

柠条锦鸡儿肌动蛋白基因的克隆和表达稳定性分析

王学敏, 王美珍, 王赞, 高洪文*

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

摘要: 以几种豆科植物中肌动蛋白的氨基酸保守序列设计简并引物, 采用 RT-PCR 结合 RACE 扩增技术, 从柠条锦鸡儿叶片中克隆到一个编码肌动蛋白的基因, 命名为 *CkACT*。该基因 cDNA 全长为 1 655 bp, 开放阅读框 1 134 bp, 编码 377 个氨基酸。氨基酸比对分析表明, 该基因编码的氨基酸与其他植物肌动蛋白基因具有较高的同源性。不同组织中的表达基本上一致, 不同发育时期的基因表达相似, 低温、NaCl、干旱和 ABA 处理后的表达强度没有明显差异, 说明 *CkACT* 基因表达稳定。

关键词: 肌动蛋白; 柠条锦鸡儿; 克隆; 表达稳定性

Clone and Expression Stability Analysis of Actin Gene in *Caragana korshinskii*

WANG Xue-Min, WANG Mei-Zhen, WANG Zan, GAO Hong-Wen*

Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100193, China

Abstract: An actin gene, *CkACT*, was cloned from the leaves of *Caragana korshinskii* by using RT-PCR and RACE with degenerate primers which were synthesized based on the high homologous region among the sequences of several leguminous *ACT* genes. The full-length cDNA of *CkACT* was 1 655 bp and contained a 1 134-bp open reading frame encoding a 377-amino acid protein. The deduced amino acid sequence of *CkACT* protein shared high identity with other ACTINs via multiple alignment. *CkACT* expressed constitutively in all tested organs, including root, shoot and leaf. There was no significant difference in mRNA expression in different development stage or under cold, NaCl, drought and ABA treatment. These results indicated that the expression of *CkACT* is stable.

Key words: actin; *Caragana korshinskii*; cloning; expression stability

古老的肌动蛋白(actin, ACT)普遍存在于维管植物细胞中, 在真核细胞进化过程中高度保守, 各种生物肌动蛋白的氨基酸序列同源性高达 70%~100%。在高等植物体内肌动蛋白主要参与细胞质流动、细胞器运动、顶端生长、植物细胞形状控制、植物细胞的有丝分裂、植物对重力的感应性和叶绿体运动等(Staiger和Chilwa 1987; 陈颖等2003; Parthasarathy等1985)。自1973年Elzinga等首次测定兔肌肉肌动蛋白的氨基酸序列至今, 国际数据库中已经存有百余种生物的200多个肌动蛋白核苷酸序列和氨基酸序列(Ghosh等1987; Baird和Mengher 1987; Mccurdy和Willamson 1987; Nairn等1988; Villanueva等1990; 伍国强等2008)。常规的植物肌动蛋白通常由 376~377 个氨基酸残基组成, 具有高度的保守性和表达稳定性。其编码基因是目前植物基因表达分析中常用的内参之一。

已发现在一些高等植物中, 肌动蛋白是由一个多基因家族编码的, 产生多种肌动蛋白的异型体(Drouin 和 Dover 1987; Kandasamy 等 2002; Reece

等 1990; Shah 等 1982)。异型体在一级结构上的同源性很高, 但时空表达调控方式不同, 表达具有组织特异性, 因而认为它可能执行不同的功能(Kandasamy 等 2001; Jiang 和 Zhao 2002)。拟南芥 *ACT1* 和 *ACT3* 特异的在花粉中表达, 而在叶片和根中不受诱导, *ACT2* 和 *ACT8* 在所有的营养型器官中都有表达, 而 *ACT4* 和 *ACT12* 主要在花粉管伸长过程中表达(An 等 1996)。豌豆肌动蛋白分为 3 类异型体, 这些异型体在植物的各器官或组织中均有表达, 但在发育时间以及表达强度上具有明显差异(Cao 等 1994; 胡松年和阎隆飞 1999; 凌毅和赵武铃 2001; Jiang 和 Zhao 2002)。

