

大果油茶中MADS-Box基因之選殖分析

吳家禎¹ 何政坤^{1*}

【摘要】山茶屬 (*Camellia*) 為我國重要的觀花植物，本研究透過基因資料庫比對分析開花基因，在B類的高保守性區域設計引子對，以山茶屬中的大果油茶 (*Camellia oleifera*) 為對象，進行基因選殖，結果選殖出三個具有MADS-box的基因，分別命名為 *COMADS1*、*COMADS2* 及 *COMADS3*，透過系統發育樹以序列相似性分析比對，將此基因歸類於開花基因模式中的B功能型之家族 (lineages)。B功能型的基因對於调控花發育極為重要，最主要被認定和花萼片與花瓣發育有關係，並透過蛋白質序列分析得知，這三個基因皆和紅山茶 (*Camellia japonica*) 基因序列相近，並進行其蛋白質功能序列分析以及預測，就其蛋白質結構而言，三個蛋白質胺基酸序列中皆含有β平板與α螺旋的結構，顯示這三個蛋白質應該具有和DNA鍵結相關的轉錄功能，並且在C端序列具有演化意義的共演徵，針對MADS-box基因的研究，未來將有助於了解大果油茶花發育之功能研究。

【關鍵詞】大果油茶、MADS-Box、開花调控、ABC模式

Cloning and Characterization of MADS-Box Gene in *Camellia oleifera*, Abel

【Abstract】 Genus *Camellia* is famous for its flower ornamental value. In this study, the primer pairs were designed from highly-conserved regions of B function genes. Three MADS-Box genes were cloned from *Camellia oleifera* and were named *COMADS1*, *2* and *3*, respectively. In phylogenetic tree, these three genes were cataloged to B function gene family, which affected development of petals and stamens. The cloned genes were sequenced, and their amino acid sequences were predicted. The alignment data showed that three predicted protein sequences had specific sub-family consensus domain as evolutionary synapomorphies and had high similarity with *C. japonica* L.. The predicted protein structures all had theβ-sheet and α-helix showing three proteins having specific DNA binding function as transcription factor. This study provided basic information for further understanding of floral molecular mechanism in *C. oleifera*.

【Key words】 *Camellia oleifera*, MADS-Box, floral regulation, ABC model

1*. 行政院農業委員會林業試驗所育林組，10066台北市南海路53號，通訊作者。
Researcher, Silviculture Division, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan. Corresponding author,
E-mail: ckho@tfri.gov.tw。

一、前言

植物生殖生理現象極為複雜，其中，植物生殖器官的形成，實為重要的一個關鍵。在被子植物的生殖器官就是花，具有雄蕊與雌蕊（或是雄花與雌花），而裸子植物中則是雄毬花或是雌毬花。Coen和Meyerowitz提出ABC模型（ABC model）（Coen and Meyerowitz, 1991），就是以分子層次，來解釋植物開花的模式及其基因調控。這個模型中包含三類的基因（A、B、C類）其被啟動或突變或是調控機制，影響植物花器構造產生變化：A類功能型是專一性影響萼片，C類是專一性影響心皮，而AB功能型結合就可影響花瓣，BC功能型結合就可影響雄蕊，所以，B類基因具有可以影響花瓣與雄蕊的功能。

調控開花的基因一般大多為具有MADS-box的轉錄因子，這些基因具有高保守性的序列，大約有60個胺基酸，屬於MADS區塊，下游部分緊接著為I、K及C的區塊，其中K區塊（K domain）保守性較高，I區塊作為M與K區塊間的間隔，C區塊則有許多不同的motif可以作為不同類基因的共衍徵（synapomorphies）（Kramer et al., 2004），能做為演化的推論與研究（Rijpkema et al., 2006）。

本研究針對大果油茶的MADS-box基因進行選殖，大果油茶（*Camellia oleifera*, Abel.）在中國稱為普通油茶，主要作為茶油的原料，茶油是全世界四大木本植物油的其中一種，營養價值高，有東方橄欖油之稱。壓榨茶油主要是使用油茶的種子，而種子的形成和其開花授粉有密切的關係，目前針對大果油茶尚無其開花基因選殖的相關研究。因此，本實驗進行大果油茶的B類開花基因的選殖，並且透過序列分析與資料庫比對，期待可以對油茶種類的開花分子層次有更深的了解。

