

灰毡毛忍冬 *MADS-box* 家族基因 *SVP* 克隆及表达分析

龙丽君^{1,2}, 刘思思², 曾慧杰², 李昌珠², 张 岗^{3,4}, 马英姿^{1*}, 李依民^{3,4*}

1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004

2. 湖南省林业科学院省部共建木本油料资源利用国家重点实验室, 湖南 长沙 410004

3. 陕西中医药大学陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 西安 712046

4. 陕西中医药大学省部共建特色秦药资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西 咸阳 712083

摘要: 目的 克隆获得灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* *MADS-box* 家族基因 *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*), 并对其进行生物信息学、时空表达特异性和蛋白原核表达等特性分析。方法 根据灰毡毛忍冬转录组数据设计特异性引物, 通过 PCR 技术克隆 *LmSVP* 基因全长; 运用生物信息学方法分析其编码蛋白的序列特征; 利用实时荧光定量技术(reverse-transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 分别检测该基因在灰毡毛忍冬 2 个品种“龙花”和“金翠蕾”叶片、花早期和晚期中的表达水平; 最后构建 pTOPO-D1-*LmSVP* 原核表达载体, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行蛋白表达。结果 *LmSVP* 基因全长 1472 bp, 开放阅读框(open reading frame, ORF) 长 720 bp, 编码 239 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量为 26 712.63。进化树分析表明, *LmSVP* 蛋白与中华猕猴桃、小粒咖啡的 *SVP* 蛋白亲缘关系最近。qRT-PCR 结果显示, *LmSVP* 基因在“龙花”和“金翠蕾”品种中的表达均存在组织特异性表达, 其在叶中的表达量显著高于花中; 而在花发育不同时期, *LmSVP* 基因表达量没有明显差异。*LmSVP* 在大肠杆菌中成功表达出蛋白, 蛋白表达结果显示其相对分子质量约为 26 710, 与预测相符合。结论 通过对 *LmSVP* 基因的全长克隆、序列分析和表达特性鉴定, 为进一步研究该基因在调控花蕾型灰毡毛忍冬蕾期长及花冠不开放的功能提供实验基础。

关键词: 灰毡毛忍冬; *MADS*; *SVP*; 基因克隆; 表达分析; 原核表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)16-5350-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.16.024

Cloning and expression analysis of *MADS-box* family gene *SVP* from *Lonicera Macranthoides*

LONG Li-jun^{1,2}, LIU Si-si², ZENG Hui-jie², LI Chang-zhu², ZHANG Gang^{3,4}, MA Ying-zi¹, LI Yi-min^{3,4}

1. School of Life Science and Technology, Central South University of Forestry Science and Technology, Changsha 410004, China

2. State Key Laboratory of Woody Oil Resources Utilization, Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China

3. Key Laboratory for Research and Development of “Qin Medicine” of Shaanxi Administration of Chinese Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

4. State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

Abstract: Objective To clone the *MADS-box* family gene *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) of *Lonicera macranthoides*, analyze the characteristics of bioinformatics, spatiotemporal expression and protein prokaryotic expression. **Methods** Based on the transcriptome sequencing data of *L. macranthoides* in the previous study, the full-length cDNA of *LmSVP* was cloned by PCR. The bioinformatics methods were used to analyze the sequence characteristics of their encoded proteins. Real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression level of *LmSVP* in leaves, early and late flowers of the “Longhua” and “Jincuilai” varieties of *L. macranthoides*. And then, the pTOPO-D1-*LmSVP* prokaryotic expression vector was constructed and transformed into *E.coli* BL21 (DE3) to express. **Results** The full-length of *LmSVP* gene was 1472 bp, containing an open reading frame (ORF) of 720 bp and encoding 239 amino acids. The relative molecular weight of *LmSVP* protein was 26 712.63. Phylogenetic analysis indicated that the *LmSVP*

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2022JJ30326); 湖南省林业科技创新资金项目(XLKY202208); 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4939)

作者简介: 龙丽君, 女, 硕士研究生, 研究方向为植物学。E-mail: 2351643604@qq.com

*通信作者: 马英姿, 女, 教授, 从事植物学及植物资源利用研究。E-mail: ma_yingzi@163.com

李依民, 女, 副教授, 从事中药资源评价与高效利用研究。E-mail: 2051058@sntcm.edu.cn

protein was most closely related to *Actinidia chinensis* and *Coffea arabica*. The qRT-PCR results showed that the expression level of *LmSVP* genes were specific in both “Longhua” and “Jinculei” variety, and expression in leaves were significantly higher than in flowers. At different stages of flower development, the expression level of *LmSVP* genes were not significantly different. *LmSVP* successfully expressed a recombination protein with molecular weight of about 26 710 in the *E. coli* BL21 (DE3), which was consistent with the prediction.

