林业科学研究 2013,26(2):200～206
Forest Research

文章编号:1001-1498(2013)02-0200-07

毛竹 *PeAP*2 基因及其启动子的克隆与表达初步分析

陈东亮，彭镇华[1,2]，高志民[1*]

(1. 国际竹藤中心,竹藤科学与技术重点实验室,北京 100102; 2. 中国林业科学研究院林业研究所,北京 100091)

摘要: *APETALA*2 (*AP*2) 基因在植物生长发育过程中发挥着重要作用。利用 RT-PCR 和 RACE 方法,从毛竹中克隆到 1 个 *AP*2 同源基因的全长 cDNA 序列,命名为 *PeAP*2。序列分析表明: *PeAP*2 基因全长 1 750 bp,其中,5′端非编码区 106 bp,3′端非编码区 174 bp,开放阅读框 1 470 bp,编码 1 个 489 aa 的蛋白,该蛋白含有 2 个 AP2 结构域,属于 AP2/EREBP 家族的 AP2 亚家族。PeAP2 蛋白与来自其它单子叶植物的 AP2 蛋白均有着较高同源性,其中,与二穗短柄草的 AP2 蛋白同源性最高,达 74.85%。实时定量 PCR 分析显示: *PeAP*2 基因在毛竹的根、茎、叶、鞘和节 5 种器官中均有表达,其中,叶片中的表达丰度最高,鞘中次之,而在根、茎、节中的表达丰度接近,均较低。利用 hiTAIL-PCR 方法克隆获得了 *PeAP*2 上游启动子区序列 1 359 bp,分析显示其含有光、激素等多种信号应答相关的作用元件。

关键词: 毛竹; *AP*2 基因; 组织特异表达; 启动子

中图分类号: S795　　**文献标识码:** A

Cloning and Express Analysis of *PeAP*2 Gene and Its Promoter in *Phyllostachys edulis*

CHEN Dong-liang[1], *PENG Zhen-hua*[1,2], *GAO Zhi-min*[1]

(1. International Centre for Bamboo and Rattan, Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: *APETALA*2 (*AP*2) gene plays an important role in plant development. A full-length cDNA sequence of *AP*2 homologous gene was cloned from *Phyllostachys edulis* by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods, and named as *PeAP*2. The *PeAP*2 is 1 750 bp and consists of a 5′-untranslated region (UTR) of 106 bp, a 3′-UTR of 174 bp and an opening reading frame of 1 470 bp. The sequence analysis showed that *PeAP*2 encoded a protein of 489 aa containing two AP2 domains which indicated that it belonged to the AP2 subfamily of AP2/EREBP family. Comparison analysis showed that PeAP2 protein shared high homology with AP2 protein from other monocotyledon plants, especially with that of *Brachypodium distachyon* up to 74.85%. Real time PCR analysis showed that *PeAP*2 expressed all in root, stem, leaf, sheath and joint. The highest expressed level presented in leaf, followed by sheath and much lower in root, stem and joint. A 1 359 bp promoter sequence of *PeAP*2 gene was cloned by hiTAIL-PCR methods. The sequence analysis showed that it contained many cis-acting elements that response to light, hormone, and other factors.

Key words: *Phyllostachys edulis*; *AP*2 gene; tissue specific expression; promoter

转录因子通过与顺式作用元件结合调控下游基因表达,是许多基因表达过程中的调控方式之一。AP2/EREBP 蛋白家族是植物中重要的一类转录因子,其家族成员在植物的生长发育、抗逆反应等过程

收稿日期: 2012-12-03
基金项目 "十二五"国家科技支撑计划课题(2012BAD23B0504)
作者简介: 陈东亮(1984—),男,河北邯郸人,在读博士,主要从事林木遗传育种研究.
* 通讯作者: 高志民,男,河北唐山人,研究员,博士,主要从事生物技术与功能基因组研究.

