

杨树 MADS 转录因子 SVL 基因克隆、原核表达 与多克隆抗体制备

王冬莉¹, 刘芸杉^{1,2}, 孟 森¹, 卞 展^{1*}

(1. 中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520; 2. 重庆三峡学院 生物与食品工程学院, 重庆 404100)

摘 要:为研究杨树 MADS 转录因子相关基因在逆境中的作用,以 84K 杨树叶片的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增得到了开放阅读框为 684 bp、氨基酸个数为 227 的 *PtSVL* 基因;构建原核表达载体 pET-B2M-*PtSVL*-3×FLAG,并在大肠杆菌 B21(DH3)中大量表达。结果表明,获得的 *PtSVL*-3×FLAG 融合蛋白,大小为 42.0 ku,主要以包涵体形式存在;用纯化后的蛋白免疫新西兰公兔制备 *PtSVL* 多克隆抗体;间接 ELISA 法和 Western blot 检测后多克隆抗体后显示其效价高,特异性好。获得的 *PtSVL* 多克隆抗体将为后续鉴定 *PtSVL* 蛋白的互作蛋白提供基础。

关键词:杨树;MADS 转录因子;*PtSVL*;原核表达;多克隆抗体

中图分类号:S792.11

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2022)03-0082-06

Cloning, Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of *Populus* MADS Transcriptional Factor Members *PtSVL*

WANG Dong-li¹, LIU Yun-shan^{1,2}, MENG Sen¹, BIAN-Zhan^{1*}

(1. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China;

2. College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China)

Abstract: In order to understand the role of MADS transcriptional factor in response to adversity stresses, *PtSVL* gene was obtained from the cDNA of 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa* '84K') leaves using PCR amplification with the full length of 684 bp, encoding 227 amino acids. The recombinant vector pET-B2M-*PtSVL*-3×FLAG was expressed in *E. coli* strain B21 (DH3). The fusion *PtSVL* and three FLAG tags protein was 42.0 ku and mainly existed in inclusion body. By immunizing the rabbits with the purified protein, polyclonal antibody of *PtSVL* was produced. ELISA and Western blot showed that the antibody had high titer and good specificity. The obtained antibody can be used for subsequent *PtSVL* protein interactions.

Key words: *Populus*; MADS transcriptional factor; *PtSVL*; prokaryotic expression; polyclonal antibody

生长在北半球的杨树属 (*Populus*) 含有约 30 种植株,在温带树木中生长速度最快。相对较小的基因组、大量的分子遗传图谱和成熟的遗传转化体系使得杨树成为重要的林木模式植物。同时,杨树还可以生产各种木材产品(木材、纸浆和纸张),具有保持水土、涵养水源等功能^[1]。然而,在杨树整个生命过程中,非生物胁迫严重影响着杨树生长^[2]。探究杨树抵御非生物胁迫的分子及生理机制具有重要

的意义。

转录因子常在生物的发育或信号转导中发挥重要作用,MADS-box 家族基因是其重要的组成部分^[3]。MADS-box 基因家族成员拥有保守的 N 端结构,由大约 60 个氨基酸组成,与 CArG 位点结合后参与下游信号途径^[4]。目前,已有许多研究解析了不同物种的 MADS 基因的结构、表达、定位、蛋白基序组织及系统发育关系,比如西瓜 (*Citrullus*

