

# 烟草 *BRANCHED1-Like* 基因的克隆及表达分析

陈雅琼<sup>1,2</sup>, 孙亭亭<sup>1,2</sup>, 陈 蕾<sup>1,2</sup>, 丁安明<sup>1</sup>, 陈 涣<sup>1,2</sup>, 孙玉合<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院烟草研究所/烟草行业烟草基因资源利用重点实验室, 青岛 266100; <sup>2</sup>中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

**摘要:** TCP 转录因子家族 CYC/TB1 簇中成员 BRC1 在调控植物侧枝发育的过程中发挥重要作用。本研究利用电子克隆结合 RT-PCR 方法从普通烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中克隆获得 4 个 *NtBRC1-Like* 基因, 分别命名为 *NtBRC1-Like1*、*NtBRC1-Like2*、*NtBRC1-Like3* 和 *NtBRC1-Like4*。4 条基因的 CDS 序列长度分别为 1140 bp、1062 bp、987 bp 和 1041 bp, 分别编码由 379、353、328 和 346 个氨基酸组成的蛋白, 这 4 个蛋白与 CYC/TB1 簇中其他成员具有较高相似性。蛋白质保守结构域分析表明, 4 个 *NtBRC1-Like* 基因编码的蛋白除具有 TCP 核心结构域外, 还具有 CYC/TB1 簇蛋白特有的 R 结构域。系统进化树分析表明, *NtBRC1-Like* 蛋白都是 TCP 家族 CYC/TB1 簇中的成员, 且 4 个 *NtBRC1-Like* 蛋白可以被分成 2 组, *NtBRC1-Like1* 和 *NtBRC1-Like4* 为一组, *NtBRC1-Like2* 和 *NtBRC1-Like3* 为另一组。荧光定量 PCR 分析发现, 4 个烟草 *NtBRC1-Like* 基因的表达呈现明显的组织特异性, 且其表达模式可分为 2 种: *NtBRC1-Like1* 和 *NtBRC1-Like4* 的表达模式相似, 在腋芽中有极高的表达; *NtBRC1-Like2* 和 *NtBRC1-Like3* 的表达模式十分相似, 在叶和腋芽中的表达量都显著高于其他组织。推测烟草 *BRC1* 基因可能存在类似番茄 *BRC1* 基因在功能上保守与进化的情况。

**关键词:** 烟草; *BRC1* 基因; 侧枝形成; 基因克隆; 基因表达分析

## Molecular Cloning and Expression Analysis of *BRANCHED1-Like* Gene in Common Tobacco

CHEN Ya-qiong<sup>1,2</sup>, SUN Ting-ting<sup>1,2</sup>, CHEN Lei<sup>1,2</sup>, DING An-ming<sup>1</sup>, CHEN Huan<sup>1,2</sup>, SUN Yu-he<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory for Tobacco Gene Resources, Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266100; <sup>2</sup>Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** BRC1, a member of CYC/TB1 subclass in TCP transcription factor family, plays an important role in the regulation of shoot branching. Four new *NtBRC1-Like* genes, designated *NtBRC1-Like1*, *NtBRC1-Like2*, *NtBRC1-Like3* and *NtBRC1-Like4*, were isolated from *Nicotiana tabacum* using silico cloning strategy combined RT-PCR methods. The length of CDS sequences of four *NtBRC1-Like* genes were 1140 bp, 1062 bp, 987 bp and 1041 bp, respectively. The deduced protein sequences contained 379, 353, 328 and 346 amino acids, respectively, and exhibited high homology with other members of CYC/TB1 subclass. The analysis of conserved domain showed that besides TCP core domain, four *NtBRC1-Like* proteins also had the R domain specific to CYC/TB1 proteins. The phylogenetic tree showed that four *NtBRC1-Like* proteins belonged to CYC/TB1 subclass of TCP family, furthermore, four *NtBRC1-Like* proteins could be divided into two groups, one was *NtBRC1-Like1/4*, another was *NtBRC1-Like2/3*. Real-time quantitative PCR assay indicated that the expression profile of *NtBRC1-Like* genes exhibited significant tissue specificity. The expression level of *NtBRC1-Like1/4* in axillary bud was the highest, however, *NtBRC1-Like2/3* expressed higher in leaf and axillary bud. These results demonstrated that the functions of *NtBRC1s* in tobacco might be differentiated just like in tomato.

收稿日期: 2014-10-23 修回日期: 2014-12-22 网络出版日期: 2015-10-29

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151029.0949.002.html>

基金项目: 国家高科技研究发展计划 (“863” 计划) (2012AA021801)

第一作者研究方向为烟草功能基因组学。E-mail: zaizaihope@sina.com

通信作者: 孙玉合, 研究方向为烟草功能基因组学。E-mail: yhsun@163.com

**Key words:** tobacco; *BRC1* gene; shoot branching; gene cloning; gene expression analysis

*TCP* 基因家族是植物特有的一类转录因子家族,广泛存在于多细胞藻类以及高等植物的基因组中,并在植物生长发育过程中起关键作用<sup>[1-2]</sup>。最早发现的家族成员是玉米 (*Zea mays*) 的 *TEOSINTE BRANCHED1* (*TB1*) 基因<sup>[3]</sup>、金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 的 *CYCLOIDEA* (*CYC*) 基因<sup>[4]</sup> 以及水稻 (*Oryza sativa*) 的 *PROLIFERATING CELL FACTORS1* 和 *CELL FACTORS2* 基因 (*PCF1* 和 *PCF2*)<sup>[5]</sup>, *TCP* 正是根据三者首字母的缩写而得名。*TCP* 转录因子家族编码的蛋白都含有一个由 59 个氨基酸组成的非典型的 basic helix-loop-helix (bHLH) 结构,被称为 *TCP* 结构域 (*TCP-domain*),可能与 DNA 的结合以及蛋白质的二聚化作用有关<sup>[6]</sup>。除了 *TCP* 结构域之外,一些 *TCP* 成员还存在一个保守的 R 结构域 (*R-domain*)。R 结构域由大约 18 个氨基酸组成,富含精氨酸、赖氨酸和谷氨酸等极性氨基酸,可以形成一个亲水性的  $\alpha$ -螺旋<sup>[7]</sup>。根据所包含结构域的差异可将 *TCP* 家族分成 Class I 和 Class II 2 个亚家族,其中 Class II 又可以分成 *CIN* 和 *CYC/TB1* 2 个亚簇,而 R 结构域只存在于 *CYC/TB1* 亚簇的成员中<sup>[8-9]</sup>。

