

刺五加肌动蛋白基因的克隆和表达稳定性分析

邢朝斌, 龙月红, 修乐山, 柴丽花, 周 秘

河北联合大学生命科学学院, 河北 唐山 063000

摘要: 目的 克隆刺五加 *Eleutherococcus senticosus* 的肌动蛋白(actin, ACT)基因并使其成为可用的内参基因。方法 运用 RT-PCR 法克隆 ACT 基因的部分序列, 并以其为内参基因进行半定量 PCR 和 real-time PCR 分析。结果 克隆了长度为 1 031 bp 的刺五加 ACT 基因, 推测其编码 343 个氨基酸, 与光皮桦 *Betula luminifera*、陆地棉 *Gossypium hirsutum*、茶树 *Camellia sinensis* 的 ACT 氨基酸序列同源性分别为 99.42%、98.83%、98.54%。刺五加 ACT 基因在不同器官和不同生长发育时期的表达量基本恒定, 以其为内参基因的半定量 PCR 和 real-time PCR 均具有良好的扩增效果和重现性。结论 首次分离并报道了刺五加 ACT 的 cDNA 克隆, 证实该序列可以作为基因表达分析的内参基因, 建立了其 real-time PCR 反应体系。

关键词: 刺五加; 肌动蛋白基因; 实时定量 PCR; 表达稳定性; cDNA 克隆

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)13-1819-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.022

Cloning and expression stability analysis of actin gene in *Eleutherococcus senticosus*

XING Zhao-bin, LONG Yue-hong, XIU Le-shan, CHAI Li-hua, ZHOU Mi

College of Life Science, Hebei United University, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective To clone the actin (ACT) gene of *Eleutherococcus senticosus*, and to make the gene a valuable internal gene. **Methods** Part of the sequence of ACT gene was cloned by real-time PCR (RT-PCR), and the sequence was used as internal control gene for analyses of semiquantitative PCR and RT-PCR. **Results** The ACT gene (1 031 bp) of *E. senticosus* was cloned, coding 343 amino acids. To compare the amino acid sequence of *E. senticosus* ACT gene with those of *Betula luminifera*, *Gossypium hirsutum*, and *Camellia sinensis*, the amino acid homology was 99.42%, 98.83%, and 98.54%. The expression of ACT in different organs of *E. senticosus* during various growing periods was constant. The expression of ACT gene in different organs and during different growth and development stages was basically constant, and when the sequence acted as internal control gene, the semiquantitative PCR and RT-PCR have good amplification effect and reproducibility. **Conclusion** The ACT sequence in *E. senticosus* is firstly separated and reported, it could act as an internal control gene, and its reaction system of RT-PCR is established.

Key words: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.; actin gene; real-time PCR; expression stability; cDNA cloning

基因表达分析是了解药用植物药用成分生物合成相关基因的表达规律, 解析药用植物复杂代谢网络并对其进行表达调控的重要手段之一。利用相对定量法获得的目的基因表达分析结果是经内参基因校正后得出的^[1-2], 因此, 选择在不同器官、不同发育时期中表达基本恒定的看家基因作为内参基因成为获得准确基因表达分析结果的关键^[2]。植物肌动蛋白(actin, ACT)是构成细胞骨架的主要成分,

执行着重要的生理功能, 是植物基因表达研究中使用最为广泛的内参基因^[3-4]。目前多种药用植物的 ACT 基因已经被克隆^[5]。

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. 根、茎、叶均可入药, 是我国重要的传统珍贵药用植物, 其次生代谢相关的基因也已被大量克隆^[6-9], 但尚未见作为重要内参基因的刺五加 ACT 基因的相关报道。本研究使用 RT-PCR 法克隆了

收稿日期: 2013-02-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30701086); 河北省自然科学基金资助项目(C2009001252); 河北省自然科学基金-石药集团医药联合研究基金项目(H2012401006)

作者简介: 邢朝斌(1975—), 男, 副教授, 研究方向为分子生药学、药用植物细胞工程。

Tel: (0315)3725859 Fax: (0315)3726341 E-mail: xzbheuu@126.com

刺五加 ACT 基因的部分序列, 检验了该基因在刺五加不同发育时期、不同器官中的表达稳定性, 并进行了半定量 PCR 条件的探索, 使其成为可用的内参基因, 为刺五加的基因表达分析奠定基础。

