

戴忠良, 陈丽, 山溪, 等. 甘蓝晚抽薹基因 *BoFLC3* 克隆、序列分析和亚细胞定位[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1324-1330.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.018

甘蓝晚抽薹基因 *BoFLC3* 克隆、序列分析和亚细胞定位

戴忠良¹, 陈丽², 山溪¹, 秦文斌¹, 肖燕¹, 朱建飞¹

(1. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏 句容 212400; 2. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 参照甘蓝 *FLC3* 基因 (GenBank 登录号 AAP31677) 碱基序列设计引物, 扩增出甘蓝晚抽薹 *BoFLC3* 基因, 序列分析结果表明, 该基因编码的蛋白质有 197 个氨基酸, 分子量 20 990, 等电点 9.45。荧光定量 PCR 分析结果表明: 抽薹后 *BoFLC3* 基因在甘蓝不同部位表达存在差异, 表达量从高到低依次为: 叶、茎、花蕾、花瓣和根。亚细胞定位结果表明: *BoFLC3* 蛋白定位在细胞核。

关键词: 甘蓝; *BoFLC3* 基因; 荧光定量 PCR; 亚细胞定位; 序列分析

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)06-1324-07

Cloning, sequence analysis and subcellular localization of *Brassica oleracea* *BoFLC3* gene

DAI Zhong-liang¹, CHEN Li², SHAN Xi¹, QIN Wen-bin¹, XIAO Yan¹, ZHU Jian-fei¹

(1. Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences in the Ning-Zhen Hilly District, Jurong 212400, China; 2. Department of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: According to the sequence of *FLC3* gene (GenBank accession number AAP31677), primers were designed to amplify the *BoFLC3* gene of *Brassica oleracea* L. Sequence analysis showed that the gene encoded a protein containing 197 amino acids, the molecular was 20 990, and the isoelectric point was 9.45. Quantitative real-time PCR analysis results showed that the expression of *BoFLC3* gene in different parts of cabbage after bolting was different, and the order of expression from high to low was leaves, stems, buds, flowers and roots. Subcellular localization results showed that the *BoFLC3* protein was located in the nucleus.

Key words: *Brassica oleracea* L.; *BoFLC3*; real-time PCR; subcellular localization; sequence analysis

甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 为十字花科芸薹属的重要蔬菜作物, 在中国广泛种植。抽薹开花是其生产中重要的农艺性状。“先期抽薹”降低产品的产量和品质, 是春季结球甘蓝生产的主要问题。培育晚抽薹品种是解决这一问题的根本途径^[1-2]。

FLC 是开花时间调控的开关基因, 对拟南芥开花控制有决定性的作用^[3-4]。该基因在白菜类作物中有 4 个同源基因, 但这些同源基因如何调控抽薹, 以及它们与其他主要的抽薹开花相关基因的相互关系尚不明确。*FLC* 编码 1 个 MADS-box 蛋白, 是开花的负调控因子, 很多控制开花的基因功能都是通过调节 *FLC* 来实现的, 对开花的抑制程度与其表达量呈正相关^[4]。*FLC* 可能通过阻遏开花信号途径来抑制植物的生殖生长。在拟南芥中, 已经克隆到了一些与 *FLC* 同源的基因, 如 *MAF5*、*FLM*、*MF2* 和 *FLK* 等, 它们在植物开花过程中也

收稿日期: 2018-06-11

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(18)2006]

作者简介: 戴忠良 (1968-), 男, 江苏句容人, 大学本科, 研究员, 主要从事蔬菜遗传育种与栽培研究。(E-mail) daizhongliang2008@163.com

