



棉花生长素结合蛋白 ABP1 基因 cDNA 的克隆及序列分析

孙建波, 崔百明, 刘德兵, 彭明*

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 热带生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘要:生长素结合蛋白 (ABP1) 在植物细胞发育中起着重要作用。在 ABP1 蛋白的保守区设计引物, 利用 RT-PCR 和 RACE 方法, 首次克隆了棉花 ABP1 基因 cDNA 的 3' 和 5' 末端。测序及生物信息学分析表明, 该基因 cDNA 全长 824 bp 编码 190 个氨基酸, 它所编码的氨基酸序列包含植物 ABP1 蛋白家族的所有特征, 被命名为 *GhABP1*。棉花 ABP1 所包含的 Box A, Box B 和 Box C 区在植物 ABP1 家族中是高度保守的。它的 C 末端氨基酸残基 WDE 在蛋白质的折叠及 ABP1 在质膜上的功能活性方面都具有重要的作用。棉花 ABP1 的 C 末端带有 KDEL 残基区, 这个 KDEL 区表明它被定位在内质网上。

用 Clustal W 软件进行多重比对分析表明, 棉花 ABP1 与拟南芥、向日葵、油菜、辣椒、甘菊的氨基酸序列同源性分别为 72%, 72%, 71%, 70% 和 70%。系统进化分析表明, 棉花在进化上与萝卜、拟南芥和油菜聚为一类。序列分析表明此基因为生长素结合蛋白基因家族的新成员。

关键词:棉花; ABP1; 基因克隆; 基因分析

中图分类号: S562.035 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2007)04-0243-05

Cloning and Analysis of Auxin-binding Protein 1 cDNA Genes in *Gossypium hirsutum*

SUN Jian-bo, CUI Bai-ming, LIU De-bing, PENG Ming*

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Auxin binding protein 1 (ABP1) plays an important role in plant cell development. Primers were designed coding for conservative amino acid regions in ABP1 protein family. Using RT-PCR and RACE methods, 5' up stream and 3' down stream cDNA sequence of ABP1 were isolated from *Gossypium hirsutum* for the first time. Information analysis indicated that the full length cDNA is 824 bp and encodes 190 amino protein. The encoding protein has all of the typical domains of ABP1's family. It was named *GhABP1*. The ABP1 protein's three residue domains, labelled box A, B and C, are highly conserved among all higher plant ABP1s. The Box A domain is an important auxin binding site. The WDE acidic residues of the C-terminus were shown to play a critical role in protein folding and functional activity of ABP1 at the plasma membrane. C terminus carries the KDEL motif. The KDEL sequence identifies ABP1 as a protein targeted to and retained in the lumen of the ER. Alignment analysis of the amino sequence deduced from the ABP1 and the sequence of other plants retrieved from GenBank were carried out by Clustal W program, which showed that the identities of the deduced ami-

no acid with *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Sinapis arvensis* C. *annuum*, *Matricaria recutita* are 72%, 72%, 71%, 70% and 70%, respectively. Phylogenetic analysis showed that the amino acid sequence of ABP1 in *Gossypium hirsutum* first gathered with that in *Raphanus sativus*, *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis arvensis*. Sequence analysis indicates that this gene is a new member of the auxin-binding protein 1 gene family.

Key words: *Gossypium hirsutum*; ABP1; gene cloning; gene characterization

生长素结合蛋白 ABP1 在植物细胞的生长发育中起着重要作用。在玉米细胞中组成型表达 ABP1, 导致了玉米细胞体积变大^[1]。研究发现, ABP1 对细胞的作用和生长素浓度密切相关。在烟草中过表达拟南芥 ABP1, 在低浓度生长素条件下, ABP1 会促进细胞伸长。当生长素浓度升高时, 它会促进细胞分裂^[2]。ABP1 在幼嫩的分生组织中含量较高, 例如在芽顶、根尖和幼叶中^[3]。这些器官也是响应生长素引起的细胞分裂、延长和分化的部位。这些结果说明 ABP1 表达水平和细胞对生长素的响应之间存在紧密的联系^[4]。免疫化学定位研究也表明 ABP1 和 IAA 有相类似的分布和活性变化。ABP1 介导了生长素诱导的细胞反应。为深入理解细胞发育的机理, 进而利用 ABP1 改良棉纤维品质, 本实验克隆了棉花 ABP1 全长基因并进行了序列分析。

