

火龙果 Ty1-copia 类反转录转座子反转录酶序列的克隆及分析

范付华, 乔 光, 郑思成, 文晓鹏*

(贵州大学贵州省农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025)

摘 要: 根据 Ty1-copia 类反转录转座子反转录酶的保守区设计简并引物, 通过 PCR 扩增, 从火龙果基因组中扩增出 260 bp 左右的目标条带, 经回收、克隆、测序及序列分析, 获得了 23 条来源于火龙果试管苗变异和非变异材料的反转录酶序列。通过系统演化分析, 所得序列可分为 5 类, 存在较高的异质性; 与母株相比, 变异植株的反转录酶序列存在缺失、移码和终止密码子突变。经反转录酶氨基酸序列对比, 火龙果与其它物种间具有较高的同源性, 表明在不同物种间可能存在反转录转座子的横向传递作用。

关键词: 火龙果; 变异; Ty1-copia 类反转录转座子; 反转录酶; 异质性

中图分类号: S 668.9

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 02-0265-08

Cloning and Analysis of Reverse Transcriptase of Ty1-copia Retrotransposons in *Hylocereus undatus*

FAN Fu-hua, QIAO Guang, ZHENG Si-cheng, and WEN Xiao-peng*

(Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Using degenerate oligonucleotide primers corresponding to the conserved domains of the Ty1-copia retrotransposon reverse transcriptase, a fragment of 260 bp was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from genomic DNA of *Hylocereus undatus*. The amplicons were recovered and cloned, then sequenced and analyzed. Twenty-three DNA sequences of reverse transcriptase were obtained from normal or somaclonal variant of *Hylocereus undatus in vitro* plants. The sequences can be classified into five groups with high heterogeneity through phylogenetic analysis. The DNA sequences displayed mutation including deletion, frameshift or stop codon. A phylogenetic tree was constructed based on the amino acid sequences from other species, indicating that they might share the common origin and that horizontal transmission of retrotransposons has occurred among the plants in the past.

Key words: *Hylocereus undatus*; variation; Ty1-copia-like retrotransposon; reverse transcriptase; heterogeneity

反转录转座子在植物中分布广, 种类多, 包括长末端重复 (Long terminal repeat, LTR) 反转

收稿日期: 2011-10-20; 修回日期: 2012-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060256)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xpwenc@hotmail.com)

录转座子和非长末端重复 (non-long terminal repeat, non-LTR) 反转录转座子。它以 RNA 为中间体, 反转录成染色体外 DNA, 再插入到基因组中, 这种特殊的转座方式使其在基因组中具有高拷贝性, 是植物核基因组的重要组成部分 (Kumar & Bennetzen, 1999; Slotkin, 2010), 其序列的克隆与分析对解析植物基因组组成、进化及表达调控具有重要意义 (Biswas et al., 2010; Kalendar et al., 2010; Ma et al., 2010)。

Ty1-*copia* 类反转录转座子是长末端重复反转录转座子的一种, 从单细胞的藻类到裸子植物和被子植物都存在 (Voytas et al., 1992; Casacuberta & Santiago, 2003; Biswas et al., 2010)。迄今已对其在多种果树基因组中的组成、系统进化和转座活性进行了研究 (孙俊 等, 2005; 杜晓云 等, 2008; Biswas et al., 2010; Ma et al., 2010)。

本研究中拟从火龙果 (*Hylocereus undatus*) 基因组 DNA 中克隆 Ty1-*copia* 类反转录转座子反转录酶序列, 并分析离体变异材料反转录酶序列的异质性特点, 以期揭示火龙果遗传进化特性提供新信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以火龙果品种‘紫红龙’ (由贵州省果树研究所提供) 为试材, 于 2010 年 9 月在贵州大学贵州省农业生物工程重点实验室离体保存。选取经形态学、ISSR 标记鉴定发生遗传变异及其未变异组培养苗, 采用天根公司 Plant Genomic DNA Kit (DP305-03) 试剂盒提取基因组 DNA。用琼脂糖凝胶电泳 (1%) 和紫外分光光度计检测其质量和浓度后, 用 TE 缓冲液稀释提取的 DNA 至约 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 放入 -20°C 冰箱储存备用。

