

## 板栗 MADS-box 蛋白基因 (*CmMADS3*) 的克隆和表达分析

刘 涛, 李晓贤, 徐平珍, 周浙昆, 胡运乾

(中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 根据 MADS-box 基因保守区结构, 设计简并引物, 从板栗 (*Castanea mollissima*) 中分离出花特异表达基因的 cDNA 片段。并通过 5' RACE 方法获得了全长 cDNA, 命名为 *CmMADS3*。该片段全长 1016 bp, 包含一个 729 bp 的开放阅读框, 推导的氨基酸序列 (243 个氨基酸) 与拟南芥的 SEP1、SEP2 和 SEP3 3 类 MADS-box 蛋白有很高的序列相似性。系统进化分析同样将 *CmMADS3* 基因归入 MADS-box 基因家族的 AGL2 组。RT-PCR 分析显示, 该基因在板栗的花和幼果中表达丰度高, 在茎中有微弱的表达, 在叶中不表达, 研究结果表明 *CmMADS3* 基因是板栗花器官发育中具有 E 功能的功能基因。

关键词: 板栗; 花器官发育; MADS-box gene; RT-PCR 分析

中图分类号: Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2006)03-295-05

## Cloning and Expression of a MADS-box Protein Gene (*CmMADS3*) from *Castanea mollissima* (Fagaceae)

LIU Tao, LI Xiao-Xian, XU Ping-Zhen, ZHOU Zhe-Kun, HU Yun-Qian\*

(*Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China*)

**Abstract:** As a kind of transcription factors, MADS-box genes play an important role in various plant development processes, especially in the development of floral organs. The flower specific gene of *Castanea mollissima*, named *CmMADS3* (GeneBank accession number DQ148295), was cloned from floral organs by the method of 5' RACE using degenerate primer designed according to the MADS-box gene family conserved region. The fragment was 1016 bp long and contained an open reading frame of 729 bp coding a polypeptide of 243 amino acids. Homology analysis showed that the deduced *CmMADS3* protein was highly homologous to the MADS-box genes SEP1, SEP2 and SEP3 of *Arabidopsis thaliana*. Phylogenetic analysis also indicated that *CmMADS3* belonged to the AGL2 group of MADS-box gene family. RT-PCR analysis showed that *CmMADS3* expressed at high levels in flowers and young fruits and at low levels in stems. No *CmMADS3* expression was detected in leaves. Our result suggested that *CmMADS3* was related to E-class genes in the development of *Castanea mollissima* floral organs.

**Key words:** *Castanea mollissima*; Flower development; MADS-box gene; RT-PCR analysis

MADS-box 结构是一个保守性很强的 DNA 结合结构域, 最早在酵母 MCM1、拟南芥 AGAMOUS、金鱼草 DIFICIENS 和血清学应答因子 SRF 中发现, 因此具有此结构的功能基因被命名为 MADS-box 基因 (Theissen 等, 1996; Theissen 等, 2000)。研究结果表明, 植物在植物花器官发育

和同源异型转换中 MADS-box 蛋白基因起着非常重要的作用 (Cai and Wang, 2000; Zeng 等, 2001)。通过对该调控蛋白的深入研究, 科学家提出了控制花器官发育的 ABC 模型 (Coen and Meyerowitz, 1991), 该模型认为, A、B、C 分别代表 3 类不同的同源异型基因, A 类基因单独作

通讯作者: Author for correspondence. E-mail: yqhu@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2005-09-06, 2005-11-07 接受发表

作者简介: 刘涛 (1978-) 男, 植物学博士, 主要从事植物分类学和植物分子遗传学。

用形成花萼, A类和B类基因共同作用形成花瓣, B类和C类基因共同作用形成雄蕊, C类基因单独作用形成心皮, 其中A类和C类基因相互抑制, 3类基因在花的发育调控中有各自的位置效应。随着研究的深入, 发现了与花瓣、雄蕊、心皮正常发育相关的另一类基因——E类基因 (Soraya等, 2000)。该类基因的缺失突变, 将导致拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 不能形成正常的心皮或种子 (Colombo等, 1995)。

板栗又称木本粮食, 因为果实具有大米, 面粉的营养成分, 并且含有人体必须的钙, 磷, 钾等无机盐。因此, 以板栗为材料研究其花器官的发育乃至果实的形成具有一定的理论和实践意义, 但目前为止有关板栗花器官发育相关的分子生物学研究还未见报道。

