

沙冬青端粒酶逆转录酶基因(*AmTERT*) 克隆及表达分析

孙丽春¹ 杨颖¹ 于婷乔¹ 孙玉萍¹ 高海波² 王瑾瑜³ 门璟煜¹ 卢存福^{1*} 陈玉珍^{1*}

(¹北京林木分子设计育种高精尖创新中心, 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程中心, 北京 100083; ²临沂大学生命科学学院, 临沂 276000; ³清华大学分析测试中心, 北京 100084)

摘要 利用分段克隆法从沙冬青中得到一条全长为3 459 bp的端粒酶逆转录酶基因(telomerase reverse transcriptase of *Ammopiptanthus mongolicus*, *AmTERT*), 并对*AmTERT*进行了系统的生物信息学分析。结果表明, *AmTERT*编码1 153个氨基酸, 蛋白相对分子质量为132.52 kDa, 等电点为9.49, 属于稳定性较差的亲水性蛋白。未发现跨膜结构存在, 定位预测结果显示其在细胞质膜及线粒体上有定位, 同时发现其有单分型(NLS-monopartite)和双分型(NLS-bipartite)细胞核定位信号, 而在原生质体中的瞬时表达实验结果表明*AmTERT*定位在细胞核中。该氨基酸序列共有147个潜在磷酸化位点, 氨基酸比对结果显示, *AmTERT*与大豆TERT相似性高达75%。另外, *AmTERT*蛋白具有端粒酶逆转录酶的保守功能结构域(TRBD及RT), 并存在潜在的Akt激酶磷酸化位点, 暗示其可能通过磷酸化作用发挥调节自身或其他基因功能的作用。荧光定量PCR结果显示, *AmTERT*在根中表达量较茎和叶组织都高, 盐、干旱、热及低温胁迫均能导致沙冬青幼苗根和叶中*AmTERT*的表达量升高, 说明植物细胞端粒酶可能和动物细胞一样具有应激保护功能。综上, 研究结果表明, 沙冬青端粒酶可能存在非端粒功能。

关键词 沙冬青; 端粒酶; *AmTERT*; 非生物胁迫

Cloning and Expression Analysis of Telomerase Reverse Transcriptase (*AmTERT*) Gene from *Ammopiptanthus mongolicus*

Sun Lichun¹, Yang Ying¹, Yu Tingqiao¹, Sun Yuping¹, Gao Haibo², Wang Jinyu³, Men Jingyu¹,
Lu Cunfu^{1*}, Chen Yuzhen^{1*}

(¹Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, College of Biological Sciences and Biotechnology, National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²College of Life Sciences, Linyi University, Linyi 276000, China; ³Analysis and Testing Center, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract A segmented cloning method was used to clone a telomerase reverse transcriptase gene (*AmTERT*) of 3 459 bp in length from *Ammopiptanthus mongolicus*, and a systematic bioinformatic analysis of the telomerase reverse transcriptase gene (*AmTERT*) was carried out. The results showed that *AmTERT* encoded a protein of 1 153 amino acids with a relative molecular weight of 132.52 kDa and an isoelectric point of 9.49, which was a poorly stable hydrophilic protein. No transmembrane structure was found. The localization analysis results showed that

收稿日期: 2017-12-30 接受日期: 2018-04-03

国家自然科学基金(批准号: 31270737)、山东省自然科学基金(批准号: ZR2014CL030)、高等学校学科创新引智计划(批准号: B13007)、长江学者和创新团队发展计划(批准号: IRT13047)和北京市自然科学基金(批准号: 6112016)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62336081, E-mail: lucunfu@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62338346, E-mail: chenyzhen@bjfu.edu.cn

Received: December 30, 2017 Accepted: April 3, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31270737), Shandong Natural Science Foundation (Grant No.ZR2014CL030), 111 Project (Grant No.B13007), Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (Grant No.IRT13047) and Beijing Municipal Natural Science Foundation (Grant No.6112016)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-62336081, E-mail: lucunfu@bjfu.edu.cn; Tel: +86-10-62338346, E-mail: chenyzhen@bjfu.edu.cn

网络出版时间: 2018-07-06 10:01:00

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180706.0959.004.html>

it was probably located on the plasma membrane and in mitochondria, and also had NLS-monopartite and NLS-bipartite nuclear localization signals. This amino acid sequence has a total of 147 potential phosphorylation sites and the result of amino acid alignment showed that the similarity between *AmTERT* and soybean TERT was as high as 75%. In addition, *AmTERT* protein has the conserved functional domains of telomerase reverse transcriptase (TRBD and RT), and one putative Akt phosphorylation sites in *AmTERT* that conform to the consensus motif was predicted. Fluorescence quantitative PCR analysis showed that *AmTERT* expressed much more in roots than in stems and leaves. Furthermore, *AmTERT* expression increased under salt, drought, hot and cold stress, indicating that telomerase might be closely associated with genomic stability. Our research results implied that *Ammopiptanthus mongolicus* telomerase might have the non-telomere functions, and provided some new hints for further study to reveal the functions of plant telomerase.

Keywords *Ammopiptanthus mongolicus*; telomerase; *AmTERT*; abiotic stress

端粒酶作为稳定端粒长度的一种酶, 在维持真核生物染色体末端DNA完整性中发挥着重要作用。目前的研究认为, 端粒酶由三个主要部分构成, 即端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)、端粒酶RNA(telomerase RNA, TER)和端粒酶相关蛋白(telomerase-associated protein, TEP)^[1]。端粒酶以端粒酶逆转录酶(TERT)为催化亚单位, 以端粒酶RNA(TER)为模板, 利用逆转录方式来补充细胞分裂增殖时丢失的端粒结构^[2]。Schmidt等^[3]在利用活细胞成像技术实时监测端粒酶招募端粒的动态过程中发现, 人的端粒酶招募端粒的过程发生在细胞分裂周期的S期, 并且这一过程都依赖于端粒酶蛋白TERT与端粒蛋白TPP1的直接相互作用。

端粒酶逆转录酶(TERT)具有逆转录活性, 是端粒酶活性的限速因子。端粒酶的组分最早是在游仆虫中发现的, 之后在人、小鼠等真核生物中也被发现, 而TERT基因序列最早是在芽殖酵母中发现的, 随后在纤毛虫中也成功克隆到了此基因^[4]。TERT基因具有高度保守性, Fitzgerald等^[5]根据该基因序列保守性较高的原理, 依*hTERT*序列设计引物, 克隆到拟南芥TERT的cDNA序列。研究发现, 人成纤维细胞和视网膜色素细胞转TERT基因后, 细胞增殖能力增强^[6]。表达*hTERT*基因的巴雷特食管上皮(Barrett's esophageal epithelium)细胞寿命明显延长^[7]。现有的一些研究表明, 端粒酶尤其是端粒酶逆转录酶(TERT)亚基, 除了维持端粒长度和染色体稳定之外, 还具有非端粒的功能^[8]。对端粒酶非端粒功能的研究有助于全面了解端粒酶的功能。

目前, 已经在多种植物中获得TERT基因, 而关于TERT功能的研究多集中在动物细胞, 植物方面的

研究很少, 并且目前未见到关于木本植物TERT的研究报道。沙冬青隶属豆科蝶形花亚科沙冬青属, 为荒漠特有超旱生常绿灌木, 是第三纪古地中海热带气候孑遗物种, 我国北方沙漠中唯一常绿阔叶灌木, 国家三级濒危保护植物^[9]。沙冬青生长环境气候干旱, 年降水量小于200 mm, 年平均蒸发量达3 000 mm, 季节性极端温度从冬季约-30 °C到夏季超过40 °C。其自然分布区域为高盐度的沙质或石质土壤。该物种对恶劣环境的耐受性使其成为研究抗逆基因和相关机制的重要植物资源^[10]。现有的一些研究表明, 沙冬青表现出对干旱、高盐度、高温和冰冻胁迫的高度耐受性^[11-12]。而沙冬青端粒酶是否具有抵御极端环境而保护基因组稳定性的功能, 是一个值得研究的问题。

