

学校代码: 10589



学号: 17071010210016

分类号: _____

密级: _____

海南大学

硕士学位论文

题目: 木薯 MeAHL31 转录因子与 MeCWINV1 启动子的互作分析及功能研究

作者: 王元元

指导教师: 胡新文教授 郭建春研究员

专业: 生物化学与分子生物学

时间: 二〇二〇年六月

**Interaction Analysis and
Functional Study of Cassava
MeAHL31 Transcription Factor
and MeCWINV1 Promoter**

A Thesis

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Master Degree in Economics

By

Wang Yuanyuan

Supervisor: Hu Xin-wen; Guo Jian-chun

Major: Biochemistry and Molecular Biology

Submitted time : June; 2020

摘要

AT-hook 转录因子家族在植物生长发育、器官形成、激素信号应答以及逆境胁迫等方面发挥重要的调控作用。本课题组前期以木薯细胞壁转化酶基因 *MeCWINV6* 启动子为诱饵，从木薯酵母单杂交文库中筛选到一个 AT-hook 转录因子家族基因 *MeAHL31* (GenBank No. MH559128)，*MeAHL31* 能与 *MeCWINV6* 启动子结合并上调其活性。生物信息学分析发现负责木薯源库器官物质转运最关键的另外一个细胞壁转化酶基因 *MeCWINV1* 启动子上也存在 AT-hook 转录因子结合的潜在顺式作用元件 AT1-motif。为了验证 *MeAHL31* 能否与 *MeCWINV1* 启动子发生结合，并解析它们之间的调控作用和生物学功能，本论文首先对 *MeAHL31* 的转录活性、亚细胞定位等进行分析；接着利用酵母单杂交实验、凝胶迁移滞后(EMSA)实验和双荧光素酶实验探究 *MeAHL31* 与 *MeCWINV1* 启动子的结合作用；构建 *MeAHL31* 基因的植物表达载体，通过农杆菌介导遗传转化木薯和拟南芥，获得 *MeAHL31* 过量表达的转基因株系并进行表型观察和功能研究。

具体结果如下：

1. *MeAHL31* 转录活性的鉴定：通过酵母双杂交技术(Y2H)鉴定 *MeAHL31* 转录激活活性，结果在实验水平证明 *MeAHL31* 作为一个转录因子具有转录激活活性。

2. *MeAHL31* 的亚细胞定位分析：烟草亚细胞定位实验结果表明 *MeAHL31* 在烟草叶片细胞的细胞质、细胞膜和细胞核中均有分布。

3. *MeAHL31* 蛋白的原核表达：将构建的 pET28a-MBP-*MeAHL31* 重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中，通过对其表达条件的不断优化最终获得 *MeAHL31* 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的最佳诱导表达条件：OD₆₀₀ = 0.6, IPTG 浓度为 1.0 mmol / L, 在 15°C 下培养 16h, 再用试剂盒纯化获得所需的 *MeAHL31* 蛋白。

4. *MeAHL31* 转录因子与 *MeCWINV1* 启动子的互作分析：(1)通过酵母单杂交技术(Y1H)验证了 *MeAHL31* 和 *MeCWINV1* 启动子可在体内结合。(2)凝胶迁移滞后试验(EMSA)证实 *MeAHL31* 和 *MeCWINV1* 基因启动子可在体外结合。(3)双荧光素酶实验证实植物体内 *MeAHL31* 不仅可以结合 *MeCWINV1* 启动子，而且可以上调 *MeCWINV1* 启动子的活性。

5. *MeAHL31* 可正向调控 *MeCWINV1* 基因的表达：利用农杆菌介导的转化方法侵染木薯华南 8 号(SC8)脆性愈伤，然后通过本实验室成熟的木薯遗传转化体系获得 *MeAHL31* 过表达木薯转基因株系。通过 DNA 水平和 RNA 水平检测鉴定转基因阳性株系。对不同阳性转基因株系进行 qRT-PCR 发现基因 *MeAHL31* 和 *MeCWINV1* 的表达水平较对照组显著上调，证明 *MeAHL31* 可正向调控 *MeCWINV1* 基因的表达。

6. *MeAHL31* 在拟南芥中功能研究：通过真空侵染和浸没法对拟南芥进行遗传转

化，筛选和鉴定拟南芥 *MeAHL31* 过表达转基因株系。拟南芥 *MeAHL31* 过表达株系进行 qRT-PCR 分析发现：不同转基因株系 *MeAHL31* 和 *MeCWINV1* 的表达水平较对照组显著上调，证明 *MeAHL31* 可正向调控 *MeCWINV1* 基因的表达。转基因拟南芥中细胞壁转化酶活性显著上升，表明转基因拟南芥可积累足够糖分应对外界环境的变化，更好的适应环境胁迫影响。

7. *MeAHL31* 过表达转基因拟南芥表型观察及分子水平鉴定：(1)观察转基因拟南芥的表型发现：转基因拟南芥表现出早花，下胚轴伸长以及主根伸长；其叶型和数量、花粉和种子活力以及果荚形状和数量没有表现出差异。(2)通过对开花、光周期、下胚轴以及主根生长等相关基因表达分析推测：*MeAHL31* 正调节了基因 *CO*、*FT* 和 *FLC* 的表达，进而提早了拟南芥的开花时间；基因 *PIF3* 和 *PIF4* 表达水平上调，使转基因株系下胚轴伸长；上调基因 *IAA1*、*E2FC* 和 *E2FF* 表达可使主根伸长，其具体的分子机理还需进一步的研究证明。

关键词： *MeAHL31*； *MeCWINV1*； 转录因子； 互作； 功能研究

ABSTRACT

The AT-hook transcription factor family plays an important role in regulating plant growth and development, organ formation, hormone signal response, and stress. In the early stage of this research group, the *MeCWINV6* promoter of the cassava cell wall invertase gene was used as a bait and an AT-hook transcription factor family gene *MeAHL31* (GenBank No. MH559128) was selected from the single-hybrid library of cassava yeast. *MeAHL31* can bind to *MeCWINV6* promoter and upregulate its activity. Bioinformatics analysis found that the potential cis-acting element AT1-motif, which is bound by AT-hook transcription factor, also exists on the *MeCWINV1* promoter, another cell wall invertase gene that is most critical for the transport of cassava source-sink organs. In order to verify whether *MeAHL31* can bind to the *MeCWINV1* promoter, and to analyze the regulatory and biological functions between them, this paper first analyzes the transcriptional activity and subcellular localization of *MeAHL31*; then, yeast single hybridization experiments and gels are used. Migration lagging (EMSA) experiment and dual luciferase experiment to explore the binding effect of *MeAHL31* and *MeCWINV1* promoter; constructing plant expression vector of *MeAHL31* gene, through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of cassava and *Arabidopsis* to obtain transgenic plants overexpressing *MeAHL31* and conduct phenotypic observation and functional research.

The specific results are as follows:

1. Identification of *MeAHL31* transcriptional activity: The yeast two-hybrid technology (Y2H) was used to identify *MeAHL31* transcriptional activation activity. The results demonstrated at an experimental level that *MeAHL31* has transcriptional activation activity as a transcription factor.

2. Subcellular localization analysis of *MeAHL31*: The results of tobacco subcellular localization experiments show that *MeAHL31* is distributed in the cytoplasm, cell membrane and nucleus of tobacco leaf cells.

3. Prokaryotic expression of *MeAHL31* protein: the constructed pET28a-MBP-*MeAHL31* recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and the optimal induction of *MeAHL31* protein in *E. coli* BL21 (DE3) was finally obtained through continuous optimization of its expression conditions. Expression conditions: OD₆₀₀ = 0.6, IPTG concentration 1.0 mmol / L, cultured at 15 ° C for 16h, and then purified with the kit to obtain the desired *MeAHL31* protein.

4. Interaction analysis of *MeAHL31* transcription factor and *MeCWINV1* promoter: (1) The yeast one-hybrid technique (Y1H) verified that *MeAHL31* and *MeCWINV1* promoters can bind *in vivo*. (2) The gel migration lag test (EMSA) confirmed that *MeAHL31* and *MeCWINV1* gene promoters can be combined *in vitro*. (3) Double luciferase experiments

confirmed that *MeAHL31* can not only bind *MeCWINV1* promoter in plants, but also upregulate the activity of *MeCWINV1* promoter.

5.*MeAHL31* can positively regulate the expression of *MeCWINV1* gene: use Agrobacterium-mediated transformation method to infect the fragile callus of cassava Huanan 8 (SC8), and then obtain the *MeAHL31* overexpressed cassava transgene through the mature cassava genetic transformation system Strains. Identify transgenic positive lines by DNA level and RNA level detection. By performing qRT-PCR on different positive transgenic lines, the expression levels of *MeAHL31* and *MeCWINV1* were significantly up-regulated compared with the control group, proving that *MeAHL31* can positively regulate the expression of *MeCWINV1* gene.

6.*MeAHL31* function in *Arabidopsis thaliana*: Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration and immersion method, screening and identification of *Arabidopsis MeAHL31* overexpression transgenic lines. The qRT-PCR analysis of *Arabidopsis MeAHL31* overexpression lines revealed that the expression levels of different transgenic lines *MeAHL31* and *MeCWINV1* were significantly up-regulated compared with the control group, proving that *MeAHL31* can positively regulate the expression of *MeCWINV1* gene. The activity of cell wall invertase in transgenic *Arabidopsis* increased significantly, indicating that transgenic *Arabidopsis* can accumulate enough sugar to cope with changes in the external environment and better adapt to environmental stress.

7.*MeAHL31* overexpression transgenic *Arabidopsis* phenotype observation and molecular level identification: (1) observation of transgenic *Arabidopsis* phenotype found: transgenic *Arabidopsis* showed early flowering, hypocotyl elongation and main root elongation; There was no difference in leaf type and quantity, pollen and seed vigor, and pod shape and quantity. (2) Through the analysis of the expression of related genes such as flowering, photoperiod, hypocotyl and main root growth, it is speculated that *MeAHL31* is positively regulating the expression of the genes *CO*, *FT* and *FLC*, and thus earlier the flowering time of *Arabidopsis*; genes *PIF3* and *PIF4* The up-regulated expression level makes the hypocotyls of the transgenic lines elongate; the up-regulated genes *IAAI*, *E2FC* and *E2FF* can make the main roots elongate, and the specific molecular mechanism needs further research to prove.

Keywords: *MeAHL31*; *MeCWINV1*; Transcription factor; Interaction; Functional study

目录

1.引言.....	1
1.1 转录因子最新研究进展.....	1
1.1.1 转录因子结构特征.....	1
1.1.2 转录因子分类.....	1
1.1.3 AT-hook 转录因子研究进展.....	2
1.2 植物转化酶最新研究进展.....	6
1.2.1 细胞壁转化酶生理功能.....	7
1.3 启动子的研究进展.....	8
1.3.1 启动子的结构特征.....	8
1.3.2 启动子的特性.....	9
1.3.3 启动子的分类.....	9
1.4 研究的目的及意义.....	10
1.5 技术路线.....	11
2 实验材料与方法.....	12
2.1 实验材料与试剂.....	12
2.1.1 实验材料.....	12
2.1.2 菌株和载体.....	12
2.1.3 主要酶和试剂.....	13
2.1.4 实验相关试剂和培养基配制方法.....	13
2.2 实验方法.....	15
2.2.1 转录激活实验.....	15
2.2.2 <i>MeAHL31</i> 的亚细胞定位.....	16
2.2.3 <i>MeAHL31</i> 蛋白的原核表达和纯化.....	17
2.2.4 烟草瞬时表达和亚细胞定位观察.....	18
2.2.5 酵母单杂交验证 <i>MeAHL31</i> 与 <i>MeCWINV1</i> 启动子结合.....	18
2.2.6 酵母单杂交验证 <i>MeAHL31</i> 与 <i>MeCWINV1</i> 启动子结合.....	19
2.2.7 凝胶迁移滞后实验 (EMSA).....	19
2.2.8 双荧光素酶实验.....	20
2.2.9 SC8 木薯的遗传转化.....	21
2.2.10 转基因木薯的鉴定.....	21
2.2.11 转基因木薯中基因的表达分析.....	22
2.2.12 转基因木薯中基因的 Real-Time qPCR 分析.....	23
2.2.13 拟南芥的转化.....	23
2.2.14 转基因拟南芥抗性筛选和移栽.....	23
2.2.15 转基因拟南芥的鉴定.....	24
2.2.16 转基因拟南芥表型观察及基因表达分析.....	24
3 结果与分析.....	25
3.1 <i>MeAHL31</i> 转录活性鉴定.....	25
3.2 <i>MeAHL31</i> 的亚细胞定位观察.....	26
3.2.1 pCAMBIA1300- <i>MeAHL31</i> -GFP 植物表达载体的构建.....	26
3.2.2 <i>MeAHL31</i> 的亚细胞定位观察.....	27
3.3 <i>MeAHL31</i> 蛋白的原核表达及纯化.....	28

3.3.1	pET28a-MBP- <i>MeAHL31</i> 原核表达载体的构建.....	28
3.3.2	<i>MeAHL31</i> 在大肠杆菌 BL21(DE3)中的优化表达.....	29
3.3.3	MBP- <i>MeAHL31</i> 融合蛋白的纯化.....	30
3.4	<i>MeAHL31</i> 与 <i>MeCWINV1</i> 启动子相互作用的初步探索.....	30
3.4.1	<i>MeAHL31</i> 与 <i>MeCWIN1</i> 启动子的体内结合验证.....	30
3.5	<i>MeAHL31</i> 与 <i>MeCWINV1</i> 启动子的体外结合验证.....	32
3.6	<i>MeAHL31</i> 与 <i>MeCWINV1</i> 启动子植物体内结合验证.....	33
3.6.1	构建植物表达载体 pGreenII- <i>MeCWINV1</i> -LUC.....	33
3.6.2	构建植物表达载体 pGreenII-62-sk- <i>MeAHL31</i>	34
3.6.3	<i>MeAHL31</i> 与 <i>MeCWINV1</i> 启动子的植物体结合验证.....	34
3.7	<i>MeAHL31</i> 基因在 SC8 木薯中的过量表达.....	34
3.7.1	SC8 木薯的遗传转化.....	34
3.7.2	<i>MeAHL31</i> 转基因木薯基因组 DNA 的提取.....	36
3.7.3	<i>MeAHL31</i> 转基因木薯植株的 PCR 鉴定和 GFP 荧光标记检测.....	36
3.8	<i>MeAHL31</i> 和 <i>MeCWINV1</i> 基因在转基因木薯中的表达分析.....	37
3.8.1	转基因木薯总 RNA 的提取.....	37
3.8.2	转基因木薯中 <i>MeAHL31</i> 和 <i>MeCWINV1</i> 基因的表达分析.....	37
3.9	转基因木薯表型观察.....	38
3.10	<i>MeAHL31</i> 在拟南芥中的功能研究.....	39
3.10.1	<i>MeAHL31</i> 过表达载体在拟南芥中的转化.....	39
3.10.2	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥基因组 DNA 提取.....	39
3.10.3	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥的 PCR 鉴定.....	39
3.10.4	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥总 RNA 的提取.....	40
3.10.5	<i>MeAHL31</i> 正向调控 <i>AtCWINV1</i> 基因的表达.....	40
3.11	<i>MeAHL31</i> 在拟南芥中的功能研究.....	41
3.11.1	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥叶的表型观察.....	41
3.11.2	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥下胚轴伸长.....	42
3.11.3	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥中下胚轴发育相关基因表达分析.....	43
3.11.4	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥主根伸长.....	44
3.11.5	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥提早开花时间.....	45
3.11.6	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥早花表型相关基因表达分析.....	47
3.11.7	<i>MeAHL31</i> 转基因拟南芥花的形态观察及果荚表型分析.....	48
4	讨论.....	51
4.1	<i>MeAHL31</i> 具有转录因子活性, 在细胞质、细胞膜和细胞核均表达.....	51
4.2	<i>MeAHL31</i> 与木薯 <i>MeCWINV1</i> 启动子结合并正调控 <i>MeCWINV1</i> 基因的表达.....	51
4.3	<i>MeAHL31</i> 在拟南芥中的功能研究.....	52
4.3.1	<i>MeAHL31</i> 过量表达提早拟南芥的开花时间.....	53
4.3.2	<i>MeAHL31</i> 过量表达促进拟南芥下胚轴伸长.....	54
5	结论.....	55
	参考文献.....	57
	硕士期间取得成果.....	63
	致谢.....	64

1. 引言

1.1 转录因子最新研究进展

转录因子(Transcription factor,TF)是具有特殊结构的蛋白质分子,具有调节基因表达的功能。它可以与基因启动子区域中的顺式作用元件和 RNA 聚合酶直接或间接相互作用,也称为反式作用因子。转录因子属于调控蛋白,是植物基因表达调控的重要组成部分。作为一种有效的基因工具,转录因子可以通过与胁迫相关启动子的表达来改变植物的抗性。

1.1.1 转录因子结构特征

通过对转录因子蛋白质结构分析,转录因子通常由四个功能域组成,但由于功能域的缺失或冗余,转录因子的某些功能域发生变化。①转录因子 DNA 结合区(DNA-binding domain)是识别并结合 DNA 顺式作用元件的特定氨基酸序列,决定了顺式作用元件的特异性,可以用作转录因子分类的基础(曹红利,2013; Riechmann and Meyerowitz., 1998; Washburn et al., 1997)。典型的植物 DNA 结合区包括 MYB 结构域、bZIP 结构域、AP2 / EREBR 结构域、MYC 结构域、Homeo 结构域以及锌指结构域(刘金义,2014; 刘强等,2000)。②转录调控区(transcription regulation domain)功能是决定同源转录因子不同功能。③核定位信号(nuclear localization signal ,NLS)的功能是控制转录因子进入细胞核,转录因子不同含有 NLS 数量不同(刘强等,2000; Boulikas., 1994); ④寡聚位点(oligomerization site)是一个保守的氨基酸序列,转录因子通过其发生互作(刘强等,2000)。

1.1.2 转录因子分类

转录因子可分为两种类型:(1)非特异性转录因子:调控基因的转录表达不具有选择特异性,如大麦中的 HvCBF2(C-repeat/DRE binding factor 2)(黄幸等,2019; Xue, 2003);(2)特异性转录因子:对某种或某些基因的转录表达具有选择特异性,如 WRKY、bHLH、bZIP、MYB、NAC、HMG、HSF、zinc-finger 蛋白、AP2/ERF(乙烯响应因子)等,它们在调控植物的特殊的生理功能方面发挥着重要的作用(黄幸等,2019; Riechmann et al., 2000; Yamasaki et al., 2008)。转录因子活性调控机制如图 1 所示。

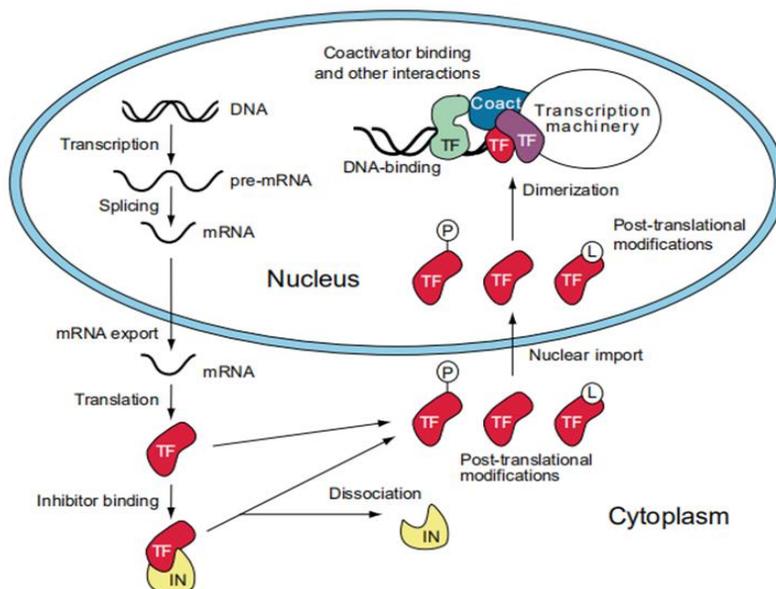


图 1 转录因子活性调控机制(Claus Schwechheimer and Michael Bevan., 1998)

Figure 1 Regulation Mechanism of Transcription Factor Activity

1.1.3 AT-hook 转录因子研究进展

目前植物中已鉴定出约 84 个转录因子家族，其中 AT-hook 蛋白是植物中一类具有核定位信号的转录因子，普遍存在于细菌、真菌和动植物中。

(1) AT-hook 转录因子结构特征

AT-hook 首次在哺乳动物非组蛋白染色体的高移动组蛋白(HMG-I/Y)中发现，它是一类新的 DNA 结合蛋白基序，定位于细胞核又被称为 AHL 蛋白(AT-hook motif nuclear localized protein)，普遍存在于细菌、真菌和动植物中(Churchill and Travers, 1991)。AT-hook 具有两个典型的结构域：AT-hook 基序(AT-hook motif)和 PPC/DUF296 结构域(plants and prokaryotes conserved domain, domain of unknown function #296, PPC, DUF296) (丁丽雪等, 2016; 肖朝文等, 2009; 张贵慰等, 2014)，结构示意图如图 2。

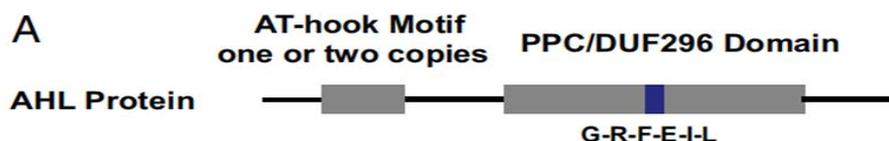


图 2 AT-hook 结构示意图(Zhao et al., 2013)

Figure 2 Schematic of AT-hook Structure

AT-hook 基序的核心序列为 GRP，该序列含有甘氨酸-精氨酸-脯氨酸(GRP)三个保守的氨基酸残基，GRP 序列的稳定性由脯氨酸承担，精氨酸深入到双链 DNA 内部与 DNA 结合(Aravind et al., 1998; Delaney et al., 2007)。GRP 核心序列通过向两边延伸的方式参与 DNA 和蛋白质互作(Xu et al., 2013; Matsushita et al., 2007; Martínez-García et al., 2007); 为了适应与 DNA 结合该序列氨基酸形成 C 字形结构且两侧有十字形交叉结构存在。陆地植物中 AT-hook 蛋白 3 类含有不等的 AT-hook

基序，在结构上也有所不同(图 3)。

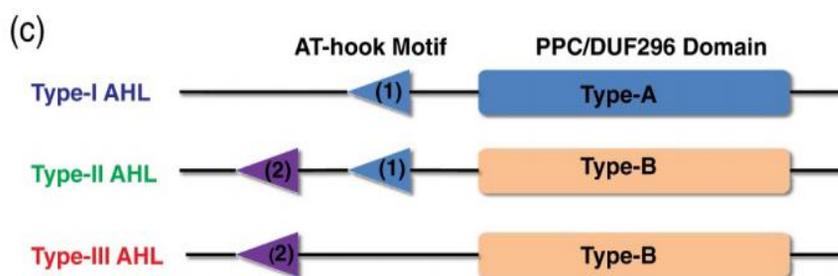


图 3 陆地植物 AT-hook 蛋白的拓扑结构(Zhao et al., 2014)

Figure 3 Topological Structure of Terrestrial Plant AT-hook Protein

PPC/DUF296 结构域由一个植物和原核生物保守结构域(PPC)和一个未知功能域 296(DUF296)组成，该结构域包含保守 Gly-Arg-Phe-Glu-Ile-Leu 序列。长度约为 120 个氨基酸，该结构域位于 AT-hook 基序的羧基末端，负责 AT-hook 蛋白在细胞核中的定位(Fujimoto et al. , 2004; Yin et al. , 2018; Zhao et al. , 2014)，该结构域的功能在真/原核生物中相对固定，AHLs 的互作以及与其他核蛋白(如转录因子)相互作用通过 PPC/DUF296 结构域。通过软件预测生物 AT-hook 的 PPC/DUF296 结构域的三维结构(如图 4)

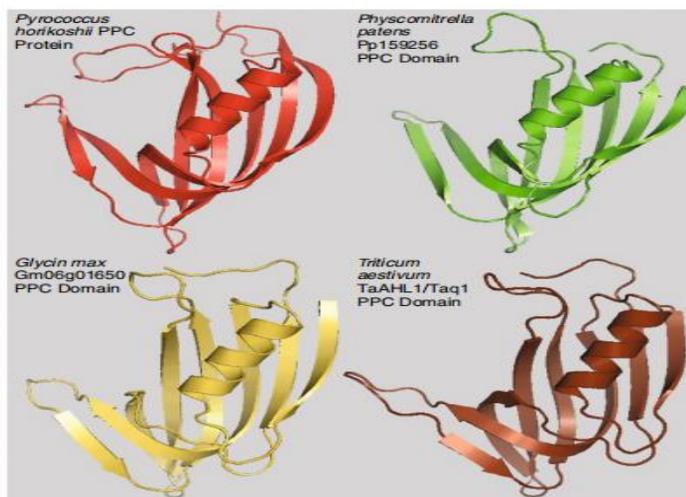


图 4 AT-hook 蛋白预测 PPC 结构域的三级结构(Zhao et al., 2014)

Figure 4 AT-hook Protein Predicts the Tertiary Structure of the PPC Domain

(2) AT-hook 转录因子分类

基于 AT-hook 转录因子的序列相似性及其与 DNA 结合的亲和力，可分为三类(Aravind and Landsman,1998)。I 型具有的典型特征是在核心序列 GRP 的 C 端含有一些既能与 DNA 互作又能形成极性网络的氨基酸残基，并且其 C 端第二位为甘氨酸并与 DNA 互作形成氨基酸残基的极性网络；II 型 GRP 核心序列下游的两个氨基酸残基赖氨酸代替了 I 型的甘氨酸；III 型兼有 I 型和 II 型的典型特征，其在 RGR 核心序列下游第 4 位为高度保守的一个赖氨酸和一些极性氨基酸残基(肖朝文等, 2009; Churchill et al. , 1991; Reddy et al. , 2005)。陆生植物 AT-hook 蛋白依据 AT-hook 基序分为两个分支(如图 5)。

