

文章编号: 1005-0906(2013)03-0040-08

玉米 LIM 结构域蛋白基因家族分析

张海燕, 李佐同, 赵长江, 杨克军,
王玉凤, 胡雪微, 赵莹

(黑龙江八一农垦大学农学院 / 寒地作物种质改良与栽培重点实验室, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 采用生物信息学的方法, 在玉米全基因组水平鉴定并分析玉米 LIM 蛋白基因, 鉴定出 11 个 *ZmLIM* 基因, 分别分布于玉米的 8 条染色体上。结构域分析表明, 多数 LIM 蛋白包括 2 个典型的 LIM 结构域。系统发育分析表明, LIM 家族可以分为 3 个亚家族。假定调控元件分析发现, 所有 LIM 基因启动子都具有大量花粉特异表达元件, 相对来说其他组织器官特异表达, 激素和逆境调控元件数量很少。*EST* 基因表达数据分析表明, 该家族成员具有明显的时空表达特性。

关键词: 玉米; LIM 结构域; LIM 基因家族; 生物信息学

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Genome-wide Analysis of LIM Domain-containing Protein Gene Family in Maize

ZHANG Hai-yan, LI Zuo-tong, ZHAO Chang-jiang, YANG Ke-jun,
WANG Yu-feng, HU Xue-wei, ZHAO Ying

(College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University /

Key Laboratory of Crop Germplasm Improvement and Cultivation in Cold Regions, Daqing 163319, China)

Abstract: By bioinformatic analysis, maize LIM genes were isolated and analyzed in those functions in whole-genome scale. A total of 11 maize LIM genes (*ZmLIM1* to *ZmLIM11*) were identified. *ZmLIM* genes were distributed in all the maize chromosomes except chromosome 7 and 8. Alignment and motif analysis results revealed major maize LIM proteins share two typical conserved domains. Phylogenetic analysis indicated LIM family could be divided into three subfamilies. Putative cis-acting regulatory elements involved in specific tissue or organ, phytohormones and stress, the tissue-specific expression elements, especial pollen-specific element, were observed in the promoters of all *ZmLIM* genes; other elements distribution presented fragmentarily. Expression data of ESTs suggested maize LIM genes had temporal and spatial expression pattern.

Key words: Maize; LIM domain; LIM gene family; Bioinformatic analysis

收稿日期: 2013-01-07

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目子课题(2011BAD16B1103)、大庆市科技计划项目(scyh-2011-73)、黑龙江省寒地作物种质改良与栽培重点实验室开放课题项目(CGIC201208)、黑龙江省垦区科研项目(NK12A-03-15)、黑龙江八一农垦大学引进人才科研启动计划课题

作者简介: 张海燕(1978-), 女, 黑龙江望奎人, 博士, 讲师, 主要从事害虫生物防治研究。

李佐同为本文通讯作者。Tel: 0459-6819001

E-mail: lxg6401999@163.com

玉米是 C₄ 作物, 呼吸作用消耗的干物质少, 光合效率较高, 单位面积产量较高。近年来, 玉米已经发展成为我国重要的粮饲作物和经济作物, 玉米产量成为我国粮食供求形势和决定畜牧业发展形势的重要因素。LIM 蛋白为含有 LIM 结构域蛋白, 其命名来源于最早分离鉴定的 3 个动物源 LIM 结构域蛋白质的首字母缩写, 即 LIN11、ISL1 和 MEC3^[1-3]。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, 由富含半胱氨酸的锌指基元组成, 其保守序列为 [C-X2-C-X16-23-H-X2-C]-X2-[C-X2-C-X16-21-C-X2-3-(CHD)], 其中 8 个保守的氨

氨基酸残基形成 2 个连续的锌指结构。Baltz 等^[4-6]发现,向日葵 LIM 结构域蛋白 SF3(HaPLIM1)在花粉特异表达,与向日葵花粉管生长有关。Eliasson 等^[7]在分析了开花植物 LIM 基因表达发现,LIM 除具有花粉特异表达外,还有其他组织和器官表达的能力。另外,与动物 LIM 蛋白一样,植物 LIM 蛋白既有定位于细胞质的,也有定位于细胞核的,或同时具有两种定位,该类蛋白在不同定位时的功能是否不同还不清楚。Kawaoka 等^[8]证明,烟草 N_LLIM1 作为转录因子结合 PAL-盒,调节苯丙氨酸代谢途径关键酶,从而调控木质素的生物合成。Mundel 等^[9]发现,向日葵 HaWLIM1 蛋白介导了肌动蛋白胞质骨架与细胞器膜和囊泡的结合,并在细胞质流动中具有重要作用。烟草的 LIM 蛋白 N_LWLIM1 可以结合丝状肌动蛋白(Filamentous actin, F-actin)^[10]。Wang 等^[11]发现,百合 LiLIM1 也可作为肌动蛋白的结合蛋白(Actin-binding proteins, ABPs),促进丝状肌动蛋白束组装,保护丝状肌动蛋白解聚,调节花粉管延伸。迄今为止已经在多种植物中分离到 LIM 基因,如向日葵、烟草、拟南芥、水稻、黑杨、百合、棉花、小立碗藓、巴西橡胶树等^[12-15],但在玉米基因组水平上系统分析 LIM 蛋白的研究未见报道,也未见玉米中该类转录因子相关功能的报道。

