

油桃组蛋白基因*PpH3.3*的克隆和表达分析

冷传远, 李玲, 谭钺, 陈修德, 高东升*

山东农业大学园艺科学与工程学院, 国家苹果工程技术研究中心, 山东泰安271000

摘要: 组蛋白H3与H2A、H2B、H4共同形成真核生物染色质核小体的八聚体核心。本文通过RACE的方法从休眠期的油桃花芽中克隆到一个编码组蛋白H3变体的基因, 命名为*PpH3.3*。序列分析结果表明, 该基因全长821 bp, 存在一个完整的开放阅读框411 bp, 编码136个氨基酸。预测的氨基酸序列具有H3家族典型的保守结构域, 与拟南芥、葡萄的组蛋白H3, 具有较高的相似性。利用荧光定量PCR技术分析该基因在花芽休眠进程中的表达特异性, 发现*PpH3.3*在休眠期表达水平显著高于休眠诱导期和休眠解除期, 并且单氰胺和高温处理能够诱导类似的表达模式。

关键词: 桃树; 组蛋白; RACE; 荧光定量PCR; 休眠

Clone and Expression Analysis of a cDNA Encoding Histone H3.3 in *Prunus persica* var. *nectarina* Maxim

LENG Chuan-Yuan, LI Ling, TAN Yue, CHEN Xiu-De, GAO Dong-Sheng*

National Research Center for Apple Engineering and Technology, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271000, China

Abstract: Histone H3 is one of the four histones, along with H2A, H2B and H4, which forms the eukaryotic nucleosome octamer core. In this study, a novel histone H3 variant gene was isolated from dormant *Prunus persica* var. *nectarina* floral buds with rapid amplification of cDNA ends (RACE), designated as *PpH3.3*. The *PpH3.3* cDNA is 821 bp long and contains an open reading frame (ORF) of 411 bp encoding 136 amino acids. Sequence alignments indicate that *PpH3.3* contains conserved regions found in histone H3 and shows a high level of sequence similarity to many other plants. The expression profile of the *PpH3.3* gene detected by QRT-PCR showed that the transcripts of *PpH3.3* was high in dormancy period of buds and both high temperature and hydrogen cyanamide lead similar expression pattern.

Key words: *Prunus persica* var. *nectarina*; histone; RACE; real-time quantitative PCR; dormancy

真核生物细胞核内的染色质是一切遗传学过程的物质基础, 染色质的基本单位是核小体。组蛋白H3与H2A、H2B、H4共同形成核小体的八聚体核心。大部分的组蛋白H3是属于复制依赖型蛋白, 它们的表达一般与细胞周期的S期相关联, 在这个时期组蛋白与新合成的DNA组装成染色质。对于不同状态的染色质, 核小体中会组装入相应的组蛋白H3变体, 且各种组蛋白的尾部也能发生多种修饰(Sarma和Reinberg 2005)。组蛋白变体嵌入核小体形成了结构和功能各异的核小体, 在生物体表现遗传过程中起非常重要的作用。目前已发现的组蛋白H3的变体有着丝粒特异的CenH3和转录激活的核小体中的H3.3 (Henikoff等2004), 还有精巢特异的H3t (Govin等2005)。H3.3变体是由组蛋白基因簇之外的基因编码的, 它的表达不限于S期, 因此, H3.3变体的替换不依赖复制进行(Jin

等2005)。H3.3主要通过一些分子伴侣如HIRA、DAXX、ATRAX以及DEK等作用, 从而代替H3.1与转录活化的染色质结合, 影响染色质的活性, 在生殖细胞的发育、表观遗传记忆和染色质重塑等方面发挥重要的作用(Tagami等2004)。然而, 有的研究也发现一些基因能够在没有H3.3的情况下正常表达, 而且H3.3也能够着丝粒和端粒等染色质的非活性区域富集, H3.3在端粒处的富集能够抑制端粒RNA的转录(Szenker等2011; Sakai等2009)。

休眠是指含有分生组织的植物结构可见生长的暂时停止。在杨树导管形成层从生长转入休眠

收稿 2013-02-25 修订 2013-05-20

资助 “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD12B02)和山东省水果创新团队专项资金。

* 通讯作者(E-mail: dsgao@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8249659)。

