

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01735

箭筈豌豆 *AGAMOUS* 同源基因及其启动子的克隆和分析

张 磊 刘志鹏 王彦荣*

兰州大学草地农业科技学院 / 草地农业系统国家重点实验室, 甘肃兰州 730020

摘 要: *AGAMOUS*(*AG*)是参与植物雌蕊和雄蕊发育调控的最重要花器官同源基因之一。通过 TAIL-PCR、RACE 和 RT-PCR 技术相结合, 获得了箭筈豌豆花器官同源基因 *VsAG*(*VsAGAMOUS*)及其上游调控序列。该基因 DNA 序列总长 3 158 bp, CDS 区域 735 bp, 编码含有 244 个氨基酸残基的蛋白产物。序列在氨基酸水平上与近缘植物豌豆 *PsAG* 基因序列一致性达 98%, 与拟南芥 *AtAG* 基因一致性为 68%。将该基因在 GenBank 上注册, 登录号为 JF313850。生物信息学分析表明, *VsAG* 基因第 2 内含子区域含有丰富的转录调控元件, 在种类和功能分化上与基因上游调控序列表现出相似特征。这一结果暗示了第 2 内含子对豆科植物 *AG* 基因表达调控的重要作用, 并为通过基因工程方法创造箭筈豌豆优良育种材料奠定了基础。

关键词: *AGAMOUS*(*AG*)基因; 箭筈豌豆; 启动子克隆; TAIL-PCR

Isolation and Analysis of *AGAMOUS* Homologous Gene and Its Promoter from *Vicia sativa* L.

ZHANG Lei, LIU Zhi-Peng, and WANG Yan-Rong*

School of Pastoral Agriculture Science and Technology / State Key Laboratory of Grassland Farming System, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

Abstract: Common vetch (*Vicia sativa* L.) is considered to be an ideal liquid spring proteid forage for Tibet stockbreeding. However, little has been known about the molecular mechanism of floral organ formation and subsequent seed development process during domestication of common vetch in alpine steppe. *AGAMOUS*(*AG*) gene is one of the most important floral homologous genes involved in plant stamen and gynoecium development. In this study, an *AG* homologue gene and its upstream regulation sequence were isolated from *Vicia sativa* L. using hiTAIL-PCR, RACE, and RT-PCR. The results showed that this gene was 3 158 bp in DNA sequence, coding a protein product of 244 amino acids. Homological analysis showed that the similarity between this sequence and *Pisum sativum* *PsAG* gene was over 98% in amino acid level. Therefore, the sequence was considered to be *Vicia sativa* *AG* gene. It was named *VsAG* with the accession number JF313850 in GenBank. By analysing the *cis*-elements existing in upstream promoter region and the second intron, the results showed *VsAG* second intron region shared some similar *cis*-elements with promoter region. It indicated the second intron of *VsAG* gene may play an important role in gene expression regulation.

Keywords: *AGAMOUS*(*AG*); *Vicia sativa*; Promoter clone; TAIL-PCR

箭筈豌豆(*Vicia sativa* L.)是豆科野豌豆属植物, 具有较高的营养价值和较强的抗寒特性, 是适宜在高寒高海拔地区栽培的优良牧草, 也可作为绿肥作物栽培^[1]。通过在高海拔地区的多年驯化, 箭筈豌豆引种品系表现出稳定的遗传特性和较强的抗寒能力^[1], 具有进一步的育种潜力^[2]。然而, 生育期不一致, 成熟果实开裂, 单株种子产量低^[3]等性状仍然是制

约箭筈豌豆种子生产的限制因子, 这些性状可能与雌蕊和种子发育过程中关键基因的表达相关。

1990 年, Coen 和 Meyerowitz^[4]提出了基于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和金鱼草(*Antirrhinum majus*)系统的花发育 ABC 模型, 将控制花器官发育的基因划分为 A、B、C 三类, 其中 A 类基因调控萼片发育, A 类和 B 类基因共同调控花瓣发育, B 类和 C 类基因

本研究由国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2007CB108904), 国家自然科学基金项目(31072072)和国家科技支撑计划项目(2008BADB3B07)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 王彦荣, E-mail: wangyrlzu@126.com

第一作者联系方式: E-mail: planta@Yeah.net

Received(收稿日期): 2011-03-01; Accepted(接受日期): 2011-06-25; Published online(网络出版日期): 2011-07-28.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20110728.1001.007.html>

共同控制雄蕊发育, C 类基因控制雌蕊发育。之后, 随着一些新基因的发现, 研究者又在经典的 ABC 模型基础上提出了 ABCDE 模型和四因子模型^[5-6]。AGAMOUS(AG)基因是在拟南芥中发现的唯一 C 类花同源异型基因^[7], 属于 MADS 基因家族。该基因调控拟南芥第三、四轮花器官发育, 缺失突变体 *ag* 第三、四轮花器官分别被花瓣和萼片取代并重复多轮出现^[7]。AG 基因在第一、二轮花器官中受到 A 类和 B 类基因的抑制, 而在芯皮原基中被 WUS 和 LFY 激活, 而 AG 的表达又对 WUS 产生负反馈的抑制调节^[8-9]。同时, AG 与 SHATTER PROOF(SHP)基因和 SEEDSTICK(STK)基因在蛋白水平上相互作用, 参与了拟南芥果实和种子发育调控过程^[10-11]。

