

国兰肌动蛋白基因片段的克隆与表达分析

田瑞雪^{1,2}, 张胜鹏^{1,2}, 张建霞¹, 吴坤林¹, 段俊¹, 曾宋君^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 根据兰科植物(Orchidaceae)蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)的肌动蛋白基因(*Actin*)序列设计跨内含子引物, 分别以cDNA第一链和基因组DNA为模板, 采用RT-PCR和PCR方法从墨兰(*Cymbidium sinense*)、春兰(*C. goeringii*)中分离出*Actin*基因的同源片段。序列分析结果表明: 墨兰和春兰*Actin*基因片段长度均为1335 bp, 其中编码区长度均为1086 bp, 编码362个氨基酸, 分别命名为*CsACT1*和*CgACT1*(GenBank登录号分别为GU181353、GU181354)。*CsACT1*和*CgACT1*均含有3个内含子, 且内含子位置非常保守。其氨基酸序列与其他植物的同源性均在90%以上, 具有高度的保守性。*CsACT1*和*CgACT1*在根、茎、叶、花梗、花蕾以及花器官中都有表达, 且表达量基本一致, 因此, 推断其为组成型表达的肌动蛋白基因。

关键词: 国兰; 肌动蛋白基因; 内含子; 克隆; 表达分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)01-0056-07

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.01.008

Cloning and Expression Analysis of *Actin* Fragments from *Cymbidium*

TIAN Rui-xue^{1,2}, ZHANG Sheng-peng^{1,2}, ZHANG Jian-xia¹,

WU Kun-lin¹, DUAN Jun¹, ZENG Song-jun^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Cross-intron primers were designed according to the nucleotide sequence of the *Actin* of *Phalaenopsis*, and *Actin* homology fragments from *Cymbidium sinense* and *C. goeringii* were obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and PCR using the first chain of cDNA and the genomic DNA as templates. The results showed that the *Actin* fragments from *C. sinense* and *C. goeringii* were 1335 bp in length with 1086 bp coding sequences, encoding a protein of 362 amino acids. They were named as *CsACT1* and *CgACT1* (GenBank accession number were GU181354 and GU181353), respectively. Both of *CsACT1* and *CgACT1* consisted of three conservative introns. The amino acid sequence shared over 90% to those of other plants in the GenBank, so that the *Actin* genes from *Cymbidium* were highly conservative. The *CsACT1* and *CgACT1* could express at similar level in root, stem, leaf, pedicel, bud and floral organ, so that *CsACT1* and *CgACT1* might be constitutive expression *Actin* genes.

Key words: *Cymbidium*; *Actin*; Introns; Cloning; Expression analysis

肌动蛋白(*Actin*)是真核生物中普遍存在的一种重要蛋白质。阎隆飞等^[1]1963年首次报道高等植物中存在肌动蛋白。迄今为止, 已相继从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[2]、水稻(*Oryza sativa*)^[3]、玉米

(*Zea mays*)^[4]、小米(*Setaria italica*)^[5]、烟草(*Nicotiana tabacum*)^[6]、大豆(*Glycine max*)^[7]和玉兰(*Magnolia denudate*)^[8]等高等植物中克隆出肌动蛋白基因。高等植物的肌动蛋白是单一多肽链的球状蛋白质, 由

收稿日期: 2010-03-15 接受日期: 2010-05-05

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2008BAC39B05); 广东省农业攻关项目(2009B020201009); 广州市科技支撑项目(2008Z1-E0111)资助

作者简介: 田瑞雪(1984~), 女, 硕士, 从事兰花基因克隆和功能验证研究, email: tianruixue1114@yahoo.cn

* 通讯作者 Corresponding author, email: zengsongjun@scib.ac.cn

375~377个氨基酸组成,分子量为42 kD左右^[9]。作为构成细胞骨架微丝系统的基本组分,肌动蛋白在植物生长和发育过程中起着重要作用,如参与细胞分裂、细胞器运动、细胞形态维持、细胞极性的建成、细胞壁沉积以及细胞伸长等生命活动^[9-12]。

高等植物的肌动蛋白是由多基因编码的^[13],拟南芥有10个肌动蛋白基因^[2],大豆至少存在6个肌动蛋白基因^[7],水稻^[3]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[14]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[15]等的肌动蛋白基因也都属于多基因家族。这些基因高度相似,由共同的祖先通过不断复制和分化遗传下来,在进化过程中保持着高度的保守性和同源性^[16]。在植物基因表达调控研究中,肌动蛋白基因作为一种管家基因常被广泛用作分子内标^[17]。

