

# 水稻 II B 型拓扑异构酶 *OsSpo11* 基因的 cDNA 克隆、 表达谱分析及其可变剪接的检测\*

康海岐<sup>1,2</sup>, 申国安<sup>1</sup>, 程在全<sup>1</sup>, 陈放<sup>1</sup>

(1. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064; 2. 四川省农科院作物所, 四川 成都 610066)

**摘要:** *Spo11* 基因是减数分裂双链断裂 (DSBs) 与分裂重组的初始化基因, 在基因组进化方面具有重要作用。通过改进的 Nest-PCR 方法, 从水稻愈伤组织中克隆到了水稻 DNA 拓扑异构酶 *OsSpo11* 基因的 cDNA 片段。克隆测序与表达研究表明, *OsSpo11* 基因是水稻 II B 型拓扑异构酶 A 亚基因, 在水稻不同组织中具有低丰度表达、组织特异性、可诱导性以及前体 RNA 剪接的可变性等特点。可变剪接异构体的发现, 使 *OsSpo11* 基因在 DNA 代谢、发育、遗传重组等过程中的生物学功能表现出一定的复杂性, 其功能和生物学意义有待进一步研究。

**关键词:** 水稻; DNA 拓扑异构酶; *OsSpo11*; 可变剪接

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 01-0088-05

DNA 拓扑学结构改变是由 DNA 拓扑异构酶来实现的。该酶有 I 型和 II 型拓扑异构酶两大类。I 型包括 IA 和 IB 型, 均为单体蛋白。II 型包括 II A 型和 II B 型, 为二聚体或四聚体蛋白, 能够在 DNA 双链上同时进行切割和两步改变超螺旋质粒 DNA 的连接数<sup>[1]</sup>。

Wang 等<sup>[2]</sup>首次报道了大肠杆菌拓扑异构酶, 之后人们又鉴别或分离出了一些物种的拓扑异构酶, 包括鼠、酵母、果蝇、人类、古细菌 *Sulfolobus shibatae*、拟南芥、菠菜、向日葵、豌豆、烟草、小麦、水稻、玉米以及 *Daucus carota*<sup>[3-5]</sup> 等。虽然细菌、酵母、动物等拓扑异构酶的结构、作用机制及生物学功能已有了深入研究, 但对除拟南芥、胡萝卜、豌豆和烟草以外植物的拓扑异构酶研究较少。

文献 [5] 报道了水稻拓扑异构酶 I 在发芽种子中的表达, 但水稻拓扑异构酶 II 及其在减数分裂重组中的机制与功能研究甚少。本文关于水稻拓扑异构酶基因克隆、表达及其 RNA 剪接的研究, 将有助于深入研究该基因在发育和进化等方面的功能和生物学意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料、RNA 提取与 cDNA 合成

采集栽培粳稻品种中花 11 号 (ZH11) 的 3 周

龄幼苗叶片和根, 抽穗期的茎、叶鞘、穗, 干旱胁迫的叶和穗, 以及胚性愈伤组织和分化愈伤组织等用于提取总 RNA。

总 RNA 提取与纯化、第一链 cDNA 合成、DNA 回收等试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司 (Watson); 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自英国 NEB 公司 (New England Biolabs Ltd.); Taq DNA 聚合酶、Kanamycin 和 Ampicillin 抗生素、DNA Markers (DL2000 和 Hind III) 等购自上海生工生物工程有限公司, PCR 引物由该公司合成; 其余试剂均为国产或进口分析纯。

以普通琼脂糖凝胶电泳粗测所提取 RNA 的纯度, 并以 DU640 (Beckman) 型分光光度计检测 280、260 nm 下的吸光度, 计算  $A_{260}/A_{280}$  值。参照 ProtoScriptTM 第一链 cDNA 合成试剂盒 (New England Biolabs Ltd.) 说明书反转录形成 cDNA。

### 1.2 引物设计

基于拟南芥 DNA 拓扑异构酶 *AtSpo11* 序列和 GenBank 中与 *AtSpo11* 具有很高同源性的水稻 ESTs, 如: CA762234, CR287921, CR287940, CB668936, CA759882, CR285910, CB663969 等, 通过序列组装, 预测 *OsSpo11* 基因的全长序列, 然后依此设计并合成如下引物, 其中 Actinf 和 Actinr 为细胞骨架 *OsActin* 基因 (内参照) 引物:

\* 收稿日期: 2007-06-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30660090); 四川省应用基础研究资助项目 (03JY029-097-2); 四川省财政育种专项 (2006YZGC04-009)

作者简介: 康海岐 (1974 年生), 男, 博士, 助理研究员; 通讯联系人: 陈放; E-mail: cfang@263.net

- fa: 5'-GCTCCACCGCTACCAGAACTAC-3';
- fb: 5'-AGTTAGAAGCCATGTTGCAAA-3';
- f1: 5'-CCATTTGTC AATACTGGGCTA3-3';
- f2: 5'-TTAGATTGCGAATAGGCCCTT3-3';
- f3: 5'-GACCGCCGAGGCTCACT3-3';
- f4: 5'-CAGGATCAGAGGGTTGGTGGC3-3';
- f5: 5'-AGGCTCACTCGCAGCGGTCG-3';
- f6: 5'-ATGGCGGGGAGGGAGAAGAG-3';
- r3: 5'-CAGGTACAACCAATCTTATA3-3';
- r4: 5'-TTTAGGAAAATTTTCACTTGT3-3';
- r5: 5'-CAAGAACTGAAAACCACAAA-3';
- r6: 5'-AAAATACTTGCTGGGGGTTA3-3';
- Actinf: 5'-AGGTATTGTGTTGACTCTG-3';
- Actinr: 5'-AATCCAGACACTGTACTTCC-3'.

1.3 表达谱分析

采用 nest-PCR 方法, 对其进行适当变通后用于 *OsSpo11* 基因组织特异性表达谱的扩增。第一轮扩增反应程序为: 94 °C, 5 min; 5 轮 (94 °C, 30 s; 49 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 28 轮 (94 °C, 30 s; 47 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 72 °C, 10 min。取每反应 10 μL PCR 产物用于 *w* = 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 另取 1 μL 作为第二轮扩增模板, 更换引物, 其他成分和反应条件与第一轮相同。第二轮扩增反应程序为: 94 °C, 5 min; 5 轮 (94 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 28 轮 (94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 72 °C, 10 min。之后每反应取 5 μL 在一块胶上进行 *w* = 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。采用类似方法扩增 *OsSpo11* 基因全长 cDNA。

1.4 克隆测序及序列分析

将 *OsSpo11* 基因引物扩增条带切胶回收, 克隆到 pGEM-T 载体并转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 选取重组克隆, 经菌落 PCR 检测后送出测序。利用 DNAssist (Version 2.0) 软件分析测序结果。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取

收集 ZH11 的愈伤、分化愈伤、根、茎、叶、叶鞘、穗子、干旱胁迫的叶和穗等组织, 分别提取总 RNA, 普通琼脂糖凝胶电泳检测提取质量, 挑选带型锐利且无降解的 RNA 样品, 以紫外分光光度计检测, 所有组织间的  $A_{260}/A_{280}$  平均值为 2.037, 处于 1.85 ~ 2.15 之间。不同组织 RNA 平均含量达到 3.966 μg/μL, 茎秆中至少, 平均为 0.453 μg/μL, 穗子中最多, 平均达 8.834 μg/μL。可见所选 RNA 样品中蛋白等杂质少, 核酸浓度高, 质量较

纯, 可用于基因克隆。

2.2 PCR 扩增方法的摸索

实验初期, 曾以 fa&b、f1 ~ f6、r1 ~ r5 等多种引物组合, 从 ZH11 不同组织的 cDNA 模板中尝试扩增, 均告失败。因此进行了引物筛选和扩增条件的优化。按表 1 进行 PCR 实验, 结果如图 1。可以看出引物 fa & fb 的特异性最好, 退火温度初步确定为 52 ~ 2 °C。但该引物和扩增条件的重复试验效果差, 且扩增的图 1 中第 7 泳道条带始终很弱。因此尝试 nest-PCR 扩增, 设计如表 2。

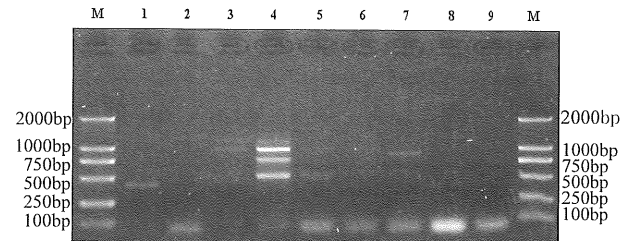


图 1 不同引物组合与退火温度下愈伤组织 *OsSpo11* 基因的扩增结果

Fig. 1 The amplified results of different combinations of primers and annealing temperatures

