

新基因、新种质、新品种
New Gene & Germplasm

一个绿竹 *MADS-box* 基因的克隆与序列分析

高志民^{1*} 刘颖丽^{1*} 李雪平¹ 彭镇华^{2**}

1 国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京, 100102; 2 中国林业科学研究院林业研究所, 北京, 100091

* 同等贡献作者

** 通讯作者, pengzh@icbr.ac.cn

摘要 *MADS-box* 基因编码的转录因子在植物花器官发育过程中起着重要作用。采用 RT-PCR 技术, 从绿竹(*Bambusa oldhamii* L.) 中分离到一个 *MADS-box* 基因, 命名为 *BOMADS1* (GenBank 登记号: EF517293)。BOMADS1 编码区 cDNA 全长 723 bp; 编码区共编码 240 个氨基酸, 具有典型的植物 *MADS-box* 基因结构, 其编码肽链包含了 MADS 区、K 区、I 区和 C 末端。序列分析结果表明, *BOMADS1* 编码的蛋白与其它植物的 *MADS-box* 蛋白有着较高的一致性, 其中与石刁柏(*Asparagus officinalis* L.) 的 AOM3 高达 87%。系统进化树分析表明 *BOMADS1* 基因属于 E 类功能基因。

关键词 绿竹, *MADS-box* 基因, 系统进化树分析

Cloning and Sequencing Analysis of a Flowering-related *MADS-box* Gene in *Bambusa oldhamii* L.

Gao Zhimin^{1*} Liu Yingli^{1*} Li Xueping¹ Peng Zhenhua^{2**}

1 International Center for Bamboo and Rattan, SFA Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, Beijing, 100102; 2 Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding author, pengzh@icbr.ac.cn

Abstract Floral homeotic *MADS-box* genes encoding transcription factors play important roles in determining floral organ identities. The flowering-related *MADS-box* gene, named as *BOMADS1* (GenBank accession number: EF517293), was cloned from the first strand of *Bambusa oldhamii* L. cDNA through RT-PCR using primers designed according to the *MADS-box* gene family conserved region. The fragment was 723 bp length and contained an open reading frame coding a polypeptide of 240 amino acids which had a typical *MADS-box* gene structure including *MADS-box* domain, K domain, I region and C terminus. Homology analysis indicated that the deduced *BOMADS1* protein was highly homologous to other *MADS-box* proteins from different species, especially with AOM3 from *Asparagus officinalis* up to 87%. Phylogenetic tree analysis also indicated that *BOMADS1* might belong to E function genes.

Keywords *Bambusa oldhamii* L., *MADS-box* gene, Phylogenetic tree analysis

MADS-box 基因是发育过程的主要调控因子, 研究表明 *MADS-box* 基因家族并不只在花器官的发育中起调控作用, *MADS-box* 基因在控制开花时间、决定分裂组织的分化 (Weigel, 1995)、控制胚胎发育 (Perry et al., 1999)、促进根的形成 (Alvarez-Buylla et al., 2000) 以及调控种子和果实的发育 (Gu et al., 1998;

Liljegren et al., 1998) 等方面都起着重要的作用。*MADS-box* 基因对生殖生长的调控是近年来的研究重点, 了解植物由营养生长向生殖生长转变的调节过程, 对于控制有花植物的生长发育有着重要意义。

竹类植物由于特殊的生物学习性, 普遍存在开花不良和自然结实率较低等现象 (袁金玲等, 2005),

基金项目: 国家林业局 948 项目(2005-4-38)、国家林业局重点林业科学技术研究项目(2007-01)

极大地限制了其杂交育种。绿竹为 (*Bambusa oldhamii* L.) 我国原产的优良笋材两用丛生竹种, 是最受竹农欢迎的竹种之一, 人们一直在寻求通过杂交育种的方法来进一步提高绿竹的品质, 因此对绿竹开花的研究一直备受人们的关注。本研究通过克隆对生殖生长起调控作用的 *MADS-box* 基因, 为从分子水平揭示竹子的开花机理奠定基础, 以期今后人为调控竹子的花期和杂交育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料和菌株

