

• 药材与资源 •

太子参 3 个肌动蛋白基因片段的克隆与序列分析

丁 铃, 李 军, 周 涛*, 郑 伟, 龙登凯, 江维克, 肖承鸿
贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

摘要: 目的 克隆太子参肌动蛋白 (Actin) 基因片段并进行序列分析。方法 利用植物 Actin 基因的保守序列设计简并引物, 通过 RT-PCR 和抑制 PCR 扩增太子参 Actin 基因核心片段。利用半定量 RT-PCR 分析太子参 Actin 基因在不同种源、不同器官、不同生长发育时期的表达情况。结果 通过 RT-PCR 获得 3 条太子参 Actin 基因的核心片段, 长度均为 760 bp, 依次命名为 PhACT1、PhACT2、PhACT3。通过抑制 PCR 及序列拼接后 3 条核心片段依次延长至 1 008、1 008、975 bp, 分别编码 336、336、325 个氨基酸残基。半定量 RT-PCR 分析表明 PhACT2 和 PhACT3 基因在不同种源、不同器官、不同生长发育时期的表达量基本恒定, PhACT1 基因存在一定的差异。结论 首次从太子参中克隆得到 3 条太子参 Actin 基因序列, 并确定 PhACT2 基因适合作为太子参功能基因表达分析的内参基因。

关键词: 太子参; 肌动蛋白; 基因克隆; 序列分析; RT-PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)11-1935-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.11.021

Cloning and sequence analysis of three Actin gene fragments from *Pseudostellaria heterophylla*

DING Ling, LI Jun, ZHOU Tao, ZHENG Wei, LONG Deng-kai, JIANG Wei-ke, XIAO Cheng-hong
Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

Abstract: Objective Cloning and sequence analysis of the cDNA fragments encoding Actin gene from *Pseudostellaria heterophylla*. **Methods** Degenerate primers were designed based on the conserved sequences of the cloned Actin gene from other plant species. The core fragments of Actin gene were obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the flanking fragments were cloned by using suppression PCR. The expression profiles of Actin gene in different cultivated provenances, organs, and development stages were analyzed by semiquantitative PCR. **Results** The three Actin genes obtained were designated PhACT1, PhACT2, and PhACT3, which were extended to 1 008, 1 008, and 975 bp through suppression PCR, encoding 336, 336, and 325 amino acids, respectively. The semiquantitative PCR analysis showed that PhACT2 and PhACT3 had a stable expression except PhACT1. **Conclusion** Three Actin genes are cloned and the PhACT2 could be used as an internal standard gene for the expression analysis of the functional genes in *P. heterophylla*.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax; Actin; gene cloning; sequence analysis; RT-PCR

基因表达分析是了解植物功能基因的表达规律, 解析植物复杂代谢网络并对其进行表达调控的重要手段之一^[1]。通过实时荧光定量 PCR 获得目的基因的相对表达量是目前最为常用的基因表达检测方法。因此, 从植物中筛选出在不同器官、不同发育时期表达基本恒定的管家基因作为研究的内参基因是获得准确基因表达分析结果的关键^[2]。肌动蛋

白 (Actin) 基因是广泛存在于植物中的管家基因, 其编码的肌动蛋白是细胞骨架中微丝的主要组分, 参与细胞内许多重要的生理活动, 如细胞形状的维持、胞质环流、细胞运动、细胞分裂、细胞分化、细胞内的物质运输、急性建成以及信号转导等, 具有高度保守、表达量高且稳定的特点, 常被用作基因表达分析的内参基因^[3-4]。

收稿日期: 2015-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81460579); 贵州省普通高等学校特色重点实验室建设项目 (黔教合 KY 字 [2013] 108 号); 施秉中药材产业科技合作专项计划项目 [施中药科合专项 (2014) 第 6 号]; 贵州省研究生工作站建设项目 (黔教研合 JYSZ 字 [2014] 016)

作者简介: 丁 铃 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源鉴定与质量控制。Tel: 15285135826 E-mail: dingling5826@163.com

*通信作者 周 涛 (1968—), 女, 教授。Tel: (0851)85607526 E-mail: taozhou88@163.com

太子参为石竹科孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax 的干燥块根, 具有益气健脾、生津润肺的功效^[5]。现代研究表明, 太子参多糖具有抗应激、抗疲劳、增强免疫力的功效^[6], 与药材益气健脾、补气生津的传统功效相似; 太子参环肽类成分具有酪氨酸酶抑制活性, 有抗黑色素生成作用^[7], 与现代将太子参作为保健品、化妆品进行研制开发的定位理念相得益彰。但大量研究显示, 各产区栽培太子参的药材质量参差不齐, 特别是药材指标性成分太子参环肽类的量差异显著^[8-9], 其量的比例变化与地区年日照数及降雨量密切相关^[10-11]。近年来, 从连作障碍、土壤微生物方面改善栽培太子参药材品质^[12-13], 结合太子参农艺性状、遗传多样性水平筛选优良种源已有研究报道^[14], 但针对太子参药材品质形成及其产生地理变异的遗传与生态学机制研究却严重滞后, 太子参功能基因的研究尚处于起步阶段。鉴于此, 本研究通过 RT-PCR 与抑制 PCR 技术克隆太子参的 Actin 基因核心片段, 并进行序列分析, 检验 Actin 基因在太子参不同种源、不同器官、不同生长过程中的表达稳定性, 为后续研究太子参其他功能基因的表达分析和调控机制提供内参基因。

1 材料与方法

1.1 材料

2014 年 9 月 26 日从贵州施秉牛大场太子参种质资源圃采集不同种源太子参共 7 份, 分别为江苏句容 (JJ-1)、江苏句容 (JJ-2)、福建柘荣 (FZ-1)、福建柘荣 (FZ-2)、贵州施秉 (GS-1)、贵州施秉 (GS-2)、贵州施秉 (GS-3); 2015 年 3 月 7 日采集

