

文心兰肌动蛋白基因 (*Actin*) 片段的克隆及表达分析

邓祖丽颖

(郑州幼儿师范高等专科学校, 郑州 450000)

摘要: 以文心兰叶片为材料, 根据 GenBank 中登录的植物肌动蛋白基因同源核苷酸保守序列设计简并引物, 利用 RT-PCR 技术得到了 2 个肌动蛋白基因 (*Actin*) 片段。序列分析结果表明, 2 个 *Actin* 基因片段长度均为 1062 bp, 2 条序列一致性为 90.87%, 分别命名为 *OnACT1* 和 *OnACT2*, 并在 GenBank 注册, 登录号分别为 JN981136 和 JN981137。2 条序列编码完全相同的 354 个氨基酸, 具有 *Actin* 蛋白的特征序列; 进化树分析表明, 文心兰 *Actin* 蛋白与萼脊兰和蕙兰的亲缘关系最近。采用实时荧光定量 (qRT-PCR) 和半定量 RT-PCR (Semi-quantitative RT-PCR) 方法进行表达分析, 结果显示该基因在营养生长和生殖生长阶段的不同组织中表达相对稳定, 可以作为发育阶段相关基因表达研究的内参基因。

关键词: *Actin* 基因; 克隆; 序列分析; 文心兰

中图分类号: S682.31

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)01-0077-06

Cloning and expression analysis of the *Actin* gene fragment from *Oncidium* 'Sweet Sugar'

Dengzu Liying

(Zhengzhou Kindergarten Teachers' College, Zhengzhou 450000)

Abstract: The aim of this study was to clone the *Actin* gene from the leaf of *Oncidium* 'Sweet Sugar'. Degenerate primers were designed based on the registered sequences of the *Actin* genes from other plants. Two *Actin* sequence fragments were obtained by RT-PCR. The sequencing result revealed that the two *Actin* gene fragments from *Oncidium* 'Sweet Sugar' contain 1062 bp with 90.87% homology, which were named as *OnACT1* and *OnACT2* and registered into GenBank (respective accession number: JN981136 and JN981137). They encode the same protein of 354 amino acids with three *Actin* signatures. Phylogenetic tree analysis indicated that *Actin* from *Oncidium* 'Sweet Sugar' was closely related to the *Actin* of *Sedirea japonica* and *Cymbidium faberi*. The expression of *Actin* gene was analyzed using qRT-PCR and semi-quantitative RT-PCR. The result showed that the expression of *Actin* was relatively stable in different tissues at the vegetative and reproductive stage; therefore, it could be used as reference genes of the development related genes.

Key words: *Actin* gene; cloning; sequence analysis; *Oncidium* 'Sweet Sugar'

文心兰 (*Oncidium* spp.) 属于兰科文心兰属, 又名舞女兰, 由于植株轻巧、花茎轻盈下垂, 花朵奇异可爱, 形似飞翔的金蝶, 又似轻舞的少女, 是一种极美丽而又极具观赏价值的兰花, 也是世界重要的盆花和切花种类之一, 适合于家庭居室和办公室瓶插, 也是加工花束、小花篮的高档用花材料, 现世界各地均有栽培。随着分子生物学在花卉植物

中的普遍开展, 文心兰有关基因的表达及功能研究也越来越多, 而植物基因的表达需要有高度保守、表达稳定的基因作为内参基因进行校正和标准化, 以减少样本之间的误差^[1-2]。

