实验证明它们在 rRNA 的转录加工过程中具有重要作用^[1]. snoRNA 的编码基因主要有 2 种类型: 独立转录的 snoRNA 基因, 这些基因具有自身的启动子和终止子, 大部分酵母 snoRNA 基因属于这种类型; 由某些蛋白质基因的一段特殊的内含子序列编码, 大多数新发现的脊椎动物 snoRNA 都是内含子编码的, 这是一种新的基因表达方式. 一方面表现了真核生物基因组织在进化过程中丰富的多样性, 同时也促使人们重新全面审视基因的概念和内涵.

近年来, 在植物中人们又发现了另外一种新的 snoRNA 基因组织: 成簇的 snoRNA 基因. 本实验室在水稻 Hsp70 基因的第一个内含子中发现了连续 6 个 snoRNA 基因连锁在一起的基因组织形式^[2~4]. Leader 等^[5]在玉米中发现了 5 或 7 个 snoRNA 基因组成的基因簇, 位于 1 个独立的转录单位之中. 这些发现暗示了植物 snoRNA 具有与脊椎动物和酵母不同的进化途径. 水稻中内含子编码的 snoRNA 基因簇结构在其它植物中的分布情况是令人感兴趣的问题, 本文就这一特殊的基因组织结构在水稻及其近缘植物中的保守性进行了初步探索, 并试图探讨 snoRNA 基因组织的进化关系.

1 材料与方法

1.1 材 料

水稻: 籼稻 (青凤 12, *Oryza sativa* spp. *indica*) 种子和粳稻 (台北 309, *Oryza sativa*)

* 基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39730300)

收稿日期: 1998-10-15 第一作者简介: 钟翎, 女, 35 岁, 博士

spp. japonica) 叶片, 由中山大学生物工程研究中心植物基因工程实验室提供. 茭白 (*Zizania caduiflora*) 叶片购自中山大学农贸市场.

1.2 方 法

1.2.1 细胞总 DNA 制备和纯化 取水稻等材料的叶片 (0.2 g) 用液氮磨成细粉, 再用 KAC 法^[4] 制备总 DNA. DNA 纯化采用玻璃粉吸附法进行 (Promega 产品).

1.2.2 寡核苷酸引物 用于 Hsp70 基因 PCR 扩增的寡核苷酸引物见表 1.

表 1 Hsp70 基因第 1 个内含子及内含子的 PCR 扩增的寡核苷酸引物
Tab 1 Oligonucleotide primers used to PCR in the first intron of Hsp70 gene from rice

编号	名称	引物序列及 3'端位置 (EMBL X67711)	引物方向
P1	Hsp	AGAACCAGGTCGCCATGAAC (883)	5'-end
P2	Hsp2	ACACCGTCTTCGGTAACTACT (911)	5'-end
P3	Hsn	AAGGGCCAGAGCTTAATGTC (2911)	3'-end
P4	H2052	CTGCCTTGATTGACTAGACT (2071)	5'-end
P5	C2-1	ACATGTGATGATGGATAAGAC (1455)	3'-end
P6	P1c	AGATCAGATGGTAGTGCATGATG (1501, 2277)	3'-end
P7	D2-1	GTAGTTCAGTAAATGGGTTAAT (1642)	3'-end
P8	F2-1	ACATAGTCGCAAAAGTAGACAATGA (1792)	3'-end
P9	H1881	ACGGCTATATAGTAATTGGAGG (1881, 2667)	3'-end
P10	D1-1	TAATTCACTTTTCATGGGTCTT (2428)	3'-end
P11	F1-1	TAATAGTCACAAGAGCAGACCATGT (2578)	3'-end

1.3 PCR

1.3.1 基因组 DNA 的扩增 20 μ L PCR 反应液中含有 20 ng 植物总 DNA, 10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 0.2 mmol/L dNTP (A, C, G, T), 1.5 mmol/L MgCl₂, 100 ng PCR 引物, 1 U Taq DNA 聚合酶 (华美生物工程公司). PCR 程序见文献 [2].