值得注意的是, 在转录调节的层面, AG 基因的表达除受基因上游启动子序列的调节外, 也受到第二内含子内特异元件的影响^[12], WUS 和 LFY 因子正是通过结合在这一区域增强了该基因的表达。因此, AG 第二内含子序列可被用于构建器官特异的表达载体。

本研究通过 RT-PCR 和 TAIL-PCR 技术结合, 在箭筈豌豆中克隆了拟南芥 AG 基因的同源基因 *VsAG* 及其启动子序列, 并对该基因的转录结构进行了分析, 获得了第 2 内含子的序列信息。这些工作为通过基因工程手段调控箭筈豌豆花发育相关基因的表达奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

箭筈豌豆采用引进品系 2560, 该品系在我国青藏高原地区经过十余年的驯化, 表现出良好的高寒环境适应特性, 具有进一步的推广价值和育种潜力。在兰州大学草地农业科技学院温室盆栽, 采集成熟叶片及花, 液氮处理后分别于 -80℃ 超低温保存。

植物基因组 DNA 提取试剂盒, RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), GenRacer Kit (Invitrogen), PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa), pGM-T 克隆试剂盒, DNA 凝胶回收试剂盒, DNA Marker, DH5α 感受态细胞, 均购自天根生化科技(北京)有限公司。引物由上海生工生物工程公司合成。其他试剂为国产或进口分析纯。

1.2 总 RNA 及 DNA 提取

参照 RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)使用说明提取箭筈豌豆花总 RNA, 参照植物基因组 DNA 提

取试剂盒(TIANGEN)使用说明提取箭筈豌豆叶片基因组 DNA, 产物用紫外分光光度计测定纯度, 通过琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 完整性。

1.3 cDNA 核心片段克隆

合成 cDNA 第一链参照 PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa)使用说明。根据已公布的拟南芥(NM_118013.2), 豌豆(*Pisum sativum*, AY884292.1)等物种的 AG 基因序列信息设计简并引物 P1 和 P2 (表 1)。PCR 反应体系 50 μL, 含 10×PCR buffer 5 μL, 10 mmol L⁻¹ dNTP mixture 2 μL, 0.5 μL Ex Taq HS 5 U μL⁻¹, 引物 P1 和 P2 各 10 μL, cDNA 1 μL。反应条件为 94℃ 预变性 1 min, 然后以 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min 进行 30 个循环, 于 72℃ 延伸 10 min, 取 5 μL 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 cDNA 3'末端克隆

参照 GenRacer Kit (Invitrogen)使用说明合成 cDNA, 根据获得的核心片段 cDNA 序列信息合成 3'RACE 特异引物 F1, Nested 引物 F2 (表 1), PCR 反应体系 50 μL, 含 5 μL 10×PCR buffer, 2 μL 10 mmol L⁻¹ dNTP mixture, 0.5 μL 5 U μL⁻¹ Ex Taq HS, 引物各 2 μL, 1 μL cDNA。第 1 轮 PCR 反应条件为 94℃ 预变性 1 min, 然后以 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 1 min 进行 35 个循环, 于 72℃ 延伸 10 min。Nested PCR 退火温度为 65℃。取 5 μL 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 启动子克隆

参照 Liu 的 *hiTAIL-PCR* 方法^[13], 根据核心片段 5'端序列信息设计预扩增 PCR 引物 0a, 第一轮 PCR 引物 1a 和第二轮 PCR 引物 2a (表 1)。预扩增 PCR 反应体系 50 μL, 含 5 μL 10×PCR buffer, 8 μL 10 mmol L⁻¹ dNTP mixture, 0.5 μL 5 U μL⁻¹ Ex Taq HS, 10 μL 引物 0a, LAD 引物各 10 μL, 1 μL 基因组 DNA (400 ng)。首轮 PCR 体系 50 μL, 含 5 μL 10×PCR buffer, 8 μL 10 mmol L⁻¹ dNTP mixture, 0.5 μL 5 U μL⁻¹ Ex Taq HS, 引物 1a、AC1 各 2 μL, 20 倍稀释预扩增产物 1 μL。第二轮 PCR 体系 50 μL, 含 5 μL 10×PCR buffer, 8 μL 10 mmol L⁻¹ dNTP mixture, 0.5 μL 5 U μL⁻¹ Ex Taq HS, 引物 2a、AC1 各 2 μL, 20 倍稀释首轮 PCR 产物 1 μL。3 轮反应的 PCR 程序以及引物 LAD 和引物 AC1 设计均参照文献描述。

1.6 基因全长克隆

根据获得的 CDS 序列信息, 设计带有酶切位点的引物 VsAG-35S-SmaI-F 和 VsAG-35S-SacI-R (表 1)。分别以箭筈豌豆基因组 DNA 和花 cDNA 为模板

