

• 药材与资源 •

芍药肌动蛋白基因的克隆及表达分析

范丙友, 李 芳, 张文婷, 史国安

河南科技大学农学院, 洛阳市牡丹生物学重点实验室, 河南 洛阳 471003

摘 要: 目的 克隆芍药肌动蛋白(Actin)基因并应用 RT-PCR 技术分析 Actin 基因在芍药不同组织中的表达情况。方法 根据近缘物种 Actin 基因的保守序列设计一对 PCR 扩增引物, 以“桃花飞雪”芍药根部总 RNA 反转录而成的 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 的方法扩增出芍药 Actin cDNA 全长并克隆至 pMD18-T 载体上, 阳性克隆经菌落 PCR、质粒 PCR 及酶切鉴定后进行测序。基于测序结果设计特异性 PCR 引物, 应用 RT-PCR 技术分析 Actin 基因在芍药根、茎、花、叶不同组织中的表达情况。结果 测序结果表明芍药 Actin 基因全长 1 134 bp 序列, 共编码 377 个氨基酸, GenBank 登录号为 JX310002; 序列分析表明芍药 Actin 蛋白中存在 3 种肌动蛋白特征信号序列, 与其他植物肌动蛋白氨基酸同源率达 99%; 基于同源模建预测的 3D 结构中含有 4 个结构域; 生物信息学软件预测芍药肌动蛋白的相对分子质量为 4.17×10^4 , 等电点(pI)为 5.31, 是一个定位于胞液、不含跨膜域、不含信号肽分子的亲水性、稳定蛋白; 半定量 RT-PCR 技术分析表明 Actin 基因在芍药根、茎、叶、花组织中的表达量保持恒定。结论 首次从芍药中克隆了 Actin 基因, 半定量 RT-PCR 表达分析结果表明 Actin 基因适合作为芍药功能基因表达分析的内标基因, 为有效利用该基因奠定了基础。

关键词: 芍药; 肌动蛋白; 基因克隆; RT-PCR; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)15-2136-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.020

Cloning and expression analysis on Actin gene from *Paeonia lactiflora*

FAN Bing-you, LI Fang, ZHANG Wen-ting, SHI Guo-an

Luoyang Key Laboratory of Peony Biology, College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

Abstract: **Objective** Cloning of Actin gene from *Paeonia lactiflora* and expression analysis of Actin gene with RT-PCR technique. **Methods** Based on cDNA sequences of Actin genes isolated from the related species reported in GenBank, one pair of PCR primers was designed. PCR products of Actin gene were successfully amplified with RT-PCR technique using cDNA synthesized from the total RNA extracted from the roots of *P. lactiflora* 'Taohuafeixue' as template, and then they were cloned to pMD18-T vector with TA cloning method. The positive clones which were characterized with colony PCR, plasmid PCR, and enzyme digestion method were sequenced. Based on the sequencing results, one pair of PCR primers was designed, and the expression profile of Actin gene in the roots, stems, flowers, and leaves in *P. lactiflora* were semi-quantified with RT-PCR technique. **Results** The sequencing results showed that the length of Actin gene of *P. lactiflora* was 1 134 bp, encoding 377 amino acids, whose GenBank accession number was JX310002. Sequence analysis showed that Actin of *P. lactiflora* contained three kinds of characteristic signal sequences, whose homologous similarity in amino acid level with other plants was up to 99%. Based on homology modeling analysis, it revealed that there were four domains in its 3D structure. Bioinformatic software predicted that the molecular weight of Actin of herbaceous peony was 4.17×10^4 , and the isoelectric point (pI) was 5.31. It was a hydrophilic and stable protein which was located in cytoplasm, without the transmembrane domain or signal peptide. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the gene expression levels of Actin gene in the roots, stems, flowers, and leaves of *P. lactiflora* were almost constant. **Conclusion** It is the first report on the cloning of Actin gene from *P. lactiflora* and the semi-quantitative analysis indicates that Actin gene can be used as the internal standard gene for the expression analysis of functional genes in *P. lactiflora*. This project plays a base for the effective application of Actin gene in *P. lactiflora*.

