

牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 序列的克隆及分析

宋程威¹, 郭大龙^{2,3}, 张曦¹, 郭丽丽^{1,3}, 侯小改^{1,3,*}

(¹河南科技大学农学院, 河南洛阳 471003; ²河南科技大学林学院, 河南洛阳 471003; ³河南省高校牡丹工程技术中心, 河南洛阳 471003)

摘要: 利用 LINE 简并引物从中原牡丹品种‘洛阳红’中扩增出 580 bp 左右的目的条带, 对其回收、克隆、测序及相关生物信息学软件分析后获得 32 条 LINE 类牡丹反转录转座子 RT (反转录酶) 序列。这些序列长度为 547~593 bp, 主要表现为点突变, 经 Clustal W 比对其同源率为 25.7%~94.2%。将其核苷酸序列经聚类后可分为 4 个家族, 其中家族 I 和 III 分别占总序列数的 50%和 28%。将 32 条 RT 序列翻译成氨基酸序列, 在第 18 氨基酸序列处有 1 个非常保守的甘氨酸 (Gly), 在 138 氨基酸序列处有 1 个半保守的赖氨酸 (Lys) 位点。32 条序列均发生较多的终止密码子突变和移码突变。与其他物种的系统进化树分析, 表明牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 序列既有一定的保守性, 同时也与其他物种间存在一定的同源性。

关键词: 牡丹; 非 LTR 类反转录转座子; 反转录酶

中图分类号: S 685.11

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 01-0157-08

Cloning and Analysis of Reverse Transcriptase of LINE-retrotransposons of Tree Peony (*Paeonia*)

SONG Cheng-wei¹, GUO Da-long^{2,3}, ZHANG Xi¹, GUO Li-li^{1,3}, and HOU Xiao-gai^{1,3,*}

(¹College of Agriculture, Henan University of Science & Technology, Luoyang, Henan 471003, China; ²College of Forestry, Henan University of Science & Technology, Luoyang, Henan 471003, China; ³Engineering Technology Research Center of Tree Peony of Henan Province University, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: A fragment of 580 bp was amplified by PCR from the genomic DNA of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andrews. ‘Luoyanghong’) using the degenerate oligonucleotide primers. The amplicons were recovered, purified and cloned. Positive clones were identified and sequenced. Finally, 32 different sequences of reverse transcriptase from tree peony ‘Luoyanghong’ LINE retrotransposons were obtained. The length of the nucleotide sequences varied from 547 to 593 bp. The homology ranged from 25.7% to 94.2% by Clustal W and the variations were characterized by point mutation. Four clusters were identified with high heterogeneity through phylogenetic analysis of their nucleotide sequences. Family I and III, respectively accounted for 50% and 28% of the total number of clones. There is a very

收稿日期: 2013-07-17; **修回日期:** 2013-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070620); 洛阳市科技攻关项目 (1102061A); 河南省高校科技创新人才支持计划项目 (13HASTIT004); 河南省重点科技攻关项目 (132102110029)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hkdhxg@126.com)

conservative point in the 18th amino acid sequence of glycine (Gly) in the translated sequence, at the same time, a conservative point in 138th amino acid sequence of lysine (Lys). More termination codon mutation and frameshift mutations were presented in 32 sequences. A phylogenetic tree was constructed based on the amino acid sequences from other species, indicating that the RT sequences from Peony LINE retrotransposons have certain homology with other species.

Key words: tree peony; non-LTR retrotransposon; reverse transcriptase

牡丹组植物具有丰富的种质资源, 近年来不同研究者采用形态学、细胞学和分子生物学等手段已对牡丹种质资源遗传多样性进行了分析(刘萍等, 2006; Zhang et al., 2009)。牡丹的花色、花型各异(张晶晶等, 2006; Shu et al., 2012), 但对于这些性状形成机制的研究并不多。前人的研究表明, 反转录转座子在葡萄果皮颜色形成(Carrier et al., 2012)和菜豆花色的形成(Erdmann et al., 2002)等方面发挥着至关重要的作用。

