

蕙兰 *Actin* 基因的克隆及序列分析

田云芳^{1,2}, 刘艺平¹, 李 涵³, 苏金乐^{1*}

(1. 河南农业大学 林学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑州师范学院 生命科学系, 河南 郑州 450044;

3. 濮阳职业技术学院 生物工程系, 河南 濮阳 457000)

摘要: 持家基因 *Actin* 常被用作定量、半定量 PCR 试验的内参。为研究其他基因的调控机制或外源基因在蕙兰中的相对表达提供内参, 根据 GenBank 已经登录的肌动蛋白(*Actin*)基因的同源核苷酸保守序列, 设计简并引物, 利用 RT-PCR 的方法, 以蕙兰花蕾期的花萼为材料, 克隆了 4 个 *Actin* 基因片段。序列分析结果表明, 4 个 *Actin* 基因片段长度均为 1 062 bp, 编码 354 个氨基酸, 具有 *Actin* 基因的标记位点: 肌动蛋白(YVGDEAQS, KRG 和 WISKaEYDE)和肌动蛋白类似物(LLTEApLNPKaNR)。各片段之间同源性高达 95.97%, 经 BLAST 分析, 与文心兰同源性可达 94%。其氨基酸序列与萼脊兰(AED94091.1)和蝴蝶兰(AAF71265.1)同源性达 99%。得到的 4 个基因序列是 *Actin* 基因的同源片段, 分别命名为 *CfACT1*、*CfACT2*、*CfACT3* 和 *CfACT5*, 并在 GenBank 注册, 登录号分别为 JN177718、JN177719、JN177720 和 JN177721。

关键词: 蕙兰; 肌动蛋白基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S682.31 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)06-0107-05

Molecular Cloning and Sequence Analysis of *Actin* Gene from Orchid (*Cymbidium faberi*)

TIAN Yun-fang^{1,2}, LIU Yi-ping¹, LI Han³, SU Jin-le^{1*}

(1. College of Forestry of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Department of Life Science of Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China;

3. Bioengineering Department of Puyang Vocational and Technical College, Puyang 457000, China)

Abstract: Housekeeping gene *Actin* is often used as an internal control gene of RT-PCR and qRT-PCR. In order to study the molecular regulatory mechanisms of other genes and relative expression level of exogenous gene, a pair of primers was designed according to the conserved sequences of the *Actin* gene in GenBank. A PCR-based homologous cloning strategy was used to identify *Actin* genes from the pedicels of *Cymbidium faberi*. Four *Actin* genes were successfully cloned and characterized. The sequencing result revealed that each of four *Actin* gene fragments contained 1 062 bp, encoding a protein of 354 amino acids. Each *Actin* contained the *Actin* family signature sequence (YVGDEAQS, KRG and WISKaEYDE) and *Actin*-related proteins signature sequence (LLTEApLNPKaNR). The fragments shared 95.97% nucleotide sequence homology with each other and 94% nucleotide sequence homology with *Oncidium hybrida* ACT2 (JN981137). The deduced amino acid sequence shared 99% homology with *Actin* of *Sedirea japonica* (AED94091.1) and *Phalaenopsis* (AAF71265.1). The cloned genes were *Actin* gene fragments, named as *CfACT1*, *CfACT2*, *CfACT3* and *CfACT5*, respectively. They were registered into GenBank (accession number: JN177718, JN177719, JN177720 and JN177721).

