

# 水稻端粒酶 RNA 候选序列的克隆及特征解析

马登旭, 杨力媛, 马国兴, 郑洁, 应畅, 刘小川

(浙江理工大学生命科学学院生物工程研究所, 杭州 310018)

**摘要:** 端粒酶是由端粒酶反转录酶和端粒酶 RNA 构成, 端粒酶 RNA 中含有端粒合成所需的模板序列。现仅获得了拟南芥的端粒酶 RNA 序列。为了建立快速有效的富集植物端粒酶的方法并克隆水稻的端粒酶 RNA 序列, 研究中使用不同浓度的 PEG6000 选择性的沉淀端粒酶萃取液中的杂蛋白。结果表明当 PEG6000 浓度为 4% 时, 端粒酶活力最高, 并可以有效降低核糖体 28S rRNA 和 18S rRNA 的干扰。从端粒酶蛋白液中提取 RNA, 并在其 3' 端连接接头, 在模板区设计上游引物, PCR 扩增获得一条 292 bp 的未知片段, 其中含有端粒模板序列 5'-AAACCCTAA-3'。将该片段及拟南芥端粒酶 RNA 的转录调控区进行序列比对分析发现, 两者具有类似的转录调控元件。因此, 初步判定 292bp 的目的片段为水稻端粒酶 RNA 的模板下游序列。

**关键词:** 水稻; PEG6000; 端粒酶 RNA; 特征解析

**中图分类号:** Q781

**文献标志码:** A

## 0 引言

端粒酶是一种 RNA 依赖性的 DNA 聚合酶, 由端粒酶反转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 和端粒酶 RNA (telomerase RNA, TER) 构成, 其功能是催化端粒序列的合成。端粒是位于染色体末端的重复序列, 在细胞周期的大多数时间, 端粒均以环状的形式存在以保护易受攻击的染色体末端<sup>[1]</sup>。通过对拟南芥、水稻、玉米、大麦等多种植物的研究发现, 端粒酶主要分布在细胞分裂旺盛的分生组织中<sup>[2-3]</sup>, 在愈伤组织中也有较高的端粒酶活力<sup>[4]</sup>。动植物端粒酶在细胞生长过程中发挥着类似的作用, 但是两者端粒酶活力的表达调控有着明显的差异。成熟的植物细胞端粒酶活力较低, 但是在诱导脱分化和再分化的过程中则可以恢复端粒酶活力, 这也反映了植物细胞全能性的特点<sup>[5]</sup>。

根据同源蛋白的序列保守性, 现已克隆到了拟南芥和水稻的端粒酶反转录酶基因, 但是在部分植物中发现 TERT 基因的转录产物还存在选择性剪切现象, 这种机制仍不清楚<sup>[4,6-7]</sup>。在端粒酶 RNA

方面, 不同物种的 TER 在大小和序列上存在着显著的差异, 然而对线虫、酵母和脊椎动物的 TER 进行系统进化分析发现, TER 的二级结构中存在多个保守结构域。这些保守结构包括端粒模板区、5' 模板边界元素、含有模板序列的大环、一个潜在的假结和一个闭合环状螺旋区<sup>[8-10]</sup>。最近有报道称, 拟南芥端粒酶中可能存在两种 TER 形式—TER1 和 TER2, 两者的模板区序列均为 5'-CTAAACCCTA-3', 但在端粒合成时 TER1 是主要的模板提供者<sup>[11]</sup>。因此, 获取更多植物端粒酶 RNA 的序列信息并进行系统的分析, 对进一步阐述其结构与功能具有重要的意义。

本研究的目的是探究一种快速有效的分离纯化植物端粒酶的方法, 克隆水稻的端粒酶 RNA, 并通过生物信息学技术预测分析水稻与拟南芥端粒酶 RNA 的转录调控元件。核糖体是影响端粒酶富集及端粒酶 RNA 克隆的主要因素。研究中利用核糖体大小亚基偶联及解聚的动态平衡受镁离子浓度调控的机制<sup>[12]</sup>, 提高裂解液中镁离子的浓度, 使核糖体大小亚基最大程度的偶联在一起。然后, 使用不同工作浓度的 PEG6000 选择性沉淀不同分子量的蛋白, 期望获