根据反转录转座子结构特点可分为 LTR 和非 LTR 两类, LTR 反转录转座子包括 *Tyl-copia* 和 *Ty3-gypsy* 两个亚家族, 非 LTR 类包括 LINEs (the long interspersed nuclear elements) 和 SINEs (short interspersed nuclear elements) 两个亚家族(Pritham & Feschotte, 2007; Pagan et al., 2010)。关于 LTR 类反转录转座子在植物方面的研究已比较多, 牡丹方面的研究也有报道(侯小改等, 2013), 非 LTR 类反转录转座子也已在部分植物中进行研究, 并且开发出不同的分子标记技术(Hill et al., 2005; Kalendar et al., 2010; Martin, 2010; Seibt et al., 2012)。而牡丹 LINE 类反转录转座子的 RT 序列的分离尚未见报道。

本研究中利用简并引物, 采用 PCR 方法从中原牡丹‘洛阳红’基因组 DNA 中分离得到反转录转座子 LINE 部分反转录酶(reverse transcriptase, RT)序列, 并利用 DNAMAN 和 DNASTAR 等软件对这些序列进行分析, 研究其序列变化特点, 以期对牡丹基因组进化和种质资源研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及 DNA 提取和 RT 序列扩增

试验材料为中原牡丹品种‘洛阳红’幼叶, 于 2012 年 3 月份取自中国洛阳国家牡丹基因库。

采用 CTAB 法提取牡丹‘洛阳红’基因组 DNA。参照 Hill 等(2005)扩增 RT 序列的引物。引物序列为 DVO144: 5'-GGGATCCNGGNCNGAYGG NWT-3'; 10712: 5'-SWNARNGGRTCNCCTY TG-3', 其中: R = A/G, Y = C/T, S = C/G, W = A/T, N = A/C/G/T。PCR 反应体系为: 2.0 mmol · L⁻¹ Mg²⁺, 1 × PCR buffer (TaKaRa), 87.5 μmol · L⁻¹ dNTPs, 0.8 μmol · L⁻¹ 引物(DVO144 和 10712), 2.0 mg · L⁻¹ 模板 DNA, 1.0 U *Taq* 酶(TaKaRa), 灭菌双蒸水补足至 20 μL。PCR 扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 2 min; 35 个循环; 最后 72 °C 8 min。

1.2 PCR 产物的回收、克隆及转化

用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 并用 BioTeke 胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。回收产物连接于 pMD-18T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞、涂板、摇菌培养后, 挑取克隆菌, 提取质粒, 阳性质粒送北京英潍捷基生物技术有限公司测序。

1.3 RT 序列分析

测序后得到序列经 DNAMAN 和 DNASTAR 软件进行进一步分析, 用 MEGA5.0 软件邻接法构建系统发育进化树(侯小改等, 2012)。

2.3 牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 序列聚类分析

利用 DNASTar 对分离得到的 32 条 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列进行聚类分析, 构建牡丹中 LINE 类反转录转座子 RT 序列的系统发育进化树, 从而明确所获得的 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列间的相互关系。

经 Clustal W 比对后将这 32 条 RT 序列分成了 I~V 4 组, 每组代表遗传距离比较近的遗传家族。IV 家族只含有 1 条序列 PTLRT18, 其序列长度为 593 bp, 与其余家族的遗传距离较大, 这可能是由于核苷酸序列间碱基的缺失突变造成的。I、II、III 家族分别有 16、6 和 9 条序列, 其中家族 I 和家族 III 分别占所分离出总序列数的 50% 和 28%, 这 2 个家族是克隆所得到的牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 序列的主要成分。家族 I 中 16 条序列的相似性为 71.55%, 核苷酸序列长度比较一致, 同时表现出一定程度上的碱基替换、点突变和缺失突变导致的差异性。另外家族 I 可以分为两个亚家族, 两个亚家族的一致性分别为 78.16% 和 82.87%, 这可能是两个亚家族在进化过程中由一类反转录转座子发生突变等造成。家族 II 的 6 条序列的一致性为 77.89%, 其中表现的有碱基替换、点突变和缺失突变。家族 III 的 9 条序列的一致性为 78.16%, 同样表现的有碱基替换、点突变和缺失突变。可见碱基替换、点突变或缺失突变都可能是同一家族的反转录转座子产生多拷贝群的原因 (Wang et al., 2010)。

