

## 荷花*LEAFY*基因的克隆及表达分析

刘艺平<sup>1</sup>, 董姬秀<sup>1</sup>, 张曼<sup>1</sup>, 李创<sup>2</sup>, 李娜<sup>1</sup>, 孔德政<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>河南农业大学林学院, 郑州450002; <sup>2</sup>河南新郑南龙湖宜居教育园区管理委员会市政建设环保局, 河南新郑451100

**摘要:** *LEAFY* (*LFY*)基因是花分生组织形成的必需基因, 在成花过程中发挥重要作用。本研究以荷花品种‘红霞满天’为材料, 利用已经获得的荷花*LFY*基因片段, 采用RT-PCR和RACE技术克隆得到荷花*LFY*基因cDNA序列, 命名为*NnLFY*。*NnLFY*全长cDNA为1 494 bp, 开放阅读框(ORF)为1 173 bp, 编码390个氨基酸, 预测其相对分子量为44 517.1 Da。与其他物种已知的*LFY*基因序列进行同源性对比分析并构建系统进化树, 结果显示荷花*LFY*基因与甜瓜*LFY*基因的亲缘关系最近。实时荧光定量PCR结果表明, *LFY*基因在荷花幼叶期、花蕾期、盛花期的根、茎、叶、花中均有表达, 其中, 花蕾期各器官的表达量较高。

**关键词:** 荷花; *LFY*基因; 实时荧光定量PCR

## Cloning and Expression Analysis of a *LEAFY* Gene From Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)

LIU Yi-Ping<sup>1</sup>, DONG Ji-Xiu<sup>1</sup>, ZHANG Man<sup>1</sup>, LI Chuang<sup>2</sup>, LI Na<sup>1</sup>, KONG De-Zheng<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; <sup>2</sup>Xinzheng Nanlong Lake Habitable Education Park Management Committee, Municipal Construction Environmental Protection Bureau, Xinzheng, Henan 451100, China

**Abstract:** *LEAFY* (*LFY*) genes are a class of inflorescence meristem identity gene which play important roles in the process of flowering. In this study, a homologue of *LFY*, designated *NnLFY*, was isolated from *Nelumbo nucifera* ‘Hongxiamantian’ by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The cDNA sequence of *NnLFY* was 1 494 bp long and contained an open reading frame (ORF) of 1 173 bp encoding a protein of 390 amino acids. Its molecular mass was 44 517.1 Da. The *NnLFY* shared highest homology with the *LFY* from melon according to the homology and phylogenetic analyses of the relationship of *NnLFY* with some known *LFY* genes from other plants. Real-time quantitative PCR analysis indicated that the *NnLFY* was ubiquitously expressed in the root, stem, leaf and flower in the different periods and the highest expression was detected in the bud period.

**Key words:** lotus; *LFY*; real-time quantitative PCR

*LEAFY* (*LFY*)基因是控制花分生组织形成的基因, 在有花和无花植物中都存在, 是决定花分生组织形成的必需基因, 在成花过程中还发挥接连许多花诱导途径的输出信号(Mouradov等2002; Amasino 2004)和激活花器官决定基因ABC的关键基因。*LFY*基因的首要作用是协同其他成花相关基因抑制分生组织细胞向营养生长转变, Coen和Meyerowitz (1991)研究发现, 花转变前*LFY*表达于叶原基, 但当*LFY*的表达量达到一定的阈值时, 则起抑制叶原基启动的作用, 从而有助于更多的分生组织细胞用于形成花原基。在植物成花转变中, *LFY*基因还参与花分生组织的形成。它维持花分生组织的正常功能(Shannon和Meeks-Wagner 1993)、花启动(Mandel和Yanofsky 1995)、防止花分生组

织的逆转(Mizukami和Ma 1997)。另外, *LFY*基因还参与花分生组织的进一步发育, 在成花中不仅调控开花时间(邵寒霜等1999)和成花转变, 而且参与花序和花发育的各个阶段。*LFY*的超量表达导致植物枝条向花的转变, 促使植株提早开花(Coupland 1995)。

