

小立碗藓冷驯化相关基因 *Pp-LIM only A* 的克隆与表达

孙铭明^{1,2}, 马荣才³, 何奕昆²

1 首都师范大学 初等教育学院, 北京 100080

2 首都师范大学 生命科学学院, 北京 100048

3 北京市农业生物技术研究中心, 北京 100089

摘要: 植物经历冷驯化后抗冻能力会有所提高。利用 cDNA-AFLP 方法从经过 0°C 冷驯化处理的小立碗藓中筛选到差异表达的 *Pp-LIM only A* 基因片段。cDNA 和基因序列比较分析表明此基因含有 7 个内含子和 8 个外显子, 编码由 345 个氨基酸残基组成的蛋白质, 其中只含有一个 LIM 结构域, 与动物蛋白质 PDZ/LIM 家族有很高的同源性, 推测是一种新的植物 LIM 蛋白。实时定量 PCR 分析显示其在冷驯化 6 h 后表达量即开始明显增加, 并随着冷驯化时间的延长表达量大幅度提高。*Pp-LIM only A* 蛋白可能通过 LIM 结构域对细胞骨架的作用而影响了细胞膜的稳定性, 本研究对其在抗冻中的作用作了进一步讨论。

关键词: 小立碗藓, 冷驯化, *LIM only A* 基因, cDNA-AFLP, 实时定量 PCR

Isolation and Identification of a *Pp-LIM only A* Gene Expressed During Cold Acclimation in *Physcomitrella patens*

Mingming Sun^{1,2}, Rongcai Ma³, and Yikun He²

1 College of Elementary Education, Capital Normal University, Beijing 100080, China

2 College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China

3 Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing 100089, China

Abstract: Cold acclimation can improve freezing tolerance. Here cDNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) was used to isolate differentially expressed cDNAs and a *Pp-LIM only A* cDNA was isolated and identified in the cold acclimation of *Physcomitrella patens*. Real-time RT-PCR indicated it is obviously up-regulated at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h after cold acclimation. After comparing the cDNA with the gene sequence, seven introns and eight exons were identified in the cDNA. The cDNA putatively encodes a protein of 345 amino acid residues and only contains one LIM domain which has highly similarity with the PDZ/LIM domains of the protein family in animals. We proposed that *Pp-LIM only A* be a new gene coding for the LIM-domain containing protein and enhance stability of cell membrane via their effects on cytoskeleton during cold acclimation in *P. patens*.

Keywords: *Physcomitrella patens* (Hedw.), cold acclimation, *LIM only A* gene, cDNA-AFLP, real-time RT-PCR

Received: March 27, 2008; **Accepted:** July 3, 2008

Supported by: the National Science Foundation of Beijing (Nos. KZ20061002817, 5021001).

Corresponding author: Yikun He. Tel: +86-10-68902345; E-mail: yhe@mail.cnu.edu.cn

Rongcai Ma. E-mail: marongcai@baafs.net.cn

北京市自然科学基金(Nos. KZ20061002817, 5021001)资助。

温度是植物生长发育所必需的环境条件,影响着所有生命过程。低温会使植物受到不同程度的伤害以至死亡,也是限制作物产量和植物分布的主要因素之一。因此,探索植物的抗冻机制和遗传背景,不仅在基础研究中有重要意义,在解决生产实际问题中也具有广泛的应用价值。研究表明植物在较低但不冻结的温度下生长一段时间会增强抗冻性,这种现象称为冷驯化(Cold acclimation)^[1,2]。植物经冷驯化锻炼后,能诱导产生植物的最大抗冻力。例如,未经历冷驯化的黑麦,在-5°C时被冻死,而在1°C~5°C条件下放置几天后,可以在-30°C的温度下存活^[3,4]。人们还没有很好的了解形成冷驯化机制的细节。现在已知的在冷驯化形成中发生的几个过程是:膜的稳定;糖、其他渗透剂和抗冻蛋白的积累和基因表达的多种变化^[1,2]。目前已经在高等植物中克隆到很多低温诱导基因,根据现有研究结果,可将植物低温诱导蛋白按其性质、结构与功能不同而分为以下几种类型:增强细胞抗冰冻脱水能力、冰冻时对酶起保护作用、具有代谢调节功能、对RNA或细胞膜具有稳定作用、参与细胞内信号转导以及低温诱导的热激蛋白等几种类型^[1]。