目前常用的内参基因包括维持生物体生命活动所必需的细胞器骨架的基本组分(肌动蛋白基因、微管蛋白基因等)或参与生物体的基本生化代谢过程

(甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因、转录延伸因子基因和多聚泛素酶基因等)^[3-4]。一般认为这些基因在所有的细胞和生理状态下都能较稳定地表达,然而,近年来大量的研究表明,这些常用的内参基因在不同细胞类型和不同生理状态下的表达并不是恒定不变的,在一定类型的细胞中或不同的实验条件下可能是变化的^[5-6]。采用多个内参基因对基因定量表达进行校正和标准化成为科研的趋势,因此越来越多的内参基因被克隆和分析,同时进行表达稳定性的验证^[7-8]。肌动蛋白(*Actin*)是真核生物中普遍存在的由多基因家族编码的重要蛋白质^[9],在植物中有多个肌动蛋白异形体^[10-11],执行重要的生理功能^[12]。迄今为止,已在许多高等植物如拟南芥^[11]、豌豆^[13]、碱蓬^[14]、蕙兰^[15]、萼脊兰^[16]、木薯^[17]等植物克隆到了 *Actin* 基因,而文心兰 *Actin* 基因的克隆及表达特性研究还未见报道。本研究从文心兰的叶片中克隆了文心兰栽培品种‘蜜糖’的 *Actin* 基因片段,通过实时荧光定量 PCR 检测分析其在文心兰不同发育阶段不同组织中的表达特性,以期开展文心兰其他重要功能基因的表达模式和调控机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

文心兰品种‘蜜糖’来自郑州师范学院智能温室。分别取营养生长阶段的根和叶片、生殖生长阶段的根、叶片、花萼及花器官的花萼、花瓣、唇瓣、蕊柱和子房等 10 种组织材料,在液氮中速冻后,存于-80℃冰箱保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 文心兰叶片总 RNA 的提取 文心兰不用组织总 RNA 用 Trizol (Invitrogen 公司)试剂提取。利用琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性;用 Q5000 核酸蛋白分析仪 (Quawell, 美国)测定其 D_{260nm} 、 D_{280nm} 值,计算 RNA 浓度和纯度。

1.2.2 RT-PCR 扩增 通过比对玉米 (NM_001155179)、结缕草 (GU290545)、拟南芥 (NM_179953)、甘蔗 (AY742219) 等几种植物 *Actin* 基因的核苷酸序列,利用 DNAMAN 和 Primer 5.0 生物软件设计一对简并引物 Act-F: 5'-ACT GGA ATG GTC AAG GCC G-3'和 Act-R: 5'-CGG ACC AGT TTCDTCA TAC TC-3',用于扩增文心兰 *Actin* 基因片段,推测目的片段的长度为 1062 bp。引物合成由上海立菲生物技术有限公司完成。

cDNA 第一链合成采用 M-MLV 反转录酶 (TaKaRa 公司)参照试剂盒说明书进行; PCR 扩增体系为 20 μ L,含 10 \times buffer 2 μ L, 4 种 dNTP 各 150 μ mol·L⁻¹, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 每条引物 0.5 μ mol L⁻¹, cDNA 模板 1000~2000 ng。PCR 扩增程序为: 95℃ 变性 3 min; 95℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 目的片段的回收、克隆和测序 采用 TIANGel Midi Purification Kit 凝胶回收 PCR 扩增产物,将回收的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,进行克隆和测序。测序由上海立菲生物技术有限公司完成。

1.2.4 序列的生物信息学分析 将文心兰 *ACTIN* 序列在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行 Blastn 和 Blastx 搜索,在线 (<http://prosite.expasy.org/>) 进行蛋白结构域预测,利用 DNAMAN 进行氨基酸序列的比对及同源性分析,系统进化树分析使用 MEGA4.0 软件的 Neighbor-joining 法。

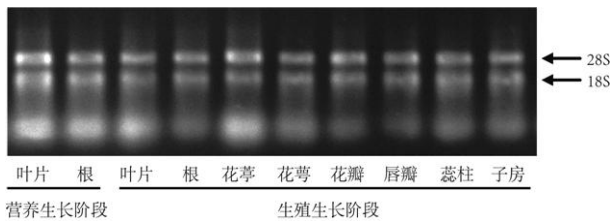
1.2.5 文心兰不同组织中 *Actin* 基因的表达分析 采用 PrimeScriptRT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)试剂盒,以每 20 μ L 反转录体系 1000 ng 总 RNA 的浓度,对文心兰不同组织总 RNA 反转录成单链 cDNA,将 cDNA 稀释 5 倍后备用。根据获得的基因序列设计 1 对特异引物: qRT-Act-F: 5'-GT ATTCCCTAGCATTGTTGGT-3'和 qRT-Act-R: 5'-CA GAGTGAGAATACCTCGTTT-3',产物长度为 103 bp,用于文心兰不同组织中 *Actin* 基因的表达分析。

