

水稻单个端粒长度定量测定及分析

马国兴, 马登旭, 杨力媛, 郑洁, 韦敬航, 刘小川

(浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018)

摘 要: 端粒是真核生物线性染色体末端的特殊结构,一定长度的端粒在维持真核生物遗传信息完整性和染色体结构稳定性中起重要作用。建立一种简单快捷定量测定水稻单个端粒绝对长度的方法对研究水稻各个染色体端粒具有积极意义。研究将特殊接头连接到水稻染色体端粒的 G-overhang 末端,并利用近端粒区域的特定引物以及下游接头引物,通过 PCR 技术,获得所需鉴定的端粒,结合 DNA 凝胶电泳成像分析系统,定量检测水稻单个端粒的长度。结果显示本方法可以通过少量水稻基因组 DNA 有效测定单个端的粒长度。

关键词: 水稻; 单个端粒; PCR 技术; 定量测定; 端粒长度

中图分类号: Q291

文献标志码: A

0 引 言

端粒是真核生物线性染色体末端高度保守富含鸟嘌呤的特殊元件,能有效防止染色体末端融合,从而维持了遗传信息的完整和染色体结构的稳定^[1]。一定长度的端粒是端粒帽状结构形成的必要条件,是细胞进行正常生命活动的重要保证。端粒的保护功能以及端粒酶对端粒的延伸效率与 G-overhang^[2]、G-四链体(阻碍端粒酶的延伸作用)^[3]、T-loop 和 D-loop 等特殊结构密切相关,而这些结构的形成在一定程度上也取决于端粒的长度。研究显示端粒还可使位于亚端粒区域中的基因处于沉默状态,即位置效应(telomere position effect, TPE)^[4]。这种位置效应的强弱与端粒长度同样存在着密切关系,长端粒产生的 TPE 效应强,可以显著抑制亚端粒区报告基因的表达;而随着端粒长度变短, TPE 效应会随之减弱^[5]。植物端粒酶广泛分布在各器官的分生组织中^[6],这使得植物端粒长度的变化机制比较特殊,需要深入研究。Broun 等^[7]发现 4 周龄和 6 个月的番茄叶片的端粒长度几乎没有差异,在整个发育过程中女娄菜端粒的长度也比较稳定^[8]。Fajkus 等^[9]将烟草叶片诱导脱分化形成愈伤组织

并将其分化生成植株,发现端粒长度在脱分化和再分化的过程中也无显著差异,而 Riha 等^[10]则发现女娄菜、大麦和拟南芥愈伤组织端粒的长度会变长。有文章报道拟南芥晚期形成的最短端粒长度大约是 350 bp,融合桥连序列的补充分析显示端粒的长度范围是 120~450 bp,平均值为 260 bp^[11]。以上研究均建立在细胞中所有端粒平均长度的基础上,然而,同一细胞的各个染色体的端粒长度存在着显著差异,它们对各染色体的作用并不清晰,可见特定单个端粒长度的准确测定具有深远的意义。

目前测定端粒长度的方法较多,常见的方法有: Southern 杂交法(southern hybridization)、实时荧光定量 PCR 法(real-time fluorescence quantitative PCR, FQ RT-PCR)、定量荧光原位杂交法(quantitative fluorescence in situ hybridization, Q-Fish)、流式荧光原位杂交技术(flow-fish)等^[12-15],但这些方法只能测定细胞中所有端粒的平均长度,无法测定细胞单个端粒绝对长度的要求。最近许多新颖的测量端粒长度的方法也见诸报道,如 Sfeir 等^[16]改良了一种可以检测单个染色体端粒长度的技术(single telomere length analysis, STELA), Ma 等^[17]发明了通过检测端粒元件数目从而测定端粒

收稿日期: 2012-10-10

作者简介: 马国兴(1987-),男,河北唐山市人,硕士研究生,研究方向为植物端粒及分子遗传研究。

通信作者: 刘小川,电子信箱: xcliu@zstu.edu.cn

长度的方法,这些方法使得端粒长度测定更加精确,但操作比较繁琐而且不经济,存在不能完整测定端粒长度的隐患。本方法通过特殊端粒接头和端粒上游引物,利用 PCR 技术扩增出完整的水稻单个端粒序列,结合凝胶成像系统分析可获得水稻单个端粒的绝对长度。

