

三叶青早期结瘤类基因 *ThENODL1* 及 *ThENODL2* 的克隆及表达分析

赵刚¹, 武思梦¹, 张悦¹, 黄舒琪¹, 蔡红², 闻静^{1*}

(1. 上饶师范学院 生命科学学院, 中国江西 上饶 334000; 2. 玉山县农林合作社, 中国江西 上饶 334000)

摘要:近年来的研究显示,早期结瘤类(early nodulin-like, ENODL)基因在植物地下储藏器官的形成与发育中起到关键作用。课题组前期研究发现,一些早期结瘤类基因在三叶青块根初始发育期及膨大期高丰度表达。本研究克隆了两个三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)的早期结瘤类基因 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 的 cDNA,初步的生物信息学分析表明, *ThENODL1* 的开放阅读框长度为 528 bp, 编码 175 个氨基酸, *ThENODL2* 的开放阅读框长度为 651 bp, 编码 217 个氨基酸, *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 都具有水稻早期结瘤类基因 (*OsENODL1_like*) 保守域, 并具备早期结瘤类基因的基本分子结构特征。相对荧光定量分析显示, *ThENODL1* 的 cDNA 表达量在块根中显著高于其他器官且在块根的初始发育阶段及膨大期显著提高, *ThENODL2* 的 cDNA 在块根中的表达量最低且在块根发育的不同时期无显著差异。大肠杆菌原核表达体系的验证结果显示, 所克隆的 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 的 cDNA 均可表达出与预期大小相符的蛋白质。本研究为进一步明确 *ThENODL* 基因在块根发育中的功能提供了基本分子生物学参考依据。

关键词: 三叶青; 早期结瘤类基因; 块根发育; 原核表达

中图分类号: Q78, S567.239

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)01-0023-08

Molecular Cloning and Expression Analysis of *ThENODL1* and *ThENODL2* of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg

ZHAO Gang¹, WU Simeng¹, ZHANG Yue¹, HUANG Shuqi¹, CAI Hong²,
WEN Jing^{1*}

(1. College of Life Science, Shangrao Normal University, Shangrao 334000, Jiangxi, China; 2. Yushan County Agriculture and Forestry Cooperative, Shangrao 334000, Jiangxi, China)

Abstract: Recent studies have found that early nodulin-like (ENODL) genes play a vital role in the formation and development of underground storage organs in plants. Our previous study found that some ENODL genes were expressed abundantly during the root formation and tuber expansion stages of *Tetrastigma hemsleyanum*. In this study, two ENODL genes *ThENODL1* and *ThENODL2* from *T. hemsleyanum* were cloned. Preliminary bioinformatics analysis showed that the open reading frame (ORF) for *ThENODL1* is 528 bp, encoding 175 amino acids, and the ORF for *ThENODL2* is 651 bp, encoding 217 amino acids. Both *ThENODL1* and *ThENODL2* have the conserved domain of rice ENODL gene (*OsENODL1_like*), and possess the basic molecular structure characteristics of ENODL gene. Relative fluorescence quantitation PCR revealed that the expression level of *ThENODL1* was significantly higher in tuberous roots than in other organs, and significantly increased in the initial development stage and expansion stage of root tuber, while the expression level of *ThENODL2* was the lowest in tuberous roots and there was no significant difference in expression profiles at different development stages of root tuber. Furthermore, the proteins encoded by cloned cDNAs of both

收稿日期: 2022-07-02; 修回日期: 2022-10-25; 网络首发日期: 2023-02-10

基金项目: 江西省教育厅科技项目(GJJ190884, GJJ201702); 2022 年上饶师范学院校级课题(2022031); 2022 年大学生创新创业训练计划项目(S202210416003); 江西省自然科学基金重点研发项目(20212BBF63020)

作者简介: 赵刚(1982—), 男, 黑龙江五常人, 助理实验师, 主要从事药用作物栽培及相关分子生物学研究; * 通信作者: 闻静(1983—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 副教授, 主要从事植物次生代谢物质分子调控网络研究, Tel: 0793-8153721, E-mail: wj55187742@163.com。

ThENODL1 and *ThENODL2* were expressed with the expected size using *E. coli* prokaryotic expression system. This study lays a basic molecular biology foundation for further ascertaining the functions of *ThENODL* genes in tuber development.

Key words: *T. hemsleyanum*; early nodulin-like (ENODL) gene; root tuber development; prokaryotic expression (*Life Science Research*, 2023, 27(1): 023–030)

三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)有着悠久的民间用药历史^[1], 相关研究报道, 其块根提取物对肿瘤如乳腺癌^[2]、肠癌^[3]及食道癌^[4]等有显著的抑制作用, 随着其药用价值的深入研究, 三叶青正成为一种新兴的大宗中药材。三叶青块根是其重要的药用器官及经济器官, 但在人工栽培中存在块根形成困难、产量不稳定等问题, 这制约了三叶青栽培产业的规模化发展, 因此, 对块根发育的分子调控机理及关键基因功能的研究有着重要的现实意义。