取等量的 10 种组织的 cDNA 混合均匀作为标准品,稀释 10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍和 100000 倍及未稀释样品 6 个梯度,以 6 个梯度的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应,制作标准曲线。以稀释的 16 种组织的 cDNA 为模板,采用 SYBR Premix Ex TaqTM II kit (TaKaRa) 进行 qRT-PCR 反应,反应体系为 25 μ L,反应条件为: 95℃ 15 s, 58℃ 15 s, 72℃ 15 s (40 个循环)。qRT-PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler 荧光定量 PCR 仪 (德国) 上进行,3 次重复。通过溶解曲线和扩增曲线确定引物的特异性。试验输出的数据用 Microsoft Excel 进行分析处理。同样以稀释的 10 种组织的 cDNA 为模板,进行半定量 RT-PCR 分析,20 μ L 体系,反应条件为: 95℃ 3 min, 95℃ 20 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 28 个扩增循环,72℃ 5 min,并用质量分数为 1% 的琼脂糖进行凝胶电泳分析。

2 结果与分析

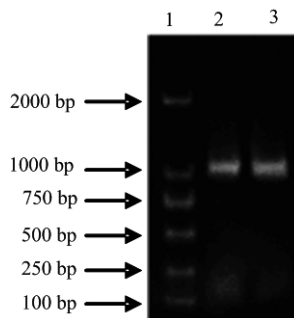
2.1 总 RNA 的提取

以文心兰不同组织为材料提取的总 RNA 经凝胶电泳检测结果显示 28S rRNA、18S rRNA 条带清晰(图 1), 紫外测定 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 平均值在 1.98~2.05 之间, 表明所提取的 RNA 完整性好、纯度高, 可用于 RT-PCR 扩增及 qRT-PCR。



营养生长阶段 Vegetative growth stage; 生殖生长阶段 Reproductive growth stage; 叶片 Leaf; 根; 花葶 Scape; 花萼 Calyx; 花瓣 Petal; 唇瓣 Lip; 蕊柱 Gynandrium; 子房 Ovary

图 1 总 RNA 的提取
Figure 1 Extraction of Total RNA



1: DNA marker; 2,3: 目的基因 Target gene

图 2 *Actin* 基因的扩增
Figure 2 Amplification of *Actin* gene

2.2 RT-PCR 扩增和克隆

以文心兰叶片总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 RT-PCR, PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳显示, 在 1000 bp 处有单一亮带, 与目的片段的大小一致(图 2)。将此片段凝胶回收, 再连接到 pMD19-T 并转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 随机挑取 5 个菌斑扩播, 扩播后以菌液为模板进行 PCR 扩增检测, 将得到的阳性克隆再次摇菌, 再次进行 PCR 扩增检测, 扩增片段大小均约为 1000 bp, 与 RT-PCR 结果一致, 表明这些菌液包含阳性克隆, 其中送 3 个阳性克隆进行测序。

2.3 测序结果及序列分析

经过对 3 个阳性克隆测序结果分析, 其中 2 条序列完全相同, 即得到 2 条 1062 bp 的序列, 均

编码 354 个氨基酸。将这些片段进行 Blast 分析, 结果显示: 2 条序列与其他植物的 *Actin* 基因核苷酸序列的相似性均在 83%~99% 之间, 表明所克隆到的片段为 *Actin* 基因片段。将 2 个基因分别命名为 *OnACT1* 和 *OnACT2*, 并在 GenBank 注册, 登录号分别为 JN981136 和 JN981137, 蛋白登录号分别为 AFD94088 和 AFD94089。对 2 条 cDNA 序列分析发现, *OnACT1* 和 *OnACT2* 之间的相似性为 91.87%, 有 97 个碱基的差异; Blastn 分析表明 *OnACT1* 与萼脊兰 (*Sedirea japonica*) *ACT1* 基因的一致性最高(99%), 而 *OnACT2* 与蕙兰 (*Cymbidium faberi*) *ACT1* 基因的相似性最高(94%)。有趣的是, 尽管 *OnACT1* 和 *OnACT2* 的核苷酸序列有较大差异, 其推导的氨基酸序列的一致性为 100%, 说明文心兰的肌动蛋白相同的氨基酸编码序列有不同的偏好性, 其蛋白序列非常保守。

