

大豆 *GmRAV* 基因参与 BR 信号传导途径及重组蛋白可溶性分析

杨春亮¹, 孙浩航¹, 张涵朔¹, 赵琳²

(1. 哈尔滨医科大学 基础医学院, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:对大豆东农 42 喷施表油菜素内酯(epiBL), 进行 *GmRAV* 定量, 研究油菜素内酯(BR)对 *GmRAV* 基因表达的影响, 同时对 T5 代 *GmRAVox* 烟草外源添加 epiBL, 研究 *GmRAV* 基因是否也参与 BR 信号从而抑制植物的生长发育。结果表明:BR 抑制 *GmRAV* 基因表达, 并且外源添加 epiBL 并未促进 *GmRAVox* 烟草植株茎延伸, 表明 *GmRAV* 可能为 BR 促进植物的生长发育信号传导途径的负调节因子。同时, 将大豆中已克隆的 *GmRAV* 基因克隆到原核表达载体 pET28a 上, 构建与 His 标签融合的重组蛋白 pET28a-*GmRAV* 质粒, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 对其进行 37℃、28℃ 两种不同温度下 0.5mmol·L⁻¹ IPTG 诱导, 诱导时间为 6 h。SDS-PAGE 电泳结果表明:分子量大约为 40 kDa 的重组蛋白在不同温度下均表达, 低温可以明显增强 *GmRAV* 蛋白的可溶性。

关键词:大豆; BR; *GmRAV* 蛋白; 原核表达; 可溶性分析
中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 06. 0928

Soybean *GmRAV* Gene Involved in BR Signaling Pathway and Analysis on Recombinant Protein Solubility

YANG Chun-liang¹, SUN Hao-hang¹, ZHANG Han-shuo¹, ZHAO Lin²

(1. Basic Medical Science School, Harbin Medical University, Harbin 150081, China; 2. Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding (Genetics) of Chinese Agriculture Ministry, Harbin 150030, China)

Abstract: Soybean DN42 was sprayed by epiBL to study the effect of BR on *GmRAV* expression by real-time quantitative PCR. Meantime, T5 generation *GmRAVox* tobaccos were treated with epiBL to study if *GmRAV* was involved in BR signaling to inhibit the plant growth and development. The results showed that the *GmRAV* mRNA expression level was inhibited by BR, and the exogenous epiBL addition did not promote *GmRAVox* tobacco stem elongation, which indicated that *GmRAV* might be a negative regulator in BR signaling pathway. Furthermore, soybean *GmRAV* was constructed into prokaryotic expression vector pET28a and the recombinant plasmid pET28a-*GmRAV* was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to get the expression protein for further study. The bacterial was induced by 0.5mmol·L⁻¹ IPTG in two different temperature 37℃ and 28℃. The result indicated that an 40 kDa recombinant protein was all expressed with the treatment of different temperature by SDS-PAGE. The lower temperature could increase protein solubility.

Keywords: Soybean; *GmRAV* protein; Prokaryotic expression; Solubility analysis

油菜素内酯(BR)在植物多个发育过程中起着非常重要的作用,参与 BR 生物合成突变体 *det2* 或 BR 信号缺陷突变体 *bri1* 均表现为矮化、叶色暗绿、叶片上卷、育性降低、发育延迟等性状^[1]。外源 BR 可以部分或者完全恢复 BR 合成缺陷型突变体的表型。研究前期发现 *RAV* 转录因子是短日照植物和长日照植物中光周期开花途径的关键抑制因子,它含有 AP2/ERF 与 B3 两种 DNA 结合结构域^[2-3]。过量表达 *GmRAV* 的转基因烟草长、短日照下均表现出延迟开花的特征,并且植株矮化,叶片深绿,发育延迟,结实少^[4-5]。并且也有报道拟南芥该基因同系物 *TEM* 基因同样抑制开花和延迟生长发育^[6-7]。我们推测该基因可能与 BR 生物合成或信号降低有关系,本研究对大豆东农 42 喷施表油菜素内酯,进

