

棉纤维发育相关基因 *GhCHS*、*GhCPI* 的克隆与鉴定

张燕洁, 朱一超, 郭旺珍, 张天真*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/棉花研究所, 江苏 南京 210095)

摘要: 以陆地棉李氏超短纤维突变体 $Li_1 li_1$ 自交后代野生型 $li_1 li_1$ 和超短纤维突变体 $Li_1 li_1$ 开花后 4 d 的胚珠纤维的复合体的 RNA 为探针, 通过基因芯片的方法筛选优质材料 7235 棉纤维伸长、次生壁加厚不同发育时期混合 cDNA 文库, 分离出两个在两种材料中差异表达的 cDNA 序列, 分别命名为 *GhCHS* (GenBank 登录号: EF643506) 和 *GhCPI* (GenBank 登录号: EF643507)。RT-PCR 分析表明: 开花后 4 d, *GhCHS*, *GhCPI* 在陆地棉李氏野生型 $li_1 li_1$ 纤维中的表达量低于超短纤维突变体 $Li_1 li_1$ 。Southern 杂交结果表明两个基因在陆地棉基因组中都存在两个拷贝。

关键词: 陆地棉; 基因芯片; 查尔酮合成酶; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂

中图分类号: S562:Q785 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2009)01-0010-07

Cloning and Characterization of *GhCHS* and *GhCPI* Which Related with Fiber Development in *Gossypium hirsutum* L.

ZHANG Yan-jie, ZHU Yi-chao, GUO Wang-zhen, ZHANG Tian-zhen*

(National Key Laboratory of Corp Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To isolate genes preferentially expressed during fiber elongation period, genechips were performed with wild line $li_1 li_1$ and the Ligon lintless mutant line $Li_1 li_1$ segregated from the self-crossing progenies of the Ligon lintless mutant line $Li_1 li_1$. Two differently expressed cDNA clones were separated from cotton fiber library of elite quality material 7235 during fiber elongation and the second wall synthesis by genechips with probes of the 4 DPA ovule-fiber compound from the wild line $li_1 li_1$ and the Ligon lintless mutant line $Li_1 li_1$. RT-PCR analysis indicated the expression quantity of two genes -*GhCHS* (GenBank accession: EF643506) and *GhCPI* (GenBank accession: EF643507) were less in the wild line $li_1 li_1$ than that in the Ligon lintless mutant line $Li_1 li_1$ at 4 DPA. The result of Southern blotting indicated that there are two copies of both genes in the genome of upland cotton.

Key words: upland cotton; genechips; chalcone synthase; cysteine proteinase inhibitor

棉纤维是胚珠外层珠被上单个表皮细胞分化产生的, 其发育受多种植物激素的诱导和控制。棉纤维发育一般经历 45~50 d, 由四个连续而重叠的发育过程组成: 起始期、伸长期(初生壁形成)、次生壁形成期和成熟期^[1]。一根棉纤维就代表一个细胞, 一根棉纤维细胞从开花当天(0

DPA, day post anthesis)到 16 DPA, 可由 10~15 μm 伸长到 2.5~3.0 cm, 无细胞分裂且形成高纤维素含量, 这使得棉花纤维成为研究植物细胞伸长和细胞壁合成的理想材料^[2]。据估计, 棉花纤维发育过程中有上千特异基因表达, 但到目前为止, 仅有少数基因被分离鉴定^[2]。

收稿日期: 2007-06-08

作者简介: 张燕洁(1982-), 女, 硕士; * 通讯作者, 分子植物育种, cotton@njau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30471104; 30270806), 国家 973 项目(2002CB111303), 教育部新世纪优秀人才项目(NCET-04-0500), 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0432)

选用陆地棉李氏超短纤维突变体 Li_1li_1 自交分离后代正常纤维野生型 li_1li_1 和李氏超短纤维突变体 Li_1li_1 为材料,利用基因芯片技术,旨在研究棉花纤维伸长发育阶段的差异表达情况,并从中分离棉纤维发育相关基因,为棉纤维发育的分子生物学研究和棉花的抗病虫研究打下基础,进而改良棉纤维品质。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。2005 年夏种植李氏超短纤维突变体 Li_1li_1 自交分离后代的正常纤维野生型 li_1li_1 和李氏超短纤维突变体 Li_1li_1 材料于南京农业大学网室。取两种材料 0、2、4、6 DPA 的胚珠纤维复合体和 8、10 DPA 的纤维;另取光照培养室中种子萌发后 10 d 的正常纤维野生型 li_1li_1 的根、下胚轴、子叶。