得单位端粒酶活力及端粒酶蛋白量均最高的蛋白提取液。从该蛋白提取液中提取 RNA,在 3'端连接接头,然后通过 RT-PCR 克隆端粒酶 RNA 序列。

不同植物的端粒酶 RNA 在大小、序列甚至是二级结构上很可能也存在较大的差异,但它们的作用都是在植物细胞分裂旺盛的组织中维持分裂细胞的端粒长度以保证染色体的完整性。这意味着不同植物的端粒酶 RNA 具有类似的表达调控机制。转录起始位点上游和下游序列在 CG 和 AT 偏爱性方面有显著的不同,这种现象在水稻和拟南芥中都普遍存在,相对熵值分析发现,这是由于上游保留着顺式元件而引起转录起始位点上下游自由能的不同<sup>[13-14]</sup>。Morey 等<sup>[15]</sup>基于毗连序列间自由能的差异提出了一种启动子预测程序 PromPredict,根据预测到的启动子位置可以初步判断未知基因 5'端转录起始位点。然后可以使用植物顺式元件数据库 PLACE<sup>[16-17]</sup>对端粒酶 RNA 候选序列中可能存在的转录调控元件进行解析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

水稻愈伤组织,乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、二硫苏糖醇(DTT)及 PEG6000 购自上海生工生物工程技术服务有限公司,RNAiso Plus、RNAiso-mate for Plant Tissue、T4 RNA ligase、PrimeScript Reverse Transcriptase (RNase H<sup>-</sup>)购自 TaKaRa 公司, RNase 固相清除剂购自天恩泽。实验中用到的引物均为上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 不同浓度 PEG6000 优化端粒酶的提取

取 3 g 水稻愈伤组织于研钵中,加液氮充分研磨,然后转入 50 mL 离心管中并迅速加入 10 mL 裂解液(裂解液:Tris-HCl 50 mmol/L pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 15 mmol/L, KCl 100 mmol/L, EGTA 20 mmol/L, PMSF 100  $\mu$ mol/L, PVP 1.5%, 甘油 10%, DTT 1 mmol/L)。4℃, 13 000 r/min 离心 15 min;将上清(端粒酶初提液)分装到 6 个 2 mL 的 EP 管中,每管 1.5 mL;分别加入 50%的 PEG6000 至其工作浓度分别为 10%、8%、6%、4%、2%、0%,冰育 30 min,期间间断混匀;4℃, 13 000 r/min 离心 15 min;将上清转入新的 EP 管中,并测定不同浓度 PEG6000 选择性沉淀杂蛋白后得到的上清液中蛋白的浓度,然后分装并保存至-80℃。

#### 1.2.2 酶促反应及端粒酶活力分析

酶促反应采用陈波等<sup>[18]</sup>的方法,用每个 PEG6000 工作浓度下得到端粒酶粗提蛋白做两组实验,分别为正常组和灭活组,每组加 30  $\mu$ L 的端粒酶粗提蛋白。其中,灭活组在酶促反应前先 65℃ 15 min 将端粒酶灭活,正常组不做处理;然后正常组与灭活组同时进行酶促反应。酶促反应体系为 300  $\mu$ L (酶促缓冲液: Tris-HCl 50 mmol/L pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol/L, KCl 50 mmol/L, TritonX-100 0.1%, EGTA 10 mmol/L, DTT 1 mmol/L, dNTPs(无 dCTP) 50  $\mu$ mol/L, BSA 10 ng/ $\mu$ L),前导引物 Chen03(见表 1)工作浓度为 1.2  $\mu$ mol/L。酶促反应条件:19℃, 13 min;94℃, 1 min。