中发挥着重要作用,如金鱼草(*Antirrhinum majus* L.) *AP2* 同源基因 *LIP1* 和 *LIP2*,在萼片、花瓣和胚珠发育中都起重要作用[1];水稻(*Oryza sativa* L.) AP2/EREBP 家族基因 *OsDREB* 参与对干旱、高盐以及低温等胁迫的抗逆反应[2]。AP2 (APETALA2) 亚家族是 AP2/EREBP 家族的一个分支,研究证明,该亚家族基因在植物花器官外轮发育中发挥着重要作用[3-4],属于花发育 ABC 模型中的 A 类基因。对模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 的研究表明: *AP2* 基因还能影响种子中脂肪、蛋白质和糖等物质的积累,从而影响拟南芥种子的大小和质量[5-6],拟南芥 AP2 亚家族成员 *SMZ* 和 *SNZ* 具有抑制开花的功能[7],而 *PLT1* 和 *PLT2* 对拟南芥根尖静止区的大小和干细胞活性的维持有着重要调节作用[8]。

竹林作为重要的森林资源倍受世人关注,竹子生理生化、培育经营、加工利用等方面的研究得到广泛开展。随着对竹子开发利用的不断深入,竹类植物分子生物学研究日益成为热点。目前,在竹类植物分子标记、基因分离与功能鉴定、高通量测序以及比较基因组学等方面已取得一定成果[9],但对其分子生物学研究仍处于起步阶段,远落后于农作物及其它经济树种。关于竹类植物转录因子的研究较少,且主要集中在与开花、抗逆等相关的少数几类,如 *MADs-box*[10-11]、*ZFP*[12] 等,有关竹类植物 AP2 转录因子的研究尚未见报道。本研究以我国重要经济竹种毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie) 为材料,从 *AP2* 基因入手,利用基因同源克隆的原理,采用 RT-PCR 和 RACE 技术从毛竹中克隆 *AP2* 同源基因的 cDNA 全长,并利用实时定量 PCR 技术检测该基因在毛竹幼苗不同组织中的表达情况,以期为开展 *PeAP2* 基因的功能研究,从分子水平揭示竹子发育过程中的相关生命现象提供基础材料。

1　材料与方法

1.1　试验材料

毛竹种子用 0.4% $KMnSO_4$ 进行表面消毒 6 h 后,用清水浸泡 12 h,撒播于铺有蛭石的塑料盘里,并以蛭石覆盖。置于培养室培养(温度 25 ℃,光周期: 光照/黑暗 = 16 h/8 h) ,待苗高 3 ~ 5 cm 时,移植到含有蛭石和腐殖土(1∶3) 的塑料小盆中,每盆 3 株。竹苗培养 3 个月左右(苗高约 10 cm) 时取样,分别剪取根、茎、叶、鞘和节,迅速液氮冷冻,-80 ℃保存备用。

1.2　RNA 的提取及基因克隆

采用 Trizol 法提取毛竹各组织的总 RNA[13],cDNA 合成使用美国 Promega 公司的反转录试剂盒,叶片 5′RACE 和 3′RACE cDNA 的合成采用 SMART RACE 试剂盒(美国 Clontech 公司产品) 。参考单子叶植物 *AP2* 基因设计保守区引物,P1: 5′-GTCTGGTTGTTTGGGTTTGAGG-3′, P2: 5′-TGAATCCAATCCACTACAAGAAACC-3′。PCR 扩增条件: 94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1 min,48 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,共 35 个循环,72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,回收目的片段连接于 pGEM-T Easy 载体(美国 Promega 公司产品) 后送华大基因测序。

根据保守区序列设计 RACE 引物,3-1: 5′-GTGCAGGGTGACGCCTCTGTATTTGGA-3′; 3-2: 5′-GCGATCAAATGCAATGGTAGAGAAGCCG-3′; 5-1: 5f′-GTGCAGGGTGACGCCTCTGTATTTGGA-3′; 5-2: 5′-GCCTGGCGGGAGCGGCAAGATTCTGATGT-3′。反应体系和反应程序按照 SMART RACE 试剂盒操作说明进行。

1.3　生物信息学分析

利用 DNASTAR 5.01 软件对获得序列进行初步分析,应用在线软件 ProtScale[14] 分析氨基酸链的亲水性/疏水性,SOMPA[15] 分析蛋白折叠结构,SWISS-MODEL[16] 构建其三维结构模型。Mega 4.0 软件邻接法(Neighbor-Joining,NJ) 构建基于 AP2 同源蛋白的系统进化树。