二、材料與方法

（一）試驗材料

本實驗之材料採集（2013年11月18日）自林業試

驗所台北植物園大果油茶單株花瓣開展之花朵，採集材料所使用之解剖刀及剪刀皆用75%的酒精噴拭消毒，植物材料馬上使用液態氮迅速冷凍，並放置於-80°C超低溫冷凍櫃保存。

（二）總體RNA萃取

使用PineTree方法（Chang et al., 1993），萃取植物總體RNA，再以分光光度計與洋菜膠體（agarose）電泳進行品質確認，置於-80°C超低溫冷凍櫃保存備用。

（三）基因之選殖（gene cloning）

選殖是由大果油茶的總體RNA（total RNA）利用反轉錄（reverse transcription）得到cDNA當作模版（template），配合所需的引子來進行聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）（Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo），引子設計是從National Center of Biotechnology Information（NCBI）基因資料庫以山茶屬植物為本，集中於B功能型基因，以PI、AP3、TM6這三個次家族（sub-family）為主，分別針對其高保守性之位置設計引子，引子分別為COMADS1 f：5'-ATGGGGAGAGGAAAGATAG-3'、COMADS1 r：5'-GTTTAAGGCTTCCCATATGAC-3'；COMADS2 f：5'-ATGGGGATCTTCATCCAAATC-3'、COMADS2 r：5'-TGTCATAGCAGTAATCGAGCT-3'；COMADS3 f：5'-ATGGGGCGTGAAAGATAG-3'、COMADS3 r：5'-TATTTGCTTACTTAGTCTCGGCG-3'，PCR反應設定為98°C/3分鐘，然後32個循環：98°C/30秒，55°C/30秒，72°C/60秒，最後72°C/10分鐘，以4°C/保存，得到DNA產物，經由1.2%的洋菜膠電泳分析，確認為預測大小之產物，以DNA Clean/Extraction kit（GeneMarker）純化，再以Prime Taq DNA Polymerase（Genetbio Inc.）在DNA兩端補上鹼基A，再進行DNA純化（DNA Clean/Extraction kit, GeneMarker）。

將純化後的產物進行TA cloning，接入pGEM-T® Easy Vector（Promega, Cat. A1036）所得到的接合產物（ligation product）利用High Efficiency DH5α competent cells（ZGeneBio Inc.）進行轉型，透

表1 大果油茶其轉譯之胺基酸序列相似度比對結果

Table 1 Similarity of amino acid with other sequences from different species. (Cj: *Camellia japonica*、Ac: *Actinidia chinensis*、Vv: *Vitis vinifera*、Ck: *Cornus kousa*、Tc: *Theobroma cacao*、Pm: *Prunus mume*)

Amino acid identity (similarity)	Cj	Ac	Ck	Vv	Tc	Pm
COMADS1	99 (100) (ADX86812.1)	88 (94) (ADU15475.1)	84 (91) (AGA61757.1)	84 (92) (NP_001267875.1)	80 (90) (XP_007019220.1)	75 (91) (XP_008219575.1)
COMADS2	99 (99) (ADL57412.1)	80 (90) (ADU15474.1)	78 (86) (AGA61754.1)	74 (86) (ABN46893.1)	77 (90) (XP_007017681.1)	63 (82) (XP_008221326.1)
COMADS3	99 (100) (ADM08179.1)	77 (88) (ADU15473.1)	76 (88) (AGA61760.1)	75 (84) (NP_001267937.1)	62 (74) (XP_007046774.1)	67 (80) (XP_008241774.1)

過載體 (Vector)上*lacZ*的機制，產生藍白菌落，以進行篩選，同時配合ampicillin抗性篩選，選取適當的單一菌落。使用液體培養基 (LB)培養，將DNA片段透過大腸桿菌生長而將其放大增殖，抽取大腸桿菌內的質體DNA (plasmid)，經限制酶酵素 (*EcoRI*)切割確認符合基因片段大小後，再使用SP6和T7引子進行DNA定序 (Genomics Inc.)。

(四) 定序結果分析與序列親緣關係比較分析

定序結果以Chromas Pro軟體進行分析，去除載體序列得到目標基因序列。接著使用ExPASy線上 (<http://web.expasy.org/translate/>)轉譯得到蛋白質序列；使用ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)做蛋白質基本資訊分析。蛋白質結構預測，使用SWISS MODEL線上分析(<http://swissmodel.expasy.org/>)，輸入胺基酸序列，找尋排名前50的蛋白質模板(template)，以相似度(identity)最高的作為模擬(model)對象，線上描繪蛋白質結構圖。核苷酸序列再透過NCBI資料庫進行比對(Blastn)，排列出相似度高的序列，並且進行序列親緣關係分析，使用MEGA4.0軟體進行序列拼接 (alignment)，以neighbor joining的演算方式，bootstrap=1000的重複測試，建構樹狀圖。