酶促反应后,先在酶促体系中加入 1  $\mu$ L 10 ng/ $\mu$ L RNase A H<sub>2</sub>O, 37℃ 孵育 30 min;然后参照《精编分子生物学指南》中的 DNA 酚抽提和乙醇沉淀法回收酶促产物,其中在酚/氯仿/异戊醇处理离心后取等量上清,最后加 20  $\mu$ L 水充分溶解,并测定 ssDNA 浓度。端粒酶的单位酶活力定义为:19℃ 条件下 1  $\mu$ g 蛋白 1 min 合成 1 ng DNA 为一个活力单位。

#### 1.2.3 水稻愈伤组织及端粒酶粗提液中 RNA 的提取

水稻愈伤组织总 RNA 和端粒酶粗提液中 RNA 的提取使用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 和 RNAiso-mate for Plant Tissue 试剂,提取方法参照其中的植物 RNA 提取。

#### 1.2.4 RNA 的 PAGE 变性电泳

配制新鲜的 4 M 尿素和 10× 标准 loading buffer(50% 甘油, 50 mmol/L EDTA, 0.2% 溴酚蓝),将两者等体积混合即为 10× 尿素上样缓冲液,每 10  $\mu$ L RNA 加 1  $\mu$ L 10× 尿素上样缓冲液。65℃, 10 min,然后迅速冰浴 5 min。上样于 3.5% PAGE 核酸凝胶中,4 V/cm 电泳。

#### 1.2.5 RNA 与接头的连接、回收及反转录

将从端粒酶粗提液中提取的 RNA 与单链接头 Linker 2(见表 1)连接,连接体系参见 T4 RNA 连接酶使用说明,15℃ 连接 16 h。

连接反应结束后加等体积水饱和酚,室温混匀 5 min;12 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入等体积的氯仿,室温混匀 5 min;4℃, 12 000 r/min 离心 10 min;取上清于新 EP 管中,加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)和 2.5 倍无水乙醇(加盐后体积),混匀后,冰上放置 30 min;4℃, 13 000 r/min 离心 20 min;75%乙醇洗涤 1 次;13 000 r/min 离心

5 min,弃上清;瞬时离心吸尽残余的乙醇,室温干燥 5 min,加 8  $\mu$ L 的 DEPC H<sub>2</sub>O 溶解。

由于端粒酶 RNA 很可能具有复杂的二级结构,因此反转录酶使用 PrimeScript Reverse Transcriptase,反转录体系及条件参见 PrimeScript Reverse Transcriptase 说明书,其中反转录引物使用与 Linker 2 反向互补的 RevPrim(见表 1)。

表 1 候选序列克隆中所用引物的序列

名称	序列(5'-3')
Chen 03	ATGATGTGCAACTCGACAACCTT
Linker 2	5'PO <sub>4</sub> -GGATCCGGTACCTCTAGATCAG-NH <sub>2</sub> 3'
RevPrim	CTGATCTAGAGGTACCGGATC
GENF 1	AGCCTTTTCTGGTAAACCCTAAAC
GENF 2	AGCCTTTTCTGGTAAACCCTAACG
GENF 3	AGCCTTTTCTGGTAAACCCTAAC
GENF 4	AGCCTTTTCTGGTAAACCCTAAAG
GENF 5	AGCCTTTTCTGGTAAACCCTAAG

1. 2. 6 候选序列的克隆

鉴于端粒酶 RNA 的模板区序列可能存在不同的排列方式,设计了多种上游引物,实验过程中根据实验结果以及陈波等<sup>[18]</sup>的实验数据做了进一步的改进,设计出了另外 5 种上游引物 GENF 1~GENF 5(见表 1)。PCR 反应中以 cDNA 为模板,上游引物分别为 GENF 1~GENF 5,下游引物为 RevPrim。PCR 反应参数:94℃ 预变性 2 min;94℃ 45 s,48℃ 40 s,72℃ 50 s 执行 8 个循环;94℃ 45 s,56℃ 40 s,72℃ 50 s 执行 24 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