最近发现,植物冷驯化和渗透胁迫机制都与细胞骨架的重排有关,尤其是细胞骨架的解聚、聚合及其排列的动态变化表现得复杂多变^[5-7]。LIM蛋白是调节细胞骨架组织的重要蛋白质之一,含有LIM结构域的蛋白质称为LIM蛋白。最早分离鉴定的LIM结构域蛋白质包括线虫*lin11*和*mec3*基因及大鼠*isl1*基因编码的DNA结合蛋白,在*lin11*、*mec3*和*isl1*基因的编码产物中除含有同源框结构域外还含有一个富含半胱氨酸的基元序列,将这个富含半胱氨酸的基元序列取这3个基因的首字母命名为LIM结构域^[8-10]。LIM结构域广泛存在于真核生物中,在不同种系不同组织中高度保守,由2个串联的富含半胱氨酸的锌指基元组成,LIM结构域的共同序列为[C-X₂-C-X₁₆₋₂₃-H-X₂-C]-X₂-[C-X₂-C-X₁₆₋₂₁-C-X₂₋₃-(C/H/D)],其中8个保守的氨基酸残基形成2个连续的锌指结构,可作为蛋白相互作用的适配器。哺乳动物中LIM蛋白的研究较为深入,目前已经发现的60多种根据结构域的特征被分为4大类,主要分布在细胞核中或细胞质内,有些LIM蛋白可以在细胞核和细胞质中穿梭移动。核LIM蛋白主要

是通过与其他转录因子和辅因子的相互作用而发挥组织特异的基因调节和细胞命运决定的功能,胞质中的LIM蛋白则通过与细胞骨架和细胞-细胞外基质蛋白连接体的作用参与细胞骨架的组织 and 信号传导^[11]。迄今为止,已经在多种植物中分离到LIM蛋白,如向日葵、烟草、拟南芥、水稻、黑杨、百合等,且均属于动物LIMs蛋白家族第2类中的CRPs亚家族,细胞核和细胞质中都有分布^[11-17]。CRPs(Cysteine-rich proteins)是一类小LIM蛋白,约由200个氨基酸组成,其中有2个LIM结构域形成锌指结构,中间被40~50个残基分隔开。植物LIM蛋白的功能与动物中类似,在细胞核中以转录因子方式调节组织特异性的基因表达,而在细胞质中则作为肌动蛋白的结合蛋白存在,调节细胞骨架的组织^[11]。

本身就具有高度抗冻性的植物物种在冷驯化研究中备受关注。藓类植物是地球上现存植物群中最古老的陆生植物之一,从热带到南极均有分布^[18],能够在干旱、冷冻等极端环境中生存。因此藓类必然进化了一套与逆境相适应的机制,但是目前对藓类植物冷驯化适应性分子机制的研究还很少。小立碗藓是第一个成功表达外源基因的苔藓植物,也是迄今为止发现的同源重组发生频率最高的植物^[19],是开展基因功能研究的优异材料^[20],最近其全基因组测序工作也已完成^[21],这些都为研究藓类冷驯化适应性分子机理奠定了基础。本研究在采用cDNA-AFLP方法研究小立碗藓冷驯化机制的过程中,发现一个差异表达的片段,并通过RT-PCR方法分离到*Pp-LIM only A*基因,对其编码的蛋白质结构的研究推测可能是一种LIM结构域蛋白,经实时定量PCR分析显示随着冷驯化时间延长其表达量发生极大变化,对*Pp-LIM only A*基因在抗冻机制中的作用进行了深入分析。此基因的鉴定既补充了植物的抗冻机制,也为农作物抗冻性的遗传改良提供了新的基因选择。

1 材料与方法

1.1 小立碗藓的培养

小立碗藓(*P. patens*)材料由德国University of Freiburg的Ralf Raski教授提供,培养参照Ashton等的方法^[22]。小立碗藓茎叶体生长在无菌的固体培养基上,培养基中含有250 mg/L KH₂PO₄, 800 mg/L

Ca(NO₃)₂·4H₂O, 12.5 mg/L FeSO₄·7H₂O, 250 mg/L MgSO₄·7H₂O, 其中补充有微量元素 0.055 mg/L CuSO₄·5H₂O, 0.055 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.614 mg/L H₃BO₃, 0.389 mg/L MnCl₂·4H₂O, 0.055 mg/L CoCl₂·6H₂O, 0.028 mg/L KI, 0.025 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O, 配以 0.7 g/L 琼脂粉, pH 7.0。培养温度约 25°C ± 1°C, 光周期为 16 h/8 h 光照/黑暗, 光密度为 55 μmol/(m²·s¹)。