Key words: *Cymbidium faberi*; *Actin*; cloning; sequence analysis

收稿日期: 2012-12-20

作者简介: 田云芳(1978-), 女, 河南荥阳人, 讲师, 在读博士研究生, 主要从事园林植物与观赏园艺种质资源研究。

E-mail: tianyunfang2011@163.com

* 通讯作者: 苏金乐(1953-), 男, 河南新郑人, 教授, 博士生导师, 主要从事园林植物遗传育种教学与科研工作。

E-mail: sujinkle2011@hotmail.com

肌动蛋白(Actin)在真核生物体内各个组织细胞中广泛存在^[1],是一种古老的生命蛋白质。肌动蛋白在植物体内以肌动蛋白单体(G-actin)和肌动蛋白纤维(F-actin)2种形式存在,在细胞内聚合成不同级别和形态的聚合物来满足发挥不同功能的需求^[2]。植物肌动蛋白作为微丝的主要组分,聚合形成植物动态微丝骨架系统,参与细胞内许多重要的生理过程,如细胞分化、细胞分裂、细胞形状的维持、胞质环流、胞内物质运输、信号转导等^[3-5],在植物的生长发育方面具有至关重要的生理过程。多基因编码的高等植物 *Actin* 基因高度相似,由一个相同基因祖先通过多轮复制进化而来^[6]。高等植物肌动蛋白具有非常保守的核苷酸序列,其相似性在 70% 以上,甚至不同物种之间达到 100%^[7],而且 *Actin* 基因在不同生长环境下的植物组织器官中表达丰富且稳定,因此,在许多基因的表达模式和调控机制的研究中充当着分子内标的角色。截至目前,已在豌豆^[8]、玉兰^[9]等高等植物中克隆到了 *Actin* 基因,然而,有关蕙兰 *Actin* 基因的研究尚未见报道。

蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)为兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium* Sw.)多年生草本花卉,是我国珍稀物种,为国家二级重点保护野生物种,其花姿秀丽,香气浓郁纯正,具有很高的观赏价值,也是经济价值最高的兰花之一^[10-11]。目前对于开花基因的研究已成为热点,蕙兰作为国兰中的一种,其开花调控及分子育种越来越受到人们的重视。*Actin* 基因作为内标基因之一,可用来研究其他开花相关基因的时空表达特性和外源基因的表达,是研究蕙兰其他相关基因表达的基础。以蕙兰的花萼为试验材料,根据 GenBank 中已经登陆的其他植物的肌动蛋白基因的同源核苷酸保守序列,设计简并引物,用 RT-PCR 的方法克隆了 *Actin* 基因片段,为研究其在蕙兰中的生理功能、组织表达特异性及其他相关基因的表达奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

将采自河南大别山花蕾期的蕙兰用清水洗净,滤纸吸干水分,将花萼切成约 2 cm 长,分装于冻存管,迅速冻存于液氮后-80℃下保存备用。主要试剂:Trizol 购于 Invitrogen 公司, RNA 反转录试剂盒(TaKaRa Prime Script™ RT-PCR Kit)克隆载体 pMD19-T vector、DNA marker DL 2000、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购于 TaKaRa 公司,

IPTG、X-gal 购于上海生工生物工程技术服务有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒购于天根生物技术公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 在 Trizol 试剂盒方法的基础上做进一步改进:(1)减少样品的起始量(使之与提取缓冲液的比例在 1:10 左右);(2)用 75% 的乙醇冲洗 2 次;(3)将-20℃异丙醇沉淀 RNA 的时间减为 5~10 min,离心速度减小到 10 000 r/min,提取蕙兰花萼总 RNA 后,使用 DEPC 水稀释,用 Q5000 核酸蛋白分析仪(美国 Quawell)测定其 A260、A280 值,测定 RNA 浓度和纯度,并用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 蕙兰 *Actin* 基因的克隆

1.2.2.1 总 RNA 反转录 用 M-MLV 反转录酶(TaKaRa 公司)合成 cDNA 第 1 链,具体方法参照试剂盒说明书。反应产物保存于-20℃。

1.2.2.2 引物设计与合成 用 DNAMAN 对蝴蝶兰(AF246715、AF246716、AF246714)、玉米(NM_001155179)、小麦(AB181991)、拟南芥(NM_179953)、结缕草(GU290545)、甘蔗(AY742219)、番木瓜(FJ696416)、白玉兰(AF281323)、油菜(AF111812)、向日葵(FJ487621)等几种植物 *Actin* 基因的核苷酸序列进行同源性比较,在高度保守的区段,利用 Primer 5.0 生物软件设计 1 对简并引物 P1:5'-GGAATGGT-CAAGGCCG-3'和 P2:5'-CGGACCAGTTTC(G/A)TCATACTC-3',用于扩增蕙兰 *Actin* 基因片段,推测目的片段的长度为 1 062 bp。引物由上海英骏生物技术公司合成。

1.2.2.3 RT-PCR 扩增 用 M-MLV 反转录酶(TaKaRa 公司)合成 cDNA 第 1 链,具体方法参照试剂盒说明书;PCR 反应体系 20 μ L:10 \times PCR Buffer 2 μ L, 25 mmol MgCl₂ 1.5 μ L, 2.5 mmol dNTP 1.6 μ L,模板 cDNA 为 1 μ L,10 μ mol/L 上下游特异引物各 1 μ L,0.5 U *Taq* 酶 0.2 μ L, ddH₂O 11.7 μ L。

