

# 棉花微丝结合蛋白基因 *GhPFN1* 的表达及功能研究\*

李利红 王海云 李彦 夏桂先\*\*

中国科学院微生物研究所植物生物技术开放实验室, 北京 100080

**摘要** Profilin 是微丝骨架的超分子结构和功能的关键调节因子之一. 以陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 棉纤维为材料, 分离鉴定了 *profilin* 基因家族的一个成员——*GhPFN1*. 同源性比较表明 *GhPFN1* 与已报道的其他植物的 *profilin* 有着较高的同源性. 半定量 RT-PCR 分析结果显示 *GhPFN1* 基因主要在棉纤维细胞内表达, 在纤维细胞的快速延伸阶段表达量最高. *GhPFN1* 在裂殖酵母细胞中过量表达导致细胞长度和形态发生显著变化. 这些结果暗示 *GhPFN1* 基因可能在纤维细胞的极性延伸中具有功能.

**关键词** *profilin* 微丝骨架 棉纤维发育 裂殖酵母

在植物细胞中, 许多生理过程及生化反应依赖或伴随着微丝骨架的动态重组, 例如细胞的极性生长、细胞分裂和分化以及对病原体侵染的反应等<sup>[1-3]</sup>. 微丝骨架的重新组装需要微丝(肌动蛋白纤丝)的解聚和再聚合, 这种动态变化受到许多细胞内外因子的调控, *profilin* 是最重要的调节蛋白之一.

*Profilin* 是在真核生物中广泛存在的一种低分子量蛋白. 生物化学研究证明, *profilin* 能以 1:1 的比例与 G-actin(肌动蛋白单体)组成复合物, 还可与多聚 L-脯氨酸(PLP)、膜磷脂肌醇等物质结合, 从而调节肌动蛋白纤丝的结构和功能. 已发现, *profilin* 在调节微丝的动态结构方面发挥着双重特性, 既可促进肌动蛋白纤丝的聚合<sup>[4]</sup>, 又可在某些特殊情况下促进其解聚<sup>[5]</sup>. 近年来, 有关植物 *profilin* 的分子生物学研究备受关注, 在拟南芥、玉米和烟草等已经研究的高等植物中, *profilin* 皆由多基因家族编码<sup>[6-9]</sup>, 其中许多基因已得到分离和鉴定. 然而, 相比动物和酵母细胞, 对植物 *profilin* 的细胞内功能还知之甚少. 迄今为止, 仅有少数几例相关研究的报道<sup>[10,11]</sup>.

棉纤维是由胚珠表皮细胞延伸而来的单细胞. 在纤维发育前期, 细胞以极快的速度进行同步化延伸, 长度可达 3~5cm, 具有如此长度的细胞在植物界中极为少见. 由于这种高度极性生长和发育同步化的特点, 加上棉纤维是单细胞, 对其伸长的研究

不受细胞分裂的影响, 故棉纤维被认为是研究植物细胞伸长及其调控机理的理想模式系统<sup>[12]</sup>. 此外, 由于已发现在棉纤维伸长和次生壁合成过程中, 微丝和微管等细胞骨架的结构发生明显的动态变化, 因此, 棉纤维又被看作是研究细胞骨架在植物细胞生长和细胞壁合成中的功能的首选实验系统之一.

对数据库中棉花 EST 的搜索过程中, 我们发现了若干与 *profilin* 基因有同源性, 但彼此又有差异的 EST 序列, 表明棉花 *profilin* 是一多基因家族. 在此基础上, 以棉花 6DPA 纤维为材料, 分离鉴定了该基因家族的一个成员, 将其命名为 *GhPFN1*. 利用半定量 RT-PCR 技术对其在棉花不同器官和纤维发育不同阶段的表达进行了分析; 此外, 通过裂殖酵母系统, 对 *GhPFN1* 的细胞内功能进行了初步分析.

## 1 材料和方法

棉花材料为陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 品种 TM-1, 由中国科学院遗传研究所何鉴星副研究员提供. 将 TM-1 种子脱绒、消毒后, 去种壳播种于 MS 盐 (murashige & skoog salt mixture) 培养基中, 于 28~30℃ 光照培养. 分别取根、下胚轴和叶; 花直接从成熟植株上采集. 棉花开花当天挂牌标记棉铃, 按 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 DPA(days post anthesis) 采集蕾铃, 剥取籽棉, 用灭过菌的镊子从胚珠上剥取纤维

2002-01-25 收稿, 2002-02-07 收修改稿

\* 国家自然科学基金(批准号: 39880014)和科技部“转基因植物研究与产业化开发”专项课题(批准号: J99-A-003)资助项目

\*\* 联系人, E-mail: guixianx@yahoo.com

细胞. 上述材料于液氮中速冻后保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ .

参考数据库中与 *profilin* 基因同源的棉花 EST 序列设计引物, 利用 RT-PCR 方法, 从 6 DPA 棉纤维总 RNA 中分离出编码 GhPFN1 的 cDNA. 参照 John<sup>[13]</sup> 的方法, 提取棉花根、下胚轴、叶、花和纤维细胞总 RNA, 取 5  $\mu\text{g}$  总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA 第一条链, 取相同量进行半定量 PCR. 用于检测 GhPFN1 mRNA 的正向引物为 5' GCTC-TAGAATGTCGTGGCAAACAT 3', 反向引物为 GhPFN1 的 3' 非编码区序列 5' CCTCCCACCTAAACAATC 3'. 反应参数:  $94^{\circ}\text{C}$  3 min,  $94^{\circ}\text{C}$  1 min,  $52^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min, 45 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min. 检测棉花 *histon* mRNA 的正向引物是 5' CCCG-TAAGTCTACTGGTG 3', 反向引物为 5' TC-TAAGCGACTGATCCAC 3'.

DNA 序列由自动测序仪(上海基康生物技术有限公司)测定, 蛋白同源序列比较在 NCBI Blast 和 Genedoc 程序中进行.

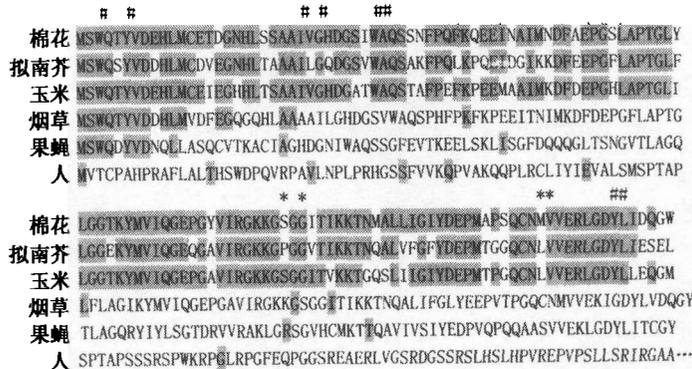


图1 不同来源 profilin 蛋白的同源性分析

阴影部分代表等同氨基酸; # 表示 PLP 的结合位点; \* 表示肌动蛋白的结合位点

## 2.2 GhPFN1 基因在棉花不同器官及纤维不同发育阶段表达水平的半定量 RT-PCR 分析

由于 GhPFN1 的表达量相对较低, 我们采用 RT-PCR 方法对 GhPFN1 在棉花纤维及不同器官中的表达水平进行了半定量分析, 所用引物为 GhPFN1 cDNA 特有的 3' 非编码区和 5' 编码区序列; 采用 *histon* 基因作为对照. 如图 2 所示, GhPFN1 基因在棉纤维细胞中的表达量明显比根、下胚轴、叶、花等其他器官高. 在根和下胚轴中虽然也有微量表达, 但远远低于其在纤维细胞中的表达量. 在棉纤维发育过程中, GhPFN1 主要在细胞延伸期和次生壁合成期表达, 特别是在快速延伸阶段表达量最高(图 2, 1~4), 说明该基因的表达受到棉纤维发育程序的调控, 其功能很可能与棉纤维细胞的极

性生长相关. 此结果经多次独立的重复实验证实.

## 2 结果和讨论

### 2.1 GhPFN1 的克隆和同源性比较

以棉花开花后 6 天的纤维为材料提取总 RNA, 利用 RT-PCR 方法, 分离到 *profilin* 基因家族的一个成员, 命名为 GhPFN1, 其 cDNA 含有一个 393 bp 的开放阅读框, 所编码产物与多种植物的 profilin 具有较高的同源性(图 1), 其中与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) profilin 的氨基酸序列同一性为 71%, 并含有与拟南芥 profilin 相似的肌动蛋白结合位点. 此外, GhPFN1 还含有典型的多聚 L-脯氨酸(PLP)结合位点, 由 N 端和 C 端几个高度保守的疏水氨基酸残基组成, 已知与 PLP 的结合是 profilin 蛋白的重要生物学特性之一.

性生长相关. 此结果经多次独立的重复实验证实.

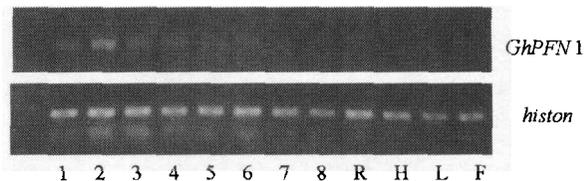


图2 GhPFN1 在棉花纤维及不同器官中表达水平的半定量 RT-PCR 分析

1~8 分别为 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27DPA 棉纤维;  
R, 根; H, 下胚轴; L, 叶; F, 花

### 2.3 GhPFN1 在酵母细胞中的过量表达对细胞形态的影响

本文利用裂殖酵母为一简单的实验系统, 对 Gh-

PFN1的细胞内功能进行了初步分析. 将 *GhPFN1* 基因的 cDNA 置于酵母可诱导启动子(nmt1)之下, 在裂殖酵母中诱导表达. 如图版 I 所示, 当 cDNA 被诱导表达后, 酵母细胞长度比诱导前明显增加, 有的可达诱导前的 3 倍以上, 与此同时, 细胞形态也发生显著变化, 出现哑铃状细胞. 这一结果除表明棉花 profilin 蛋白在酵母细胞中具有功能外, 还暗示 *GhPFN1* 在细胞伸长和形态建成(morphogenesis)中具有作用.