柠条锦鸡儿为豆科锦鸡儿属植物, 主要分布在

收稿 2009-03-09 修定 2009-05-22

资助 国家“十一五”科技支撑计划(2008BADB3B01, 2006BAD01A16)和中国农业科学院基本科研业务费(Ywf-td-3)。

* 通讯作者(E-mail: gaohongwen@263.net; Tel: 010-62894560)。

内蒙古、陕西、甘肃和宁夏等地(陈墨君和贾慎修 2000)。它属于落叶大灌木,根系极为发达,具有较强的适应性和抗逆性,营养价值高,适口性好,是我国西北、华北和东北西部水土保持和固沙造林的树种之一(时永杰和常根柱 2003)。也是分布区家畜的主要饲料来源之一。是西部生态环境建设、防沙治沙、发展畜牧业的优选灌木植物之一(王赞等 2005)。有关柠条锦鸡儿分子生物学的研究甚少。克隆肌动蛋白基因,分析确定该基因的表达稳定性,对于以此基因为内参,开展柠条锦鸡儿内源基因表达以及调控特性的研究具有一定的意义。

材料与方法

植物材料为柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii* Kom.),种子采自内蒙古赤峰。

E. coli DH5 α 感受态细胞购自天根生化公司。高保真 DNA 聚合酶 Ex Taq、T4 DNA 连接酶和 pMD18-T 载体为 TaKaRa 公司产品。实验中所有的引物合成及测序工作由上海英骏公司完成。

培养皿培养时,将柠条锦鸡儿种子用氯气法表面灭菌,逐粒摆在 MS 固体培养基上,于人工智能培养箱中 25 °C 和 16 h 光照、8 h 黑暗条件下培养。

盆栽培养时,表面灭菌的种子放在吸水滤纸上萌发直至子叶刚刚突破种皮,再将露白种子播入蛭石:珍珠岩(3:1)混匀的培养基质中,温室培养,常规灌溉。

提取总 RNA 时,将植物材料在液氮中充分研磨,用 Trizol 试剂(Invitrogen, California, 美国)提取 RNA。

引物设计时,在 GenBank 中寻找与目标基因亲缘关系最近的肌动蛋白基因编码的氨基酸序列,登录 Block Maker (http://blocks.fhrc.org/blocks/make_blocks.html)进行比对,再用 Block 的结果在 CodeHop (<http://blocks.fhrc.org/blocks/codehop.html>)数据库中搜索相关引物,最后用生物软件 Oligo 6.0 进行引物筛选分析。P1: 5' CTACTGGTATTGTTCTGGATTCTGGNGAYGG 3'; P2: 5' CACTGTA-CTTCTTTTCAGGAGGAGCNACNAC 3'。

RACE 所用 GSP 引物根据 SMART RACE 试剂盒的要求,用 Oligo 6.0 软件设计。5' GSP: 5' CAC-

ATCTGTTGGAAGGTGCTGAGGG 3'; 3' GSP: 5' TGACAGGATGAGCAAGGAGATTAC 3'。

RT-PCR 扩增时, cDNA 第一链的合成按照逆转录试剂盒(Promega, Wisconsin, 美国)操作说明进行。PCR 扩增反应体系: 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 4 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ P1 1 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ P2 1 μ L, Ex Taq DNA 聚合酶(5 U \cdot μ L⁻¹) 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, 加水至 50 μ L。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶检测。

目的片段的回收和纯化按照凝胶回收试剂盒(Axygen, California, 美国)操作说明进行。将回收纯化的目的片段连入 pMD18-T (TaKaRa, 中国大连)载体中,热击转化大肠杆菌 DH5 α 感受态,涂布加有 AMP、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板,于 37 °C 下培养 12 h 后挑取白色克隆,进行 PCR 检测,检测为阳性的克隆送交基因公司测序。

