

甘蓝型油菜 ADP-核糖基化因子基因全长 cDNA 克隆及表达分析

刘 薇, 赵 云, 安金玲, 王茂林

(四川大学生命科学院, 成都 610064)

摘要: 【目的】克隆甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 矮化突变体“NDF-1”和野生型近等基因系亲本“3529”中 ADP-核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF) 基因全长 cDNA, 分析矮化突变体中该基因在不同组织中的表达水平, 探讨矮化突变体中该基因在甘蓝型油菜茎秆发育过程中的作用。【方法】采用 SSH (suppression subtractive hybridization)、RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 和 RT-PCR 技术, 克隆甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”和野生型“3529”中的 ARF 基因的全长 cDNA 序列。分别采集甘蓝型油菜野生型和矮化突变体苗期子叶、薹期根、茎尖和真叶, 采用相对定量 PCR 方法检测矮化突变体中该基因的表达。【结果】获得了甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”和野生型“3529”的 ARF 基因的全长 cDNA, 分别命名为 *BnARF* 和 *BnARF-h*。序列分析表明: 这两个基因长度分别为 837 和 802 bp, 都含有 546 bp 的完整开放阅读框 (ORF), 编码 181 个氨基酸, 与其它植物、动物和酵母的 ARF 基因有很高的相似性。*BnARF* 基因在野生型和矮化突变体的根、子叶、茎尖和真叶中均有表达, 其中在子叶中表达量最高, 真叶中次之, 根和茎尖中的表达量最少。同时 *BnARF* 在矮化突变体的根、子叶和茎尖中的表达量都显著低于野生型, 但在真叶中表达量相近。【结论】克隆了甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”和野生型“3529”中 ADP-核糖基化因子基因的全长 cDNA, 这两个 ARF 基因的序列上有两处碱基存在差异, 其中一处是错义突变, 推测这一突变可能与植株矮化有关。而 *BnARF* 基因在野生型和矮化突变体的根、子叶和茎尖的表达存在显著性差异, 可能参与了甘蓝型油菜的矮秆发育过程。

关键词: 甘蓝型油菜; ADP-核糖基化作用因子; 相对定量 PCR; 矮化突变

Full-length cDNA Cloning and Expression Analysis of ADP-ribosylation Factor in *Brassica napus* L.

LIU Wei, ZHAO Yun, AN Jin-ling, WANG Mao-lin

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: 【Objective】 This experiment was designated to clone the full-length cDNA of ADP-ribosylation factor (ARF) from the dwarf mutant NDF-1 and its wild type 3529 of *Brassica napus* L. and to analyze its expression in different organs, so as to study the relationship of ARF with the dwarfism in the dwarfing mutant. 【Method】 Suppression subtractive hybridization, rapid-amplification of cDNA ends strategy and RT-PCR were used to clone full-length cDNA of ARF from the dwarf mutant NDF-1 and its wild type 3529. Semi-quantitative RT-PCR was conducted to investigate the expression levels of the ARF in root, cotyledon, stem and leaf samples from both wild and mutant types. 【Result】 A full-length cDNA of ARF in the dwarf mutant NDF-1 and its wild type 3529 were cloned, and named as *BnARF* and *BnARF-h*, respectively. Sequencing and analysis revealed that those two genes are 837 bps and 802 bps in length, respectively, and both contain 546 bp open reading frame encoding 181 amino acid residues, and has significant homology to the ARF of plant, mammalian and yeast. Semi-quantitative RT-PCR indicated that *BnARF* gene expressed in all the analyzed tissues in both the dwarf mutant and its wild-type parent. The expression level was found higher in

收稿日期: 2007-11-22; 接受日期: 2008-04-28

基金项目: 国家“863”(2001AA241104)及四川省“十一五”油菜育种攻关项目(200607001)

作者简介: 刘 薇(1982—), 女, 四川广汉人, 硕士研究生, 研究方向为植物分子遗传学。E-mail: julia.008@163.com。通讯作者王茂林(1965—), 男, 四川营山人, 教授, 研究方向为植物分子生物学及油菜遗传育种。Tel: 028-85418776; E-mail: mlwang@scu.edu.cn

cotyledon than in leaf, and rather higher than in root and stem. Moreover, significant difference in expression of this gene was detected in root, cotyledon and stem, but not in leaf between the dwarf mutant and the wild type. 【Conclusion】 *BnARF* and *BnARF-h* full cDNA sequence were successfully cloned. There was one nucleotide diverged between the dwarf mutant NDF-1 and its wild type 3529 ARF cDNAs, i.e., GAT/AAT. The amino acid replacement (Asp/Asn) caused by GAT/AAT may result in dwarfism in NDF-1. The dwarf mutant showed significantly lower expression of *BnARF* in root, cotyledon and stem than that in the tall wild type, suggesting that *BnARF* may play a role in the dwarfism development of the dwarf mutant in *Brassica napus* L..

