

拟南芥中 1 个新 *snoRNA* 基因的鉴定

徐玲, 胡娜, 刘仁荣*, 裘雪梅 (江西科技师范学院生命科学学院, 江西南昌 330013)

摘要 [目的] 鉴定拟南芥中 1 个新 *snoRNA* 基因。[方法] 运用生物信息学方法筛选拟南芥基因组序列, 并对候选的基因序列结构、基因组组织形式和功能进行分析。[结果] 在拟南芥基因组中发现 snR95 box H/ACA *snoRNA* 上游有一段序列具有典型 box C/D *snoRNA* 的保守组件和结构特征, 并具有 2 段与 rRNA 互补、长度超过数 10 个核苷酸的反义序列, 该基因下游的反义序列与 *snoRNA* 数据库中水稻 Z270 的下游反义序列一致, 命名为 box C/D *snoRNA*-AthZ270。[结论] 拟南芥 Z270 *snoRNA* 具有不同与一般 *snoRNA* 的功能。

关键词 拟南芥; *snoRNA*; AthZ270

中图分类号 Q522 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16255-02

Identification of a Novel *snoRNA* Gene in *Arabidopsis thaliana*

XU Ling et al (College of Life Science, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330013)

Abstract [Objective] To identify a novel *snoRNA* gene in *Arabidopsis thaliana*. [Method] Genome sequence of *Arabidopsis thaliana* was screened by using bioinformatics methods, and the sequence structure, organization form and function of typical candidate gene were analyzed. [Result] The identified snR95 box H/ACA *snoRNA* had conservative component and structural features of box C/D *snoRNA* family, possessed two more than 10 nt long rRNA antisense elements. The result revealed that the novel *snoRNA* is a partial counterpart of the rice Z270, named box C/D *snoRNA*-AthZ270. [Conclusion] Z270 *snoRNA* in *Arabidopsis thaliana* has different function with common *snoRNA*.

Key words *Arabidopsis thaliana*; *snoRNA*; AthZ270

核仁小分子 RNA (*snoRNA*) 分为 box C/D *snoRNA*, box H/ACA *snoRNA* 和 MRP RNA 3 类, 前 2 类以数量繁多, 基因组组织形式复杂, 功能多样而成为 *snoRNA* 的主要研究对象^[1]。Box C/D *snoRNA* 具有明显的序列特征, 序列两端具有异常保守的 C box (ugauga) 和 D box (cuga), 链中部通常还存在另一组保守性较弱的 C、D box, 被称为 C'、D' box, 在 box C/D *snoRNA* 序列中, 只有 C、D box (和 C'、D' box) 和 AE 序列受选择压力而保守, 其他核苷酸没有选择压力而高度可变^[2]; 在二级结构中, C、D box 侧翼两端往往有 4~6 个碱基能形成反向互补序列。box C/D *snoRNA* 的功能是指导特定核苷 2'-O-核糖甲基化的修饰, 它们的靶标目前发现有 rRNA, snRNA 及 tRNA 前体, 这些 *snoRNA* 在 D (或 D') box 上游有一段能和靶标 RNA 互补的序列, 称做反义序列 (Antisense element, AE), 通过碱基互补配对, 指导相关的酶对靶标 RNA 上特异位点进行甲基化修饰^[3], 此特异位点为 D (或 D') box 上游第 5 个核苷酸所对应的互补位点。部分 *snoRNA* 不具备一般 *snoRNA* 的功能, 它们有的作为分子伴侣参与 rRNA 前体的剪切加工, 与 rRNA 的正确折叠和组装有关^[4], 如 box C/D *snoRNA* U3、U8、U14、U22。其中, U3、U14、U22 对于 18S 的生成是必需的, U8 则在 5.8S、28S 的剪切中起重要作用。这几种 *snoRNA* 的缺失将阻止 rRNA 前体的加工, 从而导致细胞生命活动的终止^[5]。近年来, 在哺乳动物和植物中鉴定了一批 *snoRNA* 新类群^[6-7], 称为孤儿 *snoRNA* (Orphan *snoRNA*), 它们也没有指导 RNA 碱基修饰的功能, 有些与高等生物脑功能有关, 有些具有类似 Micro-RNA 的功能; 有些则功能尚不明确^[8]。

