

Cloning and Expression Analysis of a LIM-Domain Protein Gene from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

LUO Ming, XIAO Yue-Hua, HOU Lei, LUO Xiao-Ying, LI De-Mou, PEI Yan^①

(Biotechnology Research Center, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract: LIM-domain protein plays an important role in various cellular processes, including construction of cytoskeleton, transcription control and signal transduction. Based on cotton fiber EST database and contig analysis, the coding region of a cotton LIM-domain protein gene (*GhLIM1*) was obtained by RT-PCR from 4DPA (day post anthesis) ovule with fiber. The cloned fragment of 848 bp contains an open reading frame of 570 bp, coding for a polypeptide of 189 amino acids. It was demonstrated that the deduced GhLIM1 protein was highly homologous to the LIM-domain protein of sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*) and *Arabidopsis thaliana*. Two intact LIM-domains, with the conserved sequence of a double zinc-finger structure (C-X2-C-X17~19-H-X2-C-X2-C-X2-C-X16~24-C-X2-H), were found in the GhLIM1 protein. RT-PCR and Northern blot analysis showed that *GhLIM1* gene expressed in root, shoot tip, hypocotyls, bud, leaf, anther, ovule and fiber (4DPA, 12DPA, 18DPA). However it was preferentially expressed in the shoot tip, fiber and ovule. It was proposed that the express of *GhLIM1* gene is related to cotton fiber development.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; LIM gene; fiber development

棉花 LIM 结构域基因(*GhLIM1*)的克隆和表达分析

罗明, 肖月华, 侯磊, 罗小英, 李德谋, 裴炎^①

(西南农业大学生物技术中心, 重庆 400716)

摘要: LIM 结构域蛋白是一个重要的发育调控因子, 参与基因转录、细胞骨架建成和信号传导等许多发育调控过程。胞质骨架是形成和稳定细胞形态以及传递物质、能量和信息的重要成分。为研究棉花纤维细胞发育过程中胞质骨架的形成和作用机理, 通过棉花纤维 EST 序列整合, 从陆地棉徐州 142 胚珠(含纤维)中扩增并克隆出棉花 LIM 结构域基因的编码区段。该棉花 LIM 结构域基因(*GhLIM1*)长 848 bp, 包含一个 570 bp 的开放阅读框, 推导的氨基酸序列(189 个氨基酸)与拟南芥、烟草和向日葵的 LIM 结构域蛋白有极高的同源性, 而且两个 LIM 结构域完整。每个 LIM 结构域具有植物 LIM 结构域共有的双锌指结构 C-X2-C-X17~19-H-X2-C-X2-C-X2-C-X16~24-C-X2-H。RT-PCR 和 Northern 杂交分析表明, 该基因(*GhLIM1*)在陆地棉的根、茎尖、下胚轴、叶片、花蕾、花药、胚珠和不同发育时期的陆地棉纤维(4DPA, 12DPA, 18DPA)以及海岛棉纤维(18DPA)和中棉纤维(12DPA)中均有表达, 但 *GhLIM1* 基因在茎尖、纤维和有纤维的胚珠中表达量更高, 因此 *GhLIM1* 基因应与棉花纤维发育有密切关系。

关键词: 棉花; LIM 基因; 纤维发育

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 0379-4172(2003)02-0175-08

收稿日期 2002-03-05; 修回日期 2002-11-06

基金项目 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39830240, 30170588 和 39870532), 国家教委博士点基金(批准号: 1999-006003), 国家转基因植物研究与产业化专项课题 [ZJY-A-01], National Natural Foundation of China (39830240, 30170588 and 39870532), Doctoral Student Foundation of Education Administration of China (1999-006003) and Project of Plant Transformation Research and Application (ZJY-A-01)]

① 通讯作者。E-mail: Peiyan@swau.edu.cn; Tel: 023-68251883

LIM (lin-11 isl-1 mec-3) 结构域蛋白是一种含锌的蛋白质,因最早发现于线虫的 *Lin-11* 基因而得名^[1]。在真核生物中,LIM 结构域蛋白是一个重要的发育调控因子,参与细胞的许多发育调控过程。例如:基因转录、细胞骨架建成和信号传导等^[2]。动物细胞中 LIM 结构域蛋白 CRP (cysteine-rich protein) 和 MLP (Muscle LIM Protein) 等蛋白的研究证明它可作为蛋白质识别的界面而介导蛋白质的相互作用^[3-6],能与斑联蛋白和 α -辅肌动蛋白相结合^[7-9],是肌动蛋白胞质骨架形成的必要成分^[10,11]。Baltz 首次在向日葵花粉中找到植物 LIM 结构域蛋白,并证明与花粉管生长有关^[12],Mundel 等发现 HaWLIM1 蛋白介导了肌动蛋白胞质骨架与细胞器膜和囊泡的结合,并在细胞质流动中具有重要作用^[10];由于在大多数细胞类型的细胞核都能检测到向日葵 HaWLIM1 蛋白,因此认为植物 LIM 蛋白与动物 LIM 蛋白一样也参与了基因转录,其原理可能是通过聚集和稳定转录复合体而起作用^[13]。Kawaoka 将反义的烟草 *NLIM1* 基因转入烟草培养细胞,进一步证明 LIM 蛋白参与了基因转录^[14]。