收稿日期:2021-06-01 修回日期:2021-07-01

基金项目:中国林业科学研究院青年协同创新项目(CAFYBB2019QD001-4)。

第一作者:王冬莉。研究方向:植物分子生物学研究。E-mail:wangdongli1997@163.com

* 通信作者:卞 展,助理研究员。研究方向:植物分子生物学研究。E-mail:bianzhanzhan@163.com

lanatus)、苦荞麦(*Fagopyrum tataricum*)、杨树(*Populus trichocarpa*)、菊花(*Chrysanthemum nankingense*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[5-10]。许多重要的 MADS-box 转录因子决定花器官的形成、调节果实发育和胚胎发生。1990 年,金鱼草的基因 *defA-1* 突变后,花瓣转化为萼片,雄蕊转化为心皮,植株表现出“球藻”的形态^[11]。SOC1(Suppressor of Over-expression of Constants1)基因整合光周期、温度、激素和年龄等参与开花途径,同时受到 2 种拮抗开花调节剂 CO(CONSTANS)和 FLC1(Flowering Locus C1)的调控,它们分别作为花的激活因子和抑制因子^[12]。拟南芥 *fruitfull* 基因突变后消除了受精后长角果伸长的表型^[13]。AGL15 可能是调控种子发育的重要组成部分^[14]。植物 MADS 基因在应对非生物胁迫方面也发挥关键作用。比如,过表达 *SlMBP22* 后的番茄通过影响生长素、赤霉素信号影响植株的高度和叶片大小,且比野生型的番茄更耐干旱;脱水处理可以诱导 *SlMBP22* 基因表达^[15]。SVP(Short Vegetative Pahse)在拟南芥中直接靶向细胞色素 P450 单加氧酶 *CYP707A1*/*CYP707A3* 和葡萄糖苷酶 *AtBG1* 控制脱落酸含量,进而抵御干旱胁迫^[16]。目前,在杨树中已经克隆了有关 MADS 基因,但是多数集中在与花相关或营养器官相关的研究中,有关其应对非生物胁迫的研究欠缺^[17-20]。

本研究以 84K(*Populus alba* × *Populus glandulosa* ‘84K’)杨树为试验材料,对杨树 *PtSVL* (Short Vegetative Pahse-Like)进行了克隆,并纯化出融合蛋白,将融合蛋白作为抗原免疫新西兰公兔以获得多克隆抗体。使用抗体以期筛选出 *PtSVL* 潜在的互作蛋白,从而为探究 *PtSVL* 蛋白功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

将 84K 杨树培育在 MS 培养基中,幼苗高度达到 8.5 cm 左右时移植到土壤中(草炭土:蛭石=3:1)。在培养箱中(温度 25 ℃;相对湿度 75%;16/8 h 光照/黑暗)生长 2 个月后,取叶片样品,液氮速冻后立即保存于-80 ℃冰箱中。

1.2 方法

1.2.1 *PtSVL* 蛋白质结构分析及抗原性预测 *PtSVL* 蛋白的亲/疏水性被 ExPASy 软件中的 ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)在线预测。Protean 中的 Jameson-Wolf 方法被用来分析 *PtSVL* 蛋白的抗原指数等。

1.2.2 *PtSVL* 基因的克隆 依据杨树数据库 PopGenIE (<https://popgenie.org/>) 中 Potri.007G010800 序列设计用于扩增 *PtSVL* 基因的上游和下游引物。上游引物序列为 *PtSVL*-F(ATG-GCAAGAGAGAGGATTTCAGA),下游引物序列为 *PtSVL*-R(TCAGTTTGAAAATGGCAACCCCA),引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。以 84K 杨树叶片 cDNA 为 PCR 模板,50 μL 的 PCR 体系中含有 2 × Phanta Max Buffer 25 μL, dNTP Mix (10mM) 1 μL, cDNA 2 μL, *SVL*-F 2 μL, *SVL*-R 2 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL 和 ddH₂O 17 μL。PCR 程序设置为:95 ℃, 3 min;95 ℃, 15 s;53 ℃, 15 s;72 ℃, 15 s;运行 35 个循环后再经 72 ℃, 5 min;结束程序。

1.2.3 原核表达质粒构建 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段大小处的条带。采用无缝克隆技术将基因链 3 × FLAG 标签后连接到实验室保存的原核表达载体 pET-B2M 中,然后转入大肠杆菌 B21(DH3)。挑取阳性克隆在至 LB 培养基中 37 ℃ 震荡培养,提取质粒后利用 PCR 扩增后经琼脂糖凝胶电泳检测,并送至睿博兴科测序。

1.2.4 目的蛋白小量表达与鉴定 在 3 mL 液体 LB 中加入 pET-B2M-SVL-3 × FLAG 重组质粒的单菌落,在 37 ℃ 摇床中培养至浓度(OD₆₀₀)约为 0.6。取适量菌液作为对照,余下菌液加入 IPTG 诱导剂(终浓度 0.5 mmol · L⁻¹)作试验组,37 ℃ 摇床培养 4 h。取对照组和试验组各 0.15 mL, 12 000 r · min⁻¹ 离心 2 min。取 40 μL 1 × loading buffer 重悬裂解菌体沉淀,SDS-PAGE 检测上清液。

