

华山姜中钙调素基因的克隆及其 RNA 原位杂交^{*}

高雪梅

(中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部, 昆明 650223)

摘要: 本文报道了华山姜中钙调素 cDNA 的核苷酸序列以及由此推导的氨基酸序列, 并用原位杂交的方法检测其在花器官中的时空表达模式。用 [³²P] d-CTP 标记的小草蔻 *Alpinia hainanensis* AGAMOUS (AG) cDNA 的 MADS-domain 作为探针筛选华山姜的 cDNA 文库, 得到一个钙调素蛋白相关克隆, 命名为 *AoCAM*。华山姜钙调素 *AoCAM* 的 cDNA 全长 518 bp, 有一个包含 149 个氨基酸的开放读码框, 编码区起始于第 54 个核苷酸, 终止于第 501 个核苷酸。 *AoCAM* 与拟南芥、小麦、大豆、矮牵牛、玉米的钙调素氨基酸序列比较同源性高达 95%。 RNA 原位杂交表明钙调素基因在花瓣、雄蕊、雌蕊细胞中大量表达。 钙调素基因的表达强度随不同的发育阶段而变化: 花发育早期在花的各器官中都表达强烈, 以后逐渐减弱并向特定部位集中, 如花粉囊、唇瓣、花柱和胚珠等分生能力较强的细胞中表达较强。

关键词: 姜科; 山姜属; 钙调素; 花发育; 原位杂交

中图分类号: Q785; Q949.71+8.33 **文献标识码:** A

Cloning and RNA in Situ Hybridization of Calmodulin Gene in *Alpinia oblongifolia*

GAO Xue-mei

(Xishuangbanna Tropical Botanical Garden Kunming Section, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: The paper reports nucleotide sequence and correspondingly deduced amino acid sequences of calmodulin in *Alpinia oblongifolia* as well as temporal and spatial expression models of calmodulin detected in *Artemisia halodendron* flowers by in situ hybridization. [³²p] d-CTP-labeled cDNA MADS-domain of *Alpinia hainanensis* AGAMOUS (AG) was used as the probe to screen the cDNA library of *Alpinia oblongifolia* and thus a clone relating with calmodulin protein was obtained and named *AoCAM*. The *AoCAM* cDNA of *Alpinia oblongifolia* calmodulin had a full length of 518 by and contained an open reading frame consisting of 149 amino acids whose coding region began with the fifty fourth nucleotide and ended with the five hundred and first nucleotide. The *AoCAM* had a homogeneity as high as 95% with the amino acid sequences of *Arabidopsis thaliana* CAM7, *Triticum aestivum* CAM, *Glycine max* CAM, *Petunia hybrida* CAM81 and *Zea mays* CAM2. The in situ hybridization revealed that calmodulin gene was expressed in large quantities in petal, stamen and pistil cells. The expression intensity of calmodulin gene varied with different developmental stages, appearing high in the flower parts at the initial stage of flower development and then becoming low with strong expression focusing in specific locations such as pollen sac, labella,

^{*} 收稿日期: 2005-02-27; 修改稿收到日期: 2005-05-08
基金项目: 国家科技部基础研究重大项目前期研究专项(2001CCA00300)
作者简介: 高雪梅(1978-), 女(汉族), 硕士研究生, 主要从事植物学研究。 E-mail: gaouxuem@yahoo.com.cn

style, ovule cells that had high dividing capabilities.

Key words: Zingiberaceae; *Alpinia*; CAM; floral development; in situ hybridization

钙离子在植物对各种外界刺激产生特定生理反应过程中充当细胞内信使的作用, 钙调素作为最重要的一类钙离子传感蛋白可以通过与其下游钙调素结合蛋白作用而调节细胞的生理功能. 尽管钙调素在真核细胞中普遍存在, 其在细胞中的浓度随组织不同而变化, 受细胞的生理状态^[1]和环境以及荷尔蒙的刺激影响而变动^[2,3]. 钙调素基因在不同的发育时期、不同的组织和细胞类型中表达也不相同^[4,5].