国兰又称中国兰,古代称之为兰蕙,通常是指兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium*)植物中的部分地生兰,有墨兰(*Cymbidium sinense*)、建兰(*C. ensifolium*)、春兰(*C. goeringii*)、蕙兰(*C. faberi*)、寒兰(*C. kanran*)、莲瓣兰(*C. tortisepalum*)和春剑(*C. longibracteatum*)7种。国兰为我国的传统名花,其叶形优美,花朵素雅,花香馥郁,极富雅韵之美,深受人们喜爱,具有很高的观赏价值和经济价值。国兰的研究主要集中在组织培养^[18-19]以及栽培技术等方面,近年来已开始从分子水平对国兰进行研究,但对国兰重要功能基因的研究报道还较少。肌动蛋白作为一种重要的结构蛋白,兰科植物在GenBank中仅有蝴蝶兰(*Phalaenopsis* sp.)和石斛(*Dendrobium* sp.)的登录信息,有关国兰*Actin*基因的研究尚未见报道。

本研究运用同源基因克隆方法,以墨兰、春兰为材料,分别以cDNA第一链和基因组DNA为模板,用RT-PCR和PCR方法克隆*Actin*基因片段,并进行序列和表达分析,为其它植物的肌动蛋白基因的克隆提供参考,同时也为研究其他基因在国兰中的表达与调控提供内标参照。

1 材料和方法

材料 墨兰“企剑白墨”(*C. sinense* ‘Qijian Baimo’)和春兰;*C. goeringii* (Rchb. f.) Rchb. f.)野生种栽种于中国科学院华南植物园温室。分别取根、茎、叶、芽、花梗、花蕾、花器官,用液氮冻结后,置于-70℃冰箱中保存备用。

大肠杆菌 *E. coli* JM109 为本实验室保存;

D2000 marker、pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。常规化学药品及试剂,除特别说明外,均购自 Sigma 公司或国产 AR 级试剂。PCR 扩增引物及测序均由上海英骏生物技术公司完成。

引物设计 根据 GenBank 中蝴蝶兰 *Actin* 基因序列(AF246714),用 Primer 5.0 软件设计 1 对跨内含子引物,ACT-F1: 5'-ATTCAGCCTCTTGTYTG-CGATAATG-3'; ACT-R1: 5'-GGTCCAGATTCATC-GTACTCTGCCTT-3'。

总 RNA 的提取 按照 RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent (Invitrogen)说明书进行,用紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和浓度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取方法按照 Biospin Plant Genomic DNA Extraction Kit 说明书进行,用紫外分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

***Actin* 基因片段的扩增** cDNA 第一链的合成按照 M-MLV 逆转录酶(Promega)说明书进行。PCR 扩增反应体系为:2 × *Taq* MasterMix 10 μL, cDNA 模板或者基因组 DNA 模板 1 μL,正反向引物各 1 μL,灭菌超纯水补足至 20 μL。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 2 min;然后 94℃ 30 s,50℃ 45 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 再延伸 10 min,4℃ 保存。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 产物的回收、转化、鉴定和测序 目的片段的回收和纯化按东盛生物的 DNA 凝胶回收试剂盒操作说明书进行。将回收的 PCR 产物在 16℃ 下与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 *E. coli* JM109 感受态细胞,用含有 50 mg mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基进行蓝白斑筛选培养,阳性克隆用 PCR 反应鉴定确认后,送至上海英骏生物技术公司测序。

序列的生物信息学分析 使用 NCBI 在线分析软件 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源性比较;使用 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)和 DNAMAN 软件进行多重序列比对;使用 ExPASy (<http://www.expasy.ch/>)和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白质结构分析;使用 MEGA4 软件构建进化树。

基因的表达 分别提取根、茎、叶、芽、花梗、花蕾以及花器官的总 RNA,取 2 μg 总 RNA 进行逆

转录并进行 RT-PCR 反应。取 10 μL 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果和分析

2.1 *Actin* 的克隆

取约 1 μg 总 RNA 进行逆转录反应,再以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 反应,扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在约 1.1 kb 处获得与预期一致的的特异条带(图 1A),初步确定其为 *Actin* 基因的部分 cDNA 片段;而以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,在约 1.3 kb 处扩增出特异条带(图 1B),说明 *Actin* 基因可能有内含子存在。

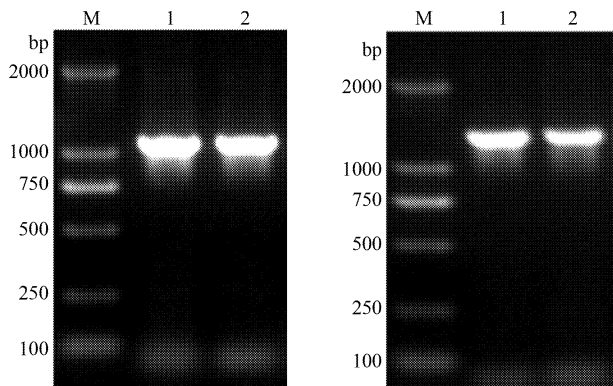


图 1 *Actin* 基因的 RT-PCR (A) 和 PCR 扩增 (B)

