

棉花 ADP-ribosylation factor 基因 (*GhARF1*) 的克隆与表达分析

侯磊 李家宝 罗小英 王文锋 肖月华 罗明 裴炎* *

(农业部生物技术与品质改良重点开放实验室, 西南大学生物技术中心, 重庆 400716)

摘要: ADP-ribosylation factor (ARF) 是 GTP 结合蛋白, 属于小 G 蛋白超家族中的 ARF 亚家族成员, 在高尔基体小囊泡形成以及细胞信号传导中起重要作用。棉花纤维的发育需要高尔基体参与, 但 ARF 基因在棉花纤维发育中的功能尚不清楚。本文利用 GHA27 作探针, 筛选棉花花药的 cDNA 文库, 得到两个序列相同的阳性克隆。核苷酸序列分析表明该基因编码一个有 181 个氨基酸残基, 分子量约 20.7 kD 的蛋白, 与动物、酵母及其他植物的 ARF 基因有很高的相似性, 命名为 *GhARF1*。采用 PCR 技术获得该基因序列, 该基因含有 5 个外显子和 4 个内含子。进化树分析表明该基因更接近人类的 class I 类 ARF 基因, 在编码的氨基酸序列中具有保守的 GTP 结合区域, 即 P(GLDAAGKT)、G(NKQD) 以及 G'(DVGGQ)。Northern 杂交结果显示 *GhARF1* 基因在棉花的纤维、花冠和根中表达量较高, 特别是在纤维中的表达量最高, 在茎、花蕾中也有表达, 而在真叶、子叶和胚珠中的表达较微弱。Southern 杂交分析表明, ARF 基因在二倍体草棉和四倍体陆地棉基因组中均以多拷贝存在。

关键词: ADP 核糖基化因子; 结构特征; G 蛋白; 棉花

Cloning, Expression and Characterization of an ADP-ribosylation Factor Gene from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

HOU Lei, LI Jia-Bao, LUO Xiao-Ying, WANG Wen-Feng, XIAO Yue-Hua, LUO Ming, and PEI Yan*

(Key Laboratory of Biotechnology and Crop Quality Improvement, Ministry of Agriculture, Biotechnology Research Center, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is the most important fiber crop in the plant kingdom. In addition to their economic importance, cotton fibers are an ideal experimental material to study cell differentiation, cell elongation, cell wall biosynthesis. ADP-ribosylation factors (ARFs), a subfamily of the small GTP binding proteins superfamily, are believed to participate in vesicular transport and signal transduction events in the cell. The elongation of cotton fiber requires vesicle trafficking to deposit new wall material and increase plasma membrane area, but the function of ARF within the key developmental processes of fiber is still unknown. The positive clone was screened from cotton anther cDNA library using GHA27 as a probe, and its corresponding genome sequence was obtained by PCR. Southern and Northern blotting were employed to determine the gene copy number and gene expression level of *GhARF1* in cotton. The cDNA, designated as *GhARF1*, encoded a polypeptide of 181 amino acid residues with significant homology to the ADP-ribosylation factor (ARF) of mammalian, plant, yeast. Its deduced amino acid sequence showed that the 20.7 kD protein had consensus with GTP-binding domain P(GLDAAGKT), G'(DVGGQ), and G(NKQD). The DNA sequence of *GhARF1* is 1.5 kb in size, including five exons and four introns. Northern blotting showed that *GhARF1* transcript was detected mainly in root and corolla rather than in shoot, bud, leaf, cotyledon and ovule, and maximally in fiber. Southern hybridization suggested that *GhARF1* is encoded by multi-copies in the genome of *Gossypium herbaceum* or *Gossypium hirsutum*. High transcript level of *GhARF1* in fiber cells suggests that *GhARF1* may play a role in cotton fiber development, especially in fiber cell elongation.

Keywords: ADP-ribosylation factor; structural characteristics; GTP-binding protein; cotton

棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) 是最重要的天然纤维作物, 棉花生产在我国国民经济中占有重要的地

位。棉花纤维由胚珠外珠被表皮细胞在受精前后经分化突起、伸长和细胞壁增厚而形成, 随着纤维细胞

*基金项目: 国家自然科学基金项目(39870532, 30471055)

作者简介: 侯磊(1967-), 男, 博士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: houlei@swu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author): 裴炎(1948-), 男, 教授, 主要从事农业生物技术的研究。E-mail: peiyan3@swu.edu.cn

Received (收稿日期): 2007-01-12; Accepted (接受日期): 2007-02-26.

