

全雌性黄瓜中 3 个肌动蛋白基因片段的克隆和表达分析

徐纪明 向太和*

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要 通过 1 次 PCR 扩增从全雌性黄瓜中同时获得了长度分别为 1 186 bp、955 bp 和 870 bp 的 3 个肌动蛋白基因片段 *Act1*、*Act2* 和 *Act3* (GenBank 登记号: DQ115881、DQ115882 和 DQ115883)。序列分析表明, 3 个肌动蛋白基因片段与 GenBank 中收录的肌动蛋白基因序列高度同源, 与 GenBank 中收录的全长肌动蛋白基因(如 AF386514.1、AF059484.1 和 AB010922.1 等)的第 2、第 3 个外显子和第 2 个内含子相对应。*Act1* 中 1~580 bp、984~1 186 bp, *Act2* 中 1~580 bp、753~955 bp, *Act3* 中 1~580 bp、668~870 bp 为外显子编码区, 其余为内含子序列, 3 个基因内含子的两端序列均符合典型的“GT-AG”规则。RT-PCR 分析表明, *Act1* 仅在根中表达, *Act2* 在根和雌花中表达, 而 *Act3* 在所有检测的器官(包括根、茎、叶、卷须、雌花和幼果)中都表达, 提示黄瓜根的生长发育需要多种肌动蛋白基因的参与, 而 *Act2* 和 *Act3* 可能与黄瓜雌性系的形成发育有关。

关键词 黄瓜; 肌动蛋白基因; 克隆; 表达

肌动蛋白(actin)最初是 1942 年在脊椎动物骨骼细胞中发现并命名的。1963 年, 阎隆飞等^[1]首次提出高等植物中存在肌动蛋白。迄今为止, 在高等植物的花粉、茎韧皮部、叶表皮细胞、叶鞘细胞、根毛、卷须、内果皮和茎形成层等组织中都已鉴定出肌动蛋白。植物肌动蛋白是微丝的主要组分, 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、极性建成以及信号转导等^[2]。有研究表明, 编码植物肌动蛋白的基因与动物及真菌一样, 属于多基因家族^[3]。

黄瓜是具有卷须的攀缘植物和重要的蔬菜作物, 其雌雄花性别决定形式复杂多样, 有雌雄同株异花(monoecious)、全雌株(gynoeceous)、全雄株(androdioecious)、两性株(hermaphroditic)、雄花两性花同株(andromonoecious)和雄花、雌花及两性花同株(trimonoecious)等不同的性别表现类型^[4]。其中, 全雌株只开雌花而无雄花, 类似于雄性不育。特别值得一提的是, 阎隆飞等^[5]认为肌动蛋白与雄性不育有关, 植物细胞质雄性不育系植株的花粉比其保持系花粉中的肌动蛋白含量低得多, 肌动蛋白的表达有器官特异性和发育阶段特异性。因此, 克隆黄瓜雌性系中的肌动蛋白基因, 对进一步研究植物中肌动蛋白基因的分子调控机制具有重要的意义。

本研究以黄瓜全雌性品种满田 700 为实验材料, 根据肌动蛋白基因家族的保守序列设计引物, 通过 1 次 PCR 同时克隆出了 3 个肌动蛋白基因片段, 并对其表达进行了分析。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的黄瓜品种为全雌性品种满田 700 (北京满田种子公司经销)。

1.2 DNA 的提取

黄瓜基因组 DNA 的提取参照向太和等^[6]的方法。

1.3 PCR 扩增

根据 GenBank 中拟南芥、烟草、大豆和水稻的肌动蛋白基因序列(GenBank 登记号: AP002063.2、U60489.1、U60497.1、X16280.1 和 X15865.1 等), 通过 Blastn 分析确定保守序列, 再根据保守序列用 Primer3 软件设计 1 组引物 Act-P1 和 Act-P2 用于扩增肌动蛋白基因。Act-P1: 5'-GGAGAAGATCTGGCA-TCACA-3', Act-P2: 5'-CCTCCAATCCAGACACTGTA-

