

棉花种子5S rRNA的全核苷酸顺序

祁国荣 曹功杰 竺来发 冯晓黎 张伊平

郑泽荣

(中国科学院上海生物化学研究所)

(中山大学生物系)

摘 要

本文用酶部分降解凝胶直读法测定了棉花种子5S rRNA的核苷酸顺序。棉花种子5S rRNA由118个核苷酸组成,其顺序为:

pGGUCAAUCAUACCGACACUAAUGCACCGGAUCCCAUCAGAACUCC
GCAGUUAAGCGUGCUUGGGCGAGAGCAGUACUAGGAUGGGUGACCUC
CUGGGAAGUCCUCGUGUUGAACCCU_{OH}

比较了棉花种子5S rRNA与已知高等植物及某些其他生物5S rRNA结构上的同源性,发现高等植物5S rRNA是非常保守的,反应它们在进化上具有密切的亲缘关系。

5S rRNA是核糖体的一个组分,在蛋白质的生物合成中具有重要的生物功能。此外,5S rRNA具有较保守的一级和二级结构,因此它也是研究生物进化的好材料。目前,已经测出5S rRNA一级结构的生物有一百多种^(1,2),并广泛开展了其结构与进化关系的研究^(3,4)。我们曾经测定了蓖麻蚕后部丝腺体5S rRNA的核苷酸顺序,比较了几种昆虫5S rRNA结构的差异⁽⁵⁾。本文报道用凝胶电泳直读法测定棉花种子的5S rRNA的核苷酸顺序的结果。

一、材料和方法

1. 试验材料 供试棉花种子为中国农业科学院棉花研究所培育的优良品种中棉所9号(本实验曾用中棉所10号测定过部分5S rRNA的顺序,未发现两者有什么差异)。

2. 棉籽5S rRNA的制备 将剥去种壳的棉籽10克放入研钵中,加入少量SSC溶液(0.14M NaCl, 0.014M柠檬酸钠)研磨成浆糊状,加入100毫升SSC溶液,再加入等体积90%苯酚搅拌抽提三小时,6000转/分钟离心30分钟,吸取水相,尽量避免吸到脂肪,再在水相中加入等体积90%苯酚,搅拌抽提30分钟,6000转/分钟离心30分钟,吸取水相,然后加入3倍体积预冷的95%乙醇,搅拌后置冰箱中沉淀过夜。第二天,冷冻离心取沉淀,沉淀用1M NaCl 10毫升溶解,8000转/分钟冷冻离心30分钟,沉淀为棉

本文1984年5月收到

籽大分子RNA,水溶液为棉籽小分子RNA,小分子RNA再用95%乙醇沉淀后,溶于15毫升20mM Tris-HCl(pH7.5)中,上DEAE-纤维素(Cl^-)柱,用0.3M NaCl, 20mM Tris-HCl(pH7.5)洗涤柱至流出液A260<0.1,再用1M NaCl, 20mM Tris-HCl(pH7.5)洗脱,收集高峰部分,样品对水透析,冻干,备用。

棉籽小分子RNA 5毫克左右加入尿素以及二甲苯蓝和溴酚蓝作为指示剂,在含有7M尿素的10%聚丙烯酰胺450×250×2mm平板凝胶中电泳分离,缓冲液为Tris-硼酸-EDTA(pH8.3)。电泳到二甲苯蓝指示剂走到平板底部,将凝胶放在荧光板上置于紫外灯下观察,并割取含有5S rRNA条带的凝胶,凝胶中的5S rRNA样品参照Naxam和Gilbert的方法^[6]抽提制备。

3. 3'末端标记部分酶解凝胶直读法

参照Peattie的3'末端标记^[7]以及Donis-Keller部分酶解的方法并稍加改进,具体实验步骤如下:

①5'-³²P-pCp的制备 反应系统包括3'-CMP 3.75nmole, 50mM Tris-HCl(pH9.0), 10mM MgCl₂, 5mM二巯基赤藓醇, 0.1mM EDTA-Na₂, 1mM精胺, r-³²P-ATP (0.2mCi, 3000Ci/mole), T₄多核苷酸激酶(中国科学院生物物理研究所产品)1—2单位。反应总体积10微升,于4℃冰箱中标记20小时,然后置100℃沸水浴中加热2分钟。