三、結果

(一) 序列選殖

總共選殖出三條基因片段，共獲得三段保守性序列長度分別為733 bp、812 bp、800 bp，分別可

以得到蛋白質轉譯區 (coding sequence region)為630 bp、681 bp、627 bp，可以轉譯成蛋白質序列各別為209 aa (amino acid)、226 aa、208 aa。經過NCBI資料庫比對發現這三條基因皆具有MADS區塊，全部都屬於ABC花器發育模式中B類的基因，並於NCBI資料庫中登錄其資料，分別命名為COMADS1 (KP314265)、COMADS2 (KP314266)及COMADS3 (KP314267)。

(二) 序列比對分析

使用大果油茶COMADS1-3基因序列轉譯後得到的蛋白質序列，以NCBI資料庫進行蛋白質序列比對，發現比對到的蛋白質序列皆為ABC花器發育模式中的B類基因，特別過濾出三條序列皆可比對到的物種，且相似度大於60%以上，其蛋白質序列相似度如表1。其中紅山茶 (*C. japonica*)都有存在與此三條序列相似度極高的蛋白質序列達99%，中華獼猴桃 (*Actinidia chinensis*)相似度在77-88%之間，與山茱萸科的四照花 (*Cornus kousa*)則為76-84%之間，與薔薇科的梅花 (*Prunus mume*)相似度最低為67-75%之間。由這樣的序列相似度比對看來，以COMADS1和這些物種所選殖出的蛋白質序列較為保守，而以COMADS3的相似度較不保守，因此可以推測出COMADS1的序列結構在這些物種間較為保守相近，而以COMADS3的序列結構，可能可以看出更大的差異。

(三) 親緣關係分析

將本次研究選殖的基因COMADS1-3進行序列親緣關係分析，從NCBI資料庫中選取開花發育不同

表2 COMADS1-3轉譯胺基酸的性質分析。

Table 2 Computation of various physical and chemical parameters in COMADS1-3.

	Negatively charged residues (Asp + Glu)	Positively charged residues (Arg + Lys)	Number of amino acids	Molecular weight	isoelectric point(pI)	Aliphatic index	Instability index
COMADS1	34	33	209	24619.0	6.77	63.53	63.53 unstable
COMADS2	29	36	226	26132.7	9.14	82.79	44.05 unstable
COMADS3	27	37	208	24306.7	9.48	73.61	41.31 unstable

類的基因序列，以MEGA4軟體進行演算處理，得到的親緣關係圖如圖2。親緣關係圖顯示和序列比對相同，本試驗選殖的COMADS1-3最相似的基因序列為紅山茶的基因序列，並且將其分類為B類基因，且從圖上可以明顯看出ABCDE類基因的關係圖，而B類基因也可以細分成為AP3/TM6與PI兩大基因次家族 (sub-family)，其中COMADS1屬於PI次家族，COMADS2、3屬於AP3/TM6次家族。親緣關係圖中B類基因，將其關係最近，且序列比對相似度高的次家族基因，分別和本實驗的三條選殖基因進行蛋白質序列比對，發現在蛋白質C端位置存在其次家族共有的胺基酸區塊 (COMADS1為PI motif、COMADS2為euAP3 motif、COMADS3為paleoAP3 motif，如圖3)。

