



研究论文

Research Article

枳两个 GRAS 基因 cDNA 全长的克隆及其亚细胞定位分析

宋长年[✉], 李阿英[✉], 刘洪[✉], 李晓颖[✉], 郭磊[✉]

南京农业大学园艺学院, 南京 210095

[✉] 通讯作者: songchangnian@njau.edu.cn; [✉] 作者

植物药与药理学杂志, 2012 年, 第 1 卷, 第 4 篇

收稿日期: 2012 年 06 月 05 日

接受日期: 2012 年 06 月 17 日

发表日期: 2012 年 06 月 28 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012, Vol.31, No.3)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

宋长年等, 2012, 枳两个 GRAS 基因 cDNA 全长的克隆及其亚细胞定位分析, 基因组学与应用生物学, 31 (3): 240-248 (doi: [10.3969/gab.031.000240](https://doi.org/10.3969/gab.031.000240))

引用格式(英文):

Li et al., 2012, Cloning and Subcellular Localization Analysis of Two GRAS Genes from *Poncirus trifoliata*, Genomics and Applied Biology, 31 (3): 240-248 (doi: [10.3969/gab.031.000240](https://doi.org/10.3969/gab.031.000240))

摘要 利用生物信息学方法以拟南芥 SCL6 和杨树 GRAS cDNA 序列作为模板, 对柑橘 EST 数据库进行同源检索筛选出柑橘 SCL6 和 GRAS 基因的 cDNA 序列, 并以枳(*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)花 cDNA 为模板, 根据以上 cDNA 序列设计 5' 末端和 3' 末端扩增的特异引物, 利用 5' RACE 和 3' RACE 技术, 分别获得该基因的 5' 和 3' 末端, 序列拼接后获得枳的 SCL6 和 GRAS cDNA 全长。分别命名 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS, 大小分别是 2,668 bp 和 1,911 bp, 在 GenBank 的登录号分别是 GQ505957 和 GU072592, 其分别编码 706 和 636 个氨基酸全长。生物信息学分析表明 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 的 cDNA 序列中分别有 microRNA171 (miR171) 和 miR1446 的识别位点, 与其它植物的 GRAS 一样有着高度保守的序列即 GRAS 结构域。构建 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 亚细胞定位载体 35S-GW-GFP- GQ505957/ GU072592, 基因枪转化洋葱表皮细胞, 暗培养 24 h 后激光共聚焦显微镜下观察。亚细胞定位结果表明 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 均定位于细胞膜中。转录因子 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 表现出在细胞膜区域定位的现象。

关键词 枳, Pt-SCL6 和 Pt-GRAS, 基因克隆, 亚细胞定位

Cloning and Subcellular Localization Analysis of Two GRAS Genes from *Poncirus trifoliata*

SONG Chang-nian[✉], Li A-ying[✉], Liu Hong[✉], Li Xiao-ying[✉], Guo Lei[✉]

College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

[✉] Corresponding author, songchangnian@njau.edu.cn; [✉] Authors

Abstract A bioinformatics strategy was applied to clone full length cDNAs of SCL6 and GRAS genes of citrus which were identified by BLAST searching in EST database with homologous gene cDNAs of *Arabidopsis thaliana* and aspen. Two gene-specific primers were designed according to the above cDNAs using cDNA library of opening flower of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., and the 5' end and 3' end sequences were obtained by 5' RACE and 3' RACE methods, respectively. The full length cDNAs of SCL6 and GRAS gene from *Poncirus trifoliata* was spliced based on 5'-end and 3'-end sequence. The complete cDNAs, designated as Pt-SCL6 and Pt-GRAS, were 2,668 bp and 1,911 bp, respectively. These sequences were deposited in GenBank database with accession numbers GQ505957 and GU072592, and open reading frames encoding 706 and 636 amino acids, respectively. Bioinformatics analysis showed that the cDNA of Pt-SCL6 and Pt-GRAS have miR171 and miR1446 recognition sites. Pt-SCL6 and Pt-GRAS have the same highly conserved amino acid sequences namely the F-box domains as GRAS in other plants. Recombinant plasmid 35S-GW- GQ505957/ GU072592-GFP were introduced into onion epidermal cells by the particle bombardment method with a PDS1000/He. Transformed cells were incubated for 24 h at 22°C in the dark and green fluorescence was monitored under a laser scanning confocal microscope. Subcellular localization results showed that the Pt-SCL6 and Pt-GRAS were localized in the cell membrane. Transcription factors Pt-SCL6 and Pt-GRAS both demonstrated the phenomenon of regional positioning in the cell membrane.

Keywords *Poncirus trifoliata*; Pt-SCL6 and Pt-GRAS; cloning; Subcellular localization

功能基因组学研究的一个重要方面是植物转录因子。转录因子(transcription factor)是一群能与基因 5' 端上有特定序列专一性结合, 从而保证目的基因以特定的强度在特定的时间与空间表达的蛋白质分子。在植物特异蛋白中, 转录因子就占到了 13%。研究已经证明一类植物特有的转录因子-GRAS 家族基因在植物生长发育以及细胞代谢方面都具有重要的作用, 如: 分生组织的形成、雄配子发育、赤霉素信号转导、光敏色素信号转导



等。例如 SCL13 是一种参与光敏色素 B(phyB)信号转导的蛋白质分子,它在脱黄化过程中,起拉长胚轴的作用(Torres-Galea et al., 2006),在水稻分蘖时期 MOC1 蛋白是控制其分蘖的关键因子,它的发现为人们更好的理解水稻分蘖分子调控机理奠定基础,也为提高水稻产量方面提供了一个重要依据(Li et al., 2003)。目前在拟南芥基因组中已经鉴定了 33 个 GRAS 家族基因,并发掘出其在植物生长发育过程中所起的作用和在组织中的特异性表达。(Lee et al., 2008) microRNA171 调控 GRAS 家族中的一些基因的表达,比如控制拟南芥花和根系的发育是通过 miR171 调节具有 GRAS 功能域转录因子家族基因(如 SCL6-II、SCL6-III和 SCL6-IV)来实现的(孙欣等, 2011)。但是由于 GRAS 家族成员较多,而目前已经进行功能分析的 GRAS 基因又很有限,为了能更加深入理解 GRAS 家族基因在植物生长发育和基础代谢等过程中的作用就需要我们对更多的成员进行克隆和研究。