1 材料、仪器及方法

1.1 材料

水稻 幼 叶; T_4 Ligase (TaKaRa); rTaq 酶 (TaKaRa); 250 bpDNA Ladder Marker (TaKaRa); 引物由上海生工生物技术有限公司合成;十六烷三甲基溴化铵(sigma);三羟甲基氨基甲烷(分析纯,上海生物生工有限公司);盐酸(分析纯,上海三鹰化工试剂有限公司);乙二胺四乙酸(sigma);NaCl(分析纯,上海生物生工有限公司); β -巯基乙醇(sangon);异丙醇(分析纯,汇普化工仪器有限公司);无水乙醇(分析纯,成都市科隆化工试剂厂);氯仿(分析纯,上海三鹰化工试剂有限公司);异戊醇(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);琼脂糖凝胶 (Agrose HRB™, Biotech);液氮。

1.2 仪器

研钵;高速离心机(CR22G,天美(上海)贸易有限公司);分光光度计(NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific);PCR 仪(S1000, Thermal Cycler);电泳仪(BIO-RAD);凝胶成像系统(Syngene)。

1.3 方法

1.3.1 上游引物设计

水稻为二倍体生物,具有 12 对染色体,48 个端粒。水稻染色体的近端粒区具有染色体序列特异性,根据水稻基因组这一特性,利用 NCBI 和 RGP 数据库中水稻近端粒序列设计了 3 条特异端粒上游引物(见表 1),作为鉴定特定端粒的上游引物。

表 1 水稻端粒定位引物

端粒所在位置	引物序列	距端粒序列起始部位的距离/bp
3 号染色体短臂	5'-ATGACTTAGTCCT-CACTCAC-3'	38
3 号染色体长臂	5'-TTCAGTGT-TCAGGGTTTTTGG-3'	41
7 号染色体短臂	5'-TAGGGG-TAGATACTTAGGT-3'	0

1.3.2 特殊接头的设计

根据水稻基因组序列比对结果设计了特殊引物

T_0 , 基于水稻的端粒单位重复序列 TTTAGGG 和特殊引物 T_0 设计了长度为 23 bp 端粒导向模板引物 T_1 , 用以制备特殊接头。接头作用原理模型(见图 1)。

T_0 : 5'-ACA CTC AGG ATT CAT C-3'

T_1 : 5'-GAT GAA TCC TGA GTG TCC CTA AA-3'.

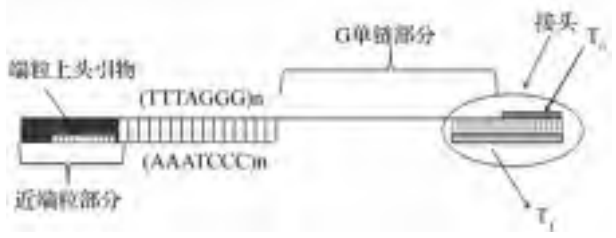


图 1 特定单个端粒长度测定策略图

1.3.3 水稻基因组 DNA 的提取

采用改进的 Murray 等^[18] 1980 年报道的方法,提取水稻幼叶基因组。将 5 g 水稻幼叶在液氮中研磨成粉末后,转入装有经 65℃ 预热的 10 mL 1×CTAB 提取液(1% CTAB; 50 mM Tris-HCl(pH=8.0); 10 mM EDTA, 700 mM NaCl, 0.5% β -巯基乙醇)的 50 mL 的离心管中,混匀,65℃ 孵育 30 min;加 10 mL 氯仿:异戊醇(24:1)混合液,充分混匀(操作过程要轻柔);10 000 r/min,离心 15 min;将上清液转到一支新 50 mL 离心管中,加 2.0 μ L 10 mg/mL RNA 酶摇匀,静置 5 min;加入等体积经 -20℃ 预冷的异丙醇,混匀,冰上放置 30 min,用玻璃钩将白色絮状 DNA 捞出,放入装有 30 mL 70% 乙醇的 50 mL 离心管中洗涤,用灭菌滤纸吸去絮状 DNA 上的残液,挑入 1.5 mL 离心管中,室温下倒置干燥 5 min;加 1 mL TE 缓冲液 50℃ 溶解,并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 样品品质,利用 NanoDrop 2000 分光光度计测定样品浓度。

1.3.4 特殊接头的制备和连接反应

反应体系(40 μ L): 10 μ L 20 μ M T_0 ; 10 μ L 20 μ M T_1 ; 2 μ L 10×adapter buffer(100 mM Tris-acetate(pH=7.5); 100 mM Mg-acetate; 500 mM K-acetate); 加 18 μ L 灭菌水, 3 000 r/min, 离心 15 s, 94℃ 变性 3 min, 缓慢冷却至室温。重复 DNA 变性和复性操作 3 次, 制得接头 A_1 , 4℃ 保存。

