

• 农业生物技术 •

普通烟草 *NtODB* 基因的电子克隆、表达及生物信息学分析

陈涛*, 彭欣怡*, 覃剑峰, 覃旭, 吴密, 黄锦媛, 黄显雅, 危丹妮, 王丽萍, 金刚

广西壮族自治区农业科学院 广西亚热带作物研究所, 广西 南宁 530001

陈涛, 彭欣怡, 覃剑峰, 等. 普通烟草 *NtODB* 基因的电子克隆、表达及生物信息学分析. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2836-2844.

Chen T, Peng XY, Qin JF, et al. *In silico* cloning, expression and bioinformatics analysis of *NtODB* from common tobacco. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2836-2844.

摘要: *ODB* 基因在植物同源重组依赖性的 DNA 双链断裂修复过程中起重要作用, 对植物诱变育种具有潜在的应用价值。克隆烟草 *NtODB* 基因并分析其表达特征为丰富 *ODB* 基因在同源重组 DNA 修复过程中的作用提供证据。为得到烟草 *NtODB* 基因序列, 采用电子克隆技术获得该基因 cDNA 序列并克隆验证。进一步使用生物信息学方法分析该基因表达特征, 对预测蛋白的理化性质、信号肽、高级结构等进行预测。生物信息学分析结果表明, *NtODB* 基因开放阅读框包含 579 个碱基, 蛋白含 192 个氨基酸残基, *NtODB* 蛋白具有碱性和亲水性, 主要定位于细胞质内; 实时荧光定量 PCR 检测结果显示 *NtODB* 基因在不同组织中呈现组成型表达特征; 亚细胞定位检测提示 *NtODB* 主要表达于细胞膜和叶绿体。*NtODB* 基因的克隆与表达分析及其蛋白高级结构和理化性质的预测, 可为进一步丰富 *ODB* 基因在同源重组依赖的 DNA 修复系统中的作用机制提供证据。

关键词: 普通烟草, *NtODB* 基因, DNA 修复, 电子克隆

In silico cloning, expression and bioinformatics analysis of *NtODB* from common tobacco

Tao Chen*, Xinyi Peng*, Jianfeng Qin, Xu Qin, Mi Wu, Jinyuan Huang, Xianya Huang, Danni Wei, Liping Wang, and Gang Jin

Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530001, Guangxi, China

Abstract: It has been reported that *ODB* genes play an important role in homologous recombination-directed DNA repair,

Received: October 19, 2020; **Accepted:** January 20, 2021

Supported by: Natural Science Foundation of Guangxi Province, China (No. 2016GXNSFAA380093), Fundamental Research Fund of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (Nos. 2020YM57, 2021YT153), Fundamental Research Fund of Guangxi Subtropical Crops Research Institute (No. GRY201904).

Corresponding author: Gang Jin. Tel: +86-771-2539210; E-mail: jing8118@163.com

*These authors contributed equally to this study.

广西自然科学基金 (No. 2016GXNSFAA380093), 广西农业科学院基本科研业务专项 (Nos. 2020YM57, 2021YT153), 广西亚热带作物研究所基本科研业务专项 (No. 桂热研 201904) 资助。

网络出版时间: 2021-02-07

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210207.1432.001.html>

suggesting their potential applications in plant breeding. To analyze the expression characteristics of tobacco *NtODB* gene, the cDNA sequence of *NtODB* was obtained using *in silico* cloning technique. The physicochemical properties, signal peptide, and advanced structures of the predicted protein were analyzed using bioinformatics tools. The results showed that the *NtODB* gene has a 579-bp open reading frame which encodes a protein with 192 amino acid residues. The protein NtODB is predicted to be alkaline and hydrophilic. Real-time quantitative PCR showed that *NtODB* was constitutively expressed in different tissues. Subcellular localization showed that NtODB was mainly expressed in cell membrane and chloroplast. These results may help us to better understand and elucidate the roles of *ODB* genes in the homologous recombination-directed DNA repair.