棉纤维是由棉花胚珠外珠被表皮层的单细胞分化发育而成。在发育过程中,极性生长十分明显,是研究细胞生长发育,特别是细胞伸长的理想材料^[15]。近年来的研究表明,胞质骨架在棉纤维细胞发育进程中具有重要作用^[15,16]。但胞质骨架影响纤维细胞发育的分子机理还知之甚少。为了深入研究胞质骨架在棉花纤维细胞分化和发育中的作用和机理,我们利用 GenBank 中棉花的 EST 信息从棉花中分离和克隆了一个 LIM 结构域蛋白基因 (*GhLIM1*),并对其表达特征进行了分析。

1 材料和方法

1.1 植物材料

陆地棉品种徐州 142 由中国棉花研究所提供。

1.2 棉花 DNA 和 RNA 的提取

棉花基因组 DNA 的提取采用本实验室改良的 CTAB 法^[17]。棉花组织 RNA 的提取用 CTAB 法提取植物组织的总 RNA。取新鲜植物材料液氮下磨成粉末,加入 65℃ 预热的 CTAB 提取液 (2% CTAB, 2% PVP, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 g/L Spermidine,

2.0 mol/L NaCl, 2% 巯基乙醇) 15 ml。65℃ 水浴 3 min 氯仿:异戊醇 (24:1) 抽提 2 次。加 1/4 体积 10 mol/L LiCl 溶液,4℃ 放置过夜。10 000 rpm/min 4℃ 离心 20 min,沉淀用 500 μ l SSTE 溶解。酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提 2 次。加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 溶液和 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 30 min 以上。12 000 rpm/min 4℃ 离心 20 min,沉淀用 70% 的酒精漂洗 1 次,风干。加 200 μ l 的 DEPC 处理水溶解。

1.3 cDNA 合成

用 TakaRa 公司的 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA,除起始 RNA 为 20 μ g 总 RNA 外,其余操作均按试剂盒说明书进行。

1.4 植物 LIM 结构域基因同源的棉花 EST 片段筛选

根据 GenBank 中提供的 LIM 结构域蛋白序列,通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 的 Protein Conservation Domain 程序比较获得相对保守区域。以此保守序列为探针用 BLASTN 程序对 GenBank 的棉花 EST 数据库进行电子信息杂交筛选,以期获得与探针序列同源的棉花 EST 片段。

1.5 cDNA 片段的克隆

选取同源性较高的 EST 片段,通过 DNA STAR 的 Seqman 程序将 EST 片段归纳为几个 EST 重叠群,并对重叠群进行整合和延长。根据其中的 1 条整合 EST 序列,设计 PCR 扩增引物: LIM-1 (5'-CATAGATC-CAGACCTTCTTCTTCTTC-3') 和 LIM-2 (5'-CTCTCCG-TTTGTTTGAGGCTTTGGTA-3')。以徐州 142 4DPA 胚珠 (含纤维) 的 cDNA 为模板,进行 cDNA 片段扩增。PCR 条件是 94℃ 预变性 5 min;随后以 94℃ 变性 1 min,56℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 1.5 min,进行 40 个循环;最后以 72℃ 延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳扩增产物并回收目标片段,然后克隆在 PUCm-T 载体上,鉴定后对其进行两端测序。

1.6 全长 cDNA 编码蛋白质序列分析

将 *GhLIM1* 全长氨基酸序列与已知的植物中的同源基因氨基酸序列送往 DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) 进行比较,并用 DNA STAR 分析软件进行相似性和系统进化分析。

1.7 RT-PCR 分析

操作程序参照 TakaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒说明书进行。

1.8 Southern 和 Northern 杂交分析

Southern 杂交:棉花基因组 DNA 用 *Hind* III、*Eco*R I + *Pst* I、*Eco*R V + *Bam*H I 和 *Dra* I 4 组限制性内切酶酶切后,按照《分子克隆手册》^[18]的方法进行电泳、转膜和杂交。探针包括 *GhLIM1* 基因的编码区域和部分 5'、3'非编码序列,通过随机引物法标记(³²P-dCTP)。Northern 杂交:取棉花不同组织的总 RNA 各 40 μg,按照《分子克隆手册》^[18]的方法进行电泳、转膜和杂交。探针和探针标记与 Southern 相同。以核糖体 RNA 溴化乙啶染色作为各组织总 RNA 上样量对照标准。

2 结果与分析

2.1 与 LIM 结构域基因同源的棉花 EST 序列的筛选和整合

保守序列的分析结果显示:LIM 结构域蛋白具有两个比较保守的氨基酸序列,一段序列是 CAGCGKPIYDREVVRRALDKVWHPECFRCAVCGKPLG-PGDFFEKDGKLYCKHDYYKLFG,另一段序列是 CAGCGKPIYDREVVRRALDKVWHPECFRCAVCGKPLG-PGDFFEKDGKLYCKHDYYKLFG。用这两段保守序列在棉花 EST 数据库中搜索到 11 条同源性较高的 EST。首先将这些序列归纳为 4 个重叠群。再通过降低同源性阈值,最终将 11 个 EST 片段整合为 2 个重叠群,其中一个重叠群包含 10 个 EST 片段,整合序列延伸至 1058 bp,含 1 个长的 ORF,起于 249 位,止于 818 位(图 1)。

