

党参肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析

吴永娜¹, 李 剑¹, 许 瑞², 王引权³, 张延红³, 王惠珍³, 张金林^{1*}

1. 兰州大学草地农业科技学院 农业部草地农业生态系统重点开放实验室, 甘肃 兰州 730020

2. 甘肃中医学院 护理系, 甘肃 兰州 730000

3. 甘肃中医学院 药理学系, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 对党参肌动蛋白 (actin) 基因进行克隆及序列分析。方法 根据已经克隆的植物 actin 基因的保守序列设计一对简并性引物, 以党参根部总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 的方法扩增 actin 基因片段并连接到 pMD19-T Simple 载体上, 阳性克隆经 PCR 检测后进行测序。结果 得到一段 603 bp 的序列, 序列分析表明, 该片段编码 200 个氨基酸, 与高等植物 actin 基因核苷酸序列同源性在 78% 以上, 与其他肌动蛋白氨基酸序列同源性达 90% 以上。结论 首次从党参中克隆出了 actin 基因, 为有效利用该基因奠定了基础。

关键词: 党参; 肌动蛋白; 基因克隆; 序列分析; RT-PCR

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2518-05

Cloning and sequence analysis of actin gene fragment from roots of *Codonopsis pilosula*

WU Yong-na¹, LI Jian¹, XU Rui², WANG Yin-quan³, ZHANG Yan-hong³, WANG Hui-zhen³, ZHANG Jin-lin¹

1. Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystem, Ministry of Agriculture, College of Pastoral Agricultural Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

2. Department of Nursing, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

3. Department of Medicine, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To clone and sequence the cDNA encoding actin gene from the roots of *Codonopsis pilosula*. **Methods** Degenerate primers were designed based on the conserved sequences of the actin gene from other plants. Total RNA was extracted from the roots of *C. pilosula*. Actin gene fragment was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and PCR products are sub-cloned into pMD19-T Simple vector. The positive clone identified by PCR was sequenced. **Results** The sequencing result revealed that the actin gene fragment from the roots of *C. pilosula* contained about 603 bp, encoding 200 amino acids. Sequence analysis suggested that the nucleotide sequence and the translated amino acid sequence shared over 78% and 90% of homology respectively with actin gene sequences from other higher plants. **Conclusion** It is the first report that a novel actin gene is cloned from roots of *C. pilosula*. This work lays a foundation for application to actin gene.

Key words: roots of *Codonopsis pilosula* Nannf.; actin; gene cloning; sequence analysis; RT-PCR

肌动蛋白 (actin) 是真核生物细胞中普遍存在的一种重要蛋白质, 植物肌动蛋白是单一多肽链的球状蛋白, 由 375~377 个氨基酸组成, 相对分子质量为 4.2×10^4 [1]。在植物中, 以 actin 和微管蛋白为基础, 它或是与质膜相关, 或是横贯细胞质, 不同程度地影响着细胞分裂、分化、胞内囊泡运输、细

胞壁的生物合成、共生现象、胞吞胞吐作用以及膜的循环利用等 [2]。迄今为止, 已经从许多高等植物, 如花生 *Arachis hypogaea* L. [3]、霸王 *Zygophyllum xanthoxylum* (Bunge) Maxim [4]、地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey [5]、碱蓬 *Suaeda glauca* (Bunge) Bunge [6] 和微孔草 *Microula*

收稿日期: 2011-03-16

基金项目: 甘肃省中医药科研立项课题 (GZK-2010-41); 兰州市科技发展计划项目 (2010-1-39); 教育部新世纪优秀人才支持计划; 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (LZUJBKY-2010-2)

作者简介: 吴永娜 (1987—), 女, 甘肃靖远人, 硕士研究生, 主要从事植物基因工程研究。

*通讯作者 张金林 Tel: (0931)8913447 Fax: (0931)8910979 E-mail: jlzhang@lzu.edu.cn

sikkimensis (C. B. Clarke) Hemsl.^[7]等中克隆到了 actin 基因。actin 作为真核细胞中普遍存在的高度保守蛋白, 各种生物间肌动蛋白氨基酸序列的同源性高达 70%~100%^[8]。由于其在各种组织中恒定表达, 常被作为一种重要的看家基因以比较不同来源的目的基因表达量的差异^[9]。

