

酵母 RNA 聚合酶 II Rpb2 和 Rpb3 两亚基间 相互作用位点的定位*

曲章义^{1,2**} 郑 树¹ 谷鸿喜² 石滨明²

(¹ 浙江大学肿瘤学研究所 杭州 310009)

(² 哈尔滨医科大学微生物学教研室 哈尔滨 150086)

摘 要:为研究 *S. pombe* RNA pol II 各亚基间体内装配成复合体的机制,本文首次用酵母双杂交系统鉴定了 Rpb2 和 Rpb3 两亚基间体内相互作用的位点。首先将 Rpb2 的 4 个片段克隆至 Gal4 BD 表达载体 pAS2 上,构建 BD-Rpb2 片段融合蛋白重组质粒;同时将 Rpb3 克隆至 Gal4 AD 表达载体 pGADGH 上,构建 AD-Rpb3 融合蛋白重组质粒。其次,将 pGADCHRpb3 分别与 pAS2Rpb2 各片段重组质粒共转化到受体酵母菌 Y190 感受态细胞内,筛选并鉴定 β -gal 活性阳性(β -gal⁺)的共转化子。最后,将 β -gal⁺ 共转化子中的 Rpb2 片段进行序列分析并进行同源序列比较确定其在 Rpb2 中的位置。结果表明,Rpb2 与 Rpb3 相互作用的位点位于 Rpb2 的 902 ~ 989aa 肽段内。

关键词: 酵母, RNA 聚合酶, 亚基, 相互作用, 双杂交系统

中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 05-0592-06

真核生物的 RNA 聚合酶分 I、II、III 型, I 型合成 rRNA, II 型合成 mRNA, III 型则合成 tRNA 和其它小 rRNA。II 型 RNA 聚合酶(RNA polymerase II, RNA pol II)合成 mRNA 的基因转录过程是基因表达的重要阶段,因而,研究 RNA pol II 的分子组成、分子结构及其功能对研究基因转录、基因表达的机制,并进一步揭示生命活动的规律具有重要的理论意义^[1]。芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 RNA pol II 由 12 个亚基组成,分别被命名为 rpb1 ~ 12;而裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的 RNA pol II 则由 10 个亚基组成,缺少相对于 *S. cerevisiae* 中的 rpb4 和 rpb9 两个亚基,其 10 个亚基分别被命名为 Rpb1 ~ 3、Rpb5 ~ 8 和 Rpb10 ~ 12^[2]。*S. pombe* RNA pol II 的三个大亚基 Rpb1、Rpb2 和 Rpb3,分别由 1752、1210 和 297 个氨基酸残基组成,分子量分别为 210kD、150kD 和 40kD,这三个亚基分别与原核生物大肠杆菌 RNA 聚合酶的 β' 、 β 和 α 亚基不仅具有序列同源性,而且具有功能的相似性^[3],所以这三个亚基的分子结构、功能及体内相互作用方式,受到了人们广泛的重视。现已知 Rpb1 和 Rpb2 在 RNA 合成过程中发挥着与模板 DNA 及底物分子结合和催化 mRNA 合成的作用,而 Rpb3 则起到连接作用,使 Rpb1 与 Rpb2 在体内装配成复合体,构成催化 mRNA 合成的核心酶(core enzyme)^[3]。体外试验的结果表明 Rpb2 与 Rpb3 间作用位点

* 本研究部分内容受日中医学会世川医学奖学金和国家自然科学基金(项目编号:39670817)资助

** 通讯作者,地址:哈尔滨市保健路 157 号,哈尔滨医科大学微生物学教研室,哈尔滨,150086

作者简介:曲章义(1961-),男,黑龙江省哈尔滨市人,哈尔滨医科大学教授,浙江大学博士研究生,主要从事基因表达和肿瘤病毒的分子生物学研究。

收稿日期:2000-12-29,修回日期:2001-04-12

位于 Rpb2 的近羧基端,但两亚基间确切的体内作用位点尚不清楚^[4]。

酵母双杂交系统是近年建立起来的体内鉴定蛋白——蛋白间相互作用的有效方法^[5]。其基本原理是将真核转录激活因子 Gal4 的 DNA 结合域(DNA binding domain, BD)和转录激活结构域(activation domain, AD)分别构建成 pAS2 和 pGADGH 两个表达载体,然后将待研究的两个靶蛋白 X 和 Y 的基因分别克隆到 BD 和 AD 序列的下游,构建成 pAS2-X 和 pGADGH-Y 两个重组质粒。将 pAS2-X 和 pGADGH-Y 两个重组质粒共转化到受体酵母菌内,使其共表达 BD-X 和 AD-Y 融合蛋白。若 X 与 Y 能够相互作用,就会在体内使 BD 与 AD 连接到一起,恢复 Gal4 转录因子的作用,激活 Gal4 控制的启动子的下游报告基因的表达。若 X 与 Y 不能相互作用,则不能激活报告基因的表达^[5]。