针对三叶青块根发育不同时期的转录组研究发现, 三叶青早期结瘤类(early nodulin-like, ENODL)基因在块根中大量表达^[5]。早期结瘤蛋白质最早发现于豆科植物与根瘤菌的相互作用过程中, 是一类诱导植物根瘤形成的多肽或蛋白质^[6]。目前研究发现, 许多非豆科植物体内存在大量的早期结瘤类蛋白质, 如拟南芥^[7]、烟草^[8]、百脉根^[9]及一些单子叶植物^[10]。在油棕的胚状体发育过程中, *EgENOD93* 基因表达对体细胞胚胎发生至关重要, 说明该基因对于细胞的重塑及新器官的发生具有重要作用^[11]。植物地下储藏器官的起始发育与豆科植物根瘤形成有相似之处^[12], 课题组前期研究发现, 早期结瘤类基因在三叶青块根发育不同阶段高丰度且差异表达^[5], 推测早期结瘤类蛋白质可能在三叶青块根起始发育中具有一定的作用。本研究以三叶青块根转录组为参照数据, 选取了表达量最高的两个早期结瘤类基因进行克隆验证, 并对这两个基因在块根发育不同时期及不同器官中的表达量进行了比对分析, 初步明确了这两个基因的表达特征, 最后利用大肠杆菌原核表达体系成功表达了相应蛋白质。本研究为进一步明确早期结瘤类基因在三叶青块根发育中的功能提供了分子生物学参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本研究以上饶市玉山县农林合作社提供的三叶青栽培品种“怀玉 2 号”为实验材料。

植物 RNA 提取采用北京华越洋生物科技有限公司的 Quick RNA Isolation Kit GK 型试剂盒; 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, 日本)、胶回收试剂盒 Mini-BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Takara, 日本)、克隆载体 pMD™ 18-T Vector Cloning Kit (Takara, 日本)、感受态细胞 *E. coli* DH5α 及 DE3 (Takara, 日本)均购自南昌天沃科技有限公司; 荧光定量试剂盒(*Trans.Start*® Top Green qPCR SuperMix)、PCR 高保真酶(2×*TransTaq* High Fidelity PCR SuperMixI)及原核表达载体(pEASY-Blunt E1 Expression Kit)购自北京全式金生物科技有限公司。琼脂糖及相关化学试剂均购自百化在线商城(<https://www.chem-mall.com/>, 2022–05–21)。

1.2 生物信息学分析

三叶青早期结瘤类基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)分析、特异引物及相对荧光定量引物设计、保守结构域预测和比对、蛋白质相对分子质量及等电点预测、蛋白质三级结构预测、亚细胞定位预测以及其参与的生物学过程分析等均采用在线软件, 具体信息如表 1 所示。采用 Clustal W2 进行序列的多重比对后, 利用 MEGA 7.0 软件的邻接法(neighbor-joining method)构建进化树。

1.3 植株取材

用于器官特异性表达分析的样品于 2022 年 5 月 15 日采集自怀玉山玉峰村玉山县农林农民专业合作社的玻璃温室内, 包括无病虫的健康功能叶、顶芽、受精后的子房、显著膨大的块根及匍匐状分枝(枝蔓)。叶片取正中间 1/4 大小部位; 枝蔓样品以互生叶中间的枝的 1/4 长度为取样部位; 块根取正中间部位横向切片; 受精子房取样以子房显著膨大且花冠萎蔫为标准, 取样时切去花托及萎蔫的花冠; 对于顶芽, 尽量去掉周围的幼叶后称量取样。针对不同时期根(块根)样品的获取, 以两年苗龄的三叶青扦插苗为取材对象, 按照块根(或纤维根)的生物学外部形态将其分成 4 个发育阶段, 即未形成块根的植株纤维根(I)、初始膨大的块根(II)、膨大块根(III)及具有块根植株的纤

表 1 用于生物信息学分析的在线软件
Table 1 Online bioinformatics analysis software used in the study

Software	Usage	Website
Primer 3-SGD	Primer design for cloning of <i>ThENODLs</i>	https://www.yeastgenome.org/primer3
Primer3Plus	Primer design for qRT-PCR	https://www.primer3plus.com/
ORF Finder	Prediction for ORF	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
BLASTP/BLASTN	Protein or nucleic acid online site alignment	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Conserved Domain	Conserved domain prediction	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb
Phyre2	Prediction for protein tertiary structure	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2
ProtParam	Prediction for molecular mass, isoelectric point and possible biological processes involved	https://web.expasy.org/protparam/
Cell-PLoc 2.0	Subcellular localization	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/

注: 以上软件分析于 2022 年 5 月 6 日至 7 日完成。

Note: The above software analyses were completed on May 6—7, 2022.