枳即“枸橘”,橘生淮南则就橘,生于淮北则就枳。它是绝大多数柑橘品种的一种优良的砧木,也是研究柑橘的重要材料,其中在柑橘分子生物学,柑橘基因组学,柑橘 EST 测序,柑橘基因功能分析等方面作为重要的试验材料(Cristofani-Yaly et al., 2007)。在枳上进行转录因子的研究以及 GRAS 家族基因功能的分析,对于利用该基因达到调控其花器官发育、转变其童期以及提高其砧木育种效率等生长发育过程都有着重要的理论价值。

基因表达产物在植物组织中的亚细胞定位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为了研究者们对植物生长发育、形态建成以及抗逆性等方面有更系统的理解,也为蛋白质功能分析,蛋白质生物学功能推断提供重要信息。(周善跃, 2009)目前,应用较普遍的植物蛋白的亚细胞定位方法是报告基因定位法即借助于报告基因表达产物的特性来实现目标蛋白的定位,近年来被应用于蛋白质定位研究较多的是绿色荧光蛋白(GFP)(夏平安等, 2004)。

本文作者通过对枳 cDNA 文库的筛选,利用 RACE 技术获得了枳 GRAS 类转录因子 SCL6 和 GRAS 的全长,利用生物信息学对其序列进行了分析,为进一步了解 SCL6 和 GRAS 的分子生物学功能,本研究首先通过亚细胞定位实验,验证 SCL6 和 GRAS 是否具有核定位功能。

1 结果与分析

1.1 Pt-SPL6 和 Pt-GRAS cDNA 全长及其推导的氨基酸序列

作者是把枳幼叶和花器官的 cDNA 作为模板,分别与根据柑橘 SCL6 和 GRAS 的 cDNA 全长设计的特异引物 P03/P09 和 P06/P12 进行 3' RACE 和 5'RACE 扩增,随后经过克隆测序分别得到 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 基因的 3'末端(1,960 bp 和 1,500 bp)和 5'末端(900 bp 和 600 bp)。还是以前面的 cDNA 为模板,引物为 P07/P08 和 P13/P14,进行 PCR 克隆获得全长分别为 2,1188 bp 和 1,908bp 的 ORF。然后将 3'端、5'端和 ORF 拼接分别获得枳全长为 2 668 bp 和 1 911 bp 的 SCL6 和 GRAS cDNA,分别有一个 2,118 bp 和 1,908 bp 完整的开放阅读框(ORF),353 bp 和 132 bp 的 5'非翻译区(5'UTR),194 bp 和 2400 bp 的 3'非翻译区(3'UTR)以及 26 bp 和 27 bp 的 poly+(A)尾。该 cDNA 分别推导编码 706 个和 509 个氨基酸分别包含有枳 miR171 和 miR1446 的识别位点(图 1)。通过 TMHMM2.0 和 SignalP3.0 软件分析,发现 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 蛋白不含有跨膜区和信号肽。在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 网站进行蛋白质结构功能域分析,发现该蛋白序列的分别从第 347-705 和第 136-508 区域含有 GRAS 结构域(图 1A 和 B),属于 GRAS 转录因子家族中的保守结构域。

Pt-SCL6 A

```
1      AGAAAGAGAAACAGAGAGAAACCCACCGAAAAGAACCTGCATCGAAACTCATCTTCAGAATCAGAAGAGGAAAGCTTATTGTAGCAAAGA
91     GTGTTGTTGTTTCGGAGTCTTGAGGTACTGAGCTAGCAAAAGAGGGCGATAGAGCCGCCAAAGAAGCTTGAGTTGTAGCTTTGTGCTTGT
181    TGTCTGATCAAAATTTGATTTTTGATTTTTGATTTCTGCTGGTTTGTATCTTCTTTGTATCGTACAAACTCATTAGTATAGTCTCTTT
271    CTTTTGTAGCTTTCTAAACCTGTGTAAACTGGAGAGTCTGGGATTTGGGATTTGGGTAACACTGTTGTGAGTTATTAGATGGAGGG
                                     M R
361    CCATGCCCTAGCCTTTGAGGATTTCAAGGGAAGGGGCTTTAGATTCTCTCTCTCTCTCAGATTGCGGCAATTTTCATCATCAGC
   A M P L A F E D F Q G K G A L D F S S S S D S R Q F H H Q
451    AGCACAAAGGAAGAACAAGACTGGCTACTCAGCAACAGCAACAGGGGAAACAAGAAAGCAAAATGTTGCTATGTGGGCAAGTCCACCACTG
   Q H K E E Q D W L L S N S N R G N K K A N C C Y V G S A T T
541    AGCCACATCAGTCTCGATAACAAGAAGTCCAAGCCCTCCACGTCATCTTCAACTGTCTTCTCTCTCTGGGCGGTGGTGGCTCT
   E P T S V L D N R R S P S P P T S S S T L S S S L G G G G S
631    CCGCCACCGACACAACCGCGTGGCGGGACCAATGCCTCTAGCAACCCCATCAGTAGATATACCAATACTGAAAAATGTGGAGGCT
   S A T D T T G V A A T N A S S N P P S V D I T N T E K C G G
721    TGGGAATGGAAGACTGGGAGAGTGTGTTGTCTGGTTACCTAATCAAGAGCAGTCCATTTAAGGCTCATTATGGGTGATACCGATGACC
   L G M E D W E S V L S G S P N Q E Q S I L R L I M G D T D D
```