本研究克隆了沙冬青的端粒酶逆转录酶基因(*AmTERT*), 进行了系统的生物信息学分析, 分析了*AmTERT*的理化性质和结构特征。同时, 研究了盐、干旱、热及低温胁迫条件下沙冬青幼苗的根和叶中*AmTERT*的表达, 为进一步探究沙冬青端粒酶在极端环境中行使端粒及非端粒功能提供了可靠证据。

1 材料与方法

1.1 材料

在本实验室前期获得的沙冬青花发育转录组数据库中筛得端粒酶逆转录酶基因*AmTERT*序列信息。试验材料为沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)幼苗, 种子于2013年采集自内蒙古阿拉善左旗, 保存在-20 °C冰箱中。

1.2 试剂及仪器

聚乙二醇(PEG4000)、MS培养基、氯化钠购自

北京蓝弋化工产品有限责任公司; 强力植物RNA提取试剂盒(PowerPlant® RNA Isolation Kit with DNase)购自拜尔迪生物科技有限公司; 反转录试剂盒[QuantScript RT Kit(KR103)]、荧光定量试剂盒[SYBR Premix Ex Taq™ II(Perfect Real Time)]及Trans1-T1克隆菌株购自TIANGEN公司; DNA内切酶*Bam*H I和*Kpn* I购自NEW ENGLAND BioLabs(NEB)公司; DNA聚合酶TransStart® FastPfu Fly DNA Polymerase及pEASY®-Blunt测序载体购自TransGen Biotech公司; 表达载体pCambia2300由本实验室构建保存; 纤维素酶(Cellulase R-10)、离析酶(Macerozyme R-10)购自Solarbio公司。

所用到的仪器包括: 低温离心机(Eppendorf)、旋涡混合器、液氮、研钵、-80 °C冰箱、-20 °C冰箱、PCR仪(TECHNE)、微量移液器(Eppendorf)、紫外分光光度计(NanoDrop2000)、iCycler® Thermal Cycler荧光定量PCR仪(Bio-RAD, USA)及A1R-si激光扫描共聚焦显微镜(Ti-E/Ti-U/Ti-S, Nikon, Japan)等。

1.3 胁迫处理沙冬青幼苗

在MS培养基(25 °C, 16 h光照/8 h黑暗, 70%相对湿度)中培养沙冬青幼苗, 将培养14天长出2片子叶的幼苗放入2 °C培养室中进行低温处理, 分别在处理1、2、4、8天时取样; 另将沙冬青幼苗置于45 °C培养室中进行热胁迫, 分别在处理1、2、4、6、8、16、24 h时取样。

在珍珠岩基质(25 °C, 16 h光照/8 h黑暗, 70%相对湿度)中培养沙冬青幼苗, 培养14天长出2片子叶时进行胁迫处理及取材。干旱处理: 用20%的聚乙二醇(PEG4000)溶液浇灌, 每2天浇1次, 分别在处理

1、2、4、8天时取样; 盐处理: 用200 mmol/L的NaCl溶液浇灌, 每2天浇1次, 分别在处理1、2、4、8天时取样。

采用混合取样法, 每个处理做3次生物重复, 即每个处理水平处理3盆/瓶幼苗, 每个重复分别取3株沙冬青幼苗的根、叶部分, 样品用锡纸包裹, 液氮速冻, -80 °C保存。

1.4 提取沙冬青总RNA并反转录获得基因组cDNA

用强力植物RNA提取试剂盒(PowerPlant® RNA Isolation Kit with DNase)提取沙冬青总RNA, 具体步骤按照说明书操作, 提取得到的RNA质量和完整性用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。RNA浓度用核酸定量仪NanoDrop2000测定, 之后保存于-80 °C冰箱备用。用反转录试剂盒[QuantScript RT Kit(KR103)]反转录获得沙冬青总cDNA, 具体步骤按照说明书操作, 并用*actin*引物(表1)进行PCR反应, 验证cDNA的质量。将获得的cDNA保存在-20 °C冰箱中备用, cDNA使用过程中尽量避免多次冻融。

1.5 沙冬青*AmTERT*基因PCR扩增

以1.4中得到的cDNA为模板, 利用Vector NTI11.2.5软件对实验室前期沙冬青花发育转录组数据库中拼接比对得到的*AmTERT*的CDS序列进行分析, 得到全长为3 459 bp的开放阅读框(ORF), 根据此ORF设计克隆引物, 但是由于常规的PCR方法未能有效扩增出目的片段, 所以采用分段克隆的方式来获得完整的*AmTERT*基因的ORF序列。

分段克隆具体方案如下(图1)。(1)序列分析, 通过生物分析软件DNAMAN对*AmTERT*基因ORF序列

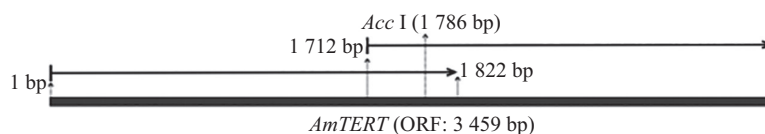
表1 基因克隆及荧光定量PCR分析所用引物

Table 1 List of primers used for gene cloning and qRT-PCR

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences
<i>AmTERT</i>	S1	<u>CGG GAT CCA</u> TGA TGT ATA GAA GGG AAC CGG C
	2A1	TCG GCT GAA GTC TGA GCT TTG AAA A
	3S3	GCA CTG TTG CTT GCT TCA AAG ACT G
	A1	<u>GGG TAC CAT</u> ACT TGA TGT CCC AAA GCA GAG AGG
	T3-S	GTA CGG ATG GTG GCG AAT CT
	T3-A	TGG GCA TCA CGA AGA ACA GA
<i>Actin</i>	Actin-S	ACC TTG CTG GCC GTG ATT TAA CG
	Actin-A	ATA GTG GAC CCA CCA CTA AGC ACG

下划线标识的是酶切位点。

Underlined are the restriction sites.

图1 分段克隆法克隆*AmTERT*基因示意图Fig.1 The schematic of cloned *AmTERT* by segmented cloning method

进行酶切位点分析, 所选酶切位点需具备以下特点: (a)酶切位点在基因ORF序列内为单一酶切位点; (b)酶切位点序列不含有简并碱基; (c)酶切位点的位置尽可能靠近基因ORF序列的中间部位。最终选择的酶切位点为*Acc* I, 位于*AmTERT*基因ORF序列1 786 bp处。(2)设计引物, 分别扩增*Acc* I酶切位点前后2段*AmTERT*基因序列, 2段基因序列均需包含*Acc* I酶切位点, 可适当延长序列长度以找到合适的扩增引物, 最终选择的引物对S1+2A1(表1)扩增扩增*AmTERT*基因ORF序列1~1 822 bp, 其中上游引物S1设计带有内切酶*Kpn* I的酶切位点。用引物对3S3+A1(表1)扩增*AmTERT*基因ORF序列1 712~3 459 bp, 下游引物A1设计带有内切酶*Bam*H I的酶切位点。

使用DNA聚合酶TransStart® FastPfu Fly DNA Polymerase进行扩增反应, PCR反应程序为: 95 °C预变性2 min, 然后按95 °C变性20 s、60 °C退火20 s、72 °C延伸1 min, 循环35次。产物用1%的琼脂糖凝胶分离后回收, 分别用DNA内切酶*Acc* I单酶切得到包含*AmTERT*基因ORF序列1~1 786 bp及1 786~3 459 bp的2段序列, 经1%的琼脂糖凝胶分离并回收后用DNA连接酶连接, 获得*AmTERT*全长序列, 连接pEASY®-Blunt载体后送往华大基因公司进行测序。