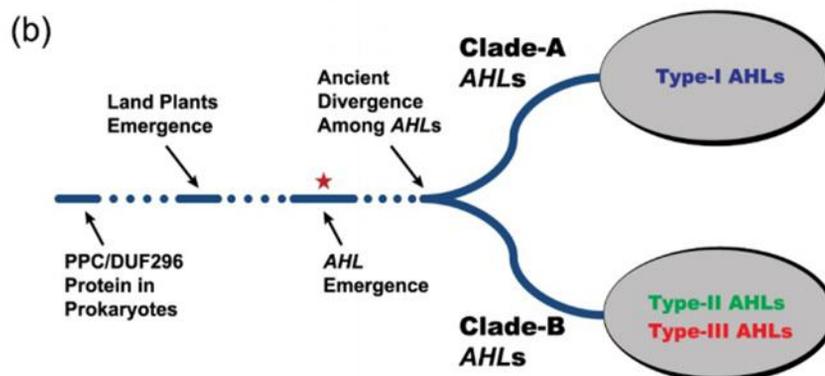


图 5 陆生植物 AT-hook 蛋白的两个分支(Zhao et al., 2014)

Figure 5 Two Branches of Terrestrial Plant AT-hook Protein

(3) AT-hook 与 DNA 结合的亲和性和特异性

研究发现这 3 类 AT-hook 基序与富含 AT 碱基的 DNA 序列亲和性不同, I 型与富含 AT 碱基的 DNA 序列亲和性在三类中最高; II 型与富含 AT 碱基的 DNA 序列的亲和性较 I 型低, 但 II 型与 DNA 亲和性比体外合成的序列与 DNA 的亲和性要高; III 型与富含 AT 碱基的 DNA 亲和性介于 I 型和 II 型之间(丁丽雪等, 2016; 肖朝文, 2009; Aravind et al., 1998)。

Reeves 和 Nissen 等发现可以通过序列和结构的典型特征来确定 AT-hook 基序与 DNA 结合的作用方式, 发现两者之间的亲和性与 AT-hook 的序列及靶 DNA 的特征有关。不同 AT-hook 蛋白中 AT-hook 基序不同与 DNA 结合能力也不同, 同一个 AT-hook 蛋白中含有多个 AT-hook 基序, 每个 AT-hook 基序与 DNA 结合能力也不同, 如水稻的 AT1 蛋白含有 15 个 AT-hook 基序, 每个 AT-hook 基序在与 DNA 结合中表现出不同的结合能力。同时靶 DNA 中 AT 碱基的含量和排列方式也决定两者之间的亲和性, 如 Metcalf 等通过对 TAF1 与 DNA 的特异性研究发现, AT-hook 蛋白与 DNA 结合的过程中偏向于富含 AAT 的目标 DNA。

目前为止, AT-hook 基序与 DNA 结合是先形成一个 C 字形结构, 两尾形成的十字形交叉可以使整个结构插入到 DNA 的小沟与之结合(Aravind and Landsman, 1998), AT-hook 蛋白与 DNA 结合的三维模型(如图 6)。

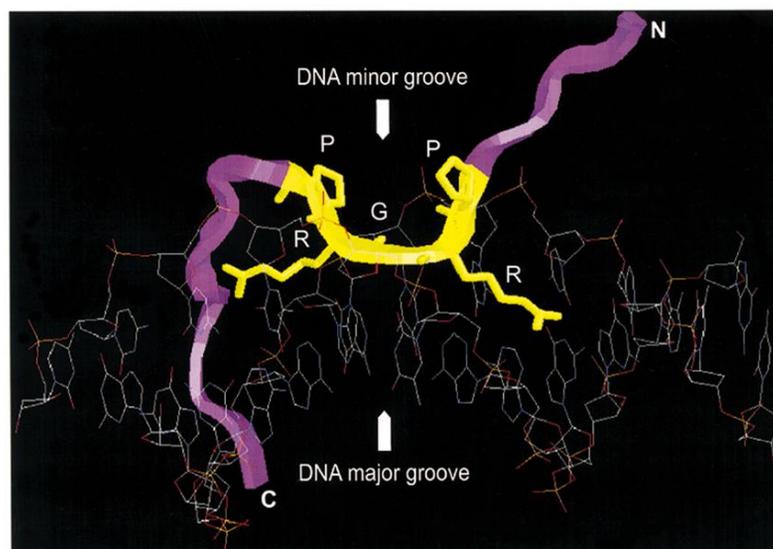


图 6 AT-hook 蛋白与 DNA 结合的三维模式图(Aravind and Landsman. ,1998)

Figure 6 Three-dimensional Pattern of Binding of AT-hook Protein to DNA

(4) AT-hook 对基因转录活性的调控

研究发现 AT-hook 蛋白既可以结合 DNA，还可以对目标基因进行正向或负向调控,如在豌豆中 HMG-1/Y 蛋白可对质体蓝素基因 *PetE* 的转录进行正调控(Gupta et al. , 1997); AT-hook 蛋白可作转录激活剂能够激活其他转录因子表达，如 AT-hook 蛋白 SPBP 在人体中可调节溶血素基因的表达，同时还可激活 Ets1、Pax6 和 Sp1 等转录因子(Rekdal. , 2000)，AT-hook 与 DNA 的结合可影响蛋白的转录活性，如 Singh 等发现非洲淋巴瘤病毒蛋白 EBNA1 中 AT-hook 基序改变影响了蛋白的转录活性，AT-hook 蛋白 SAYP 结合到正常的染色质区域时，它会激活基因转录。

(5)AT-hook 转录因子的生物学功能

①AT-hook 参与植物生长发育调控

AT-hook 蛋白家族在植物生长发育、器官形成、激素信号应答以及逆境胁迫中发挥着重要调节作用，AT-hook 蛋白家族在整个生物界的进化进程(如图 7)，其主要参与激素信号转导和延迟开花时间(Yun et al. , 2012),促进下胚轴伸长(Vom et al. , 2007)和延迟叶片腐烂(Martínez-García and Quail. , 1999)等调节作用。

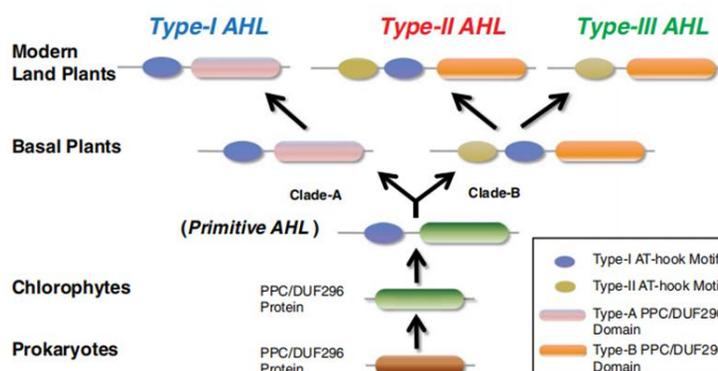


图 7 陆地植物 AHL 基因家族的进化情景(Zhao et al. , 2014)

Figure 7 Evolution of the Land Plant AHL Gene Family

拟南芥中鉴定出 29 个 AT-hook 蛋白，拟南芥的 AT-hook 蛋白均定位于细胞核，其中 AHL1 可结合到拟南芥质体蓝素基因(*PC-MARI*) MAR 序列上(Aravind et al. , 1998; Fujimoto et al. , 2004)，与拟南芥繁殖器官分化相关的转录因子 GIK 直接调控 AG 下游多个基因(Matsushita et al. , 2007)。例如拟南芥 *AGF1(AtAHL25)* 通过调节 *AtGA3ox1* 基因来控制 GA3 氧化酶的活性，拟南芥 *AHL27* 基因过表达可抑制开花基因 *FT* 的表达，并促进 *FLC* 基因的表达，从而延迟了拟南芥在各种光照条件下的开花时间(Yun et al. , 2012)。

②AT-hook 参与植物逆境胁迫的调控

水稻(*Oryza sativa*)基因组中鉴定出 45 个编码 AT-hook 蛋白的基因，主要在水稻幼穗中表达(张贵慰等, 2014)，其中 *dp1* (depressed paleal)控制内稃形成和花器官数目(Jin et al. , 2011)。棉花 AT-hook 蛋白 GhAT1 的两个 AT-hook 基序位于细胞核中，它们与脂质转移蛋白基因 *FSltp4* 启动子上富含 AT 碱基的 FSR 序列特异性结合，以调节棉纤维的生长(Delaney et al., 2007)。低温、高温、高盐、SA 和 ABA 诱导番茄 AT-hook 家族的 32 个基因表达，这些实验结果表明 AT-hook 家族可能参与了番茄对胁迫的响应(丁丽雪等, 2016)。植物中 AT-hook 家族发挥调控作用的机制如图 8 所示。

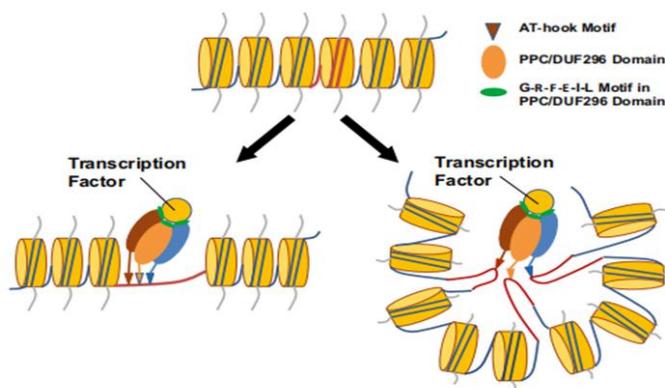


图 8 AT-hook 家族调节植物生长发育机制(Zhao et al., 2013)

Figure 8 The AT-hook Family Regulates Plant Growth and Development

1.2 植物转化酶最新研究进展

碳自养是高等植物最显著的特征，非还原性双糖蔗糖在植物代谢中起着重要作用。碳水化合物在大多数物种的源叶中合成，并以蔗糖的形式转移到库组织中，以维持异养代谢和生长，或以蔗糖或淀粉的形式存储。植物的生长发育伴随着源库关系的变化，二糖蔗糖及其裂解产物葡萄糖和果糖是高等植物碳水化合物运输，代谢和传感的核心分子，植物新陈代谢的关键酶蔗糖转化酶(sucrose invertase, INV)可催化蔗糖不可逆地分解为葡萄糖和果糖(Chandra et al. , 2012; Zhang et al. , 2013)。

植物中的蔗糖转化酶根据其亚细胞定位的不同，可分为细胞壁转化酶，液泡转化酶和胞质转化酶；根据其最适 pH 值，可分为酸性转化酶(Acid invertase)和中性/碱

性转化酶(Alkaline/neutral invertase)(Hsieh et al., 2006)。其中细胞壁转化酶(Cell wall invertase, CWI)是一种不溶性酸性转化酶,以离子或共价键的形式与细胞壁结合,属于 β -果糖呋喃糖苷酶(潘秋红等, 2003; Yao et al., 2014),本课题组已在木薯中克隆出6个细胞壁酸性转化酶基因并命名为 *MeCWINV1-6*。

1.2.1 细胞壁转化酶生理功能

(1) 细胞壁转化酶在植物生长发育中的作用

细胞壁转化酶可以在源和库之间形成蔗糖、葡萄糖和果糖之间的浓度梯度,从而为储存器官的生长和发育提供碳水化合物;高等植物中的糖为植物的生长和发育提供能量和碳水化合物;糖作为重要的信号分子,它调节植物的整个生长过程,其主要调节韧皮部卸荷、蔗糖分配、细胞分化等植物发育过程;同时糖还可作为信号分子激活或抑制植物基因表达调控(Ruan, 2012; Rolland et al., 2002; Jang et al., 1997)。细胞壁转化酶还参与对各种生物和非生物胁迫的响应,植物以此来不断地调节自己的生长发育,以适应不断变化的生长环境。

(2) 细胞壁转化酶在植物开花中的作用

碳水化合物在源器官和汇器官之间的分配是植物生长和发育的主要决定因素之一。对于开花植物来说,幼叶和幼根是营养生长期的主要碳汇,而花朵是营养生长向生殖生长过渡期间新的和强大的碳汇(Borghi and Fernie, 2017)。新的研究表明,植物通过改变内源C状态来调节开花时间,以减少压力环境给植物开花带来的风险(Kazan and Lyons, 2016; Kim and Park, 2007; Lauxmann et al., 2016)。有研究发现 *CWINV4* 是芸苔科植物产生花蜜的绝对必需因子,特别是通过保持蜜腺内的恒定库状态,从而使它们积累产生花蜜所需的糖。此外, *CWINV4* 可能是许多芸苔科花蜜富含己糖成分的原因(Jeffrey M et al., 2009)。目前的所有证据表明, *AtCWINV4* 活性在拟南芥花蜜的产生中起着至关重要的作用。拟南芥根中细胞壁转化酶特异性表达不仅可以提早花期,同时还将拟南芥的全部生物量提高。

(3) 细胞壁转化酶在植物中的调控作用

细胞壁转化酶在植物响应生物或非生物胁迫中起着重要的作用,特别是在植物的开花和种子形成等重要生殖发育时期以及激素等胁迫下发挥着关键性的作用。如番茄一个细胞壁转化酶 *Line5* 受生长素(IAA)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)的调控后活性增加;而番茄的CWI的 *Line7* 因为赤霉素(GA)的合成受阻发生表达下调;CWI活性可影响激素合成,如当烟草CWI活性受到抑制时细胞分裂素(CTK)合成受阻,其调节的叶片衰老过程被抑制(Lara et al., 2004)。孟焕文等通过番茄温度胁迫实验发现温度影响细胞壁转化酶的活性,通过调节适宜温度使番茄叶片和根系的细胞壁转化酶活性升高;水分胁迫增加了番茄CWI和VIN活性,番茄中可溶性糖含量显著增加且淀粉含量降低(程智慧等, 2002)。干旱胁迫下小麦花药的CWI基因表达下调造成还原糖源不足引起引起花粉不育(Koonjul et al., 2015);在高温胁迫下番茄花粉不

育的主要原因可能是其 *CWI* 活性显著下调(Pressman et al., 2015)。Sturm 等观察到胡萝卜酸性转化酶可以催化细菌病原体的黏性外壳水解, 并且发现其具有与果聚糖水解酶相似的作用, 同时还证实了酸性转化酶可抑制细菌在细胞外的生长并诱导植物触发防御反应(Sturm et al., 1990)。

细胞壁转化酶在植物中具有重要的生理功能, 并且对植物的生物和非生物胁迫具有重要作用; 启动子在调节植物基因表达中具有重要作用。因此研究细胞壁转化酶相关启动子的调控具有重要的意义。

1.3 启动子的研究进展

启动子是基因转录调控的核心, 转录是调节基因表达的关键环节, 主要是基因启动子特征元件与转录因子之间的互作, 因而对启动子的深入研究有助于理解基因转录模式和调控机制。

天然启动子的研究已较为清楚, 为了使靶基因具有更高的表达水平和更强的特异性, 人工启动子的研究于 1980 年代后期在国外开展(Ellis et al., 1987)。在 2000 年代初期, 人工启动子被用于植物抗逆分子生物学领域(Rushton et al., 2002)。目前, 植物基因工程中关于转录因子的研究内容主要包括: 病原体诱导的人工启动子, 胁迫诱导的人工启动子, 组织特异性人工启动子和双向人工启动子。

1.3.1 启动子的结构特征

启动子主要由核心启动子序列和上游启动子元件组成, 植物启动子的核心元件 TATA-box 是大多数植物启动子正确驱动基因表达的关键, 并且它与转录因子 TFIID 结合是实现转录起始重要一环(Yayoi et al., 2016); 特异的上游启动子元件与相应转录因子结合可促进或抑制目的基因的表达。植物启动子区域可分为: 核心启动子区和上游启动子区(雒雅婧等, 2015), 核心启动子区域(近端启动子区域)是基因调控必需的。它距转录起始 35 bp 左右, 其作用是能够准确的定位转录起点和方向。在植物基因表达过程中转录水平的调控是关键的一环。

核心启动子区域中有一些重要的功能元件: TATA-box、起始因子(Inr)、TFIIB 识别位点(BRE)和下游启动子元件(DPE)。它们在启动子上的相对位置(如图 9)所示。TATA-box(Goldgerg-Hogness)是富含 AT 的保守序列 TCACTATATAG(TATAAA 序列), 通常位于转录起始位点上游(32±7) bp 附近, 没有方向性, BRE、Inr 和 DPE 元件是否存在不影响其功能(Smale and Kadonag, 2003)。TATA-box 功能是定位转录起始位点, 以指导转录前复合物的形成, 同时也是 RNA 聚合酶 II 的识别位点及一些反式作用因子与 DNA 相互作用的位点(雒雅婧等, 2015)。

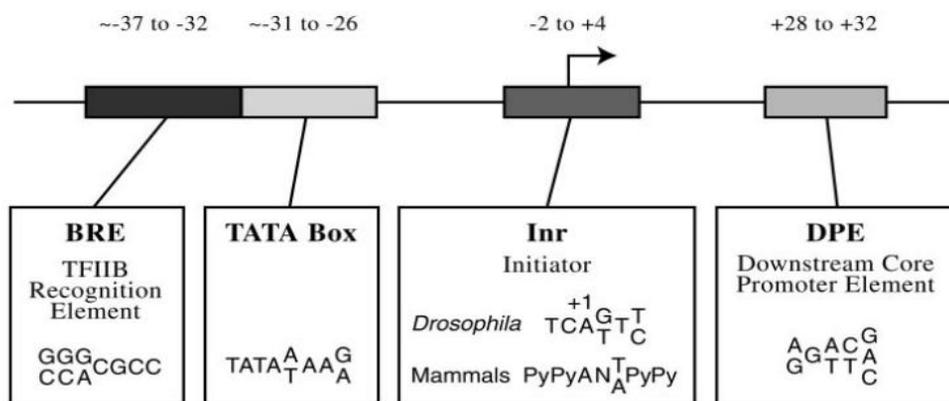


图 9 启动子区核心功能元件示意图(Smale and Kadonaga., 2003)

Figure 9 Schematic Diagram of Core Functional Elements in the Promoter Region

上游启动子区域(远端启动子区域)距转录起始位点数百至数千个核苷酸的上游区域。它主要包含一些顺式作用元件: G-box、CAAT-box 等, 它们可以调节下游基因的时空表达 CAAT-box 距转录开始约 75 bp, 其功能是确定转录起始的频率和强度, 它还可以激活正负两个向的转录, 并与顺式元件协同作用(李丹, 2017; Shahmuradov et al., 2000; Smale and Kadonaga, 2003)。

1.3.2 启动子的特性

由于启动子特殊的结构特征, 启动子具有如下一些特性: ①特异性: 启动子含有 RNA 聚合酶特异性结合和转录起始所需的保守序列; ②方向性: 通常情况下启动子只选择正反两个调控方向上的一个进行基因的转录表达调控; ③位置特征: 通常启动子只有位于其靶基因上游区域或内部前端才能发挥其活性; ④种属特异性: 启动子因物种以及组织和器官的不同而具有差异性(夏江东等, 2000; 郭育强, 2017)。

1.3.3 启动子的分类

根据启动子的功能和作用方式, 植物启动子分为三类: 组成型启动子, 诱导型启动子和组织特异性启动子, 目前, 双向启动子和可变启动子研究越来越重要。但启动子的分类不是统一标准的, 一个启动子因分类标准不同可同时属于多个类别(胡艳平, 2014)。

(1)组成型启动子(constitutive promoter)在植物的各个部位均能表达, 它们的功能是稳定植物结构基因的表达, 使植物结构基因不受时空特异性和其他外部条件的影响。例如花椰菜花叶病毒 35S 启动子(*CaMV 35S promoter*)和玉米泛素启动子(*Ubiquitin promoter*)是常用的组成型启动子, 特别是 *CaMV 35S* 启动子活性强且表达量高, 因而目前使用广泛。

(2)诱导型启动子(inducible promoter)通过外部诱导因素调控基因的转录水平, 根据诱因不同分类, 常见的是: 温度诱导型启动子、激素诱导型启动子、光诱导型启动子。其功能是可以高效调节转录基因提高转录速率(雒雅婧等, 2015; 雒雅婧等, 2016; 胡艳平, 2014; 李明月, 2017; 何康, 2016)。

(3)组织特异性启动子：指特定组织或器官中外源基因表达的调节。由于其发育的调节特性，它也被称为器官特异性启动子。该启动子促进受体的外源基因在特定位点的表达并增加区域表达水平，同时避免了植物中不必要的养分浪费。已经在组织和器官如根、茎、叶、花、果实和种子中获得了组织特异性启动子(雒雅婧等, 2015; 何康, 2016)。

(4)双向启动子位于相邻基因之间，对转录具有双向调控功能。在双向启动子的相对端结合一个或多个具有不同功能的基因可以提高基因导入的效率。如 Xie 等在 *CaMV35S* 启动子的 5'末端连接一个反向 mini35S, 并将其转换为双向人工启动子。两个方向的靶基因均在拟南芥中表达。天然启动子和人工启动子都可以通过分子生物学方法转化为双向人工启动子，从而克服了基因工程中多个基因的共转化问题(赵婉彤等, 2014)。

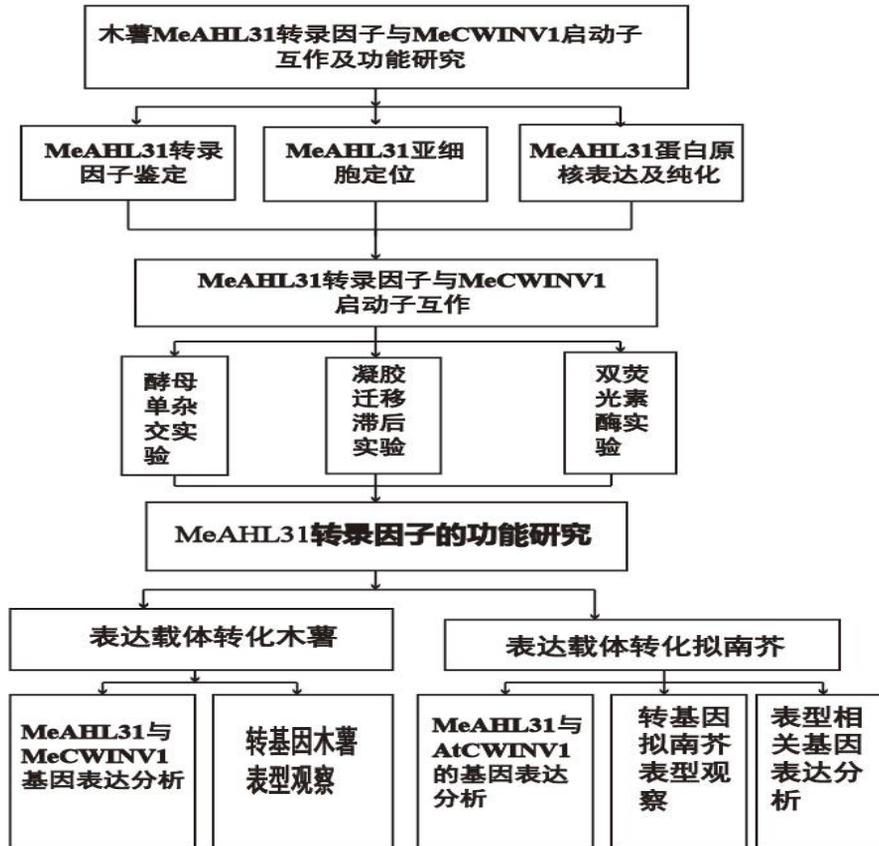
(5)可变启动子：例如在光诱导和黑暗条件下，玉米叶绿体多顺反子转录单位 OPF31-petE-ORF42 的转录起点，转录物和表达产物是不同的(Haley et al. , 1990)。

启动子有效地调节基因转录，并在外源基因的表达中起着至关重要的作用。随着基因工程技术的飞速发展，对启动子性质的有效分析已成为有效选择启动子的关键。

1.4 研究的目的地意义

本课题组前期以木薯细胞壁转化酶基因 *MeCWINV6* 启动子为诱饵，从木薯酵母单杂交文库中筛选到一个 AT-hook 转录因子家族基因 *MeAHL31* (GenBank No. MH559128), *MeAHL31* 能与 *MeCWINV6* 启动子结合并上调其活性(郭育强, 2017)。已有研究表明，AT-hook 转录因子家族在植物生长发育、器官形成、激素信号应答以及逆境胁迫等方面发挥重要的调控作用。而细胞壁转化酶可在植物源和库器官之间形成蔗糖、葡萄糖和果糖的浓度梯度，满足植物生长发育和应对逆境胁迫过程中的能量需求。木薯中的细胞壁转化酶基因 *MeCWINV1* 已证实是负责木薯源库器官物质转运最关键的细胞壁转化酶基因 (姚远, 2013)。前期生物信息学分析发现 *MeCWINV1* 启动子上也存在 AT-hook 转录因子结合的潜在顺式作用元件 AT1-motif。 *MeAHL31* 能否与 *MeCWINV1* 启动子发生结合？它们之间有着怎样的调控作用和生物学功能呢？为了解析这些问题，本论文首先对 *MeAHL31* 的转录活性、亚细胞定位等进行分析；接着利用酵母单杂交实验、凝胶迁移滞后实验(EMSA)和双荧光素酶实验探究 *MeAHL31* 与 *MeCWINV1* 启动子的结合作用；最后在木薯和拟南芥中过表达 *MeAHL31*，开展进一步的功能研究。期望解析 *MeAHL31* 转录因子对木薯细胞壁转化酶基因 *MeCWINV1* 的调控作用及在植物中行使何种功能。

1.5 技术路线



2 实验材料与方法

2.1 实验材料与试剂

2.1.1 实验材料

木薯华南8号(*Manihot esculenta* Crantz, cultivar SC8)实验材料种植于本课题组实验基地;PCR实验所选用的转基因株系是继代培养30 d左右的转基因SC8木薯组培苗,同批次的未作任何处理的SC8木薯组培苗做对照。收集组培苗材料保存于-80°C冰箱。

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)由本课题组提供,种植于中国热带农业科学院热带生物技术研究所植物培养室。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚(*Columbia*)野生型种子由本课题组提供,本试验拟南芥*MeAHL31*过表达株系与野生型均在本课题组培养。

2.1.2 菌株和载体

本实验所用的酵母单杂交系统载体 pGADT7-Rec2、pGAD-Rec2-53、p53HIS2-AbAi、pAbAi 以及双杂交系统载体 pGBKT7、pGADT7-Rec、pGBKT7-53、pGADT7-largeT, pGADT7 均购自美国 Clontech 生物公司;植物绿色荧光二元表达载体 pCAMBIA1300-GFP 由中国热带农业科学院生物所阮孟斌博士所赠送;大肠杆菌蛋白表达载体 pET-28a-MBP 以及 pVKH-*MeCWINV1* 均由本课题组保存;大肠杆菌 *E. coli* DH 5 α 、大肠杆菌 BL21(DE3)感受态酵母 Y1HGold 感受态、农杆菌 GV3101 感受态以及酵母 AH109 感受态等购自 Weidi Biotechnology 公司; pGreen II0800、pGreenII-62-sk 双荧光素酶植物表达载体和 pSoup 助质粒由华中农业大学张余洋老师馈赠。DH5 α 大肠杆菌菌株、LBA4404 根癌农杆菌菌株保存于本课题组。