2 实验结果

2. 1 不同浓度 PEG6000 处理后得到的端粒酶提取液中的蛋白浓度

实验中用不同浓度的 PEG6000 选择性的沉降端粒酶初提液中的蛋白。在 PEG6000 浓度<2% 时上清中的蛋白沉淀下的较少;随着 PEG6000 浓度的增加蛋白沉降速率增加,PEG6000 浓度达到 4% 时达到最大;在较大的 PEG6000 浓度>8% 时,基本可以沉淀下初提液中的大部分蛋白(见图 1)。

2. 2 不同 PEG6000 浓度下得到的端粒酶活性大小

从图 2 中可以看到,PEG6000 浓度在 0~4% 之间时,端粒酶的活力较高并且变化不大,在浓度为 4% 时端粒酶活力最大。随着 PEG6000 浓度的继续增加,端粒酶活力急剧下降。在 PEG6000 浓度增加到 10% 时,基本上没有端粒酶活力。

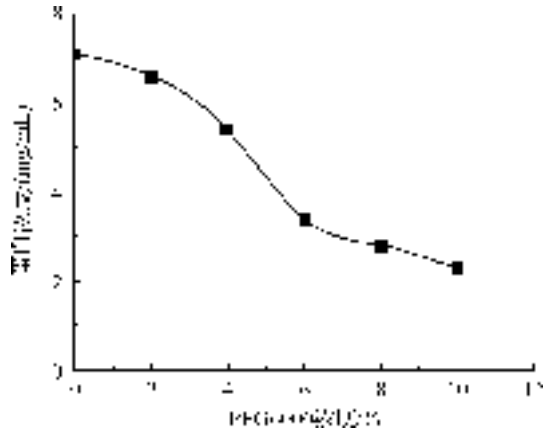


图 1 不同浓度 PEG6000 选择性沉淀后上清中的蛋白浓度

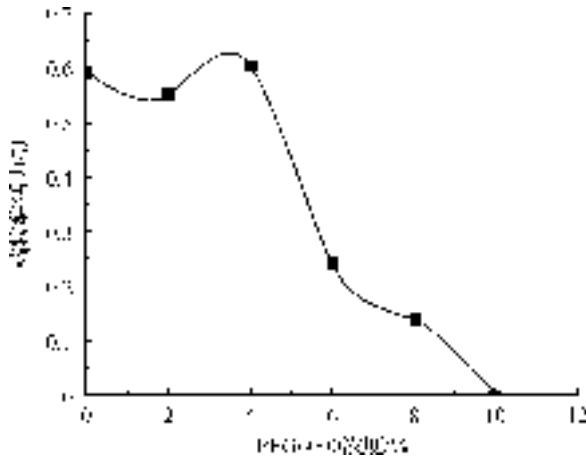


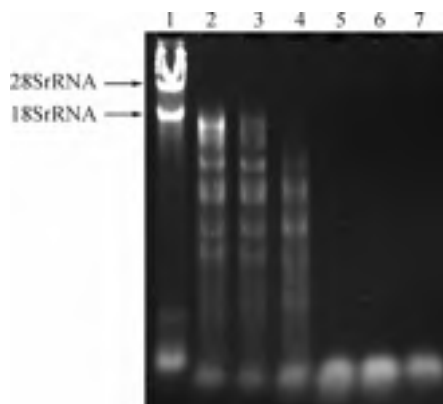
图 2 不同 PEG6000 浓度下的端粒酶活力

2. 3 端粒酶蛋白提取液中 RNA 组分的 PAGE 电泳分析

从端粒酶蛋白粗提液中提取 RNA,各组取 2  $\mu$ g,用 3.5% 的 PAGE 胶尿素变性电泳分离,电泳时用水稻愈伤 total RNA 做参照。如图 3 所示各组的 RNA 可以有效分离,并且分子量均比 18S rRNA 小。随着 PEG6000 浓度从 0% 到 4% 的增加分子量的 RNA 依次减少,而 PEG6000 浓度大于 6% 时, RNA 种类骤减。