Key words: *Paeonia lactiflora* Pall.; Actin; gene cloning; RT-PCR; expression analysis

收稿日期: 2013-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U1204323); 河南省高等学校青年骨干教师资助计划(2010GGJS-075); 河南省科技厅国际合作项目资助(134300510052)

作者简介: 范丙友(1974—), 男, 河南伊川人, 副教授, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: fanbingyou2005@163.com

网络出版时间: 2013-07-05 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1529.004.html>

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,构成细胞骨架中的微丝系统,参与真核生物细胞的许多重要的生命活动^[1]。肌动蛋白占细胞总蛋白的1%~5%,其表达量大且基本恒定,因此在半定量 RT-PCR 及定量 PCR 分析时常作为内标基因。Actin 作为内标基因已成功应用于柿子^[2-3]、茶树^[4]、黄瓜^[5]、猕猴桃^[6]、普通菜豆^[7]等植物功能基因的表达分析研究中。

芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 为芍药科芍药属多年生宿根草本植物,兼具观赏和药用价值^[8]。芍药根中含芍药苷、丹皮酚、鞣质、萜类物质;花含黄芪苷、没食子酸、除虫菊素、丹皮花苷等药用成分^[9]。芍药具有免疫调节、镇痛、镇静、解痉、保肝、扩张血管、抗炎等作用^[10]。目前,对芍药药用价值已做了大量研究,但是从分子水平对其研究尚未见报道。本研究分离了芍药 Actin cDNA 序列,并应用 RT-PCR 技术对 Actin 基因 mRNA 在芍药不同组织中的表达进行了半定量分析,为研究其他重要功能基因在芍药中的表达和调控机制奠定了基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

“桃花飞雪”芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 取自洛阳神州牡丹园,由神州牡丹园总园艺师付正林鉴定。液氮速冻后带回实验室,置于-80℃冰箱备用。大肠杆菌菌株 DH5 α 保存于洛阳市牡丹生物学重点实验室。

1.2 试剂

DNase I kit、PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis kit、DNA 凝胶回收试剂盒、克隆载体 pMD18-T、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 及 DL 2000 DNA Marker 均购自于宝生物工程(大连)有限公司,高保真 KOD-plus DNA 聚合酶为日本 TOYOBO 公司产品,其余试剂均为进口或国产分析纯。

2 方法

2.1 芍药总 RNA 的提取及纯化

采用改良的 CTAB-LiCl 法^[11]提取芍药“桃花飞雪”根总 RNA;按照 DNase I 试剂盒说明书纯化芍药总 RNA,以除去总 RNA 中微量的 DNA 污染,1.4%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2 引物设计

基于 GenBank 报道的近缘物种肌动蛋白基因的 cDNA 序列,利用 Primer 5.0 软件设计 PCR 扩增引物 5'-ATGGCCGATGCTGAGGAT-3'和 5'-TTAA-

AAGCACTTCCTGTG-3',引物序列由北京华大基因研究中心合成。

2.3 cDNA 合成

参照 PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis kit 说明书进行 cDNA 的合成。将 1 μ L Oligo dT Primer、1 μ L dNTP Mixture、2 μ L RNA、6 μ L RNA-free H₂O 混匀,65℃保温 5 min,冰上冷却 2 min;然后分别加入 4.5 μ L RNase-free dH₂O、4 μ L PrimeScript II Buffer、0.5 μ L RNase Inhibitor、1 μ L PrimeScript II RTase,混匀,42℃保温 45 min,95℃保温 5 min,-20℃保存备用。

2.4 RT-PCR 扩增

PCR 扩增体系为 50 μ L,含 5 μ L 10 $\times$ 缓冲液、5 μ L 2.0 mmol/L each dNTP、4 μ L 25 mmol/L MgCl₂、10 pmol/ μ L 上下游引物各 1.5 μ L、5 μ L cDNA、1 μ L KOD-Plus DNA 聚合酶、27 μ L ddH₂O。PCR 扩增程序为 94℃预变性 2 min,随后 98℃、10 s,54℃、30 s,68℃、40 s,共 35 个循环,延伸时间为 40 s;1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

