

葡萄花发育基因的亚细胞定位和表达分析

杨 光¹, 曹 雪¹, 房经贵¹, 黄振喜², 陶建敏¹, 王 晨¹

(¹南京农业大学园艺学院/江苏省果树品种改良与种苗繁育工程中心, 南京 210095; ²山东德州学院农学系, 山东德州 253023)

摘要: 【目的】分离和克隆葡萄品种‘香悦’ *Vitis vinifera* AGAMOUS (*VvAG*)、*Vitis vinifera* APETALA 3 (*VvAP3*)、*Vitis vinifera* FLOWERING LOCUS C (*VvFLC*)、*Vitis vinifera* FRUITFUL (*VvFUL*)、*Vitis vinifera* FLOWERING LOCUS T (*VvFT*)、*Vitis vinifera* APETALA2 (*VvAP2*) 和 *Vitis vinifera* SUPPRESSOR OF OVER EXPRESSION OF CO 1 (*VvSOCI*) 7 个重要花发育相关基因的 ORF 序列, 并对其进行亚细胞定位与表达分析。【方法】采用特异引物 RT-PCR 方法克隆基因, 并用半定量 PCR 法研究各基因在不同组织的表达, 构建亚细胞定位载体, 基因枪转化洋葱表皮细胞, 25℃暗培养 24 h 后激光共聚焦显微镜下观察。【结果】对上述基因在葡萄不同组织器官中的表达水平进行分析发现, 它们的表达不存在组织器官的特异性, 但有表达强弱差异。其中, *VvFT*、*VvFUL*、*VvAP3* 在葡萄幼果中表达量最高, *VvAG* 与 *VvAP2* 在花中表达量最高, 而 *VvSOCI* 与 *VvFLC* 在幼叶中表现出最高的表达水平。*VvSOCI*、*VvFT*、*VvFLC* 和 *VvAP2* 与 GFP 融合蛋白仅在核内产生绿色荧光, 表现出转录因子的典型特点; 而 *VvAG*、*VvFUL* 和 *VvAP3* 与 GFP 融合蛋白在细胞质膜和细胞核上均产生绿色荧光信号。【结论】这 7 个基因与葡萄的花与果实以及营养器官的发育都存在相关性, 7 个葡萄花发育相关的转录因子都呈现出细胞核内作用的特点, 但 *VvAG*、*VvFUL* 和 *VvAP3* 也表现出在细胞膜区域定位的现象。

关键词: 葡萄; 花发育; 亚细胞定位; 表达分析; *VvAG*; *VvAP3*; *VvFLC*; *VvFUL*; *VvFT*; *VvAP2*; *VvSOCI*

Sub-Cellular Localization and Expression Analysis of Genes Involved in Grapevine Floral Development

YANG Guang¹, CAO Xue¹, FANG Jing-gui¹, HUANG Zhen-xi², TAO Jian-min¹, WANG Chen¹

(¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University/Fruit Crop Variety Improvement and Seedling Propagation Engineering Center of Jiangsu Province, Nanjing 210095; ²Department of Agronomy, Dezhou College, Dezhou 253023, Shandong)

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to isolate the open reading frame sequence of *Vitis vinifera* AGAMOUS (*VvAG*), *Vitis vinifera* APETALA 3 (*VvAP3*), *Vitis vinifera* FLOWERING LOCUS C (*VvFLC*), *Vitis vinifera* FRUITFUL (*VvFUL*), *Vitis vinifera* FLOWERING LOCUS T (*VvFT*), *Vitis vinifera* APETALA2 (*VvAP2*) and *Vitis vinifera* SUPPRESSOR OF OVER EXPRESSION OF CO 1 (*VvSOCI*) from ‘Xiangyue’, one of the most popular table grape cultivars, and for some preliminary study on their functions. 【Method】Specific primers RT-PCR method was used to clone genes, and semi-quantitative PCR was used to analyze the expression of genes in different organs and tissues. Recombinant plasmid was introduced into onion epidermal cells by the particle bombardment method with a PDS1000/He. Transformed cells were incubated for 24 h at 25℃ in the dark and green fluorescence was monitored under a Laser scanning confocal microscope. 【Result】The expression results of the genes in different tissues showed that they were expressed ubiquitously in all the organs and tissues, but the expression levels were some different. *VvFT*, *VvFUL* and *VvAP3* were expressed highest in young fruit, *VvAG* and *VvAP2* highest in flower, and *VvSOCI* and *VvFLC* highest in young leaves. *VvSOCI*, *VvFT*, *VvFLC* and *VvAP2* combined with GFP were only located in nucleus of onion epidermal

收稿日期: 2010-03-30; 接受日期: 2010-11-04

基金项目: 江苏省科技支撑项目(BE2010326)、第 36 批留学回国科研启动基金项目

联系方式: 杨 光, E-mail: yangg0612@163.com. 通信作者房经贵, Tel: 025-84399069; E-mail: fanggg@njau.edu.cn

cell, which showed typical characteristics of transcription factor; however, VvAG, VvFUL and VvAP3 combined with GFP were located in both the plasma membrane and nucleus. 【Conclusion】 All these genes were involved in the developments both of reproductive and vegetative organs, and showed the nucleus location phenomena by combining with GFP except that VvAG, VvFUL, and VvAP3 showed signal at plasma membrane.

Key words: grapevine; flower development; sub-cellular localization; expression analysis; VvAG; VvAP3; VvFLC; VvFUL; VvFT; VvAP2; VvSOC1

0 引言

【研究意义】随着生命科学的不断发展, 功能基因组研究已经成为重要的研究课题。功能基因组学代表基因分析的新阶段, 是在结构基因组学提供的信息基础上, 应用高通量的试验分析方法并结合统计和计算机分析来研究基因的表达、调控与功能, 基因间、基因与蛋白质之间和蛋白质与底物、蛋白质与蛋白质间的相互作用以及生物的生长、发育等规律, 把从不同水平研究基因功能得到的数据进行系统整合, 获得植物基因活动的复杂网络蓝图^[1]。基因表达产物在组织中的亚细胞定位是蛋白质组学研究的重要信息, 也是功能基因组学研究的重要内容之一。基因亚细胞定位研究是系统理解植物形态建成、生长发育以及对逆境的耐受性和抵抗性不可缺少的环节, 是分析蛋白质正确行使其功能的前提, 也是研究者初步推断蛋白质生物学功能的重要信息的重要措施之一^[2], 因此成为生物学家们研究的重要内容之一。本研究首次利用同一试验体系对 7 个基因的亚细胞定位和表达进行研究, 为探讨葡萄花发育的分子机理和认识相关基因在葡萄生长发育过程中的作用以及后续研究奠定基础。