1.2 冷驯化处理

将生长 2 周的小立碗藓茎叶体转移到低温培养箱中, 置于冰水混合物中(0°C), 胁迫处理 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 时分别取样。0 h 作为非胁迫处理对照。

1.3 RNA 的提取、mRNA 的纯化和 cDNA 的合成

小立碗藓茎叶体的 RNA 提取采用酚抽提法^[23]。mRNA 分离纯化按照 Promega 公司试剂盒 PolyA Tract[®] mRNA Isolation System 介绍的方法进行。cDNA 合成按照 TaKaRa 公司试剂盒 cDNA Synthesis Kit(M-MLV Version)介绍的方法进行。

1.4 cDNA-AFLP 分析

cDNA-AFLP 分析中的 cDNAs 分别取自未经冷驯化和经历冷驯化的小立碗藓茎叶体(0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h), 限制性内切酶的酶切组合采用 *EcoRI/MseI*^[24]。预扩增 PCR 反应为 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 15 个循环。预扩增引物序列为: E₀, 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'和 M₀, 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'。选择性扩增 PCR 反应采用“touch down”策略, 94°C 30 s, 65°C 30 s(每个循环降低 0.7°C), 72°C 1 min, 15 个循环; 94°C 30 s; 56°C 30 s; 72°C 1 min, 20 个循环。选择性扩增引物序列为: E₁, 5'-GACTGCGTACCAATTCAA-3'; E₂, 5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'; E₃, 5'-GACTGCGTACCAATTCAG-3'; E₄, 5'-GACTGCGTACCAATTCAT-3'; E₅, 5'-GACTGCGTACCAATTCTA-3'; E₆, 5'-GACTGCGTACCAATTCTC-3'; E₇, 5'-GACTGCGTACCAATTCTG-3'; E₈, 5'-GACTGCGTACCAATTCTT-3'; M₁, 5'-GATGAGTCCTGAGTAAACA-3'; M₂, 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'; M₃, 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'; M₄, 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'; M₅, 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'; M₆, 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'; M₇, 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'; M₈, 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'。电泳后通过硝酸银染色显示差异表达片段。

从硝酸银染色胶上选择差异表达片段切下后溶于 20 μL 无菌水中, 取 5 μL 溶液再扩增后, 采用琼

脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TIANGEN, DP209-02)进行纯化。纯化后的差异片段与 pGEM-T easy (Promega) 载体连接, 转化 *E. coli* DH5α, 然后从阳性克隆中提取质粒 DNA, 以载体两端的 T7 或 SP6 引物进行序列测定。测序仪为 ABI 3100 (Applied Biosystems)。

1.5 *Pp-LIM only A* 基因 cDNA 分离和序列分析

上述分离鉴定的 DNA 片段序列与 *P. patens* EST 数据库 (<http://moss.nibb.ac.jp/blast/blast.html>) 和 *P. patens* 基因组文库 (http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html) 进行 Blast 比对后, 设计上下游引物以经过冷驯化处理的小立碗藓茎叶体的 RNA 为模板通过 RT-PCR 反应得到 *Pp-LIM only A* 基因 cDNA。引物序列为: HF, 5'-GGCCGACCGGGT AGTTCCTC-3'和 HR, 5'-TGATGACCAATGACACC CCAGTTC-3'。PCR 反应为 94°C 45 s, 65°C 45 s, 72°C 2 min, 30 个循环, 72°C 延伸 10 min。所扩增的 cDNA 按照 1.4 中的方法进行克隆和序列分析。

1.6 荧光实时定量 RT-PCR 分析

利用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 试剂盒进行荧光实时定量 RT-PCR 反应。引物序列为: 5'-GAGTACCGTTCACA CCCTTTCT-3'和 5'-GCCTCCCGCTCCACCAG-3'。使用的 PCR 仪为 Corbet Research 公司的 Rotor Gene 3000 Real-Time Thermal Cycler。实验结果利用软件 Rotor-Gene 6.0^[25]以及 Excel 7.0 进行数据分析处理。采用 *Pp-actin3* 作对照, 引物序列为: 5'-CGGAATG GTGAAGGTATGAT-3' 和 5'-CACGATGTGAAGAA GACGAT-3'。

标准曲线的生成: 将预试验的 PCR 产物按照 10 倍浓度梯度进行稀释, 选择 1/1000、1/10 000、1/100 000、1/1 000 000 浓度的稀释产物作为标准品模版, 进行荧光定量 PCR 反应。通过这 4 个标准品生成的反应数据, 软件 Rotor-Gene 6.0 根据反应的荧光实时监控数据和标准品的浓度关系, 生成标准曲线。