生长发育的进行,其极性生长越来越明显,最后长/径比可达 1 000 ~ 3 000,是研究植物细胞分化和形态建成的理想材料^[1]。ADP-ribosylation factor (ARF)是一种分子量约 21 kD 的一种 GTP 结合蛋白,属于小 G 蛋白超家族中的 ARF 亚家族^[2]。ARF 最初在研究霍乱毒素(cholera toxin)的作用机理时被发现^[3],霍乱毒素通过它的 A1 亚基催化 NAD⁺ 的 ADP-核糖单位结合到 G 蛋白的一个氨基酸残基上,使其只能与 GTP 结合而不能催化 GTP 水解,从而使细胞质中 cAMP 的含量增加,导致膜蛋白让大量水分进入肠腔,造成严重腹泻。随后又发现多种细菌毒素的生理作用均与核糖基化作用有关。目前已在哺乳动物、酵母、细菌中克隆了多种 ARF 基因,已有的研究表明,ARF 在动物和酵母细胞的高尔基体小囊泡形成以及细胞信号传导中起重要作用^[4-6]。虽然 ARF 蛋白的研究大多是在哺乳动物和酵母中进行的,但几个同源的 ARF 基因同样在植物中被克隆^[7-9, 14-17]。拟南芥 ARF1 基因在内质网与高尔基体间的小泡运输、维持高尔基体和内质网结构方面^[7-8],以及在溶酶体/液泡运输途径中起着重要作用^[9]。棉花开花后,随着纤维细胞的突起和快速伸长,不仅有物质的极性运输,而且有细胞膜的形成、细胞壁的扩展等过程,均需要有高尔基体以物质分泌的方式参与,但是有关 ARF 基因是否参与纤维发育过程,却未见相关文献。本实验从陆地棉花药的 cDNA 文库中克隆了棉花 ARF1 基因,并对其进行了序列、进化分析及表达特性研究。

1 材料与方法

1.1 供试棉花品种

陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种洞 A 种植于西南大学生物技术中心实验基地,常规田间管理。于开花当天挂牌标记纤维发育时期,分别提取花蕾、花冠、开花后 9 d 的胚珠以及纤维的 RNA。洞 A 的种子在湿润吸水纸上催芽,萌发后播于蛭石中,当 2 片真叶长出后取根、真叶、幼茎,分别提取 RNA。

1.2 主要试剂

异硫氰酸胍、Super-script II 逆转录酶为 GIBCO BRL 公司产品,ZAP-cDNA Synthesis Kit、Gigapack III Gold Cloning Kit 为 STRATAGENE 公司产品,尼龙膜、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP 和 Ready-To-Go 标记试剂盒为 Pharmacia 公司产品,DIG 标记试剂盒为 Roche 公司产品,LA Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品。其余试剂为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 花药总 RNA 的提取 参照本实验室的方法^[10],提取 2 g 棉花花药的总 RNA 备用。

1.3.2 棉花花药 cDNA 文库的构建 取 200 μg 棉花花药总 RNA,通过 GIBCO BRL 的 Super-script II 逆转录酶合成 cDNA 的第 1 链,按照 STRATAGENE 试剂盒操作手册进行 cDNA 第 2 链的合成、体外连接、 λ -ZAP 噬菌体的包装。

1.3.3 文库筛选及测序 将 cDNA-AFLP 回收的差异片段 GH27 标记为 DNA 探针。按照 Roche 公司 DIG 标记与检测操作手册进行探针的标记、原位杂交、结果检测。获得的阳性克隆由上海博亚生物技术公司进行 DNA 测序。

1.3.4 基因组序列扩增 采用改良的 CTAB 法^[11]提取棉花 DNA。根据得到的 *GhARF1* 的 cDNA 序列,在其 ORF 的上、下端设计特异引物 GhARF-up 5'-ATGGGGCTGTCTTTTGCTAAGC-3' 和 GhARF-down 5'-ACCCTTGTTAGCAATGTTGTTG-3',利用 PCR 技术从陆地棉基因组 DNA 中扩增出该基因 DNA 片段。PCR 反应的总体积为 25 μL ,含 10 \times LA Taq buffer 2.5 μL 、每种 dNTP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、1.5 mmol L^{-1} MgCl₂、模板 DNA 10 ng、上下游引物各 400 nmol L^{-1} 、LA Taq DNA 聚合酶 1 U。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 32 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。将扩增的 DNA 片段克隆到 T 载体 pGEM-T 中进行序列测定。