取自浙江省温州的绿竹扦插苗 (本实验室室内盆栽); 菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室保存。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取绿竹幼嫩新鲜叶片的 RNA (Gao et al., 2006), 用 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA。

1.3 基因的克隆与测序

根据植物的 *MADS* 基因同源序列设计 PCR 引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物 1: 5'-tctagaATGGGAAGAGGGAGAGTTGAG-3'。引物 2: 5'-ggatccCTAAAGAACCCAACCAAGCATG-3'。以绿竹 cDNA 为模板, 进行梯度 PCR。为保证扩增 DNA 片段的准确性, 在反应体系种应用宝生物工程技术有限公司的 pyrobest DNA 聚合酶, 20 μ L 反应体系: 2 μ L 10 \times LA PCR Buffer (Mg²⁺ Plus)、0.1 μ L pyrobest DNA 聚合酶、1.6 μ L dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 2.5 mmol/L each)、2 μ L 引物 1 (5 mmol/L)、2 μ L 引物 2 (5 mmol/L)、1 μ L 模板和 11.3 μ L 超纯水。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C ~ 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 产物电泳分析后用上海申能博彩生物科技有限公司试剂盒将 DNA 片段回收并加 A。加 A 反应体系 10 μ L: 1 μ L 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Plus)、1 μ L DNA 聚合酶、1 μ L dATP 和 7 μ L 回收 DNA 片段。反应条件为: 72 $^{\circ}$ C 30 min。按照 Promega 的 pGEM-T easy 载体快速连接试剂盒操作流程, 将加 A 后的 DNA 片段连到载体上, 转化大肠杆菌, 经蓝白斑筛选, 提取阳性克隆质粒并酶切图谱分析后, 再将单克隆送北京三博远志科技有限公司测序。

1.4 序列的生物信息学分析

利用 DNASTAR、SMART 和 Clustl W 等生物软件分析 cDNA 序列及其编码蛋白质的结构特点, 并与国际核酸和蛋白质数据库联网进行 blast 比较分析。

2 结果与分析

2.1 基因克隆与结构分析

以反转录合成的绿竹 cDNA 作为模板, 用引物 1 和引物 2 进行扩增反应, PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色结果如图 1 所示, 引物 1 和引物 2 的产物在 700 bp 左右有一条亮带, 与预测的基因片段基本相符, 初步确定为目的基因片段。回收与 pGEM-T easy 载体连接, 转化后将单克隆送公司测序。测序结果表明, 插入片段为 735 bp。通过序列分析表明, 插入片段为含有一个完整的开放阅读框, GenBank 登记号为 EF517293。

经过 SMART 软件和 MOTIFSCAN (<http://www.expasy.org/prosite/>) 里面选相对 EF517293 的序列进行分析, 结果显示包含一个完整的编码 240 个氨基酸 (图 2) 的开放读码框, 具有典型的植物 *MAD-box* 基因的结构。其编码肽链具有两个保守结构域, 即 *MADS* 区 (1~61 位) 和 K- 区 (第 74~172 位), *MADS* 区和 K 区之间为 12 个氨基酸的间区 (I 区), 而 C- 端区域是含有鸟苷酸结合蛋白 (G 蛋白) 的 57 个氨基酸, 属于 MIKC 型 (崔永兰等, 2003)。其中包含了双向细胞核定位信号 2 个 (第 9~26 位、140~157 位)、酪氨酸激酶 II 磷酸化位点 7 个 (第 75~78 位、第 80~83 位、第 119~122 位、第 168~171 位、第 182~185 位、第 202~205 位和第 228~231 位)、肉豆蔻酰化位点 6 个 (第 58~63 位、第 128~133 位、第 174~179 位、第 199~204 位、第 223~228 位和第 229~234 位)、蛋白激酶 C 的磷酸化位点 5 个 (第 22~24 位、第 49~51 位、第 62~64 位、第 106~108 位和第 119~121 位)。该基