Conclusion Through the full-length cloning, sequence analysis and expression characterization of *LmSVP* gene, it provided experimental basis for further study on the function of *LmSVP* gene in regulating the bud length and corolla non-opening of *L. macranthoides*.

Key words: *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.; MADS; SVP; gene cloning; expression analysis; prokaryotic expression

灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.为忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属 *Lonicera* L. 多年生常绿藤本或灌木,是中国传统中药“山银花”的主要基原植物之一,其药用部位为干燥花蕾及初开的花,具有很高的药用价值和经济价值。其味甘、性寒,具有解热抗毒、疏风散热之功效,多用于治疗热毒血病、风热感冒、温病发热等主要病症^[1]。灰毡毛忍冬主要有效成分为绿原酸类化合物,且总绿原酸含量以花蕾期最高,其量随着花冠展开而降低^[2-3]。普通灰毡毛忍冬花冠展开、蕾期短,不利于药材采摘,很大程度上降低了其产量和品质^[4];但近年来选育出的花蕾型灰毡毛忍冬新品种“金翠蕾”“银翠蕾”和“龙花”等,其花期花冠一直不展开,花蕾整齐均呈棒状,花期长达 15~25 d,其优良性状更有利于实际生产^[5-6]。为更好地指导实际生产,花蕾型灰毡毛忍冬蕾期长、花冠不展开现象背后的原因亟待研究。

MADS-box 基因在植物花器官发育、调控开花时间等方面有着十分重要的作用^[7]。属于 *MADS-box* 基因家族的 *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) 基因为开花抑制基因,最早从拟南芥的早花突变体中鉴别出来^[8],在大多数双子叶植物中起到调控开花时间和花序发育的作用^[9]。*SVP* 同源基因广泛存在于各种植物中,但其所具备的功能可能因物种而异。目前,研究人员已从蝴蝶兰 *Phalaenopsis aphrodite* H. G. Reichenbach.^[10]、梅花 *Chimonanthus praecox* (L.) Link.^[11]、中国水仙 *Narcissus tazetta* subsp. *chinensis* (M. Roem.) Masamura & Yanagih.^[12]以及细叶百合 *Lilium pumilum* DC.^[13]等多种植物中克隆得到 *SVP* 同源基因,并证实其在拟南芥中过表达能延迟开花以及参与花序形态结构和花器官发育等生命活动的调控^[8],但尚未见 *LmSVP* 基因克隆的相关报道,对其在灰毡毛忍冬开花诱导等花器官发育过程中的功能也尚不清楚。

鉴于 *SVP* 基因在植物开花及花器官发育过程中的重要作用,本研究利用前期获得的灰毡毛忍冬转录组测序数据,筛选出 *LmSVP* 基因,根据其序列设

计特异性引物,利用实时荧光定量技术 (reverse-transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 技术,克隆 *LmSVP* 基因全长,对其进行生物信息学分析。并分析了该基因在灰毡毛忍冬“龙花”和“金翠蕾”品种不同组织、花不同发育时期的相对表达量,构建原核表达载体并转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行表达,初步了解了该基因的相关特性。以期研究 *LmSVP* 基因在花蕾型灰毡毛忍冬花器官发育中的功能提供理论依据,为进一步研究花蕾型灰毡毛忍冬蕾期长、花冠不展开的分子机制奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

所用植物材料采自湖南省林业科学院试验林场,经湖南省林业科学院王晓明研究员鉴定为灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand. - Mazz.的“龙花”和“金翠蕾”品种。随机选择 3 株生长健壮、无病虫害的植株,采集灰毡毛忍冬“龙花”和“金翠蕾”的早晚期花蕾和幼嫩叶片,液氮速冻,保存于-80 ℃超低温冰箱备用。

