

当归肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析

吴永娜¹, 胡静¹, 王引权², 李剑¹, 张金林^{1*}

1. 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020

2. 甘肃中医学院 药理学系, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 对当归肌动蛋白(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, 以当归根部总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法扩增 Actin 基因片段并连接到 pMD19-T 载体上, 阳性克隆经 PCR 检测后进行测序。**结果** 得到一段 598 bp 的序列, 序列分析表明, 该片段编码 198 个氨基酸, 与高等植物 Actin 基因核苷酸序列同源性在 83% 以上, 与其他肌动蛋白氨基酸序列同源性达 94% 以上。**结论** 首次从当归中克隆出了 Actin 基因, 为有效利用该基因奠定了基础。

关键词: 当归; 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(2012)12-2485-05

Cloning and sequence analysis on Actin gene fragment from *Angelica sinensis*

WU Yong-na¹, HU Jing¹, WANG Yin-quan², LI Jian¹, ZHANG Jin-lin¹

1. College of Pastoral Agricultural Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

2. Department of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective Cloning and sequence analysis on the cDNA fragment encoding Actin gene in the roots of *Angelica sinensis*. **Methods** A pair of degenerate primers were designed based on the conservative sequences of the cloned Actin gene from other plant species. Taking total RNA from the roots of *A. sinensis* as template, Actin gene fragment was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and PCR products were sub-cloned to pMD19-T vector. The identified positive clone was sequenced. **Results** The result revealed that the Actin gene fragment from the roots of *A. sinensis* contained 598 bp, encoding 198 amino acids. Sequence analysis suggested that the nucleotide sequence shared over 83% of homology with Actin gene from other higher plants, and the amino acid homology with other Actin reached over 94%. **Conclusion** It is the first report that a novel Actin gene is cloned from the roots of *A. sinensis*. This work lays a base for the effective application of Actin gene.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; 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的蛋白质,是构成细胞骨架的主要成分,执行着重要的生理功能^[1]。植物 Actin 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 ^[2]。在植物中,以 Actin 为基础^[3],它参与细胞分裂、细胞运动、细胞形状变化、胞内物质运输、细胞内信号传导以及花粉管生长等^[1, 4-5]。由于其在各种组织中恒定表达,因而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^[6],迄今为止,已经从许多高等植物,如花生 *Arachis hypogaea* L.^[7]、霸

王 *Zygophyllum xanthoxylum* Bunge^[8]、地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey.^[9]、碱蓬 *Suaeda glauca* (Bunge) Bunge^[10]、微孔草 *Microula sikkimensis* (C. B. Clarke) Hemsl.^[11] 和党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.^[12] 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的古老蛋白之一,各种生物间 Actin 氨基酸序列的同源性高达 70%~100%^[13],这表明 Actin 基因在生物体内执行着重要的生物学功能。

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 为伞形科当归

收稿日期: 2012-07-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(81060327); 甘肃省中医药科研立项课题(GZK-2010-41); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-11-0217)

作者简介: 吴永娜(1987—),女,甘肃靖远人,硕士研究生,主要从事草类植物逆境生理与分子生物学研究。

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

网络出版时间: 2012-11-26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121126.1753.005.html>

属草本植物,其干燥贮藏根为常用中药材,素有“十方九归”之称^[14],主要产于我国甘肃、陕西、四川、湖北、云南、贵州等省。以根入药,性温、味甘、苦、辛^[15],具有活血、补血、调经止痛、润肠、通便的功效^[12]。目前,对当归药用价值已做了大量的研究,但是从分子水平对其研究尚未见报道,鉴于此,本研究采用 RT-PCR 方法克隆到当归 Actin 基因片段,并进行了一系列序列分析,为研究其他重要功能基因在当归中的表达和调控机制奠定基础。

1 材料

当归当年生种子于 2011 年 10 月采自甘肃岷县,经甘肃中医学院王引权教授鉴定为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels。将种子在滤纸上催芽 5 d 后,移栽至装有蛭石和草炭土(4:1)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*. DH5 α 由本实验室保存。部分植物 Actin 基因的来源见表 1。

表 1 部分植物 Actin 基因的来源
Table 1 Origins of some Actin genes

基因名称	物种	基因登录号
PtACT	小花碱茅 <i>Puccinellia tenuiflora</i>	FJ545641
OsACT	水稻 <i>Oryza sativa</i>	AY212324
LtACT	毒麦 <i>Lolium temulentum</i>	EU328529
PbACT	刚竹 <i>Phyllostachys bambusoides</i>	EU009452
ZxACT	霸王 <i>Zygophyllum xanthoxylum</i>	EU019550
SgACT	碱蓬 <i>Suaeda glauca</i>	EU429457
TpACT	红三叶 <i>Trifolium pratense</i>	AY372368
GhACT	陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	FJ560483

UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (San-gon, 上海)、cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa, 大连)、Taq DNA Polymerase (Promega, 美国)、PCR 产物回收试剂 (San-gon, 上海)、PCR 产物克隆试剂盒 (TaKaRa, 大连)、DNA marker (San-gon, 上海) 型号 GM33, 其他生化试剂均为进口或国产分析纯产品。

2 方法

2.1 引物设计与合成

通过对桑树(DQ785808)、陆地棉(AY305732)、红云杉 (AF172094)、白杨 (EF418792)、玉兰

(AF281323) 等几种植物 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,根据同源性高和简并性低的原则,利用 DNAMAN6.0 和 Primer 5.0 生物软件设计一对简并引物 P1、P2,用于扩增当归 Actin 基因片段,推测目的片段的长度为 598 bp。引物由上海生工合成。P1: 5'-GTGGT-CGTACAACWGGTATTGTG-3' P2: 5'-GAHCCTC-CAATCCAGACACTG-3', 其中 W=A、T, H=A、C、T。

2.2 总 RNA 的提取

当归根部总 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 1 000 核酸检测仪,根据吸光度值鉴定所提 RNA 的纯度(若 A_{260}/A_{280} 的值在 1.8~2.0,则说明 RNA 无污染)及浓度;并依照测定出的 RNA 产量来确定下一步实验中合成 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: Steril-ized ddH₂O 36.75 μ L、MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L、10 \times PCR 缓冲液 5 μ L、dNTP(2 mmol/L)1 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) 0.25 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 50 s、72 °C 延伸 50 s,30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 结束,PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析系统(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、pMD19-T 载体和 Solution 1 按照体积 3:1:5 混合均匀,于 16 °C 连接过夜。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。次日,挑选白色单菌落,经 PCR 检测后送生工生物工程上海有限公司测序。

2.5 序列的生物信息学分析

Blast 搜索在 NCBI 网站上进行,序列的比对、翻译和作图等 DNAMAN 6.0 生物软件上进行。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 的提取及检测

以当归根系为材料提取的总 RNA, 经过甲醛变性凝胶电泳检测结果显示 28 S rRNA 和 18 S 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}/A_{260} 平均值为 1.98, 表明 RNA 纯度较高, 可用于 RT-PCR 扩增。

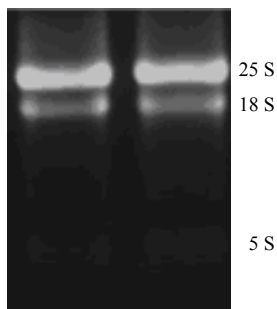


图 1 当归根系总 RNA 的甲醛变性凝胶电泳
Fig. 1 Formaldehyde denaturing gel electrophoresis of total RNA from roots of *A. sinensis*

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。

3.3 阳性克隆的鉴定

将回收纯化的目的片段连接到 pMD19-T 克隆载体上, 转化 *Escherichia coli*. DH5 α , 从转化的平板上随机挑取 10 个阳性克隆并进行 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。

