doi:10.11707/j.1001-7488.20150515

毛竹微型颠倒重复序列转座子 *PhTourist1* 的 克隆与分析*

胡 慧 周明兵 杨 萍 汤定钦

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地 临安 311300)

【目的】微型颠倒重复序列(MITE)是 DNA 转座子中一类依赖自主转座子提供的转座酶进行转座的非 自主转座子。以毛竹中与水稻 mPing 同源的 MITE ——PhTourist1 为例,研究 PhTourist1 的结构特点和转座特性,并 分析 PhTourist1 的转座对其附近基因表达的影响,进而了解转座子对毛竹基因组多态性形成和基因表达调控的作 用。【方法】利用 MEGA5.1, DNAStar, WebLogo 3-Create 等软件对 PhTourist1 的末端反向重复序列(TIR)、靶位点重 复序列(TSD)、插入位点序列偏好性等进行系统的研究和分析,并计算 PhTourist1 在毛竹基因组中的插入时间和分 布情况。通过 PCR 手段确认 PhTourist1 在来自同一母本的 24 株毛竹实生苗基因组中的所有位置并验证是否存在 插入多态性。针对其中发生转座的 PhTourist1-3,通过 RTFO PCR (real-time fluorescence quantitative PCR)分析 PhTourist1-3 存在与否对其下游基因表达量的影响。【结果】共得到 30 个 PhTourist1,通过生物信息学技术与手段 确定得到的 PhTourist1 的 TIR(GGCCAGTCTCAATG)、TSD(TWA)及插入偏好性序列((C/T)T(C/A)T(T/A)A(G/ T) A(A/C)) 与已报道的 Tourist-like MITE 的特点吻合。通过对 PhTourist1 的插入时间与分布分析了解到 PhTourist1 在毛竹基因组中的插入时间相对集中,且 PhTourist1 偏好插在基因附近。对毛竹基因组中 30 个 PhTourist1 的验证确认了每个位置的正确性,并发现 PhTourist1-3 存在插入多态性。且 PhToutist1-3 的切除为完整 切除,与 mPing 的特性一致。利用 RTFQ PCR 对 PhTourist1-3 下游基因 PH01000402G0860 表达量的分析结果表明 PhTourist1-3 转座后 PH01000402G0860 的表达量比其转座前增加了 8.04 倍。【结论】本研究鉴定到的与 mPing 高 度同源的转座子 PhTourist1,其中 PhTourist1-3 在毛竹基因组中可以发生转座,是首次在毛竹基因组中发现的有活 性的 Tourist-like MITE,且 PhTourist1-3 的转座对宿主基因表达产生显著的影响。这些结果表明,作为毛竹基因组重 要组成部分的转座子可以通过自身转座参与宿主基因组多态性的形成,调节宿主基因表达,进而参与毛竹生长发 育的调控。

关键词: 毛竹; Tourist-MITE; mPing; 转座; 基因表达

中图分类号: S718.46 文献标识码: A 文章编号: 1001 - 7488(2015)05 - 0127 - 08

Cloning and Analysis of Miniature Inverted Repeat Transposable Elements *PhTourist1* from *Phyllostachys edulis*

Hu Hui Zhou Mingbing Yang Ping Tang Dingqin

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture Zhejiang A & F University Lin' an 311300)

Abstract: 【Objective】 Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs), some of which are known as active non-autonomous DNA transposons, can jump by transposases encoded by the autonomous DNA transposons. It has been reported that the transposition of MITE influences the expression of host's genes. In order to study the structural characteristics and transposition characteristics of MITE, and to analyze the impact of the transposition of MITE on expression of its near genes in *Phyllostachys edulis* genome, the *Tourist-*like MITE *PhTourist1* which was homologous with mPing from rice was chosen to analyze the role of transposons in genome polymorphism formation and gene expression regulation in P. edulis. 【Method】TIR (terminal inverted repeat) and TSD (target site duplication) of PhTourist1 were

收稿日期: 2014-09-01; 修回日期: 2015-01-19。

基金项目:国家自然科学基金项目"毛竹活性 MITE 的分离及与宿主基因表达调控网络互作机制解析"(31270645);国家自然科学基金项目"毛竹 LTR 反转录转座子转座调控机理及对宿主生物多样性的影响"(31470615);浙江自然科学基金杰出青年项目"竹亚科 LTR 反转录座子的分布和增殖模式及对宿主基因组进化影响"(LR12C16001);浙江自然科学基金项目"Mariner-like 转座酶的人工定向进化"(Y3100239);浙江省重大科技专项"雷竹等中小径散生笋用竹新品种选育及推广"(2012C12908-2)。

