

野生大豆 *GsADF1* 基因的克隆与表达分析

何 慧,丁一琼,汪潇琳,喻德跃

(南京农业大学 大豆研究所,国家大豆改良中心,作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095)

摘 要:ADF 蛋白是一种在真核生物中广泛存在的低分子量的肌动蛋白结合蛋白,在细胞分裂、细胞运动、植物顶端生长如花粉管伸长,根毛的形成等重要的生命活动中发挥着重要的作用。以野生大豆 (*Glycine soja*) 的叶片 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 方法扩增分离获得 *GsADF1* 基因。该基因全长为 693 bp,包含 417 bp 的开放阅读框;其编码的 ADF 蛋白含 139 个氨基酸残基。运用生物信息学方法将 *GsADF1* 与其他物种 ADF 蛋白氨基酸序列进行多重比对并构建系统进化树,发现 *GsADF1* 与其它生物的 ADF 蛋白具有很高的同源性。这说明植物 ADF 基因高度保守。为进一步研究 *GsADF1* 在野生大豆不同组织,器官以及不同发育期大豆种子中的表达情况,对它进行了荧光定量分析 (Real time RT-PCR)。结果表明:*GsADF1* 在野生材料的根、茎、叶、花和种子中都有表达,且以根和花中表达量最高。而对其在不同发育阶段的种子中的分析表明该基因在 15DAF、20DAF、30DAF、40DAF 和 45DAF 的种子中都有表达,且以 15DAF 表达量最低,随后呈上升趋势。其表达量的变化表明 *GsADF1* 通过调节肌动蛋白可能参与了种子从胚胎发生到贮藏物质积累的转变。

关键词:野生大豆;肌动蛋白解聚因子;*GsADF1*;克隆

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)05-0784-07

Cloning of the *GsADF1* Gene and Expression Analysis From Soybean (*Glycine soja*)

HE Hui, DING Yi-qiong, WANG Xiao-lin, YU De-yue

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, National Center for Soybean Improvement, National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: As an important kind of actin binding proteins, actin depolymerizing factor (ADF) with a low molecular weight exist in eukaryotic cells extensively. ADF play a key roll in cell division, cell movement, plant top growth, such as pollen tube elongation and root hair formation. In this study, we took cDNA of leaves from soybean (*Glycine soja*) as the template, and cloned *GsADF1* by RT-PCR. The full length of *GsADF1* was 693 bp, which including 417bp open reading frame (ORF). *GsADF1* contained 139 amino acid residues. Comparising multiple amino acid sequences between *GsADF1* and ADFs protein from other species, we constructed a phylogenetic tree. We found that they were high homologous and greatly conserved in many amino acid sites. To further study the expression level of *GsADF1* in different tissues and differnt development stages of soybean, we chose Real time RT-PCR to analyze it. The results indicated *GsADF1* expressed in roots, stems, leaves, flowers and seeds. Especially highly expressed in roots and flowers; whereas expressed in 15DAF lowly, and presented a upward trend from 15DAF to 45DAF. The change of expressing level showed *GsADF1* possibly involved in the process from embryogenesis to the accumulation of storage material in the seeds.

Key words: Soybean (*Glycine soja*); Actin depolymerizing factor; *GsADF1*; Cloning

肌动蛋白 (actin) 是真核生物细胞中普遍存在的一种重要的蛋白质,构成细胞骨架中的微丝系统。肌动蛋白骨架对植物高度特异化的细胞如花粉管、

根毛、叶毛和气孔保卫细胞的形态发生和功能起着重要作用,同时在高等植物形态发生的细胞分裂和伸长过程中起着关键性的调节作用^[1-2]。肌动蛋白

收稿日期:2009-04-30

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(2004CB117206);国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA10Z1C1)。

作者简介:何慧(1981-),女,硕士研究生,研究方向为植物基因工程。E-mail:qqbal@163.com。

通讯作者:喻德跃,教授,博士生导师。E-mail:dyyu@njau.edu.cn。

细胞骨架的动态重组被一系列肌动蛋白结合蛋白所调控,它通过各种各样的生物化学反应辨别环境变化后调整细胞骨架的状态^[3-4]。在这些蛋白中肌动蛋白解聚因子 (actin-depolymerizing factors, ADFs) 被认为在调控细胞骨架动力学进程中起关键性作用^[5]。肌动蛋白解聚因子是一类分子量较小且高度保守的肌动蛋白结合蛋白,它既能结合单体肌动蛋白,也能结合微丝,通过提高微丝负端的解聚速度来解聚微丝,从而提高微丝的周转率^[6]。