②5S rRNA的3'末端标记 用上面含有5'-³²P-pCp的溶液,加入棉籽5S rRNA 10微克, 50mM Tris-HCl pH8.3, 10mM MgCl₂, 3.3mM二巯基赤藓醇, 5.0μM ATP, 10μg/ml BSA, 10%二甲亚砷, T₄ RNA连接酶(上海生物化学研究所制备)2单位。反应总体积25微升,置4℃冰箱中标记20小时。

③样品纯化 3'末端³²PpCp标记的5S rRNA样品用含有7M尿素的20%聚丙烯酰胺平板凝胶电泳(Tris-硼酸, pH8.3)进行纯化。电泳后,凝胶放射自显影,然后割取棉籽5S rRNA*pCp条带的凝胶,从中抽提洗脱样品,样品分管进行部分酶解。

④部分酶解 酶解是参照Donis-Keller等人^[8]在尿素缓冲液中降解的条件。反应缓冲液为20mM柠檬酸钠(pH5), 1mM EDTA, 7M尿素, 0.025%二甲苯蓝, 0.025%溴酚蓝。每种酶的用量及反应温度、时间见表1。另外,取2微克3'-³²P-5S rRNA及载体tRNA的混合样品在指管里抽干,加入5微升重蒸甲酰胺,封管,沸水浴中煮20分钟。以上不同酶部分酶解的几套样品、无酶对照样品以及甲酰胺部分降解的样品分别加到一块含有7M尿素20%聚丙烯酰胺平板凝胶(450×250×0.5mm)的不同样品槽(宽8mm)中电泳。电泳后,放射自显影,即可根据其图谱决定出RNA的序列。

4. 棉籽5S rRNA的3'末端部分顺序测定

按照李文琴等人^[9]的方法,将3'末端³²PpCp标记的棉籽5S rRNA用RNaseT₂酶全酶解,再用微晶纤维素薄板进行双向层析(第一向:异丁酸:0.5N氨水=5:3;第二向:异丙醇:浓HCl:H₂O=70:15:15)鉴定出3'-³²P-U_p,可确定棉籽5S rRNA的3'末端为U_{OH}。

表1 部分酶解使用的酶量及反应温度与时间

RNase	T ₁		U ₂		PhyM		A		- E
	3' - ³² P - 5SrRNA 及载体tRNA	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	
缓冲液	3μl	3μl	3μl	3μl*	3μl	3μl	3μl	3μl	3μl
酶量**	2.5u	0.25u	0.1u	0.2u	0.2u	1u	0.5ng	5ng	0
湿度	53℃								
时间	15'	15'	15'	7.5'	15'	20'	15'	15'	15'
	混合上样		混合上样		混合上样		混合上样		上样

●此缓冲液中无尿素，其他都相同。

●●加入酶的体积均小于1微升。

再取3'末端³²P标记的棉籽5S rRNA样品，加入8微升1mM Tris-HCl(pH7.5)，10mM NaCl，0.1mM EDTA溶液，100℃加热2分钟后速冷至0℃，再加入RNase T₁ 2微升(10U/微升)，37℃保温15分钟，进行RNase T₁全酶解以获得棉籽5S rRNA的3'末端的片段。此片段可用20%聚丙烯酰胺凝胶电泳或同系层析分离纯化并回收此片段，参照李其樑等人^[10]的方法用NaOH水解，打点，确定核苷酸顺序。具体步骤如下：上述片段加入1.5微升载体tRNA(9微克/微升)，15微升0.23N NaOH，0.2mM EDTA，于37℃保温，分别在0、2、5、10、20、30、60、90、120分钟时，各取出1~1.5微升反应液至用干冰冷冻的400微升乙醇、75微升0.3M醋酸钠溶液中停止反应。然后，样品在干冰中冷冻沉淀过夜，第二天，15000转/分钟离心，弃去上清液，沉淀的样品抽干，再溶于2微升重蒸馏水中打点；样品点在醋酸纤维素长条的一端，在5%冰醋酸—0.5%吡啶(pH3.5)缓冲液中电泳，电泳后，将样品转移至DEAE—纤维素薄板上，用Homo 6同系层析溶剂层析，放射自显影，读出棉籽5S rRNA的3'末端部分核苷酸顺序。

