

大鼠 4.5S RNAs 的 cDNA 克隆与序列分析*

徐来祥^{①②} 马建章^① 汪永庆^②

(^①东北林业大学野生动物资源学院 哈尔滨 150040; ^②中国科学院动物研究所农业虫害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080)

摘要 利用 RT-PCR 方法,首次从大鼠肝脏细胞总 RNA 中扩增出 4.5S RNAs 的 cDNA。该 cDNA 被克隆到 pGEM3Zf(+)质粒上,经酶切电泳鉴定,然后测序。与报道的小鼠和仓鼠 4.5S RNAs 序列进行了比较研究,并对该分子的结构特点进行了初步分析。

关键词 大鼠 4.5S RNAs RT-PCR

中图分类号:Q958.2 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2000)06-24-05

Cloning and Analysis of cDNA Sequences of 4.5S RNAs of Rat Cells

XU Lai-Xiang^{①②} MA Jian-Zhang^① WANG Yong-Qing^②

(^①The College of Wildlife Resource, Northeast Forestry University Harbin 150040; ^②Institute of Zoology, Chinese Academy of Science Beijing 100080, China)

Abstract The cDNA of 4.5S RNAs were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) method using total RNA extracted from the liver tissue of rat as a template. The cDNA fragment was inserted into pGEM3Zf(+) plasmid and cloned to obtain the recombinant pGEM3Zf(+)-4.5S. Using enzyme digestion and polyacrylamide gel electrophoresis methods, the recombinant plasmids that contained 4.5S cDNA sequences were detected. Then the cDNA sequences of rat 4.5S RNAs were sequenced, and the results were compared with 4.5S RNAs sequence of reported mouse and hamster to find its differences and analyzed the structural characters.

Key words Rat 4.5S RNAs RT-PCR

在真核生物细胞中,近年来陆续发现了除 rRNA、mRNA 和 tRNA 之外的许多小 RNA 分子,如核小 RNA 分子(small nuclear RNA, snRNA),核仁小 RNA 分子(small nucleole RNA, snoRNA)^[1,2],它们广泛存在于各种生物体中。虽然都是核内小 RNA 分子,但从结构和执行的功能上属于不同的两大类,它们的大小一般从几十到几百个核苷酸,并且都能同特定的蛋白质相结合,在细胞内稳定存在,并且富集于核内一定的区域^[3]。这类小 RNA 分子行使与传统 RNA 不同的功能,参与许多生命活动的调

控,大部分小 RNA 分子保留了 RNA 加工的痕迹。除少数外,一般无内含子,常有 3' poly(A),两侧有 7~21 bp 的正向重复(有的更短或更长,或者全然没有),这类 RNA 几乎都能逆转录形成其相应的 DNA 序列。这类逆转位而来

* 国家自然科学基金重点项目(No. 39730090)部分资助;
第一作者介绍 徐来祥,男,39岁,博士,教授,研究方向:动物分子遗传学;现工作单位:山东曲阜师范大学生物学系,273165;

收稿日期:1999-11-22,修回日期:2000-08-22

的序列与它的基因相比,虽有相同编码序列,但失去了上游启动子,通常不能表达,因此称为假基因(retropseudogene)或加工的假基因(processed pseudogene),在细胞中构成了为数众多的分散重复序列,近年来将这类序列称为逆转座子(retroposon)^[4]。4.5S RNAs 属于核小RNA的一种,最早从RNA肿瘤病毒中发现,随后在小鼠和仓鼠细胞中分离得到。通过对其功能的研究发现,这种小RNA分子与细胞核和细胞质内的poly(A)RNA分子相连,它在poly(A)RNA分子的拼接和运输,成熟mRNA从核内进入胞质,mRNA分子的翻译控制和在poly(A)RNA的保护中可能发挥着重要功能^[5,6]。从小鼠和仓鼠细胞中分离得到的与poly(A)RNA相联结的4.5S RNAs,经纯化后由RNaseT1和RNaseA消化,获得了寡聚核苷酸片段再由电泳后指纹图谱分析,得到了4.5S RNA的基本序列。4.5S RNAs全序列含有94个核苷酸,并且具有很高的G含量,达到40%^[7]。为证实4.5S RNAs在不同啮齿类细胞中的存在以及对其结构特点进一步研究,我们选择大鼠为材料,通过提取肝脏总RNA,首次利用RT-PCR方法,对大鼠4.5S RNAs的cDNA进行了克隆和序列分析。