将水稻基因组 DNA 与 A_1 用 T_4 DNA 连接酶进行连接。反应体系: 2 μ L 10× T_4 DNA Ligase Buffer; 2 000 ng 基因组 DNA; 3 μ L A_1 ; 1 μ L 350 U/ μ L T_4 DNA Ligase; ddH₂O 补至 20 μ L, 混匀,

16℃连接2 h。65℃,10 min 灭活 T_4 DNA 连接酶。将连接好的模板 DNA 用 ddH₂O 稀释至 10 ng/ μ L,4℃保存。

1.3.5 PCR 反应及产物的定量分析

PCR 体系:2.0 μ L 10×PCR Buffer(Mg²⁺ Plus 15 mM);1.6 μ L dNTP Mixture(各 2.5 mM);1 μ L 端粒上游引物(4 mM);1 μ L T_1 (4 mM);9.2 μ L ddH₂O;5.0 μ L 模板 DNA;0.2 μ L rTaq 酶(5 U/ μ L)。PCR 反应参数:94℃ 3 min,(94℃ 30 s,54℃ 45 s,72℃ 40 s)×36 个循环,72℃延伸 10 min。对 PCR 产物进行凝胶电泳分析,将 0.48g 琼脂糖(Agrose HRB™)加入到 40 mL 的 1×TAE 溶液(40 mmol/L Tris 碱;20 mmol/L 冰乙酸;2 mmol/L EDTA(pH=8.0))中,用微波炉煮沸混匀,配成 1.2%的琼脂糖凝胶,4 V/cm 电泳分离后,放入 1.0 μ g/mL 溴化乙锭溶液中染色 25 min,自来水中脱色 5 min。在 254 nm 波长下,通过 SynGene 凝胶电泳成像分析系统进行成像,利用 Gene Tools 软件进行定量分析,分析以 250 bp marker 的 1 000 bp 带为标准,计算出端粒 smear 区的总量及半总量,从而确定水稻单个端粒的平均长度。

$$\text{端粒长度} = (M - D - P1 - T_0) \text{ bp} \quad (1)$$

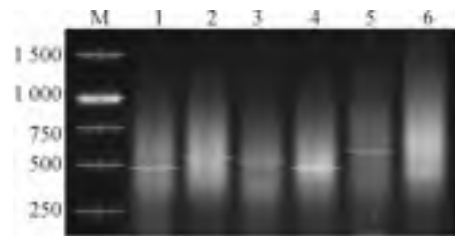
式中:

D :上游引物距端粒起始位置的距离; $P1$:上游引物的长度; $T_0 = 16$ bp; M :端粒平均分子量,即(端粒 PCR 产物总量/2)处所对应端粒 DNA 的长度。

2 实验结果

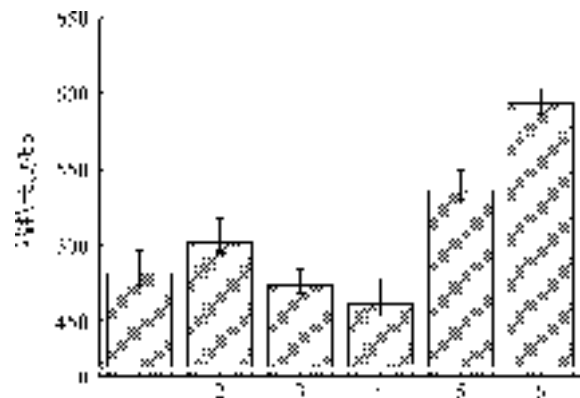
利用 Gene Tools 软件对水稻品种长粒粳和粤 B 的 3 号染色体短臂、3 号染色体长臂、7 号染色体短臂的端粒 PCR 产物(见图 2)进行数据测定,结果显示:长粒粳 3 号染色体长臂端粒最大长度为 $1\,343 \pm 20$ bp,最小值为 193 ± 15 bp,均值为 481 ± 17 bp;粤 B 3 号染色体长臂端粒最大长度为 $1\,643 \pm 18$ bp,最小值为 270 ± 16 bp,均值 501 ± 18 bp。长粒粳 7 号染色体短臂端粒最大长度为 $1\,086 \pm 15$ bp,最小值为 226 ± 13 bp,均值 473 ± 8 bp;粤 B 7 号染色体短臂端粒最大长度为 $1\,186 \pm 23$ bp,最小值为 244 ± 17 bp,均值为 460 ± 19 bp。长粒粳 3 号染色体短臂端粒最大长度为 $1\,546 \pm 15$ bp,最小值为 196 ± 13 bp,均值为 536 ± 7 bp;粤 B 3 号染色体短臂端粒最大长度为 $1\,746 \pm 13$ bp,最小值为 226 ± 12 bp,均值为 593 ± 6 bp。这表明不同水稻品种长粒粳、粤 B 以及杂交子代 F1 间的同一个端粒长