迄今为止,已知道肌动蛋白结合蛋白大约有 100 多种^[7]。在动植物以及微生物基因组中,ADF 是由多基因家族编码的^[8]。ADF 通过解聚和切割肌动蛋白而调节肌动蛋白微丝骨架的动态装配,从而调节肌动蛋白的功能^[9-12]。对动物和酵母的 ADF 的研究已有较多的报道,而植物 ADF 的研究相对来说还比较少。已发现,植物 ADFs 在花药管生长,根毛的形成和对低温的适应过程中发挥着十分重要的作用^[13-15]。植物中有大量编码肌动蛋白解聚因子的基因,并且在同一种植物中往往存在多个肌动蛋白解聚因子异型体。例如:在拟南芥中有 12 种肌动蛋白解聚因子异型体,玉米中有 3 种肌动蛋白解聚因子异型体等,这些异型体在表达模式上不尽相同,推测这些异型体可能在进化过程中产生了某种功能上的变异^[16]。

另外有报道称 ADFs 还与植物防卫相关。异位表达大麦 HvADF3 和在大麦表皮细胞中表达几个拟南芥的 ADFs 蛋白异形体,结果都削弱了植物对白粉病的抗性^[17]。

而对于大豆 ADF 基因的研究,尚未见报道。以野生大豆 (*Glycine soja*) 叶片 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 方法首次扩增分离获得了 *GsADF1* 基因。本文对所分离克隆到的 *GsADF1* 进行了序列分析,系统发生分析及不同组织和器官,不同发育期种子的表达分析。

1 材料与方法

1.1 材料

野生大豆 (*Glycine soja*) 品种“江浦野生豆 5”由南京农业大学国家大豆改良中心种质资源研究室提供。于正常季节种植于南京农业大学的自然网室中,田间管理同常规。于大豆幼苗期(出苗后四周)取幼根、茎、叶;于大豆盛花期取完整的花;且在大豆盛花期每天早上进行挂牌,取开花后 15、20、30、40 和 45 d 5 个发育时期的豆荚,无菌剥离后液氮速冻

存于 -80°C 备用。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存。

1.2 大豆总 RNA 的提取、纯化与 cDNA 第一链的合成

大豆总 RNA 的提取采用北京天根公司 (TIAN GEN) 的 RNAsimple Total RNA Kit (DP419) 进行。为防止基因组 DNA 的污染,对提取的总 RNA 样品进行纯化。取总 RNA (1 ~ 2 mg), $10 \times$ DNase 缓冲液 1 μL , DNase I (TaKaRa) 0.5 μL , RNAase Inhibitor (TaKaRa) 0.25 μL , 加 DEPC 处理的纯水至 100 μL 。于 PCR 上进行: 37°C , 30 min; 70°C , 5 min; 4°C , 5 min, 终止反应。加入 100 μL 的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提一次后用 100 μL 的氯仿再抽提一次。加入 1/10 体积的 3M NaAc 及 2 倍体积的冰乙醇,混匀, -20°C 放置 30 min 左右。离心后去上清,加入 500 μL 的 70% 乙醇洗涤两次后于超净工作台上吹干。最后加入 100 μL DEPC dH_2O , 溶解后于 -80°C 贮存。

大豆各样品 cDNA 第一链的合成参照 TaKaRa 公司 (D2639A) 的反转录系统的操作手册进行。取 2 μg 的总 RNA 于 DEPC- H_2O 稀释至 12 μL , 以 oligo (dT)₁₈ 为引物在逆转录酶 (M-MLV) 的作用下于 PCR 扩增仪上 42°C 保温 1h, 70°C 保温 15 min 后于 -20°C 保存备用。

1.3 野生大豆 *GsADF1* 基因的克隆和序列测定

搜索大豆 EST 库,使用 Primer3 程序设计一对同源序列引物。*GsADF1*-Forward: 5'-TCAGAACCCTCGATCACTCC-3'; *GsADF1*-Reverse: 5'-CACACTGGAACAAGCAAAGC-3'; 以野生大豆叶的 cDNA 为模板扩增目的基因。所用仪器为 Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler 型 PCR 扩增仪。PCR 反应体系为 25 μL , 包含模板 cDNA 1.0 μL ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $10 \times$ Taq 缓冲液 2 μL , MgCl_2 1.2 μL ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), dNTPs 0.5 μL ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), Taq 聚合酶 (上海生工, SC0010) 0.5 μL ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 上游引物, 下游引物各 1.0 μL ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 用 ddH_2O 补齐至 25 μL 。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 4 min, 反应 30 个循环包括 95°C 变性 50 s, 54°C 退火 50 s, 72°C 延伸 1 min, 最后 72°C 延伸 10 min。反应完成后,用 1.0% TAE 琼脂糖凝胶电泳分离目标 DNA 片段,经胶纯化及回收试剂盒 (上海赛百盛) 回收目的片断。