为探索板栗花器官发育的分子机理, 本研究利用MADS-box基因的保守性特征从其花中分离和克隆了一个MADS-box蛋白基因 (*CmMADS3*), 并对该基因的表达进行了初步分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

材料采自昆明市宜良县狗街乡的板栗林中。采集2004年8月份的幼嫩花序、9月份的成熟花序、果实、茎、带花的嫩叶和不带花的嫩叶, 用液氮速冻后, 保存在-80℃条件下备用。

### 1.2 RNA的提取

用CTAB法提取植物组织的总RNA, 参照Zeng and Yang (2002)方法。65℃预热提取液, 加入约1g样品, 保温10min, 间或摇匀几次而后4℃离心取上清, 用氯仿异戊醇(24:1)抽提2次, 加入LiCl过夜, 12000r/min离心, 弃去上清液, 沉淀用75%乙醇洗涤2次后, 再用NaAc和酒精沉淀RNA, 所得沉淀溶解在DEPC处理过的水中, 测OD值, 电泳检测。

### 1.3 cDNA的克隆

采用BD Biosciences Clontech有限公司的Smart cDNA Library Construction Kit合成所需的双链cDNA (dscDNA), 除起始RNA为5μg总RNA外, 其余操作均按试剂盒说明书进行。

根据拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 等植物的MADS-box基因的cDNA保守序列设计简并引物sep88 (5'-GGIMGIGGIMRIGIIGARITIAAIMG-3'), 与其搭配的引物是BD公司试剂盒所提供的3'端锚定引物 (CDSIII 3'PCR primer), 以合成的双链cDNA为模板,

PCR反应条件为94℃ 2min热变性后, 92℃ 1min, 50℃ 2min, 72℃ 1min, 循环10次。92℃ 1min, 57℃ 1min, 72℃ 1min, 循环20次。72℃延伸10min。将得到的cDNA片段用UNI-Q-10柱式DNA胶回收试剂盒 (上海生工生物工程技术服务有限公司) 回收纯化后, 与PMD18-T vector载体 (Takara) 连接, 然后转化大肠菌DH5a并涂布在含有160mg/ml IPTG和x-gal (Promage) 的LB平板上, 选择白色菌落。用PCR法 (引物对为sep88和CDSIII 3'PCR Primer) 筛选带有目的长度的cDNA片段的菌落, 提取质粒并测定碱基序列 (上海生工生物工程技术服务有限公司测序), 每个样品分别进行双向测序。5'末端扩增: 根据得到的片段, 设计了特异性内嵌引物anti-MADSL8 (5'-CA-GAAGCCCATTCCTCCTCTTGCA-3'), 与BD公司试剂盒所提供的5'锚定引物CDSIII 5' primer搭配, 以dscDNA为模板, 反应条件为94℃ 3min热变性后, 94℃ 30s, 62℃ 1min, 循环5次。94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 3min, 循环5次。94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 3min, 循环25次。72℃延伸10min。得到了近200bp的cDNA片段, 克隆到pMD18-T vector (Takara)。委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行双向测序。所得片段全长为1016bp, 包含一个729bp的开放阅读框, 推导的氨基酸序列 (243个氨基酸) 与拟南芥的SEP1、SEP2和SEP3 3类MADS-box蛋白基因有很高的序列相似性, 并将该基因命名*CmMADS3* (GenBank注册号为DQ148295)。

### 1.4 *CmMADS3* 序列对比分析

根据Theissen等 (2000) 的分类, 真核生物中存在3大类MADS-box基因, 其中ARG80和MEF2类主要存在于动物和真菌中, MIKC类则仅限于植物中。我们选定GenBank中关于拟南芥MIKC类中的MADS-box基因序列与*CmMADS3*蛋白进行系统进化分析, 并用DNASTAR软件包对所选择的序列进行序列的对比编辑, 空位作缺失 (missing) 处理。排好的序列矩阵用PAUP 4.08b10软件进行系统演化分析, 采用启发式 (Heuristic) 搜索策略, 1000次随机序列加入, 每步保留10个树 (图1)。从图1可知, 不同组的MADS-box蛋白基因被划分到不同的分支, 序列结果表明*CmMADS3*蛋白基因与MADS-box蛋白基因家族中的SEP组基因聚集在同一分支上, 即*CmMADS3*基因隶属于MADS-box蛋白基因家族的AGL2组。