1.4　组织表达分析

根据获得的基因序列设计实时定量 PCR 引物,*PeAP2*-1: GAGCCACCACCGCTGAGT, *PeAP2*-2: CCAATCCACTACAAGAAACCA。分别以毛竹根、茎、叶、鞘和节 5 种组织的 cDNA 为模板,并以毛竹 *Actin-7* 基因(FJ601918) 为内参[17],利用罗氏 480 荧光定量 PCR 仪和 SYBR Premix Ex TaqTM(TaKaRa) 实时定量 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增和实时定量检测分析。PCR 扩增反应体系为: 2 × SYBR Premix Ex Taq 10 μL,引物 *PeAP2*-1、*PeAP2*-2 各 0.4 μL(10 μmol) ,模板 cDNA 2 μL 用水补充至 20 μL。采用两步法标准程序: 95 ℃预变性 30 s; 95 ℃变性 5 s,60 ℃复性 34 s,共 45 个循环。每种材料设置 3 次重复,数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析[18]。

1.5　*PeAP2* 上游调控序列的克隆及分析

毛竹 DNA 的提取采用 CTAB 法,根据 *PeAP2* 序列

设计 3 个巢式引物，SP1: 5′-ACACCCCTCAAACCCAAA-CAACCAGA-3′; SP2: 5′-TCCTCCTCCACCTCCTCAAC-CAAGA-3′; SP3: 5′-ATCGGCAACGCCCACGTCTTTCT-3′。随机引物序列、反应体系和反应程序参考 Liu 等[19] 的方法。启动子预测及顺式元件分析分别采用 Neural Network Promoter Prediction 和 PLACE[20] 在线软件。