1.1.2 菌种。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保存。

1.1.3 基因来源。通过构建陆地棉优质材料 7235 开花后 5、8、11、14、17、20、23、25 d 等不同纤维发育时期的混合 cDNA 文库,从文库中随机挑取 10000 个克隆,5'-端单边测序,通过非冗余性比较,获得 1436 个 UniGenes。根据以李氏正常纤维野生型 li_1li_1 和李氏超短纤维突变体 Li_1li_1 4 DPA 胚珠纤维混合物提取的 mRNA 为探针的基因芯片分析结果,选取其中两个 BLAST 结果可能与纤维发育相关的 cDNA 克隆 (*GhCHS*, *GhCPI*) 进行分析。

1.1.4 试剂。试验所用各种限制性内切酶购自 NEB 公司,PCR 反应中所用 Taq 酶,RT-PCR 中 DNase I 为 TaKaRa 公司产品。M-MLV, RNase Inhibitor 为生兴公司产品。Southern 杂交采用 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I,硝酸纤维素膜也为 Roche 公司产品,探针纯化选用 QIAGEN 公司 QIAquick Nucleotide Removal Kit。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR。参照热硼酸法^[3-4],略加修改提取植物材料的总 RNA。以寡聚脱氧胸腺嘧啶为引物进行反转录得到单链 cDNA。根据两个基因 cDNA 序列设计 RT-PCR 引物。*GhCHS*: 5' TGC TGT TAC CTT TCG TGG ACC TA 3' 和 5' AGC CCA TCT TCC CTT GAT TTC TT 3'。

GhCPI: 5' GAG GGA GGA TGA GGA TAA ACG A 3' 和 5' AGA CCA CCA AGT ACT ACT GCA C 3'。内标 EF1 α 的对应引物为 5' AGA CCA CCA AGT ACT ACT GCA C 3' 和 5' CCA CCA ATC TTG TAC ACA TCC 3'。扩增体系 25 μ L,包括:cDNA 1.0 μ L,PrimerF(10 μ mol \cdot L⁻¹)1.0 μ L,PrimerR(10 μ mol \cdot L⁻¹)1.0 μ L,10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,MgCl₂ (25 mmol \cdot L⁻¹)1.5 μ L,dNTP(10 mmol \cdot L⁻¹)0.5 μ L,rTaq 酶(5 U \cdot μ L⁻¹)0.1 μ L,ddH₂O 补足至 25 μ L。扩增内标 EF1 α 的程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,28 个循环 72 $^{\circ}$ C 7 min。具体的 cDNA 量根据扩增结果而调整。扩增两个基因的程序同前,仅退火温度变化,分别是:*GhCHS* 61 $^{\circ}$ C;*GhCPI* 59 $^{\circ}$ C。产物经 1% 琼脂糖电泳鉴定。

1.2.2 提取棉花基因组 DNA 和 Southern blotting。李氏正常纤维野生型 li_1li_1 基因组 DNA 的分离与纯化参照 CTAB 法^[5]。20 μ g DNA 经 *EcoRI*, *HindIII*, *XbaI*, *BamHI*, *XhoI* 完全酶切,体系如下:DNA 20 μ g,内切酶(20 U \cdot μ L⁻¹)10 μ L,10 \times buffer 10 μ L,ddH₂O 补足至 100 μ L。酶切结果经电泳检测后纯化。电泳分离,转移到尼龙膜上,80 $^{\circ}$ C 烘膜 2 h,4 $^{\circ}$ C 保存。用引物 T3:5' ATT AAC CCT CAC TAA AG3' 和 T7:5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG3',从菌液中扩增 *GhCHS*, *GhCPI* 的 cDNA 全长作为标记探针的模板,PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 2 min 预变性,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物胶回收,随机引物法标记两个基因的探针,QIAGEN 公司 QIAquick Nucleotide Removal Kit 纯化。37 $^{\circ}$ C 预杂交 0.5~6 h,加入探针后,37 $^{\circ}$ C 杂交 17~20 h。按照 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 洗膜。