2.2 棉花 LIM 基因的克隆和测序

根据整合序列和可能的 ORF,我们设计了寡核苷酸引物进行 PCR 扩增,得到与预期长度吻合的 PCR 扩增产物。通过扩增产物的回收、克隆、验证和两端测序,其序列与整合序列比较一致,长度为 848 bp。其中包含 1 个 570 bp 的开放阅读框,起于扩增序列的 145 位,止于 714 位,编码 189 个氨基酸(图 1)。取名为 *GhLIM1*(GenBank 登录号:AF443117)。

2.3 *GhLIM1* 的同源性和系统进化分析

GhLIM1 与向日葵、烟草和拟南芥的 LIM 结构域基因的相似性比较结果表明,*GhLIM1* 与向日葵、烟草和拟南芥中的 LIM 结构域蛋白具有较高的同源性。*GhLIM1* 与烟草的 NtWLM2 蛋白的氨基酸同源性高达 89.9%,与其他植物 LIM 蛋白的同源性为 54%~71%。不同蛋白区段的序列的保守程度变化很大(图 2)。N-端区域和两个 LIM 结构域保守性很高,LIM 间区序列的保守性却较低,C-端区域的保守性更低。

对已有植物 LIM 结构域蛋白的系统进化关系分析表明(图 3),LIM 蛋白首先可以分成 LIM1 和 LIM2 两组,这两组间的同源性较低,在这两组中又分别分出 PLIM 和 WLIM 两组。棉花的 *GhLIM1* 在系统进化分析中归于 WLIM2 组,与烟草的 NtWLM2 和拟南芥的 AtWLM2 同源性很高。

2.4 *GhLIM1* 蛋白结构分析

从图 2 可以看出,*GhLIM1* 具有植物 LIM 结构域的基本结构,首先是一个较短的 N-端(9 个氨基酸残基),然后是两个含有 52 个氨基酸残基的 LIM 结构域,其间是含有 50 个氨基酸的 LIM 间区,最后是仅有 30 个氨基酸残基的 C-端区域。两个 LIM 结构域的氨基酸序列都具有[-C-X2-C-X17~19-H-X2-C-X2-C-X2-C-X16~24-C-X2-H-]结构(图 2)。*GhLIM1* 与其他植物 LIM 蛋白一样每个 LIM 结构域的最后一个锌离子配基是组氨酸(H),而在动物中是 Cys(半胱氨酸)(图 2)。而且第二个 LIM 结构域中的第二个锌指的第二个配基的位置被甘氨酸(Gly)占据,使得正常的锌指结构-C-X2-C-X17-C-X2-H-不能形成。但由于 Gly 的前后具有另外两个配基 H 和 C(图 2),也可以推导出另一个锌指结构^[13]。

2.5 棉花 LIM 结构域基因的 Southern 杂交

GhLIM1 基因的 Southern 杂交分析结果(图 4)显示,*Hind* III、*Eco*R V + *Bam*H I、*Dra* I 3 个酶切泳道只有 1 条主带,说明 *GhLIM1* 基因在棉花基因组 DNA 中是单拷贝。由于 *GhLIM1* 基因编码区内有 1 个 *Pst* I 酶切位点,所以 *Pst* I + *Eco*R I 酶切泳道中有两个主带。除主带以外,每个泳道还有 1~3 条弱带,表明棉花基因组 DNA 中有与 *GhLIM1* 基因同源的其他基因存在。

CS: cccacttctctttttacaactccottcatttttgggttttgaaccccataagcccttttcaactcctttttatactc 76
 tcattttacgtttwtwycttttctttccatagatccaggsctkctcttcttcttmktcttttatcaaagttaatat 154
 AS: catagatccaggccttctcttcttcttcttcttcttcttatcaaagttaatat 50
 CS: aggcaaatataagagaagaagaatcgaattaaagtgtatcytgggaactagrtmaagawoagtagcatttggttttgatcc 232
 AS: aggcaaatataagagaagaagaatcgaattaaagtgtatctgtggaaactagataaagaacagtagcatttggttttgatcc 128
 CS: aaagyacattckagccatgtcgttttayygggtacycarcagaatgcaaggcttgsagaagacygtttatocwtyga 310
 AS: aaagcacattcgagccatgtcgtttattggtagcccaacagaatgcaaggcttgtgagaagactgtttatocagttga 206
 AAS: M S F I G T Q Q K C K A C E K T V Y P V E 21

CS: acttttgtckgcwgtgrrtycottaccataartcttggcttcaartgcagtcattgcaaaggacactaaagttg 386
 AS: acttttgtctcagatggagttccttaccataaatcttggctcgaagtgcagtcattgcaaaggacactaaagttg 282
 AAS: L L S A D G V P Y H K S C S K C S H C K G T L K L 46