2 结果与分析

2.1 基因全长 cDNA 获得

以毛竹叶片 cDNA 为模板，用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增，得到一个 1 395 bp 的克隆片段。NCBI blast 分析表明: 该片段与多个物种 *AP*2 基因同源性较高，表明其为毛竹 *AP*2 基因的部分序列。分别利用 RACE 引物 3-1、5-1 与 RACE 试剂盒通用引物 UPM 进行第一轮扩增，之后再以第一轮的 PCR 产物为模板，分别利用 RACE 引物 3-2、5-2 与 RACE 试剂盒通用引物 NUP 进行巢式扩增，分别得到 5′端片段 526 bp，3′端片段 772 bp，通过拼接最终获得全长 cDNA 序列为 1 750 bp，其中，5′端和 3′端非编码区分别为 106 bp 和 174 bp，编码框为 1 470 bp，共编码 489 个氨基酸(图 1)，将该基因命名为 *PeAP*2(GenBank 登录号为 JX402084)。

```
-106  AGACCAAGCAAGCAAGCGGGCAGCTCGAAATTGAGACTGGGCTTGTTTGAGTTTGAGAGGTGTTGATTGG
-36   GAGTTGGGATTGATCTTGGTTGAGGAGGAGGAGGAGATGGAGCTGGATCTGAACGTGGCCGACGGGGCGCCG
                                            M  E  L  D  L  N  V  A  D  G  A  P
 37   GAGAAGCCGGCGGCGATGGCGCGGAGCGACTCATGCACGTCGGGCTCGTCGGTGCTGAACGCGGAGGCGTCC
       E  K  P  A  A  M  A  R  S  D  S  C  T  S  G  S  S  V  L  N  A  E  A  S
109   GCCGGCGGAGGCGCCGCGCCCGCGGAGGAGGGCTCCAGCTCGACGCCCCCGACCCCGCCGCCGGCGGTGCTC
       A  G  G  G  A  A  P  A  E  E  G  S  S  S  T  P  P  T  P  P  P  A  V  L
181   GAGTTCAGCATCTTGAGGAGCTCGGCGTCGGCCGAGGGCGAGAACGACGTGGGCGGCGCCGACGAGGAGGAG
       E  F  S  I  L  R  S  S  A  S  A  E  G  E  N  D  V  G  G  A  D  E  E  E
253   GAGGCCACGCCGTCGACGCCGCCGCAACTCGTCACGCGGGAGCTCTTCCCGGTCGCCGCCGGCCGCCCGCAG
       E  A  T  P  S  T  P  P  Q  L  V  T  R  E  L  F  P  V  A  A  G  R  P  Q
325   CCGCCTGTGCCGCAGCATTGGGCCCATCTCGGGTTCTTGCGCCCCGAGCCGCCGCGCCCGCAGCCGGACATC
       P  P  V  P  Q  H  W  A  H  L  G  F  L  R  P  E  P  P  R  P  Q  P  D  I
397   AGAATCTTGCCGCTCCCGCAGGCGCACGCGCCACCCCCGCCTCCTCCGGCGCAGCCGCAGGCGGCCAAGAAG
       R  I  L  P  L  P  Q  A  H  A  P  P  P  P  P  P  A  Q  P  Q  A  A  K  K
469   AGCCGCCGCGGTCCGCGCTCCCGCAGCTCGCAGTACCGCGGCGTCACCTTCTACCGCCGCACCGGCCGCTGG
       S  R  R  G  P  R  S  R  S  S  Q  Y  R  G  V  T  F  Y  R  R  T  G  R  W
541   GAGTCCCATATTTGGGATTGCGGCAAGCAAGTGTACTTAGGTGGATTCGACACTGCTCATGCTGCTGCAAGG
       E  S  H  I  W  D  C  G  K  Q  V  Y  L  G  G  F  D  T  A  H  A  A  A  R
613   GCGTATGATCGAGCAGCGATCAAGTTCCGCGGCGACGACGCGGACATAAACTTCAATCTTAGTGACTACGAG
       A  Y  D  R  A  A  I  K  F  R  G  D  D  A  D  I  N  F  N  L  S  D  Y  E
685   GACGAAATGAAGCAGATGAAGAGCCTATCCAAGGAGGAGTTCGTGCACGCCCTGCGACGGCAGAGCACTGGC
       D  E  M  K  Q  M  K  S  L  S  K  E  E  F  V  H  A  L  R  R  Q  S  T  G
757   TTCTCGCGCGGGAGCTCCAAGTACAGAGGCGTCACCCTTCACAAGTGCGGCCGATGGGAGGCTCGCATGGGC
       F  S  R  G  S  S  K  Y  R  G  V  T  L  H  K  C  G  R  W  E  A  R  M  G
829   CAGTTCCTCGGCAAGAAGTACATATATCTTGGGCTATTCGACAGCGAAGTAGAGGCTGCAAGGGCTTATGAT
       Q  F  L  G  K  K  Y  I  Y  L  G  L  F  D  S  E  V  E  A  A  R  A  Y  D