identified and the insert preference of PhTourist1 was investigated using software of MEGA5. 1, DNAStar and WebLogo 3-Create. Then the insertion time and distribution of PhTourist1 in the P. edulis genome were calculated. PhTourist1 insertion sites in the P. edulis genome were tested by PCR in the 24 seedlings to test their insert polymorphisms. With the real-time fluorescence quantitative PCR (RTFQ PCR) technique, the expression level of gene downstream PhTourist1-3 was analyzed with PhTourist1-3 exists or not. [Result] 30 copies of PhTourist1 were discovered. Their TIR (GGCCAGTCTCAATG), TSD (TWA) and insert preference sequence ((C/T)T(C/A)T(T/A)A(G/T)A(A/C)) identified with bioinformatics tools were consistent with previous reports. The insert time of PhTourist1 in P. edulis genome was relatively concentrated. PhTourist1 also preferentially inserts near genes. Each of the insertion sites of PhTourist1 was verified correct, while only PhTourist1-3 has insert polymorphism among the 30 copies. There was no footprint at the excision site of PhTourist1-3 which was in cosistence with mPing. The analysis by RTFO PCR of the expression level of a downstream gene PH01000402G0860 of PhTourist1-3 revealed an increase by 8.04 times with the missing of PhTourist1-3 than the existing of PhTourist1-3. [Conclusion] PhTourist1-3, one of the identified PhTourist1 homology with mPing in the study, could jump in the genome of P. edulis. It was the first active Tourist-like MITE discovered in P. edulis and had significant influence on expression of its downstream genes. The results showed that transposons as an important part of P. edulis genome could participate in the formation of gene polymorphism, regulate the gene expression and involve in the regulatory of host growth and development.

Key words: Phyllostachys edulis; Tourist-MITE; mPing; transposition; gene expression

转座子(transposable elements, TEs) 是广泛存在 于真核生物中的一类可以移动的 DNA 片段 (Feschotte et al., 2002),最早由 McClintock 在玉米 (Zea mays) 中发现(McClintock, 1951)。转座子根 据转座机制可分为Ⅰ、Ⅱ2类,类型Ⅰ转座子又叫反 转录转座子(retro-transposons),以RNA 为中间媒 介, 遵循"复制 - 粘贴"的转座方式: 类型 Ⅱ 转座子 又叫 DNA 转座子 (DNA transposons),通过 DNA 中 间体进行转座,遵循"剪切-粘贴"的转座方式 (Shirasawa et al., 2012)。根据转座自主性又可把 DNA 转座子分为自主转座子(autonomous elements)、非自主转座子(non-autonomous elements) 和微型颠倒重复序列(miniature inverted repeat transposable elements, MITEs) 3 类。自主转座子自 身可编码转座酶等产物,催化自身发生转座;非自主 转座子是自主转座子发生部分缺失的产物,自身不 具备编码转座酶的功能,在相应自主转座子提供转 座酶的情况下可以发生转座(Shirasawa et al., 2012)。

MITEs 是一类类似非自主转座子但比非自主转座子短的转座子,长度为 $100 \sim 800$ bp,不编码转座酶,有短末端反向重复序列(short terminal inverted repeat, sTIR) 和 靶 位 点 重 复 序 列(target site duplication, TSD),高 A/T 含量,多拷贝($1000 \sim 15000$),易形成二级结构,偏好插在基因内部或基因附近(Kidwell *et al.*, 1997)。根据其 TIR 和 TSD的不同分为不同家族,在植物中存在最多的是

Stowaway-like MITE (2 bp TSD, TA) 和 Tourist-like MITE (3 bp TSD, TWA) 两大家族。Stowaway-like MITE 与 TcI/mariner 超家族转座子在 TIR 和 TSD上的同源性很高,Stowaway-like MITE 在 TcI/mariner 超家族自主转座子编码的转座酶催化下可以发生转座 (Feschotte et al., 2000); Tourist-like MITE 与 PIF/Harbinger 超家族在 TIR 和 TSD上的同源性很高,Tourist-like MITE 在 PIF/Harbinger 超家族自主转座子编码的转座酶催化下可以发生转座 (Yang et al., 2007)。

第1个被证明有活性的 MITE 是 mPing, mPing 来源于水稻(Oryza sativa)基因组(Jiang et al., 2003; Kikuchi et al., 2003; Nakazaki et al., 2003),属于 Tourist-like MITE,其长度为 430 bp,有 15 bp 的 TIR (GGCCAGTCACAATGG)、3 bp 的 TSD (TTA 或 TAA)。mPing 偏好插在基因附近或基因内部(Naito et al., 2009), 在水稻和拟南芥(Arabidopsis thaliana) 中的插入偏好序列为 YTMTWAKAR (Yang et al., 2007; Naito et al., 2006)。 mPing 在基因组中的跳 跃还具有2个特性:1)很少留下转座足迹,例如在 酵母基因组转座时,99%的切除为精确切除 (Hancock et al., 2010), 在拟南芥基因组转座时, 82%的切除为精确切除(Yang et al., 2007); 2)偏好 插入基因附近且不会插在自己原来所处位置附近 (Hancock et al., 2011)。这些特性使 mPing 在用作 基因标签方面优于之前常见的 Ac/Ds 系统和 Tn1, 已成功应用于大豆(Glycine max)、水稻基因组功能 基因的鉴定与分析(Hancock et al., 2011)。