本文首次用酵母双杂交系统鉴定了 *S. pombe* RNA pol II Rpb2 与 Rpb3 亚基间的相互作用位点。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

克隆用受体菌为大肠杆菌 DH5 α ,培养基为 LB 培养基^[6]。双杂交检测用受体菌为芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)Y190 菌株(购自 Clontech 公司),该菌株为 *leu*、*trp* 和 *his* 营养缺陷型,常规培养用 YPD 培养基,转化用无 *Leu*、*Trp* 和 *His* 的 SD 选择培养基^[5]

1.2 载体质粒

构建双杂交用的载体质粒 pAS2 和 pGADGH 均购自 Clontech 公司。pAS2 载有 Gal4N 端 1~147aa 的 BD, pGADGH 载有 Gal4 C 端 768~881aa 的 AD。

1.3 重组质粒的构建

将已重组至 pGADGH 中的 *S. pombe* 972h⁻ 菌株 Rpb2 cDNA 的 4 个片段 2-1、2-2、2-3 和 2-4^[6] (大小及在 Rpb2 cDNA 中的位置见表 1)分别用 *Sma* I 和 *Sal* I 双酶切割下来,然后插入至 pAS2 的 *Sma* I 和 *Sal* I 酶切位点。经酶切电泳鉴定后,将正确的重组质粒分别命名为 pAS2Rpb2-1、pAS2Rbp2-2、pAS2Rbp2-3 和 pAS2Rpb2-4。同时,将 Rpb3 的 cDNA 全序列克隆至 pGADGH 中,命名为 pGADGHRpb3。

表 1 Rpb2 各克隆片段的大小及在 Rpb2 cDNA 中的位置

Table 1 Cloned Rpb2 fragment size and location in Rpb2 cDNA

Cloned fragment	Location in Rpb2 cNDA (Base No. from start to end)	Size/bp
Rpb2-1	430~1230	800
Rpb2-2	2100~2280	180
Rpb2-3	2701~3158	458
Rpb2-4	2701~2966	266

1.4 酵母双杂交试验

双杂交试验按 Clontech 公司的操作手册进行。

1.4.1 制备感受态细胞:将受体酵母菌 Y190 种子液 0.5mL 接种至 10mLYPD 培养基中, 30℃振荡培养至 $OD_{600} = 1.0$, 收集菌体加 5mLH₂O 洗涤菌体后, 加入 1mL100mmol/L LiAc 悬浮细胞, 30℃保温 30min, 离心收集菌体, 用 0.5mL LiAc 悬浮细胞备用。

1.4.2 重组质粒的共转化试验:将 pGADGHRpb3 分别与 pAS2Rpb2-1、2-2、2-3 和 2-4 等量混合, 然后在 LiAc 和 PEG 存在条件下, 30℃转化感受态 Y190 30~60min, 42℃保温 10min 后, 离心收集菌体并悬浮至 TE 中, 然后将菌液涂布在无 Leu、Trp 和 His 的 SD 选择平板上, 30℃培养筛选共转化子。

1.4.3 共转化子的 β -半乳糖苷酶(X-gal)的活性检测:将选择平板上的共转化子菌落影印到 Whatman 滤纸上, 在液氮中反复冻融三次, 然后将滤纸平放到培养皿内, 使菌落面朝上, 加 2mL X-gal/Z-buffer, 30℃保温 1h, 观察菌落的颜色。兰色者为 X-gal 阳性。

1.5 DNA 序列分析

用 Amersham 公司的荧光标记引物 Thermo Sequenase 序列分析试剂盒按双脱氧核苷酸测序法进行 DNA 序列分析^[7]。测序仪为 Shimazu 1000 自动 DNA 测序仪。