Key words: *Brassica napus* L.; ADP-ribosylation factor; Semi-quantitative RT-PCR; Dwarf mutant

0 引言

【研究意义】甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”是用快中子轰击及化学诱变剂硫酸二乙酯 (DES) 联合处理再自交纯合后获得的矮秆品系, 是一个在油菜育种中具有重要利用价值的矮秆基因资源。其遗传受一对呈加性效应的基因 (*ndf1/ndf1*) 控制, 显性效应不显著。“NDF-1”具有优良的农艺性状如收获指数高、早熟等^[1], 但环境因素对株高表现有一定影响。ADP-核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF) 是小 G 蛋白 Ras 超家族的 ARF 亚家庭中的一个成员, 可能在甘蓝型油菜的茎秆发育中具有重要作用。【前人研究进展】ARF 是一种分子量约 21 kD 的 GTP 结合蛋白。象 Ras 蛋白一样, ARF 与 GTP 结合的形式是有活性的, 而其活性持续时间由 GTP 酶活化蛋白 (GTPase-activating protein, GAP) 控制^[3]。ARF 最初在研究霍乱毒素 (cholera toxin) 的作用机理时被发现^[4], 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。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的作用^[5-7]。在拟南芥细胞的研究表明: 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, 以及在溶酶体/液泡运输途径中起着重要作用^[8-10]。另外, ARF 还在质膜和细胞质之间生长素的极性运输中起重要作用^[11-12]。【本研究切入点】尽管目前已在哺乳动物、酵母、细菌、植物中克隆了多种 ARF 基因, 但在甘蓝型油菜中 ADP-核糖基化因子的研究尚未见报道。ADP-核糖基化因子基因在甘蓝型油菜不同组织中的表达特点及其与茎秆发育的相关性尚不清楚。【拟解决的关键问题】本研究采用 SSH、RACE 和 RT-PCR 技术克隆了甘蓝型油菜矮化突变体

“NDF-1”和野生型近等基因系亲本“3529”中的 ARF 基因的全长 cDNA 序列, 同时检测了矮化突变体“NDF-1”中该基因在野生型和矮化突变型不同组织的表达, 旨在阐明 *BnARF* 参与甘蓝型油菜茎秆发育的可能机制, 为进一步认识甘蓝型油菜矮化机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

1.1.1 植物材料 甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”及其野生型亲本“3529”由四川大学生命科学学院油菜课题组提供, 种植于四川大学试验基地。

野生型亲本“3529”是甘蓝型油菜高秆纯合自交系, 为本实验室自育材料, 系由孤雌生殖产生的单倍体经染色体加倍形成的 DH 系。

矮化突变体“NDF-1”为“3529”经诱变获得的矮秆突变株系, 株高仅 70 cm 左右。

1.1.2 主要试剂 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 JM 109, pMD18-T vector、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、X-gal, IPTG, 均购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司 (中国大连) 公司。DNA 分子量标准, TRIZOL 总 RNA 抽提试剂盒、AMVDNA 回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司, 其余试剂为国产分析纯。PCR 引物合成和 DNA 测序均由北京三博远志生物有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 甘蓝型油菜中腺苷酸核糖基化因子基因的克隆、序列测定与分析 以甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”及野生型“3529”为材料构建差异表达抑制消减 cDNA 文库 (方法同周增光等^[13]), 从中筛选到一个编码腺苷酸核糖基化因子基因的已测序片段, 通过 BLAST 比对, 发现该片段位于全长 cDNA 的中间, 采用 5' RACE 和 3' RACE 技术进行腺苷酸核糖基化因子全长 cDNA 克隆。利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 PCR 引物:

扩增 5'端的引物: M8-1: 5'-TCCGAAACTTTCA
CGCAGAGTTAAG-3';

M8L2: 3'-CTTCACAGTCTGGGATGTCCG-5';

扩增 3'端的引物: M8R1: 5'-GGATCCTCCAAAT
GCCATGAAC-3';

M8R2: 5'-CACCGATAAGCTTGGTCTCCACT-3'.