毛竹(Phyllostachys edulis)为散生竹,是我国经济价值最高的竹种,占全国竹林面积的 2/3 以上(江泽慧,2002),且变异丰富(钟浩等,2010)。毛竹为典型的二倍体,其基因组草图由国际竹藤中心、中国林业科学研究院林业研究所等机构学者于2013年2月公布(Peng et al.,2013)。

本研究根据已知的 mPing 的特点在毛竹基因组中寻找与 mPing 同源的 Tourist-like MITE,系统分析了该类型 Tourist-like MITE 的结构特点及在基因组中的插入特性,研究它们在毛竹生长发育过程中的转座情况,及对宿主基因表达丰度的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 所用的 24 株毛竹实生苗由广西 灵川同一株开花毛竹的种子繁育,于温室中培养,依 次编号为 1,2,3,…,24。取生长 3 个月的新鲜叶片 用作试验。

所用克隆受体菌为大肠杆菌 (Escherichia coli) DH5α,为本实验室保存。DNeasy Plant Mini Kit 和RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN,克隆载体 pMD18-T, Ex Taq Polymerase, Prime Script™RT Master Mix 和SYBR® Premix Ex Taq Ⅱ (Tli RNaseH Plus)均购自Takara。

1.2 试验方法 1) 毛竹基因组中 mPing-like MITE 的鉴定和结构特征分析 根据水稻 mPing 的 TSD 和 TIR 保守序列 (TA/TggccagtcacaatggA) (Jiang et al., 2003),利用 transpo 软件 (Santiago et al., 2002),在 TIR 序列上允许错配碱基为 2 个,检索目标序列长度设置为 100 ~800 bp,其他为默认参数,在毛竹基因组中检索与 mPing 在 TIR, TSD 序列上同源性高的 MITE。

利用 MEGA5. 1 中 MUSCLE 程序中的 neighbor joining 算法分析得到的 mPing-like MITE 序列之间的同源性,将其中碱基完全一致的序列分为一类,共 17 类,每类选出 1 条共 17 条和 mPing 一起用 DNAStar 软件进行同源比对,同时得到 mPing-like MITE 的一致序列。

根据得到的 *mPing-*like MITE 在毛竹 scafold 中的位置提取这些 *mPing-*like MITE 的两侧侧翼序列,利用 MEGA5.1 中 MUSCLE 程序中的 neighbor joining 算法分析其 TSD 同源性及插入偏好性,用 WebLogo 3-Create 在线软件(http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi)作图。

2) mPing-like MITE 的插入时间分析 在1)中

获得了 mPing-like MITE 的一致序列,用 Clustal W 对每个序列和一致序列进行比对,然后利用 Kimura2 参数模型计算每个成员与一致序列之间的核苷酸替换情况 (k),依据公式 T=k/(2r) 计算每个 mPing-like MITE 的插入时间,式中,r 为核苷酸每年每个位点的替换率 $(1.56 \times 10^{-8}$, Han $et\ al.$, 2010)。

3) mPing-like MITE 转座活性分析 根据 mPing-like MITE 的侧翼序列分别设计引物,以验证这些 mPing-like MITE 在基因组中的位置(引物信息见表 1),反应体系如下:0.2 μ L Ex Taq Polymerase (5 $\mathrm{U} \cdot \mu \mathrm{L}^{-1}$),0.8 μ L primer-5 (10 μ mol $\cdot \mathrm{L}^{-1}$),0.8 μ L primer-3 (10 μ mol $\cdot \mathrm{L}^{-1}$),2 μ L 10 × Ex Taq Buffer,1.6 μ L dNTP mix (2.5 μ mol $\cdot \mathrm{L}^{-1}$),100 μ 0 ng DNA,加无菌水补齐 20 μ L。反应条件为:预变性 94 μ 0 30 s,退火 50 μ 0 30 s(根据引物选择合适的退火温度),延伸 72 μ 0 30 s,35 个循环;72 μ 0 μ 10 μ 10 μ 10 min。

PCR 产物琼脂糖电泳,割胶回收,连接到pMD18-T载体上送测序。

4) mPing-like MITE 下游基因表达丰度分析 选取基因组中同一个位点 2 条染色体上皆未发生缺 失的 6,11,15 号植株和 2 条染色体上皆发生缺失的 8,13,20 号植株的叶片为材料,分别提取其 RNA, 反转录成 cDNA,通过荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ PCR)分析其下 游基因的表达丰度(反应体系及程序依据说明书), 引物信息见表 1。