901   AAGGCTGCGATCAAATGCAATGGTAGAGAAGCCGTGACGAACTTCGAGCCTAGCACATATGATGGGGAGCTG
       K  A  A  I  K  C  N  G  R  E  A  V  T  N  F  E  P  S  T  Y  D  G  E  L
973   CTTACTGAAGTTGGTGCTGAAGGCGCAGATGTCAATCTGAACTTGAGCATATCTCAACCAGCTTCGCAGAGC
       L  T  E  V  G  A  E  G  A  D  V  N  L  N  L  S  I  S  Q  P  A  S  Q  S
1045  CCCGAAAGGGATAAGAACTCCCTTGGCCTGCAGCTTCACCATGGATCATTTGAAGGTTCTGAACCGAAGAGA
       P  E  R  D  K  N  S  L  G  L  Q  L  H  H  G  S  F  E  G  S  E  P  K  R
1117  GCAAAGATTGATGCTTCCTCTGAACCGGCTGGCAGCCCTCACCGATTCCCTCTTCTGACCGAGCATCCACCA
       A  K  I  D  A  S  S  E  P  A  G  S  P  H  R  F  P  L  L  T  E  H  P  P
1189  GTCTGGTCTGCCCAATCTCACCACATATTTTCAAATAATGAGGATGCATTTAGACATCATAACAGGAGGCCA
       V  W  S  A  Q  S  H  H  I  F  S  N  N  E  D  A  F  R  H  H  N  R  R  P
1261  GAGGGGGGTACAGGGGGTGTTCCCAGCTGGGCATGGAAGGTGAGCCACCCTCCTCCCACACTACCATTGCCG
       E  G  G  T  G  G  V  P  S  W  A  W  K  V  S  H  P  P  P  T  L  P  L  P
1333  CTGTTCTCGTCGTCGTCGTCATCCGCTGCAGCATCATCAGGATTCTCCAAAATCGCCGTGACAGCTGCCTCC
       L  F  S  S  S  S  S  S  A  A  A  S  S  G  F  S  K  I  A  V  T  A  A  S
1405  ACTGCCCCATCGGCCTCCCTCCGGTTTGACCCGATGGCACCATCGTCGTCGAGCCACCACCGCTGAGTAAAT
       T  A  P  S  A  S  L  R  F  D  P  M  A  P  S  S  S  S  H  H  R
1477  TTGCCGGGAAGCTGGCATCTTTTTTTCCCTCCCGGCGTTTCAACGTTTTCGGTTTTGCGCCGGGGTGGTTT
1549  CTTGTAGTGGATTGGATTCTTGACTGTATTTGCATACTGCCCAAGTGAAAATGTTCCTCTCTTTGCGCAAAA
1621  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

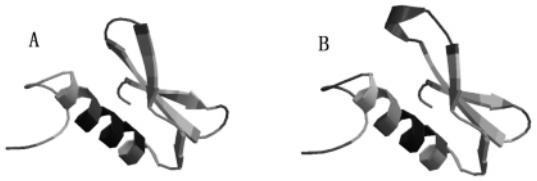
划线: 核定位序列; 双下划线: AP2 结构域; 方框: miR172 结合位点

图 1 *PeAP*2 全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

2.2　生物信息学分析

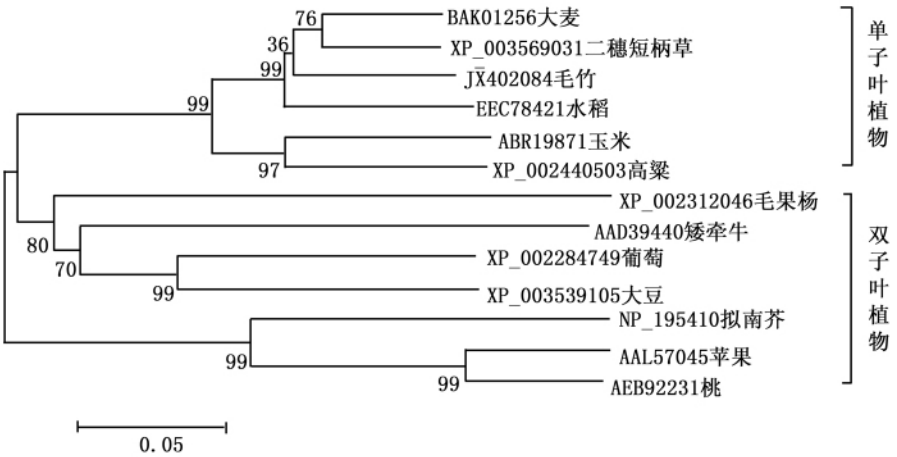
DNASTAR 软件分析表明: PeAP2 蛋白的预测分子量为 52.7 kDa,等电点为 6.977。结构域分析显示: PeAP2 蛋白含有 2 个保守的 AP2 结构域和 1 个核定位信号序列(图 1),除此之外还含有酰胺化位点,N 端糖基化位点,酪蛋白激酶 II 磷酸化位点等功能区域。氨基酸疏水性对蛋白的折叠方式及功能具有重要影响[21],疏水性/亲水性分析表明,PeAP2 蛋白同时具有疏水性和亲水性区域,但整体呈现很强的亲水性。

以拟南芥 GBD(GCC-box binding domain)三维构型做模板(1gccA),预测 PeAP2 蛋白的三维构型,得到其 2 个 AP2 结构域的三维结构,PeAP2 蛋白 2 个 AP2 结构域与模板的相似度分别为 46.77% 和 32.79%,且均具有 AP2 结构域典型的 3 个 α 螺旋和 3 个 β 回转(图 2)。基因的多重比较分析结果表明: PeAP2 蛋白与其它禾本科(Poaceae)植物的 AP2 蛋白均具有较高的同源性,其中,与二穗短柄草(*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.)的 AP2 蛋白同源性最高,达 74.85%。利用公共数据库中一些已知的 AP2 蛋白序列和 PeAP2 蛋白构建系统进化树(图 3),结果显示: 单子叶植物与双子叶植物的 AP2 蛋白分别聚类到 2 个不同的蛋白簇; 在单子叶植物簇中,PeAP2 与水稻、大麦(*Hordeum vulgare* Linn.)、二穗短柄草的 AP2 蛋白聚在一起,而高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)、玉米(*Zea mays* L.)的 AP2 则在另一分支,这与形态分类学的描述基本一致。



A: AP2(167-255)三级结构预测; B: AP2(251-317)三级结构预测

图 2　PeAP2 蛋白三级结构预测