本研究采用生物信息学的方法,在玉米全基因组水平分离鉴定并分析玉米 LIM 家族蛋白基因,有助于深入解析玉米 LIM 结构域蛋白基因在玉米生长发育调控和逆境胁迫应答中的作用,为植物品种改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 分离鉴定玉米 LIM 基因

为了更好地在玉米全基因组水平注释 LIM 基因,采用 3 种方法获取 LIM 基因的序列:①以 PF00412 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 和 SM00132 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 两个数据库中 LIM 蛋白保守结构域作为种子,搜索 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和玉米基因组数据库(<http://www.maizegenome.org/index.html>);②以拟南芥和水稻发表的 LIM 蛋白为种子,提交 NCBI 数据库,获得玉米 LIM 蛋白序列;③在 NCBI 数据库中以“LIM-domain”为关键词挖掘玉米 LIM 基因序列。将非冗余的玉米 LIM 蛋白提交 SMART 数据库和 InterProScan 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterPro>)进一步检验 LIM 蛋白结构域。

1.2 基因结构分析

玉米 LIM 基因的登录号、染色体的定位、开放读码框的长度、外显子和内含子的数量分布以及全长 cDNA(Full Length cDNA, FLcDNA)和完整编码区(complete CDS, cCDS)来自玉米 B73 基因组数据库、NCBI 数据库和玉米全长 cDNA 数据库(<http://www.maizecna.org/>),玉米 LIM 基因结构的绘制由在线 GSDS 工具(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)完成。

1.3 玉米 LIM 蛋白系统进化和结构域分析

玉米 LIM 蛋白保守域分析由 MEME(http://meme.nbcr.net/meme4_1/cgi-bin/meme.cgi)在线工具完成。参数设置如下:结构域最小氨基酸残基数(minimum motif width):10 aa;结构域最大氨基酸残基数(maximum motif width):70 aa;不同结构域的数量(Number of different motifs):5;其余参数为默认设置。玉米 LIM 蛋白的多重比对和进化树的构建由 MEGA 软件完成。进化分析采用邻接法,并进行 1 000 次 Bootstrap 检验。

1.4 玉米 LIM 基因表达谱

以玉米 LIM 基因全长 cDNA 作种子,提交 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>)进行 EST 序列比对,同时结合 NCBI 中 Unigene 数据库 EST 表达谱数据,获得玉米 LIM 家族基因在玉米不同发育时期组织和器官的表达状况。

1.5 玉米 LIM 基因启动子元件分析

为了分析 LIM 转录因子启动上顺式反应元件,玉米 LIM 基因翻译起始位点(ATG)上游 1 500 bp 的启动子序列从玉米 B73 基因组数据库中获得,然后将 LIM 基因启动子序列提交 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>)进行反应调控元件分析,对启动子上特定表达元件的数量聚类分析由 Cluster version 3.0 和 Tree View version 1.60 软件完成。

2 结果与分析

2.1 玉米基因组水平鉴定 11 个 ZmLIM 基因

综合考虑 PF00412 和 SM00132 结构域,以包括 7 个高度保守的半胱氨酸残基和 1 个组氨酸残基约 60 个氨基酸作为种子,搜索玉米 B73 基因组数据库;同时在 NCBI 数据库中以“LIM-domain”为关键词搜索 LIM 蛋白,获得 11 个含有 LIM 结构域的蛋白基因,最终获得 11 个非冗余的 LIM 基因。通过 SMART 和 InterProScan 数据库对玉米 LIM 蛋白保守结构域分析,鉴定的 11 个玉米 LIM 蛋白中有 8

个包括两个串联的 LIM 结构域,3 个蛋白有且只有 1 个 LIM 结构域。以含有两个 LIM 结构域优先的原则按照其在染色体上的位置将命名为 *ZmLIM1-11*

(表 1)。被鉴定的 11 个 *LIM* 基因分布于染色体第 1、2、3、4、5、6、10 染色体上,其中染色体 1 和染色体 6 分别包括 3 个 *LIM* 基因(表 1)。