2 结果与分析

2.1 *mPing*-like MITE 的鉴定 通过 transpo 得到 30 个 *mPing*-like MITEs, 同源比对发现其相似度高达 99%,可以确定它们来自于同一个祖先, 命名为 *PhTourist1*,每一条分别命名为 *PhTourist1*-#(#:1-30)。

将序列完全一致的 PhTourist1 分为一类,共 17 类,每一类选出 1 条,17 条序列与 mPing 同源比对的结果显示 PhTourist1 拥有共同的序列为 GGCCAGTCTCAATG 的 14 bp 的 TIR,比 mPing 的 TIR(GGCCAGTCACAATGG)少 1 bp,且内部有 1 个碱基的不同,PhTourist1 为 T,mPing 为 A。 17 条序列与 mPing 相比还存在 3 处明显的片段缺失,其余位置的比对发现 PhTourist1与 mPing 在 5′端的同源性高于 3′端,平均相似度在 68% ~ 69% 之间(图 1)。

表 1 引物序列^①

Tab. 1 The sequences of primers

	Tab. 1 The sec	juences of primers	
引物名称 Name of primer	引物序列 Sequence of primer(5´—3´)	引物名称 Name of primer	引物序列 Sequence of primer(5´—3´)
PhTourist1-4-5*	AGGTCAAAGGCAGCGGCTAA	PhTourist1-17-5*	TTATTAGGGTGCTACATCA
PhTourist1-4-3*	AACTATCTCCCGCCGTCCC	PhTourist1-17-3*	AGTTTCATCTCCCAGTTT
PhTourist1-2-5*	GCTTACGCTTCGGGTTGC	PhTourist1-18-5*	ATCTCGCCATTCACCTCG
PhTourist1-2-3*	TTGGTGGCGATGGATACG	PhTourist1-18-3*	GTGCGTAGTTCCTTCCTG
PhTourist1-3-5*	CAATGTTCTGTCTTTGGCTGAG	PhTourist1-19-5*	TGCTGCGAAACGCCAAGA
PhTourist1-3-3*	CGCTGTTCGTCCGTCAAG	PhTourist1-19-3*	TTATTAGGGTGCTACATCA
PhTourist1-4-5*	TTTTCAGAATAAAGGGAGTC	PhTourist1-20-5*	AGGATAGATTGCGGTGTT
PhTourist1-4-3*	AATACATTGAGCCCGATA	PhTourist1-20-3*	GCAGAATAAAGGCACAAC
PhTourist1-5-5*	ATTTATTAGGGTGCTACATCAG	PhTourist1-21-5*	TTTACAGGAGACGGAGCAA
PhTourist1-5-3*	AAGTTTCATCTCCCAGTTT	PhTourist1-21-3*	TCGGGTTCTTCAAGGACAAG
PhTourist1-6-5*	TATCTGTGCTCCCTTTGC	PhTourist1-22-5*	GTTTCATCTCCCAGTTTC
PhTourist1-6-3*	AATGCCGTGGTCGCTCTT	PhTourist1-22-3*	TTATTAGGGTGCTACATCA
PhTourist1-7-5*	TTCATCACAGCACCATAC	PhTourist1-23-5*	AAGTCATGCCACGTAAAT
PhTourist1-7-3*	GATAGCCAGTTCTTGTCC	PhTourist1-23-3*	GCCCGATCTAGCAGTATG
PhTourist1-8-5*	TTATTAGGGTGCTACATCA	PhTourist1-24-5*	GTTTCATCTCCCAGTTTCC
PhTourist1-8-3*	AAGTTTCATCTCCCAGTT	PhTourist1-24-3*	TTTATTAGGGTGCTACATCA
PhTourist1-9-5*	TTATTAGGGTGCTACATCA	PhTourist1-25-5*	TCTGAGCCAGTTCTTTAC
PhTourist1-9-3*	AAGTTTCATCTCCCAGTT	PhTourist1-25-3*	TTCATCACAGCACCATAC
PhTourist1-10-5*	AGGTCCTTGTGCCTCCGTAA	PhTourist1-26-5*	GTTTCATCTCCCAGTTTC
PhTourist1-10-3*	TTGCCACGCCTCCACCAT	PhTourist1-26-3*	AATAATCACCGCCATCTA
PhTourist1-11-5*	GTGATTGGAGAATAGGGATG	PhTourist1-27-5*	ACTCAAATCTCCTCGTCG
PhTourist1-11-3*	TTCCACCTTCAACTTACTCTTA	PhTourist1-27-3*	TTATTAGGGTGCTACATCA
PhTourist1-12-5*	GTCTCAATGGAGGTTTCA	PhTourist1-28-5*	GATTCGGTGTCGTAACTC
PhTourist1-12-3*	GGAGTTGGGTTGCGTTAG	PhTourist1-28-3*	ATGCGATGTGAATAGTAAAG
PhTourist1-13-5*	CGACTCAACAACCCGTAT	PhTourist1-29-5*	AGACGCATAGCAGTAGGT
PhTourist1-13-3*	TTCATCTCCCAGTTTCCA	PhTourist1-29-3*	GGATTGGATAGCGATAAG
PhTourist1-14-5*	AAAACAAAGTCGGACAAGA	PhTourist1-30-5*	CAATGGGTATTTGACAGC
PhTourist1-14-3*	ATCGCTATGTTTGGAAGGAA	PhTourist1-30-3*	TCTCCTTTCCGACAACTA
PhTourist1-45-5*	AAAAGAAGGGACGGGAGA	PhTourist1-3-2-5 ***	TCCACGAAGACGAAAGCC
PhTourist1-45-3*	TTAGTGCTTGCCTGGTGT	PhTourist1-3-2-3 ***	CGAGCAAGGTGACGATGT
PhTourist1-16-5*	TTGGATAGCGATAAGCAG	PheUBC18-F ****	CTCCTCGTCTCCCTTCCCGAA
PhTourist1-16-3*	GACGCATAGCAGTAGGTGAT	PheUBC18-R ***	GTCCGTTGCTGTAAATGTGTGG

