

C1 SnoRNA, 水稻中一种新的 核仁小分子 RNA*

屈良鹄 钟 翎 施苏华 陆勇军 周 惠

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要 通过计算机分析国际分子生物学数据库和 cDNA 序列分析等方法, 在水稻 (*Oryza sativa*) 中发现了一种新的核仁小分子 RNA: C1 SnoRNA. 该 RNA 具有 box C, box D 和末端碱基配对区等典型的核仁小分子 RNA 结构特征; 并有 14 个核苷酸与水稻 18S rRNA 中一段保守序列互补. 推测 C1 SnoRNA 可能在 18S rRNA 甲基化过程中起重要作用. 编码 C1 SnoRNA 的基因位于水稻 Hsp70 基因的第一个内含子中. 这是在水稻中发现的第一个由基因内含子编码的 SnoRNA.

关键词 SnoRNA, 水稻, Hsp70, 基因

分类号 Q 74

90 年代以来, 一系列新的核仁小分子 RNA (SnoRNA) 的发现及在核糖体生物合成中调控作用的确定, 是真核生物基因结构和表达领域中的最新进展^[1,2]. 目前已被发现的 SnoRNA 的基因有 2 种类型^[3]: 完全独立的基因, 它们编码 U_3 , U_8 , U_{13} 等 SnoRNA; 大部份新发现的 SnoRNA (如 U_{14} — U_{24}) 都是由某种基因的内含子编码的. 这些 SnoRNA 的宿主基因 (host gene), 多为细胞中高效表达的看家基因 (如核糖体蛋白质基因), 但另一类宿主基因仅编码一些功能尚不清楚的 RNA.

根据推算, 一种生物中可能存在众多的 SnoRNA 种类, 只有小部分 SnoRNA 已被发现和鉴定出来. 继续发现和鉴定新的 SnoRNA 及其基因, 对于研究真核生物中复杂的大分子 rRNA 加工和核糖体生物合成具有重要的意义^[4]; 并将进一步丰富迄今已知真核生物基因和基因组结构的内容. 所以, 采用各种方法去寻找和发现新的 SnoRNA, 已成为该领域中国际竞争十分激烈的前沿. 目前, 新发现的 SnoRNA 大多数来自动物和酵母两大类生物, 植物方面的研究还刚刚开始^[5]. 本文报道从一种植物水稻中发现了一种新的核仁小分子 RNA 及其宿主基因, 这对于阐明植物中由内含子编码的核仁小分子 RNA 的结构及功能具有重要的意义.

* 国家杰出青年基金资助项目

收稿日期: 1996-03-11 屈良鹄, 男, 43 岁, 教授

1 材料与方法

1.1 计算机分析

通过 Internet 与国际分子生物学数据库 Genbank 联网分析,获得核酸数据.核酸序列的输入,比较分析采用 PC gene 6.0 软件包进行.

1.2 DNA 引物

用于 C1 SnoRNA 逆转录的 DNA 引物 P_{1c}序列为:5′GATCAGATGGTAGTGCATGA3′. P_{1c}在 C1 SnoRNA 中的位置参见图 1. P_{1c}的 5′末端标记按分子克隆手册^[6]操作. γ-³²P ATP 购于北京福瑞公司.