扩增基因全长。反应体系 50 μL, 含 5 μL 10×PCR buffer, 2 μL 10 mmol L⁻¹ dNTP mixture, 0.5 μL 5 U μL⁻¹ Ex *Taq* HS, 引物各 2 μL, DNA 或 cDNA, 1 μL。反应条件为 94℃ 预变性 1 min, 然后以 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min 进行 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。取 5 μL 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.7 阳性克隆的筛选与鉴定

PCR 产物进行琼脂糖凝胶回收后克隆在 pGM-T, 转化 DH5α 感受态细胞, 经过蓝白斑筛选挑取阳性克隆, 经过 PCR 鉴定后送上海生工生物工程有限公司测序。

1.8 序列的生物信息学分析

通过 DNAMAN 软件进行序列翻译和多重比对, 在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 网站上进行 Blast 检索, 用 Clustal 聚类后, 用 MEGA 4.0 绘制进化树。采用 PLACE 在线分析工具分析转录元件。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 检测

提取幼嫩荚果总 RNA 后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示 28S rRNA、18S rRNA 条带清晰, 且前者亮度约为后者 2 倍, 表明所提取 RNA 完整性较好; 经 NANODROP 1000 紫外分光光度计检测, 260/280、260/230 分别为 1.92、2.11, 说明纯度较高。所提取 RNA 可以用于后续试验。

2.2 *VsAG* 基因核心和 3' 末端序列克隆

以总 RNA 反转录得到的 cDNA 第一链做为模板,

用引物 P1 和 P2 扩增 *AG* 基因核心片段, 琼脂糖凝胶电泳分析发现约在 414 bp 附近有一亮带, 且上下无杂带, 与目的产物大小相近(图 1-A)。将片段回收测序, 登陆 NCBI 数据库进行 Blast 检索, 发现该片段与已公布的近缘物种 *AG* 基因序列一致性较高, 初步断定其为箭筈豌豆 *AG* 基因同源片段, 并命名为 *VsAG*。

根据获得的 *VsAG* 基因核心片段序列信息设计正向引物 F1 和 F2, 通过 RACE 技术获得该基因 3' 末端长度为 717 bp 的 cDNA 序列(图 1-B)。

对获得的 *VsAG* 基因核心和 3' 末端序列进行电子拼接, 确定获得了包括该基因 3'UTR 在内总长度 1 010 bp 的 cDNA 序列信息。将该序列与已公布的拟南芥 *AG* 基因全长 DNA(AT4G18960.1)和 CDS(NM_118013.2)序列进行对比, 发现序列 5' 末端已经包含了 *VsAG* 基因第一外显子 182 bp 序列信息。

2.3 *VsAG* 基因 5' 末端和上游启动子序列克隆

根据 *VsAG* 基因第一外显子部分序列信息, 参照 Liu^[13] 的方法设计 3 条反向引物 0a、1a 和 2a, 以箭筈豌豆基因组 DNA 为模板对该基因上游片段进行 hiTAIL-PCR 扩增(图 2)。三轮反应后, 引物 LAD1-1, LAD1-2 和 LAD1-4 获得了较长的 PCR 产物(图 2-B)。分别对 3 组产物进行回收测序, 获得了总长度 2 569 bp 的序列信息, 分析发现该序列包括了 *VsAG* 基因 5' 末端及其上游。

在 NCBI 数据库上对此片段进行检索, 发现其 5' 端 548 bp 序列与仅在豌豆和蒺藜苜蓿中发现的 1

表 1 引物名称及序列信息
Table 1 Name and sequences of primers

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
P1	5'-AYMGNCARGTNACNTTYTG-3'
P2	5'-CNCKYTTYTGCA TRTAYTC-3'
F1	5'-AGTATTATCAGCAAGAAGCAGCGAAAC-3'
F2	5'-ATGATGGGCGAAGCATTGAGC-3'
0a	5'-GCTGATTTTGACCAGAAGTATCTGAAC-3'
1a	5'-ACGATGGACTCCAGTCCGGCCCCACGAGTCGAGAAGACGATAAGAGC-3'
2a	5'-CATCA CAAAGCACAGATAACTCATA-3'
LAD1_1	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)N(G/C/A)NNNGGAA-3'
LAD1_2	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)N(G/C/A)NNNGGTT-3'
LAD1_3	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)(G/C/A)N(G/C/A)NNNCCAA-3'
LAD1_4	5'-ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)(G/A/T)N(G/C/T)NNNCGGT-3'
AC1	5'-ACGATGGACTCCAGAG-3'
<i>VsAG</i> -35S-SmaI-F	5'-GGGCCCCGGGATGAGTTTCCAAATGAATC-3'
<i>VsAG</i> -35S-SacI-R	5'-CCGGAGCTCAACAAATTGAAGGGACATCTG-3'

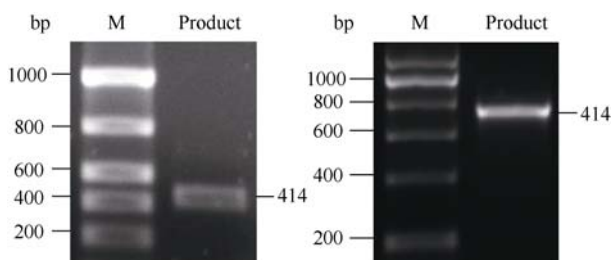


图 1 箭筈豌豆 *VsAG* 基因核心片段和 3'末端 RACE 产物检测
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of *VsAG* gene core sequence and 3'RACE product

A: *VsAG* 基因核心片段 PCR 产物; B: *VsAG* 基因 3'RACE 产物。
A: PCR products of *VsAG* gene core sequence; B: 3'RACE product.