(四) 蛋白質結構與功能位點分析

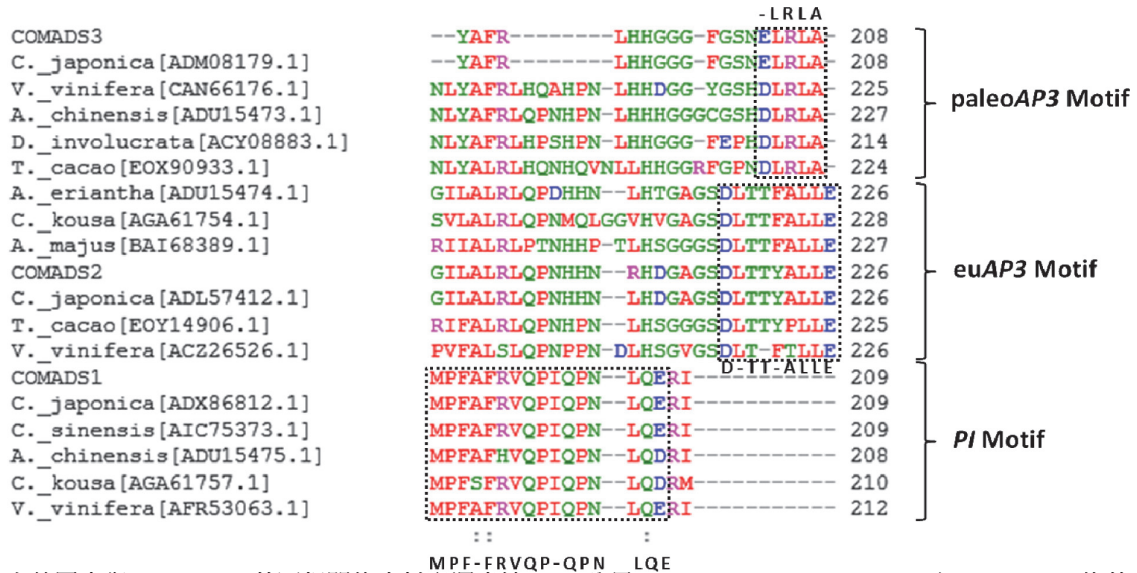
將轉譯的蛋白質序列進行分析，透過ExPASy線上軟體分析預測本實驗3條蛋白質序列的特性，COMADS1、COMADS2及COMADS3的蛋白質分子量大小分別為24.619kD、26.1327kD及24.3067kD；理論等電點 (pI, isoelectric point)分別為6.77、9.14及9.48；酸 (鹼)性胺基酸數量分別為34 (33)、29 (36)及27 (37)，不穩定指數皆大於40 (表2)。在蛋白質模型結構預測上，COMADS1、2最相似的蛋白質模型為Myocyte-specific enhancer factor 2A (PDB code: 3mu6.1.A)，COMADS3最相似的蛋白質模型為MCM1 transcriptional regulator (PDB code: 1mm.1.C)，此次的蛋白質模擬結構圖呈現如圖3，

可以很清楚的觀察到三條蛋白質結構中至少都具有一對 β 平板以及 α 螺旋的結構，且Myocyte-specific enhancer factor 2A線上推測會形成單雙體結構 (homo-dimer)。

四、討論

花是植物中重要的器官，對於繁衍後代肩負重要的責任，而花的型態構造在分類學上也有重要分類的價值與意義。這些調控花器生長發育的基因在植物體內扮演複雜的角色，不論是上游調控機制：包含溫度、光照影響，或是下游直接對於花器型態調控的基因，若有基因序列缺失，都會造成花朵發育及功能造成改變。本研究針對大果油茶的B類調控花瓣 (petal)及雄蕊 (stamen)的AP3/TM6及PI次家族的基因進行序列探討。在ABC模型中，B類基因分別可以和A、C類基因共同對於花瓣、雄蕊進行調控。但是，仍然有例外存在，在牽牛花的TM6次家族的基因僅對於雄蕊進行調控 (Rijkema et al., 2006)，所以，個別研究不同物種的調控花器功能的基因卻有其需要。

本研究所發表的COMADS1-3基因，經過序列比對分析，發現與紅山茶的基因相似度最高達到99% (表1)，而僅有COMADS1有比對到和茶 (*C. sinensis*)有99%的相似度的蛋白質序列 (AIC75373.1)，其餘兩條蛋白質皆為比對到其他非山茶屬植物的B類基因，顯示本次實驗的三條基因



在山茶屬中與MADS-Box基因相關的資料庫還尚缺分界 (Rijpkema et al., 2006)。而euAP3 motif的基圖2 大果油茶COMADS1-3轉譯後的胺基酸序列比對 (僅呈現C端位置)。虛線方框處為保守性序列位置。

Fig. 2 Alignment of C-terminal regions of *COMADS1-3* and other relative MADS-box genes. The boxes label the consensus motifs.