1.3.5 Southern 杂交 取 30 μg 草棉 DNA,限制性内切酶 *Hind* III 消化,各取 30 μg 陆地棉 DNA 分别用 *Sac* I、*Xho* I、*Bam* H I 和 *Eco* R V 消化,经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳后转移到尼龙膜上。按照 Pharmacia 公司 Ready-To-Go 标记操作手册标记探针。按照《分子克隆实验指南》中的方法预杂交、杂交、洗膜,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 湿法自显影检测杂交结果。

1.3.6 Northern 杂交 按前述的 RNA 提取方法,分别提取陆地棉根、幼茎、真叶、子叶、花蕾、花冠、纤维和胚珠的总 RNA。各取 40 μg 上述组织的总 RNA,采用《分子克隆实验指南》甲醛变性胶的方法电泳并转移至尼龙膜上。探针的标记、杂交及检测同 1.3.5。采用 BIO-RAD 公司的 Quantity One 1-D Analysis Software 分析图像。

2 结果与分析

2.1 陆地棉 ARF 基因的序列分析

从棉花洞 A 不育株和可育株花药发育的 cDNA-

AFLP 差别显示回收的差异片段中^[11], 选取 GHA27 作为探针, 筛选棉花花药的 cDNA 文库。共筛选了约十万个克隆, 其中含 2 个阳性克隆 pBGharf。测序结果表明, 这两个 cDNA 克隆的序列是一致的, 如图 1 中大写字母所示, pBGharf 中克隆的陆地棉 *GhARF1* 全长 795 bp, 其中, 在 5' 端有 97 bp 的非编码

