

# Z25, 哺乳动物核仁蛋白基因编码的一个新的内含子 snoRNA \*

周 惠 屈良鹄 \*\*

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

**摘要** 通过计算机分析和实验鉴定, 发现了哺乳动物中一种新的内含子 snoRNA-Z25. Z25 snoRNA 长为 69 个核苷酸, 具有典型的 boxC/D 结构元件和末端配对区, 一段长为 11 个核苷酸的序列与 18S rRNA 互补, 其下游紧接 boxD'. 按照理论计算, Z25 snoRNA 具有指导 18S rRNA 中 A1678(按人 18S rRNA 编号)2'-O-核糖甲基化的功能. Z25 基因位于人、小白鼠和大鼠核仁蛋白(Nucleolin)基因第 5 个内含子中, 揭示出哺乳动物核仁蛋白基因是一种多内含子 snoRNA 编码的宿主基因.

**关键词** Z25 snoRNA 核仁蛋白 哺乳动物

核仁小分子 RNA(snoRNA)是一类新的核酸调控分子, 在真核生物核糖体的生物合成中起关键作用. 近年来已陆续发现, 至少有 6 种 snoRNA 直接参与 rRNA 前体的切割, 它们是 rRNA 复杂加工体系的必要组分<sup>[1]</sup>. 最新结果表明, snoRNA 作为一类 RNA 向导(RNA guide)参与了 rRNA 化学修饰过程, 如指导 rRNA 中 2'-O-核糖甲基化和假尿嘧啶核苷的生成<sup>[2-4]</sup>. 许多 snoRNA 对于 rRNA 前体形成正确的构象具有重要的意义<sup>[5]</sup>. snoRNA 指导 rRNA 化学修饰过程的分子机制的阐明, 揭示出 rRNA 中某些修饰核苷数目与 snoRNA 基因数目的关系, 为发现新的 snoRNA 指明了方向. 例如, 在酿酒酵母 rRNA 中鉴定出 55 个 2'-O-核糖甲基化核苷, 目前已发现指导 51 个位点 2'-O-核糖甲基化的反义 snoRNA<sup>[6]</sup>. 在哺乳动物 RNA 中有约 105 个 2'-O-核糖甲基化核苷, 目前还只发现 57 种反义 snoRNA. 继续发现和鉴别哺乳动物中新的 snoRNA 及其功能, 是当前 snoRNA 研究领域中的重要课题.

过去, 主要通过实验的方法来寻找新的 snoRNA. 由于人类基因组计划的进展, 国际分子生物学数据库中已积累了大量的 DNA 序列. 采用计算机分析核酸序列来鉴定 RNA 新基因的方法正在迅速发展. 我们曾采用计算机分析基因内含子序列的方法, 发现了哺乳动物中十几种新 snoRNA<sup>[2,7,8]</sup>. 在此基础上, 我们又建立了一个新的方法<sup>[9]</sup>直接对国际数据库扫描分析, 在酵母和水稻中发现了几种独特的 snoRNA 基因组织<sup>[10,11]</sup>, 在哺乳动物中也发现了一些新的宿主基因(host gene). 本文报道通过对人、小白鼠(*mus musculus*)和大鼠(*rattus norvegicus*)核仁蛋白基因序列的分析, 在该基因的第 5 个内含子中发现一种新的反义 snoRNA 基因 Z25; 揭示

1999-08-25 收稿, 1999-11-01 收修改稿

\* 国家自然科学基金重点资助项目(批准号: 39730300)

\*\* 联系人

出哺乳动物核仁蛋白基因是一种多内含子 snoRNA 编码的宿主基因。

## 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 EMBL 和 Genbank 联网,按照我们建立的反义 snoRNA 基因鉴别方法<sup>[9]</sup>,对数据库直接进行扫描分析. 以 PCgene 6.0 软件包对所获核酸数据进一步进行序列鉴别和分析.