扩增程序为:94℃预变性 5 min;然后以 94℃ 40 s,56℃ 40 s,72℃ 40 s 进行 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2.4 目的片段的回收 60 μ L 蕙兰花萼的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,EB 染色 20 min,紫外光下迅速切下目的条带,按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明进行胶回收,最终得到 30 μ L 回

收产物,取 3 μ L 检测浓度。

1.2.2.5 构建重组质粒 取 4 μ L 回收产物克隆到 pMD19-T vector,构建重组质粒,操作方法按说明书进行。将重组质粒 42 $^{\circ}$ C 热击转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布在含有氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的平板上,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中暗培养 14 h 左右,蓝白斑筛选重组子。

1.2.2.6 重组质粒的鉴定和测序 挑白斑于含有氨苄青霉素的 LB 培养基中振荡培养 8 h,PCR 检测,将阳性菌液以 1:1 000 的比例扩大培养,再次利用 PCR 检测其扩摇菌液,提取质粒,经 PCR 鉴定确认后由上海英骏生物技术公司测序。

1.2.2.7 序列的生物信息学分析 用 NCBI 上 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)程序进行同源性检索,利用 DNAMAN、primer 5.0 等生物软件进行序列比较分析、翻译、引物设计,利用 <http://prosite.expasy.org/> 预测蛋白结构域。

2 结果与分析

2.1 蕙兰总 RNA 的提取结果

以蕙兰花萼为材料提取的总 RNA 经凝胶电泳检测,结果显示(图 1),28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 条带清晰,且 28S 的亮度是 18S 的 2 倍左右,表明所提取总 RNA 完整性好,没有降解。Q5000 核酸蛋白分析仪测定 A260/A280 平均值为 1.93,表明所提取的总 RNA 完整性好、纯度高,没有糖、蛋白质等污染,可以用于 RT-PCR 扩增。

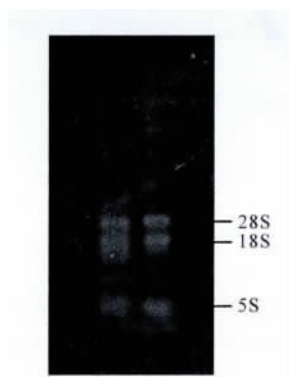


图 1 蕙兰花萼总 RNA 的提取

2.2 蕙兰 Actin 基因的克隆结果

用设计的 Actin 基因的引物,以蕙兰花萼总 RNA 反转录得到的第 1 链 cDNA 为模板,PCR 扩增经凝胶电泳检测,得到了 1 000 bp 左右的片段(图 2),这个片段与预期长度基本相同,并对此扩增产物进行纯化回收。将上述回收纯化的产物连接到 pMD19-T vector,并转化到大肠杆菌 DH5 α 中进

行菌落培养,挑白斑摇菌,进行菌液 PCR 扩增,并经电泳检测,发现得到的片段与上述以 cDNA 为模板得到的扩增产物长度相同,表明上述片段已经连接到 pMD19-T vector 上,为阳性克隆,提取质粒,其中 5 个阳性克隆送至英骏公司测序。

