

# 烟草 *CONSTANS* 同源基因的克隆与分析

陆莹<sup>1,2</sup>, 刘艳华<sup>1</sup>, 任民<sup>1</sup>, 牟建民<sup>1</sup>, 张兴伟<sup>1,2</sup>, 孙玉合<sup>1</sup>, 王志德<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

**摘要:** 日照长度影响植物的生长发育, 在拟南芥中 *CONSTANS* 是植物光周期开花途径中的关键基因。利用同源序列法结合 RACE 技术从短日照烟草品种 Kutsaga.Mammoth10 中分离出了开花时间相关的 *CO* (*CONSTANS*) 同源基因, 并命名为 *NtCO1* (基因登录号 JN022535.1)。经序列分析, *NtCO1* 全长 1493 bp, 具有完整的开放阅读框 (ORF, 81~1292 bp), 编码 403 个氨基酸; 具有 *CO* 蛋白典型的结构域; 氨基末端有两个 B-box 结构, 羧基末端有 CCT 保守结构域。氨基酸同源性比对发现, *NtCO1* 与茄科 *CO* 同源蛋白一致性最高, 同马铃薯 *CO* 序列一致性达到 86.5%; 与拟南芥 *CO* 蛋白和水稻 *Hd1* 氨基酸序列一致性也分别达到 50% 和 43.7%。基因表达分析表明, *NtCO1* 在叶片中优势表达, 茎中次之, 根中最弱。

**关键词:** *CONSTANS* (*CO*) 基因; 烟草; 克隆; 分析; *NtCO1*

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119 (2013) 03-0060-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2013.03.12

## Molecular Cloning and Analysis of a *CONSTANS* Homolog from *Nicotiana tabacum*

LU Ying<sup>1,2</sup>, LIU Yanhua<sup>1</sup>, REN Min<sup>1</sup>, MU Jianmin<sup>1</sup>, ZHANG Xingwei<sup>1,2</sup>, SUN Yuhe<sup>1</sup>, WANG Zhide<sup>1\*</sup>

(1. Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of CAAS, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Day length controls development in many plants. In *Arabidopsis thaliana*, the *CONSTANS* (*CO*) gene is a key component in the photoperiodic pathway controlling floral transition. A novel cDNA encoding a *CO* homolog was isolated from *Nicotiana tabacum* cv. Kutsaga Mammoth 10 and designated *NtCO1* (GenBank accession number, JN022535.1). The full cDNA sequence was 1493 bp with an open reading frame (ORF) of 1211 bp, encoding a protein of 403 amino acids. The predicted *NtCO1* protein contained two B-box-type zinc fingers and a CCT domain. Analysis based on amino acid sequence alignment showed that *NtCO1* shared high identity with *StCO* (86.5%) from *Solanum tuberosum*, *AtCO* (50%) from *A.thaliana* and *Hd1* (43.7%) from *Oryza sativa*. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that *NtCO1* was expressed specifically and strongly in leaf tissues but weakly in stem and root tissues.

**Keywords:** *CONSTANS*(*CO*)gene; tobacco; cloning; analysis; *NtCO1*

开花是植物由营养生长向生殖生长转化的重要过程, 光周期是调控植物开花的重要途径之一。*CONSTANS* 基因 (*CO*) 编码一个具有锌指结构的转录因子, 是光周期途径中的关键基因<sup>[1-2]</sup>。Putterill 等<sup>[3]</sup>最早在拟南芥突变体中采用图位克隆的方法分离出 *CONSTANS* 基因 (*CO*), *CO* 基因编码的 *CO* 蛋白含有与蛋白作用相关的 B-box 和与核定位有关 CCT (*CO*、*CO*-Like 和 *TOC1*) 两类重要的保守结构域<sup>[4-7]</sup>。Yano 等<sup>[8]</sup>对水稻抽穗期的一个重要数量