Fig. 1 RT-PCR (A) and PCR (B) amplification of *Actin* gene

M. D2000 marker; 1. 墨兰 *Cymbidium sinense*; 2. 春兰 *C. goeringii*

回收扩增的墨兰和春兰 *Actin* 基因的 cDNA 和 DNA 目的片段,分别连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌感受态细胞。从转化的平板上随机挑取 10 个单克隆,进行菌落 PCR 鉴定。将阳性克隆送交上海英骏生物有限公司进行测序。

2.2 序列分析

墨兰和春兰 *Actin* 基因片段的 DNA 序列均为 1335 bp,其中编码区长度 1086 bp,编码 362 个氨基酸,均含有 4 个外显子和 3 个内含子,其中 1~42 bp、120~513 bp、595~1208 bp、1298~1335 bp 为外显子编码区,其余为内含子序列,长度分别为 77、81、89 bp,内含子的两端序列均符合典型的“GT-AG”法则(图 3)。将墨兰和春兰的 *Actin* 基因片段分别命名为 *CsACT1* (*Cymbidium sinense actin1*)、*CgACT1* (*C. goeringii actin1*),并在 GenBank 注册,登录号分别为 GU181353、GU181354。

用 MEGA、DNAMAN 等软件对 *CsACT1* 和 *CgACT1* 进行比较,结果表明这两个序列非常保

守,其核苷酸序列同源性高达 99%,仅第 3 个外显子上有 1 个碱基不同,但它没有改变相应编码的氨基酸,因此由 *CsACT1* 和 *CgACT1* 推导的氨基酸序列完全一致,同源性高达 100%。此外,这两个基因的内含子序列也非常保守,其中 Intron1 完全相同,Intron2 和 Intron3 各只有 1 个碱基不同(图 2)。

PROSITE 在线分析结果表明, *CsACT1* 和 *CgACT1* 推导的氨基酸序列中存在 3 种肌动蛋白信号序列:位于 49~59 的 YVGDEAQS KR G 为 Actins signature 1 序列,位于 100~112 的 LLTEAPL NPKANR 为 Actins and actin-related proteins signature 序列,位于 352~360 的 WISKAEYDE 为 Actins signature 2 序列。此外,序列中还存在一系列与蛋白修饰调控有关的功能位点,如 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶 (cAMP- and cGMP-dependent protein kinase) 磷酸化位点,酪蛋白激酶 II (casein kinase II) 磷酸化位点,酪氨酸蛋白激酶 (Tyrosine kinase) 磷酸化位点,蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 磷酸化位点、糖基化 (glycosylation) 位点以及 N-豆蔻酰化 (N-myristoylation) 位点等。

在 NCBI 中使用 BLAST 软件对 *CsACT1* 和 *CgACT1* 推导的氨基酸序列进行同源性比较,结果表明,它们与其它植物的 *Actin* 蛋白序列的同源性均在 90% 以上,且 *CsACT1* 和 *CgACT1* 与蝴蝶兰 *PhalACT* 同源性最高,为 99%;其次为大麦的 *HvACT*、拟南芥的 *AtACT7* 以及陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 的 *GhACT*,均为 97%;与水稻的 *OsACT* 同源性最低,为 94%(图 3)。

利用 MEGA 软件将 *CsACT1* 和 *CgACT1* 推导的氨基酸序列与其他植物的进行聚类分析(图 4),结果表明, *CsACT1* 和 *CgACT1* 与蝴蝶兰 *PhalACT* 的亲缘关系最为密切,其次为禾本科的水稻 *OsACT*、玉米 *ZmACT*、小米 *SiACT* 以及大麦 *HvACT*,同处于一个分支上。从图 4 还可看出,系统分类学中同一科的植物,它们的肌动蛋白往往聚类在一起,亲缘关系非常近,禾本科的水稻和玉米,锦葵科的陆地棉与锦葵,茄科的马铃薯和烟草等,推测肌动蛋白基因的进化可能存在一定的种属特异性。而十字花科拟南芥的 2 个肌动蛋白基因分别与不同的物种聚类,这表明植物肌动蛋白基因进化的复杂性,这可能与肌动蛋白行使不同功能有关^[20]。