## 2.4 讨论

Profilin 作为一种重要的微丝结合蛋白, 已被证明在花粉管和根毛细胞的极性延伸中起重要作用<sup>[3]</sup>. Quader<sup>[15]</sup>和 Seagull<sup>[16]</sup>等在对棉纤维细胞发育过程中细胞骨架的排列、分布和动态变化的研究中发现: 在棉纤维细胞延伸过程中, 周质微管骨架的排列方式与细胞壁纤维素微纤丝的排列方式极为相似, 前者的改变总是导致后者发生同样的变化, 同时微管骨架的排列方式与微丝骨架的结构密切相关, 利用微丝抑制剂破坏其结构可以导致微管骨架的结构发生异常变化. 因而, 现一般认为, 微管骨架对纤维细胞伸长过程中细胞壁纤维素微纤丝的结构和排列起模板作用, 从而决定着纤维延伸的方向, 而这种作用又受到微丝骨架的调节.

我们的实验结果表明 *GhPFN1* 在棉花纤维细胞中优先表达, 在棉纤维发育过程中, 在纤维快速伸长期的表达量达到最高. 由于 profilin 是重要的微丝结合蛋白和调控因子, 推测 *GhPFN1* 可能通过调控微丝骨架的动态结构而影响微管骨架的排列, 从而在纤维细胞的极性延伸中发挥作用.

裂殖酵母(*S. pombe*)是单细胞真核生物, 已知许多功能保守的高等植物基因在裂殖酵母和植物细胞中具有相似功能. 鉴于已有研究证明 profilin 蛋白具有功能保守性, 我们利用这一简单模式生物对 *GhPFN1* 的细胞内功能进行了初步探讨, 发现 *GhPFN1* 基因在酵母细胞中的过量表达导致酵母细胞长度和形状发生明显变化. 这一结果支持我们以上有关 *GhPFN1* 在纤维细胞中功能的推测. Xia 等<sup>[17]</sup>证明在诱导后的裂殖酵母中, 所导入的植物基因的表达量至少升高 10 倍, 酵母的形态变化是植物蛋白诱导表达的结果. 本文研究虽然没有进行 profilin 蛋白量的检测, 但通过质粒二次转化(从发生形态变化的酵母细胞中提取出转化质粒, 用其再次转化原始酵母, 以证明形态变化确实是由于 *GhPFN1* 的导入所造成)和诱导实验, 证明了酵母细胞形态的

变化是由于棉花 profilin 的导入和诱导表达的结果.

本文研究结果为了解 *profilin* 基因以及微丝骨架在植物细胞延伸中的功能奠定了基础. 值得提出的是, 由于 *GhPFN1* 主要在纤维细胞延伸阶段表达, 其启动子可望作为基因表达调控元件, 用于棉纤维品质改良的基因工程.

## 参 考 文 献

- 1 Taylor L P, et al. Pollen germination and tube growth. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 461
- 2 Nick P. Signals, motors, morphogenesis: The cytoskeleton in plant development. *Plant Biol*. 1999, 1: 169
- 3 Staiger C J. Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annu Rev Plant Mol Biol*, 2000, 51: 257
- 4 Pantaloni D, et al. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin  $\beta$  4. *Cell*, 1993, 75: 1007
- 5 Haugwitz M, et al. *Dictyostelium amoebae* that lack G-actin sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell*, 1994, 79: 303
- 6 Staiger C J, et al. The profilin multigene family of maize: Differential expression of three isoforms. *Plant J*, 1993, 4: 631
- 7 Yu L X, et al. Molecular cloning and mRNA location of tomato pollen profilin. *Plant Mol Biol*, 1998, 36: 699
- 8 Mittermann I, et al. Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco(*Nicotiana tabacum*): Increased profilin expression during pollen maturation. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 137
- 9 Christensen H, et al. Vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *Plant J*, 1996, 10: 269
- 10 Valenta R, et al. Identification as profilin as a novel pollen allergen IgE auto-reactivity in sensitized individuals. *Science*, 1991, 253: 557
- 11 Srinivaasan R, et al. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2000, 124: 1637
- 12 Kim H J, et al. Cotton fiber growth in planta and *in vitro*. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1361
- 13 John M, et al. Gene expression in cotton(*Gossypium hirsutum* L.) fiber: Cloning of the mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5769
- 14 Wang D, et al. Characterization and functional studies of a root-specific MYB transcription factor of *Arabidopsis*. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 45(21): 1804
- 15 Quader H, et al. Cytoskeletal elements in cotton seed hair development *in vitro*: Their possible regulatory role in cell wall organization. *Protoplasma*, 1987, 137: 56
- 16 Seagull R. The effects of microtubules and microfilament disrupting agents on cytoskeletal arrays and wall deposition in developing cotton fibers. *Protoplasma*, 1990, 159: 44
- 17 Xia G X, et al. Identification of plant cytoskeletal, cell cycle-related and polarity-related proteins using *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Journal*, 1996, 10: 761