1.3.2 套式 PCR (nested PCR) 即将已扩增的 DNA 带从胶中回收, 以此作为模板再进行片段内部引物的 PCR, DNA 带的回收采用玻璃粉吸附法, PCR 反应及程序与上述相同.

1.4 PCR 产物克隆及序列测定

水稻 (包括青凤 12, 台北 3092 个亚种) H2052/Hsn PCR 片段 (859 nt) 和茭白 Hsp2/Hsn PCR 片段 (约 2 000 nt) 分别克隆到 pGEM-T 载体和 pTZ19-T 载体上, 克隆及筛选方法参照文献 [2]. 青凤 12 和台北 309 克隆子分别为 pGQ859 和 pGT859, 茭白克隆子为 pTJ2042.

水稻 859 nt 克隆质粒的序列测定以位于内含子 3' 端的 Hsn (见表 1) 为引物测得 H2052Hsn 之间约 300 碱基对的核苷酸顺序, 其中包括 F1 DNA 及其两翼序列. 以通用引物测得茭白 pTJ2042 克隆片段部分序列约 190 碱基对的核苷酸顺序. 测序均采用 T₇ sequencing kit.

2 结果和讨论

2.1 水稻的 2 个亚种 Hsp70 基因

为了探讨植物 Hsp70 基因第一个内含子中 snoRNA 编码区的保守性, 我们比较了水稻

种内 2 个亚种籼稻的情况。以 H2052/Hsn 为引物分别对籼粳稻基因组 DNA 做 PCR，均得到了 859 nt 的产物，将其克隆并对部分序列进行测定，结果如图 1 所示，籼稻和粳稻在 F1 snoRNA 基因编码区及两侧序列，相似性达 88%，而在 snoRNA 基因编码区内达到了 92%，所有的特征元素都完全相同，因此推测水稻 2 个亚种 Hsp70 基因的 第一个内含子中编码 snoRNA 基因的状况完全一致。

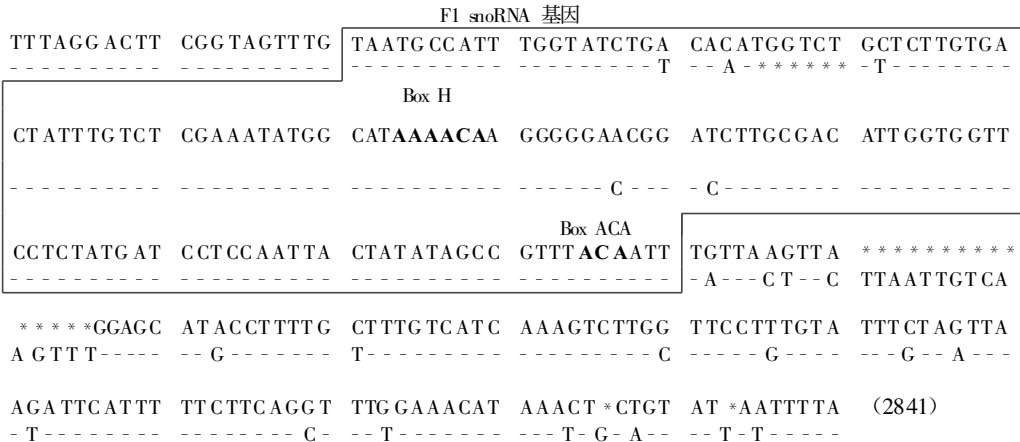


图 1 籼稻(青凤 12)和粳稻(台北 309)Hsp70 基因第 1 个内含子中 F1 snoRNA 基因及侧翼序列比较

Fig 1 Alignment of F1 snoRNA gene and its flanking sequence in the first intron of Hsp70 gene from *O. sativa* spp. *indica* and *O. sativa* spp. *japonica*

2.2 野生稻 Hsp70 基因

在以 H2052/Hsn 引物对野生稻基因组 DNA 扩增时，得到了与水稻基本相同的产物带，进一步克隆并用 H2561 为引物进行测序，得到了包括 C1 和 D1 DNA 的约 170 nt 的序列，与水稻相比，无论是在 C1 和 D1 snoRNA 基因内，还是在基因间隔区，二者的差别都很小^[3]，这表明野生稻 Hsp70 基因第一个内含子与水稻一样，含有 snoRNA 基因的序列。