的过程中,分生组织转录组的差异说明可能存在一个全局性的调控机制影响着这个过程(Schrader等2004)。休眠诱导和解除中不仅仅是基因表达发生变化,也同时伴随着表观遗传变化。在土豆块茎打破休眠过程中伴随着DNA甲基化和组蛋白的多重乙酰化的变化(Law和Suttle 2003, 2004)。随着休眠的诱导而增加的DNA甲基化程度说明染色体重塑可能在调控芽休眠中有重要作用。Santamaria等(2009)的研究也发现,板栗的基因组DNA的甲基化和组蛋白H4的乙酰化与芽休眠的形成与解除关系密切。

前人的研究多侧重于组蛋白的修饰,对组蛋白的变体在休眠中的作用未做研究。本文利用实验室构建的休眠期和休眠解除期的抑制差减文库筛选的基因片段,通过RACE的方法分离了编码组蛋白H3变体的基因*PpH3.3*,对其表达特性和功能进行了初步分析,对于休眠机理的研究具有一定意义。

材料与方 法

1 试验材料与处理

从2010年9月到2011年2月每隔20 d采集十年生‘曙光’油桃(*Prunus persica* var. *nectarina* Maxim cv. Shuguang)花芽,迅速置于液氮中速冻,于-70 °C冰箱中保存备用。所用‘曙光’油桃栽种于山东农业大学群星园艺场(35°38'~36°28'N, 116°20'~117°59'E,海拔153 m),正常管理,生长状况良好。

按照相同的取样时间,采集树冠外围(自始至终是在同一方位和同一高度上的枝条)带有花芽和叶芽的20根一年生枝条,采用清水插枝法测定休眠状态。具体操作步骤参照Jian等(1997)的方法。

测定第1颗芽萌发所需的时间(d),表示休眠状态。当10 d≤第1颗芽萌发所需时间≤6周时,表明芽体已进入自然休眠诱导状态。若连续6周末萌发,则表明已进入休眠期。随着休眠的进行,需冷量不断满足,萌芽所需时间变短,但再次出现10 d≤第1颗芽萌发所需时间≤6周时,表明芽体进入休眠解除期。

取休眠期的油桃枝条用单氰胺和高温处理进行破眠。单氰胺处理为喷施0.5%单氰胺后转移至人工气候室,对照为喷蒸馏水。高温处理为置于

50 °C高温环境中1 h后转移至人工气候室,对照为置于室温1 h。人工气候室条件为温度25 °C,光照强度40 μmol·m⁻²·s⁻¹,昼/夜12 h/12 h,相对空气湿度80%。于1、2、4和8 d分别观察和取样。将花芽置于液氮中冷冻,提取RNA。每处理3个重复。

2 试验方法

2.1 DNA与RNA提取及cDNA链的合成

取油桃花芽,用CTAB法提取总DNA,用改良的CTAB法提取RNA(Porebski等1997),电泳检测证明提取的总RNA质量良好。根据RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)说明书,反转录合成cDNA链。

2.2 目的基因的分离

根据已获得的*PpH3.3*基因中间片段序列设计特异引物3P1,与B26引物进行PCR,然后以该PCR产物为模板,以引物3P2和B25进行嵌套PCR(表1),扩增得到3'端片段。参照TaKaRa公司的5'-Full RACE Kit试剂盒,设计5'端引物5P1和5P2,以油桃的cDNA为模板,进行RACE扩增。将经测序验证后的5' RACE和3' RACE片段与中间片段进行拼接,得到全长cDNA序列。根据拼接序列,设计全长扩增引物,验证拼接结果。根据已获得的目的基因的cDNA序列,设计引物G1和G2,经扩增得到基因组序列。

2.3 油桃*PpH3.3*序列的生物信息学分析

根据NCBI的ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)寻找开放阅读框。通过ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析*PpH3.3*的理化性质。将基因*PpH3.3*编码的氨基酸序列在NCBI数据库中的BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源性搜索和比对,利用DNAMAN 6.0和MEGA 5.05软件分析*PpH3.3*蛋白与其他植物的H3.3蛋白的进化关系,构建分子进化树。