Keywords: common tobacco, *NtODB*, DNA repair, *in silico* cloning

生物有机体的 DNA 损伤修复途径包括碱基切除修复、核苷酸切除修复、错配修复、双链断裂修复等形式^[1-2]。已有的研究表明, DNA 错配修复缺陷对植物诱变育种具有重要意义。该系统可作为构建高效诱变体系的靶标, 或直接利用于创制突变体^[3]。而依赖于同源重组的双链断裂修复系统缺陷对植物诱变也具有潜在的应用价值, 但目前对此类诱变体系的研究较少^[4]。

辐射敏感蛋白 52 (Radiation sensitive protein 52, RAD52) 在依赖同源性的 DNA 双链断裂修复和重组中起着至关重要的作用, 这一点已通过酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的遗传研究得以证明^[5-10]。*rad52* 突变体对电离辐射极为敏感, 在体细胞重组路径 (包括单链退火、断裂诱导的修复以及霍利迪联结体中间物) 中表现出表型变异, 并且出现减数分裂重组的异常^[11]。RAD52 蛋白主要参与修复 DNA 双链断裂, 也参与修复其他类型的 DNA 损伤 (如停滞的复制叉)^[12-13]。

拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 类 RAD52 蛋白细胞器 DNA 结合蛋白 (Organelar DNA-binding protein, ODB) 在核和线粒体内室中的同源重组依赖的 DNA 修复中起作用^[9,14]。拟南芥中的 *ODB1* 和 *ODB2* 两个旁系同源基因通过可差异剪接编码 4 个开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 每个 ORF 都特异性地定位于细胞核、线粒体或叶绿体。拟南芥 *ODB1A* ORF 为酵母 *rad52* 突变体提供了部分互补。ODB1 的功能缺失会抑制由遗传毒性诱导的 DNA 断裂的同源重组修复,

进而促进微同源重组^[15]。与野生型相比, *ODB1* 或 *ODB2* 功能缺陷的拟南芥突变体和 RNAi 转基因植株表现为育性降低, 对丝裂霉素 C 的敏感性和染色体内重组水平降低^[15-16]。

类 RAD52 蛋白 *ODB1* 蛋白在拟南芥线粒体中还参与剪接, 并促进两个顺式剪接 II 型内含子 (*nad1* 内含子 2 和 *nad2* 内含子 1) 的剪切^[17]。*odb1* 突变体因 *ODB1* 蛋白的功能缺陷而超量积累不完全剪接的 *nad1* 和 *nad2* 转录本。类 RAD52 蛋白 *ODB1* 是通过第一步水解有效切除两个线粒体内含子所必需的^[17]。

ODB1 蛋白是植物线粒体中同源重组依赖性 DNA 修复的组成部分。在线粒体中, WHIRLY2 (WHY2) 和 *ODB1* 共同参与核蛋白复合物的构建, 两种蛋白以 DNA 结合的方式免疫共沉淀, 被认为是核体的重要组成部分^[18-19]。染色质免疫共沉淀表明 *ODB1* 可结合整个线粒体基因组的序列。*ODB1* 可促进互补 DNA 序列的退火, 暗示了其具有类 RAD52 重组介体的功能。拟南芥 *odb1* 突变体在形态学上与野生型无明显区别, 但在遗传毒性应激导致 DNA 损伤后, 其线粒体同源重组活性降低。在相同的条件下, *odb1* 突变体显示微同源介导重组产生的非正常修复旁路增加^[12,20]。将重组酶加载到单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA) 上以形成联会前纤丝需要替换 ssDNA 结合蛋白。ODB 是酵母 RAD52 的同源物, 可以分别在线粒体和叶绿体中执行此功能^[14,15]。与 RAD52 一样, *ODB1* 在体外促进互补 ssDNA 序列的杂交,

从而支持了 ODB1 在重组中的介导作用^[14,19]。WHIRLY2 蛋白还可以通过促进 ssDNA 上重组酶的加载来发挥介体的作用。然后, ODB1 和 WHIRLY2 的功能可能是冗余的,也可能在不同替代重组路径中竞争性募集其他因子参与^[14,20-22]。

近年来随着植物基因组测序工作的不断推进,植物生物学的研究早已发展到了后基因组时代。电子克隆技术便是依托现有的 EST 数据库、基因组数据库等资源,采用同源性序列检索、聚类、重叠区域拼接组装等方法延伸已知 EST 序列,最终不可继续延伸后获得部分或全长 cDNA 的一种方法。电子克隆与传统的克隆方法相比,更具有操作简便、成本低效率高、针对性强等优势;但电子克隆结果仍需传统克隆的实验验证。由于 ODB 基因在植物诱变育种中具有潜在的利用价值,因此本研究拟通过电子克隆技术获取模式植物烟草 *NtODB* 基因的编码序列,通过生物信息学分析预测其编码蛋白的理化性质和结构特征,并研究该基因的时空表达和亚细胞定位特征。这将为该基因的生物學功能以及对植物的诱变分子机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所用普通烟草 *Nicotiana tabacum* var. Samsun 和本生烟 *N. benthamiana* Domin 盆栽于广西亚热带作物研究所晾晒烟种质资源圃(东经 108° 20', 北纬 22° 53')。普通烟草材料为广西晾晒烟地方品种“牛利烟”。植物组织材料经液氮速冻后,用干冰运送至 -80 °C 超低温冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与逆转录