起着负调控作用^[5]。*FLC* 及其同源基因抑制一组开花促进因子的表达,如 *FT* 和 *SOC1*,这些因子的表达又能够促进一些分生组织特征基因 *LFY* 与 *API* 的表达^[4]。*FLC* 是开花调控过程中起决定因素的一个调控因子,它受 GA、光周期、春化与自主途径的负调控,受 *FRI*-依赖途径的正调控^[6]。遗传与分子生物学研究结果表明,*FRI* 自主途径可能是通过与 *SUF4* 等形成蛋白复合体结合到 *FLC* 启动子的区域,来影响 *FLC* 的染色体结构;春化可使 *FLC* 的第一个内含子和启动子区 H3K9 和 H3K27 二甲基化水平增加,使得 *FLC* 的染色体结构处于关闭状态,从而调控 *FLC* 的表达^[7]。为了更好地利用这些基因对甘蓝抽薹开花进行调控,本试验克隆了与抽薹相关的基因 *BoFLC3* 的全长,并对其进行序列分析以及时空特异性表达和亚细胞定位分析,为进一步利用该基因进行甘蓝抽薹的调控提供理论和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 植物材料与菌株

供试甘蓝种子由镇江市农业科学研究所提供。

表 1 甘蓝 *BoFLC3* 基因克隆引物

Table 1 Primers for the cloning of *BoFLC3* gene in *Brassica oleracea*

引物	引物序列	作用
<i>BoFLC3</i> -F	5'-ATGGGAAGAAAAAAGACTAGAAATCA-3'	基因全长克隆
<i>BoFLC3</i> -R	5'-TCAGCTTCGGCTCCCGCAAGATTCT-3'	
<i>BoFLC3</i> -qF	5'-ACCTTCTCCAAACGACGCA-3'	荧光实时定量引物
<i>BoFLC3</i> -qR	5'-AGACAACGAGAAGCGCGATG-3'	
<i>GAPDH</i> -qF	5'-TCCACCATTGATTCTTCTCTG-3'	荧光实时定量内标引物
<i>GAPDH</i> -qR	5'-TCAGCCAAATCAACAACCTCTC-3'	

1.3 目的片段回收

目的片段的回收按照购自博飞公司的 Biospin 胶回收试剂盒 (BioSpin Gel Extraction Kit) 使用说明进行。参照 TaKaRa 生物公司的 pMD18-T kit 提供的方法,向 10 μ l 的反应总体系中加入 1 μ l pMD18-T vector,4 μ l 回收并纯化的 DNA 片段以及 5 μ l Ligation solution I,于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。转化大肠杆菌。用高温高压灭菌的牙签挑取单菌落,将挑过菌的牙签置于 2 ml LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C,200 r/min 条件下振荡培养 12 h。序列测定由南京金思特生物科技有限公司完成。

大肠杆菌菌株 JM109 由本实验室保存,质粒载体 pMD18-T、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、RNA 酶抑制剂、dNTP、AMV 反转录酶等均购自 TaKaRa 公司。RNA 提取试剂盒 (RNA Simply Total RNA Kit) 购自 TIANGEN BIOTECH 公司;Biospin 胶回收试剂盒 (BioSpin Gel Extraction Kit) 购自博飞公司;SYBR *Premix Ex Taq* TM 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 *BoFLC3* 基因克隆

以甘蓝叶片 cDNA 为模板,参照甘蓝 *FLC3* 基因 (GenBank 登录号 AAP31677),设计正反向引物 *BoFLC3*-F/*BoFLC3*-R (表 1),以反转录的 cDNA 为模板进行扩增反应。反应体系为 25.00 μ l,其中加入 10 \times *Taq* plus buffer 2.50 μ l,25 mmol/L MgCl₂ 1.50 μ l,10 mmol/L dNTP 1.00 μ l,10 μ mol/L 正向引物 1.00 μ l,10 μ mol/L 反向引物 1.00 μ l,菌液 1.00 μ l,灭菌 H₂O 16.75 μ l,*Taq* plus DNA polymerase 0.25 μ l (5 U/ μ l)。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像分析系统进行拍照及分析。

1.4 序列分析

通过美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 服务器,对核酸序列数据库进行 BLAST 搜索,寻找同源序列。将编码的氨基酸序列用 NCBI 提供的 BlastP 程序进行同源性分析,用 DNAMAN 软件对 *BoFLC3* 编码的氨基酸序列进行系统树分析,利用 ProtParam^[8] 分析 *BoFLC3* 蛋白的理化性质,利用 TM-pred^[9] 和 ANTHEPROT 分析软件分析蛋白质的跨膜区域,利用 ProtScale^[8] 分析蛋白质的亲水性区域,用 SignalP v3.0^[9] 进行信号肽分析,利用 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对甘蓝 *BoFLC3*