GS-2 的花、茎、叶、块根; 2015 年 4 月 21 日采集 GS-2 单株的第 1~4 茎节及对应的叶片。太子参所有样品经贵阳中医学院周涛教授鉴定为孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax 的干燥块根均经液氮处理后, -80 °C 冰箱中保存, 备用。

质粒载体 pMD19-T、反转录酶 M-MLV、限制性内切酶 *Dra* I 和 *Hae* III、RNAiso Plus 试剂盒、DNase I、DL 500 DNA Marker 及 DL 2000 DNA Marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司, 2×Taq PCR MasterMix 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5α 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取、纯化和 cDNA 的合成 取 -80 °C 保存的太子参材料于预冷的研钵中加液氮迅速研磨成粉末状。根据 TaKaRa 公司 RNA 抽提试剂盒说明提取总 RNA; 按照 DNase I 试剂盒说明纯化太子参总 RNA, 以除去总 RNA 中残留的微量 DNA。用 30 μL DEPC 水溶解总 RNA, 取 3 μL 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用核酸定量仪检测总 RNA 浓度。以总 RNA 为模板, Oligo d (T)₁₁ 为引物, 利用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA 第一链, -80 °C 保存, 备用。

1.2.2 RT-PCR 扩增 从 NCBI 数据库下载植物 Actin 的核苷酸序列进行同源性比较, 找出高度保守区域, 根据同源性高和简并性低的原则, 设计简并引物 Actin-F/Actin-R (表 1), 以 cDNA 为模板进行

表 1 引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列 (5'→3')	引物名称	序列 (5'→3')
Actin-F	CAACTGGGATGAYATGGARAAG	ap7-H	GAACGGGGTGCTCTTCTGGTGC
Actin-R	CVACCTTDAICTTCATGCTG	ap7-D	GGCAACATACATAGCTGGAACG
Adaptor1	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGC GTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT	ap8-HD	AAGTTCATTGTAGAAAGTATGATG
Adaptor2	PO ₄ -ACCAGCCC-NH ₂	ap9	AGAGACGTCTGAAGAGCAGCTC
GSP1	GTAATACGACTCACTATAGGG	ap10	AGCTGCAGGCATTCACGAGACTACC
GSP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	ap11	GATTTGGGTCAITTTCTCCCTG
ap1	GCGTGAAATCATCAGAGACATG	ap12	CTTCGGTAAAGTAGAACTGGGTGC
ap2	TCTGTGCGAGAAGAGCTATGAGCTG	Actin-1F	TCAATCCTAAGGCAAATCGTG
ap3	CAGCACTATGCCAGTCGTACGAC	Actin-1R	TTCATAGTCAAGGGCAATGTAAG
ap4	TTGAGAGGTGCTTCAGTCAAGAGG	Actin-2F	CTCCATACCGATAAATGAAGGC
ap5	GGAAGCCGCCAAAAGCAGCTCT	Actin-2R	CACTGTTCCAATCTATGAGGGTTA
ap6	GTCCCCTGGTATCCATGAGACAAC	Actin-3F	CAATGATGGCTGGAAGAGGA
		Actin-3R	CCAAGGCTAACAGGGAGAAAA

PCR 扩增, 25 μL 反应体系包含 1 μL cDNA、1 μL Actin-F (10 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL Actin-R (10 $\mu\text{mol/L}$)、12 μL 2 \times Taq PCR MasterMix [0.1 U/ μL Taq Polymerase、500 $\mu\text{mol/L}$ dNTP each、20 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 8.3)、100 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl_2]、12 μL ddH₂O。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min; 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 7 min; PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切下目的条带, Omega 胶回收试剂盒, 回收片段重组入 pMD19-T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 并接种到含 60 mg/mL Ampicillin (AMP) 的 Luria-Bertanil (LB) 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑取菌斑以 500 μL 含 60 mg/mL AMP 的液态 LB 培养基培养 8 h。取菌液为模板 PCR 扩增进行克隆检测, 选取多个阳性克隆进行测序分析。

1.2.3 基因组 DNA 的提取及 Actin 基因侧翼序列扩增 改进 CTAB 法提取太子参基因组 DNA。取 1 g 幼嫩叶片于干净的研钵中, 加入 0.04 g PVP 和 3 mL CTAB 提取液 (1.4 mol/L NaCl; 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 值为 8.0; 20 mmol/L EDTA, pH 值为 8.0) 研匀, 装入 10 mL EP 管中; 加入 60 μL β -巯基乙醇, 充分混匀; 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 45 min; 加入 1 mL 5 mol/L 醋酸钾, 冰上放置 20 min; 加入 4 mL 氯仿-异戊醇 (24 : 1) 混合液用力混匀, 放置 10 min; 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 加入 2/3 体积预冷的异丙醇, 用力混匀, 常温静置 10 min; 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清; 75% 乙醇洗涤 2 次, 自然干燥; 加入 150 μL ddH₂O 溶解; 加入 4 μL 10 mg/mL RNase A, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h; 加入等体积酚-氯仿-异戊醇 (25 : 24 : 1) 充分混匀, 放置 5 min; 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清; 加入 1/3 体积 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇, 充分混匀, 静置 10 min; 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清; 75% 乙醇洗涤 2 次, 自然干燥; 用适量 ddH₂O 溶解。取 3 μL 用于 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用核酸定量仪检测 DNA 溶度。