乏，而大果油茶在大陸又稱為普通油茶，是目前全球茶油生產的主要原料，茶油原料為茶籽，必須經過開花與結實的過程，而MADS-box相關基因有和開花調控有極大的關聯性，所以有其研究的價值與意義。

圖1可以看出中COMADS1屬於PI次家族，COMADS2、3屬於AP3/TM6次家族，且在圖2的胺基酸序列比對分析中，在靠近蛋白質C端的位置，也可以明顯發現次家族間的共衍徵具有的保守性區塊。以阿拉伯芥與金魚草為真雙子葉植物 (eudicot) 在B類基因的研究中，主要將B類基因區分為DEF/AP3以及GLO/PI兩那類的基因家族，本實驗中的COMADS1具有PI motif，COMADS2具有euAP3 motif，COMADS3則具有paleoAP3 motif。PI motif是B類胺基酸C端序列中疏水性高的保守區塊，歸類為GLO/PI的家族內；而euAP3以及paleoAP3 motif分別源自於DEF/AP3的基因家族分支，可以透過這兩個不同的motif，容易的看到這兩個次家族的

因，僅能在較高等的真雙子葉植物中找到，但是paleoAP3 motif的基因卻是廣泛分佈在各類植物中，從演化的觀點來看若是比較C端的這兩個motif，僅看paleoAP3的第二閱讀框架 (second reading frame) 則可以發現似euAP3 (euAP3-like)的motif出現，因此推測euAP3是由paleoAP3的上游核甘酸序列移碼突變 (frameshift mutation)而產生，所以這兩個motif基因是具有彼此演化的關係 (Rijpkema et al., 2006)。MADS-box蛋白質的C端區塊的功能對於此蛋白質功能具有很大的影響，而此區域也是MADS-box的次家族區分的重要依據 (Vandenbussche et al., 2003)，未來對於山茶屬植物MADS-box基因的研究可以透過其蛋白C端序列進行，推測應該可以在複雜的山茶屬植物中，找出其演化或是蛋白質序列間的親源關係。另外，本研究的COMADS1-3基因轉譯後的胺基酸序列，在其N端區域，皆有高保守性的MADS-region以及K-region，顯示這三條基因序列屬於MADS基因家族成員。

