

芒果生长素反应因子类蛋白的 cDNA 克隆和表达

肖洁凝^{1,2} 黄学林^{1*} 黄 霞¹ 李筱菊¹

¹(中山大学 生命科学学院 基因工程教育部重点实验室, 广州 510275)

²(广州大学 生物与化学工程学院 生物系, 广州 510400)

摘 要 通过 SSH 法获得了一个与不定根形成相关的差异表达的 cDNA 片段, 其推导的氨基酸序列与拟南芥的生长素反应因子(ARF)类蛋白具有较大的同源性, 因此将它命名为 *MiARF*。用所设计的基因特异引物进行 3' RACE 扩增获得包含完整读码框架(ORF)的 *MiARF1* (GenBank 登录号为 AY255705)和 *MiARF2* (GenBank 登录号为 AY300808)。 *MiARF1* 全长为 3272bp, 其中 ORF 含 2523bp, 5' 非翻译区(5' UTR)含 285bp, 3' 非翻译区(3' UTR)含 464bp。由该序列所推导的氨基酸序列与拟南芥 ARF2 (BAB10162)的 ID 值为 64%, E 值为 0, 在 DNA 结合区域(DBD) III 和 IV 区域的同源性更高, ID 值均大于 80%。 *MiARF2* cDNA 全长为 1474bp, 其中 ORF 含 981bp, 5' 非翻译区含 285bp, 3' 非翻译区含 208bp, 由该序列所推导的氨基酸序列与拟南芥 ARF2 (BAB10162)的 ID 值为 84%, E 值为 e^{-151} 。 *MiARF2* 仅具有 DBD 保守区并与 *MiARF1* 的基本相同, 但缺乏 III 和 IV 区域。 Virtual Northern 杂交表明: *MiARF2* 在生根的组织中表达水平高, 而在非生根的组织中未见表达; *MiARF1* 在生根及非生根的组织中均有表达。

关键词 芒果(*Mangifera indica* L.)子叶, 不定根形成, 生长素反应因子基因(*ARF*), cDNA 克隆

中图分类号 Q943 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0059-04

近年来利用根形态发生突变体筛选, 已不断克隆出一些与不定根或侧根形成相关的基因^[1]。但到目前为止, 在木本植物中, 与不定根形成有关基因的研究还较少^[2]。生长素反应因子(ARF, auxin response factor)是一类影响生长素调节基因表达的作用因子, 它通过与生长素调节基因的生长素反应元件(AREs, auxin response element)的结合而起作用^[3-5]。我们初步的研究表明, 芒果子叶切段的不定根形成能力与子叶的生物学极性有关, 在子叶横切时所产生的两个的截面中只有近轴的截面才可诱导不定根的发生(另文发表), 本文首次报道与不定根形成相关的 ARF 类的 cDNA, 为进一步研究芒果 ARF 的功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料的消毒和培养

芒果(品种为紫花芒, *Mangifera indica* L. cv Zi-Hua)成熟果实购自广州市果树研究所。将胚从果核中取出, 自来水冲洗约 1h, 10% 漂白水浸 15min 后, 无菌水洗 3 次以上。选取子叶中段横切成厚约

1cm 的切段, 置于内装 30mL 6.5g/L 琼脂(不含任何营养成分)的 250mL 培养瓶中培养, 每瓶放置子叶切段 3 块。培养基的 pH 值为 5.8, 121℃ 高温消毒 15min。培养温度为 $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 黑暗培养, 诱导不定根形成。分别切取培养 5d 的芒果子叶外植体的近轴切面(生根面, 此时可见根原基的发生)及远轴切面(非生根切面)的组织, 用液氮冻结后, 置于 -70°C 冰箱中保存, 以备提取 RNA。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的纯化 参照 López-Gómez 和 Gómez-Lim^[6]的方法, 经改良后提取芒果子叶的总 RNA, 所得的 RNA 用 DEPC-H₂O 溶解, 经紫外分光光度计及琼脂糖凝胶检测, -70°C 保存备用。

1.2.2 SMART ds cDNA 的合成、抑制性消减杂交及 PCR 产物的克隆 SMART ds cDNA 的合成参照 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 说明进行, 抑制性消减杂交参照 Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 说明进行。分别利用远轴切面(非生根切面)作为参照样品, 近轴切面(生根切面)作为检测样品进行两次消减杂交及两次 PCR, 获得富集的差异表达的

PCR 产物,克隆到 pGEM-T Easy Vector 中,构建正向差异 cDNA 文库,代表近轴切面(生根切面)不定根形成时特异表达的 cDNA。PCR 产物的连接和转化参照 pGEM-T Easy Vector Systems Kit 及 Sambrook 等^[7]所述方法进行。

