

研究
简报

棉花微管结合蛋白基因 *GhMAP1-LC3* 的克隆与表达分析

何心尧¹ 张春华¹ 杨佑明^{1,*} 徐楚年¹ 刘国琴²

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; ² 中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要: 应用 RT-PCR 从陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 石远 321 开花当天胚珠中分离到一个 553 bp 的片段, 含有一个 360 bp 的开放读码框, 推导的氨基酸序列 (119 个氨基酸) 与水稻、拟南芥的 MAP1-LC3 (Microtubule-associated Protein 1-Light Chain3) 分别具有 94% 与 90% 的同源性, 由此推测该基因为编码棉花微管结合蛋白基因家族的一个成员, 命名为 *GhMAP1-LC3*。实时定量 RT-PCR 分析表明, 该基因 (*GhMAP1-LC3*) 在棉花的胚根、叶片、花瓣、花药以及 0~5 DPA (开花后天数) 胚珠、10~25 DPA 纤维中均有表达, 其中以 20 DPA 纤维中的表达量最高, 而在下胚轴、-3 DPA 胚珠、30 DPA 纤维与 35 DPA 纤维中没有表达。基于其表达模式以及对其他物种 MAP1-LC3 蛋白的认识, 推测其对纤维初生壁的形成起着重要作用。

关键词: 棉花; 微管结合蛋白; 纤维发育

中图分类号: S562

Cloning and Expression Analysis of *GhMAP1-LC3* Gene from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

HE Xin-Yao¹, ZHANG Chun-Hua¹, YANG You-Ming^{1,*}, XU Chu-Nian¹ and LIU Guo-Qin²

(¹ College of Agronomy & Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094; ² College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Using RT-PCR, a fragment of cDNA was obtained from the ovules of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. Shiyuan 321 at 0 DPA (days post anthesis). The sequence of 553 bp, containing an open reading frame of 360 bp was deduced to encode a polypeptide of 119 amino acid residues, which shared 94% and 90% homology with the light chain 3 of microtubule-associated protein 1 (MAP1-LC3) from rice and *Arabidopsis thaliana*, respectively. Therefore, it seems that the cloned sequence represents the *MAP1-LC3* gene in cotton, and it was named *GhMAP1-LC3*. The expression profile of the gene was analyzed by real-time quantitative RT-PCR. The results indicated that it was expressed in the ovule of 0-5 DPA and in the fiber of 10-25 DPA. In other cotton tissues, such as radicle, leaf, petal, anther, the transcript of *GhMAP1-LC3* was also detected. The expression of *GhMAP1-LC3* reached its peak in the fiber on 20 DPA. But the transcript of *GhMAP1-LC3* was not detected in the fiber on 30 and 35 DPA, nor in the ovule on -3 DPA and in hypocotyls. Based on the expression profile of *GhMAP1-LC3* and the function of MAP1-LC3, it was suggested that *GhMAP1-LC3* play an important role in the formation of the primary wall of cotton fiber.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; Microtubule-associated protein; Fiber development

微管是构成细胞骨架的重要成分, 普遍存在于真核细胞中, 在维持细胞形态、细胞分裂、细胞运动与运输及信号转导等方面发挥重要作用。微管结合蛋白 (microtubule-associated proteins, MAPs) 是一类结合于微管骨架上的蛋白, 可分为两大类, 一类为微管马达蛋白, 它们以微管为轨道, 水解 ATP 产生机械能, 负责胞内物质的运输^[1]; 另一类为结构性微管结合蛋白, 可以与微管结合并对微管的结构、排列方式进行调节^[2]。

Kuznetsov 等^[3]从牛脑细胞中分离出一个 18 kDa 的蛋白, 经鉴定为 MAP1A 和 MAP1B 的第 3 条轻链, 命名为 MAP1-LC3。Mann 等^[4]对 LC3 的生化特性进行了深入研究, 在大肠杆菌中表达了大鼠 LC3 基因的融合蛋白; 体外实验发现, 该融合蛋白可以与经紫杉醇稳定的大鼠脑组织微管蛋白共沉淀; 免疫荧光标记实验发现, 该蛋白仅在神经细胞中大量分布并且总是与重链 MAP1A、MAP1B 共定位, 因此认为 LC3 是

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项 (JY03A16)。

作者简介: 何心尧 (1978-) 男, 硕士, 中国农业科学院作物科学研究所在读博士。

* 通讯作者 (Corresponding author): 杨佑明。Tel: 62733871; E-mail: ymyang@cau.edu.cn

Received (收稿日期): 2005-12-06; Accepted (接受日期): 2006-03-06.

