

龙眼 *FLO/LFY* 同源基因 cDNA 片段的克隆^{*}

郑丽霞¹, 林晓东¹, 朱芳德², 肖洁凝¹, 符同浩¹, 钟伟¹, 黄上志¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 广东省肇庆市科委龙眼研究所, 广东 肇庆 526040)

摘要: 根据不同植物 *FLO/LFY* 同源基因 3' 端保守序列, 设计简并引物, 运用 RT-PCR 技术在龙眼花芽总 RNA 中扩增得到长度为 408 bp 的 cDNA 片段, 命名为 *lonFLO*。序列分析表明, 该片段与金鱼草 *FLO*、苹果 *AFL2*、拟南芥 *LFY* 有较高的核苷酸同源性, 分别达 98.8%, 81.6%, 81.1% 和 76.2%。

关键词: 龙眼; *FLO/LFY*; 克隆

中图分类号: S667.2 Q78 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2004) S1-0060-04

FLO/LFY 同源基因是花分生组织特异基因, 该基因突变会导致花分生组织不能形成正常的花, 而保持花序生长^[1-3]。Weigel 和 Nilsson 发现, *LFY* 基因的过量表达可以使拟南芥所有侧枝转变为单一的花, 并使花期大大提前^[4]。同时, 还发现, 将 *LFY* 基因转入欧洲山杨 (*hybridaspens*), 可以加速成花进程, 使其开花期从 8~12 a 提早至 7 个月^[5]。人们认为, *LFY* 基因可能控制花发育的启动程序, 而且它对维持花分生组织状态有重要的功能^[6]。由于该基因存在较高的保守性, 已经在多种植物上分离到它们的同源基因^[7-11]。

龙眼是我国南方地区重要的水果, 在生产上存在成花不同步, 成花逆转等花发育调控问题, 严重影响生产的稳定性^[12,13]。龙眼产期调控技术及机理研究已成为目前研究的热点。龙眼作为亚热带果树, 大多数品种通常成花需要低温, 而且 1 a 开花结果 1 次, 对应用分子生物学技术开展成花机理及调控研究是一个较大的限制。本研究采用的试验材料四季蜜龙眼, 是广东肇庆科委龙眼研究所 1995 年从广西引进的新品系, 具有特殊的成花特性。该龙眼在苗期及幼树容易成花座果; 成年树 1 a 中可以观察到多次开花的现象, 其中以 4—5 月和 8—9 月成花较多, 座果率较高, 具有热带龙眼成花特性, 即成花无需低温干旱条件。因此, 利用该品系, 分离 *FLO/LFY* 同源基因, 研究它在龙眼成花过程中的功能与调控, 有着重要的理论和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

四季蜜龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. cv. Sijimi 花芽、花序、花和叶片均取自广东肇庆市科委龙眼研究所种植园。样品在 -70 °C 冰箱中保存。

1.2 龙眼 RNA 提取

1.2.1 SDS 法 参照 Doehlert 等^[14] 总 RNA 的提取方法, 略加修改。

1.2.2 果实组织 RNA 提取法 参照陈昆松等 (1998)^[15] 方法。

1.2.3 改进的 RNA 提取法 称取 0.5~1.0 g 材料液氮研磨粉, 转入离心管加 10 mL $\varphi=70\%$ 预冷的丙酮 (-20 °C), 振荡混匀。10 °C 8 000×g 离心 10 min, 弃上清液。重复抽提 2~3 次。在沉淀中加入 5.5 mL 60 °C 预热的提取液 (Tris base 150 mmol/L, H₃BO₃ 575 mmol/L, EDTA 50 mmol/L, NaCl 0.5 mol/L, 4% SDS) 和 200 μ L β 巯基乙醇, 后缓慢加入 1.375 mL 的无水乙醇和 0.605 mL KAc 5 mol/L (pH 6.5), 振荡, 再加入 5.5 mL 的氯仿/异戊醇 (体积比为 24:1), 混匀后, 4 °C 17 000×g 离心 15 min。取上清液, 用等体积氯仿/异戊醇抽提 2 次, 取上清液。1 mL 上清液加入 0.4 mL LiCl 9 mol/L, -20 °C 放置 3 h, 4 °C 15 000×g 离心 30 min, 得到粗沉淀。

沉淀用 0.3 mL LiCl 3 mol/L 洗涤, 4 °C 15 000×g 离心 10 min。待沉淀干燥后, 用 0.4 mL DEPC 灭菌水溶解沉淀, 加入 1 mL 无水乙醇和 30 μ L KAc