取 1 g 烟草组织放至研钵,倒入液氮研磨至粉末状。然后用 RNeasy Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 提取 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,然后用微量核酸蛋

白测定仪检测 RNA 质量和浓度。再将烟草总 RNA 利用 Oligo(dT)₁₈ 和 HiScript 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (Vazyme) 进行逆转录。

1.2.2 烟草 ODB 基因的克隆

根据已报道的拟南芥 *ODB1* 基因 (At1g71310) 的氨基酸序列作为起始查询序列^[9],通过 BlastP 同源比对检索烟草蛋白组数据库,选择与查询序列的相似度、覆盖度、e 期望值最高的一条序列 (GenBank 登录号:XM_016606610.1) 作为研究对象。PCR 扩增烟草 *ODB* 基因的反应条件为 95 °C 4 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,目标片段经切胶回收纯化后与 pMD19-T 载体连接,转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态。筛选阳性转化子送至苏州金唯智生物科技有限公司完成 Sanger 测序。

1.2.3 生物信息学分析

分别利用在线软件 ProtParam 和 ProtScale 分析表达蛋白的基本理化指数、亲水性/疏水性;利用在线软件 ProtComp v9.0 和 TMHMM 工具分析该蛋白亚细胞定位和跨膜区域;利用 NetPhos 3.1 和 TargetP 2.0 在线软件分析磷酸化位点与信号肽;使用 SWISS-MODEL 在线软件分析结构域的高级结构^[23]。

1.2.4 qRT-PCR 分析

提取普通烟草生殖生长期的茎、花瓣、叶、萼片的总 RNA,并将提取的 RNA 反转录成 cDNA。根据克隆测序获得的烟草 *NtODB* 基因设计 qRT-PCR 引物,以烟草 *Actin* 为内参基因 (表 1)。使用 LightCycler 480 II 荧光定量 PCR 仪 (Roche) 检测目标基因的相对表达水平,每个样品设 3 次生物学重复,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算差异表达^[24]。

1.2.5 亚细胞定位分析

设计构建 *NtODB* 亚细胞定位载体的引物 pBI121-*ODB*-F/R (表 1),以 pMD19-T-*NtODB* 为模板,扩增 *NtODB* 完整的编码序列。扩增产物经

表 1 所用引物序列和用途

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Purpose
ODB-F	ATGGCCTTTTCTTCATTGCG	Cloning
ODB-R	CTATGACATGTCCTCATGATAAAGATG	
pBI121-ODB-F	GACTCTAGAATGGCCTTTTCTTCATTGCG	Vector construction
pBI121-ODB-R	TCCCCCGGGTGACATGTCCTCATGATAAAGAT	
Oligo(dT) ₁₈	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Reverse transcription
ODB-RTF	TACACAGCAGAGCGAACTAAGGA	qRT-PCR
ODB-RTR	GCAGAGAAAGAGCACTGGCAA	
NtActin F1	ACCTCTATGGCAACATTGTGCTCAG	Reference gene
NtActin R2	CTGGGAGCCAAAGCGGTGATT	

The underlined nucleotides represent the introduced restriction endonuclease sites.

Kpn I 和 *Xba* I 双酶切后, 连入同样被 *Xba* I 与 *Kpn* I 双酶切再回收纯化的空白表达载体 pBI121-GFP, 得到 pBI121-*NtODB*/GFP 融合表达载体。构建好的亚细胞定位载体转化农杆菌 EHA105 感受态细胞, 挑取阳性转化子至含卡那霉素的 YEB 液体培养基中振荡培养 12-16 h。制备农杆菌悬浮液, 调整各菌液 OD_{600} 为 0.1-0.8, 采用即时表达的方法, 用成功转化目的质粒的农杆菌注入本生烟草叶片, 暗培养 48 h。切取感染区域, 撕表皮制片, 利用激光共聚焦显微镜观察 GFP 荧光在烟草细胞中的分布。以不连接 *NtODB* 基因的 pBI121-GFP 空载体为对照。

2 结果与分析

2.1 *NtODB* 基因的 cDNA 克隆

利用拟南芥 ODB1 蛋白的氨基酸序列, 在 NCBI 数据库中进行普通烟草蛋白序列的 BlastP 同源比对, 相似度、覆盖度、e 期望值最高的一条序列在 GenBank 登录号为 XM_016606610.1。此 cDNA 的完整 ORF 框为第 75-653 bp (图 1), 起始和终止密码子分别是 ATG 和 TGA, 表达蛋白含有 192 个氨基酸。该序列与旱芹 *Apium graveolens*、牵牛 *Ipomoea nil* 的 DNA 修复类 RAD52 蛋白具有较高的亲缘关系, 序列同一性分别为 69.59% 和 71.88%, 且能比对到同源蛋白的 C 端和 N 端, 命名基因为 *NtODB*, 预测蛋白为 NtODB。