突变植株来自火龙果试管苗用 15% PEG 干旱胁迫 (-7.65 MPa) 60 d 后产生的体细胞无性系变异, 与对照相比棱的数量增加, 生长较缓慢。

1.2 反转录酶序列的 PCR 扩增

参照文献 (Flavell et al., 1992) 设计 Ty1-*copia* 类反转录转座子反转录酶简并引物。Rtp1: 5'-CAN GCNTTPyPyTNCAPyGG-3'; Rtp2: 5'-APuCATPuTCPuTCNACPuTA-3'。其中 $N = A / T / G / C$, $Py = T / C$, $Pu = A / G$ 。

选取 2 个遗传变异株系和未变异株系 (对照) 的 DNA 进行反转录酶序列的 PCR 扩增。反应体系为 $10 \mu\text{L}$, 含 $3.0 \mu\text{L}$ ddH₂O, $0.5 \mu\text{L}$ 引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $1.0 \mu\text{L}$ 模板 DNA, $5.0 \mu\text{L}$ Mix。其中 Mix 购自北京天根生化科技有限公司, 含 $0.1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq polymerase, $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.3), $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂, 以及其它稳定剂和增强剂。

PCR 反应程序为 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 1 min, 52°C 复性 2 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。

1.3 PCR 产物回收、克隆及测序

用 1% 琼脂糖凝胶检测扩增产物, 并用 Bio Teke 胶回收试剂盒回收并纯化 PCR 产物。直接将回收产物连接于 pMDTM19-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37°C 培养 16~20 h 后, 蓝白斑筛选。

挑取白色克隆, 在含有 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中过夜培养后, PCR 鉴定阳

性克隆。提取鉴定为阳性的菌液质粒, 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切鉴定后委托北京诺赛基因组有限公司测序。

1.4 反转录酶序列分析

采用 BLAST 程序推导、比对获得反转录酶基因片段的氨基酸序列, 多重比对采用 Clustal W 软件, 用 MEGA5.0 软件邻接法构建系统发育进化树, 利用自展法 (重复 1 000 次) 对做出的进化树进行评估 (Saitou & Nei, 1987)。

2 结果与分析

2.1 反转录酶序列 PCR 扩增及测序

在供试材料未变异 (母株)、变异 1 号和 2 号材料都检测到了反转录酶序列, 长度均为 260 bp 左右 (图 1), 这与在其它植物上的报道 (Ellis et al., 1998; Jiang et al., 2010) 一致。

将 3 个样品的特征片段回收、克隆并测序, 获得 23 条不同的序列, 其中有 6 条来自变异 1 号 (HURT1 ~ HURT6), 8 条来自变异 2 号 (HURT7 ~ HURT14), 9 条来自母株 (HURT15 ~ HURT23)。

2.2 Ty1-copia 类反转录酶的异质性及序列分析

将获得的 23 条序列递交到 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库进行序列比对, 结果表明它们均与已知植物 Ty1-copia 类反转录转座子的反转录酶序列有很高的相似性, 其中 HURT1、HURT7、HURT9、HURT11 和 HURT12 序列长度为 263 bp, 其余均为 266 bp。这些序列在 GenBank 中的登录号为 JN102305 ~ JN102327。所有序列均富含碱基 AT, AT 所占比例范围为 57.8% ~ 62.7% (表 1); 核苷酸序列相似性范围为 51.3% ~ 99.6%。由此可见, 由同一简并引物获得的反转录转座子反转录酶序列并不完全一致, 它们在长度、碱基变化上的多态性折射出火龙果同一类反转录转座子的异质性。

克隆的 23 条序列中, 不具有内含子序列, 将其翻译成氨基酸, 参照 Ty1-copia 类反转录转座子反转录酶基因的氨基酸保守序列, 发现有 4 条序列发生了移码突变, 分别是 HURT1 (第 74 个氨基酸处)、HURT9 (第 72 个氨基酸处)、HURT11 (第 74 个氨基酸处) 和 HURT12 (第 74 个氨基酸处); 有 7 条序列, 即 HURT1、HURT6、HURT7、HURT8、HURT11、HURT12 和 HURT13, 发生了终止密码子突变, 其中 HURT6 和 HURT8 发生了多达 4 个终止密码子的突变 (图 2), 值得注意的是, 这些差异序列均来自突变体。因此移码突变和终止密码子突变可能是导致火龙果反转录转座子异质性的重要原因。