性状基因座利用图位克隆获得 *Hd1* 基因, 序列分析表明 *Hd1* 基因与 *CO* 基因同源。利用模式植物拟南芥 *CO* 基因和水稻 *Hd1* 基因的序列, 人们利用同源克隆或筛选文库的方法在小麦<sup>[9]</sup>、美洲黑杨<sup>[10]</sup>、马铃薯<sup>[11]</sup>等多种植物中均克隆到了 *CO* 同源基因。

*CO* 基因对光周期的响应起着关键作用, 植物首先通过光敏色素 (*PhyA*、*PhyB*、*PhyC*、*PhyD*、*PhyE*) 和隐花色素 (*Cry1*、*Cry2*) 2 类光受体接受光信号, *CO* 基因在光受体和生物节律钟的共同调

基金项目: 中国种质资源平台建设(国烟办综[2005]501号); 国家烟草专卖局科技项目“烟草 cDNA 文库构建及重要基因表达谱研究”(110200701021)

作者简介: 陆莹, 女, 硕士研究生, 研究方向为烟草光周期。E-mail: luying0922@126.com。\*通信作者, E-mail: wzdycs@tom.com

收稿日期: 2011-12-06

修回日期: 2012-06-30

控下,表达量呈现节律性变化,CO 蛋白调控下游基因 FT 和 *SOC1* 的表达控制开花时间<sup>[12]</sup>。

大多数烟草品种对光照的反应是中性的,只有多叶型品种是典型的短日照作物。目前对于烟草光周期的反应只集中于生理生化的研究<sup>[13-15]</sup>,但烟草开花的分子机理还不清楚。为更好地理解光周期对烟草开花调控的分子机制及 *CO* 基因的表达模式和功能,本研究以多叶型烟草品种 Kutsaga Mammoth 10 为材料,根据马铃薯 *CO* 基因序列设计特异引物,克隆获得 *NtCO1* 基因,分析其结构特征和组织器官特异性表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为短日照烟草 kutsaga mammoth 10 (*Nicotiana tabacum* cv. Kutsaga. Mammoth 10) 由国家烟草中期库提供,2011 年秋种植于中国农业科学院烟草研究所温室内。种子催芽后播种于育苗盘,发芽后转入光照培养箱(昼/夜温度为 27°C/22°C,光照强度为 700~900  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ,光周期 8~16 h,湿度保持在 65%~75%)。待幼苗期第 3 片真叶长出时取根、茎(第 1、2 片真叶之间)和第 3 片真叶,待营养生长 10~12 片真叶时取根、茎(第 5、6 片真叶之间)和第 8 片真叶,现蕾期取根茎(第 13、14 片真叶之间)和第 15 片真叶,液氮速冻后保存于 -70°C 备用。

### 1.2 RNA 提取与 cDNA 第一链的合成

分别取上述材料各 50~100 mg 用液氮研磨后,采用 Trizol<sup>®</sup>试剂盒 (Invitrogen) 提取总 RNA,将所提取的总 RNA 用 TE 稀释后分别在 260 nm、280 nm 紫外光测定 OD 值。并用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。*NtCO1* 中间片段获得和基因表达分析所需的 cDNA 模板,采用 Oligo dt (18) 和 M-MLV 逆转录酶 (Promega Cat. NO. M1705) 合成。利用 SMART<sup>™</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech Cat. NO. 634914) 分别合成 *NtCO1* 基因全长获得所需的 5'RACE cDNA 和 3'RACE cDNA。

### 1.3 烟草 *CONSTANS* 基因的克隆及全长获得

将马铃薯 (*Solanum tuberosum*) *CO* 基因序列 (基因序列登录号 AM888389.1) 在茄科基因数据库 (<http://solgenomics.net/>) 内进行比对,获得 7 条烟草 EST 序列,使用 DNAMAN 进行拼接,得到一条拼接序列。根据这一片段,应用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计一对引物 CO-F1 和 CO-R1。以 cDNA 第一链做模板进行 PCR 扩增,扩增产物测序。根据获得序列,设计 5'RACE 引物 CO-R1 和 3'RACE 引物 GSP2,以 5'RACE cDNA 和 3'RACE cDNA 为模板,以 GSP1 和 GSP2 及 SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit 提供的通用引物 UPM,进行 PCR 扩增,克隆、测序获得 5'端序列和 3'端序列。将 5'端序列和 3'端序列进行拼接获得 *NtCO1* 基因全长序列。以上引物合成与测序均在英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行,引物序列信息见表 1。