个逆转因子 *Cassandra* 的部分片段高度一致。之后用 Vector NTI 10.3 软件将 2 569 bp 序列与已公布的豌

豆 *AG(M8)* 基因的全长 cDNA 和 CDS 序列进行比对, 确定了 *VsAG* 基因第 1 内含子, 转录起始位点和起始密码子的位置。通过 PLACE 在线分析工具在转录起始位置上游 28 bp 和 151 bp 位置预测到 TATA 框; 在上游 197 bp 位置预测到 1 个 CAAT 框(图 3)。

2.4 *VsAG* 基因全长序列克隆和进化分析

将获得的 *VsAG* 基因核心片段与末端序列进行电子拼接, 获得了全长 735 bp CDS 序列信息, 并用 DNAMAN 软件对其进行分析, 预测其编码 244 个氨基酸(图 4)。根据 CDS 序列两端序列信息, 设计引物 *VsAG*-35S-Smal-F 和 *VsAG*-35S-SacI-R 扩增花器官 cDNA *VsAG* 获得全长 CDS 序列(图 5-B), 测序结果

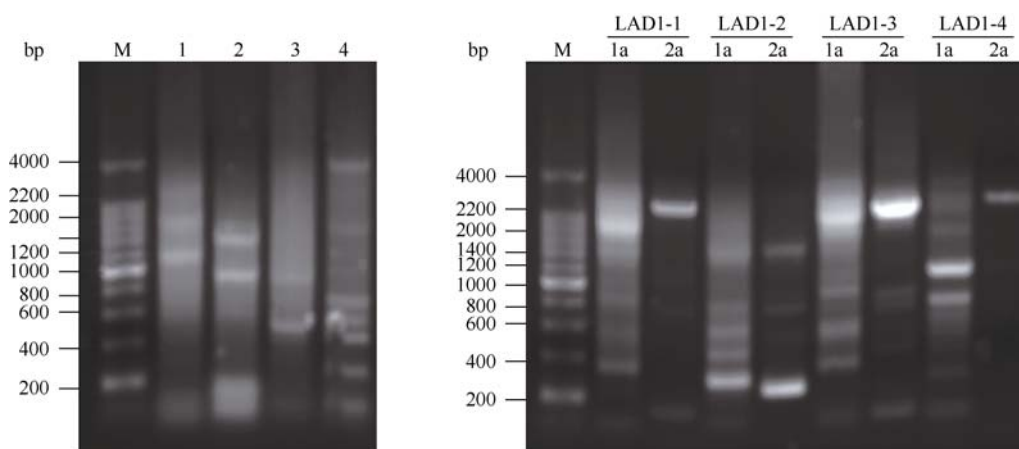


图 2 箭筈豌豆 *VsAG* 基因上游片段的 hiTAIL_PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of *VsAG* gene upstream fragment by hiTAIL_PCR

A: 箭筈豌豆 *VsAG* 基因上游片段 TAIL_PCR 预扩增, 引物 0a 分别与引物 LAD1-1(1), LAD1-2(2), LAD1-3(3) 和 LAD1-4(4) 配对; B: 分别用引物 1a 和 2a 对箭筈豌豆 *VsAG* 基因首轮(1a)和第二轮(2a)TAIL_PCR 扩增。

A: pre-amplification of *VsAG* gene using 0a combined with LAD1-1(1), LAD1-2(2), LAD1-3(3), and LAD1-4(4), respectively; B: analysis of primary and secondary TAIL_PCR products of *VsAG* gene using 1a(1a) and 2a(2a), respectively.

```

-299  TTCATTCACCTCATCATAATTCATTTTTGGTTAACTCTAAAGTTTATTCATCTTTGTCC
-239  TTCCATTTTGATTCTCTTCAAACACACACCACTAAATCAATGAGGATAGAGAAGGAAAAA
-179  AAATATTATAAAATAATAAAATATTATAGAGATATGAAGTTGAGTGTATGATATTTTAGA
-119  TGCATAAATAAAGCAAACTAAATCATCATAGAAGAAAAAGTGGTTTTTCACTTTATA
-59   AATACCATTCTTTGCTTTCTTTTACTTATATCACTTTGTTCTACAAAGTTGAAAAGAAG
-2   *** AGAGAAAGTTTATATACTAGTTCAAAGATTAGAATCTGTGTAATTGTCCTTAATAAGGTT
62   AGTGGTTTGTATTTCAGAAAAATAATGAAACATTAGTTTCAAACCTTTCTCAATGTTTCC
122  CTTCTTTTGTAGTGAAGAAATCAAACCTTTTTCACATGAAACTATGAAAAATTTGTAG
182  CTAAAAAGCCTATGATTTAAAGGGTCAAGAAGGGTTGTTCAAAGTTTAACTTTTTTTTA
242  TGATTCTTCCTAACAATCAATTTTTTTCATGGTTTTTGTGTAATATATTATATAGAGTTT
302  TGGTTTTGTGTGAAGAAAAGTATGTTGATGATGTTTTGTTTGATTGAGCTTGCAACTATGA
362  GTTTTCCAAATGAATCCATGCCTGATTCTCCTCAGAGAAAGATTGGAAGGGGAAAGATTG
422  AGATCAAGAGGATCGAAAACACGACGAATCGCCAAGTTACCTTCTGCAAACGGAGAAATG
482  GCTTGCTTAAGAAGGCGTATGAGTTATCTGTGCTTTGTGATG