### 1.5 RT-PCR分析

提取板栗不同组织 (包括幼嫩花序、成熟花序果实、茎、带花嫩叶和不带花嫩叶) 的总RNA, 用cDNA第一链合成试剂盒 (BD) 合成各种板栗器官RNA (5μg) 的第一链cDNA, 操作均按试剂盒说明书进行。取1μl第一链产物为模板进行PCR扩增, 50μl体系中包括10×PCR缓冲液, 0.4mmol/L dNTPs, 3mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 上下游引物各0.2pmol/L, 1U Taq DNA聚合酶 (Takara)。温度循环参数为

94 预变性 3 min; 94 30 s, 56 30 s, 72 2 min, 30 个循环; 72 延伸 5 min。 *CmMADS3* 基因的扩增引物为 mad-sL8 (5' -GGTTCGACCAGCAGTTAAGTGGCACA-3') 和

Anti-madsL8 (5' -GGGAAAACCACAACCTTATATTATCTTA -3')。该对特异性引物选在靠近 *CmMADS3* 的 3' 端, 因此具有很好的特异性。

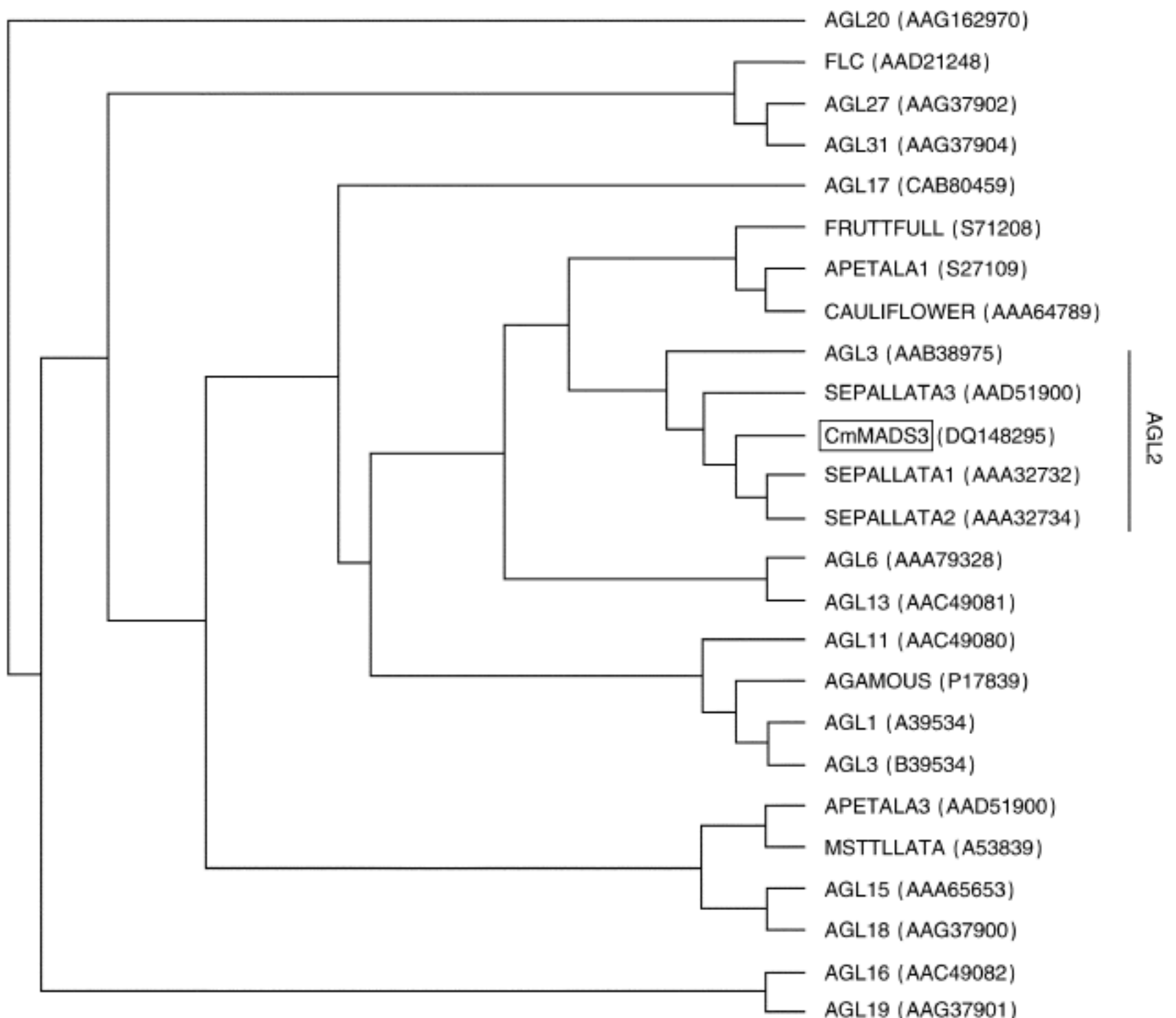


图 1 基于拟南芥 MIKC 类 MADS-box 蛋白基因序列的最大简约树, 括号中为该基因序列号。

树长 1925, CI = 0.7262, HI = 0.2738, RI = 0.6198, RC = 0.4501

Fig. 1 The phylogenetic tree based on the MIKC-type MADS-box protein sequence of *Arabidopsis thaliana*. The figure in the bracket is the gene accession number. Tree length = 1925, Consistency index (CI) = 0.7262, Homoplasy index (HI) = 0.2738, Retention index (RI) = 0.6198, Rescaled consistency index (RC) = 0.4501

## 2 结果与讨论

*CmMADS3* (GenBank 登记号: DQ148295) 的 DNA 结构和同源性序列分析表明, 该片段全长 1016 bp, 包含一个完整的编码 243 个氨基酸 ORF (Open Reading Frame) 开放读码框, 具有典型的植物 MADS-box 基因的结构。 *CmMADS3* 氨基酸序列比较表明, *CmMADS3* 蛋白属典型的植物 MIKC 型 MADS-box 蛋白, 具有两个保守结构域, 即 MADS-box 和

