

## 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 的克隆和表达分析

王芳\*

泉州师范学院化学与生命科学学院, 福建泉州 362000

**摘要:** 以乌拉尔甘草根为材料, 从中提取总 RNA, 根据植物肌动蛋白的 5' 和 3' 末端设计简并引物。采用 RT-PCR 技术和 5' RACE 试剂盒, 从乌拉尔甘草根中克隆到一个肌动蛋白基因编码区全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号 GQ 404511), 长度为 1137 bp。该基因编码一个由 377 个氨基酸残基组成的蛋白质。甘草 *GuActin2* 具有肌动蛋白 (YVGDEAQs.KRG 和 WISKgEYDE) 和肌动蛋白类似物 (LLTEApLNPkaNR) 的特征信号序列。Northern blot 分析表明, *GuActin2* 在甘草的根、茎、叶组织中都有表达, 在根中, 尤其在胚根中的表达强于茎和叶中的表达。该基因属于营养型亚类。

**关键词:** 肌动蛋白; 基因表达; 基因克隆; 乌拉尔甘草

## Molecular Cloning and Expression Analysis of An Actin Gene *GuActin2* from Chinese Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

WANG Fang\*

School of Chemistry and Life Science, Quanzhou Normal College, Quanzhou, Fujian 362000, China

**Abstract:** A PCR-based homologous cloning strategy was used to identify actin genes from the roots of Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*). Sequence analysis indicated that a 1137 bp cDNA with an open reading frame encoding a 377 amino acids actin ortholog, *GuActin2*, was successfully cloned and characterized (GenBank accession No. GQ 404511). The *GuActin2* contained the actin family signature sequence (YVGDEAQs.KRG and WISKgEYDE) and actin-related proteins signature sequence (LLTEApLNPkaNR). Analysis by Northern blot showed that *GuActin2* was abundantly expressed in roots, particularly in radicles than in stems or leaves. These results suggested that *GuActin2* might be a member of the vegetative subfamily in the *actin* family.

**Key words:** actin; gene expression; gene cloning; Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*)

肌动蛋白(actin)是真核生物中普遍存在的一种古老的蛋白质, 由 375~377 个氨基酸残基组成, 分子量为 42 kDa 左右, 是构成细胞骨架的主要成分。肌动蛋白在植物的生长和发育及许多生理活动中起作用, 如胞质环流、细胞器运动和定位、细胞极性建成、细胞形状的确定、细胞分裂、细胞伸长、细胞壁的沉积、顶端生长以及细胞对诸如病原侵蚀等外界刺激的应答和雌蕊花粉的不育等 (Kost 等 1999; Nick 1999; Meagher 等 2000; Staiger 2000; Wasteney 2000)。

根据核苷酸和氨基酸序列, 高等植物肌动蛋白基因是由一个祖先进化而来。陆生植物肌动蛋白基因在进化早期形成两个古老的亚类: 营养型和生殖型, 形成多基因家族, 从而产生了多种肌动蛋白异型体 (Hightower 等 1986; Meagher 和 Williamson 1994; McDowell 等 1996; Kandasamy 等 1999)。植物肌动蛋白异型体虽然在一级结构上同源性很高, 但时空表达调控方式不同 (Meagher 等 1999a; Kumar

1997; Fyrberg 等 1998; Kandasamy 等 2002)。营养型肌动蛋白表达具有组织和器官特异性, 因而可能执行不同的功能 (Meagher 等 1999b)。多种肌动蛋白的并存, 有利于细胞对环境变化做出灵活和动态的应答 (Meagher 1991)。因此, 对于每一个肌动蛋白异型体结构与功能的研究来说都是有意义的。

乌拉尔甘草是豆科甘草属的多年生草本植物。目前, 对甘草肌动蛋白基因的研究尚未见报道。本文报道乌拉尔甘草一种肌动蛋白基因的分子克隆、结构分析和表达模式的研究结果。

收稿 2009-08-25 修定 2009-09-29

资助 福建省自然科学基金项目(2008J04011)、福建省高校服务海西建设重点项目(A101)、福建省教育厅科技计划(2007JA07151)、泉州市科技局技术与开发项目(2007N6)、泉州师范学院重点学科建设经费、泉州师范学院大学生基金(2008DA008 和 2008DA009)。