```

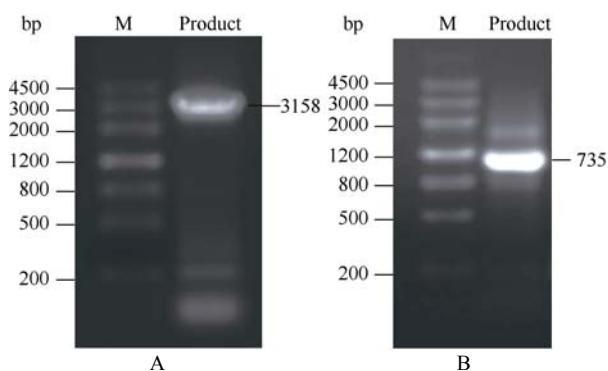
图 3 *VsAG* 基因启动子区域序列分析

Fig. 3 Analysis of *VsAG* gene promoter region sequence

```

1  ATGAGTTTTCCAAATGAATCCATGCCTGATTCTCCTCAGAGAAAAGATTGGAAGGGGAAAAG
1  M S F P N E S M P D S P Q R K I G R G K
61  ATTGAGATCAAGAGGATCGAAAAACACGACGAATCGCAAGTTACCTTCTGCAAAACGGAGA
61  I E I K R I E N T T N R Q V T F C K R R
121  AATGGCTTGCTTAAGAAGGCGTATGAGTTATCTGTGCTTTGTGATGCTGAAAGTTGCTCTT
121  N G L L K K A Y E L S V L C D A E V A L
181  ATCGTCTTCTCGACTCGTGGCCGTCTCTACGAGTATGCAAAATAACAGTGTGAAAGCTTCT
181  I V F S T R G R L Y E Y A N N S V K A S
241  ATTGAGAGGTATAAGAAAAGCATGTTTCAGATACTTCTGGTGCAAAATCAGCTTCTGAGACT
241  I E R Y K K A C S D T S G A K S A S E T
81  I E R Y K K A C S D T S G A K S A S E T
301  AATGCTCAGTATTATCAGCAAGAAAGCAGCGAAACTGCGAGTGCAAATCAGTAATTTGCAG
101  N A Q Y Y Q Q E A A K L R V Q I S N L Q
361  AATCATAACAGGCAAAATGATGGGCGAAGCATTGAGCAATATGAATGGTAAGGACCTCAGA
121  N H N R Q M M G E A L S N M N G K D L R
421  AACCTTGAGAGTAAATTAGAGAAAAGGAATTAGCCGAATTCGCTCCAAGAAGAATGAAATG
141  N L E S K L E K G I S R I R S K K N E M
481  CTATTTGCTGAAATTGAGTACATGCAGAAAGAGGGAGATAGAGTTGCATAATAGCAATCAG
161  L F A E I E Y M Q K R E I E L H N S N Q
541  GTTCTTAGAGCAAAAGATATCAGAAAATGATCAGAGGAACAACCATATGCTAATATGTTG
181  V L R A K I S E N D Q R N N H N A N M L
601  CATGGAGGCACAACTTTGAATGTATGCAACCTCAGCAACAATTTGACTCTCGCAGTTAC
201  H G G T N F E C M Q P Q Q Q F D S R S Y
661  TTCCAAAGTGAATGAATTACAACCTAATAATCAGTACGCCAGGCAGGACCACCAGATGTCC
221  F Q V N E L Q P N N Q Y A R Q D H Q M S
721  CTTCAATTTGTTTGA
241  L Q F V

```

图 4 箭筈豌豆 *VsAG* 基因 CDS 序列及推测的氨基酸序列Fig. 4 Full CDS sequence and deduced amino acid sequence of *VsAG* gene from *Vicia sativa*图 5 箭筈豌豆 *VsAG* 基因全长片段克隆Fig. 5 Products of full length *VsAG* gene

A: 使用 DNA 模板; B: 使用花器官 cDNA 模板。

A: using DNA template; B: using flower cDNA template.