1 材料与方法

1.1 材料 大鼠(*Rattus norvegicus albus*)为中国科学院动物研究所饲养场提供;质粒pGEM3Z(+),限制性内切酶EcoR I和Hind III购自Promega公司;BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit购自宝生物工程公司(大连);*E. coli* DH5 α 购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝细胞总RNA提取 处死禁食一天的大鼠取新鲜肝组织,采用异硫氰酸胍方法制备总RNA^[8],经紫外分光光度计定量检测及琼脂糖凝胶电泳分析RNA质量。

1.2.2 引物设计与4.5S RNAs RT-PCR 根据已报道小鼠等4.5S RNAs^[7],设计并合成上

游引物5'-GCCGGTAGTGGTGGCGC-3';下游引物5'-TGTGTAGCCCAGGCTGG-3'。

取8 μ l RNA(1.2 μ g/ μ l)样品,加入1 μ l 3'端引物(15 pmol/ μ l)于70 $^{\circ}$ C温育5分钟,然后冷却至室温,离心。加入5 μ l 5 \times 逆转录酶缓冲液,0.5 μ l RNasin(40 U/ μ l),2.5 μ l dNTP混合物(10 mol/L),2.5 μ l AMV逆转录酶(10 U/ μ l),加水至25 μ l,混匀,于42 $^{\circ}$ C温育1小时,然后于95 $^{\circ}$ C变性5分钟终止反应。取0.5 ml离心管并依次加入69.5 μ l 蒸馏水,10 μ l 10 \times 扩增缓冲液,2 μ l 10 mmol/L dNTP,4 μ l 3'端引物,4 μ l 5'端引物(15 pmol/ μ l),10 μ l 逆转录产物,混匀,于95 $^{\circ}$ C变性5分钟。再加入0.5 μ l Taq聚合酶(5 U/ μ l),混匀。加入100 μ l 液体石蜡封口,然后进入PCR循环。95 $^{\circ}$ C变性45秒,55 $^{\circ}$ C退火1分钟,72 $^{\circ}$ C延伸1分钟,35个循环,随后72 $^{\circ}$ C延伸5分钟。PT-PCR产物5%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.3 cDNA克隆与重组子筛选 RT-PCR产物电泳后采用压碎浸泡法回收DNA,补平且磷酸化,沉淀DNA,干燥后溶于TE。取2 μ g pGEM3Z(+)质粒DNA,依次加入2 μ l 10 \times 缓冲液J,0.5 μ l Sma I(20 U/ μ l),加水使总体积达20 μ l,37 $^{\circ}$ C保温2~4小时,酚/氯仿抽提,冰浴无水乙醇沉淀,干燥后溶于TE中。补平反应后同上过程溶于TE。

取酶切pGEM3Z(+)质粒1 μ l(含2 μ g DNA),加PCR产物1 μ l(含cDNA 0.1 μ g),1 μ l 10 \times 连接酶缓冲液,1 μ l T₄连接酶(6 U/ μ l),加水至总体积10 μ l,16 $^{\circ}$ C连接6~16小时。取上述连接产物5 μ l转化200 μ l *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂平板,37 $^{\circ}$ C培养16~20小时,随机挑取单克隆培养,碱法小量提取质粒,用EcoR I和Hind III酶切鉴定,得到pGEM3Z(+)-4.5S克隆子。提取pGEM3Z(+)-4.5S重组质粒纯化后用于测序。

1.2.4 4.5S RNA基因序列测定 利用纯化的质粒pGEM3Z(+)-4.5S经宝生物工程公司在ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer上测序,定序结果由DNASIS软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 大鼠肝脏细胞总 RNA 的鉴定 将采用异硫氰胍法提取的总 RNA,水完全溶解,取少量溶解液经变性处理后以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示。