区, 98~100 bp 为起始密码子, 从 98 bp 到 643 bp 间的 546 个碱基构成一个完整的开放阅读框, 编码 181 个氨基酸的蛋白质, 推测的分子量为 20.7 kD。然后是 152 bp 的 3' 端非编码区, 内含加尾信号 TAATTAA 及 PolyA 尾巴。

```

1 :GTGAGTGTTAAACATTGTTTGCCTTTTCAATTTCTTCTATTCCCTTGTTGCTTCCTCGGCAGCCTCTCGGTTTCTGAGTA
81 :ATCGAAGATAAAAAAGGATGGGGCTGCTTTTGCTAAGCTGTTTAGTCGACTGTTTGCCAAAGAAAGAGATGCGAATTCTT
1 : M G L S F A K L F S R L F A K K E M R I L
161 :ATGGTGGGTCTTGATGCTGCTGGTAAGACTACCATTTGTACAAGCTCAAGCTCGGTGAGATTGCTACTACCATTCCCAC
22 :M V G L D A A G K T T I L Y K L K L G E I V T T I P T
241 :CATTGgtatgctcttattgttaatTTTTTcttcaagcattTTTTtattgtttatagatattgatgcttattgctaccttt
49 : I G
321 :cccagGCTTTAATGTGGAGACCGTAGAATAAGAACATTAGCTTCACTGTTTGGGATGTTGGTGGTCAGGACAAGgtaa
51 : F N V E T V E Y K N I S F T V W D V G G Q D K
401 :tattacaggaacccgaaaatgttgacagaacaaccataattagtcacatctttaccattatattgtttccctgggtctt
481 :attgcttgatggaacatgatattttaccctgggttaactgtacaatocattgatgtttcaactaatggatgcttatgg
561 :acgatcttatgctcatgcatcagcatataagataatcataatctacatctactaatgccatctcgctcttctogtttat
641 :cctttgggtgatgaggagagcctatccatgctggtgctgtgcatattttggcatcttgccctttattgtattttcttgc
721 :aatccattgtgcttatggatggctctgtgctgattagattgtcattcgtcagcacataacatattcataagctacattta
801 :ttgctgctaccttgttcttctgttttctcctgaatgargaaggctccaatataattgcaacaacattatttcttcc
881 :ttataattaagtactggtgattttgtctgcaattgttgccttttgggtacttgcatttgctgtttcttaaaat
961 :ttaggagtgaatatctcgagctgatggcatgcttgccttaattggctttatgggaactttcagATTCGACCTTTGTGG
74 : I R P L W
1041 :AGGCACTATTTCCAAAACACTCAGGGGCTAATCTTTGTTGTTGATAGCAATGACCGTGACCGTGTGGTTGAGGCCAGGGA
79 :R H Y F Q N T Q G L I F V V D S N D R D R V V E A R D
1121 :TGAGCTTCATCGTATGCTAAATGAGgtgccagtttgccttcttgaactttgttggtttggtttctctgttaacttgaat
106 : E L H R M L N E
1201 :ttcaataatgaggtctacatgtagctgttatgcatgtgtaattactattttcaattattttgttgccttataatattgtgta
1281 :gGACGAGCTGAGGGATGCTGTGCTTCTTGTTTGCACCAAGCAAGATCTGCCGAATGCTATGAATGCTGCTGAGATTA
114 : D E L R D A V L L V F A N K Q D L P N A M N A A E I T
1361 :CTGATAAGCTTGGCCTTCACTCCCTTCGTCAGCGCCACTGgtataaccttttccctgtttgtttatttctagattggctt
141 : D K L G L H S L R Q R H W
1441 :gccagttgtctgttctgttttaaaatctctcttgtgagtcacagGTATATCCAGAGTACTTGTGCCACCTCTGGCGAAGG
154 : Y I Q S T C A T S G E G
1521 :GCTGTATGAGGGACTGGACTGGCTTTCCAACAACATTGCTAACAAGGGTTGAGGGTTGGTTGAATTCCAGTCATATCTTC
166 : L Y E G L D W L S N N I A N K G *
1601 :AGGCACTATCCTATTATTTTCTGGGTCCTTTTTAAGTTTTACAGGAAATGTATCAGATTGTGTTATATAATTAATATA
1681 :TATTCACCGTACTACTGAAATTAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