党参为桔梗科党参属植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根, 其性味甘、平, 无毒, 具有补中益气、健脾益肺等功效, 主产于甘肃、陕西、山西、四川以及东北地区。以根入药, 主要含有皂苷、菊糖、果糖、植物甾醇、微量生物碱、多种人体必需的氨基酸及微量元素类成分^[10-13]。近年来, 党参在治疗冠心病、高脂血症、低血压病和功能性子宫出血等病症方面取得了进展, 并将党参用于保健食品的研制与开发, 使其用量速增^[14]。为提高党参的抗病性、抗逆性和有效成分量, 需要深入分析其体内相关功能基因的表达模式及其调控机制。本研究采用 RT-PCR 法克隆到作为内标参照的党参 actin 基因片段, 并进行一系列序列分析, 为研究其他重要功能基因在党参中的表达和调控机制奠定理论基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

党参当年生种子于 2009 年 10 月采自甘肃岷县, 经甘肃中医学院王引权教授鉴定为桔梗科党参属植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.。将种子在滤纸上发芽一周后, 移栽至装有蛭石的穴盘中, 用 Hoagland 营养液培养, 置于温度为 25 °C、光暗为 14/10 h、光照强度为 2 000 lx、湿度为 60% 的培养室中培养 28 d 后, 取幼苗鲜根, 用于总 RNA 提取。大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* DH5a 由本实验室保存。其他植物的 actin 基因的来源见表 1。

表 1 Actin 基因的来源
Table 1 Origins of actin genes

编号	物种	基因登录号
ZxACT	霸王 <i>Z. xanthoxylum</i>	EU019550
PtACT	白杨 <i>Populus trichocarpa</i>	EF418792
LtACT	毒麦 <i>Lolium temulentum</i>	EU328529
PbACT	刚竹 <i>Phyllostachys bambusoides</i>	EU009452
SgACT	碱蓬 <i>S. glauca</i>	EU429457
AtACT	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	AY096397
OsACT	水稻 <i>Oryza sativa</i>	AY212324
PutACT	小花碱茅 <i>Puccinellia tenuiflora</i>	FJ545641
ZmACT	玉米 <i>Zea mays</i>	EU967073

1.2 试剂

UNIQU—10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (Sangon, 上海)、MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒 (BBI, 加拿大)、PCR 扩增试剂盒 (Sangon, 上海)、PCR 产物回收试剂 (Sangon, 上海)、PCR 产物克隆试剂盒 (Sangon, 上海), DNA Marker (北京天根), 其他试剂均为分析纯产品。

2 方法

2.1 引物设计与合成

通过已经克隆出来的植物 actin 基因的核苷酸序列进行同源性比较, 找出高度保守的区段, 根据引物设计原则, 利用 DNAMAN 和 Primer 5.0 生物软件设计一对简并引物 P1、P2, 用于扩增党参 actin 基因片段, 推测目的片段的长度为 600 bp 左右。引物由上海生工生物工程有限公司合成。P1: 5'-GTGGWCGTACMACHGGTATTGTG-3', P2: 5'-GAACCKCCAMTCCAATCCAGA-3', 其中 W=A+T、M=A+C、H=A+C+T、K=G+T。

2.2 总 RNA 的提取

党参根部总 RNA 提取方法按照试剂盒说明书进行。将提取到的总 RNA 在使用和保存之前进行检测, 使用 NanoDrop 1000 核酸检测仪, 根据 A 值鉴定所提 RNA 的纯度 (A_{260}/A_{280} 的值在 1.8~2.0, 说明 RNA 无杂质污染) 及浓度; 并依照测定出的 RNA 产量确定下一步合成 cDNA 所需模板的用量。

2.3 RT-PCR 扩增

cDNA 第一链合成按照试剂盒说明书进行。PCR 反应体系: 在 200 μ L PCR 管中加入下列组分, Sterilized ddH₂O 32.5 μ L、MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L、10 \times PCR 缓冲液 5 μ L、dNTP (2 mmol/L) 5 μ L、P1 (10 μ mol/L) 1 μ L、P2 (10 μ mol/L) 1 μ L、cDNA 2 μ L 和 Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 总体积为 50 μ L。PCR 反应: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s、56 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 50 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析系统 (美国 Alpha 3400) 检测, 目的片段回收和纯化按照胶回收试剂盒说明书进行。

2.4 阳性克隆的筛选与鉴定

将回收目的片段与 pMD19-T Simple 载体按照摩尔比 10:1 混合, 于 16 °C 连接 2 h。连接产物全部加入到 100 μ L 感受态大肠杆菌细胞中, 冰浴 30 min; 42 °C 热激 90 s; 冰浴 1 min。加入 800 μ L 无

氨苄青霉素的液体 LB 培养基，摇菌 1 h (37 °C, 180 r/min)。将菌液加入含有氨苄、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上，37 °C 过夜培养。第 2 天，挑选白色单菌落，经 PCR 检测后送上海生工生物工程有限公司测序。