华山姜(*Alpinia oblongifolia*)是姜科山姜属植物, 为林荫下常见的多年生草本, 具有独特的花柱卷曲性机制^[6]. 花柱卷曲性机制在姜科山姜属植物中普遍存在, 是植物中一种独特的依靠行为来促进远交的机制, 主要由雄蕊和雌蕊在发育上的相互配合来完成, 同一表型个体不同花之间性阶段在发育上的同步性使得所有的花同时进入同一性功能阶段, 这取决于花器官在发育上严格的时间控制, 以及环境和遗传因子间的相互影响^[7]. 对华山姜中钙调素在花发育各时期表达情况进行研究, 对于进一步揭示华山姜花发育的特殊性有重要意义.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 华山姜(*Alpinia oblongifolia*)是姜科山姜属植物, 其不同发育时期的花序芽, 采集自中国云南省勐海县曼稿国家级自然保护区.

1.1.2 菌种 大肠杆菌菌株: DH5 α .

1.1.3 试剂 常用试剂、克隆载体 pBluescript SK 和 pGEM-T Easy、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Xho* I、*Sal* I 等、碱性去磷酸化酶(CIP)、T₄ 连接酶、Taq 酶、dNTP、RNasin、DNA 片段的胶回收试剂盒、Hybond N+ 尼龙膜主要购自 Sigma、上海生工生物公司、上海第一化学试剂厂、Stratagene、Promega、NEB、博彩生物公司、上海华舜生物工程有限公司、Amersham Biosciences. PCR 引物合成、DNA 序列测定由上海博亚生物公司完成. 试剂的配制参照《分子克隆实验指南(第二版)》进行^[8].

1.1.4 培养基 NZY 培养基: NaCl 5.0 g · L⁻¹ + MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g · L⁻¹ + 酵母提取物 5.0 g · L⁻¹ + 水解酪蛋白 10.0 g · L⁻¹, pH 7.5; LB 培养基:

蛋白胨 10.0 g · L⁻¹ + 酵母提取物 5.0 g · L⁻¹ + NaCl 10.0 g · L⁻¹, pH 7.0.

1.1.5 华山姜生殖期顶端 cDNA 文库的构建 总 RNA 用 Oligotex mRNA Midi Kit (Qiagen) 提取, cDNA 用 ZAP cDNA Synthesis Kit (Stratagene) 合成, cDNA 文库用 ZAP-cDNA Gipapack Gold Cloning Kit (Stratagene) 包装, 滴度为 0.97 × 10⁶.

1.1.6 cDNA 文库筛选的探针 小草蔻(*Alpinia hainanensis*) 的 AG-like MADS-box cDNA, GenBank 登录号: AY621155.

1.2 方法

1.2.1 cDNA 文库的筛选 以小草蔻(*Alpinia hainanensis*) 的 AG-like MADS-box 基因的 MADS 片段为探针, 用 [³²P] d-CTP 标记探针. 将华山姜生殖期顶端 cDNA 文库铺板, 每个 15 cm 的培养皿大约 20 000 个噬菌斑, 将其转移到 Hybond-N+ 尼龙膜上. 先在 55℃ 杂交缓冲液(5 × SSC, 0.1% SDS 和 0.1% sarkosyl) 中预杂交 2 h, 再加入探针在温和条件(55℃) 下杂交过夜, 然后用洗膜液 0.2 × SSC 和 0.1% SDS 在相同温度下洗膜 3 次, 每次 15 min. 杂交膜用磷屏曝光过夜, 将可能的阳性克隆分离、释放 cDNAs. 经过第一轮筛选, 得到强弱不等的 16 个阳性克隆, 每个阳性克隆取 1 μL 菌液, 梯度稀释铺平板, 印膜, 杂交. 进行第二轮筛选, 得到阳性信号, 挑取其中 38 个单克隆, 微量制备质粒, 分别用 *EcoR* I 酶切鉴定. 将经两轮筛选得到的阳性克隆(共 5 个克隆) 测序.

1.2.2 RNA 原位杂交 设计引物对 *AcCAM* 进行 PCR 扩增制备探针. 引物 1: 5' plus: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3'; 引物 2: 3' minus: 5'-AAT TAA CCCTCA CTA AAG G-3'. PCR 程序: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 循环 30 次; 72℃ 延伸 10 min. 依据建立的金鱼草 RNA 原位杂交实验方法进行, 并稍作修改^[9~11].

1.2.3 序列分析软件 用 BioEdit version 7.0.0 分析 *AcCAM* 核苷酸及相应的氨基酸序列, 并与 GenBank 中拟南芥、小麦、大豆、矮牵牛、玉米中的钙调素蛋白比对.

引物设计采用 Premier Primer 3.0.