表 1 玉米 *ZmLIM* 基因的特征
Table 1 Characters of *ZmLIM* genes in maize

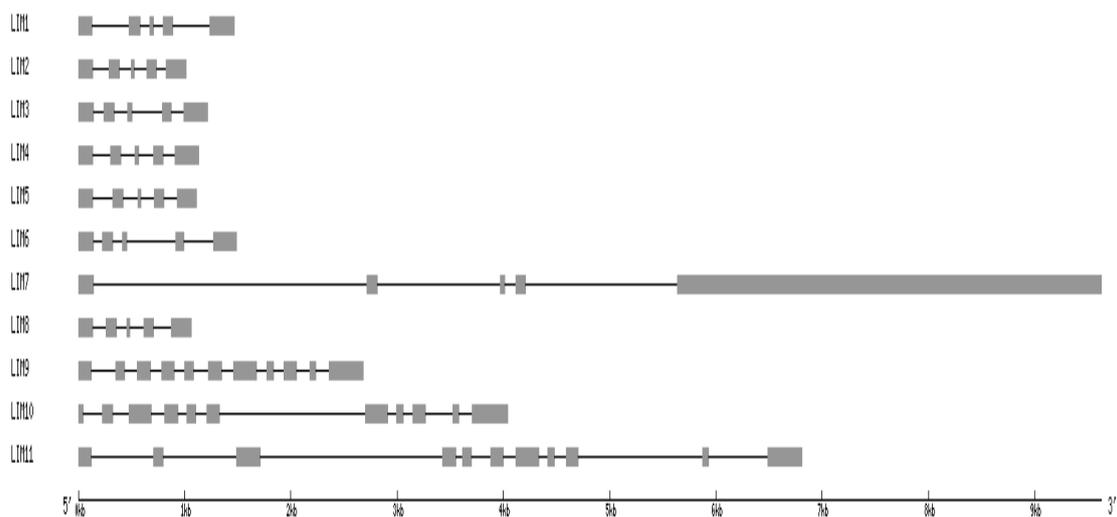
基因 Gene	转录本 Transcript				基因组定位 Genome location				蛋白 Protein
	Maize sequence	Genebank	flcDNA/cCDS	ORF(bp)	Chr.	Clone	Location	Orfiii	
<i>LIM1</i>	GRMZM2G128206_T03	LOC100281283	BT068434	597	1	AC208204.3	134591-136057	-	198
<i>LIM2</i>	GRMZM2G153268_T01	LOC100194335	BT036854	615	2	AC186516.3	130219-131230	-	204
<i>LIM3</i>	GRMZM2G175761_T01	LOC100281636	EU957376	591	3	AC182621.3	108506-109723	+	196
<i>LIM4</i>	GRMZM2G134752_T01	Not available	BT062488	624	4	AC195995.3	18963-20093	-	207
<i>LIM5</i>	GRMZM2G170034_T01	Not available	BT061506	615	5	AC213522.3	125780-126894	-	204
<i>LIM6</i>	GRMZM2G004959_T01	LOC100281636	BT055434	588	6	AC206161.4	83466-84955	+	195
<i>LIM7</i>	GRMZM2G010960_T01	Not available	Not available	4 362	6	AC206902.3	146607-156229	-	1 453
<i>LIM8</i>	GRMZM2G024887_T01	LOC100272616	BT039056	618	10	AC203898.4	38999-40058	+	205
<i>LIM9</i>	GRMZM2G160198_T02	LOC100279838	BT054993/BT063555	1 452	1	AC191592.3	66647-69329	-	483
<i>LIM10</i>	GRMZM2G099328_T01	LOC100281489	EU956868/EU954668	1 515	1	AC204374.3	157987-162084	-	504
<i>LIM11</i>	GRMZM2G017845_T01	LOC100191921	BT055878/BT085014	1 527	6	AC202874.3	63002-69808	+	508

2.2 玉米 *ZmLIM* 基因特征

鉴定命名的 *ZmLIM* 基因内含子和外显子数量分布情况分析表明,8 个 *LIM* 基因(*ZmLIM1-8*)都含有 4 个内含子,外显子编码 2 个串联的 LIM 结构域的蛋白;其余 3 个 LIM 蛋白(*ZmLIM9-11*)仅有 1 个 LIM 结构域,这 3 个 *LIM* 基因也含有相同数量的 10 个内含子(图 1)。根据内含子的数量可以将 11 个 *LIM* 基因分成两大类,即含有 4 个内含子和 10 个内含子的两类,这与在蛋白水平按 LIM 结构域的数量

来分类是完全一致的。

多重比对结果表明,多数 *ZmLIM* 蛋白主要含有两个保守的区域,即由半胱氨酸决定的 LIM 域,*ZmLIM1-8* 蛋白都含有 2 个完整的 LIM 结构域。尽管所有 *ZmLIM* 的 N 端都含有典型的 LIM 结构域,但其 C 端却不尽相同,主要差别在 *ZmLIM9-11* 蛋白 C 端虽然具有 5 个高度保守的半胱氨酸残基,并没有形成典型 LIM 结构域。



注:外显子和内含子分别被填充的方形和单线所表示。

Note: Exons and introns were showed by filled boxes and single lines, respectively.