行 *GmRAV* 定量,研究 BR 对 *GmRAV* 基因表达的影响,同时对 T5 代 *GmRAVox* 烟草外源添加表油菜素内酯(epiBL),看是否能恢复 *GmRAV* 矮小表型,研究 *GmRAV* 基因是否也参与 BR 信号从而抑制植物的生长发育。同时为更好的在蛋白水平上研究 *GmRAV* 的功能,将其构建到原核表达载体 pET28a 上,对其进行诱导表达和蛋白可溶性分析,为下一步抗体的制备、蛋白间互作及蛋白与特定元件的结合鉴定等试验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种为东农 42,培养于光照培养箱 25℃、250 μmol·m²·s⁻¹ 白光、长日照(16 h 光照/8 h 黑

收稿日期:2016-07-16
基金项目:黑龙江省教育厅面上项目(12541465)。
第一作者简介:杨春亮(1980-),男,硕士,副研究员,主要从事大豆生物技术研究工作。E-mail: 360473662@qq.com。
通讯作者:赵琳(1980-),女,研究员,博导,主要从事大豆生物技术研究。E-mail: zhaolinneau@126.com。

暗) 条件下生长。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 表油菜素内酯 (epiBL) 喷洒种植 15 d 的大豆(第 2 个 3 出复叶完全展开), 在喷施 2, 4, 6 h 后对处理和对照叶片进行取材。烟草 (*Nicotiana tabacum*) 品种为 Havana 425 和本实验室转化得到的过量表达 *GmRAV* 基因的 T5 代株系 *GmRAVox*。原核表达载体 pET28a、大肠杆菌 DH5 α 菌株、大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株均由东北农业大学大豆研究所提供。pMD18-T、各种限制性内切酶和 T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; 蛋白 Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 购自 Thermo Fisher 公司; DNA Marker 购自 Transgen 公司, epiBL 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 RT-PCR 根据 *GmRAV* 序列 (DQ147914) 和 GenBank 上登陆的大豆看家基因 ACTIN 4 (AF049106) 作为内参分别设计引物。引物具体序列如下: *GmRAV*-F: 5'-TATAGACTG-CAAGCGGAGGAGTGG-3'; *GmRAV*-R: 5'-CGGG-TACGGGTAGTTTCAAAAGGT-3'; *GmACTIN*-F: 5'-GTGTCAGCCATACTGTCCCCATTT-3'; *GmACTIN*-R: 5'-GTTTCA-AGCTCTTGCTCGTAATCA-3'。按照 SYBR(R) ExScript™ RT-PCR Kit 的程序进行荧光定量 PCR 反应。epiBL 喷洒处理的大豆和未处理的大豆对照叶片分别提取总 RNA。RNA 反转录合成 cDNA 第一链, 反应体系如下: RNA 样本 (500 ng) 各 2 μL , 5 \times m-MLV 缓冲液 2 μL , dNTP Mix (10 μM) 0.5 μL ; 随机引物六聚体 1 μL , m-MLV 反转录酶 0.25 μL , RNase 抑制剂 0.25 μL , 加去离子水 4 μL 至总体积 10 μL ; 42℃ 温育 15 min, 95℃ 温浴 2 min 灭活反转录酶。PCR 扩增反应体系如下: cDNA 第一链 2 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL , 2 \times SYBR(R) Premix Ex *Taq*™ 10 μL , 50 \times ROX 对照染料 II 0.5 μL , 加去离子水 6.7 μL 至总体积 20 μL 。每个样本进行 3 次重复, 使用 Light Cycler ABI Prism7500 SDS (Applied Biosystems, USA) 荧光定量 PCR 仪进行两步 PCR, PCR 反应条件: 95℃ 10 s; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。PCR 反应后温度从 60℃ 上升到 95℃ 绘制融解曲线以判断扩增产物的正确性, 是否存在引物二聚体。