1 材料

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. 样品采自吉林省珲春市, 经河北联合大学生命科学学院邢朝斌副教授鉴定。分别以4~9月份的叶和8月份的根、幼茎、叶片和叶柄(编号为1~10)为提取RNA的试验材料。

RevertAidTM First strand cDNA synthesis Kit (Fermentas)、植物总 RNA 提取试剂盒、IPTG、X-gal、异硫氰酸胍、dNTPs、质粒小提试剂盒购自北京拜尔迪生物技术有限公司。SYBR[®] Premix ex TaqTM II、LA Taq DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、TOP-10 感受态细胞和 PGM-T 克隆试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, PAGE 纯化。

2 方法

2.1 刺五加总 RNA 的提取与 ACT 基因保守区的获得

根据植物总 RNA 提取试剂盒和 RevertAidTM First strand cDNA synthesis Kit 的说明, 参照文献的方法^[6]提取刺五加的总 RNA, 紫外分光光度法测定总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值, 调整总 RNA 浓度均一后, 逆转录为 cDNA。根据光皮桦 *Betula luminifera* H. Winkl. (FJ410442)、陆地棉 *Gossypium hirsutum* L. (AY305737) 等植物 ACT 基因的核苷酸序列, 在保守区设计一对寡核苷酸简并引物。上游引物 ACT-S1: 5'-CTGGAATGGT(A/T/G/C)AAGGCT-3', 下游引物 ACT-X2: 5'-CCACATCTGCTGGAAGGT-3'。以逆转录获得的刺五加 cDNA 为模板, 利用 ACT-S1 和 ACT-X2 引物, PCR 扩增刺五加 ACT 基因的保守片段。扩增产物连接入 PGM-T 质粒载体, 转化大肠杆菌 TOP10 后, 送 Invitrogen 公司测序。测序结果用 DNAMAN 6.0 软件和 NCBI 在线数据库进行生物信息学分析。

2.2 刺五加 ACT 基因表达稳定性分析

参照半定量 RT-PCR 引物设计的一般原则, 根据“2.1”项中克隆的刺五加 ACT 基因保守区序列和已报道的 GAPDH 基因序列^[9], 利用 Primer premier 5.0 软件, 设计扩增刺五加 ACT 基因的上游

引物 ACTrs: 5'-GCAAGAGCTTGAAAAGCAAAC-G-3'和下游引物 ACTrx: 5'-TCAAAGATGGCTGGAAGGA-3', 预计扩增长度 128 bp; 扩增刺五加 GAPDH 基因的上游引物 RGS: 5'-GCAAGGACTGGAGAGGTGGA-3'和下游引物 RGX: 5'-AGTGGGAACTCGGAAGGACA-3', 预计扩增长度 134 bp^[9]。以“2.1”项中逆转录的1~10号刺五加 cDNA 为模板进行半定量 PCR 扩增。反应体系为 20 μ L: 上下游引物 (10 mmol/L) 各 1 μ L, 2 $\times$ PCR mix 10 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 条件为: 预变性 95 $^{\circ}$ C、3 min; 变性 95 $^{\circ}$ C、30 s; 退火 55 $^{\circ}$ C、30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C、5 s。35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。参照文献的方法^[8], 电泳后测定光密度值和进行统计学分析。

2.3 Real-time PCR 分析

按照 SYBR[®] Premix ex TaqTM II 的要求, 利用 384 孔板, 以 10 μ L 的体系, 应用 ABI 7900 HT real-time PCR system 进行 real-time PCR 分析。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 40 个循环。之后进行溶解曲线分析, 鉴定产物的特异性。每个样品设 3 个重复。

3 结果与分析

3.1 刺五加 ACT 基因的扩增与克隆

以刺五加叶的总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板, 利用简并引物 ACT-S1 和 ACT-X2, RT-PCR 扩增获得长度约 1 000 bp 的片段(图1)。片段长度与预期相符。将扩增片段重组入 PGM-T 质粒载体后, 经 PCR 扩增, 电泳检测到与刺五加叶 cDNA 的 RT-PCR 产物大小相等的片段(图1), 说明上述片段已经与克隆载体连接, 刺五加 ACT 基因的 cDNA 已被克隆。