图 1 玉米 *ZmLIM* 基因结构

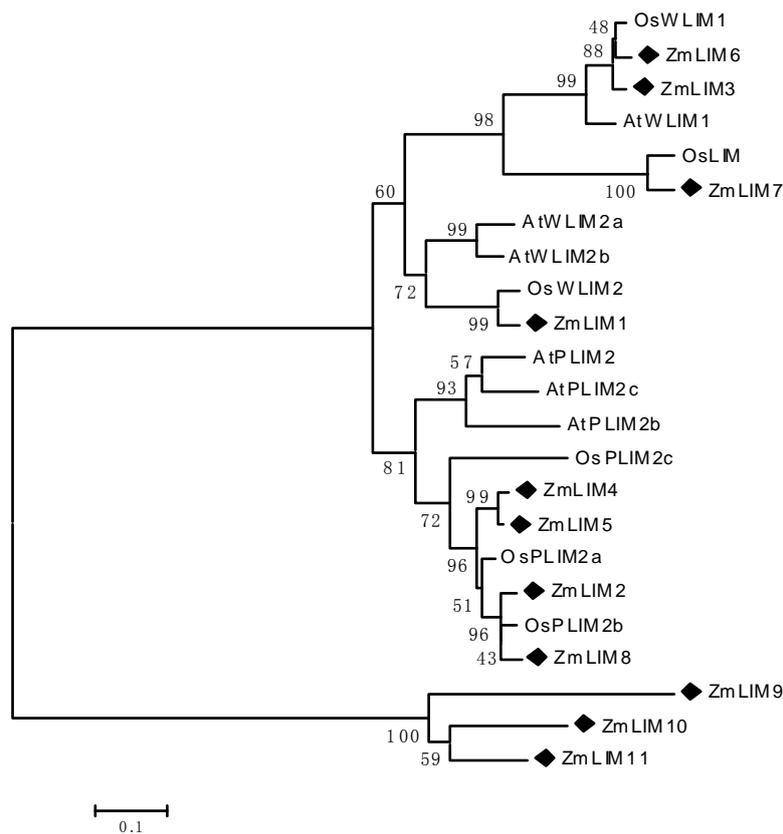
Fig.1 Gene structure of maize *ZmLIM*

2.3 玉米 LIM 蛋白进化分析

为了明确 11 个 ZmLIM 蛋白之间的进化关系,对其全长蛋白以及 N 端 LIM 结构域进行分析,通过邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统树结果发现,全长蛋白作种子构建的进化树与 LIM 域构建的进化树一致,而且最小进化法(Minimum Evolution, ME)构建的进化树也获得与 NJ 法相同的树形。依据亲缘关系,将 ZmLIM 家族蛋白分为 3 个亚组:第 1 亚组含有两个 LIM 结构域,包括 4 个 LIM 蛋白,ZmLIM2、ZmLIM4、ZmLIM5、ZmLIM8;第 2 亚组也含有两个 LIM 结构域,包括 4 个 LIM 蛋白,ZmLIM1、ZmLIM3、ZmLIM6、ZmLIM7;第 3 亚组只含有 1 个 LIM 结构域,包括 3 个 LIM 蛋白,ZmLIM9、ZmLIM10、ZmLIM11。

为了分析玉米、水稻和拟南芥 LIM 蛋白之间的亲缘关系,采用 NJ 法构建了 3 个物种间的进化树(图 2),依然将 LIM 蛋白分为相同的 3 个亚组。含

LIM 结构域蛋白氨基酸序列采用邻近法进行分析,结点数据表示基于 1 000 次重复检验的步长值。总体来看玉米 LIM 蛋白与水稻 LIM 蛋白间的亲缘关系较与拟南芥要近。依据进化关系可以将含有 2 个 LIM 结构域的玉米 LIM 蛋白划分为两类,分别与表达模式不同的两类植物 LIM 蛋白相对应。玉米 ZmLIM2、ZmLIM4、ZmLIM5 和 ZmLIM8 与植物花粉特异(或优先)表达的 LIM 蛋白 OsPLIM2a (LOC_Os02g42820)、OsPLIM2b (LOC_Os04g45010)、OsPLIM2c (LOC_Os10g35930)、AtPLIM2a (At2g45800)、AtPLIM2b (At1g01780)、AtPLIM2c (At3g61230)亲缘关系较近;另外,玉米 ZmLIM1、ZmLIM3、ZmLIM6 和 ZmLIM7 与多组织和器官表达的 OsWLIM1 (LOC_Os12g32620)、OsLIM (LOC_Os06g13030)、OsWLIM2 (LOC_Os03g15940)、AtWLIM1 (At1g10200)、AtWLIM2a (At2g39900)、AtWLIM2b (At3g55770)亲缘关系较为接近。



注:每个 LIM 蛋白由物种的首字母标记;玉米 LIM 蛋白又被填充的菱形突出标记。
Note: A species acronym is added before each LIM protein name; ZmLIMs were marked by full diamond.

图 2 植物含 LIM 结构域蛋白进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of plant LIM domain proteins