蛋白进行功能域预测分析,蛋白质二级结构预测和三维建模分别使用在线软件 SOPMA (<http://npsa-pbi.libcp.fr/cgi-bin/secpred-sopma.pl>) 和 SWISS-MODEL 完成。

1.5 实时定量 PCR 分析

将甘蓝材料播种于装有经过高温高压灭菌的基质的穴盘中,将穴盘置于光照 12 h、黑暗 12 h 光周期的光照培养箱中,夜温 20 °C、昼温 25 °C 下培养。待幼苗长至 2 片真叶时用于试验。本试验用 *GAPDH* 为内参基因(表 1),每个 cDNA 样品重复 3 次,根据标准曲线和定量报告进行试验体系评价和目的基因表达分析。使用 Opticon Monitor™ 1.02 软件(MJ Research)对 *BoFLC3* 基因相对表达含量进行分析。

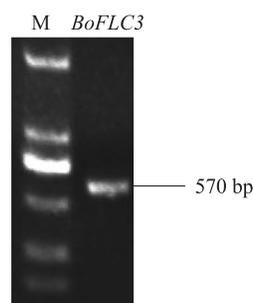
1.6 亚细胞定位分析

利用 Gateway 技术,将上一步的 PCR 回收产物与入门载体 pdonr221 和表达载体 pEarlyGate101 分别进行 BP 和 LR 重组反应。转化大肠杆菌感受态,将有扩增产物且片段大小正确的克隆进行测序。测序验证后即获得重组质粒(亚细胞定位载体) pEarlyGate101-*BoFLC3*-YFP。然后,利用液氮冻融法将重组融合表达载体 pEarlyGate101-*BoFLC3*-YFP 转入农杆菌 GV3101。将含有表达载体 pEarlyGate101-*BoFLC3*-YFP 的 GV3101 农杆菌单菌落接种于含卡那霉素的 YEB 培养基中,28 °C,180 r/min 培养 20 h。然后加入 1% 体积的菌液到同样的 YEB 培养基中,28 °C,200 r/min 培养至菌液 OD_{600} 为 1.0。在 4 000 r/min 下离心 15 min,收集菌体细胞,用终浓度为 10 mmol/L 的 $MgCl_2$,10 mmol/L MES (调节 pH 至 5.7),150 μ mol/L 乙酰丁香酮的注射缓冲液重悬至 OD_{600} 为 1.0,室温放置 5 h 后,用 1 ml 的无针头注射器将含有 pEarlyGate101-*BoFLC3*-YFP 的农杆菌菌液注射烟草叶片,用 H_2B -RFP 作为细胞核标记。注射后的烟草植株置于 25 °C,16 h/8 h 的光/暗周期下培养 3 d。在激光共聚焦显微镜下观察 YFP 荧光信号及 H_2B -RFP 红色细胞核荧光信号,进行 *BoFLC3* 蛋白的亚细胞定位分析。

2 结果与分析

2.1 甘蓝抽薹相关基因 *BoFLC3* 的全长克隆及拼接

根据甘蓝 *BoFLC3* 基因序列设计引物,扩增出甘蓝 *BoFLC3* 基因片段。结果(图 1)表明:该基因全长为 570 bp。



M: DL2000。

图 1 甘蓝 *BoFLC3* 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of *BoFLC3* gene in cabbage

2.2 甘蓝抽薹相关基因 *BoFLC3* 序列的生物信息学分析

2.2.1 甘蓝 *BoFLC3* 蛋白的理化性质分析 对 *BoFLC3* 基因所编码氨基酸序列(图 2)的理化性质进行分析得到,*BoFLC3* 基因编码 197 个氨基酸,其蛋白质分子量为 20 990;等电点为 9.45,说明该蛋白呈碱性;负电荷氨基酸(Asp+Glu)26 个,正电荷氨基酸(Arg + Lys)34 个;摩尔消光系数 0.219(胱氨酸全按半胱氨酸计);该蛋白不稳定性参数 46.88,属于不稳定蛋白;其脂肪系数 96.93;平均亲水性(GRAVY)-0.521;序列 N 末端为 Met,推测其半衰期在网状细胞中为 30 h,在酵母中大于 20 h,在大肠杆菌中大于 10 h。