维根(IV), 具体取样方法参照文献[13]。每个样品取 3~5 株, 样品剪碎后混合, 每个样品取 100 mg, 设置 3 个生物学重复; 样品称量后立即液氮速冻, 于-80 °C 保存备用。

1.4 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

样品的总 RNA 提取参照 Quick RNA Isolation Kit GK 型试剂盒说明书。RNA 提取后进行 RNA 的纯度及定量检测, 取 RNA 浓度大于 200 ng/ μ L 的总 RNA 用于反转录, 具体操作参照反转录试剂盒说明书。

1.5 cDNA 的克隆和测序

根据前期转录组获得的 *ThENODL* 基因的 cDNA 序列, 设计两个早期结瘤类基因的全长扩增引物, 引物信息见表 2。PCR 反应体系为 50 μ L, 反应成分及用量参照说明书, 反应条件: 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 40 个循环。以 1.2% 琼脂糖 TAE 凝胶电泳检测 PCR 产

物。PCR 产物纯化后与 pMD™ 18-T 载体连接并转化大肠杆菌, 菌落 PCR 检测后挑选两个以上阳性克隆进行测序。

1.6 相对荧光定量分析

目的基因的相对荧光定量(染料法)分析根据试剂盒说明书的两步法操作。在块根发育不同时期的检测中, 内参基因选用 *ELF- α* (登录号为 M-T731970) 和 *RP II*, *RP II* 的引物信息见表 1; 在器官特异性检测中, 采用 *ELF- α* 与 *TUBA* (登录号为 MT731969) 为内参基因, 引物设计参考文献[13]。内参 Ct 值取内参基因的几何平均值。设置生物学重复、技术重复各 3 次。相对荧光定量数据的分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[12], 显著性分析采用 SPSS 软件的 LSD 字母标注法。

1.7 原核表达分析

根据 *ThENODL* 基因序列设计特异引物, 扩增其 ORF 序列, 具体连接及转化步骤参照载体说

表 2 用于 *ThENODL* 基因克隆及相对荧光定量分析的引物序列
Table 2 Primers used for *ThENODL* gene cloning and relative fluorescence quantification

Abbreviation of gene name (accession number)	Primer name	Usage	Amplified fragment length/bp	Primer sequence (5'→3')
<i>ThENODL1</i> (ON086798)	ThENODL1F	Full-length	528	TGGACTTGTTCCCGAATCA
	ThENODL1R	amplification		TCAAATCCCCAACAGAGCAGAC
<i>ThENODL2</i> (ON086799)	ThENODL2F	Full-length	660	CTCTTTGCCTTGCTCACATG
	ThENODL2R	amplification		AATCCCAAACACCAACCAGC
<i>ThENODL1</i>	ThENODL1-1F	ORF	528	ATGGCGACTTCACAGACTT
	ThENODL1-1R	amplification		TCAAATCCCCAACAGAGCAGAC
<i>ThENODL2</i>	ThENODL2-1F	ORF	651	ATGACTGATCCCGTGTAAGA
	ThENODL2-1R	amplification		TCAAGCTAAAAGAAGAGATG
<i>ThENODL1</i>	ThENODL1QF	RT-qPCR	80	TCCGAGGGAGTGTAGATGCA
	ThENODL1QR			GCGTTGTTTCTTGCCCAAT
<i>ThENODL2</i>	ThENODL2QF	RT-qPCR	171	GTTCTGCTGATGCTGCTCT
	ThENODL2QR			GACAGCACTGAGTCCTTCCC
<i>RP II</i> (MW307822)	RP II -1QF	RT-qPCR	135	ATCTCCGCTTGCAGCTTCTT
	RP II -1QR			GCTGGTTGCCATGTTGATG

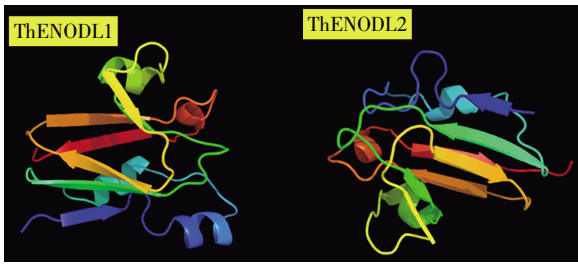


图 2 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 的推测蛋白质的 3D 模型
Fig.2 The deduced protein 3D models of *ThENODL1* and *ThENODL2*

类群, *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 分属不同类群, 其中, *ThENODL1* 与葡萄(*Vitis riparia*)的早期结瘤类蛋白 1 相似程度最高, *ThENODL2* 与唐松草(*Thalictrum thalictroides*)的早期结瘤类蛋白 93 处于同一进化分支。

2.2 目的基因克隆

以怀玉山三叶青块根的 cDNA 为模板扩增 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 基因的 cDNA 序列。凝胶电泳结果显示, 扩增产物大小与预期相符(图4)。测序得到的碱基序列(图 5)与前期获得的转录组序列相似性大于 99%, 推测的氨基酸序列与转录组原序列推测氨基酸相似度为 100%。

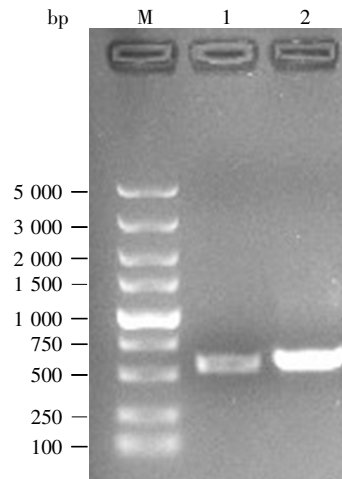


图 4 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* PCR 扩增的电泳结果
M: DL5000 分子量标准; 1: *ThENODL1* 的 PCR 扩增检测结果; 2: *ThENODL2* 的 PCR 扩增检测结果。

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of *ThENODL1* and *ThENODL2* PCR amplification products

M: DL5000 marker; 1: *ThENODL1* PCR product; 2: *ThENODL2* PCR product.