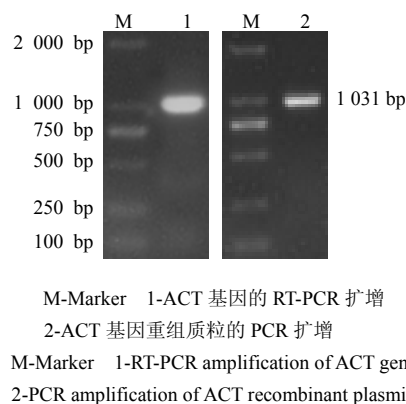


图1 刺五加 ACT 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of ACT gene from *E. senticosus*

3.2 刺五加 ACT 基因 cDNA 的序列分析

测序结果表明, 获得的刺五加 ACT 基因 cDNA 片段的长度为 1 031 bp, 与预期长度相等。推测其共编码 343 个氨基酸。利用 Clustal W 进行比对, 该片段的核苷酸序列与光皮桦 (FJ410442)、陆地棉 (AY305737)、茶树 *Camellia*

sinensis L. (HQ420251) 的 ACT 核苷酸序列一致性分别为 88.94%、88.94%、88.46%, 氨基酸序列的同源性分别为 99.42%、98.83%、98.54% (图 2)。通过 NCBI 的 BLAST 比对发现, 刺五加 ACT 蛋白与已知的蛋白质结构功能数据库中其他物种的 ACT 具有相似的结构功能域。刺五加 ACT

EACT	GMVKAGFASDDA PRAVF PS IVGRPRHT GVMVGMGOKDAYVGDEAQSKRG ILTLKYPIEHG	60
BACT	GMVKAGFAGDDA PRAVF PS IVGRPRHT GVMVGMGOKDAYVGDEAQSKRG ILTLKYPIEHG	60
GACT	GMVKAGFAGDDA PRAVF PS IVGRPRHT GVMVGMGOKDAYVGDEAQSKRG ILTLKYPIEHG	60
CACT	GMVKAGFAGDDA PRAVF PS IVGRPRHT GVMVGMGOKDAYVGDEAQSKRG ILTLKYPIEHG	60

EACT	IVSNWDDMEKIWHHTFYNE LRVAP EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYV	120
BACT	IVSNWDDMEKIWHHTFYNE LRVAP EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYV	120
GACT	IVSNWDDMEKIWHHTFYNE LRVAP EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYV	120
CACT	IVSNWDDMEKIWHHTFYNE LRVAP EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYV	120

EACT	AIQAVLSLYASGRTTGI VLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLA GRDLTDA LMK ILT	180
BACT	AIQAVLSLYASGRTTGI VLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLA GRDLTDA LMK ILT	180
GACT	AIQAVLSLYASGRTTGI VLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLA GRDLTDA LMK ILT	180
CACT	AIQAVLSLYASGRTTGI VLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLA GRDLTDA LMK ILT	180

EACT	ERGYMFTTTAEREI VRDMKEKLAYVALDYEQE LE TAKSSSVEKNYELPDGQVITIGAER	240
BACT	ERGYMFTTTAEREI VRDMKEKLAYVALDYEQE LE TAKSSSVEKNYELPDGQVITIGAER	240
GACT	ERGYMFTTTAEREI VRDMKEKLAYVALDYEQE LE TAKSSSVEKNYELPDGQVITIGAER	240
CACT	ERGYMFTTTAEREI VRDMKEKLAYVALDYEQE LE TAKSSSVEKNYELPDGQVITIGAER	240

EACT	FRCP EVL FQPSLIGMEAAGIHE TT YNS IMKCDVD IRKDL YGN IVLSGGSTMF PG IADRMS	300
BACT	FRCP EVL FQPSLIGMEAAGIHE TT YNS IMKCDVD IRKDL YGN IVLSGGSTMF PG IADRMS	300
GACT	FRCP EVL FQPSLIGMEAAGIHE TT YNS IMKCDVD IRKDL YGN IVLSGGSTMF PG IADRMS	300
CACT	FRCP EVL FQPSLIGMEAAGIHE TT YNS IMKCDVD IRKDL YGN IVLSGGSTMF PG IADRMS	300