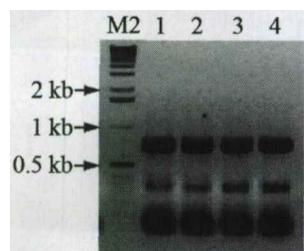


图 1 梯度 PCR 产物电泳结果

注: 1: 55.9 $^{\circ}$ C; 2: 56.7 $^{\circ}$ C; 3: 57.8 $^{\circ}$ C; 4: 59.3 $^{\circ}$ C; M2: 1 kb 分子量标记

Figure 1 DNA fragments amplified by gradient PCR

Note: 1: 55.9 $^{\circ}$ C; 2: 56.7 $^{\circ}$ C; 3: 57.8 $^{\circ}$ C; 4: 59.3 $^{\circ}$ C; M2: 1 kb ladder

```

1 ATGGGAAGAGGGAGAGTTGAATTGAAGAGGATTGAGAATAAGATAAAATCGTCAGGTGACC
  M G R G R V E L K R I E N K I N R Q V T
61 TTCTCAAAGAGGAGGAATGGGTTGTTGAAGAAAGCTTATGAGCTCTCGGTGCTTTGCGAC
  F S K R R N G L L K K A Y E L S V L C D
121 GTCGAGGTGGCGCTTATCGTGTTTTTCGAGCCGAGGGAAGCTCTATGAGTTGGGAGTGCT
  V E V A L I V F S S R G K L Y E F G S A
181 GGCACGAGTAAAA CACTTGAGCGATACCAGAGATGCTGTTACAGTTCACAGGATGGTACC
  G T S K T L E R Y Q R C C Y S S Q D G T
241 GTTGCCGACCGGAAATGCAGAGCTGGTACCAAGAAGTTTCCAAGTTGAAGGCAAATTC
  V A D R E M Q S W Y Q E V S K L K A K F
301 GAATCACTGCAACGCTCTCAGAGGCATT TGCTTGGAGAAGACCTTGGCCCATGAGCATT
  E S L Q R S Q R H L L G E D L G P L S I
361 AAAGAATTGCAACAGTTGGAGGGCCAAC TTGAATC TTCTCTTCCCAAGCTCGACAAAGA
  K E L Q Q L E G Q L E S S L S Q A R Q R
421 AAGACACAAATAATGCTGGATCAGATGGAAGAGCTTCGGAAGAAGGAACGCCGTCTTGG
  K T Q I M L D Q M E E L R K K E R R L G
481 GAAATCAA CAAGCAGCTTAAACAAAGCTTGAACAAGAAGTTCGCAATCTTGGAGCCATT
  E I N K Q L K T K L E Q E G A N L G A I
541 CAAAGTTCATGGGAAGCTGAAGCAGCAGTGGGAAATTCATACCAAATTCATCTGGGTCAA
  Q S S W F A E A A V G N S Y Q I H L G Q
601 TCCAGTGTATGGACTGTGAACCAACTCTACAAATAGGGTATCACCAATTTGTTCAACCT
  S S A M D C E P T L Q I G Y H Q F V Q P
661 GAAGCTGGCCTCCCAAGGAACACTGGCGGAGAGAAATAATTTTCATGCTTGGTTGGGTTCTT
  E A G L P R N T G G E N N F M L G W V L
721 TAG

```

图 2 BOMADS1 编码区核酸序列及其推导出的氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of BOMADS1

因命名为 *BOMADS1* (*MADS-box* gene 1 from *Bambusa oldhamii* L.)。此外,通过 DANSTAR 软件预测, *BOMADS1* 编码的蛋白质等电点和分子量分别为 8.626 和 27 272.0 Da。