1.2 主要试剂

EASYspin Plus 多糖多酚复杂植物 RNA 快速提取试剂盒、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒、Zero Background pTOPO-TA/Blunt Simple Cloning Kit、pTOPO-D1 Directional Expression Kit、DL2000 Plus DNA Marker、6×DNA Loading Buffer 等均购自北京艾德莱生物科技有限公司,HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 等均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,大肠杆菌菌株 DH5α 感受态细胞、BL21 (DE3) 感受态细胞、蛋白 Marker 等均购自北京全式金生物技术有限公司,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、5×蛋白上样缓冲液、新型考马斯亮蓝快速染色液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒等均购自北京酷莱搏科技有限公司。引物由湖南擎科生物技术有限公司合成,序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称	序列 (5'-3')	产物长度/bp	引物用途
LmSVP-F	GCGGTACGTGATGCTCTTGATACA	1472	cDNA 全长克隆
LmSVP-R	ATGGCTTACACTCGTTAGAGAAGGC		
LmSVP-qF	CCTTCCCTCACCTCACCTTACCT	127	qRT-PCR
LmSVP-qR	TGTCACCTTGCCCTTGCCGTTATGT		
18S-F	CTTCGGGATCGGAGTAATGA	118	内参基因
18S-R	GCGGAGTCCTAGAAGCAACA		
LmSVP-yF	CACCATGGCTAGAGAGAAGATAAAG	720	原核表达
LmSVP-yR	CTAAAAGGGAAGCGCTAACTT		

2 方法

2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 第 1 条链的合成

参照 EASYspin Plus 多糖多酚复杂植物 RNA 快速提取试剂盒操作说明制备样品的总 RNA, 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度和质量。以提取的 RNA 样品为模板, 按照 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 操作说明, 逆转录合成 cDNA, -20 °C 保存备用。

2.2 LmSVP 基因 cDNA 全长克隆

根据前期获得的灰毡毛忍冬转录组数据 (PRJNA 667821) 相关信息^[14-15], 选取具有完整开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的 LmSVP 序列, 应用 Primer Premier 6 设计 LmSVP 基因的特异性引物 LmSVP-F 和 LmSVP-R, 引物序列信息见表 1。将“2.1”项得到的 cDNA 原液稀释 20 倍作为模板进行 PCR 扩增, 反应体系 (25 μL): 2×Phanta Max Buffer 12.5 μL, dNTP Mix 0.5 μL, SVP-F 和 SVP-R 各 1 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL, cDNA 模板 1.5 μL, ddH₂O 8.0 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 彻底延伸 5 min; 12 °C 持续。反应结束后, PCR 扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 并按琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒回收 PCR 产物。回收产物与 pTOPO 载体连接并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 涂布于含有氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 固体培养基平板上, 倒置培养过夜。挑取单菌落, 振荡培养 4~5 h, 进行 PCR 鉴定选出阳性克隆, 送至长沙擎科生物公司测序。

2.3 LmSVP 基因生物信息学分析

基于 LmSVP 基因的测序结果, 应用 NCBI 的 ORF finder 工具查找 ORF 以及推导编码的氨基酸序列。通过 Prot Param 在线工具 (<http://web.expasy.org/>)

分析 LmSVP 蛋白的理化性质; 利用 Prot Scale (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl/>) 软件预测 LmSVP 蛋白的亲疏水性; 使用 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 分析 LmSVP 蛋白的跨膜结构域; 应用 SignalP 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>) 预测 LmSVP 蛋白的信号肽; 采用 WOLF PSO RT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 在线预测 LmSVP 蛋白亚细胞定位情况; 利用 Netphos 3.1 server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 对 LmSVP 蛋白的磷酸位点进行预测分析; 使用 NCBI 网站 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 在线分析蛋白质保守结构域; 通过 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测 LmSVP 蛋白的二、三级结构; 运用 DNA STAR 7.1 中的 MegAlign 程序进行氨基酸序列对比分析; 借助 MEGA-X 中的 NJ 法构建系统进化树。

2.4 LmSVP 基因的表达分析

根据 LmSVP 基因 cDNA 全长序列, 设计 qRT-PCR 的特异性引物 LmSVP-qF 和 LmSVP-qR (表 1), 以 18 S rRNA 作为内参基因。提取灰毡毛忍冬“龙花”和“金翠蕾”品种叶片、早期花蕾 (花蕾平均长 14.49 mm) 以及晚期花蕾 (花蕾平均长 41.85 mm) 的总 RNA 并反转录成 cDNA, 进行实时荧光定量分析。反应体系: 2×RealStar Green Fast Mixture PCR 5 μL, Forward primer 0.4 μL, Reverse primer 0.4 μL, cDNA 1 μL, H₂O 3.2 μL。扩增程序: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析, 熔解曲线为 95 °C 5 s, 56 °C 5 s,

95 ℃持续,每个样品重复3次,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。利用 SPSS26.0 进行数据的差异显著分析。