2.3 *CsACT1* 和 *CgACT1* 的表达

以等量的根、茎、叶、芽、花梗、花蕾以及花器官

<i>CsACT1</i>	ATTCAGCCTCTAGTTTGCGATAATGGAAGCTGGAATGGTTAAG	Gg	taagctacaacctaagt	60				
<i>CgACT1</i>	ATTCAGCCTCTAGTTTGCGATAATGGAAGCTGGAATGGTTAAG	Gg	taagctacaacctaagt	60				
Intron1								
<i>CsACT1</i>	tctagtctagaaataggactaaattgggtctgacttttgtttgtcatttttcatttgtt	ag	G	120				
<i>CgACT1</i>	tctagtctagaaataggactaaattgggtctgacttttgtttgtcatttttcatttgtt	ag	G	120				
<i>CsACT1</i>	CTGGATTTGCTGGTGATGATGCACCCAGGGCAGTGTTC	CCAAGCATTGTTGGCCGACCTC	180					
<i>CgACT1</i>	CTGGATTTGCTGGTGATGATGCACCCAGGGCAGTGTTC	CCAAGCATTGTTGGCCGACCTC	180					
<i>CsACT1</i>	GTCACACTGGTGTTCATGGTTGGCATGGGCCAGAAGGATGCTTATGTGGGAGATGAAGCTC	240						
<i>CgACT1</i>	GTCACACTGGTGTTCATGGTTGGCATGGGCCAGAAGGATGCTTATGTGGGAGATGAAGCTC	240						
<i>CsACT1</i>	AGTCTAAAAGAGGTATCCTTACCTTGAAATACCTTATTGAACATGGAATTGTGAGCAACT	300						
<i>CgACT1</i>	AGTCTAAAAGAGGTATCCTTACCTTGAAATACCTTATTGAACATGGAATTGTGAGCAACT	300						
<i>CsACT1</i>	GGGATGATATGAAAAGATTTGGCATCACACCTTCTACAATGAGCTTCGTGTTGCCCTG	360						
<i>CgACT1</i>	GGGATGATATGAAAAGATTTGGCATCACACCTTCTACAATGAGCTTCGTGTTGCCCTG	360						
<i>CsACT1</i>	AGGAGCACCTGTGCTTCTGACTGAAGCCCTCTCAATCCCAAGGCAAACAGAGAAAAGA	420						
<i>CgACT1</i>	AGGAGCACCTGTGCTTCTGACTGAAGCCCTCTCAATCCCAAGGCAAACAGAGAAAAGA	420						
<i>CsACT1</i>	TGACGCAGATCATGTTTGAGACTTTC	CAATGTACCTGCCATGTATGTTGCCATTCAAGCTG	480					
<i>CgACT1</i>	TGACGCAGATCATGTTTGAGACTTTC	CAATGTACCTGCCATGTATGTTGCCATTCAAGCTG	480					
<i>CsACT1</i>	TTCTTTCCTATATGCTAGTGGCCGCACA	ACTGgt	t	cg	catcttcatttagttattctat	540		
<i>CgACT1</i>	TTCTTTCCTATATGCTAGTGGCCGCACA	ACTGgt	t	cg	catcttcatttagttattctat	540		
Intron2								
<i>CsACT1</i>	gattgatttctcatctcttcgattagctctcccactgaaaattttgcttattttgt	ag	G	TATTG	600			
<i>CgACT1</i>	gattgatttctcatctcttcgattagctctcccactgaaaattttgcttattttgt	ag	G	TATTG	600			
<i>CsACT1</i>	TGCTGGATTTCTGGTGATGGCGTCAGT	CACACTGTCCCTATTTATGAGGGTTATGCGCTTC	660					
<i>CgACT1</i>	TGCTGGATTTCTGGTGATGGCGTCAGT	CACACTGTCCCTATTTATGAGGGTTATGCGCTTC	660					