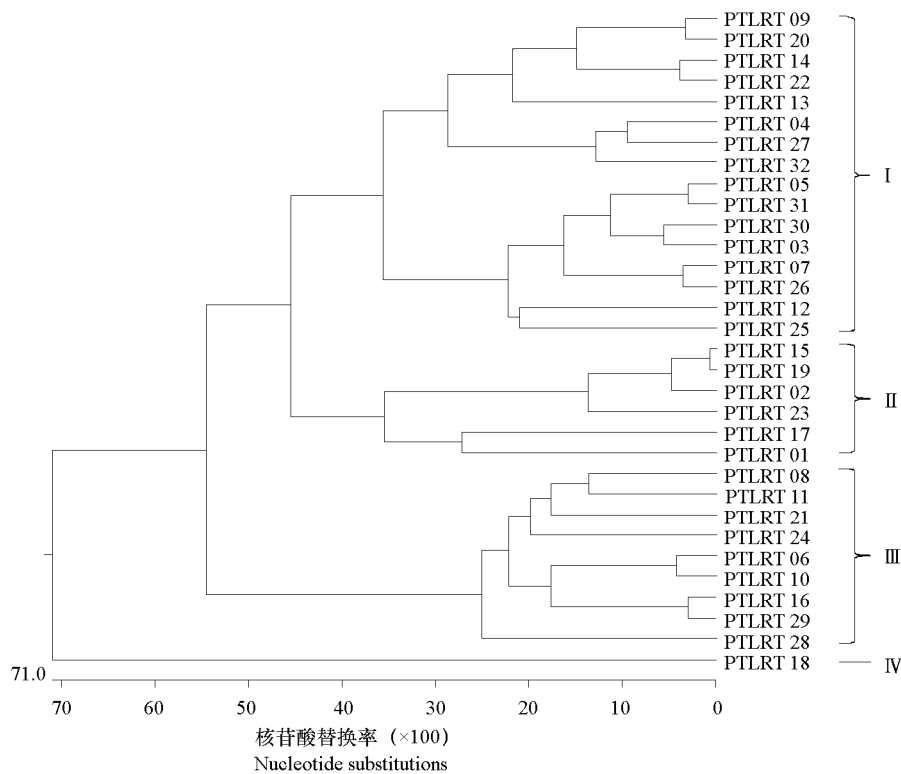


图 2 牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 序列聚类
Fig. 2 The cluster results of reverse transcriptase of LINE-retrotransposons of tree peony

2.4 牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 氨基酸序列分析

将得到的 32 条 RT 序列翻译成氨基酸序列 (图 3), 在第 18 氨基酸序列处有 1 个共同的甘氨酸 (Gly), 推测此氨基酸位点可能是 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列中 1 个非常保守的位点, 另外在第 138 位点处也表现出 1 个半保守的赖氨酸位点 (Lys)。32 条序列发生终止密码子突变的频率较

高,其中 PTLRT03、PTLRT19 和 PTLRT27 有 5 个, PTLRT07、PTLRT22 和 PTLRT26 有 6 个, PTLRT14 和 PTLRT32 有 7 个终止密码子突变位点,其余均有 9 个及以上突变位点,因此推断,氨基酸点突变和终止密码子突变可能是导致牡丹反转录转座子 LINE 异质性的主要原因。另外,此 32 条序列表现出很高的不保守性,发生了大量的移码突变,表明移码突变也是导致牡丹反转录转座子 LINE 异质性的主要原因之一。