笔者综合运用生物信息学方法, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组中发现了 1 个新的 box C/D *snoRNA*-

AthZ270, 并对其序列结构、基因组组织形式和功能进行了分析。

1 材料与方法

1.1 使用的数据库 GenBank 非冗余序列数据库、植物 *snoRNA* 数据库、非编码 RNA 数据库 NONCODE 和核仁小分子 RNA 数据库 snoRNABase。

1.2 拟南芥新 box C/D *snoRNA* 的搜索 根据 box C/D *snoRNA* 的序列、结构特征, 用计算机法在拟南芥基因组数据库中进行搜索, 候选分子用 PC gene 6.0 软件包做进一步序列鉴定和分析。

1.3 序列基因组定位 采用 BLASTN 程序对新的 box C/D *snoRNA* 进行序列基因组定位。

1.4 功能预测 在国际基因组数据库中下载拟南芥序列中 *snoRNA* 可能作用的靶标序列, 手工查找对应位点。对比拟南芥、酵母和人的核糖体大亚基及它们的碱基修饰情况。

1.5 同源序列的搜索 以拟南芥中新 box C/D *snoRNA* 为种子序列, 采用 BLASTN 程序, 在 GenBank 非冗余序列数据库和表达序列标签数据库中搜索同源分子, 用 PC gene6.0 软件包对候选分子做进一步序列鉴定和分析。

2 结果与分析

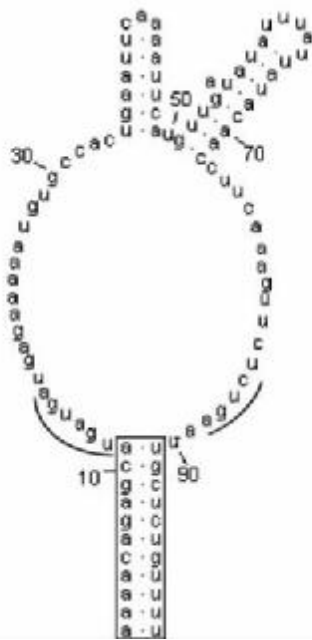
2.1 1 个新的拟南芥 box C/D *snoRNA* 的发现 通过生物信息学方法筛选拟南芥基因组序列, 发现 1 个长度为 101 nt 的序列具有典型的 box C/D *snoRNA* 保守元件和结构特征, 即具有 box C (TGATGA) 和 box D (CTGA) 2 个保守的 *snoRNA* 序列元件, 在 box C 的上游和 box D 的下游分别有 1 段 11 个核苷酸的反向重复序列, 可使该 RNA 分子形成较为稳定的末端互补结构区 (图 1)。

2.2 新 *snoRNA* 基因组组织形式 经过比对发现, 新 *snoRNA* 位于基因间隔区, 下游 114 个核苷酸处存在另一个已报道的 box H/ACA *snoRNA*-snR95^[9] 和 2 个结构特征不明显的疑似 box H/ACA *snoRNA* (图 2), 中间序列未发现启动子序列, 因此, Z270 至少和 1 条 box H/ACA *snoRNA* 形成多顺反子 *snoRNA* 基因簇。这种 *snoRNA* 基因组组织形式在拟南芥中较

基金项目 江西科技师范学院自然科学立项课题 (KY2008ZY03); 江西省高等学校教学研究省级立项课题 (JXJG-13-29)。

作者简介 徐玲 (1981-), 女, 江西南昌人, 硕士, 助教, 从事核仁小分子 RNA 方面的研究。* 通讯作者, 博士, 教授。

收稿日期 2009-07-17



注:C、D 盒用下划线示出;末端互补序列用矩形框示出。
 Note: C and D boxes are underlined; terminal stem-box structure are boxed.