<i>CsACT1</i>	CACATGCCATCCTTCGATTGGACCTTGCTGGCCGTGACCTCACAGATTCACTGATGAAGA	720						
<i>CgACT1</i>	CACATGCCATCCTTCGATTGGACCTTGCTGGCCGTGACCTCACAGATTCACTGATGAAGA	720						
<i>CsACT1</i>	TTCTTAC	C	GAGAGAGGATATTTCTTTCACA	ACTACTGCGGAACGGGAAATTGTTAGGGACA	780			
<i>CgACT1</i>	TTCTTAC	C	GAGAGAGGATATTTCTTTCACA	ACTACTGCGGAACGGGAAATTGTTAGGGACA	780			
<i>CsACT1</i>	TAAAGGAGAAGCTAGCCTATGTTGCTCTCGATTATGAGCAAGAGTTGGAAACCGGCAAGA	840						
<i>CgACT1</i>	TAAAGGAGAAGCTAGCCTATGTTGCTCTCGATTATGAGCAAGAGTTGGAAACCGGCAAGA	840						
<i>CsACT1</i>	GCAGCTCTTCAATAGAAAAGAGCTATGAACTCCCTGATGGTCAAATTA	TACCATCGGGG	900					
<i>CgACT1</i>	GCAGCTCTTCAATAGAAAAGAGCTATGAACTCCCTGATGGTCAAATTA	TACCATCGGGG	900					
<i>CsACT1</i>	CGGAGAGATTTAGGTGCCCGAGGTCCTTTTCCAGCCATCCCTGATTGGAATGGAATCTG	960						
<i>CgACT1</i>	CGGAGAGATTTAGGTGCCCGAGGTCCTTTTCCAGCCATCCCTGATTGGAATGGAATCTG	960						
<i>CsACT1</i>	CTGGAAATTCATGAGACCACATACA	ACTCCATCATGAAATGCGACGTTGATATCAGAAAAG	1020					
<i>CgACT1</i>	CTGGAAATTCATGAGACCACATACA	ACTCCATCATGAAATGCGACGTTGATATCAGAAAAG	1020					
<i>CsACT1</i>	ATTTGTATGGCAATATTGTTCTTAGTGGAGGCTCCACCATGTTCC	CAGGCATTGCTGATC	1080					
<i>CgACT1</i>	ATTTGTATGGCAATATTGTTCTTAGTGGAGGCTCCACCATGTTCC	CAGGCATTGCTGATC	1080					
<i>CsACT1</i>	GCATGAGCAAGGAGATATCAGCACTTGACCTAGCAGCATGAAGATTAAGGTGGTCGCTC	1140						
<i>CgACT1</i>	GCATGAGCAAGGAGATATCAGCACTTGACCTAGCAGCATGAAGATTAAGGTGGTCGCTC	1140						
<i>CsACT1</i>	CGCCTGAGAGGAAATACAGTGTCTGGATTGGAGGATCTATCCTTG	CCTCCCTCAGCACAT	1200					
<i>CgACT1</i>	CGCCTGAGAGGAAATACAGTGTCTGGATTGGAGGATCTATCCTTG	CCTCCCTCAGCACAT	1200					
Intron3								
<i>CsACT1</i>	TCCAGCAG	Gg	t	cattctctatacttactctctattccct	c	tctatatcttagttactgaa	1260	
<i>CgACT1</i>	TCCAGCAG	Gg	t	cattctctatacttactctctattccct	c	tctatatcttagttactgaa	1260	
<i>CsACT1</i>	gctttatataataactgatgctt	gt	t	cttttttgtc	ag	A	TGTGGATTTCTAAGGCAGAGTA	1320
<i>CgACT1</i>	gctttatataataactgatgctt	gt	t	cttttttgtc	ag	A	TGTGGATTTCTAAGGCAGAGTA	1320
<i>CsACT1</i>	CGATGAATCTGGACC	1335						
<i>CgACT1</i>	CGATGAATCTGGACC	1335						