2.4 *PpH3.3*基因的实时荧光定量PCR分析

提取油桃不同自然休眠阶段(休眠诱导期、休眠期和休眠解除期)和不同破眠处理的花芽总RNA,采用SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (TAKARA公司)合成cDNA第一条链。

*PpH3.3*定量PCR引物如表1,以Actin为内参。按照SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)说明书,在iCycler iQ5 system实时定量PCR仪上进行

表1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')	用途
3P1	TACCTTGTGGGTCTGTTGAG	<i>PpH3.3</i> cDNA 3'端克隆特异引物
3P2	ACCAACCTTTGTGCCATCC	
B26	GACTCTAGACGACATCGA(T)18	<i>PpH3.3</i> cDNA 3'端克隆通用引物
B25	GACTCTAGACGACATCGA	
5P1	TAATGGTAAACACGCTTGCC	<i>PpH3.3</i> cDNA 5'端克隆特异引物
5P2	ACAGACCCACAAGGTAAGCC	
<i>PpH3.3</i> -F	GTAAAGAAAAGACAGAGCGCGAAG	<i>PpH3.3</i> cDNA全长克隆引物
<i>PpH3.3</i> -R	ACCATATTAGTGAGGCTGCAGAC	
G1	AGAGCGCGAAGAGCACAGAG	<i>PpH3.3</i> 基因组克隆引物
G2	AGCCACCACACAACCAACC	
F	GGTCTGTTTGAGGACACCAA	<i>PpH3.3</i> 荧光定量PCR引物
R	CCTTTCCCAATTAAGCATT	
<i>Actin</i> -F	GTTATTCTTCATCGGCGTCTTCG	内参 <i>Actin</i> 荧光定量PCR引物
<i>Actin</i> -R	CTTCACCATTCAGTTCATTGTC	

PCR反应。反应体系为: 10 μL SYBR[®] Green PCR Master Mix, 2 μL cDNA, 正、反向引物各0.2 μL (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 补蒸馏水至总体积20 μL 。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共40个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。每个反应3个重复, 采用 Comparative CT ($-2^{\Delta\Delta\text{CT}}$)法分析试验结果。

结果与讨论

1 目的基因的扩增与克隆

基于文库筛到的中间序列片段, 设计2条引物, 进行3' RACE, 获得一条大约500 bp左右的特异谱带(图1-A), 回收克隆测序结果表明该片段长度为

512 bp, 其中包含21个碱基的polyA尾巴, 说明已经到达3'末端。

基于已获得的中间序列片段, 设计2条引物, 参照5'-Full RACE试剂盒进行5' RACE, 得到1条约500 bp的特异谱带(图1-B), 回收克隆测序结果表明该片段的长度为475 bp, 其5'端发现起始密码子。

将通过5' RACE和3' RACE得到的序列与中间片段进行拼接, 得到一条完整的cDNA序列, 长度为821 bp。在此基础上, 在5'端和3'端分别设计引物进行cDNA全长的特异扩增, 获得大于750 bp的特异谱带(图1-C), 将其命名为*PpH3.3*, GenBank登录号为KC907628。

根据得到的cDNA序列, 设计2条引物, 以基因

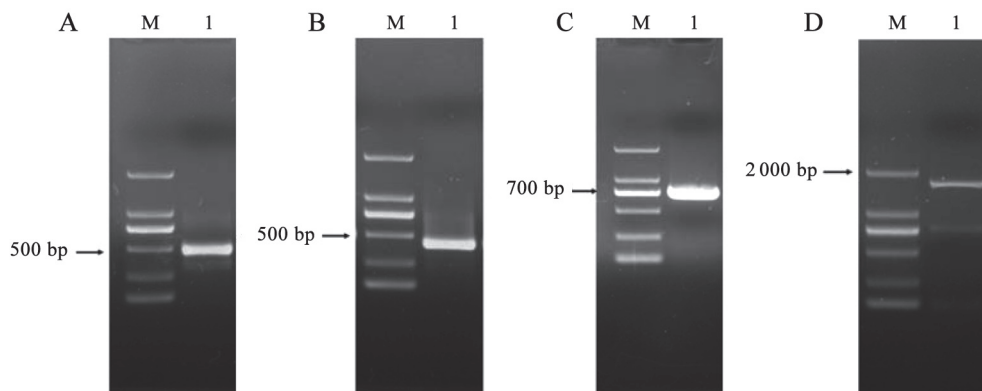


图1 DNA电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern of DNAs

A: 3' RACE扩增产物; B: 5' RACE扩增产物; C: *PpH3.3*基因组片段; D: 基因组片段。M: DL2000 marker; 1: 检测片段。