2.1.3 主要酶和试剂

名称	厂家
T4 连接酶、LA 酶、限制性内切酶	上海恒远生物科技有限公司
重组烟草蚀纹病毒蛋白酶 (rTEV 蛋白酶)	上海联迈生物工程有限公司
PCR 产物纯化试剂盒、DNA 小量抽提试剂盒	北京百奥莱博公司
Plant Total RNA Isolation Kit	上海信裕生物科技有限公司
PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒	上海易汇生物科技有限公司
SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒	北京智杰方远科技有限公司
Pierce® GST Spin Purification Kit	上海叶舟生物科技有限公司
Electrophoretic Mobility-Shift Assay (EMSA) Kit	上海联迈生物工程有限公司
Ni-NTA亲和层析介质	北京博奥龙免疫技术有限公司
双荧光素酶报告分析试剂盒 (Dual-Luciferase® Reporter Assay System)	内蒙古恒生生物科技有限公司
2* F8 FastLong PCR MasterMix	杭州昊新生物科技有限公司

2.1.4 实验相关试剂和培养液配制方法

(1) LB 培养基配制

成分	用量
YEAST EXTRACT (酵母提取物)	0.5%
TRYPTONE (蛋白胨)	1%
NaCl (氯化钠)	1%
固体培养基外加 1.2%的琼脂粉, 121°C高压灭菌 20 min 备用	

(2) YEP 培养基配制

成分	用量
YEAST EXTRACT (酵母提取物)	1%
TRYPTONE (蛋白胨)	1%
NaCl (氯化钠)	0.5%
固体培养基外加 1.2%的琼脂粉，121°C高压灭菌 20 min 备用	

(3) SD/-Trp 配制(1L)

成分	用量
Yeast Nitrogen Base	6.7 g
Glucose	20 g
10×DO	100 mL
100×Leu	10 mL
100×His	10 mL
100×Uraci	10 mL
100×Adeninel	10 mL
PH	6.5

固体培养外加 2%琼脂糖，121°C，20 min 灭菌备用。

(4) SD/-Trp/Leu 配制(1L)

成分	用量
Yeast Nitrogen Base	6.7 g
Glucose	20 g
10×DO	100 mL
100×Adenine	10 mL
100×His	10 mL
100×uracil	10 mL
PH	6.5

固体培养外加 2%琼脂糖，121°C，20 min 灭菌备用。

(5) 10×DO 配制

氨基酸	10×浓度 (mg/L)	称重 (g)
Isoleucine	300	0.3
Valine	1500	1.5
Argnine	200	0.2
Lysine	300	0.3
Methionine	200	0.2
Phenylalanine	500	0.5
Threonine	2000	2
Tyrosine	300	0.3

加 ddH₂O 定容至 1 L，4°C保存

(6) 侵染液配制

成分(溶液)	使用浓度	用量
MgCl ₂	10 mM	27 mL
MES	100 mM	3 mL
AS	100 mM	60 μL

(7) MS 基础培养基配制(1L)

成分	用量
50x 大量元素	20 mL
50x CaCl ₂	20 mL
100x 铁盐	10 mL
200x 有机元素	5 mL
1000x 微量元素	1 mL
2000x CuSO ₄	0.5 mL
蔗糖	20 g

调节 PH=5.8,固体培养基外加 6-8 g 琼脂粉, 121°C高压灭菌 20 min 备用

(8)木薯转基因体系建立过程其他培养基配方

培养基类型	成分
木薯脆性愈伤培养基(GD 培养基)	MS 培养基+1 mL 的 1 mg/L Picloram
木薯体胚形成培养基 (MSN 培养基)	MS 培养基+1 mL 的 1 mg/L NAA
木薯子叶生长培养基 (COM 培养基)	MS 培养基+1 mL 的 1 mg/L 6-BA
木薯芽伸长培养基 (CEM 培养基)	MS 培养基+400 μ L 的 1 mg/L 6-BA
木薯体胚诱导培养基 (CIM 培养基)	MS 培养基+400 μ L 的 1 mg/L 6-BA
木薯侧芽膨大培养基 (CAM 培养基)	MS 培养基+400 μ L 的 1 mg/L 6-BA

调节 pH=5.8, 固体培养基外加 8.5 g 琼脂粉, 121°C高压灭菌 20 min 备用

(10)真空侵染液配方

1/2MS 培养液用粉末直接溶解, 1×B5 有机物 (5 mL/L), 10 μ g/L 6-BA, 5%蔗糖, 121°C, 20 min 高压灭菌备用。

2.2 实验方法

2.2.1 转录激活实验

(1) pGBKT7-*MeAHL31* 重组质粒的构建

以测序成功的 pMD19T-*MeAHL31* 质粒为模板, 根据 *MeAHL31* 基因的 cDNA 序列设计引物扩增 1014 bp 的全长 *MeAHL31* 序列, 在正向引物加 *Nde* I 酶切位点, 反向引物加 *Bam*HI 酶切位点。引物序列如下: *MeAHL31*-F (*Nde* I):

TACATATGGCAAATCGCTGGTGG;

MeAHL31-R (*Bam*H I): TCGGATCCTCAGTAATTGGGAGGT。

PCR 体系及条件

PCR 扩增反应体系	体积	反应条件		
ExTaq 酶	0.2 μ L	94°C	2 min	} 32Cycle
ExTaq Buffer	2 μ L	98°C	10 s	
dNTP Mixture	2 μ L	52°C	30 s	
木薯 cDNA	0.5 μ L	72°C	1 min	
正向引物	1 μ L	72°C	10 min	
反向引物	1 μ L	16°C	forever	
ddH ₂ O	13.3 μ L			
Total	20 μ L			

将 PCR 产物、pGBKT7 质粒用内切酶 *Nde* I、*Bam*H I 双酶切，酶切方法参照(王硕，2018)。

(2)酵母AH109 转化

①pGBKT7-MeAHL31 转化酵母:

1) pGBKT7-MeAHL31 质粒 2 μ g(总体积不超过 6 μ L)加入 AH109 感受态，DNA 在水浴 95-100°C处理 5 min 后，快速冰浴 2 min，此操作重复一次，加 500 μ L PEG/LiAc 充分混匀后 30°C水浴 30 min。

2) 将(1)处理后的试管放置于 42°C 水浴 15 min (冰浴一段时间后翻转 6-8 次混匀)。

3) 将 2) 处理后的试管 8000 rpm，离心 2 min 倒掉上清，加 ddH₂O 400 μ L 后重悬，离心 50 s 倒掉上清。

4) 将 3)管中加 50 μ L 的 ddH₂O 重悬，在 SD/-T 板上菌液均匀涂步，摇床 30°C培养 2-4 d。

在 SD/-T 平板上随机挑选 8 个单克隆分别放入 500 μ L SD/-T 液体培养基中培养，采用 pGBKT7 通用引物进行菌液 PCR 鉴定，培养的菌液做模板，质粒 DNA 做阳性对照，实验方法参照(王硕，2018)。

鉴定正确的阳性单克隆扩大培养，保菌以备后续实验。

2.2.2 MeAHL31 的亚细胞定位

(1) 构建植物表达载体 pCAMBIA1300-MeAHL31-GFP

利用 Premier 5.0 软件根据MeAHL31基因cDNA序列设计引物:

MeAHL31-F (*Spe* I) : GTACTAGTATGGCAAATCGCTGGT、MeAHL31-R (*Bam*H I): TAGGATCCGTAATTGGGAGGTG，反向引物去除终止密码子。以 pMD19-T-MeAHL31 重组质粒为模板，克隆 MeAHL31 基因。纯化后的 PCR 产物和 pCAMBIA1300-GFP 质粒用限制性内切酶 *Spe* I、*Bam*H I 进行双酶切并鉴定，抽提重组质粒 pCAMBIA1300-MeAHL31-GFP。

(2)转化农杆菌 GV3101

①重组质粒pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 转化农杆菌 GV3101

- 1) 取-80℃保存的农杆菌感受态细胞GV3101于冰上融化。
- 2) 无菌条件下向刚融化的感受态细胞悬液中加入 2 μg 的 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 重组质粒，轻柔混匀，冰水浴中静置 10 min。
- 3) 将 2)管置于液氮中速冻 5 min, 37℃水浴静置 5 min, 再冰浴 5 min 。
- 4) 加入 700 μL 预冷的无抗生素的 YEP 液体培养基，28-30℃振荡培养 2-3 h, 使菌体复苏表达抗性。
- 5) 菌液5000 rpm离心1 min, 100 μL 上清吸打混匀, 在含 100 μg/mL Rif 和50 μg/mL Kan的YEP平板上将菌液涂布, 28℃摇床倒置培养48-96 h。

挑选 8 个单克隆分别放入 700 μL YEP 液体培养基(含100 μg/mL Rif 和50 μg/mL Kan)中培养, 采用 *MeAHL31* 基因引物进行菌液 PCR 鉴定, 以菌液为模板, 质粒 DNA 为阳性对照。

PCR 程序同2.2.2(2),阳性菌样扩大培养并保菌。

②重组质粒 pCAMBIA1300-GFP 转化农杆菌 GV3101 参照上述方法。

2.2.3 *MeAHL31* 蛋白的原核表达和纯化

(1) 构建原核表达载体 pET28a-MBP-*MeAHL31*

(1) pET28a-MBP-*MeAHL31* 原核表达载体的构建

根据 *MeAHL31* 基因的 cDNA 序列设计引物, 以 pMD19-T-*MeAHL31* 重组质粒为模板, 克隆 *MeAHL31* 基因。PCR 产物与 pET28a-MBP 质粒用 *Hind* III、*Xho* I 限制性内切酶双酶切, 然后纯化、连接、转化大肠杆菌 DH5α 并进行菌液 PCR 鉴定并送测。抽提重组质粒 pET28a-MBP-*MeAHL31*。

(2) MBP-*MeAHL31* 融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的优化表达

实验方法参照(王硕, 2018), 破碎后的 100 μL 菌悬液, 10000 rpm 离心 1 min, 制样, 可于保存在-20℃冰箱中, 蛋白样品 SDS-PAGE 凝胶电泳后考马斯亮蓝染色, 脱色后分析。

(3) MBP-*MeAHL31* 融合蛋白的纯化

15℃诱导 16 h 的 BL21(DE3)/pET28a-MBP-*MeAHL31* 菌悬液进行纯化收集, 实验方法参照(王硕, 2018)。

- 1) 加入平衡缓冲液平衡层析介质, 直到 A280 值最低且稳定。
- 2) 蛋白样品上柱, 流速 0.5-1 mL/min 并收集流出液。
- 3) 柱子上的杂蛋白用 8 倍柱体积洗涤缓冲液洗涤, 直到流出液 A280 值最低且稳定。
- 4) 洗脱缓冲液洗脱蛋白, 测量流出液 A280 值最低且稳定, 收集并保存流出液。
- 5) 加入储存液, 4℃保存。

2.2.4 烟草瞬时表达和亚细胞定位观察

- (1) GV3101/pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 和 GV3101/pCAMBIA1300-GFP 分别接种到 YEP 液体培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rif 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan), 30 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 扩大培养至 OD600 = 0.6 左右。
- (2) 将上述菌液 4000 rpm, 15 min 集菌。
- (3) 侵染液混匀重悬菌体调 OD600=1.0, 室温静置 2 h。
- (4) 用无针头注射器从叶片背面注射长势良好的本氏烟草, 每个菌样注射 3-4 片叶片;
- (5) 将注射后的本氏烟放置于烟草培养室中, 期间喷水保持湿润。
- (6) 48 h 后在激光共聚焦扫描显微镜下进行观察注射后的本氏烟叶片杨平并拍照。

2.2.5 酵母单杂交验证 MeAHL31 与 MeCWINV1 启动子结合

(1) 构建重组载体 pGADT7-*MeAHL31*

根据 *MeAHL31* 基因的 cDNA 序列设计引物, 以 pMD19T-*MeAHL31* 重组质粒为模板, 克隆 *MeAHL31* 基因 CDS 区序列。进行下列酶切 *MeAHL31*-F(*Nde* I): TACATATGGCAAATCGCTGGTGG、*MeAHL31*-R(*Bam*H I): TCGGATCCTCAGTAA TTGGGAGGT, PCR 扩增后, 将 PCR 产物纯化后与 pGADT7 质粒一同用限制性内切酶 *Nde* I、*Bam*HI 双酶切, 纯化、连接、转化、鉴定并送测。将测序正确的菌样扩大培养、质粒抽提, 最终得到 pGADT7-*MeAHL31* 重组质粒。

(2) 构建重组载体 p*MeCWINV1*-AbAi

以本实验室前期构建的 pMD19T-p*MeCWINV1* 质粒为模板, 根据 *MeCWINV1* 基因启动子序列 (NCBI GenBank No. KC465190) 信息设计引物, 克隆 *MeCWINV1* 基因 865 bp 潜在启动子序列。p*MeCWINV1*(*Kpn* I): CTGGTACCATGCGACTTGAAAC、p*MeCWINV1*(*Sal* I): ACGCGTCGACCTCTATTTCCCTCT, 将 PCR 产物纯化后与 pAbAi 质粒一同用限制性内切酶 *Kpn* I、*Sal* I 双酶切。将酶切的 PCR 产物和 pAbAi 进行纯化、连接、转化大肠杆菌 DH5 α 以及菌液 PCR 鉴定, 随机选取 PCR 鉴定正确的阳性单克隆送测, 将测序正确的菌样扩大培养、质粒抽提 p*MeCWINV1*-AbAi 重组质粒。以本实验室前期构建的 pMD19T-p*MeCWINV1* 质粒为模板, 根据 *MeCWINV1* 基因启动子序列 (NCBI GenBank No. KC465190) 信息设计引物, 克隆 *MeCWINV1* 基因 865 bp 潜在启动子序列。 p*MeCWINV1*(*Kpn* I) : CTGGTACCATGCGACTTGAAAC 、 p*MeCWINV1*(*Sal* I) : ACGCGTCGACCTCTATTTCCCTCT, 将 PCR 产物纯化后与 pAbAi 质粒一同用限制性内切酶 *Kpn* I、*Sal* I 双酶切。将酶切的 PCR 产物和 pAbAi 进行纯化、连接、转化大肠杆菌 DH5 α 以及菌液 PCR 鉴定, 随机选取 PCR 鉴定正确的阳性单克隆送测, 将测序正确的菌样扩大培养、质粒抽提 p*MeCWINV1*-AbAi 重组质粒。

(3) 酵母 Y1HGold 转化

①pGADT7-*MeAHL31*、p*MeCWINV1*-AbAi 转化酵母 Y1HGold:

1) pGADT7-*MeAHL31*、P*MeCWINV1*-AbAi 质粒各 1 μg 加入 Y1HGold 感受态, Carrier DNA 快速冰浴, 重复一次, 加入 500 μL 的 PEG/LiAc 混匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。

2) 将 1)管放 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min。

3) 5000 rpm 离心 1 min 倒掉上清, 加 400 μL ddH₂O 重悬, 5000 rpm 离心 45 s 倒掉上清。

4) 加 50 μL ddH₂O 重悬, 将菌液涂在 SD/-L 板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48-96 h。

在 YEP 平板上随机挑选 8 个单克隆分别到 500 μL SD/-L 液体培养基中培养, 菌液做模板, 质粒 DNA 做阳性对照, 进行菌液 PCR 鉴定, PCR 体系及程序参照 2.2.3, 扩大培养并保菌。

②pGADT7、p*MeCWINV1*-AbAi 转化酵母 Y1HGold: 实验方法参照(王硕, 2018)。

③pGADT7-*MeAHL31*、pAbAi 转化酵母 Y1HGold: 实验方法参照(王硕, 2018)。

④pGAD-*Rec2-53*、p53*HIS2*-AbAi 转化酵母 Y1HGold: 实验方法参照(王硕, 2018)。

2.2.6 酵母单杂交验证 *MeAHL31* 与 *MeCWINV1* 启动子结合

实验方法参照(王硕, 2018), 将 Y1HGold/pGADT7-*MeAHL31*+p*MeCWINV1*、Y1HGold/pGADT7+p*MeCWINV1*- AbAi、Y1HGold/pGADT7-*MeAHL31*+pAbAi、Y1HGold/pGAD-*Rec2-53*+ p53*HIS2*- AbAi 四种菌接种到 SD/-L 液体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 培养至 OD₆₀₀= 0.6。用无菌水将部分菌液稀释十倍, 将两组浓度的菌液分别点板到不含 AbA 和含有 150 ng/mL AbA 的 SD/-L 平板上, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 72 h 观察现象。

2.2.7 凝胶迁移滞后实验 (EMSA)

(1) 克隆并纯化 *MeCWINV1* 基因启动子 DNA 片段

以 p*MeCWINV1*-F : ATGCGACCTGAACTTAGC , p*MeCWINV1*-R : GATGTTCTGTAAGGTTGGGT, 克隆 *MeCWINV1* 基因 865 bp 启动子片段。PCR 体系及程序参照 2.2.3, 扩大培养并保菌。PCR 产物试剂盒进行胶回收:

1) 切下目的条带放进称重后的试管中; 再次称重, 计算胶块重量。

2) 加 Binding Buffer, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5-10 min, 使胶块完全溶解。

3) DNA 过滤柱中加入 2)溶液, 多次加入 12000 rpm 离心 1 min, 弃掉管中液体。

4) 加 300 μL Binding Buffer, 10000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中液体。

5) 加 700 μL SPW, 10000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中液体。

6) 12000 rpm, 空柱离心 2 min。

7) 移到新的 1.5 mL 离心管中, 开盖静置挥发乙醇。

8) 向膜中央加 50 μL ddH₂O 溶解 DNA。

9) 12000 rpm 离心 1 min, 收集 DNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) MBP 标签的剪切和 *MeAHL31* 蛋白的纯化

实验方法参照(王硕, 2018), 重组烟草蚀纹病毒蛋白酶(rTEV 蛋白酶)对纯化的 MBP-MeAHL31 融合蛋白进行 MBP 标签剪切。MBP-MeAHL31 融合蛋白酶切后, 对上清液进行纯化得到 MeAHL31 蛋白溶液。

(3) 凝胶迁移滞后实验(EMSA)

Electrophoretic Mobility-Shift Assay (EMSA) Kit 进行凝胶迁移滞后实验, 实验方法参照(王硕, 2018)。

2.2.8 双荧光素酶实验

(1) 构建表达载体 pGreenII-MeCWINV1-LUC

根据 MeCWINV1 基因启动子序列设计引物: pMeCWINV1-F (*Kpn* I): CTGGTACCATGCGACTTGAAAC , pMeCWINV1-R (*Bam*H I) : GTGGATCCCTCTATTTCCCTC, 实验方法参照(胡艳平, 2017; 王硕, 2018), 以 pMD19T-pMeCWINV1 质粒(实验室保存)为模板, 克隆 MeCWINV1 启动子序列。PCR 产物纯化后与 pGreen II 0800 质粒一同用限制性内切酶 *Kpn* I、*Bam*H I 进行双酶切, 纯化、连接、转化鉴定并送测。菌样扩大培养, 抽提重组质粒 pGreen II -MeCWINV1-LUC。

(2) 构建表达载体 pGreenII-62-sk-MeAHL31

根据 MeAHL31 基因的 cDNA 序列设计引物, MeAHL31-F (*Sac* I) : TAGAGCTCATGGCAAATCGCTGGT、MeAHL31-R (*Bam*H I) : TCGGATCC TCAGTAATTGGGAGGT。以 pMD19T-MeAHL31 质粒(本实验室前期保存)为模板, 克隆 MeAHL31 基因 CDS 区序列。将 PCR 产物纯化后与 pGreenII-62-sk 质粒一同用限制性内切酶 *Sac* I、*Bam*H I 双酶切。纯化、连接、转化鉴定并送测。扩大培养, 抽提重组质粒 pGreen II-62-sk-MeAHL31。

(3) 农杆菌 GV3101 的转化

① pGreen II -MeCWINV1-LUC 和表达辅助质粒 pSoup 共同转化农杆菌 GV3101 转化方法参照 2.2.2。

(4) 烟草转化和瞬时表达

1) GV3101/pGreen II -MeCWINV1-LUC 、 GV3101/pGreen II -62-sk-MeAHL31、GV3101/pGreenII-62-sk 接种到 YEP 液体培养基(100 µg/mL Rif、50 µg/mL Kan 和 20 µg/mL Tet)中, 30°C, 220 rpm 扩大培养至 OD600=0.6 左右。

2) 5000 rpm, 10 min 离心集菌。

3) 将菌体用侵染液重悬至 OD600=1.0, 室温静置 2 h。

4) GV3101/pGreenII-MeCWINV1-LUC 与 GV3101/pGreen-62-sk-MeAHL31 和 GV3101/pGreenII-62-sk 以 1:2 的体积比混匀。

5) 两种混合菌液注射长势良好的三生烟叶片。

6) 25°C 条件下培养 72 h 左右, 每 24 h 向叶片喷水 1-2 次, 保持土壤湿润。

7) 打孔器取材, -80°C 保存实验方法参照(王硕, 2018)。

(5)双荧光素酶活测定

采用 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 试剂盒检测荧光素酶活性。

2.2.9 SC8 木薯的遗传转化

(1)农杆菌侵染 SC8 木薯脆性胚性愈伤及植株再生

我们借鉴 Nyaboga 等文献中关于木薯脆性愈伤组织的遗传转化方法，再依据实际操作经验进行改动后运用于我们的实验，步骤如下：

1)将前面 2.3.1 进行亚细胞定位研究制备好的 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 质粒转化农杆菌 GV3101 扩大培养至 OD600 大约 0.75-1.0，取 20 mL 菌液到 50 mL 无菌离心管中，5000 rpm 4℃离心 10 min 收集菌体。

2)用 20 mL GD 液体培养基清洗菌体，5000 rpm 4℃离心 10 min 收集菌体，重复两次。

3)液体 GD 培养基(200 μmol/L 乙酰丁香酮的)重悬农杆菌至 OD600=0.25 并分管。

4)适量质量良好的脆性愈伤放到重悬好的 25 mL 农杆菌中，轻轻晃散愈伤，1000 rpm 4℃离心 10 min，然后放到愈伤摇床中 60 rpm 28 °C摇菌 30 min，使农杆菌与愈伤组织充分接触。

5)将脆性愈伤转移到覆有孔径大小为 100 μm 的尼龙网的吸水纸上，去除多余的水分，再将脆性愈伤转移到含 200 μmol/L 乙酰丁香酮的固体 GD 培养基，22℃暗培养 3 d。

6)用含 500 mg/L 羧苄青霉素的液体 GD 培养基清洗共培养后的脆性愈伤，重复 2-4 次，利用吸水纸吸去脆性愈伤多余液体 GD。转移到 GD 固体培养基(含有 250 mg/L 羧苄青霉素)上，在 16 h 光照 28℃的培养室内培养 7 d。

7)转移到新的 GD 固体培养基 (250 mg/L 羧苄青霉素，5 mg/L 潮霉素)中，16 h 光照 28℃的培养室内培养 7 d，重复两次，潮霉素浓度依次为提高 8 mg/L、15 mg/L。

8)脆性愈伤转移到含有 250 mg/L 羧苄青霉素，15 mg/L 潮霉素的体胚形成培养基 MSN 上，28℃，16 h 光照的培养室内培养 7 d，重复两次于子叶长出。

9)挑取尼龙网上的子叶到含有 0.4 mg/L 6-BA 的 CEM 培养基中，28℃，16 h 光照培养室内培养 7 d；子叶转移至 COM 固体培养基(含有 1 mg/L 6-BA 的)，7 天换一次培养基，14 d 后子叶出芽，MS 培养基(50 mg/L 羧苄青霉素)放入切下小芽，组培室培养 3-4 周。

10)扩繁时切下茎段，生根筛选 2-3 周，MS 培养基(50 mg/L 羧苄青霉素)，(10 mg/L 潮霉素)。

11)待生根的准阳性苗长到半瓶高时，继代到无潮霉素的 MS 培养基(50 mg/L 羧苄青霉素)上成苗，留作后期实验。

2.2.10 转基因木薯的鉴定

(1)转基因木薯基因组 DNA 的提取

取 *MeAHL31* 过表达转基因木薯组培苗清洗干净，利用 Plant DNA Isolation Kit 试剂盒提取样品 DNA。

1) 600 μL Buffer PL1, 20 μL Foregene Protease 及 2 μL β -巯基乙醇加入 2 mL 无菌离心管中，充分混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中预热。

2) 液氮研磨样品迅速取 100-200mg 加入(1)管中，迅速颠倒混匀，65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min, 10 min 颠倒混匀一次。

3) 将 600 μL Buffer PL2 加入(2)管中充分混匀后，65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。

4) 将 3)管 12000 rpm 离心 10min, 上清液转移到新 2 mL 无菌离心管，加入 180 μL 无水乙醇涡旋混匀。

5) 750 μL 混合液加入离心柱 12000 rpm 离心 1 min, 弃掉废液，分次加入直至过滤完。

6) 在 5)管的离心柱中加入 500 μL Buffer PW, 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。

7) 在 6)管加 700 μL Buffer WB(已加入无水乙醇), 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液，重复一次。

8) 空柱 12000 rpm 离心 2 min。

9) 将 8)中空离心柱转移至新的 1.5 mL 无菌离心管在膜中央悬空加入 100 μL 已于 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 ddH₂O, 室温放置 5 min, 12000 rpm 离心 1 min, 重复一次, 5 μL DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱以备后续实验。

(2) 转基因木薯的 PCR 鉴定

用转基因木薯组培苗 cDNA 做模板，用引物为 GFP-F: TTTGGAGAGAACACGGGGGA；GFP-R: CAGGGTCAGCTTGCCGTAG 来检验 *MeAHL31* 的 T-DNA 是否插入木薯基因组中。利用 TaKaRa Ex Taq[®](Code: RR001A) 酶进行 PCR 扩增，反应体系如下表：

反应体系	体积
TaKaRa Ex Taq	0.1 μL
10 \times PCR Ex Taq Buffer(Mg ²⁺ Plus)	2 μL
模板(小于 500 ng)	2 μL
正向引物 F (10 μM)	1 μL
反向引物 R (10 μM)	1 μL
ddH ₂ O	13.9 μL
Total	20 μL