以 M8-1 和 M8L2 为引物进行 PCR, 扩增出基因的 5'端; 再分别以 M8R1 和 Nested primer2R (5'-AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'), M8R2 和 Nested primer2R 为引物进行两轮 PCR, 扩增出基因的 3'端。

以甘蓝型油菜野生型亲本“3529”为材料, 提取苗期茎尖的 RNA (方法同张年辉等^[14]), 得到的 RNA 按照 cDNA 合成试剂盒的说明进行 cDNA 第一条链的合成, 并以此 cDNA 为模板, 根据拟南芥 *AtARF* 基因包括编码区在内的 cDNA 序列, 设计了一对引物: M8-1 和 M8-3: 5'-GAAGTAGAGTAAATCTTCGAT TACA-3'进行 PCR 扩增。

反应总体积 25 μ l, 包括 2.5 μ l 10 \times PCR buffer, 1.5 μ l Mg^{2+} , 1 μ l (20 ng $\cdot\mu$ l⁻¹) 模板, 1 μ l dNTP Mix (各 10 mmol \cdot L⁻¹), 0.5 μ l Taq 酶, 10 mmol \cdot L⁻¹ 引物各 1.0 μ l, ddH₂O 16.5 μ l。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1%的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 反应在美国 MJ Research 公司的 PTC-100TM 型 PCR 仪上进行。PCR 扩增产物凝胶电泳后回收特异片段 (Omega 公司出产的 E. Z. N. A Gel Extraction Kit)。回收片段克隆到 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 筛选重组子并测序。测序得到的矮化突变体“NDF-1”的腺苷酸核糖基化因子基因 5'端序列、3'端序列和已知中间序列拼接, 获得基因 cDNA 全序列。

应用 DNAMAN 分析软件进行 ARF 基因的序列比对分析。利用 PROSITE 软件分析蛋白功能结构域。

1.2.2 RT-PCR 检测 *BnARF* 基因在甘蓝型油菜不同组织、器官中的特异性表达 采用 Trizol 方法分别提取甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”及野生型亲本“3529”的薹期根、茎、真叶和幼期苗子叶总 RNA, 反转录合成 cDNA (TOYOBO First Strand First Strand cDNA Synthesis Kit)。

以 β -Actin 基因为内参, 采用相对定量 PCR 方法, 检测该基因在甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”及其野生型亲本“3529”的根、子叶、茎尖和真叶组织中

的表达情况。引物 M1: 5'-TCCGAAACTTTCACGCA GAGTTAAG-3'和 M2: 5'-CGAAAGAAGTAGAGTAA ATCTTCGA-3', 用于扩增甘蓝型油菜 *BnARF* 基因, 片段大小为 809 bp; 引物 A₁: 5'-GTGACAATGGA ACT GGAATGG-3'和 A₂: 5'-AGACGGAGGATAGCGTGA GG-3'用于扩增-Actin 基因, 片段大小为 498 bp。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。内参 26 个循环的时候就取出。扩增产物用 1% 琼脂糖电泳后 EB 染色, 凝胶成像系统拍照, 分析结果。试验重复 3 次, 采用 TotalLab 2.0 电泳分析软件对 PCR 条带进行密度扫描分析, 目的片段和相应的 β -Actin 的比值做为试验数据。数据采用 SPSS 10.0 统计软件包进行分析, 各组数据用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜腺苷酸核糖基化因子全长 cDNA 的克隆

以甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”的 cDNA 为模板, 5'RACE 扩增得到 1 条 240 bp 左右的片段 (图 1-A)。3'RACE 采用巢式扩增得到 1 条约为 436 bp 的片段 (图 1-B)。5'RACE 和 3'RACE 扩增到的片段与基因中间片段均有一段完全重叠的区域, 说明克隆到的是基因的 5'端和 3'端。