1.2.2 外源施加 epiBL 对烟草的影响 *GmRAV* 过量表达的烟草 *GmRAVox*^[4] 和对照野生型种子经无菌水冲洗干净后, 70% 乙醇表面消毒 30 s, 用 3% 次氯酸钠消毒 10 min, 无菌水洗净, 无菌滤纸吸干, 分

别接种于 MS 和添加 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ epiBL 培养基上, 30 d 后观察油菜素内酯是否可以恢复植株矮小表型。

1.2.3 *GmRAV* 基因的扩增及融合表达载体 pET28a-*GmRAV* 的构建 根据 *GmRAV* cDNA 序列 (DQ147914) 设计引物, 并在其上下游分别引入酶切位点 *Hind* III 和 *Xba* I, 引物序列如下: *GmRAV*-F: 5'-GCAAGCTTTTATCTGCACTCACTTCACAC-3'; *GmRAV*-R: 5'-GCTCTAGACAAAGCTCCAATTACTTTTAA-3'。经 RT-PCR 扩增后, 将目的带回收与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 并对重组质粒 pMD18T-*GmRAV* 进行 DNA 序列测定。重组质粒 pMD18T-*GmRAV* 用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切, 与之相连的 pET28a 载体同时也用进行双酶切, 电泳鉴定, 并用胶回收试剂盒回收 1 100 bp *GmRAV* 全长片段和 5 369 bp 载体大片段。连接后的重组质粒命名为 pET28a-*GmRAV* 大小约为 6 400 bp, 再通过双酶切鉴定该重组质粒。将该质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经菌落验证后挑取阳性克隆保存菌种备用。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达 将含有重组子的 BL21 (DE3) 菌株及对照 pET28a 菌株分别接种于 5 mL LB 液体培养基中 (含 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡纳霉素), 37℃ 过夜培养, 取出菌液进行二次活化 (1:100 稀释) 至 OD₆₀₀ 为 0.4 ~ 0.8, 加 IPTG 至 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 进行蛋白诱导表达, 37℃ 和 28℃ 下培养 6 h 后, 分别取菌液。将诱导各时间收获的菌液 OD₆₀₀ 均稀释调整至 0.8, 取菌液 1.5 mL 离心收集菌体, ddH₂O 洗涤 2 遍, 加入 50 μL ddH₂O 及 2 \times 上样缓冲液, 65℃ 水浴 10 min 后, 离心, 取上清 10 μL 加入进行 10% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色并脱色, 观察结果。

1.2.5 重组蛋白的可溶性分析 将 37℃ 和 28℃ 诱导后的菌体经液氮多次冻融破碎并离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 对试验数据进行分析 and 作图。

2 结果与分析

2.1 epiBL 抑制大豆叶片中 *GmRAV* 基因的表达 epiBL 外源喷施生长 15 d 的大豆植株, 处理 6 h, 而对照则喷施未加激素的溶剂。由图 1 可知, 大豆喷施 epiBL 2 h 后, epiBL 明显抑制 *GmRAV* 基因在叶片中的表达 (图 1)。

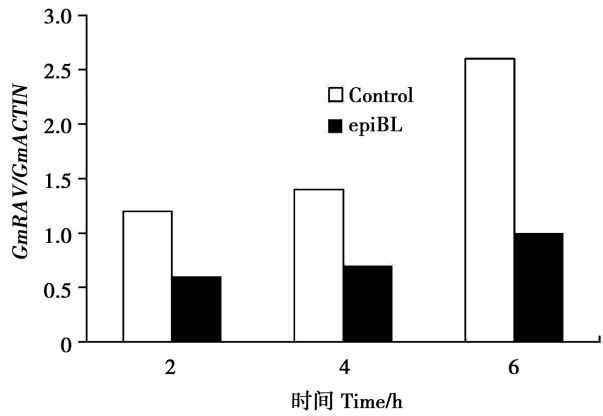


图1 epiBL处理大豆叶片中 *GmRAV* mRNA 表达水平变化

Fig. 1 The expression level of *GmRAV* mRNA in soybean leaves treated by epiBL

2.2 外源施加 epiBL 对过量表达大豆 *GmRAV* 基因烟草的影响

对 T5 代 *GmRAVox* 烟草外源添加 epiBL 发现, epiBL 能够明显促进野生型烟草植株茎伸长, 节间距变大, 但是不能恢复 *GmRAVox* 烟草植株矮小表型, *GmRAVox* 烟草植株对外源添加 epiBL 没有反应 (图 2), 结合 BR 抑制 *GmRAV* 基因表达, 这两点表明 *GmRAV* 可能为 BR 促进植物的生长发育信号传导途径的负调节因子。