PCR 反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 3 min。PCR 产物进行电泳检测。

2.2.11 转基因木薯中基因的表达分析

(1) 转基因木薯总 RNA 的提取及反转录

①总 RNA 的提取

采用 Plant Total RNA Isolation Kit 试剂盒进行 RNA 的提取，实验方法参照(王硕, 2018)

②反转录

本实验采用试剂盒进行反转录，主要包括两个过程：去 DNA 反应和反转录反应。实验方法参照(王硕, 2018)。

2.2.12 转基因木薯中基因的 Real-Time qPCR 分析

(1) 将上述反转录得到的 cDNA 稀释 10 倍作为模板，对 *MeAHL31* 基因和 *MeCWINV1* 基因进行实时荧光定量 PCR，木薯 *Tubulin* 基因(Phytozome name: 4.1_007598m.g)为内参。

基因名称	引物序列(5'→3')
Tubulin-F	ATGCGGTTCTTGATGTGTTC
Tubulin-R	TCGGTGAAGGGAATACAGAGA
<i>MeAHL31</i> -F	CTAAGCTTATGGCAAATCGCTG
<i>MeAHL31</i> -R	AGCTCGAGTCAGTAATTGGGAG
<i>MeCWINV1</i> -F	CAATGGAAGTCAAGCATAACC
<i>MeCWINV1</i> -R	TCTCAAACATACCCACAAAACA

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

Table Primers for Real-Time PCR

2.2.13 拟南芥的转化

- (1) 保存的菌液加入两瓶 500 mL YEP 液体培养基中，28°C 培养至 OD = 0.8-1.0。
- (2) 6000 rpm，离心 10 min 集菌，两瓶菌体合并弃上清，收集菌液。
- (3) 无菌真空侵染液洗涤菌液，离心倒掉洗涤液，500 mL 真空侵染液重悬，调整 OD₆₀₀=1.0 左右，加 500 μL Tween20 混匀，室温静置 2 h。
- (4) 把装有农杆菌真空渗入液的烧杯放入真空转化仪器中，小心将剪掉已开花花序的野生型拟南芥倒置于烧杯上，真空泵 0.8 MPa 中抽真空 10 min 后停止。
- (5) 取出拟南芥，平置于保湿、遮光的容器中，容器内铺上报纸将报纸用水湿润保湿，闭光放置过夜。
- (6) 24 h 后拟南芥放入组培室培养，22°C、16 h，相对湿度 80% 条件下培养。

2.2.14 转基因拟南芥抗性筛选和移栽

- (1) 适量的拟南芥 T1 代种子，根据 2.2.14 的方法将种子消毒灭菌。
- (2) (1) 中拟南芥种子播种于含有适当浓度的潮霉素抗性(MS + 50 μg/mL 潮霉素 Hygromycin + 50 μg/mL 羧苄青霉素)MS 固体培养基平板上。

- (3) 4°C, 36-48 h 后, 光照强度 4000 lx, 22°C光照时间 8 h/d 培养。
- (4) 10 d 左右可判断出幼苗是否有抗性, 抗性苗可正常生长。
- (5) 长到 4-5 对真叶后可移栽到花盆, 培养条件参照(耿梦婷, 2017)。

2.2.15 转基因拟南芥的鉴定

- (1) 转基因拟南芥基因组 DNA 的小量提取

提取方法参照 2.2.11。

- (2) 转基因拟南芥的 PCR 鉴定

鉴定方法参照以及 PCR 反应程序及体系参照 2.2.11。

- (3) 转基因拟南芥总 RNA 的提取及反转录

实验方法参照 2.2.13。

- (4)转基因拟南芥的 RT-PCR 鉴定

对鉴定出来的阳性株进行 RT-PCR 鉴定, 运用 PCR 反应条件: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 10 s, 52°C 退火 10 s, 72°C 延伸 15 s, 33 个循环; 72°C 充分延伸 2 min。PCR 扩增反应结束后, 再将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.16 转基因拟南芥表型观察及基因表达分析

将鉴定为阳性的过表达株系与拟南芥野生型比较, 二者同期种植并在同一培养室中培养生长, 观察野生型和过表达株系叶片形状及数目, 果荚生长状态及数目, 台式显微镜下观察二者的花药是否开裂, 用亚历山大法鉴定花粉的活性。果荚长到 10d 左右观察野生型和突变体的形态及饱满程度; 果荚生长到 20 d 左右观察比较二者的种子数目, 判断其育性是否下降以及降低的程度。

- (1)转基因拟南芥开花相关基因的表达量分析

以转基因拟南芥 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应, 扩增体系及反应条件参照, qRT-PCR 引物设计参照(肖朝文, 2009)。qRT-PCR 反应在 96 孔板上进行, 内参基因为 *ACT2*。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

- (2)转基因拟南芥下胚轴相关基因的表达量分析方法同上。

- (3)转基因拟南芥主根相关基因的表达量分析方法同上。

3 结果与分析

本课题组前期从木薯酵母单杂交文库中筛选到一个与木薯细胞壁转化酶 *MeCWINV6* 启动子结合的 AT-hook 转录因子家族基因 *MeAHL31* (GenBank No. MH559128)。PlantCARE 生物信息学分析发现木薯另一个细胞壁转化酶—*MeCWINV1* 启动子上也存在 AT-hook 转录因子结合的潜在顺式作用元件 AT1-motif (图 10)。

```

-865 ATGCGACTTGAAACTTAGCAAAAAAGCAGGAAAACCTATAGCTAGCTTTC
-815 CATGAAATTAGAGTTGCTAGACCTGATTTTGCATTCTAATAATTATTTTC
-765 ATAACCCATAAAAAATCATTATTTTCAATCACTT AATTTTTTTTTTATTAA
-715 TTTATTTGTGATTATTAACCATGTGAATTTTTGTATCCAACCTGTTGAATG
-665 GGCTCCCATTTTAAAGATCCATGCTCTATCTGTTAAGCTAAATGAAAGAG
-615 TTGAAGTTGAAAGTTGAAACTGAACCCTCAATAGGCCTTTACACTTCCCA
-565 GAAGTTGGGCTCCACCATCTACATCTGCTTGCATGAGAATTCAGAATTGA
-515 GAAGTTGGGCTCCATCCATCCCCCTTCTGCATGCATGAGAATTGAGAAGTT
-465 GGATGCTACAGTAATCAGAAAAGATGAAAAGTGTGGCTGCAGGAGGTCTGA
-415 AAGTTGAGCTGGGTACTCTTTTATCAGATTAGTCTTCATTACAGTAGCCCA
-365 GATCTAGGATTTCCACAGATGGTTGCTTTTATTCTATCCACTAGGCTCAA
-315 CAGAATAGAAAATTCATACTGAAAACGACTTTAGTCTTCAATTATTGGA
-265 GAAGTTTGTCTTCAGCAGTCTTCTTTCCCCCTTTTTTTTTTTTATCATCT
-215 TTTAGCTTGTGCTGGGTATTCAAACCTTTATTCTTATTATTATCAATTT
-165 TTTTTTGTGATTGAGCAATCAAACCTCATCCAAATTGTAATGATTCTTCTG
-115 GGTATTTCTTGTAATGATTCCTTTCCTTCATATGAAATACTAGTTCCAA
-65 AATCAGAGGAAACA CACTTCTTTGTTGCTGATATTCATAGTCTGTTTCC
-15 AGAGGGAAAATAGAG atg

```

图 10 *MeCWINV1* 启动子序列及 AT1-motif 顺式作用元件分析

注：阴影部分：AT1-motif；atg 框：翻译起点

Figure 10 The Promoter Sequence and the AT1-Motif of *MeCWINV1*.

Note: The AT1-motif is shown in shadow, and the box represents the translation start site ATG.

为了验证 *MeAHL31* 能否与 *MeCWINV1* 启动子发生结合，首先对 *MeAHL31* 的转录活性、亚细胞定位等进行分析；接着利用酵母单杂交实验、凝胶迁移滞后 (EMSA) 实验和双荧光素酶实验探究 *MeAHL31* 与 *MeCWINV1* 启动子的结合作用。具体结果如下：

3.1 *MeAHL31* 转录活性鉴定

本课题组前期通过 AT-hook 蛋白特征基序 PF02178 从木薯数据库中检索筛选出木薯 AT-hook 转录因子家族基因 42 个，并对这 42 个家族成员进行了系统进化分析和蛋白保守基序分析。根据 Aravind 提出的 *AT-hook* 家族基因分类标准，我们得到的木薯 *MeAHL31* 基因含有 AT-hook motif 1 和 PPC/DUF296 结构域 A，属于 I 型 AT-hook 亚族。那么，*MeAHL31* 是否具有转录因子的转录活性呢？本论文通过转录激活实验来进行验证。

本实验采用酵母双杂交技术 (Y2H) 对 *MeAHL31* 的转录激活活性进行鉴定。将 *MeAHL31* 基因 1014 bp 的 CDS 区克隆到 GAL4-DNA-BD 载体 pGBKT7 中，得到 pGBKT7-*MeAHL31* 重组质粒 (图 11)。

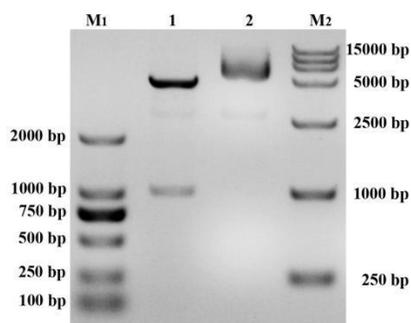


图 11 pGBKT7-*MeAHL31* 的酶切鉴定

注：M1：2000 DNA marker；1： *MeAHL31* 基因 PCR；2： pGBKT7- *MeAHL31* 酶切结果；M2：15000 DNA marker。

Figure 11 Enzyme Digesting Identification of pGBKT7- *MeAHL31*

Note: M1: 2000 DNA marker ; 1: PCR amplification of *MeAHL31*; 2: Enzyme digesting of pGBKT7- *MeAHL31*; M2: 15000 DNA marker.

转化至酵母 AH109 的 pGBKT7-*MeAHL31* 培养 OD600=0.6 左右后，涂在有 X- α -gal (10 mg/mL) 的 SD/-T 平板上，30°C 避光培养 36 h 左右，pGBKT7 (阴性对照)、pGBKT7-*p53* + pGADT7-*largeT* (阳性对照)。若 *MeAHL31* 具有转录激活活性，就能启动下游报告基因的表达，使酵母分泌 α -半乳糖苷酶分解底物 X- α -gal，从而产生蓝色菌斑。实验结果显示：pGBKT7-*MeAHL31* 出现蓝色菌斑，与 pGBKT7-*p53* + pGADT7-*largeT* 阳性对照结果一致，而阴性对照 pGBKT7 的菌落颜色是乳白色 (如图 12)。证明 *MeAHL31* 具有转录激活活性，实验结果与生物信息学预测一致，证明 *MeAHL31* 是一个转录因子。

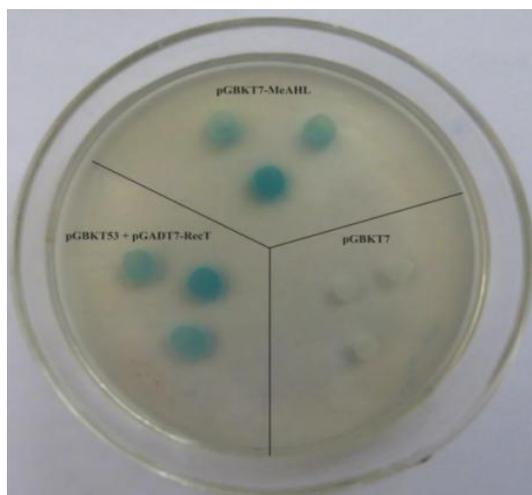


图 12 *MeAHL31* 基因的转录活性鉴定

Figure 12 Identification of the Transcriptional activity of *MeAHL31* Gene

3.2 *MeAHL31* 的亚细胞定位观察

通过烟草瞬时表达实验对 *MeAHL31* 进行了亚细胞定位，以此来研究 *MeAHL31* 在细胞中发挥功能的具体位置。

3.2.1 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 植物表达载体的构建

重组质粒 pMD19T-*MeAHL31* 为模板，克隆 *MeAHL31* 基因。纯化后的 PCR 产物和 pCAMBIA1300-GFP 质粒一同用限制性内切酶 *Spe* I、*Bam*HI 进行酶切。将酶切后的 PCR 产物与 pCAMBIA1300-GFP 进行纯化、连接、转化至大肠杆菌 DH5 α ，再进行菌液 PCR 鉴定。PCR 鉴定正确的阳性单克隆送生工测序。将测序正确的菌样扩大培养，用试剂盒抽提 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 重组质粒，将 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 重组质粒用限制性内切酶 *Spe* I、*Bam*HI 进行酶切验证，结果如图 13。

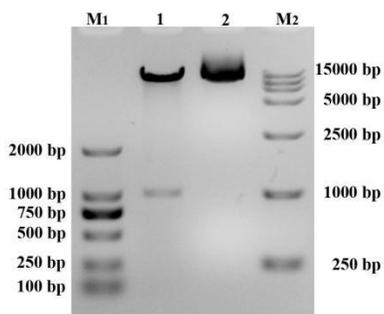


图 13 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 植物表达载体的鉴定

注：M1：2000 DNA marker；1：pCAMBIA1300-GFP 载体电泳；2：pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 双酶切鉴定；M2：15000 DNA marker。

Figure 14 Identification of pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP Plant Expression Vector

Note: M1: 2000 DNA marker; 1: pCAMBIA1300-GFP vector electrophoresis; 2: pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP double digestion identification; M2: 15000 DNA marker.

3.2.2 *MeAHL31* 的亚细胞定位观察

利用质粒试剂盒大提重组质粒 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 和 pCAMBIA1300-GFP。将上述质粒通过 PEG-CaCl₂ 法注射到烟草叶片原生质体中，25℃弱光下放置过夜，1-3d 后在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白的分布。通过观察绿色荧光蛋白 GFP 分布来确定 *MeAHL31* 在细胞中发挥功能的位置。共聚焦图像显示（如图 14）：转化 pCAMBIA1300-GFP 质粒的烟草细胞中绿色荧光蛋白 GFP 分布在整個细胞中，转化 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 重组质粒的烟草细胞中绿色荧光蛋白 GFP 在细胞核、细胞质和细胞膜中也都有分布，这些实验结果表明 *MeAHL31* 蛋白定位在整个细胞中，在整个细胞中都可发挥其功能。

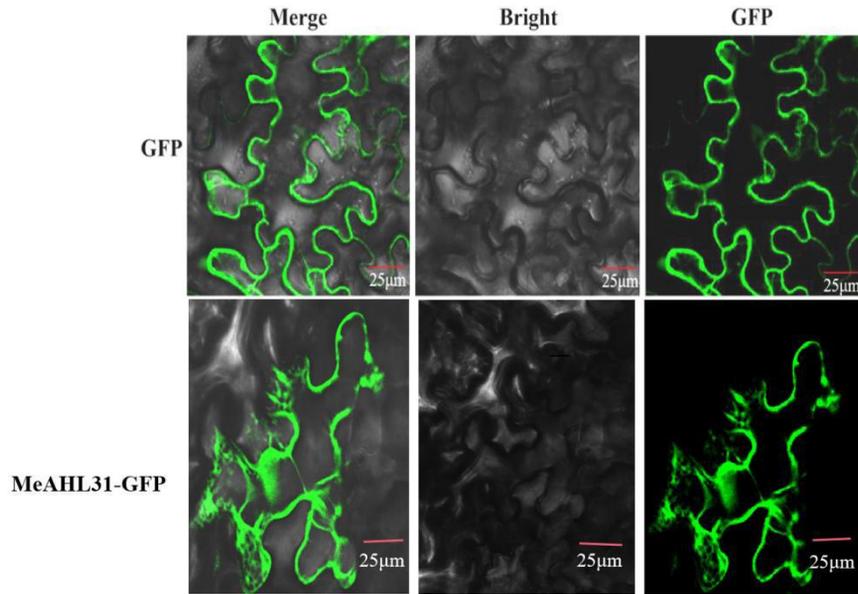


图 14 MeAHL31 在烟草叶片细胞中的定位

Figure 14 Subcellular Localization of MeAHL31 in Tobacco Leaves

3.3 MeAHL31 蛋白的原核表达及纯化

3.3.1 pET28a-MBP-MeAHL31 原核表达载体的构建

前期我们分别选用 pGEX-6p-1 和 pET28a 两种原核表达载体，通过优化诱导温度、起始菌液浓度、IPTG 浓度以及诱导时间，在大肠杆菌 BL21(DE3)中对 MeAHL31 蛋白多次进行原核表达及纯化实验，但 MeAHL31 蛋白表达量极低，无法用于下游实验。因而本实验后续选用 pET28a-MBP 原核表达载体进行 MeAHL31 蛋白的原核表达。

根据 *MeAHL31* 基因序列信息，设计添加 *Hind* III、*Xho* I 酶切位点的引物，以 pMD19T-*MeAHL31* 重组质粒为模板，克隆获得 *MeAHL31* 基因 1014 bp 全长 CDS 区片段。将酶切后的 PCR 产物与 pET28a-MBP 纯化、连接、转化至大肠杆菌 DH5 α ，菌液 PCR 鉴定并送生工测序。菌样扩大培养并抽提 pET28a-MBP-*MeAHL31* 重组质粒，将重组质粒 pET28a-MBP-*MeAHL31* 用限制性内切酶 *Hind* III、*Xho* I 进行酶切验证。重组质粒经双酶切电泳后显示两条带，一条为载体条带，另一条带为 *MeAHL31* 基因的目的片段，大小符合预期，表明已成功构建重组质粒 pET28a-MBP-*MeAHL31* (图 15)。

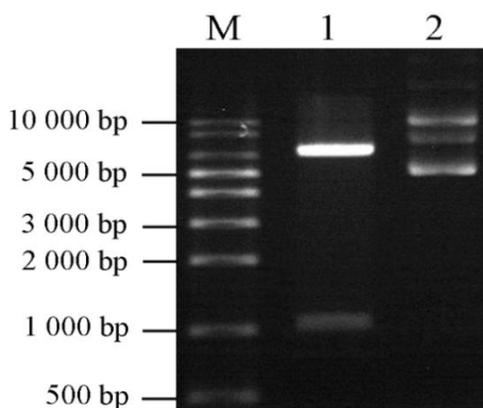


图 15 pET28a-MBP-MeAHL31 原核表达载体的酶切鉴定

注: M:15000 DNA marker ; 1: *Hind* III和 *Xho*I双酶切鉴定; 2: 未酶切质粒。

Figure 15 Enzymic Digestion Identification of the pET28a-MBP-MeAHL31 Prokaryotic expression vector

Note: M: 15000 DNAmarker; 1: Plasmid digested by *Hind* III and *Xho*I; 2: pET28a-MBP-MeAHL31 plasmid.

3.3.2 MeAHL31 在大肠杆菌 BL21(DE3)中的优化表达

转化后的 BL21(DE3)/pET-28a-MBP-MeAHL31 分别接种到 LB 液体培养基中, 扩大培养 OD600 = 0.6 左右, 添加 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L, 分别在 15°C 诱导 16 h 和 37°C 诱导 4 h, 其中一瓶不做诱导作为阴性对照。菌液离心分别对上清和沉淀制样。对该菌体的总蛋白、上清蛋白和沉淀蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测。实验结果如图 16 所示: 15°C 诱导 16 h 和 37°C 诱导 4 h 后的 BL21(DE3)/pET28a-MBP-MeAHL31, 在大约 80 kD 处均有明显的蛋白条带出现, 与预测的蛋白大小相符; 在 15°C 诱导 16 h 的蛋白表达量高于 37°C 诱导 4 h。该结果表明, MeAHL31 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的最优诱导表达条件是 OD600=0.6, IPTG 浓度为 1.0 mmol/L, 15°C 培养 16 h。

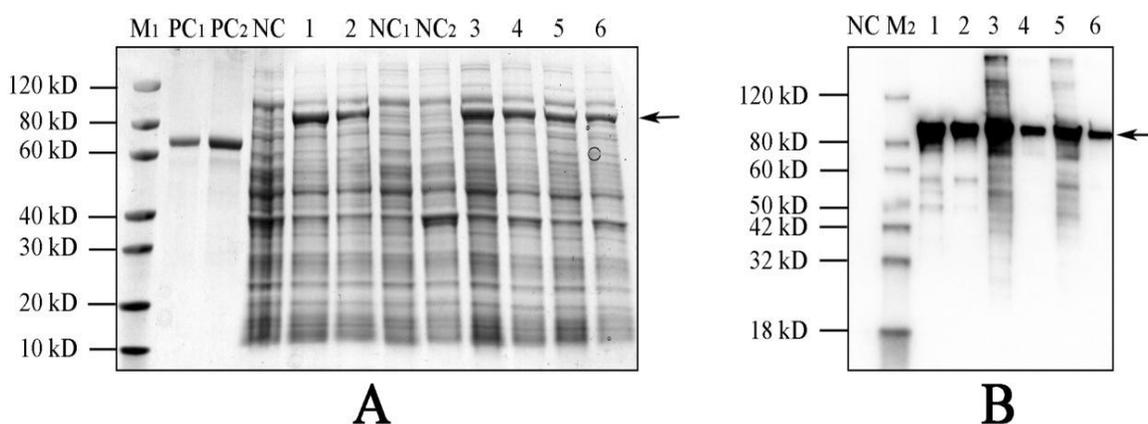


图 16 SDS-PAGE (A)和 western blot (B)检测 pET28a-MBP-MeAHL31 融合蛋白在 BL21 (DE3)中的诱导表达

注: M1: 蛋白分子标尺; M2: Western blot 分子标尺; PC1: BSA (1 µg); PC2: BSA (2 µg); NC: 未诱导的 BL21 (DE3)/pET28a-MBP-MeAHL31 菌体总蛋白; 1: 15°C 诱导 16 h 的菌体总蛋白; 2: 37°C

诱导4 h的菌体总蛋白；NC1: 未诱导的菌体上清蛋白；NC2: 未诱导的菌体沉淀蛋白；3~4: 15°C 诱导16 h的菌体上清蛋白(3)和沉淀蛋白(4)；5~6: 37°C诱导4 h的菌体上清蛋白(5)和沉淀蛋白。

Figure 16 SDS-PAGE (A) and Western Blot (B) Analysis for MeAHL31 Cloned in pET28a-MBP and Expressed in BL21 (DE3) Strain.

Note: M1: Protein marker; M2: Western blot marker; PC1: BSA (1 μ g); PC2: BSA (2 μ g); NC: BL21 (DE3)/pET28a-MBP-MeAHL31 Cell lysate without induction; 1: Cell lysate with induction for 16 h at 15°C; 2: Cell lysate with induction for 4 h at 37°C; NC1: Supernatant of cell lysate without induction;

NC2: Debris of cell lysate without induction; 3~4: Supernatant of cell lysate (3) and Debris of cell lysate (4) with induction for 16 h at 15°C; 5~6: Supernatant of cell lysate (5) and Debris of cell lysate (6) with induction for 4 h at 37°C.

3.3.3 MBP-MeAHL31 融合蛋白的纯化

15°C诱导 16 h 的 BL21(DE3)/pET-28a-MBP-MeAHL31 菌体超声波破碎后取上清液进行纯化。纯化后的样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析和 western blot 检测。结果如图 17: SDS-PAGE 凝胶电泳显示纯化得到的蛋白条带大小符合预期；用 His 标签抗体和 MBP 标签抗体进行 western blot 检测同样在目标位置获得预期大小的条带。说明纯化所得溶液即 MBP-MeAHL31 纯化蛋白。

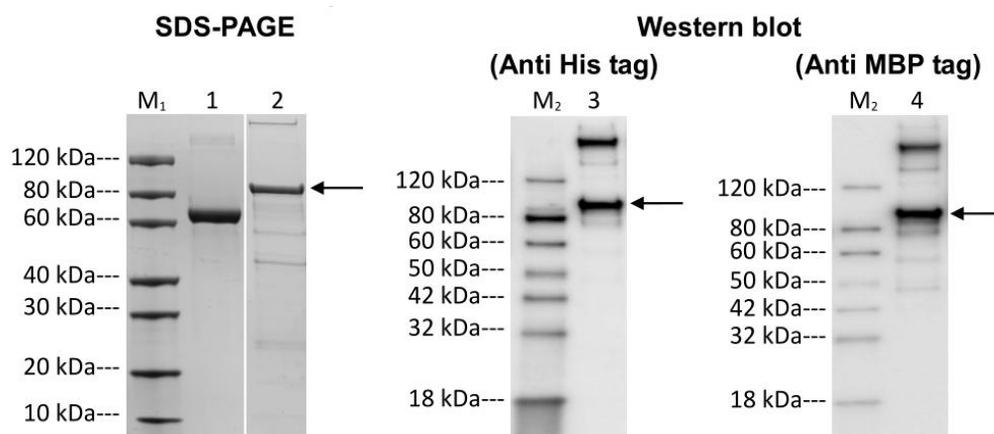


图 17 MBP-MeAHL31 蛋白的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析

M1 道: 蛋白质标记; M2 道: 蛋白质标记; 泳道 1: BSA (2.00 μ g); 泳道 2: MeAHL31 (2.00 μ g); 泳道 3: MeAHL31 泳道 (His 标签); 4: MeAHL31 (MBP 标签)。

Figure 17 SDS-PAGE and Western Blot Analysis of MBP-MeAHL31 Protein

Lane M1: protein marker; Lane M2: protein marker; lane 1: BSA (2.00 μ g); lane 2: MeAHL31 (2.00 μ g); lane 3: MeAHL31 lane (His tag); 4: MeAHL31 (MBP tag).

3.4 MeAHL31 与 MeCWIN1 启动子相互作用的初步探索

为了探究 MeAHL31 是否真正与木薯 MeCWIN1 启动子具有结合作用，分别通过酵母单杂交实验、凝胶迁移滞后实验和双荧光素酶实验对 MeAHL31 与 MeCWIN1 启动子的结合与互作进行分析。

3.4.1 MeAHL31 与 MeCWIN1 启动子的体内结合验证

(1) pGADT7-MeAHL31 和 pMeCWIN1-AbAi 重组载体的构建

将构建的重组质粒 pGADT7-*MeAHL31* 用限制性内切酶 *Nde*I、*Bam*H1 进行酶切验证，结果如图 18。

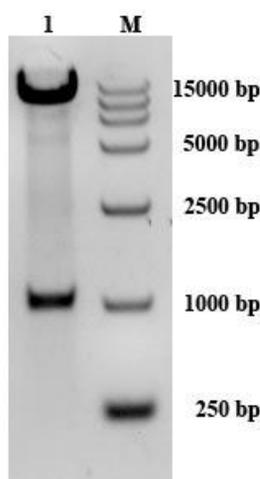


图 18 pGADT7-*MeAHL31* 的酶切鉴定

注：M：15000 DNA marker；1：pGADT7-*MeAHL31* 的酶切结果。

Figure 18 Enzyme Digesting Identification of pGADT7-*MeAHL31*

Note: M: 15000 DNA marker; 1: Enzyme digesting of pGADT7-*MeAHL31*.