度有很大的不同,同一水稻品种的不同单个端粒长度也有一定差距(见图 3)。



M:250 bp DNA Ladder Marker;1,2:水稻 3 号染色体长臂端粒;3,4:水稻 7 号染色体短臂端粒;5,6:水稻 3 号染色体短臂端粒;1,3,5:长粒粳;2,4,6:粤 B

图 2 水稻单个端粒 PCR 产物



1,2:水稻 3 号染色体长臂端粒;3,4:水稻 7 号染色体短臂端粒;5,6:水稻 3 号染色体短臂端粒;1,3,5:长粒粳;2,4,6:粤 B

图 3 水稻单个端粒的长度

3 讨论

端粒长度测定的方法较多,各种测定方法各有所长。以往测定端粒长度的方法只能检测到所有端粒的平均长度,而这里报道的定方法能够测定水稻细胞 48 个端粒中单个端粒的长度,并且方法简捷、精确度高,所测得端粒中无亚端粒序列的影响。Sfeir 等人基于端粒导向平台 (CCAATC)_n,利用 PCR 方法测定了人细胞单个端粒长度,用此技术测量人类成纤维细胞的 XpYp 端粒长度始终比端粒限制性片段 (telomere restriction fragment, TRF) 法测得的端粒长度平均值小,且这两者成线性关系,说明此方法测得的数据可避免亚端粒长度的影响。但由于动物的 G-overhang 长度多样化而且比较长,如人类 G-overhang 长度范围为 35~600 nt,而水稻的 G-overhang 长度虽不确定,但这种状况的存在很可能导致下游接头引物无法在 G-overhang 上的精确定位,后续 PCR 反应中很可能由于端粒导向平台 (CCAATC)_n 在端粒 G-overhang 上出现滑动结合,在一定程度上造成端粒长度的测定值不精确,并且

亚端粒区域常常存在零星的(TTAGGG)_n序列,也会影响导向平台的定位。这些情况都会影响端粒长度测量的精确性,而本方法(见图1)设计特殊接头^[19]可以连接到端粒 G-overhang 的最末端从而彻底解决以上了隐含的问题。近端粒区域引物距端粒起始处的距离是已知的并且序列具有特异性,故而可以保证测出精确地单个端粒的长度。另外本方法对细胞材料无严格要求,仅需要少量的基因组 DNA 即可,取材方便,整个操作过程简单快捷。但这个方法也有一些不足,由于 PCR 技术固有缺陷,PCR 反应会优先扩增短端粒序列,但 Sfeir 等的实验表明本方法与端粒限制性片段法获得结果成明显线性关系,表明不影响本法方法对端粒长的测定;其次本技术需要清楚水稻染色体近端粒区域序列,如果近端粒区域是未知,则需要测定近端粒序列;再者本方法需要保证水稻基因组是完整的,基因组断裂会直接影响测定数据;PCR 反应灵敏度极高,要求操作流程严格标准化;由于端粒会随着细胞分裂而逐渐缩短,因而本方法获得 PCR 产物为大小不同的同一个单端粒的混合物,实验表明对 PCR 产物进行定量分析时需采用严格一致的条件。本方法统一使用浓度为 1.2%(0.48 g 琼脂糖加入 40 mL 1×TAE 溶液)的 HRBTM(Biotech)琼脂糖;DNA Marker 为 250 bp DNA Ladder Marker(TaKaRa),用量为 3 μL;电泳液为 1×TAE;电压为 4 V/cm;电泳时 Loading 指示剂移动到胶板同一刻度时停止电泳;溴化乙锭染色时间为 25 min,清水洗胶 5min,充分洗去胶表面的溴化乙锭溶液以及杂质污物。通过 Gene Tools 分析软件精确地分析端粒 DNA 的电泳图信息,根据端粒 PCR 产物半总量处所对应的 DNA 大小确定端粒长度,而并不与 PCR 总产量相关,稳定、精确地测定水稻单个端粒的长度。实验数据显示所测的水稻长粒梗和粤 B 单端粒长度在 481~591 bp 之间,这表明测得的水稻端粒普遍比较短,这可能由于水稻端粒能及时得到端粒酶的延伸,从而保证了分生组织中端粒的长度,在一定程度上表现了植物端粒长度调控的特殊性。实验数据表明水稻品种长粒梗的 3 号染色体短臂、3 号染色体长臂、7 号染色体短臂的端粒长度存在显著地差异,水稻品种粤 B 也存在相同的现象,并且水稻品种长粒梗与粤 B 间的相同单个端粒的长度也表现出了一定的差异性,这表明水稻相同品种的不同单个端粒长度以及不同品种的相同单个端粒的长度均存在一定的差异性,这可能说明水稻特定单个端粒长度与水稻的一些生理