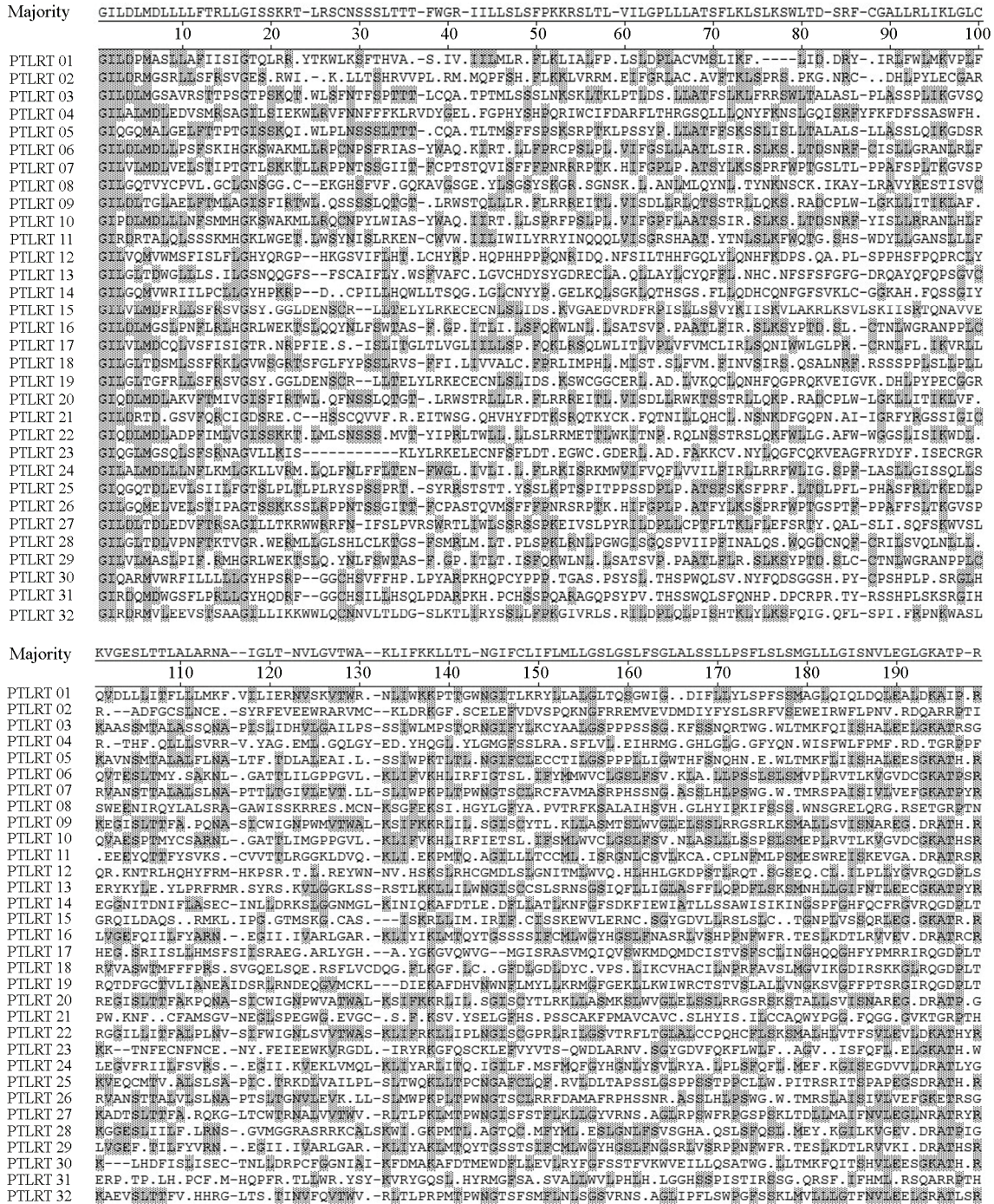


图 3 牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 氨基酸序列比较

Fig. 3 The comparison of amino acid sequence of reverse transcriptase of LINE-retrotransposons of tree peony

2.5 系统进化树分析

将本研究中从牡丹中克隆的 32 条 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列, 与从 GenBank 中搜索已登录的不同生物来源的反转录转座子 LINE 中 RT 的氨基酸序列进行比较, 并构建系统进化树(图 4), 进行分析。克隆得到的牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 序列聚类比较集中, 其中家族 I、III 和 IV 全为 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列, 其中 75% 的牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 序列聚类在家族 I 中, 表明 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列具有较高的同源性; 同样, 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和鹿子百合 (*Lilium speciosum*) 遗传距离较远, 具有一定的保守性。PTLRT14、PTLRT19 和 PTLRT30 此 3 条牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 序列与洋葱 (*Allium cepa*)、白花甜菜 (*Beta lomatogona*)、蚕豆 (*Vicia faba*)、金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 遗传距离较近, 聚在家族 II 中, 说明它们具有较高的同源性。反转录转座子作为基因组的重要组成部分, 在生物中广泛存在, 它不仅可以在物种内纵向传递, 而且可以在物种间进行横向传递 (Kumar & Bennetzen, 1999), 可能在牡丹的进化历史上与这几个物种的 LINE 类反转录转座子 RT 间存在这种横向传递的现象。