对 SSH 文库中已得到的 *BnARF* 部分序列 (288 bp) 和 RACE 产物进行测序和拼接, 结果表明: 该 cDNA 全长 837 bp, 其中 5'端有 27 bp 的非编码区 (UTR), 28~30 bp 为起始密码子, 从 28 bp 到 573 bp 间的 546 个碱基构成一个完整开放阅读框 (ORF), 编码 181 个氨基酸, 然后是 264 bp 的 3'端非编码区 (UTR)。与其它的 ARF 基因十分相似, 拟将此基因命名为 *BnARF* (GenBank 登陆号为 EU593895)。经分析表明, 该 cDNA 在起始密码子 ATG 的-3 位为 A, 符合 Kozak 规律, 在 3'端有 polyA 尾, 这些都符合有效翻译的基因全长 cDNA 的特征。

以甘蓝型油菜野生型亲本“3529”cDNA 为模板, RT-PCR 扩增得到一条约为 802 bp 左右的片段 (图 1-C), 与预计的拟南芥 *AtARF* 基因包括编码区在内的序列大小一致。测序结果显示, 克隆的 cDNA 片段长度为 802 bp, 含有一个完整的开放阅读框, 显示已成功克隆到野生型亲本“3529”中腺苷酸核糖基化因

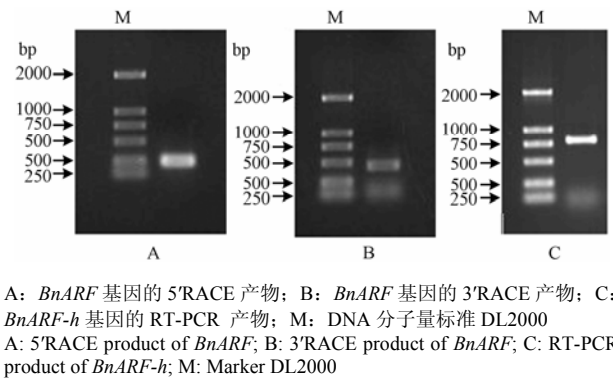


图 1 *BnARF* 基因的 5'与 3'端扩增结果以及 *BnARF-h* 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Electrophoresis results of *BnARF* and *BnARF-h*

子基因的全长 cDNA 序列, 将此基因命名为 *BnARF-h* (GenBank 登陆号为 EU595666)。

2.2 甘蓝型油菜 ADP-核糖基化因子基因的 cDNA 和氨基酸序列分析

应用 DNAMAN 序列分析软件对已成功克隆的甘蓝型油菜野生型亲本“3529”和矮化突变体“NDF-1”中 ADP-核糖基化因子基因全长 cDNA 序列进行比对(图 2)。结果显示这两段 cDNA 结构非常相似, 编码的蛋白质均由 181 个氨基酸组成, 含有 GTP 的结合区。*BnARF-h* 和 *BnARF* 的 cDNA 序列之间有 2 处碱基存在差别, 分别为 231 位 (GTT/GTC) 和 421 位 (AAT/GAT), 前者属同义突变, 后者属错义突变, 421 位由天冬酰胺变成天冬氨酸。