5. 棉籽5S rRNA的5'末端部分顺序测定

参照Donis-Keller等人的方法^[9]，棉籽5S rRNA用碱性磷酸单酯酶脱去5'末端磷酸，再用r-³²P-ATP，T₄多核苷酸激酶标记5S rRNA的5'末端。其5'末端³²P标记的5S rRNA用RNase T₂全酶解，再用微晶纤维素薄板进行双向层析(方法同前)，鉴定出棉籽5S rRNA的5'末端为³²pGp。

再将5'末端³²P标记的5S rRNA(整分子)用前面所述的打点法确定棉籽5S rRNA的5'末端部分核苷酸顺序。

二、结果与讨论

1. 棉籽小分子RNA在含有7M尿素的10%聚丙烯酰胺平板凝胶中的分离见图1。图中上面一条带为5S rRNA，下面一些条带为tRNA。实验中，我们曾将棉籽5S rRNA

与蓖麻蚕后部丝腺体5S rRNA (120个核苷酸)在同一块凝胶中电泳时,发现棉籽5S rRNA在凝胶中的迁移速度稍快,因此,棉籽5S rRNA的分子量是比蓖麻蚕后部丝腺体5S rRNA要小一些。结构测定的结果也证明了这一点。

2. 经3'末端标记鉴定,5SrRNA的3'末端为U_{OH}。再将3'末端³²P标记的5SrRNA用RNase T₁全酶解所获得的片段进行打点法鉴定,可知其顺序为AACCCU*_pCp(见图2)。由于这是用RNase T₁酶解所获得的片段,因此棉籽5S rRNA3'末端的顺序应为GAACCCU_{OH}。

图2以及图3打点图谱中除了正常放射性自显影的点以外,还有一些杂点,这是由于采用碱进行部分水解的缘故,此情况在文献[10]中有较详细的说明。

3. 经5'末端标记可鉴定出棉籽5S rRNA的5'末端为pG,再经打点法可以得到5'末端顺序为pGGUUCA AUC……(见图3)。



图1 棉籽小分子RNA 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离图谱 (箭头所指为5SrRNA)

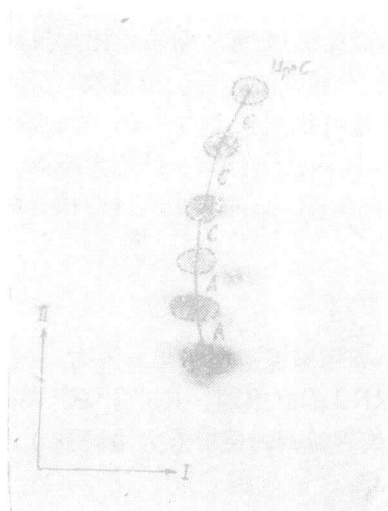


图2 3'-³²P 标记的棉籽5S rRNA的3'末端片段部分碱水解双向电泳同系层析放射自显影图谱
I. 第一向是醋酸纤维素电泳, 醋酸-吡啶缓冲液, pH3.5。
II. 第二向是DEAE微晶纤维素同系层析, Homomix VI展层。

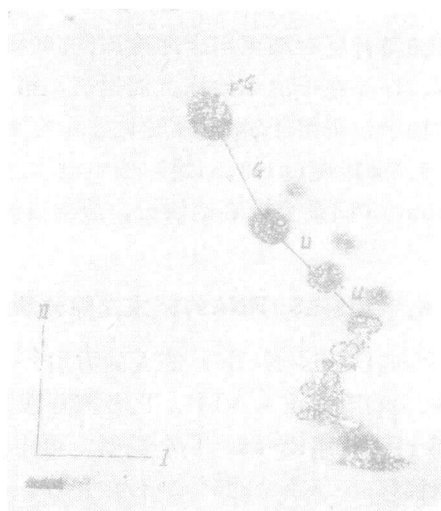


图3 5'-³²P 标记的棉籽5S rRNA部分碱水解双向电泳, 同系层析放射自显影图谱
I、II同图2。

4. 图4为凝胶直读法阅读棉籽5S rRNA的图谱。在此图中，除了RNase A部分酶解情况较差外，其他三种酶较好，因此确定是否是C，可根据其他三种酶均无明显条带，并参考RNase A的情况。我们在部分酶解后，分次先后上样，即可以读出5S rRNA的大部分顺序。