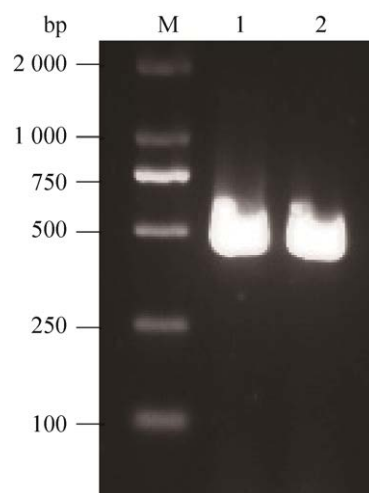
图 1 烟草 *NtODB* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *NtODB*. M: DL2000 DNA marker; lane 1 and 2: PCR product of *NtODB*.

2.2 *NtODB* 蛋白理化性质分析

使用 ProtParam tool 预测 NtODB 蛋白的理化参数, 该蛋白质分子式、分子量和理论等电点分别为 $C_{943}H_{1479}N_{269}O_{295}S_8$ 、21.56 kDa 和 8.38, 是碱性蛋白质; 脂肪系数、负电荷残基数 (天冬氨酸+谷氨酸) 和正电荷残基数 (精氨酸+赖氨酸) 分别是 67.50、25.00 和 27.00; 不稳定系数和平均总亲水性分别是 47.91 和 -0.596, 属于不稳定亲水蛋白。预测 NtODB 蛋白含有 20 种氨基酸, 含量最多的是丝氨酸 (Ser), 占 15.1%。利用 ProtScale 对烟草 NtODB 蛋白的一级结构进行亲水和疏水

性分析, 该多肽链的第 135 位酪氨酸 (Tyr) 和第 42 位的赖氨酸 (Lys) 分别具有最高 (1.478) 和最低 (-3.722) 分值, 前者疏水性最强, 后者亲水性最强 (图 2)。

2.3 亚细胞定位与跨膜区分析

利用 ProtComp 9.0 软件预测 NtODB 蛋白的亚细胞定位, NtODB 蛋白质在细胞外 (2.22)、叶绿体 (2.19) 和内质网 (2.11) 中具有较高整体分数; 而根据五聚体算法, 该蛋白在线粒体 (3.62) 中分数较高 (表 2)。据此预测 NtODB 蛋白可能分布于细胞器。利用 TMHMM v.2.0 软件在线分析 NtODB 蛋白跨膜区, 该蛋白没有明显的跨膜区, 不属于膜结合蛋白 (图 3)。

表 2 普通烟草 NtODB 蛋白亚细胞定位分析

Table 2 Analysis of subcellular localization of NtODB protein in tobacco

Location	LocDB	PotLocDB	Neural nets	Pentamers	Integral
Nuclear	0	0	0	0	0.11
Golgi	0	0	0.11	0.25	0.41
Extracellular	0	0	0.96	0.02	2.22
Cytoplasmic	0	0	0	0.65	0
Peroxisomal	0	0	0.96	0.22	2.03
Plasma membrane	0	0	0.96	0	0
Vacuolar	0	0	0	0	0
Mitochondrial	0	0	0	3.62	0.94
Endoplasmic reticulum	0	0	0	0.05	2.11
Chloroplast	0	0	0	0.33	2.19

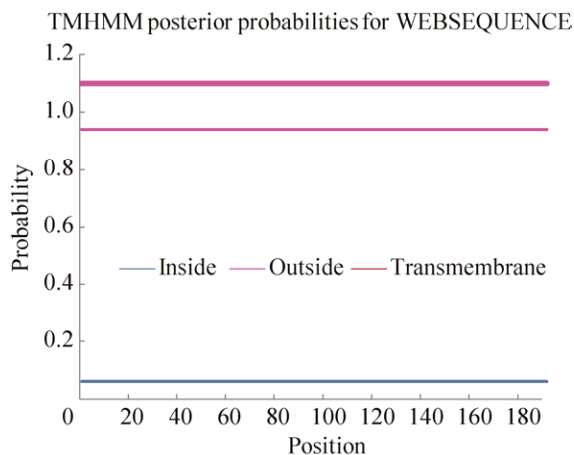


图 3 NtODB 蛋白的跨膜区分析

Fig. 3 Prediction of the transmembrane regions of NtODB protein.