2.2 氨基酸序列比较与系统进化树分析

通过 NCBI 在线 Blast 软件,将 *BOMADS1* 基因编码的蛋白与数据库中已知的序列进行比较分析,结果显示 *BOMADS1* 与石刁柏(*Asparagus officinalis*)的 AOM3 (AAQ83835)、藏红花 (*Crocus sativus*)的 AGL6a (ABK35281)、藏红花 (*C. sativus*)的 AGL6b (ABK35282)、百子莲 (*Agapanthus praecox*)的 SEP1 (BAC66964)和风信子 (*Hyacinthus orientalis*)的 SEP1 (AAT88088)等有着较高的一致性,都在 85% 以上。其中与石刁柏的 AOM3 一致性最高,达 87%。图 3 是 *NTMADS1* 编码的蛋白质与一致性靠前的 4 个不同物种蛋白质序列的 Clustal W 比较分析结果,可以看出氨基酸序列的 5' 端的 MADS 区高度保守, K 区 (第 74~172 位)比较保守,而 K 区的下游部分 C 末端的保守性则比较差。

在模式植物拟南芥的花发育 ABCDE 模型中, A 类基因控制萼片和花瓣的发育, B 类基因控制花瓣

和雄蕊的发育, C 类基因控制雄蕊和雌蕊的形成, D 类基因控制胚珠的发育, E 类基因则是与 ABC 三类共同对特定的花器官的发育进行调控。选取拟南芥中的一些典型的功能基因作对照,对 *BOMADS1* 基因进行系统进化树分析(图 4),结果表明 *BOMADS1* 与拟南芥(*Arabidopsis*)的 AGL6 亲缘关系最近,因此 *BOMADS1* 基因应属于 E 类功能基因。

3 讨论

从基因功能方面来说,与模式植物拟南芥的 *MADS-box* 基因家族的蛋白相比, *BOMADS1* 与拟南芥的 AGL6 (NP_182089)一致性最高,为 59%, AGL6 主要在花中表达,未成熟的果荚中表达有所减弱,在茎中也有微弱表达 (Ma et al., 1991)。本研究使用 RT-PCR 方法从绿竹叶片中分离到 *BOMADS1* 基因,因此推测 *BOMADS1* 基因为 E 类功能基因,但其具体的功能有待于进一步鉴定。

研究发现, *MADS-box* 基因在植物由营养生长向生殖生长的过程中具有调控功能 (Sheldon et al., 1999; Michaels and Amasino, 1999; Immink et al., 1999), 并已经被证明在植物的花、叶、种子及果实的