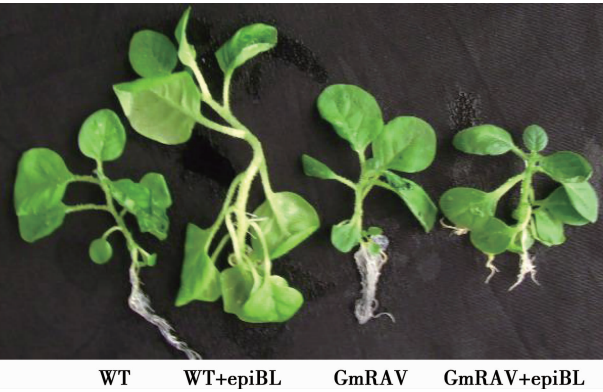


图2 外源施加 epiBL 对过量表达大豆 *GmRAV* 基因烟草的影响

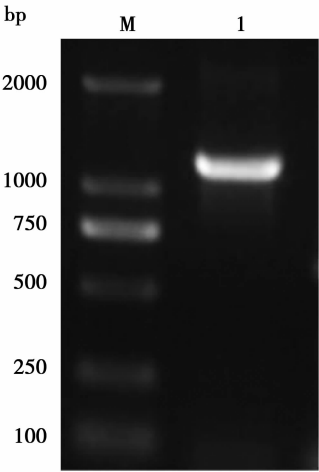
Fig. 2 The effect of exogenous epiBL addition on *GmRAVox* tobaccos

2.3 目的基因编码框的 PCR 扩增

通过 PCR 方法扩增到 *GmRAV* 的编码框全长, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见一条约 1.1 kb 的 DNA 片段, 该片段与预期 PCR 产物长度一致 (图 3)。

2.4 原核表达质粒的构建及重组子的鉴定

经 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切并纯化后的 pMD18T-*GmRAV* 和 pET28a 质粒, 在 T4 DNA 连接酶的作用下连接, 构建重组子 pET28a-*GmRAV*, 经双



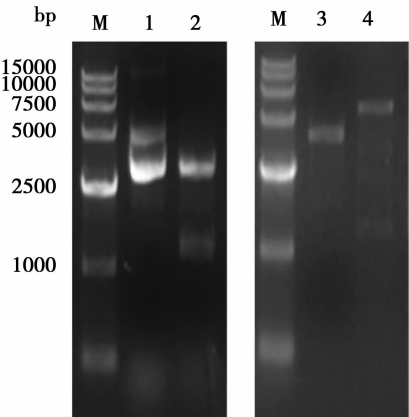
M: DNA Marker 2 000; 1: *GmRAV* 全长基因的 PCR 产物。

M: DNA Marker 2 000; 1: The PCR product of full-length *GmRAV*.

图3 PCR 扩增产物 *GmRAV* 的凝胶电泳

Fig. 3 Electrophoresis of the PCR product of full-length *GmRAV*

酶切得到 1 100 bp *GmRAV* 全长片段和 5 369 bp 载体大片段。测序结果显示 *GmRAV* 的开放阅读框与 pET28a 的蛋白阅读框完全吻合, 没有移码。检测结果表明已经成功构建出 *GmRAV* 的原核表达载体 (图 4)。



M: Marker 15000; 1: pMD18T-*GmRAV* 质粒; 2: pMD18T-*GmRAV* 质粒双酶切; 3: pET28a-*GmRAV* 质粒; 4: pET28a-*GmRAV* 质粒双酶切。

M: Marker 15 000; 1: pMD18T-*GmRAV* plasmid; 2: double digestion of pMD18T-*GmRAV* plasmid; 3: pET28a-*GmRAV* plasmid; 4: double digestion of pET28a-*GmRAV*.