用 T4 DNA 连接酶 (Promega) 将经胶纯化回收的目的 DNA 片断与 pGEM-Teasy 载体 (Promega) 于 4°C

连接过夜,然后转化大肠杆菌 DH5 α 细胞,转化的重组子的鉴定在含有 Amp(100 mg \cdot L $^{-1}$),IPTG(24 mg \cdot L $^{-1}$),X-gal(20 mg \cdot L $^{-1}$)的固体 LB 培养基上进行,经蓝白斑筛选后挑选阳性克隆,进行菌液 PCR 检测。对鉴定结果为阳性的菌液进行测序(引物合成与序列测定均由上海英骏生物公司完成)。

1.4 序列分析及系统发生树的构建

将所得的序列提交到 NCBI 网站进行 BLASTp 分析。利用软件 ClustalX (ver 2.0) 进行氨基酸序列的比对,比对结果通过 Genedoc (ver 2.6) 程序显示。系统发生树利用 MEGA program(ver 4.0) 软件的 neighbor-joining 法构建。特异性结合位点通过 NCBI cds Blast。(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd)。用 DNAMAN (ver 6.0) 分析 cDNA 序列及推导出的氨基酸序列。采用 BioXM (ver 2.6) 程序计算其分子量及等电点。

1.5 实时定量 (Real-time) RT-PCR

为了进一步研究 *GsADF1* 在野生大豆不同组织,器官以及在不同发育期种子中的表达情况,以大豆内源 *tublin* 基因作为参照,使用 Primer3 程序分别设计一对目标引物和 *tublin* 引物。序列如下:G-Forward:5'-GAGCAGCAGAAGCAGGTCATT-3'; G-Reverse:5'-CAGCATAACGGCACTCATCAG-3'; T-Forward:5'-GGAGTTCACAGAGGCAGAG-3'; T-Reverse:5'-CACTTACGCATCACATAGCA-3'。25 μ L 反应体系包括:上游引物,下游引物(1 pmol \cdot L $^{-1}$)各 5 μ L, QPCR Master Mix (ToYoBo 公司)10 μ L,模板 5 μ L。按以上顺序加入 PCR 扩增板(Axygen 公司)的小管底部,用枪吸打几次混匀后,将反应管放入美国应用生物公司荧光定量 PCR 仪(ABI, USA)中。运行程序如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,反应 40 个循环包括 95 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,1 min。

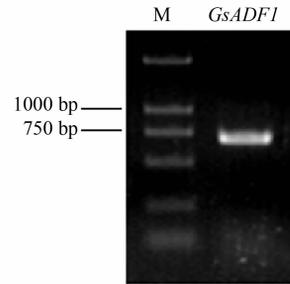
1.6 实时定量 RT-PCR 结果的数据分析

通过比较 Ct 的方法^[18]进行基因表达水平的相对定量分析。以大豆内源 *tublin* 基因作为参照(reference gene),待检测的基因 *GsADF1* 为目标基因(target gene),按照下列公式计算相对于根组织,目标基因在茎,叶,花,种子(15DAF)中的相对表达量:fold change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 此处 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{tublin}})_{\text{stem or leaf or flower or seed}} - (Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{tublin}})_{\text{root}}$,用同样的方法分析目标基因在不同发育阶段的大豆种子中的表达情况,则此处 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{tublin}})_{20\text{DAF or }30\text{DAF or }40\text{DAF or }45\text{DAF}} - (Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{tublin}})_{15\text{DAF}}$ 。

2 结果与分析

2.1 *GsADF1* 基因的 PCR 扩增

应用 *GsADF1* 基因的特异引物,以野生大豆叶的反转录产物 cDNA 为模板,扩增目的基因,将 PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,获得一条约 700 bp 左右的目的条带,结果如图 1 所示。



M: DL2000

图 1 野生大豆 *GsADF1* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of *GsADF1* gene

2.2 *GsADF1* 基因的序列特征及同源性分析

测序结果表明 *GsADF1* 全长 693 bp, 包含 417 bp 的开放阅读框;其编码的 ADF 蛋白含有 139 个氨基酸残基(图 2)。预测其分子量为 16.01 kDa, 等电点为 6.53。