相对表达量的计算: 目的基因的相对表达量根据 Pfaffl^[26], 用下列公式计算:

$$\text{相对表达量} = (1 + E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{t target}}} / (1 + E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{t ref}}}$$

其中, E_{target} 表示目的基因转录本的 PCR 效率; E_{ref} 表示内源参照基因转录本的 PCR 效率。 $\Delta C_{\text{t target}}$ 是目的基因转录本的 Ct 值减去目的基因对照转录本的 Ct, $\Delta C_{\text{t ref}}$ 是内源参照基因转录本的 Ct 值减去内源

参照基因对照转录本的 Ct 值。

1.7 核酸序列结构分析

采用 DNASTAR 软件(<http://www.dnastar.com/>)的 EditSeq 和 MegAlign 程序分析 *Pp-LIM only A* 基因编码的蛋白质序列以及外显子和内含子的结构比例, 采用 pfam 软件分析蛋白质结构域特征(<http://pfam.janelia.org/>)。

2 结果

2.1 差异表达基因 *Pp-LIM only A* 的克隆和序列分析

利用 0°C 下冷驯化 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 的小立碗藓茎叶体进行 cDNA-AFLP 分析, 结果发现 1 个大小约 260 bp 左右的差异表达条带(图 1)。对此条带进行测序研究发现其与 LIM 结构域含有蛋白质相似性很高。从图 1 中可以看出, 这一条带代表的基因在冷驯化 6 h 后表达量即明显上升, 一直持续到 72 h 后。

根据已公布的小立碗藓全基因组信息^[21], 分别设计上下游引物通过 RT-PCR 扩增到 *Pp-LIM only A* 基因的 cDNA。将此 cDNA 连接到 pGEM-T easy 载体上, 测序分析得到 1238 bp 的全长 cDNA 序列(图 3)。将此序列与其基因组序列比较, 结果表明此基因含有 7 个内含子和 8 个外显子(图 2); DNASTAR 软件分析其编码 345 个氨基酸的蛋白质序列; 通过 pfam 进行蛋白质结构特征分析显示其 N 端序列含有 1 个 LIM 结构域(图 3)。

利用小立碗藓全基因组文库和 BLAST 进行同源搜索发现在小立碗藓中 *Pp-LIM only A* 是 1 个含有 8 个同源基因的基因家族。本研究中分离的 *Pp-LIM only A* 基因在 GenBank 的登录号是 1195116, 其他 7 个分别为 1112685、1134951、1152562、143146、1147716、1122122 和 1153635。这些基因编码的蛋白质序列与本研究中分离的 *Pp-LIM only A* 基因编码的蛋白质序列相似性分别为 83%、82%、80%、

78%、73%、72%和 70%, 所有这些蛋白质序列中均只含有 1 个 LIM 结构域(图 4)。

2.2 *Pp-LIM only A* 在冷驯化过程中的表达变化

进一步用实时定量 PCR 方法研究了 *Pp-LIM only A* 基因在冷驯化过程中的表达变化。由图 5 可见 *Pp-LIM only A* 基因的表达明显受冷驯化影响。相对于未驯化材料, 小立碗藓在冷驯化 12 h 时 *Pp-LIM only A* 基因的相对表达量即达到 21.54 倍, 此后一直维持在很高的水平, 最高表达时间是在冷驯化 72 h, 最高相对表达量为 53.72 倍。

实时定量 PCR 中常用平方回归系数(R^2)和 PCR 扩增的效率(E)来分析实验结果的严谨性和可比性。本实验中内源参照基因 *Pp-actin3* 的 R^2 是 0.99776, E 为 105%; *Pp-LIM only A* 基因的 R^2 是 0.99831, E 为 111%, 说明实时定量 PCR 的结果是稳定和可靠的。

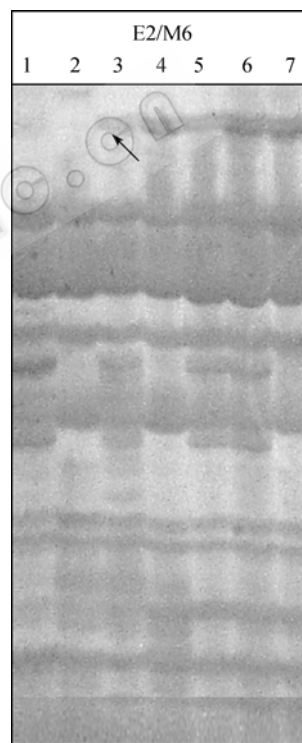


图 1 cDNA-AFLP 分析图谱

Fig. 1 cDNA-AFLP profile

The primers used for mean amplification were E2 and M6, arrow indicates the different expressed fragment of *Pp-LIM only A*