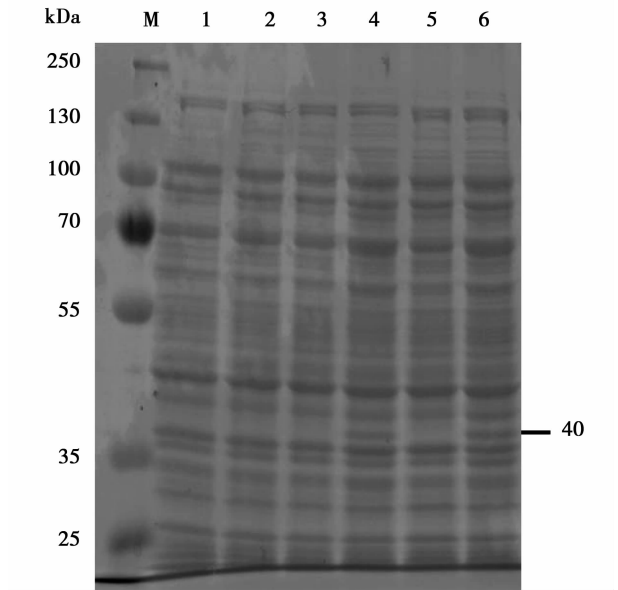
图4 pMD18T-*GmRAV* 及 pET28a-*GmRAV* 重组质粒和双酶切分析

Fig. 4 Recombinant plasmid of pMD18T-*GmRAV* and pET28a-*GmRAV* and its double enzyme digestion

2.5 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

具有重组质粒 pET28a-*GmRAV* 的 BL21 加入 0.5 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 后, 于 37℃ 和 28℃ 分别诱导

6 h,重组蛋白表达情况如图 5 所示。在不同诱导条件下,与转入空载体 pET28a 的对照菌株相比,含有 pET28a-*GmRAV* 重组质粒的宿主菌株沉淀部分有 1 个分子量约为 40 kDa 的条带,这与 *GmRAV* 重组蛋白理论值 38 kDa(His 标签蛋白分子量 0.6 kDa) 相吻合,而空载体的对照菌株则没有该蛋白条带(图 5)。表明 *GmRAV* 基因在诱导条件下得到了表达。



M:蛋白 Marker;1:pET28a 37℃ 0 h;2:pET28a-*GmRAV* 37℃ 0 h;3:pET28a 37℃ 诱导 6 h;4:pET28a-*GmRAV* 37℃ 诱导 6 h;5:pET28a 28℃ 诱导 6 h;6:pET28a-*GmRAV* 28℃ 诱导 6 h。

M: Protein Marker; 1: pET28a 37℃ 0 h; 2: pET28a-*GmRAV* 37℃ 0 h; 3: pET28a 37℃ induction 6 h; 4: pET28a-*GmRAV* 37℃ induction 6 h; 5: pET28a 28℃ induction 6 h; 6: pET28a-*GmRAV* 28℃ induction 6 h.

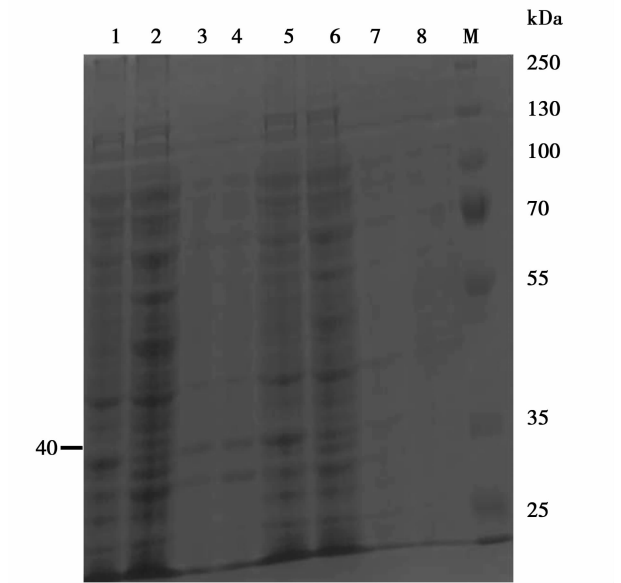
图 5 *GmRAV* 重组蛋白在不同温度下诱导表达分析
Fig. 5 The inductive expression analysis of *GmRAV* recombinant protein in different temperature