\* 通讯作者(E-mail: dwf320@163.com; Tel: 0595-22919563)。

## 材料与方法

乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)种子由内蒙古自治区通辽市农业科学研究院自野外采集并馈赠。pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO载体购自Invitrogen公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 为东北师范大学提供菌种。*EcoRI*及其缓冲液购自TaKaRa公司; T4 DNA连接酶及连接缓冲液购自BBI公司; Taq DNA聚合酶及缓冲液购自Invitrogen公司。总RNA提取试剂盒、mRNA纯化试剂盒、PCR凝胶回收试剂盒和质粒精提试剂盒均购自QIAGEN公司; cDNA合成试剂盒和RT-PCR扩增试剂盒购自Invitrogen公司; 5' RACE试剂盒购自CLONTECH公司。其它生化和分子生物学试剂均为国产分析纯。

简并引物序列为: 5'端引物P1, 5' ACCATGGCGGA(ACT)G(CAG)(AT)G(AG)(GA)GA(TA)(AG)T 3'; 3'端引物P2, 5' TTAGAAGCA(TC)TTCC(TG)-GTG(GC)AC 3'。特异性引物: 5'端引物SP1, 5' ACCATGGCGGATGGAGAAGATG 3'; 3'端引物SP2, 5' TTAGAAGCATTTCGGTGGAC 3'。由上海生物工程技术服务有限公司合成。

甘草种子消毒后, 于40 °C水中浸泡12 h, 然后于25 °C恒温培养箱中暗催芽3 d。胚根长至0.5 cm时, 移到光照培养箱中培养, 营养液为Hoagland营养液[5 mmol·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、5 mmol·L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>、2 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>、0.025 mmol·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>-EDTA], 光/暗为16 h/8 h, 光照强度为100  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 昼夜温度为24 °C/22 °C, 相对湿度为70%。培养期间无任何水分胁迫。培养7 d后提取根总RNA, 电泳检测其完整性、紫外分光光度法检测纯度后用于基因克隆。继续培养40 d后提取根、茎、叶的总RNA用于Northern blot分析。

甘草根用液氮速冻后, 采用TRIZOL法从中提取总RNA。Oligotex mRNA Mini Kit (QIAGEN)纯化mRNA后进行逆转录反应合成cDNA。参照5' RACE试剂盒说明书进行cDNA的纯化和加尾后作为RT-PCR的模板。在50  $\mu$ L的PCR反应体系中依次加入5  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液、2  $\mu$ L 50 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs、1.5  $\mu$ L 50 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> P1和100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> P2各2  $\mu$ L、0.8  $\mu$ L Taq聚合酶、2  $\mu$ L模板cDNA, 其余用ddH<sub>2</sub>O补齐。PCR反应条件为: 预变性94 °C, 5 min; 变性94 °C, 1 min;

退火45 °C, 1 min; 延伸72 °C, 1 min, 进行35个循环; 72 °C延伸, 7 min。取5  $\mu$ L PCR产物进行电泳检测。将预期大小的PCR产物凝胶回收后亚克隆到pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO载体中, 由上海生物工程技术服务有限公司测序。

甘草肌动蛋白基因cDNA序列的分析时, 首先, 用VectNTI软件包对所克隆的甘草肌动蛋白基因的3'和5'末端序列结果进行拼接, 获得全长。然后, 用DNA Strider 1.2对肌动蛋白cDNA序列、开放阅读框(open reading frame, ORF)、氨基酸编码序列、蛋白质疏水图进行分析。序列相似性及进化地位分析用ClustalX 1.8进行多序列比对, MEGA3.0建立表示亲缘关系的系统进化树。蛋白修饰位点的预测采用Prosite软件。