注: 毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr.& Gray)、矮牵牛(*Petuniax hybrida* Vilm)、葡萄(*Vitis vinifera* L.)、大豆(*Glycine max*(L.)Merr.)、苹果(*Malus domestica* Borkh.)、桃(*Prunus persica*(L.) Batsch)。

图 3　基于 AP2 同源蛋白的不同物种系统进化树

2.3　组织表达分析

以毛竹 *Actin-7* 基因为内参,确定 *PeAP2* 基因在不同组织中的表达特异性,实时定量 PCR 结果(图 4)表明: *PeAP2* 基因在毛竹根、茎、叶、鞘和节 5 个组织中均有表达,其中,在叶中的表达丰度最高,其次为鞘中,在根、茎、节 3 个组织中的表达丰度相似,均较低。

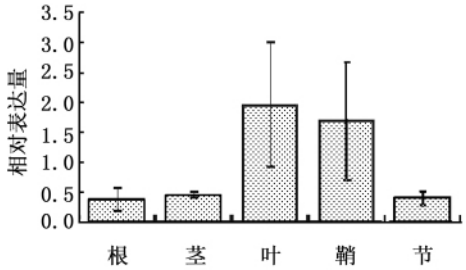


图 4　*PeAP2* 在不同组织中的表达

2.4　启动子的克隆与分析

以毛竹叶片 DNA 为模版,利用 hiTAIL-PCR 方法

表 1 *PeAP2* 启动子片段功能预测

起始位点	终止位点	分值	启动子序列
108	158	0.82	CTCGCTAATTTATAGCCGGGAGTGAATCCTTCCCCCGCGC**A**CGATCGATT
643	693	0.85	GCCAAATAAATAAATAAATTGGGACGATCATTTCTATATA**T**ACCATGTGA
667	717	0.92	CGATCATTTCTATATATACCATGTGAAAACGTGACAATAC**G**GCCAAAAAA
999	1 049	0.93	CAAGGAAGGGAAAAAAAACCGTGTTGAACTTGAATCCAAC**G**GTAGAGACA
1 231	1 281	1.00	CCCTCTTCTATATATACCACCCGCCTCTTTTTCCATCTTC**A**CACACGCCC
1 559	1 609	0.92	CGTGGAGGAGGCTAAATGTACCGCAGGAACGACTCGGCCC**T**ATCCTGCTT

注: 放大黑体字母是预测的转录起始位点。

进行了 3 轮巢式 PCR 扩增,对 1 000 bp 以上的特异片段进行回收并测序,获得了 1 359 bp 的 *PeAP2* 上游启动子区序列,对该段序列进行转录起始功能预测,得到可能的起始位点 6 个(表 1),其中,满分位点 1 个,表明该序列具有明显的启动子结构。顺式作用元件分析显示: 除了核心启动子元件 TATA box 和 CAAT box,之外还含有大量的光、激素等信号的应答元件(表 2)。

3 讨论

AP2/EREBP 蛋白家族是植物中非常重要的一类转录因子,该家族蛋白的共有特征是含有至少 1 个 AP2 结构域,根据蛋白结构域和数量差异 AP2/EREBP 家族又分为 3 个亚家族[22]: AP2(APETALA2)亚家族(含有 2 个 AP2 结构域)、EREBP(ethylene - responsive element binding protein)亚家族(含有 1 个 AP2 结构域)和 RAV(Related to ABI3/VP1)亚家族(含有 1 个 AP2 结构域和 1 个 B3 结构域)。本研究从毛竹中克隆到的 *PeAP2* 基因编码的蛋白具有 2 个 AP2 结构域和 1 个具有引导蛋白进入细胞核的核定位序列[23],符合 AP2 亚家族的特征。构建基于 AP2 同源蛋白的进化树,结果显示: PeAP2 蛋白与来自单子叶植物的 AP2 蛋白聚为 1 支,明显区别于来自双子叶植物的 AP2 蛋白,且与形态分类学上进化关系较近的二穗短柄草、水稻等分支点较近,表现出与形态分类学的一致性。

MicroRNAs(miRNAs)是存在于真核生物的一类长约 21 ~25 nt 的非编码 RNA,它们可以通过碱基配对与靶基因 mRNA 结合而降解 mRNA,从而抑制基因的表达。miRNA 与其结合位点序列高度匹配,它们是基因表达过程中一种重要的调节方式。研究表明: miRNA172(miR172)是某些 *AP2* 基因的抑制因子[24-25],根据是否含有 miR172 结合位点,AP2 亚家族进一步划分为 AP2 组(含 miR172 结合位点)和 ANT(AINTEGUMENTA)组。目前,在大麦、

表 2 *PeAP2* 启动子区段作用元件

名称	数量	功能描述
AAAC-motif	1	光响应元件
AAGAA-motif	1	
ABRE	10	参与脱落酸响应的顺式元件
AC-II	1	参与光响应的顺式元件
ACE	2	
AE-box	1	光响应组件的一部分
ATCT-motif	1	光响应相关保守组件的一部分
ATGCAAAT motif	1	与 TGAGTCA motif 相关的顺式调控元件
Box 4	1	光响应相关保守组件的一部分
CAAT-box	29	启动子和增强子区域常见的顺式元件
CAG-motif	1	光响应元件的一部分
CCAAT-box	2	MYBHv1 结合位点
CGTCA-motif	1	参与茉莉酸甲酯响应的顺式调控元件
G-Box	7	参与光合响应的顺式调控元件
G-box	14	参与光合响应的顺式调控元件
GATA-motif	2	光响应元件的一部分
GAG-motif	1	光响应元件的一部分
GARE-motif	1	赤霉素响应元件
GC-motif	1	参与缺氧诱导的类似于增强子的元件
GT1-motif	2	光响应元件
I-box	2	光响应元件的一部分
LTR	2	参与低温响应的顺式作用元件
MSA-like	1	参与细胞周期调控的顺式作用元件
O2-site	1	参与玉米醇溶蛋白代谢的顺式调控元件
P-box	1	赤霉素响应元件
Skn-1_motif	2	胚乳表达所必须的顺式调控元件
Sp1	7	光响应元件
TATA-box	32	转录起始位点-30 处核心启动子元件
TATC-box	1	参与赤霉素响应的顺式作用元件