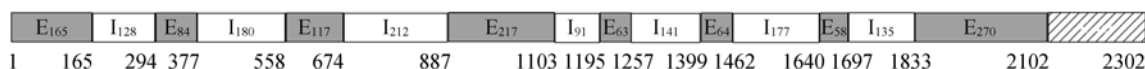


图 2 *Pp-LIM only A* 基因的内含子和外显子结构图示

Fig. 2 Intron and exon structures of *Pp-LIM only A* gene

E: exon; I: intron. Numbers at right bottom indicates the amount of exon and intron; Numbers in figure indicate the nucleotide positions of exon

```

1 atgttfaatggcaatcgtggctctgagcaggctctgtaggattggcgacgtgtgctgggtgccatc gcacccttgattcgg 80
  MFNG N RGLCR S VGLA T CAGCHRT L GFG
                                     ── * - - * - -
81 tagttdttgacgtgcctcaaccagaattggcaccagcttgccttgcctccgatacgcctt caggggatcgtggata 160
  RFLTCLNQNWHPACFCCR YCLQGIVDK
  - - - - - * - - * - - * - - * - - - - -
161 aggagtctcctgcatggaaatgaccctaccatcgggactgtataaaaaagcctttccatcc caagtgtgagatctgc 240
  EFSVHGN D P YHRDC YKKL FHPKCEIC
  - - - - - * - - - - * - - - - *
241 tataatc atattccttgaatcctaaaggacaaatgagtaacgcttcacaccccttctggaacc agaggactgtccgtc 320
  YNH I PL NPKG Q I E Y R S H PFWN Q R YCPS
321 ccatgaactagatggaagc caatgttgcctgagtcggatc gcattccagcagtgatcaacgg tatcgacgttgcag 400
  HELDGSQCCCS CDRI QPVDQR YRRLPD
401 atgtaggaaggtgtcctcggaatgcatgattctcagtcagtgatgaccaccaaggactgtcaacc actctatcgagacgtt 480
  GRKVCSECMDSA VMTTKDKCQPL YRDV
481 ctaaaaatctacagaaacctggcatccatc gaacaagaatttcgatccttctgtggagc ggagggcctcaacca 560
  LKFYRN LGMPIEQE I SMLLVEREALNH
561 tgcctgtgaagttgaaggggagacactcagccccg gaaactcagagctgtgcttctgc gaagacaaattctcc 640
  AREVEEGGHTHAPET RGLCLSEE QILP
641 ctgtaaaaatgaggaaatcaacggcattgctgaggtcacagc cattctgttctatagttt acctagattgtaaca 720
  VKMRK LTRHCEVTA I LVL YGLPRLLT
721 gggtctatcctgctcacgaactgacgcatggattcgtctcagcggagatattccgaatc tagacaacgactaga 800
  GSILAH ELMHAWIRLDGRYPNL DNDVE
801 ggagggtatctgcaagtgatgcacacatgtgtggaagtcggagcttgaactctcatgca actgggggtgtcattgg 880
  EGICQVI AHMWLKSE LETLMR TGVS LV
881 tcatcaaacgactaggagaattttctcccaaaaacgaaactgactcatcactattacgg tgacggttcaagaact 960
  I KRLGE FFLHQ IET DSSPIYGDGFR T
961 gcttccgctcagtttctctcatgactcaacgaaactcactcacttgagg caaactggtg agatactcaaaaa 1040
  ASAAVSSHGLTR T LHH LRQTGE I LH
1041 tgcattcaattgtaaacacttctaacaatctgtgtacacgtgattcttctgtagtttccg gatgacagctattgtt 1120
1121 gctatttccggaaacataactgcttttgaattctgggtattatata ggaagatgtgtgafattccatccatata 1200
1201 caatccatattgaatccatatacatctggtgtatt

```

图3 *Pp-LIM only A* 基因的全长 cDNA 序列和推测的氨基酸序列Fig. 3 cDNA and amino acid sequence of *Pp-LIM only A* gene

Arrow indicates the position of LIM domain, the sequences in frame are primers of real-time RT-PCR