荷花系睡莲科莲属的多年生水生草本花卉, 是重要的水生观赏植物及经济作物。目前, 已经有研究者从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Weigel等1992)、银杏(*Ginkgo biloba*) (张建业等2002)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*) (崔波等2012)、荔枝

收稿 2013-09-22 修定 2013-11-21

资助 河南省重点科技攻关项目(072102150001)。

\* 通讯作者(E-mail: kzxy303@163.com; Tel: 0371-63558303)。

(*Litchi chinensis*) (李宁等2013)等植物中克隆出了 *LFY* 的全长基因, 但有关荷花 *LFY* 基因的研究尚未见报道。本文采用RT-PCR和RACE技术, 拼接得到荷花 *LFY* 基因cDNA全长, 并就荷花不同时期、不同部位的 *LFY* 基因表达量进行了实时荧光定量PCR分析, 为该基因的深入研究提供了基础。

## 材料与方法

### 1 实验材料与试剂

供试材料为荷花的小型品种碗莲‘红霞满天’ (*Nelumbo nucifera* Gaertn. ‘Hongxiamantian’), 由河南农业大学园林植物生物技术实验室保存。分别取幼叶期、花蕾期、盛花期的根、茎、叶、花, 用去离子水冲洗干净, 液氮处理后放于-80℃冰箱中保存。

cDNA第一链合成试剂盒(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit)购于Fermentas公司; 5'-RACE试剂盒(SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit)购自大连宝生物有限公司(TaKaRa); RT-PCR试剂盒(Power 2×SYBR Real-time PCR Premixture)购于BioTeke公司; 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购于天根生化科技有限公司; *Taq*酶、DL 1000和DL 2000 DNA marker购于大连宝生物有限公司(TaKaRa); 大肠杆菌DH5α菌株由本实验室保存; 克隆载体pUCm-T购于生工生物工程(上海)有限公司; 引物合成与测序均由生工生物工程(上海)有限公司完成。

### 2 试验方法

#### 2.1 总RNA的提取与纯化

荷花总RNA的提取采用改良的CTAB法(杨峰

等2009), 用紫外可见分光光度计测定 $A_{260}/A_{280}$ 、 $A_{260}/A_{230}$ 及RNA的浓度, 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 在Alpha Imager PE型凝胶成像系统(购于美国Alpha Innotech公司)上观察拍照。

#### 2.2 *LFY*基因cDNA全长序列的克隆

采用已得到的荷花 *LFY* 基因保守区的cDNA片段(GenBank登录号为HQ328497.1), 设计3'-RACE引物LP-F1、LP-F2和5'-RACE引物LP-R1、LP-R2 (表1), 下游引物分别为B26 (5' GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3')和UPM (5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGTATCAACGCAGAGT 3')。分别按照RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas公司)和SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Contech公司)说明书合成3'-RACE-Ready cDNA和5'-RACE模板cDNA。

PCR扩增的反应体系为20 μL, 反应结束后进行电泳, 用凝胶成像仪拍照。目的片段回收纯化后与pUCm-T载体连接, 转入大肠杆菌DH5α感受态细胞, 经过PCR扩增, 挑选含有目的片段的菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序。根据拼接全长序列设计开放阅读框(ORF)的核苷酸引物LFY-F (ORF)和LFY-R (ORF)(表1)。

#### 2.3 荷花 *LFY* 序列的生物信息学分析

利用DNAMAN等软件对得到的5'-端片段、中间片段和3'-RACE片段进行拼接, 分析氨基酸序列同源性, 并构建系统进化树; 采用NCBI数据库中的BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析ORF; 氨基酸的推断利用Primer 5.0软件; 用ProtParam

表1 荷花 *LFY* 基因克隆和表达分析所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in gene cloning and expression analyses of *N. nucifera LFY*