图 1 陆地棉 ADP-ribosylation factor 基因 (*GhARF1*) (Accession No. AJ421017) 内含子、外显子的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide of intron and exon and deduced amino acid sequences of cotton *GhARF1* (accession No. AJ421017)

大写字母、小写字母和星号分别表示 *GhARF1* 的 cDNA 序列、内含子序列和终止密码子, 下划线表示加 A 信号。

The sequence of cDNA, the sequence of intron and the stop codon were framed by uppercase, lowercase and asterisk respectively.

由上述 cDNA 序列设计的特异引物经 PCR 扩增陆地棉的基因组 DNA, 得到 1 条约 1.45 kb 的特异 DNA 带。序列分析表明该基因的编码区域内有 1 472 bp, 含有 5 个外显子和 4 个内含子。其中内含子长度分别为 80、629、136 和 84 bp。所有内含子的左右边界均为 gt-ag 结构, 保证在 RNA 加工过程中内含子被正确识别和切除。 *GhARF1* 的这种结构与任茂智所克隆的 *GhARF* 基因在基因长度、内含子长度以及对应内含子序列的一级结构等方面均不相

同, 表明本文所克隆的是一个新的 ARF 基因。

2.2 陆地棉 ARF 基因的进化树分析

根据基因大小、氨基酸序列、系统发生以及基因结构的异同, 人类基因组中的 6 个 ARF 基因被分成 3 类, 即 class I (HARF1~3), class II (HARF4~5) 和 class III (HARF6)^[12]。为明确所克隆的棉花 ARF 基因类别, 选取人类基因组中 6 个 ARF 基因、9 个类 ARF 基因和酵母中 3 个 ARF 基因进行多重序列比较, 并构建了无根进化树, 结果如图 2 所示。本文克

隆的棉花 ARF 基因与人类的 HARF1、HARF2 和 HARF3 聚在同一分支,与 HARF4~6 的距离较远。即该基因处于 I 类和 II 类 ARF 基因之间但更接近

于 I 类,因此命名为 *GhARF1*。图 2 的结果还表明与酵母 ScARF1 和 ScARF2 基因相比,*GhARF1* 与人类 class I 的亲缘关系更近。

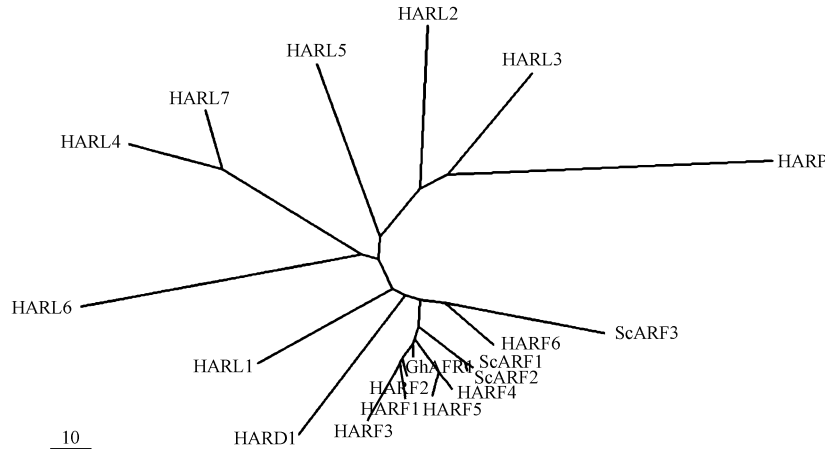


图 2 陆地棉 *GhARF1* 基因的无根进化树分析

Fig.2 Unrooted bootstrapped tree generated with MegAlign 5.01 of DNASTar software that compares the sequences of *GhARF1* protein with ARFs, ARLs, ARP and ARD from human (H) and *Saccharomyces cerevisiae* (Sc)

H 表示来自人,Sc 表示来自啤酒酵母。横条及数字表示每条序列中可被替换的氨基酸数目平均值。Scale bar indicates the mean number of amino acid substitutions per sequence position.

2.3 陆地棉 *GhARF1* 基因的多重比较分析

应用 NCBI 的 Blastn 在 GenBank 中进行 DNA 序列的相似性分析,结果表明, *GhARF1* 基因与其他植物、动物和酵母的 ARF 基因具有较高的相似性。其中与拟南芥 ARF1 基因的同源性为 86% (441/512)、与大豆的同源性为 84% (420/499),与小麦、长春花、胡萝卜、玉米等的同源性都为 83%。棉花 ARF1 基因编码的氨基酸序列与拟南芥、辣椒等的同源性达

到 99% (179/180),与小麦、水稻的同源性也达 98% (177/180)。目前植物中克隆的 ARF 基因大多数是第 I 类 ARF,它们的氨基酸序列相当保守,可能在植物发育中起重要作用。为了明确 *GhARF1* 基因编码蛋白的功能结构域,选择 HARF1、ScARF1 以及其他植物来源的 ARF 蛋白序列,进行同源性比对,得到如图 3 所示的结果。表明在棉花 ARF1 基因编码的氨基酸序列中,同样有保守的 GTP 结合区域,即 P

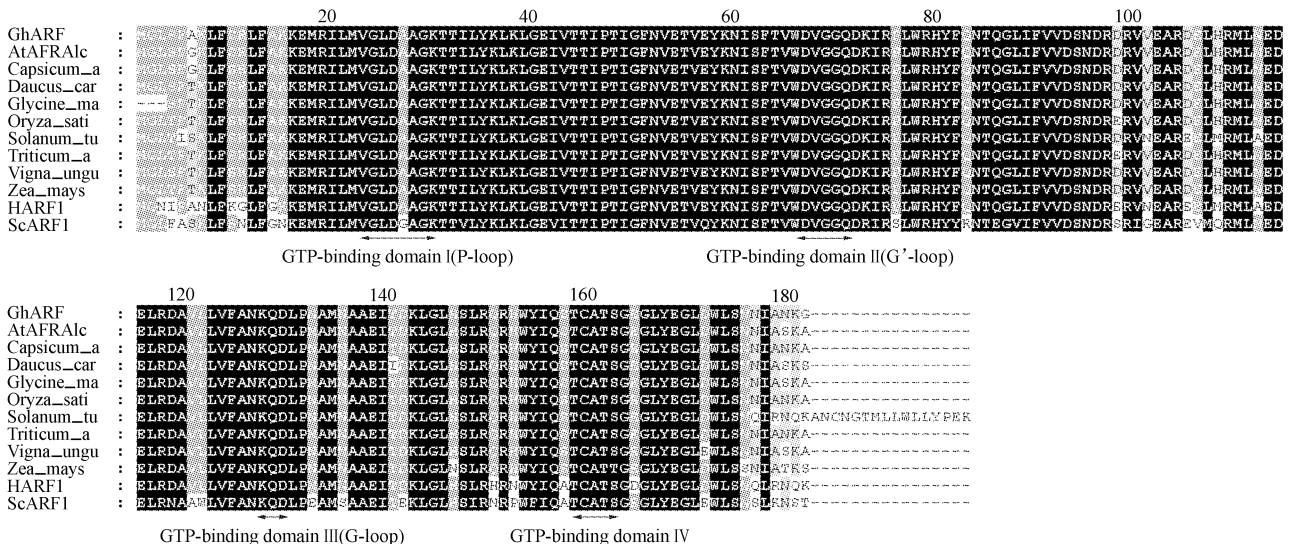


图 3 *GhARF1* 基因推测的氨基酸序列与人、酵母和其他植物 ARF 的同源性比较

Fig.3 Alignment of the deduced amino acid sequence of *GhARF1* and the other ARF sequence of human, yeast and plant

下划线的区域为推测的 GTP 结合域。

Putative domains (P, G', G) involved in GTP-binding are underlined.

(GLDAAGKT)区、G'(DVGGQ)区和 G(NKQD)区。说明所克隆的 *GhARF1* 的编码产物可能具有与 GTP 结合的功能。

2.4 陆地棉 *GhARF1* 在不同组织中的表达特性分析