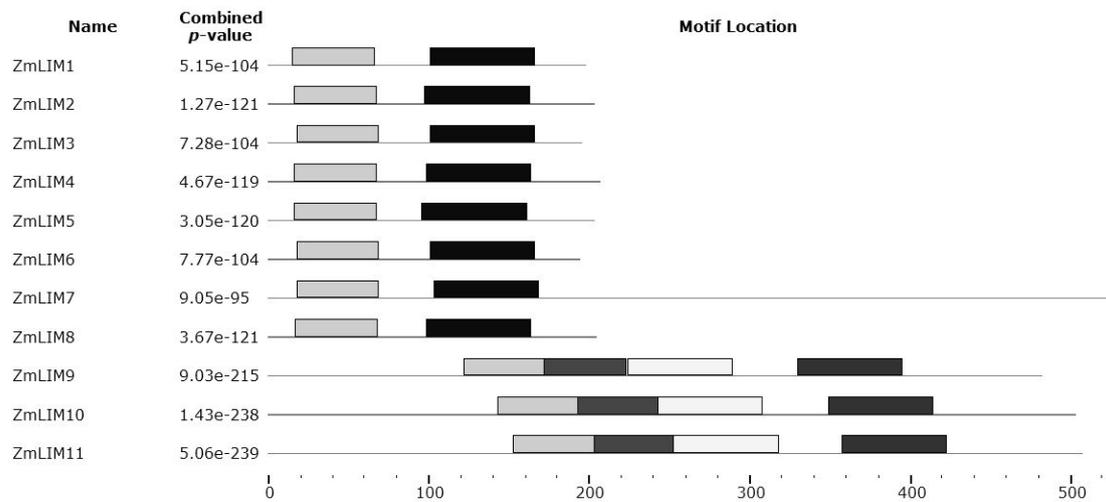
2.4 玉米 LIM 蛋白保守域分析

为了分析玉米 LIM 蛋白保守域,将 11 个鉴定

的玉米 ZmLIM 蛋白全长序列提交 MEME 数据库,发现所有 LIM 蛋白 N 端都含有一个保守域 M1,即

为 LIM1 结构域,其保守序列为 [C-X2-C-X3-(V/I)-X5-L-X7-H-X2-CF-(R/K)-C-X2-C-X3-(L/I)-X4-(Y/F)-X7-Y-(C/H)-(K/R)-X-(H/C)];ZmLIM1-8 都具有另外一个保守域 M2,即为 LIM2 结构域,其保守序列为 [KC-X2-C-X-KT-(V/A)-YP-X-E-(K/R)-X7-YHK-X-CF-(K/R)-C-X-HGGC-X4-S-X6-G-X-LYCK-X-H];ZmLIM9-11 也共享 3 个高度保守的区域 M3、M4 和 M5,其保守序列分别为 [FIPTN-X2-GLIEYRAHPFW-X-QKY-CPSHE-X-D-X-TPRCC]、[RP-X2-KY-X2-L-X-DGR-X-LC-X-ECL-X-SAVMD-X3-CQ-X-LY-X2-I-X4-EG-X2-

M-X3-QQ-X-P-X-LLVERQALNEA]、[N-X4-M-X3-P-X2-L-X-RRCEVTAIL-X-LYGLPRL-X-TGSILAHE-X-MH-X2-LRLKG-X-R-X-L-X3-VEEGICQV](图 3)。NCBI 数据库保守结构域分析发现,ZmLIM9-11 也都含有 2 个结构域:除 N 端 LIM 域外,在 C 端有约 210 个氨基酸的保守域 DUF3633(PFAM12315),该结构域在细菌和真核生物中都很保守,但功能未知。通过 MEME 分析得出的 M4 和 M5 保守区与 NCBI 中的 DUF3633 结构域几乎完全重叠。



注:LIM蛋白保守域分析由 MEME 网站完成。从左至右依次出现且对比度不同的长条形代表 5 种不同的保守域,分别被命名为 M1~M5。

Notes: Conserved motifs of LIM proteins were investigated by MEME web server. The contrast strips in light represented five species of motifs from left to right and named M1-5 respectively.

图 3 玉米 ZmLIM 蛋白保守域

Fig.3 Conserved motif in maize LIM proteins

2.5 玉米 LIM 家族基因表达模式

在 NCBI 数据库中通过对 LIM 基因全长 cDNA 序列进行表达 EST 的分析,获得玉米 LIM 家族基因在玉米不同发育时期组织和器官的表达状况(表 2)。根据组织器官表达部分可以将 LIM 基因分成 3 类:1 类为花粉特异表达,包括 ZmLIM2、ZmLIM4、ZmLIM5、ZmLIM8;2 类为根特异表达,包括 ZmLIM3 和 ZmLIM6;3 类为无组织器官特异性,包括 ZmLIM1、ZmLIM9、ZmLIM10 和 ZmLIM11。在这 3 类中,第 1 类和第 2 类都是具有 2 个 LIM 结构域的蛋白基因,第 3 类中只有 ZmLIM1 具有 2 个 LIM 结构域,其余 3 个都为单个 LIM 结构域。

2.6 玉米 LIM 基因启动子特异顺式元件

在 PLACE 数据库中对 LIM 基因翻译起始位点上游 1 500 bp 的启动子顺式表达元件进行全面分析,然后选取决定组织特异表达顺式作用元件 8 个

(S000512、S000352、S000215、S000378、S000245、S000254、S000122、S000148)、激素诱导表达元件 10 个(S000394、S000401、S000270、S000234、S000419、S000439、S000430、S000458、S000323、S000390)和逆境诱导表达元件 9 个(S000493、S000499、S000505、S000175、S000413、S000250、S000157、S000142、S000508),对这些元件在启动子上的数量进行聚类分析(图 4)。在组织特异表达元件分析中,11 个 ZmLIM 基因启动子上花粉特异表达元件分布数量最多,其次是根特异表达元件,茎、叶和种子特异表达元件有零星分布;在激素诱导表达元件分析中,排除可被水杨酸诱导的 W-box(S00039011)外,脱落酸、生长素、赤霉素和茉莉酸等激素诱导表达的元件分布都较少,最多 2 个;在逆境诱导表达元件分析中,铜、硫、脱水和激发子诱导元件分布依次减少。