用途	引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度及时间
3'-RACE扩增	LP-F1	GCCGAAGATGCGACACTA	52℃退火30 s
	LP-F2	GTATCAATGGCAGCACGAC	
5'-RACE扩增	LP-R1	TTCATCCAGGCAATGCAGC	55℃退火30 s
	LP-R2	CAGATGGAATAGATAATCAAGCCCGT	
验证cDNA全长	LFY-F (ORF)	ATGGATCCTGAAGCTTTCACCGCAAGCTTGTTT	56℃退火30 s
	LFY-R (ORF)	TTAGAAGGTAGAGGGGGGAGCGATGGTAGC	
扩增内参	F-18S	CCATAAACGATGCCGAC	55℃退火20 s
	R-18S	CACCACCCATAGAATCAAGA	
检验 <i>LFY</i> 表达	LFY-F1	TGGTATCAATGGCAGCAC	55℃退火20 s
	LFY-R1	GAGCAGGCAGAAGCAGA	

(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析LFY蛋白的理化性质; 将LFY基因推测的氨基酸序列在NCBI网站上进行CDD (Conserved Domain Database) 搜索; 用DNAMAN 6.0预测荷花LFY蛋白的二级结构。

#### 2.4 LFY的表达分析

将提取的荷RNA反转录成cDNA。以LFY的cDNA为模板, 设计RT-PCR引物。用荷花的18S rRNA基因作为内参基因, 扩增引物为R-18S和F-18S。根据荷花LFY基因序列设计特异性引物, 上下游引物分别为LFY-F1和LFY-R1。以cDNA为模板进行PCR扩增, 扩增程序根据BioTeke公司的Power 2×SYBR Real-time PCR Premixture试剂盒说明书进行。采用iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System和配套软件对样品cDNA进行相对定量分析, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 3次重复。

### 实验结果

#### 1 LFY基因cDNA的ORF扩增

LFY基因保守区经3'-RACE和5'-RACE扩增分别得到435和837 bp的核苷酸序列(图1)。测序结果表明, 3'-端和5'-端序列均与已知荷花LFY基因保守区的测序结果有重叠, 3'-端包含一个23个A的多聚腺苷(polyA)尾巴。利用DNAMAN软件将已得到的LFY基因保守区3'-RACE和5'-RACE的cDNA序列和保守区序列进行拼接, 得到荷花LFY基因cDNA的全长序列, 共1 494 bp, GenBank登录号为KC202819.1。根据拼接全长序列设计引物, 进行

PCR扩增(图1), 测序结果表明拼接序列正确。测序并分析荷花LFY基因cDNA序列的结果表明, 其ORF有1 173 bp, 5'-端非编码区为69 bp, 3'-端非编码区为252 bp, 起始密码子为ATG, 终止密码子为TAA。NCBI网站的BLAST工具搜索显示, 该序列与豌豆、核桃、芒果等植物LFY基因的相似性在90%以上。

#### 2 LFY基因编码产物的同源性分析

将荷花LFY基因和番茄(*Solanum lycopersicum*; AAF66099)、核桃(*Juglans regia*; ACZ48701)、甜瓜(*Cucumis melo*; FJ971628)、甘菊(*Chrysanthemum lavandulifolium*; AAT51708)、香睡莲(*Nymphaea odorata*; AAF77609)、百合(*Lilium longiflorum*; ABR13015)、水稻(*Oryza sativa*; BAA21547)等植物的LFY基因推测的氨基酸序列进行同源性比较(图2), 结果表明, 在氨基酸水平上荷花LFY与草本植物有很高的一致性, 与甜瓜的最高(82%), 与水稻的最低(56%)。从系统进化树可以看出, 荷花LFY基因与甜瓜LFY基因的亲缘关系最近, 与番茄和甘菊的较近, 与水稻的最远(图3)。

#### 3 LFY基因编码蛋白质的结构与功能预测

将LFY基因编码的氨基酸序列在NCBI网站上进行CDD搜索的结果显示, 该蛋白属于FLO\_LFY基因家族, 为LFY基因翻译合成的蛋白。分析荷花LFY基因的全长cDNA序列表明, 它共编码390个氨基酸, 通过ProtParam预测其相对分子量为44 517.1 Da, 分子式为 $C_{1946}H_{3041}N_{595}O_{577}S_{16}$ , 此蛋白由20种氨基酸组成, 其中含量最丰富的氨基酸为Arg (10.8%),