收稿日期: 2007-08-02 接受日期: 2007-09-24

浙江省自然科学基金(No. Y304083), 杭州市科技创新基金(No. 20070232H07)和杭州市“131”人才基金资助项目

*通讯作者。Tel/Fax: 0571-28865327, E-mail: xthcn@163.com

3'(引物由上海 Sangon 公司合成)。PCR 扩增反应体积为 100 μ l, 其中包括 0.2 μ l 10 mmol/L dNTP 混合物(美国 Promega 公司产品, 产品号: U1151), 2 μ l 10 pmol/L PCR 引物, 5 u Taq Plus DNA 聚合酶(上海申能博彩公司产品, 产品号: E2300)和约 0.2 μ g 基因组 DNA。用美国 ABI 公司 PE9700 型 DNA 扩增仪进行扩增反应。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min 变性后, 按 94 $^{\circ}$ C 45 s、55 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 90 s 的设置进行 30 个循环, 反应结束后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min, 随后于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳 1.5 h (5 V/cm), 溴化乙锭(EtBr)染色, 用美国 Bio-Rad 凝胶成像系统观察并拍照记录。

1.4 PCR 产物的克隆和测序

PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳后, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海 Sangon 公司产品, 产品号: SK1131)提取和纯化。纯化后的 DNA 连接到测序载体 pMD18-T(日本 TaKaRa 公司产品, 产品号: D103A)。采用冻融法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 将转化后的菌液在含 50 mg/L 氨苄青霉素(Amp)和 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)及异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)的 LB 筛选平板上筛选阳性克隆。用无菌牙签挑取白色单菌落接种于含 50 mg/L Amp 的 LB 液体培养基中繁殖, 碱裂解法提取质粒, 质粒用 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切电泳鉴定。阳性克隆用 UNIQ-10 柱式质粒抽提试剂盒(上海 Sangon 公司产品, 产品号: SK1191)提取质粒 DNA 后送交上海华诺生物技术有限公司, 用 ABI377 型 DNA 测序仪测定序列。测序选用 M13 正反向通用引物测定, 最后重叠拼接成完整序列。

1.5 肌动蛋白基因的序列分析

与国际核酸数据库联网, 对测定的序列进行 Blastn 和 Blastx 分析; 利用 ORFfinder 软件分析测定序列的开放阅读框(ORF); 利用 ClustalW 软件对测定的 DNA 序列和 DNA 编码的氨基酸序列进行分析。

1.6 RNA 提取和 RT-PCR 分析

采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿抽提法提取黄瓜开花植株的茎、叶、根、卷须、雌花和开花后 15 天的幼嫩完整果实(由孤雌生殖产生)的总 RNA, 应用 RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司产品, 产品号: K1003S)进行基因的表达分析。逆转录引物为 oligo d(T)₁₈(上海 Sangon 公司产品, 产品号: B0205), 3 对 RT-PCR 引物(图 3 中划线的序列)分别根据克隆的 3 个肌动蛋白基因推测的编码区设计, 即: RTAct1-P1: 5'-

AGGACAATGTTGCCATAGAG-3' 和 RTAct1-P2: 5'-TTCTACAACGAGCTTCGAGT-3'; RTAct2-P1: 5'-CCTTAATTTTCATGCTGCTT-3' 和 RTAct2-P2: 5'-ATGTTTGAGACCTTCAATGCA-3'; RTAct3-P1: 5'-GTGCAACGACCTTAATCTTC-3' 和 RTAct3-P2: 5'-ACCCAAAGGCTAACAGAGAA-3'(引物由上海 Sangon 公司合成)。RT-PCR 扩增反应体积为 50 μ l, 其中包括 1 μ l 10 mmol/L dNTP 混合物, 2 μ l 10 pmol/L PCR 引物, 2.5 u Taq DNA 聚合酶和 1 μ l cDNA。PCR 的扩增和电泳程序同 1.3。

2 结果

2.1 PCR 扩增和 3 个肌动蛋白基因片段的克隆

引物 Act-P1 和 Act-P2 对黄瓜品种满田 700 基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 在 1 次 PCR 扩增中同时扩增出非常清晰的 3 条带, 3 条带从大到小依次命名为 *Act1*、*Act2* 和 *Act3* (图 1)。根据标准分子量估算, 其大小约为 1 200 bp、950 bp 和 850 bp。经过 3 次重复, 结果稳定一致。