2. 4 候选序列的克隆

使用上游的 5 种引物及下游引物 RevPrim 进行 PCR 扩增,结果如图 4,第 2 组、第 3 组和第 4 组在 400 bp~500 bp 间有一条片段,而第 4 组在 300 bp 附近还有一条带。将第 4 组的两条带回收克隆并测序,测序结果显示两条带的大小分别为 459 bp 和 292 bp。经 blast 比对分析发现,459 bp 的片段不具备完整的模板序列,而 292 bp 的片段则含有合成端粒序列的模板,模板区序列为 5'-AAACCCTAA-3'。

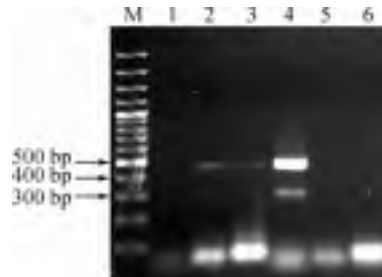


1. total RNA, 2. 0%组 RNA, 3. 2%组 RNA, 4. 4%组 RNA, 5. 6%组 RNA, 6. 8%组 RNA, 7. 10%组 RNA

图3 端粒酶粗提蛋白中RNA的PAGE电泳

## 2.5 候选序列转录调控元件的分析

从NCBI水稻及拟南芥的基因组数据库中,分别查找水稻292 bp目标序列及拟南芥TER1的模板区上游1000 bp序列,用PromPredict程序进行了启动子预测分析。在水稻中预测到3个启动子区,拟南芥中为2个(见图5)。横轴代表模板区上



M. 100 bp Maker, 1. 对照, 2. GENE 1, 3. GENE 2, 4. GENE 3, 5. GENE 4, 6. GENE 5

图4 不同上游引物与RevPrim的PCR结果

游核苷酸的位置,其中右边界为模板区5'端,纵轴表示自由能的大小。通过对这些启动子位置及启动子两侧自由能差异的分析,可以初步判定水稻的转录起始位点为758 bp处,距模板区5'端243 bp;拟南芥的转录起始位点为703 bp处,距TER1的模板区5'端298 bp。