* 收稿日期: 2003-12-26

基金项目: 广东省科技计划 (农业攻关) 资助项目 (A20406)

作者简介: 郑丽霞 (1977 年生), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 黄上志; E-mail: lsshsz@zsu.edu.cn

5 mol/L (pH 6.5), -20℃放置 1 h, 4℃15 000×g 离心 30 min。沉淀用 $\varphi=70\%$ 乙醇和无水乙醇分别洗涤一次, 干燥后, 沉淀用 DEPC 水溶解, 或以乙醇沉淀的形式保存在 -70℃中备用。

1.3 龙眼 DNA 提取

参照丁晓东等方法^[19], 稍作修改。

1.4 *FLO/LFY* 同源基因保守片段克隆

利用 Superscript™ II RNase H 逆转录酶 (Invitrogen 公司) 合成 cDNA 第 1 链, 根据拟南芥、金鱼草、烟草等植物 *LFY/FLO* 同源基因 3' 端序列的高度保守性, 用 GeneTool 软件, 设计合成简并引物。

上游引物 1:

5'-GAA/GGTGGCGGCGTGGG/CAAA/GAAGAA-3'

下游引物 2:

5'-CGGAGC/TTTGGTGGGC/AACA/GTACCA-3'

PCR 扩增条件: 采用“热启动”法, 即温度升至 72℃时加入 *ExTaq* 酶 (Takara 公司)。94℃放置 2 min, 55℃退火 70 s, 72℃延伸 90 s, 94℃变性 30 s, 35 次循环, 72℃放置 7 min。用胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 将扩增片段回收并将纯化的 PCR 产物直接和 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌, 大量克隆后, 回收目的片段进行后续分析。

1.5 基因组 *FLO/LFY* 特异片段的扩增

引物和 PCR 扩增条件同 1.4。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对收获的总 RNA 纯度和产量的影响

龙眼组织富含多糖和多酚等次生代谢物, 常规的 RNA 提取方法, 无法获得可用于检测的 RNA。采用 SDS 法从每克鲜质量的龙眼组织中提取的 RNA 产量低, 不能用于电泳检测。采用果实组织 RNA 提取法, 得到的 RNA A_{260}/A_{280} 比值为 2.012 (表 1), 能用于电泳检测, 但 25S rRNA 和 18S rRNA 的带染色浅和分不开。在此基础上, 进行了提取方法的改进, 增加了冷丙酮的沉淀, 去除影响 RNA 纯化的酚类物质及其他的次生物质, 联合使用乙醇和醋酸钾去除蛋白和多糖, 结果有效缩短了 RNA 提取时间, 提高了收获的 RNA 纯度和产量, 尤其是 RNA 收获的产量每克鲜质量达到了 49.5 μg , 是方法改进前产量的 5 倍。

方法改进后, 同样适合龙眼花芽、花序和花组织的总 RNA 提取, 经紫外分光光度计测定发现, A_{260}/A_{280} 比值均在 2.0 左右 (表 2)。电泳检测显示为 25S rRNA 和 18S rRNA 2 条清晰的亮带 (图 1)。

表 1 不同提取方法对每克鲜质量龙眼叶片所提取的总 RNA 纯度与产量的影响

Tab 1 Total RNA isolation from leaf of longan with different RNA extraction methods		
提取方法	$m(\text{RNA})/\mu\text{g}$	A_{260}/A_{280}
改进法	49.5	2.079
果实组织 RNA 提取法	9.90	2.012
SDS 法	3.75	1.870

表 2 每克鲜质量龙眼花芽、花序和花组织所提取的总 RNA 纯度与产量

Tab 2 Total RNA isolated from longan flower bud, inflorescence and flower		
组织	$m(\text{RNA})/\mu\text{g}$	A_{260}/A_{280}
花芽	181.5	2.058
花序	304.3	2.002
花	83.8	2.055