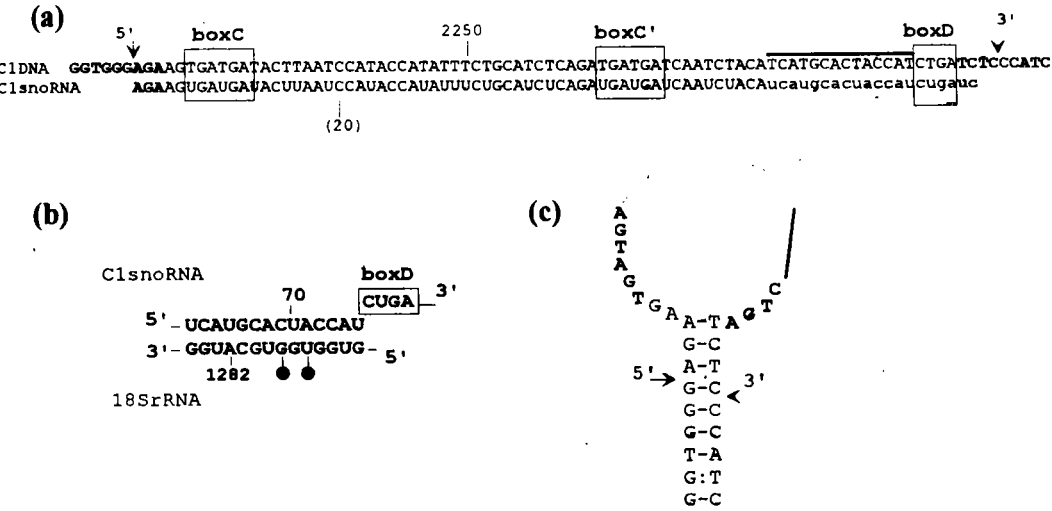


图 1 水稻 C1 SnoRNA 及其基因的核苷酸序列和结构元素

Fig. 1 Rice C1 SnoRNA and its gene sequences and structural elements in it

1.3 水稻(Oryza sativa)总 RNA 的提取和纯化

取人工温室培养的水稻黄化苗嫩叶,经液氮冷冻后,磨成粉,以醋酸钾法提取^[7],并以异硫氰酸胍法纯化^[6].

1.4 C1 SnoRNA cDNA 的合成和 PCR 扩增

逆转录反应的 20 μL 缓冲液中包含 15 μg 水稻总 RNA,10 ng DNA 引物 P_{1c}(以 γ-³²P 标记 5′末端),dNTP(A,G,C,T)的浓度分别为 200 mmol/L.反应液在 65℃变性 5 min 后,放于 42℃保温 10 min,加入 AMV 逆转录酶(promega)10 个单位,再于 42℃继续保温 30 min.在反应结束后,以 8%聚丙烯酰胺变性凝胶检测逆转录结果. pBR322 质粒以限制性内切酶 Taq I 和 Hae III 水解作为分子量标准.cDNA 的纯化和 PCR 扩增参照方法^[8]进行.Taq DNA 聚合酶购于 Promega 公司,PCR 扩增反应在 P E 公司的 DNA Thermal Cycler 上进行.

1.5 分子克隆和 DNA 序列测定

分子克隆以 pTZ-19 质粒为载体,按照分子克隆手册^[5]操作. DNA 序列测定采用 Pharmacia 试剂盒,直接测定重组质粒的 DNA 序列.

2 结 果

通过 Internet 与国际分子生物学数据库联网,我们用计算机对 Genbank 和 EMBL 中的核酸数据进行分析,寻找具有 SnoRNA 结构特征的核酸序列.经过大量的分子数据处理,获得了一批有意义的结果(屈良鹤等,待发表),其中一段非常有趣的 DNA 序列(被命名为 C1 DNA)已被计算机鉴别出来.该序列位于水稻 Hsp70 基因第一个内含子中,具有典型的 SnoRNA 的结构特征(见图 1):在该序列的 5'端,有 TGATGA(box C)序列,在 3'端则有 CTGA(box D)序列,紧随着这两个保守的结构元素,有一段长达 9 个核苷酸的反向重复序列,可使该序列的两端形成较为稳定的发夹结构.在 box D 前方,有一段长为 14 个核苷酸与 18s rRNA 互补的序列(图 1 用黑线指明).这些特征表明,该内含子 DNA 序列能够编码一个新的核仁小分子 RNA(C1 SnoRNA),其结构与 U_{14} , U_{16} , U_{20} , U_{21} 和 U_{24} 等 6 种现已公开发表的 SnoRNA 十分相似^[3,4,9].迄今为止,以上序列尚未被国际上任何其他实验室报道为一种新的 SnoRNA 基因.

