

## 亚洲棉腺苷酸环化酶结合蛋白基因 *GaCAP* 的克隆及序列分析

王 晟, 赵国红, 杜雄明\*

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南安阳 455000)

**摘要:**在腺苷酸环化酶结合蛋白(CAP)的编码区两端设计引物, 利用 PCR 方法, 克隆了亚洲棉 CAP 基因 DNA 和 cDNA 序列。经测序及生物信息学分析发现: 该基因 DNA 序列中存在 9 个内含子; cDNA 序列全长 1425 个核苷酸, 总共编码 471 个氨基酸残基, 其序列特征包含 CAP 蛋白家族所特有的四个结构域, 因此被命名为 *GaCAP*。它的 C 末端氨基酸残基可以与 Actin 蛋白结合; N 末端带有 CAP 蛋白特有的 RLE 残基区, 可介导 CAP 与腺苷酸环化酶发生互作, 因此, 该蛋白可能参与细胞对信号的应答反应进而影响细胞骨架结构的生物过程。

**关键词:**亚洲棉; CAP; 基因克隆; 序列分析

**中图分类号:**S562.035.3 **文献标识码:**A

**文章编号:**1002-7807(2009)03-0184-06

## Cloning and Analysis of Adenylyl Cyclase-associated Protein Genes in *Gossypium arboreum* L.

WANG Sheng, ZHAO Guo-hong, DU Xiong-ming\*

(Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, MOA, Anyang, Henan 455000, China)

**Abstract:** Adenylyl cyclase-associated proteins (CAPs), functioning in cytoskeletal organization and signal transduction, may play an important role in cell development. Using PCR method, the DNA and cDNA sequences of CAP were isolated from *Gossypium arboreum* L.. The 1425 bp cDNA contains an open reading frame (ORF) encoding 471 amino acid residues. The encoding region had all four of the typical domains of CAP protein family. It was named *GaCAP*. The C-terminal domains could bind to actin protein. And a common feature of the CAP proteins is the presence of a CAP motif in their N-terminal domains. The motif is characterized by RLE repeats, which have the potential to form an amphipathic helix that mediates protein-protein interactions, the RLE repeats are known to be involved in the binding to adenylyl cyclase. These results suggested that CAP may play an essential role in cell differentiation.

**Key words:** *Gossypium arboreum* L.; CAP; gene cloning; sequence analysis

植物细胞骨架系统在细胞分化、形态建成和发育过程中发挥了重要功能。在大多数细胞类型中均已建立起研究这种微纤维的模型<sup>[1-3]</sup>。微纤维网架参与了许多重要的生物发育过程, 包括: 细胞有丝分裂中赤道板的形成, 细胞伸长及细胞壁物质的沉积过程, 这些都与植物细胞分化和发育息息相关<sup>[4]</sup>。

腺苷酸环化酶结合蛋白(adenylyl cyclase-associated proteins, CAPs)家族在肌动蛋白(actin)应答外源信号刺激的重组(remodeling)过程中发挥了重要作用。CAPs 是一类对单体肌动蛋白高度保守的结合蛋白, 广泛存在于酵母、果蝇、植物和哺乳动物中。在 *Saccharomyces cerevisiae* 中, 腺苷酸环化酶复合体作为应答营养信号 Ras 的

一个作用因子首先被发现。该复合体具有 2 个亚基结构,一个是分子量为 200 kDa 的催化亚基,参与了由 ATP 生成 cAMP 的生化途径<sup>[5]</sup>;另一个是分子量为 70 kDa 的腺苷酸环化酶结合蛋白亚基(CAP)<sup>[6]</sup>。经过深入研究,发现 CAPs 是具有多重作用的多结构域蛋白,通过敲除 CAP 基因的部分序列,将腺苷酸环化酶结合位点和 cAMP 相关功能域定位在 CAP 蛋白的 N 末端,C 端部分则决定了细胞骨架的表型<sup>[7-8]</sup>。还有研究表明,CAP 蛋白的 C 端结构就可以诱导微丝肌动蛋白(filament actin,F-actin)的解聚<sup>[9]</sup>。