811 CATCTCTGGATTAACAAGATCTTGCATCAAGATACGGAATCAATGCAGGTTTTGGTGTGTGGATCAGGCTAGTCTTGGCTTTGAGA
P S L G L N K I L H Q D T E F N A G F G V V D Q A S L G F E
901 CACCTTTACTTCGGTCAGCAGCAATATTGACCTGATTTGTGGCAACAGTGCAAGGCTTGGTTCTGGTTCAAACCAAAATCACATTT
T P F T S V S S N I D P D F V G N S A R L G S G S N Q N H I
991 TTTCAACAGCAGCAGCTACAAATCTTTCACCTCCTCCAAGCGTTTTTCAACCGCAACCGTTGAAGCTTTGGATGAGAAGCCGAGATAT
F S T A A A T N L S P P P S V F Q P Q P V E A L D E K P Q I
1081 TCAGCCCTCAGCTGATAATGAATCAGAATCAAGCTCAGTATGCTCAAAATCCAGCTTTATTCTTGCCTTTTCATATGCTCAAAATGCAAG
F S P Q L I M N Q N Q A Q Y A Q N P A L F L P L S Y A Q M Q
1171 TGCATCAACTTTACCACCAGCAGCCGCCCCGCCGAAAGCTTAAATCTTGGGCCCAATCAAAGGTCCTCATTTCAGATTCGGGGCAGC
V H Q L L P P A P P P P K R L N L G P N Q K V P F S D S G Q
1261 AAGAGCTATTTCTCGACGACAGCCGCTTCAAATGCTTCAACAACAAGGAAACAATGGGCGTGACAACAACAGCAACGAAGCAGAAGT
Q E L F L R R Q P L Q M L Q Q Q R E T M G V T T T A T K Q K
1351 TGGTAAACGATGAATTGGCAATCAGCAGCTCAGCAGGCAATAACTGACCAATTTCAAGGCTCAGAGCTGATCGAAACAGGTAATC
L V N D E L A N Q Q L Q Q A I T D Q I F K A S E L I E T G N
1441 CTGTACACGCGCAAGAGATATTGGCGCGCTCAATCACCAGCTCTACCAATTTGGTAAGCCTTTTCAGAGGCTGCTTTTATTTCAGG
P V H A Q E I L A R L N H Q L S P I G K P F Q R A A F Y F K
1531 AGGCTTACAGTTACTTCCACATGAATATGAATAATAGTAGCTTGGCTTTGCCCGTTATAGTATCATTTCAGATTAGTCTTACA
E A L Q L L L H M N M N N S S L A L P G Y S I I F K I S A Y
1621 AATCTTCTCTGAAATCTCACGATTCTTCAATTTGCTAATTTCACTTGTAAACCAAGCACTTCTGAAGCCTTTGAAGGTTGCAATAGAA
K S F S E I S P I L Q F A N F T C N Q A L L E A F E G C N R
1711 TCCACATTATAGATTCGATATTGGATATGGTGGCAGTGGGCTTCTCTTATGCAGGAGCTTGTTTTGAAGTGAAGGCTCCTCCTTCGC
I H I I D F D I G Y G G Q W A S L M Q E L V L R S E G P P S
1801 TTAATACTCACTGCATTTGCTTCTCCGTCACACATGATGAGCTCGAGCTCAGCTTCACTCGAGAAAATTTGAAGCACTTTGCAAGTGAAA
L K I T A F A S P S T H D E L E L S F T R E N L K H F A S E
1891 TCAATATGCCGTTTGGAGCTTGAATTTAAGCCTTGAAGCTTAAATTTGCTTCTTTGGCGCTTCTTTTCGGGATTAGAAAAGTGAGG
I N M P F E L E I L S L E A L N S A S L A L P F R G L E S E
1981 CAACTGCTGTGAATCTCCCAATTTGGCACCTTCTGTAATTTACCAGCAACCTTTCTTCGGTGTCTTTGCTTTGTAAGCACTTAAACCCA
A T A V N L P I G T F C N Y P A T F P S V L C F V K Q L K P
2071 AGATTGTGTCTTTGGATAGAGGCTGTGATCGAACAGATGTTCCATTTCCACCATACGATTTCATGCACTCAGTCACTACTCATGCC
K I V V S L D R G C D R T D V P F P H H T I H A L Q S Y S C
2161 TACTTGAATCGCTGGATGCTGTGAATGTGAATTTGGATGCCTTGCAAAAAGATTGAGAGGTTTTGGTATTATCCTTGTATTGAAAAAATTG
L L E S L D A V N V N L D A L Q K I E R F L V Y P C I E K I
2251 TATTAGGACGCCACCGTTCTCCTGAGAGATTGCCTCCTTGAAGAGTCTGTTTATGCAATCTGGGTTTGCTCCATTGACATTTAGTAACT
V L G R H R S P E R L P P W K S L F M Q S G F A P L T F S N
2341 TCACTGAGTCCCAGGCTGACTGTTTGGTGAACGGACTCCAGTTAAGGTTTCCATGTTGAGAAGAGACAGTCTCGCTCGTTTTCTGCT
F T E S Q A D C L V Q R T P V K G F H V E K R Q S S L V F C
2431 GGCAGCGAAAGAGCTTATCTTGGCACTGCTTGGAGGTGCTAAAGGAGTAGCAGCGGATATTGGTTGCAAGGTTGCCAACAACAGCTT
W Q R K E L I L A T A W R C *
2521 TGGTTTATGATTATTTGACTTTTCTTGTGTGTTCTTATGCTAATTTGTCTATGAGCTTTGGGTTTATTGTCCAATCAACAAACAAA
2611 ACATTTTCGTAGCTTTCATGCATGTTTACTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Pt-GRAS B