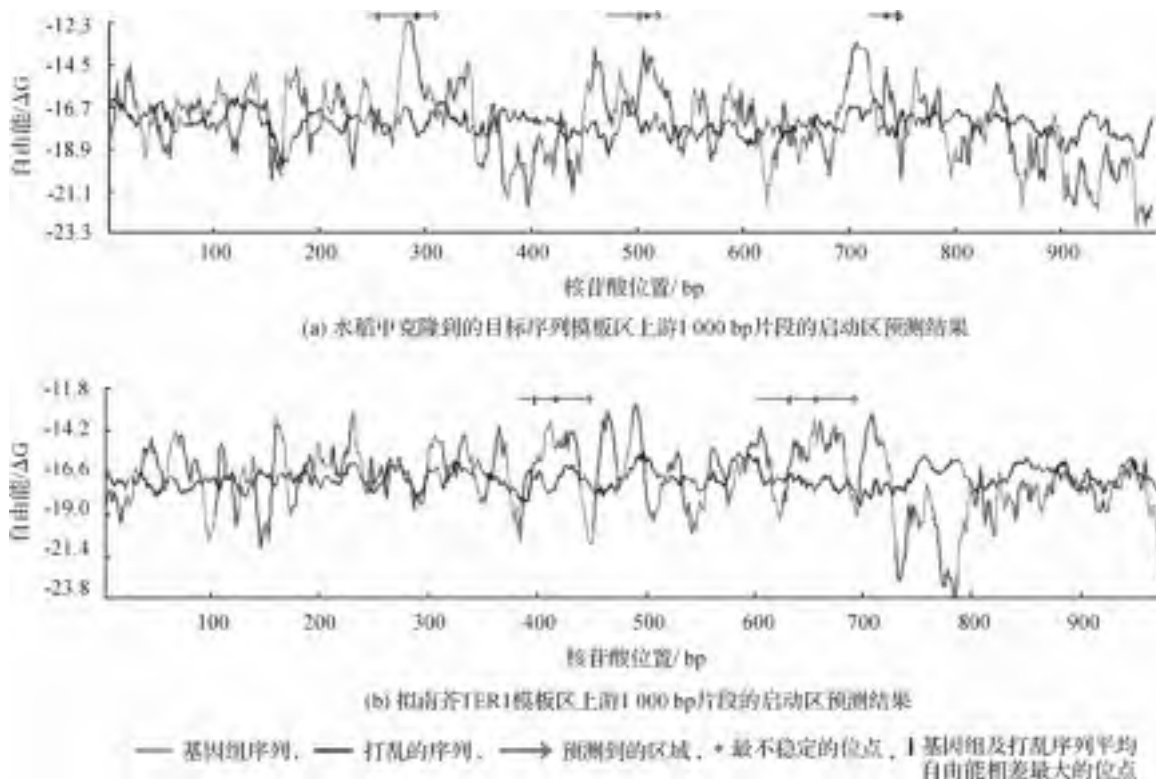


图5 启动子区预测

以图5中预测的转录起始位点为基础,通过PLACE数据库<sup>[16-17]</sup>对起始位点上游约800 bp的序列进行了转录调控元件的预测及比较分析(如图6)。水稻中的目标序列及拟南芥TER1序列转录起始位点上游的转录调控元件很相似,两者在-40~-50

bp区均有TATABOX元件,在转录起始位点附近没有起始密码子ATG,此外在上游还有CAATBOX、CACT、EBOXNAPA、GATABOX、DOFCOREZM、POLLENILELAT52、ARR1AT等转录调控元件,并且这些调控元件在两者中的分布位置也很相似。