2.3 茭白 Hsp70 基因

为了进一步探讨植物中这种 snoRNA 基因簇的保守性及其分布范围，选取与水稻和野生稻属于同一个亚科的植物茭白 (*Zizania caduiflora*)，通过 PCR 检测 Hsp70 基因第 1 个内含子中 snoRNA 的情况，并测定了克隆子的部分序列。

以 Hsp2/Hsn 引物对扩增茭白基因组 DNA，结果表明茭白均可得到与水稻和野生稻相似的产物，相对分子质量与后者相比可看到稍有变化 (图 2, Lane 3)。

将碱基对为 2 000 的茭白产物从胶上割下以玻璃粉回收，以此为模板，Hsp2 分别和 snoRNA 基因中保守序列 P1c, P2d 和 H1881 为引物做套式 PCR，结果均只有一条带，其中 Hsp2/P1c 和 Hsp2/ P2d 扩增的相对分子质量与水稻、野生稻相应的产物，基本一致。但是 Hsp2/H1881 扩增的产物有明显的差异 (图 3C, Lane 3)。接着又将这种茭白的 DNA 片段进一步用 snoRNA 基因的专一性引物对 Hsp2/C2-2, Hsp2/ D1-1, Hsp2/ D2-1, Hsp2/F1-1 和 Hsp2/F2-1 做套式 PCR，结果 Hsp2/ D1-1 和 Hsp2/ F2-1 扩增出与水稻、野生稻相似大小的产物，茭白 Hsp2/ F1-1 的扩增产物相对分子质量明显比水稻和野生稻的小，而另外 3 个引物对无产物 (图 4, Lane3)。上述结果表明，茭白 Hsp70 基因第一个内含子中至少含有 4 个 snoRNA 基因，即 C2、D2、F2 和 F1。

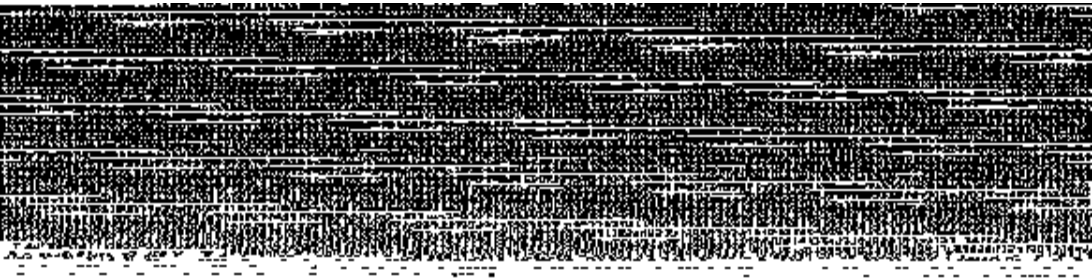


图 2 基因组 DNA 的 PCR 扩增
Fig 2 PCR of genomic DNA
引物为 Hsp2/ Hsn;
M 2 kb marker; 1 水稻;
2 野生稻; 3 茭白; 4 小麦

图 3 茭白 Hsp2/ Hsn 扩增产物为模板的 PCR
Fig 3 Nested PCR under *Z. caduciflora*
products of Hsp2/ Hsn template
A 引物为 Hsp2/ P1c; B 引物为 Hsp2/ P2d; C 引物为 Hsp2/ H1881
M 2 kb marker; 1 水稻; 2 野生稻; 3 茭白



图 4 以茭白 Hsp2/ Hsn 扩增产物为模板的套式 PCR

Fig 4 Nested PCR under *Z. caduciflora* products of Hsp2/ Hsn template
A 引物为 Hsp2/ C2-1; B 引物为 Hsp2/ D2-1; C 引物为 Hsp2/ F2-1; D 引物为 Hsp2/ F1-1
M 2 kb marker; 1 水稻; 2 野生稻; 3 茭白