1.6 构建荧光蛋白融合表达载体

将上述测序正确的pEASY®-Blunt-*AmTERT*用对应内切酶进行酶切后连接表达载体pCAMBIA2300, 连接反应使用T4 DNA连接酶(NEB)。之后转化Trans1-T1克隆菌株并进行测序。表达载体pCAMBIA2300大小为8 742 bp, 载体本身不含启动子序列和GFP序列, 在多克隆酶切位点(multiple cloning sites, MCS)区*Eco*R I和*Sac* I酶切位点间插入CaMV 35S启动子序列(678 bp), 在*Pst* I和*Hind* III酶切位点间插入GFP序列(717 bp), pCAMBIA2300-GFP载体大小为10 137 bp。载体pCAMBIA2300-*AmTERT*-GFP表达的蛋白为融合蛋白*AmTERT*-GFP, 在*AmTERT*蛋白C-端通过4个甘氨酸连接GFP蛋白, 通过检测细胞内GFP蛋白荧光信号来间接研究TERT蛋

白的亚细胞定位。

1.7 *AmTERT*蛋白在沙冬青原生质体中瞬时表达

将上述测序正确的pCAMBIA2300-*AmTERT*-GFP融合质粒及pCAMBIA2300质粒利用PEG介导法转入沙冬青原生质体中。沙冬青原生质体游离方法如下: 称取0.2 g纤维素酶(Cellulase R-10)、0.08 g离析酶(Macerozyme R-10), 加入到20 mL酶储液(0.4 mol/L甘露、20 mmol/L MES、20 mmol/L KCl)中, 55 °C水浴10 min, 冷却后加入CaCl₂(10 mmol/L), BSA(0.1%), 0.45 μm微孔过滤, 制成酶解液, 移入100 mL小烧杯中备用。取4周大的沙冬青幼苗子叶(健康、生长状况良好的肥厚叶片), 约5片子叶, 用镊子去除上下表皮, 置于酶解液中, 锡箔纸包裹避光, 23 °C、50 r/min酶解1 h, 之后于23 °C静置2 h。期间每隔0.5 h镜检1次。酶解完全后用100~200目筛子过滤, 将滤液置于50 mL离心管中, 4 °C、60 ×g离心15 min。弃上清, 沉淀用4 mL冰浴的W5溶液(154 mmol/L NaCl、125 mmol/L CaCl₂、5 mmol/L KCl、2 mmol/L MES)轻轻吹散洗涤, 4 °C、100 ×g离心3 min。弃上清, 沉淀再次用4 mL冰浴的W5溶液重悬, 冰上放置30 min, 23 °C、100 ×g离心1 min。弃上清, 沉淀用mmg溶液(0.4 mol/L甘露醇、4 mmol/L ME、15 mmol/L MgCl₂)重悬, 每一个转化加100 μL mmg溶液。取10~20 μg质粒于1.5 mL EP管中, 加入100 μL原生质体, 轻柔混匀。加入110 μL 40% PEG-Ca溶液, 轻柔混匀, 放置20~30 min。加入440 μL W5溶液, 轻柔混匀, 23 °C、100 ×g离心1 min。弃上清, 加入500 μL W5溶液, 轻柔混匀, 移入清洗干净且用W5溶液润洗过的6孔板中, 用W5溶液补足1 mL, 稍微混匀。23 °C、锡箔纸包裹避光培养12 h。加入固定液(4%多聚甲醛)固定5 min后加入DAPI(10 μg/mL)染色30 min, 加入4 mL W5溶液, 60 ×g离心3 min, 弃上清后再次加入4 mL W5溶液, 60 ×g离心3 min。在A1R-si激光扫描共聚焦显微镜(Ti-E/Ti-U/Ti-S, Nikon, Japan)下观察。激发光波长分别为: GFP, 488 nm; 叶绿素自体荧光, 663~738 nm; DAPI, 360 nm。

1.8 AmTERT生物信息学分析

AmTERT蛋白的基本理化性质由在线软件ExPASy-ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行预测;用TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测AmTERT蛋白的跨膜结构;Predictprotein(<http://www.predictprotein.org/>)预测蛋白的二级结构;ExPASy-ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)预测疏水性;TargetP V1.0和MitoProt II V1.0a4预测可能存在的亚细胞定位;为了解AmTERT与其他植物TERT蛋白的亲缘关系,从NCBI数据库搜索和下载了已知植物的TERT蛋白序列。研究中选取了几个具有代表性的科属,包括百合科、豆科、禾本科、葫芦科、葡萄科、蔷薇科、茄科、十字花科、芸香科、苔藓和藻类。采用MEGA5.1软件,Neighbor-Joining法构建系统树,Bootstrap值为100。

1.9 荧光定量PCR分析

以沙冬青Actin用作内参基因(表1),以引物对T3-S/T3-A为荧光定量引物,使用SYBR Premix Ex Taq™ II(Perfect Real Time)试剂盒,用iCycler® Thermal Cycler荧光定量PCR仪(Bio-RAD, USA)进行实时荧光定量分析。PCR反应体系(10 μ L)为: 5 μ L Premix Ex Taq(2 $\times$)、0.3 μ L正向引物(10 μ mol/L)、0.3 μ L反向引物(10 μ mol/L)、1 μ L总cDNA、3.4 μ L ddH₂O。PCR反应程序为: 95 $^{\circ}$ C预变性90 s,然后按95 $^{\circ}$ C变性10 s、60 $^{\circ}$ C退火15 s、72 $^{\circ}$ C延伸20 s,循环40次;最后,72 $^{\circ}$ C延伸90 s。每个实验设置3个生物重复。数据分析按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。结果用软件Opticon Monito 3.1分析,同时用SPSS 19.0软件进行数据的统计分析,采用单因素方差分析统计方法, $P<0.05$ 为

差异具有显著性。

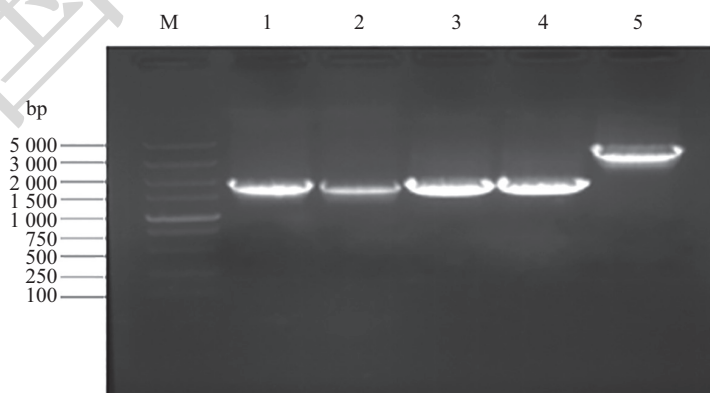
2 结果

2.1 沙冬青AmTERT基因克隆

经分段法克隆得到2段AmTERT基因序列,并连接得到全长3 459 bp序列(图2),测序后结果与转录组数据库中序列100%一致。将其注册在NCBI(National Center for Biotechnology Information)网站,序列号为MG650470。