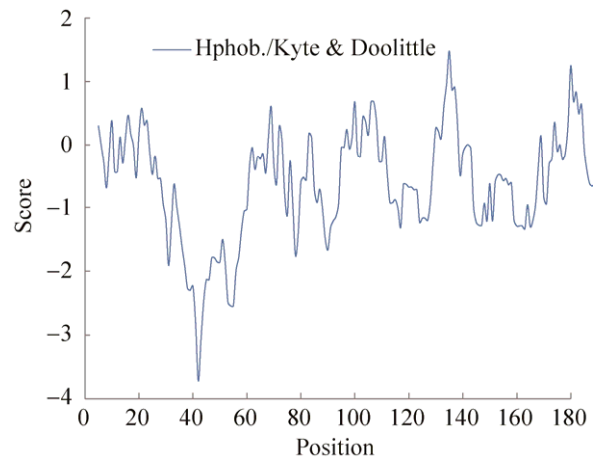


图 2 烟草 ODB 蛋白疏水性/亲水性预测

Fig. 2 Prediction of the hydrophilicity/hydrophobicity of NtODB protein in tobacco.

2.4 磷酸化位点与信号肽分析

蛋白质磷酸化处于信号传递链的终端, 可通过对转录因子的磷酸化达到调节基因活性的目的。利用 NetPhos 3.1 在线分析 NtODB 磷酸化位点, 此蛋白含有的 Ser、Thr 和 Tyr 磷酸化位点数目分别是 18、4、4 (图 4)。经 TargetP 2.0 分析, NtODB 为线粒体转运蛋白的可能性是 93.92%, 切除位点在第 24-25 个氨基酸残基之间。暗示 NtODB 蛋白的细胞器定位性质。

2.5 保守结构域和高级结构的分析

使用在线软件 CD-Search 对 NtODB 蛋白进行保守结构域分析 (图 5A), 该蛋白第 70-185 位氨

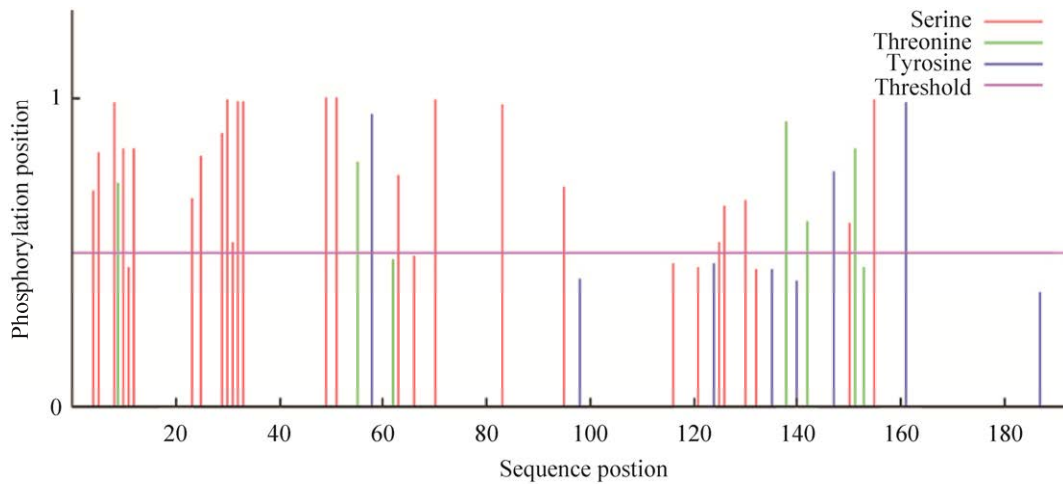


图 4 *NtODB* 蛋白的磷酸化位点预测

Fig. 4 Prediction of the phosphorylation sites of *NtODB* protein.