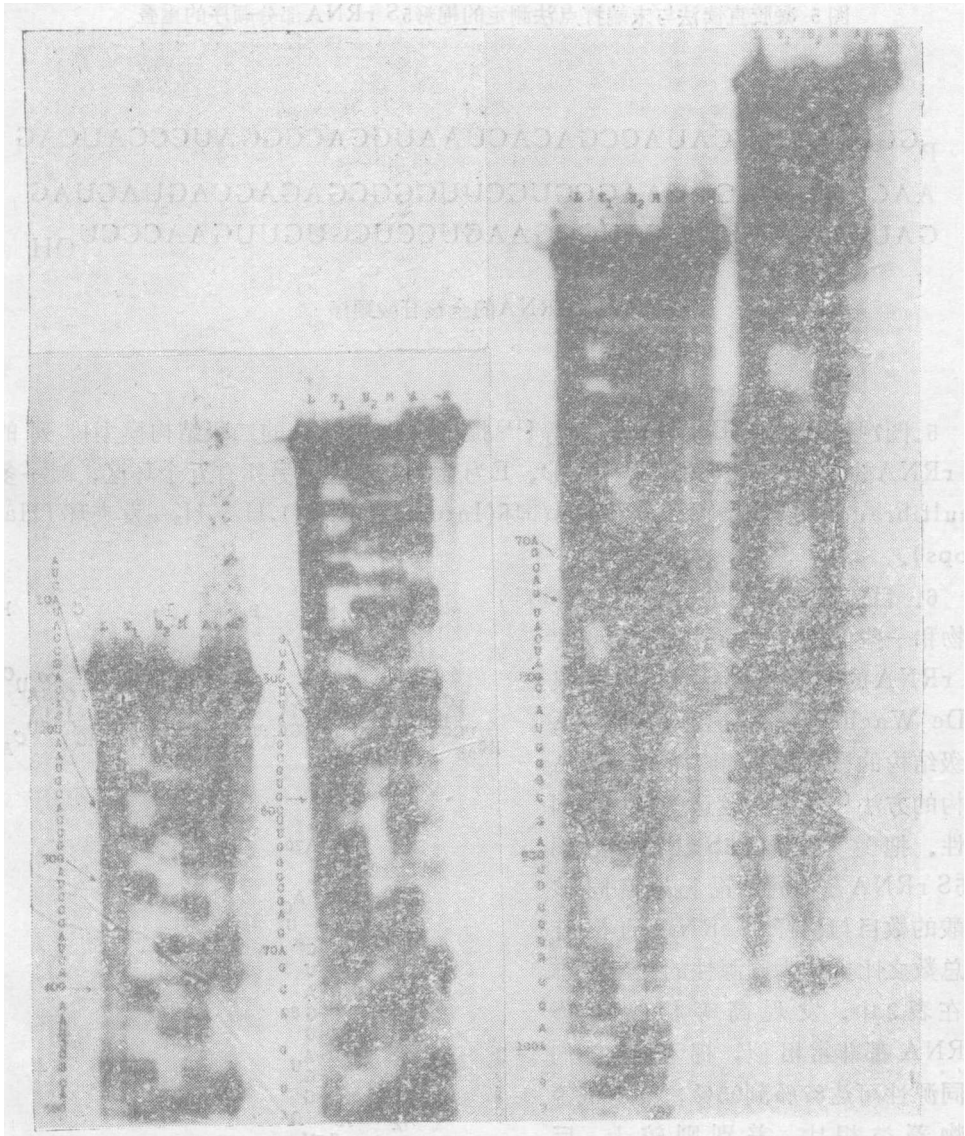


图4 3' - ³²P标记的棉籽5S rRNA的RNase 部分酶解凝胶直读顺序的放射性自显影图谱 (L—甲酰胺降解, T₁—RNase T₁部分酶解, U₂—RNase U₂部分酶解, M—RNase Phy M 部分酶解, A—RNase A 部分酶解, -E——无酶)

我们把凝胶电泳直读法所获得的顺序与5'末端、3'末端打点法所获得的顺序重叠 (图5) 即可获得棉籽5S rRNA的全核苷酸顺序 (图6), 棉籽5S rRNA为118个核苷酸。