2 对引物与 2 个温度梯度下的 4 种扩增情况如图 2, 结果为: ①引物组合 [(f6 & r4) + (f6 & r5)], 退火温度 [(45 + 45) / (45 + 49)], 总是优先扩出小于 1K 片断, 大小不对; ②引物组合 [(f6 & r5) + (f6 & r5)], 难于扩增; ③引物组

表 1 扩增 *OsSpo11* 基因的引物对筛选和条件试验

Tab. 1 Primer screening for the amplification of *OsSpo11* and PCR conditions

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
f5	1	1	1						
f6				1	1	1			
fa							1	1	1
fb			1	1			1		
r4	1				1			1	
r5		1				1			1
温度 (°C)	45-2 <sup>①</sup>	49-2	52-2	52-2	45-2	49-2	52-2	45-2	49-2

(①: 2 为降落 PCR 反应程序中第二次退火温度的降低值)

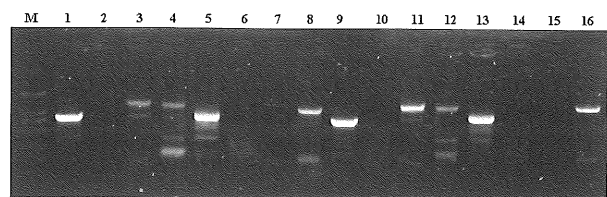


图 2 两轮扩增结果

Fig. 2 The second result of amplification

合 [(f5 & r4) + (f6 & r5)]、退火温度 (45 + 49) 下产率和特异性均好, (45 + 49) 下也较好。因此, 方案④为较好的 nest-PCR 试验方案。

表 2 两轮 PCR 反应设计

Tab. 2 Design for the nest-PCR

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Step1	f6	1	1			1	1			1	1		1	1		
	f5			1	1			1	1			1	1		1	1
	r4	1		1		1		1			1		1		1	
	r5		1		1		1		1		1		1		1	1
	(°C)	45-2				49-2				45-2				49-2		
Step2	f6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	r5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	(°C)	45-2								49-2						

### 2.3 *OsSpo11* 基因 cDNA 片段的初步克隆

以 fa & fb 为引物, 采用 nest-PCR 方法, 从 ZH11 胚性愈伤组织中对 *OsSpo11* 基因进行预扩增, 结果如图 3a。回收扩增片段并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 用相同引物、以菌落 PCR 对转化子进行筛选, 发现转化子中插入的 *OsSpo11* 基因片段 Fab 大小有所差异, 如 8 号克隆 (图 3b)。

### 2.4 初步测序结果与可变剪接的发现

将图 3b 泳道 1~12 扩增片段回收并克隆测序, 发现共有 3 种类型, 分别编号为 Clone 1, 2, 3。Clone 1 长 890 bp; Clone 2 长 904 bp, 比 Clone 1 多了 14 bp; Clone 3 长 809 bp, 比 Clone 1 缺失两个片段, 共 81 bp (图 4)。将测序结果与基因组序列 (AC13525) 及拼接序列相比较, 发现 Clone 2 多出的 14 bp 为内含子序列, Clone 3 缺失的 81 bp 为外显子序列, 证明这些克隆都是该基因的 cDNA 序列, 含有部分片段插入或缺失的 cDNA 序列为 *OsSpo11* 基因的可变剪接转录本。

### 2.5 *OsSpo11* 基因全长 cDNA 的克隆分析

根据所摸索的 nest-PCR 方法, 从 ZH11 的愈伤组织中扩增到了 *OsSpo11* 基因的 cDNA 全长片段。克隆并测序, 其 cDNA 序列和相应氨基酸序列如图 5。经 Pfam 搜索, 表明 *OsSpo11* 属于 II B 型的 DNA 拓扑异构酶。其 N 端含有 TP6A\_N 功能域, 是 II B 型 DNA 拓扑异构酶的特征性功能域, 由于其序列与 *E. coli* 降解物激活蛋白 (CAP) 相似, 也认为涉及 DNA 的结合过程。C 端含有 TOPRIM\_Topoprimase 功能域, 为 II B 型 DNA 拓扑异构酶和 Spo11 家族基因中存在的拓扑异构酶引发酶 (topoisomerase-primase, TOPRIM) 核苷酸转移酶/水解酶结构域, 这类蛋白与古细菌 (*Sulfolobus shibatae*)