2.5 LmSVP 基因原核表达载体的构建及诱导表达

根据测序所得 CDS 序列,设计原核表达引物 SVP-yF 和 SVP-yR (表 1),以稀释 20 倍的 cDNA 为模板,经 PCR 扩增、1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后,对 PCR 扩增产物进行切胶回收,回收产物按照 pTOPO-D1 一步法定向原核表达试剂盒操作说明于 37 ℃连接 5 min,产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含有 Amp 的 LB 固体培养基上,次日挑选单菌落进行 PCR 鉴定、测序及提取重组质粒。将构建好的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,挑取单克隆进行菌液验证,将验证正确的原核表达工程菌液按照 1:100 比例在 50 mL LB 液体培养基 (含 Amp) 中培养,培养至菌液 A_{600} 为 0.6 时向培养基中加入终浓度为 0.6、0.8、1.0 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导,37 ℃培养 4 h。诱导结束后,5000 r/min 离心 15 min,去上清,加入 1×PBS (pH 7.5) 缓冲液重悬菌体,冰浴条件下超声破碎 20 min,彻底破碎后,12 000 r/min 离心 20 min。分别取上清、沉淀加入蛋白上样缓冲液,沸水煮沸 10 min,经 12.0% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白表达情况。

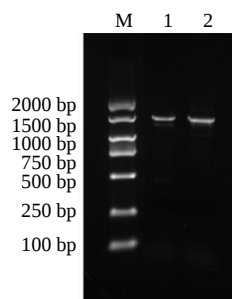
3 结果与分析

3.1 LmSVP 基因全长 cDNA 克隆

从灰毡毛忍冬转录组中获得该基因的全长序列,以灰毡毛忍冬 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。以 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,结果显示在靠近 Marker 的 1500 bp 附近出现了一条清晰明显的条带,与预期大小相符,见图 1。阳性克隆经测序比对,与转录组中序列一致,测序结果在 NCBI 网站上利用 Blast 功能进行比对,显示序列为 STMADS11 亚家族成员 SVP 基因,将该基因命名为 LmSVP,基因登录号为 OQ507619。通过 ORF-Finder 分析,LmSVP 基因全长 1472 bp,包含 1 个 720 bp 的 ORF 区,编码 239 个氨基酸,其中 5'UTR 为 382 bp,3'UTR 为 370 bp。

3.2 LmSVP 基因生物信息学分析

3.2.1 LmSVP 基因编码氨基酸理化性质分析 通过 ExPASy ProtParam 在线软件对 LmSVP 基因编码蛋白进行预测分析,推测其分子式为 $C_{1146}H_{1902}N_{326}O_{372}S_{16}$,



M-Marker 1, 2-LmSVP 全长扩增片段
M-Marker 1, 2-full length cDNA of LmSVP

图 1 LmSVP 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products of LmSVP gene

相对分子质量为 26 712.63,等电点为 6.16,不稳定系数为 $45.60 > 40$,属于不稳定蛋白,带正电残基 (Arg+Lys) 为 33,带负电残基 (Asp+Glu) 为 35,脂肪系数 83.26,亲水性平均系数为 -0.501 ,应用 ProtScale 在线分析其蛋白亲/疏水性,结果表明 LmSVP 蛋白亲/疏水氨基酸分布整体上是负值大于正值,亲水区域所占比例大于疏水区域,推测其为亲水性蛋白。利用 WOLF PSORT 在线预测亚细胞定位情况,结果表明 LmSVP 蛋白定位于细胞核 (nucleus) 中。运用在线软件 TMHMM2.0 分析,发现 LmSVP 编码的氨基酸 1~239 全部在膜外,不具有跨膜区域。SignalP 4.1 软件预测 LmSVP 蛋白不具有信号肽序列,属于非分泌型蛋白。

通过 Netphos 3.1 server 软件在线预测蛋白的磷酸化位点,结果显示 LmSVP 编码的氨基酸序列可能发生磷酸化的位点有 25 个。其中包括丝氨酸 (Ser) 位点 14 个,苏氨酸 (Thr) 位点 10 个,酪氨酸 (Tyr) 位点 1 个。

3.2.2 LmSVP 蛋白结构域、二级结构和三级结构预测 利用 NCBI 网站 CD-Search 在线分析 LmSVP 蛋白保守结构域,LmSVP 第 2~75 个氨基酸为高度保守的 MADS 结构域,第 95~170 个氨基酸为中度保守的 K-box 结构域,具有 MADS-box 基因家族共有的典型结构域,见图 2。

通过 SOPMA 在线软件预测 LmSVP 蛋白的二级结构 (图 3-A),结果显示 LmSVP 蛋白的构成成分及比例分别为: α 螺旋 (alpha helix) 占 59%,无规则卷曲 (random coil) 占 28.03%,延伸链 (extended strand) 占 10.46%, β 转角 (beta turn) 占 2.51%, α -螺旋和无