CS: gstaattactcctcratggaagggtysttttaytgaagcctcatttgcagcaactmttcaaggagwccggkay 461
 AS: gtaattactcctcaatggaagggtttctttactgcaagcctcatttgcagcaactccttcaaggagacgggtaac 357
 AAS: A N Y S S M E G V L Y C K P H F E Q L F K E T G N 71

CS: ttcaacaagaatttccartcryctgcaagkcgactgagaagttactcccagactgacragatcaccwagcaa 535
 AS: ttcaacaaggatttccaattgtctgcaagcgactgagaagttactcccagactgacgagatcaccwagcaa 431
 AAS: F N K D F Q L S A K A A E K L T P E M T R S P S K 96

CS: agctgccagcatgttttccygggacacswmgaanaatgygctacttggmmaaactgwtatccactyagaagg 609
 AS: agctgccagcatgttttccygggacagctgaaanaatgygctacttggmmaaactgwtatccactyagaagg 505
 AAS: A A S M F S G T V E K C A T C G K T A Y P L E K V 121

CS: taacrgrgaaggacagctctaccacaartcatgtttcaartgctctcatrgtggotgcyctwtaaastccatcaaat686
 AS: taacagtagaaggacagcttaccctcaaatcatgtttcaagtgtctctcatrgtggotgctctttgagtcacatcaaat582
 AAS: T V E G Q S Y L K S C F K C S H G G C S L S P S N 146

CS: tatgcagcacttgaaggcattttgtactgcaaacatcacttctccarctytyttaaaggagaaaggaagctacaatc 763
 AS: tatgcagcacttgaaggcattttgtactgcaaacatcacttctccagctcttcaaggagaaaggaagctacaatc 658
 AAS: Y A A L E G I L Y C K H H F S Q L F K E K G S Y N 171

CS: atottatcaaatctgcatcaatcaagcgtacogctgcatcogttctctgaaggttgaatacctatgcatgttcttc 838
 AS: atottatcaaatccgcatcaatcaagcgtgocgctgcatcogttctctgaaggttgaatacctatgcatgttcttc 734
 AAS: H L I K S A S I K R A A A S V P E A 189

CS: gtctattccocatgtttgocgggtgttttctgattgatttctttgatttatgccaggagggggaaccgggaagaaaga 916
 AS: gtctattccocatgtttgocgggtgcttttctgattgatttctttgatttatgctcgggagggggaactggaaagaaaga 812
 CS: actogggttctctcogttttgttggaggtttgtatttattgatctaaagtagaagtgaatgttgaacangactct 994
 AS: actogggttctctcogttttgttggaggtttgttga 848
 CS: ctgtgcaagaattttttgcaattcaaatggctctttcgaattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1058

图 1 整合序列、扩增序列和氨基酸序列的排列

整合序列中 $s = G$ 或 C , $k = G$ 或 T , $m = A$ 或 C , $y = C$ 或 T , $r = G$ 或 A , $w = A$ 或 T (DNA STAR),
 CS 整合序列 ,AS 扩增序列 ,AAS 氨基酸序列。

Fig.1 co-alignment of the sequences of consensus amplified fragment and deduced amino acid.

In consensus sequences $s = G$ or C , $k = G$ or T , $m = A$ or C , $y = C$ or T , $r = G$ or A , $w = A$ or T (DNA STAR),
 CS :consensus sequences ,AS :amplified fragment sequences ,AAS :amino acid sequences.

2.6 GhLIM1 基因的 Northern 杂交和 RT-PCR 分
 析

提取不同组织和纤维发育不同时期的总 RNA ,

以棉花 LRR-RL 基因^[24]作内标 ,进行 RT-PCR 分析。
 结果(图 5)表明 ,GhLIM1 基因在棉花的根、下胚轴、
 叶、花药、徐州 142 4DPA 的胚珠(含纤维)、12DPA 和
 18DPA 的纤维中 ,以及海岛棉 18DPA 纤维和中棉