2.3 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 在不同器官和根(块根)不同发育时期的表达量

为初步验证 *ThENODL1* 及 *ThENODL2* 与块根发育的相关性, 我们检测了这两个基因在块根

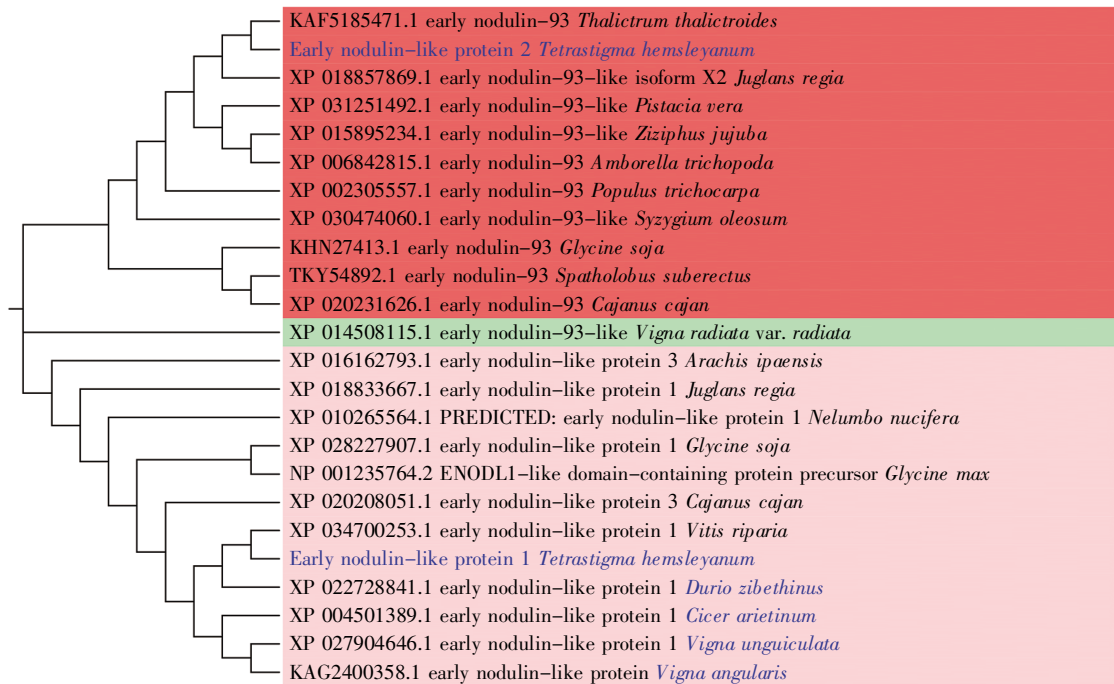


图 3 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 系统进化树的构建

红色、绿色及粉色背景代表不同的进化类群, 其中蓝色字体标记的是 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 所在位置。

Fig.3 Phylogenetic tree construction of *ThENODL1* and *ThENODL2*

Different evolutionary groups are represented by red, green and pink backgrounds, respectively, and the locations of *ThENODL1* and *ThENODL2* are marked in blue font.

ThENODL1

TGGACTTGTTTCGGGAATCAATGGCGACTTCACGAGTTTTTCTTCTATGTTTCGCTCTCA
 TTTCTCTGCTCTTTGCTTGCTACATGCCGAGAATACCTGGTCGGAGGGAGTGTAGAT
 GCATGGAAAGTTCCATCTTCTCATGGGCGGTTGTCCCTCAGCGATTGGGCCAAGAAAC
 AACGCTTCAGAATCGGAGATTATCTCATCTTCAAATACGACCCCAAAGTTCATTCATTG
 CTGGAATTGAATGAGGAGATTACAAAACAGCAACTTCAAGGCCGATCAAGAAAT
 TCACAGAGGGCTATACAAGTTACGAGCTCCACCGAACAGGGAGGTTTCACTTCACCGG
 CGGACCCGACGAACACTGTTTCTATGGCCAGAACTGTTTCGTAGACGTGATGGCTGCA
 GAAGATCTTGCAGGAACTGAGCTGGCAATGACAACTTTAGCTCCGGTGCCGCCGCTG
 AAATGTCCAAGGCCAACGTTTGTAGAGTTGGATTTCATCGGCTGCGTAACGCTTATGATG
 TCTGCTCTGTTKGGGATTTGAGAGAATACGAGCCGATTTATGATCATGGCG