1.2.3 cDNA 扩增及芒果 ARF cDNA 的克隆 将 SSH 获得的差异表达 cDNA 片段,经测序后,在核酸数据库和蛋白数据库中进行同源性比较,其中编号为 F18 的 cDNA 片段所推导的氨基酸序列与拟南芥的 ARF 类蛋白具较大同源性,由此设计 3' 基因特异引物如下:GSP 为 5' CCGGACACTGACGAGGTTTTGCGCAA3';NGSP(巢式引物)为 5' CCTCCTCCACTGCTGCCAAGAT 3'。3'RACE 扩增及克隆参照 Gene Racer KitTM和 TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing 说明进行。

1.2.4 Virtual Northern 杂交分析:Virtual Northern (cDNA Southern)杂交参照 Endege 等^[8]和 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 说明进行。取近轴切面(生根切面)和远轴切面(非生根切面)未经纯化的 SMART ds cDNA 的各 2μg,经毛细管法转移至 Hybond N⁺ 尼龙膜上。以芒果的 ARF 靠近 3'-UTR 的 cDNA 片段作特异探针,参照 RadPrime DNA Labeling System Kit 进行探针标记。预杂交、杂交及洗膜参照 Sambrook 等^[7]所述方法进行。以芒果 GAPDH 的 cDNA 片段(SSH 中假阳性克隆)为探针,进行二次杂交,作上样量对照。

1.2.5 序列测定及其检索与比较 选出含有 cDNA 的重组克隆进行序列测定,所用测序仪器为 ABI-PRISM377-96,测序试剂为 BigDye terminatorv2.0。经测定的序列在核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)[blastn]和蛋白数据库[blastx]中进行同源性比较。推导的氨基酸序列与拟南芥 ARF 类蛋白的配比用 Clustal W 1.8 程序(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)进行。

2 结果

2.1 芒果 ARF cDNA 序列测定及序列分析

通过 SSH 法获得了一些与不定根形成相关的差异表达的 cDNA 片段,其中编号为 F18,长度为 737bp 的 cDNA 片段,其推导的氨基酸序列与拟南芥的 ARF 类蛋白具有较大的同源性,因此我们将其命名为 *MiARF*。用基因特异引物进行 3'RACE 扩增,获得两个长度为 2606bp 和 808bp 的 cDNA 片段,分别与 *MiARF* 拼接,得出包含完整读码框架(ORF)的 *MiARF1*(GenBank 登录号为 AY255705)和 *MiARF2*

(GenBank 登录号为 AY300808)。*MiARF1* 全长为 3272bp,其中,ORF 含 2523bp,包括起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG,5'非翻译区(5'UTR)含 285bp,3'非翻译区(3'UTR)含 464bp。*MiARF1* 核酸序列与拟南芥 ARF χ BT000784 的 cDNA 同源性较高,ID 值达 73%。由该序列所推导的氨基酸序列与拟南芥的 ARF χ 序列号 BAB10162 同源性较大,ID 值为 64%,E 值为 0,尤其在 DBD、III 和 IV 区域的同源性更高,ID 值均大于 80%。在 DBD 的保守区具有基序(motif)ELWHACAGPL,IV 区域的保守区具有基序 GD-DPW。*MiARF2* cDNA 长为 1474bp,其中 ORF 含 981bp,5'非翻译区含 285bp,3'非翻译区含 208bp,由该序列所推导的氨基酸序列与拟南芥 ARF2 (BAB10162)的 ID 值为 84%,E 值为 e^{-151} 。*MiARF2* 仅具有 DBD 保守区并与 *MiARF1* 的基本相同,但缺乏 III 和 IV 区域。*MiARF1* 与 *MiARF2* 在第 1207bp 处开始出现较大差异(图 1),其推导的蛋白质在第 308 个氨基酸处出现较大差异(图 2)。



图 1 *MiARF1* 和 *MiARF2* 部分核苷酸序列之比较

Fig.1 Alignment of partial nucleotide sequences of *MiARF1* and *MiARF2*

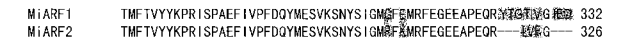


图 2 *MiARF1* 和 *MiARF2* 部分氨基酸序列之比较

Fig.2 Alignment of the amino acid sequences deduced from the DNA sequences of *MiARF1* and *MiARF2*. The different amino acids are shown in shadow

2.2 Virtual Northern 杂交与分析

经 Virtual Northern 杂交分析,*MiARF2* 在生根的组织中表达水平高,而在非生根组织中几乎无表达;*MiARF1* 在非生根组织及生根组织中均有表达(图 3)。这说明 *MiARF2* 与芒果子叶切段不定根的形成有关,为上调表达或诱导表达基因;而 *MiARF1* 与之无关,为组成型表达基因。