1	t	cagaaccctcgatcactcccacgcgctctatatactctctcttcacccgctgctctctcc
61	a	acgatcacaacaacatcgtcatccc ATGGCA AAACGCCGCATCTGGTATGGCAGTCCATG
1		M A N A A S G H A V H
121	A	TGACTGCAAGTTAAAGTTTTTGGAGCTGAAGACAAAGAGGACACACCGCTTCATAGTTT
12	D	D C K L R F L E L K T K R T H R F I V
181	T	TAAAGATTGAGGAGCAGCAGAAGCAGGCTATTGGTGAAGAAGCTGGTGAAGCCAGCCCAAG
32	F	K I E E Q Q K Q V I V E K L G E P A Q
241	G	CATGAAAGATTCACTGCCAGCCTTCCTGCTGATGAGTGGCGTTATGCTGTTTATGATT
52	G	Y E D F T A S L P A D E C R Y A V Y D
301	T	TGAGTATCTGACTGAAGGGAATGTCCTAAAAGCAGAAATTTTTTCATTGCATGGTCCC
72	F	E Y L T E G N V P K S R I F F I A W S
361	C	TGACACATCAAGGGTGAGGAGCAAGATGATGATGATGCAAGCTCCGAAAGACAGATTCAAGA
92	P	D T S R V R S K H I Y A S S K D R F K
421	G	GGAGCTGGATGGAATCAAGTAGAGCTGCAAGCAACTGATCTCTACTGAGATGGGTCTTG
112	R	E L D G I Q V E L Q A T D P T E H G L
481	A	TGTGTTCAAAAAGCCGGGCCAACTAAaagattatagaaaaatagtaggctttctgggtggg
132	D	V F K S R A N *
541	a	gcagcactccttaagccttagttactctgggaaatattccttagtttgggatgggtcaa
601	c	tgggttagttatgggtcccaactctctcaattttccaaagttgggcaataaattctattg
661	c	accttttaacaagcttggcttggctccagctgtg

小写字母代表非编码区,大写字母代表编码区,粗体和星号标记的字母分别代表起始密码子和终止密码子。

The small letters were untranslated sequence, and the capital letters were coding sequence. The bold font and asterisk indicated initiation and termination codons, respectively.

图 2 *GsADF1* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *GsADF1* from cDNA

and its deduced amino acid sequence

将 *GsADF1* 的氨基酸序列提交 NCBI 进行保守位点搜索,发现它含有众多的高保守性结合位点。

如肌动蛋白结合位点, N-端 6-Ser 磷酸化位点, 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2)/肌动蛋白结合位点, 及核定位信号等等 (图 3; 图 4)。磷酸化直接抑制 ADF 蛋白的活性, 因为磷酸化的 ADF 不能诱导 F-actin 的解聚合^[19]。在 C-末端存在一个保守的 (4,5-二磷酸磷脂酰肌醇) (PIP2/ actin 结合位点。研究

表明, ADF/切丝蛋白的活力受 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 的调节, 它们结合于 ADF/切丝蛋白的 104 ~ 115 残基和 N 末端的肌动蛋白结合域^[20], 这意味着经由 PIP2 的跨膜信号可以调节 ADF/切丝蛋白的功能。4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 可帮助 ADF 结合到细胞膜上来而影响肌动蛋白的动态变化^[21]。

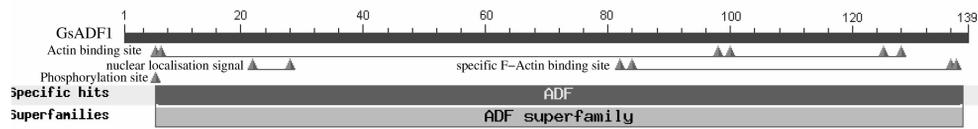
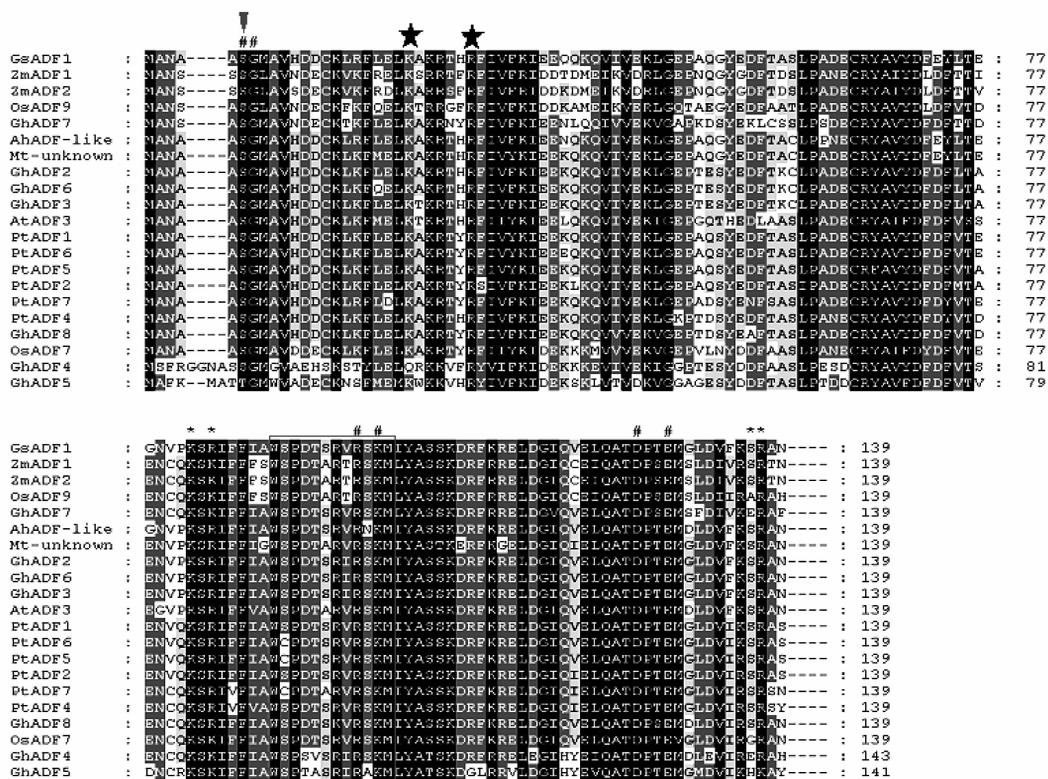