选取 *GhARF1* 基因标记为探针,与提取的陆地棉根、幼茎、真叶、子叶、花蕾、花冠、纤维和胚珠的总 RNA 进行 Northern 杂交。结果(图 4)表明, *GhARF1* 基因在棉花纤维、花冠和根中表达较高,特别是在纤维中的表达量最高,说明该基因可能调控纤维、根等组织的极性生长。在茎、花蕾中也有表达,真叶、子叶和胚珠中的表达较微弱。表明 *GhARF1* 基因在棉花的整个生长发育过程中,可能具有重要的调节作用。

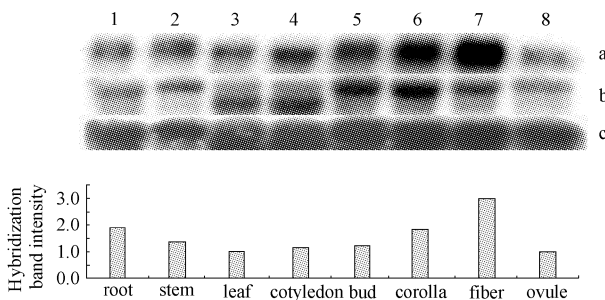


图 4 定量分析陆地棉 *GhARF1* 基因在不同组织中的转录水平

Fig. 4 Quantitative analysis of northern blotting using *GhARF1* and 18S rDNA as probes

1:根;2:茎;3:真叶;4:子叶;5:花蕾;6:花冠;7:纤维(9 DPA);8:胚珠(9 DPA)。

a: *GhARF1* 探针自显影 20 h;

b: 18S rDNA 探针自显影 2 h; c: 18S rDNA 探针自显影 20 h。

Total RNA isolated from cotton: (1) root, (2) stem, (3) leaf, (4) cotyledon, (5) bud, (6) corolla, (7) fiber (9 DPA) and (8) ovule (9 DPA) are subjected to electrophoresis in 1.5% denaturing agarose, transferred to Hybond-N⁺ membrane, hybridized with ³²P-labeled probes and autoradiographed for (a) 20 h, (b) 2 h, (c) 20 h.

2.5 陆地棉 *GhARF1* 基因在基因组中的结构分析

为探讨 *GhARF1* 基因在棉花基因组中的结构变化,将标记的 *GhARF1* 探针,对二倍体的草棉和四倍体的陆地棉的总 DNA 进行了 Southern 杂交分析。结果见图 5, *GhARF1* 探针在草棉基因组中检测到 3 条杂交信号,在陆地棉中也检测到多条阳性信号,数目由 2~6 个不等。由于所选用的内切酶 *Hind* III、*Eco* RV、*Bam* HI 等在基因内部无识别位点,因此这几种酶切时的杂交带基本上代表了棉花基因组中 *GhARF1* 基因的同源序列,表明该基因在棉花基因组中可能有多个拷贝。

3 讨论

3.1 小 G 蛋白基因对植物生长的调控作用

在细胞信号传递中除了与膜受体偶联的 G 蛋

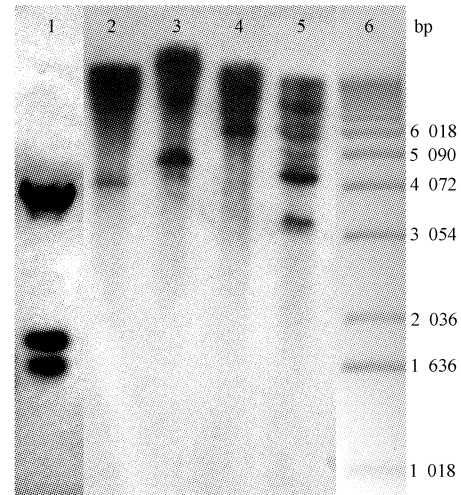


图 5 *GhARF1* 基因在棉花基因组中的 Southern 杂交结果

Fig. 5 Southern blot analysis of cotton genomic DNA

1: *Hind* III 消化的草棉 DNA, 2~5: *Sac* I、*Xho* I、*Bam* HI 和 *Eco* RV 消化的陆地棉 DNA, 6: Marker X (Roche)。

Lane 1: *Hind* III; Lane 2: *Sac* I; Lane 3: *Xho* I; Lane 4: *Bam* HI; Lane 5: *Eco* RV; Lane 6: Marker X (Roche)。

白外,还有其他类型的 GTP 结合蛋白,其中的一大类因其分子量较小(20~30 kD)被称为小 G 蛋白,包括 Ras、Rho、ARF、SEC₄、YPT₁ 等家族^[13]。在植物中也发现了这一类的小 G 蛋白 (Rop, Rho-related GTPase from Plant),作为膜上的信号开关,植物 Rop 蛋白参与多种发育过程,包括细胞极性伸长、次生壁合成、抗病反应和激素信号转导等。在植物根毛和花粉管极性伸长的过程中, Rop 蛋白始终定位于生长细胞的顶端细胞膜上,通过调节肌动蛋白骨架的排列控制细胞的极性生长^[14]。总之,在植物的生长发育过程中,小 G 蛋白作为分子开关调控许多植物特有的信号途径,从而影响植物细胞的生长、分化^[2]。

哺乳动物的 ARF 存在于高尔基体复合物中,通过与 GTP 结合成活化态的方式,改变膜脂成分,并影响膜表面蛋白,虽然其初始状态并不清楚,但是可促使高尔基体小囊泡从细胞质中的形成。因此, ARF 担负着高尔基体的形成、结构变化及跨膜物质运输等重要功能^[4-6]。从已克隆的植物 ARF 基因来看,它与动物 ARF1 基因有很高的同源性,而且在拟南芥、玉米、小麦、棉花等植物中氨基酸序列的相似性均大于 90%,说明该基因可能是普遍存在于显花植物中的一个保守基因。Verwoert 等在分离植物的丙二酸单酰辅酶 A 时,从玉米的 cDNA 文库中克隆到 ARF 基因,但未对其功能做进一步的研究^[15]。小麦 ARF 基因的表达不受冷、热、干旱和盐等逆境胁迫的诱导,但其表达具有组织特异性,在根中的表达

量要高于茎^[16]。同哺乳动物的 ARF1 一样,从拟南芥中克隆的 ARF1 基因不仅可以恢复酵母的 *arf* 突变体表型,而且也在内质网与高尔基体间的小泡运输,维持高尔基体和内质网结构方面起着重要作用^[7-9]。Xu 等的研究证实,拟南芥 ARF1 基因通过调控表皮细胞顶端-基部的极性运输,进而影响根毛的发育^[17]。

3.2 棉花中的小 G 蛋白

棉花纤维因其发育特点,近年来一直是作物分子生物学的热点。但由于目前棉花遗传转化较为困难,而棉花纤维发育又没有其他系统可以模拟^[18],因此,大多数基因研究仍停留在基因转录特性上,至今人们对控制棉花纤维的起始和伸长的分子机制仍不清楚。