与电子拼接一致; 扩增基因组 DNA, 获得了该基因的全长 3 158 bp 的 DNA 序列(图 5-A)。

对预测的 *VsAG* 基因氨基酸序列的分析表明该序列具有 *AG* 基因共有的 N 末端氨基酸保守序列, 通过 NCBI 数据库的 Blast 比对, 发现其与近缘植物 *AG* 同源基因序列一致性较高, 其中与拟南芥 (NP_567569.3)、豌豆(AAX69069.1) *AG* 基因氨基酸序列相似度分别为 69%和 98%; 与拟南芥(AAU 82070.1)、豌豆(AAX69070.1) D 类花器官同源基因 *SHP* 基因氨基酸序列相似度分别为 65%和 63%。进化分析也显示出 *VsAG* 基因与植物 *AG* 基因归于统一分支, 而与 D 类 *SHP* 类成员基因关系较远(图 6)。

将该基因正式命名为 *VsAG*, 并在 GenBank 注册, 登录号为 JF313850。

2.5 *VsAG* 基因结构和转录调控元件分析

根据获得的 *VsAG* 基因 DNA 及 cDNA 序列信息, 确定了该基因第 1 内含子、第 2 内含子的位置, 并用 PLACE 在线分析工具分析了这 2 个区域以及逆转因子 *Cassandra* 和转录起始位点上游区域的转录元件, 按转录调控元件功能可以将其划分为转录发生、光信号响应、激素响应、逆境胁迫和组织特异表达五类(表 2)。分析表明, 与转录起始位置, 频率密切相关的调控元件如 Py-rich stretch、AT-rich element、CAAT-box 和 TATA-box 在 *VsAG* 基因转录起始位点上游和第二内含子内分布最为密集, 尤其是与转录发生频率相关的 Py-rich stretch 元件仅在这两个区域出现, 而 AT-rich element 仅出现在第 2 内含子。这一现象暗示该基因第 2 内含子与转录调控过程密切相关, 可能起到增强转录的作用。

3 讨论

AG 基因在植物雌蕊和果实发育控制过程中居核心位置, 在拟南芥中其表达受 *LFY*、*AP2* 及 *ANT* 等基因的调控^[14-15], 并与 *WUS* 形成反馈环通过控制花器官顶端干细胞的命运决定了花器官轮数的多少。在拟南芥中, *AG* 基因缺失或表达水平下调导致