微管结合蛋白 MAP1A 与 MAP1B 的轻链,并参与调节 MAP1A 与 MAP1B 的活性^[4]。

迄今为止,尚未见到有关植物 *MAP1-LC3* 基因功能报道。对于棉花 *GhMAP1-LC3* 基因的研究将有助于理解其在棉纤维发育及棉纤维品质形成中的作用,同时为开展植物 LC3 蛋白的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 石远 321 为材料,开花当天挂牌标记棉铃,采集 -3、0、5、10、15、20、25、30、35 DPA (Days post anthesis, 开花后天数) 的蕾或铃,剥取胚珠或籽棉,以液氮速冻于 -80℃ 保存。胚根和下胚轴取自萌发 5 d 的棉花幼苗,叶为花铃期的幼嫩叶片,花瓣取自开花前 1 d 的花蕾,花药取自开花当天的花,液氮速冻后于 -80℃ 保存。

1.2 RNA 提取

参照 Jaakola 等^[5]的方法进行。

1.3 棉花 *GhMAP 1-LC 3* 基因的克隆

cDNA 第一链合成采用通用引物 Q_T 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CGA(T)₁₇-3'; RT-PCR 的上游引物应用简并引物序列 5'-TGG AGG AAA(G) TAC(T) GGA(TC) CAA(G) AAA(G)-3', 下游引物为 Q_0 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CG-3' (引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。

取 5 μg 开花当天胚珠总 RNA,以 Q_T 为引物进行 cDNA 第一链合成,并以其为模板进行 PCR 扩增,反应体系含 cDNA 2 μL,简并引物 (50 μg/μL) 4 μL, Q_T (10 μmol/L) 1 μL, Q_0 (10 μmol/L) 2 μL, 5 × dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, 10 × buffer 2 μL, ddH₂O 4.7 μL, *Taq* 酶 1 U, 总体积 20 μL。反应程序为 94℃ 5 min, 38℃ 3 min, 72℃ 10 min; 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的条带,回收采用 Ultrafree-DA 离心过滤装置 (Millipore 公司)。回收的 DNA 片段连接到 pGEM-T 载体,验证后测序 (上海生工生物工程技术服务有限公司)。序列测定结果用 DNAMAN 软件进行分析并在 GenBank 中进行同源性比对 (BLASTX)。

1.4 棉花 *GhMAP 1-LC 3* 基因的实时定量 RT-PCR 分析

根据 *GhMAP1-LC3* 基因序列设计定量 PCR 引物,上游引物为 5'-CTGGATCCTTAGCAATGGCGAAAA-3', 下游引物为 5'-GCCGACTCT TGATAATAGCGTAGTG-3' (由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。

提取各组织总 RNA,取 2 μg 总 RNA 以 Olig dT₁₅ 为引物进行反转录。应用 DNA Engine Option 2 实时定量 PCR 仪 (MJ Research™ 公司),以棉花的各个组织 (胚根、下胚轴、叶片、花瓣、花药) 以及不同发育时期的胚珠 (-3、0、5 DPA)、纤维 (10、15、20、25、30、35 DPA) 的 cDNA 为模板,应用设计的引物进行 PCR 扩增。体系含 cDNA 2 μL,引物 (10 μmol/L) 各 0.3 μL, 10 × buffer 2 μL, 5 × dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, *Taq* 酶 1 U, SYBG 0.5 μL, ddH₂O 12.5 μL, 总体积 20 μL。反应程序为 94℃ 变性 1 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 读取荧光值,继续升温至 80℃,再读取荧光值

1 次, 40 个循环; 72℃ 延伸 5 min; 温度由 65℃ 升至 94℃, 每升高 0.3℃ 读取荧光值 1 次。PCR 反应结束后分析荧光值变化曲线以及融解曲线。本实验同时应用一系列已知浓度的连有 *GhMAP1-LC3* 基因序列的质粒作为定量标准, 绘制标准曲线, 计算出 *GhMAP1-LC3* 基因的转录产物在不同组织中的确切浓度。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

对石远 321 开花当天胚珠 RNA 反转录后的 cDNA 进行 PCR 扩增,并对产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增产物呈弥散状,但可见主带。