以本实验室前期构建的 pMD19T-p*MeCWINV1* 质粒为模板，根据 *MeCWINV1* 基因启动子序列 (NCBI GenBank No. KC465190) 信息设计引物，克隆 *MeCWINV1* 基因 865 bp 潜在启动子序列。p*MeCWINV1*(*Kpn* I): CTGGTACCATGCGACTTGAAAC、p*MeCWINV1*(*Sal* I): ACGCGTCGACCTCTATTTCCCTCT，参照上述构建载体方法，获得 p*MeCWINV1*-AbAi 重组质粒，进行限制性内切酶 *Kpn* I、*Sal* I 酶切验证，结果如图 19。



图 19 p*MeCWINV1*-AbAi 的酶切鉴定

注：M1：2000 DNA marker；1：*MeAHL31* 基因 PCR；2：p*MeCWINV1*-AbAi 的酶切结果；M2：15000 DNA marker。

Figure 19 Digestion Identification of p*MeCWINV1*-AbAi

Note: M1: 2000 DNA marker; 1: *MeAHL31* gene PCR; 2: p*MeCWINV1*-AbAi digestion results; M2: 15000 DNA marker.

(2)验证 *MeAHL31* 与 *MeCWINV1* 启动子体内结合

pGADT7-*MeAHL31*+pAbAi 为阴性对照，pGAD-Rec2-53+p53HIS2-AbAi 为阳性对照。若 *MeAHL31* 可与 *MeCWINV1* 基因启动子结合，*MeAHL31* 融合的 AD

(Activation domain) 可启动下游报告基因的表达使酵母具有 AbA 抗性, 在 SD/-L 液体培养基中培养至 OD600 = 0.6, 无菌水稀释十倍后点到不含 AbA 和含有 150 ng/mL AbA 的 SD/-L 平板上, 30°C 培养 72 h 左右。结果如图 20, 四种转化子在不含 AbA 的 SD/-L 平板上都能正常生长; 只有 pGADT7-MeAHL31+pMeCWINV1-AbAi 转化子和阳性对照在含有 150 ng/mL AbA 的 SD/-L 平板上能正常生长, 两个阴性对照不能正常生长, 实验证明 MeAHL31 能够与 MeCWINV1 启动子在生物体内发生结合。

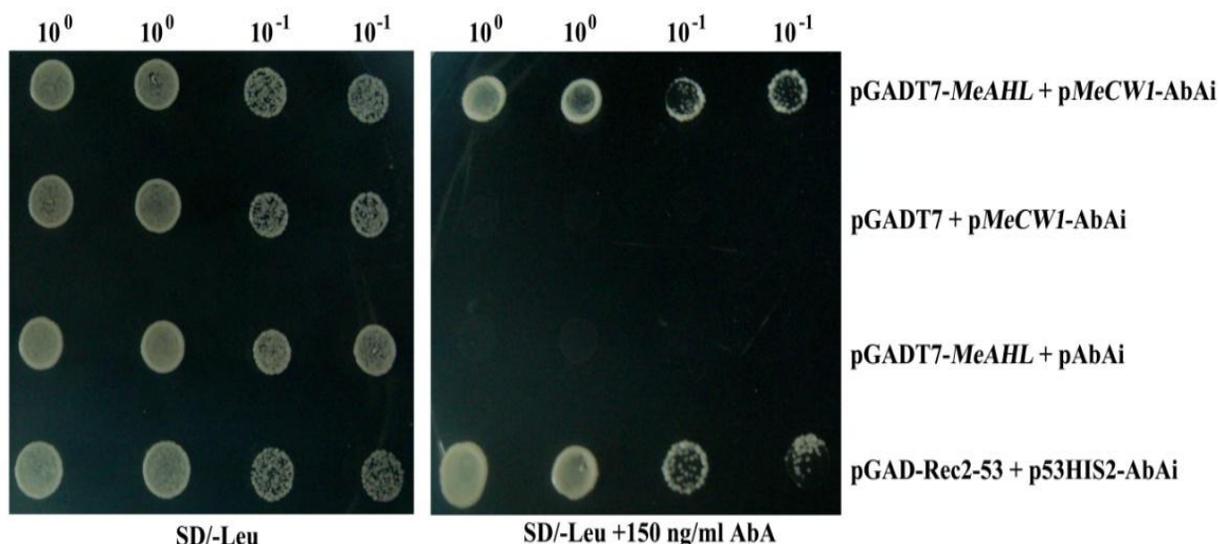


图 20 MeAHL31 与 MeCWINV1 启动子结合的验证

Figure 20 Identification of the Combination of MeAHL31 with MeCWINV1

3.5 MeAHL31 与 MeCWINV1 启动子的体外结合验证

对剪掉 MBP 标签的 MeAHL31 与 MeCWINV1 基因启动子进行凝胶迁移滞后实验, 用以验证 MeAHL31 与 MeCWINV1 基因启动子的体外结合。若 MeAHL31 可与 MeCWINV1 启动子结合会产生 DNA/MeAHL31 复合物(一条滞后条带)。本实验 7 个样品, 其中 1、6、7 为对照。结果如图 21: MeAHL31 与 MeCWINV1 启动子产生了一条滞后带, 且随着 MeAHL31 的增加滞后带亮度递增, 同时游离的 MeCWINV1 基因启动子条带亮度递减; 且 BSA 替代 MeAHL31 蛋白后无滞后带产生。实验结果证明 MeAHL31 与 MeCWINV1 基因启动子可在生物体外发生结合。

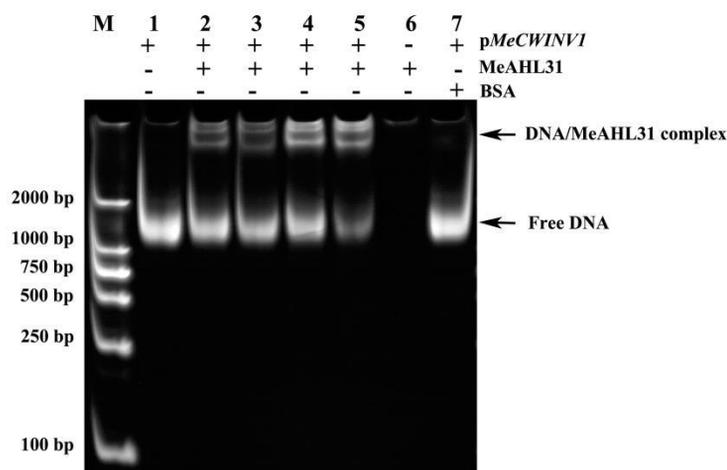


图 21 凝胶迁移滞后实验

注: M: 2000 DNA marker; 1: 0.5 μg *MeCWINV1* 基因启动子; 2: 0.5 μg *MeCWINV1* 基因启动子+0.1 μg MeAHL31 蛋白; 3: 0.5 μg *MeCWINV1* 基因启动子+0.15 μg MeAHL31 蛋白; 4: 0.5 μg *MeCWINV1* 基因启动子+0.2 μg MeAHL31 蛋白; 5: 0.5 μg *MeCWINV1* 基因启动子+0.25 μg MeAHL31 蛋白; 6: 0.25 μg MeAHL31 蛋白; 7: 0.5 μg *MeCWINV1* 基因启动子+0.25 μg BSA。

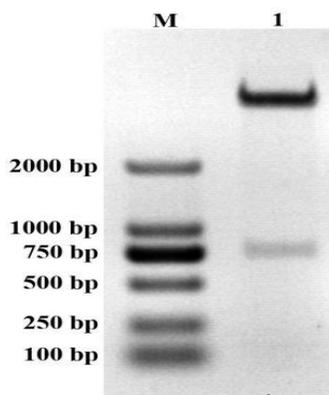
Figure 21 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Note: M: 2000 DNA marker; 1: 0.5 μg promoter of *MeCWINV1*; 2: 0.5 μg promoter of *MeCWINV1* + 0.1 μg protein of MeAHL31; 3: 0.5 μg promoter of *MeCWINV1* + 0.15 μg protein of MeAHL31; 4: 0.5 μg promoter of *MeCWINV1* + 0.2 μg protein of MeAHL31; 5: 0.5 μg promoter of *MeCWINV1* + 0.25 μg protein of MeAHL31; 6: 0.25 μg protein of MeAHL31; 7: 0.5 μg promoter of *MeCWINV1* + 0.25 μg protein of BSA.

3.6 MeAHL31 与 *MeCWINV1* 启动子植物体内结合验证

3.6.1 构建植物表达载体 pGreenII-*MeCWINV1*-LUC

以实验室保存重组质粒 pVKH-*MeCWINV1* 为模板, 根据 *MeCWINV1* 基因的启动子序列设计引物克隆 *MeCWINV1* 启动子, 构建载体 pGreenII-*MeCWINV1*-LUC 并抽提重组质粒。Kpn1、BamH1 进行酶切验证, 结果如图 22。

图 22 pGreenII-*MeCWINV1*-LUC 重组质粒的酶切鉴定

注: M: 2000 DNA marker ; 1: pGreenII-*MeCWINV1*-LUC 的酶切结果。

Figure 22 pGreenII-*MeCWINV1*-LUC Recombinant Plasmid Digestion Identification

Note: M: 2000 DNA marker; 1: digestion result of pGreenII-*MeCWINV1*-LUC.

3.6.2 构建植物表达载体 pGreenII-62-sk-*MeAHL31*

pMD19-T-*MeAHL31* 重组质粒为模板克隆 *MeAHL31* 基因。*Sac*I、*Bam*HI 进行酶切后纯化、连接、转化、鉴定并送测。扩大培养并抽提重组质粒 pGreenII-62-sk-*MeAHL31*，然后 *Nde*I、*Bam*HI 酶切验证，结果如图 23。

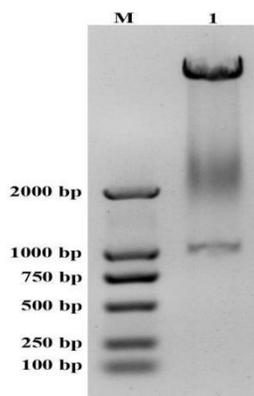


图 23 pGreenII-62-sk-*MeAHL31* 的酶切鉴定

注：M：2000 DNA marker；1：pGreenII-62-sk-*MeAHL31* 的酶切结果。

Figure 23 Enzyme Digesting Identification of pGreenII-62-sk-*MeAHL31*

Note: M: 2000 DNA marker; 1: Enzyme digesting of pGreenII-62-sk-*MeAHL31*.

3.6.3 *MeAHL31* 与 *MeCWINV1* 启动子的植物体结合验证

用双荧光素酶报告分析试剂盒对荧光素酶活性进行检测。结果如图 24，与对照相比 *MeAHL31* 的表达促进萤火虫荧光素酶（luciferase）表达，实验结果明，*MeAHL31* 可与 *MeCWINV1* 启动子在植物体发生结合并上调 *MeCWINV1* 启动子活性。

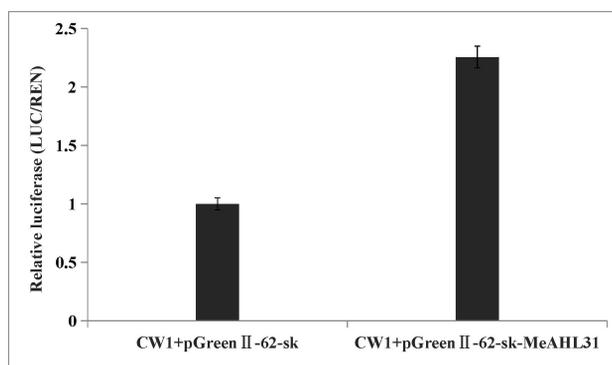


图 24 双荧光素酶实验

Figure 24 Dual Luciferase Assay

3.7 *MeAHL31* 基因在 SC8 木薯中的过量表达

3.7.1 SC8 木薯的遗传转化

为探究 *MeAHL31* 在木薯中是否对 *MeCWINV1* 基因具有调控作用，以及在木薯生长发育过程中行使哪些作用，我们将前面进行亚细胞定位研究构建的含有

pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 质粒的 GV3101 农杆菌侵染 SC8 木薯的脆性胚性愈伤 (FEC)。22°C 黑暗共培养 3 天, 洗菌后将 FEC 依次放在加有羧苄青霉素和不断提高潮霉素浓度 (5 mg/L ~ 20 mg/L) 的 GD 培养基上培养 3 周 (图 25A), 再转移到加有羧苄青霉素和潮霉素的 MSN 培养基上直到长出子叶 (图 25B)。挑取抗性子叶依次在 COM 培养基和 CEM 培养基上直到长出不定芽 (图 25C-D)。不定芽长到 1-2 cm 后, 切取芽插入 MS 基本培养基进行生根、成苗 (图 25E-F)。

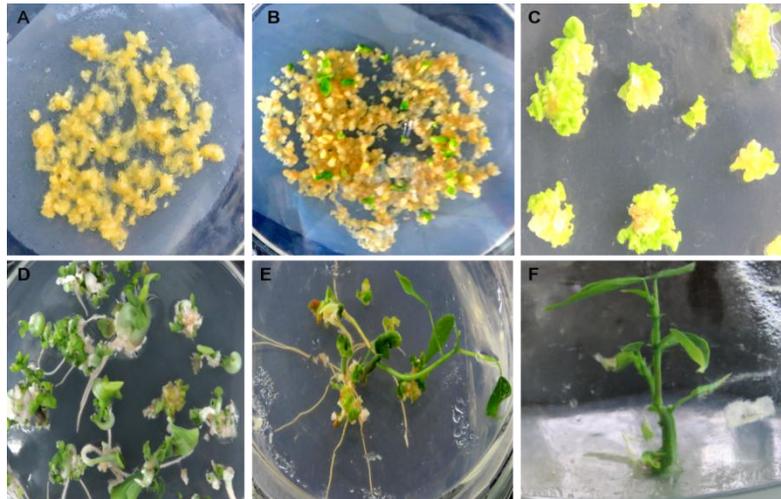


图 25 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 转化 SC8 木薯

A: 农杆菌侵染木薯脆性愈伤组织; B: 子叶潮霉素筛选; C: 子叶潮霉素继续筛选; D: 潮霉素筛选的子叶伸出芽; E: 潮霉素筛选的幼芽生根发育; F: 潮霉素筛选的幼苗转移至 MS 培养基继续潮霉素筛选培养。

Figure 25 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP Transforms SC8 Cassava

Note A: Agrobacterium infects cassava brittle calli; B: Cotyledon hygromycin screening; C: Cotyledon hygromycin screening; D: Hygromycin screening cotyledon elongation and budding; E: Hygromycin screening young Bud rooting development; F: hygromycin-selected seedlings were transferred to MS medium to continue hygromycin selection culture.

为了降低假阳性率, 将生长 30 d 左右的抗性苗切掉叶片继代到含有 10 mg/mL 的 MS 继代培养基上再次进行生根筛选。具体表型如图 26 所示: 阳性株系在继代一周左右开始生根并正常生长, 假阳性株系和 SC8 对照不能生根, 会逐渐发黄枯萎致死。筛选 1-2 周后, 将正常生长的株系继代到正常 MS 继代培养基上培养, 生长一个月后进行后续分子鉴定和功能研究。

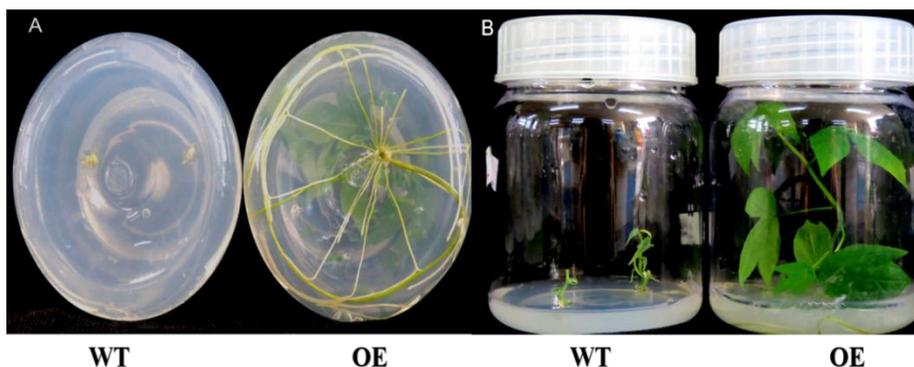


图 26 *MeAHL31* 转基因木薯组培苗潮霉素生根筛选

注：WT: SC8 对照；OE: 转基因株系，在含 10 mg/mL 潮霉素的 MS 培养基上筛选 2 周。

Figure 26 Rooting screening of *MeAHL31* transgenic cassava tissue culture seedling hygromycin

Note: WT: SC8 control; OE: transgenic lines, selected on MS medium containing 10 mg / mL hygromycin for about 2 weeks.

3.7.2 *MeAHL31* 转基因木薯基因组 DNA 的提取

为检测 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 植物表达载体经农杆菌介导转化 SC8 木薯 FEC 后，其 T-DNA 是否已经成功插入木薯转基因株系的基因组中，本文利用 Plant DNA Isolation Kit 试剂盒小量提取未处理的 SC8 木薯（对照）和转基因株系的基因组 DNA。进行琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA 质量，部分电泳结果如图 27，结果显示提取的基因组 DNA 质量较好，条带单一，可用于后续实验。

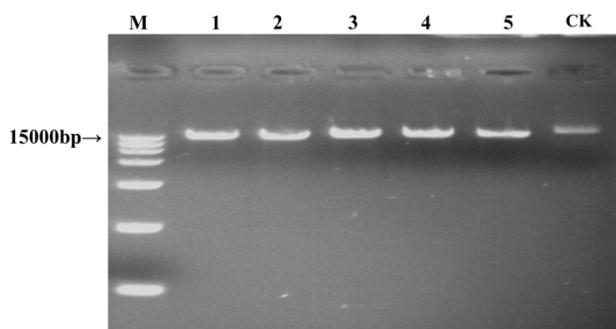


图 27 转 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 木薯再生植株基因组 DNA

注：M: DL15000 marker; 1~5: 转 *MeAHL31* 再生植株; CK: 对照 SC8。

Figure 27 Transgenic pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP Cassava Regenerated Plant Genomic DNA

Note: M: DL15000 marker; 1-5: Transplant *MeAHL31* to regenerate plants; CK: Control SC8.

3.7.3 *MeAHL31* 转基因木薯植株的 PCR 鉴定和 GFP 荧光标记检测

取 *MeAHL31* 过表达转基因株系基因组 DNA 和非转基因 DNA 进行 PCR 鉴定，pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 质粒作为阳性对照，用 *GFP* 引物进行 PCR 扩增后经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析，电泳结果图 28：扩增大小大约为 460 bp 的 *GFP* 基因，符合预期条带大小，证明 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 载体的 T-DNA 基因已经整合到 SC8 木薯基因组。

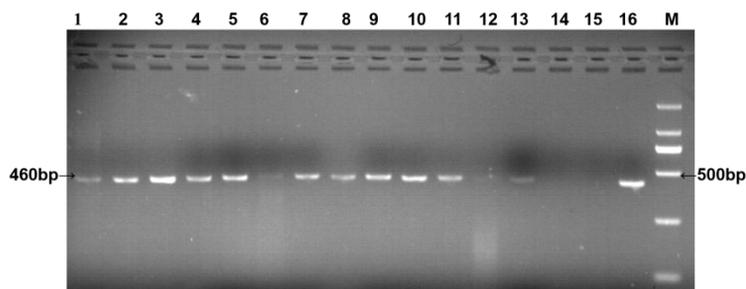


图 28 转 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 木薯 PCR 鉴定

注：1-14 再生植株；15 阴性对照；16 阳性质粒，M, Marker DL2000。

Figure 28 PCR Identification of *MeAHL31* Overexpressing Transgenic Lines

Note: 1-14 transgenic lines; 15 negative controls; 16 positive plasmids, M, Marker DL2000.

将鉴定出来的 *MeAHL31* 过表达转基因株系取其叶片进行荧光观察拍照，结果如图 29：可观察到 GFP 绿色荧光蛋白。

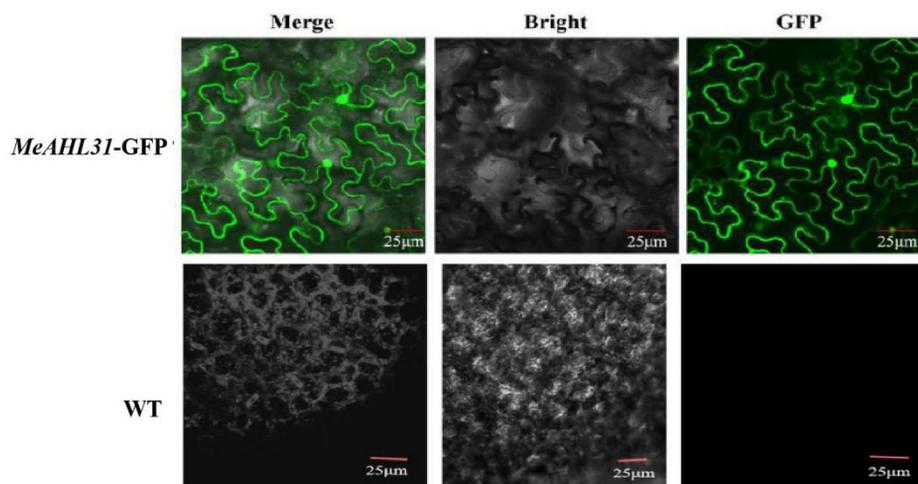


图 29 转 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 木薯叶片荧光蛋白

Figure 29 Leaf Fluorescent Protein in pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP Transgenic Cassava

3.8 *MeAHL31* 和 *MeCWINV1* 基因在转基因木薯中的表达分析

3.8.1 转基因木薯总 RNA 的提取

提取转基因株系、非转基因 SC8（对照）株系组培苗的总 RNA，然后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 质量（结果如图 30）。电泳结果显示：提取的 RNA 的 28S 和 18S 条带明显，条带单一，表示提取的 RNA 没有降解可以用于后续试验。将 RNA 反转录，合成 cDNA 第一链，用于后续 qRT-PCR 实验。

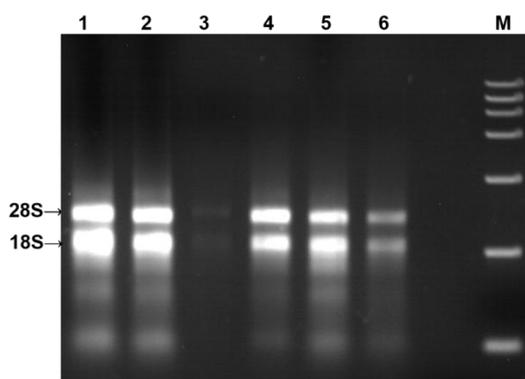


图 30 木薯总 RNA

注：1-5，部分转基因株系总 RNA；6，非转基因 SC8 总 RNA；M, Marker DL15000。

Figure 30 Total RNA of Cassava

Note: 1-5, total RNA of transgenic lines; 6, total RNA of SC8; M, Marker DL15000.