2 结果与分析

2.1 *GhCHS* 的序列分析与表达

2.1.1 *GhCHS* 的序列分析。4 DPA 芯片分析结果显示,编号为 G019B11A 的克隆结果为上调表达,即该基因在野生型胚珠和纤维混合物中的表达量高于突变体中的表达量^[6]。对其整个插入片段测序,得到 1502 bp 的全长 cDNA 序列。包含 1170 bp 的 ORF,编码 389 个氨基酸(图 1)。通过 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

blast) 比对, 根据同源性将其命名为 *GhCHS* (*Gossypium hirsutum* chalcone synthase)。该序列是棉属新发现的基因, GenBank 登录号为 EF643506。用 pI/Mw 程序 (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html) 对 *GhCHS* 预测, 其理论上的 pI=6.12, Mw=42.6 kDa。根据 NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) 预测共有 17 个磷酸化位点。根据 NetNGlyc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) 预测该蛋白在 336 位有个 N-端糖基化位点。根据 NCBI CDS (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/structure/cdd>) 进行保守区预测, 该蛋白

包含下列保守区域: 类 CHS 的保守区域, 柚皮素基-查尔酮合成酶保守区域。

2.1.2 *GhCHS* 的 RT-PCR 分析。 对 *GhCHS* 基因的表达进行分析, 结果如图 2 和图 3 所示。RT-PCR 结果表明, *GhCHS* 基因组成型表达, 在胚珠或纤维中起始阶段表达量稍高于伸长阶段的其它时期。正常纤维野生型 li_1li_1 4 DPA 胚珠纤维混合物中表达量低于超短纤维突变体 Li_1li_1 , 属于上调表达, 与芯片结果符合。在花瓣和雄蕊中有较高的表达量, 这可能与查尔酮合成酶的色素合成功能相关。