1.6 DNA 分析软件

用 GeneWorks 软件分析核酸及蛋白质序列, 并进行相关序列的同源性比较。

2 结果

2.1 β -gal 阳性共转化子的筛选及鉴定

将 pGADGHRpb3 分别与 pAS2Rpb2-1、Rpb2-2、Rpb2-3 和 Rpb2-4 共转化受体酵母菌 Y190, 用无 Leu、Trp 和 His 的 SD 选择培养基筛选共转化子, 然后检测共转化子的报告基因 *lacZ* 表达活性。 β -gal 活性检测结果如表 2。

从表 2 可知, 位于 Rpb2 近 N 端的 Rpb2-1 及中部的 Rpb2-2 不能与 Rpb3 发生相互作用, 而位于近 C 端的 Rpb2-3 和 Rpb2-4 能够与 Rpb3 发生相互作用, 但 Rpb2-3 的活性明显地低于 Rpb2-4。

表 2 共转化子的 β -gal 活性

Table 2 Cotransformants and their β -gal activities

Two-hybridplasmid In cotransformants	No. of cotransformants	No. of β -gal positive
pGADGH Rpb3/pAS2 Rpb2-1	54	0
pGADGH Rpb3/pAS2 Rpb2-2	48	0
pGADGH Rpb3/pAS2 Rpb2-3	51	1
pGADGH Rpb3/pAS2 Rpb2-4	38	19

2.2 pAS2Rpb2-3 和 pAS2Rpb2-4 的序列分析及比较

最初用 PCR 法扩增 Rpb2-3 和 Rpb2-4 构建 pGADGH 重组质粒时两者所用的上游引物相同, 只是下游引物不同。Rpb2-3 片段较长, 458bp; Rpb2-4 较短, 266bp。Rpb2-3 5'端的 266 个碱基与 Rpb2-4 相同, 翻译后的 Rpb2-4 多肽应与 Rpb2-3 多肽 N 端的八十余个氨基酸残基相同, 因而, 两者与 Rpb3 的相互作用活性应相似, 但上述共转化的结果

表明,较短的 Rpb2-4 与 Rpb3 的相互作用活性明显地比较长的 Rpb2-3 的活性强。为分析这一结果的可能原因,本试验分别对 Rpb2-4 和 Rpb2-3 进行了序列分析。序列分析及序列同源性比较的结果(图 1)表明除了 Rpb2-3 中的第 69 个氨基酸由甘氨酸可能突变为半胱氨酸外,没有其它的错义突变或无义突变。上述结果表明,Rpb2-3 与 Rpb3 相互作用强度较弱可能与 Rpb2-3 的肽链长度、次级结构及立体构象有关。

Rpb2-4	MDDVYNLYFD DEDTPNPCK EILELVDPPG CRNFGKTAPI PLDHEELGQR	50
Rpb2-3	MDDVYNLYFD DEDTPNPCK EILELVDPPG CRXFGKTAPI PLDHEELGQR	50
Consensus	MDDVYNLYFD DEDTPNPCK EILELVDPPG CR FGKTAPI PLDHEELGQR	50
Rpb2-4	TQLHAKRDVS TPLRSTESGI VDQVMVTINQ EGLKFVKVRM RSTRIPQIGD	100
Rpb2-3	TQLHAKRDVS TPLRSTESXI VDQVMVTINQ EGLKFVKVRM RSTRIPQIGD	100
Consensus	TQLHAKRDVS TPLRSTES I VDQVMVTINQ EGLKFVKVRM RSTRIPQIGD	100
Rpb2-4	KFASRHGQKG TIGMTYRHED MPNS-----	124
Rpb2-3	KFASRHGQKG TIGMTYRHED MPFSAQGIVP DIIINPHAIP SRMTVAHLVE	150
Consensus	KFASRHGQKG TIGMTYRHED MP S.....	150
Rpb2-4	-----IS SLSIPSTSRG	136
Rpb2-3	CQLSKVSALS GFEGDATPFT DVTVEAVSKL LRSHGFNSIS SLSIPSTSRG	200
ConsensusIS SLSIPSTSRG	200
Rpb2-4	GPVPNSPYSE SYYNLAVVL QRRDWENP-- DL	166
Rpb2-3	GPVPNSPYSE SYYNLAVVL QRRDWETLIY ES	232
Consensus	GPVPNSPYSE SYYNLAVVL QRRDWE....	232

图 1 重组质粒 pAS2Rpb2-3 与重组质粒 pAS2Rpb2-4 融合蛋白序列同源性比较

Fig.1 Protein alignment between pAS2 Rpb2-3 and pAS2Rpb2-4
Rpb2-3' sequence ranged from aa 33 to 186 and Rpb2-4 ranged from aa 33 to 122 were identical. The other sequences were provided by the vecoter pAS2.