2.2.2 甘蓝 *BoFLC3* 编码的氨基酸序列同源性及进化树分析 在 NCBI 站点上用 BLAST 分析 *BoFLC3* 基因编码氨基酸序列与其他植物抽薹相关基因的同源性,结果(图 3)表明,*BoFLC3* 基因与已克隆的植物的抽薹相关基因均有不同程度同源性,与不结球白菜的控制抽薹基因碱基序列相似性高达 94%,与拟南芥(同源蛋白编号 AAV51217)控制抽薹基因碱基序列相似性为 79%。DNAMAN 软件对 *BoFLC3* 及其他植物抽薹相关基因的氨基酸序列进行系统树分析,结果(图 4)显示,*BoFLC3* 基因与不结球白菜最先聚为一类,亲缘关系最近,而后与萝卜聚为一类。与拟南芥(AAV51217),白芥(ABP96967)亲缘关系相对较远。

2.2.3 甘蓝 *BoFLC3* 蛋白疏水性及跨膜结构域的预测和分析 蛋白质的疏水性分析是蛋白质二级结构以及三级结构预测中一个必要的过程,通过分析可以得到蛋白质的亲疏水区域,一方面可以为二级结构预测结果提供参考,另一方面还可以为结构域以

```

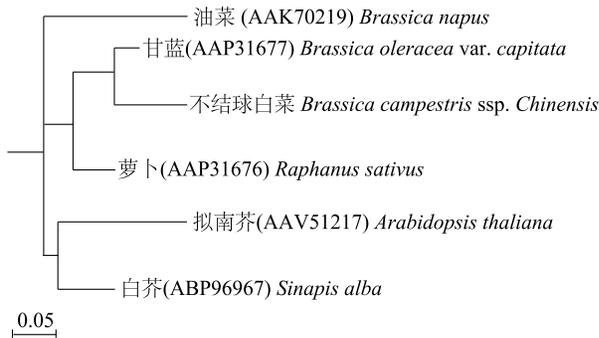
1  ATGGGAAGAAAAAACTAGAAATCAAGCGAATTGAGAACAAA
   M G R K K L E I K R I E N K
43  AGTAGCCGACAAGTCACCTTCTCCAACGACGCAGCGGTCTC
   S S R Q V T F S K R R S G L
85  GTTGAGAAAGCTCGTCAGCTTCTGTTCTCTGCGATGCATCC
   V E K A R Q L S V L C D A S
127 ATCGCGCTTCTCGTTGTCTCCTCCTCCGAAAGCTCTACAGC
   I A L L V V S S S G K L Y S
169 TTCTCCGCCGGTGATAACCTGGTCAGGATCCTTGATCGATAT
   F S A G D N L V R I L D R Y
211 GGAAAACAGCATGCTGATGATCTTAAAGCCCTGGATCTTCAG
   G K Q H A D D L K A L D L Q
253 TCAAAAGCTCTGAGCTATGGTTCACACAATGAGTTACTTGAA
   S K A L S Y G S H N E L L E
295 CTTGTGGATAGCAAGCTTGTGGAATCAAATGTCGGTGGTGTGA
   L V D S K L V E S N V G G V
337 AGCGTGGACACCCTCGTTCAGCTGGAGGGTGTCTTGAGAAT
   S V D T L V Q L E G V L E N
379 GCTCTCTCTAACTAGAGCTAGGAAGACAGAACTAATGTTG
   A L S L T R A R K T E L M L
421 AAGCTTGTGATAGCCTCAAAGAAAAGGAGAAGCTGCTGAAA
   K L V D S L K E K E K L L K
463 GAAGAGAATCAGGCTTGGCTAGCCAGGTTAGTACGAAGAAG
   E E N Q A L A S Q V S T K K
505 AAACAACCAAGGCAAAAATCATTAAACAAGAAGAGAAGAA
   K Q P R Q K S F K Q E G E E
547 GAATCTTGCGGGAGCCGAAGCTGA
   E S C G S R S *