1.2.5 蛋白大量表达、破菌检测 在 100 mL 液体 LB 中加入 100 μL 原保存于-20 ℃的菌种,过夜培养。随后将菌液接种于 2 L LB 液体培养基中,37 ℃ 培养至浓度(OD₆₀₀)约 0.6。加入诱导剂 IPTG 至其终浓度为 0.5 mmol · L⁻¹, 30 ℃ 震荡培养 4 h。8 000 r · min⁻¹ 离心 3 min 收集菌体后用 50 mL 预冷 NTA-0 缓冲液重悬菌体,冰浴 30 min。使用功率 200 W、工作 3 s、暂停 4 s 的超声破碎菌体 25~30 min。16 000 r · min⁻¹ 4 ℃ 离心 50 min,收集上清以及沉淀。SDS-PAGE 检测上清和沉淀,剩余部分置于 4 ℃ 备用。

1.2.6 包涵体蛋白纯化 使用 50 mL STET 缓冲液重悬沉淀,加入 DTT 至其终浓度 1 mmol · L⁻¹。功率 200 W、工作 3 s、暂停 3 s 的超声促进杂蛋白溶解,时间 10 min。10 000 r · min⁻¹ 4 ℃ 离心 10 min,去上清。重复以上步骤至上清透明。沉淀以 1 × PBS 重悬后经 200 W、工作 3 s、暂停 3 s、时间 5

min 的超声处理。 $16\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 去上清。用 $4\ \text{mL}\ 6\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍重悬包涵体后加 DTT 至其终浓度 $5\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。转速 $220\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 $37\ ^\circ\text{C}$ 的摇床中培养 3 h 至包涵体全部溶解。 $10\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 取 $10\ \mu\text{L}$ 上清进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.7 蛋白亲和纯化 $0.22\ \mu\text{m}$ 过滤器过滤蛋白溶液后。准备 Ni-NTA 柱, 以 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速上样蛋白溶液, 以 $6\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 为 8.0 盐酸胍缓冲液洗 Ni-NTA 柱至流出液不含蛋白, 即经 G250 检测后流出液不变色可视为不含蛋白。以含 20、60、200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $500\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑的洗脱液分别进行洗脱, 分段收集洗脱液至 G250 检测液不变色。以 3 倍柱体积去离子水洗涤柱料, 并以 20% 乙醇封柱。在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下 SDS-PAGE 电泳检测收集的洗脱液。 $4\ ^\circ\text{C}$ 下超滤浓缩产物, SDS-PAGE 电泳检测 $10\ \mu\text{L}$ 的浓缩产物。

1.2.8 多克隆抗体制备和鉴定 将纯化的融合蛋白与弗氏完全佐剂按照 1:1 体积混合后进行乳化。按 $500\ \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$ 剂量在 2 只白兔的皮下多点注射乳化后的融合蛋白。每只兔子免疫 3~4 次, 免疫间隔时间为 14 d。检测免疫效价, 待抗体表达恒定后采血分离血清, $-20\ ^\circ\text{C}$ 储存。

1.2.9 抗体纯化 以 10 倍柱床体积、流速为 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的去离子水将 ProteinG 柱冲洗 3~5 遍。再以 10 倍柱体积、流速 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的 $0.02\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB+ $0.3\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 冲洗 3~5 遍。取经 $0.02\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB 稀释后的抗血清 8 mL, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后上柱, 流速为 $5\sim 7\ \text{s} \cdot \text{滴}^{-1}$ 。用 $0.02\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB 以 $2\ \text{s} \cdot \text{滴}^{-1}$ 的流速冲洗至无蛋白流出, 检测标准为 G250 不变蓝。 $0.1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 为 3.0 的甘氨酸洗脱, 并收集洗脱物, 经 G250 检测洗脱产物至不变蓝。饱和碳酸钠调节洗脱产物的 pH 为中性。使用 10 ku 超滤管超滤浓缩至 1~3 mL。用 $0.01\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 pH 为 7.4 的 5 L PBS 透析过夜, 第 2 天更换 PBS 1 次。然后再使用去离子水冲洗层析柱至其为中性, 最后使用 5 倍柱床体积的 20% 乙醇冲洗层析柱, $4\ ^\circ\text{C}$ 封存。