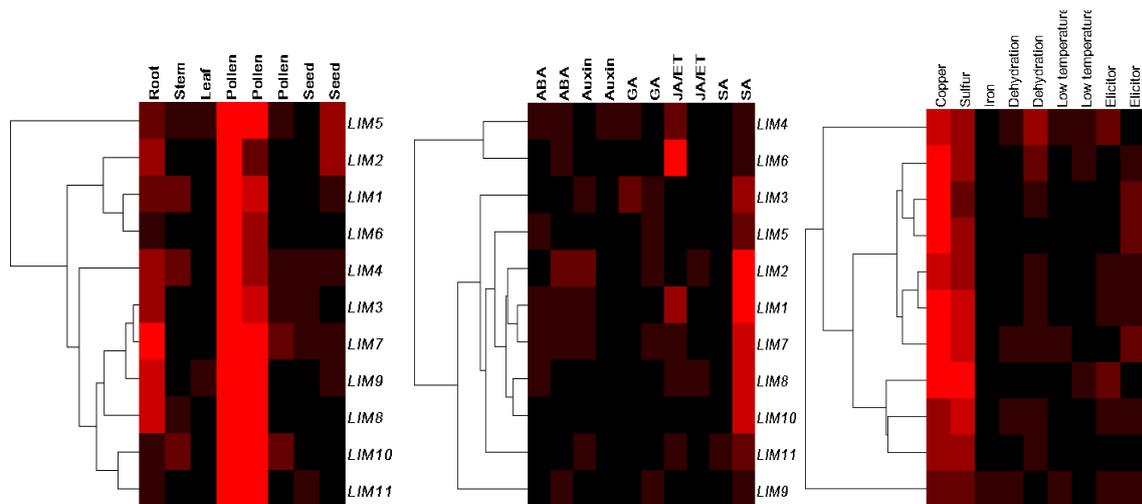
表 2 玉米 *ZmLIM* 基因表达分析
Table 2 Expression analysis of *ZmLIM* genes in silico

组织 / 器官 Tissue/organ	玉米基因 Gene of maize										
	<i>LIM1</i>	<i>LIM2</i>	<i>LIM3</i>	<i>LIM4</i>	<i>LIM5</i>	<i>LIM6</i>	<i>LIM7</i>	<i>LIM8</i>	<i>LIM9</i>	<i>LIM10</i>	<i>LIM11</i>
气生器官	▲▲										
果穗	▲										▲
胚芽	▲					▲					
胚乳							△			▲▲	▲
叶片	▲▲									▲	
分生组织	▲								▲	▲	▲
子房	▲								▲	▲	▲
小穗										▲▲	
花粉	▲▲	▲▲▲		▲	▲▲▲			▲▲▲			
根	▲▲		▲			▲				▲	
芽	▲										▲
雌花丝	▲▲										
雄花	▲					▲	△				

注:黑色三角形表示表达,三角形的数量越多表达越强;空白意味无表达;空三角形表示表达很弱。

Notes: Black triangle meant expression, amount of which represents expression strongly; Blank meant non-expression.

Empty triangles showed feeble expression.



注:*LIM* 基因 1 500 bp 启动子元件分析在 PLACE 网上进行。图示结果由 Cluster version 3.0 和 Tree View version 1.60 软件完成。

A: *ZmLIM* 启动子上组织特异表达元件的数量。从左至右依次为根、茎、叶、花粉和种子。

B: *ZmLIM* 启动子上激素诱导元件的数量。从左至右依次为脱落酸、生长素、赤霉素、茉莉酸/乙烯和水杨酸。

C: *ZmLIM* 启动子上逆境诱导元件的数量。从左至右依次为铜、硫、铁、干旱、低温和激发子。

Notes: Analysis of various elements in 1 500 bp promoter was performed by PLACE website. The results of elements number were acquired softwares.

A, Amount of specific-tissue elements distributed in *ZmLIM* promoters. Columns from left to right represent respectively root, stem, leaf, pollen and seed.

B, Amount of hormones-inducing elements distributed in *ZmLIM* promoters. Columns from left to right represent respectively ABA, auxin, GA, JA/ET and SA.

C, Amount of elements involved in stresses distributed in *ZmLIM* promoters. Columns from left to right represent respectively copper, sulfur, iron, dehydration, low temperature and elicitor.