组DNA为模板扩增,回收特异条带(图1-D),克隆测序,得到基因组序列,GenBank登录号为KC-907629。

2 油桃*PpH3.3*基因cDNA序列的生物信息学分析

根据NCBI的ORF Finder发现,基因*PpH3.3*的全长cDNA为821 bp,包含56 bp的5'端非编码区、358 bp的3'非编码区和411 bp的开放阅读框,编码含有136个氨基酸的蛋白质,起始密码子为ATG,终止密码子为TAA。

通过ProtParam分析其理化性质,推测*PpH3.3*蛋白的分子式 $C_{679}H_{1144}N_{216}O_{186}S_3$,其相对分子量为15.41 kDa,等电点(pI)为11.15。该蛋白中相对含量较多的氨基酸是丙氨酸Ala (13.2%, 18个)、精氨酸Arg (12.5%, 17个)、赖氨酸Lys (10.3%, 14个)、亮氨酸Leu (9.6%, 13个)和苏氨酸Thr (8.1%, 11个)。总的带负电荷的残基(Asp+Glu)为11,总的带正电荷的残基(Arg+Lys)为31。

比较该基因的基因组和cDNA序列发现,该基因含有4个内含子,分别为595、95、97和99 bp,并且这四个内含子序列都具有植物内含子的典型结构特征:都富含AT;具有相同的保守剪切位点5'-GT和AG-3'位点(图2)。



图2 *PpH3.3*的基因组序列
Fig.2 Genomic sequence of *PpH3.3*

氨基酸序列的保守结构域分析结果(图3)显示,该基因具有组蛋白H3家族典型的保守结构域PTZ00018。同源性分析结果(图4)发现,*PpH3.3*编码的氨基酸序列与拟南芥*AtH3.3* (GenBank登录号AEE87157.1)和葡萄*VvH3.3* (GenBank登录号AAP-

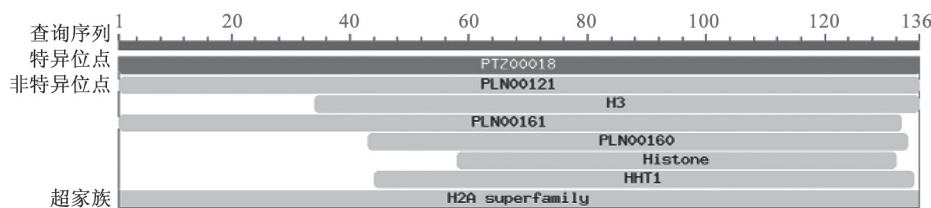


图3 *PpH3.3*氨基酸序列的保守结构域
Fig.3 Conserved domains of amino acid sequences of *PpH3.3*

30739.1)的氨基酸序列完全相同,与拟南芥*AtH3.1* (GenBank登录号AAO24594.1)、烟草*NtH3.1* (GenBank登录号BAF76800.1)和苜蓿*MsH3.1* (GenBank登录号AAB49545.1)的氨基酸序列在3、88、91位存在差异。利用DNAMAN 6.0和MEGA 5.0软件,将桃树*PpH3.3*氨基酸序列与其他物种已经报道的组蛋白H3序列进行比对并绘制系统发生树,结果(图5)表明*PpH3.3*与拟南芥、葡萄亲缘关系较近。这些结果证明*PpH3.3*是组蛋白H3.3家族的一员,且组蛋白H3.3在进化过程中非常保守(Thatcher和Gorovsky 1994; Loidl 2004)。