2.2 生物信息学预测显示AmTERT序列具有高保守性

克隆得到的沙冬青端粒酶逆转录酶基因AmTERT的ORF为3 459 bp,预测编码1 153个氨基酸,相对分子质量为132.52 kDa;等电点为9.49,不稳定参数51.00,总亲水平均系数(GRAVY)值为-0.344,属于稳定性较差的亲水性蛋白。AmTERT基因编码的蛋白未发现跨膜结构存在。定位预测结果显示,其在细胞质膜及线粒体上有定位,同时发现其有单分型(NLS-monopartite)和双分型(NLS-bipartite)细胞核定位信号。对TERT蛋白质序列中的氨基酸残基潜在的磷酸化位点作出了预测,结果表明,该氨基酸序列共有147个潜在磷酸化位点,其中包括84个几乎分布在整条多肽链上的丝氨酸(Ser)磷酸化位点,54个苏氨酸(Thr)磷酸化位点和9个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点。通过氨基酸序列比对发现,TERT蛋白保守性均很高,其中AmTERT与大豆和鹰嘴豆的相似性都达到了75%,并且它们都属于豆科。Predictprotein预测AmTERT的二级结构由26.54%的 α -螺旋、8.06%的 β -折叠和64.86%的无规则卷曲组成(图3)。将AmTERT

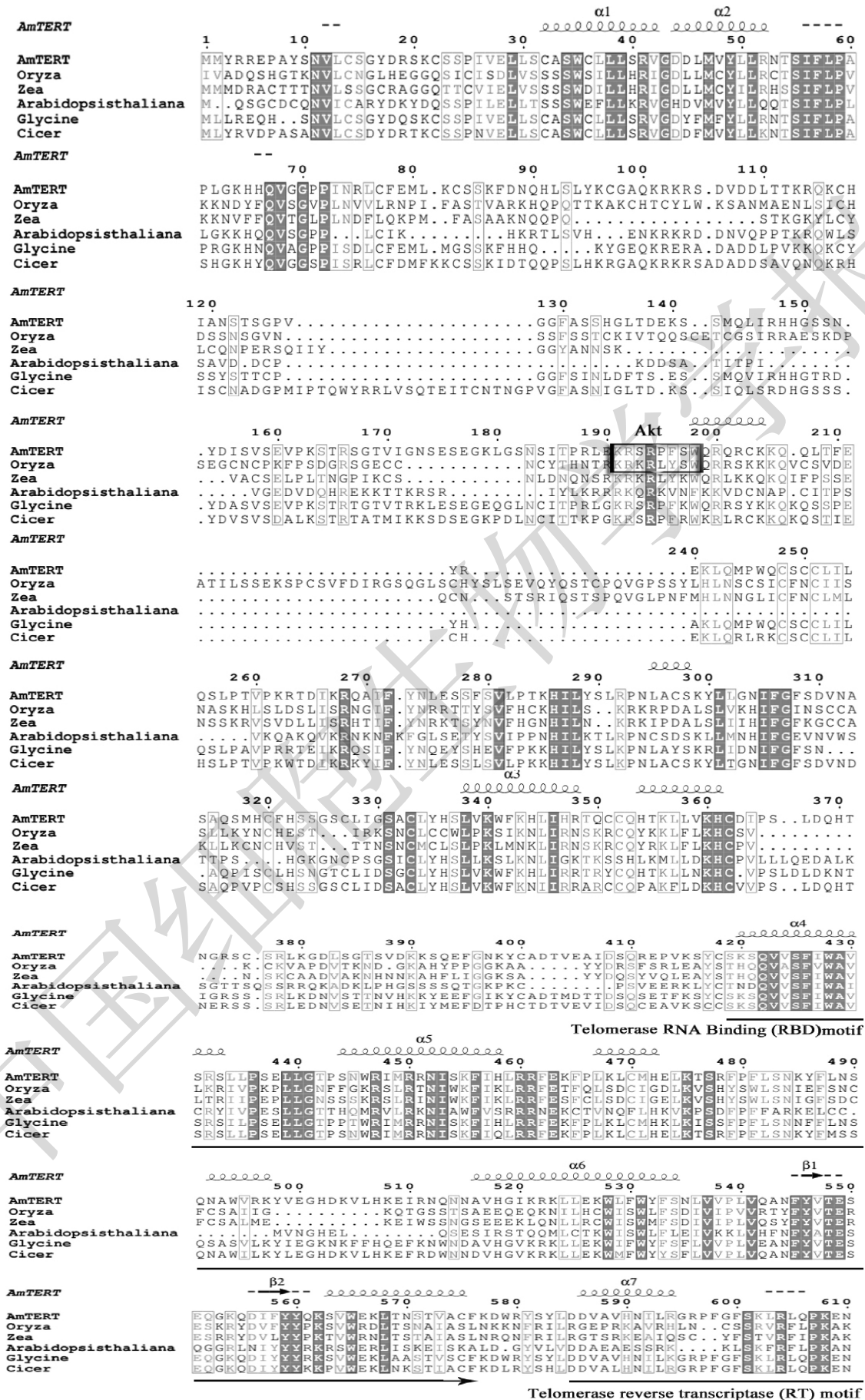


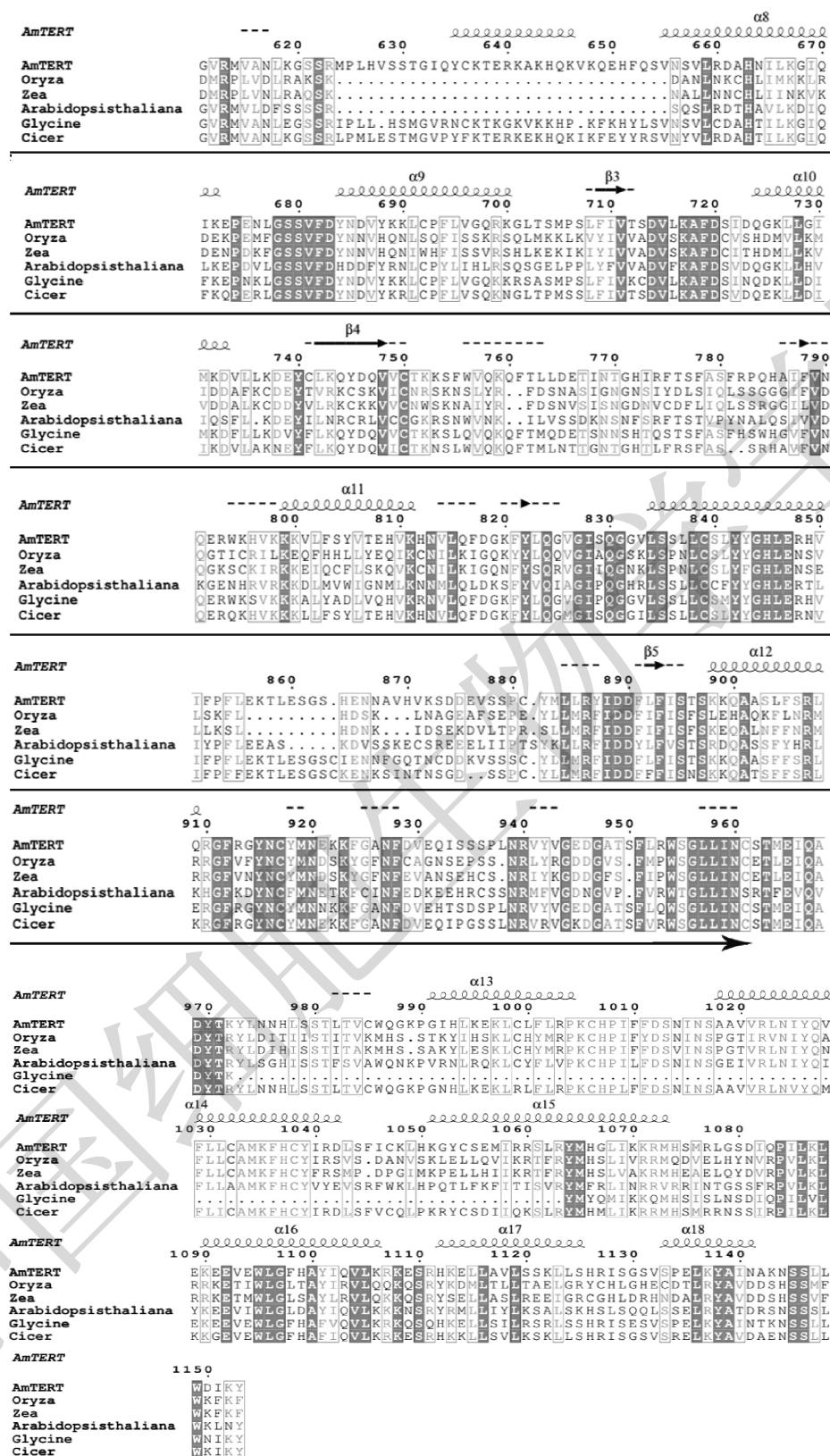
M: DL2000 marker; 1, 2: 扩增产物1~1 822 bp; 3, 4: 扩增产物1 712~3 459 bp; 5: 全长ORF扩增产物(3 459 bp)。