【前人研究进展】目前对植物蛋白的亚细胞定位方法较多, 应用较普遍的主要有借助于报告基因表达产物的特性来实现目标蛋白定位的融合报告基因定位法, 近年来绿色荧光蛋白 (GFP) 被应用于活体定位观察、蛋白质定位、细胞间物质运输及运输的动力学研究^[3]。当 GFP 在真核细胞或原核细胞中表达时, 如受到蓝光或紫外光的照射, 会产生一种明亮的绿色荧光。GFP 作为一种新的报告系统, 在基因表达和蛋白质定位的研究中得到了广泛的应用^[4], 利用该方法已成功地应用于大量的植物研究^[5-8]。开花是植物从营养生长向生殖生长的转变过程。开花相关基因的表达与作用是实现这一转变的基础, 环境因子以及细胞自身的生长状况对这些基因的表达起着调控作用^[9]。在对拟南芥花发育的研究中发现, AG 在 3、4 轮中表达, 当雄蕊、雌蕊原基发生形态分化后, 其表达局限于雄蕊、雌蕊

的特定细胞类型中。AG 基因的主要功能有: 决定生殖器官的发育, 在花发育的早期决定雄蕊和雌蕊的发育, 后期决定正确的细胞分化; 决定花分生组织的终止性; 抑制 AP2 在内两轮的表达^[10-12]。AP2 可使花分生组织早期建立, AP2 和 AP1 共同使萼片花瓣特异化。AP2 抑制 AG 在花萼和花瓣中的表达^[13]。FT (FLOWERING LOCUS T) 是光周期途径植物开花时间决定关键基因, FT 在 SOC1 的上游, 对 SOC1 有正调控作用, 并认为 FT 基因的表达产物可能就是人们长期追寻的开花刺激物质, 即开花素 (florigen) FT (FLOWERING LOCUS T) 基因最初在叶片中表达, 并不定位于开花发端的茎顶端特异区域^[14-16]。虽然春化作用调控的具体机理还不明了, 但从基因调控的水平可以肯定, 春化途径是通过抑制 FLC (FLOWERING LOCUS C) 的表达来促进开花的, 在 FLC 抑制途径中, VRN (VERNALIZATION) 类基因和 HOS1 (HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1) 基因抑制 FLC 的表达, FRI (FRIGIDA) 基因促进 FLC 的表达。所有这些基因效应都会间接地作用于 SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS) 和 FT, 在叶中影响 SOC1 和 FT 的表达, 最终达到促进或抑制开花的目的; 但是在顶端分生组织的情况却恰好相反, FLC 的表达会受到 FT 表达的抑制^[17-20]。在长光照途径中起作用的基因是 CO (CONSTANS), 其直接靶基因是属于 MADS-box 基因家族的 SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1), CO 突变会导致植物推迟开花。非长光照依赖途径的调控与植物中的赤霉素相关, 它通过激活 LFY 类基因来完成对开花的调控。在这 3 种调控途径中均有 MADS-box 基因的参与, 尤其是 SOC1 在以上 3 个开花调控途径中均参与并发挥作用, 因此可以说 MADS-box 基因是调控开花时间的一个重要因子^[21]。在已研究确立的 ABC 模型中^[22-23], 大多数基因属于 MADS-Box 基因家族, MADS-box 基因是一类结构保守的基因, 是广泛存在于植物中序列特异的同源异型基因。它所编码的 MADS-box 蛋白质是一

种转录因子, 具有高度保守的 MADS-Box 结构域和半保守的能形成螺旋卷曲的 K 区^[24]。在生物体中通过调节其它基因的转录来发挥其调控作用^[25]。花的发育受多个途径的调控, 并且形成一个复杂的网络。在该调控网络中, 一些转录因子或者通过和其它转录因子共同作用或者直接结合到靶基因的调控区, 激活或抑制下游基因的表达, 从而调节花的发育^[26]。植物中 MADS-box 基因的功能主要是调控植物花的发育和果实的成熟, 研究 MADS-box 基因功能及其作用的分子机制, 不仅有生物学意义, 而且某些重要功能基因还可能应用于作物分子育种实践, 用遗传操作技术培育优良的作物品种。【本研究切入点】在充分利用葡萄分子生物学研究条件的基础上, 本试验有目的地对葡萄 *VvAG*、*VvAP3*、*VvFLC*、*VvFUL*、*VvFT*、*VvAP2*、*VvSOC1* 等 7 个花发育相关基因进行亚细胞定位研究。克服不同试验体系在所利用葡萄品种、取样方式与时间以及试验条件等方面的影响, 利用相同试验体系同时对上述葡萄重要基因在葡萄不同器官中的表达进行分析。【拟解决的关键问题】利用同一试验体系研究葡萄成花途径网络中多个重要基因在葡萄生长发育过程中的表达情况, 了解基因的亚细胞定位功能, 为更深入研究葡萄乃至其它果树成花机理以及调控措施奠定基础, 丰富葡萄分子生物学研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 供试葡萄品种为‘香悦’。‘香悦’是由辽宁省农业科学院葡萄实验园以‘沈阳玫瑰’(7601)为母本, 用‘紫香水’优良芽变(8001)作父本, 采取有性杂交方法选育成功的欧美杂种四倍体鲜食葡萄品种, 它具有优质、大粒、高产、抗病、广适等特点, 2004 年在辽宁省种子管理局登记注册^[27]。植物样品材料取自江苏省南京市江宁区汤山果园—南京农业大学实验基地, 分别于 2009 年 5 月份采取未展开的花蕾与开放花; 6—7 月份采取 20 个节位长的枝条上第 17、18 节位的幼叶, 7、8 节位的成熟叶, 1、2 节位的老叶; 直径约 0.6、1.4、2.1 cm 的幼果、中果与大果。