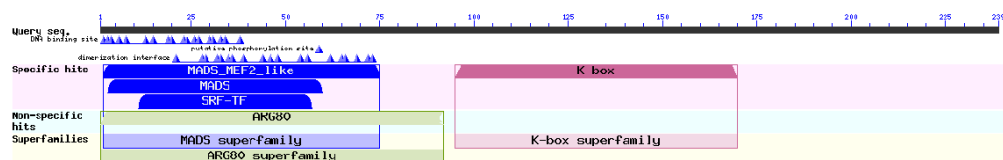
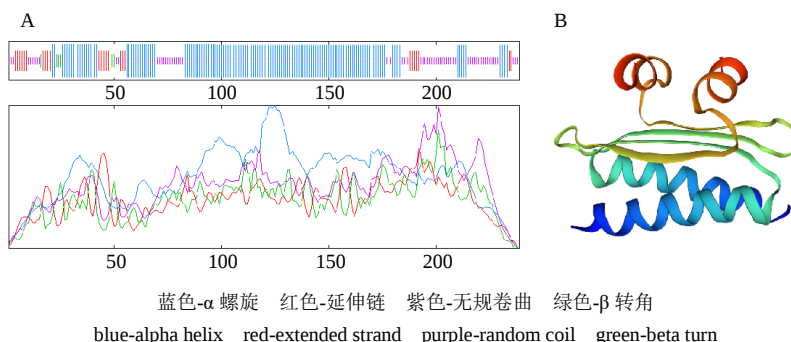


图 2 LmSVP 蛋白结构域

Fig.2 Domain of LmSVP protein



蓝色- α 螺旋 红色-延伸链 紫色-无规卷曲 绿色- β 转角
 blue-alpha helix red-extended strand purple-random coil green-beta turn

图 3 LmSVP 蛋白二级结构 (A)、三级结构 (B)

Fig. 3 Secondary structure (A) and three tertiary (B) structure of LmSVP protein

规则卷曲为该蛋白二级结构的主要组成元件。

使用 SWISS-MODEL 在线软件对 LmSVP 进行同源建模，构建其三维结构模型（图 3-B）。选择 7nb0.1.A 作为同源蛋白模板构建 LmSVP 模型，序列相似性为 73.58%，整体评分为 0.72。

3.2.3 LmSVP 氨基酸序列同源性比对和系统进化分析 运用 DNASTAR 7.1 中的 MegAlign 程序对 LmSVP 基因编码蛋白与 5 种植物的 LmSVP 蛋白进行多序列比对分析（图 4）。结果表明，LmSVP 与可可 *Theobroma cacao* L. (XP_007018219.2)、榴莲 *Durio zibethinus* Murr. (XP_022768443.1)、酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F.

Chow. (XP_015885971.1)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (XP_002285687.1)、小粒咖啡 *Coffea arabica* L. (XP_027090010.1) SVP 蛋白的一致性分别为 70.29%、67.36%、66.11%、66.53%和 69.26%。LmSVP 与可可 (XP_007018219.2) 的 SVP 蛋白序列相似性最高为 70.29%。

为了进一步了解 LmSVP 蛋白的系统进化情况，从 NCBI 数据库中挑选 16 条与 LmSVP 氨基酸序列具有一定同源性的 MADS-box 家族的氨基酸序列，运用 MEGA-X 构建 LmSVP 蛋白的 NJ 进化树。结果显示（图 5），LmSVP 蛋白与中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch. 和小粒咖啡 *C. arabica* L. 的蛋白聚