将 PCR 产物纯化并连接到测序载体 pMD18-T

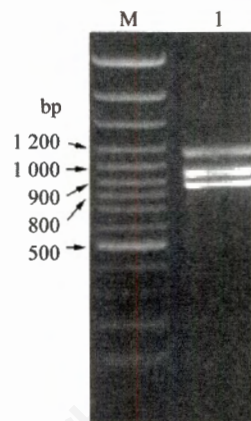


图 1 黄瓜基因组 PCR 扩增结果
M, 100 bp ladder DNA 标准分子量标记; 1, PCR 产物。

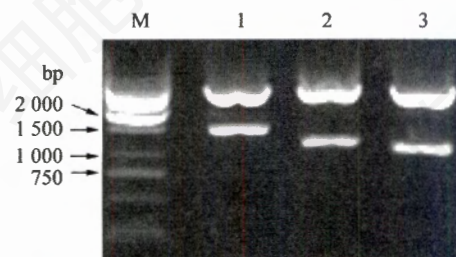


图 2 重组质粒 DNA 用 *Eco*RI 和 *Sal*I 酶切结果
M, 1 kb ladder DNA 标准分子量标记; 1, *Act1*; 2, *Act2*; 3, *Act3*。

上, 经过转化和蓝白斑筛选获得了白色单菌落克隆, 提取单克隆质粒 DNA, 经过 *EcoRI* 和 *SaII* 双酶切鉴定获得了阳性克隆(图 2)。

2.2 肌动蛋白基因的序列测定和分析

经过序列测定, *Act1*、*Act2* 和 *Act3* 长度依次为

1 186 bp、955 bp 和 870 bp, PCR 扩增所用的引物全部在两端被正确测出(图 3)。3 条序列已提交 GenBank 并被收录, 序列登记号依次为 DQ115881、DQ115882 和 DQ115883。

对测定的 3 条序列进行 Blastn 分析, 结果表明本



图 3 *Act1*、*Act2* 和 *Act3* 的 ClustalW 比较

研究克隆的序列与 GenBank 中收录的肌动蛋白基因, 如 GenBank 登记号 AF386514.1(西洋梨)、U60489.1(烟草)、U60485.1(马铃薯)、X15865.1(水稻)、AF234528.1(水稻)、AF234528.1(燕麦)、X16280.1(水稻)等高度同源, 支持本研究克隆的基因片断为肌动蛋白基因片断。

对于肌动蛋白基因的研究表明, 绝大多数肌动蛋白基因含有 4 个外显子和 3 个内含子, 而且内含子的

位置高度保守^[7]。对本研究克隆的 3 个肌动蛋白基因片断的序列进行 Blastx 以及 ORFinder 分析, 结果显示 *Act1* 中 1~580 bp、984~1 186 bp, *Act2* 中 1~580 bp、753~955 bp, *Act3* 中 1~580 bp、668~870 bp 为外显子编码区, 其余为内含子序列, 3 个基因内含子的两端序列均符合典型的“GT-AG”规则(图 3 中用方框标出, 为 GT-AG 的反向互补序列)。序列比对显示本研究克隆的 3 个肌动蛋白基因片段与 GenBank 中收



图 4 *Act1*、*Act2* 和 *Act3* 编码的氨基酸与 GenBank 中相关序列的多序列比对结果

AAA98561、AAB37098、AAA98562 和 AAB39403 为拟南芥肌动蛋白基因编码的氨基酸; CAA47899、CAA48609 和 CAA62028 为豌豆肌动蛋白基因编码的氨基酸。