分别取 10 μg 基因组 DNA, 各加入 *Dra* I 和 *Hae* III 3 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 3 h, 取适量用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果, 酶切产物用乙醇沉淀法回收, 并用适量 ddH₂O 溶解。根据已经报道的接头序列^[15]合成 Adaptor1 和 Adaptor2, 稀释成 50 $\mu\text{mol/L}$, 等体积混匀, 沸水浴保温 5 min, 然

后在沸水浴中自然冷却至室温。连接体系包含 8 μL 基因组酶切产物、4 μL 混合接头、10 μL 10 \times Ligase Buffer、3 μL T4 DNA Ligase, 于 PCR 仪上 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h, 乙醇沉淀法回收连接产物作为扩增模板。根据 Adaptor1 设计特异引物 GSP1、GSP2, 获得的 3 条 Actin 基因核心片段设计特异引物 ap1~ap12 (表 1), 以 GSP1 与外侧特异引物形成引物对进行第 1 轮扩增, 将扩增产物稀释 2 倍, 取 1 μL 作为模板, GSP2 与内侧特异引物形成引物对进行第 2 轮巢式扩增。用琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物, 切下目的条带, Omega 胶回收试剂盒回收, 回收片段重组入 pMD19-T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选出多个阳性克隆进行测序分析。

1.2.4 序列分析 运用生物信息学软件分析 Actin 氨基酸序列中的保守结构域与活性位点, 从 NCBI 数据库下载其他植物 Actin 基因的氨基酸序列, 采用 Muscle 3.6 软件进行多重比对, 并将比对结果通过 MEGA 4.0 软件采用邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统发育树。

1.2.5 基因表达分析 根据获得的 3 条 Actin 基因片段序列比对结果, 设计特异引物 Actin-1F/Actin-1R、Actin-2F/Actin-2R、Actin-3F/Actin-3R (表 1), 以等量总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行半定量 RT-PCR 扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 分析太子参 Actin 基因在不同种源、不同器官、不同生长发育时期的表达情况。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及 Actin 基因核心片段的获得

按照 TaKaRa RNA 抽提试剂盒说明书提取的总 RNA, 28 S、18 S 条带清晰, 无 DNA 污染均可用于后续实验 (图 1)。以总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 用 Actin 基因的简并引物 Actin-F/Actin-R 进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测发现在 760 bp 处有一条亮带 (图 2), 且上下无杂带, 与推测的目的片段大小一致。将该条带进行切胶、回收、克隆。随机挑取 14 个阳性克隆测序, 经序列比对后发现其中包含了 3 条不同的 Actin 基因片段, 长度均为 760 bp, 分别命名为 PhACT1、PhACT2、PhACT3。

2.2 基因组 DNA 及 Actin 基因侧翼片段的扩增

琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 改良 CTAB 法能获得较高质量的基因组 DNA, 可用于后续实验

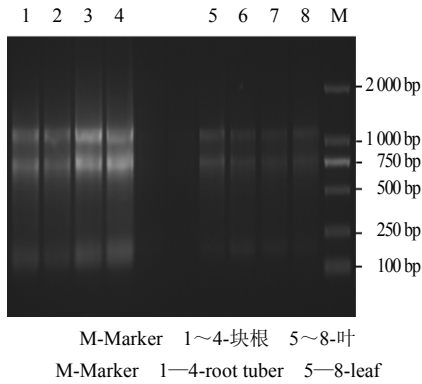


图 1 太子参总 RNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA from *P. heterophylla*

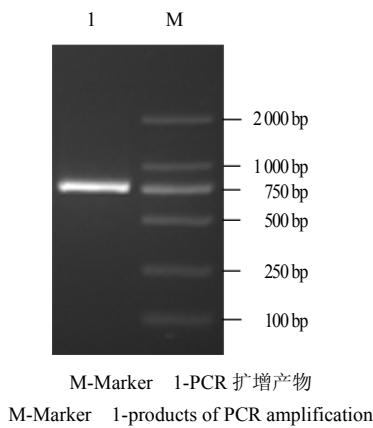


图 2 Actin 基因核心片段电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of DNA fragments of Actin by PCR

(图 3)。经 *Dra* I 和 *Hae* III 2 种限制性内切酶消化后与接头相连的产物形成 2 个“DNA 库”，利用 GSP1、GSP2 与 ap1~ap12 组成的引物对对 3 条 Actin 基因的侧翼序列进行巢式扩增，选取阳性扩增进行克隆，每条序列选取 2~3 个阳性克隆进行平行测序（图 4）。通过 Sequencher 4.2 软件将测序结果分别与 PhACT1、PhACT2、PhACT3 进行序列拼接，通过 Blast 和 Genetyx version 7 对接序列进行比较、分析，除去非编码区，最终确定 3 条 Actin 基因的编码区由 760 bp 分别延长至 1 008、1 008 及 975 bp，GenBank 登入号依次为 KT363847、KT363848、KT363849。

2.3 太子参 Actin 基因序列分析

根据序列拼接结果，推测 PhACT1、PhACT2 与 PhACT3 分别编码含 336、336 和 325 个氨基酸残基的多肽，其中包含 2 种 Actin 信号序列：YVGDEAQSQRG（35~45、35~45、24~34）为 Actinssignature 1 序列，LLTEAPLNPKANR（86~