玉米的 *CYC/TB1* 亚簇基因 *TB1* 具有抑制侧枝生长和调控花序形成的作用,在大刍草驯化形成玉米的过程中,其表达模式的变化发挥了关键作用<sup>[10]</sup>。目前,对 *TB1* 同源基因的研究不仅集中在水稻 (*Oryza sativa*)<sup>[11]</sup>、高粱 (*Sorghum bicolor*)<sup>[12]</sup> 等禾本科植物,也扩展到了拟南芥<sup>[13-14]</sup>、番茄 (*Solanum lycopersicum*)<sup>[15]</sup>、豌豆 (*Pisum sativum*)<sup>[16]</sup>、菊花 (*Chrysanthemum indicum*)<sup>[17-18]</sup> 等双子叶植物。已证实 *BRC1* 就是 *TB1* 在双子叶植物中的同源基因。拟南芥中, *BRANCHED1* (*BRC1*) 基因作为调控腋芽发育的信号整合者发挥作用, *BRC1* 的表达量降低时分枝增多。番茄中, *BRC1* 基因复制一次后形成了 *SIBRC1a* 和 *SIBRC1b* 2 个基因,二者在进化过程中受到了不同的选择压,其中 *SIBRC1b* 受到了强烈的纯化选择,抑制侧枝伸长的功能被保留;而 *SIBRC1a* 经历了正向选择,其抑制侧枝的功能已消失,正在往功能多样性的方向进化<sup>[15]</sup>。

烟草 (*Nicotiana tabacum*) 是植物界中具有重要地位的模式植物,对其 *BRC1* 基因的研究至今未见报道,该基因在烟草中的功能更未可知。本研究利

用烟草 EST 数据和基因组数据,以拟南芥 *BRC1* 基因的 cDNA 序列为探针,采用电子克隆结合 RT-PCR 方法,从普通烟草中获得了 4 条 *NtBRC1-Like* 基因的 CDS 序列,对这些基因编码的蛋白序列进行分析,研究与其他植物 *BRC1* 之间的同源性及进化关系,并利用荧光定量 PCR 分析烟草 *BRC1-Like* 基因在不同组织部位的表达特性,为烟草 *BRC1* 基因的功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 数据来源** 拟南芥 *TCP* 蛋白序列 (包括 *BRC1*) 从拟南芥信息资源网站 (TAIR: <http://www.arabidopsis.org>) 下载得到。烟草表达序列标签 (EST) 数据从美国国立生物技术信息中心 (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载得到。番茄 (*Solanum lycopersicum*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、玉米 (*Zea mays*)、水稻 (*Oryza sativa*)、豌豆 (*Pisum sativum*)、菊花 (*Chrysanthemum × morifolium*)、蒺藜草 (*Cenchrus americanus*) 和金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 等植物的相关蛋白序列从 UniProt 蛋白质数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 下载得到。

**1.1.2 植物材料** 供试材料为烤烟品种红大,温室种植,自然光照下培养至生殖生长期。采集营养生长期的根、茎、茎尖、叶以及生殖生长期的花芽和花,经液氮速冻后于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。烟株打顶 7 d 后,采集腋芽,同样用液氮速冻保存。

**1.1.3 试剂与仪器** 试验所用 RNA 提取试剂盒 (The GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit) 购自美国 Thermo 公司;DNA 聚合酶 (*Ex Taq*)、反转录试剂盒 (TaKaRa PrimerScript™ RT-PCR Kit 和 TaKaRa PrimerScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time))、凝胶回收试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit)、克隆载体 PMD-19T、T4 连接酶、大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$  以及荧光定量试剂盒 (SYBR® Premix Ex Taq™ II) 均购自 TaKaRa (大连) 有限公司。所用引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成 (表 1)。qRT-PCR 所用仪器为 Applied Biosystem 7500 (ABI 7500)。

表 1 引物序列目录

Table 1 List of primers sequences

引物名称 Name of primers	序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')	引物用途 Use of primers
NtBRC1-Like1-F	TACTTGTGCTTGTATATCCGTCCTT	用于扩增 <i>NtBRC1-Like1</i> 全长开放阅读框(ORF)
NtBRC1-Like1-R	TCATAGAATACGCCAAAACGAAATAG	To amplify the whole open reading frame of <i>NtBRC1-Like1</i>
NtBRC1-Like2-F	ATGTTTTAACTGTGTTTTATCCGTC	用于扩增 <i>NtBRC1-Like2</i> 的 ORF
NtBRC1-Like2-R	TCCCACATTAATTAGATTGACCA	To amplify the whole open reading frame of <i>NtBRC1-Like2</i>
NtBRC1-Like3-F	ACTGTGTTTTATCCGCTTTTCTCA	用于扩增 <i>NtBRC1-Like3</i> 的 ORF
NtBRC1-Like3-R	GTCTGTAAATTGCTGCTGTAGGA	To amplify the whole open reading frame of <i>NtBRC1-Like3</i>
NtBRC1-Like4-F	GTACTTGTGCTTGTATATCCGTCCT	用于扩增 <i>NtBRC1-Like4</i> 的 ORF
NtBRC1-Like4-R	CTTATGTGCTTATAGTCATCGGTTG	To amplify the whole open reading frame of <i>NtBRC1-Like4</i>
NtBRC1-Like1-qF	ATTACAAGGCCGCTGCAAG	用于 <i>NtBRC1-Like1</i> 的荧光定量 PCR
NtBRC1-Like1-qR	CTTGGACGAGCTCATTGACAG	To perform quantitative real-time PCR for <i>NtBRC1-Like1</i>
NtBRC1-Like2-qF	GGCCTTAGAGATCGAAGGATG	用于 <i>NtBRC1-Like2</i> 的荧光定量 PCR
NtBRC1-Like2-qR	GGTAGTACTGCAGCTTTGTTTAGGA	To perform quantitative real-time PCR for <i>NtBRC1-Like2</i>
NtBRC1-Like3-qF	CTCAGAGACCGAAGGATGAGACT	用于 <i>NtBRC1-Like3</i> 的荧光定量 PCR
NtBRC1-Like3-qR	GTTTAGGAATGCCTCCTCTTTA	To perform quantitative real-time PCR for <i>NtBRC1-Like3</i>
NtBRC1-Like4-qF	CGACATCCGAGTGTGAAGTGA	用于 <i>NtBRC1-Like4</i> 的荧光定量 PCR
NtBRC1-Like4-qR	CCGCCATAGACTGATCACCA	To perform quantitative real-time PCR for <i>NtBRC1-Like4</i>
NtL25-qF	AGGCTGTCAAGTCAGGATCAAC	用于扩增荧光定量内参基因核糖体蛋白基因 <i>NtL25</i>
NtL25-qR	TGTTCTTCCAGGTGCACTAA	To amplify internal reference gene <i>NtL25</i> , a ribosomal protein gene