2.5 PCR 产物的回收、克隆及测序

按照 DNA 凝胶回收试剂盒(Takara)的说明书切胶回收,KOD 酶扩增的 PCR 产物 3'末端不含碱基 A,参照文献方法^[12]对回收的 PCR 产物 3'末端加 A,然后与 pMD 18-T 载体连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,菌落 PCR 和质粒 PCR 筛选后进一步用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定重组子,将阳性重组子送至北京华大基因研究中心测序。

2.6 芍药 Actin 序列分析

利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)BlastP 程序在氨基酸水平上对芍药 Actin 进行序列同源性分析;采用 DNAMAN 7.0 软件对多个物种 Actin 的氨基酸序列进行比对;使用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。

2.7 芍药 Actin 结构及性质预测

通过 NCBI 数据库 GenBank 分析蛋白质保守结构域;采用 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>)同源建模原理进行三维结构预测;应用 PROSITE 软件(<http://prosite.expasy.org/>)进行结构域分析。利用 ProtParam 软件(<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>)分析相对分子质量、等电点;利用 TMPRED 软件(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)分析跨膜结构区域;利用 PROTSKALE 软件(<http://www.expasy.org/>)

cgi-bin/protscale.pl) 分析疏水性; 利用PRORT软件 (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) 分析亚细胞定位; 利用 SignalP 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽分析。

2.8 半定量 RT-PCR 表达分析

基于芍药 Actin 基因 cDNA 序列设计特异性 PCR 扩增引物 5'-CATCGGTTGAGAAGAAGACTACG-3' 及 5'-GACCCTCCAATCCAGACACT-3', 引物序列由北京华大基因研究中心合成。分别提取“桃花飞雪”芍药根、茎、叶、花的总 RNA, 以等量的 RNA 反转录为 cDNA, 取等量 cDNA 进行 RT-PCR 反应。20 μ L PCR 反应体系中含 2 μ L 10 $\times$ 缓冲液、1.6 μ L 2.5 mmol/L each dNTP、1.6 μ L 25 mmol/L MgCl₂、0.6 μ L 10 pmol/ μ L 上下游引物、2 μ L cDNA、1 μ L Taq DNA 聚合酶。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。再取等量的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像系统拍摄后比较 Actin 基因在芍药不同组织中的表达强度。

3 结果与分析

3.1 芍药总 RNA 的提取及纯化

“桃花飞雪”芍药根总 RNA 的条带完整, 28 S 和 18 S 条带清晰, 经 DNase I 处理后 RNA 样品中无 DNA 污染 (图 1), 可以用于下一步 cDNA 的合成。

3.2 Actin 基因的 RT-PCR 扩增

以反转录的芍药 cDNA 为模板, 应用 RT-PCR 技术成功扩增出了芍药 Actin 基因 PCR 产物 (图 2), 扩增产物大小约为 1 100 bp, 所得片段与预期的理论片段大小一致。

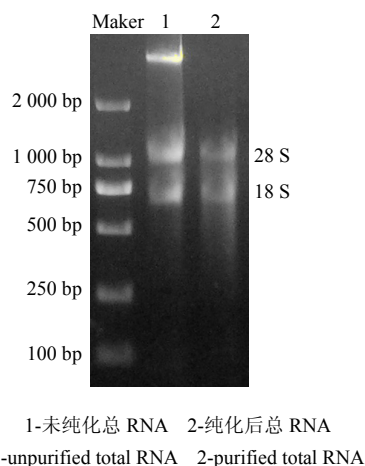


图 1 芍药总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from *P. lactiflora*

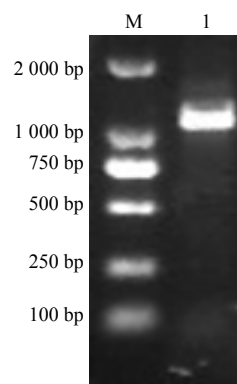


图 2 Actin 基因的 RT-PCR 扩增产物

Fig. 2 RT-PCR amplification products of Actin gene

3.3 Actin 基因的克隆及鉴定

从转化的平板上随机挑取单菌落进行菌落 PCR 检测, 阳性菌过夜培养后提取质粒并进行质粒 PCR 鉴定 (图 3), 质粒 PCR 扩增产物片段与预测片段大小一致, 进一步用 *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切阳性重组质粒 (图 4), 酶切片段大小与预期结果一致。将筛选出的 2 个阳性菌送至北京华大基因研究中心进行测序。2 个阳性菌的测序结果完全一致, 芍药 Actin 基因 cDNA 全长为 1 134 bp, 涵盖起始密码子 ATG 及终止密码子 TAA, 共编码 377 个氨基酸 (图 5), GenBank 登录号为 JX310002。