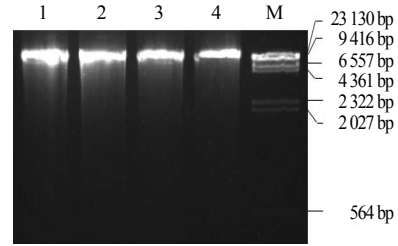


图 3 太子参基因组 DNA 电泳检测

Fig. 3 Electrophoresis of genomic DNA from *P. heterophylla*

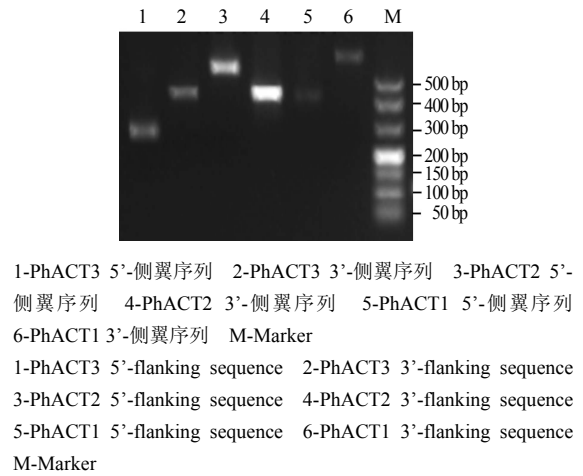


图 4 抑制 PCR 扩增 Actin 基因侧翼序列 (5'→3')

Fig. 4 Suppression PCR amplification flanking sequence of Actin gene (5'→3')

98、86~98、85~87)为 Actins and actin-related proteins signature 序列（图 5）。通过 BlastP 对 3 个 Actin 基因编码的蛋白进行保守区预测，结果显示 PhACT1、PhACT2 和 PhACT3 均属于 NBD_sugarkinase_HSP70_actin superfamily 家族（图 6）。统计发现，3 条多肽均含有 20 种常见氨基酸，量相对较多的是丙氨酸 (Ala, A)、甘氨酸 (Gly, G)、异亮氨酸 (Ile, I)、亮氨酸 (Leu, L) 和谷氨酸 (Gly, E)，以上 5 种氨基酸的总量在 3 条多肽中分别达 40%、38%和 38.4%，量相对较低的是色氨酸 (Trp, W) 和半胱氨酸 (Cys, C)，分别只含 3 个和 2 个。

2.4 太子参 Actin 基因进化分析

为了探索太子参 Actin 基因与其他植物 Actin 基因的进化关系，选取序列比对中同源性较高的鹅肠菜 *Myosoton aquaticum* (L.) Moench、甜菜 *Betavulgaris* L.、青葙 *Celosia argentea* L. 等 15 个物种的 23 条 Actin 基因，利用它们的氨基酸序列构建