## 1.2 方法

**1.2.1 *NtBRC1-Like* 基因的电子克隆** 以 *AtBRC1* 基因的 cDNA 序列为探针, tblastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 检索烟草表达序列标签(EST)数据库,并参考菲利普莫里斯国际公司烟草基因组测序数据<sup>[19]</sup>,使用 DNAMAN 软件对所获得的 EST 片段进行序列拼接,构建出重叠群 contig。以获得的 contig 为新探针 blast 搜索烟草 EST 数据库,直到没有新的 EST 可供拼接为止。然后,把可能的新基因序列在非冗余数据库(nr 数据库)中进行搜索,确认电子克隆所获得的烟草 *BRC1-Like* 基因是否为新基因。

**1.2.2 *NtBRC1-Like* 基因 cDNA 的获得** 参照 The GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit 操作说明提取红大腋芽的总 RNA,参照 TaKaRa PrimerScript™ RT-PCR Kit 的说明进行 RT-PCR 反应。根据上述电子克隆与序列比对的结果,在拼接出的重叠群上分别设计特异引物对 NtBRC1-Like1-F/-R、NtBRC1-Like2-F/-R、NtBRC1-Like3-F/-R 和 NtBRC1-Like4-F/-R(表 1),以红大腋芽的 cDNA 为模板,进行 PCR

扩增反应。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55/57 °C 退火 30 s (*NtBRC1-Like1* 和 *NtBRC1-Like4* 的温度为 57 °C, *NtBRC1-Like2* 和 *NtBRC1-Like3* 的温度为 55 °C), 72 °C 延伸 1 min 20 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min 后 4 °C 保存。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,参照 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 操作说明将目的条带进行纯化回收。将回收产物连入 PMD-19T 载体,转化大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ 。筛选阳性克隆,并送北京六合华大基因公司测序。

**1.2.3 *NtBRC1-Like* 蛋白序列分析** 利用 NCBI 和 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 上的工具软件对克隆获得的 4 条烟草 *BRC1-Like* 基因编码的蛋白进行序列分析;基因开放读码框的查找与翻译采用 ORF finder 完成;编码蛋白的理化性质、疏水性/亲水性、跨膜结构域、亚细胞定位、信号肽及磷酸化位点分析分别利用 ProtParam、ProtScale、TmPred、ProtComp9.0、SignalP4.1 和 NetPhos2.0 等在线软件完成;蛋白质二级结构预测利用在线工具 SOPMA 完成。

**1.2.4 NtBRC1-Like 蛋白的保守结构域与系统进化分析** 利用在线工具 ScanProsite 预测 NtBRC1-Like 蛋白的保守结构域。将从 UniProt 数据库下载到的 13 条 BRC1 或 TB1 蛋白序列与 4 条 NtBRC1-Like 蛋白序列进行相似性比对,寻找保守结构域。对 41 条 TCP 蛋白序列进行比对后利用 MEGA5.0 软件中的 Neighbor Joining 法构建系统进化树。

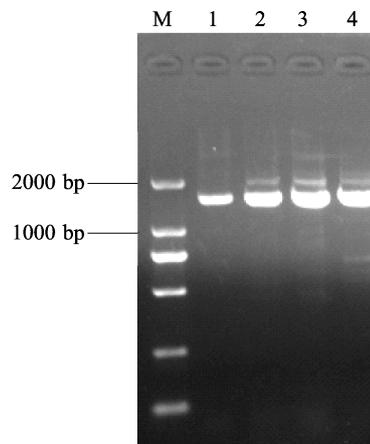
**1.2.5 烟草 BRC1-Like 基因的表达模式分析** 分别提取红大的根、茎、茎尖、叶、腋芽、花芽和花的总 RNA,稀释至 100 ng/ $\mu$ L 的相同质量浓度后,使用 TaKaRa PrimerScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time) 进行 cDNA 合成。将反转录所得 cDNA 产物稀释 5 倍后作为模板,利用 SYBR Green I 荧光染料法进行相对荧光定量 PCR 反应,每个样品设 3 次重复。根据烟草 *NtL25*<sup>[20]</sup> 和 4 条 *NtBRC1-Like* 基因的序列,设计的荧光定量 PCR 引物对分别为 *NtL25*-qF/-qR、*NtBRC1-Like1*-qF/-qR、*NtBRC1-Like2*-qF/-qR、*NtBRC1-Like3*-qF/-qR 和 *NtBRC1-Like4*-qF/-qR (表 1)。PCR 反应体系共 20  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L, SYBR Premix Ex *Taq* II 10  $\mu$ L, ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L 和上下游引物各 0.8  $\mu$ L。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 34 s, 共 40 个循环。用 7500 software v2.0.1 软件对荧光定量结果进行分析,并构建相对定量表达图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *NtBRC1-Like* 基因全长 cDNA 克隆的获得

以 *AtBRC1* 基因搜索烟草 EST 数据库,得到 13 条高度同源的 EST 序列,并进行比对分析,结果显示,13 条 EST 可拼接成 4 个独立的 cDNA 序列,长度分别为 1367 bp、1308 bp、1225 bp 和 1271 bp。

以电子克隆得到的 4 条拼接序列设计特异引物,通过 RT-PCR 方法克隆得到 4 条长度分别为 1222 bp、1304 bp、1179 bp 和 1250 bp 的核酸序列(图 1)。测序结果表明,所获序列与电子克隆结果基本一致。利用 NCBI 网站的 ORF finder 软件对扩增序列进行分析,发现 4 者分别包含一个长度为 1140 bp、1062 bp、987 bp 和 1041 bp 的开放读码框,分别编码 379、353、328 和 346 个氨基酸,由此将新获得的 4 个基因依次命名为 *NtBRC1-Like1*、*NtBRC1-Like2*、*NtBRC1-Like3* 和 *NtBRC1-Like4*。



M:DL2000 marker; 1、2、3 和 4 分别为包含 *NtBRC1-Like1*、*NtBRC1-Like2*、*NtBRC1-Like3* 和 *NtBRC1-Like4* 的核酸序列扩增结果

M:DL2000 marker, 1, 2, 3 and 4: Amplified product of *NtBRC1-Like1*, *NtBRC1-Like2*, *NtBRC1-Like3* and *NtBRC1-Like4*