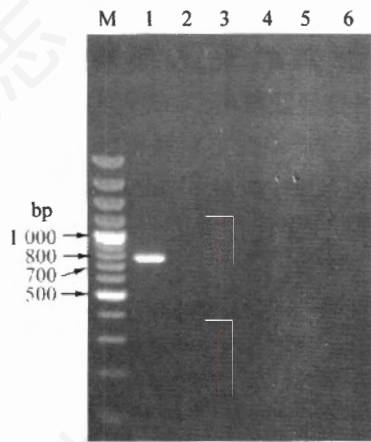


图5 *Act1* 的器官特异性表达分析

M, 100 bp ladder DNA 标准分子量标记; 1, 根; 2, 茎; 3, 叶; 4, 卷须; 5, 雌花; 6, 幼果。

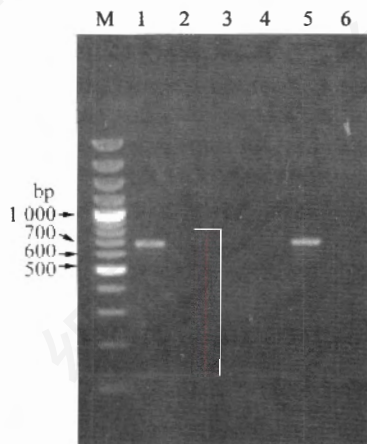


图6 *Act2* 的器官特异性表达分析

M, 100 bp ladder DNA 标准分子量标记; 1, 根; 2, 茎; 3, 叶; 4, 卷须; 5, 雌花; 6, 幼果。

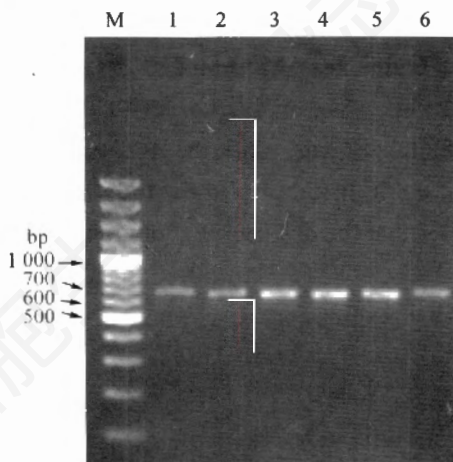


图7 *Act3* 的器官特异性表达分析

M, 100 bp ladder DNA 标准分子量标记; 1, 根; 2, 茎; 3, 叶; 4, 卷须; 5, 雌花; 6, 幼果。

录的肌动蛋白基因(如: AF386514.1、AF059484.1 和 AB010922.1 等)的第3、第2个外显子和第2个内含子相对应。

通过对3个基因编码的氨基酸序列进行分析发现,3条序列的反向互补序列都编码261个氨基酸(GenBank 登记号为: AAZ74664.1、AAZ74665.1 和 AAZ74666.1),其中 *Act1* 编码的氨基酸与 *Act2* 之间相似性98.9%,*Act1* 编码的氨基酸与 *Act3* 之间相似性是96.9%,*Act2* 编码的氨基酸与 *Act3* 之间相似性是96.2%,而与拟南芥、豌豆等植物的肌动蛋白基因编码的氨基酸序列比较,相似性在92%~98%之间,并且2个外显子连接区域的氨基酸序列高度保守(图4中用下划线标出)。

2.3 肌动蛋白基因的器官特异性表达分析

提取黄瓜植株的茎、叶、根、卷须、雌花和开花后15天的幼嫩果实总RNA,用3对引物进行RT-PCR分析。在进行RT-PCR之前,用设计的3对RT-PCR引物对黄瓜基因组DNA进行普通PCR扩增,结果每条引物都只能扩增出1条带、且大小正确;而RT-PCR扩增的条带大小比基因组扩增的条带小,即除去了内含子序列,说明引物的特异性设计符合实验要求。RT-PCR分析结果表明,*Act1* 仅在根中表达,*Act2* 在根和雌花中表达,而*Act3* 在所有检测的器官中都表达(图5、图6和图7)。

3 讨论

目前已从多种植物中克隆了肌动蛋白基因,它们都属于多基因家族,如大豆中有6个编码肌动蛋白的基因^[8]、玉米有6个^[9]、马铃薯有5个^[10]、番茄有10个^[11]、水稻有4个^[12]、拟南芥有10个^[13]。阎隆飞实验室克隆了18个豌豆卷须的肌动蛋白基因,并将它们分为3类^[14,15]。本研究通过1次PCR扩增同时获得了3个肌动蛋白基因,序列分析表明,3个肌动蛋白基因内含子与外显子拼接处序列符合典型的“GT-AG”规则。曹晓风等^[4]对几种高等植物肌动蛋白的氨基酸序列进行比较发现,在这些肌动蛋白一级结构上存在一系列不连续的、高度保守的区域,这些结构被认为是肌动蛋白与肌动蛋白、肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白相互作用的功能位点,对 *Act1*、*Act2* 和 *Act3* 编码的氨基酸序列分析发现同样存在5个这样的区域(图4中用方框标出)。3个肌动蛋白基因之间以及与GenBank中收录的其他物种的肌动蛋白基因,无论是核酸序列还是编码的氨基酸序列,都