M: DL2000 marker; 1,2: PCR amplified 1-1 822 bp; 3,4: PCR amplified 1 712-3 459 bp; 5: full length of ORF PCR amplified (3 459 bp)。

图2 PCR扩增AmTERT基因

Fig.2 PCR amplification of AmTERT gene





氨基酸比对结果及二级结构。其中黑色框标识的是Akt酶磷酸化位点; Oryza: 水稻; Zea: 玉米; *Arabidopsis thaliana*: 拟南芥; Glycine: 大豆; Cicer: 鹰嘴豆。

amino acid alignment results and secondary structure. the black box identifies the Akt kinase phosphorylation site; Oryza: *Oryza sativa*; Zea: *Zea mays*; *Arabidopsis thaliana*: *Arabidopsis thaliana*; Glycine: *Glycine max*; Cicer: *Cicer arietinum*.

图3 不同物种间TERT蛋白的比对结果

Fig.3 Comparison of TERT proteins from different species

与库中的已知同源蛋白晶体结构比对并进行三维重构, 利用SWISS-MODEL预测了AmTERT的主链构象(图4C), 其包含有保守的具有逆转录活性结构序列(telomerase reverse transcriptase motifs, RT)(图4B)及在进化过程中也十分保守的端粒酶RNA结合结构域(telomerase RNA binding domain, TRBD)(图4A)。

基于不同植物的TERT氨基酸序列, 使用MEGA5.1软件用Neighbor-Joining法构建NJ进化树, 研究中选取了几个具有代表性的科属: 包括百合科、豆科、禾本科、葫芦科、葡萄科、蔷薇科、茄科、十字花科、芸香科、苔藓和藻类, 其中红色圆圈标识的是AmTERT氨基酸序列。在对各物种氨基酸序列进行格式化处理后, 使用Clustal W软件对获取的全部TERT蛋白序列进行多序列比对, 通过筛选和去除结果中的低相似性冗余序列。利用筛选后的序列比对结果, 使用PhyML构建系统发育树(Bootstrap=100), 得到不同物种TERT氨基酸序列的系统进化关系(图5)。

系统进化结果表明, TERT在同一类群中的保守性极强。如TERT基因在黄瓜、香瓜等的分支中具有高度的保守性(bootstrap $\geq$ 99), 而上述均属于葫芦科植物, 也即TERT基因的系统进化关系与其所在物种的系统进化关系保持了一致。其他如水稻、小麦等为主的禾本科, 大豆、菜豆等为主的豆科, 番茄、烟草等为主的茄科也都反映出了类似的情况, 也即同一科属物种的TERT的亲缘关系都较近。

2.3 AmTERT亚细胞定位

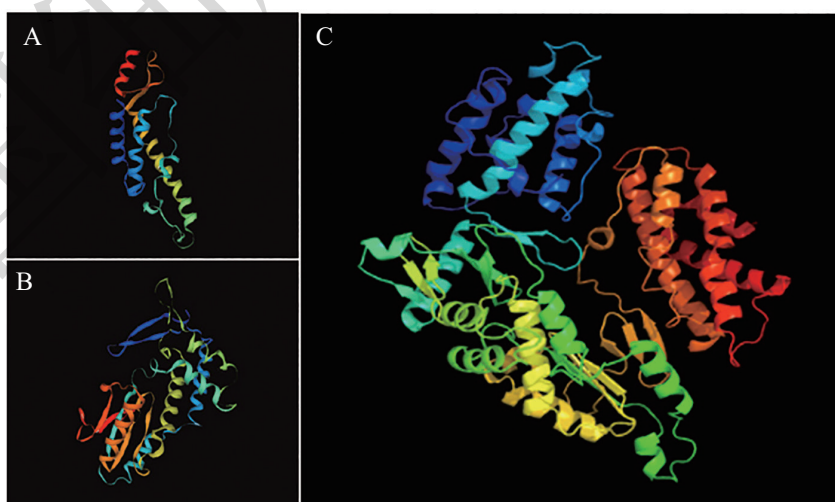
利用PEG介导法将pCAMBIA2300-AmTERT-GFP融合质粒及pCAMBIA2300质粒导入沙冬青原生质体, 瞬时表达结果显示, AmTERT主要定位在细胞核中(图6A和图6B)。

2.4 基因表达分析

2.4.1 不同组织(器官)中的表达差异 利用实时荧光定量PCR技术分析了AmTERT在培养14天的沙冬青幼苗根、茎和叶中的表达量, 结果显示, AmTERT在根中的表达水平平均高于茎及叶组织, 其中在茎组织中表达量较低(图7)。

2.4.2 AmTERT响应盐、热、干旱及冷胁迫 在不同的非生物胁迫处理下, AmTERT的响应模式存在差异, 即使在同一逆境下, 在不同组织间的表达模式也不同。

在NaCl胁迫下, AmTERT在叶中的表达水平在0~1天呈现轻微的下趋势, 后明显升高, 在处理2天时达到最大值, 而后降低; 而在处理0~4天时, AmTERT在根中的表达呈现先和缓上升后再达到最大值, 而后恢复至正常水平的趋势, AmTERT在根中的表达量同样高于叶(图8E和8F)。在渗透(PEG)胁迫下, 沙冬青幼苗的根和叶组织中AmTERT受PEG6000胁迫诱导, 表达量呈逐渐上升趋势, 在4天时均达到最大值, 而后降低, 根中的表达量始终显著高于叶片组织(图8A和8B)。



A: AmTERT的端粒酶RNA结合结构域(TRBD)三维结构模型; B: AmTERT的逆转录活性区域(RT)三维结构模型; C: AmTERT三维结构模型。

A: the three-dimensional structural model of the telomerase RNA binding domain (TRBD) of AmTERT; B: the three-dimensional structural model of the reverse transcriptional activation region of AmTERT; C: the three-dimensional structural model of AmTERT.