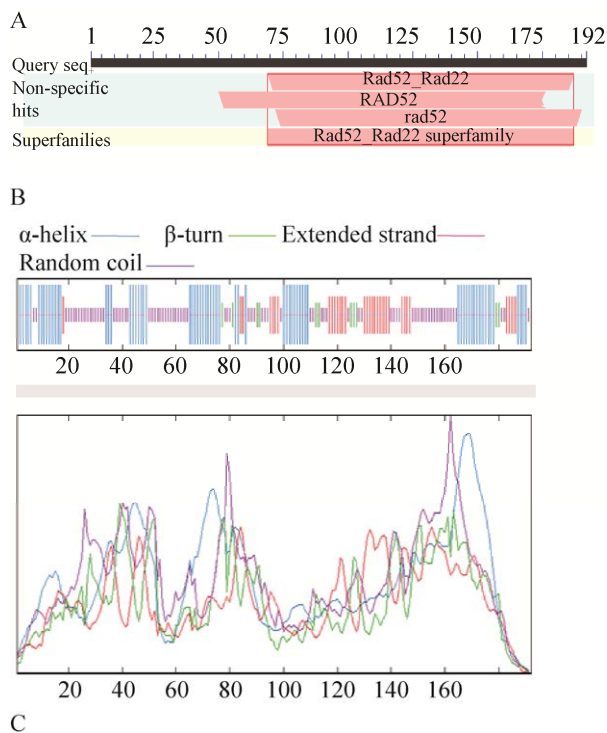


图 5 烟草 *NtODB* 蛋白保守结构域和高级结构预测

Fig. 5 Prediction of the conservative region and advanced structure of *NtODB* protein. (A) Conserved domain. (B) Secondary structure. (C) Tertiary structure.

氨基酸残基之间存在高度保守的 RAD52 结构域,表明本研究所克隆 *NtODB* 基因的编码蛋白属于 DNA 修复蛋白 RAD52 家族成员。使用 SOPMA 分析 *NtODB* 蛋白的二级结构,包括 35.94%的 α 螺旋、16.67%的延伸链、5.73%的 β -折叠和 41.67%的无规则卷曲序列 (图 5B)。利用 SWISS-MODEL 预测该蛋白的三级结构,空间结构主要由 α 螺旋和无规则卷曲构成 (图 5C)。

2.6 *NtODB* 基因的表达分析

从盛花期普通烟草的茎、叶、花瓣和萼片等器官中提取总 RNA。以普通烟草 *NtActin* 基因为内参基因进行 qRT-PCR 检测 *NtODB* 基因的相对表达水平。结果表明, *NtODB* 在盛花期普通烟草的不同器官中虽呈现组成型表达特征,但其相对表达量在不同器官之间差异显著。在叶片中表达丰度最高,茎和萼片表达丰度次之,在花瓣中表达丰度最低 (图 6)。

为了进一步研究 *NtODB* 蛋白的亚细胞定位情况,以空载体为对照,在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白的分布,结果发现,转 pBII121-GFP 的荧光信号分布于整个细胞中;而 *NtODB*-GFP 融合蛋白的绿色荧光信号定位于叶绿体和细胞膜上 (图 7)。

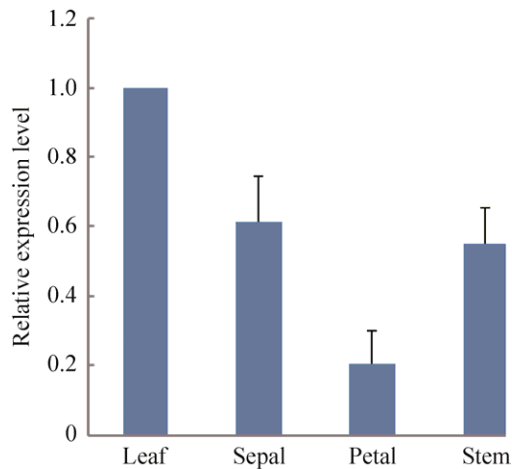


图6 *NtODB* 在烟草中的时空表达模式
Fig. 6 Temporal and spatial expression pattern of *NtODB* in tobacco.

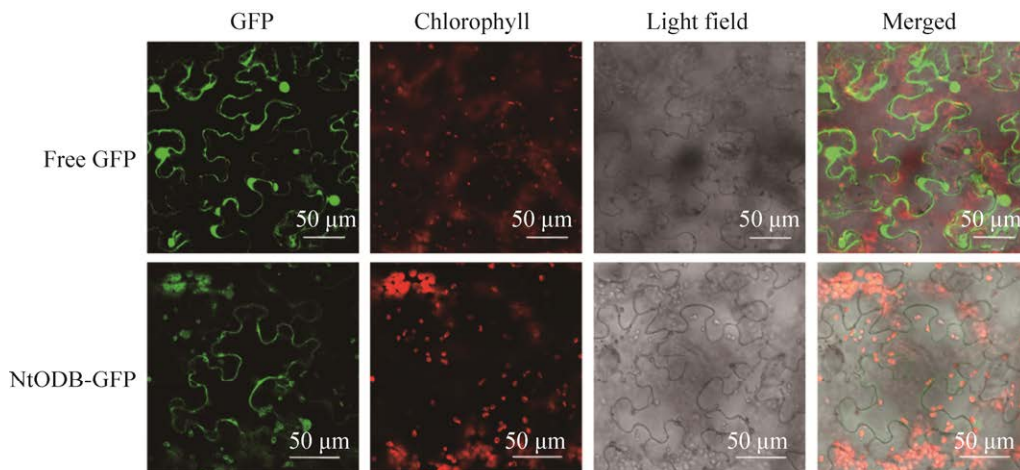


图7 *NtODB-GFP* 在本生烟表皮细胞中的定位
Fig. 7 Subcellular localization of *NtODB* fused with GFP in the epidermal cells of *N. benthamiana*.