2. 6 重组蛋白的可溶性分析

将诱导后的菌体经液氮多次冻融破碎并离心,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。结果表明,与菌体在 37℃ 温度诱导下相比,低温 28℃ 可以明显增强 *GmRAV* 蛋白的可溶性,上清中可溶性蛋白增多(图 6)。

3 结论与讨论

油菜素内酯(BR)在植物生长过程中起着重要作用,促进细胞延伸和增殖,种子萌发,花粉管生长,木质部分化和衰老^[6-7]。BR 生物合成减少或信号缺陷的突变体植株表现为矮化、叶色暗绿、发育延迟等性状^[8]。RAV 转录因子是植物中重要的开花及生长抑制因子,过量表达 *GmRAV* 的转基因烟草长、短日照下均表现出延迟开花的特征,并且植株



M: 蛋白 Marker; 1: pET28a 37℃ 上清; 2: pET28a-*GmRAV* 37℃ 上清; 3: pET28a 37℃ 沉淀; 4: pET28a-*GmRAV* 37℃ 沉淀; 5: pET28a 28℃ 上清; 6: pET28a-*GmRAV* 28℃ 上清; 7: pET28a 28℃ 沉淀; 8: pET28a-*GmRAV* 28℃ 沉淀。

M: Protein Marker; 1: pET28a 37℃ supernant; 2: pET28a-*GmRAV* 37℃ supernant; 3: pET28a 37℃ pellet; 4: pET28a-*GmRAV* 37℃ pellet; 5: pET28a 28℃ supernant; 6: pET28a-*GmRAV* 28℃ supernant; 7: pET28a 28℃ pellet; 8: pET28a-*GmRAV* 28℃ pellet.

图 6 *GmRAV* 重组蛋白在不同温度下诱导表达可溶性分析

Fig. 6 The soluble analysis on the induction of *GmRAV* recombinant protein in different temperature

矮化,叶片深绿,发育延迟,结实少。表现出与 BR 生物合成减少或信号缺陷的突变体相似的表型。我们推测该基因可能与 BR 生物合成或信号降低有关系,对大豆东农 42 喷施表油菜素内酯,进行定量 PCR,发现其抑制 *GmRAV* 基因表达,并且外源添加 epiBL 并未促进 *GmRAVox* 烟草植株茎延伸,表明 *GmRAV* 可能为 BR 促进植物的生长发育信号传导途径的负调节因子,从而抑制植物生长发育。

另一方面,ChIP 试验表明 RAV 蛋白通过与 FT、TSF 启动子中特定元件的结合来调控下游基因的表达^[9-10],发挥其生物功能。目前多采用体外凝胶阻滞试验 EMSA 来鉴定蛋白与元件的作用情况。最简单有效的方法就是通过原核表达系统在大肠杆菌中大量表达目的重组可溶性蛋白,再通过重组蛋白上的表达序列标签对目的蛋白进行纯化。选择合适的表达载体和表达菌株是外源基因高效表达可溶性蛋白的关键。低温导致细胞蛋白浓度降低,有利于增强蛋白稳定性和正确折叠,提高了可溶性诱导蛋白的表达水平,然而低温也抑制了细菌生长导 (下转第 957 页)

of quality supervision, inspection and test center. The determination of water-soluble soybean protein; NY/T 1205-2006[S]. Beijing: Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, 2006; 12.