图 3 *GsADF1* 的保守位点搜索 (NCBI)

Fig. 3 Conserved domain site of *GsADF1* searching from NCBI

将 *GsADF1* 与已知的其他植物二十种 ADF 蛋白进行同源性分析, 结果如图 5 所示。 *GsADF1* 与花生

AhADF-like 的同源性最高 (94%); 其次是棉花 *GhADF* 3 (91%); 苜蓿 *Mt-unknown*、棉花 *GhADF* 2、



所用蛋白的注册号如下: 棉花 *GhADF7* (ABD66503), 水稻 *OsADF7* (QODLA3), 水稻 *OsADF9* (NP_001059648), 玉米 *ZmADF1* (P46251), 玉米 *ZmADF2* (Q43694), 棉花 *GhADF4* (ABD66506), 棉花 *GhADF5* (ABD66507), 花生 *AhADF*-like (ABC49719), *GhADF3* (ABD66505), 苜蓿 *Mt-unknown* (ACJ84098), 棉花 *GhADF* 2 (ABD63906), *PlADF* 1 (XP_002299887), 棉花 *GhADF6* (ABD66508), 毛果杨 *PtADF6* (XP_002314195), 毛果杨 *PlADF5* (XP_002314194), 毛果杨 *PlADF2* (XP_002299888), 毛果杨 *PtADF7* (XP_002316301), 毛果杨 *PlADF4* (XP_002311154), 拟南芥 *AtADF3* (NP_851227), 棉花 *GhADF8* (ABD66504), 毛果杨 *PlADF3* (XP_002303579)。三角形表示 N-端的磷酸化位点; 星星代表核定位信号; 井号代表肌动蛋白结合位点; 小星号表示特异的纤丝肌动蛋白结合位点; 红色方框表示 PIP2 (Phosphatidylinosito-4,5-bisphosphate, 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇) /肌动蛋白结合位点。

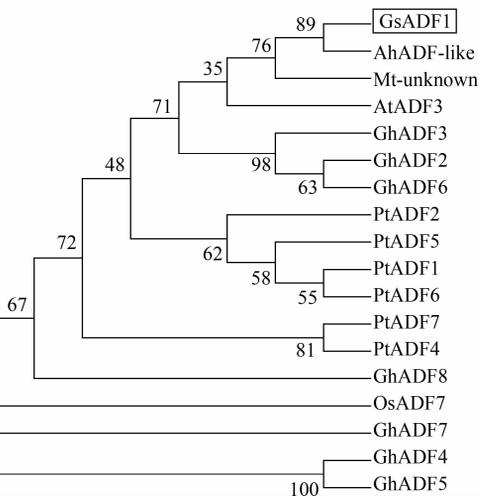
The triangle indicated the position of the putative phosphorylation site at the N-terminus. The asterisk denoted the nuclear localisation signal. The well symbol indicated the position of actin binding site. The little asterisk denoted the position of special F-actin binding site. And the rectangle showed the PIP2/actin binding site.

图 4 *GsADF1* 与其他植物 ADF 蛋白的氨基酸比较

Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of *GsADF1* and other ADFs

毛果杨 PtADF1 (90%); 棉花 GhADF6、毛果杨 PtADF6 (89%); 毛果杨 PtADF5 (87%); 毛果杨 PtADF2、毛果杨 PtADF 7、毛果杨 PtADF4(85%); 棉花 GhADF8 (84%); 拟南芥 AtADF3 (82%); 水稻 OsADF7 (76%); 毛果杨 PtADF3 (75%); 棉花 GhADF7 (71%); 水稻 OsADF9 (65%); 玉米 ZmADF1、玉米 ZmADF2(64%); 而与棉花 GhADF5、GhADF4 的同源性相对低一些 (60% 和 59%)。这表明 ADF 蛋白是高度保守的, 这种结构上的保守性可能对维持其基本功能起着非常重要的作用。