甘草肌动蛋白基因的mRNA在甘草不同组织部位的表达通过Northern blot进行分析。各取20  $\mu$ g的甘草胚根、叶、茎和根的总RNA进行1.2%变性琼脂糖凝胶电泳后, 将RNA转移到Hybond-N<sup>+</sup>尼龙膜上。尼龙膜在RapidHyb快速杂交液中于68 °C下预杂交1 h, 然后用<sup>32</sup>P标记的*GuActin2*的全长编码区cDNA序列片段制作的探针杂交1 h。尼龙膜用0.2 $\times$ SSC/0.1% SDS于68 °C洗15 min, 重复3次。用双层增敏屏于-80 °C下放射自显影16 h。

## 结果与讨论

### 1 甘草肌动蛋白基因*GuActin2*的分子克隆

以甘草胚根cDNA为模板进行RT-PCR, 扩增产物电泳检测, 在分子量相当于1 100 bp左右位置存在1条清晰的泳带(图1-a)。该泳带的大小与已知植物肌动蛋白Actin的大小相近, 推断其为甘草肌动蛋白Actin的序列。PCR产物凝胶回收后克隆到pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO载体中, 质粒经载体上多克隆位点*EcoRI*单酶切鉴定, 电泳结果显示, 2和3泳道有2条泳带(图1-b), 分别长3 900 bp和300 bp左右, 2条带大小再加300 bp左右的总和与质粒预期大小接近, 预示可能在基因编码区cDNA中存在2个*EcoRI*酶切位点。用M13 Forward引物和M13 Reverse引物分别对质粒测序后, 将2个cDNA片段用Vector NTI Suite 6.0进行拼接, 有一个完整的ORF, 表明得到Actin基因的完整编码区cDNA序列。根据所拼接序列重新设计特异性引物用以扩增所克隆基因全长编码区cDNA序列。RT-PCR和

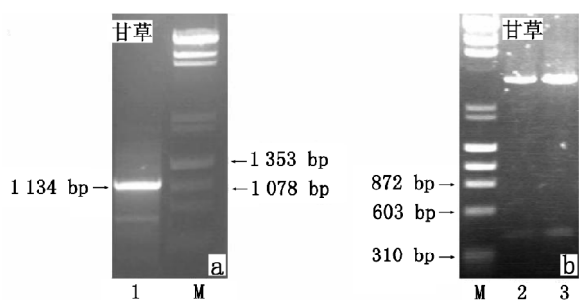


图1 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 全长编码区 cDNA 的克隆

Fig.1 Molecular cloning of an actin gene cDNA from *G. uralensis*

a: PCR 产物凝胶电泳图谱; b: 质粒酶切鉴定凝胶电泳图谱。

M:  $\lambda$ -HindIII+ $\phi$ X174-HaeIII DNA 分子量标准; 1: PCR 产物; 2 和 3: 质粒经 *EcoRI* 酶切鉴定。

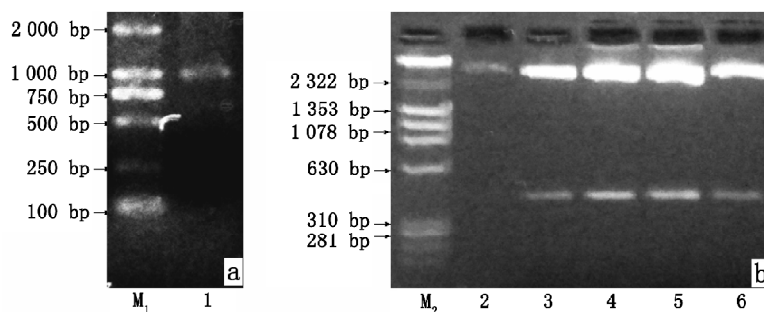


图2 用特异性引物对甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 全长编码区 cDNA 的克隆

Fig.2 Molecular cloning of an actin gene cDNA from *G. uralensis* with special primer

a: PCR 产物凝胶电泳图; b: 质粒酶切鉴定凝胶电泳图。M<sub>1</sub>: DL2000DNA 分子量标准; M<sub>2</sub>:  $\lambda$ -HindIII+ $\phi$ X174-HaeIII DNA 分子量标准; 1: PCR 产物; 2~6: 质粒经 *EcoRI* 酶切鉴定。