1 材料和方法

1.1 植物材料

棉花材料为新陆中 5 号, 种植于热带生物技术研究所实验地(海口)。

1.2 棉花总 RNA 的制备及 cDNA 合成

取棉花幼嫩叶片, 立即投放于随身所带的液氮瓶中。带回实验室后根据蒋建雄的方法提取棉花总 RNA^[5]。cDNA 合成反应按照生工生物公司的 Reverse Transcript 反转录试剂盒说明进行。

1.3 3'末端 PCR 引物的设计及扩增

根据几种典型植物 ABP1 氨基酸序列的保守区设计一条 5'上游简并引物, 用大连宝生物公司的 takara 3'-Full Race 试剂盒提供的下游引物扩增 ABP1 基因的 3'末端。

简并引物序列为 5'-ACACCNATHCAY-AGRCACTC-3'。其中 R 为(A+G), Y 为(C+T), H 为(A+C+T), N 为(A+C+G+T)。

以 cDNA 为模版进行 PCR 扩增, 所用 Taq 酶为 takara Taq 酶。反应程序为 94℃ 5 min,

94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 1 min。30 个循环。

1.4 5'末端 PCR 引物的设计及扩增

以 cDNA 为模板, 根据 3'末端测序结果, 设计两对引物, 用大连宝生物公司的 takara 5'-Full Race 试剂盒扩增 5'端。引物序列为:

A1: 5'-GAGATATAGAGTGCCACTGC-3'

S1: 5'-AAGTACCCTGGAAAACCGGAG-3'

A2: 5'-ACAAGAGTGCCTATGGATCGG-3'

S2: 5'-GTCAATGATGTTCCACCAGGTC-3'

先用 A1, S1 引物进行扩增, 把扩增后的产物稀释 500 倍, 再用 A2, S2 引物扩增。反应程序为: 第一轮 PCR 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 第二轮 PCR 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环。

1.5 PCR 产物的克隆

PCR 产物经 0.1% 琼脂糖凝胶电泳, 用生工生物公司的胶回收试剂盒回收目的 DNA, 连接到大连宝生物公司的 T-simple 载体上, 鉴定后送生工生物公司测序。

2 结果与分析

2.1 测序结果

图 1a 为 3'端 PCR 扩增电泳图, 测序结果为 575 bp。图 1b 为 5'端 PCR 扩增电泳图, 测序结果为 249 bp。

2.2 用 Vceter NT I 软件进行 3'端及 5'端的序列拼接及结果分析

将 ABP1 基因 3'端和 5'端用 Vceter NT I 软件进行拼接, 得到一条 824 bp 的序列。该序列包含一个完整的开放阅读框, 编码 190 个氨基酸(图 2)。起始密码子 ATG 上游有同框终止密码子, 阅读框的终止密码子下游有 polyA, 符合有效翻译的基因全长 cDNA 特征, 因此为完整的棉花 ABP1 基因 cDNA。该基因命名为 GhABP1。将棉花 ABP1 和几种典型植物 ABP1 用 Vceter NT I 软件进行比对分析, 发现棉花 ABP1 包含 ABP1 蛋白家族的所有特征: 它有 BoxA, BoxB 和 BoxC