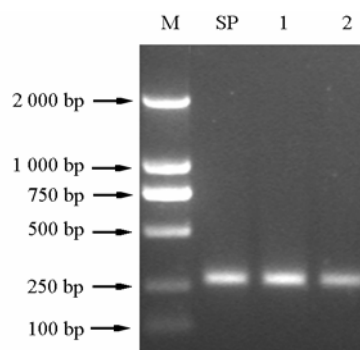


图 1 火龙果反转录转座子反转录酶序列的 PCR 扩增

M: Marker; SP: 母株; 1: 变异 1 号;
2: 变异 2 号。

Fig. 1 PCR amplification of reverse transcriptase sequence from *Hylocereus undatus*

M: Marker; SP: Stock plant; 1: Mutant 1;
2: Mutant 2.

表 1 火龙果 Ty1-copia 类反转录酶序列的组成

Table 1 The nucleotide composition of reverse transcriptase of Ty1-copia retrotransposons in *Hylocereus undatus*

序列号 Sequence No.	大小/bp Size	AT 比例/% AT content	登录号 Accession number	序列号 Sequence No.	大小/bp Size	AT 比例/% AT content	登录号 Accession number
HURT1	263	58.9	JN102305	HURT13	266	61.3	JN102317
HURT2	266	59.4	JN102306	HURT14	266	60.2	JN102318
HURT3	266	59.4	JN102307	HURT15	266	58.6	JN102319
HURT4	266	60.2	JN102308	HURT16	266	59.8	JN102320
HURT5	266	59.8	JN102309	HURT17	266	60.2	JN102321
HURT6	266	59.8	JN102310	HURT18	266	59.0	JN102322
HURT7	263	62.7	JN102311	HURT19	266	59.0	JN102323
HURT8	266	59.4	JN102312	HURT20	266	61.3	JN102324
HURT9	263	57.8	JN102313	HURT21	266	59.8	JN102325
HURT10	266	61.7	JN102314	HURT22	266	62.0	JN102326
HURT11	263	62.4	JN102315	HURT23	266	60.9	JN102327
HURT12	263	59.3	JN102316				



图 2 火龙果 Ty1-copia 类反转录酶氨基酸序列比较

- 为优化联配产生的缺口；* 表示序列完全相同；: 表示保守；. 表示半保守；阴影中的 X 代表终止密码子；
右边的数字表示序列中氨基酸的数量。

Fig. 2 The amino sequence alignment of reverse transcriptase of Ty1-copia retrotransposons in *Hylocereus undatus*

“ - ”, “ * ”, “ : ” and “ . ” stand for gaps introduced for optimal alignment, identical, conserved and semi-conserved amino acid residues in all sequences, respectively; X in the shadow stands for stop codons; Numerals on the right indicate the number of amino acid residues in the sequences.

2.3 系统发育进化树分析

为了阐明所得火龙果 23 条 Ty1-copia 类反转录转座子反转录酶 DNA 序列间的相互关系，利用 MEGA5.0 软件邻接法构建了相应的系统发育进化树（图 3）。根据进化树 branch 的长度可把这 23 条反转录酶序列分成了 5 类。其中 I 类包含了 13 个序列，多数来自母株；II 类和 III 类分别包括 5 个和 3 个序列，除了 HURT20 外，其它序列均来源于突变体，且都发生了终止密码子突变；而 IV 类