2 结果与分析

2.1 华山姜 cDNA 文库筛选

以小草蔻 (*Alpinia hainanensis*) 的 AG-like *MADS-box* 基因的 *MADS* 片段为探针, 筛选华山姜 (*Alpinia oblongifolia*) 的不同发育时期花序构建的 cDNA 文库, 得到两个 *MADS-box* 基因分别命名为 *AoAG*、*AoAGL20*, 一个钙调素基因命名为 *AoCAM*。

2.2 克隆测序及序列分析

华山姜钙调素 cDNA 全长 518 bp, 有一个包含 149 个氨基酸的开放读码框。编码区起始于第 54 个

核苷酸, 终止于第 501 个核苷酸。3' poly(A) 尾巴由 6 个碱基 A 构成, 起始于第 512 个核苷酸。这 149 个氨基酸的钙调素基因与拟南芥 CAM7 (*Arabidopsis thaliana* CAM7: NM-114249. 2)、小麦 CAM (*Triticum aestivum* CAM: U48691. 1)、大豆 CAM (*Glycine max* CAM: L01431. 1)、矮牵牛 CAM81 (*Petunia hybrida* CAM81: M80836. 1)、玉米 CAM2 (*Zea mays* CAM2: X77397. 1) 进行同源性分析(括号中为 GenBank 登录号), 结果表明只有 7 个氨基酸不同, 同源性高达 95%(图 1)。

AoCAM	1	MAQLTDDQIAEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQ
Arabidopsis thaliana CAM7	1	MADQLTDDQIEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQ
Triticum aestivum CAM	1	MADQLTDDQIAEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQ
Glycine max CAM	1	MADQLTDDQIAEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQ
Petunia hybrida CAM81	1	MADQLTDDQIEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQ
Zea mays CAM2	1	MADQLTDEQIAEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTAEALQ
AoCAM	51	DMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARKHKDTSSEELKEAFRVFDKQNGF
Arabidopsis thaliana CAM7	51	DMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARKHKDTSSEELKEAFRVFDKQNGF
Triticum aestivum CAM	51	DMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARKHKDTSSEELKEAFRVFDKQNGF
Glycine max CAM	51	DMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARKHKDTSSEELKEAFRVFDKQNGF
Petunia hybrida CAM81	51	DMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARKHKDTSSEELKEAFRVFDKQNGF
Zea mays CAM2	51	DMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMARKHKDTSSEELKEAFRVFDKQNGF
AoCAM	101	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVNNMAK
Arabidopsis thaliana CAM7	101	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVNNMAK
Triticum aestivum CAM	101	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVNNMAK
Glycine max CAM	101	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVNNMAK
Petunia hybrida CAM81	101	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVNNMAK
Zea mays CAM2	101	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVNNMAK

图 1 华山姜 CAM 蛋白与拟南芥、小麦、大豆、矮牵牛、玉米中 CAM 蛋白的同源性分析
序列中保守的氨基酸用阴影表示

Fig. 1 Homogeneity analysis of the AoCAM with the CAMs of *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Glycine max*, *Petunia hybrida* and *Zea mays*
The conservative amino acids in the sequences are shaded

2.3 RNA 原位杂交

利用 RNA 原位杂交技术检测了钙调素 mRNA 在华山姜花发育过程中的时空分布特征。原位杂交表明钙调素基因在花瓣、雄蕊、雌蕊细胞中大量表达。钙调素基因的表达强度随花的不同发育阶段而变化。花发育早期在花的各器官中都表达强烈, 以后逐渐减弱并向特定部位集中, 如花粉囊、柱头和胚珠等分生能力较强的细胞中表达较强, 其它部位表达呈弥散状(图 2)。

3 讨论

笔者克隆了华山姜的钙调素 cDNA 并用原位杂交的方法检测其 RNA 在花部各器官中的表达情况。核苷酸序列分析表明 *AoCAM* 包含了钙调素的整个编码序列, 由此得到的氨基酸序列与其它植物

的相比有很高的同源性。这说明: (1) 钙调素蛋白在华山姜花发育过程中可能也是一个基本的、起着重要作用的蛋白; (2) 华山姜所属的姜科植物(Zingiberaceae) 是一个高度进化的单子叶植物类群, 但进化过程中仍然存在着相当大的进化压力, 使钙调素蛋白序列高度保守。