```

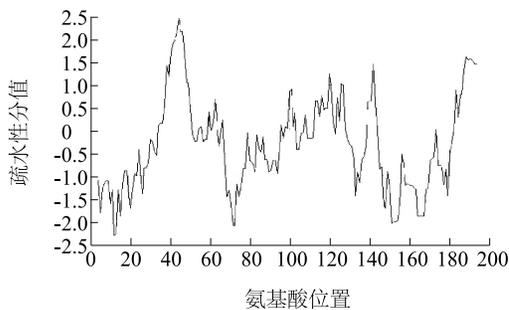
图2 *BoFLC3* 的核苷酸序列(上列)及其编码的氨基酸序列(下列)Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of *BoFLC3*

拟南芥(AAV51217)	MGKKKLEIKRIENKSSRQVTFSSKRRNGLTEKARQLSVLCDASVALLVVSASCKLYSFSSGDNLVKII	66
甘蓝(AAP31677)	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSSKRRSGLTEKARQLSVLCDASTALLVVSASSCKLYSFSAGDNLVRI	66
白芥(ABP96967)	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSSKRRNGLTEKARQLSVLCDASVALLVVSASCKLYSFSSGDNLVKII	66
油菜(AAK70219)	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFCKRRNGLTEKARQLSVLCEASVGLLVVSASDKLYSFSSGDRLEKI	66
不结球白菜	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSSKRRSGLTEKARQLSVLCDASVALLVVSASSCKLYSFSAGDNLVRI	66
萝卜(AAP31676)	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSSKRRSGLTEKARQLSVLCDASVALLVVSASSCKLYSFSSGDNLVRI	66
拟南芥(AAV51217)	LDRYGKCHADDLKALDHSKALNYGSHYELLELVDSKLVGSNVKKNVSIIDALVLEHLETALSVT	131
甘蓝(AAP31677)	LDRYGKCHADDLKALDLQSKALSYGSHNELLELVDSKLVESNVGGVSVDTLVGLEGVLENALSIT	131
白芥(ABP96967)	LDRYGKCHDDDLKALDLQSKPLNCGSHHELLELVESKLEESMDNNVSVGSLVLEENLESALSIT	131
油菜(AAK70219)	LDRYGKCHADDLKALDLQSKSLNYSSHHELLELVESKLVESIDVSVDSLVELEDHLETALSIT	130
不结球白菜	LDRYGKCHAGDLKAKMLQSKALSYGSHNELLELVDSKLVESNVGGXSVDTLVGLEGVLENALSIT	131
萝卜(AAP31676)	LHRYEKCHADDLKALLDLQSKSLSYGSHNELLELVESKLVESNVGWSVDALVLEHLETALSIT	131
拟南芥(AAV51217)	RARKTELMLKLVENLKEKEKMLKEENQVLASQMEKNHNVCAEAEEMESPAGQISDNLPVTLPLLM	196
甘蓝(AAP31677)	RARKTELMLKLVDLKEKEKLLKEENQALASQMEKNLAGEAEDNMEMSPGQISDINLPVTLPLLM	197
白芥(ABP96967)	RARKTELMLKLVENLKEKEKLLKEENHVLASQMEKNLWRAEADNMEVSPGQISDINLPVTLPLLM	197
油菜(AAK70219)	RARKTELMLKLVDLKEKENLLKEENQVLASQIEKKNLECAEADNTEMSGQISDINLPVTLPLLM	196
不结球白菜	RARKTELMLKLVDLKEKEKLLKEENQALAGQEKKNLAGEAEDNMEMSPGQISVINLPVTLPLLM	197
萝卜(AAP31676)	RARKTELMLKLVDLKEKEKLLKEENKVLASQMEKNLAGEAEDNMEIARAQISDINLPVTLPLLM	197