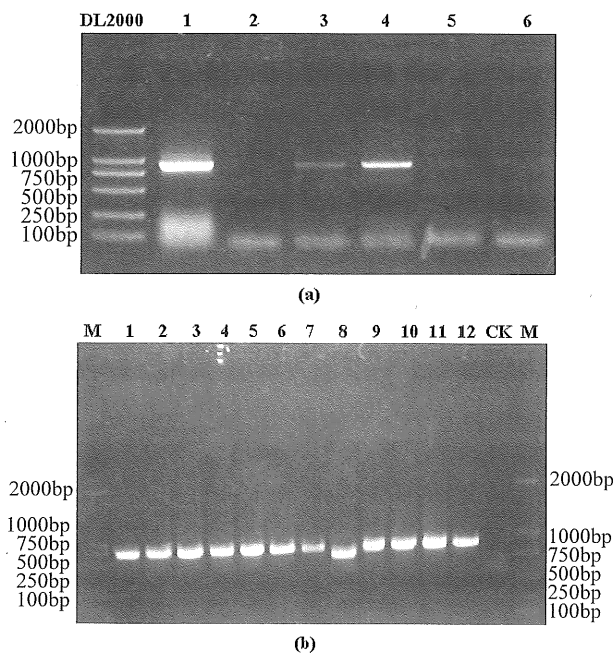
图 3 *OsSpo11* 基因在水稻愈伤组织中的初步扩增与克隆

Fig. 3 Primary amplification of *OsSpo11* in ZH11 callus. Amplification primers were fa & fb; (a) lanes 1~2 templates were: callus cDNA, undifferentiated callus cDNA, 3~6 templates were diluted 50, 10, 100, 1000 times ZH11 callus cDNA; (b) lanes 1~12 were single clones randomly selected from DH5 $\alpha$  transformants, containing fa & fb amplified *OsSpo11* fragments.

拓异构酶 VI (Topo VI)<sup>[6]</sup> 和酵母减数分裂重组因子 *Spo11* 的序列相似, TOPRIM 结构域含有两个保守基序, Bergerat A 等<sup>[6]</sup> 报道的古细菌拓异构酶 5 个特征基序也同样存在于 *OsSpo11* 的 cDNA 序列中。从同源模建法三维结构分析来看, *OsSpo11* 也

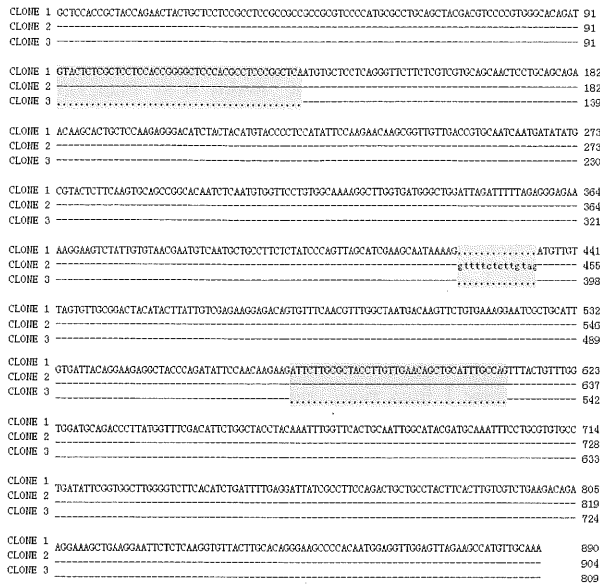


图 4 从水稻愈伤组织中检测到的 3 种 *OsSpo11* 基因转录本片段

Fig. 4 Three transcripts of *OsSpo11* detected from callus (灰色部分短线表示相同碱基, 圆点表示缺失碱基)