区,以及 ABP1 蛋白末端特征区,证明克隆获得的基因为 ABP1 基因家族。用 Vceter NT I 软件推测出的棉花 ABP1 氨基酸序列如图 2 所示。

BoxA 区被认为是主要的生长素结合位点。C 末端特征区的 KDEL 为内质网定位信号。

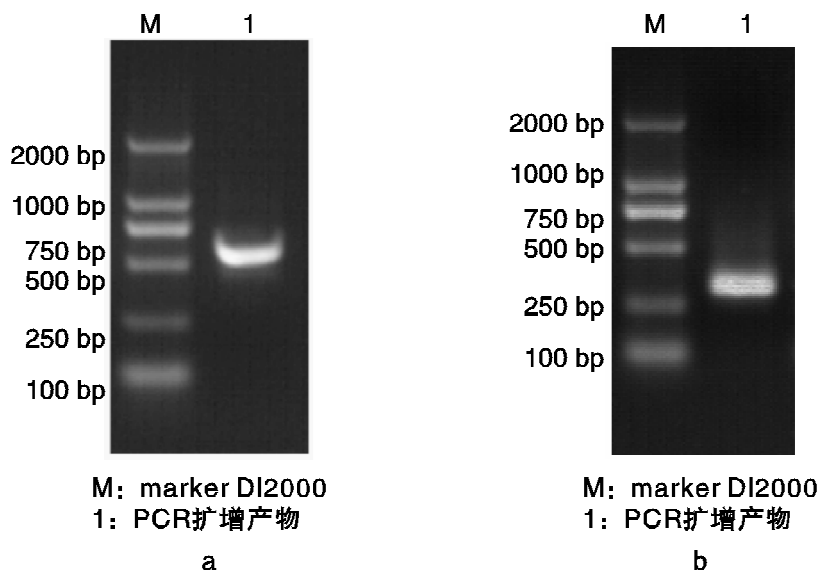


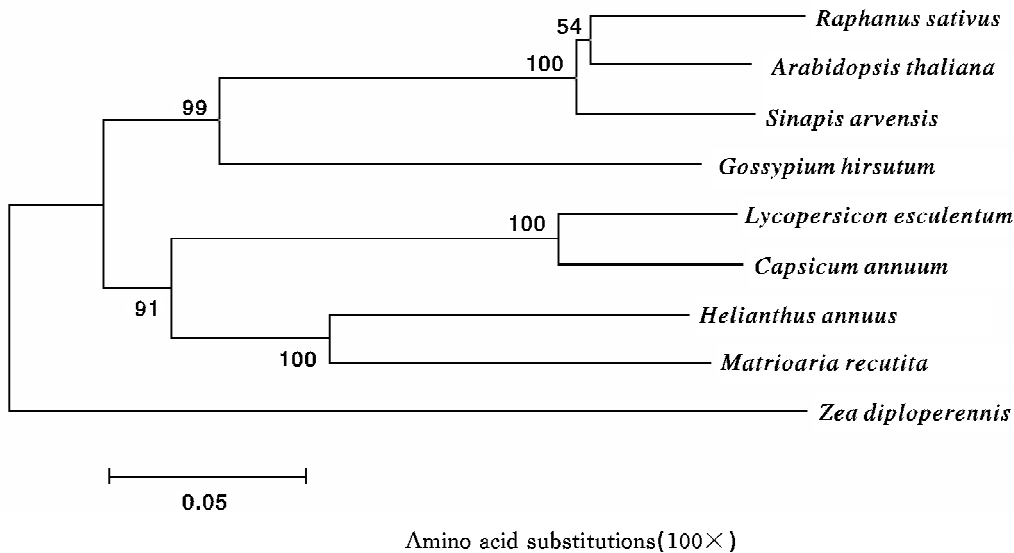
图 1 PCR 产物凝胶电泳分析
Fig. 1 PCR product in gel electrophoresis