具有高度的同源性。这进一步证明植物肌动蛋白起源于一个共同的祖先,各物种之间的肌动蛋白基因在序列(包括内含子的数目与位置、与肌动蛋白结合蛋白作用的区域等)和编码的氨基酸上具有高度的保守性。

器官特异性表达分析表明, *Act1* 仅在根中特异表达, *Act2* 在根和雌花中特异表达, 而 *Act3* 未见组织特异性, 在所有检测的器官(包括根、茎、叶、卷须、雌花和幼果)中都表达。这表明肌动蛋白基因家族不同成员之间的表达不完全相同, 具有器官和发育的特异性。有报道根的生长发育需要大量的肌动蛋白, 对拟南芥肌动蛋白基因的研究表明, 至少有 3 个肌动蛋白基因在根中表达, 参与了根毛突出位点的选择、根毛的生长和根细胞分裂等生理过程, 而且不能互相替代^[16]。本研究中克隆的 3 个肌动蛋白基因都在根中表达, 其是否也具有相同的功能值得深入研究。此外, *Act2* 和 *Act3* 都在雌花中表达, 由于本研究的实验材料是全雌性黄瓜品种, 其植株仅有雌花而无雄花, 为此, 我们对雌雄同株的黄瓜品种津研 4 号植株的雄花进行了 RT-PCR 扩增, 结果 *Act2* 和 *Act3*

也均在雄花中表达(资料未出示)。阎隆飞等^[5]报道植物细胞质雄性不育系植株的花粉比其保持系花粉中的肌动蛋白含量低得多, 本研究实验材料中的黄瓜全雌性品种相当于雄性不育系植株、雌雄同株品种相当于保持系, 因此, *Act2* 和 *Act3* 表达量的多少可能与黄瓜雌雄花的发育有关。

参考文献(References)

- [1] 阎隆飞等. 生物化学与生物物理学报, 1963, 3: 490
- [2] 张少斌等. 植物学通报, 2006, 23: 242
- [3] Hussey PJ et al. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 109
- [4] Malepszy S et al. *Plant Sci*, 1991, 80: 39
- [5] 阎隆飞等. 科学通报, 1999, 44: 2471
- [6] 向太和等. 杭州师范学院学报(自然科学版), 2005, 4: 122
- [7] 梁卫红等. 自然科学进展, 2004, 14: 646
- [8] Shah DM et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 1022
- [9] Shah DM et al. *J Mol Appl Genet*, 1983, 2: 111
- [10] Drouin G et al. *Nature*, 1987, 328: 557
- [11] Bernatzky R et al. *Theor Appl Genet*, 1986, 72: 314
- [12] Reece KS et al. *Plant Mol Biol*, 1990, 14: 621
- [13] Kandasamy MK et al. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 251
- [14] Cao XF et al. *Chin Sci Bull*, 1994, 39: 332
- [15] 胡松年等. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15: 857
- [16] Ringli C et al. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1464

Cloning and Characterization of Three Actin Genes in Gynoecious Line Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Ji-Ming Xu, Tai-He Xiang*

(College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract Three actin genes with length of 1 186 bp, 955 bp and 870 bp named as *Act1*, *Act2* and *Act3* (GenBank accession number: DQ115881, DQ115882 and DQ115883) from gynoecious cucumber line were cloned in one-step PCR reaction. The cloned genes share high similarity to the 2th exon, 3th exon and 2th intron of other actin gene in the GenBank (AF386514.1, AF059484.1 and AB010922.1 etc.). The analysis of RT-PCR revealed that *Act1* expressed in root only, the *Act2* could be detected in root and female flower, while the *Act3* expressed in all tested organs. The cloned genes enriched the actin gene family and could be employed to study molecular and physiological mechanism of actin gene. In addition, the result indicates that the origin and evolution of plant actin genes were highly homologous and conservative respectively.

Key words cucumber (*Cucumis sativus* L.); actin gene; clone; expression

Received: August 2, 2007 Accepted: September 24, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y304083), the Science and Technology Foundation of Hangzhou Government Administration (No.20070232H07), and the Science Foundation for Hangzhou "131" Talents

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-28865327, E-mail: xthcn@163.com