在拟南芥中,过量表达 *AtCAP1* 可使细胞数量和细胞扩展速度下降,从而导致叶片组织的体积变小。在转基因烟草中,*AtCAP1* 基因可以与 Actin 微丝发生互作,造成 F-actin 的解聚,同样出现叶片体积的变化。这些结果表明,*AtCAP1* 在植物细胞 Actin 表达过程中具有重要的调控作用<sup>[10]</sup>。后续研究发现,融合酵母的 CAP 蛋白仅能结合自身的腺苷酸环化酶,却不能与出芽酵母的腺苷酸环化酶结合。这些结果说明,在 CAP 蛋白与腺苷酸环化酶之间存在着高度特异的作用机制<sup>[11]</sup>。

在棉花中,CAP 蛋白的 mRNA 主要在纤维组织中表达。棉花纤维是由胚珠外表皮的单一细胞发育而来<sup>[12]</sup>。在产生棉纤维的阶段,细胞急速伸长而不进行分裂。细胞骨架蛋白 Actin、Tubulin、Spectrin 和微纤维中间物蛋白均在分化阶段表达,在纤维伸长期达到最高<sup>[13]</sup>。为深入理解细胞发育的机理,进而利用 CAP 改良棉纤维品质,本实验克隆了亚洲棉 CAP 全长基因并进行了序列分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

本实验的试验材料(DPL971)来源于中国农业科学院棉花研究所“棉花种质资源中期库”,种植在河南安阳中棉所东场试验田(北纬 36°6',东经 114°21'),耕作及灌溉方式无特殊处理。在棉花苗期进行新鲜幼嫩叶片的采集,采集后立即提取基因组 DNA 或置于-76℃冰柜低温暂存。取 DPL971 开花当天的棉铃,在冰上剥取胚珠,并立即用液氮冷冻,-76℃冰冻储藏。

### 1.2 棉花胚珠核酸的制备及 cDNA 合成

采用 CTAB 法提取棉花基因组 DNA,参照

宋国立等所述方法<sup>[14]</sup>提取。根据蒋建雄等的方法<sup>[15]</sup>提取棉花胚珠总 RNA。cDNA 合成反应按照 BBI 公司的 AMV Reverse Transcriptase 合成 cDNA 第一链。

### 1.3 PCR 引物的设计及扩增

为了得到亚洲棉 CAP(adenylyl cyclase-associated protein)基因的全长 cDNA,以从 NCBI 下载的 GenBank 登录号为 AB014884 的陆地棉 *GhCAP* 基因序列为模板,利用 Oligo 6.0 软件在基因预测的开放阅读框(ORF)之外选取保守区段设计 PCR 引物。引物序列为 CCRI205F: 5'- AAT GGA GGC GAA GCT GAT AG-3'; CCRI205R: 5'- AGG CCT CAT TTA TGC TCC TG-3'。

分别以基因组 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,所用 Taq 酶为 TaKaRa 公司的 Ex-Taq DNA 聚合酶。反应程序为:94℃预变性 3 min 后,94℃变性 45 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,35 个循环,最后 72℃延伸 10 min。其中,退火温度的选择依扩增目的片段的 GC 含量而改变。

### 1.4 PCR 产物的克隆

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,用 BBI 生物公司的胶回收试剂盒(EZ Spin Column DNA Gel Extraction Kit)回收目的片段,连接到 Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector 载体上,酶切鉴定后送上海生工测序。

### 1.5 序列分析

分别将 DNA 序列及 cDNA 序列在 NCBI 网站进行 Blast 同源比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>);应用 Softberry server 在 DNA 序列中寻找内含子/外显子的边界序列(<http://www.softberry.com/berry.phtml>);应用 ORF finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 在 cDNA 序列上确定开放阅读框(Open Reading Frame,ORF)。