CAACACTGAAAGATGACTGGACCTTGCTTCATTTTCTTCTTCTCTTAACTTGCTTCCATTCTTTCGAACTCTCGAAGCTTCT
M T G P C F I F F F L L L N L L P F F R T L E A S
CACTGCTCCATCAAAGGGTTACCTCTGGTGAGGAACATTGCTGATCTTCCACAGGATAATTATGGAAGAGGAGGTTTATCCCATATA
H C S I K G L P L V R N I A D L P Q D N Y G R G G L S H I
ACTGTTGCTGGTTCTCTCTTGCATGGGTTGAAAGAAGTTGAGGTTTGGCTTCAAACATTTGCACCAGGATCGCGCACGCCGATCCAT
T V A G S L L H G L K E V E V W L Q T F A P G S R T P I H
AGGCACTCTTGTGAAGAAGTTTTGTGTTCTCAAGGCAGTGGCACTCTATATCTCGCCTCGAGTTCTAATAAGTACCCTGGAAAA
R H S C E E V F V V L K G S G T L Y L A S S S N K Y P G K
CCGGAGGAGCACTTTATATTTTGAATAGCAGCTTCATATCCCTGTCAATGATGTTACCAGGTCTGGAATACAAATGAACATGAG
P E E H F I F S N S T L H I P V N D V H Q V W N T N E H E
GATTTGCAAATGCTTGTGATAATATCTCGGCCGCTATCAAAGTGTTCATATATGAAGATTGGTTGATGCCTCACACTGCAGCTAAG
D L Q M L V I I S R P P I K V F I Y E D W L M P H T A A K
TTGAAGTTTCCCTACTATTGGGATGAGCAGTGCTTCAAGTACCTCAGAAAGATGAGCTTTAATTTTTGAAGACACGCCCTTCACA
L K F P Y Y W D E Q C F Q V P Q K D E L
TGCTACTATATGAGCACTGTAATGGGGCCATTCCCATTTTACTGCTCAGATTACTTTACAAATTACATAAAGATTACAACATCTTAG
CTTAGTTTGTATATTTTCCCCTCATTTGAAGTCTGAATCCATTTTCTATTTTCATTTTATTGACACTTCCAAAATCAATTGATGG
TTCCCTTGAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 2 棉花 ABP1 全长 cDNA 基因序列及所推测出的编码蛋白序列
Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of GhABP1

将该基因编码的氨基酸序列在 NCBI 服务器上用 BLAST 软件进行同源性搜索,发现该氨基酸序列和植物 ABP1 具有较高的同源性。选取几种典型植物的 ABP1,用 Clustal W 软件进行蛋白质序列的多重比对分析,发现同源性较高的依次为拟南芥、向日葵、油菜、辣椒、甘菊、番茄、萝卜、玉米,一致性分别为 72%,72%,71%,70%,70%,68%,66%,56%。

用 MEGA 软件将棉花 ABP1 与拟南芥、油菜、萝卜、辣椒、番茄、向日葵、甘菊、玉米等植物 ABP1 进行系统进化分析,结果发现棉花 ABP1 在进化上与萝卜、拟南芥、油菜等在进化上最为接近,与玉米的进化关系最远。这可能与棉花、萝卜、拟南芥及油菜同为双子叶植物,而玉米为单子叶植物有关。进化关系如图 3 所示。



The horizontal branch length are drawn to scale and represent the numbers of amino substitute per site

图 3 部分植物 ABP1 氨基酸序列系统进化分析图

Fig. 3 Phylogenetic tree of ABP1 proteins of some plants

3 结论与讨论

3.1 实验结论

反转录反应中,由于 AMV 反转录酶有较高的稳定性而被采用,并且在 cDNA 第一链合成反应中适当地升高到 50℃,有效地防止了 RNA 的二级结构对反转录的影响。3' Race 实验中发现,简并引物设计的好坏是 Race 实验成功的关键。简并引物的设计中,应尽量选择氨基酸保守区并结合核苷酸序列,尽可能降低简并度,引物设计时较高的退火温度有利于特异片段的扩增。在实验中采用降落 PCR 和热启动能有效地提高 PCR 产物特异性。

3.2 讨论

生长素结合蛋白 ABP1 最初是在研究生长素受体的过程中发现的,1972 年,在玉米的黄花胚芽鞘膜中首次检测到了 ABP1 的生长素结合活性^[6]。接着,很多研究者对 ABP1 进行了深入研究,包括和生长素结合的有活性的特异配基及

亲和力的大小^[7-8]等。1985 年,首次从玉米中纯化出了 ABP1^[9]。随后在一些单子叶和双子叶植物中相继鉴定出了 ABP1,并对它们的体内分布、生理功能进行了研究^[10]。

在细胞核、细胞质膜、细胞内膜系统中都发现有 ABP1 存在。内质网是 ABP1 的主要存在系统。在不同的植物生长部位,ABP1 的分布和含量也不同^[3-4]。

所有高等植物的 ABP1 中,有三个区域是高度保守的,这些序列一般有 13~20 个氨基酸残基,分别命名为 BoxA,BoxB 和 BoxC。其中 BoxA 被认为是主要的生长素结合位点。随着新的 ABP1 序列的不断被测定,人们发现,这段序列有超过 15 个保守的氨基酸残基。ABP1 的另一个高度保守区 BoxC 区和另一个生长素结合位点区有重叠,这个位点能结合 IAA。因此,BoxC 区可能也和生长素结合位点有关。三态残基 WDE,被认为无论是在质膜 ABP1 的活性上,还是在蛋白质的折叠上,都起着关键的作用^[11-12]。