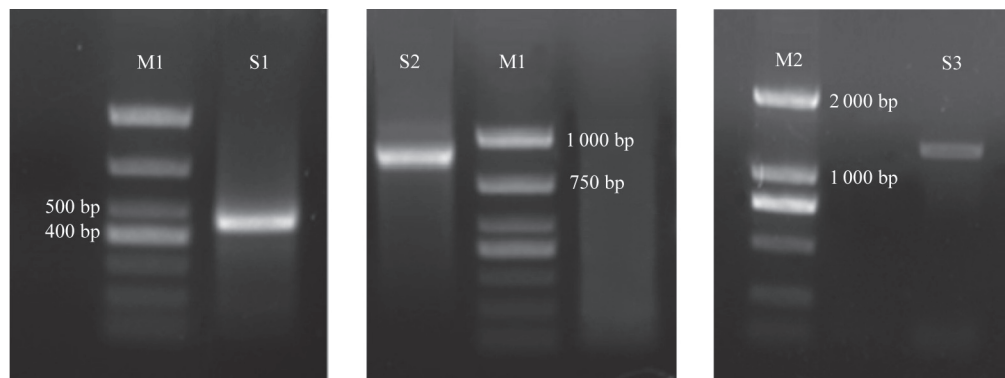


图1 荷花LFY的电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis pattern of *N. nucifera* LFY

S1: 3'-RACE扩增产物; S2: 5'-RACE扩增产物; S3: LFY的ORF扩增产物; M1: DL 1000 DNA marker; M2: DL 2000 DNA marker。