3 自然休眠进程中油桃*PpH3.3*的表达

自然条件下生长的桃树,随着日照长度的变短和温度的降低,植株新梢的生长速度逐渐降低并最终停止生长。由图6可知,9月16日采样测得新梢第1颗芽萌发所需时间为16 d,因此,芽体在9月16日已进入休眠的第1阶段——休眠诱导期。随着日照长度的变短和环境温度的进一步降低,休眠程度逐渐加深,至11月18日,测得新梢第1颗芽萌发所需时间为50 d,超过6周,说明芽体在11月18日已进入休眠期。至12月28日,新梢第1颗芽萌发所需时间为28 d,低于6周,说明芽体在12月28日已进入休眠解除期。

如图7所示,在休眠诱导期和休眠期解除期*PpH3.3*表达量相对较低,在休眠期表达量迅速升高,最高值出现在11月18日,然后在12月8日迅速降低,最高表达量是最低表达量的26倍。对此我们以下两种理解:第一,在休眠过程中细胞分裂多停滞于G1期(den Boer和Murray 2000; Gutierrez等2002),H3与DNA复制有关,在S期大量表达,而H3.3的表达则不受S期限制。我们认为H3.3的骤增可能是在S期时对H3嵌入染色体能力不足的整体补偿。第二,在休眠期基因表达受到抑制,为维

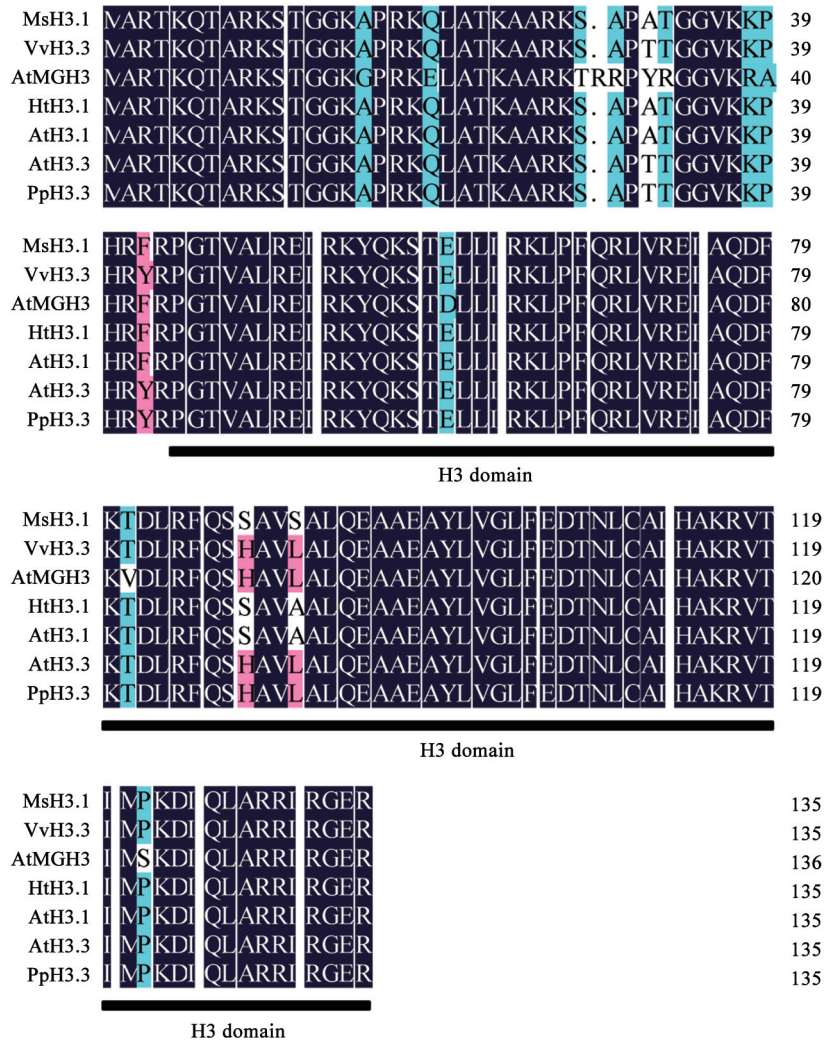


图4 不同植物来源的组蛋白H3氨基酸序列比对

Fig. 4 Comparison of the amino acid sequences of histone H3 in different plants

拟南芥 *AtH3.3* (GenBank 登录号 AEE87157.1), 拟南芥 *AtH3.1* (GenBank 登录号 AAO24594.1), 拟南芥 *AtMGH3* (GenBank 登录号 NP_173418.1), 葡萄 *VvH3.3* (GenBank 登录号 AAP30739.1), 烟草 *NtH3.1* (GenBank 登录号 BAF76800.1), 苜蓿 *MsH3.1* (GenBank 登录号 AAB49545.1)。