1.2.10 免疫效价 ELISA 检测 将 $2\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原放置在 $4\ ^\circ\text{C}$ 中过夜包被。按 1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000 等进行梯度稀释待检血清, 各取 $100\ \mu\text{L}$ 加入 96 孔板作为试验组, 空白血清为阴性对照。放置在 $37\ ^\circ\text{C}$ 条件下温育 1 h 后, 用 $200\ \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 的 TBST 洗涤 3 遍。 $10\ 000$ 倍稀释后羊抗兔-HRP 作为二抗, $37\ ^\circ\text{C}$ 温育 45 min, 用 $200\ \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 的 TBST 洗涤 3 遍, 用

$100\ \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ TMB 显色液显色 20 min, 酶标仪测定 OD_{450} 值。

1.2.11 Western blotting 检测 SDS-PAGE 检测分析纯化的融合蛋白、杨树叶片总蛋白、杨树叶片蛋白上清液或沉淀, 200 mA 湿法转 PVDF 膜, $37\ ^\circ\text{C}$ 封闭液封闭 2 h。加入免疫前兔血清或兔抗血清, $37\ ^\circ\text{C}$ 下摇床孵育 1 h。洗涤后, $10\ 000$ 倍稀释后羊抗兔-HRP 作为二抗, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。ECL 试剂的 A 液、B 液 1:1 混合后滴于 PVDF 膜正面, 暗室反应 2 min, 显影液反应 1 min, 定影液定影 1 min, 晾干, 标定 Marker 后分析 PtSVL 抗血清的特异性。

2 结果与分析

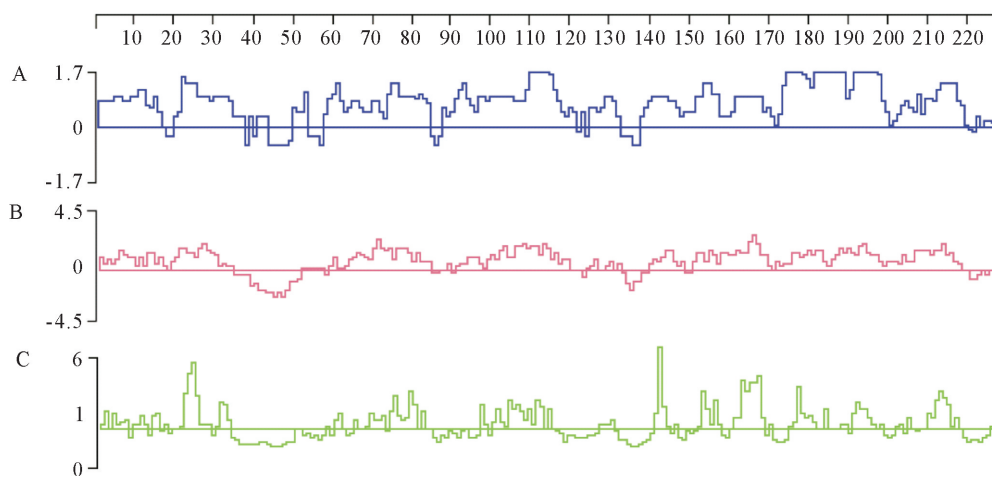
2.1 PtSVL 蛋白的抗原性、亲/疏水性和表面可及性的分析

SVL 基因编码蛋白由 227 个氨基酸组成, 预测蛋白分子量为 25.6 ku, 3×FLAG 标签蛋白的分子量为 17.0 ku。由图 1 可看出, 丰富且均匀的潜在抗原表位点分布在 SVL 蛋白上, 抗原指数较高的区段为第 1~16、20~37、41~43、50~53、9、88~121、125~132、138~220 位和 223~227 位氨基酸。亲/疏水性预测结果显示 PtSVL 蛋白平均亲水性为 -0.654。亲水性区段主要为第 1~17、19~34、52~57、59~84、92~119、124~126、129~130、140~148、150~170 位和 172~218 位氨基酸(图 1B), 序列亲水性较强。丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、蛋氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)和缬氨酸(Val)疏水性氨基酸分别占编码氨基酸的 4.0%、1.3%、4.8%、11.9%、2.6%、2.6% 和 5.7%。1~16、20~34 和 59~84 等位点具有抗原指数较高、亲水性较强等特征, 说明利用 SVL 蛋白制备抗体的可行性较强。采用 Emini 方法分析 SVL 蛋白表面可及性结果如图 1C 所示, 其表面可及性较高的区段为: 1~7、9~12、21~28、30~33、68~72、74~80、100~115、127~130、141~144、152~157、161~168、175~181、184~198、202~206 位和 208~218 位氨基酸。