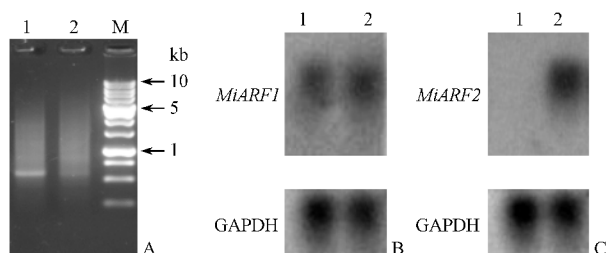


图3 芒果子叶 *MiARF1* 和 *MiARF2* 的差异表达分析结果

Fig.3 Virtual Northern blot analysis of *MiARF1* and *MiARF2* cDNA from mango cotyledon

A : unpurified SMART ds cDNA. B : *MiARF1*. C : *MiARF2*. 1 : non-rotating cut surface (distal surface); 2 : rooting cut surface (proximal surface); M : DNA marker

3 讨论

经氨基酸序列配比结果表明, *MiARF1* 与拟南芥的 *ARF2* (序列号为 BAB10162) 相似, 具有大部分 *ARF* 的结构特点, 即含有 DBD、III 及 IV 区域, 并具有 DBD 的 ELWHACAGPL 基序 (motif) 及 IV 区域的 GDDPW 基序^[3,9]。而 *MiARF2* 仅含有 DBD 区域, 不含 III 区域及 IV 区域。 *MiARF1* 和 *MiARF2* 在 DBD 区域的氨基酸顺序大部分相同, 仅在 *MiARF2* 的 C 末端存在几个氨基酸的差异。

ARF 蛋白是一类转录调节因子。 Ulmasov 等^[5] 分析了拟南芥 *ARF* 家族的 10 个成员。除 *ARF3* 不含 C 端的 III 区域和 IV 区域外, *ARF* 通常含有 3 个保守区域, 分别是 N 端的 DBD 区域以及 C 端的 III 区域和 IV 区域。 *ARF* 的 DBD 区域含有大约超过 350 个氨基酸, 它可与生长素的顺式作用启动子元件 (AuxREs) TGTCTC 结合。 DBD 的 N 末端含有一个基序 (motif) ELWHACAGPL。 DBD 区域与 III 区域之间的中间区域保守性较差, 可能对基因起着激活或抑制作用^[10]。 *ARF* 的 III 区域和 IV 区域与 Aux/IAA 蛋白的 C 末端的 III 区域和 IV 区域相同^[3-5]。 *ARF* 通过与生长素的顺式作用启动子元件 (AuxREs) 结合以及 Aux/IAA 蛋白与 *ARF* 的相互作用, 从而激活或抑制目的基因的表达^[11]。 *MiARF2* 缺乏 III 区域和 IV 区域, 它在基因表达和调控中扮演什么角色, 值得作进一步的研究。

对拟南芥 *ARF* 缺失突变体的研究表明, 缺失 *ARF3* 可使雌蕊基部及顶端发育不良^[12], 缺失 *ARF5* 使叶维管大大减少, 影响胚轴的形成^[13,14]; 缺失 *ARF7* 使上胚轴向光性消失及下胚轴的向地性消失^[15,16]。水稻中的 *OsARF1* 与胚芽鞘的向性有关,

并证明是早期生长素反应基因^[9]。我们的结果表明 *MiARF2* 与不定根的形成有关, 这一功能国内外未有报道, 在芒果子叶的生根中如何作用, 有待研究。 *MiARF1* 和 *MiARF2* 的成功克隆为 *ARF* 基因家族又增添新的成员, 为进一步研究 *ARF* 的功能打下基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Aeschbacher RA. Root development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1994, **45** : 27 – 43
- [2] Butler B, Gallagher TF. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase which is up-regulated during adventitious root formation in apple (*Malus domestica*) ' Jork 9 ' stem discs. *Journal of Experiment botany*, 1999, **50** : 551-552
- [3] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 1997, **276** : 1865 – 1868
- [4] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999a, **96** : 5844 – 5849
- [5] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant Journal*, 1999b, **19** : 309 – 319
- [6] Lopez-Gomez R, Gomez-Lim MA. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hort-Science*, 1992, **27** : 440 – 442
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Endege WO, Steinmann K E, Boardman L A *et al.* Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Bio-Techniques*, 1999, **26** : 542 – 550
- [9] Waller F, Furuya M, Nick P. OsARF1, an auxin response factor from rice, is auxin-regulated and classifies as a primary auxin responsive gene. *Plant Molecular Biology*, 2002, **50** : 415 – 425
- [10] Hagen G, Guilfoyle T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*, 2002, **49** : 373 – 385
- [11] Liscum E, Reed EL. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant molecular biology*, 2002, **49** : 387 – 400
- [12] Sessions RA, Zambryski PC. *Arabidopsis* gynoecium structure in the wild-type and *ettin* mutants. *Development*, 1995, **121** : 1519 – 1532
- [13] Berleth T, Jürgens G. The role of the *MONOPTEROS* gene in organizing the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development*, 1993, **118** : 575 – 587
- [14] Hardtke CS, Berleth T. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO Journal*, 1998, **17** : 1405 – 1411
- [15] Liscum E, Briggs WR. Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell*, 1995, **7** : 473 – 485
- [16] Liscum E, Briggs WR. Mutations of *Arabidopsis* in potential transduction and response components of the phototropic signaling pathway. *Plant Physiology*, 1996, **112** : 291 – 296