EACT	KEIT ALAPS SMKIKVVA PPERKYS VWI GGSILAS LST FQ QMWI	343
BACT	KEIT ALAPS SMKIKVVA PPERKYS VWI GGSILAS LST FQ QMWI	343
GACT	KEIT ALAPS SMKIKVVA PPERKYS VWI GGSILAS LST FQ QMWI	343
CACT	KEIT ALAPS SMKIKVVA PPERKYS VWI GGSILAS LST FQ QMWI	343

EACT-刺五加 ACT BACT-光皮桦 ACT GACT-陆地棉 ACT CACT-茶树 ACT *代表保守氨基酸 白线为 ACT 家族的标志性序列

EACT-*E. senticosus* ACT; BACT-*B. luminifera* ACT; GACT-*G. hirsutum* ACT; CACT-*C. sinensis* ACT

* stands for conserved amino acid; white lines ACT family symbolic sequence

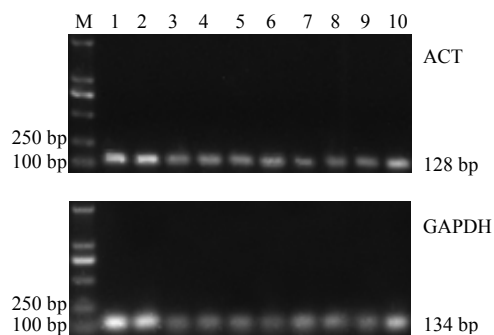
图 2 刺五加 ACT 基因推测氨基酸序列与光皮桦、陆地棉、茶树氨基酸序列比对

Fig. 2 Putative amino acid sequence alignment of ACT gene in *E. senticosus* compared with sequences of *B. luminifera*, *G. hirsutum*, and *C. sinensis*

蛋白 39~49 位的“YVGDEAQSKRG”和 90~102 位的“LLTEAPLNPKANR”氨基酸残基处为肌动蛋白家族的标志性序列。说明成功克隆了刺五加 ACT 基因的部分序列。该序列已登录 Genbank, 登录号为 KC469585。

3.3 刺五加 ACT 基因表达的稳定性分析

刺五加 ACT 基因相对定量 PCR 的扩增结果表明, 扩增条带清晰, 无非特异性扩增, 引物二聚体少 (图 3), 扩增片段的测序结果与预期目的片段完全相同。自萌芽期 (4 月 26 日) 至叶片大部分衰老 (9 月 26 日) 的整个生长期中, ACT 基因均有表达, 其与 GAPDH 基因光密度值的比值依次为 0.64 ± 0.04 、 0.62 ± 0.02 、 0.63 ± 0.02 、 0.63 ± 0.04 、 0.64 ± 0.03 、 0.61 ± 0.04 。ACT 基因在叶柄、幼茎、根和叶中也均有表达, 与 GAPDH 基因光密度值的比值分



1-04-26 2-05-26 3-06-26 4-07-26 5-08-26 6-09-26 7-叶柄
8-幼茎 9-根 10-叶片
1-04-26 2-05-26 3-06-26 4-07-26 5-08-26 6-09-26 7-petiole
8-tender stems 9-roots 10-blades

图 3 ACT 基因在刺五加不同生长发育时期和不同器官中的表达
Fig. 3 Expression of ACT gene during different growth and development stages and in different organs of *E. senticosus*

别为 0.63 ± 0.03 、 0.68 ± 0.05 、 0.66 ± 0.04 、 0.69 ± 0.08 。在不同生长发育时期和不同器官中 ACT 基因与 GAPDH 基因的表达量比值基本恒定,无显著差异。说明所克隆的刺五加 ACT 基因可作为基因表达定量的内参基因。