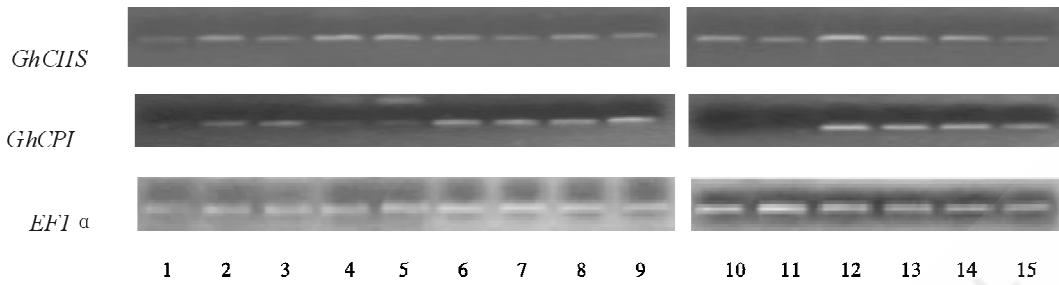
```

1   GACCTTCTGTTCTTTTTTACCATTTCATAGCATAGCAGCTTAGTCCAACTCCACACCCACC
61  ACCATTGGCTGTTTCGTAATCATCCGAAAAAGAAATGCGTGACCGTGAAGAAGTTCGTAAGG
    M V T V E E V R K A
121 CTCAACGTGCCCAAGGCCCTGCCACCGTGTGGCCATCGGCACATCAACCCCGCTAATT
    Q R A Q G P A T V L A I G T S T P P N C
181 GTTTGATCAGAGCACATACCCTGACTACTATTTCCGTATCACAAATAGTGAGCACAAAA
    V D Q S T Y P D Y Y F R I T N S E H K T
241 CCGAGTTGAAAGAGAAGTTCAAGCGCATGTGTGAAAAATCGATGATCAAGAAGCGATACA
    E L K E K F K R M C E K S M I K K R Y M
301 TGTACCTTACAGAAGAGATTTTGAAGAGAATCCCAATGTATGTGAATACATGGCTCCTT
    Y L T E E I L K E N P N V C E Y M A P S
361 CACTGGACGCTAGGCAAGATATGGTGGTAGTTGAGGTGCCAAAGCTAGGCAAGGAAGCAG
    L D A R Q D M V V V E V P K I G K E F A A
421 CCACCAAGGCCATTAAGGAGTGGGCCAGCCCAAGTCCCAAGATCACCCACCTTGTCTTTT
    T K A I K E W G Q P K S K I T H L V F C
481 GCACCACTAGCGGTGTGGACATGCCTGGGGCTGACTACCAGCTCACCAAGCTTTTAGGCC
    T T S G V D M P G A D Y Q L T K L L G L
541 TCCGCCCCCTCCGTTAAGCGCCTCATGATGTACCAACAAGGTTGCTTCCGAGGGGGACGG
    R P S V K R L M M Y Q Q G C F A G G T T V
601 TGCTCCGAGTGGCTAAGGACTTAGCTGAGAACAACAAGGTTGCTCGTGTACTTGTGTGT
    L R V A K D L A E N N K G A R V L V V C
661 GCTCGGAGATTACTGCTGTTACCTTTTCGTGGACCTAGTGACACTCACCTAGACAGTCTTG
    S E I T A V T F R G P S D T H L D S L V
721 TGGGCCAAGCATTGTTGGTGATGGTGCCGACCTGTTATAATCGGGCCAGACCCCGTGC
    G Q A L F G D G A A A V I I G A D P V P
781 CCGAAATCGAGAAGCCCATGTTTGAAGTCTCAGCAGCCCAAACGATCTTGCCGAGATA
    E I E K P M F E L V S A A Q T I L P D S
841 GTGATGGTGGCATTGATGCTCACCTTCGTGAAGTTGCTCTTACATTTACCTTCTTAAGG
    D G A I D G H L R A E V G L T F H L L K D
901 ATGTTCCGGGGCTTATTTTGAAGAATATAGAAAAGAGCCTGGTAGAAGCATTTCACCAT
    V P G L I S K N I E K S L V E A F F Q V L
961 TGGGCATATCCGATTGGAACCTCCCTTTTTTGGATTGCTCATCCTGGTGGTCCAGCAATAT
    G I S D W N S L F W I A H P G G P A I L
1021 TAGATCAAGTAGAAGCCAAATTAGCACTGAAGCCAGAGAAGCTACGAGCCACAAGGCACG
    D Q V E A K L A L K P E K L R A T R H V
1081 TTCTTTCAGAGTATGGTAACATGTCAAGTGCTTGTGTTCTATTTATTTGGATGAGATGA
    L S E Y G N M S S A C V L F I L D E M R
1141 GGAAGAAATCAAGGCAAGATGGGCTTCAGACCACAGGAGAAGGATTGGAGTGGGGAGTGC
    K K S R E D G L Q T T G E G L E F W G V L
1201 TCTTTGGGTTTGGACCTGGCCTCACTGTTGAGACTGTTGTGCTCCATAGTGTGCTGCTT
    F G F G P G L T V E T V V L H S V A A *
1261 AAAGTTAAACAAACATGCCTTTTAAGTAATTGCTCGTGCTCCACTTGGCTTGCAGTTTTA
1321 TCTTCTCTTTTTTCCCTTTTTAGAATCCTATGAATTTGTGTGTTTATTGTTAAAGACTA
1381 GAAGCCTTTGATGTTGTGGGCGGGAAGCCTAACGGCCTATTCAGTTCATGTATCAACTTAT
1441 ATTAAATTTATGGCAATAATAAGTTACTTTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1501 AA

```

图 1 *GhCHS* cDNA 的核苷酸及编码的氨基酸序列, ORF 的起始与终止密码子以方框标出

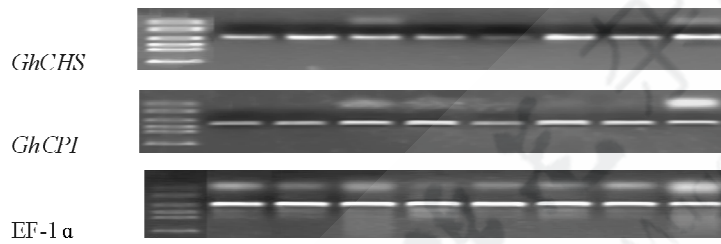
Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the full-length *GhCHS* cDNA, ORF are boxed



1~15 泳道依次为 *li₁li₁* 的根、下胚轴、子叶、0、2、4、6、8、10 DPA 胚珠纤维复合体, *Li₁li₁* 的 0、2、4、6、8、10 DPA 胚珠纤维复合体;EF-1 α 为内对照。