1.1.2 质粒、菌株和试剂 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 由本实验室保存。亚细胞定位载体 pJIT166-GFP 由南京农业大学作物遗传与育种国家重点实验室惠赠。PowerScript IITM 反转录酶购自 Clontech 公司, DNase 酶 I、Ex Taq 酶、pMD18-T

simple 载体、dNTP、DNA Marker、*Hind* III、*Bam*HI、*Sal* I 和 *Xba* I 购自 TaKaRa 公司, Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司, T₄ DNA 连接酶购自 Promega 公司, DNA 回收试剂盒、DL 2000 Plus DNA Marker 为北京金式金生物技术有限公司生产, 所用引物由上海英俊生物技术有限公司 (Invitrogen) 合成, 其编号及序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取与纯化 葡萄各组织总 RNA 的提取采用 CTAB 法^[28-29]。mRNA 的纯化采用 Promega 公司生产的 PloyATtract[®] mRNA Isolation System IV 试剂盒进行。

1.2.2 cDNA 合成 以 mRNA 为模板, 引物 P01 反转录合成 cDNA 第 1 条链, 引物 P02 延伸加帽子, 空气加热条件下 42℃ 保温 1 h, 75℃ 保温 10 min, 冰上冷却 2 min 后, -70℃ 保存备用。

1.2.3 基因 ORF 的扩增 根据其在拟南芥成花途径网络^[30]中的位置推测, 本文所研究 7 个葡萄花发育相关的基因其可能在葡萄成花途径中也处于中游或下游, 已根据 GenBank 上发表的基因序列, 选择保守区域设计引物以 cDNA 为模板利用 RACE 技术和 PCR 扩增获得 6 个基因的 3' 末端和 2 个基因的完整 ORF^[31]。本研究则是在已有试验基础上利用 PCR 方法获得 ORF 用于亚细胞定位分析, 即以 cDNA 为模板用特异引物进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μ L: cDNA 2 μ L, 10 pmol $\cdot\mu$ L⁻¹ 的引物各 1 μ L, 10 \times Ex Buffer 5 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ 的 dNTP Mixture 5 μ L, Ex Taq 酶 0.25 μ L, 用灭菌纯水补足到 50 μ L。反应参数为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 45 s、T_m 45 s、72℃ 1 min、35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测后回收目标片段进行 TA 克隆, 由上海博亚生物技术有限公司完成测序。

1.2.4 亚细胞定位载体的构建 分别以 *VvAG*、*VvAP3*、*VvFLC*、*VvFUL*、*VvFT*、*VvAP2*、*VvSOC1* 基因的 ORF 正确的克隆提取质粒, 分别经 *Hind* III 和 *Bam*HI、*Sal* I 和 *Bam*HI、*Hind* III 和 *Sal* I、*Hind* III 和 *Xba* I、*Hind* III 和 *Xba* I、*Hind* III 和 *Sal* I、*Hind* III 和 *Sal* I 双酶切, 用 T₄ DNA 连接酶连接到 pJIT166-GFP 载体, 得到 GFP/基因融合表达载体 (图 1), 转入 DH5 α , PCR、酶切筛选阳性克隆, 并对阳性克隆进行测序验证。

1.2.5 基因枪法转化洋葱表皮细胞

1.2.5.1 微粒子子弹的制备 DNA 的钨粉包埋按照

表 1 引物序列及 PCR 扩增片段大小
Table 1 Sequence of primers and sizes of PCR amplified products

| 编号 Code No | 序列 Sequence (5'-3') | 片段大小 Size of amplified product (bp) | 用途 Use | 登录号 Accession No. |
|---------------|---|---|----------------------------|-------------------------|
| P01 | GCAGGACTGCAGCTGACTGACTACT ₃₀ VN | | cDNA 合成 | |
| P02 | GACCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG | | cDNA synthesis | |
| AG-1 | <u>AAGCTT</u> ATGGGAAGGGGGAAGATCGAGAT | 681 | VvAG 基因 ORF 扩增 | GU133631 |
| AG-2 | <u>GGATCC</u> TAAACTAATTGAAGAGCTGGTTGGTC | | Complete ORF amplification | |
| AP3-1 | <u>GTCGAC</u> ATGGCTAGAGGAAAGATTGAGAT | 681 | VvAP3 基因 ORF 扩增 | GU133632 |
| AP3-2 | <u>GGATCC</u> TACTCGAGCAAAGTAAAGGTCA | | Complete ORF amplification | |
| FLC-1 | <u>AAGCTT</u> ATGGGTAGGAAGAAGGTCTGAACTG | 633 | VvFLC 基因 ORF 扩增 | GU133630 |
| FLC-2 | <u>GTCGAC</u> TACCTCTAAGCAAGGAAAGGGTT | | Complete ORF amplification | |
| FUL-1 | <u>AAGCTT</u> ATGGGGAGAGGAAGGGTTCAGTT | 744 | VvFUL 基因 ORF 扩增 | GU133635 |
| FUL-2 | <u>TCTAGA</u> TTATTGATTGACGTGGCGCAGCA | | Complete ORF amplification | |
| FT-1 | <u>AAGCTT</u> ATGCCTAGGGAAGGGATCCTCT | 525 | VvFT 基因 ORF 扩增 | GU133629 |
| FT-2 | <u>TCTAGA</u> TTATGATCTTCGACCACCCGAGC | | Complete ORF amplification | |
| AP2-1 | <u>AAGCTT</u> ATGTGGGATCTCAACGACTCGCCTGAT | 1536 | VvAP2 基因 ORF 扩增 | FJ809943 |
| AP2-2 | <u>GTCGAC</u> TCAGGAGGGTCTGATGAGAGAGTGGAACC | | Complete ORF amplification | |
| SOC1-1 | <u>AAGCTT</u> ATGGTGAGAGGAAAGACTCAAATGAGGCG | 657 | VvSOC1 基因 ORF 扩增 | GU133633 |
| SOC1-2 | <u>GTCGAC</u> CAGTTTCCAATAGGAGGCGCTTGG | | Complete ORF amplification | |
| UBI-1 | GCTCGCTGTTTTGCAGTTCTAC | 150 | 扩增 UBI | |
| UBI-2 | AACATAGGTGAGGCCGCACTT | | UBI amplification | |
| AG-3 | TGTGGGGATGATCTAGTGCC | 137 | 半定量 RT-PCR | |
| AG-4 | GACCTATGCCCATCAACAAAGA | | Semi-Quantitative RT-PCR | |
| AP3-3 | CAGGCAAACAATCATCCAGA | 143 | 半定量 RT-PCR | |
| AP3-4 | ACCTCCCGCTGTCAAGTTAC | | Semi-Quantitative RT-PCR | |
| FLC-3 | AGTGGAAGGCCAAGTGTTTG | 168 | 半定量 RT-PCR | |
| FLC-4 | TACAGCTCCTGCTTGATTCTG | | Semi-Quantitative RT-PCR | |
| FUL-3 | AGTCCCAATACCCTCATGCCACC | 135 | 半定量 RT-PCR | |
| FUL-4 | GGGGCATTAAAGACTTGCTGAC | | Semi-Quantitative RT-PCR | |
| FT-3 | GTGTTAGCCTAAACCAAGCT | 124 | 半定量 RT-PCR | |
| FT-4 | ACGATTCATTAAGACCGAAAG | | Semi-Quantitative RT-PCR | |
| AP2-3 | AGCCCCACCATACCATGTAA | 120 | 半定量 RT-PCR | |
| AP2-4 | CCTCTTCATATCCCCAACA | | Semi-Quantitative RT-PCR | |
| SOC1-3 | GTCCATGCTCAGCAACACTG | 171 | 半定量 RT-PCR | |
| SOC1-4 | GCAGGGCAATTTACATCAT | | Semi-Quantitative RT-PCR | |