图 2 *CsACT1* 和 *CgACT1* 的核苷酸序列Fig. 2 Nucleotide acid sequences of *CsACT1* and *CgACT1*

CsACT1	-----	IQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP	IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGD	EA	54
CgACT1	-----	IQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP	IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGD	EA	54
PhalACT	MADVDD	IQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP	IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGD	EA	60
HvACT	MADGED	IQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP	IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGD	EA	60
GhACT	MADAED	IQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP	IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGD	EA	60
AtACT7	MADGED	IQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP	IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGD	EA	60
AtACT3	MADGED	IQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP	IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGD	EA	60
OsACT	MADAED	IQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP	IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGD	EA	60
BnACT	MADGED	IQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP	IVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGD	EA	60
CsACT1		QSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKI	IWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK		114
CgACT1		QSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKI	IWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK		114
PhalACT		QSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKI	IWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK		120
HvACT		QSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKI	IWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK		120
GhACT		QSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKI	IWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK		120
AtACT7		QSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKI	IWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK		120
AtACT3		QSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKI	IWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK		120
OsACT		QSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKI	IWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK		120
BnACT		QSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMENI	IWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK		120
CsACT1		MTQIMFETFNV	PAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRL		174
CgACT1		MTQIMFETFNV	PAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRL		174
PhalACT		MTQIMFETFNV	PAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRL		180
HvACT		MTQIMFETFNV	PAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRL		180
GhACT		MTQIMFETFNV	PAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRL		180
AtACT7		MTQIMFETFNV	PAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRL		180
AtACT3		MTQIMFETFNA	PAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRL		180
OsACT		MTQIMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRL		180
BnACT		MTHIMFETFNV	PAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRL		180
CsACT1		DLAGRDLTDSLMKILTERGYSFTTT	TAEREIVRDIKEKLAYVALDYEQEL	LETGKSSSSIEK	234
CgACT1		DLAGRDLTDSLMKILTERGYSFTTT	TAEREIVRDIKEKLAYVALDYEQEL	LETGKSSSSIEK	234
PhalACT		DLAGRDLTDSLMKILTERGYSFTTT	TAEREIVRDIKEKLAYVALDYEQEL	LETGKSSSSIEK	240
HvACT		DLAGRDLTDSLMKILTERGYSFTTT	TAEREIVRDIKEKLAYVALDYEQEL	LETGKSSSSIEK	240
GhACT		DLAGRDLTDSLMKILTERGYMFTTT	TAEREIVRDMKEKLAYVALDYEQEL	LETGKSSSSIEK	240
AtACT7		DLAGRDLTDSLMKILTERGYMFTTT	TAEREIVRDIKEKLAYVALDYEQEL	LETGKSSSSIEK	240
AtACT3		DLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTT	TAEREIVRDIKEKLAYVALDYEQEL	LETGKSSSSIEK	240
OsACT		DLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTT	TAEREIVRDMKEKLSYALDYDQEM	ETAKTSSSVEK	240
BnACT		DLAGRDLTDSLMKILTERGYMFTTT	TAEREIVRDIKEKLAYVALDYEQEL	LETGKSSSSIEK	240
CsACT1		SYELPDGQVITIGAERFRCPEVLF	QPSLIGMESA	GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIV	294
CgACT1		SYELPDGQVITIGAERFRCPEVLF	QPSLIGMESA	GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIV	294
PhalACT		SYELPDGQVITIGAERFRCPEVLF	QPSLIGMESA	GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIV	300
HvACT		SYELPDGQVITIGAERFRCPEVLF	QPSMIGMESS	GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIV	300
GhACT		NYELPDGQVITIGAERFRCPEVLF	QPSLIGMESA	GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIV	300
AtACT7		NYELPDGQVITIGAERFRCPEVLF	QPSLIGMEAP	GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIV	300
AtACT3		NYELPDGQVITIGSERFRCPEVLY	QPSMIGMENA	GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIV	300
OsACT		SYELPDGQVITIGAERFRCPEVLF	QPSFIGMESA	GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIV	300
BnACT		NYELPDGQVITIGAERFRCPEVLF	QPSLIGMEAP	GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYGNIV	300
CsACT1		LSGGS	TMFPGIADRMSKE	ITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS	354
CgACT1		LSGGS	TMFPGIADRMSKE	ITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS	354
PhalACT		LSGGS	TMFPGIADRMSKE	ITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS	360
HvACT		LSGGT	TMFPGIADRMSKE	ITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS	360
GhACT		LSGGS	TMFPGIADRMSKE	ITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS	360
AtACT7		LSGGS	TMFPGIADRMSKE	ITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS	360
AtACT3		LSGGT	TMFPGIADRMSKE	ITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIA	360
OsACT		LSGGT	TMFPGIADRMSKE	DHCLAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIA	360
BnACT		LSGGS	TMFPGIADRMSKE	ITALAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS	360
CsACT1		KA	EYDESG	-----	362
CgACT1		KA	EYDESG	-----	362
PhalACT		KA	EYDESG	PAIVHRKCF	377
HvACT		K	EYDESG	PAIVHRKCF	377
GhACT		K	EYDESG	PSIVHRKCF	377
AtACT7		K	EYDESG	PSIVHRKCF	377

图 3 Actin 蛋白序列的多重比对

Fig. 3 Multialignment of Actin protein sequences

CsACT1: 墨兰 *Cymbidium sinense*, GUI81353; CgACT1: 春兰 *C. goeringii*, GUI81354; PhalACT: 蝴蝶兰 *Phalaenopsis hybrid*, AAF71265; OsACT: 水稻 *Oryza sativa*, CAA33874; HvACT: 大麦 *Hordeum vulgare*, AAN59956; BnACT: 油菜 *Brassica napus*, AAD03741; GhACT: 陆地棉 *Gossypium hirsutum*, AAP73457; AtACT3: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, NP_566988; AtACT7 拟南芥 *A. thaliana*, NP_196543.

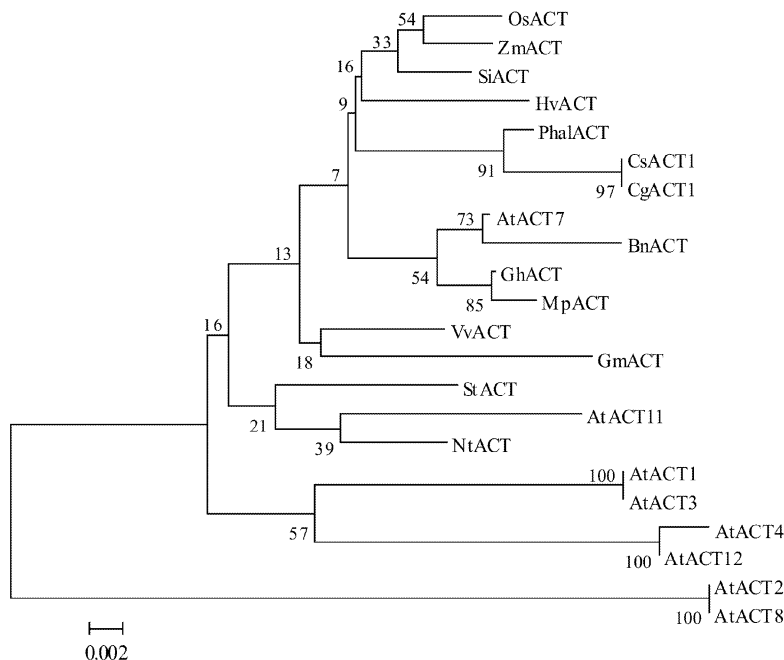


图 4 Actin 蛋白序列的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of Actin proteins