① "*"为验证每个位点 mPing-like MITE 的扩增引物 "**"为 RTFQ PCR 分析 PhTourist1-3 下游基因表达丰度的引物 "***"为 RTFQ PCR 中内参基因 UBC18 (泛素结合酶基因) 的引物。One asterisk indicates the primers for amplification of all mPing-like MITEs in Phyllostachys edulis genome; Two asterisks indicate the primers for RTFQ PCR of the gene downstream PhTourist1-3; Three asterisks indicate the primers for RTFQ PCR of the reference gene UBC18 (ubiquitin-conjugating enzyme 18).

经 MEGA5. 1 分析得到的结果表明 PhTourist1 的 TSD 为 TWA,9 bp 的插入偏好序列比较明显,为 (C/T) T(C/A) T(T/A) A(G/T) A(A/C)(图 2)。 2.2 PhTourist1 在毛竹基因组中的插入时间与分布插入时间的计算结果(表 2)显示 PhTourist1 的插入时间比较集中,14 个在 19 万年前插入,10 个在 10

万年前插入,2个插入发生在将近26万年前,4个在

最近发生插入。

已有报道表明, mPing 倾向于插入基因附近 (Natio et al., 2009)。分析 30 个 PhTourist1 在毛竹基因组 scafold 上与基因的距离,除有6个 PhTourist1 所在的毛竹基因组 scafold 太短,没法获得附近基因的信息外,剩余的24个 PhTourist1中17% PhTourist1位于距离基因上下游2kb范围内,

21%位于距离基因上下游 4 kb 范围内,8%位于基 因内含子中(表 3)。

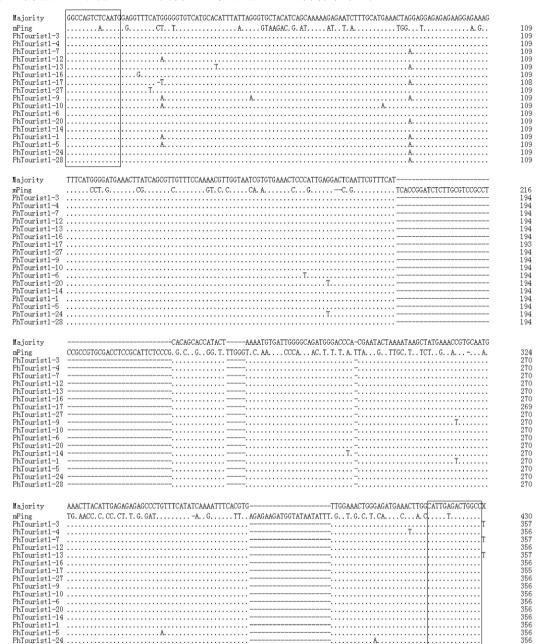


图 1 PhTourist1 与 mPing 序列同源比对结果

Fig. 1 Sequence homologous alignment result between *PhTourist1* and *mPing* 黑色框标记的为 TIR。TIR is boxed in black.