图1 AthZ270 二级结构预测
 Fig.1 Predictive second structure of AthZ270



注:方框部分表示 C、D 及 C'、D'盒;阴影部分表示末端互补序列;箭头表示 D(D')盒上游第 5 个碱基的互补碱基。
 Note: C (C')and D (D') are boxed; terminal structure are shaded; arrows show the 5th bases at upstream of D (D') in target rRNA.

图3 拟南芥 Z270 与 rRNA 互补序列
 Fig.3 The complementary sequence of AthZ270 and rRNA

较大可信度的同源物;与 snoRNA 数据库中的序列进行比较,发现该基因与水稻 (*Oryza sativa*) Z270 snoRNA 基因具有相同的反义序列,因此,该 snoRNA 命名为拟南芥 Z270 snoRNA。除几个保守序列元件和反义序列一致外,水稻 Z270 与拟南芥 Z270 碱基差别较大,因此,通过直接比较的方法很难从不同的物种中鉴定 Z270 同源物。

3 结论与讨论

在当前发现的 box C/D snoRNA 中,末端反向重复序列一般为 4~6 个,它们通过碱基互补,能使在一级结构分布较远的 C、D box 元件在空间结构中紧密相连,这种末端茎与 snoRNA 的生物合成以及 snoRNA 在核仁中的定位有关^[11]。AthZ207 的末端反向重复序列长达 11 个,远远长于一般 box C/D snoRNA,说明这一结构对该 snoRNA 功能的发挥有特殊作用。

大多数 snoRNA 的功能是指导靶标位点碱基的修饰,如拟南芥 U59 box C/D snoRNA 指导 18S rRNA A975 位点 2'-O-核糖甲基化修饰^[12],粟酒裂殖酵母 snR46 box H/ACA snoRNA 指导 25S rRNA U2959 假尿嘧啶化修饰^[13];少部分 snoRNA 的功能是参与 rRNA 前体的剪切加工,与 rRNA 的正确折

常见^[10]。

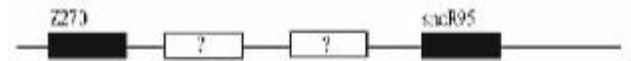
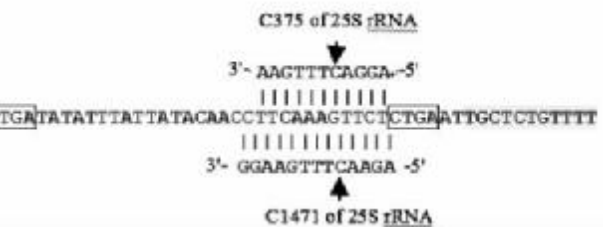


图2 拟南芥 Z270 基因组组织形式示意
 Fig.2 Genome organization of AthZ270

2.3 新 snoRNA 功能预测 计算机分析表明,新 snoRNA 的 D' 盒与 D 盒上游均存在与 25S rRNA 互补的反义序列。D' 盒上游能和 25S rRNA 形成长达 16 nt 的互补序列,但关键的 D' 上游第 5 个核苷酸与 rRNA 对应的碱基 28S rRNA C1125 不互补(图 3 左),与一般 snoRNA 发挥碱基互补功能所遵循的基本规律不相符。更值得注意的是, D 盒上游能和 25S rRNA 中的 2 段序列形成互补序列(图 3 右),且关键的 D 上游第 5 个核苷酸与 rRNA 对应的碱基 25S rRNA C375 和 C1471 都互补。将拟南芥核糖体 RNA 与人及酵母的核糖体 RNA 进行比较,发现拟南芥 25S rRNA 中 C1125、C375 和 C1471 都位于核糖体的保守区域,表明这 3 个碱基在核糖体中有一定的作用。但这 3 个位点在植物中尚未确定为甲基化修饰位点,甚至在人类、酵母等物种中也未被确定为甲基化修饰,说明 Z270 有着不同于一般 box C/D snoRNA 的功能。