CsACT1: 墨兰 *Cymbidium sinense*, GU181353; CgACT1: 春兰 *C. goeringii*, GU181354; PhalACT: 蝴蝶兰 *Phalaenopsis hybrid*, AAF71265; OsACT: 水稻 *Oryza sativa*, CAA33874; ZmACT: 玉米 *Zea mays*, NP_001146931; SiACT: 小米 *Setaria italica*, AAG10041; HvACT: 大麦 *Hordeum vulgare*, AAN59956; BnACT: 油菜 *Brassica napus*, AAD03741; GhACT: 陆地棉 *Gossypium hirsutum*, AAP73457; MpACT: 锦葵 *Malva pusilla*, AAD41039; VvACT: 葡萄 *Vitis vinifera*, XP_002265476; GmACT: 大豆 *Glycine max*, ACU17933; StACT: 马铃薯 *Solanum tuberosum*, P30171; NtACT: 烟草 *Nicotiana tabacum*, ABI58612; AtACT1: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, NP_850284; AtACT2 (AAB37098); AtACT3 (NP_566988); AtACT4 (NP_001078769); AtACT7 (NP_196543); AtACT8 (NP_175350); AtACT11 (AAB39404); AtACT12 (NP_190236).

的 cDNA 第一链为模板进行 RT-PCR 扩增。从图 5 可见, *CsACT1* 和 *CgACT1* 在这些器官中都有表达, 而且表达量基本一致。据此推断, *CsACT1* 和 *CgACT1* 应该为组成型表达的肌动蛋白基因。

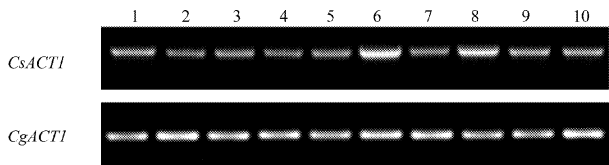


图 5 Actin 基因在不同器官中的表达

Fig. 5 Expression in different organs of Actin gene

1. 根 Root; 2. 茎 Stem; 3. 叶 Leaf; 4. 芽 Shoot; 5. 花梗 Pedicel; 6. 花蕾 Bud; 7. 萼片 Sepal; 8. 花瓣 Petal; 9. 唇瓣 Lip; 10. 柱头 Column.

3 讨论

肌动蛋白是生物体内重要的结构蛋白, 广泛存在于高等植物的各种组织细胞中, 如花粉、茎韧皮部、叶表皮细胞、叶鞘细胞、根毛、卷须等^[21], 参与许多重要的生命活动。高等植物肌动蛋白基因家族各成员的氨基酸组成和序列长度(375 ~ 377 个氨基

酸)具有高度的保守性和同源性, 而且亲缘关系越近, 其氨基酸序列的相似程度越高, 这与肌动蛋白作为细胞骨架的保守功能是相应的^[22]。本研究从墨兰、春兰中克隆到肌动蛋白基因的部分片段 *CsACT1* 和 *CgACT1*, 序列分析表明, 它们与 GenBank 收录的其他植物的肌动蛋白基因有较高的同源性, 其编码的氨基酸序列与蝴蝶兰 PhalACT 的同源性最高, 为 99%。此外, 由 *CsACT1* 和 *CgACT1* 推导的氨基酸序列在蛋白质一级结构上也相当保守, 不仅具有肌动蛋白的 3 种特征信号序列, 还存在一系列保守的磷酸化位点, 如丝氨酸 (Ser) 和苏氨酸 (Thr) 残基, 说明 Actin 在蛋白水平上可能存在着复杂的修饰和调控作用^[20]。

在基因结构上, *CsACT1* 和 *CgACT1* 都由 4 个外显子和 3 个内含子组成的, 且内含子的两端序列均符合典型的“GT-AG”法则, 属于真核生物的第二类内含子, 这类内含子的拼接位点很保守, 其 5' 拼接位点的保守序列是“AG | GURAGU”; 3' 拼接位点的保守序列是“YYYYYYYYYNCAG | G”。目前已知的许多肌动蛋白基因都含有 3 个内含子, 而

且内含子的位置非常保守,尤其是第一个内含子通常都位于第 20 个密码子处^[23-24]。*CsACT1* 和 *CgACT1* 与拟南芥、水稻、玉米、马铃薯等植物的肌动蛋白基因虽然内含子序列存在较大差异,但内含子的位置却是高度保守的,这在动物的肌动蛋白基因中是没有的^[16,24]。由此可见,肌动蛋白基因是生物进化过程中一类高度保守的基因。