根据 C1 DNA 序列,合成了一个 20 个核苷酸长的 DNA 引物 P_{1c} ,对 C1 SnoRNA 进行验证.首先,以 ^{32}P 标记的 P_{1c} 引物对水稻 RNA 进行逆转录延伸,反应产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射性自显影检查.结果清楚地表明:逆转录得到的唯一产物,是一个 80 个核苷酸长的 cDNA(见图 2).将逆转录中引物与 RNA 模板的杂交复性改在不同的条件下进行(分别在 20℃ 或 42℃),逆转录产物量并无明显变化,也没有其它非特异性的延伸产物,这说明 P_{1c} 引物对水稻中一种 RNA(即 C1 SnoRNA)具有良好的专一性.按照逆转录合成的 cDNA 长度,我们计算出 C1 SnoRNA 的 5'末端核苷酸在 C1 DNA 中的位置(见图 1a 中箭头指示).这一结果,与预期设想完全吻合.因为,具有 box C, box D 结构特征的内含子编码的 SnoRNA(如 U_{16} , U_{20} 等),其 5'末端一般都在保守的结构元素 box C 前方 5 个核苷酸左右.

采用 RT-PCR 方法^[6],我们把 P_{1c} 引物合成的 cDNA 扩增.扩增后的 cDNA 被克隆到 pTZ-19 质粒中的 Sma I 酶切位点.两个包含 cDNA 插入片段的重组质粒(pSN-1 和 pSN-2)分别经 DNA 序列测定,得到相同的结果.将 C1 SnoRNA 序列与 C1 DNA 对应序列相比较(见图 1a),两者完全一致.而且, C1 SnoRNA 序列的 5'末端核苷酸与根据 cDNA 长度计算得到的结果相比也是一致的.这就更清楚地证明:水稻 Hsp70 基因是水稻 C1 SnoRNA 的宿主基因;编码 C1 SnoRNA 的基因是位于 Hsp70 基因第一个内含子中一段特殊的 DNA 序列.

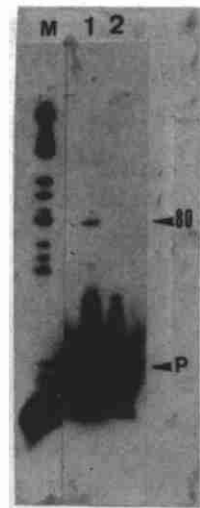


图 2 水稻 C1 SnoRNA cDNA 的合成

Fig. 2 Synthesis of rice C1 SnoRNA

M 分子量标准

1 水稻总 RNA 逆转录

2 P_{1c} 引物对照

3 讨 论

1994 年,英国一个实验室根据已知的哺乳动物和酵母 SnoRNA U_{14} 序列设计分子探针,成功地测定出玉米等 3 种植物中的 U_{14} SnoRNA. 但是由于缺乏充分的证据,他们并不能确定植物中的 U_{14} SnoRNA 是否由基因的内含子编码^[5]. C1 SnoRNA 的发现及鉴定,是水稻中发现和鉴定的第一个由一种蛋白质基因的内含子编码的核仁小分子 RNA,也是世界上首次报道的植物基因内含子编码的核仁小分子 RNA.

水稻 C1 SnoRNA 与 U_{14} 等 SnoRNA 具有 box C, box D 和末端碱基配对区等相同的结构特征. 但是,这些不同种类的 SnoRNA 有完全不同的与 rRNA 互补的序列. 这意味着它们具有不同的功能. 与 C1 SnoRNA 互补的 rRNA 序列,是 18s rRNA 中部一段十分保守的序列,其中还包含两个保守的甲基化位点(图 1b 中用黑点指出). 过去的研究已表明, SnoRNA 与 rRNA 中甲基化位点有密切的关系^[7,8]. 所以,我们推测, C1 SnoRNA 可能参与 18s rRNA 中部这一保守序列甲基化的形成.