机制以及细胞代谢调控存在一定的关系。当今水稻单个端粒长度变化与生理机制的关系的研究还不透彻,急需进一步的深入研究。本方法将为这些研究打下基础,而且经过接头改造本方法可以广泛应用于其他植物以及动物端粒长度变化机制及端粒长度与细胞代谢调控关系的相关研究,有助于揭示端粒长度调控与真核生物生理机制、发育机制的关系。

参考文献:

- [1] Blackburn E H, Greider C W. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts[J]. *Cell*, 1985, 43: 405-413.
- [2] Riou J F. G-quadruplex interacting agents targeting the telomeric G-overhang are more than simple telomerase inhibitors[J]. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2004, 4(5): 439-443.
- [3] Mullen M A, Olson K J, Dallaire P, et al. RNA G-Quadruplexes in the model plant species *Arabidopsis thaliana*: prevalence and possible functional roles[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(22): 8149-8163.
- [4] Baur J A, Zou Y, Shay J W, et al. Telomere position effect in human cells[J]. *Science*, 2001, 292(5524): 2075-2077.
- [5] Wood J G, Sinclair D A. TPE or not TPE? It's no longer a question[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002, 23(1): 1-4.
- [6] Fitzgerald M S, McKnight T D, Shippen D E. Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(25): 14422-14427.
- [7] Broun P, Ganai M W, Tanksley S D. Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(4): 1354-1357.
- [8] Riha K, Fajkus J, Siroky J, et al. Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants [J]. *The Plant Cell Online*, 1998, 10(10): 1691-1698.
- [9] Fajkus J, Fulnečková J, Hulanova M, et al. Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1998, 260(5): 470-474.
- [10] Riha K, McKnight T D, Fajkus J, et al. Analysis of the G-overhang structures on plant telomeres: evidence for two distinct telomere architectures[J]. *The Plant Journal*, 2000, 23(5): 633-641.

- [11] Watson J M, Riha K. Comparative biology of telomeres: where plants stand[J]. FEBS Letters, 2010, 584(17): 3752-3759.
- [12] Saldanha S N, Andrews L G, Tollefsbol T O. Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(3): 389-403.
- [13] O'Callaghan N J, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length[J]. Biological Procedures Online, 2011, 13(3): 1-10.
- [14] O'Sullivan J N, Finley J C, Risques R, et al. Telomere length assessment in tissue sections by quantitative FISH: image analysis algorithms[J]. Cytometry Part A, 2004, 58(2): 120-131.
- [15] Baerlocher G M, Vulto I, De Jong G, et al. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres(Flow FISH)[J]. Nature Protocols, 2006, 1(5): 2365-2376.
- [16] Sfeir A J, Shay J W, Wright W E. Extra view fine-tuning the chromosome ends[J]. Cell Cycle, 2005, 4(11): 1467-1470.
- [17] Ma Y. Assays for determining telomere length and repeated sequence copy number: US, 20110195864A1 [P]. 2011-08-11.
- [18] Murray M, Thompson W. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [19] 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.

Analysis and Quantitative Determination of Single Telomere Length in Rice

MA Guo-xing, MA Deng-xu, YANG Li-yuan, ZHENG Jie, WEI Jing-hang, LIU Xiao-chuan

(Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Telomere is a special structure at the tail end of linear chromosomes of eucaryon. Telomere with a certain length plays an important role in maintaining the genetic information integrity of eucaryon and structural stability of charomosomes. Establishing a simple and quick method for quantitative determination of absolute length of single telomere has positive significance for studying various chromosome telomeres of rice. This research connects the special joint to the tail end of G-overhang of chromosome telomere of rice and obtains the telomere to be identified by using the specific primer and downstream joint primer in near telomere area with PCR technology, and quantitatively measures the length of single telomere of rice in combination with DNA gel electrophoresis imaging analysis system. The result shows that this method can effectively measures the length of single telomere through a little rice genome DNA.

Key words: rice; single telomere; PCR technology; quantitative determination; telomere length

(责任编辑: 许惠儿)