2.2 目的片段的回收、克隆及重组质粒的 PCR 验证

回收 PCR 产物中约 600 bp 的片段,将其连接到 pGEM-T 载体后进行转化,并应用载体上的 SP6/T7 引物对连接产物进行 PCR 鉴定 (图 1),选择插入片段在 600 bp 左右的克隆并测序 (上海生工生物工程技术服务有限公司)。

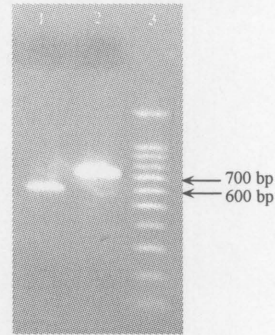


图 1 重组克隆的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinants
1: 回收片段; 2: 重组克隆; 3: Marker (100 bp DNA ladder).
1: Recovered fragment; 2: Recombinants;
3: Marker (100 bp DNA ladder).

2.3 测序结果及序列分析

测序得到长 553 bp 的 DNA 序列。利用 NCBI ORF Finder 在 553 bp 内检索到 3 个开放读码框,长度分别为 360 bp (frame + 1, 31 ~ 390)、153 bp (frame - 1, 12 ~ 164) 和 105 bp (frame + 3, 426 ~ 530),其中按 +1 读码框所获得的编码区最长,编码 119 个氨基酸 (图 2),起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TAA。将三种读码框翻译后得到的氨基酸序列分别进行 BLASTP 检索,其中按 -1 和 +3 读码框推导所得的氨基酸序列未检索到保守区域,也没有检索到与其相似的蛋白质;按 +1 读码框推导的氨基酸序列进行 BLASTP 检索结果显示其与多个生物物种的微管结合蛋白具有高度同源性 (图 3),其中该序列与水稻及拟南芥微管结合蛋白的同源性分别为 94% 和 90%。

将该序列按 +1 读码框翻译所得的氨基酸序列进行 RPS-BLAST 比对,结果表明,其与微管结合蛋白 1A (MAP1A) 和 1B (MAP1B) 的第 3 条轻链 (MAP1-LC3) 保守区的 104 个氨基酸残基完全一致 (100% aligned),期望值为 5e-45,由此推测该序列为编码棉花 MAP1-LC3 的基因,命名为 *GhMAP-LC3*。该基因的 cDNA 序列已提交 GenBank 注册,登录号 AY311346。

```

1      ctcctggatagtcaggatcaaatattagcaATGGCGAAAAGTTCCTTTAAAGCTTGAACAT
1      M A K S S F K L E H

61     CCTTTGGAAAAGGAGGCAGGCTGAATCTGGTCGCATCAGGGAGAAGTATCCAGACAGAGTT
11     P L E R R Q A E S G R I R E K Y P D R V

121    CCTGTTATCGTGGAGAAGGCTGAAAGGAGTGACATTCCTGCATTGATAAAAAAGAGTAT
31     P V I V E K A E R S D I P D I D K K K Y

181    CTGTTCCATCTGATTTGACTGTGGGGCAATTCGTTTATGTTGTACGCAAAAAGGATTAAG
51     L V P S D L T V G Q F V Y V V R K R I K

241    CTTAGTGCAGGAGAAAGCTATATTTGCTTTTGTGAAGAACACTCTCCCCTCTACTGCTGCT
71     L S A E K A I F V F V K N T L P P T A A

301    TTGATGCTCGCAATTTTGAAGAAAACAAGGATGAAGATGGCTTTCTGTATATGACTTAC
91     L M S A I Y E E N K D E D G F L Y M T Y

361    AGTGGAGAGAACACATTTGTTCCCCATAACTctcttagcactacgctattatcaatcta
111    S G E N T F G S P *

421    tghtaatggctaaaagggaaagcgtaaatctcctcaatggttccacttaggctatggctctc
481    tgttcttgacgatgaacttggaaatcttattttcttaatggaagaattaactttatcaat
541    ggaaaaaaaaaaaa
    
```

图2 克隆片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列
Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of cloned segment