图 4 LmSVP 与其他植物 SVP 蛋白的多序列比对分析

Fig. 4 Multiple sequence alignment of LmSVP and other plant SVP proteins

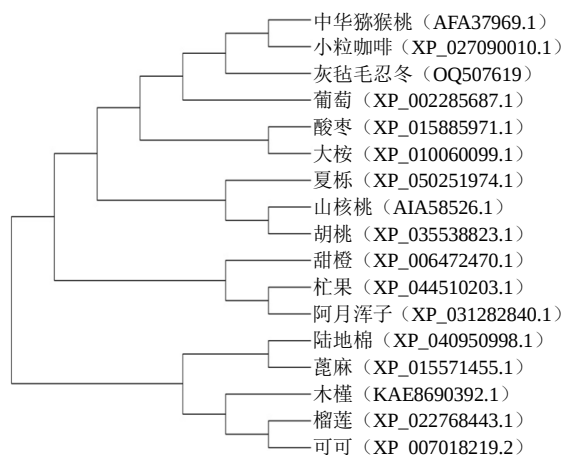


图 5 LmSVP 蛋白的 NJ 系统进化树

Fig. 5 Neighbor-joining phylogenetic tree of LmSVP proteins

类在同一分支上,表明 LmSVP 蛋白可能与双子叶植物猕猴桃科、茜草科 SVP 蛋白在功能上更为接近。

3.3 LmSVP 基因的组织特异性表达

以灰毡毛忍冬 18S rRNA 为内参基因,利用 qRT-PCR 技术对灰毡毛忍冬“龙花”和“金翠蕾”品种不同组织部位(花、叶)及不同花发育时期 LmSVP 基因的表达情况进行分析,见图 6。结果显示,无论是在叶片中还是花蕾早期和晚期,“金翠蕾”品种中 LmSVP 基因表达量整体高于“龙花”品种;LmSVP 基因在灰毡毛忍冬 2 个品种“龙花”和“金翠蕾”不同组织部位的表达存在极显著差异($P < 0.01$),叶片中表达量显著高于花中的表达量;LmSVP 基因在灰毡毛忍冬不同花期的表达量差异不明显,变化较平缓。

3.4 LmSVP 重组蛋白的表达

将测序结果正确的重组质粒 pTOPO-D1-LmSVP 及 pTOPO-D1 空载转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞,挑取单克隆于 37 °C 培养,当菌液的 A_{600} 值达到 0.6 左右时加入终浓度分别为 0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,37 °C 培养 4 h,菌液超声波破碎后分别取上清、沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果(图 7)显示,pTOPO-D1 空载体经诱导后无特异性条带产生,而重组质粒 pTOPO-D1-LmSVP 经 IPTG 诱导后在沉淀中产生一条约 26 710 的特异性条带,与 LmSVP 预测蛋白相对分子质量(26 710)一致,说明 LmSVP 重组蛋白在大肠杆菌中成功表达。菌液上清中无特异性条带

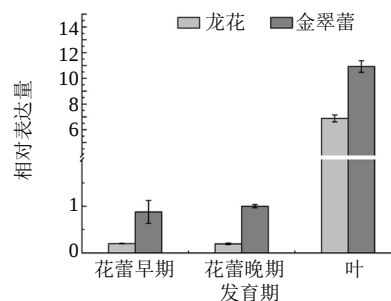
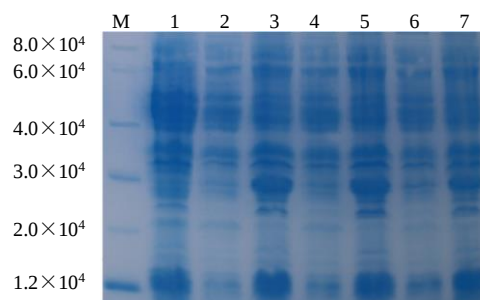


图 6 LmSVP 基因在灰毡毛忍冬“龙花”和“金翠蕾”品种不同发育期中表达模式

Fig. 6 Expression patterns of LmSVP at different stages of “Longhua” and “Jincuilai” of *L. macranthoides*



M-Marker 1-空载体 pTOPO-D1 2-经 0.6 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的上清 3-经 0.6 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的沉淀 4-经 0.8 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的上清 5-经 0.8 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的沉淀 6-经 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的上清 7-经 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的沉淀
M-Marker 1-empty vector pTOPO-D1 2-supernatant after 0.6 mmol/L IPTG induction 3-precipitation after 0.6 mmol·L⁻¹ IPTG induction 4-supernatant after 0.8 mmol·L⁻¹ IPTG induction 5-precipitation after 0.8 mmol/L IPTG induction 6-supernatant after 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG induction 7-precipitation after 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG induction

图 7 LmSVP 原核表达 SDS-PAGE 分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of LmSVP prokaryotic expression

产生,说明表达的 LmSVP 以包涵体的形式存在,其原因可能是由于外源基因的高效表达,导致新生肽链的合成速度超过了正确折叠的速度,从而形成非结晶、无定形的蛋白质聚集体。

4 讨论

MADS-box 转录因子在植物花器官发育过程中发挥着极其重要的作用,其在不同植物中所具备的功能存在较大差异^[16],SVP 基因作为 MADS-box 基因家族的重要成员,在许多植物中均被证实能够参与调控植物开花、花器官发育及休眠等生物过程。近年来,科研人员针对 SVP 基因对植物花发育的调控作用进行了广泛研究,SVP 基因过表达会阻碍下