下划线为添加的酶切位点，AAGCTT 为 *Hind* III，GGATCC 为 *Bam*H I，GTCGAC 为 *Sal* I，TCTAGA 为 *Xba* I
AAGCTT、GGATCC、GTCGAC、TCTAGA underlined in primers indicates restriction enzyme sites of *Hind* III, *Bam*H I, *Sal* I and *Xba* I

Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System 的方法^[32]。取钨粉悬液 50 μL (50 mg·mL⁻¹)，加入 50 μLCaCl₂ (2.5 mol·L⁻¹)，20 μL 亚精胺 (0.1 mol·L⁻¹)，5 μg 的 35S-GFP/基因载体质粒充分混匀，12 000 r/min

离心 1 min，冰上静置 15 min，分别用 70%乙醇和无水乙醇洗涤沉淀 1 次，重新悬浮沉淀于 50 μL 无水乙醇中。

1. 2. 5. 2 轰击受体材料 将幼嫩的洋葱表皮摆放在在

MS 高渗培养基上, 25℃ 预培养 4 h。选用 1 100 psi 的压力膜, 将 20 μ L 钨粉 DNA 混合物点在轰击膜中央, 洋葱表皮 (约 1 cm \times 1 cm 的小块) 放在 10 g \cdot L $^{-1}$ 琼脂培养基上, 采用 PDS1000/He 型基因枪 (Bio-Rad) 进行轰击, 轰击距离 6 cm, 真空度为 25 In-Hg。轰击后的洋葱表皮细胞 25℃ 暗培养 24 h 后制片, 于激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP2) 下观察细胞中的荧光。将转化后的洋葱表皮用 20% 蔗糖进行质壁分离处理后, 再分别用蓝光 (395 nm) 和紫外光激发成像, 选用 B (IF2490) 激发滤光器, 用 PM230 全自动显微照相装置拍照。

1.2.6 半定量 RT-PCR 分别提取 ‘香悦’ 葡萄幼叶、成熟叶、老叶、花蕾、花、幼果、中果、大果的总 RNA, 用 DNase I 酶 (RNase free) 消化和氯仿抽提后分别取 2 μ g 以 P01 和 P02 引物反转录合成的 cDNA 作模板, 为确保半定量 RT-PCR 的特异性, 引物设计在每个基因的 3' 非翻译区 (3'UTR)。葡萄看家基因 UBI 为内参进行半定量 RT-PCR, 目的基因的引物见表 1。反应条件为: 94℃ 变性 3 min 后进入循环: 94℃ 变性 30 s, T_m 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 28 个循环后, 72℃ 终延伸 5 min。UBI 反应程序条件与扩增目的基因的条件相同。本研究中, 随机对部分样品半定量 RT-PCR 的扩增产物进行回收、克隆与测序。

2 结果

2.1 基因 ORF 的克隆结果

根据已克隆的 *VvAG*、*VvAP3*、*VvFLC*、*VvFT*、*VvSOCI*、*VvAP2*、*VvFUL* 等 7 个基因序列设计特异引物, 以 ‘香悦’ 葡萄花序 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增出其 ORF 片段, 将得到的基因的 ORF 区连接于 pMDTM18-T Simple Vector 载体后测序, 结果显示所得各个基因的 ORF 序列与作者已登录的序列完全一致, 基因 ORF 区片段大小与登录号见表 1。

2.2 七个基因表达载体的构建与亚细胞定位

2.2.1 七个基因表达载体的构建 分别以 2.1 中 7 个基因的 ORF 正确的克隆提取质粒, 经相应的两种限制性内切酶 (表 1) 双酶切并电泳, 分别回收目的基因; 同时, 用相同的限制性内切酶消化表达载体 pJIT166-GFP, 并电泳回收切除空载体, 最后用 T₄ DNA 连接酶将目的基因分别与空载体相连得到融合表达载体, 连接产物分别转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 对单菌落进行 PCR 检测, 酶切筛选阳性克隆, 并对阳性克隆进行测序, 序列分析表明插入片段与预期序列