1 CAATATCTATCATAATATCTTGAATTTCCGCGGAACAAGGCAAGCGTTGCCATAAAATCATCTTCCGATAGCAATAGGTTCTTTTCAGA
91 GGTGTGTGAATTTATTTAGCCAAAGTGAAGGAGAGCGAATATGGTTTATGATTTTTTGTTTAACACTCATAAGCTCATAATGATCAA
M V Y D F L F N T H K L Y N D Q
181 AGGAGTAATCAAGCGATTGGCCTTCAACTGGGCTTTCGATCGTTGATGCTATCCTTACTTGGCCATGATGTCGGATAACTCTGCTGCT
R S N Q A I G L Q L G L S I V D C Y P Y L P M M S D N S A A
271 TCTTCCATGATTCTTCAGCCAGAGATCAAAAGAGGCTTAAAGCGGACAATAAGTGTGGTGTGATGAGCCCAACCAAGTACTTTCAGCCG
S S M I L Q P R D Q K R L K R T I S V G D G S P T S T L S R
361 AGTAGCAGCACTAGCAGCTTGAATTTGCAAGGCTTCAATTCAGGGACCATATTTGGACTTATACTCGAAGATACCTTGTGCTGAA
S S S T S S L S N L P R L Q F R D H I W T Y T R R Y L A A E
451 GCTGTGCAAGAACGCGCGGAGCTATGATCAAAATCAGAAGTGGCTGCGACGGTGTCAACAAGATGGACCGGAGTGGGATGAGGCTC
A V E E A A A A A M I K S E D G C D G D Q D G T A D G M R I
541 GTTACGCTCCTAATGCTTGTGCTGAAGCTGTGCTTGTGCGCAGAGTCTCATGCTCGCTTTGTTATCCGAAGTTCGTTGCCAATGCT
V Q L L I A C A E A V A C R D K S H A S A L L S E L R A N A
631 TTGGTCTTTGGCTTCTTCCAGCGCTCGCTTCTTGTCTTGTCCAAGGCTTGTGACCGCTTTCATCGGTTACGCTTCTTGGAGCG
L V F G S S F Q R V A S C F V Q G L A D R L A S V Q P L G A
721 GTAGGCTCCTTCGCGCCATCAATGAACATAATGACATTTGCTGGCTCGCGGAGAAGGAAGAAGCTTTTCGCTTGTCTATGAAATTTGC
V G S F A P S M N I M D I A G S R E K E E A F R L V Y E I C
811 CCACACATTCAGTTTGGTCACTTTTGGCCAACTCATCCATATTGGAAGCCTTTGAGGGAGAGAGTTTAGTCCATGTTGTGGACTTAGGT
P H I Q F G H F V A N S S I L E A F E G E S L V H V V D L G
901 ATGACCCTAGTCTGCCACGCGTCAAGTGGCGCGGCTGATCGAAAGCCTCGCAACCGCGCTGGCAACCGCCAGCGGCTTCGA



```

991  M T L G L P R G Q Q W R R L I E S L A N R A G Q P P R R L R
    ATAAGTCCGTTGGCTTTGTGTTGAAAAATCCAAAGCATTGGTGATGAGCTTAAAGATTATGCGAAAACCTATGGCATCAATTTGGAG
1081  I T A V G L C V E K F Q S I G D E L K D Y A K T Y G I N L E
    TTCTGTGGTGGAAAGCAACTTGAAAAATTCAGACTAAAGACATCAAAGTCTTGAAAACGAAGTGCTTGTGTCAATAGCATACTT
1171  F S V V E S N L E N L Q T K D I K V L E N E V L V V N S I L
    CAGCTGCATTGTGGTCAAAGAAAGCAGAGGAGCTCTAAATTCAGTGTGCAAATAATCCATGAGCTGTACCAGAAAGTATTGGTGCTT
1261  Q L H C V V K E S R G A L N S V L Q I I H E L S P K V L V L
    GTTGAGCAGGACTCAAGCCATAATGGGCCATTTTTTCTTGGGAGATTTCATGGAAGCGTTGCACTACTACTCAGCAATATTTGACTCCCTT
1351  V E Q D S S H N G P F F L G R F M E A L H Y Y S A I F D S L
    GATGCCATGCTGCCAAGTATGACACAAAACCGCCAAAATAGAACAGTTTTACTTTGCGAGAGGAGATAAAGAACATTGTGAGCTGTGAG
1441  D A M L P K Y D T K R A K I E Q F Y F A E E I K N I V S C E
    GGGCTGCAAGGGTGGAGAGGCAGAGGGTGGACCAATGGCGTCGGAGGATGAGCCGTGCCGGTTCCAGGCGGCCACCCATTAAGATG
1531  G P A R V E R H E R V D Q W R R R M S R A G F Q A A P I K M
    ATAAATCAGGCACAGAAATGGCTCAAGAACAACAAGTCTGTGAGGGTTACACGGTGTGAAGAGAAAGGGTCTGGTTCTCGGCTGG
1621  I N Q A Q K W L K N N K V C E G Y T V V E E K G C L V L G W
    AAATCCAAGCCTATTATTGCTACTACTGCTGGAATGCTAAACTACAGCTGCCTAATTCACAGTCTTCTACAAATAAAGTTTCACC
    K S K P I I A T T C W K C *
1711  AATAAAGTTAGAAGCAGCTATTTAATTATATAATGTCTCCATTGCATTACCGTGTGCAACTCCGGAGTCTGGAGTGATGAATGTT
1801  GTTTTCATATTTCAGTGTGAGCAAGCTGTTTCAGGTGCTTGAACAGATGAAATAAAGATTTATGTATTGTTGGTTTTAAAAAAAAAAAAA
1891  AAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 1 *Pt-SCL6* (A)和 *Pt-GRAS* (B) cDNA 全长与推导氨基酸序列

注: 黑体ATG为起始密码子, TAA为终止密码子; 方框为保守的GRAS结构域; 双下划线是miR171和miR1446的识别位点

Fig. 1 Nucleotide sequences of complete *Pt-SCL6* and *Pt-GRAS* cDNAs and their deduced amino acid sequences