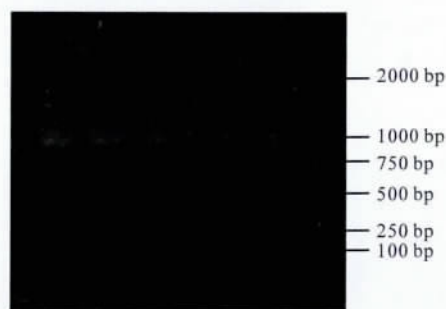


图 2 蕙兰 Actin 目的基因的扩增

2.3 测序结果及序列分析

测序结果表明,5 个阳性克隆中,其中 2 条序列完全相同,即得到 4 条 1 062 bp 大小的序列,均编码 354 个氨基酸。将这些片段在 NCBI 进行 BLAST 比较,结果显示:4 条核苷酸序列与其他植物的 Actin 基因核苷酸序列的同源性均在 77%~94%,其中同源性最高的是文心兰的肌动蛋白基因 ACT(JN981137.1,94%);而 4 条氨基酸序列,与其他植物相比,同源性最高达 99%,如萼脊兰(AED94091.1)、蝴蝶兰(AAF71265.1)。通过 <http://prosite.expasy.org/> 在线分析,4 条氨基酸序列均在相同的位置有 3 个 Actin 基因标记位点(图 3):肌动蛋白(YVGDEAQS, KRG 和 WISKaEYDE)和肌动蛋白类似物(LLTEApLNPkaNR)的特征信号序列。将 4 条推导的氨基酸序列在 GenBank 中进行 BLASTP 搜索,发现三者均相似地具有 Actin 基因家族典型的保守结构域(图 4)。表明所克隆的为 Actin 基因片段,登录至 NCBI。将 4 个基因分别命名为 CfACT1、CfACT2、CfACT3 和 CfACT5,并在 GenBank 注册,登录号分别为 JN177718、JN177719、JN177720 和 JN177721。

对 4 条 cDNA 序列分析发现,其相互之间同源性为 95.97%,CfACT1 和 CfACT2 之间的相似性为 99.44%,CfACT1 和 CfACT3 的相似性为 99.44%,而 CfACT2 和 CfACT3 之间的相似性为 99.91%,仅有 1 个碱基的差异;对 4 条序列推导的氨基酸序列分析发现,4 个氨基酸序列之间同源性为 99.22%,其中有 2 条氨基酸序列完全相同,CfACT1 和 CfACT2 之间仅有 1 个氨基酸不同(图 3)。

CfACT1	TGMVKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHTGVMVGMGQKG	AYVGDEAOSKRG	50
CfACT2	-----d-----		50
CfACT3	-----d-----		50
CfACT5	-----d-----		50
CfACT1	ILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPV	LLTEAPLNPK	100
CfACT2	-----		100
CfACT3	-----		100
CfACT5	-----		100
CfACT1	ANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVLDSGDGVSHTV		150
CfACT2	-----		150
CfACT3	-----		150
CfACT5	-----		150
CfACT1	PIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTTAEREIVRDVK		200
CfACT2	-----		200
CfACT3	-----		200
CfACT5	-----s-----i-		200
CfACT1	EKLAYVALDYEQELETAKSSSAVEKTYELPDGQVITIGAERFRCPEVLFQ		250
CfACT2	-----		250
CfACT3	-----		250
CfACT5	-----g---si---s-----i-		250
CfACT1	PSMIGMEVAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLGNIVLSGGSTMFPGIADRM		300
CfACT2	-----		300
CfACT3	-----		300
CfACT5	--l---s-----		300
CfACT1	SKEITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQM	WISKAEYS	350
CfACT2	-----		350
CfACT3	-----		350
CfACT5	---s-----		350
CfACT1	TGP		354
CfACT2	----		354
CfACT3	----		354
CfACT5	----		354

灰色部分分别为Actin标记位点

图 3 Actin 基因编码的氨基酸序列及其功能结构域

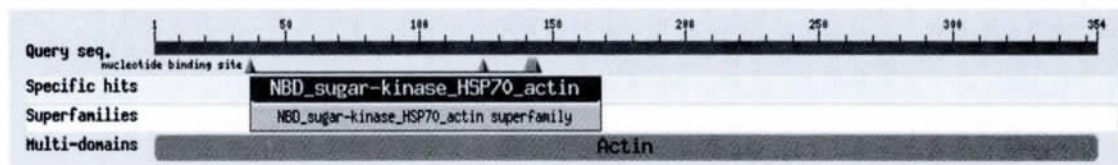


图 4 Actin 基因推导的氨基酸序列的保守结构域

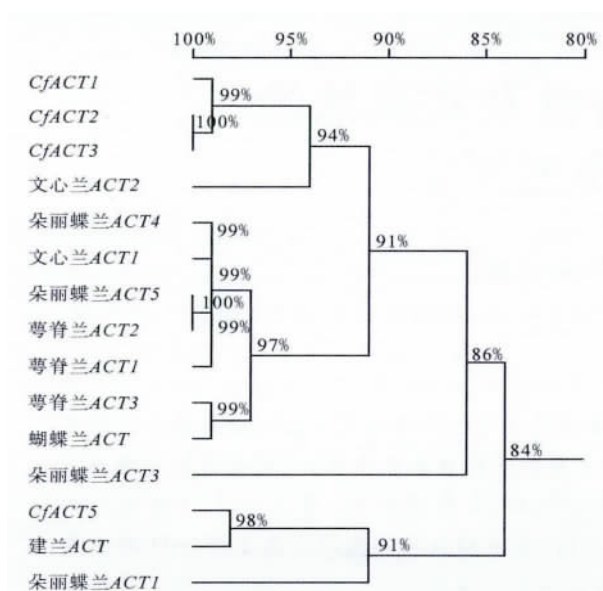
通过对蕙兰与其他兰科植物 *Actin* 基因核苷酸序列的聚类分析发现,蕙兰 *CfACT1*、*CfACT2* 和 *CfACT3* 基因与文心兰的肌动蛋白基因 *ACT2* 同源性最高(94%),与朵丽蝶兰 *ACT4*、朵丽蝶兰 *ACT5*、文心兰 *ACT1*、蝴蝶兰 *ACT*、萼脊兰 *ACT1*、萼脊兰 *ACT2* 和萼脊兰 *ACT3* 同源性次之(91%),而与朵丽蝶兰 *ACT1* 和建兰 *ACT* 的同源性最低(84%)(图 5)。