表 1 本实验所用到的引物  
Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列信息	用途
CO-F1	5'-TCGACCTTTGATTCCTTGCCCGTGTTT-3'	<i>NtCO1</i> 中间片段扩增
CO-R1	5'-GATGCTGCCTCTCTTTGTGCTCCTG-3'	
GSP1	5'-CACTACTCCCCACAAACAACATCC-3'	5'RACE 扩增
GSP2	5'-GGATGTTGTTTGGTGGGGAAGTAGTGG-3'	3'RACE 扩增
NUP	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	RACE 扩增通用引物
CO-YGF	5'-GCAGCAACAACCTGGGCAAA-3'	<i>NtCO1</i> 基因表达分析引物
CO-YGR	5'-TTCACACGCCTCGCAAAC-3'	
Actin-F	5'-AAGGGATGCGAGGATGGA-3'	<i>Actin</i> 内参基因扩增引物
Actin-R	5'-TACAACCTGCATACGACATAGG-3'	

### 1.4 烟草 *CONSTANS* 基因生物信息学分析

应用 Computer pI/Mw Tool 软件 (www.expasy.org) 分析推测 NtCO1 蛋白质等电点和分子量, 蛋白质和 DNA 同源性分析在 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 上用 BLAST 完成。根据其他物种已报道的 CO 家族全长序列和本研究克隆得到的共 25 个序列, 用 DNAMAN 进行多序列比对, 使用 MEGA4.0 通过 Neighbor-joining (NJ) 方法构建 NtCO1 分子进化树, 并进行 Bootstrap 检测。

### 1.5 烟草 *CONSTANS* 表达分析

利用 primer premier 5.0 生物软件设计半定量 RT-PCR 目的基因特异引物 (表 1), 采用 *Actin* 基因作为内参基因, 使用 TAKARA EX Taq<sup>®</sup> HS 酶。PCR 反应程序: 94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 60 s; 30 个循环。72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, AlphaImager EP 凝胶成像系统观察结果, 3 次重复。

## 2 结果

### 2.1 *NtCO1* 基因的克隆

使用引物 CO-F1 和 CO-R1 进行以总 cDNA 为模板获得一条 900 bp 的片段 (图 1B)。克隆测序, 所得序列经 NCBI-BLAST 检索发现与 *CONSTANS* 基因有很高的同源性, 确认该序列是目的片段。利用该片段设计 5'RACE 引物 GSP1 和 3'RACE 引物 GSP2, 经过 5'RACE 和 3'RACE 扩增分别获得 654 bp 和 863 bp 的 PCR 产物 (图 1C 和图 1D)。测序后发现, 5' 和 3' 端序列与已知中间片段有重叠, 为烟草 *CONSTANS* 基因 mRNA 的 5' 和 3' 端序列。3 个序列经 DNAMAN 软件拼接后得到了烟草 *CONSTANS* 基因完整 cDNA 序列, 全长 1493 bp, 在命名为 *NtCO1*, GenBank 登录号为 JN022535.1。

### 2.2 *NtCO1* 基因编码蛋白质的分析

序列分析表明该基因含有一个 1211 bp 的编码区, 编码 403 个氨基酸 (图 2)。预测相对分子质量

为 44.8 kD, 等电点 pI=5.28。与所报道的其他植物的 CO 蛋白质性质相似。经 SMART 程序在线预测, NtCO1 蛋白无跨膜结构与信号肽, 为水溶性蛋白。