胞定位结果一致。烟草 *NtODB* 在叶绿体中表达的特征与拟南芥通过差异剪接编码的开放阅读框之一 *ODB2B* 的叶绿体定位具有一致性^[15]，暗示了本研究所克隆的烟草 *NtODB* 与拟南芥 *ODB2B* 在叶绿体中可能执行了相似的生物学功能。但在拟南芥中未见 *ODB1* 和 *ODB2* 细胞膜的定位^[15]。

基于 *why2-1* 突变体在环丙沙星处理后的亚化学计量转换效应以及 *WHIRLY2* 和 *ODB1* 共结合这两点原因，初步判断 *ODB1* 也与细胞质异质性的亚化学计量转换密切相关，这仍有待于实验论证。

在拟南芥中，和 *ODB1* 共同参与线粒体大型

3 讨论

发掘依赖于同源重组的双链断裂修复系统缺陷的相关基因并进行功能研究是对其开展植物诱变育种应用的前提。本研究表明，*NtODB* 在烟草不同器官中呈组成型表达。但在不同器官中的相对表达量存在一定差异，在生殖器官花瓣中的表达丰度低于其他器官。Samach 等通过亚细胞定位实验，发现拟南芥 *ODB1* 蛋白在叶绿体、细胞核和叶绿体中均有定位^[15]。而其他植物 *ODB* 同源蛋白的亚细胞定位结论未见报道。亚细胞定位研究表明，烟草 *NtODB* 在叶绿体和细胞膜中表达。这与基于 ProtComp v.9.0 软件预测的 *NtODB* 亚细

核蛋白复合物组成的 *WHIRLY2* 已被证实与 DNA 胁迫诱变有关^[26]。*WHY* 蛋白与 ssDNA 的结合有利于 DNA 双链断裂的精确修复。对拟南芥 *why2-1* 突变体的研究表明，环丙沙星胁迫处理条件下的植株线粒体中含有以亚化学计量水平存在的异型 DNA 分子。在环丙沙星处理后，微观同源介导的 DNA 重排分子形式以亚化学计量在野生型、*why2-1* 突变体以及 *why1 why3* 双突变体中积累，并且一些重排 DNA 以亚基因组长度分子形式存在^[25-26]。并且在环丙沙星处理条件下，*why2* 突变体比野生型材料更容易在线粒体基因组中积累 DNA 重排分子。

ODB1 是植物线粒体中同源重组依赖性 DNA 修复的组成部分^[14]。在拟南芥的染色质免疫共沉淀研究表明, ODB1 可结合于整个线粒体基因组的序列。ODB1 促进互补 DNA 序列的退火, 提示具有类似 RAD52 重组介体的功能。拟南芥 *odb1* 突变体在形态学与野生型无明显区别, 但在遗传毒性应激导致 DNA 损伤后, 显示出降低的线粒体同源重组活性。在相同的条件下, *odb1* 突变体展示了由微同源介导重组产生的不合理修复旁路的增加^[14]。

本研究克隆的烟草 *NtODB* 更近似于拟南芥 *ODB2*, 因为亚细胞定位结果展示了 *NtODB* 具有与 *ODB2* 相同的叶绿体定位特征。拟南芥叶绿体定位的 *ODB2* 可能参与到叶绿体 DNA 的修复路径^[15]。推测与已在拟南芥中证实的 *ODB1* 和 *WHIRLY2* 协同参与线粒体 DNA 的修复机制类似, *NtODB* 与具有叶绿体定位特征的 *WHY1* 及 *WHY3* 直系同源基因共同参与叶绿体 DNA 的修复。拟南芥 *ODB1* 或 *ODB2* 功能缺陷出现的表型变化, 如育性降低、对丝裂霉素 C 的敏感性和染色体内重组水平降低等, 可能均与这一类 DNA 修复机制有关^[14-15]。这也暗示了 *NtODB* 在叶绿体 DNA 同源重组修复中的作用, 其功能缺陷可能会导致叶绿体 DNA 变异, 对植物 DNA 诱变具有潜在的研究意义^[20,25-26]。