完全一致, 表明载体构建成功 (图 1)。

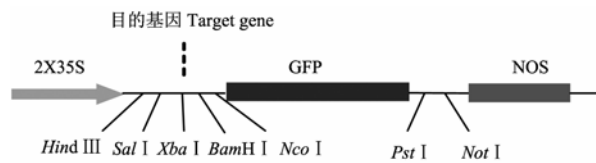


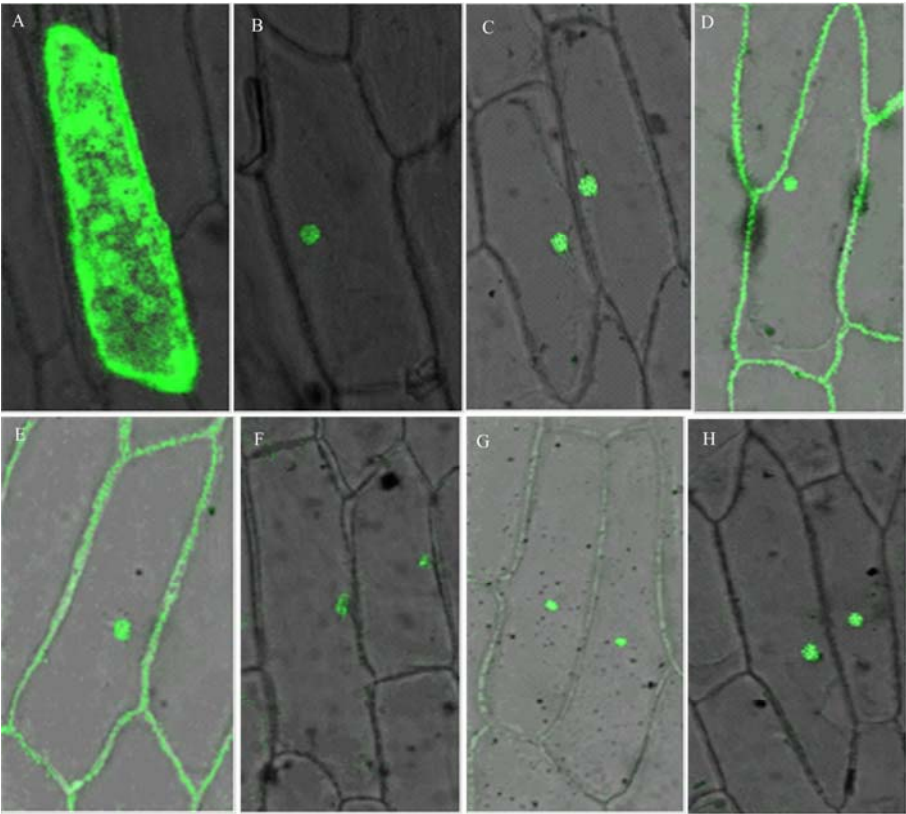
图 1 表达载体的构建

Fig. 1 Construction of expression vector

2.2.2 七个基因在洋葱表皮细胞内的分布 利用 GFP 作为标签时不能改变它的开放阅读框, 所以在构建融合基因表达载体后需要测序检测融合是否正确。本试验在融合基因表达载体构建完成后, 对载体目标区域的测序结果表明融合基因载体构建正确。细胞中蛋白质合成后被转运到特定的细胞器中, 只有转运到正确的部位才能参与细胞的各种生命活动^[33]。为了确定花发育相关基因表达的蛋白在细胞中发挥功能的具体部位, 构建了绿色荧光蛋白与基因的融合表达载体, 利用基因枪法将绿色荧光蛋白 (GFP) 基因转化到洋葱表皮细胞中, 获得高效瞬时表达, 绿色荧光蛋白在 475 nm 蓝光激发下产生 509 nm 的绿色荧光。对照 GFP 蛋白无核定位功能, 可经过核孔复合物扩散进入细胞核, 从而在细胞核内和细胞质中都可以观察到清晰的 GFP 的绿色荧光信号 (图 2-A)。本研究将 7 个基因 ORF 分别插入到 35S 启动子和绿色荧光蛋白基因之间形成融合蛋白, 根据 7 个基因编码蛋白的功能性质, 理论上它们都应该定位于细胞核 (表 2)。试验研究结果基本与预期的情况相符, 如 *VvSOCI*、*VvFT*、*VvFLC* 和 *VvAP2* 与 GFP 融合蛋白仅在核内产生绿色荧光。但是也存在特殊的情况, 如 *VvFUL* 和 *VvAP3* 与 GFP 融合蛋白不仅在细胞核上产生绿色荧光, 在细胞质膜上也观察到荧光, *VvAG* 与 GFP 融合蛋白在细胞核上产生绿色, 在细胞质膜上也有微弱荧光, 表明这 3 个基因除了发挥转录因子的主要功能外, 可能对细胞质膜的稳定和控制蛋白转运也具有一定的保护作用。

2.3 七个基因在葡萄不同器官组织中的表达分析

为确定 7 个基因在葡萄不同器官组织的表达模式与时空性, 利用来自不同发育阶段葡萄不同器官的 cDNA 作为 PCR 模板, 以葡萄中的 UBI 基因为内参, 进行半定量 RT-PCR, 各基因的表达情况见图 3 与表 3。结果显示, *VvSOCI* 在幼叶、幼果中表达量高, 在老



A: GFP B: VvSOC1 C: VvFT D: VvFUL E: VvAP3 F: VvFLC G: VvAG H: VvAP2

图 2 七个基因在洋葱表皮细胞中的定位

Fig. 2 Subcellular localization of seven grapevine genes protein in onion epidermal cells

表 2 七个葡萄基因在洋葱表皮细胞中的定位结果

Table 2 Sub-cellular localization results of seven genes in onion epidermal cells

| 基因 | 基因功能 | 亚细胞定位预测 | 试验结果 |
|--------|---------------------------|---|--------------------------------------|
| Gene | Gene function | Prediction of sub-cellular localization | Experimental results |
| VvAG | 转录因子 Transcription factor | 细胞核 Nucleus | 细胞质膜和细胞核 Plasma membrane and nucleus |
| VvAP3 | 转录因子 Transcription factor | 细胞核 Nucleus | 细胞质膜和细胞核 Plasma membrane and nucleus |
| VvFLC | 转录因子 Transcription factor | 细胞核 Nucleus | 细胞核 Nucleus |
| VvFT | 整合因子 Integration factor | 细胞核 Nucleus | 细胞核 Nucleus |
| VvSOC1 | 转录因子 Transcription factor | 细胞核 Nucleus | 细胞核 Nucleus |
| VvAP2 | 转录因子 Transcription factor | 细胞核 Nucleus | 细胞核 Nucleus |
| VvFUL | 转录因子 Transcription factor | 细胞核 Nucleus | 细胞质膜和细胞核 Plasma membrane and nucleus |