根据测序获得的正确序列信息分别设计 3' GSP 和 5' GSP 引物,利用 SMART RACE cDNA Amplification 试剂盒(Clontech, 日本),根据操作说明进行 3' RACE 和 5' RACE, PCR 扩增产物回收纯化后连接入 pMD18-T 载体并进行测序,获得 3' 末端和 5' 末端序列。

分析组织特异性时,取处在花期的柠条锦鸡儿的根、茎、叶、花,与已有的柠条锦鸡儿种子分别提取总 RNA,并进行电泳(使 RNA 的浓度一致),以等量的 RNA 逆转录为 cDNA,从中取等量进行 RT-PCR,电泳结束后,取等量的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,以条带的灰度判定基因表达的强弱。

进行表达稳定性分析时,在柠条锦鸡儿不同生育期的芽期(萌发后 8 d)、幼苗期(4 周龄)和成熟期分别取样,提取 RNA,逆转录为 cDNA,用 RNA 作参照进行 RT-PCR。电泳结束后,取等量的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,以条带的灰度判定基因表达的强弱。

低温处理时,将盆栽培养 4 周的柠条锦鸡儿幼苗放在 4 °C 培养箱中冷处理 8 h,全株取样提取 RNA;盐胁迫、干旱胁迫和外源 ABA 处理时,将 4 周龄的柠条锦鸡儿幼苗小心从土中取出,过程中不损伤植物组织。将根系分别浸在 200 mmol \cdot L⁻¹

NaCl、20%PEG 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 液体培养基中处理 8 h, 全株取样, 提取 RNA。用 RNA 作参照进行 RT-PCR。电泳结束后, 取等量的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以条带的灰度判定基因表达的强弱。

目的基因的同源氨基酸序列搜索在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上进行, 多序列联配用 DNAMAN 软件运行, 测序结果拼接借助 DNASTAR 软件, 系统进化树分析用 MEGA 4.0 软件进行(薛庆中等 2009)。

实验结果

1 肌动蛋白基因的克隆和序列分析

采用基于反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)的技术获得柠条锦鸡儿肌动蛋白基因。以柠条锦鸡儿叶中总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板, 用在肌动蛋白基因家族保守区内设计的简并引物 P1 和 P2, 扩增到一个长度为 573 bp 的片段。该片段的 DNA 序列与其他植物中的 ACTs 基因高度同源。基因的全长序列以 3' 和 5' RACE-PCR 技术获得。该序列全长为 1 655 bp, 包含一个 1 134 bp 的开放阅读框(ORF), 3' 非编码区 312 bp, 5' 非编码区 209 bp, 共编码 377 个氨基酸, 蛋白分子量为 41.7 kDa。用 CLUSTALW 软件与豌豆等其他 10 种植物中同源基因的氨基酸序列进行同源保守域分析发现, 该序列与 ACTIN 家族其他成员的同源性很高(图 1), 其中同源性最高的是绿豆, 达到 98%, 最低的为大豆, 也达到了 91.3%。该基因命名为 *CkACT*, 已在 GenBank 上注册, 编号为 FJ485727。

2 *CkACT* 基因表达的组织特异性

用 Trizol 法分别提取根、茎、叶、花和种子中的 RNA, 逆转录为 cDNA 后进行半定量 RT-PCR 检测的结果显示, *CkACT* 基因在植株的各器官中都有表达, 各器官的表达量基本上一致(图 2)。

3 柠条锦鸡儿不同发育时期 *CkACT* 基因的表达

于柠条锦鸡儿的几个发育阶段(芽期、幼苗期、成熟期)分别取样, 并用半定量 RT-PCR 分析其表达差异的结果表明, *CkACT* 基因在不同发育时期均表达, 表达强度基本上一致(差异不显著)(图 3)。

4 *CkACT* 基因对外界环境变化的响应

4 周龄的柠条锦鸡儿用冷、盐、干旱和植物

激素 ABA 处理, 全株提取 RNA。RT-PCR 结果表明, *CkACT* 不受外界逆境胁迫的影响, 在各种处理条件下表达量一致(图 4)。

5 肌动蛋白家族基因的系统进化树分析

用 MEGA 软件对柠条锦鸡儿和其他植物的氨基酸序列进行聚类分析的结果表明, 柠条锦鸡儿肌动蛋白基因(*CkACT*)与豆科植物绿豆、豌豆、鹰嘴豆、茄科植物烟草以及大多数拟南芥肌动蛋白基因归为一个亚类, 而水稻、谷子和玉米等禾本科植物与菊科及锦葵科植物等归为另一亚类(图 5)。