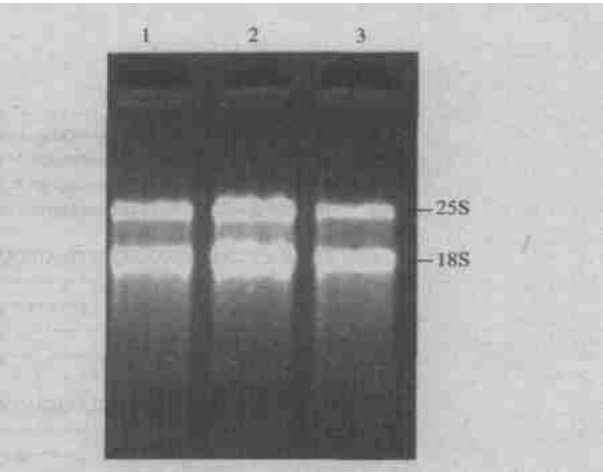


图 1 不同龙眼组织总 RNA 电泳图

Fig 1 Agarose gel (1.2%) electrophoresis of total RNA from different tissues of longan
1. 花芽; 2. 花序; 3. 花

可见, RNA 的纯度和完整性达到了分子生物学实验的基本要求。不同组织材料, 每克鲜质量中所提取的总 RNA 产量不同。其中, 花序中的产量最高, 达到 304.3 μg , 花组织中的产量最低, 为 83.8 μg 。

2.2 *FLO/LFY* 同源基因保守片段克隆

根据设计的引物, 以花芽总 RNA 反转录合成的 cDNA 第 1 链混合物为模板进行 RT-PCR 扩增, 扩增出 1 条大小为 400 bp 左右亮带 (图 2)。将该片段回收, 与 pMD18-T 载体连接转化大肠杆菌, 获得大量克隆后, 挑取含目的片段的质粒进行序列测定, 得到 1 个 408 bp 的 DNA 序列 (图 3)。

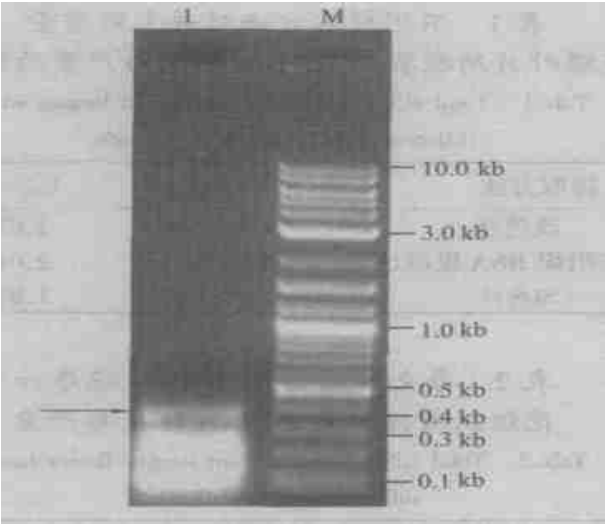


图 2 龙眼花芽 RT-PCR 扩增产物

Fig 2 RT-PCR product of longan flower bud
(electrophoresis on 1.2% agarosegel)

1. 15 μL RT-PCR 产物; M. DNA 相对分子质量标准

AGAGGTGGCG CGTGGGAAAA AGAATGGTCT TGATTATTTG
TTTTATTTGT ACGAGC AATG CCGCGACTTC TTGATCC AAG
TTCAACTAT TGCTA AAGGAG AGAGGTGAAA AATGTCCTC AC
TAAGGTGACG AACC AAGTGT TCAGGTACGC AAAGAAGGCT
GGCGCTAAT ACATC AACAA ACCAAAAATG CGCCACTACG
TGCCTGCTA CGCCCTGC AC TGCCTTGATG AGGCCGCTC
CAATGC ACTT CGTCGGGC AT TC AAGGAGCG TGGTGAGAAC
GTCGGTGC AT GCGCTC AGGC ATGCTAC AAG CCCTTGGTGG
CCATTGC AGC AAGAC AAGGA TGGGATATCG ATACC ATATT
CAACGCTC AT CCCCCTCTCT CGATCTGGTA CGTTCCC ACC
AAGCTCCG

图 3 龙眼 *LFY/FLO* 同源基因 (*lonFLO*)
的 cDNA 序列片段 (408 bp)

Fig 3 The cDNA fragment sequence of the longan
LFY/FLO homologous gene (*lonFLO*, 408 bp)

用 Blast 工具搜索 GenBank 进行序列比较, 发现它与已发表的 *LFY/FLO* 同源基因具有很高的同源性, 特别是与金鱼草的 *FLO*^[1], 苹果的 *AFL2*, *AFL1*^[10], 拟南芥的 *LFY*^[3] 相比, 其核苷酸同源性分别高达 98.8%, 81.6%, 81.1%, 76.2% (图 4)。