图4 AmTERT三维结构模型

Fig.4 Three-dimensional structure diagram model of AmTERT

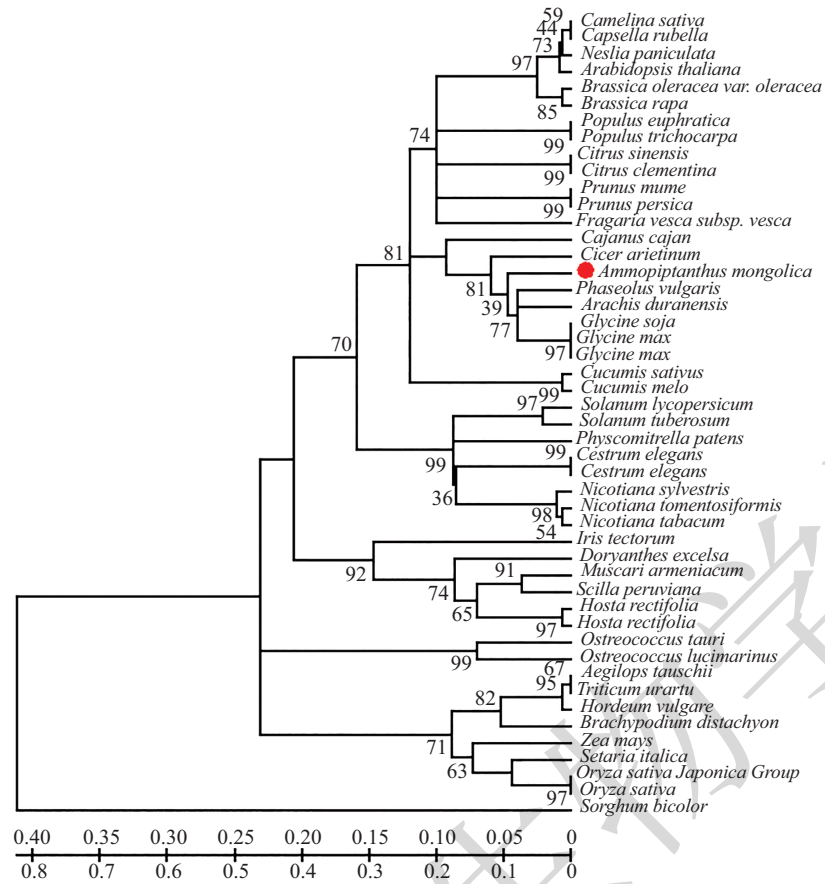


图5 多种植物TERT系统进化树分析

Fig.5 Phylogenetic tree constructed by TERT protein sequences in plants

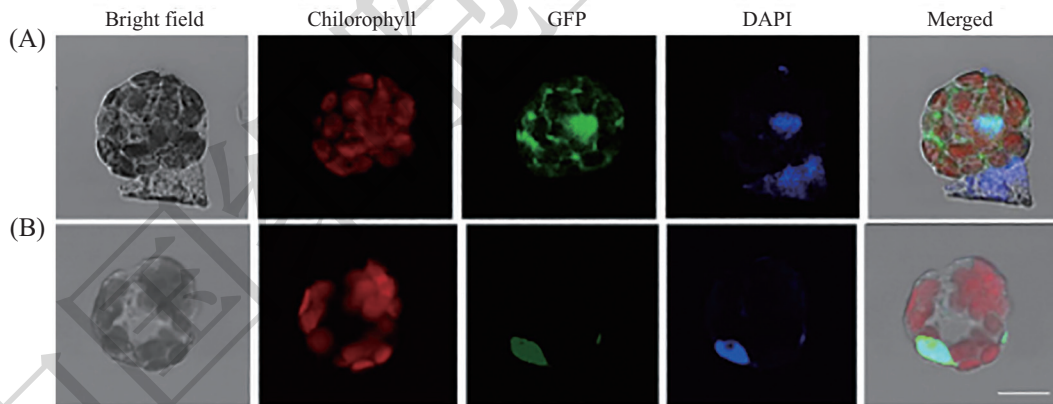
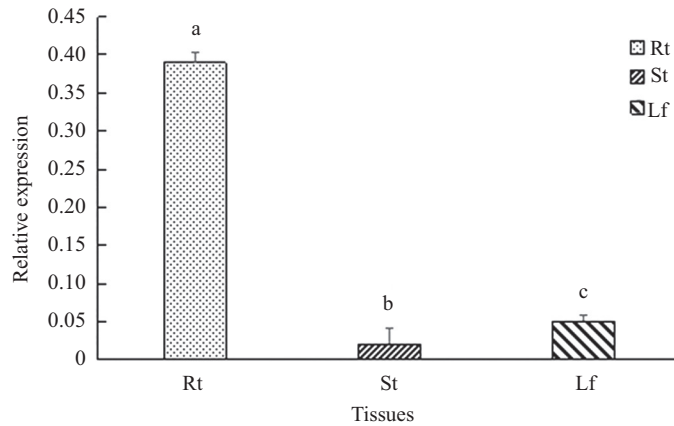
A: pCambia2300-GFP质粒在原生质体中的瞬时表达; B: pCambia2300-AmTERT-GFP融合质粒在沙冬青原生质体中的瞬时表达。比例尺=10 μm 。A: transient expression of GFP in protoplasts; B: transient expression of AmTERT-GFP in protoplasts. Bar=10 μm .

图6 AmTERT蛋白瞬时表达

Fig.6 Transient expression of AmTERT protein

在2 °C低温胁迫下, 叶组织中*AmTERT*的表达水平在0~1天呈现轻微的下陷趋势, 后明显升高, 在4天时达到最大值。根组织中处理0~1天呈现先下降而后在2~8天之间逐渐升高的趋势。叶组织中*AmTERT*表达量的达峰时间比根组织中早(图8G和图8H)。在

45 °C高温胁迫下, 叶组织中*AmTERT*的表达水平在0~1天呈现轻微的下陷趋势, 后明显升高; 在叶组织中2~4 h内没有明显差异, 在6 h时骤然升高至峰值后逐渐下降。根组织中*AmTERT*的表达水平在4 h时出现峰值, 而后骤然下降。值得注意的是, 根组织中的



Rt: 根; St: 茎; Lf: 叶。所呈现的数据代表 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$, 误差线表示3个生物重复 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的标准误差。不同小写字母表示不同组织间表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

Rt: root; St: stem; Lf: leaf. Data presented represent the $\text{mean} \pm \text{S.D.}$. Error bars indicated the S.D. based on three biological replicates. Different small letters indicated significant difference between different tissues at 0.05 level.

图7 *AmTERT*在沙冬青不同组织中的表达模式
Fig.7 Expression profiles of *AmTERT* in different tissues