Note: ATG (start codon) and TGA (stop codon) are shown in bold. Two boxes delineate the GRAS domains. The double-underlined sequences delineate the miR171 and miR1446 recognition sites.

1.2 PSIPRED 在线程序预测的 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 基因编码蛋白的二级结构

用 PSIPRED 在线程序预测的 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 基因编码蛋白的二级结构如图 5-23 所示。图中显示 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 成熟蛋白的二级结构中都包含 α -螺旋、 β -折叠和随机卷曲结构, 再用 SOPMA 程序进一步分析得知, 这三种结构在 *Pt-SCL6* 占 32.44 %、13.88 %、和 53.68%, 而在 *Pt-GRAS* 蛋白中分别 48.92 %、11.59 %、和 39.49 %, 由此 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 蛋白结构分别主要由随机卷曲和 α -螺旋组成, 并都属于混合型蛋白。

1.3 BAP 和 NAA 对芽再生的影响


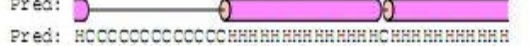
用 Hind III和 Xba I 对表达载体 pJIT166-GFP 和 3.2 中 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 的 ORF 正确的克隆提取质粒同时进行双酶切, 再已经酶切过的表达载体 pJIT166-GFP 与目的片断在 T4DNA 连接酶的作用下进行连接, 得到 35S-GW-GQ505957-GFP 和 35S-GW-GU072592-GFP 融合表达载体, 然后将其转入到热击转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞中, 进行 PCR、酶切从而筛选出所需要的阳性克隆, 并进行测序验证分析。

通过构建绿色荧光蛋白基因与 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 两个基因 ORF 的瞬时表达载体, 并将其转化到洋葱表皮细胞中, 获得高效瞬时表达, 从而通过绿色荧光蛋白的荧光信号来确定目标蛋白在细胞内的位置, 用该方法以达到确定基因表达产物-蛋白质在细胞中发挥功能的具体部位目的。如图 3-A-d 和 3-B-d 所示, 在细胞核内和细胞质中都可以观察到 GFP 的绿色荧光信号是由于对照的 GFP 蛋白没有细胞核定位的功能, 可以通过核孔扩散到细胞核内, 又如图 3-A-c 和 3-B-c 所示, 仅在细胞膜产生绿色荧光, 可见转录因子 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 表现出在细胞膜区域定位的现象。这一事实表明 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 均不具有核定位功能。

2 讨论

目前, 人类对生物代谢及生命过程的研究已经进入了基因水平的阶段, 有关功能基因的研究也成为了一个热点。进行功能基因的研究首先需要将其克隆出来, 为其后续研究提供一个基础; 其次要进行蛋白质的亚细胞定位, 因为在生物的生命活动中起直接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位置密切相关。因此, 对基因进行克隆和对其表达产物进行亚细胞定位是研究功能基因的两个重要环节。



Pred: CCHHHHHHHHHHHHHHHCCCHHHHHHHHHHHHHHHHH
 AA: GNFVHAQELI LARLNHQLSPIGKPFQRAAFYFKEALQLLLH
 370 380 390 400

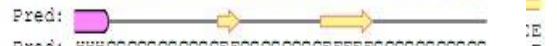
Conf: 
 Pred: 
 Pred: HCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
 AA: MNMNNSS LALPGYS IIFKI \$AYKSFSE ISPI LQFANFTCN
 410 420 430 440

植物
Zhiwu
http://


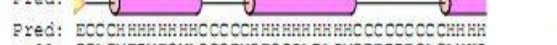



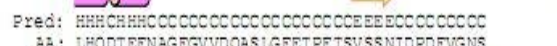
Pt-S1


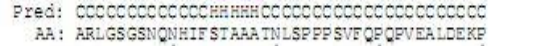
Conf: 
 Pred: 
 Pred: CCCCCCHHHHCCCEEEEECCCCCCHHHHCHHHHHHHHHHH
 AA: MRAMP LAFEDFQGGKALDFFSSSSSDSRQFHHQQHKBEQDW
 10 20 30 40


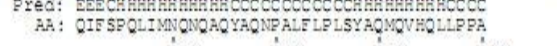
Conf: 
 Pred: 
 Pred: HHHCCCCCCCCCEEECCCCCEEEEECCCCCCCCCCCC
 AA: LLSNSNRGNKKANCCYVGSATTEPTSVLDNRRSPSPPTSS
 50 60 70 80

Conf: 
 Pred: 
 Pred: CCEEECCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCCCCE
 AA: STLSSSLGGGSSATDITGVAATNASSNPPSVDITNTEKC
 90 100 110 120

Conf: 
 Pred: 
 Pred: ECCCCHHHHHHCCCHHHHHHHHCCCHHHHHHHHHHH
 AA: GGLGMEWESVLSGSPNQEQSLRLIMGDTDDPSLGLNKI
 130 140 150 160

Conf: 
 Pred: 
 Pred: HHHCHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCC
 AA: LHQDTEFNAGFGVVDQASLGFTPTTSVSSNIDPFDVGNSS
 170 180 190 200



Conf: 
 Pred: 
 Pred: CCCCCCCCCCHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
 AA: ARLGSGSNQNHIFSTAAANLSPPPSVFQPQVFEALDEKP
 210 220 230 240



Conf: 
 Pred: 
 Pred: EEECHHHHHHHHHCCCHHHHHHHHHHHHHHHHH
 AA: QIFSPQLMNNQQAQVQNPALFLPLSYAQMNVHQLLPPA
 250 260 270 280



Conf: 
 Pred: 
 Pred: HHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
 AA: SCLLESLEDAVIVNLDALQKIERFLVYPCIEKIVLGRHRS
 290 300 310 320



Conf: 
 Pred: 
 Pred: CCHHHHHHHHHHHHCEEEEEECHHHHHHHHHHHHH
 AA: ERLFPFKSLFQMSQFAPLTFSTNFTESQADCLVQRTPVXG
 330 340 350 360


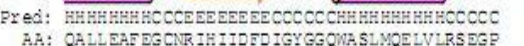