3.8.2 转基因木薯中 *MeAHL31* 和 *MeCWINV1* 基因的表达分析

在前面我们证实了 *MeAHL31* 能与 *MeCWINV1* 基因启动子发生结合并上调该启动子的活性。为了验证 *MeAHL31* 基因在 SC8 木薯转基因株系中过量表达的有效性，

以及它能否调控 *MeCWINV1* 基因的表达, qRT-PCR 实验结果(图 31)表明: 转基因木薯株系中 *MeAHL31* 基因成功过表达, 且 *MeCWINV1* 基因的表达量也较对照株系有明显提高。

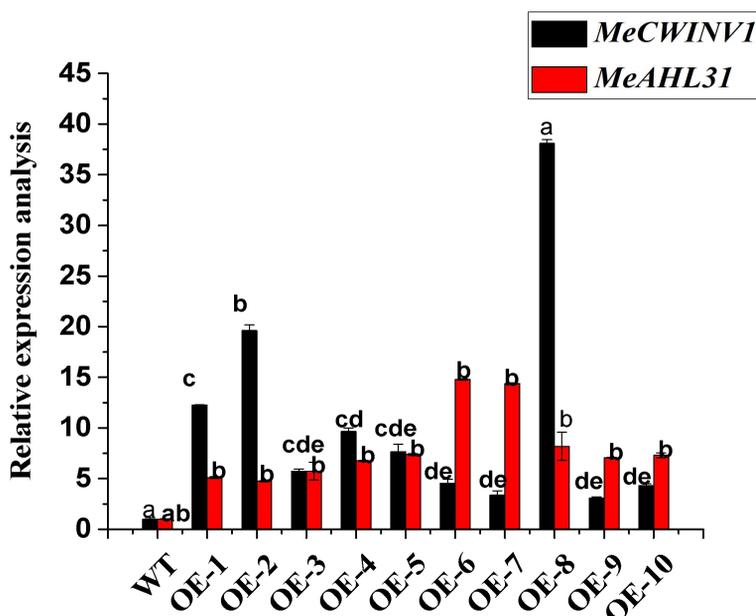


图 31 qRT-PCR 检测转基因木薯 SC8 中的 *MeAHL31* 和 *MeCWINV1* 表达

相同小写字母表示经 Duncan 法在 0.05 水平上无显著差异

Figure 31 qRT-PCR Detection of *MeAHL31* and *MeCWINV1* Expressions in *MeAHL31* Transgenic Cassava SC8

The same lowercase letter are not significantly different (Duncan, $p=0.05$)

3.9 转基因木薯表型观察

选取生长 30 d 左右的组培苗进行表型观察并拍照, 与野生型相比 *MeAHL31* 转基因木薯生根情况没有差异, 结果如图 32A。对地上部分进行观察, 结果如图 32B, *MeAHL31* 转基因木薯的叶型、叶片颜色以及茎秆颜色与野生型相比没有差异。

由于木薯生长周期长, 对 *MeAHL31* 转基因木薯的花与种子的研究工作后续将会开展, 现阶段这部分研究结果无法进行。

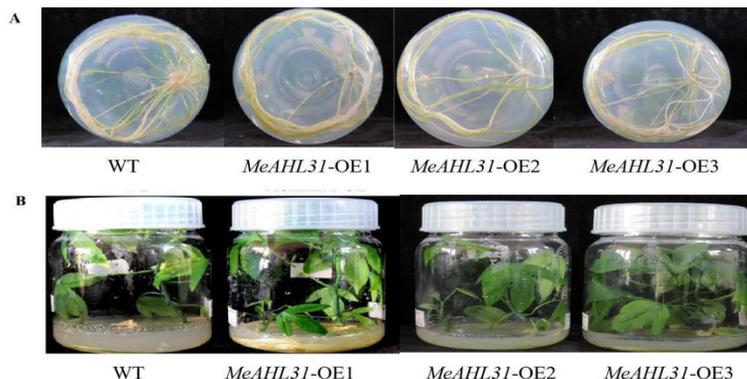


图 32 *MeAHL31* 转基因木薯表型观察

Figure 32 Phenotype Observation of *MeAHL31* Transgenic Cassava

3.10 *MeAHL31* 在拟南芥中的功能研究

3.10.1 *MeAHL31* 过表达载体在拟南芥中的转化

利用真空渗入法将 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 过表达载体转化拟南芥，T1 代种子消毒后播种在 MS 固体培养基(含 100 mg/L 羧苄青霉素和 100 mg/L 潮霉素)，4°C 春化 36 h 后，22°C、8 h/d 的短日照培养长出 4-5 对真叶后移栽。转化成功的阳性幼苗能够健康生长，没有转化的阴性苗逐渐黄化枯萎死亡(图 33)。

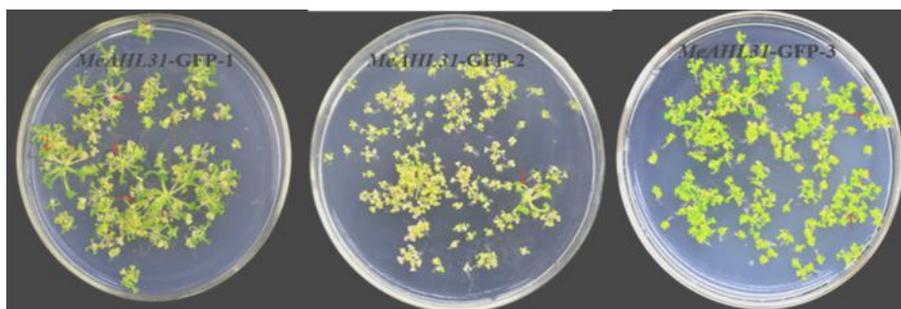


图 33 *MeAHL31* 转基因拟南芥幼苗的筛选

Figure 33 Screening of the *MeAHL31* Transgenic Arabidopsis Seedlings

3.10.2 *MeAHL31* 转基因拟南芥基因组 DNA 提取

为验证转基因拟南芥 *MeAHL31*-GFP 植物表达载体的 T-DNA 是否已成功插入拟南芥基因组中，对三个转基因株系每个株系选取 3 棵抗性植株，用试剂盒提取其基因组 DNA，经琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 质量(如图 34)，用于后续 PCR 实验检测。

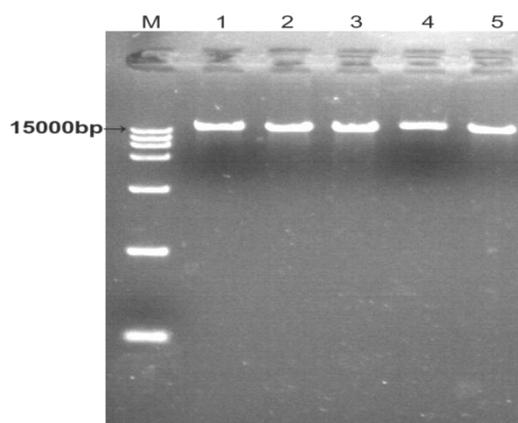


图 34 转基因拟南芥基因组 DNA

M, DNA marker; 1, *MeAHL31*-GFP-1 转基因植株; 2, *MeAHL31*-GFP-2 转基因植株; 3, *MeAHL31*-GFP-3 转基因植株; 4-5, WT。

Figure 34 Transgenic Arabidopsis Genomic DNA

M, DNA marker; 1, *MeAHL31*-GFP-1 transgenic plants; 2, *MeAHL31*-GFP-2 transgenic plants; 3, *MeAHL31*-GFP-3 transgenic plants; 4-5, WT.

3.10.3 *MeAHL31* 转基因拟南芥的 PCR 鉴定

本试验采用 T₂ 代抗性转基因拟南芥苗的基因组 DNA 为模板（每个株系选取 5 棵抗性苗），用 GFP-1 引物鉴定转基因苗，PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。结果发现，*MeAHL31*-GFP-1、*MeAHL31*-GFP-2 和 *MeAHL31*-GFP-3 的转基因植株均能扩增出与目的条带大小一致的特征带（如图 35），实验结果表明 *MeAHL31*-GFP-1、*MeAHL31*-GFP-2 和 *MeAHL31*-GFP-3 载体的 T-DNA 已整合到拟南芥基因组中。

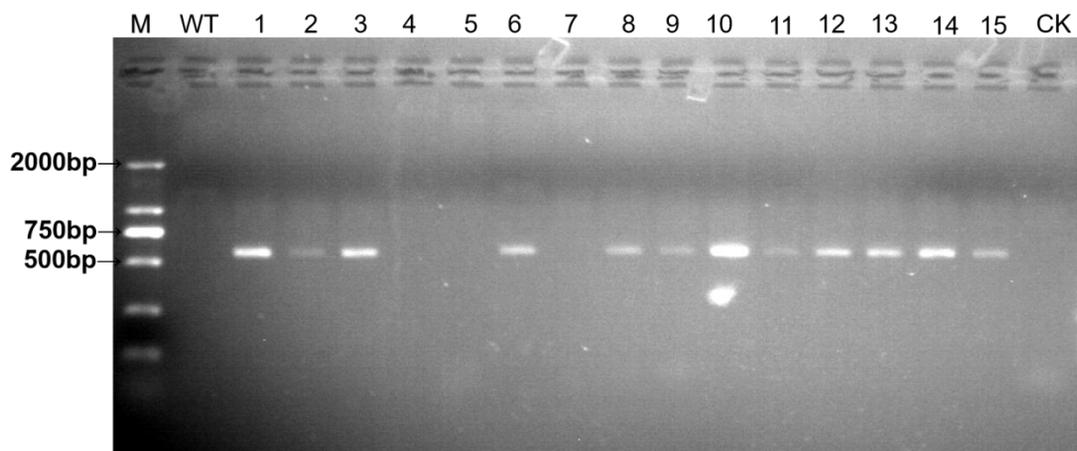


图 35 PCR 检测 *MeAHL31* 转基因拟南芥

M, DL2000 Marker; WT, 野生型; 1-5, *MeAHL31*-GFP-1 转基因植株; 6-10, *MeAHL31*-GFP-2 转基因植株; 11-15, *MeAHL31*-GFP-3 转基因植株; CK, 阴性对照水。

Figure 35 PCR Detection of the Transgenic Arabidopsis

M, DL2000 Marker; WT, wild type; 1-5, *MeAHL31*-GFP-1 transgenic plants; 6-10, *MeAHL31*-GFP-2 transgenic plants; 11-15, *MeAHL31*-GFP-3 transgenic plants; CK, negative control water.

3.10.4 *MeAHL31* 转基因拟南芥总 RNA 的提取

利用试剂盒提取转基因、非转基因株系拟南芥总 RNA，然后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 质量(结果如图 36)。电泳结果显示提取的 RNA 的 28S 和 18S RNA 条带明显，表示提取的拟南芥的 mRNA 没有降解。然后将 mRNA 反转录，合成 cDNA 第一链，用于后续 RT-PCR 或 qRT-PCR 实验。

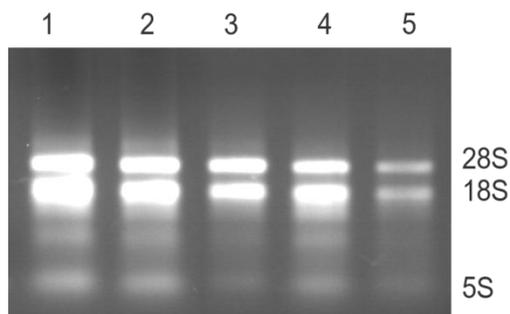


图 36 拟南芥总 RNA

1, *MeAHL31*-GFP-1 转基因植株; 2, *MeAHL31*-GFP-2 转基因植株; 3, *MeAHL31*-GFP-3 转基因植株; 4-5, 非转基因植株。

Figure 36 Arabidopsis Total RNA

1, *MeAHL31*-GFP-1 transgenic plants; 2, *MeAHL31*-GFP-2 transgenic plants; 3, *MeAHL31*-GFP-3 transgenic plants; 4-5, non-transgenic plants.

3.10.5 *MeAHL31* 正向调控 *AtCWIN1* 基因的表达

在前面我们证实了木薯转基因株系中 *MeAHL31* 可正向调控 *MeCWINV1* 基因的表达, 为了验证 *MeAHL31* 基因在拟南芥中过量表达的有效性, 以及它能否调控 *AtCWINV1* 基因的表达, 通过 qRT-PCR 实验结果(如图 37): OE2-1、OE3-1 和 OE3-3 中 *AtCWINV1* 基因表达量显著上调, 其中基因表达量最大上调 5 倍, 表明在拟南芥转基因株系中 *MeAHL31* 也可正向调控 *AtCWINV1* 基因的表达。

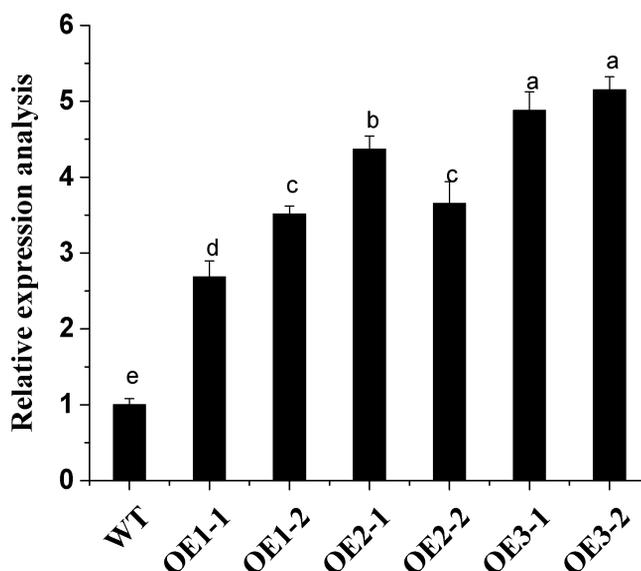


图 37 *MeAHL31* 转基因拟南芥中 *AtCWINV1* 基因的表达分析

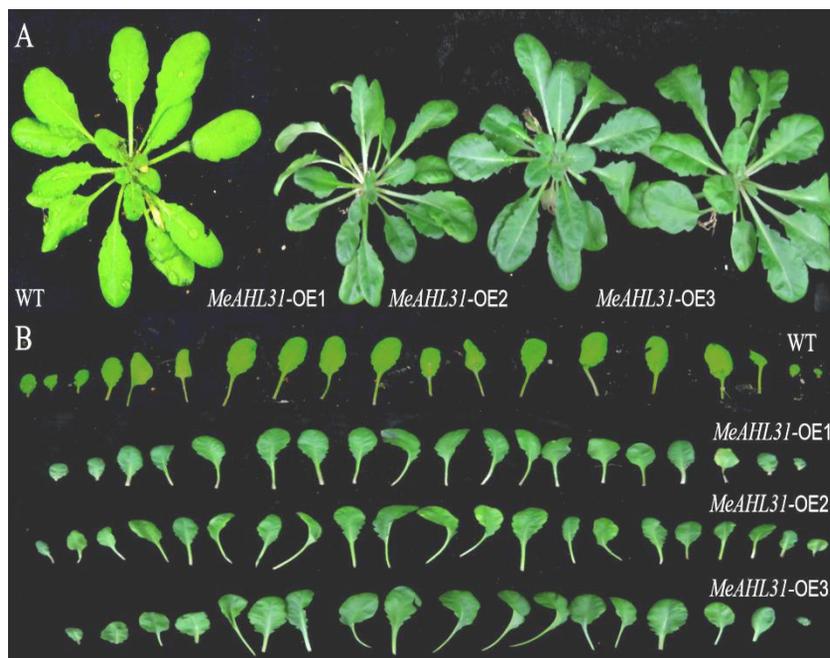
Figure 38 Expression Analysis of *AtCWINV1* Gene in the *MeAHL31* Overexpressing and Wild-Type Arabidopsis

3.11 *MeAHL31* 在拟南芥中的功能研究

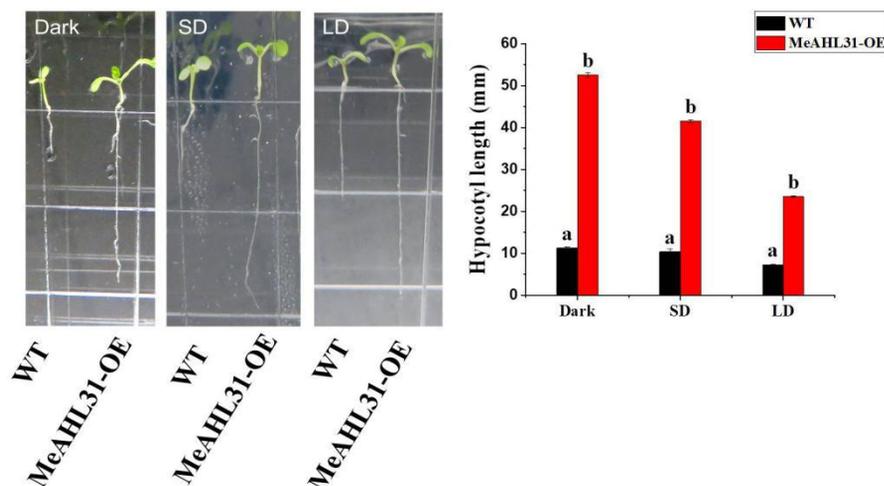
为了进一步研究 *MeAHL31* 基因在拟南芥中的功能, 将鉴定出来的 *MeAHL31* 转基因阳性拟南芥移栽到营养土: 蛭石 (1:1) 的介质中, 22°C 人工气候箱中短日照培养 5 周, 观察拟南芥的表型并拍照记录。对拟南芥的下胚轴、根以及花进行观察记录, 发现拟南芥 *MeAHL31* 过表达株系与野生型相比在下胚轴伸长、开花时间以及主根的伸长方面有了差异, 在叶型、叶片数量方面没有差异。

3.11.1 *MeAHL31* 转基因拟南芥叶的表型观察

将鉴定出来的 *MeAHL31* 过表达株系与野生型在相同条件下培养 1 周左右, 进行叶型、叶片数量以及叶片颜色的观察分析(如图 38A & B), 大量观察发现 *MeAHL31* 基因过表达对拟南芥的叶型及叶片颜色没有影响。为进一步说明实验结果对 *MeAHL31* 过表达株系与野生型叶片数量进行统计学分析发现: 转基因株系与野生型株系单株叶片数量大约 19-29 片, 叶片数量二者没有显著差异。

图 38 *MeAHL31* 转基因拟南与野生型株系叶片比较Figure 38 Comparison of Leaves of the *MeAHL31* Overexpressing Lines and Wild-Type Lines3.11.2 *MeAHL31* 转基因拟南芥下胚轴伸长

在连续黑暗、长日照以及短日照条件下，分别培养拟南芥 *MeAHL31* 转基因株系和野生型，一周后观察发现(图 39)：在三种光照条件下 *MeAHL31* 转基因拟南芥株系和野生型相比，都表现出下胚轴的伸长，连续黑暗条件下促进伸长最为明显，长日照下促进现象不明显，进一步统计下胚轴的长度进行统计学分析发现(图 39)：*MeAHL31* 转基因拟南芥株系下胚轴长度和野生型下胚轴长度具有差异显著性。由于拟南芥下胚轴的伸长与暗形态建成有关，*MeAHL31* 过表达可促进拟南芥下胚轴的伸长，因而推测 *MeAHL31* 可能参与植物暗形态的建成。

图 39 *MeAHL31* 转基因拟南芥下胚轴表型分析Figure 41 Hypocotyl Phenotype Analysis of the *MeAHL31* Overexpressing Arabidopsis

3.11.3 *MeAHL31* 转基因拟南芥中下胚轴发育相关基因表达分析

通过 qRT-PCR 分析下胚轴发育相关基因在 mRNA 水平的表达量, 实验结果表明 (图 40): *CRY1*、*CRY2*、*PHYA*、*PHYB*、*HY5* 和 *COP1* 基因的表达水平没有明显变化, 而 *PIF* (*PIF3* 和 *PIF4*) 基因的表达上调, 尤其是 *PIF3* 的 mRNA 表达水平变化十分达水平上调的结果。据文献报道 *PIF* 基因的过量表达会促进下胚轴的伸长, 其突变体的下胚轴会变短。我们可以推测 *MeAHL31* 的过表达植株下胚轴变长可能是由于 *PIF3* 和 *PIF4* 的表达上调导致的。

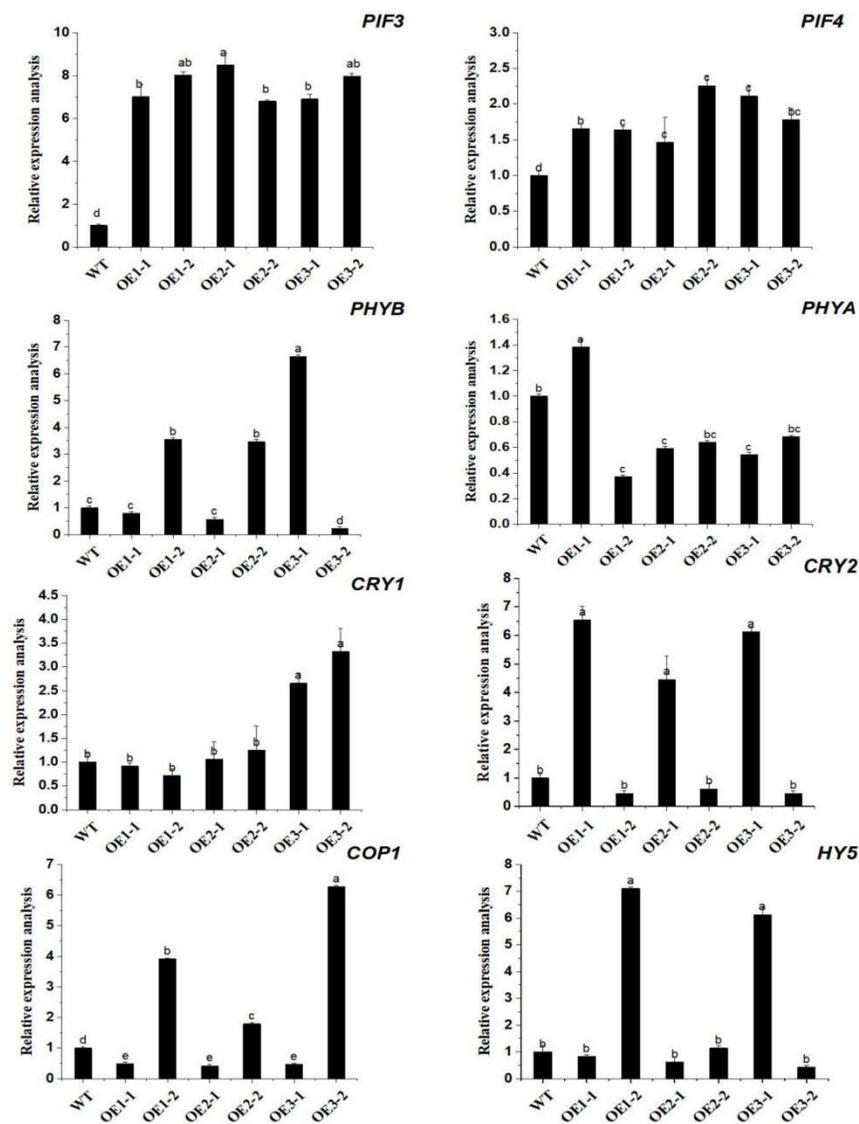


图 40 *MeAHL31* 转基因拟南芥中与光受体和下胚轴相关基因的表达分析

相同小写字母表示经 Duncan 法在 0.05 水平上无显著差异

Figure 42 Gene Expression Levels of the Photoreceptors and Hypocotyl-related Genes in the *MeAHL31* Overexpressing Arabidopsis

The same lowercase letter are not significantly different (Duncan, $p=0.05$)

3.11.4 *MeAHL31* 转基因拟南芥主根伸长

在长日照以及短日照条件下，分别培养拟南芥 *MeAHL31* 过表达株系和野生型，一周后观察发现(图 43A)：在两种光照条件下拟南芥 *MeAHL31* 过表达株系和野生型相比，都表现出主根的伸长，长日照下促进现象最明显，进一步统计下胚轴的长度进行统计学分析发现(图 43B)：拟南芥 *MeAHL31* 过表达株系主根长度和野生型主根长度具有差异显著性。*MeAHL31* 过表达拟南芥主根明显伸长，因而推测 *MeAHL31* 可能参与植物主根生长的调节。

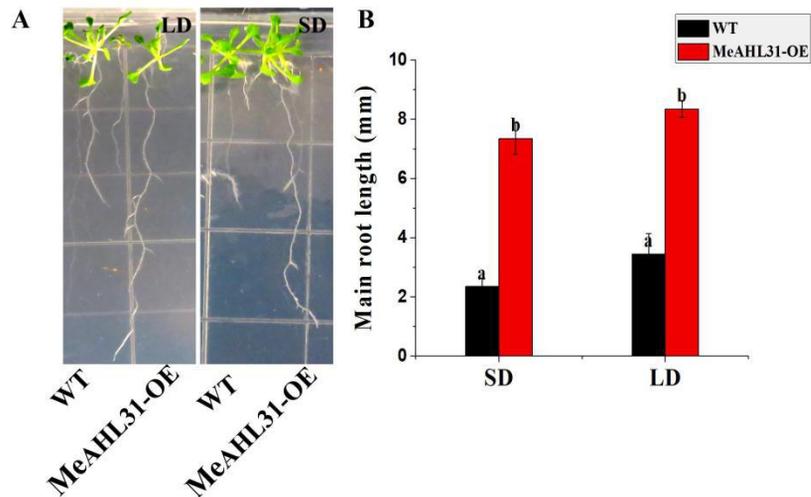


图 43 *MeAHL31* 转基因拟南芥主根表型分析

Figure 43 Root Phenotype Analysis of the *MeAHL31* overexpressing Arabidopsis

根的生长发育涉及到四个部分包括静止中心、起始细胞、分生细胞和细胞延长区。在 *MeAHL31* 过表达的拟南芥静止中心的 *WOX5* 基因表达量下调，参与生长素反应 *IAA1*、*E2FC* 和 *E2FF* 基因的表达显著上调，这表明 *MeAHL31* 促进植株主根的生长可能是通过调控 *IAA1*、*E2FC* 和 *E2FF* 基因的表达完成的，其具体的分子机理还需进一步的研究证明。

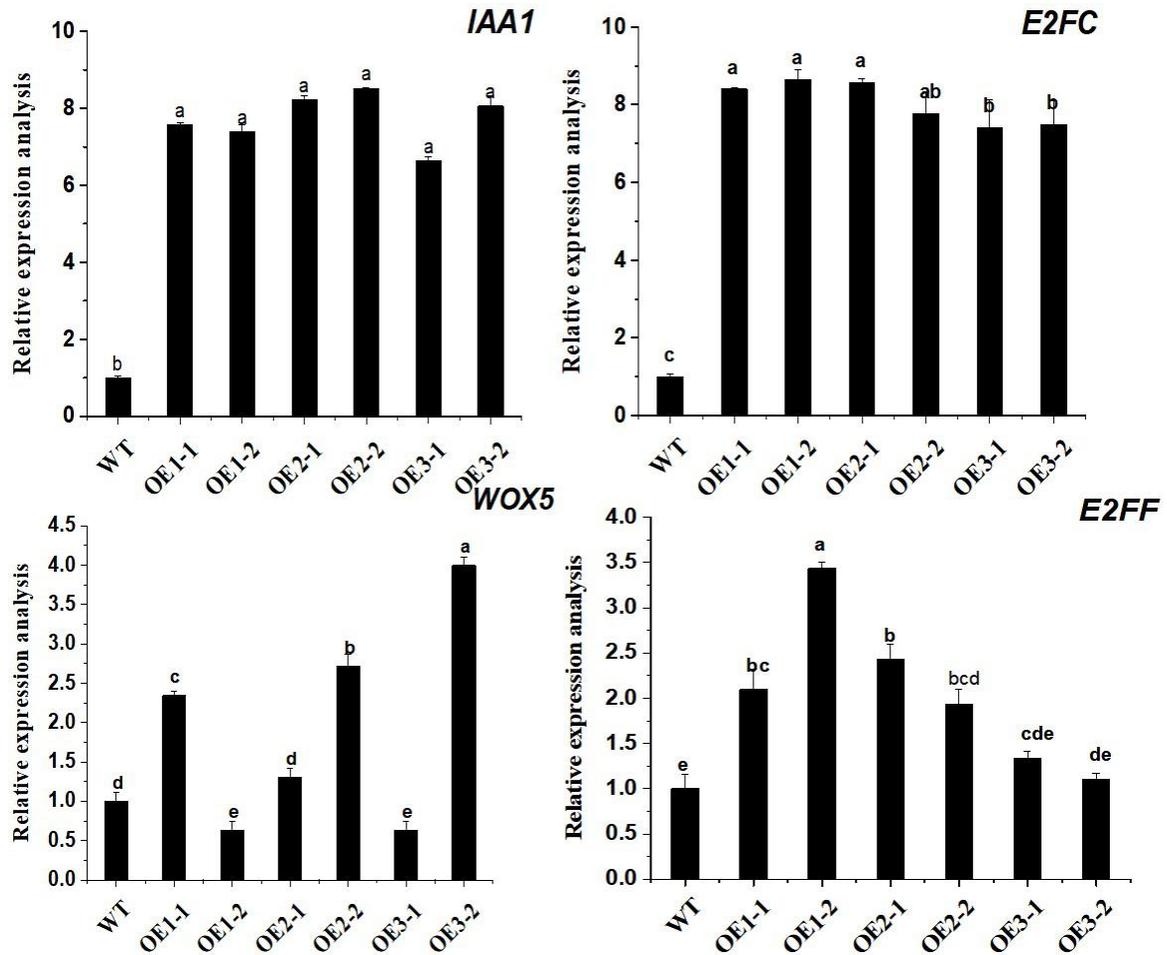


图 44 拟南芥 *MeAHL31* 过表达主根相关基因的表达分析

相同小写字母表示经 Duncan 法在 0.05 水平上无显著差异

Figure 44 Expression Level of the Main Root-Related Genes in the *MeAHL31* Overexpressing Arabidopsis