## 2 结果分析

### 2.1 测序结果

图 1A 为基因组 DNA PCR 扩增电泳图,测序结果为 3998 个核苷酸。图 1B 为 cDNA PCR 扩增电泳图,测序结果为 1425 个核苷酸。

### 2.2 序列同源性分析

基因组 DNA 序列长度为 3998 个核苷酸,包

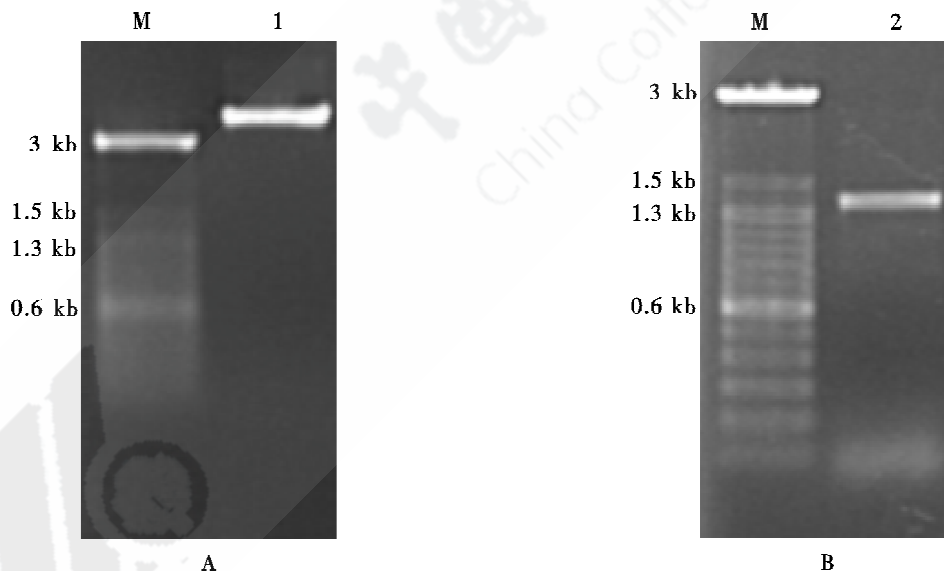
括 9 个内含子区,其中最长的一个内含子序列长度约 1000 个核苷酸,最短的一个内含子序列约 100 个核苷酸长度(图 2)。cDNA 的序列长度为 1425 个核苷酸,包括一个完整的开放阅读框(1416 个核苷酸,编码 471 个氨基酸)(图 3),这与拟南芥中 CAP 蛋白的氨基酸数目大小一致(476 个氨基酸)。但是, *GaCAP* 的基因组长度(~4 kb)要大于拟南芥 *AtCAP1* 基因组长度(~2.9 kb),这与棉花和拟南芥基因组大小不同有一定关系。

预测该基因编码的氨基酸序列并在 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 CAP 具有较高的同源性。选取其中几种典型植物的 CAP 氨基酸序列,用 Clustal W 软件进行多重序列比对分析,发现亚洲棉 CAP 包含 CAP 蛋白家族的 4 个特征结构域:N-端结构域;C-端结构域;富含脯氨酸的中部区域和促进 CAP 形成多聚复合体的结构域,这证明克隆所得到的基因为 CAP 基因家族。

用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 程序将亚洲棉 CAP 与植物,微生物,哺乳动物等 CAP 蛋白进行系统进化分析(图 4),结果发现亚洲棉 CAP 蛋白除与陆地棉 GhCAP 蛋白亲缘关系最接近外,还与拟南芥、苜蓿等双子叶植物在进化上较为接近,而与秀丽线虫(*C. elegans*)的进化关系最远。

### 3 讨论

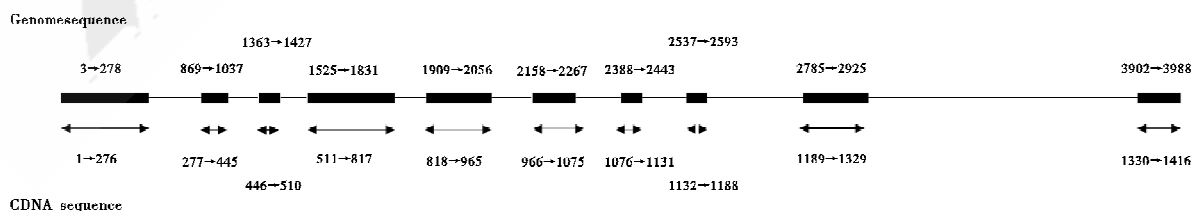
腺苷酸环化酶结合蛋白 CAP 首先是在出芽酵母中发现的<sup>[6]</sup>。在随后的近 20 年时间内,很多研究者对 CAP 进行了深入的研究,包括利用 X 射线晶体衍射及核磁共振技术,得到关于 CAP 蛋白结构的初步结果<sup>[16]</sup>。1998 年,首先在陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)中得到了 CAP 的编码序列<sup>[17]</sup>,这也是首次在植物中克隆得到与 CAP 同源的基因序列。之后相继在拟南芥等植物中鉴定分离出 CAP,并对它们在植物细胞中发挥的生理功能进行了研究<sup>[18]</sup>。