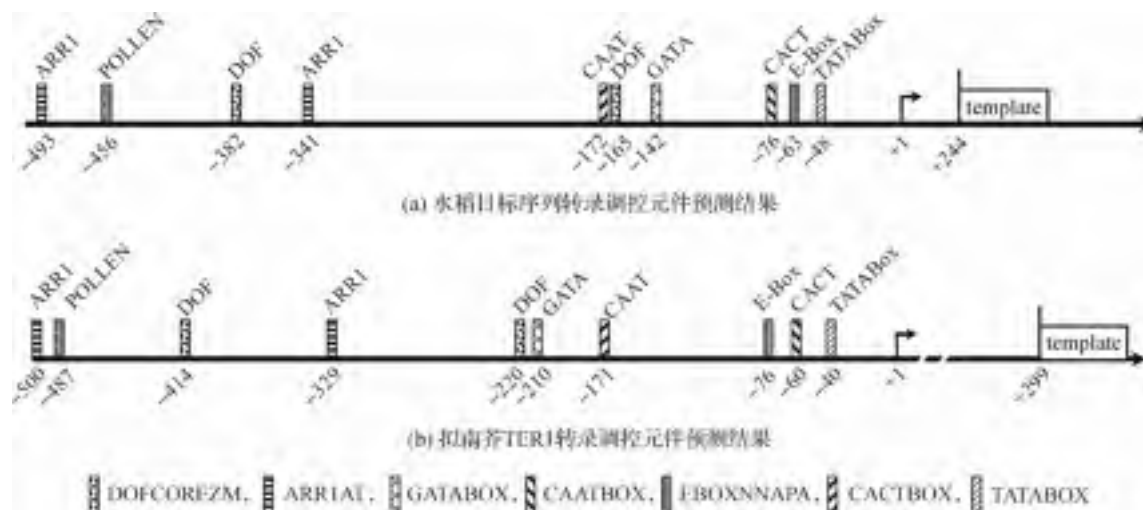


图6 水稻目标序列与拟南芥 TER1 转录调控元件比较分析

### 3 讨论

聚乙二醇能够按分子量大小的不同对蛋白质等生物大分子进行选择性的沉淀,因此实验中采用不同浓度的 PEG6000 对端粒酶的提取进行优化。对图 1 和图 2 数据比较分析,发现在 PEG6000 浓度从 0% 增加到 4% 时,蛋白的浓度有明显的下降,而端粒酶的活力变化不大,说明离心后的上清中部分分子量较大的杂蛋白沉降而端粒酶蛋白基本上还处于上清中;在 4%~8% 范围内,从图 1 中可以看到粗提蛋白的沉降有一个明显加快的过程,而在图 2 中相应的 PEG6000 浓度范围端粒酶的活力也有一个大幅下降。由此可以推断出在 PEG6000 浓度大于 4% 时,端粒酶开始沉淀,而 4% 的 PEG6000 浓度可以从初提液中选择沉降大约 50% 的杂蛋白,此时端粒酶基本上仍处于上清中,所以 4% 的 PEG6000 可以有效的沉淀杂蛋白,并获得较好的端粒酶活力。

在端粒酶 RNA 的克隆过程中发现,核糖体小亚基中的 18S rRNA 中存在与端粒酶 RNA 模板相似的序列,所以排除细胞中大量存在的 18S rRNA 的干扰是实验中必须解决的问题。RNA 的变性电泳分析显示,裂解液中镁离子工作浓度从 5 mmol/L 提高到 15 mmol/L 基本上可以促进游离的核糖体大小亚基聚合,增加其分子量而被 PEG6000 选择性沉降下来;在 PEG6000 的浓度为 0% 时,提取出的 RNA 中也不含有核糖体 RNA,可能是因为裂解液中不含有蛋白质变性剂,核糖体大多吸附在内质网或多个核糖体共同结合在 mRNA 上,这样在高速离心的条件下,大部分附着核糖体即随着沉淀下来。因此提高镁离子浓度可以更有效地降低核糖体小亚

基 18S rRNA 的干扰。

对克隆到的 292 bp 序列进行 blast 比对分析,发现该片段是位于水稻第 6 号染色体上的未知序列,含有合成端粒序列所需要的模板区,模板区序列为 5'-AAACCCTAA-3'。该模板区具备端粒合成时的锚定位点,同时该模板区 3' 端以 AA 结尾也与之之前研究发现的端粒酶在体外延伸时优先合成以 TT 结尾的前导引物想吻合<sup>[18]</sup>。此外,与拟南芥模板区 10 个碱基相比,9 个碱基的模板区可以防止复制时出现滑动现象,保证端粒合成的准确性。水稻目标序列和拟南芥 TER1 转录调控元件的预测结果表明,两者的基本启动子是 TATABOX。在上游还都具有调控转录起频率的 CAAT 元件,调控植物发育的 EBOXBNNAPA 元件以及调控基因组织特异性表达的 GATABOX 元件。预测结果显示两者的转录调控元件具有较高的相似性,但仍需克隆端粒酶 RNA 5' 端的转录调控区序列并进行实验验证。

综合以上分析,研究认为从水稻中克隆的 292 bp 目标片段为端粒酶 RNA 的模板下游序列,在后续的实验中还需要获取完整的转录序列,并进一步分析鉴定。

### 参考文献:

- [1] Neidle S, Parkinson G N. The structure of telomeric DNA [J]. Curr Opin Struct Biol, 2003, 13 (3): 275-283.
- [2] Heller K, Kilian A, Piatyszek M A, et al. Telomerase activity in plant extracts[J]. Mol Gen Genet, 1996, 252 (3): 342-345.
- [3] Riha K, Fajkus J, Siroky J, et al. Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants [J]. Plant Cell, 1998, 10 (10): 1691-1698.