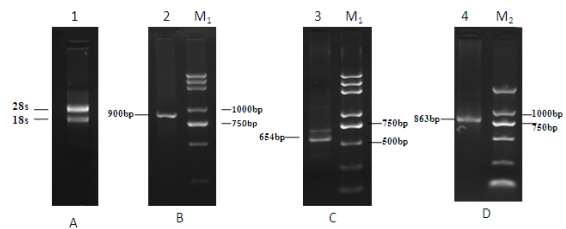


图 1 烟草总 RNA 提取、*NtCO1* 基因中间片段、5'RACE、和 3'RACE 扩增

Fig. 1 Total RNA extracted from tobacco, amplification of the middle fragment, PCR products of 5'RACE and 3'RACE 注: A,1 (总 RNA, 28s 和 18s 条带); B,2 (中间片段扩增产物); C,3 (5'RACE 扩增产物); D,4 (3'RACE 扩增产物); M<sub>1</sub> (DL2000 DNA Marker); M<sub>2</sub> (D2000 DNA Marker)。

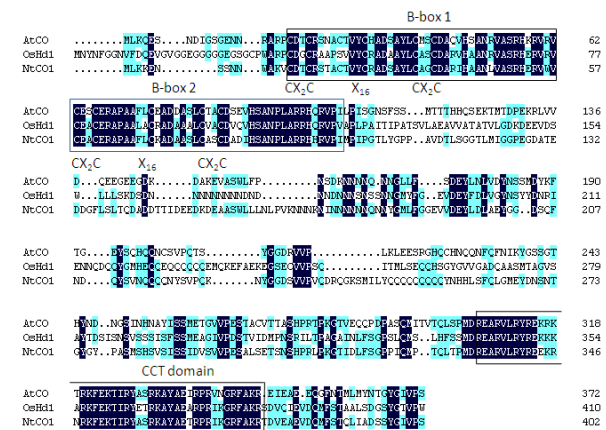


图 2 *NtCO1* 基因的推测氨基酸序列同 AtCO (拟南芥) 和 OsHd1 (水稻) 的多序列比对

Fig. 2 Alignment of the constans homologs from Arabidopsis (AtCO), rice (OsHd1), and tobacco (NtCO1)

对预测的 NtCO1 蛋白序列分析发现, 在氨基末端有 2 个串联的锌指结构域 B-box (15~57; 58~100), 羧基末端有 1 个 CCT 结构域 (334~378) (图 2)。每个 B-box 包含 1 个有 4 个半胱氨酸组成的 C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>16</sub>-C-X-C 的特殊结构。CCT 结构域大约有 43 个碱基组成。

### 2.3 *NtCO1* 序列一致性比较和进化树分析

分析 NtCO1 氨基酸序列同源性比对和分子进化树表明 (图 3), 各物种间在 B-box 结构和 CCT 结构域 2 个区域的同源性很高, 其他区段 CO 蛋白的同源性较低。NtCO1 氨基酸序列同马铃薯 CO 一

致性最高，为 86.5%。NtCO1 与拟南芥 (*Arabidopsisthaliana*) AtCO 和水稻 (*Oryza sativa*) Hd1 氨基酸序列一致性依次为 50.0%和 43.7%。从进化树上可以看出，NtCO1 与茄科植物马铃薯 CO、番茄 CO 聚为一类，小麦、毒麦和玉米等禾本科植物聚为一类，拟南芥、芥菜和甘蓝等十字花科植物聚为一类。

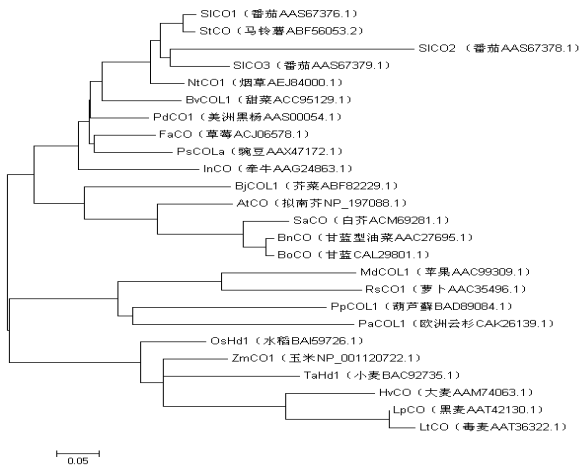


图 3 NtCO1 同其他物种的 CO、COL<sub>S</sub> 的进化树分析  
Fig. 3 Phylogenetic relationship of NtCO1 with CO and COLs in other species