目前已经发现,许多 SnoRNA(如 U_{14} , U_{18} , U_{24} 等)都普遍存在于从人到酶母等各种生物细胞中^[2,8]. 这些 SnoRNA 与 rRNA 互补的核苷酸序列,在进化过程中具有十分强烈的保守性. 所以,该序列可以作为鉴别同源 SnoRNA 的一个有效指标. 通过对已发表的各种 SnoRNA 数据的比较,尚未发现任何其它生物中的 SnoRNA 与水稻 C1 SnoRNA 有相似的 18s rRNA 互补序列. 因此, C1 SnoRNA 的发现与鉴定,不仅对研究植物基因的结构与功能有重要的意义;而且为在人类或其它生物中鉴定出与 C1 SnoRNA 同源的核仁小分子 RNA 提供了分子基础.

C1 SnoRNA 的 cDNA 序列已被国际分子生物学数据库 EMBL 收入,其 ACC 编号为 Z69633.

参 考 文 献

- 1 Mount S. Nested genes take flight. *Current Biol*, 1993, 3(6):372~374
- 2 Maxwell E S, Fournier M J. The small nucleolar RNA. *Ann Rev Biochem*, 1995, 35:897~934
- 3 Filipowicz W, Kiss T. Structure and function of nucleolar snRNAs. *Mol Biol Rep*, 1993, 18:149~156
- 4 Steitz J A, Tycowskik T. Small RN chaperones for ribosome biogenesis. *Science*, 1995, 270:1 626~1 627
- 5 Leader D J. Molecular characterisation of plant U_{14} small nucleolar RNA genes; closely linked genes are transcribed as polycistronic U_{14} transcript. *Nucleic Acids Res*, 1994, 24, 5 196~5 203
- 6 Sambrook J. *Molecular Cloning*. New York, CSH press, 1989.
- 7 施苏华, 张宏达, 余小强, 等. 银杏与其它裸子植物之间的关系. *中山大学学报(自然科学版)*, 1992, 31(4):63~67
- 8 Qu L H. U_{21} , a novel small nucleolar RNA with a 13 nt. complementarity to 28s rRNA, is encoded in an intron of ribosomal protein L5 gene in chicken and mammas. *Nucleic Acids Res*, 1994, 29, 4 073~4 081

- 9 Qu L H. U24, a novel intron-encoded small nucleolar RNA With two 12 nt long, phylogenetically conserved complementarities to 28s rRNA. *Nucleic Acids Res*, 1995, 14:2669~2676

C1 SnoRNA, a Novel Intron-Encoded Small Nucleolar RNA from Rice

Qu Lianghu* Zhong Lin Shi Suhua Lu Yongjun Zhou Hui

Abstract With computer analysis on Genbank database and cDNA sequencing methods, a novel intron-encoded SnoRNA, termed C1 SnoRNA, from rice (*Oryza sativa*) was identified. The RNA possesses the structural feature (boxC, boxD and a terminal stem) typical of SnoRNA, as well as with a 12 nt complementary to a conserved sequence of rice 18s rRNA, which implies a possible function of C1 SnoRNA in 18s rRNA methylation. The gene coding for C1 SnoRNA is nested in the first intron of rice Hsp70 gene. This is the first report on intron-encoded SnoRNA characterized from rice and plant.

Keywords C1 SnoRNA, gene, rice, Hsp70

· 简 讯 ·

本刊 1995 年发表的基金资助论文情况

1995 年中山大学学报(自然科学版)共出版 4 期, 发表论文 100 篇. 其中有基金资助的论文共 53 篇, 占 53%. 各基金分布情况如下.

基金名称	产生基金论文数(篇)	基金名称	产生基金论文数(篇)
国家自然科学基金	34	中山大学高等学术研究中心基金会	6
高等学校博士学科点专项科研基金	6	中山大学科学研究基金	7
国家 863 计划	3	香港城市大学研究基金	3
国家重点科技项目	2	香港科技大学科学基金	1
广东省自然科学基金	6	美国国家科学基金	1
		美国能源部基金	1

(朱 嫻)

* School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275