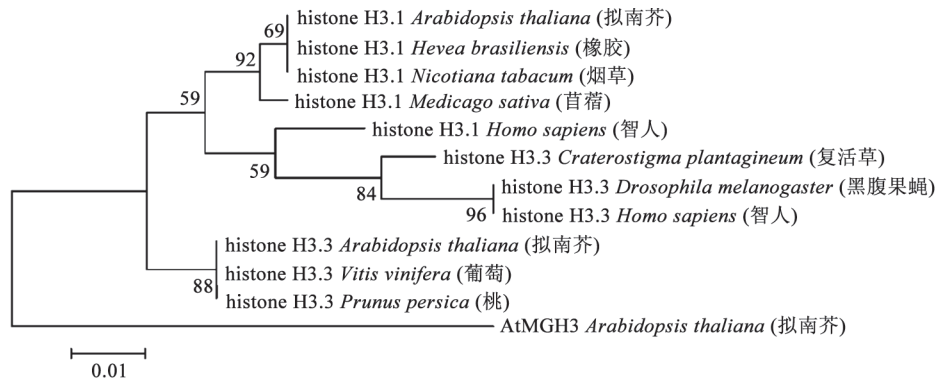


图5 不同物种组蛋白H3氨基酸序列系统树分析

Fig. 5 Phylogenetic trees of the deduced amino acid sequences of histone H3

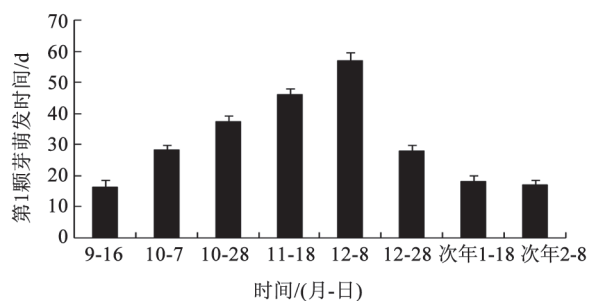
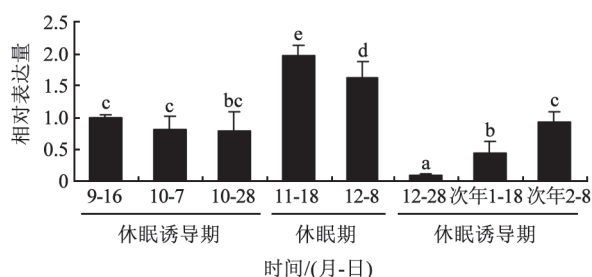


图6 油桃花芽的休眠进程

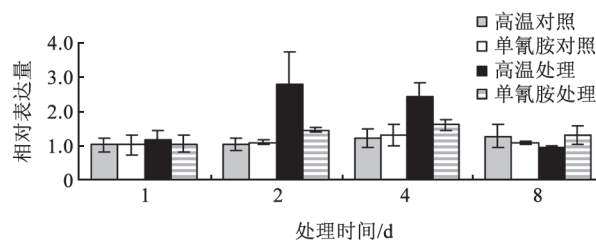
Fig.6 Dormancy process of floral buds of *P. persica* var. *nectarina*图7 自然休眠进程中*PpH3.3*的表达水平Fig.7 Expression levels of *PpH3.3* during dormancy process
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

持染色质活性状态的表观遗传记忆, H3.3大量表达, 参与组蛋白周转, 从而有利于休眠解除后转录调控元件的结合, 对染色质的活性形成影响。Gurdon的研究小组证实了后一种情况: 即在没有转录的情况下, 活性基因表观遗传的记忆依赖于H3.3嵌入染色质(Ng和Gurdon 2008)。