### 2.4 NtCO1 基因表达分析

RT-PCR 分析表明，NtCO1 在烟草不同发育时期的根、茎和叶片中均有表达(图 4)。在幼苗期根、茎、和叶片中表达丰度极低。在营养生长阶段，在叶片中优势表达，在茎中次之，根中最弱。生殖生长阶段，在茎和叶片中优势表达，根中较弱。

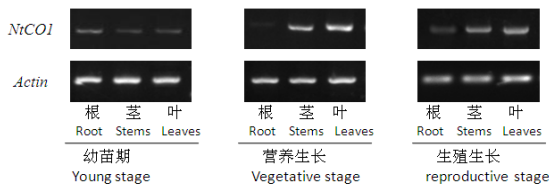


图 4 NtCO1 在烟草的表达分析  
Fig. 4 Expression of NtCO1 in tobacco.

## 3 讨 论

预测蛋白保守性分析表明 NtCO1 具有 CONSTANS 家族典型的 B-box 和 CCT 结构域。NtCO1 蛋白与马铃薯 CO 一致性高达 86.5%，与模式植物拟南芥 AtCO 蛋白的一致性也达到 50%。就

B-box 结构域进行比较，NtCO1 与 AtCO 一致性达到 77.9%；而 CCT 结构域一致性达到 83.7%。由此可初步推断 NtCO1 与马铃薯 CO 基因为同源基因，属于 CONSTANS 家族成员之一，与拟南芥 AtCO 基因为同源基因。

CONSTANS 基因在植物基因组中是多拷贝基因家族。在拟南芥中有 17 个成员<sup>[7]</sup>，水稻种也有 16 个成员<sup>[16]</sup>，拟南芥中 CONSTANS 蛋白家族根据 N 末端 B-box 结构特征分为 3 类：第 1 类是在 N 末端具有 2 个 B-box 结构；第 2 类是在 N 末端只有 1 个 B-box；第 3 类是在 N 末端有 1 个正常的 B-box 和 1 个二级结构改变的 B-box 锌指结构。NtCO1 具有两个正常的 B-box 结构，可以认为 NtCO1 应属于家族成员中的第一类。

通过基因表达分析可以看出，NtCO1 基因有时空表达差异，在烟草开花的调控的途径中可能起重要的作用。其他物种中 CO 同源基因对植物开花时间起着重要的作用，牵牛花的 *PnCO* 基因则可以弥补拟南芥 *co* 突变体的晚花表型并使其比野生型拟南芥开花期提前<sup>[17]</sup>。油菜 *BnCO1* 基因可以互补拟南芥 *co-2* 突变体的晚花表型<sup>[18]</sup>，在烟草中过表达蝴蝶兰 *PhalCOL* 基因可导致烟草早花<sup>[19]</sup>。这说明 CO 同源基因在植物成花方面具有一定的保守性。

### 参考文献

- [1] Imaizumi T, Schultz T F, Harmon F G, et al. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2005, 309: 293-297.
- [2] Kobayashi Y, Weigel D. Move on up, it's time for change mobile signals controlling photoperiodic-dependent flowering[J]. *Genes Dev.*, 2007, 21: 2371-2384.
- [3] Putterill J, Robson F, Lee K, et al. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors [J]. *Cell*, 1995, 80: 847-857.
- [4] Borden K L. RING fingers and B-boxes: Zinc-binding protein-protein interaction domains[J]. *Biochem Cell Biol.*, 1998, 76: 351-358.
- [5] Strayer C, Oyama T, Schultz T F, et al. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog[J]. *Science*, 2000, 289: 768-771.
- [6] Torok M, Elkin L D. Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins[J].