K-box。从结构上可将 *CmMADS3* 分成 4 个区 (图 2), N-端是 62 个氨基酸的 MADS 框 (aa 1—62), 蛋白的中部为 67 个氨基酸 K-box (AA90 ~ AA157)。 MADS 区和 K 区之间为 34 个氨基酸的间区 (I 区)。而 C 一端区域包含 80 个氨基酸。无论是全长序列还是用特定的区段进行比较, *CmMADS3* 与拟南芥的 SEP1、SEP2 和 SEP3 3 类 MADS-box 蛋白都有很高的序列相似性, *CmMADS3* 与 SEP1, SEP2, SEP3 的

同源性分别为 71.5%，70%，61.7%，而与其他类型的 MADS-box 蛋白的相似性则相对较低。



图2 CmMADS3 基因的氨基酸序列的同源序列比较，两个上划线部分分别代表 MADS 区和 K 区

Fig. 2 The Comparison of CmMADS3 gene and its homologues. The first and second uplined regions represent MADS domain and K domain respectively

CmMADS3 基因的 RT-PCR 分析的结果如图 3 所示，CmMADS3 基因在板栗的幼嫩花序、成熟花序和果实中的表达量较强，在茎中有微弱表达，而在带花嫩叶和不带花嫩叶中不表达。这些结果说明 CmMADS3 基因主要在板栗生殖器官中表达，与花器官发育有关。

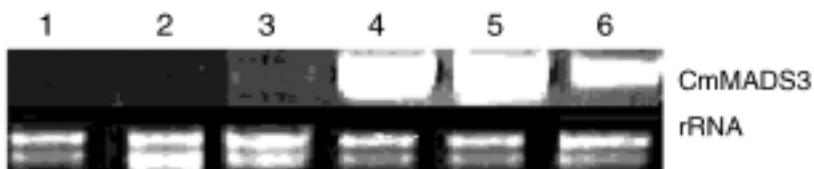


图3 板栗 CmMADS3 基因表达的 RT-PCR 分析

1: 不带花嫩叶; 2: 带花嫩叶; 3: 茎; 4: 幼嫩花序; 5: 成熟花序; 6: 果实。rRNA 为对照。CmMADS3 扩增 30 个循环。

Fig. 3 Expression pattern of CmMADS3 gene revealed by RT-PCR analysis. Lane1: tender leaves with no flowers; Lane2: tender leaves with flowers; Lane3: stem; Lane4: tender inflorescences; Lane5: mature inflorescences; Lane6: fruit. rRNA is used as RNA standard. Amplification of CmMADS3 were performed for 30 cycles.