表达量达峰时间早于叶组织, 且在峰值时的表达量远高于叶组织中的表达量(图8C和图8D)。

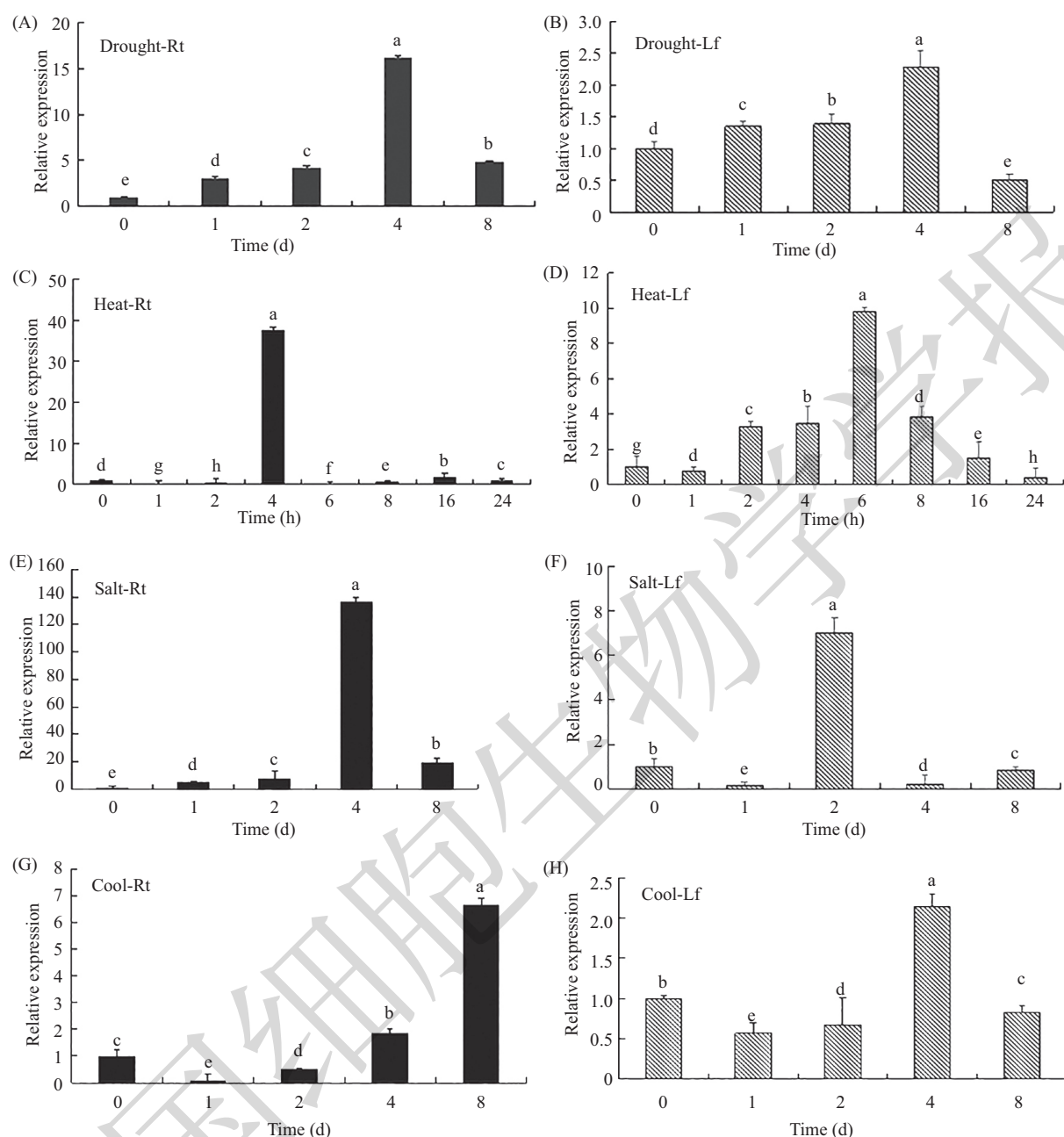
3 讨论

在大多数真核生物中, TERT蛋白包含4个功能域: 端粒酶N-末端功能域(telomerase N-terminal motif, TEN)、端粒酶RNA结合结构域(TRBD)、端粒酶逆转录活性结构域(RT)和C-末端扩展功能域(telomerase C-terminal motif, CTE)^[13]。TEN功能域对端粒招募端粒酶至关重要, 且参与催化端粒重复序列合成, 增加酶的整体活性并赋予持续合成重复序列的能力^[14-18]; TRBD功能域提供端粒酶RNA与端粒酶逆转录酶TERT的相互作用位点^[19]; RT功能域含有端粒酶活性位点, 与逆转录转座子(retrotransposon)和逆转录病毒逆转录酶(retroviral reverse transcriptases)的RT功能域具有明显的同源性^[20-21]; 但并不是所有真核生物都含有全部的4个功能域^[22], 如赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)TERT蛋白没有发现端粒酶N-末端功能域TEN^[23], 而线虫(*Caenorhabditis*)的TERT蛋白中缺少CTE。本研究中预测结果显示, *AmTERT*具有保守的端粒酶RNA结合结构TRBD和逆转录活性结构域RT, 并且其氨基酸序列与其他物种同源性很高, 揭示测序所得序列的可靠性很高。同时, 二级结构及三维结构预测结果显示以上两个功能结构域蛋白结构中, 端粒酶RNA结合结构TRBD涵盖3个 α -螺旋和2个 β -折叠, 而RT结构域包含6个 α -螺旋和3个 β -

折叠(基因全长中共预测出17个 α -螺旋和5个 β -折叠), 即*AmTERT*的复杂结构多集中于具有特殊功能的部位。但是, 有趣的是, 在*AmTERT*的CTE包含了连续的 α -螺旋, 这可能暗示其具有某些特殊的功能。

另外, 磷酸化是细胞内一种普遍的调节方式。对*AmTERT*潜在磷酸化位点预测结果显示其存在Akt、PKA、PKC、CKII、EGFR、cdc2等多种酶潜在磷酸化位点。其中Akt又称PKB或Rac, 保守序列模式为: XXXRXXS/TXX。预测结果显示, Akt位点位于*AmTERT*蛋白的第192~198氨基酸之间, 对应的氨基酸序列为: RSRPFSW。之前的研究表明, 人TERT和小鼠的TERT都具有蛋白激酶Akt的磷酸化位点, 这些位点的磷酸化参与调节端粒酶活性^[24], 同样的磷酸化位点在水稻^[25]和烟草BY-2细胞^[26]的TERT序列中也能检测到, 并且参与了端粒酶活性的调节, 但是在拟南芥的AtTERT中没有检测到。因此*AmTERT*可能存在与拟南芥不同的端粒酶活性调控机制, *AmTERT*可能通过磷酸化或去磷酸化的作用调节自身或其他基因的功能, 同时磷酸化位点的预测与分析为今后研究其功能提供了重要依据。

Santos等^[27]首先通过TargetP V1.0和MitoProt II V1.0a4软件预测了人类TERT蛋白N-端存在一个线粒体定位信号, 随后构建hTERT-EGFP融合蛋白表达载体转化成纤维细胞(NHF), Mitotrackerred标记线粒体, hTERT-EGFP融合蛋白与Mitotrackerred共定位, 且在线粒体组分中检测到端粒酶活性, 首次证明



A-H: 不同胁迫条件下 *AmTERT* 的表达模式。Drought: 干旱处理(PEG); Heat: 热处理(45 °C); Salt: 盐处理(NaCl); Cold: 冷处理(2 °C); Rt: 根; Lf: 叶; 所呈现的数据代表 mean±S.D., 误差线表示 3 个生物重复 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的标准误差, 不同小写字母表示同一处理条件下不同时间点表达量差异显著 ($P < 0.05$)。纵坐标表示与未处理材料中 *AmTERT* 表达量(基准为 1)比较。

A-H: relative expression profiles of *AmTERT* under abiotic stress. Drought: drought treatment (PEG); Heat: heat treatment (45 °C); Salt: salt treatment (NaCl); Cold: cold treatment (2 °C); Rt: root; Lf: leaf; Data presented represent the mean±S.D., Error bars indicate the S.D. based on three biological replicates, different small letters indicate significant difference at 0.05 level. Relative gene expression levels were compared with untreated material control (baseline=1).

图8 *AmTERT* 在不同胁迫条件下的表达模式

Fig.8 Relative expression profiles of *AmTERT* under abiotic stress

hTERT能够定位到线粒体。Sykorova等^[28]的研究中曾报道植物TERT蛋白的TEN端存在保守的NLS, 这与我们的预测结果一致。对AmTERT的定位预测结果显示, 其具有两个核定位序列(NLS), 同时原生质

体瞬时表达结果也显示, AmTERT主要定位在细胞核中, 细胞质膜上也有较弱的定位。另外也预测到AmTERT蛋白具有线粒体及细胞质膜定位信号, 但其是否能进入线粒体并参与调节线粒体氧化应激功

能需进一步实验验证。不过, 在Zachova等^[29]的实验中, 除了通过构建荧光融合蛋白证明拟南芥TERT蛋白及其结构域主要定位于细胞核和核仁内, 并且预测到有线粒体定位信号存在, 也观察到拟南芥TERT的CTE端出现较弱的细胞质定位, 猜测可能是由于NLS的优势作用效果导致TERT在细胞质中的定位较弱。