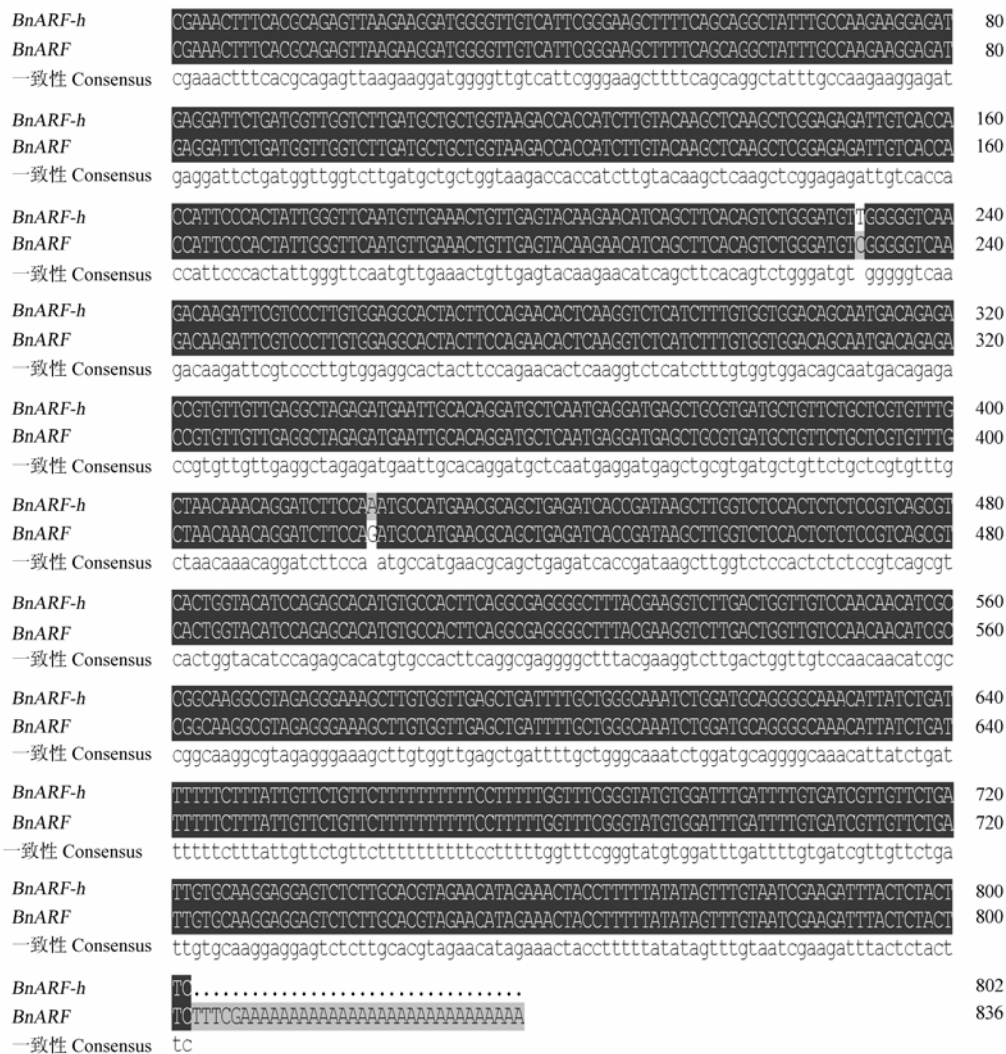


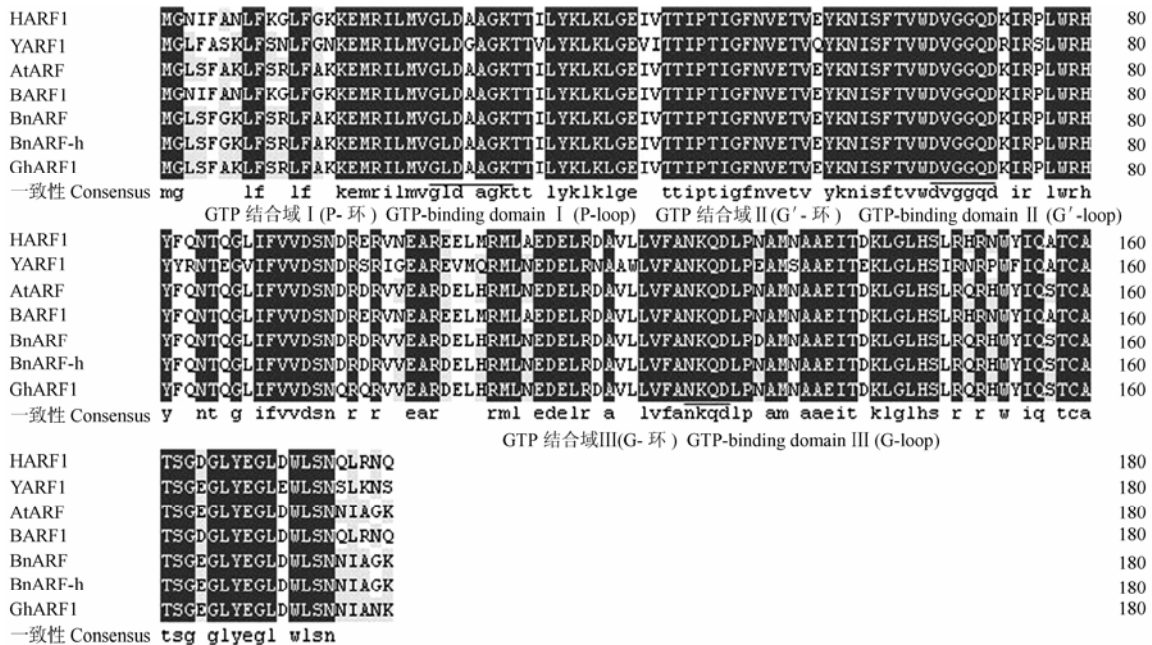
图 2 甘蓝型油菜 *BnARF* 和 *BnARF-h* 序列比对

Fig. 2 Comparing sequences between *BnARF* and *BnARF-h*

与拟南芥 *AtARF* 编码的蛋白质序列相比,甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”有 2 个氨基酸存在差异, 同源率为 98.90%, 野生型亲本“3529”只有 1 个氨基酸存在差异, 同源率为 99.45%, 其中,“NDF-1”发生变化的 2 个位点中的 1 个(即 231 位)氨基酸变化后与拟南芥相同; 另一个位点(即 421 位)氨基酸变化后为天冬氨酸, 而拟南芥与野生型亲本“3529”编码的都是天冬酰胺。

而应用 NCBI 的 Blastn 在 GenBank 中进行核苷酸序列的相似性分析, 结果表明, 甘蓝型油菜的两个 ADP-核糖基化因子基因与其它植物、动物和酵母的 ARF 基因具有较高的相似性。其中与拟南芥的 ARF 基因的同源率为 91% (658/722), 与玉米、胡萝卜、风信子的同源率都为 84%。甘蓝型油菜 ARF 基因编码

的氨基酸序列与拟南芥、辣椒、大麦、胡萝卜的同源性达到了 98% (179/181), 与棉花、烟草和玉米的同源性也达到了 97% (177/181), 与人、牛的同源性均为 85%, 与酵母的同源率为 75%。由此可见, 本试验所克隆到的两个 ADP-核糖基化因子基因也属于 ARF 亚族。目前植物当中克隆的 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 *BnARF* 和 *BnARF-h* 基因编码蛋白的功能结构域, 选择 HARF1、BARF1、YARF1 以及其它植物来源的 ARF 蛋白序列, 进行同源性比对, 得到如图 3 所示的结果。表明甘蓝型油菜在 ARF 基因编码的氨基酸序列中, 同样有保守的 GTP 结合区域, 即 P (GLDAAGKT) 区、G' (DVGGQ) 区和 G (NKQDL) 区。说明所克隆的 *BnARF* 基因的编码