不同植物的 ADF 基因可能来源于共同的“祖先”基因, 因而其基因及其编码蛋白之间具有高度的序列同源性与结构相似性^[22]。用 Clustal X 软件对来自不同物种的共 18 种 ADFs



所用蛋白的名称及登录号同图 4

The accession numbers and names used were the same as Fig. 4

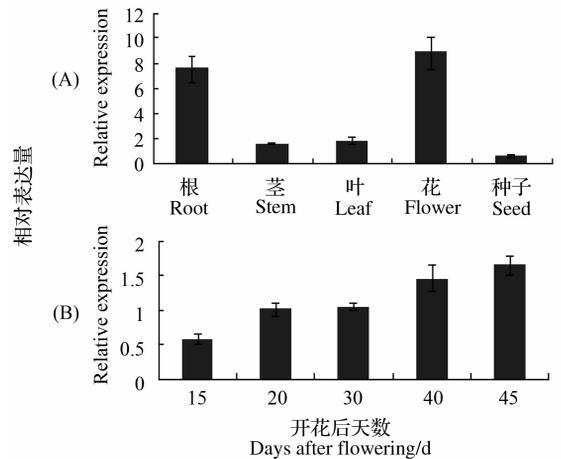
图 5 GsADF1 与其他植物 ADF 蛋白系统发生树

Fig. 5 Phylogenetic analysis based on amino acid alignment of GsADF1 and ADF proteins from other plant species 蛋白进行系统进化分析 (图 5) 结果表明, GsADF1 与 AhADF-like 处于同一个进化枝上, 亲缘关系最近。可以推测野生大豆 GsADF1 与花生 AhADF-like 在生物体内行使的功能可能相似。有趣的是, GhADF3 与 GsADF1 在氨基酸同源性上比 AtADF3 要高, 但在图 5 所示的进化树上显示的亲缘关系则是 AtADF3 要更近一些。可能在所体现的功能方面来看 GsADF1 与 AtADF3 更接近一些。

2.3 荧光定量 Real-time RT-PCR 分析

荧光定量表达分析结果如图 6 所示。(A) 图显示 GsADF1 在野生大豆各个组织和器官中均有表达, 但以根和花中的表达量最高, 推测该基因可能更

多的参与了这两种组织的形态建成过程。(B) 图表示 GsADF1 在不同发育期的种子中都有表达, 但以 15DAF 的表达量最低, 随后呈上升趋势。引起这种表达量的变化的机理目前尚不是很清楚, 推测 GsADF1 可能通过调节肌动蛋白参与了种子从胚胎发生到贮藏物质积累的转变。



(A) *GsADF1* 在不同组织中的表达分析; (B) *GsADF1* 在种子不同发育时期的表达分析。

(A) Expression of *GsADF1* in different tissues. (B) Expression of *GsADF1* during different development stages of seeds.

图 6 *GsADF1* 在野生大豆不同组织和器官以及不同发育期种子中的实时荧光定量 RT-PCR 分析

Fig. 6 Real-time RT-PCR analysis of gene expression level of *GsADF1* about different tissues and different development seeds in soybean

3 讨论

肌动蛋白对生物正常细胞形态维持、胞质分裂、胞质环流、细胞器运动及植物的顶端生长起着重要的作用。一旦破坏生物体细胞肌动蛋白的动态平衡, 生物或多或少表现出形态异常。

另外, 已知肌动蛋白与许多病毒和病原微生物的侵染、复制等过程有关。病原微生物进入细胞以后, 引起细胞肌动蛋白骨架成分的重排, 使细胞为其自身的运输、复制、增殖服务, 尤其是细胞之间的迁移。许多不相关的细胞内病原体如李斯特单胞菌、志贺氏菌、立克次氏体、痘病毒以及杆状病毒等都有一整套操控宿主细胞骨架的策略侵入细胞或在细胞间移动^[23-24]。肌动蛋白解聚因子 (ADF) 作为最关键的一种肌动蛋白结合蛋白参与并影响这些生物过程。Dong 等^[1]研究了 ADF 在活体内和发育的多细胞器官中的功能, 试验制造了表达 ADF 蛋白的转基因

因拟南芥,研究发现过量表达 *AtADF1* 植株在不同细胞类型它们的厚肌动蛋白索消失,形成不规则的细胞和组织形态,降低了细胞和器官的生长。相反,抑制表达 *AtADF1* 则促进了肌动蛋白索的形成、导致开花时间延迟、刺激了细胞膨胀和器官的生长,这一结果与在体外研究时预测的功能一致,证明 ADF 蛋白是 F-actin 形成,开花和细胞、器官膨胀生长的主要调节器。ADF 在调控肌动蛋白的动力学进程和植物防卫方面起着重要的作用。