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification result of PCR

### 2.2 *NtBRC1-Like* 基因编码蛋白的理化性质分析

利用 ProtParam 工具对 4 条烟草 *BRC1-Like* 基因编码的蛋白质进行了理化性质分析,结果如下(表 2): *NtBRC1-Like1*、*NtBRC1-Like2*、*NtBRC1-Like3* 和 *NtBRC1-Like4* 编码多肽的原子组成分别为 C<sub>1863</sub>H<sub>2941</sub>N<sub>551</sub>O<sub>590</sub>S<sub>15</sub>、C<sub>1702</sub>H<sub>2730</sub>N<sub>498</sub>O<sub>560</sub>S<sub>13</sub>、C<sub>1604</sub>H<sub>2559</sub>N<sub>467</sub>O<sub>511</sub>S<sub>13</sub> 和 C<sub>1700</sub>H<sub>2686</sub>N<sub>506</sub>O<sub>540</sub>S<sub>10</sub>; 分子量分别是 42979、39546.1、36978.5 和 39173.6Da; 理论等电点 pI 分别是 8.02、8.57、8.95 和 8.65。在这 4 种蛋白质的氨基酸组成中,都是 Ser(S) 含量最多, Trp(W) 最少, *NtBRC1-Like1*、*NtBRC1-Like2*、*NtBRC1-Like3* 和 *NtBRC1-Like4* 分别含 Ser 8.4%、12.2%、9.8% 和 9.2%, 分别含 Trp 1.3%、0.6%、0.9% 和 0.9%; 总的负电荷残基(Asp + Glu) 数分别为 45、47、41 和 40, 正电荷残基(Arg + Lys) 数分别为 47、51、49 和 44。这 4 个蛋白的不稳定系数(instability index)分别为 49.25、52.23、42.88 和 46.99, 均属于不稳定蛋白。4 个 *NtBRC1-Like* 蛋白的总平均疏水系数(GRAVY, grand average of hydropathicity)分别为 -0.753、-0.757、-0.707 和 -0.829, 预测均属于亲水蛋白。通过在线软件 ProtScale 对 *NtBRC1-Like* 基因编码蛋白的疏水性/亲水性进行了预测,结果同样显示蛋白质的亲水性。

表 2 NtBRC1-Like 基因编码蛋白的理化性质分析

Table 2 Physical and chemical properties of NtBRC1-Like proteins

Table with 5 columns: Property, NtBRC1-Like1, NtBRC1-Like2, NtBRC1-Like3, NtBRC1-Like4. Rows include Molecular formula, Molecular weight, Theoretical pI, Asp + Glu, Arg + Lys, Instability index, and GRAVY.

2.3 NtBRC1-Like 蛋白的结构特征分析

将推导的氨基酸序列利用 SignalP4.1 在线软件分析,未发现 NtBRC1-Like 蛋白中存在信号肽。利用 ProtComp 在线软件对蛋白质的亚细胞定位进行预测,预测数值由软件直接计算得出,分值越高表明预测的准确性越大。经分析(表 3),NtBRC1-Like 基因编码的蛋白有明显的定位偏好性,四者在细胞核中的分值都是最高,故推断目标蛋白均定位于细胞核,这与该类基因编码产物为转录因子的结论相一致。此外,NtBRC1-Like3 在线粒体中有较多的分布,其是否在线粒体中执行功能有待进一步研究。通过 TMpred 软件预测 NtBRC1-Like 蛋白的跨膜结构域,结果显示 4 个 NtBRC1-Like 蛋白均无跨膜螺旋区,为非膜蛋白。

2.4 NtBRC1-Like 蛋白的二级结构预测及磷酸化位点分析

利用 garnier v6.0.1 软件对 NtBRC1-Like 蛋白质的二级结构进行分析(图 2),发现 NtBRC1-

表 3 NtBRC1-Like 蛋白的亚细胞定位

Table 3 Subcellular location of NtBRC1-Like proteins

Table with 5 columns: Location, NtBRC1-Like1, NtBRC1-Like2, NtBRC1-Like3, NtBRC1-Like4. Rows include Nucleus, Plasma membrane, Cytoplasm, Chloroplast, Golgi, Mitochondria, and Endoplasmic reticulum.

Like1、NtBRC1-Like2、NtBRC1-Like3 和 NtBRC1-Like4 蛋白中 α-螺旋所占比例都是最高,分别为 38%、39.5%、34.9% 和 39.4%;NtBRC1-Like1 和 NtBRC1-Like4 中无规则卷曲所占的比例居第 2 位,

MYPPSNCNYSNLISSNNLFIHPSNPMQYEHFLFYFHDHLLQPQQQQQLLITTP
eettttttteeeccctteecccccccchhhhhhhhhhtccctttttteeeccccc
DHYMAADSKNDTVISSTNQDPEEVLQGRCKNKRGRVAYKKDRHSKINTAHGPRDR
teehhhhhhhhteeccccccccchhhhhhhhttttthhhhhhhhttttcccccctte
RMRLSLDVARFFNLQDLGFDKASKTVEWLLTKSKAVNELVQGINKENCATANIGAIS
eeehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhtttthhhhhhhhtccctthhhhteeee
TCSTTSECEVVSIGIDESTTNDIQKQSNRQVGEKKKANKLVRRAAFNPVAKESRQARA
ttttccccccccccccctttcttccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
RARERTIKKSFNLIGDQSMADDLKRLGCWSLFTGEESGIGQTNHQIEHTTHHEEPL
hhhhhhhhhhhteeccccccccchhhhhhhhttttccccccccctccccccccchhhhh
LGTINENVDCNLLVVTGNWNPYTFNYHSTEISHEVATIKYLPVFWELVSGVTRGRTT
ccctttttteeeettccctteetccccchhhhhhhhhheccccccctccceetttt
SCWFSATQPEEGLVLLVM
tttccccccchhhhhhhhh

NtBRC1-Like1

MYPPSNCNYSPIFNIPSPCMQYDELFFQYFHDHLLQPQQQQQLLITDPHY
eettttttteeeccctteecccccccchhhhhhhhhhtccctttteeeccccc
MAADSKNDTVISSTINQLEGPKEVELQGSCKNNGENKRAVAYKKDRHSKINTAHGPRDR
hhhhhhhhhteeccccccccchhhhhhhhttttthhhhhhhhhhhhhhtccccctte
RMRLSLDVARFFNLQDLGFDKASKTVEWLLTKSKAVNELVQGINKENCATANIGAIS
eeehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhtttthhhhhhhhttttccccccccctte
EVISGIDESTTNDIQKQSNRQVGEKKKANKLVRRAAFNPVAKESRQARARARERTKI
eeccccccccctttttcccttchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
KKSLNIGDQSMADDLKRLGCWSLFTGEESGIGQYTNHQVDEQHTNHEEHLGTKE
hheeeccccchhhhhhhhtttccccccccctttccccccccchhhhhhhhhhhhhhh
NVDGCLVVTGNWNPYTFNYHSTEISHEVGFTRLRNPRFIIYSD
ttttccccccccctteeeccccccccchhhhhhhhhhtccccccccctteeeett