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

图 3 *BnARF* 和 *BnARF-h* 基因推测的氨基酸序列与人、牛、酵母、棉花和拟南芥 ARF 的同源性比较

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequence of *BnARF* and *BnARF-h* with those from human, bovine, yeast, cotton and *Arabidopsis*

产物可能具有与 GTP 结合的功能。

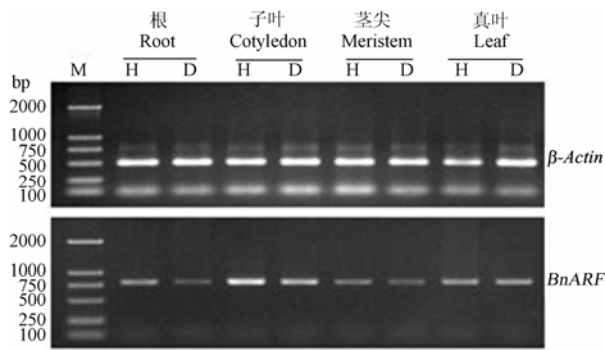
蛋白质的二级结构预测分析表明, 它含有大量的 α -螺旋、 β -转角和无规则卷曲。

2.3 *BnARF* 在不同组织当中的表达分析

甘蓝型油菜野生型和矮化突变型两种材料藁期的

根、茎尖、真叶和刚出苗时的子叶, 进行相对定量 RT-PCR 检测 *BnARF* 在不同组织器官中的表达水平。结果表明, 该基因在这两种材料各个组织中均有表达, 但表达量有显著差异。其中在子叶中表达量最高, 真叶中次之, 根和茎尖中的表达量最少, 这说明此基因

在子叶中有组织表达特异性。同时结果还表明了此基因在不同材料的相同组织中表达量也存在差异: 在根、子叶和茎尖中差异显著, 真叶中几乎没有差别(图 4)。进一步应用 TotalLab 2.0 电泳分析软件分析结果表明, *BnARF* 在野生型和突变体中表达量存在差异, 在矮化突变体的根、子叶和茎尖中此基因的表达量都显著低于野生型, 但在真叶中的表达量相近(表)。



H: 高秆野生型油菜; D: 矮秆突变体油菜; M: DNA 分子量标准 DL2000
H: Wild type; D: Dwarf mutant; M: Marker DL2000