3 讨论

本研究采用 cDNA-AFLP 方法结合 RT-PCR 分析从经过冷驯化的小立碗藓中获得一个差异表达的 *Pp-LIM only A* cDNA, 实时定量 PCR 分析证实其在冷驯化过程中的表达情况显著受冷驯化时间影响, 而且随着冷驯化时间的增加表达量大幅度提高(图 5)。Pp-LIM only A 中含有 1 个 LIM 结构域(图 3)。有趣的是, 目前植物中已有的研究显示 LIM 蛋白均含有 2 个 LIM 结构域, 而小立碗藓中的 Pp-LIM only A 及其基因家族中其他编码成员的蛋白质都只含有 1 个 LIM 结构域, 为 [C-X₂-C-X₁₆₋₂₃-H-X₂-C]-X₂-[C-X₂-C-X₁₆₋₂₁-C-X₅-H], 此外, 与 LIM 结构域的共同序列相比, Pp-LIM only A 的最后 3 位其他氨基酸变成了 5 位。这种微小的差异也许是苔藓植物所特有的, 因为我们发现小立碗藓中的 8 个 LIM only 转录本具有同样的特征(图 4)。Pp-LIM only A 的 LIM 结构域与已知的植物 LIM 结构域相似性较低, 而与动

物中发现的 PDZ-LIM 结构域类似^[27]。推测 Pp-LIM only A 可能是一种新的植物 LIM 结构域蛋白。

动物中 LIM 蛋白的研究比较早而全面, 研究发现 LIM 蛋白通过与其他蛋白质的相互作用, 在调节基因的转录、细胞命运决定、生长发育、细胞骨架的组织等许多生物过程中发挥重要作用^[28]。高等植物中的 LIM 蛋白也是蛋白质和蛋白质相互作用的界面, 是许多发育相关途径的关键调节因子^[13]。动物胞质 LIM 蛋白广泛分布于细胞骨架相关的区域, 可以直接调节肌动蛋白的聚合反应和解聚反应; 还可以通过细胞和细胞外基质的黏附把细胞外基质和细胞内的骨架成分连接起来, 在细胞内外双方向传递细胞信号, 调节细胞的运动和细胞形态变化^[29]。植物中 LIM 蛋白的功能似乎也与细胞骨架的变化有关。LILIM1 是一种肌动蛋白结合蛋白质, 能够促进 F-肌动蛋白束的装配, 保护 F-肌动蛋白免受解聚复合物的影响, 过量表达 LILIM1 蛋白会引发不正常的星型 F-肌动蛋白的聚集和异常的内膜结构的变化。