Rice	... NARSSKHRRRAANRRKYDR VVKARSD DDKKKYVA T GVVYVVKRKS AK A VKNFTAAMS AYN T	63
Yeast	... ANRRKYDR VVKARSD DDKKKYVA T GVVYVVKRKS AK A VKNFTAAMS AYN T	53
Cotton	... NAKSSKHRRASGRKRYDRVVKARSD DDKKKYVST GVVYVVKRKS AKTV VKNFTAAMS AYN T	65
Thale_cress	... NASSKHHKRAAAARRKYDR VVKARSDV DDKKKYVA T GVVYVVKRKS KA VKN TAAMS AYN T	62
Human	MKWKDHSR CVSAKRAKYDRVVKVSGSV DDKKKYVST AMWRKSK ... AADKTVSS TMSYK T	64
Rat	MSDRKRRKADRCVVDHS KRYKQKVKTE ... VVHNNVVKRRNT ... AVNHSMVS VSTADY T	60
Consensus	ma ss h raa r rkydr vvkars d v ddkkkyvad t gvyvvr krks ak avknt taams ayn kd	
Rice	... GYMTYSGNTG	74
Yeast	... GYMTYSGNPG	64
Cotton	... GYMTYSGNPG	64
Thale_cress	... GYNSYSGNPG	76
Human	... GYVAASGNTG	73
Rat	... GYVVAASGNTG	75
Consensus	dgy mty s gntg	70

图3 GhMAP1-LC3蛋白与其他MAP1-LC3蛋白的序列比对
Fig.3 Alignment of cotton MAP1-LC3 protein with other MAP1-LC3 proteins

2.4 GhMAP1-LC3基因的实时定量PCR结果

根据标准曲线计算出GhMAP1-LC3基因的转录产物在不同组织中的确切浓度,结果显示,在-3 DPA胚珠中没有检测到GhMAP1-LC3基因的转录产物;从0 DPA开始可以在胚珠中检测到转录产物,并且在随后的胚珠、纤维发育期内转录量逐渐增大并维持在较高水平,至20 DPA纤维中达到最高值;纤维中的转录产物量在25 DPA后开始急剧下降,在30 DPA纤维中即已检测不到基因的转录;在胚根、叶片、花瓣、花药等组织中也检测到了该基因的转录,但在下胚轴中没有检测到(图4)。

3 讨论

棉花不同品种在纤维发育进程上有所差异,但均可分为纤维原始细胞的分化与突起(约-5~0 DPA)、纤维伸长(约0~25 DPA)、次生壁增厚(约始于15 DPA)与脱水成熟4个时期。本实验的实时定量RT-PCR结果显示,GhMAP1-LC3基因在纤维开始伸长(0 DPA)时有所表达,在纤维伸长期始终保持较高的表达水平,到了25 DPA开始急剧下降,此时纤维

即将停止伸长。这种表达模式显示GhMAP1-LC3基因可能在棉纤维伸长过程中起着重要作用。

已有证据表明LC3大量存在于高尔基体、溶菌体以及其他囊泡状细胞器中^[6-7]。高尔基体是棉纤维细胞中的囊泡状细胞器,参与初生壁与溶酶体膜的形成。现已证明,棉纤维初生壁中的半纤维素、果胶质等物质都是由高尔基体分泌泡运载的^[8]。在开花当天,纤维细胞内的高尔基体含量急剧上升,以适应初生壁合成所需要的大量多糖类物质运输的需要^[9]。在整个伸长期,高尔基体一直保持着旺盛的生理活动,据估计,在一个2 cm长的处于伸长期的纤维细胞中,高尔基体的数量大约为75 000个^[10]。在次生壁增厚期,高尔基体数目明显减少,形态发生变化,并且分泌小泡的内含物与次生壁物质不同^[9],因此推测高尔基体并不参与次生壁的形成。关于高尔基体等膜泡状细胞器在细胞内的运动方式已有较为深入的研究,普遍认为高尔基体是以细胞微管骨架为轨道运动的^[11-12]。Sato-Harada等^[13]在轴突神经细胞中证实了微管结合蛋白通过磷酸化/去磷酸化作用对微管进行调