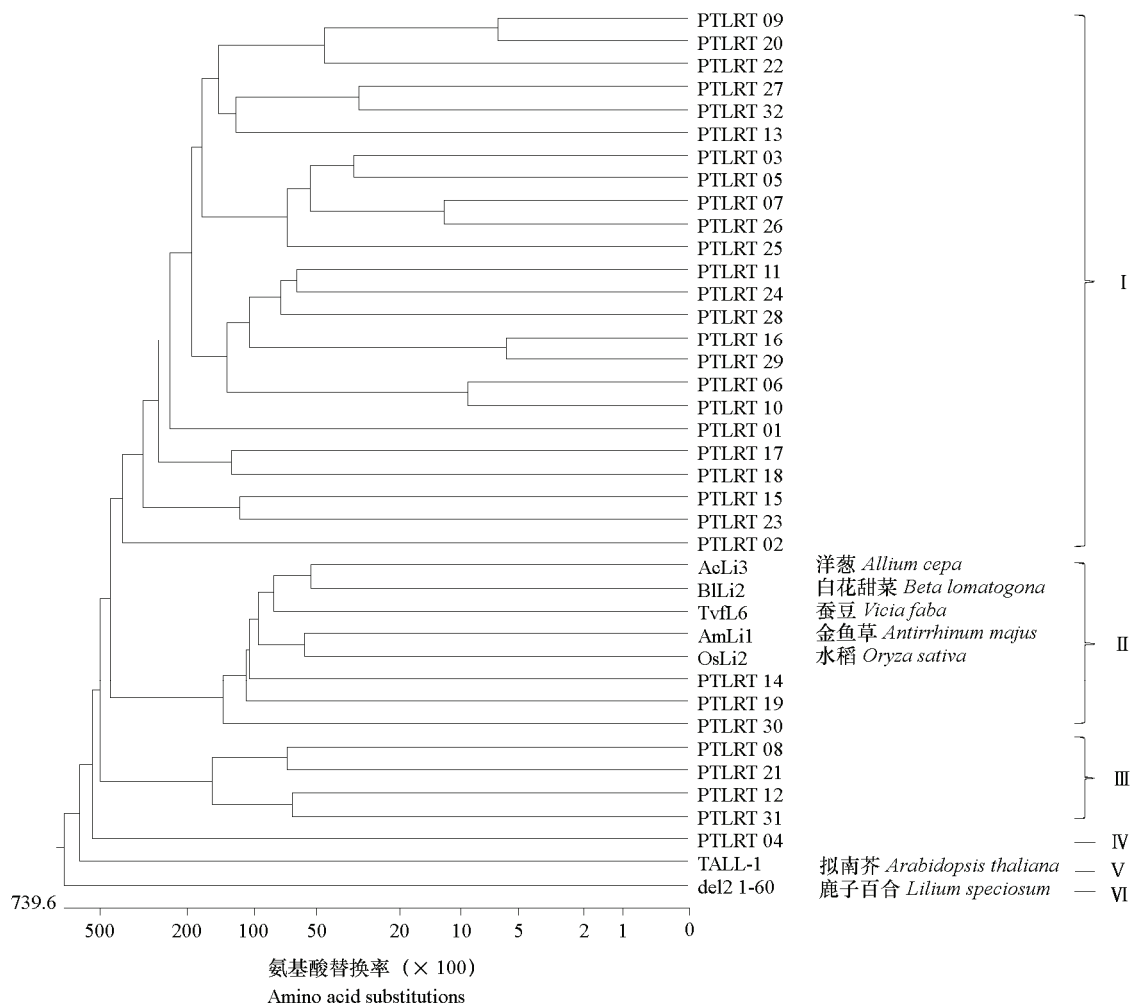


图 4 牡丹与其他植物反转录酶的氨基酸序列进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of reverse transcriptase among tree peony and some other plants

3 讨论

牡丹具有很高的观赏价值、文化价值和经济价值,对牡丹进行种质资源评价在牡丹系统演化、生物多样性保护和栽培牡丹品种培育和改良等一系列研究中具有重要的价值。目前牡丹的遗传多样性研究主要是形态学、细胞学和分子生物学手段。然而传统的基于形态学、细胞学的分析很容易受环境因素的影响(戴思兰等,2002;侯小改等,2006)。不同的标记方法各有其特异性(李保印等,2008)。本研究首次利用 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 的简并引物采用 PCR 技术从‘洛阳红’中扩增分离出了牡丹相应的 RT 序列,长度为 547~593 bp。