2.4 同源分子的搜索 以新 snoRNA 基因为种子序列,用 blastn 序列比对程序在 GenBank 中进行搜索,不能搜索到有



叠和组装有关,如 U3^[14];还有一些 snoRNA 具有其他还未揭示出的生物学功能,如人的 U21、U26 snoRNA 以及酿酒酵母的 snR38。该试验鉴定的拟南芥 Z270 snoRNA 能与 3 段 rRNA 序列进行碱基互补,同时,根据一般 snoRNA 指导甲基化修饰的规律所找到的 rRNA 上对应的 3 个碱基位点也高度保守,但它们尚无被甲基化修饰的报道,说明新 snoRNA 具有不同与一般 snoRNA 的功能。

参考文献

- [1] QU L H, MENG Q, ZHOU H, et al. Identification of 10 novel snoRNA gene cluster from arabidopsis thaliana [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29 (7):1623 - 1630.
- [2] BROWN J W, CLARK G P, LEADER D J, et al. Multiple snoRNA gene clusters from Arabidopsis [J]. RNA, 2001, 7(12):1817 - 1832.
- [3] BAZELEY P S, SHEPELEV V, TALEBIZADEH Z, et al. snoTARGET shows that human orphan snoRNA targets locate close to alternative splice junctions [J]. Gene, 2008, 408(1/2):172 - 179.
- [4] 卓敏, 屈良鹤. snoRNA 及其结构与功能研究新进展 [J]. 自然科学进展, 2007, 17(7):858 - 863.
- [5] 刘娜, 黄巧娟, 周惠, 等. 粗糙脉孢菌 U3 snoRNA 基因的鉴定及其表达和功能分析 [J]. 自然科学进展, 2008, 18(9):1058 - 1063.
- [6] HÜTTENHOFER A, KIEFMANN M, MEIER-EWERT S, et al. RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse [J]. EMBO J, 2001, 20(11):2943 - 2953.

对表 1 数据的分析表明,玉米浆浓度对酶活性的影响较显著,甘油浓度对酶活性没有显著影响。选择玉米浆浓度为 8.0%,甘油浓度为 1.0% 的培养基进行后续试验。

2.2 诱导剂加入时机及诱导时间的影响 在确定培养基组成的试验中,诱导剂是在扩大培养后 5 h 加入的,从试验结果来看,酶活性较低。通常,如果扩大培养时培养基成分与种子培养基成分相差很大,微生物生长的延滞期会加长。因此选择扩培后 8、10、12、14、16 h 加入诱导剂 IPTG,得出酶活性依次为 8.40、9.60、9.55、8.46、8.13 U/ml。

由此可以看出,诱导剂加入时机对酶活性的影响十分显著,与“2.1”中扩培 5 h 后加入诱导剂的试验结果相比较,扩培 10 h 后加入诱导剂,酶的活性提高了约 2.5 倍。因此,后续试验采用扩培 10 h 后加入诱导剂。

改变培养基组成和诱导剂加入时间后,可能会影响诱导剂对产酶的最佳诱导时间。在诱导时间为 8、10、12、14、16、18 h 时,其测得的酶活性依次为 19.17、21.02、21.35、17.03、8.95、1.30 U/ml。试验结果表明,合适的诱导时间对酶活性有显著影响,最佳诱导时间为 10~12 h,诱导时间超过 12 h,酶的活性明显下降。

2.3 乳糖浓度对酶活性的影响 工业生产中,常用乳糖代替 IPTG 作为诱导剂,以降低生产成本。该研究在 5 L 发酵罐内考察了乳糖浓度分别为 0.1、0.3、0.5、1.0、3.0 g/L 时对酶活性的影响,结果得出酶活性依次为 19.28、22.39、23.81、12.55、12.72 U/ml。

试验结果表明,乳糖完全可以替代 IPTG 作为诱导剂,效果基本相同。乳糖的终浓度以 0.3~0.5 g/L 较好。后续试验采用乳糖作为诱导剂,终浓度为 0.5 g/L。

2.4 通气量对酶活性的影响 通气量对好氧微生物的生长具有重要的影响,但对产物生产的影响并不确定。从前期的摇瓶研究结果来看,较高的通气量有利于 L-天冬酰胺酶的生产。5 L 发酵罐的通气量试验结果如下:通气量为 0.50、0.83、1.67、2.50、4.17 VVM 时,酶活性分别为 21.46、24.96、