3.4 芍药 Actin 序列分析

为了探索芍药 Actin 与其他近缘植物 Actin 的进化关系, 选取来自棉花 *Gossypium hirsutum* L.、向日葵 *Helianthus annuus* L.、蓖麻 *Ricinus communis* L.、白梨 *Pyrus bretschneideri* Rehd.、白毛杨 *Populus tomentosa* Carr.、蔷薇 *Rosa multiflora* Thunb.、荔枝

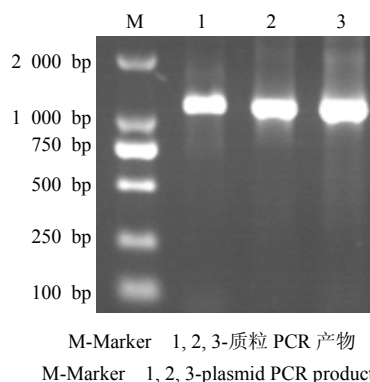


图 3 质粒 PCR 鉴定重组子

Fig. 3 Recombinants by plasmid PCR

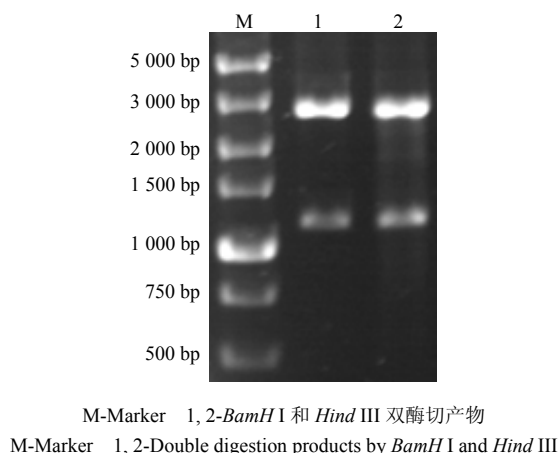


图 4 双酶切鉴定重组子

Fig. 4 Recombinants by double enzyme digestion

Litchi chinensis Sonn.、美味猕猴桃 *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang et A. R. Ferguson、芒果 *Mangifera indica* L. 的 13 个 Actin 序列, 利用它们完整的氨基酸序列构建 NJ 进化树 (图 6), 结果表明芍药 Actin 与棉花 Actin 11 (AAP73457) 的亲缘关系最近, 其次为棉花 Actin 4 (AAP73451) 和 Actin 1 (ACL97684); 进化分析还发现来源于植物的 Actin 被分为 2 个明显的亚群 Class I 和 Class II, 该结果与前人的研究结果相似^[13]。