游开花基因 *AP1*(*APETALA1*)、*SOC1*(*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1*)、*LFY*(*LEAFY*) 等的表达,从而延迟植物开花^[17],例如百合 *LbSVP* 过量表达至拟南芥后,延迟了植株开花^[18]。目前已从腊梅 *Chimonanthus praecox* (L.) Link^[19]、日本矮牵牛 *Pharbitis nil* (L.) Choisy^[20]、德国鸢尾 *Iris germanica* L.^[21]、棉花 *Gossypium hirsutum* L.^[22]和蔷薇 *Rosa multiflora* Thunb.^[23]等植物中分离得到 *SVP* 同源基因, *SVP* 基因参与许多观赏植物的成花机理研究已被报道,而有关 *SVP* 基因是否参与调控灰毡毛忍冬花发育进程的研究尚未见报道。

本研究通过对花蕾型灰毡毛忍冬“龙花” *MADS-box* 基因家族 *LmSVP* 基因进行研究,成功克隆获得灰毡毛忍冬 *SVP* 基因全长,并命名为 *LmSVP*,该基因全长 1472 bp,具有完整的 ORF 720 bp,氨基酸 239 个,预测其为亲水性蛋白,亚细胞定位于细胞核中。结构域预测该蛋白具有高度保守的 *MADS* 结构域和适度保守的 *K-box* 结构域,与其他植物 *SVP* 基因编码的保守结构域相同^[24-26],属于 *MADS-box* 基因家族。系统进化树分析表明,*LmSVP* 蛋白与中华猕猴桃 *A. chinensis* Planch.、小粒咖啡 *C. arabica* L. *SVP* 蛋白聚为一支,说明三者亲缘关系较近。

不同植物中 *SVP* 基因调控植物成花的功能不同,一般在花发育初期发挥作用,从而决定花分生组织的特异性^[27]。组织特异性分析显示, *PlsVP* 基因在芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.不同组织器官中均有表达,但表达量有差异,在根中高表达,特别是在须根中;在花瓣中痕量表达^[28]。猕猴桃中 *AcSVP* 同源基因仅在营养器官中大量表达,尤其是在叶、茎尖和腋芽中,在花朵中不表达^[29]。本研究 *LmSVP* 基因在 2 品种灰毡毛忍冬叶和花中的表达量存在显著差异,其中在叶中的表达量最高,这与前人的研究结果类似。对灰毡毛忍冬花发育不同时期的表达分析结果显示,在“龙花”和“金翠蕾”这 2 种花蕾型灰毡毛忍冬中, *LmSVP* 基因在花早期和花晚期的表达量无明显差异。此处由于材料限制,只针对 *LmSVP* 基因在两种花蕾型灰毡毛忍冬中的表达情况进行研究,未来应收集更多植物材料进行研究探讨。

迄今,尚无报道 *LmSVP* 重组蛋白的原核表达体系,为进一步研究 *LmSVP* 基因在灰毡毛忍冬花器官发育中的功能,本研究成功构建了 pTOPO-D1-

LmSVP 载体,并且在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行表达,成功获得分子量约为 26 710 的重组 *LmSVP* 蛋白。但是由于原核表达系统高效表达时,表达的重组蛋白常常出现不能自发折叠这一现象,二硫键不能正确配对,蛋白间过多的非特异性结合,无法达到足够的溶解性,即以包涵体的形式存在^[30]。为了使重组蛋白具有生物活性,需对包涵体进行复性处理^[31]。在本实验条件下, *LmSVP* 重组蛋白以包涵体的形式存在。后续将采取复性等方式,以获得有生物学活性的 *LmSVP* 重组蛋白,从而对 *LmSVP* 重组蛋白的功能进行深入研究。本研究为进一步通过转基因验证 *LmSVP* 基因的生物学功能奠定了基础,为从分子水平探索花蕾型灰毡毛忍冬蕾期长、花冠不展开等优良性状以及培育灰毡毛忍冬优良新品种提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 30-31.
- [2] 杨苗, 马逾英, 周娟, 等. 细毡毛忍冬采收期动态研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 34-35.
- [3] 耿世磊, 宁熙平, 吴鸿, 等. 山银花不同发育阶段花结构与绿原酸含量变化关系研究 [J]. 云南植物研究, 2005, 27(3): 279-287.
- [4] 孙梦姗, 周日宝, 彭晓丹, 等. 灰毡毛忍冬不同品种开花时期内源乙烯动态变化的研究 [J]. 中成药, 2013, 35(9): 1969-1972.
- [5] 蔡嘉洛. 毡毛忍冬蕾期延长相关基因 *AGL15* 的克隆与表达 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [6] 徐玉琴, 王珊, 刘湘丹, 等. 灰毡毛忍冬花蕾总 RNA 提取方法的研究 [J]. 中医药导报, 2015, 21(24): 31-34.
- [7] Liu C, Chen H Y, Er H L, et al. Direct interaction of *AGL24* and *SOC1* integrates flowering signals in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2008, 135(8): 1481-1491.
- [8] Hartmann U, Höhmann S, Nettesheim K, et al. Molecular cloning of *SVP*: A negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2000, 21(4): 351-360.
- [9] Lee J H, Yoo S J, Park S H, et al. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis* [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(4): 397-402.
- [10] 张燕, 许申平, 梁芳, 等. 蝴蝶兰 *Ph SVP* 的克隆及其在花发育过程中的表达分析 [J]. 园艺学报, 2020, 47(6): 1111-1125.
- [11] 李玉舒, 杨炜茹, 程堂仁, 等. 梅花 2 个 *SVP* 基因的克隆与表达分析 [J]. 西北植物学报, 2019, 39(7): 1163-1171.