综合 SVL 蛋白亲水性、表面可及性和抗原表位预测结果可知, 许多区段在亲水性、表面可及性、抗原表位可能性均较高, 比如 1~12、21~28、30~33、68~80、100~115 和 175~198, 使得这些预测区段有更大几率成为抗原表位。

2.2 PtSVL 基因的克隆和蛋白结构分析

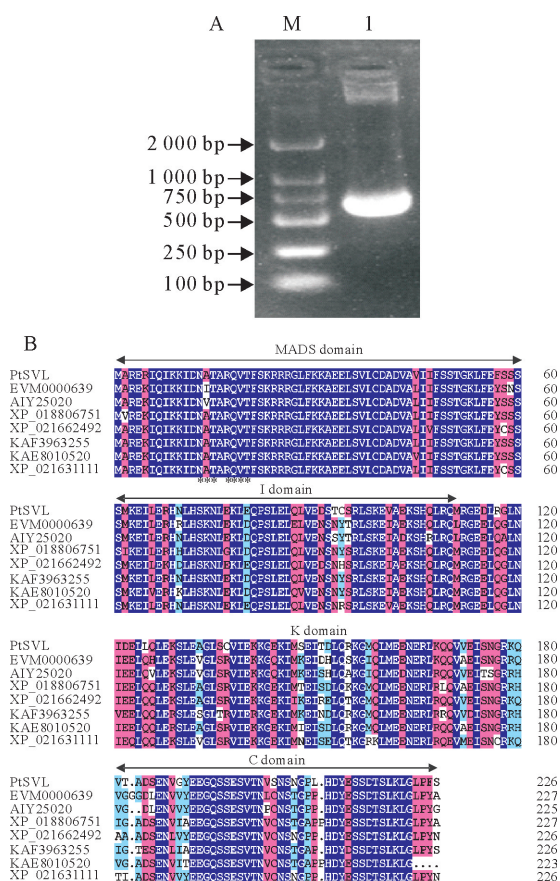
由图 2 可见, PCR 扩增得到的 PtSVL 基因大小为 684 bp, 编码 227 个氨基酸。多序列比对结果显示, PtSVL 蛋白具有 MIKC 结构, 氨基端拥有高



注: A. 抗原表位分析; B. 亲水性分析; C. 蛋白表面可及性分析。

图 1 杨树 SVL 蛋白抗原性、亲水性和表面可及性分析结果

Fig. 1 Antigenicity index, hydrophilicity and surface probability analysis of *Populus* SVL protein



注: A. M, B500350—0500 marker; 泳道 1, *PtSVL* 基因。B. *PtSVL* 蛋白结构分析。

图 2 杨树 *PtSVL* 基因克隆和蛋白结构分析

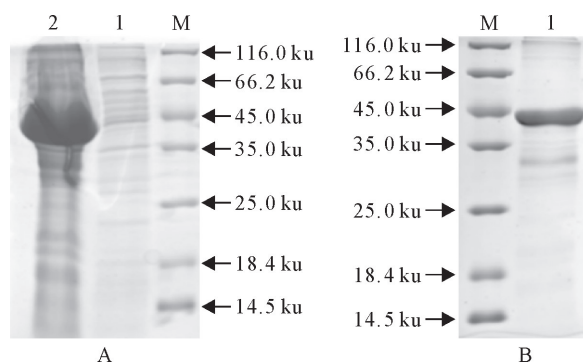
Fig. 2 Cloning of *PtSVL* and analysis of the protein structure

度保守的 DNA 结合 MADS 结构域,中部有 K 结构域。MADS 和 K 结构域由一个保守的 I 结构域连接,而羧基末端 C 区域可能作为反式活化结构域。

2.3 融合蛋白的表达与纯化

SVL-3×FLAG 融合蛋白主要以包涵体形式存在(图 3)。重组表达的大肠杆菌经过 IPTG 诱导后

小量表达、超声波裂解后经 SDS-PAGE 检测、大量表达及破菌检测。在 Ni-NTA 树脂层析柱中进行纯化。SDS-PAGE 检测分析经 10 倍稀释的纯化融合蛋白,结果见图 3,一条清晰的条带显示在 42.0 ku 处,与预测结果基本一致。