[23] 全国粮油标准化技术委员会. 油料含油量测定: GB/T 14488. 1-2008[S]. 北京: 国家粮食局, 1993; 6. (The national standardization technical committee of grain and oil. Fuel oil content determination; GB/T 14488. 1-2008 [S]. Beijing: State Grain Administration, 1993;6.)

[24] 刘香英, 康立宁, 田志刚, 等. 东北大豆品种贮藏蛋白 7S 和 11S 组分及其亚基相对含量分析[J]. 大豆科学, 2009, 28 (6): 985-989. (Liu X Y, Kang L N, Tian Z G, et al. 7S and 11S globulin and subunit content of soybean in Northeast China [J]. Soybean Science, 2009, 28(6): 985-989.)

[25] Cai T, Chang K C. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(2): 720-727.

[26] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准, 食品中水分的测定: GB/T5009. 3-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010; 3. (The Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standard, Determination of water content in food; GB/T5009. 3-2010 [S]. Beijing: China Standards Press, 2010; 3.

[27] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准, 食品中蛋白质的测定: GB 5009. 5-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010; 6. (The Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standard, Determination of protein content in food; GB 5009. 5-2010 [S]. Beijing: China Standards Press, 2010; 6.

[28] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准, 食品中脂肪的测定: GB/T 5009. 6-2003[S]. 北京: 中国国家标准管理委员会, 2003;8. (The Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standard, Determination of fat content in food; GB/T 5009. 6-2003 [S]. Beijing: China's national standard management committee, 2003;8.

[29] 付佳. 矿物成分对干豆腐品质的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2013. (Fu Jia. Effect of mineral elements on the quality of dried bean curd[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2013.)

[30] 程学勋, 林洁文, 黄敏, 等. 质构仪及其在食品研究中的应用简介[J]. 广东化工, 2012, 39(9): 164-165, 146. (Cheng X X, Lin J W, Huang M, et al. The application of texture analyzer and its application in food research[J]. Guangdong Chemical Industry, 2012, 39(9): 164-165, 146.)

(上接第 931 页)

致了生物量减少,所以随着温度降低,要延长诱导时间,获得更多的可溶性蛋白^[11]。本研究对 RAV 蛋白的诱导也证实了低温诱导可以提高可溶性诱导蛋白的表达水平,通过原核表达获得具有生物活性的大豆 GmRAV 蛋白,为研究其大豆蛋白的结构和功能奠定了基础。

参考文献

[1] Bishop G J, Koncz C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling[J]. Plant Cell, 2002, 14: S97-110.

[2] Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 470-478.

[3] Sohn K H, Lee S C, Jung H W, et al. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance [J]. Plant Molecular Biology, 2006, 61: 897-915.

[4] Zhao L, Luo Q, Yang C, et al. A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean[J]. Planta, 2008, 227: 1389-1399.

[5] Zhao L, Hao D Q, Chen L M, et al. Roles for a soybean RAV - like orthology in meristem regulation, shoot regeneration and photoperiodicity inferred from transgenic plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 (8): 3257-3270.

[6] Bishop G J, Yokota T. Plants steroid hormones, brassinosteroids: Current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response[J]. Plant Cell Physiology, 2001, 42: 114-120.

[7] Hong, Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, et al. A rice brassinosteroid-deficient mutant, ebisu dwarf (d2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450[J]. Plant Cell, 2003, 15: 2900-2910.

[8] Nomura T, Sato T, Bishop G J, et al. Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6- deoxocasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis[J]. Phytochemistry, 2001, 57: 171-178.

[9] Castillejo C, Pelaz S. The balance between *CONSTANS* and *TEMPRANILLO* activities determines *FT* expression to trigger flowering [J]. Current Biology, 2008, 18: 1338- 1343.

[10] Esther Marín-González, Luis Matías-Hernández, Andrea E, et al. *SHORT VEGETATIVE PHASE* up-regulates *TEMPRANILLO2* floral repressor at low ambient temperatures[J]. Plant Physiology, 2015, 169: 1214-1224.

[11] Hans P S, Mortensen K K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4: 1.