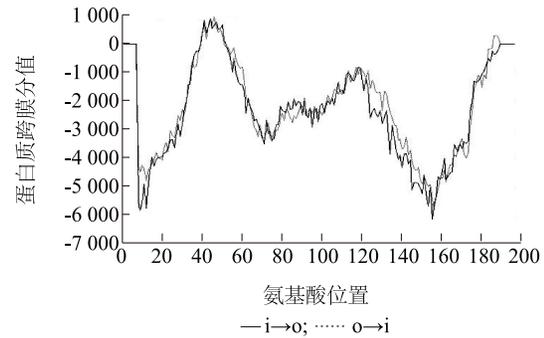
图3 不同植物 *BoFLC3* 基因编码的氨基酸序列同源性比较Fig.3 Alignment of predicted amino acid sequences of *BoFLC3* genes from different plants

图4 不同植物 *BoFLC3* 编码的氨基酸序列的系统树分析Fig.4 Phylogenetic tree analysis of the deduced amino acid sequences of *BoFLC3* in different species

及功能域的划分提供依据。因此,对甘蓝 *BoFLC3* 氨基酸序列进行疏水性分析,结果(图5)表明,在该蛋白35~50 aa处有1个显著疏水峰,其他区域以亲水性为主。跨膜结构域是膜中蛋白与膜脂结合的主要部位,一般由20个左右的疏水氨基酸残基组成,形成 α 螺旋,与膜脂相结合。预测和分析跨膜结构域,对认识蛋白质的结构、功能、分类以及在细胞中的作用部位均有一定的意义。利用TMpred在线软件预测甘蓝 *BoFLC3* 蛋白的跨膜螺旋区域,该软件预测得分超过500的区域为可能的跨膜螺旋区域,符合该条件的区域为35~57 aa处膜外向膜内的跨膜螺旋(图6),被赋予的分值为942(34~59 aa处膜内向膜外的跨膜螺旋,赋予分值为895)。跨膜区域位于膜结构中,应为蛋白质的疏水区域。上述预测的跨膜螺旋与ProtScale预测的蛋白质疏水区对应。因此,被预测的跨膜螺旋区可信度较高。

图5 甘蓝 *BoFLC3* 蛋白的疏水性分析Fig.5 Hydrophobicity analysis of *BoFLC3* in *Brassica oleracea*

2.2.4 甘蓝 *BoFLC3* 蛋白二级结构的预测分析
多肽链借助氢键排列成沿一维方向呈现有规则重复构象的二级结构,是氨基酸顺序与三维构象之

图6 甘蓝 *BoFLC3* 蛋白的跨膜螺旋区分析Fig.6 TMpred output for *BoFLC3* in *Brassica oleracea*

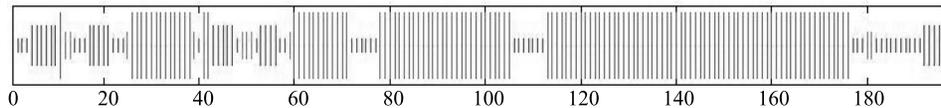
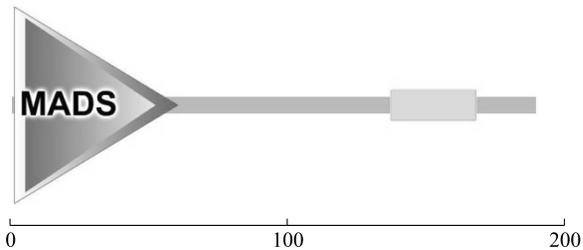
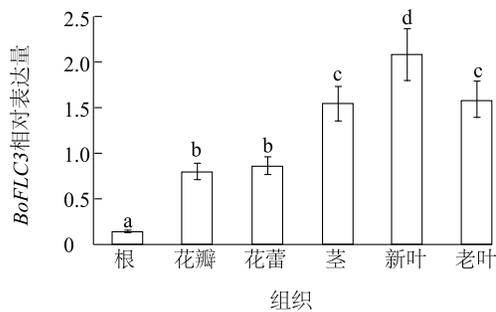
间的桥梁。二级结构借助范德华力、氢键、静电和疏水等相互作用形成蛋白质的三级结构,从而发挥正常的生物学功能。据此,用SOPMA对甘蓝 *BoFLC3* 蛋白的氨基酸序列进行二级结构预测,结果(图7)表明,*BoFLC3* 蛋白含有比较丰富的二级结构,由120个氨基酸残基组成 α 螺旋结构,占全部氨基酸残基的60.91%;24个氨基酸残基组成延伸链,占全部氨基酸残基的12.18%;由10个氨基酸残基组成 β 转角,占全部氨基酸残基的5.08%;由43个氨基酸残基组成随机卷曲,占全部氨基酸的21.83%。可以看出,随机卷曲和 α -螺旋是*BoFLC3* 多肽链中的主要结构元件, β 转角和延伸链散布于整个蛋白质中。