图 4 甘蓝型油菜 *BnARF* 基因的半定量 RT-PCR 结果

Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR of *B. napus* L *BnARF* gene

表 *BnARF* 基因在突变型和野生型不同组织中的相对表达量比较分析

Table Relative expression quantity of *BnARF* gene in wild type and dwarf mutant in different tissues

组织部位 Tissue	<i>BnARF</i> / <i>β-Actin</i> (mean±SD, %)	
	野生型 Wild type	突变型 Mutant
根 Root	0.44±0.05293	0.32±0.02646*
子叶 Cotyledon	0.84±0.03	0.61±0.03464*
茎尖 Meristem	0.43±0.05292	0.32±0.03603*
真叶 Leaf	0.54±0.04583	0.54±0.03606

*与野生型油菜相比, 在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

*Significant difference at $P < 0.05$ level with the wild-type

3 讨论

本研究通过 SSH、RACE 和 RT-PCR 技术从甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”和野生型亲本“3529”中各克隆到一个 ADP-核糖基化因子基因, 分别命名为 *BnARF* 和 *BnARF-h*, 其氨基酸序列与拟南芥 ARF 基因编码的氨基酸序列同源性极高, 属于 ARF 亚族, 并具有保守的 GTP 结合区域。ADP-核糖基化因子家

族基因在其它多种动物和植物中都已研究, 但在甘蓝型油菜中却未见报道。

ARF 是一类在真核生物进化早期出现的高度保守的 GTP-激酶, 它对于分泌性囊泡的形成是必须的。其在内吞途径、生物合成、类脂的代谢、胚胎发育及物质运输中起重要的调控作用, 主要在内质网和高尔基体之间囊泡运输是必须的^[15]。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。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、棉花、大麦、胡萝卜、玉米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^[16]。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, 可能参与了对整个生殖器官分化和发育的调控^[17]。侯磊等从陆地棉中克隆的 *GhARF1* 基因在纤维、花冠和根中表达较高, 而且在纤维中优势表达, 推测其参与了调控纤维、根等组织的极性生长, 并在棉花的整个生长发育过程中具有重要的调节作用^[18]。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^[19]。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^[20]。Rujin 等的研究表明, 拟南芥 ARF 基因还参与了植物激素的极性运输^[21]。Leigh K 等的研究表明, 在拟南芥的 ARF 反义表达植株中, 与野生型植株相比, 它们的生长严重受阻, 表现出植株矮小, 叶柄短, 角果间距不规则等表型特征, 这可能是 ARF 参与多种激素信号传导途径作用的结果^[22]。

笔者首次在甘蓝型油菜中克隆了 ADP-核糖基化因子基因, 且发现矮化突变体及其野生型近等基因系在该基因碱基序列上存在差异, 导致 ADP-核糖基化因子一个氨基酸的变化。由于氨基酸残基发生替换可能导致蛋白质空间构象的变化, 从而影响蛋白的性质和功能。因此矮化突变体“NDF-1”中 ADP-核糖基化因子基因氨基酸的变化可能影响其功能, 但此氨基酸的变化是否与植株的矮化相关还需要做进一步的研究。

究。此外,半定量 RT-PCR 结果也表明该基因的表达具有一定时空差异,矮化突变体及其野生型近等基因系间也存在表达量上的不同,这表明了 *BnARF* 基因可能在油菜的发育过程中发挥了一定的作用,但目前甘蓝型油菜中已克隆到的与矮秆相关的基因中均未发现与 *BnARF* 基因有联系的。*BnARF* 基因在油菜矮化性状形成过程和茎秆发育过程中的具体作用还有待进一步研究。

4 结 论

通过 SSH、RACE 和 RT-PCR 方法从甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”和野生型亲本“3529”中各克隆了一个 ARF 基因的全长 cDNA,分别命名为 *BnARF* 和 *BnARF-h*。这两个基因具有完整的开放阅读框架,编码 181 个氨基酸,在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)。此外 *BnARF* 基因与 *BnARF-h* 基因的氨基酸序列存在一个氨基酸的变化,这可能对该基因的功能有一定的影响。而半定量 RT-PCR 分析表明该基因在野生型和矮化突变体不同组织中均有表达,但在矮化突变体的根、子叶和茎尖的表达量显著低于高秆亲本,这表明 *BnARF* 基因可能在甘蓝型油菜的发育过程中发挥了一定的作用。