表2 棉花种子5S rRNA与其他生物5S rRNA的同源性比较

高等植物	藻类及酵母	动物及细菌
菠菜 Spinach (<i>Spinacia oleracea</i>) 95%	蛋白核小球藻 (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>) 75%	蓖麻蚕 (<i>Philosamia cythia ricini</i>) 66%
小麦 Wheat (<i>Triticum aestivum</i>) 91%	条斑紫菜 (<i>Porphyra yezoensis</i>) 57%	爪蟾 (<i>Xenopus laevis</i>) 61%
向日葵 Sunflower (<i>Helianthus aauus</i>) 90%		KB细胞 KB cell (<i>Homo sapiens</i>) 66%
菜豆 Dwarf bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>) 90%	球似酵母 Yeast (<i>Torulopsis utilis</i>) 57%	
蚕豆 Broad bean (<i>Vicia faba</i>) 89%		大肠杆菌 <i>E. coli</i> 50%
黑麦 Rye (<i>Secale cereale</i>) 89%		
浮萍 Duckweed (<i>Lemna minor</i>) 88%		
蕃茄 Tomato (<i>Lycopersicom esculentum</i>) 87%		

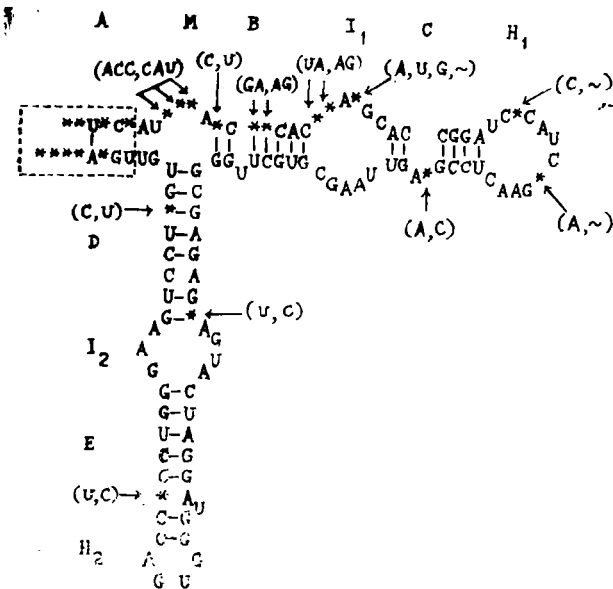


图8 高等植物的5S rRNA的同源性

1. 比较的高等植物为棉花以及表2中列举的8种高等植物
2. *处为有变化的核苷酸的地方。括号内的核苷酸为在此处的核苷酸，~表示此处空缺

参 考 文 献

- [1] Erdmann V.A. et al., *Nucleic Acids Res.*, 1983,11, r105.
[2] Erdmann V. A., *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10, r93.
[3] Kimura M. and Ohta T., *Nature New Biol.*, 1973,243, 199.
[4] Hori H. and Osawa S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, 76, 381.
[5] 曹功杰等, 生物化学与生物物理学报,1983,15,405.
[6] Maxam A. M. and Gilbert w., *Proc. Natl. Acad. USA.*, 1977, 74, 560.
[7] Peattie D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, 76, 1760.
[8] Donis-killer H. et al., *Nucleic Acids Res.*, 1977, 4, 2527.
[9] 李文琴等, 生物化学与生物物理学报, 1983, 15,167.
[10] 李其樑等, 生物化学与生物物理学报, 1979, 11 ,319.
[11] De Wachter R. et al., *Biochimie*, 1982, 64,311.

The Complete Sequence of the 5S rRNA from the Cotton Seed

Qi Guorong Cao Gongjie Zhu Laifa Feng Xiaoli Zhang Yiping

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

Zheng Zerong

(Department of Biology, Zhongshan University)

Abstract

By means of rapid gel sequencing technique, the complete sequence of the 5S rRNA from the cotton seed was determined to be pGGUCAAUCAUACCGAC-ACUAAUGCACCGGAUCCCAUCAGAACUCCGCAGUUAAGCGUGCUUGGGCGAGAGCAGUAGUAGGAUGGGUGACCUCUGGGAAGUCCUCGUGUUGAACCCU_{OH}.

The structural features and homology of 5S rRNA of plants were discussed (see Table 2 and Figure 8).