<i>lonFLO</i>	AGAGGTGGCGCGTGGGAAAAAGAATGGTCTTGATTATTTGTTTTAT	46
<i>FLO</i>	agagggagcatcggtttatcgtgacggagcccgga-----c-----	820
<i>LFY</i>	agagggagcatcggtttatcgtacggagccctggg-a-----a-----c-----c-ct-a-----c-----cc-c	774
<i>AFL2</i>	agagggagcaccggttcattgtgacggagccctggg-----c-----c-c-c-----cc-c-cc--	815
<i>AFL1</i>	agagggagcaccggttcattgtgacggagccctggg-----a-----c-----c-----cc-c-c--	798
<i>lonFLO</i>	TTGTACGAGCAATGCCGCACTTCTTGATCCAAGTTCAAATATTGCTAAGGAGAGAGGTGAAAAATGTCCCACTAAGGT	126
<i>FLO</i>	-----	900
<i>LFY</i>	-----a-----t-g-c-tc-t-g-c-g-a-----a-cc-t-c-----c-----c-----	854
<i>AFL2</i>	c-c-----g-----t-----g-c-g-ac-----c-----c-c-----c-----	895
<i>AFL1</i>	c-c-----tg-----t-t-----g-c-g-ac-----c-----c-c-----a-c-----	878
<i>lonFLO</i>	GACGAACCAAGTGTTCAAGTACGCAAAAGAAGCTGGCGCTAACTACATCAACAAACCAAAAATGCCCACTACGTGCACT	206
<i>FLO</i>	-----	980
<i>LFY</i>	-----a-----g-----at-a-a-g-gt-----a-----g-t-----a-----t-----	934
<i>AFL2</i>	-a-----t-----t-c-a-----a-g-c-g-----g-----g-----g-----	975
<i>AFL1</i>	-a-----g-----t-----t-c-a-----t-a-----a-g-----g-g-g-g-----t-----	958
<i>lonFLO</i>	GCTACGCCCTGCACTGCCTTGATGAGGCGCGCTCCAATGCACTTCGTCGGGCATTCAAGGAGCGTGGTGAGAACGTCGGT	286
<i>FLO</i>	-----	1060
<i>LFY</i>	-t-----t-c-----a-c-a-aa-t-a-----t-ca-aa-a-g-t-a-a-c-----t-c-----	1014
<i>AFL2</i>	-----t-t-g-----ag-a-g-----g-ga-ga-a-g-----a-g-c-a-t-g-----	1055
<i>AFL1</i>	-----t-----g-c-t-ag-----g-----tg-ga-ga-a-g-----a-g-c-a-t-g-----	1038
<i>lonFLO</i>	GCATGGCGTCAGGCATGCTACAAGCCCTTGGTGGCCATTGCAGCAAGACAAGGATGGGATATCGATACCATATTCAACGC	366
<i>FLO</i>	-----	1140
<i>LFY</i>	t-----t-t-----ac-t-aa-c-ttgct-t-t-c-----a-cg-g-c-t-----	1094
<i>AFL2</i>	-t-----g-----t-----tc-t-----g-c-----c-----c-t-g-c-----tt-----	1135
<i>AFL1</i>	-----g-----g-t-----tc-t-----t-----gcc-----c-----c-----g-----t-----tt-----	1118
<i>lonFLO</i>	TCATCCCCGTCTCTCGATCTGGTACGTTCCCAAGCTCCG.....	407
<i>FLO</i>	-----t-c-----t-gtcagctctgccatgccgagaggagcagtcggcagttg	1220
<i>LFY</i>	-----t-----t-t-----t-a-a-----g-gtcagctttgccatttgagcggaacaatgcggttgctg	1174
<i>AFL2</i>	c-----t-t-----t-----g-----t-gtcagctttgtcacgccgagcgcaacaacgc.....ca	1209
<i>AFL1</i>	-----c-----c-----g-----gtcagctttgtcacgccgagcgccacaatgc.....ca	1192

图 4 不同植物 *LFY/FLO* 同源基因 cDNA 序列比较 (—表示相同核苷酸)

Fig 4 cDNA sequence comparison of *LFY/FLO* homologous gene (—represent identical nucleotide)

现将该片段命名为 *lonFLO*。用该克隆片段对龙眼基因组 DNA 进行 Southern blot 检测, 没有得到结果 (数据未发表)。但有趣的是, 用同样的引物和 PCR 扩增条件, 可以在其基因组中扩增出同样大小的片段 (图 5), 而且用金鱼草的 *FLO* 作探针进行 Southern blot, 发现在相同位置上有相同强度的杂交信号产生 (数据未列出)。