M: Marker; 1: 基因组 DNA 扩增产物; 2: cDNA 扩增产物。

图 1 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 PCR products in 1% agarose gel electrophoresis



黑色矩形为“外显子”;黑色实线为“内含子”。

图 2 亚洲棉 CAP 基因组 DNA 结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of *GaCAP* DNA sequence

```

atggaggcgaagctgatagagaggctggaagccgcggtggctcggctggagtctctatcg
M E A K L I E R L E A A V A R L E S L S
gccggtggaatctcggataggggattaccggacggtggtgatgaggtgtcttcggatcct
A G G I S D R G L P D G V D E V S S D P
tcgattttggcgtttgacgatctgatggctcaatatgccggctagggtttcggctgctgcc
S I L A F D D L M A Q Y A A R V S A A A
gagaagattggaggtcaagtgctggatgtgactaagctagttctcggagcattctctgtt
E K I G G Q V L D V T K L V L E A F S V
caaaagaaacttcttatcggatcaagcagactcagaaacctgatatggcgggcttggtc
Q K K L L I E I K Q T Q K P D M A G L V
gaatttctcaaacactgaatgaagtgatcttgaagggttaatgctatgacggaagggagg
E F L K P L N E V I L K V N A M T E G R
cgatctgatttcttcaaccacttgaagagtgctggagacagtctttcagcttttagcatgg
R S D F F N H L K S A G D S L S A L A W
attgcttacacaggcaagattgtggtatgagcatgcctatcgcacatgtggaagaaagt
I A Y T G K D C G M S M P I A H V E E S
tggcagatggctgaattttataacaacaagggttctttagtagtacagaaacaagatcag
W Q M A E F Y N N K V L V E Y R N K D Q
atccatgttgaatgggccaagctttgaaggaactgtatttaccgggtctgagggattat
I H V E W A K A L K E L Y L P G L R D Y
gtcaaaagccattatcctcttggccccggtatggagtgcttccggtaaaaaggcatctagt
V K S H Y P L G P V W S A S G K K A S S
gctccgcaaaaagctcctccaccagggggcccctgcacctcctccccctccacctgcttct
A P P K A P P P G A P A P P P P P A S
cttttcagctcagaaccttctcagccttcttcatcaaatccaaaacaagggatgtcagct
L F S S E P S Q P S S S N P K Q G M S A
gttttccaagaaattagtagtggaatgtctctgcaggcctgaagaagggttactgctgat
V F Q E I S S G N V S A G L K K V T A D
atgaagacaagaaccgtacagatagaacaggtggtttagtgccagtggaaggaaaca
M K T K N R T D R T G V V S A S G K E T
cgttcaagctcccccttcttctcaaaaagccggaccacccaaaactagagctgcaaatgggt
R S S S P S F S K A G P P K L E L Q M G
cgcaagtgggctggtgagaaccaaatggaagaaagaacttagttattgatgactgtgat
R K W A V E N Q I G R K N L V I D D C D
gccaaacagctctgtgtatatttatggatgcaagattctgttttgcagattcaggggaaa
A K Q S V Y I Y G C K D S V L Q I Q G K
gtcaacaatataaccattgacaaatgcactaagatgggagtggtatttaaggatggtgtg
V N N I T I D K C T K M G V V F K D V V
gctgcttgtgaggttagtaaacgtgcaatgggtggtgaggtgcaatgtcagggttctgctcca
A A C E V V N C N G V E V Q C Q G S A P
acaatttcagtggaacaacacatctggctgtcagttgtacttaagcaagactctttaggg
T I S V D N T S G C Q L Y L S K D S L G
acatctataacatcagcaaaagtcaagtgagatcaatgtgttggtgcctaccggacctgat
T S I T S A K S S E I N V L V P T G P D
ggtgactggggggagcattcattgccgcaacagtatatccatgtatttaaggatggtcaa
G D W G E H S L P Q Q Y I H V F K D G Q
tttgaactacccccgtgtcgcactcaggagcataa
F E T T P V S H S G A *