我们克隆的 CmMADS3 基因与 AGL2 组的

MADS-box 蛋白基因有很高的序列相似性，同源性分析将其归入 AGL2 组具有 SEP 蛋白功能的一组中。CmMADS3 基因具有花器官特异的表达特性，与其他的 AGL2 组 MADS-box 蛋白基因表达特征类似。结果说明，CmMADS3 基因是 AGL2 组的 MADS-box 蛋白基因，在板栗花器官发育中有着重要的作用。

【参 考 文 献】

Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, et al, 2000. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes [J]. Plant J, 24 (4): 457—466

Borner R, Kampmann G, Chandler J, et al, 2000. A MADS domain gene involved in the transition to flowering in Arabidopsis [J]. Plant J, 24 (5): 591—599

Bowman JL, Smith DR, Meyerowitz EM, 1991. Genetic interaction among floral homeotic genes of Arabidopsis thaliana [J]. Development, 112: 1—20

- Cai XT, Wang JF, 2000 . Function and mechanism of MADS-box gene in plant [J] . *Plant Physiology and Molecular Biology*, 36 (3): 277—281
- Coen ES, Meyerowitz EM, 1991 . The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development [J] . *Nature*, 353: 31—37
- Colombo L, Franken J, Koetje E, *et al*, 1995 . The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity [J] . *Plant Cell*, 7: 1859—1868
- Goto K, Meyerowitz EM, 1994 . Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene PISTILLATA [J] . *Genes Dev*, 8 (13): 1548—1560
- Heck GR, Perry SE, Nichols KW, *et al*, 1995 . AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos [J] . *Plant Cell*, 7 (8): 1271—1282
- Huang H, Tudor M, Weiss CA, *et al*, 1995 . The *Arabidopsis* MADS-box gene AGL3 is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein [J] . *Plant Mol Biol*, 28 (3): 549—67
- Kempin SA, Savidge B, Yanofsky MF, 1995 . Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis* [J] . *Science*, 267 (5197): 522—525
- Ma H, Yanofsky MF, Meyerowitz EM, 1991 . AGL1-AGL6, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes [J] . *Genes Dev*, 5 (3): 484—495
- Mandel MA, Gustafson-Brown C, Savidge B, *et al*, 1992 . Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1 [J] . *Nature*, 360 (6401): 273—277
- Pelaz S, Gustafson-Brown C, Kohlami SE, *et al*, 2001 . APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development [J] . *Plant J*, 26: 385—394
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, *et al*, 2000 . B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes [J] . *Nature*, 405: 200—203
- Purugganan MD, Rounsley SD, Schmidt RJ, *et al*, 1995 . Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family [J] . *Genetics*, 140 (1): 345—356
- Purugganan MD, Suddith JI, 1999 . Molecular population genetics of floral homeotic loci . Departures from the equilibrium-neutral model at the APETALA3 and PISTILLAT genes of *Arabidopsis thaliana* [J] . *Genetics*, 151 (2): 839—848
- Riechmann JL, Meyerowitz EM, 1997 . MADS domain proteins in plant development [J] . *Biol Chem*, 378: 1097—1011
- Schwarz S, Huijser P, Nacken W, *et al*, 1990 . Genetic control of flower development: Homeotic genes in *Antirrhinum majus* [J] . *Science*, 250: 931—936
- Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, *et al*, 1999 . The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation [J] . *Plant Cell*, 11 (3): 445—458
- Shore P, Sharrocks AD, 1995 . The MADS-box family of transcription factors [J] . *Eur J Bio Chem*, 229: 1—13
- Soraya P, Gary SD, Elvira B, *et al*, 2000 . B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS box genes [J] . *Nature*, 405: 200—203
- Sung SK, Yu GH, Nam JJ, *et al*, 2000 . Developmentally regulated expression of two MADS-box genes . MdMADS3 and MdMADS4, in the morphogenesis of flower buds and fruits in apple [J] . *Planta*, 210: 519—528
- Theissen G, Becker A, Rosa AD, *et al*, 2000 . A short history of MADS-box genes in plant [J] . *Plant Molecular Biology*, 42: 115—149
- Theissen G, Kim J, Saedler H, 1996 . Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes [J] . *J Mol Evol*, 43: 484—516
- Theissen G, Saedler H, 2001 . Plant biology . Floral quartets [J] . *Nature*, 409: 469—471
- Weigel D, Meyerowitz EM, 1994 . The ABCs of floral homeotic genes [J] . *Cell*, 78: 203—209
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, *et al*, 1990 . The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors [J] . *Nature*, 346 (6279): 35—39
- Zeng Y, Hu JY, Li ZJ, 2001 . MADS-box genes in the evolution of flower development [J] . *Plant Physiology Communication*, 37 (4): 281—287
- Zeng Y, Yang T, 2002 . RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides [J] . *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: 417a—417e