25.07、25.40、27.04 U/ml。由试验数据可知,通气量的增加有利于酶的产生,但超过 0.83 VVM 后,通气量的继续增加对酶活性的影响并不显著。因此,考虑到通气量的增加会加大生产能耗,选择 0.83 VVM 作为较适宜的通气量。

3 结论与讨论

工业发酵生产中考虑到成本问题,常用价廉易得的原料作为培养基,玉米浆就是一种常用的工业发酵培养基原料。在确定该研究中的发酵培养基之前,还选择了一种发酵培养基,由玉米浆、牛肉浸膏和谷氨酸钠组成^[5],但试验测定的酶活性很低。考虑到前期研究中甘油对蛋白的表达非常有利,因此选择了该研究中的培养基组成。

由于种子培养使用的是 LB 培养基,而扩大培养使用的是玉米浆和甘油,2 种培养基成分相差悬殊,使得菌种在进入扩大培养后延滞期加长。因此,与前期研究结果相比,该研究中诱导剂加入的最佳时机推迟到扩培后 10 h。但是该研究中扩培时的接种量为 1%,如果将接种量增加到 5% 或 10%,诱导剂的最佳加入时机可以提前,这样可以缩短发酵周期。

该研究还考察了 pH 值对酶活性的影响。结果表明,在整个发酵过程中,发酵液的 pH 值始终保持在 6.4~7.2,发酵过程中调节 pH 值对酶活性没有明显影响。因此,笔者在此未列出 pH 值影响酶活性的试验结果。

参考文献

- [1] POZNANSKY M J, SHANDLING M, SALKIE M A. Advantages in the use of L-asparaginase album in polymer as an antitumor agent[J]. *Cancer Research*, 1982, 42: 1020-1024.
- [2] 吴晓英, 吴振强, 林影, 等. L-天冬酰胺酶的研究进展[J]. *广东药学*, 2003, 13(6): 42-44.
- [3] 张志红, 王利群, 陈昶, 等. 天冬酰胺酶胞外表达的初步研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(16): 6653-6654, 6659.
- [4] 刘景晶, 李晶, 吴梧桐, 等. 大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶 II 基因的高效表达[J]. *中国药科大学学报*, 1996, 27(11): 696-700.
- [5] 吴敬, 吴梧桐, 刘景晶, 等. 重组 L-天门冬酰胺酶 II 的中试工艺及其性质研究[J]. *中国药理学杂志*, 2000, 35(4): 268-271.

(上接第 16256 页)

- [7] ENDER C, KREK A, FRIEDLAENDER M R, et al. A human snoRNA with microRNA-like functions[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(4): 519-528.
- [8] 张筱晨, 周惠, 屈良鹤. snoRNA 的结构与功能[J]. *生命科学*, 2008, 20(2): 171-177.
- [9] MARKER C, ZEMANN A, TERHORST T, et al. Experimental RNomics: identification of 140 candidates for small non-messenger RNAs in the plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(23): 2002-2013.
- [10] REICHOW S L, HAMMA T, FERRE-DAMARE A R, et al. The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(5): 1452-1464.

- [11] BACHELLERIE J P, CAVAILLE J, HUTTENHOFER A. The expanding snoRNA world[J]. *Biochimie*, 2002, 84(8): 775-790.
- [12] 孟清, 周惠, 许飞, 等. 拟南芥 U59 snoRNA 基因簇的结构与功能研究[J]. *中山大学学报:自然科学版*, 2000, 39(4): 74-79.
- [13] LI S G, ZHOU H, LUO Y P, et al. Identification and functional analysis of 20 Box H/ACA small nucleolar RNAs (snoRNAs) from *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 16446-16455.
- [14] SASANO Y, HOKII Y, INOUE K, et al. Distribution of U3 small nucleolar RNA and fibrillarin during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biochimie*, 2008, 90(6): 898-907.