Identification of an Auxin Response Factor-like Protein cDNA
from Mango Cotyledon Section

XIAO Jie-Ning^{1 2} HUANG Xue-Lin^{1*} HUANG Xia¹ LI Xiao-Ju¹

¹(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education , School of Life Sciences , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China)
²(Department of Biology , College of Biology and Chemistry Engineering , Guangzhou University , Guangzhou 510400 , China)

Abstract Auxin-responsive elements (AuxRE) interact with a new class of plant-specific transcription factors , auxin response factors (ARFs). Some of ARFs have been shown to repress or activate expression of genes with an AuxRE promotor element . In *Arabidopsis* , ARFs play important roles in early embryo development and vascular strand formation (ARF5) , floral patterning (ARF3) and photo- and gravitropic responses (ARF7). Two cut surfaces (distal and proximal) of mango (*Mangifera indica* L. var. Zi-Hua) cotyledon showed different patterns of adventitious root formation , with only the proximal cut surface , but not the distal one , could be induced to form the roots . Thus , the mango cotyledon is a good system for studying adventitious root formation . A cDNA fragment homologous to the *Arabidopsis* auxin response factor-like protein and relates to adventitious root formation from the cut sections were isolated using suppressive subtractive hybridization (SSH). Two cDNA clones , designated as *MiARF1* (mango auxin response factor 1 gene , GenBank accession number AY255705) and *MiARF2* (mango auxin response factor 2 gene , GenBank accession number is AY300808) , were identified by 3'RACE . *MiARF1* , 3 272bp long , contains an open reading frame (ORF) of 2 523bp , 5'UTR of 285bp and 3'UTR of 464bp , *MiARF2* , 1 474bp long , contains an ORF of 981bp , 5'UTR of 285bp and 3'UTR of 208bp . The deduced MiARF1 and MiARF2 are homologues of auxin response factor (ARF) family of transcriptional regulators , and show high similarity to ARF of *Arabidopsis* in conserved domains . The motifs of MiARF1 EL-WHACAGPL in DBD (DNA binding domain) and GDDPW in IV domain are identical to that of ARF-like protein of *Arabidopsis* . MiARF2 is identical to MiARF1 in a large part of DBD , but lacks a carboxyl-terminal domain containing conserved motifs III and IV . Virtual Northern blot showed that the expression of *MiARF2* was high in rooting tissue of cultured cotyledon sections but low in non-rooting tissue , and the *MiARF1* was expressed both in the rooting and non-rooting tissues . We suggest that the MiARF2 is related to adventitious root formation of mango cotyledon section .

Key words mango (*Mangifera indica* L.) cotyledon , adventitious root formation , auxin response factor gene (*ARF*) , cDNA cloning

Received : 06-17-2003
This work was supported by a grant (No. J00-A-009) from Transgenic Center of the Ministry of Science and Technology , China .
* Corresponding author . Tel 86-20-84110797 , Fax 86-20-84113472 , E-mail :ls17@zsu.edu.cn

本期广告索引

企 业	版 位	企 业	版 位
Amersham Biosciences 公司	封底	无锡雪浪发酵工程设备厂	文后黑白插 I
Roche 诊断公司	封二	扬中威柯特公司	文后黑白插 II
Agilent 公司	封三	南通通联发酵设备公司	文后黑白插 III
Promega 公司	文前彩插 I 、 II	Promega 公司	文后黑白插 IV
江苏达森集团	文前彩插 III	南京宁和生化设备公司	文后彩插 I
镇江东方生物工程公司	文前彩插 IV	美国英杰生命技术公司	文后彩插 II