Conf: 
 Pred: 
 Pred: EEEEECCCCCEEEECCEEEEEESEEESEEE
 AA: HVEKRQSSLYFCWQRKELI LATAWR
 370 380 390 400


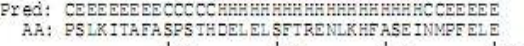
Conf: 
 Pred: 
 Pred: CCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
 AA: PPPPKRLNLGPNQKVPFSDSGQQQLFLRRQPLQLQQQRE
 290 300 310 320


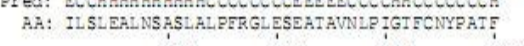
Conf: 
 Pred: 
 Pred: HRCCEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
 AA: TMGVTTTATKQKLVNDELANQQLQQAITDQIFKASELIET
 330 340 350 360

Conf: 
 Pred: 
 Pred: CCHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHH
 AA: GNFVHAQELI LARLNHQLSPIGKPFQRAAFYFKEALQLLLH
 370 380 390 400

Conf: 
 Pred: 
 Pred: HCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
 AA: MNMNNSS LALPGYS IIFKI \$AYKSFSE ISPI LQFANFTCN
 410 420 430 440

Conf: 
 Pred: 
 Pred: HHHHHHHHCCCEEEEECCCCCHHHHHHHHHHHHH
 AA: QALLEAFEGCNRIH IIDFDIGYGGQWASLMQELVLRSEGP
 450 460 470 480

Conf: 
 Pred: 
 Pred: CEEEEEECCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
 AA: PSLKITAFA SPS TRDEL EL SFTREN LKHFASE INMPFELE
 490 500 510 520

Conf: 
 Pred: 
 Pred: ECCCCHHHHHHHHHCCCCCCCCCEEEECCHHHHHHH
 AA: ILSLEALNSASLALPFRGLESEATAVNLPIGTFNYPATF
 530 540 550 560





Pt-SCL6 B

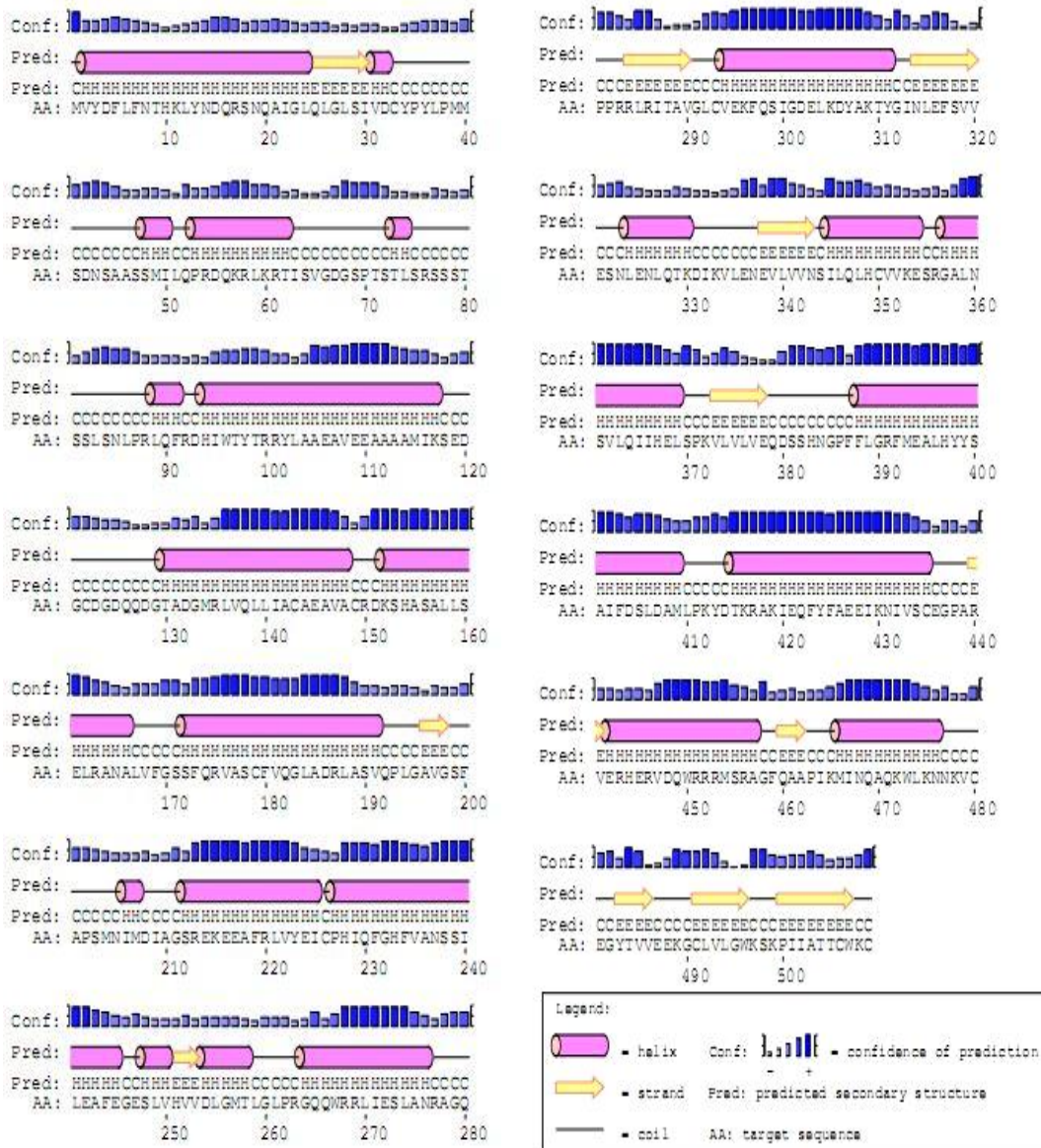


图 3 PSIPRED 预测的拟 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 基因推导成熟蛋白的二级结构

Figure 3 The secondary structures of the putative proteins of Pt-SCL6 and Pt-GRAS by PSIPRED

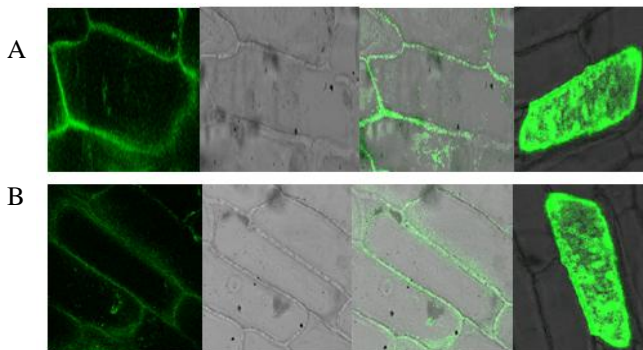


图 4 35S-GW- GQ505957 (A)/ GU072592 (B) -GFP 蛋白在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位

注: a: 35S-GW- GQ505957/ GU072592 -GFP 融合蛋白在蓝光激发下产生的荧光; b: 在明场下洋葱表皮细胞的外观图; c: a 与 b 的叠加图; d: GFP 对照

Figure 4 The subcellular localization of 35S-GW- GQ505957 (A)/ GU072592 (B) -GFP in onion epidermal cells



Note: a: the fusion protein of 35S-GW- GQ505957/GU072592 with GFP excited by blue light emerges green fluorescence; b: the photograph is an external view of onion epidermal cell under bright light; c: The photograph is an overlaid of a and b; d: GFP is the control

一般情况下, 克隆未知基因需要进行保守结构域的比对, 兼并引物的设计 3' 端和 5' 端序列的扩增等一系列实验过程。本实验过程中作者对枳中未知的 GRAS 基因进行了电子克隆。通过同源序列的比对和分析后, 得到目的基因序列, 并对目的序列的正确性进行了验证。结果表明, 该基因克隆方法是一种快速简便的方法, 既简化了步骤又增加了目的序列的正确性。这种方法适用于已经建立了 EST 库的物种上。

GRAS 结构域是高等植物所特有的一类转录因子, 拟南芥中 miR171 通过对具有 GRAS 结构域的 SCL(SCARECROE-LIKE)转录因子家族成员如 SCL6-II、SCL6-III 和 SCL6-IV 的调控, 来控制花的发育和根系发育(Llave at al., 2002)。本研究通过构建的 cDNA 文库中克隆到两个 GRAS 基因全长即 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 其编码的蛋白都有 GRAS 结构域, 属于 GRAS 转录因子家族中的保守结构域, 为了进一步确定相关 F-box 基因蛋白在细胞中的存在位置, 本试验首次以枳为试材, 通过 GFP 标记方法研究了 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 基因的亚细胞定位特性。研究表明, Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 均定位于细胞膜中。转录因子 Pt-SCL6 和 Pt-GRAS 表现出在细胞膜区域定位的现象, 不具有核定位功能。

3 材料与方法

3.1 电子克隆

为了在柑橘中获得 EST 序列, 作者首先在 GenBank 的核酸数据库中对拟南芥的 SCL6 基因序列 NP_191926 和杨树 GRAS 基因序列 XM_002322191 进行检索, 由于不同物种间同源基因的核酸序列具有相对保守的特点, 所以可以把已检索出的拟南芥 NP_191926(SCL6)和杨树 XM_002322191(GRAS)作为探针, BLAST 检索柑橘 EST 数据库, 结果分别得到了具有高度相似性的 EST 序列 EY745185 和 DY287666, 接着再 BLAST 检索该两个高相似序列, 将检出与 EY745185 和 DY287666 序列有部分重叠或同源性较高的的 EST 序列 (EY747196, EY693961, EY697821, CX078582)和(DY268860, FC901464, FC897031)拼接组装为克隆重叠群, 重复以上过程, 反复的拼接和比对 EST 重叠群序列, 从而尽可能的获得枳 SCL6 和 GRAS 的 cDNA 全长(张波等, 2008; 宋长年等, 2009)。

3.2 实验克隆

3.2.1 试验材料

供试材料来自于江苏省太湖常绿果树技术推广中心—苏州科学研究所的枳(*P. trifoliata*)采其幼叶和花后立即用液氮冷冻, 并带回实验室于-70 °C 保存, 为提取其总 RNA 备用。