讨 论

肌动蛋白广泛存在于高等植物的各种组织细胞中, 是细胞骨架的主要成份之一、因其具有高度的保守性和表达稳定性, 常常用作植物基因表达分析中的内参之一。但近几年的研究表明并非所有的植物肌动蛋白基因均稳定表达(Thellin 等 1999), 一些植物的肌动蛋白基因存在异构体, 其表达有明显的组织特异性(Diaz-Camino 等 2004)。理想的内参基因应该满足以下条件: (1) 高度或中度表达, 但不是太高或低表达; (2) 稳定表达于不同类型的细胞和组织中, 而且其表达量是近似的, 无显著差别; (3) 不受任何内源性或外源性因素的影响(如不受任何实验处理措施的影响)(朱芷葳和董长生 2006)。本文中用半定量 RT-PCR 技术分析不同器官、不同发育时期以及多种胁迫条件下柠条锦鸡儿肌动蛋白基因(*CkACT*)表达特点的结果表明, *CkACT* 表达并不存在明显的组织特异性, 在不同发育时期和多种外界条件影响下 *CkACT* 基因均能稳定表达, 并且表达强度适中。同源性比较分析表明, 该基因与其他肌动蛋白基因编码的氨基酸序列高度同源。说明本文克隆的肌动蛋白基因具有高度的保守性和表达稳定性, 可以用于柠条锦鸡儿基因表达分析。

肌动蛋白基因在进化上是一个保守的基因家族, Hightower 和 Meagher (1986) 认为, 植物与动物在肌动蛋白基因上的分化率大概是每 5 600~9 400 万年发生 1%。说明肌动蛋白基因的核酸代换率是很低的, 这暗示肌动蛋白基因携带很强的选择压力。本文结果也表明, *CkACT* 基因与其他同源基因的核苷酸序列的同源性非常高(资料未列出)。而且, 以柠条锦鸡儿为代表的豆科植物肌动蛋白的氨基酸在进化上与十字花科植物的距离比与禾本科

CkACT	MAEAEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
VrACT	MADAEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
PsACT	MAESEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
GmACT	MADAEDIEPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
OsACT	MADGEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
ZmACT2	MADAEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
GhACT	MADAEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
NtACT	MADGEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
PrACT	MADAEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
BpACT	MADAEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
RcACT	MADAEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHTGVMVGMGQKDAVVGDEAQSQRGILTLKYP IEHGIVSN	80
Consensus	ma edi plvcdngtgmvkagfagddapravfpsivgrprhtgvmvgmqkd yvgdeaqskrgiltlky piehgivsn	
CkACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
VrACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
PsACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
GmACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVVSEEPVVLSEAPLNPKVNRRE.SAQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	159
OsACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
ZmACT2	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
GhACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
NtACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
PrACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
BpACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
RcACT	WDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETENPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDG	160
Consensus	wddmekiwhhtfynelrv ee vl eaplnpk nre kmt qimfetf pamyvaiqavlsllyasgrttgivlsgdg	
CkACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
VrACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
PsACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
GmACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDHLMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	239
OsACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
ZmACT2	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
GhACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
NtACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDHLMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
PrACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
BpACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
RcACT	VSHVPIYEGVALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTSAEREIVRDKKELAYIALDYEQLETAKTSSAVEK	240
Consensus	vsh vpiyeg alphailrldlagrdltd lmk ltergy ftt saereivr dkkel y ald yeq e k ss k	
CkACT	SYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
VrACT	SYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
PsACT	TYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
GmACT	SYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	319
OsACT	SYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
ZmACT2	SYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
GhACT	NYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
NtACT	SYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
PrACT	SYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
BpACT	NYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
RcACT	NYELPDGQVITIGAERFRCEVLFQPSMTCGMEAPGIHETTNSIMKCDVDIRKDYGNIVLSGGSTMFPGIADRMSCKEIT	320
Consensus	elpdgqvitigaerfrce lfqps i me gihett nsim cdvirdkdygnivlsggstmf giadrmскеit	
CkACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIAKAEYDESGPSIVHRKC	376
VrACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIAKAEYDESGPSIVHRKC	376
PsACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIAKAEYDESGPSIVHRKC	376
GmACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKGEYDESGPSIVHRKC	375
OsACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKGEYDESGPSIVHRKC	376
ZmACT2	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISRAEYDESGPSIVHRKC	376
GhACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKGEYDESGPSIVHRKC	376
NtACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIAKAEYDESGPSIVHRKC	376
PrACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIAKAEYDESGPSIVHRKC	376
BpACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKGEYDESGPSIVHRKC	376
RcACT	ALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKGEYDESGPSIVHRKC	376
Consensus	alapssmk kvvapperkysvwiggsila lstfqqmwi ae yd esgp ivhrkc	