2.3 Rpb2 与 Rpb3 相互作用位点的定位

为确定 Rpb2 与 Rpb3 相互作用的位点,将从 β-gal 阳性转化子中分离到的 pAS2Rpb2-4 序列与 Rpb2 亚基的基因组 DNA 的碱基序列及蛋白质的氨基酸序列进行了同源性比较。核酸序列同源性比较结果表明,Rpb2-4 位于 Rpb2 基因组的 3200~3465bp 处,该处相对于 Rpb2 cDNA 的 2701~2966bp 处。蛋白质序列同源性比较结果表明 Rpb2-4 多肽位于 Rpb2 蛋白的 902~989aa 处(图 2)。Rpb2 蛋白的总长度为 1210 个氨基酸,因此,Rpb2 与 Rpb3 体内形成复合物时的相互作用位点位于 Rpb2 蛋白近 C 端的 902~989 氨基酸处。

3 讨论

大肠杆菌 RNA 聚合酶的核心酶由 2 个 α 亚基、一个 β 亚基和一个 β' 亚基组成。β' 亚基负责与 DNA 结合,β 亚基负责催化 RNA 的合成,而 α 亚基则负责将 β、β' 亚基联接起来,形成 α₂ββ' 核心酶复合物。同源性比较表明,*S. pombe* RNA pol II 的三个大亚基 Rpb1、Rpb2 和 Rpb3 分别与 β'、β 和 α 亚基同源^[3]。DNA 序列的同源性预示着其功能的相似性,体外 Far-Western blot 的研究结果表明,与 α 亚基具有同源序列的 Rpb3 亚基确实既能与 Rpb1 亚基结合,又能与 Rpb2 亚基结合,且与后者的结合能力明显地比前者的结合能力强^[8]。本

<i>S. pombe</i> rpb 2-4	-----	34
<i>S. pombe</i> rpb2 pr	QEKKIGMTVM EEFERPVRST TLRMKHGYD KLEDDGLIAP GTRVSGEDII	900
Consensus	900
<i>S. pombe</i> rpb 2-4	-GKTAPIPLD HEELGQRTQL HAKRDVSTPL RSTESGIVDQ VMVTTNQEGL	83
<i>S. pombe</i> rpb2 pr	IGKTAPIPLD HEELGQRTQL HAKRDVSTPL RSTESGIVDQ VMVTTNQEGL	950
Consensus	.GKTAPIPLD HEELGQRTQL HAKRDVSTPL RSTESGIVDQ VMVTTNQEGL	950
<i>S. pombe</i> rpb2-4	KFKVKRMRST RIPQIGDKFA SRHGQKGTIG MTYRHEDMPN S-----	124
<i>S. pombe</i> rpb2 pr	KFKVKRMRST RIPQIGDKFA SRHGQKGTIG MTYRHEDMPF SAQGVIPDII	1000
Consensus	KFKVKRMRST RIPQIGDKFA SRHGQKGTIG MTYRHEDMP S.....	1000

图 2 Rpb2-4 片段与 Rpb2 亚基的蛋白同源序列比较

Fig. 2 Protein alignment between Rpb2-4 and Rpb2 Rpb2-4

The region contacting to Rpb3, was mapped to aa 902 ~ 989 of Rpb2 protein.

文首次用双杂交检测系统鉴定出了 Rpb2 与 Rpb3 间的相互作用位点位于 Rpb2 的 902 ~ 989aa 处, 这为揭示 *S. pombe* RNA pol II 各亚基间的装配方式、分子结构及功能奠定了坚实的基础。同时, 在方法学上, 为体内研究各亚基间的相互作用方式提供了有效的手段。

多次重复试验的结果均表明, 比 Rpb2-4 多肽长 64 个氨基酸的 Rpb2-3 多肽与 Rpb3 亚基间的作用活性反而较低。这一现象的可能原因有二: 一是较长的 Rpb2-3 在体内的次级结构或立体构象掩蔽了其于 Rpb3 接触的位点; 二是 Rpb2-3 的碱基序列发生了改变, 导致 Rpb2-3 与 Rpb3 相接触位点的一级结构发生了变异。前者的可能性较大, 因为序列分析的结果表明, Rpb2-3 仅在其相对于 cDNA 的第 2806 号碱基可能由 G 突变为 T, 导致相应于 Rpb2 中的第 936 号甘氨酸可能突变为半胱氨酸。第 936 号一个氨基酸的改变是否对 Rpb2 与 Rpb3 的相互作用活性有如此大的影响, 值得在今后的工作中研究证明。