叶和花中表达量低；VvFT 在果中表达量高，在幼叶中表达量低，在老叶中无表达，开花素基因 FT 转录本或蛋白是怎样完好无损地从叶传输到茎顶端分生组织值得进一步研究；VvFUL、VvAP3 在幼果中表达量高，VvFLC 在叶片中表达量高，在花中低；VvAG 在花与

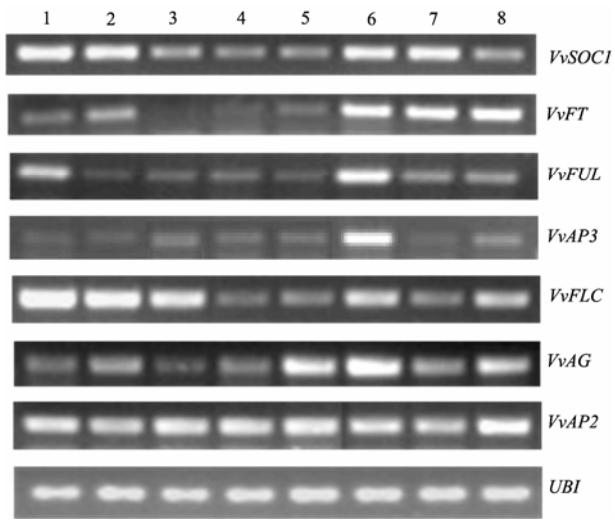
幼果中表达量最高，说明该基因不仅与花器官形成有关，与果实发育也有密切关系；VvAP2 在花中表达量最高，在其它器官也均有高表达，说明这 7 个基因不仅跟葡萄的花与果实发育过程有关，而且与营养器官的发育有密切关系。

表 3 半定量 RT-PCR 检测 7 个基因在葡萄不同器官中的表达结果

Table 3 Expression results of seven genes in different tissues of grapevine by semi-quantitative RT-PCR

| 基因 Gene | 幼叶 Young leaf | 成熟叶 Mature leaf | 老叶 Old leaf | 花蕾 Flower bud | 花 Flower | 幼果 Young fruit | 中果 Medium fruit | 大果 Big fruit |
|---------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|-------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| <i>VvSOC1</i> | he | he | me | le | me | he | he | me |
| <i>VvFT</i> | le | me | ne | le | le | he | he | he |
| <i>VvFUL</i> | me | le | le | le | le | he | me | me |
| <i>VvAP3</i> | le | le | me | me | me | he | le | me |
| <i>VvFLC</i> | he | he | he | le | le | me | le | me |
| <i>VvAG</i> | le | me | le | me | he | he | me | me |
| <i>VvAP2</i> | me | me | me | me | he | me | le | he |

he 表示表达量高，le 表示表达量低，me 表示表达量中等，ne 表示无表达
he high expression, le low expression, me moderate expression, ne no expression



1、2、3、4、5、6、7、8 分别为幼叶、成熟叶、老叶、花蕾、花、幼果、中果、大果
1: Young leaf; 2: Mature leaf; 3: Old leaf; 4: Flower bud; 5: Flower; 6: Young fruit; 7: Medium fruit; 8: Big fruit

图 3 半定量 RT-PCR 检测 7 个基因在葡萄不同器官中的表达

Fig. 3 Expression of seven genes in different tissues of grapevine by semi-quantitative RT-PCR

3 讨论

人类进入功能基因组时代后，大量动物、植物和微生物的功能基因相继被克隆。在进行基因功能的研究过程中，由于有些植物生长周期短、转基因技术成熟或者转基因过程简单易操作如烟草、拟南芥等，它们常被用作试验材料进行外源功能基因的亚细胞定位，加快了功能基因的研究进程。近年来，一些新方

法的应用如将定位载体经金粉或钨粉包埋利用基因枪轰击法，在洋葱表皮实现蛋白的亚细胞定位^[5-6]。

尽管植物花发育相关基因是植物界中相对保守的基因，但是它们与模式植物或同一物种的不同品种间的同源基因存在碱基与 AA 序列上的变化^[31]，这些基因是否都具备与其同源基因类似的功能需要进一步的研究。由于在生命活动中真正起作用的是基因的表达产物—蛋白质，而蛋白质的功能与其在细胞中的亚细胞定位密切相关，尤其是对于真核细胞，蛋白质位于细胞的不同部位所行使的功能也不同，因此对蛋白质进行亚细胞定位是研究其功能必不可少的环节之一^[34]。为了确定葡萄花发育相关基因蛋白在细胞中的存在位置，本试验首次以重要葡萄栽培品种‘香悦’为试材，通过 GFP 标记方法研究了 *VvAG*、*VvAP3*、*VvFLC*、*VvFT*、*VvSOC1*、*VvAP2*、*VvFUL* 7 个基因的亚细胞定位特性。研究结果表明，*VvSOC1*、*VvFT*、*VvFLC* 和 *VvAP2* 与 GFP 融合蛋白定位于细胞核上，发挥了转录因子的功能，即能与 DNA 结合而调控 DNA 的转录，转录是在细胞核中完成的，因此蛋白最终定位于细胞核。*VvFUL* 和 *VvAP3* 与 GFP 融合蛋白定位于细胞质膜和细胞核上，说明这两种蛋白既有转录因子的功能，又对细胞质膜的稳定具有保护作用，*VvAG* 与 GFP 融合蛋白主要定位于细胞核上，在细胞质膜上有微弱荧光，膜上的蛋白质主要有载体蛋白、与细胞活动相关的离子泵、通道蛋白和蛋白受体等，表明该基因主要发挥了转录因子的功能，但对细胞质膜的稳定或控制蛋白转运也具有一定的作用^[33, 35-36]。