NtBRC1-Like3

MYPPSNCNYSPIFNIPSPCMQYDELFFQYFHDHLLQPQQQQQLLITDPHY
eettttttteeeccctteecccccccchhhhhhhhhhtccctttteeeccccc
TNNKETVINS DSHVSKVYNIETVINSQGLGNEEKRVGRENKRDRMSGTISI THGRKNK
ccchheehhtccccccccccccccccccccchhhhhhhhtttttcccccccccttttt
CSHKDRHSKISTARGLRDRMRRLSLDAARKFFSLQDMLGFDKASKTVEWLLTKSESEIEE
thhhhtttteeecccccteeehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
LAKGNKGEESLPGQSCSTTNGIGAISSISTSECEVVSIGIDESTTNDIKKIKLETARGPL
hhhhhhhhhtttttttttccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh
KKGKTARRATFDPLITRESRNQARVRARERTIKKSLSKSKAMTHENSADDCNLVNFGF
hhttheeecccccccccttttccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
DWSQSFIFNYQNAVGISHDQEDFVSSSVFALQMAVQNTKGGRSYTAASIA
tcctttttttccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh

NtBRC1-Like2

MYPPSNCNYSPIFNIPSPCMQYDELFFQYFHDHLLQPQQQQQLLITDPHY
eettttttteeeccctteecccccccchhhhhhhhhhtccctttteeeccccc
MAADSKNDTVISSTINQLEGPKEVELQGSCKNNGENKRAVAYKKDRHSKINTAHGPRDR
hhhhhhhhhteeccccccccchhhhhhhhttttthhhhhhhhhhhhhhtccccctte
RMRLSLDVARFFNLQDLGFDKASKTVEWLLTKSKAVNELVQGINKENCATANIGAIS
eeehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhtttthhhhhhhhttttccccccccctte
EVISGIDESTTNDIQKQSNRQVGEKKKANKLVRRAAFNPVAKESRQARARARERTKI
eeccccccccctttttcccttchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
KKSLNIGDQSMADDLKRLGCWSLFTGEESGIGQYTNHQVDEQHTNHEEHLGTKE
hheeeccccchhhhhhhhtttccccccccctttccccccccchhhhhhhhhhhhhhh
NVDGCLVVTGNWNPYTFNYHSTEISHEVGFTRLRNPRFIIYSD
ttttccccccccctteeeccccccccchhhhhhhhhhtccccccccctteeeett

NtBRC1-Like4

h: α-螺旋; e: β-折叠; t: β-转角; c: 无规则卷曲
h: α-helix, e: β-sheet, t: β-turn, c: Random coil

图 2 NtBRC1-Like 蛋白的二级结构预测

Fig. 2 Predicted secondary structure of NtBRC1-Like proteins

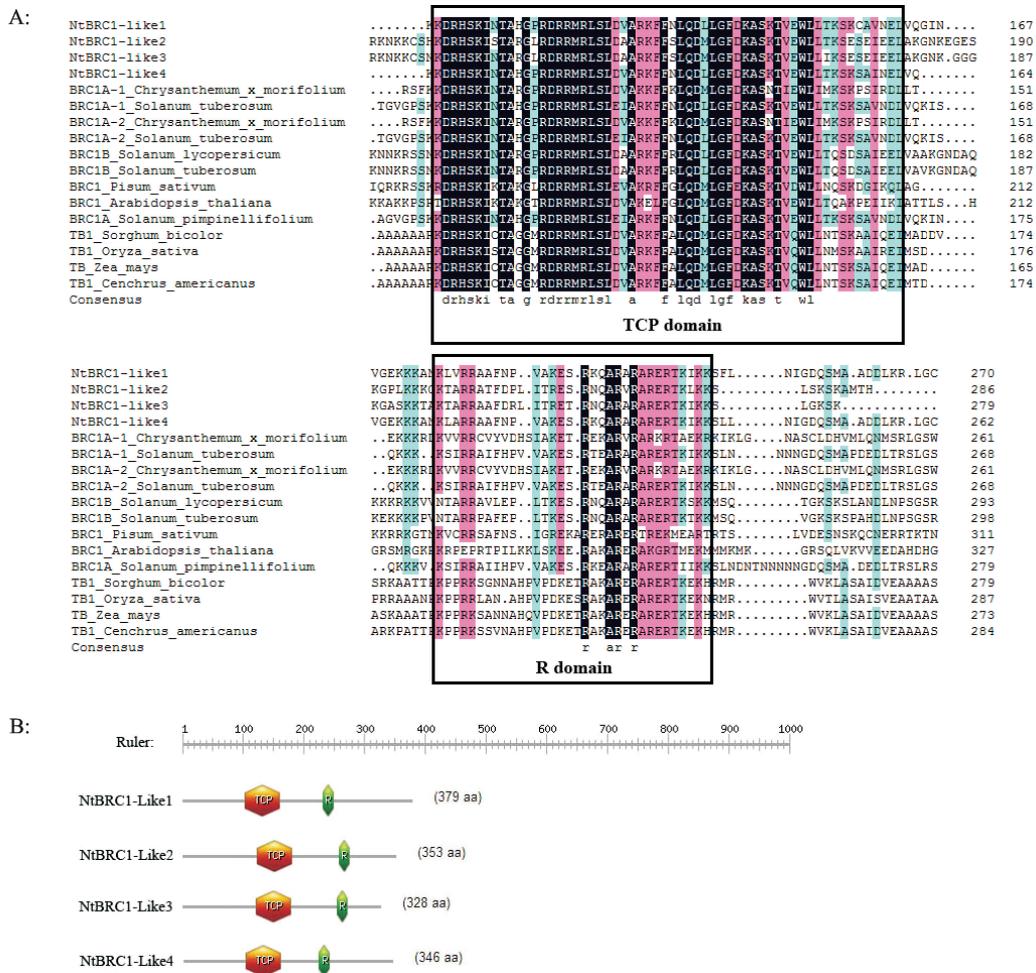
分别为 27.5% 和 31.2%；而 NtBRC1-Like2 和 NtBRC1-Like3 中  $\beta$ -转角所占比例居第 2 位,分别为 25.5% 和 28.5%。由此可知, $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲是 NtBRC1-Like1 和 NtBRC1-Like4 蛋白的主要结构,而  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角则是 NtBRC1-Like2 和 NtBRC1-Like3 蛋白的主要结构。