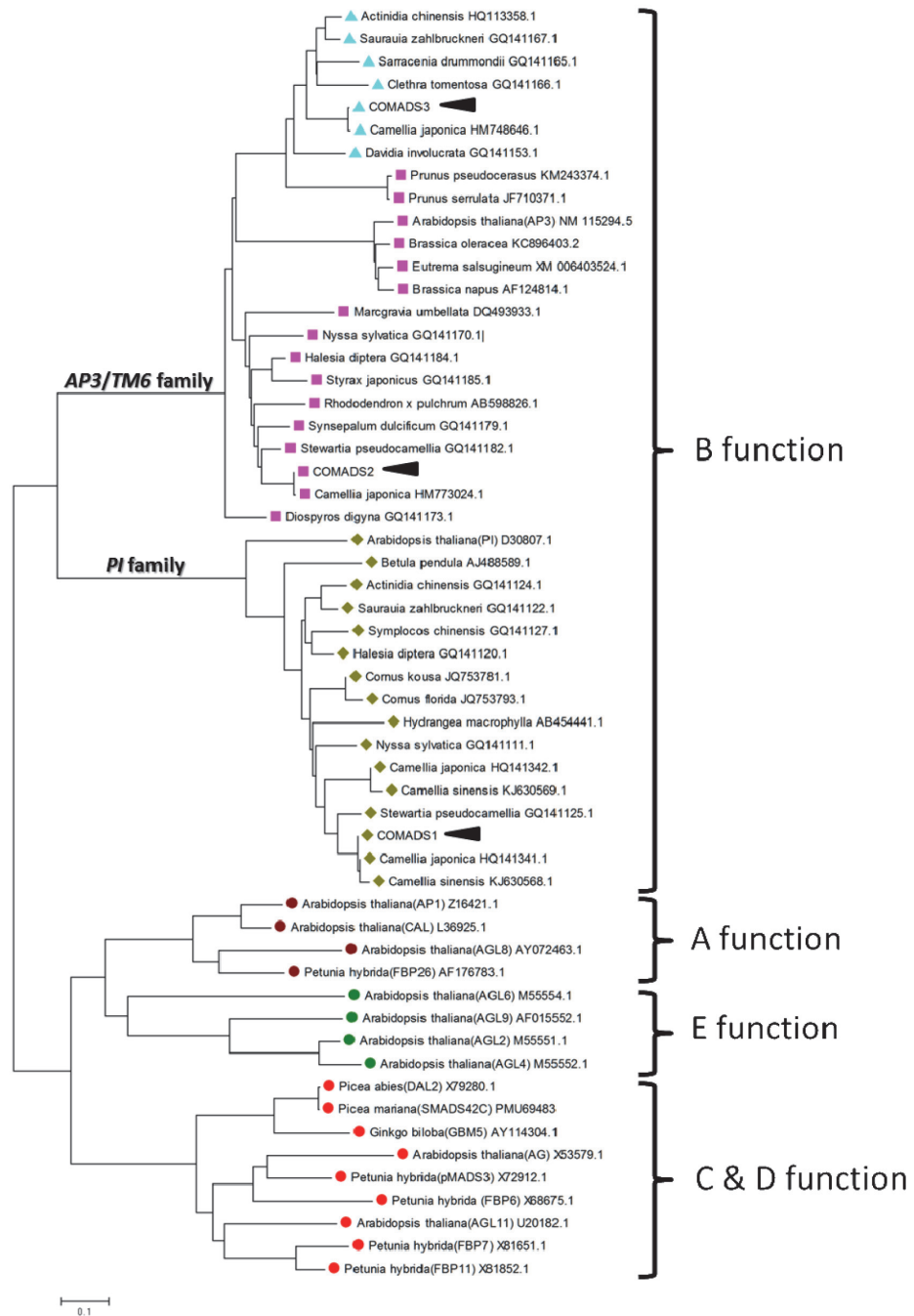
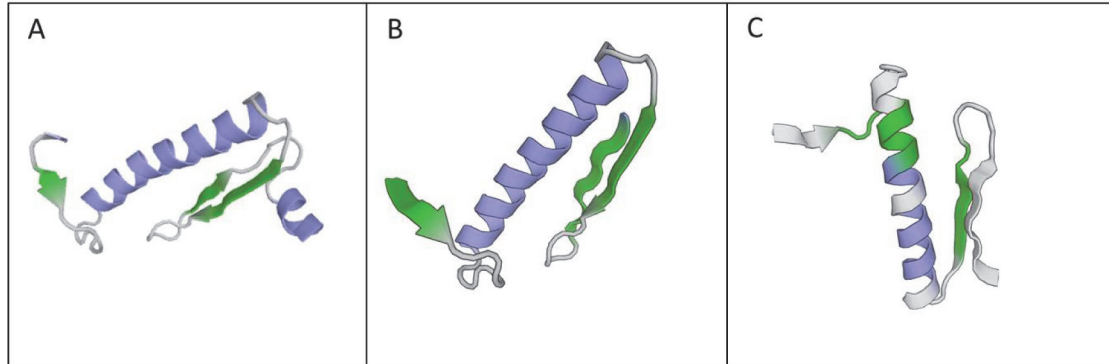


圖1 *COMADS1-3*於開花調控基因中分類的親緣關係樹狀圖。黑色箭頭為*COMADS1-3*的位置。圓形圖示為ACDE類基因；正方形與三角形圖示為*AP3/TM6*次家族、菱形圖示為*PI*次家族。

Fig. 1 Phylogenetic tree of different MADS-box genes in different functional gene families. Arrows are *COMADS1-3*; round shape depicts function ACDE genes; square and triangle depict *AP3/TM6* sub-family; rhombus depicts *PI* sub-family.



從胺基酸的性質分析中(表2)，文獻指出MADS- 山茶屬的分類中，屬於野生原始的「單瓣」，花
圖3 大果油茶COMADS1-3轉譯後之預測的蛋白質結構預測圖，(A為COMADS1、B為COMADS2、C為COMADS3)。

Fig. 3 The predicted protein structures for COMADS1-3. (A: COMADS1, B: COMADS2 and C: COMADS3)

box基因往往扮演轉錄因子有關，並且可以和其他蛋白質或是核酸產生相互作用，以MEF2蛋白質鍵結區為例，就具有許多的帶正電荷的胺基酸，而且會以橋式交互作用 (bridging interaction)相連結 (Wu et al., 2010)。而本研究的三條轉譯胺基酸，僅COMADS1極性胺基酸中帶正電 (鹼性)與帶負電 (酸性)的數量相近；而COMADS2與COMADS3的帶正電胺基酸遠高於帶負電胺基酸，推測就是扮演著具有蛋白質交互作用的功能。而其胺基酸不穩定指數 (Instability index)皆高於40，文獻指出，高於40的胺基酸序列乃被歸類為不穩定蛋白質，因此未來在純化此蛋白質時，可能要注意到其不穩定性。