References

- [1] 王茂林. 油菜(*Brassica napus* L.)矮秆和无花瓣突变体的创制、遗传及优质杂交油菜选育研究. 成都: 四川大学博士论文, 2005.
Wang M L. *Studies on the Creation and Genetics of a Dwarf Mutant and an Apetalous Flower Mutant and Development of New Hybrids in Brassica napus* L. Chengdu: Ph. D. Dissertation of Sichuan University, 2005.
- [2] Yang Z. Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *The Plant Cell*, 2002, S375-S388.
- [3] Poon P P, Wang X, Rotman M, Huber I, Cukierman E, Cassel D, Singer R A, Johnston G C. *Saccharomyces cerevisiae* Gcs1 is an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93: 10074-10077.
- [4] 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257(1): 20-23.
- [5] 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(13): 9743-9745.
- [6] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92: 3056-3059.
- [7] Julie G. Donaldson. Filling in the Gaps in the ADP-ribosylation factor story. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(8): 3792-3794.
- [8] 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. *The Plant Journal*, 2002, 31(4): 499-515.
- [9] Lee M H, Min M K, Lee Y J, Jin J B, Shin D H, Kim D H, Lee K H, Hwang I. ADP-ribosylation factor 1 of *Arabidopsis* plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2002, 129: 1507-1520.
- [10] 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. *The Plant Cell*, 2003, 15: 1242-1256.
- [11] Steinmann T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson C L, Paris S, Galaeiler, Palme K, Jurgens G. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, 1999, 286: 316-318.
- [12] Geldner N, Friml J, Stierhof Y D, Jurgens G, Palme K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 2001, 413: 425-428.
- [13] 周增光, 周云涛, 高 勇, 王茂林. 油菜矮化突变体茎段伸长初期茎尖差异表达基因的初步分析. 河南农业科学, 2007, (9): 33-36.
Zhou Z G, Zhou Y T, Gao Y, Wang M L. Primary analysis of the differentially expressed genes in stem tip of rape dwarf mutant “NDF-1” at early elongation stage. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2007, (9): 33-36. (in Chinese)
- [14] 张年辉, 韦振泉, 何军贤, 杜林方, 梁厚果. 一种高效经济的高质量植物 RNA 提取方法. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(10): 947-950.
Zhang N H, Wei Z Q, He J X, Du L F. An efficient and economic method for preparation of high quality plant RNA. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2004, 31(10): 947-950. (in Chinese)
- [15] Li Y, Kelly W G, Logsdon J M, JR, Schurkon A M, Harfe B D, Hill-harfe K L, Kahn R A. Functional genomic analysis of the

- ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in *C. elegans*. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2004, 18: 1834-1850.
- [16] 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 Molecular Biology*, 1995, 27(3): 629-633.
- [17] 任茂智, 陈全家, 张 锐, 郭三堆. 棉花腺苷酸核糖基化作用因子 1(arf1)的结构特征、替换剪接和遗传表达分析. *遗传学报*, 2003, 31(8): 850-857.
- Ren M Z, Chen Q J, Zhang R, Guo S D. The structural characteristics, alternative splicing and genetic expression analysis of ADP-ribosylation factor 1 (arf1) in cotton. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(8): 850-857. (in Chinese)
- [18] 侯 磊, 李家宝, 罗小英, 王文锋, 肖月华, 罗 明, 裴 炎. 棉花 ADP-ribosylation factor 基因(GhARF1) 的克隆与表达分析. *作物学报*, 2007, 33(8): 1226 -1231.
- Hou L, Li J B, Luo X Y, Wang W F, Xiao Y, Luo M, Pei Y. Cloning, expression and characterization of an ADP-ribosylation factor gene from cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(8): 1226-1231. (in Chinese)
- [19] 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 Science*, 2001, 160: 535-542.
- [20] Xu J, Scheres B. Dissection of *Arabidopsis* ADP-ribosylation factor 1 function in epidermal cell polarity. *The Plant Cell*, 2005, 17: 525-536.
- [21] Chen R, Masson P H. Auxin transport and recycling of PIN proteins in plants. *Plant Cell Monographs*, 2005, 10: 139-157.
- [22] Gebbie L K, Burn J E, Hocart C H, Williamson R E. Genes encoding ADP-ribosylation factors in *Arabidopsis thaliana* L. Heyn.: genome analysis and antisense suppression. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56: 1079-1091.

(责任编辑 于 竞)