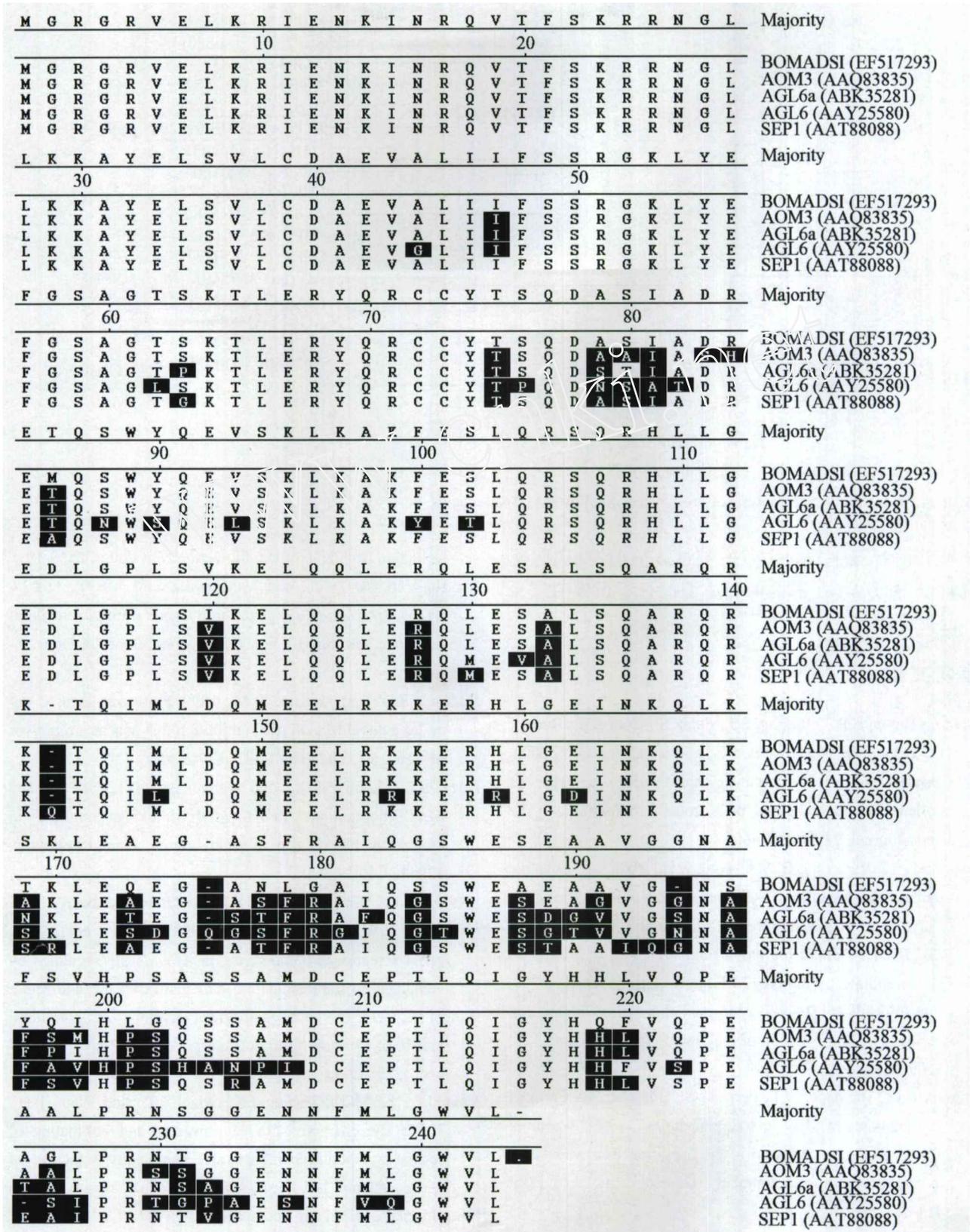


图3 BOMADS1 编码的氨基酸序列与其他物种 *MADS-box* 蛋白的序列比较

Figure 3 Alignment of BOMADS1 protein with other *MADS-box* proteins

发育中均发挥着重要的作用。本研究从绿竹叶片中分离到了可能对植物由营养生长向生殖生长过渡起

调控作用的 *MADS-box* 基因, 对于竹子这样非草非木、不易开花, 且开花后会大面积死亡的植物来说,

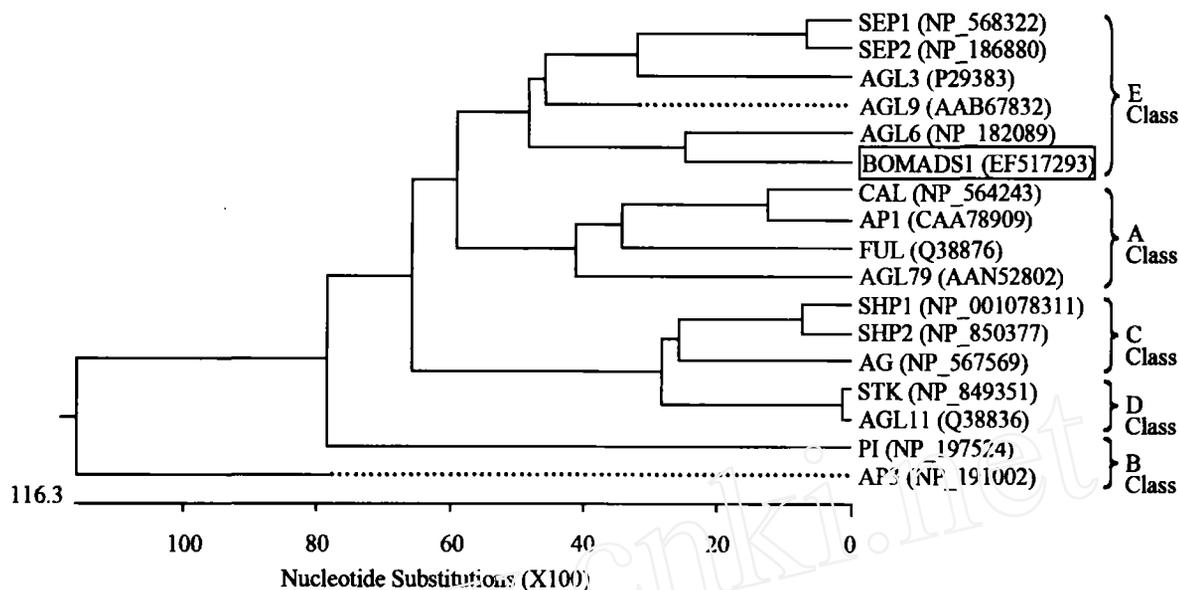


图4 *MADS-box* 基因编码蛋白的系统进化树分析
Figure 4 Phylogenetic tree analysis of proteins encoded by *MADS-box* genes

了解其由营养生长向生殖生长过渡的调控机制, 研究竹子 *MADS-box* 基因的表达调控有着积极的意义和应用价值。

参考文献

Alvarez-Buylla E.R., Liljegren S.J., Pelaz S., Gold S.E., Burgeff C., Ditta G.S., Vergara-Silva F., and Yanofsky M.F., 2000, *MADS-box* gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes, *The plant Journal*, 24(4): 457-466

Gao Z.M., Li X.P., Li L.B., and Peng Z.H., 2006, An effective method for total RNA isolation from bamboo, *Zhongguo Linye Keji (Chinese Forestry Science and Technology)*, 5 (3): 52-54 (Chinese Journal in English)

Gu Q., Ferrandiz C., Yanofsky M.F., and Martienssen R., 1998, The Fruitfull *MADS-box* gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development, *Development*, 125: 1509-1517

Immink R.G., Hannapel D.J., Ferrario S., Busscher M., Franken J., Campagne M.M.L., and Angenent G.C., 1999, A petunia *MADS-box* gene involved in the transition from vegetative to reproductive development, *Development*, 126 (22): 5117-5126