注: A. 蛋白表达, M, 蛋白 Marker; 泳道 1, 上清液; 泳道 2, 沉淀。B. 蛋白纯化, M, 蛋白 Marker; 泳道 1, 纯化的蛋白。

图 3 *PtSVL*-3×FLAG 蛋白的表达与纯化

Fig. 3 Expression and Purification of *PtSVL*-3×FLAG protein

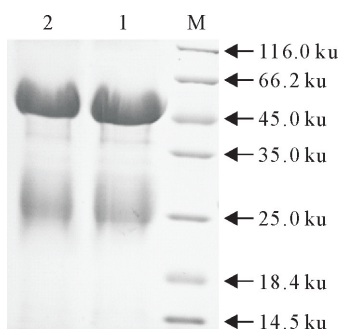
2.4 抗体的纯化结果

取纯化后的 *PtSVL* 蛋白分 4 次免疫 2 只白兔,进行免疫杨树 *PtSVL* 的多克隆抗体的制备。取免疫后的兔血清,利用 Protein G Agarose 进行抗体纯化。经 4 倍稀释后进行 SDS-PAGE 检测分析。结果见图 4,在 45.0 ku 附近有 1 条清晰条带,与纯化后的 *PtSVL* 融合蛋白显示的大小基本吻合。经 Protein G 亲和层析柱纯化后的抗体浓度超过 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,纯度约 90%,抗体纯化效果良好。

2.5 SVL 融合蛋白血清抗体的免疫效价检测和 Western blotting 检测

利用间接 ELISA 法测定 *PtSVL* 多克隆抗体效价。将多克隆抗体从 1:2 000 开始依次稀释至 1:32 768 000,羊抗兔-HRP 稀释 10 000 倍后作为二

抗,加入底物显色终止反应,测定其在 450 nm 波长处的吸光度。图 5 结果显示多克隆抗体的效价超过 $1:32\,000$,表明 PtSVL 融合蛋白可诱导兔产生良好的免疫反应,且抗体效价较高。为了检测 PtSVL 多克隆抗体的特异性,2 只不同兔子纯化的抗体(G1397 和 G1398)作为一抗, $10\,000$ 倍稀释后羊抗兔-HRP 作为二抗,对融合蛋白进行 Western blotting 分析。结果显示 $2\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 免疫前兔血清与 PtSVL 蛋白之间未发生特异性反应,免疫后兔血清纯化的抗体与 PtSVL 蛋白在 $42.0\,\text{ku}$ 处杂交出明显条带(图 6A)。提取杨树叶片的总蛋白,免疫前兔血清孵育时未在 $42.0\,\text{ku}$ 杂交出明显条带。图 6B 红框标识显示用纯化的抗体孵育杨树叶片蛋白上清液或者沉淀时,在 $42.0\,\text{ku}$ 处杂交出了明显条带。