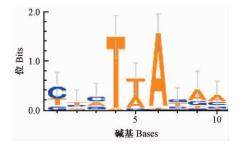


图 2 PhTourist1 插入偏好序列

Fig. 2 Preference insertion sequence of PhTourist1

2.3 PhTourist1 的转座特性 针对 24 株毛竹实生苗中的 30 个 PhTourist1 的位点进行 PCR 验证并测序,得到的结果显示各位点的 PhTourist1 及其侧翼序列同已报导的毛竹基因组序列一致。但 30 个位点中有 29 个位点在 24 株毛竹实生苗基因组中皆表现为插入,无多态性。只有 PhTourist1-3 呈现插入多态性:24 株实生苗中 12 株表现为 PhTourist1-3 在1 对同源染色体上都缺失,所占比例为 50%;6 株表现为 1 条染色体上 PhTourist1-3 保留,其同源染色体

上等位位点处 $PhTourist1 \rightarrow 3$ 缺失,所占比例为 25%;剩余 6 株表现为 $PhTourist1 \rightarrow 3$ 在 1 对同源染色体都保留,所占比例为 25%(图 3)。分析 $PhTourist1 \rightarrow 3$

的转座足迹,发现 *PhTourist1-3* 的切除接近精确切除,除自身完全切除外还缺失 1 bp TSD(图 4)。

表 2 毛竹基因组中 30 个 PhTourist1 的插入时间

Tab. 2 Insertion time of thirty PhTourist1 in the Phyllostachys edulis genome

<i>PhTourist1</i> ⊣D	核苷酸替换水平 The level of nucleotide substitutions(k)	插入时间 Insertion time/a (T)	PhTourist1 -ID	核苷酸替换水平 The level of nucleotide substitutions(k)	插入时间 Insertion time/a (T)
PhTourist1-1	0.006	192 307. 7	PhTourist1-16	0.006	192 307.7
PhTourist1-2	0.003	96 153. 85	PhTourist1-17	0	0
PhTourist1-3	0.003	96 153. 85	PhTourist1-18	0.003	96 153. 85
PhTourist1-4	0.006	192 307.7	PhTourist1-19	0.003	96 153. 85
PhTourist1-5	0.006	192 307.7	PhTourist1-20	0.003	96 153. 85
PhTourist1-6	0.006	192 307.7	PhTourist1-21	0.006	192 307.7
PhTourist1-7	0	0	PhTourist1-22	0	0
PhTourist1-8	0.006	192 307.7	PhTourist1-23	0.003	96 153. 85
PhTourist1-9	0.008	256 410. 3	PhTourist1-24	0.006	192 307.7
PhTourist1-10	0.008	256 410. 3	PhTourist1-25	0.006	192 307.7
PhTourist1-11	0.003	96 153. 85	PhTourist1-26	0.006	192 307.7
PhTourist1-12	0.006	192 307. 7	PhTourist1-27	0.006	192 307.7
PhTourist1-13	0.003	96 153. 85	PhTourist1-28	0.003	96 153. 85
PhTourist1-14	0.006	192 307. 7	PhTourist1-29	0.003	96 153. 85
PhTourist1-15	0	0	PhTourist1-30	0.006	192 307.7

表 3 30 个 PhTourist1 在毛竹基因组中的分布 Tab. 3 Distribution of thirty PhTourist1 in the Phyllostachys edulis genome

	, , ,	,
PhTourist1-ID	基因编号	转座子位置
FILLOURISH AD	No. of gene	Location of transposon
PhTourist1-I	PH01000072G1310	5′-270
PhTourist1-18	PH01000116G0910	3′-461
PhTourist1 -1 9	PH01000199G0530	5′-6897
PhTourist1-2	PH01000399G0080	5′-108
PhTourist1-3	PH01000402G0860	5′-1585
PhTourist1-20	PH01000581G0780	5´ -9 750
PhTourist1-4	PH01000624G0480	5′-10298
PhTourist1-5	PH01000651G0650	3′-124522
PhTourist1-21	PH01000702G0290	3′-46913
PhTourist1-6	PH01000718G0720	5′-11406
PhTourist1-22	PH01001014G0590	intron
PhTourist1-7	PH01001095G0560	intron
PhTourist1-23	PH01001137G0480	5′-48475
PhTourist1-8	PH01001156G0580	3′-3144
PhTourist1 -9	PH01001294G0310	5′-12229
PhTourist1-24	PH01001328G0500	5′-25271
PhTourist1-10	PH01001372G0040	5′-2051
PhTourist1-11	PH01001631G0390	3~12837
PhTourist1-12	PH01001754G0170	3′-35277
PhTourist1-13	PH01002468G0070	5′-53137
PhTourist1-25	PH01003283G0220	3′-2119
PhTourist1-26	PH01003283G0220	3~-2622
PhTourist1-14	PH01003574G0160	5′-2198
PhTourist1-15	not find	not find
PhTourist1-27	not find	not find
PhTourist1-28	not find	not find
PhTourist1-29	not find	not find
PhTourist1-16	not find	not find
PhTourist1-17	not find	not find
PhTourist1-30	PH01005567G0040	5′-17835