大量的研究显示，半定量 RT-PCR 结果与定量 RT-PCR 结果表现出高度一致性^[37-39]，这是由于两者的基本原理是一致的。前者是利用了某一个合适的

PCR 反应阶段进行 PCR 扩增产物量的比较,后者则是利用了达到某一 PCR 扩增产物量所需要的 PCR 反应次数。事实上,半定量 RT-PCR 结果更为直观,且具有较高的可靠性,而定量 RT-PCR 由于技术与仪器的原因往往存在一些非预见性的问题。利用半定量 RT-PCR 方法进行基因表达研究一直是重要的技术措施^[40-43]。本研究采用半定量 RT-PCR 方法对 7 个葡萄花发育相关重要基因表达特性的研究表明, *VvSOC1*、*VvFUL*、*VvAP3*、*VvFLC*、*VvAG*、*VvAP2* 在各个器官均有表达,但表达量不同,说明这几个基因对于葡萄营养与生殖器官的发育都具有一定作用,但作用的大小可能存在着差异,均能表达也反映了基因编码的蛋白是一种普遍的转录因子,可能在葡萄生长阶段的转变、花器官形成乃至果实发育等整个生长发育阶段都起着重要作用。*VvFLC* 在幼叶、幼果中表达量最高,这与拟南芥 *FLC* 基因主要在其分裂活跃的组织中表达,其表达量与对开花的抑制程度呈正相关^[44]、在叶中 *FLC* 的表达会抑制 *FT* 的表达^[17-19]结果相似。*VvFT* 在果实中检测到了较高量的表达,*Kobayashi* 研究结果显示^[45], *FT* 在未成熟长角果中比花芽中表达量高。这种模式和葡萄中相似,在花及果实中检测到 *VvFT* 的表达,说明 *VvFT* 基因的功能除与开花相关,可能在果实发育中也承担重要的角色。

4 结 论

利用相同试验体系对 7 个重要的葡萄花发育相关基因的亚细胞定位及时空表达情况的研究结果表明,7 个葡萄花发育相关的基因与 GFP 的融合蛋白产物都在核内产生绿色荧光,体现出其转录因子作用的特点。但是 *VvAG*、*VvFUL* 和 *VvAP3* 也表现出在细胞膜区域定位的现象。7 个基因在葡萄中的表达不存在组织器官的特异性,但有表达强弱差异。其中, *VvFT*、*VvFUL*、*VvAP3* 在葡萄幼果中表达量最高, *VvAG* 与 *VvAP2* 在花中表达量最高,而 *VvSOC1* 与 *VvFLC* 在幼叶中表现出最高的表达水平。这些基因与葡萄的花与果实以及营养器官的发育都存在着不同水平上的相关性。

References

- [1] Viclal M. A biological atlas of functional maps. *Cell*, 2001, 104: 333.
- [2] 周善跃. 三个烟草品种瞬时表达 *OsWAK1::GFP* 的差异. 中国农学通报, 2009, 25(8): 58-61.
Zhou S Y. Difference of transient expression of *OsWAK1::GFP* in three tobacco species. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(8): 58-61. (in Chinese)
- [3] 夏平安, 刘维全, 江 禹, 孙绍光, 杨淑艳, 王吉贵. 家蝇卵黄蛋白基因启动子区的克隆与活性分析. 遗传学报, 2004, 31(7): 688-694.
Xia P A, Liu W Q, Jiang Y, Sun S G, Yang S Y, Wang J G. Cloning and characterization of the promoter region of *Musca Domestica* Yolk Protein-1 gene. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(7): 688-694. (in Chinese)
- [4] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W, Prasher D C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263: 802-805.
- [5] Zhou S Y, Zhao W S, Li H, Guo Z J, Peng Y L. Characterization of a novel RING finger gene *OsRFP1*, which is induced by ethylene, salicylic acid and blast fungus infection in rice. *Phytopathology*, 2008, 156: 396-402.
- [6] Lin R M, Zhao W S, Meng X B, Wang M, Peng Y L. Rice gene *OsNAC19* encodes a novel NAC domain transcription factor and responds to infection of *Magnaporthe grisea*. *Plant Science*, 2007, 172: 120-130.
- [7] 刘肖飞, 梁卫红. 根癌农杆菌介导的 GFP 在洋葱表皮细胞定位研究. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2009, 37(1): 123-125.
Liu X F, Liang W H. Localization analysis of GFP in onion epidermal cell via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Journal of Henan Normal University: Natural Science*, 2009, 37(1): 123-125. (in Chinese)
- [8] 周雪莉, 王 园, 刘菊华, 金志强, 迟光红, 徐碧玉. 香蕉 *MuMADS1* 基因表达产物的亚细胞定位. 生命科学研究, 2009, 13(5): 418-421.
Zhou X L, Wang Y, Liu J H, Jin Z Q, Chi G H, Xu B Y. Sub-cellular localization of expression products of banana *MuMADS1* gene. *Life Science Research*, 2009, 13(5): 418-421. (in Chinese)
- [9] 陈 晓, 李思远, 吴连成, 王翠玲, 陈彦惠. 光周期影响植物花时的分子机制. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1490-1499.
Chen X, Li S Y, Wu L C, Wang C L, Chen Y H. Molecular mechanisms of photoperiod actions on plant flowering. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(7): 1490-1499. (in Chinese)
- [10] Bowman J L, Drews G N, Meyerowitz E M. Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell*, 1991, 3(8): 749-758.
- [11] Bowman J L, Smyth D R, Meyerowitz E M. Genetic directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1989, 1(1): 37-52.
- [12] Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, Drews G N, Feldmann K A,