有趣的是，当用 H2052/ Hsn 为引物扩增茭白基因组 DNA 时，亦获得了与水稻和野生稻相似大小的 PCR 产物，然后以该 800 多个核苷酸为模板做 6 个引物对的套式 PCR，即 H2052/ P1c，H2052/ D1-1，H2052/ F1-1，H2052/ C2-1，H2052/ D2-1，H2052/ F2-1，结果前 3 个引物对均扩增出与水稻、野生稻相似的产物，而后 3 对引物无产物（图片未显示），亦即在以引物 H2052/ Hsn 扩增的 800 多个核苷酸的片段中含有 C1、D1 和 F1 snoRNA 基因。

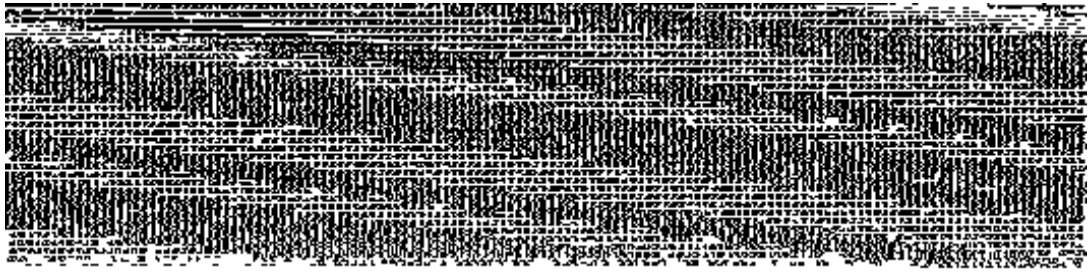


图 5 基因组 DNA 的 PCR 扩增
Fig 5 PCR of genomic DNA
引物为 H2052/ Hsn; M 2 kb marker;
1 水稻; 2 野生稻; 3 茭白; 4 小麦

图 6 以茭白 H2052/ Hsn 扩增产物为模板的套式 PCR
Fig 6 Nested PCR under *Z. caduciflora*
products of H2052/ Hsn template
A 引物为 H2052/ P1c; B 引物为 H2052/ D1-1;
C 引物为 H2052/ F1-1; M 2 kb marker;
1 水稻; 2 野生稻; 3 茭白

以上结果表明, 在茭白 Hsp70 基因的不同拷贝的内含子之间存在着差异, 这种差异表现在其中所含的 snoRNA 基因的不同, 亦即在茭白中 Hsp70 基因至少有 2 个拷贝, 1 个拷贝中其内含子至少含有 C2, D2, F2 和 F1 4 个 snoRNA 基因, 而另 1 个拷贝中则至少含有 C1、D1 和 F1 3 个 snoRNA 基因, 由于从 Hsp2/Hsn 片段中做套式 PCR 时 H2052/Hsn 没有扩增产物, 因此 H2052/Hsn 不包含在 Hsp2/Hsn 片段之中, 它们应属于 Hsp70 基因不同的拷贝. 事实上这一现象在水稻中已有所发现^[5,6], 在水稻 D1 和 D2 snoRNA 鉴定工作中发现了 D3 snoRNA, 它极有可能是由水稻 Hsp70 基因的另一 1 个拷贝的内含子编码的. 由此看来植物 snoRNA 基因具有更加丰富的多样性和移动性. 在小麦的实验中尽管基因组 DNA 的扩增有产物 (见图 2, 图 5, Lane 4), 但是进一步的套式 PCR 未能扩增出 DNA, 推测小麦 Hsp70 基因虽有内含子, 但可能并不编码 snoRNA 基因, 在烟草中也存在类似的情况. 文献 [6] 报道在矮牵牛和拟南芥等虽含有内含子, 但在其中未发现 snoRNA 基因. 通过 Genbank 可得, 在双子叶植物如胡萝卜、大豆中不含有内含子, 几种禾本科植物玉米, 小麦和高粱中 Hsp70 基因虽然存在内含子, 但亦未发现编码 snoRNA 基因的特征序列. 因此 Hsp70 基因第一个内含子中的 snoRNA 基因簇的存在范围可能局限在禾本科稻亚科之内 (图 7).