3.4 刺五加 ACT 基因 real-time PCR 的建立

刺五加 ACT 基因 Real-time PCR 扩增产物的溶解曲线仅具有单一的特异峰,表明无引物二聚及非特异性产物(图4),各样本的 Ct 值范围为 18~24,说明依据克隆的刺五加 ACT 基因设计的引物具有良好的特异性,建立了其较好的 real-time PCR 反应条件。以相对拷贝数的对数为横坐标,以 Ct 值为纵坐标,建立 ACT 基因 real-time PCR 扩增的标准曲线,得 ACT 基因 Ct 值与模板浓度的回归方程为 $Y = -3.469 \lg X + 32.25$, $r = 0.994$,扩增效率 $E = 100.04\%$,说明该方法相关性良好。

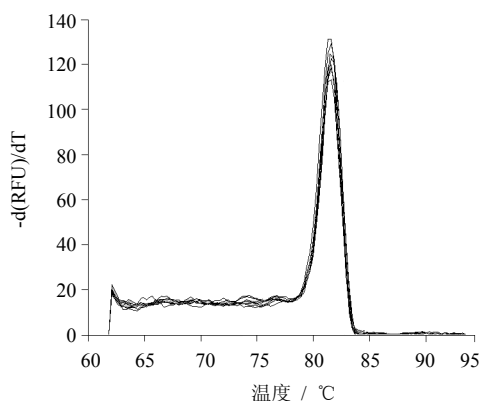


图4 ACT 基因的溶解曲线

Fig. 4 Dissolution curve of ACT gene

4 讨论

ACT 是生物体内重要的结构蛋白,参与许多重要的生命活动,ACT 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^[2,5]。本试验从刺五加中分离得到的 ACT 基因的核苷酸序列与其他植物 ACT 基因核苷酸序列的同源性均在 84%以上,而氨基酸序列的同源性则高达 94%。功能结构域的分析表明,刺五加 ACT 基因的编码蛋白包含 ACT 家族的标志性序列。同时在 GenBank 中未查询到刺五加的 ACT 基因,因此本实验首次分离并报道了刺五加 ACT 基因的 cDNA 克隆。

大量的研究结果表明,不同植物有最合适的内参基因而同一种植物不同组织之间内参基因的稳定

性也存在差异,在植物的基因表达分析中, GAPDH 和 ACT 均是常用的内参基因^[2]。如菊苣 *Cichorium intybus* L. 不同器官中, ACT 基因的表达稳定性最好,而 GAPDH 基因的稳定性较差。因此针对特定的物种和样品类型选择恰当的内参基因进行标准化是获得准确基因表达结果的关键所在。本实验中设计的一对扩增长度为 128 bp 的引物可特异性地扩增 ACT 基因,且无引物二聚体,扩增效率高, Ct 值和模板起始拷贝数的相关性好,标准曲线的斜率为-3.469,接近荧光定量 PCR 理想状态下建立的斜率-3.322^[10],加之其表达量较为恒定,说明刺五加的 ACT 基因是基因表达分析中的可用内参基因。

参考文献

- [1] 张艳君,朱志峰,陆融,等. 基因表达转录分析中内参基因的选择 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(5): 546-550.
- [2] 牙库甫江·阿西木,关波,张富春. 植物基因表达转录分析中内参基因的选择与应用 [J]. 生物技术通报, 2011(7): 7-11.
- [3] Dominguez R, Holmes K C. Actin structure and function [J]. *Annu Rev Biophys*, 2011, 40: 169-186.
- [4] Reid K E, Olsson N, Schlosser J, et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development [J]. *BMC Plant Biol*, 2006, 6: 27.
- [5] 吴永娜,胡静,王引权,等. 当归肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2485-2489.
- [6] 邢朝斌,龙月红,吴鹏,等. 刺五加环阿屯醇合酶基因的克隆及其表达分析 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1387-1392.
- [7] 邢朝斌,劳风云,龙月红,等. 刺五加鲨烯合酶和鲨烯环氧酶基因单核苷酸多态性及其与总皂苷量的相关性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2020-2024.
- [8] 邢朝斌,龙月红,吴鹏,等. 刺五加皂苷合成关键酶基因表达的半定量 RT-PCR 分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(6): 691-696.
- [9] 邢朝斌,吴鹏,陈龙,等. 刺五加 GAPDH 基因的克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 155-158.
- [10] 马雄风,喻春明,唐守伟,等. 苧麻 Actin1 基因克隆及其在韧皮部纤维不同发育阶段的表达 [J]. 作物学报, 2010(1): 101-108.