蛋白结构域预测发现该蛋白有 2 个 *Actin* 蛋白的标记序列(第 40~50 位: YVGDEAQsKRG 和第 343~351 位: WISKaEYDE) 及 1 个 *Actin* 相关蛋白标记序列(第 91~103 位: LLTEApLNPkaNR)。Blastp 分析发现与该基因编码的蛋白有 ACTIN 多保守区域(multi-domain), 在 61~168 位点包含核苷酸结合结构域(nucleotide-binding domain, NBD)、sugar kinase/HSP70/actin superfamily 特异标签(图 4), 这些结果进一步说明该蛋白属于 *Actin* 蛋白家族的成员。

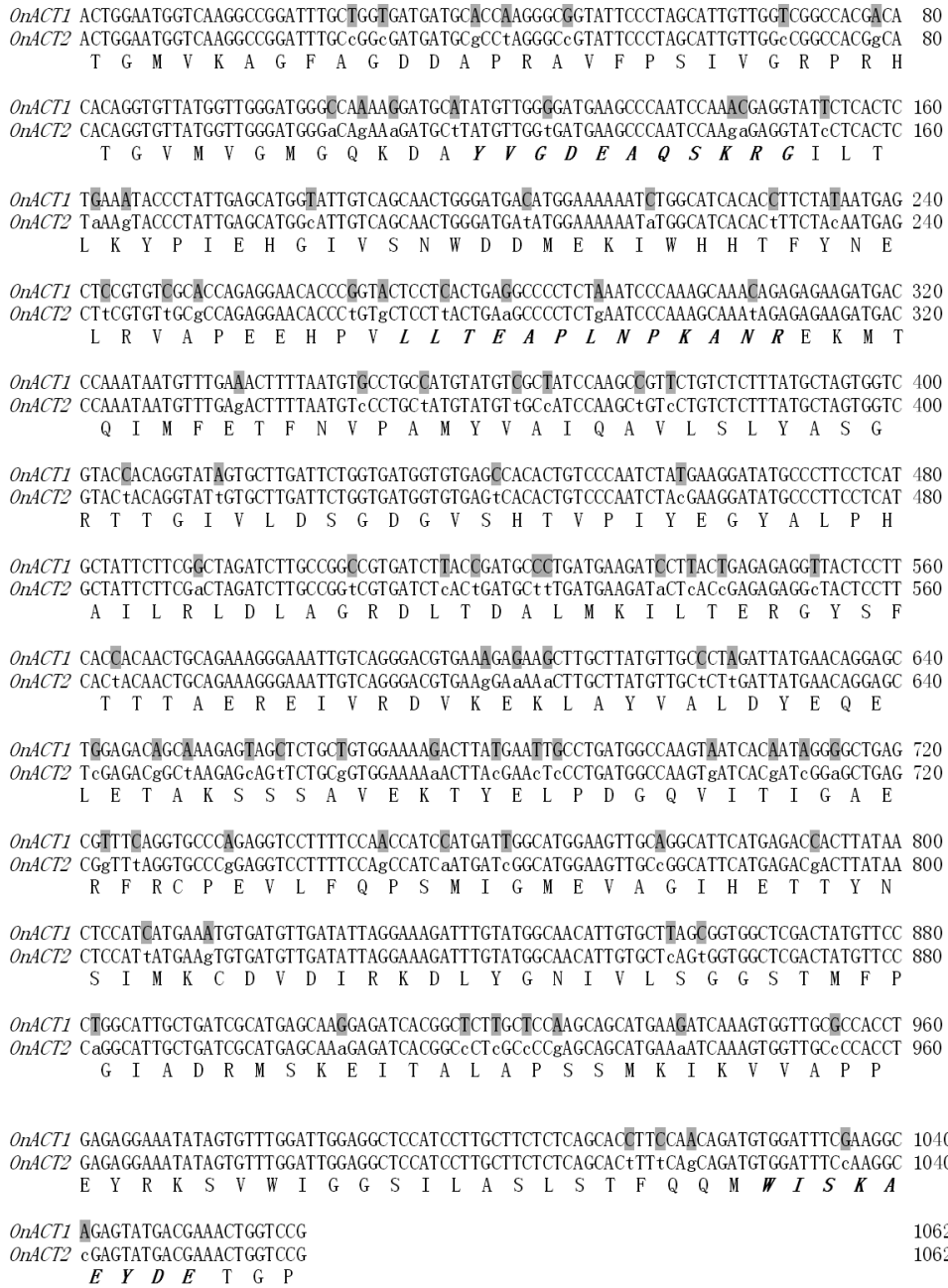
为更好地了解 *OnActin* 与其他 *Actin* 家族基因之间的进化关系, 选取一致性较高的 13 个 *Actin* 家族蛋白的氨基酸序列构建系统进化树(图 3)。结果表明, 这些蛋白被聚为 2 大支, 文心兰与萼脊兰和蕙兰的 *Actin* 氨基酸序列亲缘关系最近, 与铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*) 和水仙 (*Narcissus tazetta*) 一起分为一支, 而柚子 (*Citrus maxima*)、可可 (*Theobroma cacao*)、巨桉 (*Eucalyptus grandis*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、毛叶番荔枝 (*Annona cherimola*)、油棕 (*Elaeis guineensis*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 和荷花 (*Nelumbo nucifera*) 聚为另一支, 进化树分析说明文心兰 *Actin* 蛋白具有明显种属特性(图 5)。