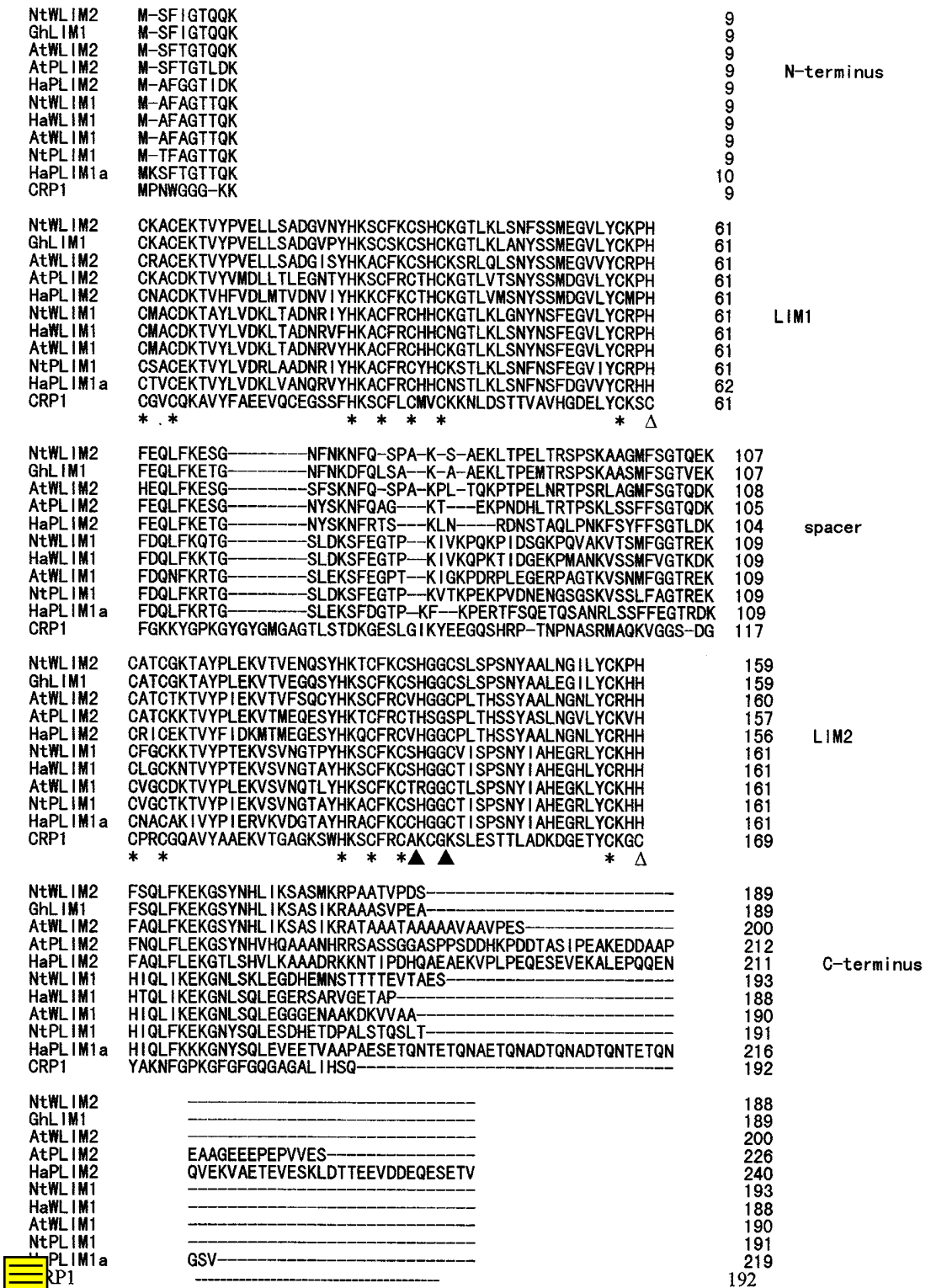


图 2 植物 LIM 结构域蛋白和动物 CRP1 蛋白的氨基酸序列排列比较

LIM 结构域蛋白分成 4 个部分 :N-端、两个 LIM 结构域、间区和 C-端进行排列。“ * ” 示锌指配基 ;

“ ▲ ” 示第二个 LIM 结构域的第二个锌指的两个可能配基 ; “ Δ ” 示 LIM 结构域的第二个锌指的最后一个配基。

Fig.2 Alignment of the LIM domain sequences of plant and animal's CRP1

To facilitate comparison ,the individual domains of the protein (N-terminal ,two LIM domains ,spacer and C-terminal regions) are aligned separately. The “ * ” indicate the zinc ligands ,while the two black triangles mark putative ligands in the second zinc finger of the second LIM domain in the plant protein and the open triangle mark the last zinc ligands in the second zinc finger of every LIM domain .

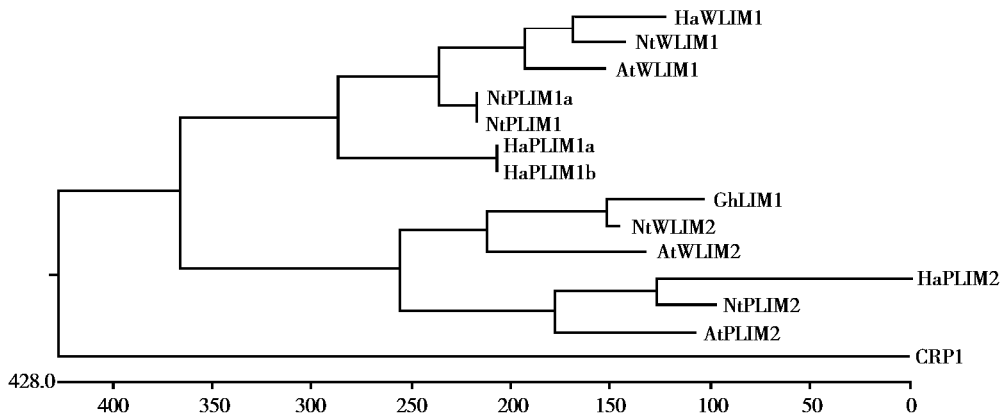


图3 LIM 结构域蛋白的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic relationships between the various plant LIM proteins as well as CRP1