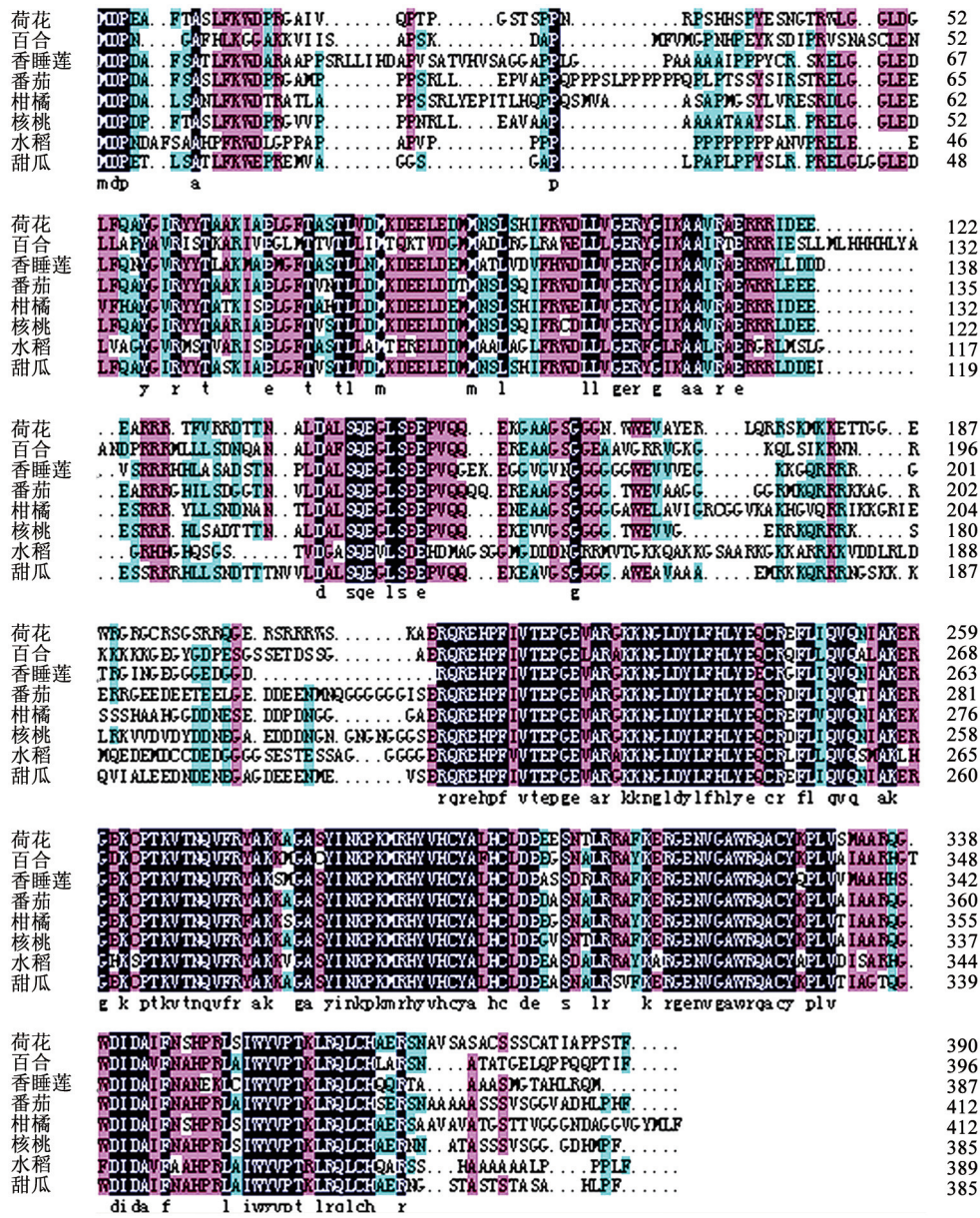


图2 不同植物LFY基因推测的氨基酸序列的多重序列比对分析

Fig.2 Multiple alignment of predicted amino acid sequences of LFY genes from different plants

其次是Ala (9.2%), 带负电氨基酸总和(Asp+Glu)为48, 带正电氨基酸总和(Arg+Lys)为63。用DNAMAN预测荷花LFY蛋白二级结构(图4)的结果表明, 该蛋白的二级构象中, 螺旋结构、折叠结构和线装结构交替出现, 以螺旋结构最多, 占50.00%, 其次是折叠结构, 占41.79%, 线状结构最少, 占8.21%。

#### 4 荷花不同时期不同部位中LFY基因的表达分析

实时荧光定量PCR分析的结果表明, 荷花中

的LFY基因在幼叶期、花蕾期、盛花期的根、茎、叶、花中均有表达(图5), 说明根、茎、叶及花器官的生长发育都需要LFY的存在。由图5可见, 在幼叶期根、茎、叶中LFY的表达量差异不大; 进入花蕾期后, 处于花序分化阶段, 根中的表达量稍有减少, 花中的表达量最高; 在盛花期, LFY表达量较幼叶期和花蕾期有所减少, 其中花中的表达量下降最明显。LFY基因在荷花花蕾期表达量达到最高, 这可能与荷花花序分化有关。

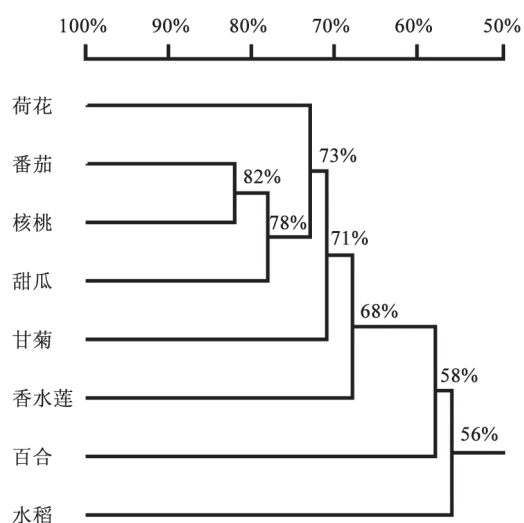


图3 不同植物LFY基因的系统进化分析  
Fig.3 Phylogenetic analysis of LFY genes from different plants