图 2 *GhCHS* 和 *GhCPI* 的 RT-PCR 分析

Fig. 2 The RT-PCR analysis of *GhCHS* and *GhCPI*

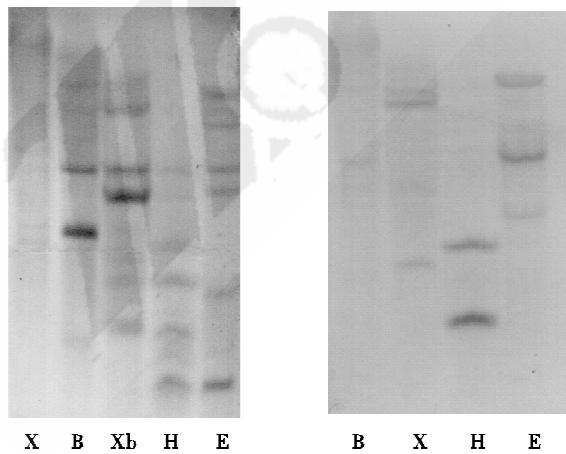


从左至右 marker、*li₁* 和 *Li₁*4DPA 胚珠纤维混合物、根、下胚轴、子叶、花瓣、萼片、雄蕊。

图 3 *GhCHS* 和 *GhCPI* 的 RT-PCR 分析-2

Fig. 3 The RT-PCR analysis of *GhCHS* and *GhCPI* -2

2.1.3 *GhCHS* 的 Southern 杂交分析。 *GhCHS* 基因 cDNA 全长 1502 bp, 在 527 bp 和 1404 bp 处都有一个 *Hind*III 酶切位点。 Southern 杂交分析结果如图 4 所示。 *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I, *Bam*HI, *Xho*I 对应的泳道分别有 6, 6, 4, 2, 4 条带。 *Bam*HI 对应的泳道只有两条带, 则推测 *GhCHS* 基因在整个基因组中有两个拷贝。 *Hind*III 在 cDNA 序列中有两个切点, 对应的泳



X, B, Xb, H, E 分别代表 *Xho*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Hind*III, *Eco*RI。

图 4 *GhCHS* 和 *GhCPI* 的 Southern 杂交分析

Fig. 4 Southern blotting analysis of *GhCHS* and *GhCPI*

道有 6 条带。而 *Eco*RI, *Xba*I, *Xho*I 也是切点较多的常用酶, 可能在内含子中都分别存在两个和一个酶切位点, 故在各自泳道中分别有 6、4、4 条带。另外泳道上还有一些弱带, 产生原因可能是探针与其它同源性较高的基因组序列杂交出现的非特异带。

2.2 *GhCPI* 的序列分析与表达

2.2.1 *GhCPI* 全长序列分析。 4 DPA 芯片结果显示, 编号为 G055H06A 的克隆上调表达^[6]。对其整个插入片段测序, 得到 788 bp 的全长 cDNA 序列。包含 378 bp 的 ORF, 编码 125 个氨基酸。通过 BLAST 比对, 将其命名为 *GhCPI* (*Gossypium hirsutum* cysteine proteinase inhibitor)。该序列是棉属新发现的基因, GenBank 登录号为 EF643507。

pI/Mw 程序预测 *GhCPI* 理论上 pI=9.93, Mw=13.8 kDa。与大多数植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂的分子量是 12~16 kDa 符合, 故推断 *GhCPI* 是单结构域的。 NetPhos2.0 预测 *GhCPI* 共 5 个磷酸化位点。 SignalP3.0 预测 *GhCPI* 在 21-22 位氨基酸之间存在信号肽裂解位点: VDG-LG, 推测 *GhCPI* 是一个蛋白前体, 它在被合成之后通过分泌途径运输到其作用部位或被分泌到细

胞外。根据 NCBI CDS 预测 GhCPI 包含类半胱氨酸蛋白酶抑制剂结构域保守区域。

2.2.2 GhCPI 序列与其它相关序列的同源性分析。根据 BLAST 结果,从不同植物中挑取了五

个同源性较高的氨基酸序列(表 1),用软件 DNAMAN 与 GhCPI 进行同源性比较(图 5)和聚类分析(图 6),以期揭示其与其它蛋白的同源关系、进化特征和结构特征。

表 1 与 GhCPI 进行同源性比较和聚类分析的氨基酸序列信息

Table 1 The amino acid sequences information for homological comparison and clustering analysis with GhCPI

Table with 3 columns: 来源 (Source), 可能功能 (Possible function), GenBank 登录号 (GenBank accession number). It lists sequences for Malus x domestica, Oryza sativa, Daucus carota, Arabidopsis thaliana, and GhCPI with their respective amino acid alignments and residue counts.