*Actin* 家族典型的结构域(图 3-d)。采用 ClustalX1.8 程序分析多序列相似性的结果(图 3-c 和图 4)显示, 所得序列与 GenBank 中注册的 *Actin* 基因序列的相似性均在 85% 以上。其中与蓖麻的核苷酸序列的相似性为 94%, 与杨树的相似性为 92%, 与亮叶桦的相似性为 89%, 与番茄、白桦、葡萄的相似性均为 88%。用 CLUSTALW 聚类分析后, 采用相邻连接法绘制进化树(图 3-c)的结果显示, *GuActin2* 与番茄的 *Actin* 属同一种进化分支。

通过 DNA Strider 1.2 软件对甘草 *GuActin2* 的氨基酸进行疏水性分析的结果表明, 其亲水氨基酸含量很高, 具有很强的亲水性(图 3-b), 不具备明显的跨膜区。

Prosite 软件分析显示, 甘草肌动蛋白 *Actin* 序列具有肌动蛋白的特征信号序列 YVGDEAQS.KRG

质粒 *EcoRI* 单酶切鉴定的电泳结果如图 2。挑选阳性克隆再次测序的结果表明, 测得的序列与拼接的序列一致(图 3-a)。该基因全长 1 137 bp, 包含 3 bp 的 5' 非编码区、1 134 bp 的 ORF, 编码一个由 377 个氨基酸残基组成的蛋白质, 预期分子量约 42 kDa。基因编码区 cDNA 序列在 379 和 766 bp 处存在 *EcoRI* 酶切位点。该基因命名为 *GuActin2*, 其全长编码区 cDNA 序列已登录 GenBank, 登录号为 GQ 404511。

## 2 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 全长编码区 cDNA 序列的生物信息学分析

将推断的肌动蛋白 *Actin2* 基因编码的氨基酸序列在 GenBank 上进行 Blast 检索的结果表明, 其具有

(55~65)和 WISKgEYDE (358~366), 以及肌动蛋白和肌动蛋白相关蛋白的特征序列 LLTEApLNPKaNR (106~118); 同时, 存在可能的磷酸化位点: 4 个丝氨酸残基(Ser62、Ser147、Ser326、Ser340)和 3 个苏氨酸残基(Thr68、Thr196、Thr231)。其中, Ser340 可能是 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 磷酸化位点; Ser62、Ser147、Ser326 和 3 个苏氨酸残基可能是蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 磷酸化位点; 另外, 还有 2 个潜在的酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, TPYK)磷酸化位点和 4 个酪氨酸蛋白激酶 II (casein kinase II, CKII) 磷酸化位点以及糖基化(glycosylation)位点和 *N*-豆蔻酰化(*N*-myristoylation)位点。这表明, *GuActin2* 在蛋白水平上可能存在复杂的修饰和调控作用。