2.4 文心兰 *Actin* 基因的表达分析

采用 qRT-PCR 的方法对文心兰不同组织中 *Actin* 基因的表达进行检测, 结果显示 qRT-PCR 的扩增效率为 99%, 相关系数为 0.997, 得到 $y = -3.336x + 21.51$ 的标准曲线(图 6-A), 并且溶解曲线为单峰(图 7), 表明 qRT-PCR 的引物具有特异

性, 没有非特异性扩增。在文心兰 10 种组织中的循环阈值 (Ct) 平均值为 22.36~24.42 (图 6-B), 变化幅度不大。半定量 RT-PCR 结果显示, 文心兰 *Actin* 基因凝胶电泳条带的亮度基本一致 (图 6-C), 表明

在文心兰不同组织中的表达基本稳定。这些结果表明, 文心兰 *Actin* 基因可以用于文心兰不同发育时期不同组织其它基因的定量表达分析研究。



灰色, 差异碱基; 黑色斜体, 特异标记序列。Gray, different bases; Bolt italic, *Actin* signature

图 3 文心兰 *Actin* 基因的核苷酸序列比对分析

Figure 3 Multiple sequence alignment of *Actin* gene in *Oncidium* 'Sweet Sugar'

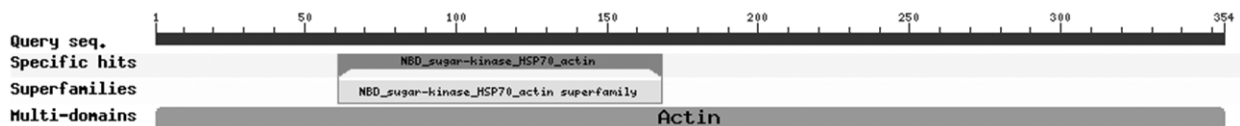


图 4 肌动蛋白基因推导的氨基酸序列的保守结构域

Figure 4 Conservative domain of *Actin* actin amino acid sequence

3 讨论

在文心兰的研究中,常用的内参基因有甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (*GAPDH*)^[18]和微管蛋白基因 (*TUA*)^[19]。肌动蛋白基因是常用的内参基因,在文心兰中也有应用^[20]。然而文心兰内参基因的序列分析及稳定性检测还未见报道。本研究克隆了文心兰 2 个 *Actin* 基因序列,其核苷酸有一定差异,但是其编码的氨基酸序列却完全相同,说明其蛋白非常保守,进化树分析表明该基因与蕙兰和萼脊兰 *Actin* 基因关系最近。