反转录转座子广泛存在于真核生物中,对基因组的大小、结构、功能和进化都具有重要的作用,近年来已经成为基因克隆、生物多样性及系统发育进化研究的重要工具。反转录转座子在种内和种间表现出较高的序列差异性和丰富的插入多态性,因此在长期的进化过程中,反转录转座子形成了高度异质群体(Wang et al., 2010),本研究分离的 32 条 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列在长度、碱基同源性、碱基变化上存在较大的异质性,经过对序列特征的深入分析表明碱基替换,定点或缺失突变可能是造成牡丹反转录转座子异质性的重要原因,这与 Woodrow 等(2012)在其他植物中的研究结果一致。

对本研究分离出的 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列的系统聚类分析可将它们分为 4 个家族,不同家族里含有的反转录酶序列数量不同,反映了不同家族反转录转座子的转录过程存在差异,其存在的历史地位也可能不同,对牡丹基因组进化的作用也可能各异。将 32 条 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列翻译为氨基酸后,发现在第 18 氨基酸序列处它们有 1 个共同的非常保守的甘氨酸(Gly)位点,在第 138 位点处也表现出 1 个半保守的赖氨酸位点(Lys);而在其他多处位点的氨基酸序列表现出很大的差异性,这可能是在进化的过程中发生氨基酸突变而形成。32 条序列均发生较多的终止密码子突变和移码突变。这也反映了在牡丹进化的过程中其存在的历史地位也可能不同。

将本研究中从牡丹中克隆的 32 条 LINE 类反转录转座子 RT 序列与其他物种的反转录转座子 LINE 中 RT 序列比较,并构建系统进化树。由聚类图可知牡丹的反转录转座子 LINE 中 RT 序列聚类比较集中,说明其具有一定的保守性;同样,部分序列与洋葱、白花甜菜、蚕豆、金鱼草和水稻遗传距离较近,说明它们具有一定的同源性。推测在牡丹的进化历史上可能与这几个物种的 LINE 类反转录转座子 RT 存在物种间的横向传递。

本研究分离出 LINE 类牡丹反转录转座子 RT 序列,对进一步基于其开发出一种新型分子标记具有重要意义。

References

- Carrier G, Le Cunff L, Dereeper A, Legrand D, Sabot F, Bouchez O, Audeguin L, Boursiquot J, This P. 2012. Transposable elements are a major cause of somatic polymorphism in *Vitis vinifera* L. *PLoS one*, 7 (3): e32973.
- Dai Si-lan, Wang Wen-kui, Huang Jia-ping. 2002. Advances of researches on phylogeny of *Dendranthema* and origin of chrysanthemum. *Journal of Beijing Forestry University*, 24 (5): 230 - 234. (in Chinese)
- 戴思兰, 王文奎, 黄家平. 2002. 菊属系统学及菊花起源的研究进展. *北京林业大学学报*, 24 (5): 230 - 234.
- Erdmann P M, Lee R K, Bassett M J, McClean P E. 2002. A molecular marker tightly linked to P, a gene required for flower and seedcoat color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), contains the Ty3-gypsy retrotransposon Tpv3g. *Genome*, 45 (4): 728 - 736.
- Hill P, Burford D, Martin D M, Flavell A J. 2005. Retrotransposon populations of *Vicia* species with varying genome size. *Molecular Genetics and Genomics*, 273 (5): 371 - 381.
- Hou Xiao-gai, Duan Chun-yan, Liu Su-yun, Lu Jing-xia, Zhang Ya-bing, Li Jia-jue. 2006. Advances on chromosome study of Chinese tree peony.