Blast 分析结果表明在氨基酸水平上芍药 Actin 与棉花 Actin 11 (AAP73457)、Actin 4 (AAP73451) 和 Actin 1 (ACL97684), 向日葵 Actin 1 (ACL27885) 和 Actin 2 (ACL27886)、白梨 Actin 2 (ADF31905)、

```

ATGCCGATGCTGAGGATATCCAGCCCCTTGTCTGTGACAATGGAAGTGAATGGTCAAGGCTGGTTTTGCTGGTGATGATGCTCCAGA 90
M A D A E D I Q P L V C D N G T G M V K A G F A G D D A P R 30
GCAGTGTCCCGAGTATTGTTGGTCGACCCAGACACACTGGAGTCATGGTTGGAATGGGCCAAAAGGATGCCTATGTAGGTGATGAAGCA 180
A V F P S I V G R P R H T G V M V G M G Q K D A Y V G D E A 60
CAATCAAAAAGAGGTATTCTTACCTTGAAATATCCTATTGAGCATGGTATAGTCAGCAACTGGGATGACATGGAAGATCTGGCATCAT 270
Q S K R G I L T L K Y P I E H G I V S N W D D M E K I W H H 90
ACGTTCTACAATGAGCTTCGTGTTGCTCCTGAAGAGCACCCAGTGTCTCCTCAGAGGCACCCCTTAACCCCAAAGCCAACAGAGAAAAG 360
T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K 120
ATGACTCAGATCATGTTTGAGACCTTCAATGTGCTGCAATGTACGTTGCCATCCAGGCCGTGCTGTCTCTATATGCCAGTGGTGTGACA 450
M T Q I M F E T F N V P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T 150
ACTGGTATTGTGCTGGATTCTGGTGATGGTGTGAGTCACACTGTACCTATCTATGAAGGTTATGCCCTTCCTCAGCTATCCTCCGTCTT 540
T G I V L D S G D G V S H T V P I Y E G Y A L P H A I L R L 180
GACCTTGCTGGTGTGATCTCAGATTCTTGTGATGAAGATCTTGACTGAAAGAGGTTACATGTTTACCACCACTGCTGAACGGGAAATT 630
D L A G R D L T D S L M K I L T E R G Y M F T T T A E R E I 210
GTCCGTGACATGAAGGAGAAGCTAGCATACGTTGCCCTTGATTACGAGCAGGAAGTGGAGACTTCCAAAAGCAGCTCATCGGTTGAGAAG 720
V R D M K E K L A Y V A L D Y E Q E L E T S K S S S S V E K 240
AACTACGAATTGCCTGATGGACAAGTACCATCGAGCTGAGAGATTCCGTTGCCAGAAGTCTGTTCCAGCCATCACTAATCGGA 810
N Y E L P D G Q V I T I G A E R F R C P E V L F Q P S L I G 270
ATGGAAGCTGCTGGAATTCACGAGACTACTTACAATTCTATCATGAAGTGTGATGTGGATATCAGAAAGGATTTATATGGAAACATTGTT 900
M E A A G I H E T T Y N S I M K C D V D I R K D L Y G N I V 300
CTCAGTGGTGGATCGACTATGTTCCCTGGTATTGCAGACAGAATGAGCAAGGAAATCACTGCTCTTGCTCCAGCAGCATGAAGATTAAG 990
L S G G S T M F P G I A D R M S K E I T A L A P S S M K I K 330
GTTGTGGCACCGCCTGAGAGAAAATACAGTGTCTGGATTGGAGGGTCTATTCTTGCTTCCCTCAGTACCTTCCAGCAGATGTGGATTTCC 1 080
V V A P P E R K Y S V W I G G S I L A S L S T F Q Q M W I S 360
AAGGGTGAATACGATGAATCTGGTCCATCCATTGTCCAGGAAGTGCTTTTAA 1 134
K G E Y D E S G P S I V H R K C F * 377
    
```

ATG-起始密码子 TAA-终止密码子
ATG-start codon TAA-termination codon

图 5 芍药 Actin 基因核苷酸及编码的氨基酸序列

Fig. 5 Nucleotide of Actin gene and sequences of its encoded amino acids in *P. lactiflora*

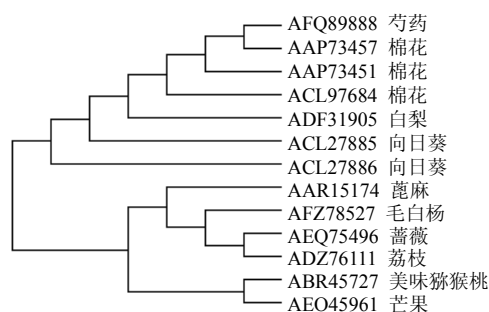


图6 Actin 的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of Actin

蓖麻 Actin (AAR15174)、毛白杨 Actin (AFZ78527)、蔷薇 Actin (AEQ75496)、荔枝 Actin (ADZ76111)、美味猕猴桃 Actin 1 (ABR45727)、芒果 Actin 1 (AEO45961) 同源性均高达 99%, 仅在第 4、51、180、190、202、214、221、232、317 个氨基酸残基处存在差异 (图 7), 表明 Actin 氨基酸序列在不同物种之间高度保守^[14]。