2.5 序列的生物信息学分析

Blast 搜索在 NCBI 网站上进行，序列的比较、翻译和作图等 DNAMAN 生物软件上进行。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 的提取及检测

以党参根为材料提取的总 RNA，经过甲醛变性凝胶电泳检测结果显示 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰 (图 1)，前者亮度约是后者的 2 倍，说明所提取的 RNA 完整性较好；经 NanoDrop 1000 核酸蛋白检测仪测得 $A_{280\text{ nm}}/A_{260\text{ nm}}$ 平均值为 1.95，表明 RNA 纯度较高，可用于 RT-PCR 扩增。

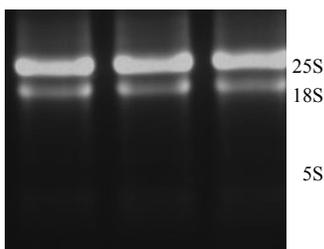


图 1 党参根系总 RNA 的甲醛变性凝胶电泳图
Fig. 1 Formaldehyde agarose gel electrophoresis of total RNA from roots of *C. pilosula*

3.2 RT-PCR 扩增

以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板，用 actin 基因的简并性引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。扩增产物经检测发现约在 600 bp 处有一条亮带 (图 2)，且上下无杂带，与推测的目的片段的大小一致，可能是 actin 基因片段，有待进一步鉴定。

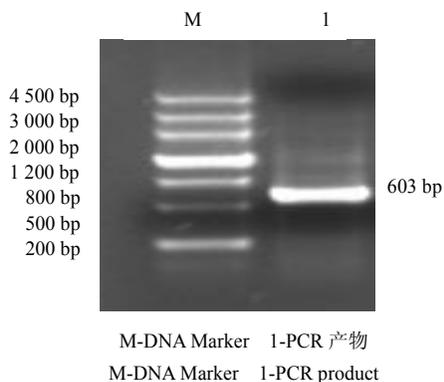


图 2 actin 基因的 RT-PCR 产物凝胶电泳
Fig. 2 Gel electrophoresis of actin gene RT-PCR product

3.3 阳性克隆的鉴定

将回收纯化的目的片段连接到 pMD19-T Simple 克隆载体上，转化 *Escherichia coli* DH5a，从转化的平板上随机挑取 10 个阳性克隆，随后从这些克隆中任选 3 个提取质粒进行 PCR 扩增，经检测片段大小约为 600 bp (图 3)，与 RT-PCR 结果一致，表明这些克隆为阳性克隆，可以进行测序。

3.4 序列分析

将重组 pMD19-T Simple 质粒进行测序，得到一段长度为 603 bp 的序列，编码 200 个氨基酸 (图 4)，Blast 比对结果显示，该片段与其他植物的 actin 基因核苷酸序列的同源性在 78% 以上，表明所克隆