Liljegren S.J., Ferrandiz C., Alvarez-Buylla R., Pelaz S., and Yanofsky M.F., 1998, *Arabidopsis MADS-box* genes in-

involved in fruit dehiscence, *Flowering Newsletter*, 25: 9-19

Ma H., Yanofsky M.F., and Meyerowitz E.M., 1991, *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes, *Genes & Development*, 5: 484-495

Michaels S.D., and Amasino R.M., 1999, Flowering locus C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering, *The Plant Cell*, 11: 949-956

Perry S.E., Lehti M.D., and Fernandez D.E., 1999, The MADS-domain protein *AGAMOUS-like15* accumulates in embryonic tissues with diverse origins, *Plant Physiology*, 120: 121-130

Sheldon C.C., Burn J.E., Perez P.P., Metzger J., Edwards J.A., Peacock W.J., and Dennis E.S., 1999, The *FLF MADS-box* gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation, *The Plant Cell*, 11: 445-458

Weigel D., 1995, The genetics of flower development: from floral induction to ovule morphogenesis, *Annual Review of Genetics*, 29: 19-39

Yuan J.L., Fu M.Y., Zhuang J.K., Xiao X.T., and Wang P.H., 2005, The characteristics of flowering and pollinating of several sympodial bamboos and elementary selection of *dendrocalamus lactiflorus* seedlings, *Zhuzi Yanjiu Huikan (Journal of Bamboo Research)*, 24(3): 9-13 (袁金玲, 傅懋毅, 庄金坤, 肖贤坦, 王品华, 2005, 几个丛生竹开花授粉特性及麻竹苗期初步选择, *竹子研究汇刊*, 24(3): 9-13)