ThENODL2

CCAAATGCCCTTATAAATACCCAAAACCTACCCATAGCTTCTTCACTCAGCTTTTTCC
 ATTTCTGTAATTTCCCTTCTCTCCAGTTCATCGAATTTGTGCAATTATGGGGAAGAAT
 GTGGGTGGGTCTCCCTTTGACAGAAATGAGTTTGCCGCAATTGACCAAAGCAGGCT
 ATGGCCAAGCGCTGCTCTCATGAGGAGTAGTTGCAGGAGCAAAGGCTGCAGTTGTT
 GCCAGCATCGCCACAGCCATACCCACTATGGCTAGTGCAAGATGGCTGCCATGGGCG
 AAAGCCCATCTCAATTACACTGCTCAAGCTCTCATTATTTCTACAGTGGGCGGAGCGG
 CCTATTTTCATCGTTGCCGATAAGACGATACTGGCCACGGCTCGCCGCAACTCCTCAA
 TAAACCTCCATCTCCGATGAGTTATGAATATTGATGTAACCCCAATTTCTTGATAAT
 CCATGAACTACCAACCTCTGATGTAATTTACCATCTTCTCAGTATTAATAAACCCAG
 TGCTTTCTTTTCTGTTATAAAA

图 5 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* PCR 扩增的测序结果

蓝色碱基部分为非编码区, 黑色碱基部分为编码区。

Fig.5 The results of *ThENODL1* and *ThENODL2* sequencing

The blue parts are non-coding regions, and the black parts are coding regions.

4 个标志性发育时期的表达量。结果如图 6 所示, *ThENODL1* 在块根发育的 4 个时期的表达量具有显著差异, 其中, II 期即块根发育初始阶段的表达最高; 虽然 III 期(块根期)的表达量显著低于 II 期, 但显著高于 I 期(纤维根期)及 IV 期; IV 期(具有块根的纤维根)的表达量最低。*ThENODL2* 的表达量在块根发育的 4 个时期无显著差异。

为了初步明确 *ThENODL1* 及 *ThENODL2* 与不同器官发育的相关性, 我们检测了叶、顶芽、受精后的子房、块根及枝蔓中这两个基因的表达量。结果如图 7 所示, *ThENODL1* 在块根中的表达量最高且显著高于其他器官, 在顶芽及枝蔓中的表达量相近且无显著差异, 在叶片及刚受精子房中的表达量相近且显著低于其他器官; *ThENODL2*

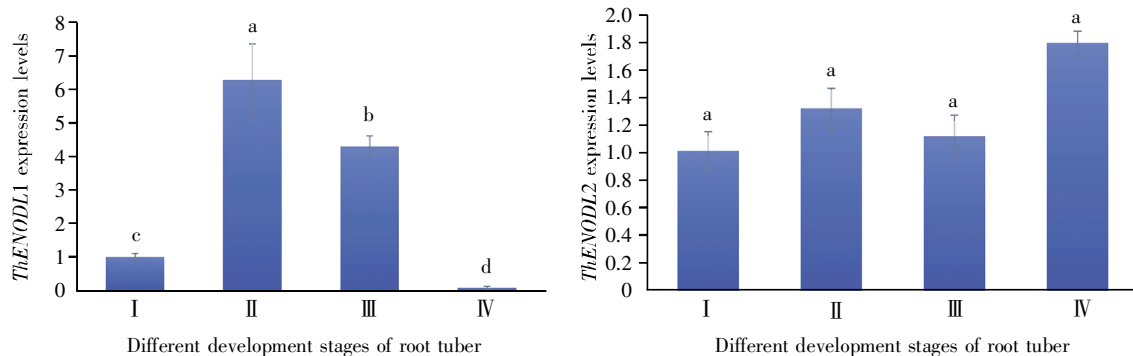


图 6 *ThENODL1* 及 *ThENODL2* 在块根发育不同时期的表达量

I: 未形成块根的植株的纤维根; II: 初始膨大的块根; III: 块根; IV: 具有块根植株的纤维根。显著性水平为 $P < 0.05$; 最大平均数标记字母 a, 依次向下比较, 两两比较后, 若呈显著差异则依次标注 b, c 及 d, 若差异不显著则标注相同字母。

Fig.6 The relative expression levels of *ThENODL1* and *ThENODL2* in different development stages of root tuber

I: The fibrous roots without tuber; II: Initially expanded tuber; III: Tuber; IV: The fibrous roots with tuber. The significance level is $P < 0.05$. The letter "a" is marked the maximum average, and the average is compared with the following averages one by one, and "b", "c" and "d" were marked in turn if there is a significant difference after pairwise comparison. Those with the same letter indicate that the difference between them is not significant.