- [4] Heller-Uszynska K, Schnippenkoetter W, Kilian A. Cloning and characterization of rice (*Oryza sativa* L) telomerase reverse transcriptase, which reveals complex splicing patterns[J]. *Plant J*, 2002, 31 (1): 75-86.
- [5] Fajkus J, Fulneckova J, Hulanova M, et al. Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths[J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 260 (5): 470-474.
- [6] Oguchi K, Tamura K, Takahashi H. Characterization of *Oryza sativa* telomerase reverse transcriptase and possible role of its phosphorylation in the control of telomerase activity[J]. *Gene*, 2004, 342 (1): 57-66.
- [7] Autexier C, Lue N F. The structure and function of telomerase reverse transcriptase[J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 493-517.
- [8] Romero D P, Blackburn E H. A conserved secondary structure for telomerase RNA[J]. *Cell*, 1991, 67 (2): 343-353.
- [9] Chen J L, Blasco M A, Greider C W. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA[J]. *Cell*, 2000, 100 (5): 503-514.
- [10] Dandjinou A T, Levesque N, Larose S, et al. A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA[J]. *Curr Biol*, 2004, 14 (13): 1148-1158.
- [11] Cifuentes-Rojas C, Kannan K, Tseng L, et al. Two RNA subunits and POT1a are components of Arabidopsis telomerase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (1): 73-78.
- [12] Gorisch H, Goss D J, Parkhurst L J. Kinetics of ribosome dissociation and subunit association studied in a light-scattering stopped-flow apparatus[J]. *Biochemistry*, 1976, 15 (26): 5743-5753.
- [13] Tanaka T, Koyanagi K O, Itoh T. Highly diversified molecular evolution of downstream transcription start sites in rice and Arabidopsis[J]. *Plant Physiol*, 2009, 149 (3): 1316-1324.
- [14] Fujimori S, Washio T, Tomita M. GC-compositional strand bias around transcription start sites in plants and fungi[J]. *BMC Genomics*, 2005, 6: 26-36.
- [15] Morey C, Mookherjee S, Rajasekaran G, et al. DNA free energy-based promoter prediction and comparative analysis of Arabidopsis and rice genomes [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156 (3): 1300-1315.
- [16] Prestridge D S. SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements[J]. *Comput Appl Biosci*, 1991, 7 (2): 203-206.
- [17] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27 (1): 297-300.
- [18] 陈波, 梁江丽, 田晓平, 等. 水稻愈伤组织端粒酶催化特征检测[J]. *浙江理工大学学报*, 2009, 26 (4): 597-601.

## Cloning and Characteristic Analysis of Rice Telomerase RNA Candidate Sequence

MA Deng-xu, YANG Li-yuan, MA Guo-xing, ZHENG Jie, YING Chang, LIU Xiao-chuan  
(Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Telomerase is composed of telomerase reverse transcriptase and telomerase RNA. Telomerase RNA contains the template sequence required for telomere synthesis. Only telomerase RNA sequence of Arabidopsis is obtained now. To establish a rapid and effective method of hyperaccumulator telomerase and clone telomerase RNA sequence of rice, this research uses heteropolymeric protein in different concentrations of PEG6000 selective sedimentary telomerase extract. The result shows that, when PEG6000 concentration is 4%, the activity of telomerase is the highest and it can effectively reduce the interference of ribosome 28S rRNA and 18S rRNA. This paper extracts RNA from telomerase protein fluid, connects the joint at 3' end, designs forward primer in the template area and obtains a 292 bp unknown fragment through PCR amplification. It contains telomerase template sequence 5'-AAACCCTAA-3'. The sequence alignment analysis on this fragment and the transcription regulation domain of Arabidopsis telomerase RNA finds that both have similar transcriptional regulatory elements. Therefore, it is preliminarily judged that the target fragment of 292 bp is template downstream sequence of rice telomerase RNA.

**Key words:** rice; PEG6000; telomerase RNA; characteristic analysis

(责任编辑: 许惠儿)