## 讨 论

已有研究表明, 在拟南芥中, *LFY*的mRNA长1.6 kb (Weigel等1992), 所编码蛋白质在GenBank中只找到一个同源基因*FLO*, *LFY*不属于目前已知的任何一个基因家族(马月萍等2005)。本试验克隆得到的荷花*LFY*基因cDNA序列全长为1494 bp, 所编码的蛋白包含390个氨基酸, 属于*FLO\_LFY*基因家族。

在不同植物中, *LFY*基因的表达在时间和空间上有差异。王利琳等(2004)的研究表明, *LFY*基因在拟南芥开花转换前的叶原基以及整个营养发育阶段均有表达, *LFY*基因的表达使拟南芥所有侧梢转变成单花芽, 从而诱导植株提早开花。*LFY*的过量表达对花的结构无本质上的影响, 但导致枝条

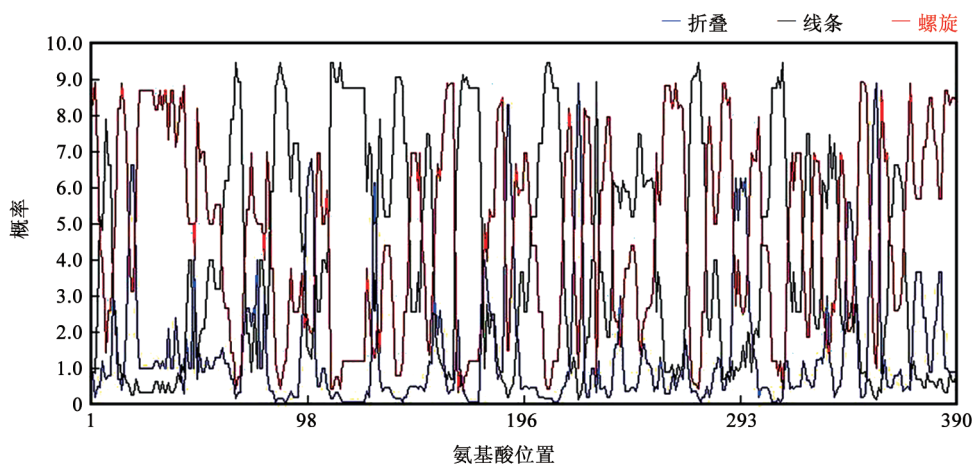


图4 荷花LFY蛋白序列的二级结构预测

Fig.4 Prediction of second structure for sequence protein of lotus

蓝色、黑色、红色线条分别表示这段氨基酸序列形成的折叠结构、线条结构、螺旋结构。

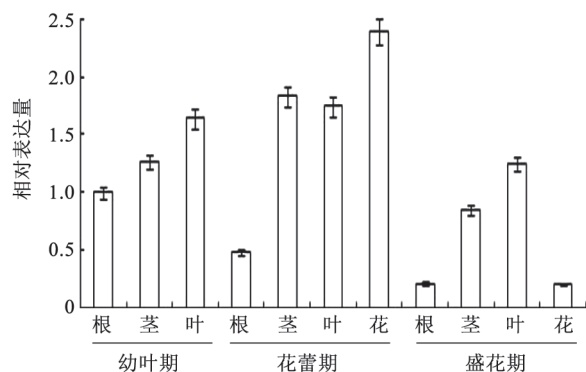


图5 不同时期荷花不同部位LFY基因的相对表达量  
Fig.5 The relative expression levels of LFY gene during different periods in different parts of *N. nucifera*

转变成花, 从而使植株提早开花。Blazquez等(1997)研究发现, *LFY*基因在营养生长阶段表达较弱, 在花芽分化启动后表达增强, 在花分生组织中表达最强。在核桃中, *JrLFY*基因在芽、雄花序和雌花序中的表达量最高, 嫩茎中的表达次之, 而叶中表达量最少(何富强2011)。

目前, *LFY*同源基因已从多种植物中克隆并进行了表达分析。例如, *ELF1*在拟南芥中的过量表达使茎间分生组织转变为花分生组织(Southern等1998)。GinNdy和Ginlfy基因是从银杏中克隆出来的*LFY*同源基因, 它们在银杏雌花芽和雄花芽中都有强烈的表达(郭长禄等2005)。曹秋芬等(2003)