在顶芽、刚受精的子房及枝蔓中的表达较高且相互之间差异不显著,在叶片中的表达量居中且与其他器官呈显著差异,在块根中的表达量最低且显著低于其他器官。

2.4 *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 的原核表达

ThENODL1 编码 175 个氨基酸,原核表达载体上带有 23 个氨基酸,故 *ThENODL1* 原核表达的蛋白质约有 21.78 kD (198 个氨基酸)。*ThENODL2* 编码 217 个氨基酸,其原核表达的蛋白质约为 26.40 kD (240 个氨基酸)。图 8 显示,*ThENODL1* 与 *ThENODL2* 表达的蛋白质大小与预期结果相近。

3 讨论

经蛋白质相似性比对及保守域分析发现,

ThENODL1 与 *ThENODL2* 基因编码的蛋白质都属于蓝铜蛋白质家族中的早期结瘤类亚家族(表 3)。植物蓝铜蛋白质家族可分为蓝花青素(uclacyanin, UC)、星藻蓝素(stellacyanin, SC)、植物花青素(plan-tacyanin, PLC)和早期结瘤类 4 个亚家族^[14],各亚家族之间重要的区分标准在于铜离子结合位点的氨基酸类型。早期结瘤类基因因缺少铜的结合位点而不能与铜结合^[15],所以早期结瘤类蛋白质被认为参与到了不需要结合铜的生物学过程^[16]。保守域分析表明,所克隆的两个三叶青早期结瘤类基因的编码蛋白含有与水稻 *OsENODL1* 相似的保守域(图 1)。*OsENODL1* 基因在种子晚期发育阶段特异表达,被认为与种子发育密切相关^[17]。但是,*ThENODL1* 在 N 端脯氨酸和丝氨酸富含区有大量的氨基酸缺失,我们推测 *ThENODL1* 和 *ThEN-*

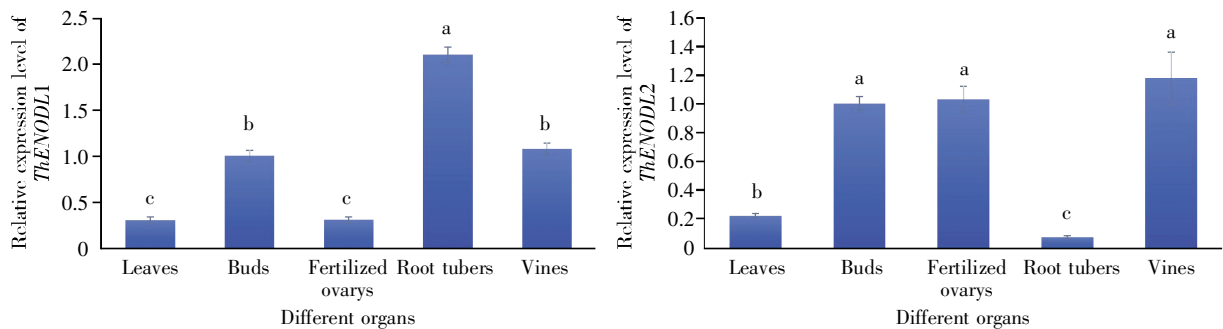


图 7 *ThENODL1* 及 *ThENODL2* 在不同器官中的表达量差异

显著性水平为 $P < 0.05$; 最大平均数标记字母 a, 依次向下比较, 若呈显著差异则依次标注 b、c 及 d, 若差异不显著则标注相同字母。

Fig.7 The relative expression levels of *ThENODL1* and *ThENODL2* in different organs

The significance level is $P < 0.05$. The letter "a" is marked the maximum average, and the average is compared with the following averages one by one, and "b", "c" and "d" were marked in turn if there is a significant difference after pairwise comparison. Those with the same letter indicate that the difference between them is not significant.

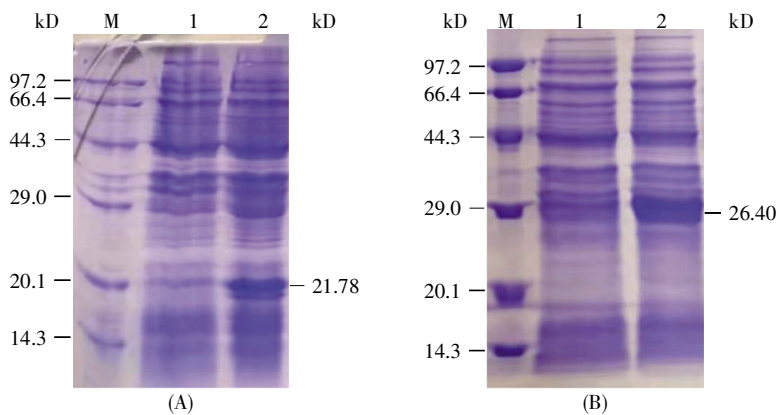


图 8 *ThENODL1* 及 *ThENODL2* 原核表达的 SDS-PAGE 结果

(A) *ThENODL1*; (B) *ThENODL2*. M: 97.2 kD 的蛋白质分子量标准; 1: 对照(空载体); 2: *ThENODL1* 或 *ThENODL2* 经诱导表达的蛋白质产物。

Fig.8 SDS-PAGE results of prokaryotic expression of *ThENODL1* and *ThENODL2*

(A) *ThENODL1*; (B) *ThENODL2*. M: 97.2 kD protein marker; 1: Control (empty vector); 2: *ThENODL1* or *ThENODL2* expression products.