- [12] Li X F, Wu W T, Zhang X P, *et al.* Narcissus tazetta SVP-like gene NSVP1 affects flower development in Arabidopsis [J]. *J Plant Physiol*, 2015, 173: 89-96.
- [13] 汪王, 苏小霞, 杨柳慧, 等. 细叶百合 LpSVP 基因的克隆及其表达分析 [J]. 西北林学院学报, 2018, 33(4): 89-94.
- [14] 刘思思, 乔中全, 曾慧杰, 等. 灰毡毛忍冬转录组 SSR 位点分析及 EST-SSR 标记开发 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(9): 3015-3021.
- [15] 刘思思, 乔中全, 刘新民, 等. 花蕾型和普通型灰毡毛忍冬花冠开裂过程的转录组比较分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(6): 1822-1829.
- [16] 王力娜, 范术丽, 宋美珍, 等. 植物 MADS-box 基因的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2010(8): 12-19.
- [17] Blümel M, Dally N, Jung C. Flowering time regulation in crops—What did we learn from Arabidopsis? [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 32: 121-129.
- [18] Tang X L, Liang M X, Han J J, *et al.* Ectopic expression of LoSVP, a MADS-domain transcription factor from lily, leads to delayed flowering in transgenic Arabidopsis [J]. *Plant Cell Rep*, 2020, 39(2): 289-298.
- [19] 候慧芳. 蜡梅 CpFUL-like 基因的克隆及功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, .
- [20] Kikuchi R, Sage-Ono K, Kamada H, *et al.* PnMADS1, encoding an StMADS11-clade protein, acts as a repressor of flowering in *Pharbitis nil* [J]. *Physiol Plant*, 2008, 133(4): 786-793.
- [21] 王银杰, 张永侠, 刘清泉, 等. 德国鸢尾 IgSVP 基因的克隆及其表达分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(23): 7697-7702.
- [22] 张文香, 庞朝友, 范术丽, 等. 棉花 SVP-like 基因 GhMADS29 的克隆与表达分析 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(15): 28-31.
- [23] 任闽. 蔷薇 RmSVP 基因的进化分析及功能鉴定 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [24] 陈微, 惠林冲, 李威亚, 等. 洋葱 AcSVP 基因的克隆及其表达分析 [J]. 江西农业学报, 2020, 32(6): 17-22.
- [25] Liu Y Z, Gao Y K, Yuan L, *et al.* Molecular characterization and expression patterns of the HkSVP gene reveal distinct roles in inflorescence structure and floral organ development in *Hemerocallis fulva* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 12010.
- [26] 高耀辉, 马斌, 魏光普, 等. 菊花 SVP 和 AGL24 基因的克隆及序列分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(13): 4286-4292.
- [27] Gregis V, Sessa A, Dorca-Fornell C, *et al.* The Arabidopsis floral meristem identity genes AP1, AGL24 and SVP directly repress class B and C floral homeotic genes [J]. *Plant J*, 2009, 60(4): 626-637.
- [28] 籍凤娇, 马燕, 元帅, 等. 芍药 PISVP 基因的克隆及其花期调控功能分析 [J]. 园艺学报, 2022, 49(11): 2367-2376.
- [29] Wu R M, Walton E F, Richardson A C, *et al.* Conservation and divergence of four kiwifruit SVP-like MADS-box genes suggest distinct roles in kiwifruit bud dormancy and flowering [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(2): 797-807.
- [30] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli* [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9(5): 497-501.
- [31] Francois J, Baneyx R. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10: 411-421.

[责任编辑 时圣明]