- Differentiation, 2000, 67: 63-71.
- [7] Robson F, Costa M M, Hepworth S R, et al. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants[J]. *Plant Journal*, 2001, 28: 619-631.
- [8] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, et al. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12: 2473-2483.
- [9] Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, et al. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice[J]. *Plant Journal*, 2003, 36: 82-93.
- [10] Yuceer C, Harkess R L, Land S B, et al. Structure and developmental regulation of *CONSTANS-LIKE* genes isolated from *Populus deltoides*[J]. *Plant Science*, 2002, 163: 615-625.
- [11] Drobyazina P E, Khavkin E E. A structural homolog of *CONSTANS* in potato[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, 53(5): 698-701.
- [12] Onouchi H, Igeno M I, Perilleux C, et al. Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes[J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 885-900.
- [13] 王秀荣. 短日照对烤烟多叶品种生长发育的影响[J]. *中国烟草*, 1991(3): 37-40.
- [14] 颜合洪, 赵松义. 生态因子对烤烟品种发育特性的影响[J]. *中国烟草科学*, 2001, 22(2): 15-18.
- [15] 段玉琪, 金磊, 杨宇虹, 等. 短日照对烤烟花芽分化及生物学性状的影响[J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(3): 108-112.
- [16] Griffiths S, Dunford R P, Coupland G, et al. The evolution of *CONSTANS-Like* gene families in barley, rice and Arabidopsis[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 1855-1867.
- [17] Liu J, Yu J, McIntosh L, et al. Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125: 1821-1830.
- [18] Robert L S, Robson F, Sharpe A, et al. Conserved structure and function of the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS* in *Brassica napus*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37: 763-772.
- [19] Zhang J X, Wu K L, Tian L N, et al. Cloning and characterization of a novel *CONSTANS-like* gene from *Phalaenopsis hybrida*[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(2): 409-417.

### 《烟草科技》2013年第3期目次

- 05 基于烟叶原料化学特性的卷烟配方叶组分组方法..... 王晓辉, 易 斌, 谭国治, 等
- 08 KLD2-3 两段式滚筒烘丝机控制模式研究..... 张 炜, 刘江生, 王道宽, 等
- 12 复烤温度对片烟收缩率及大小分布的影响..... 徐大勇, 李新锋, 范明登, 等
- 17 基于 NI Single-Board RIO 的嵌入式烟支质量控制系统..... 肖亚平, 周 密, 唐 磊
- 20 FOCKE 700S 硬盒包装机烟库分烟隔板的改进..... 郭建娟, 马文静
- 23 FOCKE 750 烟包转角输入装置同步齿形带跑偏问题的解决..... 刘伟忠
- 25 GDX2 包装机组 CH 小包透明纸检测系统的设计应用..... 罗彩丽
- 27 聚类分析法监控不同存放期复配烟用香精的质量稳定性..... 孔浩辉, 陈翠玲, 伍锦鸣, 等
- 31 HILIC-MS/MS 测定家兔血液中的 NNK 及其 7 种代谢物..... 郎海磊, 王 昇, 赵贝贝, 等
- 37 制丝线主要热处理工序前后原料致香成分差异性解析..... 朱 勇, 何邦华, 刘 泽, 等
- 43 LC-MS/MS 法测定卷烟主流烟气中的丙烯酰胺..... 王 冰, 蔡君兰, 赵 阁, 等
- 47 微波消解-石墨炉原子吸收光谱法检测烟草及烟草制品中的硒含量..... 胡立中, 胡永华, 葛少林, 等
- 50 GC/MS 结合化学计量学用于复杂香精配方中香料成分的定性识别..... 卢红兵, 孔 波, 魏维伟, 等
- 54 卷烟燃吸模拟装置的设计与应用..... 曹得坡, 夏巧玲, 郭吉兆, 等
- 61 多聚磷酸铵对造纸法再造烟叶热解燃烧特性和感官质量的影响..... 周 顺, 宁 敏, 徐迎波, 等
- 67 烟草侧芽生长相关基因克隆及 RNAi 载体的构建转化..... 陈兴江, 蔡刘体, 郑少清
- 72 不同土壤改良剂对烟草吸收镉的影响..... 陈 钊, 高 远, 张艳玲, 等
- 77 烤烟品种 K326 内生细菌分离、抗黑胫病菌株筛选及种群组成分析..... 奚家勤, 冯云利, 薛超群, 等