图 4 玉米 *ZmLIM* 基因启动子顺式元件数量分布

Fig.4 Amount of cis-elements in maize *LIM* promoters

3 结论与讨论

LIM 结构域广泛存在于真核生物中,充当蛋白-蛋白互作的组件行使其蛋白的功能^[6]。通常所指的 LIM 家族是一类半胱氨酸富集蛋白(Cys-Rich Proteins, CRPs),其典型特征为包括两个相似 LIM 结构域的 200 个左右氨基酸残基组成,结构域间被 40~50 个氨基酸残基分隔^[7]。在动物中,定位于细胞核的 LIM 蛋白参与发育基因的转录调节^[8],定位于细胞质中 LIM 蛋白主要作为 ABP 参与肌动蛋白细胞骨架形成调节功能如 zyxin, EPLIN 和 CPR1^[19~21]。在植物中已发现 LIM 蛋白参与细胞骨架的调节^[22,23]。最近 Papuga 等^[24]全面分析了拟南芥 6 个 LIM 蛋白的功能,明确指出拟南芥 LIM 蛋白是高度专一化的 ABP 蛋白家族。通过启动子转基因的方式揭示了拟南芥 LIM 基因的组织/器官特异表达方式,表明 *AtLIM* 确实存在营养生长和生殖生长 2 种表达模式,更严格地来讲是 *WLIM1*、*WLIM2a* 和 *WLIM2b* 在孢子体组织广泛表达,在花粉中无表达或极弱表达;*PLIM2a*、*PLIM2b* 和 *PLIM2c* 在花粉粒中优先且大量表达。实验证明,拟南芥 LIM 蛋白都可以作为肌动蛋白的结合蛋白发挥功能,具有不同程度的肌动蛋白结合(*WLIM* 比 *PLIM* 结合力强)、稳定和成束调节能力。已有研究指出,pH 值和 Ca^{2+} 这两个因素之所以为花粉管摆动生长的调解者,主要是通过激活和失活 ABPs 来实现的^[25,26]。Papuga 等发现,拟南芥 LIM 蛋白对 pH 和 Ca^{2+} 反应不同,值得关注的是,3 个花粉富集的 *PLIMs* 可以被相对的高 pH 值(≥ 6.8)失活,然而相同条件下的 3 个 *WLIMs* 却不受影响。此外,一个植物 LIM 的同系物人类 CRP3(肌肉 LIM 蛋白)也是以 pH 值依赖的方式直接与 ADF/cofilin 2 互作^[27]。上述结果表明,LIM 蛋白在植物和动物中是非常保守的,主要都作为 ABP 发挥其功能,尤其是在全基因组水平对拟南芥 LIM 蛋白功能的系统研究,为其他物种的该类蛋白功能研究提供了良好的借鉴。植物中 CRP 相关的 LIM 蛋白形成了小的多拷贝基因家族,但是玉米 LIM 蛋白功能以及该基因家族的系统分析至今未见报道。

Arnaud 等在分析杨树、拟南芥和水稻等植物 LIM 基因家族时命名了 4 个含有两个 LIM 结构域的玉米 LIM 基因,分别命名为 *ZmWLIM1*、*ZmWLIM2*、*ZmPLIM2a* 和 *ZmPLIM2b*。通过序列比对分析,本研究鉴定命名的 11 个玉米 LIM 基因中,*ZmLIM6*、*ZmLIM1*、*ZmLIM2* 和 *ZmLIM5* 依次与 Arnaud 等命名

的玉米 LIM 基因对应。不同植物的 LIM 家族成员数量相差不多,如在水稻和拟南芥中各有 6 个,目前发现最多的物种杨树有 12 个 LIM 蛋白。早期研究表明,含有两个 LIM 结构域的基因表达模式可以依据组织或器官表达特异性被分成两个亚家族,*WLIM* 亚家族成员在植物多个组织中均可以表达,而 *PLIM* 亚家族成员具有花粉特异性或是花粉优先表达的模式。依据这样的分类,拟南芥 LIM 基因可分为 3 个营养生长期表达的 *WLIM1*、*WLIM2a* 和 *WLIM2b* 以及 3 个生殖生长期表达的 *PLIM2a-c*,而且这样的分类也得到实验的证明。从拟南芥、水稻和玉米 LIM 蛋白聚类分析中,玉米 LIM 被分成 3 类:第 1 类包括玉米 *ZmLIM2*、*ZmLIM4*、*ZmLIM5* 和 *ZmLIM8* 以及拟南芥和水稻的 *WLIMs*;第 2 类包括玉米 *ZmLIM1*、*ZmLIM3*、*ZmLIM6* 和 *ZmLIM7* 以及拟南芥和水稻 *PLIMs*;第 3 类为玉米 *ZmLIM9*、*ZmLIM10* 和 *ZmLIM11*,含有单个 LIM 结构域。由此可以认为,玉米 LIM 基因也应该存在 *ZmPLIMs* 和 *ZmWLIMs* 两种表达模式,该推论也得到玉米 LIM 基因 EST 表达数据的支持,即 *ZmLIM2*、*ZmLIM4*、*ZmLIM5* 和 *ZmLIM8* 只在花粉中表达,为 *PLIM* 型基因。

本研究鉴定命名了 11 个玉米 LIM 蛋白,包括 8 个双 LIM 结构域的蛋白和 3 个单 LIM 结构域的蛋白。单 LIM 结构域蛋白只保留了 N 端的 LIM 结构域,C 端再生出新的高度保守的结构域,虽然功能未知,但依然富含半胱氨酸残基,可能是 LIM 结构域的异化。另外,通过分析 LIM 基因启动子发现,无论单 LIM 结构域还是双 LIM 结构域的基因启动子上都具有大量的花粉特异表达顺式元件的存在,而且其他供分析的顺式元件也相差不多,这在一定程度上表明单、双结构域 LIM 基因在基因水平亲缘关系较为密切。最后,玉米 LIM 基因结构分析发现,玉米含有双 LIM 结构域的基因都具有 4 个内含子,与 Arnaud 等指出的植物 LIM 蛋白普遍具有 4 个内含子的结论一致,表明该类基因进化上的保守性。

本研究在玉米全基因组水平鉴定含有 LIM 结构域蛋白基因,并分析了该家族 11 个成员的表达状况。系统发育分析将 LIM 家族分为 3 个亚组,第 1 和第 2 亚组蛋白都包括 2 个典型的 LIM 结构域,第 3 亚组有且只有 1 个 LIM 结构域。组织和器官表达特异性分析表明,*ZmLIM* 具有明显的时空表达特性,第 2 亚组为花粉特异表达基因(*PLIMs*);第 1 亚组与第 3 亚组无组织表达特异性(*WPLIMs*)。玉米 LIM 蛋白系统发育分类与基因表达模式的分类结果