注:M, 蛋白标准分子量;泳道 1. 兔 1 纯化抗体;泳道 2. 兔 2 纯化抗体。

图 4 多克隆抗体的纯化

Fig. 4 Purification of polyclonal antibody

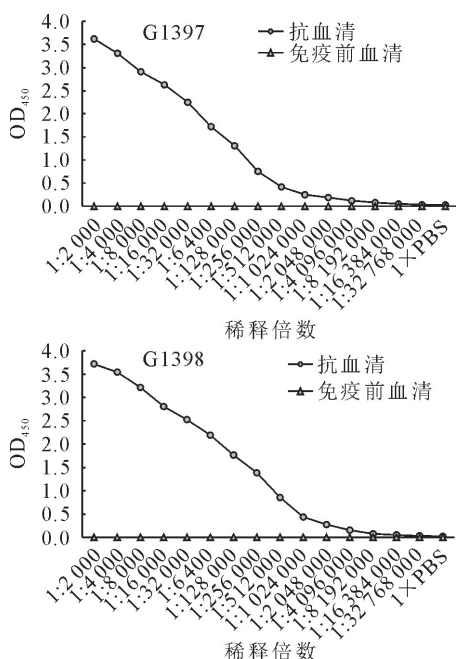


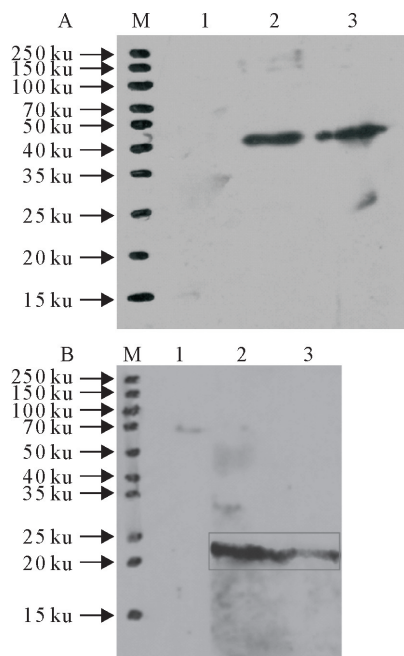
图 5 多克隆抗体免疫效价测定

Fig. 5 Identification of polyclonal antibody

3 结论与讨论

杨树具有独特的木本结构、多年生、雌雄异株等

特性,与拟南芥、水稻等草本植物之间存在巨大的差异^[1,7,21]。杨树的维管形成层形成的次生木质部组织产生木质生物量的能力满足社会对木材、纸浆和纸张的需求,具有很高的经济价值^[1]。在非生物胁迫中,干旱影响了根系对水分的吸收,导致蒸腾和光合作用减少,严重影响了杨树的生长和发育^[22]。MADS-box 转录因子的功能分析揭示了它们在植物主要发育过程(如开花、花器官特征)以及与胁迫相关的发育过程(如脱落、果实成熟、衰老)中的作用。OSMADS26 基因下调表达的水稻植株对稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)和水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae*)表现出更强的抗性,对于干旱也表现出更强的耐受性^[23]。



注:A. M, 蛋白 Marker;泳道 1, 免疫前上清孵育;泳道 2, 抗体 G1397 孵育;泳道 3, 抗体 G1398 孵育。B. M, 蛋白 Marker;泳道 1, 免疫前上清孵育杨树叶片总蛋白;泳道 2, 抗体孵育杨树叶片蛋白上清液;泳道 3, 抗体孵育杨树叶片蛋白沉淀。

图 6 多克隆抗体 Western blotting 检测

Fig. 6 Western blotting detection of polyclonal antibody

尽管目前已经从各种模式植物中克隆获得了一些 MADS 基因,并对部分基因的功能和调控网络进行了探究,比如转录因子 SVP 通过结合 CYP707A1/CYP707A3 和 AtBG1 启动子区的 CArG 位点进而调控这些基因的表达^[16]。AGL16 能够结合 CYP707A3、AAO3 和 SDD1 启动子的 CArG 并位点调控其转录,导致叶片气孔密度和 ABA 水平的改变^[24]。转录因子除了靶向下游基因的启动子中的特定位点,还可以通过蛋白互作激活或者抑制其他基因。比如,AtMYBL2 直接与 TT8 蛋白结合,抑制 DFR 和 TT8 蛋白的表达,进而调控花青素的合

成^[25]。FD 和 FT 蛋白相互作用在茎尖起作用促进花的转变,并通过花分生组织特征基因 *AP1* (*APETA-1A1*) 的转录激活来启动花的发育^[26]。

为深入揭示杨树 MADS 转录因子 *PtSVL* 在杨树中的生物学功能和其调控网络,本研究构建原核表达载体 pET-B2M-*PtSVL*-3×FLAG,并成功在大肠杆菌表达菌株大量表达。纯化后免疫新西兰公兔,获得了 *PtSVL* 多克隆抗体。经间接 ELISA 法和 Western blot 检测后发现抗体的效价高,特异性好。本研究成功制备了 *PtSVL* 多克隆抗体,将解析 *PtSVL* 基因功能和探究其上下游通路提供重要基础。

参考文献:

- [1] TAYLOR G. *Populus*: arabidopsis for forestry. Do we need a model tree[J]. *Annals of botany*, 2002, 90(6): 681-689.
- [2] 焦绪娟. 几个杨树杂交无性系抗逆性研究与评价[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007: 1-84.
- [3] DUAN W K, SONG X M, LIU T K, *et al.* Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Brassica rapa* (Chinese cabbage)[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(1): 239-255.
- [4] YANOFSK M F, MA H, BOWMAN J L, *et al.* The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors[J]. *Nature*, 1990, 346(6279): 35-39.
- [5] WANG P, WANG S B, CHEN Y, *et al.* Genome-wide analysis of the MADS-Box gene family in watermelon[J]. *Computational biology and chemistry*, 2019(80): 341-350.
- [6] LIU M Y, FU Q K, MA Z T, *et al.* Genome-wide investigation of the MADS gene family and dehulling genes in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. *Planta*, 2019, 249 (5): 1301-1318.
- [7] LESEBERG C H, LI A, KANG H, *et al.* Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Populus trichocarpa* [J]. *Gene*, 2006(378): 84-94.
- [8] WON S Y, JUNG J-A, KIM J S. Genome-wide analysis of the MADS-Box gene family in *Chrysanthemum* [J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2021(90): 107424.
- [9] WANG Y S, ZHANG J L, HU Z L, *et al.* Genome-wide analysis of the MADS-box transcription factor family in *Solanum lycopersicum* [J]. *International Journal of Molecular Science*, 2019(20): 2961.
- [10] PARENICOVA L, FOLTER D S, KIEFFER M, *et al.* Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world[J]. *Plant Cell*, 2003(7): 1538-1551.
- [11] SOMMER H, BELTRAN J P, HUIJSER P, *et al.* Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors[J]. *The EMBO Journal*, 1990(3): 605-613.
- [12] YOO S K, CHUNG K S, KIM J, *et al.* Constans activates suppressor of overexpression of constans 1 through flowering locus T to promote flowering in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005(2): 770-778.
- [13] GU Q, FERRANDIZ C, YANOFSKY M F, *et al.* The Fruit-full Mads-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development [J]. *Development*, 1998 (8): 1509-1517.
- [14] HECK G R, PERRY S E, NICHOLS K W, *et al.* AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos [J]. *Plant Cell*, 1995(8): 1271-1282.
- [15] LI F F, CHEN X Y, ZHOU S G, *et al.* Overexpression of *SIMBP22* in tomato affects plant growth and enhances tolerance to drought stress [J]. *Plant Science*, 2020(301): 110672.
- [16] WANG Z, WANG F X, HONG Y C, *et al.* The flowering repressor SVP confers drought resistance in *Arabidopsis* by regulating abscisic acid catabolism [J]. *Molecular Plant*, 2018 (9): 1184-1197.
- [17] BUSOV V B. Plant development: dual roles of poplar SVL in vegetative bud dormancy [J]. *Current Biology*, 2019 (2): 68-70.
- [18] CSEKE L J, CSEKE S B, RAVINDER N, *et al.* SEP-class genes in *Populus tremuloides* and their likely role in reproductive survival of poplar trees [J]. *Gene*, 2005(358): 1-16.
- [19] CSEKE L J, RAVINDER N, PANDEY A K, *et al.* Identification of PTM5 protein interaction partners a MADS box gene involved in aspen tree vegetative development [J]. *Gene*, 2007 (1/2): 209-222.
- [20] ZHANG B Y, SU X H, ZHOU X M. A MADS-box gene of *Populus deltoides* expressed during flower development and in vegetative organs [J]. *Tree Physiology*, 2008(6): 929-934.
- [21] 程玮哲, 樊军锋, 周永学, 等. 基于荧光 SSR 标记的 10 个白杨派种质资源遗传多样性分析 [J]. *西北林学院学报*, 2021, 36 (3): 88-93.
- CHENG W Z, FAN J F, ZHOU Y X, *et al.* Genetic diversity analysis of the 10 poplar accessions based on SSR molecular makers [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2021, 36(3): 88-93. (in Chinese)
- [22] 邱兴, 吕小锋, 李晓东, 等. 4 个杨树新无性系的抗旱性研究 [J]. *西北林学院学报*, 2015, 30(4): 99-108.
- QIU X, LÜ X F, LI X D, *et al.* Research on drought resistance of four new poplar clones [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2015, 30(4): 99-108. (in Chinese)
- [23] KHONG G N, PATI P K, RECHAUD F, *et al.* OsMADS26 negatively regulates resistance to pathogens and drought tolerance in rice [J]. *Plant Physiology*, 2015(4): 2935-2949.
- [24] ZHAO P X, MIAO Z Q, ZHANG J, *et al.* *Arabidopsis* MADS-box factor AGL16 negatively regulates drought resistance via stomatal density and stomatal movement [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020(19): 6092-6106.
- [25] MATSUI K, UMEMURA Y, MASARU O-T. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2008(6): 954-967.
- [26] ABE M, KOBAYASHI Y, YAMAMOTO S, *et al.* FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex [J]. *Science*, 2005(5737): 1052-1056.