3.2.2 菌株、质粒以及实验试剂亚细胞定位载体, 大肠杆菌菌株 DH5

表 1 引物的序列及其预期的片段大小

Table 1 Sequences of primers and pre-production lengths

编号 Code No	序列 Sequence (5'-3')	预期的片段大小 Predicted size of amplified product (bp)	用途 Use
P01	<u>GCAGGACTGCAGCTGACTGACTACT</u> ₃₀ VN		cDNA 合成
P02	<u>GACCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG</u>		cDNA synthesis
P03	AATGTGGAGGCTTGGGAATGGAAGACTG	±1960	扩增 <i>Pt-SCL6</i> 基因 3'端
P04	<u>GCAGGACTGCAGCTGACTGACTAC</u>		3'-end amplification
P05	<u>GACCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC</u>	±900	扩增 <i>Pt-SCL6</i> 基因 5'端
P06	GGTGTCTCAAAGCCAAGACTAGCCT		5'-end amplification
P07	<u>AAGCTTATGAGGGCCATGCCCTAGCCTTTG</u>	2118	<i>Pt-SCL6</i> 基因 ORF 扩增
P08	<u>TCTAGATTAGCACCTCCAAGCAGTGGCCAAG</u>		<i>Pt-SCL6</i> complete ORF amplification
P09	AAGCTTCAATTCAGGGACCATATTTGGAC	±1500	扩增 <i>Pt-GRAS</i> 基因 3'端



P10	<u>GCAGGACTGCAGCTGACTGACTAC</u>		3'-end amplification
P11	<u>GACCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC</u>	±600	扩增 <i>Pt-GRAS</i> 基因 5'端
P12	TCGGATAACAAAGCCGAGGCATGAGAC		5'-end amplification
P13	<u>AAGCTT</u> ATGTGGGATCTGAATGACTCGC	1908	<i>Pt-GRAS</i> 基因 ORF 扩增
P14	<u>TCTAGAGGAGGGTCTAACAAGGGAGTGGAATC</u>		complete ORF of <i>Pt-GRAS</i> amplification

注: 下划线为酶切位点, AAGCTT 为 *Hind* III, TCTAGA 为 *Xba* I; 粗线和双下划线是相互匹配的引物与接头。

Note: Underlined portions in primers are the restriction enzyme sites of *Hind* III and *Xba*, AAGCTT is *Hind* III and TCTAGA is *Xba*; the thick underline and double underline indicate matching primers or adaptors

3.2.3 提取和纯化枳的 RNA

枳的叶和花组织中总 RNA 的提取是采用 CTAB 法并用 DNase I 酶进行消化除去 DNA。然后用的 PloyAtract® mRNA Isolation System IV 试剂盒(Promega 公司生产)进行 mRNA 的纯化。

3.2.4 反转录合成 cDNA

利用 mRNA 模板和反转录引物经过 PCR 反转录合成对应的 cDNA, 再进行一系列的保温、冰浴冷却后, 置于-70 °C 冰箱中保存备用。其中模板是 3.2.3 提取并纯化后的 mRNA, 合成 cDNA 第一条链的反转录引物是 P01, 延伸加帽子的引物是 P02。

3.2.5 PCR 对基因 3'和 5'末端进行扩增

把上一步反转录合成的 cDNA 作为模板, 分别以引物 P03/P04 和引物 P09/P10 为 PCR 扩增引物进行扩增获得目的基因 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 的 3' 末端。其中所采用的反应体系和反应参数参照宋长年等(2009)电子克隆方法中的 50μL 的反应体系和 35 个循环的反应参数。之后用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测并割胶回收目标片段(利用 Axygen 公司生产的 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒), 将回收的目标片段与 pMD18-T Simple 克隆载体连接, 进行 T/A 克隆, 将菌液交于公司进行测序。用同样的方法以引物 P05/P06 和 P11/P12 为扩增引物进行 PCR 扩增以得到基因 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 的 5' 末端。

3.2.6 扩增基因的 ORF

以引物 P07/P08 和 P13/P14 为扩增引物, 用 3.2.4 反转录合成的 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增获得 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 的 ORF。反应体系和反应参数及回收、克隆与测序都同上, 唯一不同的是反应体系中的 Taq 酶用的是 Ex-Taq 酶。

3.2.7 生物信息学分析

将以上扩增出的 *SCL6* 和 *GRAS* 的 ORF、3' 末端和 5' 末端等序列利用 DNAMAN5.22 软件进行拼接分析; 分别用 BLASTn 和 BLASTp 对该序列的核苷酸和氨基酸序列进行相似性分析; 用 PSIPRED 在线程序预测的 *Pt-SCL6* 和 *Pt-GRAS* 基因编码蛋白的二级结构(Liam et al., 2000)。

3.3 亚细胞定位载体的构建

用内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 同时双酶切上面测序正确的 *Pt-SCL6*、*Pt-GRAS* 的 ORF 提取质粒和载体 pJIT166-GFP, 电泳检测后, 分别回收目的基因片段和空载体; 经 T4 DNA 连接酶连接从而得到 35S-GW-GQ505957/ GU072592--GFP 融合表达载体, 然后将其分别转入到热击转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 进行 PCR 检测、酶切检测、测序等一系列过程筛选并验证阳性克隆及其正确性。

3.4 35S-GW-GQ505957/ GU072592-GFP 转化洋葱表皮细胞

3.4.1 制备微粒子弹

方法是 DNA 的钨粉包埋法(徐淑平等, 1998)。具体操作: 取 50 mg/mL 钨粉悬液和 2.5mol/LCaCl₂ 各 50 μL, 0.1 mol/L 亚精胺 20 μL, 以及 35S-GW-GQ505957/ GU072592-GFP 载体质粒 5 μg 充分混匀, 经离心、冰浴静置后用 70%乙醇和无水乙醇各洗涤一次后沉淀, 50 μL 纯酒精悬浮沉淀。



3.4.2 基因枪轰击受体材料