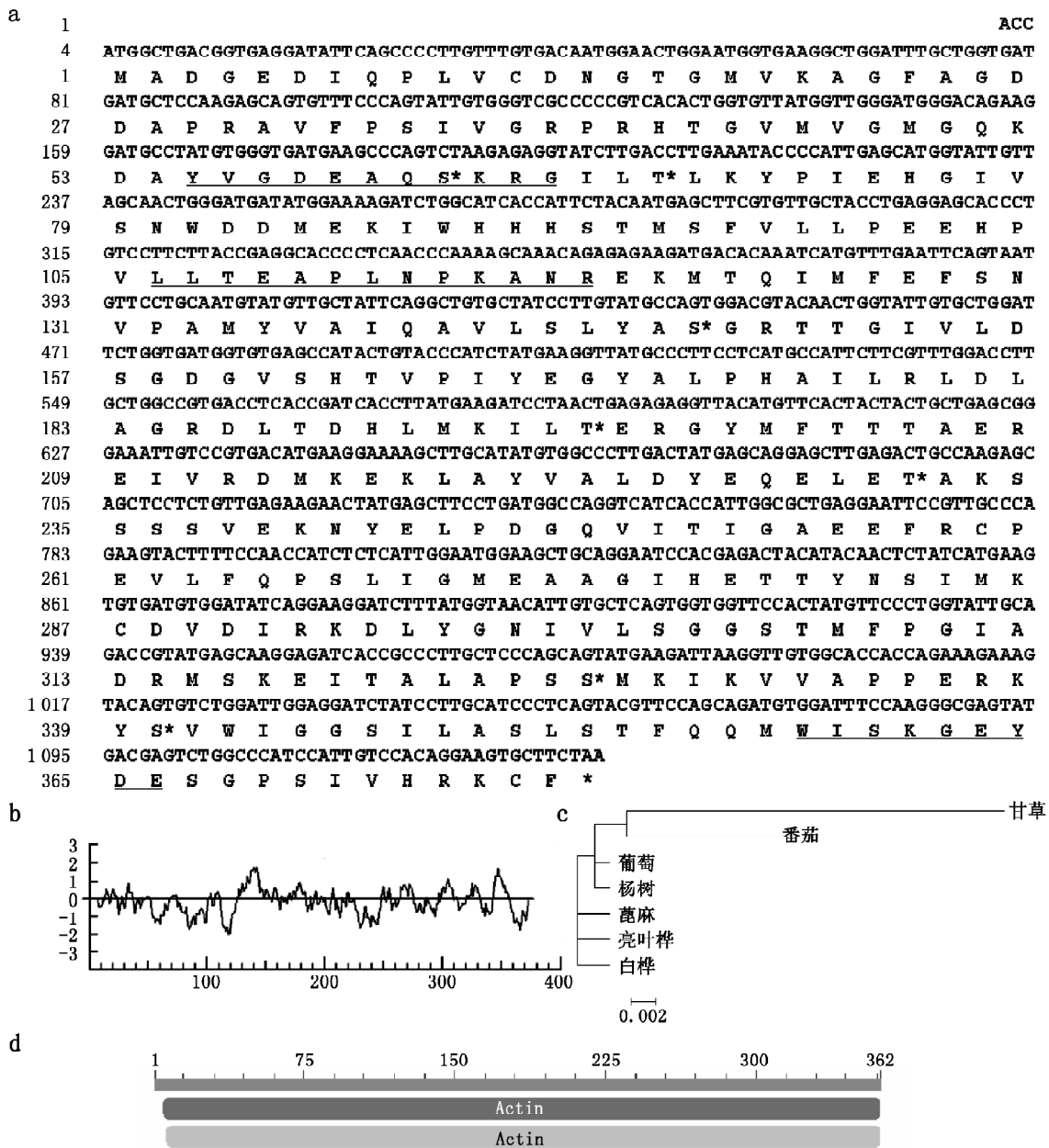


图3 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 全长编码区 cDNA 序列的生物信息学分析

Fig.3 Bioinformatic analysis of actin gene cDNA from *G. uralensis*

a: *GuActin2* 基因的完整编码区 cDNA 序列和推断的氨基酸序列(GenBank 登录号为 GQ 404511); b: 推断的蛋白序列疏水图; c: 推断的蛋白序列进化树分析; d: 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 推断的蛋白序列保守结构域。

### 3 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 在甘草不同组织部位的表达

Northern blot 分析 *GuActin2* 在甘草根、茎和叶中转录水平(图5)的结果表明, *GuActin2* 在甘草的根、茎、叶组织都有表达, 在根中, 尤其在胚根中的表达强于在茎和叶中的表达。

总之, 荒漠植物甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 全长编码区 cDNA 序列得到克隆。Northern blot 分