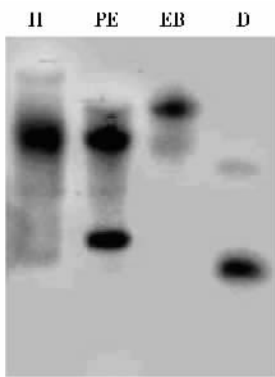


图4 棉花 *GhLIM1* 基因 Southern 杂交分析图谱
陆地棉基因组 DNA 经限制性内切酶酶切 0.7% 琼脂糖凝胶
电泳分离。用 ^{32}P -dCTP 标记的探针杂交。H : *Hind* III ,
PE : *Pst* I + *Eco* R I , EB : *Eco* R V + *Bam* H I , D : *Dra* I 。

Fig.4 Genomic Southern blot analysis of *Gossypium hirsutum* DNA probed with the coding region and partial 5' 3' flanking sequence of *GhLIM1* cDNA

Genomic DNA (25 μg) was digested using the indicated restriction enzymes. Separated on a 0.7% agarose gel and transferred to a nylon membrane. H : *Hind* III , PE : *Pst* I + *Eco* R I , EB : *Eco* R V + *Bam* H I , D : *Dra* I .

12DPA 纤维中也有表达。并且在花药和纤维,特别是 18DPA(海岛棉和陆地棉)的纤维中表达量相对较高。Northern 杂交分析的结果(图 6)表明, *GhLIM1* 基因在棉花茎尖中表达量最高,在纤维和有纤维的胚珠中表达量仅次于茎尖,而在无纤维的胚珠(徐州 142 无绒无絮 0DPA 胚珠)和根中表达较少,在叶和花蕾中表达最少。RT-PCR 和 Northern 分析的结果说明 *GhLIM1* 基因在棉花各组织中均有表达,但不同组织的表达水平却有较大的差异,在棉花纤维发育过程中有较强的表达,进一步证明 *GhLIM1* 基因

与纤维发育有密切的关系。

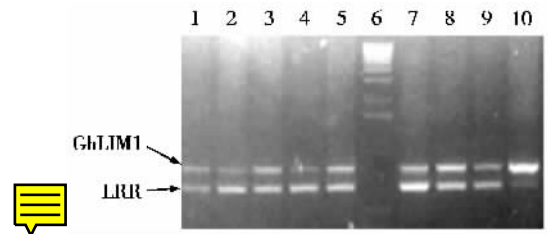


图5 棉花 *GhLIM1* 基因在各组织表达的 RT-PCR 分析

1 根 2 :下胚轴 3 花药 4 叶 5 4DPA 的胚珠(含纤维);
6 marker(ROCHE) 7 :12DPA 纤维 8 :18DPA 纤维;
9 :中棉 12DPA 纤维, 10 海岛棉 18DPA 纤维, 箭头
所示为 *GhLIM1* 片段和棉花 *LRR-RL* 基因片段
(在本实验中作内标)。

Fig.5 Expression of *GhLIM1* gene as revealed by RT-PCR analysis in cotton

1 :root 2 hypocotyle 3 :anther 4 leaf 5 4DPA(day post anthesis)
ovul(with fiber) 6 :marker(ROCHE) 7 :12DPA fiber 8 :18DPA
fiber 9 : *G. arboreum* 's 12DPA fiber , 10 : *G. barbadense* 's 18DPA
fiber. The positions of *GhLIM1* fragment and *LRR* fragment are
indicated by the arrows. The cotton *LRR* gene is regarded as
an intro-marker in the experiment.

3 讨论

3.1 棉花 LIM 结构域基因的命名

从植物 LIM 结构域蛋白的系统进化关系分析结果(图 3)可以看出,棉花的 *GhLIM1* 基因与 *NtWLIM2* 和 *AtWLIM2* 同源性很高,归于 *WLIM2* 组。*GhLIM1* 基因的表达分析结果表明 *GhLIM1* 在孢子体

和花粉中都有表达。按照 Eliasson 等人的研究结果:WLIM1 和 WLIM2 两组在孢子体组织中表达, PLIM1 和 PLIM2 两组仅在花粉粒中(至少在向日葵和烟草中是这样)表达^[13]。棉花 LIM 结构域基因似乎应命名为 *GhWLIM2*,但在棉花其他的 LIM 基因没有克隆和分析之前,我们仍保留原名。*GhLIM1* 基因的 Southern 杂交分析表明,在棉花基因组 DNA 中还存在与 *GhLIM1* 基因有较高同源性的序列,该序列有可能就是另一个棉花 LIM 结构域蛋白基因。

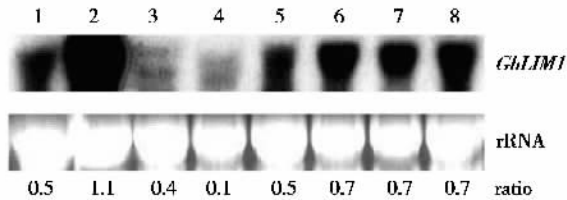


图 6 棉花 *GhLIM1* 基因 Northern 杂交分析图谱
取棉花根、茎尖、叶、花蕾、徐州 142 无绒无絮 0DPA 胚珠、徐州 142 野生型 4DPA 胚珠(含纤维)、12DPA 纤维和 12DPA 胚珠的总 RNA 40 μg ,经 1% 的琼脂糖甲基变性电泳分离转膜,用 Southern 杂交相同的探针杂交。
1 根 2 茎尖 3 叶 4 花蕾 5 徐州 142 无绒无絮 0DPA 胚珠;
6 徐州 142 野生型 4DPA 胚珠(含纤维);7 12DPA 纤维;
8 12DPA 胚珠。溴化乙啶染色的 rRNA 作为总 RNA 上样量标准。