为了解 NtBRC1-Like 蛋白中的磷酸化位点分布情况,经 NetPhos2.0 在线软件进行分析,结果显示,NtBRC1-Like1、NtBRC1-Like2、NtBRC1-Like3 和 NtBRC1-Like4 分别含有 10、24、15 和 17 个丝氨酸激酶磷酸化位点,6、7、6 和 4 个苏氨酸激酶磷酸化位点,3、1、1 和 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点。4 个 NtBRC1-Like 蛋白均含有比较多的磷酸化位点,这说明磷酸化修饰对于 NtBRC1-Like 蛋白行使功能可能非常重要,磷酸化作用可能参与 NtBRC1-Like 蛋白活性的调控。

## 2.5 NtBRC1-Like 蛋白的保守结构域与系统进化分析

### 2.5.1 NtBRC1-Like 蛋白的保守结构域分析

氨基酸序列相似性比对结果表明(图 3A),4 个 NtBRC1-Like 蛋白与拟南芥 BRC1(AM408560.1)的氨基酸序列相似性为 49.24%,此外,NtBRC1-Like1/4 与番茄 BRC1A(HM597208.1)的氨基酸序列相似性为 64.63%,NtBRC1-Like2/3 与番茄 BRC1B(HM597230.1)的相似性为 62.05%。蛋白质保守结构域分析显示(图 3B),除了含有高度保守的 TCP-domain 之外,所获得的 4 条 NtBRC1-Like 蛋白还都含有非常保守的 R-domain。因为 R-domain 是 TCP 家族 CYC/TB1 亚簇成员区别于其他簇中成员的特殊结构,由此表明,克隆获得的烟草 NtBRC1-Like 基因属于 CYC/TB1 亚簇,是玉米 ZmTB1 和拟南芥 AtBRC1 的直系同源基因,推测具有与其同源基因相近或相似的功能。



A: NtBRC1-Like 与其他物种 BRC1 蛋白的氨基酸序列比对; B: NtBRC1-Like 蛋白的保守域分析

A: Sequence alignment among NtBRC1-Like and BRC1 proteins in other plants, B: Analysis of conserved domain of NtBRC1-Like pteoreins

图 3 NtBRC1 基因编码蛋白保守结构域分析

Fig. 3 Analysis of conserved domain in NtBRC1 proteins

**2.5.2 NtBRC1-Like 蛋白的系统进化分析** 采用 MEGA5.0 软件的 Neighbor-Joining 方法,对来自不同植物的 41 个 TCP 蛋白(包括 4 个 NtBRC1-Like)构建系统进化树(图 4)。结果表明,41 个 TCP 蛋白可以清晰地分成 CYC/TB1 簇、CIN 簇与 Class I,烟草 NtBRC1-Like 蛋白与其他植物 CYC/TB1 簇成员亲缘关系密切,归入 CYC/TB1 亚簇。CYC/TB1 亚簇中,双子叶植物和单子叶植物的 BRC1 蛋白可以独立成支,但是拟南芥比较特殊,相比双子叶植物,拟南芥的 BRC1 蛋白似乎与单子叶植物的 TB1 蛋白亲缘关系更为接近,这可能是由于基因进化早于物种分化造成的。茄属植物(番茄、马铃薯和烟草)内 *BRC1-Like* 基因的亲缘关系近于茄属和拟南芥间的关系,说明属内植物的蛋白亲缘性高于属间植物。在番茄 *BRC1-like* 基因的进化中,该基因经过复制产生了 *BRC1a* 和 *BRC1b* 2 个基因,这 2 个基因由于在进化过程中受到了不同的选择压而使功能有所不同,其中 *BRC1b* 在一个强的纯化选择压下功能趋于稳定,保持控制侧枝的功能,而 *BRC1a* 经历了正向选择,其抑制侧枝的功能已消失,正在往功能多样性的方向进化<sup>[15]</sup>。推测在烟草和马铃薯中也存在类

似番茄 *BRC1* 基因在功能上保守与进化的情况。就烟草而言,*NtBRC1-Like1/4* 与 *SIBRC1a* 关系更近,*NtBRC-Like2/3* 与 *SIBRC1b* 更像。

**2.6 NtBRC1-Like 基因的表达模式分析**

从红大的根、茎、茎尖、叶、腋芽、花芽以及花这 7 个器官中提取总 RNA。以烟草核糖蛋白基因 *NtL25* 为内参基因进行 qRT-PCR 检测 *NtBRC1-Like* 基因的表达情况。以花芽为校正器,其表达水平设置为 1,相对表达量结果显示(图 5),4 条 *NtBRC1-Like* 基因的表达呈现明显的组织特异性,且 4 条基因的表达可分为 2 种模式:*NtBRC1-Like1* 和 *NtBRC1-Like4* 的表达模式相似,在腋芽中有极高的表达;*NtBRC1-Like2* 和 *NtBRC1-Like3* 的表达模式十分相像,在叶和腋芽中的表达量都显著高于其他组织。基因在特定组织中的表达是其在该组织中发挥功能的前提,该结果表明这 4 条 *NtBRC1-Like* 基因在功能上可能有所分化,*NtBRC1-Like1* 和 *NtBRC1-Like4* 的功能相近分为一类,*NtBRC1-Like2* 和 *NtBRC1-Like3* 相近为另一类。表达模式分析的结果与蛋白质结构分析的结果相吻合。

**3 讨论**

TCP 转录因子作为植物中特有的一个基因家族,参与了植物生长发育的许多过程,促进了植物的生长和增殖、花的对称性以及侧生器官和侧枝的形成等。TCP 家族 CYC/TB1 分支成员都存在一个特殊的 R 结构域,在植物侧枝发育过程中发挥重要作用。玉米的 *ZmTB1*、拟南芥 *AtBRC1*、豌豆的 *PsBRC1* 以及番茄的 *SIBRC1* 都属于 CYC/TB1 分支,到目前为止,在玉米和拟南芥等植物中只发现了 1 个 *BRC1* 成员,但在番茄 *BRC1* 的进化过程中,该基因复制一次后形成了 *SIBRC1a* 和 *SIBRC1b* 2 个基因,二者在功能上有所分化。茄属植物马铃薯与番茄的情况类似,也存在 2 个 *BRC1* 基因。某些菊科植物的 *BRC1-Like* 基因由于受到不同的选择压也分成了 2 组,说明选择压的改变可能是该家族基因进化出多种功能的原因之一<sup>[17]</sup>。TCP 家族成员较多,进化速度较快,很多成员都是来源于基因的复制。作为转录因子,*BRC1* 基因的复制可能对下游基因表达调控产生影响。在茄属或者菊科的植物中,同时有 2 个不同的 *BRC1-Like* 基因表达,可能会导致这些转录因子形成四聚体,形成更复杂的基因调控网络<sup>[15]</sup>。在菊科花的发育中已经检测到一些 CYC 蛋白能够形成同源或异源四聚体<sup>[21]</sup>。