棉花中的小 G 蛋白基因 *GhRac9* 和 *GhRac13* 首先被克隆出来,研究表明它们在初生壁和次生壁合成的转换时期大量表达,通过产生 H₂O₂ 引发棉纤维的次生壁合成^[19-20]。在棉花纤维起始和伸长时期 *GhRacA* 和 *GhRacB* 基因优势表达^[21]。任茂智等从陆地棉中克隆了 ARF 基因,研究表明该基因不仅在纤维中表达,而且在棉花的蕾、花和铃壳中优势表达,参与对整个生殖器官分化和发育的调控^[22]。本文克隆的棉花 *GhARF1* 基因,在基因组序列长度、内含子的大小和结构以及该基因在不同组织中的转录特性等方面,与上述 *GhARF* 基因相比均有很大差异,因此本文所克隆的是一个新的 ARF 基因,它在纤维中优势表达,可能调控纤维等细胞的极性生长。这些结果为进一步研究 ARF 基因在棉花发育中的功能和作用奠定了理论和物质基础。

4 结论

从棉花花药的 cDNA 文库中,克隆了陆地棉 ADP-ribosylation factor(*GhARF1*) 基因。该基因编码一个有 181 个氨基酸残基,分子量约 20.7 kD 的蛋白,与动物、酵母以及其他植物的 ARF 基因有很高的相似性,序列保守性高。序列进化树分析表明该基因属于 class I 类的 ARF 基因,而且,在编码的氨基酸序列中具有保守的 GTP 结合区域 P (GLDAAGKT)、G(NKQD)以及 G'(DVGGQ)。

该基因表达的组织特异性不强,在纤维中优势表达,在花冠、根、茎和花蕾中也有表达,真叶、子叶和胚珠中的表达较微弱。

References

[1] Zhong R Q, David H B, Zheng H Y. Fibers: a model for studying cell differentiation, cell elongation, and cell wall biosynthesis. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 477-479

[2] Yang Z B. Small GTPases: Versatile signaling switches in plants. *The Plant Cell*, 2002, 14 (suppl): 375-388

[3] Schleifer L S, Kahn R A, Hanski E, Northup J K, Sternweis P C, Gilman A G. Requirements for cholera toxin-dependent ADP-ribosylation of the purified regulatory component of adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 1982, 257(1): 20-23

[4] Hong J X, Haun R S, Tsai S C, Moss J, Vaughan M. Effect of ADP-ribosylation factor amino-terminal deletions on its GTP-dependent stimulation of cholera toxin activity. *J Biol Chem*, 1994, 269(13): 9743-9745

[5] Hong J X, Zhang X, Moss J, Vaughan M. Isolation of an amino-terminal deleted recombinant ADP-ribosylation factor 1 in an activated nucleotide-free state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(7): 3056-3059

[6] Julie G, Donaldson. Filling in the GAPS in the ADP-ribosylation factor story. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(8): 3792-3794

[7] Takeuchi M, Ueda T, Yahara N, Nakano A. Arf1 GTPase plays roles in the protein traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells. *Plant J*, 2002, 31(4): 499-515

[8] Lee M H, Min M K, Lee Y J, Jin J B, Shin D H, Kim D H, Lee K H, Wang I H. ADP-ribosylation factor 1 of *Arabidopsis* plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1507-1520

[9] Pimpl P, Hanton S L, Taylor J P, Pinto-DaSilva L L, Denecke J. The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell*, 2003, 15: 1242-1256