析表明, 该基因的表达模式也与拟南芥肌动蛋白基因 *Actin7* 相似, 拟南芥肌动蛋白基因 *Actin7* 属于营养型亚类(Wasteney 2000)。因此认为, 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 可能属于营养型亚类。有关 *GuActin2* 在甘草发育过程中的功能和调控模式, 我们准备将该基因用于拟南芥中正义超表达、反义或 RNA 干扰的表达抑制方法对其进行研究。

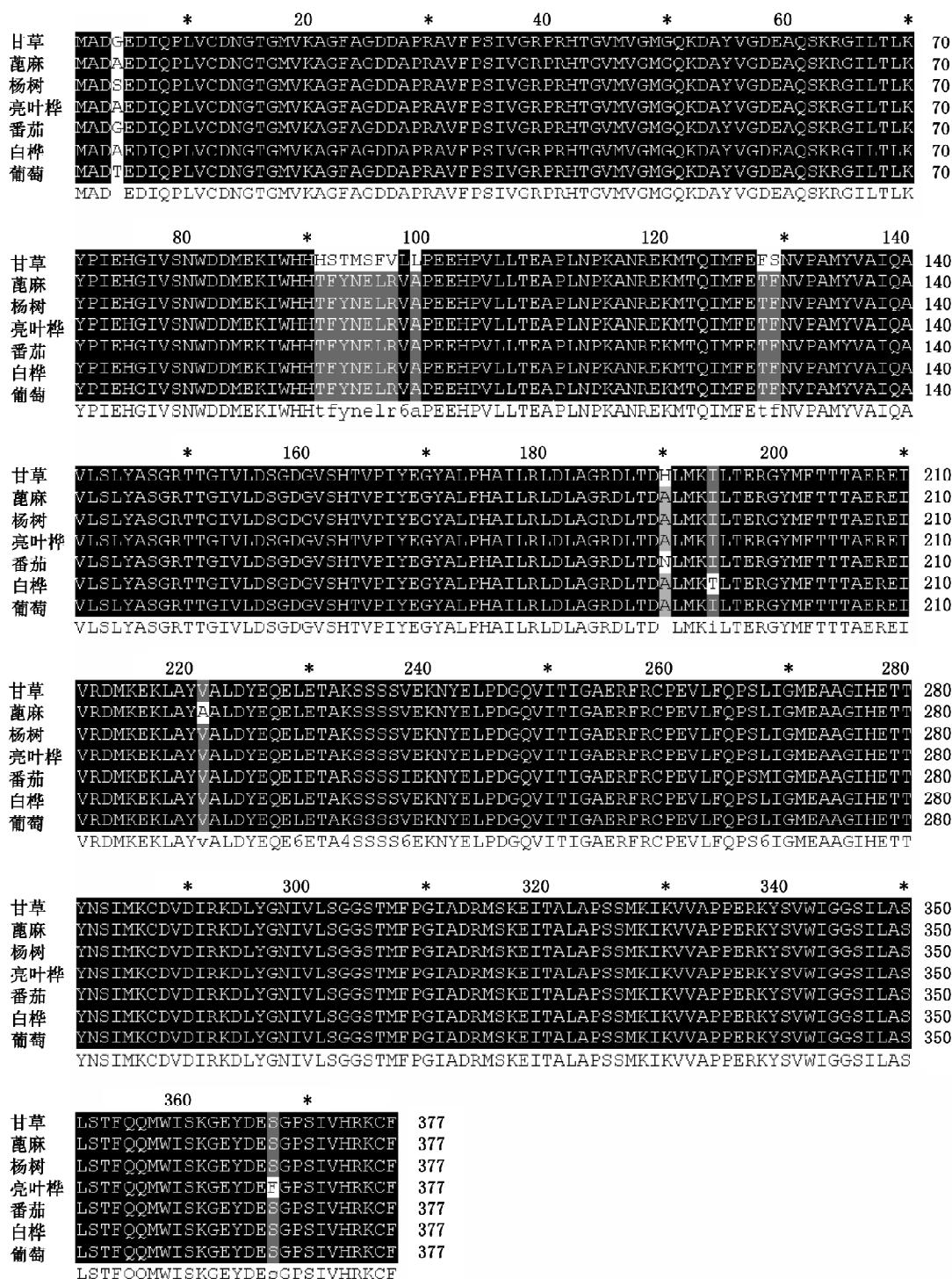


图4 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 全长编码区推断的蛋白序列同源比对分析

Fig.4 Multiple sequence analysis of *G. uralensis* derived *GuActin2* with the best scoring results from similarity searches of sequence databanks