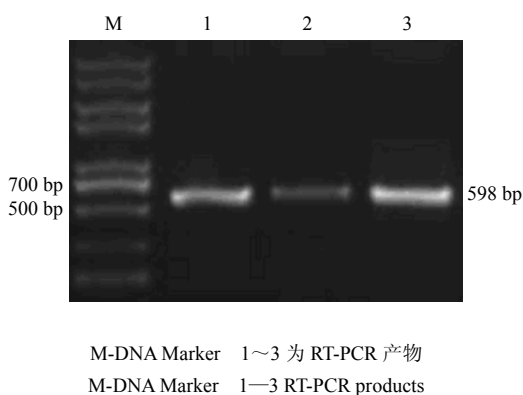


图 2 RT-PCR 产物凝胶电泳
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

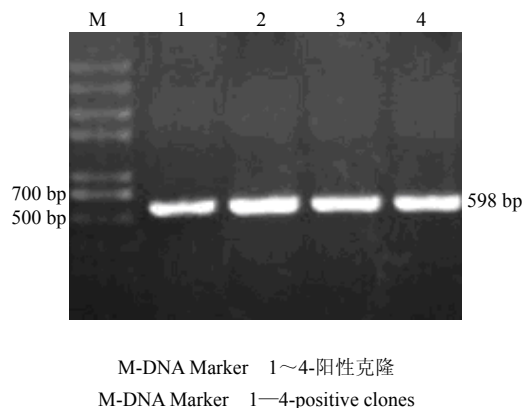


图 3 阳性克隆的 PCR 鉴定
Fig. 3 PCR analysis on positive clones

3.4 序列分析

将检测后的菌液进行测序, 得到一段长度为 598 bp 的序列, 编码 198 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 83% 以上, 表明所克隆到的片段为 Actin 基因片段。将推测的当归的 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), 结果发现它的保守氨基酸多达 175, 而非保守氨基酸仅有 23 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 AsACT。另外, 它与小花碱茅、水稻、毒麦、刚竹、霸王、碱蓬、红三叶和陆地棉的氨基酸序列同源性分别为 95.5%、96.5%、95.9%、93.9%、97.5%、94.5%、96.5% 和 99.5%, 这进一步证明了 Actin 是一种高度保守的蛋白。

4 讨论

内参基因是生物体或者细胞中稳定表达的基因, 表达量几乎不变, 基因研究技术实时反转录 PCR 和传统的 mRNA 定量方法如 Northern blotting, 要求使用参照基因以校正转录效率和 cDNA 用量, 目前主要应用的内参基因有 β -actin (BETA-actin)、GAPDH、18SRNA、28SRNA、B2M、ACTB、SDHA、HPRT1 及 ARBP。Actin 作为最重要的定量表达标准, 是所有细胞中均要表达的一类基因, 它的表达水平受环境影响较小, 并且在个体各个生长阶段均持续表达, 它被看作真核细胞生理过程中的看家基因, 在基因表达调控研究时具有重要的作用, 被广泛作为分子内标^[16], 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。本研究得到的当归 Actin 基因片段与其他植

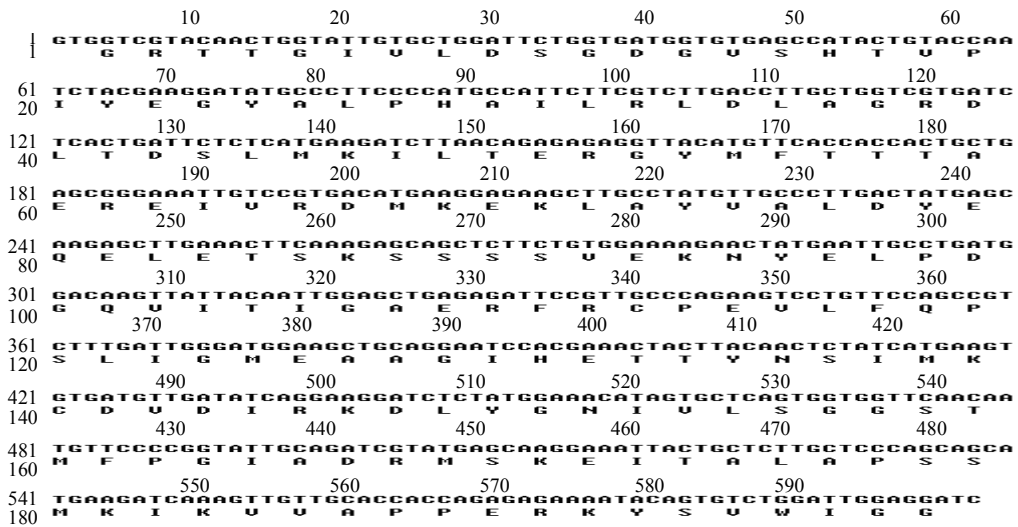


图 4 当归 Actin 基因片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleic acid and deduced amino acid sequences of Actin gene fragment from roots of *A. sinensis*