和V类均只有 1 个序列，分别是 HURT10 和 HURT9，来自变异 2 号材料，这两类与其余类别中序列的遗传距离较大。

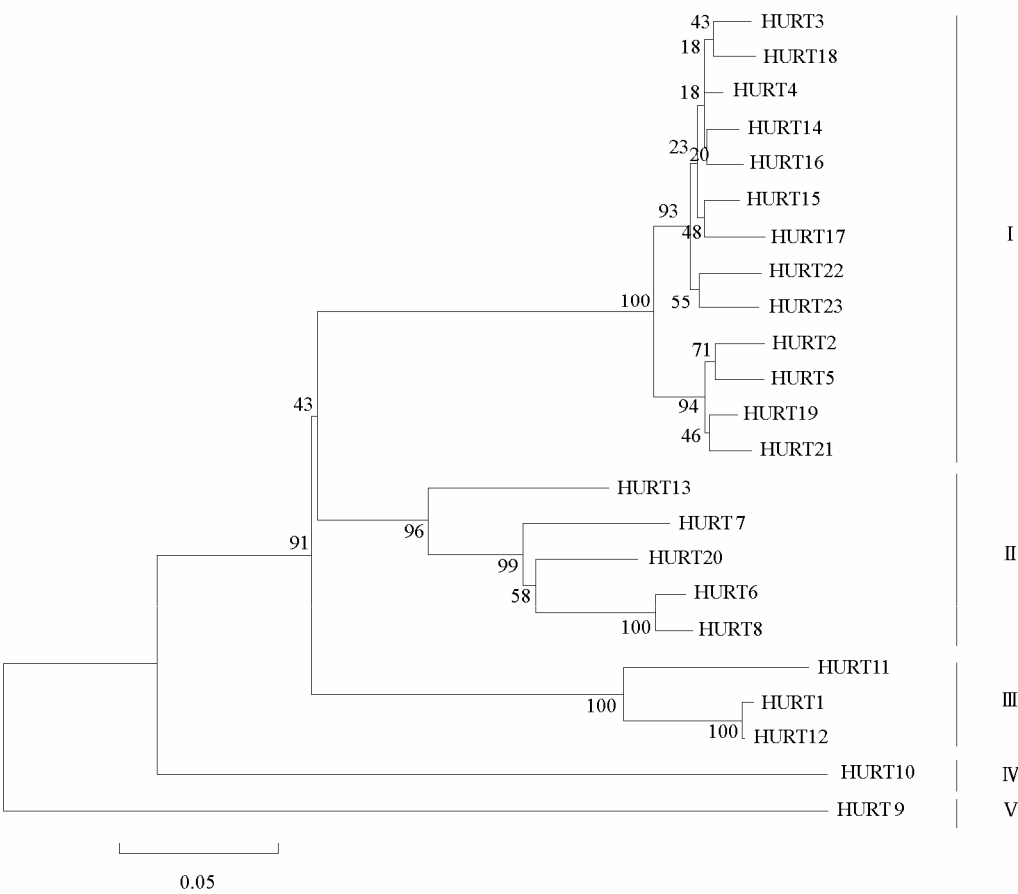


图 3 火龙果 Ty1-copia 反转录转座子反转录酶 DNA 序列进化树
树枝节点处的数值表示 1 000 次重复得到的自展值，树枝长度代表以邻接法估算出来的遗传距离。
Fig. 3 Phylogenetic tree of DNA sequences of reverse transcriptase of Ty1-copia retrotransposons in *Hylocereus undatus*
Numerals at the branch nodes indicate the bootstrap support out of 1 000 replications. The branch lengths are proportional to the genetic distances as estimated by the neighbor-joining method.

将获得的 23 条火龙果反转录酶的氨基酸序列，与 GenBank 中来源于不同生物 Ty1-copia 类反转录酶的氨基酸序列比较，并构建系统发育进化树（图 4），这些序列间的遗传距离范围为 0~0.649。

从图 4 中可以看出，I、II 和 III 这 3 类的氨基酸序列具有较高的相似性，与其它植物差异较大，仅与杨树（*Populus ciliata*）中的 AAT73704 和橙（*Citrus sinensis*）中的 CAJ41389 序列遗传距离较近；IV 类中 HURT10 氨基酸序列与甜瓜（*Cucumis melo*）中的 CAJ76068 和柿子（*Diospyros kaki*）中的 BAB47226 序列在进化关系上相对较近，遗传距离分别为 0.243 和 0.230。以上结果可以推断，火龙果反转录转座子的进化过程中发生了横向传递作用。

由图 3、图 4 还可见，母株的绝大多数序列进化距离很近，表明它们被转座复制的时间较短；变异材料中部分反转录酶序列被聚在 I 类中，未发生突变，但发生突变的反转录酶序列全部来自变异材料，且具有很高的异质性，彼此之间的遗传距离也较远。