图 5 GhCPI 与其它植物 cystatin 的同源性比较

Fig. 5 Alignment of GhCPI with cystatin of other plants

植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂特征性地缺失二硫键[7]。它们包含与目标蛋白酶反应的三个基序(1)动植物中都普遍存在的反应活性基序 Qx-VxG;(2)在 N-末端存在一个 G;(3)在蛋白的另外一半存在着一个保守的 W[7]。在预测的 N-端螺旋区还存在一个特殊的一致基序 [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-x-[EDQV]-[HYFQ]-N[7]。在 GhCPI 中三个基序是 QV-VAG;N-末端的两个 G;C-末端的一个 W(图 5)。

六个序列共同的氨基酸序列是 L-G-[RE]-[FY]-[SC]-V-E-[EQ]-[YFH]-N,而 GhCPI 中则是 LGRFSVEEYN。

用 DNAMAN 软件对 GhCPI 与其它植物的半胱氨酸蛋白酶抑制剂氨基酸序列进行聚类分析(图 6),结果显示 GhCPI 位于一单独的分支上,与苹果(Malus x domestica)和水稻(Oryza sativa)中半胱氨酸蛋白酶抑制剂亲缘关系较近。

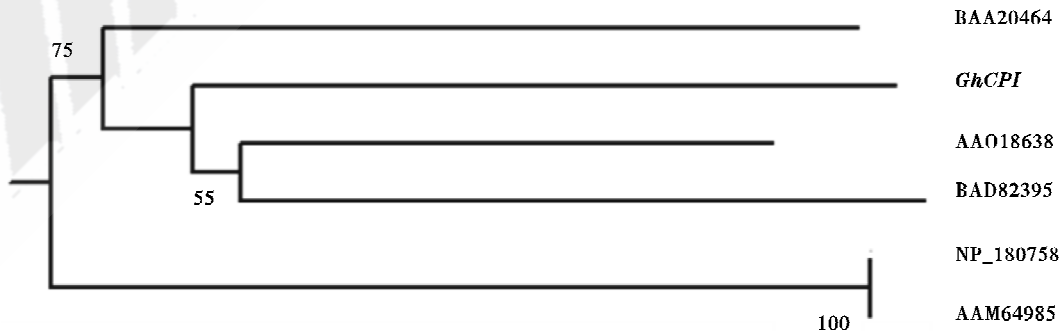


图 6 棉花 GhCPI 和其它植物 cystatin 的聚类关系(GenBank 登录号同表 1 所示)

Fig. 6 The phylogenetic relationship of GhCPI with cystatin of other plants which are described in table 1

2.2.3 *GhCPI* 的 RT-PCR 分析。对 *GhCPI* 基因的表达进行分析,结果如图 2 和图 3 所示。RT-PCR 结果表明,*GhCPI* 基因纤维伸长期优势表达,正常纤维野生型 li_1li_1 和超短纤维突变体 Li_1li_1 的胚珠纤维混合物中 0 DPA, 2 DPA 中表达量较弱,之后各时期表达量明显高于纤维伸长期起始时期。4 DPA 正常纤维野生型 li_1li_1 中表达量略低于超短纤维突变体 Li_1li_1 中,这与芯片结果符合。

2.2.4 *GhCPI* 的 Southern 杂交分析。*GhCPI* 基因 cDNA 全长 788 bp。Southern 杂交分析结果如图 4 所示。*EcoRI*, *HindIII*, *XbaI*, *BamHI* 对应的泳道都有 2 个条带,推测基因组中对应 *GhCPI* 基因有两个拷贝,而其它较弱的带可能是非特异杂交产生的。

3 讨论

3.1 查尔酮合酶在生物体中以及棉纤维发育中的可能功能分析

查尔酮合酶(CHS; EC 2.3.1.74)基因在许多植物中组成了一个多基因家族,是植物中黄酮类的植物杀菌剂和花青素合成的关键酶^[8]。在含有色素的花和根中,按照组织特异的形式组成性地表达,同时也受环境压力的诱导^[8-9]。一些研究显示在花粉囊中抑制类黄酮的生物合成导致自交不亲和,如转基因的矮牵牛和马铃薯^[10-12],玉米 *chs* 突变种^[13]。