The same lowercase letter are not significantly different (Duncan, $p=0.05$)

3.11.5 *MeAHL31* 转基因拟南芥提早开花时间

MeAHL31 过表达阳性株系移栽到营养土: 蛭石 (1:2) 的介质中, 22°C 拟南芥培养室中短日照培养 2 周左右, 观察其表型并拍照记录。与对照组相比, 三个转基因株系都已开花, 且 OE-2 和 OE-3 开花时间明显早于对照(如图 45A)。基于上述实验现象, 进一步通过 qRT-PCR 分析发现: 三个转基因株系在 mRNA 水平上的基因相对表达量不同, OE-2、OE-3 基因相对表达量高于对照(如图 45B)。因而推断转基因株系在 mRNA 水平上的表达量越高开花时间越早。

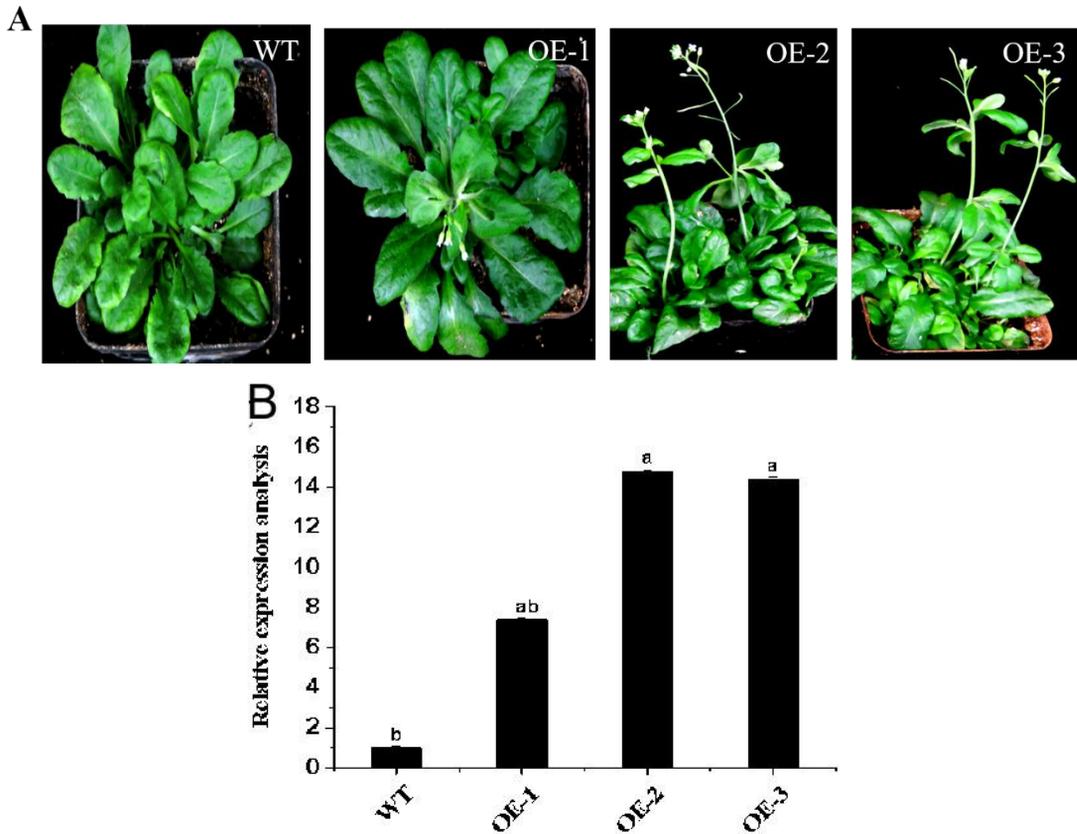


图 45 *MeAHL31* 转基因拟南芥开花观察

注：A,长日照条件下生长 15 d 的 *MeAHL31* 过表达植株三个株系都表现出不同的早花现象；B, qRT-PCR 检测野生型和过表达株系中 mRNA 表达水平

Figure45 Early Flower Phenotype of *MeAHL31* Overexpressing Arabidopsis

Note: A, *MeAHL31* overexpressing plants grown for 15 d under long-day sunshine conditions showed different early flowering phenomenon; B, qRT-PCR to detect mRNA expression levels in wild-type and overexpressing lines

光照是影响植物开花的关键因素，将转基因株系与野生型分别培养在短日照和长日照条件下进行观察，统计拟南芥开花时间。在短日照条件下，在短日照条件下转基因株系 22 d 左右开花，而对照组 37 d 左右开花；在长日照条件下转基因株系 14 天左右就开花，而对照组 33 d 左右才开花。实验结果表明(如图 46)：*MeAHL31* 过表达拟南芥表现出明显的早花现象，推测 *MeAHL31* 可能参与拟南芥开花时间的调控。

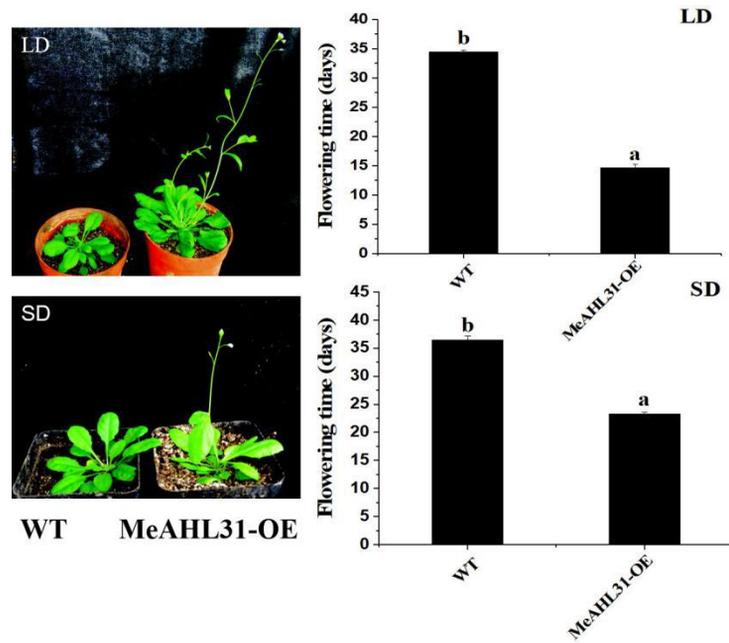
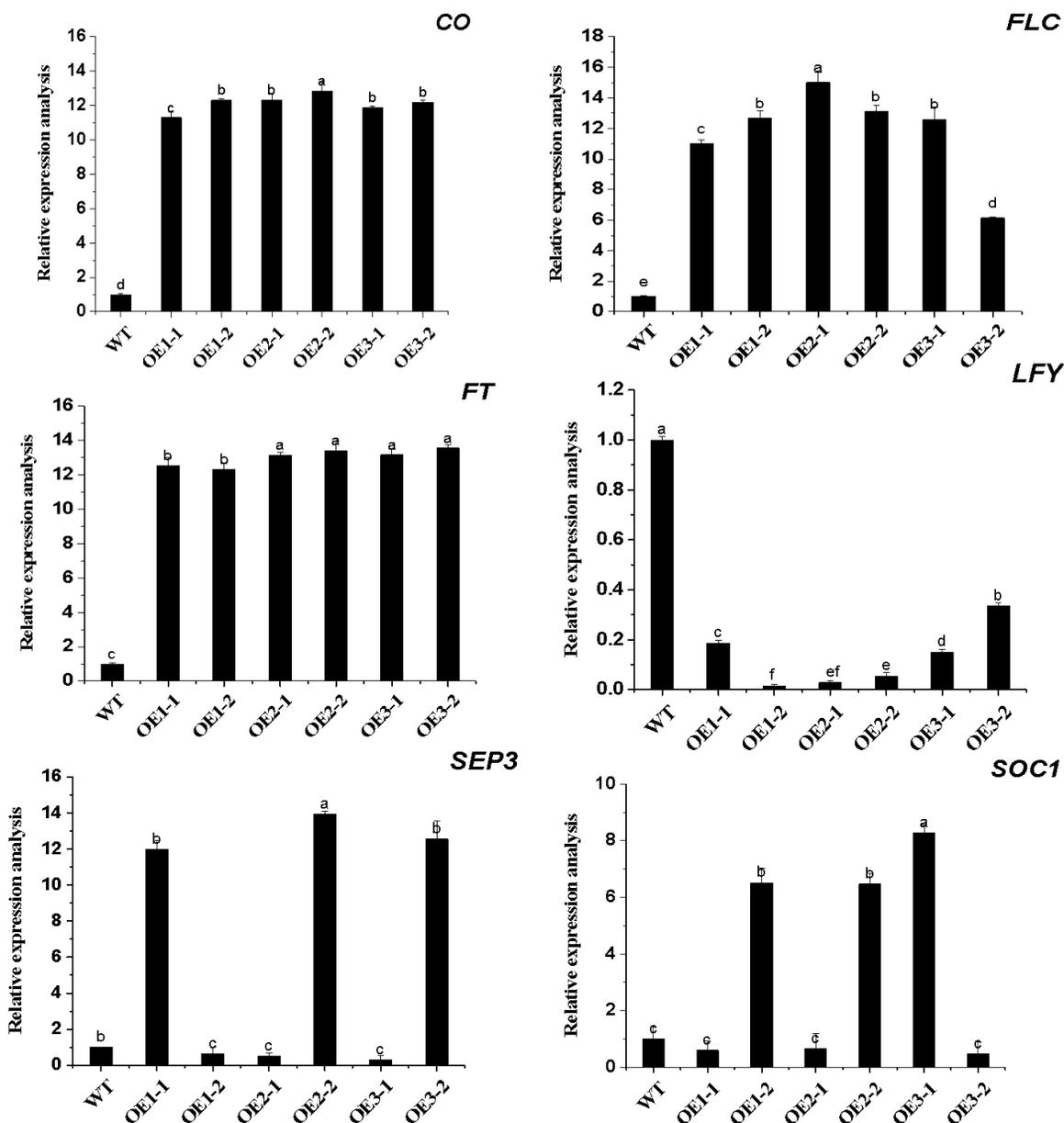


图 46 *MeAHL31* 转基因拟南芥长日照和短日照下开花时间

Figure 46 Flowering Time of the *MeAHL31* Overexpressing Arabidopsis under Long and Short Days

3.11.6 *MeAHL31* 转基因拟南芥早花表型相关基因表达分析

利用实时定量 PCR 检测主要开花基因的 mRNA 表达水平(如图 47), 实验结果分析发现基因 *CO*、*FT* 和 *FLC* 的表达量显著上调, 基因 *LFY* 表达量下调, 而基因 *SEP3* 和 *COPI* 的表达量没有明显变化趋势。从这个实验结果, 我们推测 *MeAHL31* 的过量表达导致的早花现象可能是 *MeAHL31* 正调节了 *CO*、*FT* 和 *FLC* 的表达, 进而提早了拟南芥的开花时间。

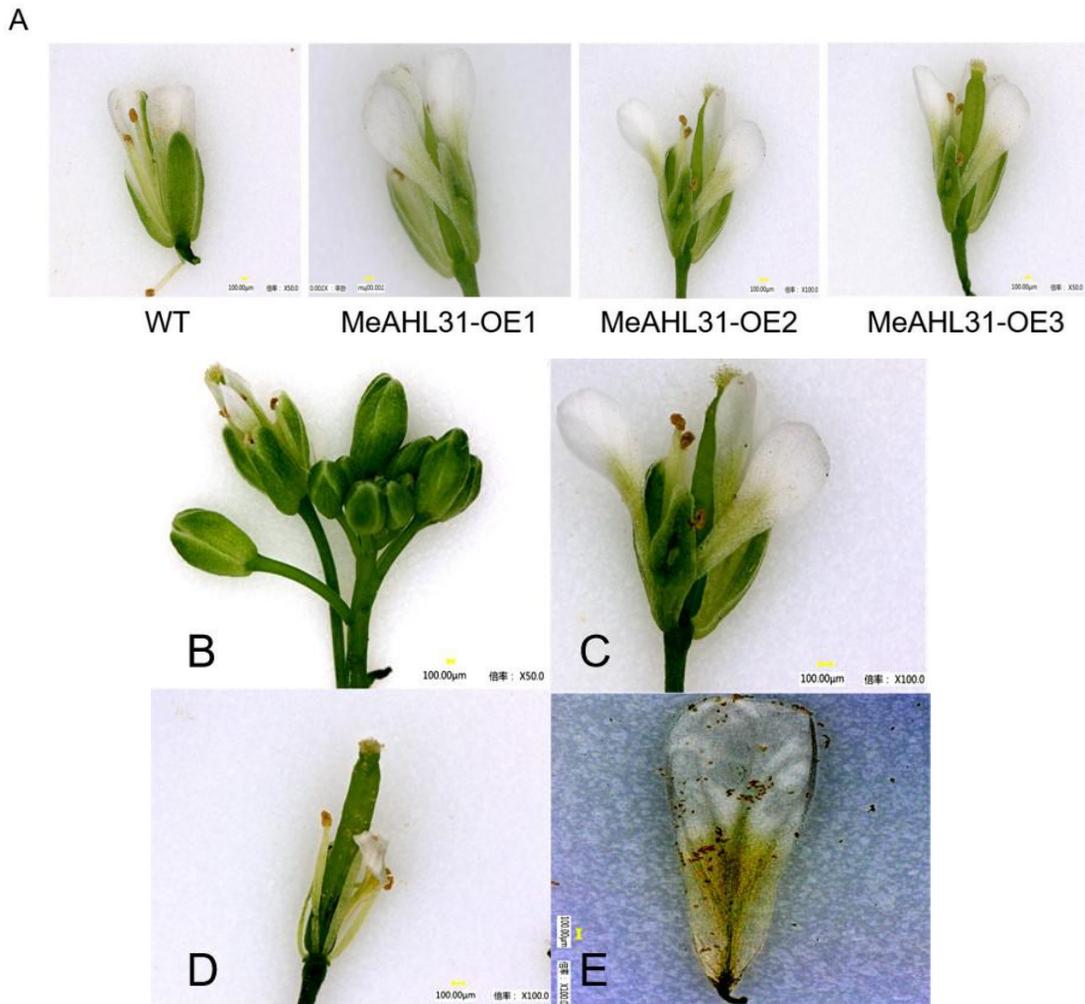
图 47 *MeAHL31* 转基因拟南芥开花相关基因的表达分析

相同小写字母表示经 Duncan 法在 0.05 水平上无显著差异

Figure 47 Analysis of Expression Levels of the Flowering-Related Genes in the *MeAHL31* Overexpressing ArabidopsisThe same lowercase letter are not significantly different (Duncan, $p=0.05$)

3.11.7 *MeAHL31* 转基因拟南芥花的形态观察及果荚表型分析

为了研究拟南芥 *MeAHL31* 过表达的育性，我们选择转基因株系 OE-1 和 OE-2 盛开的花，对其花进行电镜观察发现：发现转基因株系与野生型花瓣及柱头上明显散落有饱满的成熟花粉(如图 48A)，因而推测转基因株系花药发育可能正常。同时对其花朵进一步解剖电镜观察发现：在其柱头及萼片上明显散落有成熟饱满的花药(如图 48B)，进一步证明拟南芥 *MeAHL31* 过表达株系花可发育正常成熟花粉。



MeAHL31-OE

图 48 *MeAHL31* 转基因拟南芥花表型分析

A:野生型和 *MeAHL31* 转基因拟南芥的花; B: *MeAHL31* 转基因拟南芥未开放的花; C: *MeAHL31* 转基因拟南芥开放的花; D: *MeAHL31* 转基因拟南芥的雄蕊和雌蕊; E: *MeAHL31* 转基因拟南芥的花瓣。

Figure48 Anther Phenotype Analysis of *MeAHL31* Overexpressing Arabidopsis

A: Wild-type and *MeAHL31* Transgenic Arabidopsis Flowers; B: *MeAHL31* Transgenic Arabidopsis Unopened Flowers; C: *MeAHL31* Transgenic Arabidopsis Open Flowers; D: *MeAHL31* Transgenic Arabidopsis Stamens and Pistils; E: Petals of *MeAHL31* Transgenic Arabidopsis.

进一步观察拟南芥 *MeAHL31* 过表达株系 OE-1 和 OE-2 的果荚状态, 对相同生长周期条件下的转基因株系和野生型株系进行单株观察发现: 果荚形态和数目没有显著差异(如图 49, C&D), 进一步对转基因株系和野生型株系果荚数目进行统计学分析发现: 果荚数目与野生型相比没有显著性差异, 且果荚成熟后转基因株系与野生型相比收获的种子育性正常, 种植后可正常发芽生长。表明 *MeAHL31* 过表达对拟南芥果荚形态、数目以及种子的正常发育没有影响。

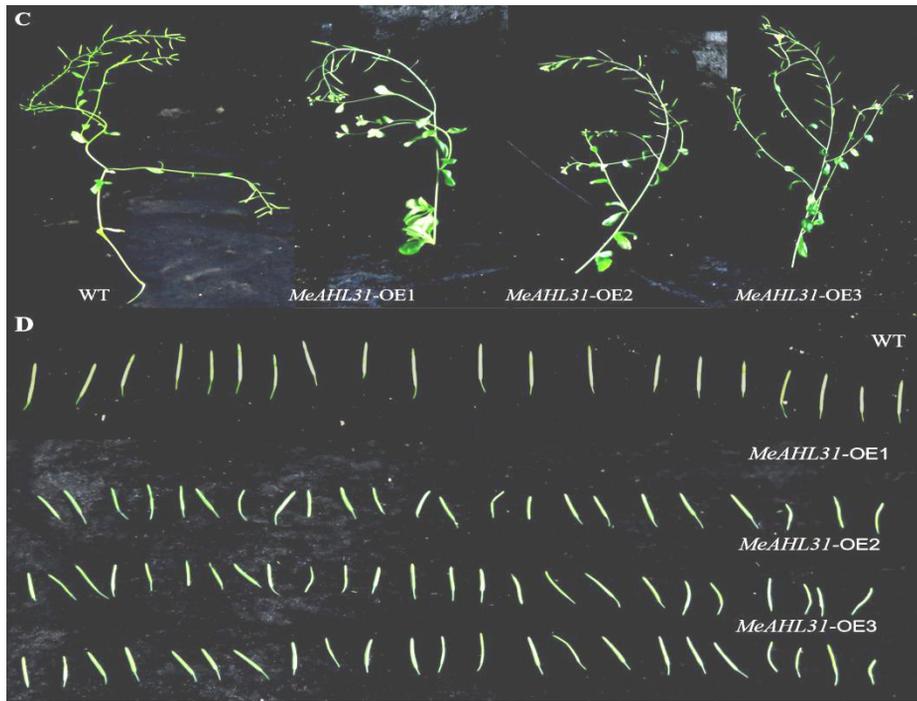


图 49 *MeAHL31* 转基因拟南芥果荚表型分析

Figure 42 Phenotype Analysis of Fruit Pods of the *MeAHL31* Overexpressing Arabidopsis

4 讨论

4.1 MeAHL31 具有转录因子活性，在细胞质、细胞膜和细胞核均表达

AT-hook 蛋白是一类含 AT-hook 基序的转录因子，具有典型的 AT-hook 基序和 PPC/DUF296 结构域，在植物生长发育、器官形成、激素信号应答以及逆境胁迫等方面发挥重要的调控作用。依据 AT-hook 蛋白 C 端氨基酸不同可分为 3 类：I 型 C 端第二位为甘氨酸并与 DNA 互作形成氨基酸残基的极性网络；II 型 C 端第二位为赖氨酸；III 型 RGRP 下游第 4 位为一个赖氨酸和一些极性氨基酸残基(肖朝文等，2009；Churchill et al., 1991；Reddy et al., 2005)。本课题组前期从木薯酵母单杂交文库中筛选到一个 AT-hook 转录因子家族基因 *MeAHL31* (GenBank No. MH559128)，又根据 AT-hook 蛋白特征基序 PF02178 从木薯数据库中检索筛选出木薯 AT-hook 转录因子家族基因共 42 个，并对这 42 个家族成员进行了系统进化分析和蛋白保守基序分析(郭育强，2017)。根据 AT-hook 家族基因分类标准，我们从木薯酵母单杂交文库筛选得到的木薯 *MeAHL31* 基因含有 AT-hook motif 1 和 PPC/DUF296 结构域 A，属于 I 型 AT-hook 亚族，和拟南芥 *AtAHL27* (AT1G20900)和 *AtAHL29* (AT1G76500)同源关系最近(郭育强，2017)。那么，MeAHL31 是否具有转录因子的转录活性呢？本论文通过转录激活实验对 MeAHL31 的转录活性进行鉴定，结果显示 MeAHL31 具有转录因子的转录激活活性，从实验水平上证实了 MeAHL31 是具有转录活性的 AT-hook 转录因子。

接着我们构建了 pCAMBIA1300-*MeAHL31*-GFP 的烟草瞬时表达载体并转化烟草对 MeAHL31 的亚细胞定位进行观察研究，发现 MeAHL31 在细胞膜、细胞质和细胞核中都有分布。而拟南芥目前已知的多个 AHL 蛋白如 HMGA、HMGB1 和 HMGB5 等都定位在细胞核，棉花的 GhAT1 蛋白也发现定位于细胞核(Aravind et al., 1998；Fujimoto et al., 2004；Delaney et al., 2007)。而本研究中我们在烟草中重复多次瞬时表达，其亚细胞定位结果都是在整个细胞都有表达。后续我们对转基因木薯叶片进行显微观察发现其在木薯叶片的表达部位和烟草中一致(图 14)，也是在整个细胞均表达。用在线生物学软件 ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>)预测木薯 MeAHL31 的亚细胞定位情况，预测结果也显示定位于细胞膜、细胞质和细胞核中。因此，我们推测木薯 MeAHL31 可能在整个植物细胞都行使功能。

4.2 MeAHL31 与木薯 MeCWINV1 启动子结合并正调控 MeCWINV1 基因的表达

转录因子(Transcription factor,TF)是具有特殊结构的蛋白质分子,具有调节基因表达的功能。它可以与基因启动子区域中的顺式作用元件和 RNA 聚合酶直接或间接相互作用,是植物基因表达调控的重要组成部分。启动子是基因转录调控的核心,启动子本身并不能直接参与基因活动,而是需要通过与转录因子相结合才能发挥其作用,进而控制基因表达时间和程度。

细胞壁转化酶是植物蔗糖代谢过程的关键酶,不可逆地将蔗糖分解成葡萄糖和果糖,参与了蔗糖的韧皮部卸载、植物的生长发育、开花结果、信号转导、响应生物和非生物胁迫等多种生理过程。本课题组前期研究发现木薯中存在 6 个细胞壁转化酶基因 MeCWINV1-6,其中 MeCWINV1 是负责木薯源库器官物质转运最关键的细胞壁转化酶基因之一(姚远,2013)。我们通过 PlantCARE 生物软件分析发现木薯 MeCWINV1 启动子上存在 AT-hook 转录因子结合的潜在顺式作用元件 AT1-motif。而 AT-hook 转录因子家族在植物生长发育、器官形成、激素信号应答以及逆境胁迫等方面都发挥重要的调控作用。为了探究 MeAHL31 能否与木薯 MeCWINV1 启动子发生结合以及它们之间有着怎样的调控作用,本论文通过酵母单杂交实验、凝胶迁移滞后实验和双荧光素酶实验对此进行解析。酵母单杂交实验发现转录因子 MeAHL31 与 MeCWINV1 启动子可发生结合,凝胶迁移滞后实验证明转录因子 MeAHL31 与 MeCWINV1 启动子可在体外发生结合,双荧光素酶实验证明转录因子 MeAHL31 与 MeCWINV1 启动子可在植物体内结合,并能上调 MeCWINV1 启动子活性。

为探究 MeAHL31 是否对 MeCWINV1 基因具有调控作用,我们构建 pCAMBIA1300-MeAHL31-GFP 植物表达载体,分别转化木薯和拟南芥。结果发现转基因木薯中 MeAHL31 有效进行过表达,并可正向调控 MeCWINV1 基因的表达;转基因拟南芥中 AtCWINV1 基因的表达量也明显上调。因此,本研究结果表明 MeAHL31 转录因子结合 MeCWINV1 基因启动子并正调控 MeCWINV1 基因的表达。在其他作物中已证实 AT-hook 蛋白可目的基因启动子发生结合,直接对下游目标基因进行正向或负向调控。如棉花 AT-hook 蛋白 GhAT1 通过与脂质转移蛋白基因 *FSItp4* 启动子上富含 AT 碱基的 FSR 序列特异性结合,进而调节棉纤维生长(Delaney et al., 2007);豌豆 HMG-I/Y 蛋白质能够正向调控质体蓝素基因 *Pet E* 的转录过程(Gupta et al., 1997)等。

4.3 MeAHL31 在拟南芥中的功能研究

拟南芥(*A.thaliana*)十字花科(Brassicaceae)鼠耳芥属,植株个体小,形态特征简单,易于管理,生长周期短,与其他植物具有高度同源性,自花传粉基因高度纯合,在实验过程中易获得具有多种基因功能的突变体材料,是用来研究基因功能最典型的模型植物。本论文将木薯 MeAHL31 基因在拟南芥中过表达来初步研究其基因功能。对 MeAHL31 过表达转基因拟南芥表型观察发现:转基因拟南芥表现出早花,下胚轴伸长以及主根伸长;其叶型和数量、花粉和种子活力以及果荚形状和数量没有表现

出差异。对开花、光周期、下胚轴以及主根生长等相关基因的表达进行了分析，具体分子机理还需进行深入研究。因木薯从基因的遗传转化、阳性苗鉴定、炼苗移栽、大田种植至成熟收获期整个流程最快至少需要两年半时间，本研究目前只获得了转基因木薯阳性组培苗，组培苗阶段的转基因木薯在形态上未出现明显差异，后续我们将继续在转基因木薯中开展进一步的功能研究。