图1 CkACT氨基酸序列与其他同源序列的多序列联配

Fig.1 The multiple alignment of CkACT and other homologous amino acid sequences

Ck: 柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii*); Vr: 绿豆(*Vigna radiate*); Ps: 豌豆(*Pisum sativum*); Gm: 大豆(*Glycine max*); Os: 水稻(*Oryza sativa*); Zm: 玉米(*Zea mays*); Gh: 棉(*Gossypium hirsutum*); Nt: 烟草(*Nicotiana tabacum*); Pr: 红云杉 (*Picea rubens*); Bp: 白桦(*Betula platyphylla*); Rc: 蓖麻(*Ricinus communis*)。

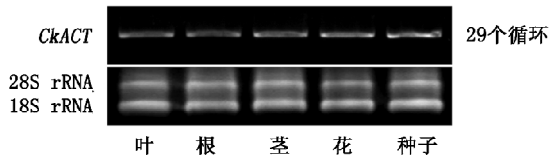


图2 柠条锦鸡儿不同器官中肌动蛋白基因的表达
Fig.2 The expression level of *CkACT* in different organs

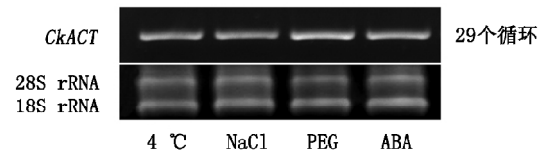


图4 不同胁迫条件下柠条锦鸡儿肌动蛋白基因的表达
Fig.4 The expression level of *CkACT* under different treatment

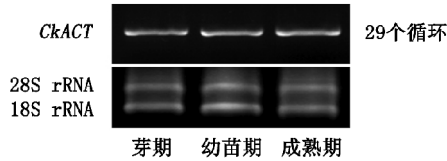


图3 不同发育时期柠条锦鸡儿肌动蛋白基因的表达
Fig.3 The expression level of *CkACT* in different developmental stage