考察了几种植物 Hsp70 基因内含子编码多个 snoRNA 基因的分布情况, 从所得结果来看, 由于 Hsp70 基因是多基因家族^[9], 其中的不同拷贝之间的差异导致了其内含子中所含 snoRNA 基因的种类和数量的变化, 这种情况目前发现只存在于禾本科的稻亚科内. 最近我们对内含子编码的 snoRNA 基因在植物烟草体内的表达研究表明, 内含子编码的 snoRNA 基因簇在植物中并不是个别或偶尔的现象, 而是普遍存在的 (待发表), 这种情况至今尚未在脊椎动物和酵母中发现.

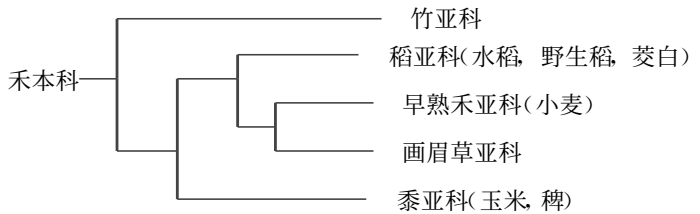


图 7 禾本科的分类系统 (柯朗奎斯特系统)

Fig. 7 Classified system of Poaceae

参 考 文 献

- [1] MAXWELL E S, FOURNIER M J. The small nucleolar RNAs. *Ann Rev Biochem*, 1995, 35: 897~934
- [2] 屈良鹄, 钟翎, 施苏华, 等. 水稻 Hsp70 基因的的第一个内含子编码 2 种核仁小分子 RNA. *自然科学进展*, 1997, 7 (2): 234~241
- [3] 钟翎, 陆勇军, 周惠, 等. 水稻 D1 snoRNA 及其基因的鉴定和功能分析. *植物学报*, 1998, 40 (4): 325~329
- [4] ZHONG L, QU L H, LU Y J, et al. Six snoRNAs are encoded in the first intron of rice Hsp70 gene. In: 编者. Eighth International Congress of Genetics. Beijing, 1998, 74
- [5] LEADER D J, CLARK H P, WATTERS J, et al. Clusters of multiple different small nucleolar RNA genes in plants are expressed as and processed from polycistronic pre-snoRNAs. *EMBO*, 1997, 16 (18): 5742~5751
- [6] 王群, 方荣祥. 水稻热激蛋白 70 基因的序列及热诱导表达. *中国科学 (B 辑)*, 1995, 25 (12): 1263~1272

Characteristics and Distribution of snoRNA Gene Cluster in the First Intron of Hsp70 Gene in Plant

ZHONG Ling^{*}, WANG Chengbing, QU Lianghu

Abstract: The snoRNA genes in the first intron of Hsp70 gene from several plants were investigated by PCR analysis and sequencing. It was shown that the snoRNA gene cluster in the first intron of Hsp70 gene was distributed over the subfamily Oryzoideae (Poaceae), which revealed that intron-encoded snoRNA genes of plant have richer diversity and mobility than those of vertebrates and yeast during plant snoRNA evolution.

Keywords: *Oryza*, *Zizania*, Hsp70 gene, intron, snoRNA gene cluster

·简 讯·

1997 年度中山大学学报 (自然科学版) 优秀论文评选揭晓

根据各单位推荐或自荐, 经过中山大学理科学报评选委员会的评选, 评出 1997 年度中山大学学报 (自然科学版) 优秀论文 5 篇, 结果如下. 中山大学对获奖论文给予校级奖励.

《补偿紧性在任意阶奇异摄动守恒律中的应用》 (作者: 殷朝阳; 责任编辑: 黄怡胜)

《藻胆体杆核复合物的能量传递途径研究》 (作者: 赵福利, 郑锡光, 汪河洲, 张景民, 赵井泉; 责任编辑: 张楚民)

《N-取代-1,8-萘二甲酰亚胺类荧光物的合成》 (作者: 汪波, 梁智博, 刘正阳, 许遵乐; 责任编辑: 朱娴)

《具全期启动子盒的杆状病毒高效表达载体的组建与应用》 (作者: 吴文言, 王 章, 龙繁新, 曲士芮, 庞义; 责任编辑: 张冰)

《影响侏罗纪双壳动物群分异度的主要因素》 (作者: 刘春莲; 责任编辑: 秦杜彩)

(芊 子)

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China