Fig. 6 Northern blot analysis of total RNA from different tissues of *Gossypium hirsutum* hybridized to the radiolabelled coding region and partial 5' 3' flanking sequence of *GhLIM1* cDNA

1 root 2 shoot tip 3 leaf 4 bud 5 0DPA(day post anthesis) ovule of Xuzhou142 mutant 6 4DPA ovule (with fiber) 7 12DPA fiber 8 12DPA ovule. rRNA shows the total RNA loading control stained with ethidium bromide.

3.2 棉花 LIM 蛋白的功能

棉花 LIM 结构域基因(*GhLIM1*)虽然在本文所检测的组织中均有表达,但在棉纤维的不同时期和不同品种的棉纤维中表达均高,说明 *GhLIM1* 是棉纤维发育所必需的基因。*GhLIM1* 的氨基酸序列与其他植物 LIM 结构域蛋白一样,与动物的 CRP/MIP 蛋白具有相当数量的相同序列,而且都具有 4 个功能区域。说明植物 LIM 基因可能具有与 CRP 相似的功能。CRP/MIP 是肌动蛋白胞质骨架形成的必要成分^[7-11, 20, 21]。由此推测植物 LIM 结构域蛋白也与肌动蛋白胞质骨架有关,Baltz 证明 HaPLIM1 大量聚集在成熟花粉粒的萌发锥的表层区域,该区域富集

F-肌动蛋白(F-actin)^[22],说明该蛋白参与了花粉管生长。花粉生长被认为是由肌动蛋白复合体控制的^[23]。Mundel 等研究发现 HaWLIM1 在大多数细胞类型中与细胞器膜和囊泡的形成有关,认为该蛋白介导了肌动蛋白胞质骨架与这些结构的结合。并且在细胞质流动中具有重要作用^[10]。花粉管和棉纤维都是需要极性伸长的单细胞,其生长过程中不仅要维持一定的形态,而且需要相应的信息传递和物质交流。这些过程多少与胞质骨架有关,但棉花 LIM 结构域蛋白在纤维发育中的具体作用如何还有待于进一步研究。

3.3 棉花纤维中基因表达分析的内标

基因表达分析中的内标是样品 RNA 质量和数量的标志,其特点是它在参与分析的各组织及其不同发育时期,内标的量比较稳定。常用的内标有肌动蛋白、组蛋白、核糖体 RNA(16S 或 28S)以及微管蛋白等基因。内标的选择与特定的组织有关。许多研究表明,纤维的这种发育过程与细胞骨架有密切的关系^[15]。不同微管蛋白在纤维的不同发育时期表达量明显变化^[15],肌动蛋白在纤维的不同发育时期表达量的变化还不十分确定,但由于其与细胞的极性生长紧密相关^[20],所以也不宜作为棉花纤维中基因表达分析的内标。本文中使用的棉花 LRR (Leucine Rich Repeat)基因(*GhLRR-RL*)作为内标,是因为本实验室研究了该基因在棉花各组织及纤维不同发育时期的表达特征,证明该基因在各组织及纤维不同发育时期的表达较稳定^[24]。组蛋白和核糖体 RNA 也许是棉花纤维中基因表达分析的理想内标,但使用时也应当具体研究。

参考文献(References):

- [1] Gwen Freydt, Stuart K Kim, H Robert Horvitz. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature*, 1990, 344(26): 876 ~ 879.
- [2] Dawid I B, Toyama R, Taira M. LIM domain proteins. *C R Acad Sci [III]*, 1995, 318: 295 ~ 306.
- [3] Schmeichel K L, Beckerle M C. The domain is a modular protein-binding interface. *Cell*, 1994, 79: 211 ~ 219.
- [4] Jurata L W, Pfaff S L, Gill G N. The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerization of LIM domain transcription factors. *J Biol Chem*, 1998, 273: 3152 ~ 3157.
- [5] LI Rong, WANG Ji-Shu, SUN Qiang, WANG Jian, ZHOU Peng, HAN Hua. Expression of LIM protein KyoT in adult mouse testis. *Acta Bio-*

chemica et Biophysica 2001 33(4) :401 ~ 404.

李荣,王冀妹,孙强,王键,周鹏,韩骅. LIM结构域蛋白KyoT在成年小鼠睾丸中的表达. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(4) :401 ~ 404.