试验表明 Rpb2 与 Rpb3 的作用位点位于其 902 ~ 989 号氨基酸处, 但这 80 余个氨基酸组成的多肽是否是与 Rpb3 相互作用的最小单位, 应进一步分别在 Rpb2-4 的 N 端和 C 端进行不同长度的缺失突变^[9], 再研究各突变体与 Rpb3 的相互作用活性而加以确定。

酵母双杂交系统的建立为体内研究蛋白质间的相互作用提供了有效的方法, 因而, 该方法近几年在蛋白研究的各领域得到了广泛而迅速的应用^[5]。双杂交试验经典方法介绍的检测 β -gal 活性时将共转化子菌落影印到硝酸纤维素膜或尼龙膜上, 然后在液氮中冻融破碎细胞。工作中发现, 硝酸纤维素膜和尼龙膜经液氮冷冻后变得很脆, 极易破碎, 操作时应格外小心。本文用 Whatman 滤纸代替硝酸纤维素膜检测转化子的 β -gal 活性, 取得了更为满意的实验结果。

参 考 文 献

- [1] Young R A. *Ann Rev Biochem*, 1991, **60**: 689 ~ 715.
- [2] Sakurai H, Miyao T, Ishihama A. *Gene*, 1996, **180**: 63 ~ 67.
- [3] Kimura M, Ishigoro A, Ishihama A. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 25851 ~ 25855.
- [4] Miyao T, Yasui K, Sakurai H. *et al. Genes to Cells*, 1996, **1**: 843 ~ 854.
- [5] Bai C, Elledge S J. *Method in Enzym*, 1997, **283**: 141 ~ 156.
- [6] 曲章义, 郑 树, 赵育莹, 等. 哈尔滨医科大学学报, 2001, **35**(2): 85 ~ 88.
- [7] 曲章义, 席家宁, 牛美娟, 等. 核酸-蛋白质的非放射性标记和检测, 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 1996.

- [8] Miyao T, Honda A, Qu Zhangyi, et al. *Mol Gen Genet*, 1998, 259: 123 - 129.
- [9] 曲章义, 赵育莹, 刘慧雯, 等. 细胞因子. 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 1998.

MAPPING THE INTERACTION SITE OF Rpb2 AND Rpb3 SUBUNIT OF FISSION YEAST RNA POLYMERASE II

Qu Zhangyi^{1,2*} Zheng Shu¹ Gu Hongxi² Shi Binming²

(¹ Cancer Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

(² Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: To map the interacting site of subunit Rpb2 to subunit Rpb3 of RNA polymerase II in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the yeast two-hybrid system was employed in this paper to screen the interacting clones between Rpb2 and Rpb3. 4 fragments of Rpb2 cDNA were cloned into the Gal4 BD vector pAS2. The 4 clones were named as pAS2 Rpb2 - 1, 2 - 2, 2 - 3 and 2 - 4, respectively. The complete cDNA of Rpb3 was cloned into the Gal 4 AD vector pGADGH. The clone was named as pGADGH Rpb3. The two-hybrid plasmids pGADGH Rpb3 and pAS2Rpb2 - 1, 2 - 2, 2 - 3 or 2 - 4 respectively were cotransformed into host cell yeast Y190. The interaction positive cotransformants were identified by β -gal activity assay. The β -gal positive cotransformants were selected from pGADGH Rpb3 and pAS2Rpb2 - 4 two-hybrid system. DNA sequencing and alignment results showed that the interacting site of Rpb2 to Rpb3 located within the fragment from base 2701 to 2966 of Rpb2 cDNA, or within the C-termini polypeptide from amino acid 902 to 989 of Rpb2 protein.

Key words: Yeast, RNA polymerase, Subunit, Interaction, Two-hybrid system

This work was partially granted by Japan-China Medical Association and National Natural Science Foundation, China(39670817)

* Corresponding Author, Department of Microbiology, Harbin Medical University, No. 157, Baojian Road, Harbin, 150086, China

寻求微生物发酵新技术、新产品合作项目

★ 合作方式: 技术转让、技术入股、共同开发均可。

★ 单 位: 山西省农科院科锋中心

★ 联 系 人: 张先生 郭先生

★ 联系电话: 0351 - 7123328

★ E-mail: kefeng@public.ty.sx.cn