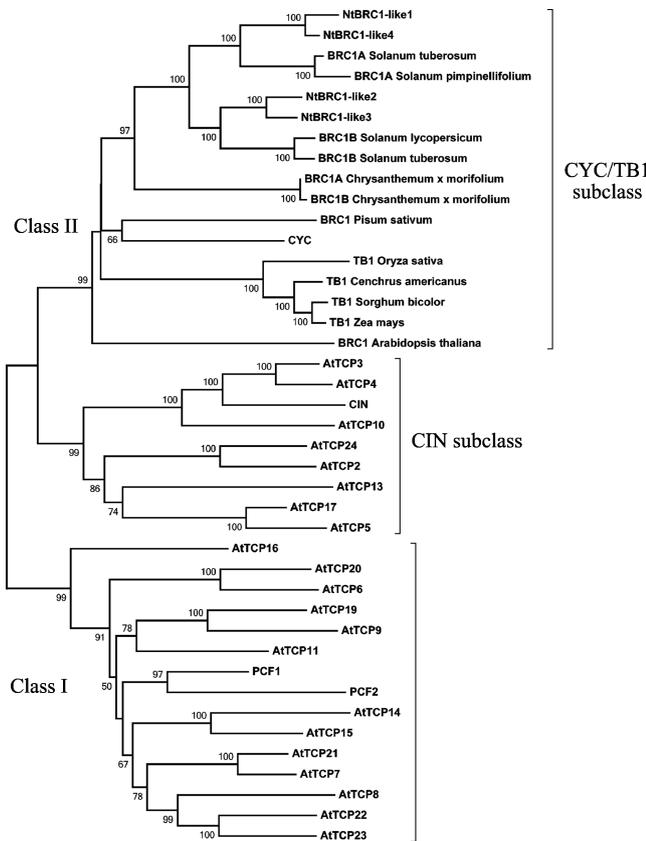
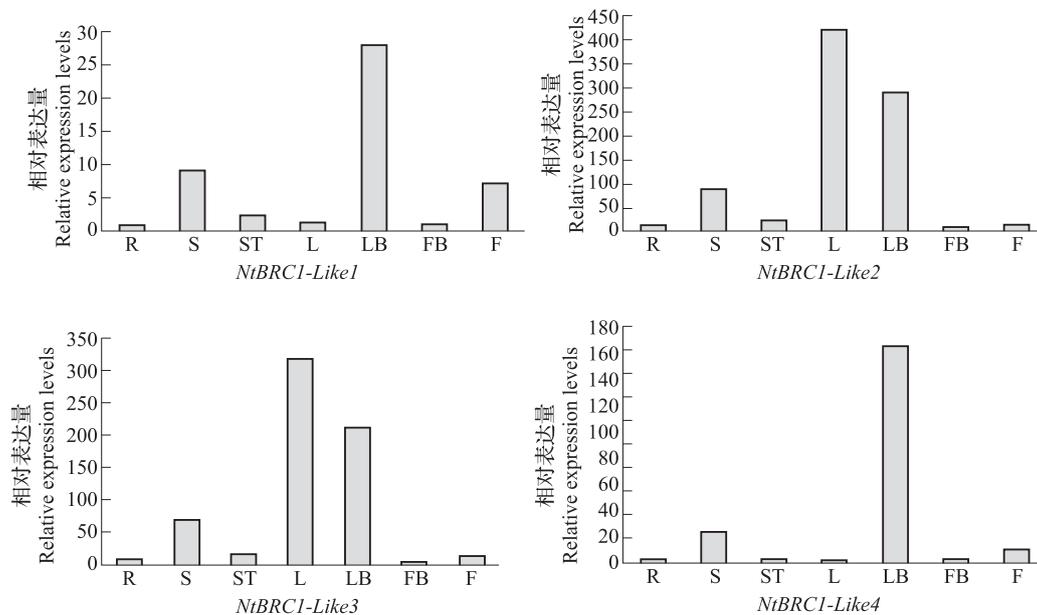


图 4 NtBRC1-Like 蛋白在 TCP 家族中的分类地位  
Fig.4 Taxonomic position of NtBRC1-Like in TCP family



R: 根; S: 茎; ST: 茎尖; L: 叶; LB: 腋芽; FB: 花芽; F: 花

R: Root, S: Stem, ST: Shoot tip, L: Leaf, LB: Lateral bud, FB: Flower bud, F: Flower

图5 *NtBRC1-Like* 基因的荧光定量表达分析

Fig. 5 qRT-PCR analysis of *NtBRC1-Like* genes

普通烟草是异源四倍体,含有2套不同的染色体,因此1个基因都会包含有2个拷贝。烟草具有丰富的EST数据库,美国菲利普莫里斯国际公司也在不久前公布了3个栽培烟草的基因组测序数据<sup>[19]</sup>,这为烟草基因的研究提供了极大的便利。本研究利用现有数据结合RT-PCR方法,从烟草中分离得到4个*NtBRC1-Like*基因。分析表明,*NtBRC1-Like*蛋白都含有R结构域,且与其他植物中的*BRC1*高度同源,属于TCP家族class II中的CYC/TB1亚簇。根据进化关系远近可将4个*NtBRC1-Like*蛋白分为2组,*NtBRC1-Like1*、*NtBRC1-Like4*与番茄*SIBRC1A*、马铃薯*StBRC1A*接近,*NtBRC1-Like2*、*NtBRC1-Like3*与番茄*SIBRC1B*、马铃薯*StBRC1B*接近。

基因的时空表达模式是研究基因功能的重要方法,具有相似表达模式的基因可能具有共同的功能,或者被相同的基因所调控,或者是具有共同的起源<sup>[22-23]</sup>。基因表达数据表明,4个*NtBRC1-Like*基因的表达模式也可以分成2类,四者在腋芽中都有极高的表达,不同于*NtBRC1-Like1*和*NtBRC1-Like4*的是,*NtBRC1-Like2*和*NtBRC1-Like3*在叶片中也有高度表达。推测烟草的2组*NtBRC1-Like*基因也存在功能上保守与进化的分化。