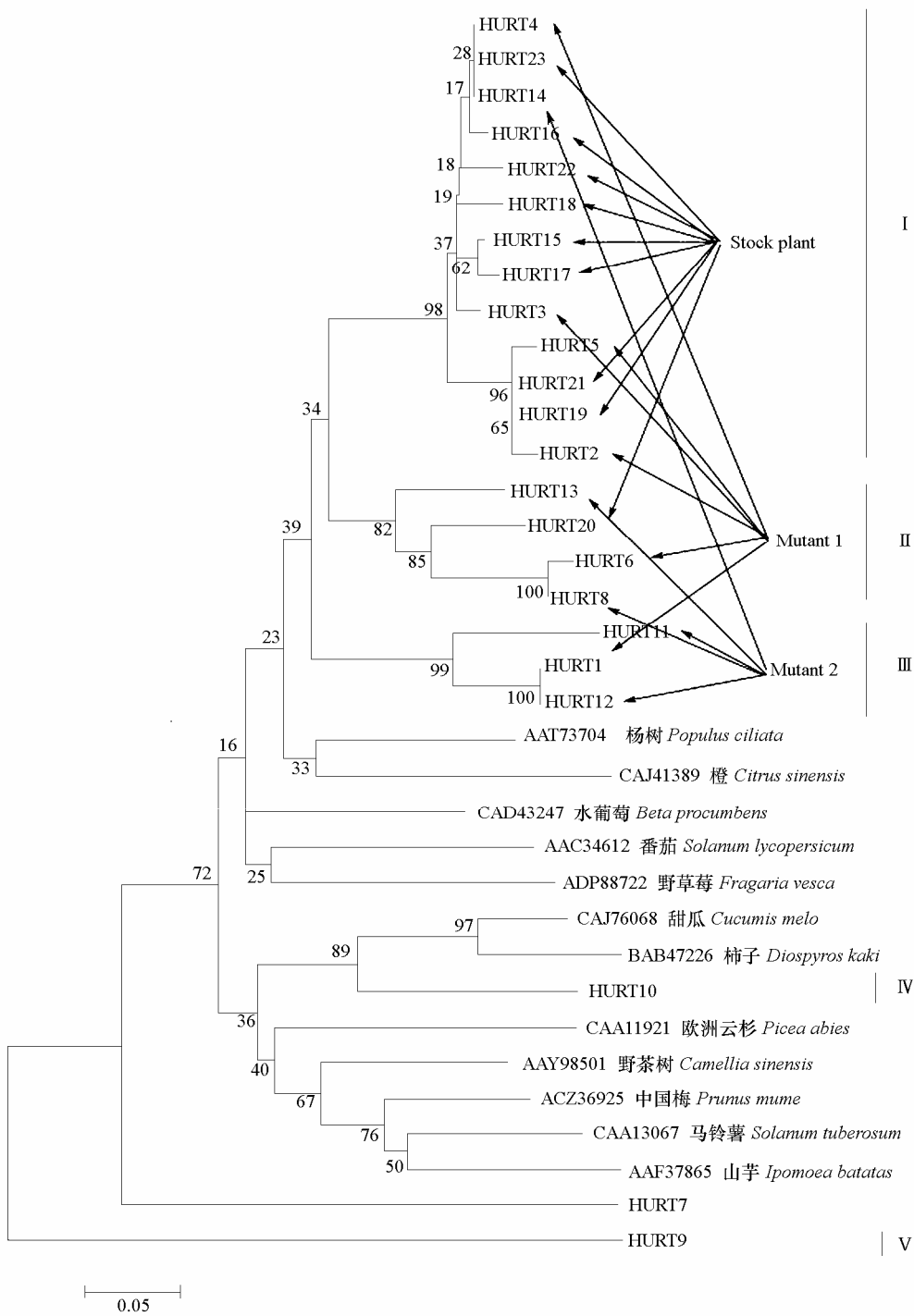


图 4 火龙果与其它植物 Ty1-copia 反转录转座子反转录酶的氨基酸序列进化树
树枝长度代表以邻接法估算出来的遗传距离，树的分支程度根据 1 000 次重复的自展率。
Fig. 4 Phylogenetic tree of amino sequences of reverse transcriptase of Ty1-copia retrotransposons in *Hylocereus undatus* and other plants
The branch lengths are proportional to the genetic distances as estimated by the neighbor-joining method.
This study employed 1 000 bootstrap replication.