PhACT1	GCTGTTTGGTGGATGATGCCCAAGGGCTGTGTCCTAGCATTGTTGGCCACCACTGGTGTGATGTTGGCATGGGCCAAAAGGATGCATATGTTGGAGATGAAGCT A G F A G D D A P R 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 CAATCAAAAAGTGGAAATCTGACTCTCAATACCCGATAGCATGGTATCTCGACCACTGGGATGATGGAGAAGATTGGCATCACACTTCTACAATGAGCTCGTGGTCTCT 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 T F Y N E L R V A P GAAGACATCCAAATCTCTGACTGAAGCACTCTCAATCTGAAGCAATCTGAAAAGATGACTCAAAATCATGTTGAGACCTTTAATGCTCTGCTGATGATGGCAATTCAGGCT E E H P I L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F N A P A M Y V A I Q A GTCTCTCGCTTATGCTAGTGGTGTAGACTGGCATAGTGGATTCTGGAGATGGTGTGAGOCACACAGTGCACATACAGAGGGGTACGCTCTCCACATGCAATCTGCTCT V L S L Y A S G R T 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 GACTTAGCTGGCCAGACTCACAGACTACATGATGAAGATCTAACCCAGCGTGGATACCTCTTCAAGACCTCAGCTGAGCGTGAATCATCAGAGACATGAAGAAAAGCTTGCCTAC D L A G R D L T D Y M M K I L T E R G Y S F T T S A E R E I I R D M K E K L A Y ATTGCCCTGACTATGAACAAGATGGAACCCGCAAACTAGCTCTCTGCGAAGAGCTATGAGCTGCGTATGGACAGGTGATCAACATTGGAGAGAGATTCAGCTGCGCCG I A L D Y E Q E M E T A K T S S S V E K S Y E L P D G Q V I T I G G E R F R C P GAAGTCTTATCCAACTGCTCTTCAATGGAACTGGAGCTGCTGGAATCATGAAGACTTATAAATCATCATGAATGATGATGGATATTAGAAAAGACTTGTATGGAAAATGTA E V L F Q P S F I G 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 CTTAGTGGCGTACAACTGTTCACTGGTATTGGGATGAGATGAGCAAGAACTCAGTCTCTGCTCAAGCAGCATGAAGATTAAAGTGGTGCACCGCTGAGAGAAATACAGT L S G G T T M F T G I A D R M S K E I T A L A P S S M K I K V V A P P E R K Y S GTTGGATTGGTGGATCTATTGGCATCTCCAGCAGCTCCAGCAG V W I G G S I L A S L S T F Q Q	120 40 240 80 360 120 480 160 600 200 720 240 240 840 280 960 320 1 008 336
PhACT2	GCAGGTTTGGTGGAGATGATGCCAAGGGCAGCTTCCCGATATTGTTGGTCTCCCGACACACTGGTGTATGTTGGATGGGACAGAAGGATGCTATGTCGGAGATGAAGCT A G F A G D D A P R 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 CAATCAAAAAGTGGAAATCTGACTCTCAATACCCGATAGCATGGTATGTAAGCACTGGGATGACATGGAGAAGATTGGCATCACACTTCTACAATGAGCTCGTGGTCTCT 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 T F Y N E L R V A P GAGGACACCCCTTCCGCTAAGTCAAGCCCTGATGCTAAGCTAAGCAAGATGACTCAGATTATGTTGAGACCTTCAACCTCCAGCTATGATGTTGCCATCCAGCT E E H P I L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F N A P A M Y V A I Q A GTCTCTCGCTTATGCTAGTGGTGTAGACTGGCATAGTGGATTCTGGAGATGGTGTGAGOCACACAGTGCACATACAGAGGGGTACGCTCTCCACATGCAATCTGCTCT V L S L Y A S G R T 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 GACTTAGCTGGCCAGACTCACAGACTACATGATGAAGATCTAACCCAGCGTGGATACCTCTTCAAGACCTCAGCTGAGCGTGAATCATCAGAGACATGAAGAAAAGCTTGCCTAC D L A G R D L T D Y M M K I L T E R G Y S F T T S A E R E I I R D M K E K L A Y ATTGCCCTGACTATGAACAAGATGGAACCCGCAAACTAGCTCTCTGCGAAGAGCTATGAGCTGCGTATGGACAGGTGATCAACATTGGAGAGAGATTCAGCTGCGCCG I A L D Y E Q E M E T A K T S S S V E K S Y E L P D G Q V I T I G G E R F R C P GAAGTCTTATCCAACTGCTCTTCAATGGAACTGGAGCTGCTGGAATCATGAAGACTTATAAATCATCATGAATGATGATGGATATTAGAAAAGACTTGTATGGAAAATGTA E V L F Q P S F I G 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 CTTAGTGGCGTACAACTGTTCACTGGTATTGGGATGAGATGAGCAAGAACTCAGTCTCTGCTCAAGCAGCATGAAGATTAAAGTGGTGCACCGCTGAGAGAAATACAGT L S G G T T M F T G I A D R M S K E I T A L A P S S M K I K V V A P P E R K Y S GTTGGATTGGTGGATCTATTGGCATCTCCAGCAGCTCCAGCAG V W I G G S I L A S L S T F Q Q	120 40 240 80 360 120 480 160 600 200 720 240 240 840 280 960 320 1 008 336
PhACT3	GCTTTCCAAATATAGTGGTGGTCCCGACACACTGGTGTATGTTGGGACAGAAGGATGCATATGTTGGAGACAGGCTCAGTCCAAAAGAGTATCTTGCATTGGAAGTAC 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 Q S K R G I L T L K Y CAAATGAGCATGGTATTGAGTAACTGGGATGACATGGAGAAGATTGGCATCACACTTCTACAAGAGCTCGTGGTCTCTGAAGACACCCAGTCTACTTACCGAAGCCCC P I E H G I V S N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P TGGACCCCAAGGCTAACAGGAGAAAATGACCAAAATCATGTTGAGACATCAATGAGTGGCTGCCATGATGCTGCTATCCAGCCGCTCTTCTCTGATGCTAGTGGGCTACAA L N P K A N R E K 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 GGTATGCTACTTGTCTGGTGGTGTAGTCACTACTGTCACCAATACGAGGGTATGCTCTACCCCATGCTATTCTACGTTGGATCTTGGTGGTGGTACTTCCAGCATCTC 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 D L A G R D L D Y L ATGAAGATCTTACTGAGAGAGGTTACATGTTCCACCATCTGCGGAAACCGGAAATGTCCTGATGATTAAGGAGAGCTGGCATACCTTGGCTTGTATTGAGGAGCAATCAGAGAGC M K I L T E R G Y M F T T S A E R E I V R D I K E K L A Y V A L D F E Q E S E T TGGAGGACAGCTCAGCAATCGAGAAGACTACGAACCTCCCTGATGGACAGGTGATCAACATTGGAGCCGAGAGATTCCGTTGCCAGAGGTCCTCTCCAGCCATCATTGCTGGTATC S K S S A I E K 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 F I G 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 L S G G T T M F P G I GAAGCTGAGGCAATCAAGACTACCTCAAACTCATGAAAGTGTGAGCTGGATATCAGGAGGAGCTTACGGTAAACATTGCTCAGTGGTGGTACTACCATGTTCCCTGGTATI E A G 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 L S G G T T M F P G I GCTGAGCATGAGCAAGAAATCAGCCGACTGCTCTGAGCAGCATGAAGATCAAGTGTGTCACCACTGAGCGTAAATACAGTGTCTGGATCGGAGGCTCTATCTCGCATCACT A D R M S K E I T A L A P S S M K I K V V A P P E R K Y S V W I G G S I L A S L AGCAGCTTCCAAAG S T F Q Q	120 40 240 80 360 120 480 160 600 200 720 240 240 840 280 960 320 975 325

框内为 Actin 信号序列
Box for Actin signal sequence

图 5 太子参 Actin 基因片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 5 Nucleic acid sequence and deduced amino acid sequence of Actin gene fragment of *P. heterophylla*

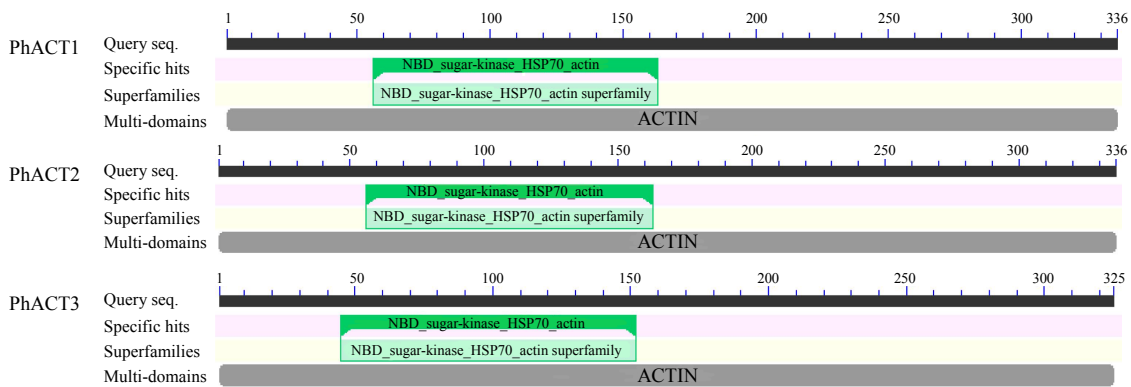


图 6 太子参 Actin 保守区结构域

Fig. 6 Conserved domains of Actin protein from *P. heterophylla*

NJ 进化树 (图 7)。结果发现, 来源于太子参的 3 个 Actin 基因被归入 Class I 和 Class II 2 个亚群, PhACT2 (KT363848) 和 PhACT3 (KT363849) 出现在 Class I, PhACT1 (KT363847) 出现在 Class II,