比对序列为甘草 *GuActin2* (GenBank 登录号为 GQ 404511)、蓖麻(*Ricinus communis*, GenBank 登录号为 AY360221)、杨树 (*Ponulus hopeiensis*, GenBank 登录号为 XM002331844)、亮叶桦(*Betula luminifera*, GenBank 登录号为 FJ410442)、番茄(*Solanum lycopersicum*, GenBank 登录号为 BT013524)、白桦(*Betula platyphylla*, GenBank 登录号为 EU588981)、葡萄(*Vitis vinifera*, GenBank 登录号为 XM002282480)。黑色区域表示相对保守部分, 浅色区域表示变异部分(颜色越深表示氨基酸同源性越高)。

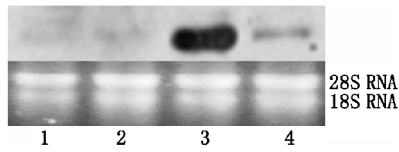


图5 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 在胚根和生长 40 d 幼苗的不同器官中的表达

Fig.5 Expression of *GuActin2* in radicals and various organs of 40-day-old *G. uralensis* seedlings

1: 叶; 2: 茎; 3: 胚根; 4: 根。

### 参考文献

- Fyrberg EA, Fyrberg CC, Biggs JR, Saville D, Beall CJ, Ketchum A (1998). Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. *Biochem Genet*, 36 (7-8): 271~287
- Hightower RC, Meagher RB (1986). The molecular evolution of actin. *Genetics*, 114 (1): 315~332
- Kandasamy MK, McKinney E, Meagher RB (1999). The late pollen-specific actins in angiosperms. *Plant J*, 18 (6): 681~691
- Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB (2002). Functional nonequivalency of actin isovariants in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell*, 13 (1): 251~261
- Kost B, Mathur J, Chau NH (1999). Cytoskeleton in plant development. *Curr Opin Plant Biol*, 2 (6): 462~470
- Kumar A, Crawford K, Close L, Madison M, Lorenz J, Doetschman T, Pawlowski S, Duffy J, Neumann J, Robbins J et al (1997). Rescue of cardiac  $\alpha$ -actin-deficient mice by enteric smooth muscle  $\gamma$ -actin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (4): 4406~4411
- Meagher RB (1991). Divergence and differential expression of actin gene families in higher plants. *Int Rev Cytol*, 125: 139~163
- Meagher RB, McKinney EC, Kandasamy MK (1999a). Isovariant dynamics expands and buffers the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family. *Plant Cell*, 11 (6): 995~1005
- Meagher RB, McKinney EC, Vitale AV (1999b). The evolution of new structures: clues from plant cytoskeletal genes. *Trends Genet*, 15 (7): 278~284
- Meagher RB, McKinney EC, Kandasamy MK (2000). The significance of diversity in the plant actin gene family. In: Staiger CJ, Baluska F, Volkmann D, Barlow P (eds). *Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 3~27
- Meagher RB, Williamson RE (1994). The plant cytoskeleton. In: Meyerowitz E, Somerville C (eds). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1049~1084
- McDowell JM, Huang S, McKinney EC, An YQ, Meagher RB (1996). Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 142 (2): 587~602
- Nick P (1999). Signals, motors, morphogenesis—the cytoskeleton in plant development. *Plant Biol*, 1 (2): 169~179
- Staiger CJ (2000). Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51 (6): 257~288
- Wasteneys GO (2000). The cytoskeleton and growth polarity. *Curr Opin Plant Biol*, 3 (6): 503~511