3.5 芍药 Actin 结构及物理性质预测

通过 GenBank 数据库分析芍药 Actin 保守结构域, 发现氨基酸序列中含有核苷酸结合位点

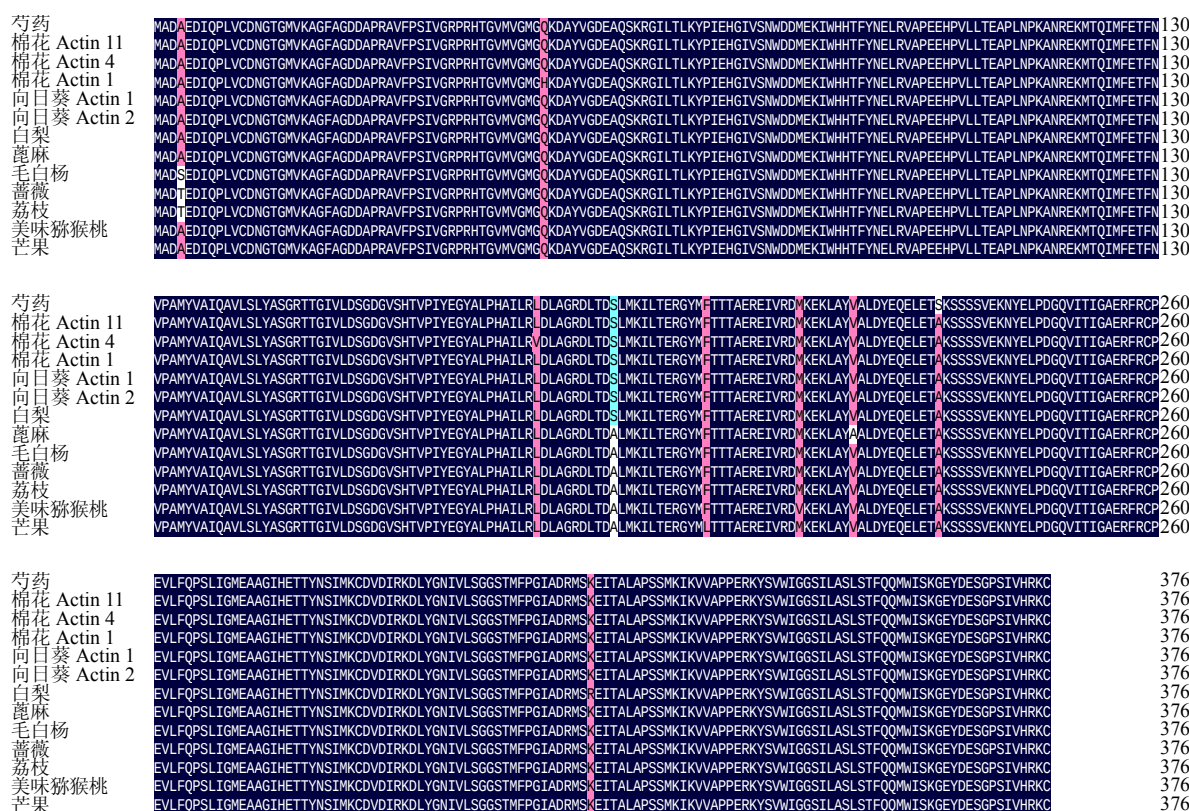


图7 芍药 Actin 与近缘物种 Actin 氨基酸序列的多重比较

Fig. 7 Multiple comparison on amino acid sequence of Actin among *P. lactiflora* and other allied species

(Nucleotide binding site), 隶属于 NBD_sugar-kinase_HSP70_actin 蛋白超级家族; 利用 PDB 数据库中果蝇 (*Drosophila melanogaster*) Actin-5C 蛋白晶体 (3EKS A 链) 3D 结构^[15]作为模板, 基于同源建模原理, 利用 SWISS-MODEL 软件^[16]预测出三维结构, 该蛋白具有 4 个结构域, 在结构域 II 与 IV 之间存在着 ATP 结合位点 (图 8); PROSITE 在线分析结果表明芍药 Actin 氨基酸序列中存在 3 种 Actin 特征信号序列: 位于 55~65 bp 的 YVGDEAQSQRG 为 Actin signature 1、位于 106~