具有一致性。*ZmLIM* 基因启动子假定调控元件分析发现,所有启动子都具大量有花粉特异表达元件,其他组织器官特异表达、激素和逆境诱导元件在启动子上分布很少且数量相差不多。结果表明玉米 *LIM* 基因可能主要参与发育调控。

参考文献:

- [1] Freyd G, Kim S K, Horvitz H R. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*[J]. *Nature*, 1990, 344: 876-879.
- [2] Karlsson O, Thor S, Nörberg 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[J]. *Nature*, 1990, 344: 879-882.
- [3] Way J C, Chalfie M. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*[J]. *Cell*, 1988, 54: 5-16.
- [4] Baltz R, Domon C, Pillay D T N, et al. Characterization of a pollen-specific cDNA from sunflower encoding a zinc finger protein[J]. *Plant J.*, 1992, 2: 713-721.
- [5] Baltz R, Evrard J L, Domon C, et al. A LIM motif is present in a pollen-specific protein[J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 1465-1466.
- [6] Baltz R, Schmit A C, Kohnen M, et al. Differential localization of the LIM domain protein PLIM-1 in microspores and mature pollen grains from sunflower[J]. *Sex Plant Reprod*, 1999, 12: 60-65.
- [7] Eliasson A, Gass N, Mundel C, et al. Molecular and expression analysis of a LIM protein gene family from flowering plants[J]. *Mol. Gen. Genet.*, 2000, 264(3): 257-267.
- [8] Kawaoka A, Kaothien P, Yoshida K, et al. Functional analysis of tobacco LIM protein *Nlim1* involved in lignin biosynthesis[J]. *Plant J.*, 2000, 22: 289-301.
- [9] Mundel C, Baltz R, Eliasson A, et al. A LIM2 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[J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42: 291-302.
- [10] Thomas C, Hoffmann C, Dieterle M, et al. Tobacco WLIM1 is a novel F-Actin binding protein involved in actin cytoskeleton remodeling[J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 2194-2206.
- [11] Wang H J, Wan A R, Jauh G Y. An Actin-Binding Protein, LILIM1, Mediates Calcium and Hydrogen Regulation of Actin Dynamics in Pollen Tubes[J]. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1619-1636.
- [12] Arnaud D, Dejardin A, Leple J C, et al. Genome-wide analysis of LIM gene family in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*[J]. *DNA Res.*, 2007, 14(3): 103-116.
- [13] 罗明,肖月华,侯磊,等.棉花 LIM 结构域基因(*GhLIM1*)的克隆和表达分析[J]. *遗传学报*, 2003, 30(2): 175-182.
- [14] 孙铭明,马荣才,何奕昆.小立碗藓冷驯化相关基因 *Pp-LIM only A* 的克隆与表达[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(11): 1867-1873.
- [15] 吴瑞,朱家红,张全琪,等.巴西橡胶树 LIM 结构域基因克隆与生物信息学分析[J]. *热带生物学报*, 2010, 1(1): 62-66.
- [16] Schmeichel K L, Beckerle M C. Molecular dissection of a LIM domain[J]. *Mol. Biol. Cell.*, 1997, 8: 219-230.
- [17] Weiskirchen R, Gunther K. The CRP/MLP/TLP family of LIM domain proteins: acting by connecting[J]. *Bioessays*, 2003, 25: 152-162.
- [18] Thaler J P, Lee S K, Jurata L W, et al. LIM factor *Lhx3* contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions[J]. *Cell*, 2002, 110: 237-249.
- [19] Nix D A, Fradelizi J, Bockholt S, et al. Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus[J]. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 34759-34767.
- [20] Maul R S, Song Y, Amann K J, et al. EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments[J]. *J. Cell Biol.*, 2003, 160: 399-407.
- [21] Tran T C, Singleton C, Fraley T S, et al. Cysteine-rich protein 1 (CRP1) regulates actin filament bundling[J]. *BMC Cell Biol.*, 2005, 6: 45.
- [22] Thomas C, Dieterle M, Gatti S, et al. Actin bundling via LIM domains[J]. *Plant Signal Behav.*, 2008, 3: 320-321.
- [23] Thomas C, Tholl S, Moes D, et al. Actin bundling in plants[J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2009, 66: 940-957.
- [24] Papuga J, Hoffmann C, Dieterle M, et al. *Arabidopsis* LIM Proteins: A Family of Actin Bundlers with Distinct Expression Patterns and Modes of Regulation[J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 3034-3052.
- [25] Cheung A Y, Wu H M. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, 59: 547-572.
- [26] Staiger C J, Poulter N S, Henty J L, et al. Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen[J]. *J. Exp. Bot.*, 2010, 61: 1969-1986.
- [27] Papalouka V, Arvanitis D A, Vafiadaki E, et al. Muscle Lim Protein interacts with Cofilin 2 and regulates F-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle[J]. *Mol. Cell Biol.*, 2009, 29: 6046-6058.

(责任编辑:朴红梅)