3 讨论

反转录转座子是导致植物突变及基因组遗传和进化的重要原因 (Alix et al., 2005), 本研究中分离克隆了火龙果 Ty1-copia 类反转录转座子反转录酶序列, 序列分析显示这些序列存在很高的异质性, 这与其它植物的反转录酶序列类似 (Ma et al., 2008; Jiang et al., 2010)。导致这种现象的主要原因是反转录酶没有错读校对功能, 在反转录转座子发生转座过程中易发生高频突变 (Steinhauer & Holland, 1986; 杜晓云 等, 2008; 江彪 等, 2008); 其次, 反转录转座子间同源序列重组和寄主的防御机制也会促使反转录转座子变异 (Heslop-Harrison et al., 1997; Ostertag et al., 2007)。克隆的 23 条序列分析表明缺失突变、移码突变以及终止密码子突变可能是造成火龙果反转录转座子异质性的主要原因, 这与江彪等 (2008) 在黄瓜中的研究结果一致。

植物中多数长末端重复反转录转座子通常不具有相应功能, 但是能被一些生物和非生物因素激活其转录活性。在植物离体培养过程中, 反转录转座子的活性能被激活, 发生转座, 使得基因组扩增; 同时, 离体培养也能使转座子发生不规则的切除, 从而导致离体材料发生相应的可遗传变异 (Mitsuru et al., 2011)。在本研究中, 两个突变体均来自离体培养。前期研究表明, 这两个突变体不但在形态特征 (棱的数量、大小) 上与原母株存在明显差异, 通过 ISSR 分子标记检测, 也进一步确认它们在分子水平上也存在遗传差异 (未发表)。与母株材料相比, 变异植株的 ISSR 图谱表现为谱带的缺失或增加, 说明基因组序列发生了改变, 进一步折射了离体和/或干旱胁迫产生变异与反转录转座子的转座作用可能存在某种联系, 关于此问题将进一步研究求证。

通过火龙果反转录酶 DNA 序列的系统分析, 突变材料中克隆的反转录酶序列多为碱基缺失, 或者存在终止密码子。具有转座活性的反转录转座子转录酶序列中, 通常不会产生终止密码子 (Rajput & Upadhyaya, 2010)。因此可以推测, 长时间常温保存的离体材料, 在缺少水分和营养的条件下易激活反转录转座子, 部分反转录转座子发生转座作用后, 其自身在插入位点发生突变, 以无活性的形式存在于基因组中, 而没有发生突变的转座子因其具有的转座活性, 也可能在其它胁迫下作用发生相应的遗传学效应; 定期转接的材料反转录转座子活性被激活, 但环境相对较稳定, 因受到宿主严格调节, 转座的发生非常少 (唐益苗和马有志, 2005), 一旦有其它逆境的刺激, 便可能发生转座而导致可遗传的变异。

通过与其它植物反转录酶的氨基酸构建的进化树分析 (图 4), 发现火龙果 Ty1-copia 类反转录酶与其它植物有一定的同源性, 被证明是反转录转座子在物种间横向传递的结果 (Kumar, 1998)。

反转录转座子被激活, 发生转座导致基因的变异等研究, 对于基因组组成、进化及优良基因的发掘具有重要意义。

References

- Alix K, Ryder C D, Moore J, King G J, Heslop-Harrison J S. 2005. The genomic organization of retrotransposons in *Brassica oleracea*. *Plant Molecular Biology*, 59: 839 - 851.
- Biswas M K, Baig M N R, Cheng Yun-jiang, Deng Xiu-xin. 2010. Retrotransposon based genetic similarity within the genus *Citrus* and its relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57: 963 - 972.
- Casacuberta J M, Santiago N. 2003. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: Control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene*, 311: 1 - 11.
- Du Xiao-yun, Zhang Qing-lin, Luo Zheng-rong. 2008. Isolation and characterization of RNaseH-LTR sequences of Ty1-copia like retrotransposons in oriental persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. 'Luotian-tianshi'). *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (4): 501 - 508. (in Chinese)
- 杜晓云, 张青林, 罗正荣. 2008. 罗田甜柿Ty1-copia类逆转座子RNaseH-LTR序列的分离和特性分析. *园艺学报*, 35 (4): 501 - 508.