氨基酸序列聚类分析表明,*CfACT1*、*CfACT2*、*CfACT3* 与朵丽蝶兰 *ACT4*、朵丽蝶兰 *ACT5*、文心兰 *ACT1*、文心兰 *ACT2*、萼脊兰 *ACT2* 和萼脊兰 *ACT3* 的氨基酸序列同源性达 100%,与蝴蝶兰 *ACT*、萼脊兰 *ACT1* 氨基酸序列同源性次之(99%),而与朵丽蝶兰 *ACT1* 和建兰 *ACT* 的同源

性最低(96%)(图 6)。

3 讨论

碗豆^[12]、萼脊兰^[13]、桑树^[14]等很多植物中都含有多个 *Actin* 基因,笔者用 RT-PCR 的方法从蕙兰花萼中克隆到 4 个 *Actin* 基因片段,均编码 354 个氨基酸。通过比对分析,4 条基因片段序列与兰科植物文心兰的同源性达到 94%,其氨基酸序列与萼脊兰和蝴蝶兰同源性达到 99%,这表明由多基因编码的肌动蛋白序列高度保守。*Actin* 基因在核苷酸和氨基酸水平上高度保守和同源,而且在多种植物的各种组织器官中表达稳定,表达量也较高,因此常在基因的表达调控研究中作为分子内标^[15-16]。



朵丽蝶兰 ACT1; *Doritaenopsis* ACT1 (JN185655); 朵丽蝶兰 ACT3; *Doritaenopsis* ACT3 (JN185657); 朵丽蝶兰 ACT4; *Doritaenopsis* ACT4 (JN185658); 朵丽蝶兰 ACT5; *Doritaenopsis* ACT5 (JN185659); 建兰 ACT; *Cymbidium ensifolium* (JQ360575); 文心兰 ACT1; *Oncidium hybrida* ACT1 (JN981136); 文心兰 ACT2; *Oncidium hybrida* ACT2 (JN981137); 蝴蝶兰 ACT; *Phalaenopsis* (AF246716); 萼脊兰 ACT1; *Sedirea japonica* ACT1 (JN981138); 萼脊兰 ACT2; *Sedirea japonica* ACT2 (JN981139); 萼脊兰 ACT3; *Sedirea japonica* ACT3 (JN981140), 图 6 同。

图 5 兰科植物 Actin 基因核苷酸序列的聚类分析

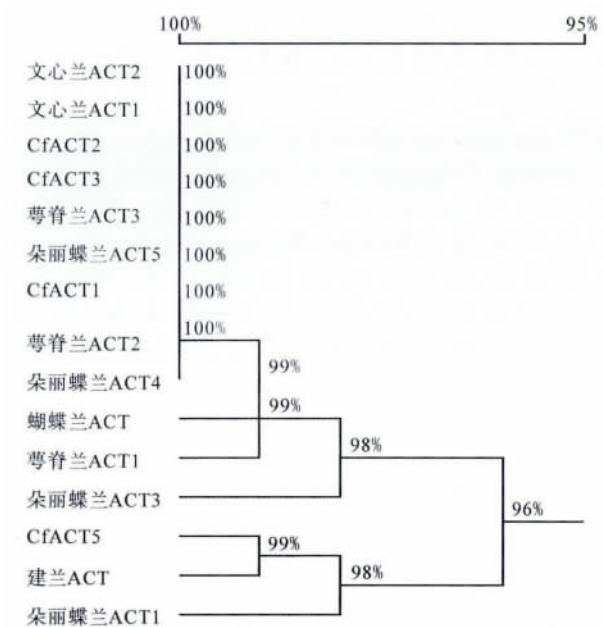


图 6 兰科植物 Actin 基因编码的氨基酸序列的聚类分析

高等植物的肌动蛋白基因是一个多基因家族,至少编码营养型和生殖型 2 类古老的不同类型的肌动蛋白^[6,17],其每类蛋白都包括不同亚类的数个肌动蛋白异型体^[18]。一般来说,营养型的 Actin 基因在所有营养器官和细胞类型中组成型表达,而生殖型 Actin 基因主要在成熟花粉、生长的花粉管或者胚珠中表达。所以