本研究为进一步通过转化验证 *NtODB* 基因的生物功能提供了可能, 丰富了 *ODB* 基因在烟草中的功能实验证据。

REFERENCES

- [1] Bray CM, West CE. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol*, 2005, 168(3): 511-528.
- [2] 董隽, 张天, 文碧秀. DNA 双链断裂与同源重组修复的研究进展. *中国医学创新*, 2015, 12(3): 143-146.
Dong J, Zhang T, Wen BX. Advance in research of homologous recombination repair in DNA double strands breakage. *Med Innovat China*, 2015, 12(3): 143-146 (in Chinese).
- [3] 崔海瑞, 宋悦, 袁兵, 等. 植物 DNA 错配修复缺陷及其对诱变育种的意义. *核农学报*, 2014, 28(9): 1606-1614.
Cui HR, Song Y, Yuan B, et al. Plant mismatch repair deficiency and its significance for mutation breeding. *J Nucl Agric Sci*, 2014, 28(9): 1606-1614 (in Chinese).
- [4] Krejci L, Altmannova V, Spirek M, et al. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(13): 5795-5818.
- [5] Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 2018, 293(27): 10524-10535.
- [6] Arai N, Kagawa W, Saito K, et al. Vital roles of the second DNA-binding site of Rad52 protein in yeast homologous recombination. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 17607-17617.
- [7] Shi I, Hallwyl SCL, Seong C, et al. Role of the Rad52 amino-terminal DNA binding activity in DNA strand capture in homologous recombination. *J Biol Chem*, 2009, 284(48): 33275-33284.
- [8] Xue CY, Greene EC. New roles for RAD52 in DNA repair. *Cell Res*, 2018, 28(12): 1127-1128.
- [9] Piazza A, Heyer WD. Homologous recombination and the formation of complex genomic rearrangements. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(2): 135-149.
- [10] Dhingra N, Zhao XL. Intricate SUMO-based control of the homologous recombination machinery. *Genes Dev*, 2019, 33(19/20): 1346-1354.
- [11] Symington LS. Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66(4): 630-670.
- [12] Gangavarapu V, Prakash S, Prakash L. Requirement of *RAD52* group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(21): 7758-7764.
- [13] Shinohara A, Ogawa T. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature*, 1998, 391(6665): 404-407.
- [14] Janicka S, Kühn K, Le Ret M, et al. A RAD52-like

- single-stranded DNA binding protein affects mitochondrial DNA repair by recombination. *Plant J*, 2012, 72(3): 423-435.
- [15] Samach A, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolski N, et al. Identification of plant *RAD52* homologs and characterization of the *Arabidopsis thaliana* *RAD52*-like genes. *Plant Cell*, 2011, 23(12): 4266-4279.
- [16] Samach A, Gurevich V, Avivi-Ragolsky N, et al. The effects of *AtRad52* over-expression on homologous recombination in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2018, 95(1): 30-40.
- [17] Gualberto JM, Le Ret M, Beator B, et al. The *RAD52*-like protein *ODB1* is required for the efficient excision of two mitochondrial introns spliced via first-step hydrolysis. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(13): 6500-6510.
- [18] Gualberto JM, Kühn K. DNA-binding proteins in plant mitochondria: implications for transcription. *Mitochondrion*, 2014, 19 Pt B: 323-328.
- [19] Pfalz J, Pfannschmidt T. Essential nucleoid proteins in early chloroplast development. *Trends Plant Sci*, 2013, 18(4): 186-194.
- [20] Cappadocia L, Maréchal A, Parent JS, et al. Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in *Arabidopsis* organelle genome repair. *Plant Cell*, 2010, 22(6): 1849-1867.
- [21] Wild P, Susperregui A, Piazza I, et al. Network rewiring of homologous recombination enzymes during mitotic proliferation and meiosis. *Mol Cell*, 2019, 75(4): 859-874.e4.
- [22] Chevigny N, Schatz-Daas D, Lotfi F, et al. DNA repair and the stability of the plant mitochondrial genome. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 328.
- [23] 杜尚广, 余波. 木薯 *HSP21* 基因的电子克隆与生物信息学分析. *生物工程学报*, 2020, 36(7): 1422-1430.
- Du SG, Yu B. *In silico* cloning and bioinformatics analysis of *HSP21* in *Manihot esculenta*. *Chin J Biotech*, 2020, 36(7): 1422-1430 (in Chinese).
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Krause K, Kilbiński I, Mulisch M, et al. DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Lett*, 2005, 579(17): 3707-3712.
- [26] Gualberto JM, Newton KJ. Plant mitochondrial genomes: dynamics and mechanisms of mutation. *Annu Rev Plant Biol*, 2017, 68: 225-252.

(本文责编 陈宏宇)