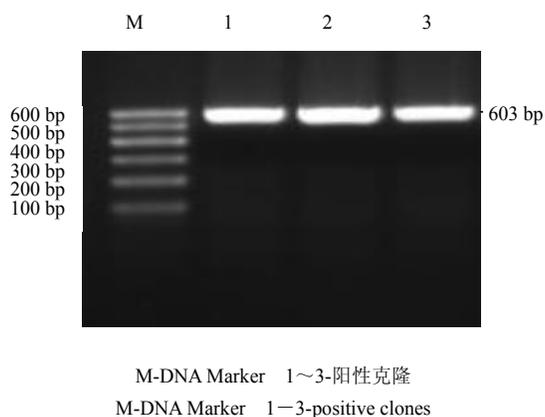


图 3 阳性克隆的 PCR 鉴定
Fig. 3 PCR identification of positive clones

```

1 GTGGTCGTACAACAGGTATTGTGCTCGATTCTGGGGATGGTGTGTCAGCCATACAGTCCCT
1  G R T T G I V L D S G D G V S H T V P
60ATATACGAGGGGATGCACTCCCCATGCAATTCCTCGTCTCGACTGGCCGGTCCGGAC
20 I Y E G Y A L P H A I L R L D L A G R D
120CTCACCGATAGCTTGATGAAAATCCTTACAGAGCGTGGTACTCTTTTACTACCACAGCA
40 L T D S L M K I L T E R G Y S F T T A
180GAGCGGAAATAGTGAGGGACATGAAAGAGAAGCTGGCTTACATTGCCCTTGACTATGAG
60 E R E I V R D M K E K L A Y I A L D Y E
240CAAGAGCTTGAGACCTCCAAAATAGCTTTCAGTTGAGAAGAGCTACGAGCTACCCGAT
80 Q E L E T S K T S S S V E K S Y E L P D
300GGCAGGTTATCACCATTGGTGTGAGCGTTCAGATGCCAGAGGTCTCTTCCAACCC
100 G Q V I T I G A E R F R C P E V L F Q P
360TCAATGATTGGGATGGAAGCTGCTGGTATTCACGAGACCACATACAATTCATCATGAAG
120 S M I G M E A A G I H E T T Y N S I M K
420TGCAGCGTGGATATCAGGAAAGACCTCTACGGTAACATTGTTCTTAGTGGTGGTTCAACT
140 C D V D I R K D L Y G N I V L S G G S T
480ATGTTTCTGGTATTGCTGATAGGATGAGCAAAGAGATCACTGCCTAGCACCAGCAGC
160 M F P G I A D R M S K E I T A L A P S S
540ATGAAGATTAAGTTGTTGCCACCACAGAGAGGAAGTACAGTGTCTGGATTGGATTGGAG
180 M K I K V V A P P E R K Y S V W I G L E
600GTTC
200 V
    
```

图 4 党参 actin 基因片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列
Fig. 4 Nucleic acid sequence and deduced amino acid sequence of actin gene fragment from roots of *C. pilosula*

到的片段为 actin 基因片段。将推测的党参的 actin 基因的氨基酸序列片段和其他植物 actin 基因的氨基酸序列进行多重比较 (图 5), 发现其保守氨基酸多达 174, 而非保守氨基酸仅有 26 个。这表明克隆的片段为 actin 基因的高度保守区域, 并将其

命名为 *CpACT*。另外, 由图 6 可见, 它与小花碱茅、玉米、水稻、白杨、刚竹、拟南芥、毒麦、霸王和碱蓬的氨基酸序列同源性分别为 96%、95.5%、95%、95%、94.5%、94.5%、94.5%、93.5%、90.5%, 这进一步证明 actin 是一种高度保守的蛋白。

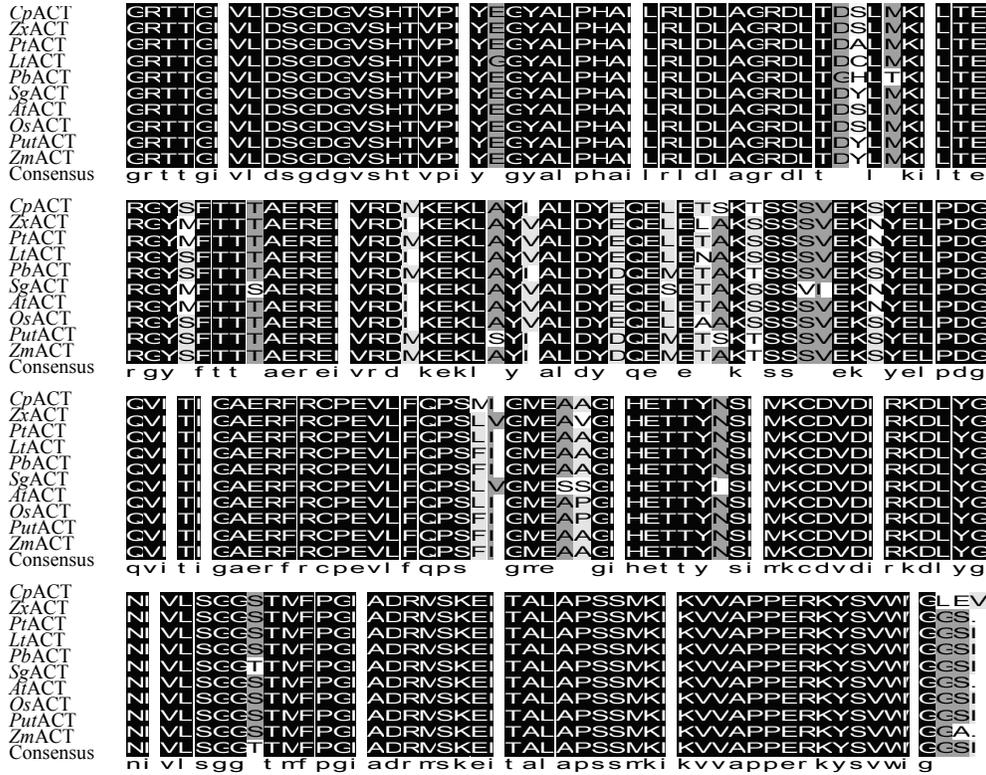


图 5 党参 actin 氨基酸序列与其他植物 actin 氨基酸序列多重比较

Fig. 5 Multiple comparison in amino acid sequence of actin between roots of *C. pilosula* and other plants