生长素是最早发现的一种植物激素,可促进细胞分裂,维管束分化,叶片扩大,茎伸长等^[14]。正常纤维野生 li_1li_1 的茎维管束发育良好,而李氏超短纤维突变体 Li_1li_1 仅木质部发育较好,韧皮部不发达,韧皮组织明显偏少,形成层的发育不充分^[15]。

RT-PCR 结果显示,*GhCHS* 基因在超短纤维突变体 Li_1li_1 中 4 DPA 的表达量高于正常纤维野生型 li_1li_1 。查尔酮合酶的功能之一是生长素转运的生理性抑制剂,此酶表达量升高,则可能对生长素的运输起的抑制作用就较大。推测在李氏超短纤维突变体 Li_1li_1 中查尔酮合酶表达量高,对生长素的极性运输抑制也高。据朱勇清等^[15]推测,李氏超短纤维突变体 Li_1li_1 茎维管束结构的变异可能是由其生长素极性运输能力的下降所引起的,但维管束的发育不良也可能是造成生长素极性运输能力下降的原因之一。

本研究中 RT 结果推测的结论与其一致。生长素运输与维管束发育两者相互关联,互相制约,

导致短纤维,植株矮小,叶片边缘下翻,茎、叶柄、叶脉等扭曲一系列与正常纤维野生型 li_1li_1 有显著差异的表型。

3.2 半胱氨酸蛋白酶抑制剂在生物体中的可能功能及应用分析

半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin, cysteine proteinase inhibitor, CPI)是一组特异地抑制半胱氨酸蛋白酶的蛋白,“cystatin”是由分离自鸡蛋清的类似木瓜蛋白酶的一种半胱氨酸肽酶的抑制剂而得名^[16]。

植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂参与对内源和外源的蛋白酶进行调控。它们内源的角色是调节细胞编程性死亡和种子萌发中的蛋白流通,以及抑制内源的半胱氨酸蛋白酶,这些酶抑制发育中胚乳贮存蛋白降解。它们的防御角色是抑制外源蛋白酶,比如那些存在于昆虫消化道中的酶。可以通过抑制昆虫中肠中的巯基蛋白水解酶活性从而降低昆虫取食量,抑制昆虫生长甚至杀死昆虫^[17-19],故可用作多种昆虫的防治因子。植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂还有对植物病原体真菌生长的抑制作用^[20]。同时还是干旱、低温等环境胁迫等条件下一种重要的组织防御应激机制蛋白^[21]。

巯基蛋白酶抑制剂作为一种抗虫因子已被用于基因工程。生产上已获得转 CPI 基因水稻,且表现出对昆虫和真菌抗性的提高^[22-23]。在棉花育种上,随着 Bt 杀虫晶体蛋白基因抗虫棉在生产上推广时间的延长,具 Bt 抗性的昆虫已有发生^[24-25];而且已获得推广的转基因棉花品种大多转入的是外源基因,多表现为对单一虫害、病原的抗性。半胱氨酸蛋白酶抑制剂作为一种在植物抗虫、抗病、抗逆境胁迫等生理过程中都表现出显著作用的植物自身逆境诱导蛋白^[26],已经引起了广泛关注。如能通过基因工程手段获得高表达半胱氨酸蛋白酶抑制剂株系,无疑会在分子育种中更加具有应用价值。

参考文献:

- [1] BASRA A S, Malik C P. Development of the cotton fiber [J]. *Int Rev Cyto*, 1984, 89: 65-113.
- [2] KIM H J, Triplett B A. Cotton fiber growth in planta and *in vitro* models for plant cell elongation and cell wall biogenesis [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1361-1366.
- [3] 李继刚,郭三堆.棉花高质量 RNA 的提取及 MADS-box 基因保守区段的克隆[J]. *棉花学报*, 2004, 16(1): 3-7.