在华山姜花的各部位中都观察到钙调素 RNA 的表达, 然而在不同的部位表达量不同。钙调素基因在花瓣、雄蕊、雌蕊细胞中大量表达, 这说明钙调素蛋白在花发育过程中起着重要的作用。CAM 在增殖的细胞、分生能力较强的细胞中表达增加^[12, 13], 本研究中钙调素基因的表达强度随不同的发育阶段而变化: 花发育早期在花的各器官中都表达强烈, 以后逐渐减弱并向特定部位集中, 如花粉囊、柱头和胚珠等分生能力较强的细胞中表达较强, 这表明

AoCAM 是细胞周期进行过程中所需要的. 前人的研究表明钙调素蛋白涉及被子植物雌雄配子体形成^[14]. 本研究中钙调素在花粉囊和胚珠等的细胞中表达较强, 可能是因为它参与了华山姜的雌雄配子体形成.

与钙调素相反, 钙调素结合域的下游靶蛋白表

现出极端的序列变异性, 包括许多不同的基因, 体现了钙离子-钙调素信号转导途径的多样性、复杂性以及钙调素蛋白调节的灵活性^[15]. 但 *MADS-box* 基因是否也能和钙调素结合并被其调节从未有过报道, 本文用 *MADS-box* 基因作为探针筛选到钙调素基因可能是一个偶然.

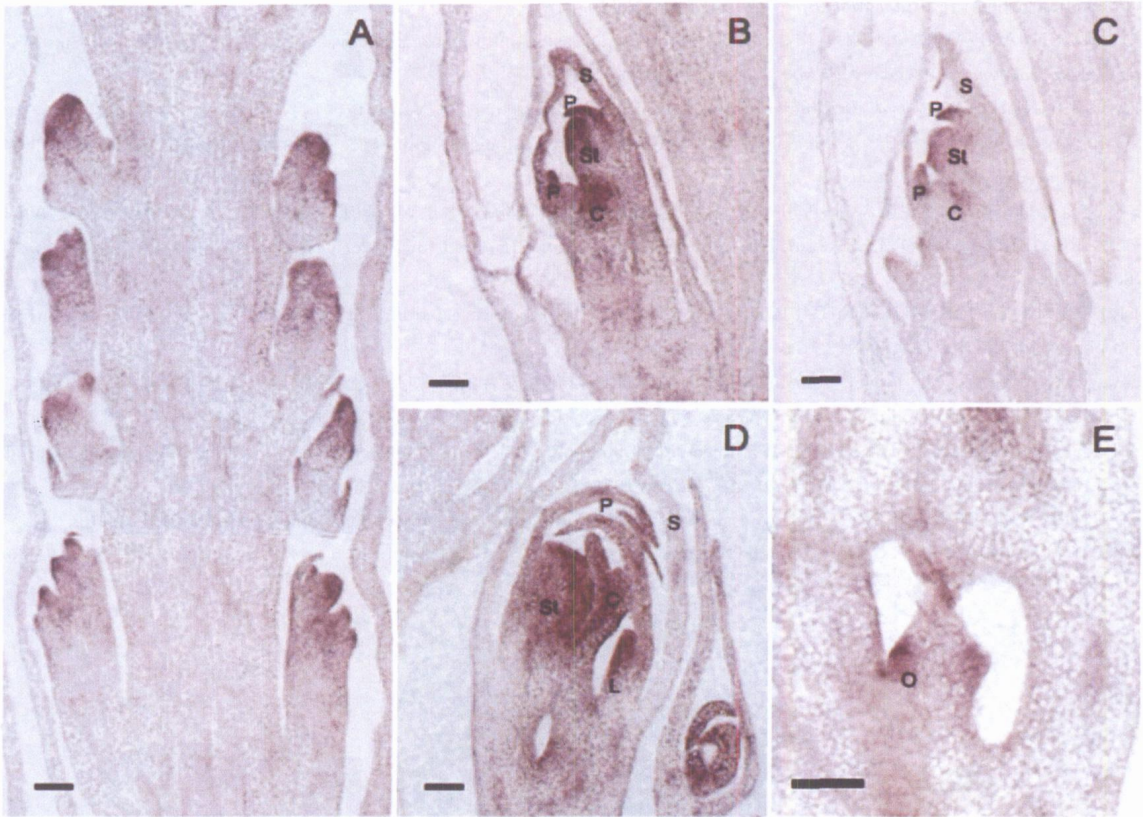


图2 *AoCAM* 原位杂交结果

A. 花发育早期, 花序上花原基起始, *AoCAM* 在花原基中强烈表达, 从中央到四周表达逐渐减弱; B、C. 随着共同原基的起始分化, *AoCAM* 强烈表达于起始雄蕊、花瓣和心皮的位置, 花萼中没有表达信号; D、E. 花发育后期, 各花器官分化成型, *AoCAM* 集中于雄蕊的花粉囊、唇瓣、花柱和胚珠表达
S. 花萼; P. 花瓣; St. 雄蕊; L. 唇瓣; C. 心皮; O. 胚珠. 比例尺: 50 μ m