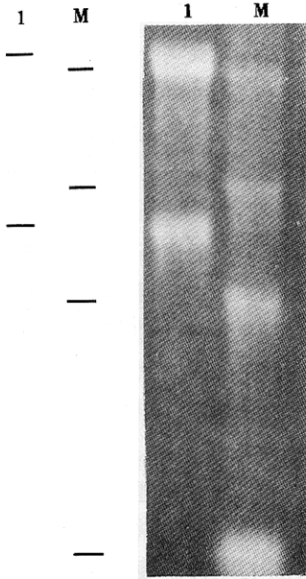


图 1 鼠肝细胞总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱

M:RNA 分子量标准(9.5 kb; 4.4 kb; 2.4 kb; 1.4 kb; 0.2 kb); 1:大鼠肝脏细胞总 RNA 分子

图 1 中的 1 为大鼠肝脏细胞总 RNA,两条带分别为 28S 和 18S。28S 带比 18S 带亮度清晰程度约为 2:1,大小分布范围与分子量标准相比约为 4.4 kb 和 1.9 kb。经紫外分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 比值为 2.03。说明总 RNA 的完整性和纯度已达到了实验的要求。

2.2 RT-PCR 扩增产物的鉴定 以大鼠总 RNA 为模板,逆转录形成了 4.5S cDNA 单链,继而 PCR 获得 4.5S cDNA。5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果如图 2 所示。

4.5S DNA 条带大小由 pBR322/*Bst*NI 分子量标准可见在 90 bp 左右。设计引物时参考的 4.5S RNA 序列为 94 bp,其中 3' 端为 6 个 U,实际设计引物时未将 U 系列考虑在内,因此 RT-PCR 得到的产物为 88 bp 的 4.5S 序列,电泳结果与其相符,是否为 88 bp 的大小,须经

过克隆后测序证实。

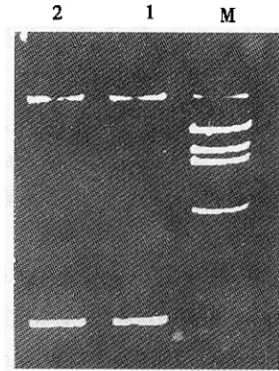


图 2 4.5S RNAs 逆转录 PCR 产物的 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳

M:pBR322/*Bst*NI 分子量标准;1,2:RT-PCR 产物

2.3 4.5S cDNA 的克隆与序列分析 RT-PCR 扩增得到的 4.5S cDNA 经末端补平,磷酸化后插入到 pGEM3Zf(+) 的 *Sma*I 位点。转化 *E. coli* DH5 α 后筛选到重组体 pGEM3Zf(+)-4.5S。提取 pGEM3Zf(+)-4.5S 重组质粒用 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切,5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,如图 3 所示。



图 3 重组质粒 pGEM3Zf(+)-4.5S 的 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切鉴定

M:pGEM3Zf(+)/*Hae*III 分子量标准; 1:pGEM3Zf(+)-4.5S *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切产物

图 3 中的 1 道酶切的两条带中较大的带为载体 DNA 片段,最远端的带其大小为 139 bp,是 4.5S cDNA 双酶切时带上部分质粒片段所形成,与预计结果一致。

鉴定且纯化的重组体 pGEM3Zi(+)-4.5S 经测序,并且与报道的小鼠和仓鼠 4.5S RNAs 的 cDNA 相比较^[7],结果如图 4 所示。通过测序波纹图分析 4.5S RNAs 的 cDNA 序列共包括如图 4 所示的 88 个核苷酸,这与设计引物所应该扩增得到的 4.5S cDNA 序列长度完全相符。通过比较可见大鼠的 4.5S RNAs

的 cDNA 序列与报道的小鼠和仓鼠的基本相似,差异表现在第 7 位,大鼠与报道小鼠相同为 T,而仓鼠的为 A;第 84 位和 86 位,大鼠分别以 A 替代了报道小鼠和仓鼠该两个位置上的 T。全部序列比较分析表明,这种差异仅发生在 A 和 T 之间的替代,并未打破 G-C 含量;在 5' 端开始的第 1~10 和 17~25 位、第 48~53 和 76~83 位分别为重复序列可以形成双链区。在大鼠中与小鼠和仓鼠之间差异的核苷酸均在重复序列之外,并未因碱基替换的变异而在不同种间打破这种空间结构的形成。

```

大鼠 TGA86GA84AGCCC AGGCTGGCCT CGAACTCGTG ATCCCTCTGC CTCTGCCTCC
仓鼠 ---T---T-----
小鼠 ---T---T-----

大鼠 TTCAGCAAAT CCTACCGGCG TGCGCCACCA CT7ACCGGC
仓鼠 -----A-----
小鼠 -----T-----