说明太子参 Actin 不仅存在多个异形体, 而且发生了功能的分化。

将太子参与其他植物的 Actin 氨基酸序列片段进行多重比较, 发现 Actin 基因虽然在植物进化过

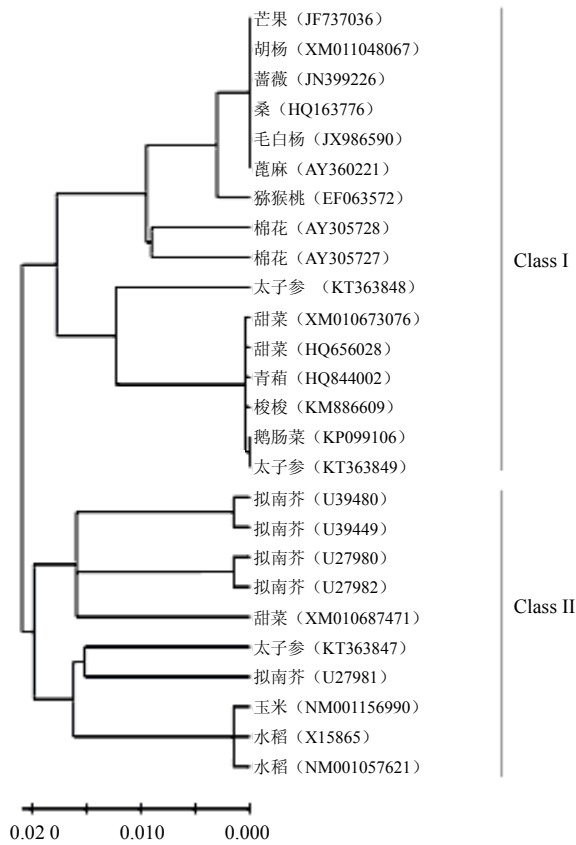


图 7 Actin 氨基酸序列 NJ 进化树分析

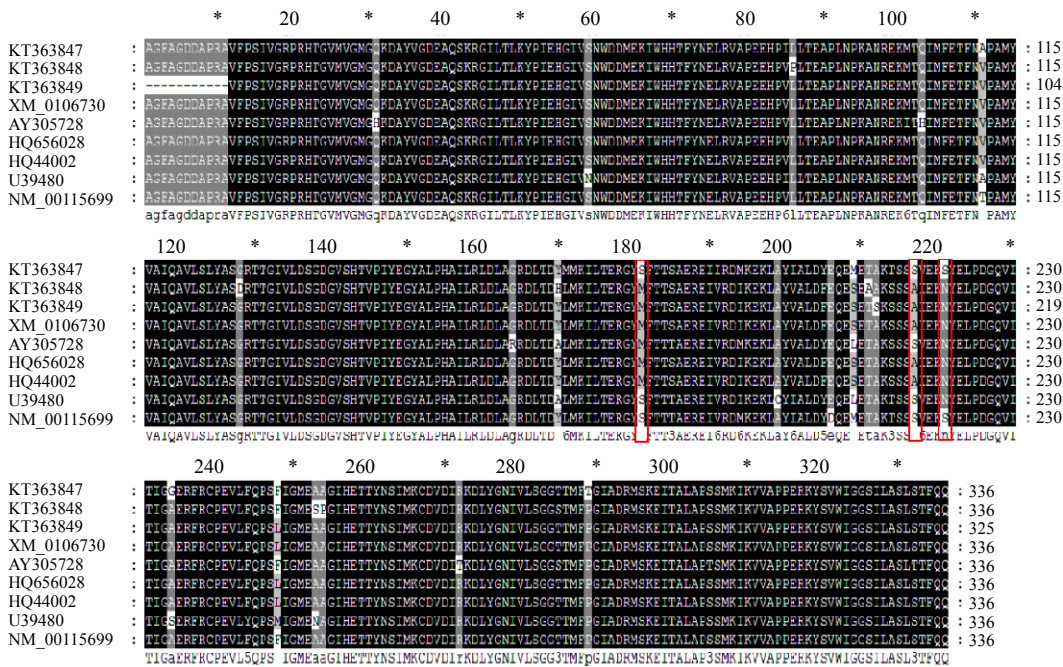
Fig. 7 Phylogenetic tree of Actin amino acid sequence

程中基因功能发生了分化,但其氨基酸序列仍表现出高度的保守性。在进行多重比较的 336 个氨基酸序列中,保守氨基酸多达 314 个,而非保守氨基酸仅有 22 个,不足 7%。已有研究^[16]发现在关键位置氨基酸的替换可能是引起植物 Actin 基因功能分化的原因,在本研究中同样的位置也出现了类似的替换,PhACT1 与同属于 Class II 的拟南芥 (U39480) 和水稻 (NM001057621) 在第 181 位由 S 取代了 M,第 217 位 S 取代 A,第 221 位 S 取代 N (U39480 为 N) (图 8),暗示这 3 个特殊位置的氨基酸突变可能与植物 Actin 基因功能分化存在一定的联系。