- LI Ji-gang, Guo San-dui. Extraction of total RNA and cloning of conservative fragments of MADS-box gene by RT-PCR in upland cotton [J]. Cotton Science, 2004, 16(1): 3-7.
- [4] 武耀廷, 刘进元. 一种高效提取棉花不同组织总RNA的热硼酸改良法[J]. 棉花学报, 2004, 16(2): 67-71.
WU Yao-ting, Liu Jin-yuan. A modified hot borate method for efficient isolation of total RNA from different cotton tissues [J]. Cotton Science, 2004, 16(2): 67-71.
- [5] PARTERSON A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp) genomic DNA suitable for RFLP and PCR analysis [J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 122-127.
- [6] 朱一起, 张天真, 贺亚军, 等. 棉花纤维伸长发育期的基因表达分析[J]. 作物学报, 2006, 32(11): 1656-1662.
ZHU Yi-chao, Zhang Tian-zhen, He Ya-jun, et al. Gene expression analysis during the fiber elongation period in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(11): 1656-1662.
- [7] MARGIS R, Reis E M, Villeret V. Structural and phylogenetic relationship among plant and animal cystatins [J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 359: 24-30.
- [8] DANGL J L, Hahlbrock K, Schell J. Regulation and structure of chalcone synthase genes [J]. Cell Culture Somatic Cell Genetics Plants, 1989, 6: 155-173.
- [9] VAN DER MEER I M, Stuitje A R, Mol J N M. Regulation of general phenylpropanoid and flavonoid gene expression [M]. New York: CRC Press, Boca Raton, 1993: 125-155.
- [10] YAMADA T, Hashimoto H, Shiraishi T, et al. Suppression of pisatin, phenylalanine ammonia-lyase mRNA, and chalcone synthase mRNA accumulation by a putative pathogenicity factor from the fungus *Mycosphaerella pinodes* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 1989, 2: 256-261.
- [11] FISCHER R, Budde I, Hain R. Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco [J]. Plant J, 1997, 11: 489-498.
- [12] TAYLOR L, Jorgensen R. Conditional male fertility in chalcone synthase-deficient petunia [J]. J Hered, 1992, 83: 11-17.
- [13] VAN DER MEER I M, Stam M E, Van-tunen A J, et al. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility [J]. Plant Cell, 1992, 4: 253-262.
- [14] MO Y, Nagel C, Taylor L. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 7213-7217.
- [15] 朱勇清, 许可香, 陈晓亚. 棉花 *Li* 突变体生长素极性运输的减弱 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(1): 15-20.
ZHU Yong-qing, Xu Ke-xiang, Chen Xiao-ya. Impaired polar auxin transport in cotton *Li* mutant [J]. Acta Photophysiological Sinica, 2003, 29(1): 15-20.
- [16] BARRETT A J. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors [J]. Trends Biochem Sci, 1987, 12: 193-196.
- [17] HINES M E, Osuala C I, Nielsen S S. Isolation and partial characterization of a soybean cysteine proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity [J]. J Agri Food Chem, 1991, 9: 1515-1520.
- [18] MICHAUD D, Nguyen-Quoc B, Bernier-Vadnais N, et al. Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber [J]. Plant Physiol, 1994, 90: 497-503.
- [19] MISAKA T, Kuroda M, Iwabuchi K, et al. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin [J]. Euro J Biochem, 1996, 240: 609-614.
- [20] PERNAS M, Sanchez-Monge R, Gomez L, et al. Antifungal activity of a plant cystatin [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1999, 12: 624-627.
- [21] WALDRON C, Wegrich L M, Merlo P A O, et al. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin an eight-domain cysteine proteinase inhibitor [J]. Plant Mol Biol, 1993, 23: 801-812.
- [22] HOSOYAMA H, Irie K, Abe K, et al. Oryzacystatin exogenously introduced into protoplasts and regeneration of transgenic rice [J]. Bioscience Biotechnol Biochem, 1994, 58: 1500-1505.
- [23] IRIE K, Hosoyama H, Takeuchi T, et al. Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitors activity against insect gut proteinases [J]. Plant Mol Biol, 1996, 30: 149-157.
- [24] GROOT A T, Dicke M. Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context [J]. Plant J, 2002, 31(4): 387-406.
- [25] BOURGUET D. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the European corn borer: What chance for *Bt* maize [J]. Physiol Entomol, 2004, 29(3): 25-256.
- [26] RYAN C. Protease inhibitors in plants; genes for improving defenses against insects and pathogens [J]. Ann Rev Phytopathol, 1990, 28: 425-429.