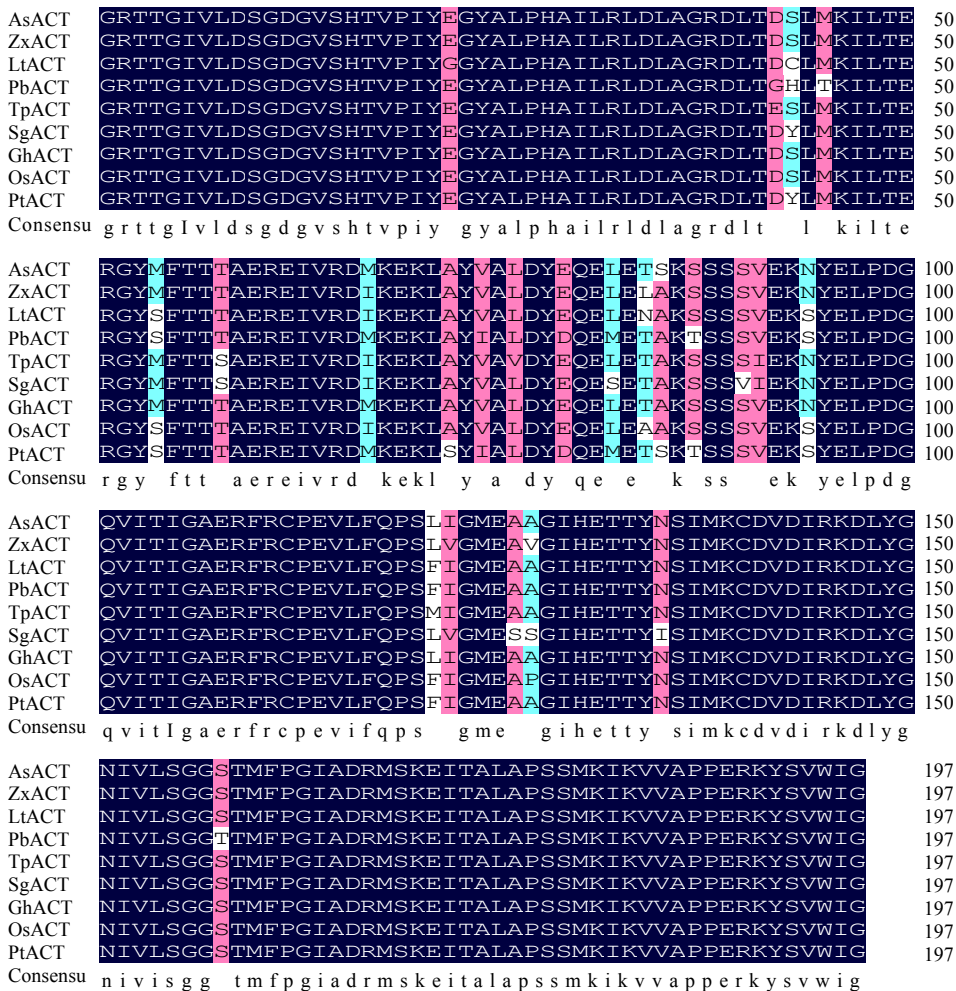


图 5 当归 Actin 氨基酸序列与其他植物 Actin 氨基酸序列多重比较

Fig. 5 Multiple comparison on amino acid sequence of Actin in roots of *A. sinensis* and other plants

物 Actin 基因核苷酸序列的同源性均在 83%以上,而与氨基酸序列的同源性则在 94%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。相关研究表明,将病原体或肿瘤抗原基因、抗病毒基因及其他有用基因引入中药细胞,育成可以口服的转基因疫苗以及对中药原有药理活性产生增效作用的转基因中药,是非常有意义的^[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。当归作为一种高品质的药用植物^[18],GenBank 数据库中未能搜索到有关其 Actin 的基因序列,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了基础。

参考文献

- [1] Dominguez R, Holmes K C. Actin structure and function [J]. *Annu Rev Biophys*, 2011, 40: 69-186.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Vidali L, McKenna S T, Hepler P K. Actin polymerization is essential for pollen tube growth [J]. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(8): 2534-2545.
- [5] Nadella K S, Saji M, Jacob N K. Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of Limk1 [J]. *Eur Mol Biol Organ Rep*, 2009, 10(6): 599-605.
- [6] Wu G Q, Xi J J, Wang Q, et al. The *ZxNHX* gene encoding vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* plays important roles in response to salt and drought [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 758-767.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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(1): 3-5.
- [11] 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.
- [12] 吴永娜,李剑,许瑞,等. 党参肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2518-2522.
- [13] 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.
- [14] 徐国钧,何宏贤,徐珞珊,等. *中国药材学* [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996.
- [15] 魏强,柴春山. 当归栽培及加工技术 [J]. *中国野生植物资源*, 2004, 23(1): 64-65.
- [16] 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(421): 2907-2914.
- [17] 姬可平,李应东,张西玲,等. rRNA 基因间隔区碱基测序对当归进行鉴定的研究 [J]. *中草药*, 2003, 34(1): 66-69.
- [18] 左利娟,石进朝. 当归组织培养技术研究 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(1): 171-173.