4.3.1 MeAHL31 过量表达提早拟南芥的开花时间

研究发现拟南芥中有四个与开花有关的途径：光周期途径(photoperiod pathway)、春化途径(vernalization pathway)、自主途径(autonomous pathway)和赤霉素途径(GA pathway)。调节植物光周期的主要基因是 *CO(CONSTANS)*、*GI(GIGANTEA)*、*FT(FLOWERING LOCUS T)*等基因(Endo et al.,2007; Kardailsky et al.,1999;Putterill et al.,1995;Valverde et al,2004;Yu et al.,2007)，主要是 *CO* 基因在传递光信号后调节开花关键基因 *FT* 的表达，在长日照条件下这些基因过表达将促进植物开花；在短日照条件下它们的开花时间与野生型一致(Endo et al.,2007;Kardailsky et al.,1999;Putterill et al.,1995;Valverde et al,2004;Yu et al.,2007;肖朝文，2009)。*FT* 和 *SOC1(SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1)*位于的 *CO* 下游是 *CO* 直接靶基因(Suarez-Lopez et al.,2001),*CO* 激活 *FT* 和 *SOC1* 的转录,*FT* 和 *SOC1* 共同调控基因 *LFY(LEAFY)* 和基因 *API(APETALA1)* 的表达最终启动花的发生(Mouradov et al.,2002;Parey,2005;马锦花，2010；肖朝文，2009)。生物钟基因主要有 *TOC1(TIMING OF CAB)*、*ELF4(EARLY FLOWERING4)*、*LHY(LATE ELONGATED HYPOCOTYL)* 和 *CCA1(CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1)*，它们之间的互作构成了生物钟的反馈环。

在长日照和短日照条件下 *LHY*、*CCA1* 会抑制开花,但是在连续光照条件下则会提高 *FT* 的表达而促进植物开花。植物的开花是由多种途径共同调控的，每个途径可以独立地执行某些调控功能又能相互联系共同调控，并且开花相关基因的表达也相互影响，从而形成一个调控拟南芥开花的网络，其调节网络机制如图 50 所示。

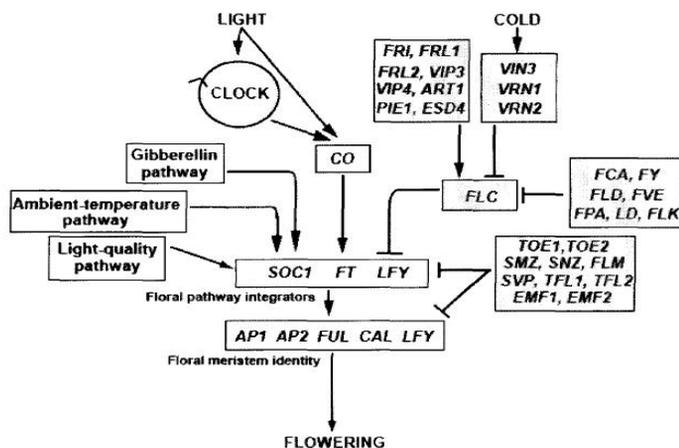


图 50 拟南芥开花调控模式(Blazquez,2000)

Figure 50 Arabidopsis Flowering Regulation Mode

本实验中转基因拟南芥株系表现出早花现象，我们对转基因拟南芥中与早花表型相关基因做了表达量分析。结果显示 *CO*、*FT* 和 *FLC* 的表达量显著上调，基因 *LFY* 表达量下调，而基因 *SEP3* 和 *COPI* 的表达量没有明显变化趋势。已有研究证实拟南芥 *AtAHL18*、*AtAHL22*、*AtAHL27*、*AtAHL29* 共同参与植物的开花调控，*AtAHL22* 通过抑制 *CO* 和 *FT* 的表达而延迟开花，*AtAHL27* 通过抑制 *FT* 的表达并提高 *FLC* 的表达来延迟开花时间（肖朝文，2009）。本研究结果发现 *MeAHL31* 提早拟南芥的开花时间可能是正调节了 *CO*、*FT* 和 *FLC* 基因的表达，具体调节机制仍需进一步深入研究。

4.3.2 *MeAHL31* 过量表达促进拟南芥下胚轴伸长

拟南芥下胚轴伸长的主要机制是细胞伸长，拟南芥的形态发生分为暗形态发生和光形态发生，在暗形态发生中，植物表现出长下胚轴，子叶不打开，下胚轴和子叶之间形成钩；光形态发生主要表现为：下胚轴变短，子叶打开，下胚轴和子叶之间的钩消失，叶绿体开始分化。其中基因 *COPI(CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC)*，*HY5(ELONGATED HYPOCOTYL5)*，*HYH(LONG HYPOCOTYL5 HOMOLOG)*，*PIF(PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR)* 和 GA 对植物的两种形态建成均具有重要的作用(肖朝文，2009；Alabadi et al.,2008)，*COPI*、*COP8*、*COP9*、*COP10*、*COP11* 和 *DET1(DEETIOLATED 1)* 在黑暗下会促进暗形态的建成，*COPI* 蛋白通过 E3 泛素化途径降解调节光调基因 *HY5* 和 *HYH*(肖朝文，2009；Alabadi et al. , 2008；Deng et al. , 1991；Holm et al. , 2002)，拟南芥 *HY5* 基因通过编码一个 bZIP 蛋白调控下胚轴和根的生长(肖朝文，2009；Oyama et al. , 1997)；植物移到光下继续培养 *COPI* 的表达和 GA 的合成就会受到抑制进而光调基因表达；*PIF3* 和 *PIF4* 是 bHLH 转录因子，暗反应基因 *PIF* 被抑制表现出植物的去黄化，下胚轴变短，子叶张开，子叶和下胚轴形成的钩消失，叶绿素的含量升高(肖朝文，2009；Feng et al. , 2008)。

本实验中拟南芥 *MeAHL31* 过表达在黑暗、长日照以及短日照条件下会促进下胚轴的伸长，推测 *MeAHL31* 的过表达植株下胚轴变长。已有文献报道拟南芥基因 *AtAHL18*、*AtAHL22*、*AtAHL27*、*AtAHL29* 参与拟南芥暗形态建成和光形态建成，四突变体基因 *PIF4* 表达量上调，下胚轴伸长(肖朝文，2009)。本实验中 *MeAHL31* 转基因拟南芥基因 *PIF3* 和 *PIF4* 的表达上调，转基因拟南芥下胚轴变长，如何调节还需要进一步的研究。

5 结论

1. 利用酵母双杂交实验对 MeAHL31 的转录活性鉴定结果显示 MeAHL31 具有转录激活活性。
2. 亚细胞定位表明 MeAHL31 在烟草叶片细胞的细胞质、细胞膜和细胞核中都有表达，推测 MeAHL31 可能在整个细胞都发挥作用。
3. MeAHL31 在大肠杆菌 BL21 (DE3)中的原核诱导表达实验表明，其最佳诱导表达条件是 OD600=0.6，IPTG 浓度为 1.0 mmol/L，15°C培养 16 h。
4. 利用酵母单杂交实验、凝胶迁移实验和双荧光素酶实验证明 MeAHL31 可以与木薯细胞壁转化酶基因 *MeCWINV1* 启动子结合。
5. *MeAHL31* 转基因木薯中细胞壁转化酶 *MeCWINV1* 基因表达量显著上调，表明 MeAHL31 可正向调控 *MeCWINV1* 基因的表达。
6. *MeAHL31* 转基因拟南芥中细胞壁转化酶活性显著上调，表明 *MeAHL31* 过表达株系可通过积累足够糖分应对外界环境的变化，更好的适应环境和生长。
7. *MeAHL31* 过量表达提早拟南芥的开花时间，无论是在长日照还是短日照条件下 *MeAHL31* 转基因拟南芥株系都表现出早花的现象，并且植株花朵发育正常。推测 *MeAHL31* 正调节了 *CO*、*FT* 和 *FLC* 的基因表达，进而提早了拟南芥的开花时间。
8. *MeAHL31* 过量表达促进拟南芥下胚轴的伸长，推测可能是由上调 *PIF3* 和 *PIF4* 的表达导致的。
9. *MeAHL31* 过量表达可促进拟南芥主根的生长，推测可能是通过上调 *IAA1*、*E2FC* 和 *E2FF* 基因的表达完成的，其具体的分子机理还需进一步的研究证明。

参考文献

- [1] 曹红利. 茶树 bZIP 转录因子基因家族的克隆与表达分析[D]. 北京. 中国农业科学院. 2013.
- [2] 丁丽雪, 李涛, 李植良, 等. 番茄 AT-hook 基因家族的鉴定及胁迫条件下的表达分析[J].植物遗传资源学报, 2016, 17(2):303-315.
- [3] 郭育强. 木薯中与 MeCWINV6 基因启动子互作的转录因子筛选及生物信息学分析[D]. 海南.海南大学.2017.
- [4] 胡艳平. 木薯细胞壁酸性转化酶基因 MeCWINV1 启动子的克隆与功能分析[D].海南.海南大学.2014.
- [5] 黄幸,丁峰,彭宏祥,等.植物 WRKY 转录因子家族研究进展[J].生物技术通报,2019,35(12):129-143.
- [6] 贾琦石. 拟南芥 AT-hook 基因 TEK 调控阿拉伯半乳糖蛋白 AGPs 控制花粉外壁内层发育[D]. 上海.上海师范大学. 2014.
- [7] 李杰, 雒雅婧, 张爽, 等. 杨树木质部特异启动子诱导活性分析[J].江苏农业科学,2016,44(01):63-67.
- [8] 刘姣, 胡艳平, 周扬, 等. 木薯细胞壁酸性转化酶基因 MeCWINV1 启动子的克隆及其在烟草中的瞬时表达分析[J]. 分子植物育种, 2014, 12(6):1169-1174.
- [9] 刘金义. 葡萄 bZIP 转录因子家族的全基因组鉴定、表达分析及 *VvbZIP45/VvbZIP08*(AREB/ABF 类)基因的功能研究[D]. 南京. 南京农业大学. 2014.
- [10] 刘强, 张贵友. 植物转录因子的结构与调控作用[J]. 科学通报, 2000, 45(14):1465-1474.
- [11] 雒雅婧,李杰,张爽,等.植物启动子研究进展[J].北方园艺,2015(22):186-189.
- [12] 马锦花. *GmCOLs* 基因的克隆与时空表达分析[D].河南.河南农业大学.2010.
- [13] 马倩,张岁芳,周佳旋,等.葡萄 *VvWRKY13* 基因促进转基因番茄果实的早熟[J].北方园艺,2018(01):23-28.
- [14] 潘秋红. 果实酸性转化酶研究[D]. 北京. 中国农业大学. 2003.
- [15] 荣晶. 木薯干旱胁迫相关 R2R3-MYB 转录因子 *MeMYB63* 的基因特性及启动子分析[D]. 海南.海南大学.2014.
- [16] 王硕, 刘姣, 符少萍等. 木薯 *MeCREB* 基因的分子克隆及其在原核细胞中的表达和优化[J].分子植物育种, 2018, 16(10).
- [17] 文添龙,刘雪梅,冀亚萍等.高等植物胁迫诱导型启动子的研究进展[J].西北植物学报,2014,34(01):206-214.
- [18] 夏江东, 夏平. 高等植物启动子功能和结构研究进展[J]. 楚雄师范学院学报, 2005,21(3):41-48.
- [19] 夏文睿. 木薯细胞壁转化酶基因 MeCWINV2、MeCWINV5 和 MeCWINV6 启动子的克隆及分析[D].海南.海南大学农学院.2014.
- [20] 肖朝文, 傅永福. AT-hook 蛋白的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(5):12-16.
- [21] 肖朝文,陈福禄,傅永福.AT-hook 基因 AHL27 过量表达延迟拟南芥开花[J].中国农业科技导报,2009,11(04):89-94.
- [22] 肖朝文. 拟南芥 AT-hook 蛋白的功能研究[D].北京. 中国农业科学院,2009.
- [23] 姚远. 木薯转化酶基因家族克隆、结构进化及表达分析[D]. 海南. 海南大学. 2013.

- [24] 叶剑秋. 木薯种质资源遗传多样性评价与创新利用[D].海南.海南大学.2014.
- [25] 张贵慰, 曾珏, 郭维, 等. 水稻 *AT-hook* 基因家族生物信息学分析[J]. 植物学报, 2014, 49(01):49-62.
- [26] 张鹏, 安冬, 马秋香, 王红霞, 等. 木薯分子育种中若干基本科学问题的思考与研究进展[J]. 中国科学:生命科学, 2013, 43(12):1082-1089.
- [27] 张鹏. 能源木薯种质资源面临的问题与解决策略[J]. 生物产业技术, 2008(05):25-30.
- [28] 张鹏. 我国薯类基础研究的动态与展望[J]. 生物技术通报, 2015, 31(04):65-71.
- [29] 赵杰堂. 蔗糖转化酶在高等植物生长发育及胁迫响应中的功能研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(3):352-358.
- [30] 赵婉彤, 付畅. 植物人工启动子的研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(22):7377-7385.
- [31] 郑晓瑜, 郭晋艳, 张毅, 等. 植物非生物胁迫诱导启动子顺式作用元件的研究方法[J]. 植物生理学报, 2011, 47(02):129-135.
- [32] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学[M]. 第四版..北京:高等教育出版社, 2002: p1-p481.
- [33] Adeyemo O S, Chavarriaga P, Tohme J, et al. Overexpression of *Arabidopsis* *FLOWERING LOCUS T (FT)* gene improves floral development in cassava (*Manihot esculenta*, Crantz)[J]. Plos One. 2017, 12(7): America, 2013, 110(48):4688-97.
- [34] Aravind L, Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding
- [35] proteins[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(19):4413-21.
- [36] Aravind L, Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins[J], Nucleic Acids Res, 1998, 26(19): 4413-4421.
- [37] Burns A, Gleadow R, Cliff J, et al. Cassava: The Drought, War and Famine Crop in a
- [38] Changing World[J]. Sustainability, 2010, 2(11):3572-3607.
- [39] Chandra A, Jain R, Solomon S. Complexities of invertases controlling sucrose accumulation and retention in sugarcane[J]. Current Science, 2012, 102(6): 857-866.
- [40] Cheng W H, Taliencio E W, Chourey P S. Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(18):10512.
- [41] Chung M S, Lee S, Min J H, et al. Regulation of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane
- [42] glucose-responsive regulator, (AtPGR) expression by *A. thaliana*, storekeeper-like
- [43] transcription factor, AtSTKL, modulates glucose response in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2016, 104:155-164.
- [44] Churchill M E, Travers A A. Protein motifs that recognize structural features of DNA[J].
- [45] Trends in Biochemical Sciences, 1991, 16(3):92-97.
- [46] Churchill M.E.A, Travers A.A. A protein motifs that recognize structural features of DNA[J], Trends Biochem, 1991, 16(3): 92-97
- [47] Delaney S K, Orford S J, Martinharris M, et al. The fiber specificity of the cotton FS1tp4 gene promoter is regulated by an AT-rich promoter region and the AT-hook transcription factor GhAT1[J]. Plant & Cell Physiology, 2007, 48(10):1426-1437.
- [48] Delaney S.K, Orford S.J, Martin H.M, et al. The fiber specificity of the cotton FS1tp4 gene promoter is regulated by an AT-rich promoter region and the AT-hook transcription factor GhAT1[J]. Plant Cell Physiol, 2007, 48 (10):1426-1437.
- [49] Dickinson C D, Altabella T, Chrispeels M J. Slow-growth phenotype of transgenic tomato expressing apoplastic invertase[J]. Plant Physiology, 1991, 95(2):420-425.
- [50] Do H J, Song H, Yang H M, et al. Identification of multiple nuclear localization signals in

- murine Elf3, an ETS transcription factor[J]. *Febs Letters*, 2006, 580(7):1865-71.
- [51] Elsharkawy M A. Cassava biology and physiology[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(4): 481-501FAO.
- [52] Franzetti B, Zhou D X, Mache R.. Structure and expression of the nuclear gene coding for the plastid CSI ribosomal protein from spinach[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992,20(16):4153-4157.
- [53] Fujimoto S, Matsunaga S, Yonemura M, et al. Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004,56(2):225-39.
- [54] Goetz M, Godt D E, Guivarc'H A, et al. Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(11):6522.
- [55] Goodwin G H, Sanders C, Johns E W. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids.[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1973,38(1):14-19.
- [56] Gordon B.R.G, Li Y.F, Wang L.R, et al. Change in physicochemical traits of cassava roots and starches associated with genotypes and environmental factors[J]. *Starch-Starke*, 2013, 65,253-263.
- [57] Gu Y Q, Wildermuth M C, Chakravarthy S, et al. Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*,2002, 14(4): 817-831.
- [58] Hellens R P, Allan A C, Friel E N, et al. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants[J]. *Plant Methods*, 2005, 1(1): 13.
- [59] Ho LC. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength[J]. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 1988, 39(1):355-378.
- [60] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(Web Server issue):W585-7.
- [62] Hyun T K, Hoffmann A, Sinha A K, et al. Tomato mitogen activated protein kinases regulate the expression of extracellular invertase *Lin6* in response to stress related stimuli[J].*Functional Plant Biology*, 2009, 36(12):1088-1097.
- [63] Initiative A G. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature*. 2000, 408(6814): 796.
- [64] Jansson C, Westerbergh A, Zhang J, et al. Cassava, a potential biofuel crop in China[J]. *Applied Energy*, 2009.
- [65] Jin Y, Luo Q, Tong H, et al. An AT-hook gene is required for palea for-4 mation and floral organ number control in rice[J], 2011,*Dev Biol*,359(2): 277-288
- [66] Keddie J S, Tsiantis M, Piffanelli P, et al. A seed-specific *Brassica napus*, oleosin promoter interacts with a G-box-specific protein and may be bi-directional[J]. *Plant Molecular Biology*,1994, 24(2):327.
- [67] Kocal N, Sonnewald U, Sonnewald S. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible
- [68] interaction between tomato and *Xanthomonas campestris pvvesicatoria*[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(3):1523-36.

- [69] Kosugi S, Suzuka I, Ohashi Y. Two of three promoter elements identified in a rice gene for proliferating cell nuclear antigen are essential for meristematic tissue-specific expression.[J]. *Plant Journal*, 1995, 7(6):877-886.
- [70] Krausgrill S, Sander A, Greiner S, et al. Regulation of cell wall invertase by a proteinaceous inhibitor[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47 Spec No(Special):1193-1198.
- [71] Lara M E B, Garcia M C G, Fatima T, et al. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(5):1276.
- [72] Le B H, Cheng C, Bui A Q, et al. Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(18):8063.
- [73] Lei Y U, Liu J P, Zhuang Z X, et al. Quantitative Analysis of Real-Time PCR Expression Production by REST and $2^{-(-\Delta\Delta CT)}$ [J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2007.
- [74] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(Database issue):302-5.
- [75] Liao S C, Lin C S, Wang A Y, et al. Differential expression of genes encoding acid invertases in multiple shoots of bamboo in response to various phytohormones and environmental factors[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 2013, 61(18): 4396-4405.
- [76] Lim P O, Kim Y, Breeze E, et al. Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants[J]. *Plant Journal*, 2007, 52(6):1140-1153.
- [77] Martinez GJF, Quail P.H. The HMG-I/Y protein PF1 stimulates binding of the transcriptional activator GT-2 to the PHYA gene promoter[J]. *Plant J*, 1999, 18(2): 173-183
- [78] Matsushita A, Furumoto T, Ishida S, et al. AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of AtGA3ox1 encoding GA 3-oxidase.[J]. *Plant Physiology*, 2007,143(3):1152-62.
- [79] Narender Kumar Goel, Virendra Kumar, Yatendra Kumar Bhardwaj, et al. Gibberellin-dependent induction of tomato extracellular invertase Lin7 is required for pollen development.[J]. *Functional Plant Biology*, 2006, 33(6):547-554.
- [80] Ng K H, Yu H, Ito T. AGAMOUS controls GIANT KILLER, a multifunctional chromatin modifier in reproductive organ patterning and differentiation.[J]. *Plos Biology*, 2012,7(2):e1000251-201.
- [81] Niu Q, Li J, Cai D, et al. Dormancy-associated MADS-box genes and microRNAs jointly control dormancy transition in pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) flower bud[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 67(1):239.
- [82] Ohyama A, Nishimura S, Hirai M. Cloning of cDNA for a cell wall-bound acid invertase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and expression of soluble and cell wall-bound invertases in plants and wounded leaves of *L. esculentum* and *L. peruvianum*[J]. *Genes & Genetic Systems*. 1998, 73(3): 149-157.
- [83] Pressman E, Harel D, Zamski E, et al. The effect of high temperatures on the expression and activity of sucrose-cleaving enzymes during tomato, anther development[J]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2015, 81(3):341-348.
- [84] Proels R K, Hause B, Berger S, et al. Novel mode of hormone induction of tandem tomato invertase genes in floral tissues[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52(1):191-201.
- [85] Reddy M.C., Christensen J., and Vasquez K.M., 2005, Interplay between human high mobility group protein 1 and replication protein a on psoralen-cross-linked DNA,

Biochemistry,44(11): 4188-4195

[86] Ricardo CP. Alkaline β -fructofuranosidases of tuberous roots: Possible physiological function[J]. *Planta*, 1974, 118(4):333-343.

[87] Riechmann J L , Heard J , Martin G , et al . Arabidopsis Transcription Factors : Genome-Wide Comparative Analysis among Eukaryotes. *Science*[J]. 2000, 290 (5499): 2105.

[88] Riechmann J L , Meyerowitz E M . The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry*[J]. 1998, 379(6): 633-646.

[89] Rishmawi L , Pesch M , Juengst C , et al . Non-cell-autonomous regulation of root hair patterning genes by WRKY75 in Arabidopsis thaliana . *Plant physiology* [J]. 2014 , 165(1): 186-195.

[90] Roitsch T, Balibrea M E, Hofmann M, et al. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(382):513.

[91] Shahmuradov I A , Gammerman A J , Hancock J M , et al . PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Research*[J]. 2003 , 31(1): 114.

[92] Tian S, Navarre W W, Xia B, et al. Lsr2 is anucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in Mycobacterium tuberculosis, *Proc.Natl.Acad*,2010, *Sci.USA*, 107(11): 5154-5159

[93] Vom E D, Soares e S M, Kijne J W, et al. Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the Catharanthus roseus ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-Hook DNA-binding proteins[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(144):1680-1689.

[94] Vom ED, Silva M.S, Kijne J.W,et al. Identification of a bipartite jasmonate responsive promoter element in the Catharanthus roseus ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-Hook DNA-binding proteins[J] . *Plant Physiol*,2007,144(3): 1680-1689

[95] Washburn K B , Davis E A , Ackerman S . Coactivators and TAFs of transcription activation in wheat. *Plant Molecular Biology*[J]. 1997 , 35(6): 1037-1043.

[96] Wind J, Smeeckens S, Hanson J. Sucrose: metabolite and signaling molecule[J].*Phytochemistry*, 2010, 71(14): 1610-1614.

[97] Xu Y.F, Gan E.S, and Ito T, 2013, The AT-hook/PPC domain protein TEK negatively regulates floral repressors including MAF4 and MAF5, *Plant Signal. Behav.*, 8(8): e25006

[98] Yin D.D., Liu X., Shi Z.Y., Li D.Y., and Zhu L.H., 2018, An AT-hook protein DEPRESSED PALEA1 physically interacts with the TCP Family transcription factor RETARDED PALEA1 in rice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 495(1):487-492

[99] Yun J., Kim Y.S., Jung J.H., Seo P.J., and Park C.M., 2012, The AT-hook motif-containing protein AHL22 regulates flowering initiation by modifying FLOWERING LOCUS T chromatin in Arabidopsis, *J. Biol. Chem.*, 287(19): 15307-15316

[100] Zhang Y L , Zhang A H , Jiang J . Gene expression patterns of invertase gene families and modulation of the inhibitor gene in tomato sucrose metabolism . *Genetics and Molecular Research* [J]. 2013, 12 (3): 3412-3420.

[101] Zhao J., Favero D.S., Peng H., and Neff M.M., 2013, A rabadopsis thaliana AHL family modulates hypocotyl growth redundantly by interacting with each other via the PPC/DUF296 domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(48): 4688-4697

[102] Zhao J., Favero D.S., Qiu J., Eric H.R., and Michael M.N., 2014, Insights into the

evolution and diversification of the AT-hook Motif Nuclear Localized gene family in land plants,
BMC Plant Biol., 14(1): 266

硕士期间取得成果

1. 《MeABL5,an ABA Insensitive 5-Like Basic Leucine Zipper Transcription Factor, Positively Regulates MeCWINV3 in Cassava(Manihot esculenta Crantz)》
2. 《基因组学与应用生物学》发表论文《AT-hook 蛋白的最新研究进展》
3. 《分子植物育种》发表论文《木薯 MeAHL31 基因克隆及其在原核细胞中的表达与优化》
- 4.参与海南省创新课题《AT-hook 基因家族在木薯块根腐烂中的调节机制研究》Hys2018-08
- 5.参与国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-11-HNGJC)

致谢

时光荏苒，三年的研究生学习生涯即将随着论文的完成而结束，心中满是感激与不舍。本论文是在导师郭建春研究员、胡新文教授和刘姣副研究员的悉心指导下完成的，从论文的选题、实验的设计、实验的实施到论文撰写的整个过程，都凝聚了三位导师的心血和汗水。在三年的学习期间，三位导师无论在生活上还是学习上，都给与我极大的帮助，值此论文完成之际特向三位导师表示衷心的感谢！感谢课题组符少萍老师、姚远老师和李瑞梅老师在我实验过程中给与的指导和帮助。感谢实验室的陈霞、王亚杰、周杨骄、陆小花、王硕、吕瑞、欧阳宇珺、张建禹、王晓彤、仇婷婷、李崧等师兄弟和师姐妹在实验和生活中给与的支持与帮助。时光飞逝，但与大家相处的时光将是我生命中不可磨灭的美好回忆。感谢我的室友尚璐和孟宇红，她们给与了我生活上的关心、精神上的支持和实验中的帮助，有他们的陪伴，我的研究生生涯变得多姿多彩、快乐无限！

感谢热带农林学院和热带生物技术研究所有给与我帮助的老师及同学，是大家的慷慨帮助为我的求学路减少一份辛苦。最后，感谢我的家人和朋友给我的无私关心与爱护，感谢他们给我全力的支持与鼓励，他们是我的铠甲与后盾，也是我牵挂和软肋，有他们的爱为我一路护航，我将走的更远更好。

王元元
2020年6月19日