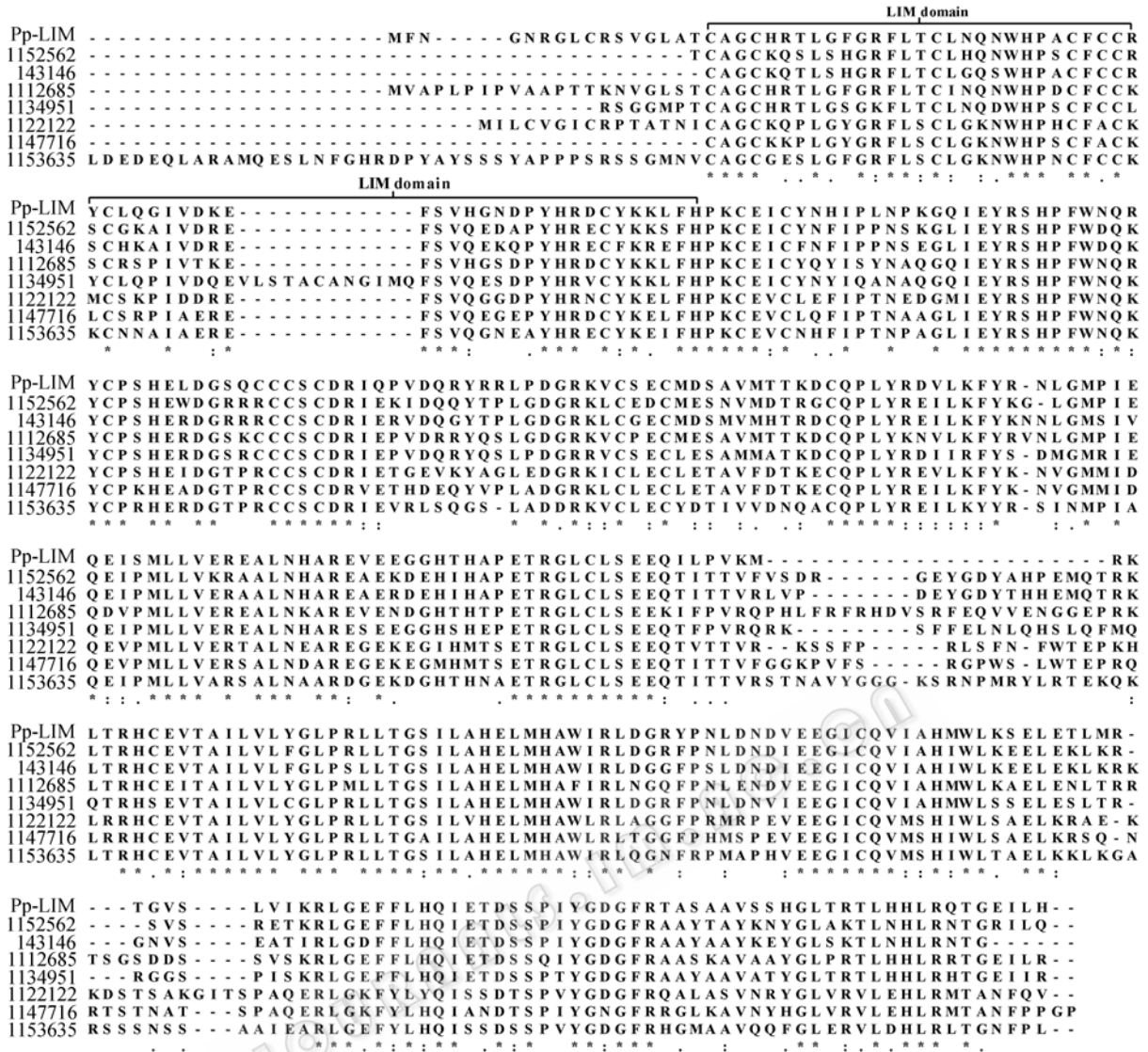


图 4 小立碗藓 Pp-LIM only A 与该家族中其他 7 个同源蛋白质的相似性比较

Fig. 4 Similarity analysis of the Pp-LIM only A protein sequence and seven other proteins of the same protein family in P. patens

*indicates that all eight proteins have the same amino acid; : indicates that there is only one different amino acid residue in the eight proteins; . indicates that there are two different amino acid residues

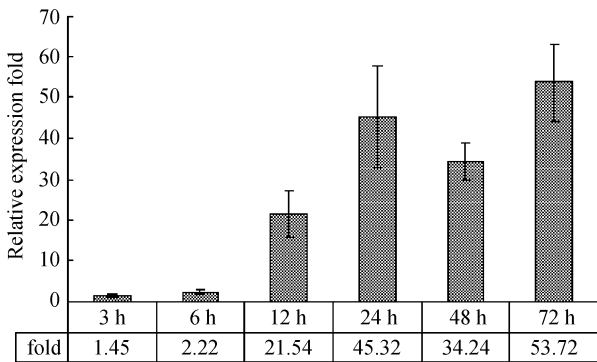


图 5 Pp-LIM only A 基因的表达与冷驯化时间的关系
Fig. 5 Relative expression profile of the Pp-LIM only A gene during cold acclimation

研究认为 LIM1 蛋白介导了超稳定 F-肌动蛋白束的形成, 进而干扰了由内膜的运动变化而引起的生长停滞现象^[12]。HaWLIM1 的功能与周质微管和肌动蛋白细胞骨架有关^[14]。NtWLIM1 参与调节肌动蛋白细胞骨架的稳定性^[30]。研究发现, 植物 LIM 蛋白也参与信号传导, 并且影响细胞内外的离子浓度^[12]。

植物的细胞骨架在细胞的多项生理活动中发挥着重要的作用。其中包括对低温胁迫的应答反应。近年有文献报道, 细胞骨架受冷驯化影响发生动态组装变化^[5-7]。据此, 我们推测小立碗藓的 Pp-LIM only A 蛋白在冷驯化过程中通过 LIM 结构域引起细

胞骨架的组织发生改变, 从而稳定了细胞膜结构, 使其功能得以保持, 如细胞膜的运输功能、细胞形态特征的维持、细胞膜和细胞壁之间的正常通讯等等。这些特征均有利于植物适应逆境胁迫。*Pp-LIM only A* 基因的功能有待于进一步研究。

植物对低温的耐受性是一种综合而复杂的应答反应, 研究小立碗藓冷驯化过程中基因表达的变化, 即可以从分子水平认识抗冻性形成的机制, 又为抗逆性转基因植物育种提供了重要的基因。