- Ellis T H N, Poyser S J, Knox M R, Vershinin A V, Ambrose M J. 1998. Polymorphism of insertion sites of Ty1-*copia* class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Molecular Genetics and Genomics*, 260: 9 - 19.
- Flavell A J, Smith D, Kumar A. 1992. Extreme heterogeneity of Ty1-*copia* group retrotransposons in plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 231: 233 - 242.
- Heslop-Harrison J S, Brandes A, Taketa S, Schmidt T, Vershinin A V, Alkimova E G, Kamm A, Doudrick R L, Schwarzacher T, Katsiotis A, Kubis S, Kumar A, Pearch S R, Flavell A J, Harrison G E. 1997. The chromosomal distributions of Ty1-*copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implication for genome evolution. *Genetica*, 100: 197 - 204.
- Jiang Biao, Lou Qun-feng, Diao Wei-ping, Chen Long-zheng, Zhang Wan-ping, Chen Jin-feng. 2008. The cloning and analysis of reverse transcriptase of Ty1-*copia*-like retrotransposons in *Cucumis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 5 (8): 1147 - 1154. (in Chinese)
- 江彪, 娄群峰, 刁卫平, 陈龙正, 张万萍, 陈劲枫. 2008. 黄瓜属 Ty1-*copia* 类逆转座子逆转录酶序列的克隆及分析. *园艺学报*, 35 (8): 1147 - 1154.
- Jiang Biao, Wu Zhi-ming, Lou Qun-feng, Wang Dong, Zhang Wan-ping, Chen Jin-feng. 2010. Genetic diversity of Ty1-*copia* retrotransposons in a wild species of *Cucumis* (*C. hystrix*). *Scientia Horticulturae*, 127: 46 - 53.
- Kalendar R, Flavell A J, Ellis T H N, Sjakste T, Moisy C, Schulman A H. 2010. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*, 106: 520 - 530.
- Kumar A. 1998. The evolution of plant retroviruses: Moving to green pasture. *Trends in Plant Science*, (3): 371 - 374.
- Kumar A, Bennetzen J L. 1999. Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 33: 479 - 532.
- Ma Yue, He Ping, Sun Hai-yue, Zhao Gui-ling, Dai Hong-yan, Zhang Zhi-hong. 2010. Isolation and characterization of transcriptionally active Ty1-*copia* retrotransposons in *Fragaria* × *ananassa*. *Agricultural Sciences in China*, 9 (3): 337 - 345.
- Ma Yue, Sun Hai-yue, Zhao Gui-ling, Dai Hong-yan, Gao Xiu-yan, Li He, Zhang Zhi-hong. 2008. Isolation and characterization of genomic retrotransposon sequences from octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Plant Cell Reports*, 27: 499 - 507.
- Mitsuru Sato, Takashi Kawabe, Munetaka Hosokawa, Fumi Tatsuzawa, Motoaki Doi. 2011. Tissue culture-induced flower-color changes in *Saintpaulia* caused by excision of the transposon inserted in the *flavonoid 3', 5' hydroxylase* (F3' 5'H) promoter. *Plant Cell Reports*, 30: 929 - 939.
- Ostertag E M, Madison B B, Kano H. 2007. Mutagenesis in rodents using the L1 retrotransposon. *Genome Biology*, 8 (Supplement 1): S16.
- Rajput M K, Upadhyaya K C. 2010. Characterization of heterogeneity in Ty1-*copia* group retrotransposons in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Biology*, 44 (4): 529 - 535.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, (4): 406 - 425.
- Slotkin R K. 2010. The epigenetic control of the Athila family of retrotransposons in *Arabidopsis*. *Epigenetics*, 5 (6): 483 - 90.
- Steinhauer D A, Holland J J. 1986. Direct method for quantitation of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA. *Journal of Virology*, 57: 219 - 228.
- Sun Jun, Fang Jing-gui, Tao Jian-min, Cai Bin-hua, Zhang Zhen. 2005. Transcription activity of apple Ty1-*copia*-like retrotransposons during tissue culture. *Journal of Fruit Science*, 22 (5): 441 - 445.
- 孙俊, 房经贵, 陶建敏, 蔡斌华, 章镇. 2005. 组织培养条件下苹果 Ty1-*copia* 类逆转座子的转录活性. *果树学报*, 22 (5): 441 - 445.
- Tang Yi-miao, Ma You-zhi. 2005. Characteristics of plant retrotransposons and their applications in functional genomics. *Journal of Plant Genetic Resources*, 6 (2): 221 - 225. (in Chinese)
- 唐益苗, 马有志. 2005. 植物反转录转座子及其在功能基因组学中的应用. *植物遗传资源学报*, 6 (2): 221 - 225.
- Voytas D F, Cummings M P, Konieczny A, Ausubel F M, Rodermeel S R. 1992. Copia-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 7124 - 7128.