2.2.5 甘蓝 *BoFLC3* 蛋白的功能域预测分析
利用SMART软件对甘蓝 *BoFLC3* 蛋白进行功能域预测分析,结果(图8)表明,该基因为MADS盒基因,其编码的蛋白1~60 aa属于MADS盒基因蛋白,MADS-box基因是一个序列特异的调节基因家族,其编码的MADS-box蛋白转录因子以二聚体化的形式通过保守的MADS结构域与特定的DNA序列结合来调控基因的表达,通过反向平行的 α -螺旋二聚体结构与DNA小沟相互作用。MADS-box基因编码一类转录调控因子,是一类调节植物发育的重要基因,在决定植物开花时间和花形态建成中起着非常重要的作用。

2.3 *BoFLC3* 基因在甘蓝不同组织中的特异性表达

如图9所示,*BoFLC3* 基因的表达在甘蓝不同组织中存在显著的差异,抽薹后,根中表达量最少,花蕾与花瓣中的表达量相近且略低于茎部中的表达量,叶片中表达量最高。

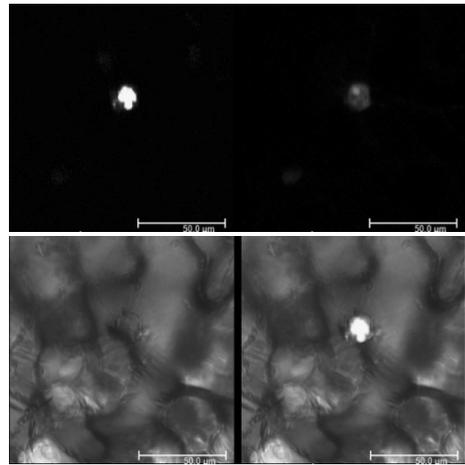
SOPMA :			
Alpha helix	(Hh) :	120	is 60.91%
3 ₁₀ helix	(Gg) :	0	is 0
Pi helix	(Ii) :	0	is 0
Beta bridge	(Bb) :	0	is 0
Extended strand	(Ee) :	24	is 12.18%
Beta turn	(Tt) :	10	is 5.08%
Bend region	(Ss) :	0	is 0
Random coil	(Cc) :	43	is 21.83%
Ambiguous states	(?) :	0	is 0
Other states	:	0	is 0

图7 甘蓝 *BoFLC3* 蛋白质的二级结构Fig.7 The secondary structure of *BoFLC3* in *Brassica oleracea*图8 *BoFLC3* 蛋白的功能域预测分析Fig.8 Prediction analysis on functional domains of *BoFLC3* protein图9 实时定量 PCR 检测分析 *BoFLC3* 基因在不同组织中的表达Fig.9 Real-time quantitative PCR analysis of *BoFLC3* gene expression in different tissues

2.4 亚细胞定位分析

将含有 pEarlyGate101-*BoFLC3*-YFP 的农杆菌侵染烟草植株 36 h 后,利用荧光共聚焦显微镜观察本氏烟叶片中的荧光。结果见图 10,在激光共聚焦显微镜下,试验组 pEarlyGate101-*BoFLC3*-YFP 侵染烟草植株在 YFP 激发光下可以检测到较为明显的黄