```

图 3 亚洲棉 *CAP* 基因全长 cDNA 序列及预测编码的蛋白序列Fig. 3 cDNA and deduced amino acid sequences of *GaCAP*

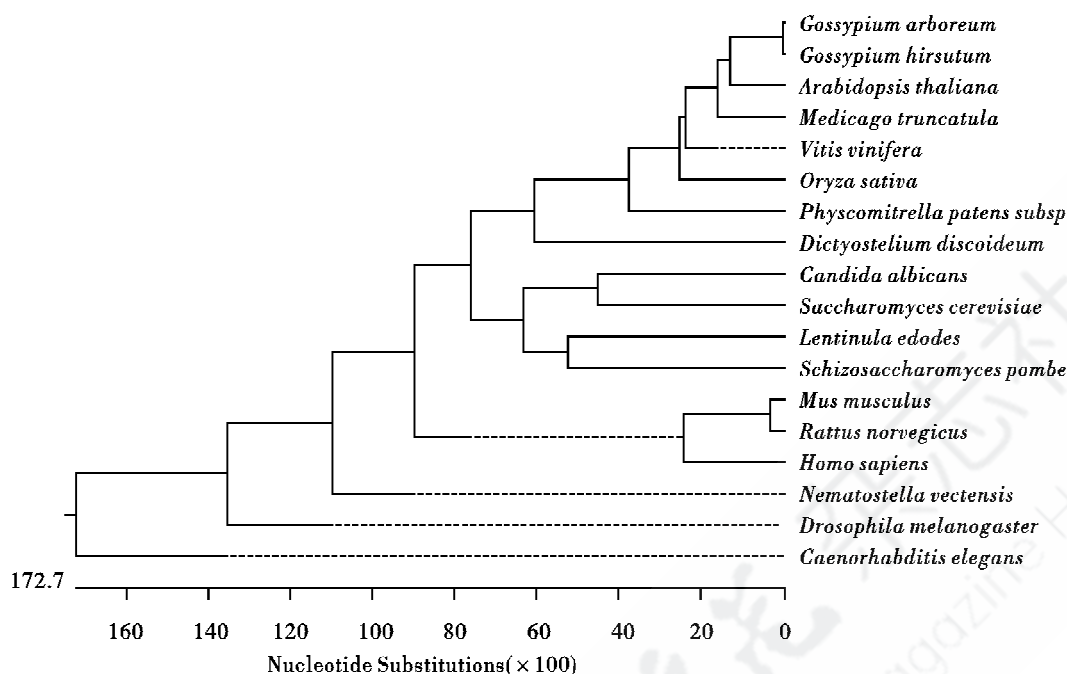


图 4 部分已知 CAP 蛋白氨基酸序列系统进化分析图

Fig. 4 Phylogenetic tree of CAP proteins

通过 X 射线晶体衍射及核磁共振技术,研究者发现在所有生物的 CAP 中,有 4 个蛋白结构域是高度保守的,而且每个结构域都有明确的生物功能。其中,N-端是与腺苷酸环化酶发生互作,而外源信号的刺激下也可诱导 RAS 蛋白的活性;C-端主要与细胞分化有关,以目前的研究结果,所有 CAP 蛋白的 C-端都能够与 actin 单体结合;第三个就是富含脯氨酸的中部区域,它可以和一些特异蛋白的 Src 同源结构域(SH3)发生互作。最后一个结构域的功能是将这些 CAP 蛋白单体形成多聚复合体,一般是二聚体形式<sup>[18]</sup>。

通过研究 CAP 蛋白家族序列比对的结果发现,这些 CAP 蛋白在特征结构域都具有极高的同源性,但在这些结构域之外,序列的同源性较低,说明 CAP 蛋白家族成员之间的生理功能可能存在一定的差异。因此,鉴定和分离不同来源的 CAP 并进行研究,对进一步深入理解 CAP 具有重要的意义。

CAP 在受到外界信号刺激后可以调控下游 Actin 蛋白的聚合和解聚过程,进而影响细胞的分化和伸长发育。棉花纤维细胞是由胚珠外表皮单细胞发育而来的,而且在细胞发育阶段极性伸长现象尤为明显,这就为更好地研究 CAP 调控细胞发育提供了良好的细胞发育模式实验材料。因此,系统研究 CAP 在棉纤维细胞发育过程中与腺苷酸环化酶和细胞骨架蛋白之间的相互关系,可