2.5 表达稳定性分析

通过半定量 RT-PCR 技术,分析 3 个 Actin 基因在不同种源、不同器官、不同生长发育时期的表达情况。根据 3 个 Actin 基因的核心片段设计的特异引物 Actin-1F/Actin-1R、Actin-2F/Actin-2R、Actin-3F/Actin-3R 分别对 PhACT1、PhACT2、PhACT3 基因进行特异扩增,扩增产物长度依次为 344、328 和 464 bp (图 9)。

2.5.1 种源特异性分析 分别提取不同种源太子参块根中的总 RNA,利用半定量 RT-PCR 分析 3 个 Actin 基因在太子参不同种源块根中的表达情况。研究发现,3 个 Actin 基因在不同种源块根中均有表

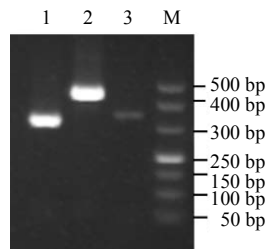


框内为特殊位置的氨基酸突变位点

Box for the special position of the amino acid mutation sites

图 8 不同物种 Actin 基因比对分析

Fig. 8 Comparison on alignment of Actin from different species



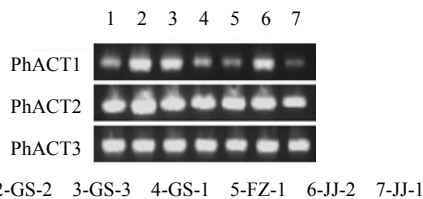
M-Marker 1-PhACT2 2-PhACT3 3-PhACT1

图 9 3 个 Actin 基因扩增片段

Fig. 9 Amplification fragments of three Actin genes

达, PhACT2 和 PhACT3 表达量高且稳定, PhACT1 在不同种源太子参块根中的表达量具有一定的差异且相对较低(图 10)。

2.5.2 组织特异性分析 分别提取 GZ-2 的花、茎、叶、块根的总 RNA, 半定量 RT-PCR 分析表明, 3 个 Actin 基因在太子参各器官中均有表达, PhACT1 在各器官中的表达量相对较低, PhACT3 的表达量相对较高, 但两者在不同器官的表达量存在一定的差异, 而 PhACT2 在各器官中的表达量高且稳定(图 11)。

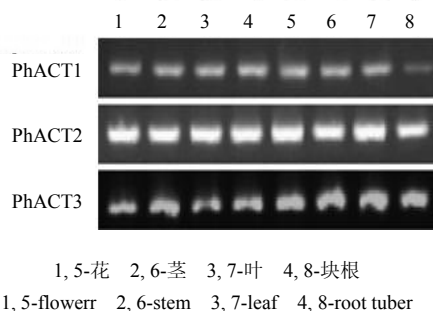


1-FZ-2 2-GS-2 3-GS-3 4-GS-1 5-FZ-1 6-JJ-2 7-JJ-1

图 10 3 个 Actin 基因在不同种源块根中的表达

Fig. 10 Expression levels of three Actin genes in root tuber of *P. heterophylla* from different sources

2.5.3 生长过程中表达稳定性分析 为了检测 3 个 Actin 基因在太子参生长过程中的表达情况, 以 GZ-2 为样品, 提取同一株太子参不同茎节和相应茎节上叶的总 RNA, 通过半定量 RT-PCR 分析, 结果表明, 3 个 Actin 基因在生长过程中表达相对稳定,

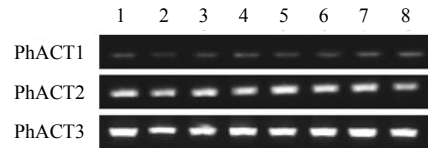


1, 5-花 2, 6-茎 3, 7-叶 4, 8-块根
1, 5-flower 2, 6-stem 3, 7-leaf 4, 8-root tuber

图 11 3 个 Actin 基因在太子参不同器官中的表达

Fig. 11 Expression levels of three Actin genes of *P. heterophylla* in different organs

除 PhACT1 表达量相对偏低外, PhACT2 和 PhACT3 均相对较高(图 12)。



1-第 1 茎节 2-第 2 茎节 3-第 3 茎节 4-第 4 茎节 5-第 1 茎节叶
6-第 2 茎节叶 7-第 3 茎节叶 8-第 4 茎节叶
1-1th stem 2-2nd stem 3-3rd stem 4-4th stem 5-1th leaf
6-2nd leaf 7-3rd leaf 8-4th leaf

图 12 3 个 Actin 在太子参生长过程中的表达

Fig. 12 Expression levels of three Actin genes during the growth of *P. heterophylla*

3 讨论

植物中的 Actin 是一条多肽链的球状蛋白, 一般由 375~377 个氨基酸组成, 相对分子质量约为 4.2×10^4 , 属于多基因家族, 从而产生多种 Actin 异型体^[17-18]。这些异型体虽然在一级结构上同源性很高, 但在时间和空间表达上具有组织和器官特异性, 执行着不同的生理功能, 以适应不同组织和细胞类型在不同发育时期的需要^[19-20]。目前研究证明 Actin 主要分为营养型和生殖型 2 类。编码营养型的 Actin 基因在所有营养器官和细胞类型中组成型表达, 而编码生殖型的 Actin 基因主要在成熟花粉、生长的花粉管或者胚珠中表达^[21-23]。因此, 在以 Actin 作为内参基因进行功能基因相对定量分析时, 需要筛选出在该植物不同器官、组织以及不同生长期均能稳定表达的组成型 Actin 基因。本研究利用 RT-PCR 和抑制 PCR 技术得到分别编码 3 种太子参 Actin 异型体的 Actin 基因的核心片段 PhACT1、PhACT2 和 PhACT3, 其编码的蛋白质保守区预测结果显示, 3 条序列均属于 Actin superfamily 家族, 且含有 2 种 Actin 基因信号序列: YVGDEAQSQRG 和 LLTEAPLNPKANR, 与 GenBank 中收录的其他植物的 Actin 基因编码的氨基酸序列相似度均达 95% 以上, 说明太子参的 Actin 基因也属于多基因家族, 编码多种 Actin 异型体, 并且基因序列具有高度的保守性。将太子参的 3 个 Actin 基因片段编码的氨基酸序列与其他植物同等大小的氨基酸序列进行进化分析, 发现明显被分为 2 类: Class I 和 Class II 2 个亚群, 该研究与前人研究结果一致^[16,24]。3 个太子参 Actin 基因分别属于 2 类, PhACT2 和 PhACT3 属于 Class I, PhACT1 单独属于 Class II, 说明在这 3 个太子参 Actin 基因中包含