- China Agricultural Science Bulletin, 22 (2): 307 - 309. (in Chinese)
- 侯小改, 段春燕, 刘素云, 吕静霞, 张亚冰, 李嘉珏. 2006. 中国牡丹染色体研究进展. 中国农学通报, 22 (2): 307 - 309.
- Hou Xiao-gai, Guo Da-long, Huang Yan-mei, Zhang Xi. 2013. Cloning and analysis of reverse transcriptase of Ty3-gypsy-like retrotransposons in tree peony (*Paeonia*). Acta Horticulturae Sinica, 40 (1): 98 - 106. (in Chinese)
- 侯小改, 郭大龙, 黄燕梅, 张 曦. 2013. 牡丹 Ty3-gypsy 类反转录转座子反转录酶序列的克隆及分析. 园艺学报, 40 (1): 98 - 106.
- Hou Xiao-gai, Zhang Xi, Guo Da-long. 2012. Identification and analysis methods of plant LTR retrotransposon sequences. Hereditas, 34 (11): 1491 - 1500. (in Chinese)
- 侯小改, 张 曦, 郭大龙. 2012. 植物 LTR 类反转录转座子序列分析识别方法. 遗传, 34 (11): 1491 - 1500.
- Kalendar R, Flavell A J, Ellis T, Sjakste T, Moisy C, Schulman A H. 2010. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. Heredity, 106 (4): 520 - 530.
- Kubis S E, Heslop-Harrison J S, Desel C, Schmidt T. 1998. The genomic organization of non-LTR retrotransposons (LINEs) from three Beta species and five other angiosperms. Plant Molecular Biology, 36 (6): 821 - 831.
- Kumar A, Bennetzen J L. 1999. Plant retrotransposons. Annual Review of Genetics, 33 (1): 479 - 532.
- Li Bao-yin, Zhou Xiu-mei, Jiang Xi-wang, Zhang Qi-xiang. 2008. Research advancement on the relationship between Chinese tree peony species and cultivars at the molecular level. Journal of Henan Agricultural University, 42 (1): 121 - 126. (in Chinese)
- 李保印, 周秀梅, 蒋细旺, 张启翔. 2008. 牡丹种及品种亲缘关系的分子生物学研究进展. 河南农业大学学报, 42 (1): 121 - 126.
- Liu Ping, Wang Zi-cheng, Shang Fu-de. 2006. AFLP analysis of genetic diversity of *Paeonia suffruticosa* cultivars in Henan province. Acta Horticulturae Sinica, 33 (6): 1369 - 1372. (in Chinese)
- 刘 萍, 王子成, 尚富德. 2006. 河南部分牡丹品种遗传多样性的 AFLP 分析. 园艺学报, 33 (6): 1369 - 1372.
- Martin S L. 2010. Nucleic acid chaperone properties of ORF1p from the non-LTR retrotransposon, LINE-1. RNA Biology, 7 (6): 706 - 711.
- Noma K, Ohtsubo E, Ohtsubo H. 1999. Non-LTR retrotransposons (LINEs) as ubiquitous components of plant genomes. Molecular and General Genetics MGG, 261 (1): 71 - 79.
- Pagan H J, Smith J D, Hubley R M, Ray D A. 2010. PiggyBac-ing on a primate genome: Novel elements, recent activity and horizontal transfer. Genome Biology and Evolution, 2: 293.
- Pritham E J, Feschotte C. 2007. Massive amplification of rolling-circle transposons in the lineage of the bat *Myotis lucifugus*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104 (6): 1895 - 1900.
- Seibt K M, Wenke T, Wollrab C, Junghans H, Muders K, Dehmer K J, Diekmann K, Schmidt T. 2012. Development and application of SINE-based markers for genotyping of potato varieties. Theoretical and Applied Genetics, 125 (1): 185 - 196.
- Shu Q, Wang L, Wu J, Du H, Liu Z, Ren H, Zhang J. 2012. Analysis of the formation of flower shapes in wild species and cultivars of tree peony using the MADS-box subfamily gene. Gene, 493 (1): 113 - 123.
- Ungerer M C, Strakosh S C, Stimpson K M. 2009. Proliferation of Ty3/gypsy-like retrotransposons in hybrid sunflower taxa inferred from phylogenetic data. BMC Biology, 7 (1): 40.
- Wang F, Tong Z, Sun J, Shen Y, Zhou J, Gao Z, Zhang Z. 2010. Genome-wide detection of Ty1-copia and Ty3-gypsy group retrotransposons in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). African Journal of Biotechnology, 9 (50): 8583 - 8596.
- Woodrow P, Pontecorvo G, Ciarmiello L F. 2012. Isolation of Ty1-copia retrotransposon in myrtle genome and development of S-SAP molecular marker. Molecular Biology Reports, 39 (4): 3409 - 3418.
- Zhang J, Wang J, Xia T, Zhou S. 2009. DNA barcoding: Species delimitation in tree peonies. Science in China Series C: Life Sciences, 52 (6): 568 - 578.
- Zhang Jing-jing, Wang Liang-sheng, Liu Zheng-an, Li Chong-hui. 2006. Recent advances in flower color research of tree peony. Acta Horticulturae Sinica, 33 (6): 1383 - 1388. (in Chinese)
- 张晶晶, 王亮生, 刘政安, 李崇辉. 2006. 牡丹花色研究进展. 园艺学报, 33 (6): 1383 - 1388.