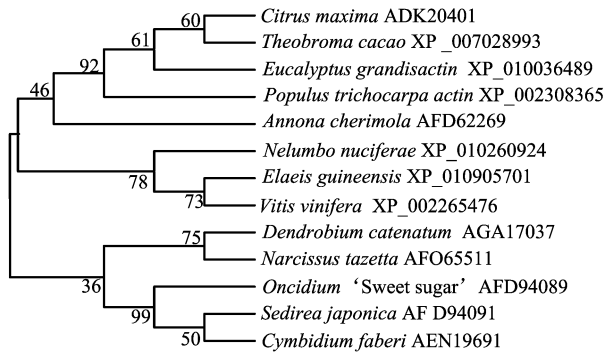
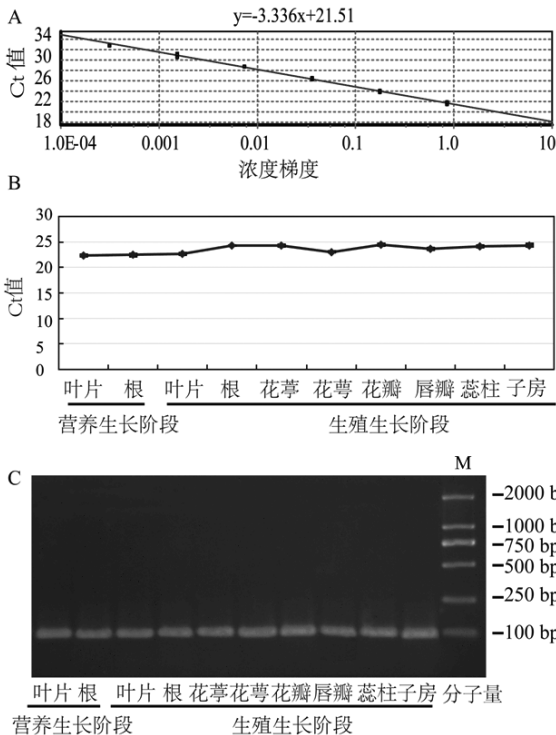


图 5 文心兰 *Actin* 的系统进化分析

Figure 5 Phylogenetic tree of *Actin* in *Oncidium* 'Sweet sugar'



A.标准曲线; B.Ct 值; C.凝胶电泳

A: Standard curve; B: Ct value; C: Gel electrophoresis

图 6 文心兰 *Actin* 基因的表达分析

Figure 6 The expression of *Actin* gene in *Oncidium* 'Sweet sugar'