### 1.2 实验鉴定

用于 Z25 snoRNA Northern 杂交和逆转录分析的寡核苷酸引物和探针为 PZ25, 序列为: 5' GTTTCAGTATTAAGTCCCTTTGT 3'. 引物 5' 末端的<sup>32</sup>P 标记按分子克隆手册<sup>[12]</sup>操作, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (5 000 Ci<sup>1</sup>/mmol) 购自北京亚辉公司. 采用异硫氰酸胍法提取和纯化人的细胞株和小白鼠肝细胞总 RNA<sup>[13]</sup>. 20  $\mu$ g 总 RNA 以 8 mol/L 尿素-8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离. 用 Pharmacia MultiphoreII 型电泳系统将分离后的 RNA 转移至 Hybond + 尼龙膜 (Amersham) 上, 晾干后的尼龙膜在 253 nm 紫外灯下交联 5 min 固定 RNA. 以<sup>32</sup>P 标记的寡核苷酸 PZ25 为探针, 杂交和洗膜条件按文献<sup>[7]</sup>操作. 逆转录反应的体积为 20  $\mu$ L, 含 20  $\mu$ g 总 RNA 和 20 ng 以<sup>32</sup>P 标记的寡核苷酸引物, dNTP 浓度为 250  $\mu$ mol/L. 反应液充分混合后于 65 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冷至 42 $^{\circ}$ C 后, 加入 200 单位的 MMLV 逆转录酶 (Promega), 在 42 $^{\circ}$ C 延伸反应 30 min, 以 8 mol/L 尿素-8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射性自显影检查逆转录产物, 分子量标准为 pBR322 质粒以限制性内切酶 *Taq* I 和 *Hae* III 水解并以<sup>32</sup>P 作 5' 末端标记制备. cDNA 的克隆和序列测定按文献<sup>[7]</sup>操作, 以 Sequenase Sequencing 试剂盒 (life science) 直接测定质粒 DNA 序列.

## 2 结果

通过对基因库的计算机分析, 发现了一个 snoRNA 基因候选序列, 命名为 Z25DNA. 该序列保守地位于人、小白鼠和大鼠核仁蛋白基因的第 5 个内含子中 (图 1), 并且具有典型的反义 snoRNA 基因特征 (图 2). 在序列的 5' 端有 TGATGA (boxC) 序列, 中部和 3' 端则分别有一个 CTGA (boxD' 和 boxD) 序列; 在 boxC 上游及 boxD 的下游, 各有一段长达 6 个以上核苷酸的反向重复序列, 可形成常见的 snoRNA 末端配对区 (terminal stem); 一段长为 11 个核苷酸的序列与 18S rRNA 互补 (图 2 中用黑线指明), 其下游紧接 boxD'. 按照反义 snoRNA 结构与功能理论计算<sup>[2,3]</sup>, 该互补序列与下游的 boxD' 可共同指导 18S rRNA 中第 1678 位的腺嘌呤核苷 (按人 18S rRNA 编号) 的 2'-O-核糖甲基化. 18S rRNA A1678 是一个保守的位点, 在人和爪蟾中已被实验