透過COMADS1-3的蛋白質立體結構預測 (Tan and Richmond, 1998), (Jayathilaka et al., 2012)，發現結構中皆出現MADS基因家族共同具有的一對 β 平板以及 α 螺旋，都會以雙體 (異質或同質)形式和目標的DNA結合 (Jayathilaka et al., 2012)。 α 螺旋在蛋白質骨架上具有穩定的作用，MADS-box胺基酸序列中也存在著隨機捲曲 (random coil)的結構，介於 β 平板以及 α 螺旋之間，往往這些位點決定了此蛋白質的功能，尤其是酵素催化的能力。

B類基因對於花器構造的調控主要扮演著花瓣以及雄蕊的形成，然而，本研究的大果油茶，在

瓣僅有一輪，交錯圍成一圈，有別於觀賞的重瓣品種，據文獻指出，目前推論全世界山茶屬大約有5000多個品種 (包含變種與亞種) (黃松根和吳國伍，1986)，且許多重要觀賞品種多由紅山茶雜交授粉而來，又中國文化食用茶油的歷史可以推到漢武帝的時代，大果油茶在中國算是廣泛大面積種植的林木，兩者在中國經過長時間的存在，不免產生雜交的可能，透過這些原始單瓣花的山茶屬MADS-box中B類基因的研究，未來，更可以研究重瓣的山茶植物，重瓣的產生乃是由於雄蕊瓣化成為花瓣的情形，甚至沒有雄蕊的存在，因此授粉困難。如此，因為B類基因扮演雄蕊形成的調控，在這些重瓣花中的表現，到底是甚麼樣的分子機制於單瓣及重瓣花之間扮演關鍵角色，使得雄蕊退化且成為重瓣花，將是未來十分重要且有意義的研究主題。

針對林木MADS-box基因的研究將分為三大方向：開花時間以及花器發育、加速開花 (acceleration of flowering)及阻礙開花 (prevention of flowering)，也可以透過基因序列配合生物資訊學來建構林木間親緣關係。本篇對於大果油茶MADS基因的研究，可以加深山茶屬植物相關開花研究的能量與基礎，對於山茶屬的林木育種 (觀賞或是結實產油)、開花分子調控，將有極大的發展潛力。

五、引用文獻

1. 黃松根、吳國伍 1986 油茶雜交育種 (一)花粉處理與控制授粉技術 台灣林業 12 (3) : 29-30。
2. Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Report.* 11 (2): 113–116.
3. Coen, E.S., Meyerowitz, E.M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31–37.
4. Jayathilaka, N., Han, A., Gaffney, K.J., Dey, R., Jarusiewicz, J. a., Noridomi, K., Philips, M. a., Lei, X., He, J., Ye, J., Gao, T., Petasis, N. a., Chen, L. 2012. Inhibition of the function of class IIa HDACs by blocking their interaction with MEF2. *Nucleic Acids Res.* 40 (12): 5378–5388.
5. Kramer, E.M., Jaramillo, M.A., Di Stilio, V.S. 2004. Patterns of Gene Duplication and Functional Evolution during the Diversification of the AGAMOUS Subfamily of MADS Box Genes in Angiosperms. *Genetics* 166: 1011–1023.
6. Rijpkema, A.S., Royaert, S., Zethof, J., Weerden, G. Van Der, Gerats, T., Vandenbussche, M. 2006. Analysis of the *Petunia* TM6 MADS Box Gene Reveals Functional Divergence within the DEF / AP3 Lineage. *Gene* 18: 1819–1832.
7. Tan, S., Richmond, T.J. 1998. Crystal structure of the yeast MAT α 2/MCM1/DNA ternary complex. *Nature* 391: 660–666.
8. Vandenbussche, M., Theissen, G., Van de Peer, Y., Gerats, T. 2003. Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Res.* 31 (15): 4401–4409.
9. Wu, Y., Dey, R., Han, A., Jayathilaka, N., Philips, M., Ye, J., Chen, L. 2010. Structure of the MADS-box/MEF2 Domain of MEF2A Bound to DNA and

Its Implication for Myocardin Recruitment. *J. Mol. Biol.* 397 (2): 520–533.