解,进而实现对细胞器沿微管骨架运动方式的调节。

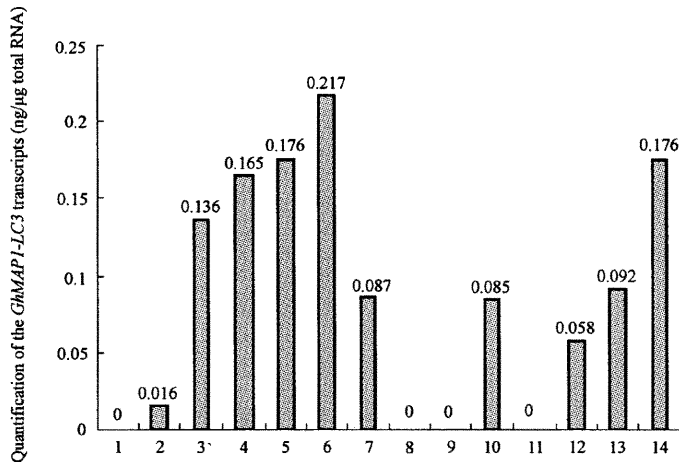


图4 *GhMAP1-LC3* 在各棉花组织中转录的定量结果

Fig. 4 Quantification of *GhMAP1-LC3* transcript in cotton tissues

1~14 列分别为 -3、0、5 DPA 胚珠、开花后 10、15、20、25、30、35 d 纤维、胚根、下胚轴、叶片、花瓣、花药。

1-14 indicate the ovules of -3, 0, 5 DPA, the fibers of 10, 15, 20, 25, 30, 35 DPA, radicle, hypocotyls, leaf, petal, anther, respectively.

本实验的实时定量 RT-PCR 结果与高尔基体的数目变化是很吻合的。因此棉花 LC3 蛋白可能是结合在由高尔基体分泌的小泡外膜表面的一种蛋白,通过与微管蛋白的作用使分泌小泡沿着微管骨架运输初生壁合成所需的物质。棉花 LC3 蛋白与微管的作用方式可能是直接作用,但鉴于 Mann 等^[4]的研究结果,也不排除其与重链结合在一起,通过调节重链与微管作用而使分泌小泡沿着微管运输胞壁物质的作用模式。

目前,对于 LC3 蛋白的研究主要集中于动物组织,将 *GhMAP1-LC3* 基因的表达特点与 LC3 蛋白在动物组织中的功能进行分析比较,能够为揭示其在棉纤维发育过程中的功能提供启迪。但应该承认,动物细胞与植物细胞在形态、结构、生理、代谢等方面存在着巨大的差异,不能仅仅通过简单的模拟来推测其在植物细胞中所执行的功能,因此 LC3 在棉纤维品质性状形成中起的作用还有待后续研究的证实。

致谢:本文工作在中国农业大学作物基因组学与遗传改良重点开放实验室完成,承蒙刘庆昌教授、李自超教授以及周海鹰、刘振英老师的关照与指导,谨致谢意!

References

- [1] Hirokawa N, Noda Y, Okada Y. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(1):60-73
- [2] Maccioni R B, Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev*, 1995, 75:835-864
- [3] Kuznetsov S A, Rodionov V I, Nadezhkina E S, Murphy D B, Gelfand V I. Identification of a 34 kD polypeptide as a light chain of microtubule-associated protein-1 (MAP-1) and its association with a MAP-1 peptide that binds to microtubules. *J Cell Biol*, 1986, 102(3): 1060-1066

- [4] Mann S S, Hammarback J A. Molecular characterization of light chain 3: a microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem*, 1994, 269:11492-11497
- [5] Jaakola L, Pirttila A M, Halonen, Hohtola A. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Mol Biotechnol*, 2001, 19: 201-203
- [6] Luscher B, Keller C A. Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Thero*, 2004, 102(3):195-221
- [7] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 2004, 117(13):2805-2812
- [8] Basra A S, Saha S. Cotton Fibers: Developmental Biology, Quality Improvement, and Textile Processing. New York: Food Products Press, 1999
- [9] Berlin J D. Cotton Physiology. Memphis, TN: The Cotton Foundation, 1986
- [10] Westafer J M, Brown R M. Electron microscopy of the cotton fiber: new observations on cell wall formation. *Cytobios*, 1976, 15:111-138
- [11] Roos U P, De Brabander M, Nuydens R. Movements of intracellular particles in undifferentiated amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskel*, 1987, 7:258-271
- [12] Pollock N, Koonce M P, de Hostos E L, Vale R D. *In vitro* microtubule-based organelle transport in wild-type *Dictyostelium* and cells overexpressing a truncated dynein heavy chain. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1998, 40(3):304-314
- [13] Sato-Harada R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Hirokawa N. Microtubule-associated proteins regulate microtubule function as the track for intracellular membrane organelle transports. *Cell Struct Funct*, 1996, 21:283-295