4 高温和单氰胺处理对*PpH3.3*表达的影响

在目前所能利用的破眠措施中, 高温处理和施用单氰胺为休眠的研究提供了一个可控系统。研究发现, 尽管高温和单氰胺处理引起的变化在时间和强度上有所不同, 但二者在破眠效果、氧化胁迫、呼吸代谢和转录组的变化等方面具有极大地相似性(Halaly等2008, 2011; Ophir等2009)。

结果(图8)显示, 高温处理后*PpH3.3*的表达量在第2天达到最大值, 早于单氰胺处理的; 单氰胺处理后最大值出现在第4天, 且二者差异显著。但2种处理均引起*PpH3.3*表达的短暂升高, 然后降低, 恢复到初始水平。这一结果结合我们实验室构建的休眠期和休眠解除期的抑制差减文库筛选到*PpH3.3*的部分序列(李玲等2011), 说明至少在一定

图8 高温和单氰胺处理下*PpH3.3*的表达水平Fig.8 Expression levels of *PpH3.3* under high temperature and hydrogen cyanamide treatments

程度上*PpH3.3*参与休眠的过程。

参考文献

- 李玲, 王慧, 谭钺, 王宇, 陈修德, 李冬梅, 高东升(2011). 桃花芽休眠解除SSH文库构建及相关基因表达分析. 园艺学报, 38 (12): 2273~2280
- den Boer BGW, Murray JAH (2000). Control of plant growth and development through manipulation of cell-cycle genes. *Curr Opin Biotechnol*, 11: 138~145
- Govin J, Caron C, Rousseaux S, Khochbin S (2005). Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem Sci*, 30: 357~359
- Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Castellano MM, del Pozo JC (2002). G1 to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 480~486
- Halaly T, Pang X, Batikoff T, Keilin T, Crane O, Keren A, Venkateswari J, Ogrodovitch A, Sadka A, Lavee S et al (2008). Similar mechanisms are triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds. *Planta*, 228: 79~88
- Halaly T, Zion B, Arbel A, Regev R, Barak M, Or E (2011). Short exposure to sublethal heat shock facilitates dormancy release in grapevines. *Am J Enol Vitic*, 62: 106~112
- Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K (2004). Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet*, 20: 320~326
- Jian LC, Li PH, Sun LH, Chen THH (1997). Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca^{2+} in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. *J Exp Bot*, 48:1195~1207
- Jin J, Cai Y, Li B (2005). In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci*, 30: 680~687
- Law RD, Suttle JC (2003). Transient decreases in methylation at 5'-CCGG-3' sequences in potato (*Solanum tuberosum* L.) meristem DNA during progression of tubers through dormancy precede the resumption of sprout growth. *Plant Mol Biol*, 51 (3): 437~447
- Law RD, Suttle JC (2004). Changes in histone H3 and H4 multiacetylation during natural and forced dormancy break in potato tubers. *Physiol Plant*, 120 (4): 642~649
- Loidl P (2004). A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci*, 9: 84~90
- Ng RK, Gurdon JB (2008). Epigenetic memory of an active gene state

- depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol*, 10: 102~109
- Ophir R, Pang X, Halaly T, Venkateswari J, Lavee S, Galbraith D, Or E (2009). Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Mol Biol*, 71: 403~423
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep*, 15: 8~15
- Sakai A, Schwartz BE, Goldstein S, Ahmad K (2009). Transcriptional and developmental functions of the H3.3 histone variant in *Drosophila*. *Curr Biol*, 19: 1816~1820
- Santamaría M, Hasbún R, Valera M, Meijón M, Villedor L, Rodríguez JL, Toorop PE, Cañal M, Rodríguez R (2009). Acetylated H4 histone and genomic DNA methylation patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*. *J Plant Physiol*, 166: 1360~1369
- Sarma K, Reinberg D (2005). Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 139~149
- Schrader J, Moyle R, Bhalerao R, Hertzberg M, Lundeberg J, Nilsson P, Bhalerao RP (2004). Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodelling of the transcriptome. *Plant J*, 40 (2): 173~187
- Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res*, 21: 421~434
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, 116: 51~61
- Thatcher TH, Gorovsky MA (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucl Acids Res*, 22: 174~179