图 1 哺乳动物核仁蛋白基因结构示意图

■ 外显子, □ 内含子

1) 1Ci =  $3.7 \times 10^{10}$ Bq

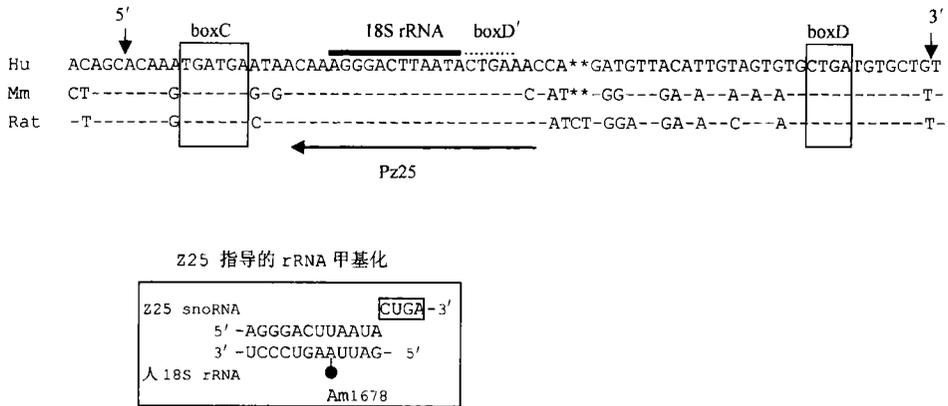


图 2 3 种哺乳动物 Z25 snoRNA 基因序列及功能元素

Hu Mm Rat 分别代表人、小白鼠和大鼠

鉴定为一个 2'-O-核糖甲基化核苷<sup>[14]</sup>。迄今为止,尚未在任何生物中发现指导该位点甲基化的 snoRNA。因此,Z25DNA 可能编码一种新的核仁小分子 RNA,即 Z25 snoRNA。

采用实验的方法对 Z25 snoRNA 进行了验证。根据 Z25DNA 的序列,合成一个 22 个核苷酸长的 DNA 引物或探针 PZ25(见图 2)。以<sup>32</sup>P 标记的 PZ25 探针对人和小白鼠总 RNA 进行 Northern 分析,结果表明,在严格的条件下,PZ25 探针与人和小白鼠中一个大小为 69 个核苷酸的 RNA(即 Z25 snoRNA)稳定地杂交(图 3(a))。这一长度与预期结果十分吻合。以 PZ25 为引物对人和小白鼠总 RNA 进行逆转录,得到的唯一产物是一个 36 个核苷酸的 cDNA(图 3(b))。将该 cDNA 克隆并进行序列测定,其结果与 Z25DNA 对应序列一致。根据所合成的 cDNA 的长度和序列分析,可将 Z25 snoRNA 的 5'端确定在 boxC 上游第 5 个核苷酸处(图 2(a)箭头所示)。参照 Northern 杂交的结果,Z25 snoRNA 的 3'端确定在 boxD 下游的第 7 个核苷酸处。

### 3 讨论

核仁蛋白是细胞核中一种主要的蛋白质,保守地存在于各种真核生物中。核仁蛋白已被发现具有多种功能,它不仅在 rDNA 的转录,rRNA 前体的加工和核糖体的组装中起重要作用,而且还具有维持染色体结构以及细胞信号传导等多方面功能<sup>[15]</sup>。哺乳动物核仁蛋白基因长达 9 kb,有 14 个外显子,但 70% 以上的序列为内含子成分。Nicoloso 等<sup>[16]</sup>在哺乳动物核仁蛋白基因的第 11 号内含子中发现了一种指导 18S rRNA 甲基化的 U20 snoRNA 编码区,首次揭示了核仁蛋白基因也是一种宿主基因。随后,我们从人、鸡、爪蟾和两种鱼(*Cyprinus carpio* 和 *Salmo gairdneri*)核仁蛋白基因的第 12 号内含子中鉴别出 U23 基因,一种能够指导 18S rRNA 中

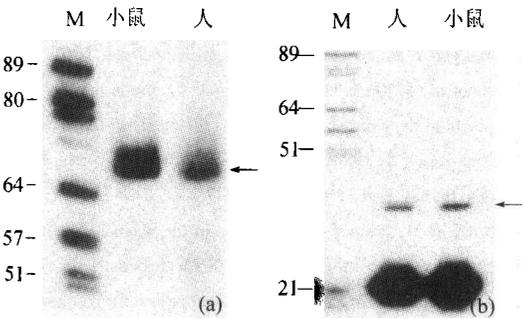


图 3 Z25 snoRNA 的鉴定 (a) Northern 杂交,(b)逆转录分析

U97 生成假尿嘧啶核苷的 boxH/ACA snoRNA (另文发表, Genbank accession no. Aj007015, Aj009729-Aj009731), 再次显示了核仁蛋白基因内含子的功能意义. 现在该基因的第 5 个内含子中又发现了 Z25 基因, 进一步揭示出哺乳动物核仁蛋白基因是一种多内含子 snoRNA 编码的宿主基因.