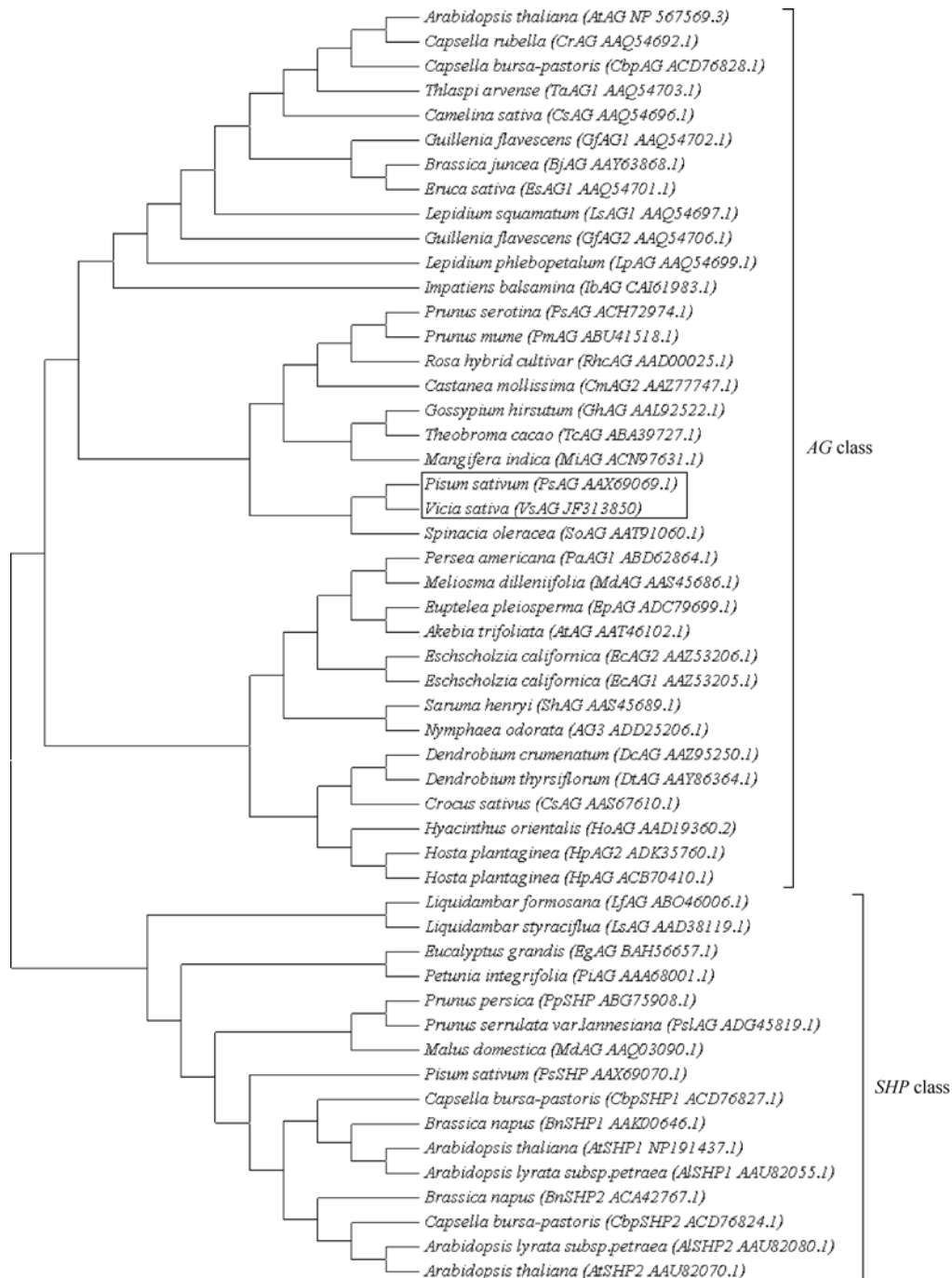


图 6 箭筈豌豆 VsAG 基因氨基酸序列与其他植物同源基因的进化树分析
Fig. 6 Phylogenetic analysis of VsAG with other plants AG gene based on amino acid sequence

花发育模式异常,如第三、四轮花器官形态异常,花器官轮数增多等现象^[16]。这表明 AG 基因可能参与调控多个基因的表达。Folter 等^[17]通过酵母双杂交实验证实了这一观点,发现 AG 基因与 SHP、STK 和 SEP 等功能基因在蛋白质水平存在相互作用。然而至今尚未发现 AG 的直接靶基因。

AG 基因在高等植物中广泛存在,目前在豆科

植物蒺藜苜蓿和豌豆中均已发现^[18]。徐雷等^[19]通过 VIGS (病毒诱导的基因沉默, virus induced gene silencing)对豌豆 PsAG 基因的功能进行了研究,发现该基因保守区域沉默导致了花的同源异型转变,雄蕊芯皮化,雌蕊开裂并且内部出现重复的小花。我们克隆获得的 VsAG 基因与 PsAG 基因在氨基酸水平上的一致性为 98%,暗示 AG 基因在箭筈豌豆中的

表 2 *VsAG* 基因不同区域转录元件分布及功能
Table 2 Distribution and function of different translation regulatory elements in *VsAG* gene

转录元件 Element	基序 Motif	功能 Function	逆转因子区域 Retrotransposon region	起始位点上游 Upsteam sequence	第 1 内含子 1st intron	第 2 内含子 2nd intron
Py-rich stretch	TTTCTTCTCT	转录发生 Translation start		3		2
AT-rich element	ATAGAAATCAA	转录发生 Translation start				1
CAAT-box	CAAT	转录发生 Translation start	10	27	3	16
TATA-box	TATAA	转录发生 Translation start	11	74	12	32
AAAC-motif	CAACAAAAACCT	光信号响应 Light response		1		
AE-box	AGAAACAA	光信号响应 Light response		1		1
ATCT-motif	AATCTAATCT	光信号响应 Light response				
ATC-motif	AGTAATCT	光信号响应 Light response	1			
ATCC-motif	CAATCCTC	光信号响应 Light response	1			
Box I	TTTCAAA	光信号响应 Light response			1	
Box 4	ATTAAT	光信号响应 Light response		2		3
Gap-box	CAAATGAA(A/G)A	光信号响应 Light response				1
G-Box	CACGTG	光信号响应 Light response	2			
GA-motif	AAAGATGA	光信号响应 Light response	1			3
GAG-motif	AGAGATG	光信号响应 Light response		1		1
GATA-modif	AAGATAAGATT	光信号响应 Light response				1
GT1-motif	GGTTAA	光信号响应 Light response		2		3
I-box	CTCTTATGCT	光信号响应 Light response	1	1		1
MNF1	GTGCCC	光信号响应 Light response		2		
TCCC-motif	TCTCCCT	光信号响应 Light response		1		
TCT-motif	TCTTAC	光信号响应 Light response			1	2
circadian	CAANNNNATC	光信号响应 Light response	1			1
ABRE	CACGTG	激素(ABA)响应 ABA response	2	2		
GARE-motif	AAACAGA	激素(GA)响应 GA response		1		1
P-box	CCTTTTG	激素(GA)响应 GA response		1		1
TCA-element	CCATCTT	激素(水杨酸)响应 Salicylic acid response		3	1	
HSE	AAAAAATTTTC	胁迫(热激)响应 Heat shock response		1	1	2
MBS	CAACTG	胁迫(干旱)响应 Drought response		1		1
LTR	CCGAAA	胁迫(低温)响应 Low temperature response	1			
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	胁迫(病原)响应 Pathogenic response			3	5
W-box	TGAC	胁迫(病原)响应 Pathogenic response	2		2	
GCN4_motif	TGAGTCA	组织特异表达(胚乳) Endosperm specific expression		1		4
Skn-1_motif	GTCAT	组织特异表达(胚乳) Endosperm specific expression	3	3		3