虽然 ABP1 是否作为生长素受体还存在很大争议,然而,ABP1 和生长素相互作用,在植物的生长发育中起着重要作用。研究认为生长素-ABP1 复合物可能结合在质膜上的一个特殊的结合位点,刺激了离子的流动,导致了细胞壁的松弛和延伸^[13-14]。通过研究 ABP1 和生长素在植物体内的分布关系认为 ABP1 的表达水平可能和细胞对生长素信号的感知相关^[3]。

对一些典型植物 ABP1 氨基酸序列的同源性比较发现,这些 ABP1 蛋白家族中,在特征区它们都具有极高的同源性,但是除了特征区外,序列其它部位的同源性较低,说明它们在生理功能上可能还有一定的差异。因此,克隆不同植物的 ABP1 并进行研究,对深入理解 ABP1 具有重要意义。

生长素(IAA)促进棉纤维伸长,但是转 *iaaM* 和 *iaaH* 基因棉花中,虽然棉纤维中 IAA 含量提高了 2~8 倍,然而棉纤维的长度并没有得到提高^[13]。因此,棉纤维伸长的分子生理机制还很不清楚。植物 ABP1 介导了生长素引起的细胞伸长,棉花纤维是由单一细胞发育而来,棉纤维的发育也和生长素的作用密切相关。因此,研究 ABP1 在植物细胞发育中的作用机理,ABP1 和生长素之间以及 ABP1 和生长素信号转导途径中调控基因之间的相互关系,可以更好地理解植物细胞的伸长及发育。

本实验首次克隆了棉花 ABP1 全长基因并进行了初步分析,为后续在棉花中研究 ABP1 工作奠定了基础。

参考文献:

[1] JONES A M, Im K H, Savka M A, et al. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1 [J]. *Science*, 1998, 282: 1114-1117.
[2] CHEN J G, Shimomura S, Folke S, et al. The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco

leaf cells[J]. *The Plant Journal*, 2001, 28(6): 607-617.

- [3] CLEMENT T, Denise M, Michel W, et al. Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 Gene[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52: 1025-1036.
[4] HOU Z X, Huang W D. Immunohistochemical localization of IAA and ABP1 in strawberry shoot apices during floral induction [J]. *Planta*, 2005, 222(4): 678-687.
[5] 蒋建雄,张天真. 利用 CTAB/酚法提取棉花组织总 RNA[J]. *棉花学报*, 2003, 15(3): 166-167.
[6] HERTEL R, Thomson K, Russo V E A. *in vitro* auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptile[J]. *Planta*, 1972, 107: 325-340.
[7] RAY P M, Dohrman U, Hertel R. Characterization of naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile tissue [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 357-364.
[8] BATT S, Wilkins M B, Venis M A. Auxin binding to corn coleoptile membranes; kinetics and specificity [J]. *Planta*, 1976, 130: 7-13.
[9] LOBLER M, Klambt D. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.): purification by immunological [J]. *Biol Chem*, 1985, 260: 9848-9853.
[10] RICHARD M N, Karine M D, Catherine P R. A short history of auxin-binding proteins [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 49: 339-348.
[11] WARWICKER J. Modelling of auxin-binding protein 1 suggests that its C-terminus and auxin could compete for a binding site that incorporates a metal ion and tryptophan residue 44 [J]. *Planta*, 2001, 212: 343-347.
[12] KARINE D, Eugenie C D, Nathalie L, et al. Conformational dynamics underlie the activity of the auxin binding protein, Nt-ABP1 [J]. *Biol Chem*, 2001, 276: 34517-34523.
[13] 杜雄明,潘家驹,汪若海. 棉纤维细胞分化和发育 [J]. *棉花学报*, 2000, 12(4): 212-217. ●