Fig. 2 RNA *AoCAM* in situ hybridization

A. The early stage of flower development showing initial primordia in which *AoCAM* intensely expresses at a intensity that decrease from the center to the outer; B, C. With the development of the common primordia, strong *AoCAM* expression began to appear in stamens, petals and carpels and no express signals occurred in sepals; D, E. The late stage of flower development showing that various flower parts finished their formation and *AoCAM* expression concentratively appeared in pollen sacs, labella, styles and ovules
S: sepal; P: petal; St: stamen; L: labellum; C: carpel; O: ovule. Scale bar: 50 μ m

致谢: 本实验均由中国科学院西双版纳热带植物园李庆军老师资助, 在上海植物生理生态研究所植物分子遗传国家重点实验室罗达组完成, 华山姜生殖期顶端 cDNA 文库由上海植物生理生态研究所马伟等构建和保存, 小草蔻 (*Alpinia hainanensis*) 的 AG-like *MADS-box* cDNA 由华南植物园宋娟娟赠送, 在此表示感谢!

参考文献:

- [1] ROBERTS D M , HARMON A C . Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants[J] . *Annu. Rev. Plant Physiol. , Plant Mol. Biol.* , 1992, 43: 375– 414.
- [2] LIU H T , LI B , SHANG ZH L , *et al.* Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat[J] . *Plant Physiol.* , 2003, 132: 1 186– 1 195.
- [3] ALI G S , REDDY V S , LINDGREN P B , *et al.* Differential expression of genes encoding calmodulin-binding proteins in response to bacterial pathogens and inducers of defense responses[J] . *Plant Mol. Biol.* , 2003, 51: 803– 815.
- [4] YANG T B , LEV-YADUN S , FELDMAN M , *et al.* Developmentally regulated organ- tissue- and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat[J] . *Plant Mol. Biol.* , 1998, 37: 109– 120.
- [5] DUVAL F D , RENARD M , JAQUINOD M , *et al.* Differential expression and functional analysis of three calmodulin isoforms in germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds[J] . *Plant J.* , 2002, 32: 481– 493.
- [6] LI Q J , XU Z F , KRESS W J , *et al.* Flexible style that encourages outcrossing[J] . *Nature* , 2001, 410: 432.
- [7] ZHANG L (张 玲) , LI Q J (李庆军) . Flexistylis and its evolutionary ecological significance[J] . *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报) , 2002, **26**(4) : 385– 390 (in Chinese) .
- [8] 萨姆布鲁克 J , 弗里奇 E F , 曼尼阿蒂斯 T . 分子克隆实验指南(第二版)[M] . 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992: 908– 938.
- [9] COEN E S , ROMERO J M , DOYLE S , *et al.* Floricaula: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*[J] . *Cell* , 1990, 63: 1 311– 1 322.
- [10] FOBERT P R , COEN E S , MURPHY G J P , *et al.* Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants[J] . *EMBO J.* , 1994, 13: 616– 624.
- [11] 赵 忠 . 豆科模式植物百脉根中 TCP domain 基因的生物学功能与花瓣发育的研究[D] . 上海: 复旦大学生命科学院, 2003: 38– 40.
- [12] CHIN D , MEANS A R . Calmodulin: a prototypical calcium sensor[J] . *Trends. Cell Biol.* , 2000, 10: 322– 328.
- [13] JENA P K , REDDY A S N , POOVAIAH B W . Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant calmodulin: signal-induced changes in the expression of calmodulin[J] . *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 1989, **5**(86) : 3 644– 3 648.
- [14] POOVAIAH B W , REDDY A S N . Calcium and signal transduction in plants[J] . *Crit. Rev. Plant Sci.* , 1993, **12**(3) : 185– 211.
- [15] YANG T B , POOVAIAH B W . Calcium/ calmodulin-mediated signal network in plants[J] . *Trends Plant Sci.* , 2003, **8**(10) : 505– 512.