以更好地理解植物细胞分化以及伸长的发育机理。

本实验首次克隆了亚洲棉 CAP 全长基因并进行了初步的生物信息学分析,为后续在棉纤维细胞中开展研究 CAP 的工作奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] PATHSARATHY M V, Perdue T D, Witzmun A, et al. Actin network as a normal component of the cytoskeleton in many vascular plant cells [J]. American Journal of Botany, 1985, 72: 1318-1323.
- [2] MEAGHER R B, Williamson R E. The plant cytoskeleton [M] // Meyerowitz E, Somerville C. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 1049-1084.
- [3] KOST B, Spielhofer P, Chua N H. A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes [J]. Plant Journal, 1998, 16(3): 393-401.
- [4] KOST B, Mathur J, Chua N H. Cytoskeleton in plant development [J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(6): 462-470.
- [5] TODA T, Uno I, Ishikawa T, et al. In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase [J]. Cell, 1985, 40(1): 27-36.
- [6] FIELD J, Vojtek A, Ballester R, et al. Cloning and characterization of CAP, the *S. cerevisiae* gene enco-

- ding the 70 kd adenylyl cyclase-associated protein [J]. *Cell*, 1990, 61(2): 319-327.
- [7] GERST J E, Ferguson K, Vojtek A, et al. CAP is a bifunctional component of the *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase complex [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(3): 1248-1257.
- [8] FIELD D J. What is the goal of sensory coding? [J]. *Neural Computation*, 1994, 6(4): 559-601.
- [9] ZELICOF A, Protopopov V, David D, et al. Two separate functions are encoded by the carboxyl-terminal domains of the yeast cyclase-associated protein and its mammalian homologs. Dimerization and actin binding [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(30): 18243-18252.
- [10] BARRERO R A, Umeda M, Yamamura S, et al. *Arabidopsis* CAP regulates the actin cytoskeleton necessary for plant cell elongation and division [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(1): 149-163.
- [11] BARRERO R A, Umeda M, Yamamura S, et al. Over-expression of *Arabidopsis* CAP causes decreased cell expansion leading to organ size reduction in transgenic tobacco plants [J]. *Annals of Botany*, 2003, 91(5): 599-603.
- [12] 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.  
DU Xiong-ming, Pan Jia-ju, Wang Ruo-hai. Differentiation and development of fiber cells on the ovules in cotton [J]. *Cotton Science*, 2000, 12(4): 212-217.
- [13] 王素会, 杜雄明. 两个棉纤维发育突变体分子生物学研究进展 [J]. *棉花学报*, 2003, 15(6): 376-379.  
WANG Su-hui, Du Xiong-ming. Advances in researches on molecular biology of two fiber-mutant [J]. *Cotton Science*, 2003, 15(6): 376-379.
- [14] 宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA [J]. *棉花学报*, 1998, 10(5): 273-275.  
SONG Guo-li, Cui Rong-xia, Wang Kun-bo, et al. A rapid improved CTAB method for extraction of cotton genomic DNA [J]. *Cotton Science*, 1998, 10(5): 273-275.
- [15] 蒋建雄, 张天真. 利用 CTAB/酸酚法提取棉花组织总 RNA [J]. *棉花学报*, 2003, 15(3): 166-167.  
JIANG Jian-xiong, Zhang Tian-zhen. Extraction of total RNA in cotton tissues with CTAB-acidic phenolic method [J]. *Cotton Science*, 2003, 15(3): 166-167.
- [16] KSIAZEK D, Brandstetter H, Israel L, et al. Structure of the N-terminal domain of the adenylyl cyclase-associated protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum* [J]. *Structure*, 2003, 11(9): 1171-1178.
- [17] KAWAI M, Aotsuka S, Uchimiya H. Isolation of a cotton CAP gene; a homologue of adenylyl cyclase-associated protein highly expressed during fiber elongation [J]. *Plant Cell Physiology*, 1998, 39(12): 1380-1383.
- [18] HUBBERSTEY A V, Mottillo E P. Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization [J]. *The FASEB Journal*, 2002, 16(6): 487-499. ●