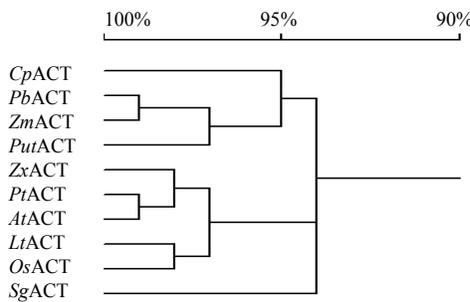


图 6 党参与其他植物 actin 氨基酸序列同源性分析

Fig. 6 Homological analysis on amino acid sequence of actin between roots of *C. pilosula* and other plants

4 讨论

植物肌动蛋白具有高度的保守性, Hightower 等^[15]的研究表明, 大豆与玉米肌动蛋白间存在 8%~10%的氨基酸取代, 而大豆肌动蛋白异型体之间仅存在 6%~9%的氨基酸取代。研究表明, actin

基因不论在核苷酸还是氨基酸水平上都具有高度的保守性和同源性, 这暗示了 actin 作为看家基因在植物生命活动过程中起着非常重要的作用。本研究得到的党参 actin 基因片段与其他植物 actin 基因核苷酸序列的同源性均在 78%以上, 而与氨基酸序列的同源性则在 90%以上。由此可见, 高等植物的 actin 是一种高度保守的看家基因, 本实验结果也证明了这一点。党参作为一种常用大宗补益类中药材, 稳定产量、提高品质是重点的生产目标。但近年来, 党参立枯病、锈病、斑枯病、纹枯病、根腐病和紫纹羽病等频发在生产上造成了较为严重的经济损失^[16], 因此, 对党参相关功能基因的研究显得尤为重要。相关研究表明, 向植物中转入病毒的 RNA 基因、病毒的反义 RNA 基因、植物自己编码的抗病毒基因等能有效地提高药用植物的抗病性和抗逆性^[17], 要深入研究这些基因表达模式及调控机制, 往往需要内标参照, actin 基因由于其表达比

较稳定,常作为植物重要的内标基因^[9]。但是在 GenBank 数据库中未能搜索到有关党参的肌动蛋白基因序列,因此本研究结果填补了这方面的空白,为研究其他功能基因的表达和调控机制奠定基础。

参考文献

- [1] 陈颖,王刚,赵俊霞. 高等植物体内的肌动蛋白[J]. 生物学报, 2003, 38(1): 13-15.
- [2] 王卓,张少斌,马镒,等. 植物肌动蛋白研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(10): 2860-2863.
- [3] 杨丽霞,李玲. 花生肌动蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 花生学报, 2006, 35(4): 6-9.
- [4] 伍国强,席杰军,包爱科,等. 多浆旱生植物霸王 actin 基因片段的克隆及序列分析[J]. 生物技术通报, 2008(2): 101-104.
- [5] 孙鹏,郭玉海,祁建,等. 地黄肌动蛋白基因片段的克隆与序列分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 8470-8471.
- [6] 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): 3-5.
- [7] 吴淑娟,张一弓,张丽静,等. 微孔草 actin 基因核心片段的克隆及分析[J]. 草业科学, 2010(4): 101-105.
- [8] 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(2): 34-36.
- [9] Clément T, Denise M, Michel W, et al. Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 gene[J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 1025-1036.
- [10] 任丽靖,张静,刘志存,等. 党参多糖的分离纯化及其结构研究[J]. 中草药, 2008, 39(7): 986-989.
- [11] 杨鹏飞,鲜小龙,陈叶. 党参种子发芽检验标准化研究[J]. 中国种业, 2007(8): 41-42.
- [12] 李艳,兰卫,孙萍,等. 新疆党参总黄酮和多糖的含量测定[J]. 中草药, 2004, 35(2): 214-215.
- [13] 张占军,杨小生,朱文适,等. 土党参化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(8): 1144-1146.
- [14] 马雪梅,吴朝峰. 药用植物党参的研究进展[J]. 安徽农业科技, 2009, 37(15): 6981-6983.
- [15] Hightower R, Meagher R. The molecular evolution of actin[J]. *Genetics*, 1986, 114: 315-332.
- [16] 傅俊范,石建华,周如军,等. 辽宁轮叶党参斑枯病发生初报[J]. 植物保护, 2010, 36(2): 130-132.
- [17] 许铁峰,张汉明,张磊,等. 生物技术在中药材品质改良、保护和鉴定等方面的应用[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(3): 6-10.