[10] Hou L (侯磊), Xiao Y-H (肖月华), Li X-B (李先碧), Wang W-F (王文锋), Luo X-Y (罗小英), Pei Y (裴炎). The cDNA-AFLP differential display in developing anthers between cotton male sterile and fertile line of 'Dong A'. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2002, 29(4): 284-289 (in Chinese with English abstract)

[11] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA mini-preparation: vision II. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1(4): 19

[12] D' Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(5): 347-358

[13] Sun D-Y (孙大业), Guo Y-L (郭艳林), Ma L-G (马力耕). Cell Signal Transduction (细胞信号转导), 2nd edn. Beijing: Science Press, 1998. pp 49-50 (in Chinese)

[14] Jones M A, Shen J J, Fu Y, Li H, Yang Z, Grierson C S. The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip Growth. *Plant Cell*, 2002, 14(4): 763-776

[15] Verwoert I I, Brown A, Slabas A R, Stuitje A R. A *Zea mays* GTP-binding protein of the ARF family complements an *Escherichia coli* mutant with a temperature-sensitive malonyl-coenzyme A: acyl carrier protein transacylase. *Plant Mol Biol*, 1995, 27(3): 629-633

[16] Kobayashi-Uehara A, Shimosaka E, Handa H. Cloning and expression analyses of cDNA encoding an ADP-ribosylation factor from wheat: tissue-specific expression of wheat ARF. *Plant Sci*, 2001, 160(3): 535-542

[17] Xu J, Scheres B. Dissection of *Arabidopsis* ADP-ribosylation factor 1 function in epidermal cell polarity. *Plant Cell*, 2005, 17(2): 525-536

[18] Ryser U. Cotton fiber initiation and histodifferentiation. In: Basra AS ed. Cotton fibers: Developmental Biology, Quality Improvement, and Textile Processing. New York: Food Products Press, 1999. pp 1-45

[19] Delmer D P, Pear J R, Andrawis A, Staiker D M. Genes encoding small GTP-binding proteins analogous to mammalian rac are preferentially expressed in developing cotton fibers. *Mol Gen Genet*, 1995, 248(1): 43-51

[20] Potkha T S, Collins C C, Johnson D J, Delmer D P, Levine A. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiol*, 1999, 119(3): 849-858

[21] Li X-B (李先碧), Xiao Y-H (肖月华), Luo M (罗明), Hou L (侯磊), Li D-M (李德谋), Luo X-Y (罗小英), Pei Y (裴炎). Cloning and expression analysis of two rac genes from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2005, 32(1): 72-78 (in Chinese with English abstract)

[22] Ren M-Z (任茂智), Chen Q-J (陈全家), Zhang R (张锐), Guo S-D (郭三堆). The structural characteristics, alternative splicing and genetic expression analysis of ADP-ribosylation-factor 1 (*arf1*) in cotton. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2004, 31(8): 850-857 (in Chinese with English abstract)