ODL2 与水稻 *OsENODL1* 的生物学功能可能存在差异。

器官特异性表达分析表明, *ThENODL1* 在块根中的表达量显著高于其他器官(图 7), 证明 *ThENODL1* 具有块根高丰度表达特异性。早期结瘤类基因在根中高丰度表达的特异性研究早有报道, 例如: 蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)的 *MtENODL27* 与 *MtENODL28* 均可在根瘤处大量特异表达^[15], 与本研究结果类似。1989 年 Hirsch 等^[18]的研究表明, 通过施用生长素转运抑制剂(1-萘基邻苯二甲酸及 2,3,5-三碘苯甲酸), 早期结瘤类基因可以引起苜蓿根部结节状结构的生长, 说明该基因与根部新器官的起始发育有关。目前的研究推测, 早期结瘤类基因可能主要通过两种生物学过程调控块根发育。第一种可能为早期结瘤类基因促进了新器官的分化, Scheres 等^[19]认为豆科植物早期结瘤基因参与了根部新器官的细胞分化过程; 拟南芥早期结瘤类基因(*At3g20570*)的 cDNA 在生殖器官的筛管中特异表达, 证明该基因在促进新器官形成中具有重要作用^[7]。*ThENODL1* 的表达水平在初始膨大的块根及膨大的块根中显著提高, 推测该基因可能参与了纤维根细胞向块根发育的转变。第二种途径为早期结瘤类基因促进了营养物质的运输, 从而促进了储藏器官的发育。现有的文献报道, 拟南芥的早期结瘤类蛋白质(SWEET 蛋白)是葡萄糖、果糖及蔗糖的运转蛋白质^[20], 而 *AtENODL9* 被认为与碳水化合物的运输有关^[6], 影响植物从营养阶段向生殖阶段的转变。此外, 水稻、拟南芥及玉米等的结瘤类蛋白质(ZIP)被证明能够参与到植物对硼(B)、硅(Si)等矿质元素的吸收运转过程^[21]。目前, 已发现的早期结瘤类蛋白质均为膜蛋白质^[22], *ThENODL1* 与 *ThENODL2* 经亚细胞定位被预测为细胞膜蛋白质, 与前人研究结果一致。

越来越多的研究表明早期结瘤类基因是一个多功能基因, 该类基因参与到根瘤的形成^[15]、花粉管与柱头的识别^[23]及生殖发育^[11]等多种生物学过程。植物地下储藏器官的形成和发育是一个多方面调控的生物学过程, 包括环境信号的刺激及基因水平的应答与调控。本研究发现, *ThENODL1* 在块根发育过程中积极表达且在块根呈现高丰度表达特征; 同时, 我们利用原核表达体系成功获得 *ThENODL1* 相应的蛋白质。因此, 可初步拟定 *ThENODL1* 基因为参与三叶青块根发育相关的候选

基因, 而本研究为通过转基因方法进一步研究 *ThENODL1* 基因的生物学功能提供了初步的分子生物学基础。

参考文献(References):

- [1] 丁富娟, 李慧芬, 崔伟亮, 等. 三叶青名实考辨[J]. 中国实验方剂学杂志(DING Fujuan, LI Hui fen, CUI Weiliang, et al. Discrimination of name and nature of *Tetragium hemsleyanum*[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae), 2018, 24(9): 208-212.
- [2] 吕晓皓, 王蓓, 陈建彬, 等. 三叶青散结抗癌方对三阴性乳腺癌新辅助化疗患者病理完全缓解率的影响[J]. 中医杂志(LÜ Xiaohao, WANG Pei, CHEN Jianbin, et al. Effect of Sanyeqing Sanjie Kang'ai Formula on pathological complete response rates in triple-negative breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine), 2014, 55(23): 2016-2019.
- [3] 吴晓尉, 杨妙芳, 余纳, 等. 三叶青黄酮对结肠癌 SW620 细胞增殖凋亡的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志(WU Xiaowei, YANG Miaofang, YU Na, et al. Radix *Tetragium hemsleyanum* flavone inhibits proliferation and induces apoptosis of human colon cancer SW620 cells[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion), 2016, 24(12): 902-905.
- [4] 张胜强, 张洪艳, 黄建伟, 等. Notch1 下调对三叶青黄酮抑制食管癌 EC9706 细胞迁移和侵袭的影响[J]. 中国实验方剂学杂志(ZHANG Shengqiang, ZHANG Hongyan, HUANG Jianwei, et al. Inhibitory effect of down-regulation of Notch1 on *Tetragium hemsleyanum* radix flavone on migration and invasion of esophageal cancer EC9706 cells[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae), 2017, 23(5): 162-167.
- [5] 闻静, 赵刚, 杨玉琪, 等. 三叶青块根发育比较转录组分析[J]. 分子植物育种(WEN Jing, ZHAO Gang, YANG Yuqi, et al. Analysis of comparative transcriptome in the development of *Tetragium hemsleyanum* tuber[J]. Molecular Plant Breeding), 2019, 17(17): 5660-5667.
- [6] 陈龙祥. 大豆早期结瘤基因克隆及功能验证[D]. 武汉: 华中农业大学(CHEN Longxiang. Cloning and Characterization of Early Nodulation Genes in Soybean[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University), 2017.
- [7] KHAN J A, WANG Q, SJÖLUND R D, et al. An early nodulin-like protein accumulates in the sieve element plasma membrane of Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2007, 143(4): 1576-1589.
- [8] WU H Y, SHEN Y, HU Y L, et al. A phycocyanin-related early nodulin-like gene, *BcBCP1*, cloned from *Boea crassifolia* enhances osmotic tolerance in transgenic tobacco[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(9): 935-943.
- [9] GRÖNLUND M, ROUSSIS A, FLEMETAKIS E, et al. Analysis of promoter activity of the early nodulin *Enod40* in *Lotus japonicus*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(5): 414-427.
- [10] ZHANG M M, ZHONG X, LI M J, et al. Genome-wide analyses of the *Nodulin-like* gene family in bread wheat revealed its potential roles during arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 201: 424-436.
- [11] CHAN P L, ROSE R J, ABDUL MURAD A M, et al. Early nodulin 93 protein gene: essential for induction of somatic embryogenesis in oil palm[J]. Plant Cell Reports, 2020, 39(11): 1395-1413.