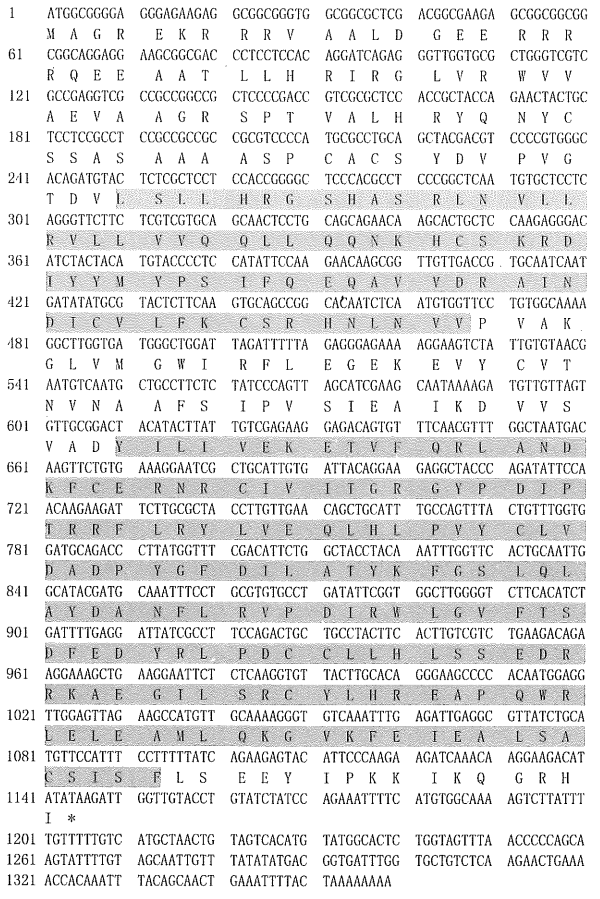


图 5 *OsSpo11* 基因的 cDNA 全长和相应氨基酸序列及其保守结构域

Fig. 5 The cDNA and putative amino acid sequence of *OsSpo11* and the conserved domains

(灰色标出部分 L<sub>84</sub> ~ V<sub>156</sub> 为 TP6A<sub>-</sub> N 功能域, Y<sub>203</sub> ~ F<sub>365</sub> 为 TOPRIM<sub>-</sub> Topo II B<sub>-</sub> SPO 功能域)

具有与 II B 型拓扑异构酶 A 亚基十分相似的结构和功能基因。

2.6 *OsSpo11* 基因的组织特异性表达谱分析

在严格控制实验环节前提下, 以 *OsActin* 基因为内参照, 对 *OsSpo11* 基因在 ZH11 的 9 种组织中的表达情况进行了 nest-PCR 扩增, 扩增结果如图 6。由第一轮扩增结果可见, *OsActin* 基因在这 9 种组织中的扩增带型均匀一致, 但 *OsSpo11* 基因在这 9 种组织中没有扩增到任何条带。第二轮扩增后, *OsActin* 基因的扩增带型在 9 种组织间仍然清晰一致, 而 *OsSpo11* 基因在愈伤组织、干旱胁迫的叶片、穗子和干旱胁迫的穗子中扩增到了条带, 从其它组织中没有扩增到条带, 说明 *OsSpo11* 是一个低丰度表达基因。*OsSpo11* 在 ZH11 的 7 种天然组织中, 非干旱胁迫下仅在穗子中表达, 受到干旱胁迫后穗子中的表达量增强, 同时叶片也有一定表达量。在同样干旱条件下, 穗子中的表达量明显高于叶片。因此, *OsSpo11* 的表达具有组织特异性, 并且其上调表达受干旱环境诱导。

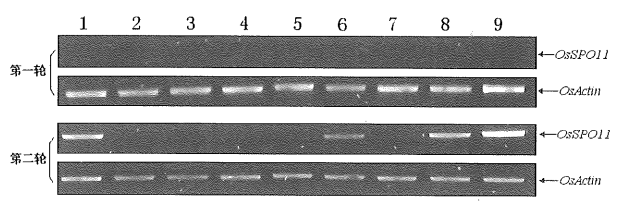


图 6 *OsSpo11* 基因在不同水稻组织中的 nest-PCR 扩增结果

Fig. 6 Nest-PCR amplification for tissue-specific expression pattern of *OsSpo11*