从‘红玉’苹果顶芽中克隆得到2个*LFY*同源基因*AFL1*和*AFL2*, *AFL2*在萼片、子房、根、茎、叶及果枝中都有表达, *AFL1*只在枝条顶芽中表达。马月萍等(2004)在甘菊中克隆得到*LFY*同源基因*DFL*, 在甘菊成花至发育成熟的整个过程均有不同程度的表达。以上结果表明, *LFY*基因的表达可促进植物开花, *LFY*同源基因在不同植物中的功能相近(吕玲玲等2011)。因此, 对荷花*LFY*基因以及其他成花相关基因的克隆及研究, 将为荷花花期调控以及成花机理的揭示提供一定的理论基础。

### 参考文献

- 曹秋芬, 和田雅人, 孟玉平, 黄静, 孙毅, 王果萍(2003). 苹果*LEAFY*同源基因的cDNA克隆与表达分析. 园艺学报, 30 (3): 267~271
- 崔波, 牛苏燕, 蒋素华, 武思, 王默菲, 叶永忠(2012). 蝴蝶兰*LFY*基因克隆及高效植物表达载体的构建. 生物技术通报, (2): 65~68
- 郭长禄, 陈力耕, 何新华, 戴正, 袁海英(2005). 银杏*LEAFY*同源基因的时空表达. 遗传, 27 (2): 241~244
- 何富强(2011). 核桃*LFY*同源基因的克隆和表达[学位论文]. 保定: 河北农业大学
- 李宁, 陈厚彬, 张昭其, 胡志群, 周碧燕(2013). 荔枝*LEAFY*同源基因克隆及表达分析. 华南农业大学学报, 34 (1): 57~61
- 吕玲玲, 孙光明, 刘玉革, 魏长宾, 刘胜辉, 段俊(2011). *LEAFY*同源基因研究进展. 西北植物学报, 31 (1): 197~203
- 马月萍, 陈凡, 戴思兰(2005). 植物*LEAFY*同源基因的研究进展. 植物学通报, 22 (5): 605~613
- 马月萍, 方晓华, 申业, 陈凡, 戴思兰(2004). 植物开花基因新资源: 甘菊中花分生组织决定基因*DFL*. 分子植物育种, 2 (4): 597~599
- 邵寒霜, 李继红, 郑学勤, 陈守才(1999). 拟南芥*LFY* cDNA的克隆及转化菊花的研究. 植物学报, 41 (3): 268~271
- 王利琳, 梁海曼, 庞基良, 朱睦元(2004). 拟南芥*LEAFY*基因的花发育中的网络调控及其生物学功能. 遗传, 26 (1): 137~142
- 杨峰, 李创, 刘艺平, 何明珍, 孔德政(2009). 荷花花瓣总RNA的提取方法. 河南科学, 27 (10): 1226~1228
- 张建业, 陈力耕, 胡西琴, 何新华(2002). 银杏*LEAFY*同源基因的分离克隆. 林业科学, 38 (4): 167~170
- Amasino R (2004). Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell*, 16 (10): 2553~2559
- Blazquez MA, Soowal LN, Lee L, Weigel D (1997). *LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development*, 124: 3835~3844
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991). The war of the whorls: genetic interaction controlling flower development. *Nature*, 353: 31~37
- Coupland G (1995). *LEAFY* blooms in aspen. *Nature*, 377: 482~483
- Mandel MA, Yanofsky MF (1995). A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature*, 377: 522~524
- Mizukami Y, Ma H (1997). Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by *AGAMOUS*. *Plant Cell*, 9: 393~408
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G (2002). Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 14: S111~S130
- Shannon S, Meeks-Wagner DR (1993). Genetic interaction that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 5: 639~655
- Southorton SG, Strauss SH, Olive MR, Harcourt RL, Decroocq V, Zhu X, Llewellyn DJ, Peacock WJ, Dennis ES (1998). Eucalyptus has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*. *Plant Mol Biol*, 37: 897~910
- Weigel D, Alvarez D, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1992). *LFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 69: 843~859