荧光定量PCR(qRT-PCR)结果表明, *AmTERT*在培养14天的沙冬青幼苗的不同组织表达模式不同, 在根中表达量较茎和叶都高, 茎中表达量极少。前人的研究结果显示, 与脊椎动物一样, 植物TERT的转录水平在分裂旺盛的细胞中较高, 包括植物的幼苗、根和芽的分生区、花以及悬浮细胞培养物。同时, 端粒酶活性研究也显示, 在TERT表达差的器官如成熟的叶片中几乎检测不到酶活性^[30]。

研究表明, 端粒酶除了端粒DNA的合成作用外, 还具有其他的生物学功能, 包括促进DNA修复、抗细胞凋亡、基因表达调控和保护线粒体完整性等非端粒功能^[8,31]。张徐俞等^[32]的研究表明, 在盐胁迫条件下, 沙冬青细胞端粒酶活性的维持对细胞响应应激保护、维持染色体DNA稳定性具有一定的作用。另外, 刘颖等^[33]较为详细地介绍了TERT与基因的表达调节及肿瘤发生和TERT与线粒体功能调控相关的端粒酶非端粒功能。沙冬青幼苗的根和叶中的*AmTERT*在非生物胁迫条件下都表现出了表达量上调, 其中根对胁迫的响应更为明显。这些结果暗示, 沙冬青端粒酶逆转录酶*AmTERT*可能具有非端粒功能。

综上, 沙冬青端粒酶逆转录酶*AmTERT*具有端粒酶逆转录酶保守结构域: 端粒酶RNA结合结构域(TRBD)及端粒酶逆转录活性结构域(RT)。同时, 还含有多种潜在激酶磷酸化位点, 可能参与沙冬青端粒酶的端粒和非端粒功能的调节, 并和动物细胞一样具有应激保护和响应DNA损伤的非端粒功能。但其具体的胁迫响应机制需进一步研究。

参考文献 (References)

- Blackburn E, Greider CJ. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 2006; 12(10): 1133-8.
- 万 向, 马 跃, 曹立亭, 许李丽, 王海珍, 何吉春. 端粒酶的功能、结构与调控的研究进展. *广东畜牧兽医科技*(Wan Xiang, Ma Yue, Cao Liting, Xu Lili, Wang Haizhen, He Jichun. Research progress on functional structure and regulation of telomere. *Guangdong Animal Science and Veterinary Science*) 2010; 35(5): 7-9.
- Schmidt J, Zaug A, Cech T. Live cell imaging reveals the dynamics of telomerase recruitment to telomeres. *Cell* 2016; 166(5): 1188.
- Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional est genes. *Genetics* 1996; 144(4): 1399-412.
- Fitzgerald MS, Riha K, Gao F, Ren S, McKnight TD, Shippen DE. Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(26): 14813-8.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, *et al.* Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279(2): 349-52.
- Palanca-Wessels MCA, Klingelutz A, Reid BJ, Norwood TH, Oheim KE, Paulson TG, *et al.* Extended lifespan of Barrett's esophagus epithelium transduced with the human telomerase catalytic subunit: a useful *in vitro* model. *Carcinogenesis* 2003; 24(7): 1183-90.
- Chiodi I, Mondello C. Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Front Oncol* 2012; 2(133): 133.
- 马世威, 马玉明. 半荒漠的空间分布及景观生态总析. *干旱区研究*(Ma Shiwei, Ma Yuming. Spatial distribution and landscape ecological analysis of semi desert. *Arid Zone Research*) 1998; 7(4): 58-63.
- Wu Y, Wei W, Pang X, Wang X, Zhang H, Dong B, *et al.* Comparative transcriptome profiling of a desert evergreen shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, in response to drought and cold stresses. *BMC Genomics* 2014; 15(1): 671.
- Wang W, Chen J, Li J, Zhang Y, Shao Z, Kuai B. Extraordinary accumulations of antioxidants in *Ammopiptanthus mongolicus* (Leguminosae) and *Tetraena mongolica* (Zygophyllaceae) distributed in extremely stressful environments. *Bot Stud* 2007; 48: 55-61.
- Liu JQ, Qiu MX. Ecological, physiological and anatomical traits of *Ammopiptanthus mongolicus* grown in desert of China. *J Integr Plant Biol* 1982; 24: 568-73.
- Blackburn EH, Collins K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(5): a003558.
- Jurczyk J, Nouwens AS, Holien JK, Adams TE, Lovrecz GO, Parker MW, *et al.* Direct involvement of the TEN domain at the active site of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(5): 1774-88.
- Robart AR, Collins K. Human telomerase domain interactions capture DNA for TEN domain-dependent processive elongation. *Mol Cell* 2011; 42(3): 308-18.
- Eckert B, Collins K. Roles of telomerase reverse transcriptase n-terminal domain in assembly and activity of tetrahymena telomerase holoenzyme. *J Biol Chem* 2012; 287(16): 12805.
- Schmidt JC, Dalby AB, Cech TR. Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *Elife* 2014; 3: e03563.
- Wu RA, Collins K. Human telomerase specialization for repeat synthesis by unique handling of primer-template duplex. *Embo J* 2014; 33(8): 921-35.

- 19 Lai CK, Mitchell JR, Collins K. RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 2001; 21(4): 990-1000.
- 20 Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 1997; 276(5312): 561-7.
- 21 Nakamura TM, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997; 277(5328): 955-9.
- 22 Sýkorová Eva, Fajkus. Structure-function relationships in telomerase genes. *Mol Biol Cell* 2009; 101(7): 375-406.
- 23 Gillis AJ, Schuller AP, Skordalakes E. Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature* 2008; 455(7213): 633-7.
- 24 Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 1999; 274(19): 13085-90.
- 25 Oguchi K, Tamura K and Takahashi H. Characterization of *Oryza sativa* telomerase reverse transcriptase and possible role of its phosphorylation in the control of telomerase activity. *Gene* 2004; 342(1): 57-66.
- 26 Yang SW, Jin E, Chung IK, Kim, WT. Cell cycle dependent regulation of telomerase activity by auxin, abscisic acid and protein phosphorylation in tobacco BY-2 suspension culture cells. *Plant J* 2002; 29(5): 617-26.
- 27 Santos JH, Meyer JN, Skorvaga M, Annab LA, Van Houten B. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. *Aging Cell* 2004; 3(6): 399-411.
- 28 Sykorova E, Fajkus J. Structure-function relationships in telomerase genes. *Cell* 2009; 101(7): 375-92.
- 29 Zachova D, Fojtova M, Dvorackova M, Mozgova I, Lermontova I, Peska V, *et al.* Structure-function relationships during transgenic telomerase expression in *Arabidopsis*. *Physiol Plantarum* 2013; 149: 114-26.
- 30 Nelson ADL, Beilstein MA, Shippen DE. Plant Telomeres and Telomerase. In: Howell SH, (ed). *Molecular Biology*, New York: Springer Reference, 2014, 25-50.
- 31 Ding D, Zhou J, Wang M, Cong, YS. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer. *FEBS J* 2013; 280(14): 3205-11.
- 32 张徐俞, 王瑾瑜, 郑广顺, 张俊琦, 卢存福. 盐胁迫下沙冬青细胞端粒酶活性的变化与DNA稳定性的关系. *生物技术通讯* (Zhang Xuyu, Wang Jinyu, Zheng Guanshun, Zhang Junqi, Lu Cunfu. Effects of salt stress on Telomerase activity in relation to DNA stability of *Ammopiptanthus mongolicus* cells. *Biotechnology Bulletin* 2014; (10): 134-8.
- 33 刘颖, 吴晓飞, 门景煜, 卢存福. 端粒酶的非端粒功能研究进展. *中国细胞生物学学报* (Liu Ying, Wu Xiaofei, Men Jingyu, Lu Cunfu. Development of non-telomere function of telomerase. *Chinese Journal of Cell Biology* 2016; 5: 640-6.