TCT-motif	1	光响应元件的一部分
TGA-element	1	生长素应答元件
TGACG-motif	1	参与茉莉酸甲酯应答的顺式调控元件
Unnamed_1	6	
Unnamed_10	1	
Unnamed_12	1	
Unnamed_14	1	
Unnamed_3	6	
Unnamed_4	23	
Unnamed_8	1	
Unnamed_9	1	
circadian	1	参与昼夜节律调控的顺式调控元件
motif I	1	根部特异性的顺式作用元件

小麦(*Triticum aestivum* Linn.) 等[26] 植物中克隆的某些 *AP*2 类基因中含有 miR172 结合位点。本研究中的 *PeAP*2 基因在编码框靠近 3′端处含有 1 个高度匹配的 miR172 结合序列,表明 *PeAP*2 基因表达过程中可能受到 miR172 调控; 然而,在竹子中 miR172 是如何调控 *PeAP*2 基因表达的,需要进一步深入研究。

大量实验已证明 *AP*2 基因在外轮花器官发育中扮演着非常重要的角色[3-4] ,但 *AP*2 在植物各个组织均有表达[27-29] ,表明 *AP*2 的作用不只局限于花器官发育,模式植物拟南芥的研究也说明了这一点[5-8] 。*AP*2 基因在不同物种和组织中的表达差异较大: 任磊等[28] 对牡丹花(*Paeonia suffruticosa* Andr.) 不同组织 *AP*2 基因的表达分析表明,*AP*2 在花瓣中表达丰度最高[28] ; 而宿红艳等[27] 对草莓(*Fragaria* × *ananassa* Duch.) 的研究显示,*AP*2 基因在花瓣中的表达丰度最低,而花芽最高。这种差异可能是由于种间差异或研究材料所处的发育时期不同造成的,或者本来就是这个多基因家族不同功能基因间的差异。本研究以旺盛营养生长期的毛竹实生幼苗为材料,实时定量 PCR 证实 *PeAP*2 为组成型表达,表明 *PeAP*2 作为转录因子可能在毛竹的整个生长发育过程中均具有一定的调节作用。

真核基因的 5′端上游区域包含有启动子和众多顺式作用元件,它是基因转录起始的重要调控区域,决定着基因表达的时期、位置以及表达的程度,它对植物的作用甚至比基因本身都重要。TAIL-PCR 末端克隆是获取 DNA 未知序列最经典的方法,利用改良的 TAIL-PCR 方法[19] 克隆获得了 1 359 bp 的 *PeAP*2 基因的上游调控序列,分析显示该序列具有明显的启动子结构特征。顺式作用元件分析显示其有许多与光、激素等信号应答相关的元件,表明 *PeAP*2 的表达可能受到光、激素等因子的调节。组织特异表达分析显示,*PeAP*2 在叶片和叶鞘等绿色组织中表达丰度均较高,这意味着该基因在绿色组织发育过程中可能扮演着光、激素等信号的调节角色。

参考文献:

[1] Keck E, McSteen P, Carpenter R, *et al*. Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers [J]. Embo Journal, 2003, 22(5): 1058-1066

[2] Dubouzet J, Sakuma Y, Ito Y, *et al*. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt and cold-responsive gene expression [J]. Plant Journal, 2003, 33(4): 751-763

[3] Kunst L, Klenz J E, Martinez-Zapater J, *et al*. *AP*2 gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 1989, 1(12): 1195-1208

[4] Nilsson L, Carlsbecker A, Sundås-Larsson A, *et al*. *APETALA*2 like genes from *Picea abies* show functional similarities to their *Arabidopsis homologues* [J]. Planta, 2007, 225(3): 589-602

[5] Ohto M, Fischer R L, Goldberg R B, *et al*. Control of seed mass by *APETALA*2 [J]. PNAS, 2005, 102(8): 3123-3128

[6] Jofuku K D, Omidyar P K, Gee Z, *et al*. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA*2 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(8): 3117-3122

[7] Schmid M, Uhlenhaut N H, Godard F, *et al*. Dissection of floral induction pathways using global expression analysis [J]. Development, 2003, 130(24): 6001-6012

[8] Aida M, Beis D, Heidstra R, *et al*. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche [J]. Cell, 2004, 119(1): 109-120

[9] 江泽慧. 竹类植物基因组学研究进展 [J]. 林业科学, 2012, 48(1): 159-166