Actin 基因在有些植物各个组织中的表达有一定的特异性,不同环境条件下表达丰度不稳定,不能作为所有植物的内参基因。

蕙兰属于国兰,花色淡雅,花姿秀丽,具有较高的观赏价值和经济价值。近年来,关于其开花机制及分子植物育种已成为研究热点,与开花相关的基因研究更是越来越受到人们的重视,寻找一种合适且稳定的内标基因是亟待解决的问题之一。蕙兰肌动蛋白的克隆及序列分析填补了其内标基因克隆的空白,同时也充实了关于肌动蛋白研究的资料库,但 Actin 基因是不是适合蕙兰的内标基因,还需要通过与其他常用的内标基因进行比较,研究其表达的组织特异性和稳定性。

参考文献:

- [1] 陈颖,王刚,赵俊霞.高等植物体内的肌动蛋白[J].生物学通报,2003,38(1):13-15.
- [2] 程超,王远亮,张军,等.肌动蛋白的聚合动力学研究进展[J].重庆大学学报,2005,28(4):131-135.
- [3] Staiger C J, Schliwa M. Actin localization and function in higher plants[J]. Protoplasm, 1987, 141(1):1-12.
- [4] 朱筱娟,曾宪录,宋朝霞,等.细胞核内肌动蛋白及其功能研究进展[J].科学通报,2004,49(11):1031-1035.
- [5] 刘曦,张少斌,汪澈.植物肌动蛋白功能的研究进展[J].生物技术通报,2010(3):13-16.
- [6] Kandasamy M K, McKinney E C, Meagher R B. Functional nonequivalency of actin isovariants in *Arabidopsis* [J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(1):251-261.
- [7] 王洪振,程焉平.细胞核内肌动蛋白参与基因转录的研究进展[J].吉林师范大学学报:自然科学版,2005,5(2):34-36.
- [8] 曹晓凤,王荣臣,阎隆飞,等.豌豆卷须 cDNA 文库构建及肌动蛋白基因序列分析[J].科学通报,1993,38(19):1804-1808.
- [9] 周海飞,赵武玲,阎隆飞.玉兰肌动蛋白基因的克隆与序列分析[J].农业生物技术学报,2001(3):274-278.
- [10] 李小玲,赵娜,华智锐.商洛山区野生兰花资源及其生境土壤特性调查[J].河南农业科学,2011,40(1):112-114.
- [11] 吕晋慧,杨玉芳.山西野生观赏植物种质资源及其利用研究[J].山西农业科学,2007,35(6):12-15.
- [12] 胡松年,阎隆飞.豌豆卷须肌动蛋白类异型体 cDNA 克隆的序列分析[J].中国生物化学与分子生物学报,1999,15(6):857-860.
- [13] 袁秀云,田云芳,蒋素华,等.萼脊兰 Actin 基因片段的克隆及序列分析[J].中国农学通报,2012,28(13):243-248.
- [14] 李军,赵爱春,王茜岭,等.三个桑树肌动蛋白基因的克隆与组织表达分析[J].作物学报,2011,37(4):641-649.
- [15] 张家亮,曹金华,王直华,等. Actin, 干旱胁迫条件下相对可靠的内部参照基因[J].生物学杂志,2010,27(3):13-19.
- [16] 赖建勋,金志强,王家保.采后荔枝果皮抗坏血酸过氧化物酶基因的差异表达试验初报[J].现代农业科技,2007(14):7-9.
- [17] Kandasamy M K, Burgos-Rivera B, McKinney E C, et al. Class-specific interaction of profilin and ADF isovariants with actin in the regulation of plant development[J]. Plant Cell, 2007, 19(10):3111-3126.
- [18] 张少斌,刘国琴.植物肌动蛋白异型体研究进展[J].植物学通报,2006,23(3):242-248.