1~9 分别为愈伤组织、分化愈伤、根、茎、叶、干旱胁迫的叶、干旱胁迫的叶鞘、穗子、干旱胁迫的穗子

3 讨论

从结果分析可见, *OsSpo11* 就是水稻 II B 型 DNA 拓扑异构酶 A 亚基基因, 在水稻不同组织中具有低丰度表达、组织特异性以及可诱导性特点。它很可能是水稻减数分裂 DSBs 和减数分裂重组的初始化基因, 在水稻基因组进化方面具有重要的作用。特异性表达部位为愈伤组织和穗子。穗子是水稻的减数分裂器官, 由减数分裂重组产生的后代具有极强的适应性和进化潜力。另外, 体细胞变异来源于愈伤组织的再生过程中极为普遍, 染色体重排是这种变异的重要原因之一<sup>[7]</sup>。典型的遗传变异表现在染色体数目、结构和 DNA 序列的变化。本文在胚性愈伤组织中检测到了 *OsSpo11* 的表达而在

分化愈伤组织中未检测到,说明组织培养中常见的无性变异可能与该基因的活性表达有关。

减数分裂重组机制在进化上是保守的,虽有文献报道基因剪接具有多种方式<sup>[8]</sup>,而 *Spo11* 是减数分裂特异和核心减数分裂复合物的关键成分之一<sup>[9]</sup>,其功能在基因组进化中应当是非常保守的。但本实验通过克隆测序,发现愈伤组织中存在 2 种类型的可变剪接,表明该基因在转录时,有些 5' 或 3' 剪接位点是可变的。其变化使得组成型 mRNA 出现外显子删除和内含子保留现象,必然对 *OsSpo11* 的 CDS、功能域、氨基酸序列及蛋白结构等产生一定影响。*OsSpo11* 基因在水稻发育和进化等过程中具有重要的生物学作用,其可变剪接异构体的发现,使其在 DNA 代谢、发育、遗传重组等过程中的生物学角色表现出一定的复杂性。不同剪接变体的功能和生物学意义还不清楚,其功能有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] SINGH B N, MUDGIL Y, SOPORY S K, et al. Molecular characterization of a nuclear topoisomerase II from *Nicotiana tabacum* that functionally complements a temperature sensitive topoisomerase II yeast mutant [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 1063 - 1076.
- [2] WANG J C. Interaction between DNA and an Escherichiacoli protein omega [J]. *J Mol Biol*, 1971, 55: 523 - 533.
- [3] SINGH B N, SOPORY S K, Reddy M K. Plant DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Cellular Roles in Plant Development. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2004, 23(3): 251 - 269.
- [4] JAMES J. Champoux. DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function, and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem*, 2001, 70: 369 - 413.
- [5] YOSHIDA T, NAKATA T, ICHISHIMA E. DNA topoisomerase I from rice: enzyme synthesis in germination and partial purification from cultured cells [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30: 3885 - 3887.
- [6] BERGERAT A, MASSY B, GADELLE D, et al. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination [J]. *Nature*, 1997, 386: 414 - 417.
- [7] LARKIN P J, SCOWCROFT W R. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell culture for plant improvement [J]. *Theor Appl Genet*, 1981, 60: 179 - 214.
- [8] GRAVELEY B R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world [J]. *Trends Genet*, 2001, 17: 100 - 107.
- [9] VILLENEUVE A M, HILLERS K J. Whence meiosis? [J]. *Cell*, 2001, 106: 647 - 650.

## Molecular Cloning and Expression Profiling Analysis of *OsSpo11*, and Identification of Alternative Splicing Transcripts in Rice (*Oryza sativa* L.)

KANG Hai-qi<sup>1,2</sup>, SHEN Guo-an<sup>1</sup>, CHENG Zai-quan<sup>1</sup>, CHEN Fang<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agriculture Sciences, Chengdu 610066, China)

**Abstract:** *OsSpo11* is the initiation gene of meiotic DSBs and meiotic recombination. It had important function in genomic evolution. In this study, it was cloned from rice callus using the improved nest-PCR. *OsSpo11* was determined as the subunit A of type II B topoisomerase in rice according to the results of sequencing and expression. It has the characters of low-abundance expressing, tissue specificity, inductivity and alternative splicing of pre-mRNA in different tissues. The identification of alternative splicing transcriptions of *OsSpo11* highlighted the importance of rice topoisomerase in diverse cellular processes.

**Key words:** *Oryza sativa*; DNA topoisomerase; *OsSpo11*; alternative splicing