[10] Lin E P, Peng H Z, Jin Q Y, *et al*. Identification and characterization of two bamboo (*Phyllostachys praecox*) *AP*1/*SQUA*-like MADS-box genes during floral transition [J]. Planta, 2009, 231(1): 109-120

[11] 高志民, 郑　波, 彭镇华. 毛竹 *PeMADS*1 基因的克隆及转化拟南芥初步研究 [J]. 林业科学, 2010, 46(10): 37-41

[12] 刘志伟, 张智俊, 杨　丽. 毛竹抗逆锌指蛋白基因 cDNA 克隆与序列分析 [J]. 生物技术通讯, 2010(1): 87-92

[13] Gao Z M, Li X P, Li L L, *et al*. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. Chinese Forestry Science and Technology, 2006, 5(3): 52-54

[14] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein [J]. Journal of Molecular Biology, 1982, 157: 105-132

[15] Deleage G, Blanchet C, Geourjon C. Protein structure prediction. Implications for the biologist [J]. Biochimie, 1997, 79(11): 681-686

[16] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al*. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201

[17] 高志民, 彭镇华, 李雪平, 等. 毛竹苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及组织特异性表达分析 [J]. 林业科学研究, 2009, 22(3): 449-453

[18] Livak K J, Schmittgen D T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J].

Methods, 2001, 25(4): 402 – 408

[19] Liu Y, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. MedSci Entry for Biotechniques, 2007, 43(5): 649 – 650, 652, 654

[20] Lescot M, Dehais P, Thijs G, *et al*. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325 – 327

[21] Guardiani C, Livi R, Cecconi F. Coarse grained modeling and approaches to protein folding [J]. Current Bioinformatics, 2010, 5(3): 217 – 240

[22] Nole-Wilson S, Krizek B A. DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(21): 4076 – 4082

[23] Chelsky D, Ralph R, Jonak G. Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus [J]. Molecular and Cellular Biology, 1989, 9(6): 2478 – 2492

[24] Mlotshwa S, Yang Z, Kim Y, *et al*. Floral patterning defects induced by *Arabidopsis APETALA*2 and microRNA172 expression in *Nicotiana benthamiana* [J]. Plant Molecular Biology, 2006, 61(4 – 5): 781 – 793

[25] Chen X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA*2 in *Arabidopsis* flower development [J]. Science, 2004, 303(5666): 2022 – 2025

[26] Gil-Humanes J, Pistón F, Martín A, *et al*. Comparative genomic analysis and expression of the *APETALA*2-like genes from barley, wheat, and barley-wheat amphiploids [J]. BMC Plant Biology, 2009, 9: 66

[27] 宿红艳，周盛梅，王 磊，等. 草莓 *APETALA*2 同源基因的克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报，2005，25(10): 1937 – 1942

[28] 任 磊，王 雁，周 琳，等. 牡丹 *PsAP*2 基因的克隆及表达 [J]. 林业科学，2011，47(9): 50 – 56

[29] 张 妍，刘 瀛，孙丰宾，等. 白桦 *APETAL*2(*AP*2) 转录因子基因的分离及其表达 [J]. 林业科学研究，2012，25(2): 254 – 260