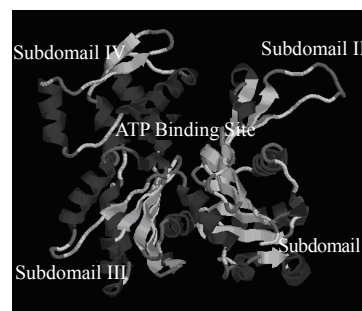


图8 芍药 Actin 三级结构同源建模

Fig. 8 Homology modeling of Actin 3D structure in *P. lactiflora*

118 bp 的 LLTEAPLNPKANR 为及 Actin 相关蛋白 signature 2、位于 358~366 bp 的 WISKGEYDE 为 Actin signature 3。生物信息学分析预测芍药 Actin 的相对分子质量为 4.17×10^4 ，等电点 (pI) 为 5.31；预测芍药 Actin 是一个定位于胞液、不含跨膜域、不含信号肽分子的亲水性、稳定蛋白。

3.6 半定量 RT-PCR 分析

半定量 RT-PCR 分析表明，在 RNA 浓度保持一致水平的条件下，Actin 基因在芍药根、茎、叶、花中的表达量一致（图 9）；因此 Actin 基因能够作为半定量 RT-PCR 及荧光定量 PCR 分析的内参基因，为研究其他重要功能基因在芍药中的表达和调控机制奠定了一定基础。

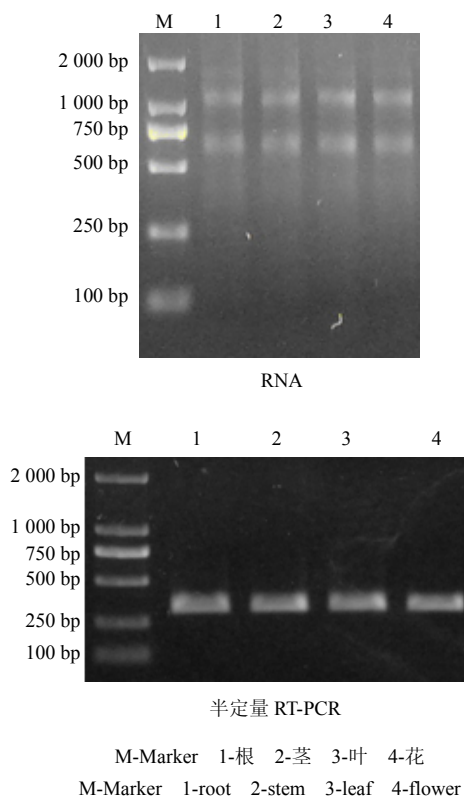


图 9 Actin 基因在芍药不同组织中的表达

Fig. 9 Expression levels of Actin in different organs of *P. lactiflora*

4 讨论

内参基因是在研究其他基因表达模式时作为参照的一个基因，在植物中常用 16 S RNA、组蛋白 H3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）基因以及 Actin 基因等。本研究克隆了芍药 Actin 基因，其全长 1 134 bp，跨越起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA，共编码 377

个氨基酸，具有 Actin 家族特有的特征信号序列。Blast 分析表明在核苷酸水平上芍药 Actin 基因与牡丹 Actin（JN105298）、棉花（Actin 11（AY305732）、Actin 1（FJ560483）和 Actin 4（AY305726）、亮叶桦 *Betula luminifera* H. Winkl. Actin（FJ410442）、美国黑杨 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray Actin 9（XM_002331844）的同源性达 90% 以上；芍药 Actin 的氨基酸序列与棉花、向日葵、红凤菜、白梨等植物的 Actin 的同源性均高达 99%，多序列比对结果表明芍药与其他 8 种植物的 12 条 Actin 的氨基酸序列仅在少数位置上有差异，由此说明 Actin 无论是在核苷酸序列还是在氨基酸序列水平上都具有高度的同源性^[17]，进一步证明 Actin 基因是高度保守的看家基因。Actin 的高度保守性是其参与构成细胞骨架的重要功能紧密相关的。由于生理功能的重要性，Actin 在自然选择过程中承受着巨大选择压力，因而核苷酸序列和氨基酸序列都表现出高度保守。