3 讨 论

龙眼组织中含有大量的酚类和多糖物质, 是提取高质量 RNA 的主要障碍。在完整的细胞内, 多酚类化合物、多糖、花色素苷和一些未知次级代谢产物在空间上与核酸是分离的, 但当组织被研磨, 细胞破碎后, 这些物质就会与 RNA 相互作用。要采用防止氧化的措施并通过分级沉淀的办法将 RNA 同多糖和多酚类化合物分开^[17,18]。研究表明, 用预冷的丙酮连续抽提, 可除掉大量的原花色素类等物质^[9], 防止了它们在氧化后与 RNA 结合, 解决了 RNA 沉淀呈褐色的问题。同时, 加入了 Tris-硼酸 (pH 7.5), 与酚类化合物形成复合物, 抑制了酚类化合物的氧化及其与 RNA 的结合, 乙醇和醋酸钾联合使用能有效去除蛋白和多糖^[20]。这些措施的采用, 有效的解决了龙眼 RNA 提取质量差和产量低的问题。

FLO/LFY 基因作为成花调控一个关键基因, 由于结构和功能的保守性, 从一开始就成为人们研究的焦点。通过转基因, 人们发现它的过量表达, 不仅能促进草本植物开花^[4,21], 而且能提早木本植物欧洲山杨和柑橘的开花^[5,22]。目前, 在果树上分离得到 *FLO/LFY* 同源基因的有柑橘^[8,9], 苹果^[10], 葡萄^[11] 和猕猴桃。本实验室分离得到的龙眼 *FLO/LFY* 同源基因片段 *lonFLO* 与苹果的 *AFL2* 同源性最高。*AFL2* 在苹果的茎端、花芽、花器官和根均有表达, 转入拟南芥中能提早开花^[10]。陈大明等 (1997) 以 *LFY* 基因 3'端 414 bp 的片段作探针, 与苹果、梨、湖北海棠和柑橘基因组 Southern blot, 发现它们只含一个单拷贝的 *LFY* 同源基因^[23]。Wada (2002) 利用分离的 *AFL* 基因其中 400 bp 的片段作探针, 检测苹果基因组发现, 它含有两个以上同源基因^[10]。以 *lonFLO* 为探针对龙眼基因组进行 Southern blot, 没有得到杂交信号, 推测可能是基因组中该基因拷贝数低或序列含有内含子。但有趣的是, 用同样的引物对龙眼基因组进行 PCR, 能得到相同大小的 DNA 片段, 比较发现, 在该区域通常存在并能与金鱼草 *FLO* 基因有强的杂交信号。该基因的第二内含子, 该内含子序列在不同植物中

长度变化大^[1,2,8,11], 实验结果暗示了 *lonLFY* 基因可能缺乏第二内含子, 该特点是否是龙眼基因组特有, 需进一步分析。目前, 本实验室已建立四季蜜龙眼成花初期的 cDNA 文库, 为该基因的全长 cDNA 的获得及功能分析奠定了基础。

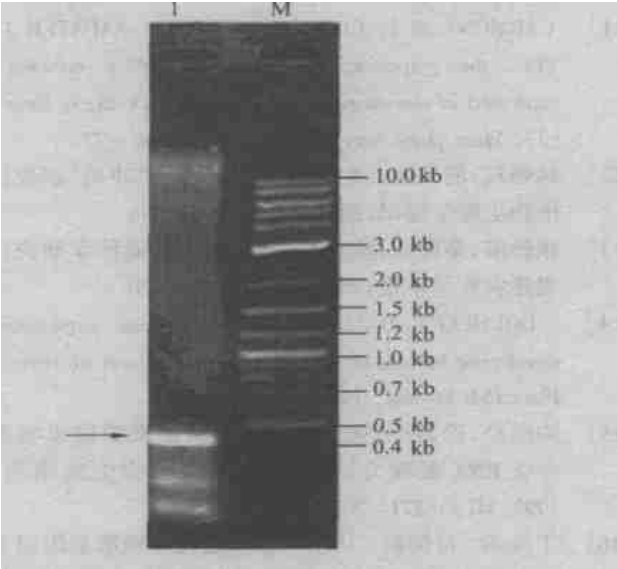


图 5 龙眼基因组 PCR 扩增产物
Fig. 5 The PCR products of Longan genomic DNA
1. 基因组 PCR 产物;
M. DNA 相对分子质量标准

参考文献:

[1] COEN E S, ROMERO J M, DOYLE S, et al. floricaula: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus* [J]. Cell, 1990, 63: 1311—1322.
[2] WEIGEL D, ALVAREZ J, SMITH D R, et al. LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis* [J]. Cell, 1992, 69: 843—859.
[3] WEIGEL D, Meyerowitz E M. Activation of floral homeotic genes in *Arabidopsis* [J]. Science, 1992, 261: 1723—1726.
[4] WEIGEL D, NILSSON O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants [J]. Nature, 1995, 377: 495—500.
[5] NILSSON O, WEIGEL D. Modulating the time of flowering [J]. Curr Opin Biotechnol, 1997, 8: 195—199.
[6] 田淑兰, 陈敏, 白书农. *LEF/FLO* 基因与高等植物成花诱导分子机理的研究进展 [J]. 生物学通报, 1999, 34 (9): 5—7.
[7] KELLY A J, BONNIANDER M B, MEEKS-WAGNER D R. NFL, the tobacco homolog of FLORICAULA and LEAFY, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems [J]. The Plant Cell, 1995, 7: 225—23.
[8] 陈大明, 金勇丰, 张上隆. 柑桔 *LEAFY* 同源基因片段分离及特性研究 [J]. 园艺学报, 2001, 28 (4): 295—300.

[9] 刘淑芳,陈力耕,陈大明,等. 柑橘 LEAFY 同源基因片段的克隆及分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2001,27(3): 297—300.

[10] WADA M, CAO Q F, KOTODA N, et al. Apple has two orthologue of FLORICAULA/LEAFY involved in flowering[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49: 567—577.

[11] CARMONA M J, CUBAS P, MARTINE ZAPATER J M. VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate[J]. Plant physiology, 2002, 130(9): 68—77.

[12] 林顺权,胡又厘. 龙眼的成花逆转与“冲梢”调控[J]. 植物生理学通讯,2001, 37(6): 581—583.

[13] 赖钟雄,桑庆亮,陈春玲,等. 龙眼的遗传学研究[J]. 福建农业学报,2000, 29(4): 416—420.

[14] DOEHLERT D C, KUO T M. Gene expression in developing kemels of some endosperm mutants of maize[J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35: 411—418.

[15] 陈昆松,徐昌杰,张上隆. 富含多糖猕猴桃果实组织中总 RNA 提取方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(5): 371—373.

[16] 丁晓东,吕柳新. 从顽拗植物荔枝中提取基因组 DNA 技术的研究[J]. 应用与环境生物学报,2000, 6(2): 142—145.

[17] AINSWORTH C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa*(Sorrel)[J]. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12: 198—203.

[18] SCHULTZ D J, CRAIN R, COX FOSTER D L, et al. RNA isolation from recalcitrant plant tissues[J]. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12: 310—316.

[19] SCHNEIDERBAUER A, SANDERMANN H J, ERNST D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds[J]. Anal Biochem, 1991, 197: 91—95.

[20] LOPEZ GOMEZ R, GOMEZ-LIM M A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp[J]. Hort Science, 1992, 27: 440—442.

[21] HE Z H, ZHU Q, DABI T, et al. Transformation of rice with the Arabidopsis floral regulator LEAFY cause early heading[J]. Transgenic Res, 2000, 9(3): 223—227.

[22] PENA L, MARTIN TRILLO M, JUAREZ J, et al. Constitutive expression of Arabdopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(3): 263—267.

[23] 陈大明,张上隆. 拟南芥菜 LEAFY 基因片段的分离及果树基因组中存在 LEAFY 同源基因的证据[J]. 浙江农业学报,1997, 9(4): 185—188.

Cloning of *LFY*/*FLO* Homologous Gene cDNA Fragment in Longan (*Dimocarpus longan* Lour.)

ZHENG Li xia¹, LIN Xiao dong¹, ZHU Fang de², XIAO Jie ning¹,
FU Tong hao¹, ZHONG Wei¹, HUANG Shang zhi¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Zhaoqing Longan Institute, Zhaoqing 526040, China)

Abstract: The longan *LFY*/*FLO* homologous gene cDNA fragment (*lonFLO*) of was cloned from total RNA of floral bud by RT-PCR. The *lonFLO*, a 408 bp cDNA fragment, was high homology to *FLO* (98.8%), *AFL2* (81.6%), *AFL1*(81.1%) and *LEY* (76.2%).

Key words: longan; *FLO*/*LFY*; clon