哺乳动物核仁蛋白基因共有 13 个内含子, 除已发现的 3 个内含子编码 snoRNA 及第 4 个内含子(仅 98-106 bp)外, 其他 9 个内含子中是否也存在 RNA 基因或功能元件, 目前尚未有任何的报道. 值得指出, 在人、小白鼠和大鼠核仁蛋白基因第 1 个内含子中有一段相当保守的序列 CISI<sup>[17]</sup>. 但是, 我们在其中并没有发现任何 snoRNA 基因的序列和结构特征. 以该保守序列合成专一性 DNA 探针, 对人和小白鼠细胞总 RNA 进行分析, 也未能发现对应的 RNA 分子(未发表结果). 但是这并不排除采用常规技术无法检出一些丰度极低或不稳定的 RNA 分子的局限性. 对哺乳动物核仁蛋白基因其它内含子序列的功能意义以及内含子基因的起源仍有待进一步的研究.

人、小白鼠和大鼠 Z25 基因序列已被 GenBank 收录, 分别为 Aj010666, Aj010667 和 Aj010668.

## 参 考 文 献

- 1 Maxwell E S, Fournier M J. The small nucleolar RNA. *Ann Rev Biochem*, 1995, 35: 897
- 2 Nicoloso M, Qu L H, Michot B, et al. Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs; the characterization of nine novel species points to their direct role as guides for the 2'-O-ribose methylation of rRNAs. *J Mol Biol*, 1996, 260: 178
- 3 Kiss-Laszol Z, Henry Y, Bachelier J P, et al. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: A novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*, 1996, 85: 1 077
- 4 Smith C M, Steitz J A. Sno storm in the nucleolus: new roles for myriad small RNPs. *Cell*, 1997, 89: 669
- 5 Steitz J A, Tycowski K T. Small RNA chaperones for ribosome biogenesis. *Science*, 1995, 270: 1 626
- 6 Lowe T M, Eddy S. A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast. *Science*, 1999, 283: 1 168
- 7 Qu L H, Nicoloso M, Michot B, et al. U21, a novel small nucleolar RNA with a 13 nts complementarity to 28S rRNA, is encoded in an intron of ribosomal protein L5 gene in chicken and mammals. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(20): 4 083
- 8 Qu L H, Henry Y, Nicoloso M, et al. U24, a novel intron-encoded small nucleolar RNA with two 12nt long, phylogenetically conserved complementarities to 28S rRNA. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(14): 2 669
- 9 屈良鹤, 周 惠. 一种从基因数据库中识别反义 snoRNA 基因的新方法. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 38(1): 25
- 10 屈良鹤, 钟 翎, 施苏华, 等. 水稻 Hsp70 基因第一个内含子编码 2 种核仁小分子 RNA. *自然科学进展*, 1997, 7(2): 234
- 11 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 ratlp and RNase III in yeast. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(2): 1 144
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: CSH Press, 1989
- 13 Krieg P A. *A Laboratory Guide To RNA*. New York: Wiley-Liss Publication, 1996
- 14 Maden B E H. The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucl Acids Res Mol Biol*, 1990, 39: 241
- 15 Ginisty H, Sicard H, Rongier B, et al. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, 1999, 112(6): 761
- 16 Nicoloso M, Caizergus-Ferrer M, Michot B, et al. U20, a novel small nucleolar RNA, is encoded in an intron of the nucleolin gene in mammals. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(9): 5 766
- 17 Bourbon H M, Amelric F. Nucleolin gene organization in rodents: highly conserved sequences within three of the 13 introns. *Gene*, 1990, 88: 187