多细胞真核生物的 Actin 由多基因家族编码，如拟南芥基因组中含有 10 个 Actin 基因^[18]。Actin 家族不同成员的表达具有时间和空间上的差异^[19-20]，以适应不同组织和细胞类型在不同发育时期的需要。植物中的 Actin 可被划分为 2 类，第 1 类表达较恒定，是构成植物细胞骨架的重要成分，对于维持细胞的形态与细胞器定位有重要作用，如 MaACT2 和 MaACT3；第 2 类仅在特定时期表达，与植物生理活动密切相关，如 MaAC1T^[21]。因此，克隆的 Actin 基因必须待分析其时空表达特异性后，才能作为内标基因。本实验基于克隆的芍药 Actin 基因 cDNA 序列，建立了芍药 Actin 基因的半定量 RT-PCR 扩增体系，扩增出的条带清晰，无拖尾现象；半定量 RT-PCR 分析表明 Actin 基因在芍药不同组织中的表达量保持恒定，适合作为芍药功能基因表达分析的内参基因，为研究其他重要功能基因在芍药中的表达和调控机制奠定了一定基础。

参考文献

- [1] 陈颖, 王刚, 赵俊霞. 高等植物体内的肌动蛋白 [J]. 生物学通报, 2003, 38(1): 13-15.
- [2] 祝庆刚, 饶景萍, 田红炎, 等. 丙烯和 1-甲基环丙烯处理对采后柿果实 XTH 基因表达的影响 [J]. 园艺学报, 2012, 39(7): 1278-1284.
- [3] 宋康华, 饶景萍, 常晓晓, 等. 柿果实内切-1, 4-β-葡聚糖酶基因克隆与定量表达分析 [J]. 园艺学报, 2011,

- 38(10): 1893-1900.
- [4] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 植物学报, 2010, 45(5): 579-587.
- [5] 张婧妹, 茆振川, 刘 峰, 等. 黄瓜根结 RDR 酶基因的分离与表达分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(10): 1911-1920.
- [6] 张 波, 徐昌杰, 陈昆松. 猕猴桃 6 个 *LOX* 基因家族成员实时定量 PCR 引物特异性的检测与应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(3): 262-267.
- [7] 陈吉宝, 景蕊莲, 毛新国, 等. 普通菜豆 *PvP5CS2* 基因对逆境胁迫的应答 [J]. 作物学报, 2008, 34(7): 1121-1127.
- [8] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [9] 杨纯瑜. 中国芍药属药用植物资源 [J]. 中药材, 1991, 14(12): 42-45.
- [10] 康晓飞, 郭先锋, 许世磊, 等. 三个观赏芍药芍药苷含量的动态变化研究 [J]. 北方园艺, 2011(05): 85-87.
- [11] Gasic K, Hernandez A, Korban S S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, 22: 437a-437g.
- [12] 范丙友, 高水平, 侯小改, 等. Col 生态型拟南芥 *AP3* 基因启动子克隆及植物表达载体构建 [J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 21-26.
- [13] Zhang D Q, Du Q Z, Xu B H, *et al.* The actin multigene family in *Populus*: organization, expression and phylogenetic analysis [J]. *Mol Genet Genomics*, 2010, 284: 105-119.
- [14] Peng H, Cheng H Y, Yu X W, *et al.* Molecular analysis of an actin gene, *CarACT1*, from chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37: 1081-1088.
- [15] Nair U B, Joel P B, Wan Q, *et al.* Crystal structures of monomeric actin bound to cytochalasin D [J]. *J Mol Biol*, 2008, 384: 848-864.
- [16] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195-201.
- [17] Monizde S M, Drouin G. Phylogeny and substitution rates of angiosperm Actin genes [J]. *Mol Bio Evol*, 1996, 13: 1198-1212.
- [18] Kandasamy M K, McKinney E C, Meagher R B. Functional nonequivalency of Actin isoforms in *Arabidopsis* [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 251-261.
- [19] Meagher R B. Divergence and differential expression of actin gene families in higher plants [J]. *Int Rev Cytol*, 1991, 125: 139-163.
- [20] Hightower R C, Meagher R B. Divergence and differential expression of soybean actin genes [J]. *EMBO J*, 1985, 4(1): 1-8.
- [21] 李 军, 赵爱春, 王茜龄, 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.