2.4 PhTourist1 对下游基因表达丰度的影响 PhTourist1 3 插入位点位于 PH01000402G0860 基因上游 1 585 bp 处,针对 PhTourist1 3 插入位点多态性,分析了 PhTourist1 3 存在与否对下游基因表达丰度的影响。 RTFQ PCR 的结果显示,PhTourist1 3 缺失之后下游基因表达量相对缺失前平均增加了 8.04 倍(图 5)。

3 结论与讨论

本研究利用 transpo 软件共寻找到 30 个 mPing-like MITEs,同源比对之后确定它们源自于共同祖先,统一命名为 PhTourist1,对其 TIR、TSD、插入位点序列偏好性、插入时间和分布进行了系统分析。

PhTourist1 的 TIR 与 mPing 的 TIR (GGCCAGTC ACAATG) 基本一致,为 GGCCAGTCACAATG, TIR 的 G/C 含量为 57.1%; 9 bp 的偏好序列为YTMTWAKAR;发生转座的PhTourist1→6位点上,转座子除自身完整切除,还缺失1 bp TSD。这些都表明PhTourist1具备了Tourist-like MITE 的典型特点。

验证 30 个 PhTourist1 在来源于同一母本的 24 株毛竹实生苗基因组中的插入位点,发现插入多态性很低,只有 PhTourist1-3 存在插入多态性,在 75% 实生苗中 PhTourist1-3 发生了转座,从而造成了该位点在 24 株实生苗基因组中的插入多态性。已有报道表明,mPing 在外源压力作用下会发生转座,如

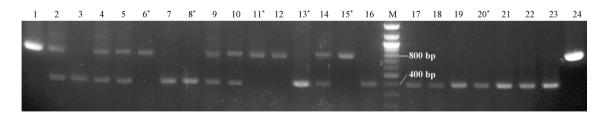


图 3 24 株毛竹半同胞实生苗中 PhTourist1-3 PCR 验证结果

Fig. 3 PCR result of PhTourist1-3 in genomes of 24 Phyllostachys edulis half-sib seedlings

PCR 产物长度少于 400 bp 的表示 PhTourist1-3 发生转座,长度在 800 bp 左右的表示 PhTourist1-3 留在该位置, "*"标识的 为做 RTFQ PCR 的植株。

The PCR products less than 400 bp reveal the transposition of *PhTourist1-3*. The PCR products about 800 bp reveal that *PhTourist1-3* still existed at this genomic location. The seedlings whose cDNA used in RTFQ PCR are marked by the asterisk.



图 4 PhTourist1-3 转座足迹

Fig. 4 Transposition footprint of PhTourist1-3

黑色框标出的为 PhTourist1-3 的位置。Black box marked the location of PhTourist1-3.

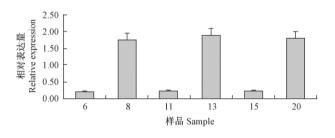


图 5 PhTourist1-3 下游基因 RTFQ PCR 结果

Fig. 5 Result of RTFQ PCR of the gene downstream PhTourist1-3

辐射、高静水压、细胞培养和近期驯化(Jiang et al., 2003; Nakazaki et al., 2003; Naito et al., 2006; Lin et al., 2006);而本试验中的24株实生苗是于相同的 适宜条件下培养的,其生长过程中受到的外源压力 具有一致性,因此 PhTourist1-3 的转座可能不是由 于外源压力作用引起的。有报道显示 mPing 的转 座发生在胚胎发育阶段,从球状体时期到子叶期转 座事件逐渐增多,但是到苗期转座事件变得很少 (Hancock et al., 2011);考虑到每株实生苗的胚胎发 育都是独立的, PhTourist1-3 可能在种子萌发过程中 发生了转座,从而导致 PhTourist1-3 的插入多态性。 本试验中24株实生苗源自同一母本,母本基因型一 致,但因为花药来源不能确定而无法确定其父本基 因型;有文章报道种间杂交会促使 mPing 发生转座 (Yasuda et al., 2012),分析 PhTourist1-3 的转座也可 能是由于父本来源不同引起。

RTFQ PCR 还表明 *PhTourist1→* 的缺失对其下游基因 PH01000402G0860 表达量有显著影响,

PH01000402G0860 的表达量在 PhTourist1-3 缺失后比缺失前增加了 8.04 倍。水稻中关于 mPing 的插入影响试验显示,mPing 插在基因附近或内部会造成该基因转录增多或者对该基因没有影响(Naito et al., 2009),但 mPing 在基因上游启动子区域的插入会影响顺式作用元件和反式作用元件间的相互作用(Yasuda et al., 2013)。本试验中 PhTourist1-3 的转座使下游基因表达量增加,可能原因是 PhTourist1-3 的存在使其附近的作用元件作用方式发生了变化从而抑制了 PH01000402G0860 的表达,PhTourist1-3 转座离开后,这种抑制效果消失了,从而PH01000402G0860 的表达量明显增加。 PhTourist1-3转座对下游基因表达的调控机制有待进一步研究。