```

图 4 大鼠与报道小鼠和仓鼠 4.5S RNAs 的 cDNA 序列比较

3 讨论

迄今知道的逆转座子是散布于基因组中的中度重复序列,多种动植物的逆转座子在组织培养条件下其拷贝数增加,说明逆转座子的调控机制在进化中始终是保守的^[9]。大鼠等不同种类啮齿动物的 4.5S RNAs 的 cDNA 其差异性很小,替代的核苷酸也在重复序列之外,由此可见 4.5S 逆转座子结构是相当稳定的,并且这种稳定性结构保证了其转录产物 4.5S RNAs 二级结构的形成,进而才能使 4.5S RNAs 在细胞生命活动中执行与其结构相适应的功能。

根据对 4.5S DNA 中重复序列分析,其结构特点类似于增强子(enhancer)的结构。增强子首先发现于 SV40 病毒中,早期启动子 5' 端上游约 200 个碱基对的 DNA 片段连接在其它基因旁侧,可使该基因转录效率提高 100 倍,该片段可远离基因转录起始点达 3 000 bp 以上。SV40 病毒基因增强子区先后有两个 72 bp 重

复序列,其中的“核心”是 GGTGTGGAAAG,这与 4.5S cDNA 序列相比虽不相同但极为相似。在人的 CD8 α T 细胞特异增强子中,曾发现了一个 Alu 单体与增强子中的一个反向 Alu 形成十字结构来破坏增强子的作用^[10]。在原核生物中存在通过自身反义 RNA 来调节靶基因表达的现象,但在真核生物中尚未发现有如此现象,而人工构建的反义 RNA 或反义基因能有效地抑制细胞内源或外源基因的暂时性或稳定性表达确是事实^[11]。大鼠等动物 4.5S RNAs 基因是否也为细胞内一种增强子目前尚缺乏充分的实验证据,对其行使的生物学功能还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Birstiel, M. L. Small nuclear ribonucleoprotein particles. Springer Verlag, Berlin, 1988 95:192~203.
- [2] Lamond A. I., M. Carmo-Fonseca. Localization of splicing snRNPs in mammalian cells. Mol. Biol. Rep., 1993, 18: 127~133.
- [3] 屈良鹤. 核仁小分子 RNA. 生物工程进展, 1996, 16(5):

- 21~26.
- [4] 朱圣庚. 逆转座子介导的基因突变和重排. 基因分子生物学研究进展, 1992, 160~166.
- [5] Harada, F., Y. Ikawa. A new series of RNAs associated with the genome of spleen focus forming virus (SFFV) and poly(A)-containing RNA from SFFV-infected cells. *Nucleic Acids Research*, 1979, 7(4): 895~908.
- [6] Harada, F., N. Kato, H. Hoshino. Series of 4.5S RNAs associated with poly(A)-containing RNAs of rodent cells. *Nucleic Acids Research*, 1979, 7(4): 909~917.
- [7] Harada, F., N. Kato. Nucleotide Sequences of 4.5S RNAs associated with poly(A)-containing RNAs of mouse and hamster cells. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(6): 1273~1285.
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992, 139~149.
- [9] Finnegan, D.J. Plant retrotransposons and the perspective of their application in gene functional and genome analysis. *Trends Genet*, 1989, 5: 103~107.
- [10] Hanke J. H., J. E. Hamber, P. Kavathas. Repetitive Alu elements from a cruciform structure that regulates the function of the human CD8 α T cell-specific enhancer. *J. Mol. Biol.*, 1995, 246: 63~73.
- [11] 金振华, 周宗迅. 萤火虫荧光素酶基因的反义 RNA 及其缺失片段抑制基因表达的研究. 中国科学院研究生院学报, 1994, 11: 97~103.