植物的近一些, 这说明, 豆科植物的肌动蛋白基因与禾本科植物的分离在进化上可能要早于十字花科。

恶劣生存环境的长期自然选择使柠条锦鸡儿具有较强的抗逆性, 预示着丰富抗逆基因资源的存在。一般来说, 要深入研究这些基因的表达模式和

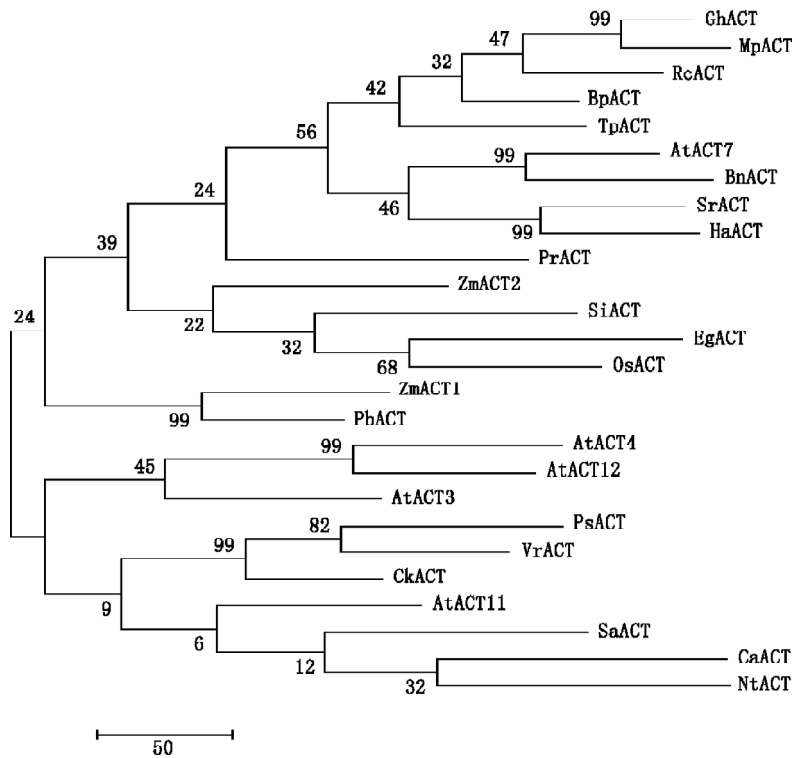


图5 柠条锦鸡儿肌动蛋白基因与其他21种植物中ACT基因的系统进化分析

Fig.5 Neighbor-joining phylogenetic tree of the complete sequence of *C. korshinskii* actin (*CkACT*) with other 21 plant ACTs

拟南芥(*Arabidopsis*, AtACT3, NM_115235; AtACT4, AY088111; AtACT7, NM_121018; AtACT11, NM_112046; AtACT12, NM_114519); 绿豆(*VrACT*, AF143208); 水稻(*OsACT*, NM_001057621); 独角金(*Striga asiatica*, SaACT, U68461); 蓖麻(*RcACT*, EQ974226); 红云杉 (*PrACT*, AF172094); 烟草(*NtACT*, EU938079); 豌豆(*PsACT*, U76190); 玉米(*ZmACT1*, NM_01156990; *ZmACT2*, NM_001153459); 鹰嘴豆(*Cicer arietinum*, CaACT, EU529707); 谷子(*Setaria italica*, SiACT, AF288226); 棉(*GhACT*, AY305732); 桂竹(*Phyllostachys bambusoides*, PbACT, EU009452); 向日葵(*Helianthus annuus*, HaACT, AF282624); 油棕(*Elaeis guineensis*, EgACT, AY550991); 圆叶锦葵(*Malva pusilla*, MpACT, AF112538); 油菜(*Brassica napus*, BnACT, AF111812); 白桦(*BpACT*, EU588981); 红三叶(*Trifolium pretense*, TpACT, AY372368); 甜菊(*Stevia rebaudiana*, SrACT, AF548026)。

调控机制, 往往需要内部参照, 由于看家基因 β -肌动蛋白(actin)的 mRNA 表达水平相对恒定, 被广泛用于定量 mRNA 表达研究中样本量的校正。本研究得到的结果为利用 RT-PCR 技术, 研究柠条锦鸡儿其他内源基因的表达模式和调控机制奠定了一定的基础。