本研究鉴定到一类与 mPing 高度同源的转座子 PhTourist1,其在毛竹基因组中可以独立发生转座,并对宿主基因表达产生了显著的影响。这些结果表明,作为毛竹基因组重要组成部分的转座子可以通过自身转座参与宿主基因组多态性的形成,调节宿主基因表达,进而参与毛竹生长发育的调控。

参 考 文 献

江泽慧. 2002. 世界竹藤. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 3-4.

(Jiang Z H. 2002. Bamboo and rattan in the world. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House, 3-4. [in Chinese])

钟 浩,周明兵,白友煌,等. 2010. 毛竹 Stowaway-like MITEs 转座 子的分离与分析. 林业科学,46(4):37-42.

(Zhong H, Zhou M B, Bai Y H, et al. 2010. Isolation and analysis of Stowaway-like MITEs from DNA libraries enriched in Phyllostachys

- edulis. Scientia Silvae Sinicae, 46 (4):37-42. [in Chinese])
- Feschotte C, Mouches C. 2000. Evidence that a family of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) from the *Arabidopsis thaliana* genome has arisen from a *pogo*-like DNA transposon. Mol Biol Evol, 17(5):730-737.
- Feschotte C, Jiang N, Wessler S R. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. Nat Rev Genet, $3\,(5):329-341$.
- Han M J, Shen Y H, Gao Y H, et al. 2010. Burst expansion, distribution and diversification of MITEs in the silkworm genome. BMC Genomics, 11:520.
- Hancock C N, Zhang F, Wessler S R. 2010. Transposition of the Tourist-MITE mPing in yeast: An assay that retains key features of catalysis by the Class 2 PIF/Harbinger super-family. Mobile DNA, 1(1): 5.
- Hancock C N, Zhang F, Floyd K, et al. 2011. The rice (Oryza sativa)
 MITE mPing is an effective insertional mutagen in soybean (Glycine max). Plant Physiology Preview, 10 (1104):111.
- Jiang N, Bao Z R, Zhang X Y, et al. 2003. An active DNA transposon family in rice. Nature, 421 (6919): 163-167.
- Kidwell M G, Lisch D. 1997. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94 (15): 7704-7711.
- Kikuchi K, Terauchi K, Wada M, et al. 2003. The plant MITE mPing is mobilized in anther culture. Nature, 421 (6919):167-170.
- Lin X, Long L, Shan X, et al. 2006. In plant a mobilization of mPing and its putative autonomous element Pong in rice by hydrostatic pressurization. Journal of Experimental Botany, 57 (10): 2313-2323.
- McClintock B. 1951. Chromosome organization and gene expression. Cold Spring Harbor Symp, 16:13.
- Naito K, Cho E, Yang G J, et al. 2006. Dramatic amplification of a rice

- transposable element during recent domestication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (47):17620-17625.
- Naito K, Zhang F, Tsukiyama T, et al. 2009. Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. Nature, 461 (7267):1130-1134.
- Nakazaki T, Okumoto Y, Horibata A, et al. 2003. Mobilization of a transposon in the rice genome. Nature, 421 (6919): 170-172.
- Peng Z H, Lu Y, Li L B, et al. 2013. The draft genome of the fastgrowing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). Nature Genetics, 45 (4):456-461.
- Santiago N, Herraiz C, Goñi J R, et al. 2002. Genome-wide analysis of the emigrant family of MITEs of Arabidopsis thaliana. Journal of Molecular Biology and Evolution, 19 (12):2285 - 2293.
- Shirasawa K, Hirakawa H, Tabata S, et al. 2012. Characterization of active miniature inverted-repeat transposable elements in the peanut genome. Theor Appl Genet, 124 (8):1429-1438.
- Yang G J, Zhang F, Hancock C N, et al. 2007. Transposition of the rice miniature inverted repeat transposable element mPing in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104 (26):10962-10967.
- Yasuda K, Tsukiyama T, Karki S, et al. 2012. Mobilization of the active transposon mPing in interspecific hybrid rice between Oryza sativa and O. glaberrima. Euphytica, 192(1):17-24.
- Yasuda K, Ito M, Sugita T, et al. 2013. Utilization of transposable element mPing as a novel genetic tool for modification of the stress response in rice. Mol Breeding, 32(3):505-516.

(责任编辑 徐 红)