色荧光信号,红色荧光信号表示本氏烟植株细胞核位置;2 张荧光信号重叠表明 *BoFLC3* 定位于细胞核,这与该基因发挥转录因子功能以及编码蛋白质的功能性质有关。

图10 *BoFLC3* 在本氏烟叶片细胞中的定位Fig.10 Subcellular localization of *BoFLC3* in leaves of *Nicotiana benthamiana*

3 讨论

以拟南芥为模式作物,对其不同生态型和突变体的研究表明,基因 *FLC* 可能是春化反应的关键基因^[6]。研究发现,*FLC* 的表达水平与植株低温处理的时间呈负相关,低温处理时间越长,*FLC* 的表达越弱,去甲基化也可能对 *FLC* 起负调控的作用^[5-6]。同时 *FLC* 也存在于自主开花途径中,与其

他基因共同作用以调节植株开花时间^[10]。而 *FLC* 的表达对开花起抑制作用。一系列研究结果表明,春化的低温作用导致相关基因的去甲基化,消除了 *FLC* 对开花的抑制作用,从而解除对赤霉素合成途径的封锁最终导致植株在一定时期开花^[11]。

本试验利用 RT-PCR 技术从甘蓝中克隆了 *BoFLC3* 基因,在 NCBI 站点上用 BLAST 分析 *BoFLC3* 基因编码的氨基酸序列与其他植物抽薹相关基因的同源性,结果表明 *BoFLC3* 基因与已克隆的植物的抽薹相关基因均有不同程度同源性,与不结球白菜的控制抽薹基因碱基序列相似性高达 94%,与拟南芥(AAV51217)控制抽薹基因碱基序列相似性为 79%。利用荧光定量 PCR 就 *BoFLC3* 基因在不同组织中的转录表达进行了分析,结果表明,该基因在甘蓝植物体内的表达有普遍性。低温处理后不同组织 *BoFLC3* 的表达量从高到低依次为:叶>茎>花蕾>花瓣>根。通过亚细胞定位分析,结果表明,*BoFLC3* 蛋白定位在细胞的细胞核,这与 *BoFLC3* 的转录因子功能相吻合。

本研究利用 PCR 方法研究了甘蓝抽薹相关基因 *BoFLC3* 的时空特异性表达,通过亚细胞定位分析了 *BoFLC3* 在细胞中的表达,为下一步研究甘蓝中其他抽薹功能基因提供了经验和技术基础。

参考文献:

[1] 杨丽梅,方智远,刘玉梅,等.“十一五”我国甘蓝遗传育种研究进展[J].中国蔬菜,2011(2):1-10.

- [2] 戴忠良,秦文斌,张振超,等.晚熟耐寒结球甘蓝瑞甘 22 的选育[J].江苏农业科学,2017,45(17):130-131.
- [3] MOURADOV A, CREMER F, COUPLAND G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity[J]. The Plant Cell, 2002, 14(S):111-130.
- [4] MICHAELS S D, AMASINO R M. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering[J]. Plant Cell, 1999, 11:949-956.
- [5] SHELDON C C, BURN J E, PEREZ P, et al. The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation[J]. Plant Cell, 1999, 11: 445-458.
- [6] SHELDON C C, ROUSE D T, FINNEGAN E J, et al. The molecular basis of vernalization: the central role of FLOWERING LOCUS C(*FLC*) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 3753-3758.
- [7] MICHAELS S D, AMASINO R M. Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization[J]. Plant Cell, 2001, 13:935-941.
- [8] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A. The proteomics protocols handbook[M]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005: 117-121.
- [9] HOFMANN K, STOFFEL W. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments [J]. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1993, 374: 166.
- [10] ONOUCHI H, IGEÑO M I, PERILLEUX C, et al. Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes [J]. Plant Cell, 2000, 12: 885-900.
- [11] SUNG S, AMASINO R M. Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization[J]. Annual Review of Plant Biology, 2005, 56:491-508.

(责任编辑:陈海霞)