参考文献

- 陈墨君, 贾慎修(2000). 中国饲用植物. 北京: 中国农业出版社, 458~560
- 陈颖, 王刚, 赵俊霞(2003). 高等植物中的 actin 基因. 生物学通报, 38 (1): 13~15
- 胡松年, 阎隆飞(1999). 豌豆卷须肌动蛋白 II 类异型 cDNA 克隆的序列分析. 中国生物化学与分子生物学报, 15: 857~860
- 凌毅, 赵武铃(2001). 豌豆肌动蛋白异型体基因的特异性表达. 植物学通报, 18: 76~80
- 时永杰, 常根柱(2003). 柠条. 中兽医医药杂志, S1: 163~164
- 王赞, 高洪文, 韩建国, 上官铁梁(2005). 柠条锦鸡儿不同居群形态变异研究. 西北植物学报, 25 (1): 118~123
- 伍国强, 席杰军, 包爱科, 王锁民(2008). 多浆旱生植物霸王 Actin 基因片段的克隆及序列分析. 生物技术通报, (2): 101~104
- 薛庆中, 陈辰, 陈晓龙, 程尹, 冯晔, 洪旭, 黄鹏宇, 蒋琰, 骆迎峰, 莫凡等(2009). DNA 与蛋白质序列数据分析工具. 北京: 科学出版社, 54~71
- 朱芷葳, 董常生(2006). 持家基因作为相对定量内标物的稳定性比较. 生物技术通讯, 17 (5): 807~809
- An YQ, Huang SR, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB (1996). Conserved expression of the *Arabidopsis* ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. Plant Cell, 8: 15~30
- Baird WV, Meagher RB (1987). A complex gene superfamily encodes actin in petunia. EMBO J, 6 (11): 3223~3231
- Cao XF, Wang RC, Yen LF, Lu ZB, Pan NS, Chen ZL (1994). Construction of a pea tendril cDNA library and sequence analysis of a pea actin cDNA, PEAc1. Chin Sci Bull, 39: 332~337
- Diaz-Camino C, Renaud C, Ovsenek N, Villanueva MA (2004). Actin expression is induced and three isoforms are differentially expressed during germination in *Zea mays*. J Exp Bot, 56 (412): 557~565
- Drouin G, Dover GA (1987). A plant processed pseudogene. Nature, 328: 557~558
- Elzinga M, Collins JH, Kuehl WM, Adelstein RS (1973). Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA, 70 (9): 2687~2691
- Ghosh G, Mukherjee J, Biswas S, Pal A (1987). Actin-like protein from *Mimosa pudica* L. Indian J Biochem Biophys, 24 (6): 336~339
- Hightower RC, Meagher RB (1986). The molecular evolution of actin. Genetics, 114: 315~332
- Jiang YQ, Zhao WL (2002). Expression and phylogenetic analysis of pea actin isoforms. J Integr Plant Biol, 44: 1456~1461
- Kandasamy MK, Gilliland LU, McKinney EC, Meagher RB (2001). One plant actin isovariant, ACT7, is induced by auxin and required for normal callus formation. Plant Cell, 13: 1541~1554
- Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB (2002). Functional nonequivalency of actin isovariants in *Arabidopsis*. Mol Biol Cell, 13: 251~261
- Mccurdy DW, Williamson RE (1987). An actin-related protein inside pea chloroplasts. J Cell Sci, 87: 449~456
- Nairn CJ, Winesett LL, Ferl RJ (1988). Nucleotide sequence of an actin gene from *Arabidopsis thaliana*. Gene, 65 (2): 247~257
- Parthasarathy MV, Perdue TD, Witzmun A, Alevnaz J (1985). Actin network as a normal component of the cytoskeleton in many vascular plant cells. Am J Bot, 72: 1318~1323
- Reece KS, McElroy D, Wu R (1990). Genomic nucleotide sequence of four rice (*Oryza sativa*) actin genes. Plant Mol Biol, 14: 621~624
- Shah DM, Hightower RC, Meagher RB (1982). Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. Proc Natl Acad Sci USA, 79: 1022~1026
- Staiger CJ, Chilwa MS (1987). Actin localization and function in higher plants. Protoplasma, 141: 1~12
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Couman B, Hennen G, Grisar T, Iqout A, Heinen E (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol, 75: 291~295
- Villanueva MA, Ho SC, Wang JL (1990). Isolation and characterization of one isoform of actin from cultured soybean cells. Arch Biochem Biophys, 277 (1): 35~41