- [61] MIYAGUCHI K, UZAWA N, MOGUSHI K, *et al.* Loss of NKX3-1 as a potential marker for an increased risk of occult lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma[J]. *International Journal of Oncology*, 2012, 40(6): 1907-1914.
- [62] QIAN D, ZHENG W C, CHEN C X, *et al.* Roles of CCNB2 and NKX3-1 in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2020, 35(3): 208-213.
- [63] ROBLES E F, MENA-VARAS M, BARRIO L, *et al.* Homeobox NKX2-3 promotes marginal-zone lymphomagenesis by activating B-cell receptor signalling and shaping lymphocyte dynamics[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11889.
- [64] DAI J, PENG T L, YU X D. NK6 homeobox 2 regulated gas-trokin-2 suppresses gastric cancer cell proliferation and invasion via Akt signaling pathway[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2021, 79(1): 123-131.
- [65] YOON J H, EUN J W, CHOI W S, *et al.* NKX6.3 is a transcription factor for Wnt/ β -catenin and Rho-GTPase signaling-related genes to suppress gastric cancer progression[J]. *EBio-Medicine*, 2016, 9: 97-109.
- [66] YOON J H, EUN J W, ASHKTORAB H, *et al.* Depletion of NK6 homeobox 3 (NKX6.3) causes gastric carcinogenesis through copy number alterations by inducing impairment of DNA replication and repair regulation[J]. *Oncogenesis*, 2021, 10(12): 85.
- [67] VALLSTEDT A, MUHR J, PATTYN A, *et al.* Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to *Nkx6* genes in motor neuron and interneuron specification[J]. *Neuron*, 2001, 31(5): 743-755.

(上接第 30 页)

- [12] DAMIANI I, PAULY N, PUPPO A, *et al.* Reactive oxygen species and nitric oxide control early steps of the legume-rhizobium symbiotic interaction[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 454.
- [13] 闻静, 刘俊, 段华平, 等. 三叶青 2 个 ThBLH 转录因子 cDNA 的克隆及其对光质与光周期信号的响应[J]. 河南农业大学学报(WEN Jing, LIU Jun, DUAN Huaping, *et al.* Cloning of two ThBLH transcription factors cDNA of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg and its response to light quality and photoperiod signals[J]. *Journal of Henan Agricultural University*), 2021, 55(6): 1065-1073.
- [14] KOCH M, VELARDE M, HARRISON M D, *et al.* Crystal structures of oxidized and reduced stellacyanin from horseradish roots[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(1): 158-166.
- [15] SUN Y L, WU Z F, WANG Y J, *et al.* Identification of phyto-cyanin gene family in legume plants and their involvement in nodulation of *Medicago truncatula*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2019, 60(4): 900-915.
- [16] MASHIGUCHI K, ASAMI T, SUZUKI Y. Genome-wide identification, structure and expression studies, and mutant collection of 22 early nodulin-like protein genes in *Arabidopsis*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(11): 2452-2459.
- [17] MASHIGUCHI K, YAMAGUCHI I, SUZUKI Y. Isolation and identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored arabino-galactan proteins and novel beta-glucosyl Yariv-reactive proteins from seeds of rice (*Oryza sativa*)[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2004, 45(12): 1817-1829.
- [18] HIRSCH A M, BHUVANESWARI T V, TORREY J G, *et al.* Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1989, 86(4): 1244-1248.
- [19] SCHERES B, VAN EENGELEN F, VEN DER KNAAP E, *et al.* Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule[J]. *Plant Cell*, 1990, 2(8): 687-700.
- [20] CHEN L Q, QU X Q, HOU B H, *et al.* Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport[J]. *Science*, 2012, 335(6065): 207-211.
- [21] LI B, LI Y Y, WU H M, *et al.* Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N_2 fixation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2016, 113(23): 6496-6501.
- [22] REDDY P M, AGGARWAL R K, RAMOS M C, *et al.* Widespread occurrence of the homologues of the early nodulin (*EN-OD*) genes in *Oryza* species and related grasses[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 258(1): 148-154.
- [23] HOU Y N, GUO X Y, CYPREYS P, *et al.* Maternal ENODLs are required for pollen tube reception in *Arabidopsis*[J]. *Current Biology*, 2016, 26(17): 2343-2350.