不同植物的 ADF 基因可能来源于共同的“祖先”基因,因而其基因及其编码蛋白之间具有高度的序列同源性与结构相似性^[22]。在植物 ADF 蛋白进化过程中,一些位点上的氨基酸替换可能具有结构和功能上的意义。例如由酸性氨基酸替换为碱性氨基酸,或者疏水氨基酸转变成极性氨基酸(图 3),可能直接影响该蛋白质的结构以及功能。野生大豆 *ADF3* 与其他已知的 ADF 一样,存在多个肌动蛋白结合位点和核定位信号。在 N-末端还存在着 1 个很保守的 Ser 磷酸化位点,其后的 Gly 位点在植物、酵母各种组织的 ADF 蛋白中都相当保守^[25],磷酸化直接抑制 ADF 蛋白的活性,因为磷酸化的 ADF 不能诱导 F-actin 的解聚合^[20],C-末端存在 1 个保守的 PIP2/actin 结合位点。通过该结合位点,PIP2 结合 ADF 并与 F-actin 竞争^[26],抑制 F-actin 的结合,从而实现对肌动蛋白细胞骨架的结构与功能调节。除此之外,PIP2 还是其它信号传导途径的一个重要因子^[27]。因此,PIP2 不仅可以调节 F-actin 的动力学,还可以调节 ADF 的细胞膜定位^[9]。

大豆起源于我国,是重要的粮油兼用作物。一年生野生大豆 (*Glycine soja*) 是栽培大豆 (*Glycine max*) 的祖先物种,野生种由于承受独特的环境压力,其遗传多样性大多大于栽培品种,因而是作物改良中的重要基因来源。同时野生大豆具有很强的环境适应能力,对不良环境表现出很强的耐性,包括对病虫害的抵抗性。所以研究野生大豆的重要特异基因信息,对大豆品质和性状的改良具有重要意义。

利用分子生物学方法首次从野生大豆中克隆分离了 *GsADF1*。并对其做了生物信息学相关分析和不同组织,器官以及种子不同发育阶段的表达分析。结果表明 *GsADF1* 与其他多种物种中的 ADF 蛋白具有很高的同源性,其中与 *AhADF-like*, *GhADF3* 的同源性最高,其序列一致性分别为 94% 和 91%。且含有多个保守性的结合位点。可以推测野生大豆

GsADF1 与花生 *AhADF-like*, 棉花 *GhADF3* 在生物体内行使的功能可能相似。荧光定量表达分析结果表明 *GsADF1* 在根和花中的表达量最高,更多的可能参与了这两种组织的形态形成过程。*GsADF1* 在不同发育期的种子中都有表达,但以 15DAF 的表达量最低,随后呈上升趋势。引起这种表达量的变化的机理目前尚不是很清楚,推测 *GsADF1* 可能通过调节肌动蛋白参与了种子从胚胎发生到贮藏物质积累的转变。

此外,植物体内每个肌动蛋白解聚因子大家族都由多个成员组成,不同的成员可能执行不同的功能。总之,今后将进一步结合生物信息学,遗传学,分子生物学等方法,在野生大豆中挖掘出更多的新的肌动蛋白解聚因子基因。并采用植物过量表达和干扰表达体系等突变系统,为进一步揭示 *GsADF1* 在野生大豆中的功能提供新的线索和依据。

参考文献

- [1] Dong C H, Xia G X, Hong Y, et al. ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2001, 13:1333-1346.
- [2] Kost B, Lemiche E, Chua N H. Cytoskeleton in plant development [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2:462-470.
- [3] Hussey P J, Ketelaar T, Deeks M J. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57:109-125.
- [4] Staiger C J, Blanchoin L. Actin dynamics: old friends with new stories [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9:554-562.
- [5] Maciver S K, Hussey P J. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins [J]. *Genome Biology*, 2002, 3: Reviews 3007. 1-3007. 12.
- [6] Carlier M F, Laurent V, Santolinin J, et al. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover; implication in actin-based motility. [J]. *Journal of Cell Biology*, 1997, 136(6):1307-1323.
- [7] Dos Remedios C G, Chhabra D, Kekic M, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal Microfilaments [J]. *Physiological Reviews*, 2003, 83:433-473.
- [8] 郭林林, 李学宝. 肌动蛋白解聚因子/丝切蛋白: 肌动蛋白重塑蛋白质家系 [J]. *生命的化学*, 2005, 25:216-218. (Guo L L, Li X B. Actin depolymerizing factor/cofilin, ADF/cofilin: actin remodeling protein family [J]. *Chemistry of Life*, 2005, 25:216-218.)
- [9] Allwood E G, Ant hony R G, Smertenko A P, et al. Regulation of the pollen specific actin-depolymerizing factor L1ADF1 [J]. *Plant Cell*, 2002, 14:2915-2927.
- [10] Ayscough K R. In vivo functions of actin-binding proteins [J].