- [6] LI Rong ,WANG Ji-Shu ,SUN Qiang ,WANG Jian ,YANG Xi ,HUANG Hong-Yan ,ZHOU Peng ,HAN Hua. Screening and Detecting of Proteins Interaction with KyoT. *Acta Genetica Sinica* 2002 29(2) :175 ~ 180.
- 李荣,王冀妹,孙强,王键,杨曦,黄红燕,周鹏,韩骅. LIM结构域蛋白KyoT相互作用分子的筛选. 遗传学报, 2002 29(2) :175 ~ 180.
- [7] Sadler L ,Crawford A W ,Michelsen J W ,Beckerle M C. Zyxin and cCRP: two interactive LIM domain protein associated with the cytoskeleton. *J Cell Biol* ,1992 ,119 :1573 ~ 1587.
- [8] Louis H A ,Pino J D ,Schmeichel K L ,Pomies P ,Beckerle M C. Comparison of three member of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem* ,1997 272 :27484 ~ 27491.
- [9] Pomies P ,Louis H A ,Beckerle M C. CRP1 ,a LIM domain protein implicated in muscle differentiation ,interacts with alpha-actinin. *J Cell Biol* ,1997 ,139 :157 ~ 168.
- [10] Christophe Mundel ,Rachel Baltz ,Åsa Eliasson ,Roberte Bronner ,Nathalie Grass ,Regina Krauter ,Jean-Luc Evrard ,André Steinmetz. A LIM-domain protein from sunflower is localized to the cytoplasm and/or nucleus in a wide variety of tissues and is associated with the phragmoplast in dividing cells. *Plant Molecular Biology* ,2000 ,42 :291 ~ 302.
- [11] Alan D. Agulnick ,Masanori Taira ,Joseph J. Breen ,Tomohiro Tanaka ,Igor B Dawid ,Heiner Westphal. Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* ,1996 ,384 (21) :270 ~ 272.
- [12] Baltz R ,Domon C ,Pillay D T N ,Steinmetz A. Characterization of a pollen-specific cDNA from sunflower encoding a zinc finger protein. *Plant J* ,1992a 2 :713 ~ 721.
- [13] Å Eliasson ,Gass ,C Mundel ,R Baltz. Molecular and expression analysis of a LIM proteingene family from flowering plants. *Mol Gen Genet* ,2000 264 :257 ~ 267.
- [14] Kawaoka A ,Ebinuma H. Transcriptional control of lignin biosynthesis by tobacco LIM protein. *Phytochemistry* 2001 85(7) :1149 ~ 1157.
- [15] David J Whittaker ,Barbara A. Triplett. Gene-Specific Changes in α -Tubulin Transcript Accumulation in Developing Cotton Fibers. *Plant*

Physiology ,1999 ,121 :181 ~ 188.

- [16] Diego Breviario Peter Nick. Plant tubulins :a melting pot for basic questions and Promising applications. *Transgenic Research* ,2000 ,9 :383 ~ 393.
- [17] XIAO Yue-Hua ,LUO Ming ,FANG Wei-Guo ,LUO Ke-Ming ,HOU Lei ,LUO Xiao-Ying ,PEI Yan. PCR Walking in Cotton Genome Using YADE Method. *Acta Genetica Sinica* 2002 29(1) :62 ~ 66.
- 肖月华,罗明,方卫国,罗克明,侯磊,罗小英,裴炎. 利用YADE法进行棉花基因组PCR步行. 遗传学报, 2002, 29(1) :62 ~ 66.
- [18] J Sambrook ,E F Fritsch ,T Maniatis. Molecular Cloning a Laboratory Manual (2nd ed) ,Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.
- [19] ZHAO Yong ,WEI Ying-Jie ,CAO Hui-Qing ,DING Jin-Feng. Molecular Cloning of *NELIN* ,a Putative Human Cytoskeleton Regulation Gene. *Acta Biochemica et Biophysica* 2001 33(1) :19 ~ 24.
- 赵勇,魏英杰,曹慧青,丁金凤. 人细胞骨架调节蛋白基因*NELIN* cDNA的克隆及特征分析. 生物化学与生物物理学报, 2001 33(1) :19 ~ 24.
- [20] Neng Yang ,Osamu Higuchi ,Kazumasa Ohashi ,Kyoko Nagata ,Atsushi Wada ,Kenji Kangawa ,Eisuke Nishida ,Kensaku Mizuno. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* ,1998 393(25) :809 ~ 812.
- [21] Silvia Arber ,Freda A Barbayannis ,Hartwig Hanser ,Corinna Schneider ,Clement A Stanyon ,Ora Bernard ,Pico Caroni. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* ,1998 393(25) :805 ~ 809.
- [22] Baltz R ,Schmit AC ,Kohnen M ,Hentges F ,Steinmetz A. Differential localization of the LIM domain protein PLIM-1 in microspores and mature pollen grains from sunflower. *Sex Plant Report* ,1999 ,12 :60 ~ 65.
- [23] Mascarenhas J P. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* ,1993 5 :1303 ~ 1314.
- [24] XIAO Yue-Hua ,LUO Ming ,HOU Lei ,LUO Ke-Ming ,LUO Xiao-Ying ,PEI Yan. Cloning and Characterization of a LRR Resistance Like (*GhLRR-RL*) Protein Gene from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Genetica Sinica* 2002 29(7) :653 ~ 658.
- 肖月华,罗明,侯磊,罗克明,罗小英,裴炎. 棉花类LRR抗病蛋白(*GhLRR-RL*)基因的克隆及表达分析. 遗传学报, 2002 29(7) :653 ~ 658.

(责任编辑:周素)