功能可能与 *PsAG* 类似。

AG 基因上游启动子元件在近缘物种间的调控特征并不保守, 拟南芥 *AG* 基因启动子并不能有效启动油菜 (*Brassica napus*) 和亚麻 (*Linum usitatissimum*) 的瞬时表达^[20]。然而, 具有 *WUS* 和 *LFY* 基因

调控位点表达的第二内含子区域的调控元件在近缘种间表现出保守特征, 桃(*Prunus perscia*) 的 *PpMADS4* 基因第二内含子却可以指导 *GUS* 在拟南芥第三、四轮花器官的表达^[21]。Hong 等^[12]利用报告基因、系统发生印迹法(phylogenetic footprinting)和系统发生渐

变法(phylogenetic shadowing)在 29 种十字花科植物中鉴定出 6 个与 *AG* 基因表达密切相关的调控位点,证明了第 2 内含子区域对 *AG* 基因表达的重要作用。对箭筈豌豆 *VsAG* 基因的生物信息学分析也表明,第 2 内含子具有丰富的转录调控元件,这些元件的种类和功能与基因上游调控序列表现出较为相似的特征,这一结果暗示了豆科植物 *AG* 基因第 2 内含子对该基因表达调控的重要作用。

4 结论

克隆了箭筈豌豆花器官同源基因 *VsAG* 及其上游调控序列,并分析了该基因上游调控序列和第 2 内含子的转录调控元件,验证了第 2 内含子对 *AG* 基因表达调控的重要作用。

References

- [1] Nan Z-B(南志标), Zhang J-Y(张吉宇), Wang Y-R(王彦荣), Li C-J(李春杰), Nie B(聂斌), Zhang J-Q(张健全), Zhao H(赵宏). Genotype \times environment interactions and consistency analysis for agronomic characteristics of five *Vicia sativa* lines. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2004, 24: 395–401 (in Chinese with English abstract)
- [2] Wang Y-W(王赞文), Nan Z-B(南志标), Wang Y-R(王彦荣), Li C-J(李春杰), Ma L-X(马隆喜). Herbage and seed yields of *Vicia* and *Lathyrus* species under alpine grassland conditions. *Acta Prata Sin* (草业学报), 2001, 10: 47–55 (in Chinese with English abstract)
- [3] Hu X-W(胡小文), Wang Y-R(王彦荣), Nan Z-B(南志标), Nie B(聂斌). Sowing date effects on vetch seed quality. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2004, 24: 409–413 (in Chinese with English abstract)
- [4] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353: 31–37
- [5] Theissen G, Saedler H. Floral quartets. *Nature*, 2001, 409: 469–471
- [6] Honma T, Goto K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, 2001, 409: 525–529
- [7] Yanfsky M F, Ma H, Bowman J H. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 1990, 346: 35–39
- [8] Busch M A, Bomblies K, Weigel D. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 585–587
- [9] Lohmann J, Hong R, Hobe M, Hobe M, Busch M, Parcy F, Simon R, Weigel D. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, 2001, 105: 793–803
- [10] Pinyopich A, Ditta G S, Savidge B, Liljegren S J. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, 2003, 424: 85–88
- [11] Liljegren S J, Ditta G S, Eshed Y, Savidge B, Bowman J H, Yanofsky M F. *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, 2000, 404: 766–700
- [12] Hong R L, Hamaguchi L, Busch M A, Weigel D. Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *Plant Cell*, 2003, 15: 1296–1309
- [13] Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *BioTechniques*, 2007, 43: 649–656
- [14] Busch A, Bomblies K, Weigel D. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 585–587
- [15] Sieburth E, Meyerowitz M. Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that *cis*-elements for spatial regulation are located in transgenically. *Plant Cell*, 1997, 9: 355–365
- [16] Jack T, Sieberth L, Meyerowitz Z E. Target misexpression of *AGAMOUS* in whorl 2 of *Arabidopsis* flowers. *Plant J*, 1997, 11: 825–839
- [17] Folter S, Immink R G, Kieffer M, Parenicova L. Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS-box transcription factors. *Plant Cell*, 2005, 17: 1424–1433
- [18] Hecht V, Foucher F, Ferrandiz C, Macknight R, Navarro C, Morin J. Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model Legumes. *Plant Physiol*, 2005, 137: 1420–1434
- [19] Xu L(徐雷), Song W-J(宋伟杰), Wang L-L(王利琳). Preliminary study on the functions of *AGAMOUS* homologous genes in *Pisum sativum*. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2009, 54: 3207–3212 (in Chinese)
- [20] Pylatuk J D, Cross R H, Davis A R, Bonham P C. Elements regulating *AGAMOUS* expression are conserved between *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *Linum usitatissimum*. *Canad J Bot*, 2003, 81: 523–530
- [21] Chen Y(陈瑶), Xu Y(徐勇), Ma R-C(马荣才). Cloning and identification of the second intron of an *AGAMOUS*-like gene from peach (*Prunus persica*). *China Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2008, 28: 104–110 (in Chinese with English abstract)