Current Opinion in Cell Biology, 1998, 10:102-111.

- [11] Bamburg J R. Proteins of the ADF/cofilin family; essential regulators of actin dynamics[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1999, 15:185-230.
- [12] McCurdy D W, Kovar D R, Staiger C J. Actin and actin-binding proteins in higher plants[J]. Protoplasma, 2001, 215:89-104.
- [13] Chen C Y, Cheung A Y, Wu H M. Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth. [J]. Plant Cell, 2003, 15:237-249.
- [14] Ouellet F, Carpentier E, Cope M J, et al. Regulation of a wheat actin-depolymerizing factor during cold acclimation[J]. Plant Physiology, 2001, 125:360-368.
- [15] Thomas P, Schiefelbein J. Cloning and characterization of an actin depolymerizing factor gene from grape (*Vitis vinifera* L.) expressed during rooting in stem cuttings [J]. Plant Science, 2002, 162:283-288.
- [16] 张成伟, 郭林林, 王秀兰, 等. 4 个棉花 ADF 基因的分子鉴定及其差异表达[J]. 遗传学报, 2007, 34(4):347-354. (Zhang C W, Guo L L, Wang, et al. Molecular characterization of four ADF genes differentially expressed in cotton[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(4):347-354.)
- [17] Miklis M, Consonni C, Bhat R A, et al. Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery[J]. Plant Physiology, 2007, 144:1132-1143.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25:402-408.
- [19] Morgan T E, Lockerbie R O, Minamide L S, et al. Isolation and characterization of a regulated form of actin-depolymerizing factor [J]. Journal of Cell Biology, 1993, 122:623-633.
- [20] Bryan C Gibbon. Actin monomer-binding proteins and the regulation of actin dynamics in plants[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2001, 20:103-112.
- [21] Ellen G A, Richard G A, Andreip S, et al. Regulation of the pollen-specific actin-depolymerizing factor LiADF1 [J]. Plant Cell, 2002, 14:2915-2927.
- [22] 张成伟, 黄耿青, 许文亮, 等. 棉花 *GhADF7* 基因结构与进化分析[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2006, 40:575-579. (Zhang C W, Huan G Q, Xu W L, et al. Analysis of cotton *GhADF7* gene structure and evolutionary relationship[J]. Journal of Central China Normal University (Nat. Sci.), 2006, 40:575-579.)
- [23] Goldberg M B. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65:595-626.
- [24] Kerr J R. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection [J]. Molecular Pectology, 1999, 52:220-230.
- [25] Agnew B J, Minamide L S, Bamburg J R. Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270:17582-17587.
- [26] Yonezawa N, Nishida E, Iida K, et al. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides [J]. Journal of Biological Chemistry 1990, 265:8382-8386.
- [27] Takenawa T, Itoh T. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organisation and membrane traffic from the plasma membrane[J]. BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2001, 1533:190-206.

(上接第 783 页)

- [9] Delas H A, Patino B, Posada M L, et al. Characterization and in vitro expression patterns of an exopolysaccharide encoding gene from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94:856-864.
- [10] Gotesson A, Marshall J S, Jones D A, et al. Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(9):907-921.
- [11] 巩振辉, Arvid Gotesson, David A. Jones. 樟疫霉多聚半乳糖醛酸酶 *Pcp1*、*Pcp2* 和 *Pcp4* 基因的克隆、测序及其遗传转化[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5):477-482. (Gong Z H, Gotesson A, David A J. Cloning, sequencing and genetic transformation of *Pcp* (Phytophthora cinnamomi polygalacturonase) 1. *Pcp2* and *Pcp4* genes[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(5):477-482.)
- [12] 巩振辉, Arvid Gotesson, David A. Jones. 樟疫霉多聚半乳糖醛酸酶基因 9 和 10 的克隆、测序及其遗传转化研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2004, 32(8):1-6. (Gong Z H, Gotesson A, David A J. Studies on cloning, sequencing and genetic transformation of *Pcp* (Phytophthora cinnamomi polygalacturonase) 9 and *Pcp10* [J]. Journal of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, 2004, 32(8):1-6.)
- [13] Torto T A, Rauser L, Kamoun S. The *pipg1* gene of the oomycete *Phytophthora infestans* encodes a fungal-like endopolygalacturonase [J]. Current Genetics, 2002, 40:385-390.
- [14] Yan H Z, Liou R F. Cloning and analysis of *pppg1*, an inducible endopolygalacturonase gene from the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42:339-350.
- [15] Li J, Goodwin P H. Expression of *cgmpg2*, an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Malvae*, in culture and during infection of *Malva pusilla* [J]. Journal of Phytopathology, 2002, 150:213-219.