- Meyerowitz E M. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 1990, 346(6279): 35-39.
- [13] Flamagan CA, Ma H. Spatially and temporally regulated expression of the MADS-box gene *AGL2* in wild-type and mutant *Arabidopsis* flowers. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26: 581-595.
- [14] Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator *FT* at the shoot apex. *Science*, 2005, 309: 1052-1056.
- [15] Huang T, Bohlénus H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O. The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science*, 2005, 309: 1694-1696.
- [16] Wigge P A, Kim M C, Jaeger K E, Busch W, Schmid M, Lohmann J U, and Weigel D. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 2005, 309: 1056-1059.
- [17] Moon J, Suh S S, Lee H, Choi K R, Hong C B, Paek N C, Kim S G, Lee I. The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 2003, 35(5): 613-623.
- [18] Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Molecular Cell Biology*, 2002, 22(9): 3157-3173.
- [19] Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, Amasino R A, Coupland G. The transcription factor *FIC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 2006, 20(7): 898-912.
- [20] Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29: 464-489.
- [21] 张则婷, 李学宝. MADS-box 基因在植物发育中的功能. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 218-222.
- Zhang Z T, Li X B. Function of MADS-box genes in plant development. *Plant Physiology Communications*, 2007, 43(2): 218-222. (in Chinese)
- [22] Bowman J L, Smith D R, Meyerowitz E M. Genetic interaction among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*, 1991, 112: 1-20.
- [23] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353: 31-37.
- [24] Ma H, Yanofsky M F, Meyerowitz E M. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes and Development*, 1991, 5: 484-495.
- [25] 曾 英, 胡金勇, 李志坚. 植物 MADS 盒基因与花器官的进化发育. 植物生理学通讯, 2001, 37(4): 281-287.
- Zeng Y, Hu J Y, Li Z J. MADS-Box genes in the evolution of flower development. *Plant Physiology Communications*, 2001, 37(4): 281-287. (in Chinese)
- [26] Kaufmann K, Melzer R, Theissen G. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, 2005, 347(2): 183-198.
- [27] 王德生. 大粒中熟鲜食葡萄-香悦. 西北园艺 (果树), 2007(2): 29.
- Wang D S. Large seed table grape with mid-maturity-Xiangyue. *Northwest Horticulture(Fruit)*, 2007(2): 29. (in Chinese)
- [28] 房经贵, 高志红, 陶建敏. 一种提取葡萄芽中总 RNA 的方法. 生物技术, 2003, 13(2): 24-25.
- Fang J G, Gao Z H, Tao J M. A method for isolating total RNA from grapevine bud. *Biotechnology*, 2003, 13(2): 24-25. (in Chinese)
- [29] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11: 113-116.
- [30] Blazquez M A. Flower development pathways. *Cell Science at a Glance*, 2000, 3547-3548.
- [31] 杨 光, 曹 雪, 房经贵, 宋长年, 陶建敏, 王 晨, 初建青. 葡萄七个重要花发育相关基因序列特征的分析. 江西农业学报, 2010, 22(2): 49-52.
- Yang G, Cao X, Fang J G, Song C N, Tao J M, Wang C, Chu J Q. Characterization of seven important genes involved in grapevine flower development. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, 22(2): 49-52. (in Chinese)
- [32] 徐淑平, 卫志明. 基因枪的使用方法介绍. 植物生理学通讯, 1998, 34(1): 41-43.
- Xu S P, Wei Z M. Introduction to method of microprojectile bombardment and its application. *Plant Physiology Communications*, 1998, 34 (1): 41-43. (in Chinese)
- [33] 林 茂. 蜡梅 *Cpcor413pm1* 基因的抗逆分析与亚细胞定位[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- Lin M. Stress tolerance analysis and subcellular localization of *Cpcor413pm1* gene[D]. Chongqing: Southwest University, 2008. (in Chinese)
- [34] 张付云, 陈士云, 赵小明, 白雪芳, 杜昱光. NtSKP1-GFP 植物表达载体的构建及亚细胞定位. 西北农业学报, 2009, 18(4): 144-148.
- Zhang F Y, Chen S Y, Zhao X M, Bai X F, Du Y G. Construction of NtSKP1-GFP plant expression vector and subcellular location. *Acta*

- Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009, 18(4): 144-148. (in Chinese)
- [35] 李广旭, 吴茂森, 吴 静, 何晨阳. 受病原细菌诱导表达增强的水稻转录因子基因 *OsBTF3* 的分子鉴定. 中国农业科学, 2009, 42(7): 2608-2614.
- Li G X, Wu M S, Wu J, He C Y. Molecular identification and characterization of a rice gene of *OsBTF3* encoding a transcriptional factor up-regulated by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(7): 2608-2614. (in Chinese)
- [36] 邢浩然, 刘丽娟, 刘国振. 植物蛋白质的亚细胞定位研究进展. 华北农学报, 2006, S2: 1-6.
- Xing H R, Liu L J, Liu G Z. Advancement of protein sub-cellular localization in plants. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2006, S2: 1-6. (in Chinese)
- [37] 宋长年, 房经贵, 王 晨, 上官凌飞, 章 镇. 基于 EST 库的枳 *APETALA2* 基因 cDNA 克隆及其表达分析. 园艺学报, 2009, 36(6): 799-806.
- Song C N, Fang J G, Wang C, Shangguan L F, Zhang Z. Cloning and expression analysis of *APETALA2* gene from *Poncirus trifoliata* based on EST database. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36(6): 799-806. (in Chinese)
- [38] 周林福, 陈离伟, 姜云水, 陈 峰. 荧光定量PCR与半定量PCR检测 HBV DNA 的对比分析. 中国病理生理杂志, 2005, 21 (5): 837, 848.
- Zhou L F, Chen L W, Jiang Y S, Chen F. Contrast analysis of HBV DNA detection between fluorescent quantitative PCR and semi-quantitative PCR. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2005, 21(5): 837, 848. (in Chinese)
- [39] 王 晨, 刘 洪, 房经贵, 宋长年, 曹 雪, 杨 光, 章 镇. 基于 EST 数据库的葡萄 *APETALA2* 基因 cDNA 克隆及其表达分析. 果树学报, 2010, 27(2): 207-212.
- Wang C, Liu H, Fang J G, Song C N, Cao X, Yang G, Zhang Z. Cloning and expression analysis of *APETALA2* gene from grapevine based on EST database. *Journal of Fruit Science*, 2010, 27(2): 207-212. (in Chinese)
- [40] Favre N, Bordmann G, Rudin W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *Journal of Immunological Methods*, 1997, 204: 57-66.
- [41] Meadus W J. A semi-quantitative RT-PCR method to measure the in vivo effect of dietary conjugated linoleic acid on porcine muscle PPAR gene expression. *Biology*, 2003, 5(1): 20-28.
- [42] Serazin-Leroy V, Denis-Henriot D, Morot M, de Mazancourt P, Giudicelli Y. Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of housekeeping gene transcripts. *Molecular and Cellular Probes*, 1998, 12: 283-291.
- [43] Al-Bader M D, Al-Sarraf H A. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Developmental Brain Research*, 2005, 156: 38-45.
- [44] Scortecci K, Michaels S D, Amasino R M. Genetic interactions between *FLM* and other flowering-time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52(5): 915-922.
- [45] Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Lwabuchi M, Araki T. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 1999, 286: 1960-1962.

(责任编辑 曲来娥)