REFERENCES

- [1] Thomashow MF. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 571–599.
- [2] Thomashow MF. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *J Plant Physiol*, 2001, **125**: 89–93.
- [3] Griffith M, Ala P, Yang DSC, *et al.* Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol*, 1992, **100**: 593–596.
- [4] Griffith M, Antikainen M, Hon WC, *et al.* Antifreeze proteins in winter rye. *Physiol Plant*, 1997, **100**: 327–332.
- [5] Abdrakhamanova A, Wang QY, Khokhlova L, *et al.* Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol*, 2003, **44**(7): 676–686.
- [6] Olinevich OV, Khokhlova LP. Effects of abscisic acid, low temperature, and plant age on cytoskeleton and phosphorylated proteins. *Biochemistry (Mosc)*, 2003, **68** (6): 678–687.
- [7] Wang QY, Nick P. Cold acclimation can induce microtubular cold stability in a manner distinct from abscisic acid. *Plant Cell Physiol*, 2001, **42**(9): 999–1005.
- [8] Freyd G, Kim SK, Horvitz HR. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-II*. *Nature*, 1990, **344**: 876–879.
- [9] Karlsson O, Thor S, Norberg T, *et al.* Insulin gene enhancer binding protein *Isl-1* is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*, 1990, **344**: 879–882.
- [10] Way JC, Chalfie M. *Mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell*, 1988, **54**: 5–16.
- [11] Arnaud D, Dejardin A, Leple JC, *et al.* Genome-wide analysis of LIM gene family in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*. *DNA Res*, 2007, **14**(3): 103–116.
- [12] Wang HJ, Wan AR, Jauh GY. An actin binding protein, LILIM1, mediates Ca and H regulation of actin dynamics in pollen tubes. *Plant Physiol*, 2008, in press.
- [13] Thomas C, Moreau F, Dieterle M, *et al.* The LIM domains of WLIM1 define a new class of actin bundling modules. *J Biol Chem*, 2007, **282**(46): 33599–33608.
- [14] Briere C, Bordel AC, Barthou H, *et al.* Is the LIM-domain protein HaWLIM1 associated with cortical microtubules in sunflower protoplasts? *Plant Cell Physiol*, 2003, **44** (10): 1055–1063.
- [15] Kosarev P, Mayer KF, Hardtke CS. Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the Arabidopsis genome. *Genome Biol*, 2002, **3**(4): RESEARCH0016.
- [16] Mundel C, Baltz R, Eliasson A, *et al.* 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 Mol Biol*, 2000, **42**(2): 291–302.
- [17] Eliasson A, Gass N, Mundel C, *et al.* Molecular and expression analysis of a LIM protein gene family from flowering plants. *Mol Gen Genet*, 2000, **264**(3): 257–267.
- [18] Robinson SA, Wasley J, Tobin AK. Living on the edge—plants and global change in continental and maritime Antarctica. *Global Change Biol*, 2003, **9**: 1681–1717.
- [19] Schaefer DG, Zrýd JP. The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiol*, 2001, **127**(4): 1430–1438.
- [20] Quatrano RS, McDaniel SF, Khandelwal A, *et al.* *Physcomitrella patens*: mosses enter the genomic age. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, **10**(2): 182–189.
- [21] Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, *et al.* The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*, 2008, **319**(5859): 64–69.
- [22] Ashton NW, Cove DJ, Featherstone DR. The isolation and physiological analysis of mutants of the moss *Physcomitrella patens*, which over-produce gametophores. *Planta*, 1979, **144**: 437–442.
- [23] Robaglia C, Bruening G, Haseloff J, *et al.* Evolution and replication of tobacco ringspot virus satellite RNA mutants. *EMBO J*, 1993, **12**(7): 2969–2976.
- [24] Bachem WB, Oomen FJ, Visser GF. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, **16**: 157–173.
- [25] Donald CE, Qureshi F, Burns MJ, *et al.* An inter-platform repeatability study investigating real-time amplification of plasmid DNA. *BMC Biotechnol*, 2005, **5**(1): 15.
- [26] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**: e45.
- [27] Te Velthuis AJ, Isogai T, Gerrits L, *et al.* Insights into the molecular evolution of the PDZ/LIM family and identification of a novel conserved protein motif. *PLoS ONE*, 2007, **2**(2): e189.
- [28] Dawid IB, Breen JJ, Toyama R. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Gen*, 1998, **14**: 156–162.
- [29] Zheng Q, Zhao Y. The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction. *Biol Cell*, 2007, **99** (9): 489–502.
- [30] Thomas C, Hoffmann C, Dieterle M, *et al.* Tobacco WLIM1 is a novel F-actin binding protein involved in actin cytoskeleton remodeling. *Plant Cell Physiol*, 2006, **18**: 2194–2206.