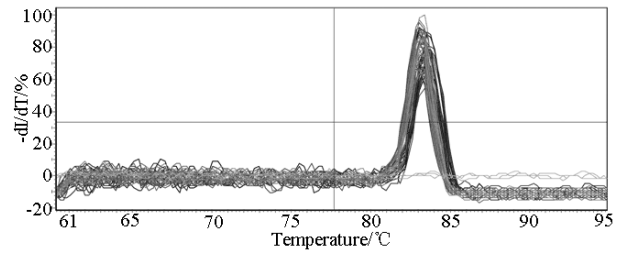


图 7 文心兰 *Actin* 基因 qRT-PCR 的溶解曲线

Figure 7 The melt curve of *Actin* gene from *Oncidium* 'Sweet sugar' in qRT-PCR

在植物细胞中,肌动蛋白有多种异型体^[10],拟南芥中的肌动蛋白异型体可分 5 个亚类,这些异型体基因的表达存在组织特异性^[13]。对蝴蝶兰内参基因的研究表明,蝴蝶兰不同的 *Actin* 基因在植物发育的不同阶段,不同器官中表达稳定性存在一定差异,其中蝴蝶兰 *ACT2* 和 *ACT4* 在发育的不同阶段不同组织中表达最为稳定,其次是 *ACT1* 和 *ACT3*,总的来说, *Actin* 对于研究不同组织及不同的发育阶段相关基因的定量分析是较为合适的内参基因^[21]。对能源植物麻疯树内参基因的研究结果显示,肌动蛋白基因 *Actin* 在营养生长发育阶段及干旱和冷胁迫下也是较为稳定表达的基因^[22]。而对水稻的研究表明,在不管是不同的发育阶段,还是在干旱胁迫和盐胁迫下,肌动蛋白基因 *ACT11* 都不是最稳定的内参基因^[23]。对土豆进行生物和非生物胁迫下内参基因筛选的研究中,肌动蛋白基因 *Actin* 也是最不稳定表达的基因^[24],对菊花^[25]、西红柿^[26]和桃树内参基因的筛选研究也得到了相似的结论,认为 *Actin* 不是最为稳定的内参基因。本研究结果表明,文心兰 *Actin* 基因在营养生长阶段和生殖生长阶段的不同组织中表达相对稳定,可以用于发育阶段不同组织中其它基因定量表达分析研究,而该基因作为内参基因是否适用于其他的试验条件还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] SUZUKI T, HIGGINS P J, CRAWFORD D R. Control selection for RNA quantitation [J]. *Biotechniques*, 2000, 29(2): 332-337.
- [2] TUNBRIDGE E M, EASTWOOD S L, HARRISON P J. Changed relative to what? Housekeeping genes and normalization strategies in human brain gene expression studies [J]. *Biol Psychiatry*, 2011, 69(2): 173-179.
- [3] 胡瑞波, 范成明, 傅永福. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. *中国农业科技导报*, 2009, 11(6): 30-36.
- [4] 袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择[J]. *植物学报*, 2012, 47(4): 427-436.
- [5] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ORNTTOFT T F. Norma-

- lization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 5245-5250.
- [6] GU C, CHEN S, LIU Z, et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Chrysanthemum* subjected to biotic and abiotic stress [J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 49: 192-197.
- [7] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 2002, 3: 1-11.
- [8] HU R, FAN C, LI H, et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10: 93-104.
- [9] 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.
- [10] MEAGHER R B, MCKINNEY E C, Kandasamy M K. Isovariant dynamics expands and buffers the responses of complex systems: The diverse plant *actin* family [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 1-12.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 凌毅, 赵武玲. 豌豆肌动蛋白异型体基因的特异性表达[J]. *植物学通报*, 2001, 18(1): 76-80.
- [14] 马清, 周向睿, 伍国强, 等. 盐生植物碱蓬 *Actin* 基因片段的克隆及序列分析[J]. *生物技术*, 2009, 19 (1): 1-3.
- [15] 田云芳, 刘艺平, 李涵, 等. 蕙兰 *Actin* 基因的克隆及序列分析[J]. *河南农业科学*, 2013, 42(6): 107-111.
- [16] 袁秀云, 田云芳, 蒋素华, 等. 蕙脊兰 *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.
- [17] 许娟, 罗兴录. 木薯 *Actin* 基因片段的克隆及序列分析[J]. *生物技术通报*, 2011(6): 65-70.
- [18] 崔波, 武振江, 刘佳, 等. 文心兰开花相关 *OnAPI-like* 基因的克隆及表达分析[J]. *园艺学报*, 2014, 41(2): 357-364.
- [19] HSU H F, HSIEH W P, CHEN M K, et al. C/D class MADS box genes from two monocots, orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) and lily (*Lilium longiflorum*), exhibit different effects on floral transition and formation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(6): 1029-45.
- [20] 杨光华, 刘进平. 文心兰 *ACC* 氧化酶基因 *OnACO1* 克隆与表达分析[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(4): 693-699.
- [21] YUAN X Y, JIANG S H, WANG M F, et al. Evaluation of internal control for gene expression in *Phalaenopsis* by quantitative real-time PCR[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(6): 1431-45.
- [22] ZHANG L, HE L L, FU Q T, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in the biofuel plant *Jatropha curcas* using real-time quantitative PCR [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12): 24338-24354.
- [23] JAIN M, NIJHAWAN A, TYAGI A K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345: 646-651.
- [24] NICOT N, HAUSMAN J F, HOFFMANN L, et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56: 2907-2914.
- [25] GU C, CHEN S, LIU Z, et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Chrysanthemum* subjected to biotic and abiotic stress [J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 49(2): 192-197.
- [26] LOVDAL T, LILLO C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress [J]. *Anal Biochem*, 2009, 387: 238-242.
- [27] TONG Z, GAO Z, WANG F, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using realtime PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10: 71-82.