本实验的受体材料是幼嫩的洋葱表皮, 将其经过 MS 高渗预培养后切成约 1 cm × 1 cm 的小块放在 10 g/L 琼脂培养基上, 同时将 20 μl 钨粉 DNA 混合物点在轰击膜中央, 采用基因枪进行轰击, 轰击后将其细胞暗培养后制片, 通过激光共聚焦显微镜观察细胞中的荧光。用 20% 蔗糖溶液对转化了的洋葱表皮进行处理使其质壁分离, 再用紫外光和蓝光激发成像并拍照(杨光等, 2011)。

作者贡献

李阿英完成了主要实验操作和文章初稿的写作; 刘洪在 GRAS 家族蛋白序列的相关软件的使用等实验操作中提供指导和帮助; 宋长年是项目的构思者及负责人, 提供写作思路与最后审阅和修改工作; 李晓颖和郭磊, 对论文进行了详细的阅读和并提出修改意见。在这里对他们致以诚挚的感谢!

致谢

诚挚感谢教育部科学技术研究重点项目(109084); 江苏省 2009 年度高校研究生科研创新计划(CX09B_238Z)。

参考文献

- Torres-Galea P., Huang L.F., Chua N.H., Bolle C., 2006, The GRAS protein SCL13 is a positive regulator of phytochrome-dependent red light signaling, but can also modulate phytochrome A responses [J], *Mol Genet Genomics*, 276: 13-30.
- Li X.Y., Qian Q., Fu Z.M., Wang Y.H., Xiong G.S., Zeng D.L., Wang X.Q., Liu X.F., Teng S., Hiroshi F., Yuan M., Luok D., Han B., Li J.Y., 2003, Control of tillering in rice, *Nature*, 422: 618-621.
- Lee M.H., Kim B., Song S.K., Heo J.O., Yu N.L., Lee S.A., Kim M., Kim D.G., Sohn S.O., Lim C.E., 2008, Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana* [J], *Plant Mol Biol*, 67:659-670.
- Cristofani-Yaly M., Berger I.J., Targon M L P N, Takita M.A., Dorta S.O., Freitas-Astúa J., Souza A.A., Boscaroli-Camargo R.L., Reis M.S., Machado M.A., 2007, Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and in silico hybridization, *Genet and Mol Bio*, 30: 972-979.
- Llave C., Xie Z., Kasschau K.D., Carrington J.C., 2002, Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA [J], *Science*, 297: 2053-2056.
- Liam J., McGuffin, Kevin B., David T.J., 2000, The PSIPRED protein structure prediction server, *BIOINFORMATICS Applications Note*, 16 (4), 404-405.
- Sun X., Wang C., Fang J.G., Mu Q., Wang X.C., 2001, Bioinformatics Analysis of Gene Family in Grapevine, *Acta Agriculturae Jiangxi*, 23(7):1~8 (孙欣, 王晨, 房经贵, 慕茜, 王西成. 2011, 葡萄 GRAS 基因家族生物信息学分析, *江西农业学报*, 23(7):1~8)
- Zhou S.Y., 2009, Difference of transient expression of OsWAK1::GFP in three tobacco species, *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25(8): 58-61 (周善跃, 2009, 三个烟草品种瞬时表达 OsWAK1::GFP 的差异, *中国农学通报*, 25(8): 58-61)
- Xia P.A., Liu W.Q., Jiang Y., Sun S.G., Yang S.Y., Wang J.G., 2004, Cloning and characterization of the promoter region of *Musca Domestica* Yolk Protein-1 gene, *Acta Genetica Sinica*, 31(7): 688-694 (夏平安, 刘维全, 江禹, 孙绍光, 杨淑艳, 王吉贵, 2004, 家蝇卵黄蛋白基因启动子区的克隆与活性分析, *遗传学报*, 31(7): 688-694)
- Zhang B., Li X., Chen K.S., 2008, Molecular cloning of lipoxygenase gene family members in kiwifruit based on EST database, *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (3): 337-342 (张波, 李鲜, 陈昆松, 2008, 基于 EST 库的猕猴桃脂氧合酶基因家族成员的克隆, *园艺学报*, 35 (3): 337-342)
- Song C.N., Fang J.G., Wang C., Shanguan L.F., Zhang Z., 2009, Cloning and Expression Analysis of APETALA2 Gene from *Poncirus trifoliata* Based on EST Database, *Acta Horticulturae Sinica* 35(3): 337-342 (宋长年, 房经贵, 王晨, 上官凌飞, 章镇, 2009, 基于 EST 库的枳 APETALA2 基因 cDNA 克隆及其表达分析, *园艺学报*, 35(3): 337-342)
- Xu S.P., Wei Z.M., 1998, Introduction to method of microprojectile bombardment and its application, *Plant Physiology Communications*, 34(1): 41-43 (徐淑平, 卫志明, 1998, 基因枪的使用方法介绍, *植物生理学通讯*, 34 (1): 41-43)
- Yang G., Cao X., Fang J.G., Huang Z.X., Tao J.M., Wang C., 2011, Sub-Cellular Localization and Expression Analysis of Genes Involved in Grapevine Floral Development, *Agricultural Sciences in China*, 44(3): 641-650 (杨光, 曹雪, 房经贵, 黄振喜, 陶建敏, 王晨, 2011, 葡萄花发育基因的亚细胞定位和表达分析, *中国农业科学*, 44(3): 641-650)