了营养型和生殖型 2 种类型的 Actin 异型体, 基因功能发生了分化, 并且 PhACT2 和 PhACT3 这 2 个基因在亲缘关系及功能上可能更为接近。

肌动蛋白虽然被认为是真核生物细胞中普遍存在的最保守的古老蛋白之一, 但在自然界适应生存下其编码基因仍然存在着变异, 其中在一些关键位置的变异可能导致其产生多种异型体。通过对 3 个太子参 Actin 基因编码的氨基酸序列的同源性比较, 结果显示, 太子参存在 3 个特殊位置氨基酸的替换, 与李军等^[16]对桑树的研究结果极为相似, 这可能就是导致功能分化的关键位置。为了从 3 个太子参 Actin 基因中筛选出稳定表达基因作为内参基因, 本研究对 3 个 Actin 基因在太子参不同种源、不同器官以及在不同生长过程中的表达情况进行了分析, 结果与序列进化分析一致: PhACT1 表达量相对较低且在不同的种源、器官和生长阶段中表达存在一定的差异, 可能为生殖型肌动蛋白基因; PhACT2 和 PhACT3 表达量相对较高且表达差异相对较小, 推断其为营养型肌动蛋白基因, 在所有营养器官和细胞类型中组成型表达, 其中尤其以 PhACT2 表达量高且稳定, 可以作为太子参功能基因研究的内参基因。该基因的确定为探讨太子参药材代谢物质形成的遗传学机制以及其他功能基因的表达规律奠定了前期基础。

参考文献

- [1] 邢朝斌, 龙月红, 修乐山, 等. 刺五加肌动蛋白基因的克隆和表达稳定性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1819-1822.
- [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] Vidali L, Hepler P K. Actin and pollen tube growth [J]. *Protoplasma*, 2001, 215(1): 64-76.
- [4] Collings D A, Harper J D, Marc J. Life in the fast lane: actin-based motility of plant peroxisomes [J]. *Can J Bot*, 2002, 80(4): 430-441.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [6] 刘训红, 陈彬, 王玉玺. 太子参多糖抗应激和免疫增强作用的实验研究 [J]. 江苏中医, 2000, 21(10): 51-52.
- [7] Hiroshi M, Takashi K, Hideyuki K, et al. Pseudostellarins A-C, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla* [J]. *Tetrahedron*, 1994, 50(23): 6797-6804.
- [8] 陈传艺, 肖承鸿, 江维克, 等. 不同引种地与原产地太子参药材的品质比较 [J]. 农技服务, 2013, 30(9): 1008-1012.
- [9] 邹立思, 傅兴圣, 刘训红, 等. 太子参药材中环肽 A、B 含量分析及其动态研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(2): 175-178.
- [10] 肖承鸿, 周涛, 江维克, 等. 贵州太子参生物量与次生代谢物积累的动态变化分析 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(16): 1349-1351.
- [11] 康传志. 太子参商品规格与生态适宜区划研究 [D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2015.
- [12] 林茂兹, 王海斌, 林辉锋. 太子参连作对根际土壤微生物的影响 [J]. 生态学杂志, 2012, 31(1): 106-111.
- [13] 肖承鸿, 周涛, 江维克, 等. 贵州栽培太子参主要农艺性状比较及相互关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 812-816.
- [14] 肖承鸿, 周涛, 江维克, 等. 栽培太子参的遗传多样性与质量分析 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1319-1325.
- [15] Jiang Z B, Wang H P, Ma Y S, et al. Characterization of two novel lipase genes isolated directly from environmental sample [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2006, 70(3): 327-332.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Meagher R B, McKinney E C, Kandasamy M K. Isovariant dynamics expands and buffers the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(6): 995-1005.
- [19] Jiang Y Q, Zhao W L. Expression and phylogenetic analysis of pea actin isoforms [J]. *J Integr Plant Biol*, 2002, 44(12): 1456-1461.
- [20] Kandasamy M K, Gilliland L U, McKinney E C, et al. One plant Actin isovariant, ACT7, is induced by auxin and required for normal callus formation [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(7): 1541-1554.
- [21] Kandasamy M K, McKinney E C, Meagher R B. Functional nonequivalency of Actin isovariants in *Arabidopsis* [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 251-261.
- [22] Kandasamy M K, Burgos-Rivera B, McKinney E C, et al. class-specific interaction of profilin and ADF isovariants with Actin in the regulation of plant development [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(10): 3111-3126.
- [23] McDowell J M, Huang S, McKinney E C, et al. Structure and evolution of the Actin gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 1996, 142(2): 587-602.
- [24] Jiang Z B, Wang H P, Ma Y S, et al. Characterization of two novel lipase genes isolated directly from environmental sample [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2006, 70(3): 327-332.