植物侧枝的形成不仅影响植物的株型,更会影响

作物的结实和单产。目前,在植物中已经克隆出了许多调控腋芽发育的基因,然而,由于研究条件和研究手段的限制,烟草腋芽形成与发育的研究甚少,相关报道仅限于*NtLS*基因<sup>[24]</sup>。本研究克隆的*NtBRC1-Like*基因是TCP家族CYC/TB1簇中控制侧枝形成的*BRC1*的同源基因,*NtBRC1-Like*在烟草腋芽发育中的作用,是否形成同源或异源四聚体,是否存在功能的多样化,还需要更多的遗传学和分子生物学的证据。下一步可以构建基因的相关表达载体,探索*NtBRC1*基因在烟草侧枝发育中发挥的作用。

#### 参考文献

- [1] Kosugi S, Ohashi Y. DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family[J]. *Plant J*, 2002, 30(3): 337-348
- [2] Danisman S, van Dijk A D, Bimbo A, et al. Analysis of functional redundancies within the *Arabidopsis* TCP transcription factor family[J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(18): 5673-5685
- [3] Doebley J, Stec A, Gustus C. *teosinte branched1* and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance[J]. *Genetics*, 1995, 141(1): 333-346
- [4] Luo D, Carpenter R, Vincent C, et al. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*[J]. *Nature*, 1996, 383(6603): 794-799
- [5] Kosugi S, Ohashi Y. *PCF1* and *PCF2* specifically bind to *cis* element in the rice proliferating cell nuclear antigen gene[J]. *Plant*

- J,1997,9(9): 1607-1619
- [6] Cubas P, Larter N, Doebley J, et al. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development[J]. *Plant J*,1999,18(2): 215-222
- [7] Navaud O, Dabos P, Carnus E, et al. TCP transcription factors predate the emergence of land plants[J]. *J Mol Evol*,2007,65(1): 23-33
- [8] Martín-Trillo M, Cubas P. *TCP* genes: A family snapshot ten years later[J]. *Trends Plant Sci*,2010,15(1): 31-39
- [9] Howarth D G, Donoghue M J. Phylogenetic analysis of the 'ECE' (CYC/TBI) clade reveals duplications predating the core eudicots[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2006,103(24): 9101-9106
- [10] Studer A, Zhao Q, Ross-Ibarra J, et al. A transposon insertion was the causative mutation in the maize domestication gene *tb1*[J]. *Nat Genet*,2011,43(11): 1160-1163
- [11] Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, et al. The *OsTBI* gene negatively regulates lateral branching in rice[J]. *Plant J*,2003,33(3): 513-520
- [12] Kebrom T H, Burson B L, Finlayson S A. Phytochrome B represses *Teosinte Branched1* expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals[J]. *Plant Physiol*,2006,140: 1109-1117
- [13] Aquilar-Martinez J A, Poza-Carrion C, Cubas P. *Arabidopsis BRANCHED1* acts as an integrator of branching signals within axillary buds[J]. *Plant Cell*,2007,19(2): 458-472
- [14] Finlayson S A. *Arabidopsis Teosinte Branched1-like1* regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot *Teosinte Branched1*[J]. *Plant Cell Physiol*,2007,48(5): 667-677
- [15] Martín-Trillo M, Grandio E G, Serra F, et al. Role of tomato *BRANCHED1-Like* genes in the control of shoot branching[J]. *Plant J*,2011,67(4): 701-714
- [16] Braun N, de Saint Germain A, Pillot J P, et al. The pea TCP transcription factor *PsBRC1* acts downstream of Strigolactones to control shoot branching[J]. *Plant Physiol*,2012,158(1): 225-238
- [17] 陈晓丽,刘勇,赵瑞艳,等. 菊科 *BRC1-Like* 基因片段的克隆与进化分析[J]. *农业生物技术学报*,2013,21(6): 650-658
- [18] Chen X, Zhou X, Xi L, et al. Roles of *DgBRC1* in regulation of lateral branching in chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflora* cv. Jinba)[J]. *PLoS One*,2013,8(4): e61717
- [19] Sierro N, Battey J N, Ouadi S. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato[J]. *Nat Commun*,2014,5: 3833-4833
- [20] Schmidt G W, Delaney S K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress[J]. *Mol Genet Genomics*,2010,283(3): 233-241
- [21] Tahtiharju S, Rijpkema A S, Vetterli A, et al. Evolution and diversification of the *CYC/TBI* gene family in Asteraceae-A comparative study in gerbera (Mutisieae) and sunflower (Heliantheae)[J]. *Mol Biol Evol*,2011,29: 1155-1166
- [22] Oakley T H, Ostman B, Wilson A C V. Repression and loss of gene expression outpaces activation and gain in recently duplicated fly genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2006,103(31): 11637-11641
- [23] Gu X. Statistical framework for phylogenomic analysis of gene family expression profiles[J]. *Genetic*,2004,167(1): 531-542
- [24] 王卫锋,太帅帅,王鲁,等. 烟草 *NtLS* 基因 RNA 干扰表达载体的构建及遗传转化[J]. *中国烟草科学*,2011,32(4): 31-35

## 欢迎订阅 2016 年《遗传》

《遗传》是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物学研究所主办、科学出版社出版的学术期刊、中文核心期刊和中国精品科技期刊。已被医学索引(MEDLINE)、生物学数据库(BIOSIS)、生物学文摘(BA)、医学索引(Medical Index)和美国化学文摘(CA)以及俄罗斯文摘杂志(AJ)等 20 多种国内外重要检索系统与数据库收录。

本刊主要刊登有创新性的研究论文、新技术与新方法、学科热点问题的综述、学术讨论、遗传学教学、遗传学家介绍、学术会议信息及科学新闻等,内容涉及遗传学、基因组学、细胞生物学、发育生物学、分子进化、遗传工程及生物技术等领域。本刊开辟绿色通道,重要成果的研究论文可申请优先刊出。

月刊,每期定价 80 元,全年 960 元。各地邮局发行,邮发代号:2-810。国内刊号 CN 11-1913/R,国际统一刊号 ISSN 0253-9772。

地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院中国科学院遗传与发育生物学研究所 2 号楼

邮编:100101

电话:(010)64807669

传真:(010)64807786

E-mail:yczz@genetics.ac.cn

网址:http://www.chinagene.cn;