高等植物的肌动蛋白是由复杂的基因家族编码的,其家族各成员的表达模式具有时间和空间上的差异^[25-26]。本研究结果表明, *CsACT1* 和 *CgACT1* 在根、茎、叶、花梗、花器官中都有表达,且表达水平基本一致,因此推断它们为组成型表达的肌动蛋白基因,可以作为墨兰和春兰基因表达调控研究中的内标参照。

参考文献

- [1] Yan L F(阎隆飞), Shi D Q(石德权). The presence of contractile protein in higher plant [J]. *Acta Biochem Biophys Sin*(生物化学与生物物理学报), 1963, 3(4): 90-96.(in Chinese)
- [2] Kandasamy M K, McKinney E C, Meagher R B. Functional non-equivalency of *Actin* isovariants in *Arabidopsis* [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 251-261.
- [3] Reece K S, McElroy D, Wu R. Genomic nucleotide sequence of four rice (*Oryza sativa*) *Actin* genes [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 14(4): 621-624.
- [4] Alexandrov N N, Brover V V, Freidin S, et al. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(1/2): 179-194.
- [5] Li Y L(李园莉), Jiang Y Q(江元清), Zhao W L(赵武玲), et al. Cloning and sequence analysis of *Actin* gene from millet (*Setaria italica*) [J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 2002, 19(3): 310-316.(in Chinese)
- [6] Yasuda H, Kanda K, Koiwa H, et al. Localization of *Actin* filaments on mitotic apparatus in tobacco BY-2 cells [J]. *Planta*, 2005, 222(1): 118-129.
- [7] Shah D M, Hightower R C, Meagher R B. Complete nucleotide sequence of a soybean *Actin* gene [J]. *Proc Nat Acad Sci (USA)*, 1992, 79: 1022-1026.
- [8] Zhou H F(周海飞), Zhao W L(赵武玲), Yan L F(阎隆飞). Cloning and sequence analysis of *Actin* gene from *Magnolia denudata* Desr. [J]. *J Agri Biotechn*(农业生物技术学报), 2001, 9(3): 274-278.(in Chinese)
- [9] Chen Y(陈颖), Wang G(王刚), Zhao J X(赵俊霞). Actin in higher plant [J]. *Bull Biol*(生物学通报), 2003, 38(1): 13-15.(in Chinese)
- [10] Vidali L, Hepler P K. Actin and pollen tube growth [J]. *Protoplasma*, 2001, 215: 64-76.
- [11] Williamson R E. Actin in motile and other processes in plant cells [J]. *Can J Bot*, 1980, 58(7): 766-772.
- [12] Collings D A, Harper J D I, Marc J, et al. Life in the fast lane: actin-based motility of plant peroxisomes [J]. *Can J Bot*, 2002, 80: 430-441.
- [13] Firtel R A. Multigene families encoding actin and tubulin [J]. *Cell*, 1981, 24: 6-7.
- [14] Bernatzky R, Tanksley S D. Genetics of actin-related sequences in tomato [J]. *TAG*, 1986, 72(3): 314-321.
- [15] Drouin G, Dover G A. A plant processed pseudogene [J]. *Nature*, 1987, 328: 557-558.
- [16] Hightower R C, Meagher R B. The molecular evolution of actin [J]. *Genetics*, 1986, 114(1): 315-332.
- [17] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits [J]. *J Biotechn*, 1999, 75: 291-295.
- [18] Zeng S J(曾宋君), Chen S J(程式君), Zhang J L(张京丽), et al. A study on tissue culture and rapid propagation of *Cymbidium sinense* and its hybrids *in vitro* [J]. *Guihaia*(广西植物), 1998, 18(2): 153-156.(in Chinese)
- [19] Tian T(田甜), Zhu Q(朱泉), He W X(何卫星), et al. Research advances in tissue culture of Chinese Orchid [J]. *Guangdong Agri Sci*(广东农业科学), 2009(8): 105-109.(in Chinese)
- [20] Li Y L(李园莉), Jiang Y Q(江元清), Zhao W L(赵武玲), et al. Cloning and evolutionary analysis of *Actin* gene from sunflower (*Helianthus annuus*) [J]. *J Agri Biotechn*(农业生物技术学报), 2002, 10(1): 67-71.(in Chinese)
- [21] Zhang S B(张少斌), Liu G Q(刘国琴). Research advances in plant *Actin* isoforms [J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 2006, 23(3): 242-248.(in Chinese)
- [22] Liang W H(梁卫红), Tang C R(唐朝荣), Wu N H(吴乃虎). Cloning and characterization of a new *Actin* gene from *Oryza sativa* [J]. *Proc Nat Sci*(自然科学进展), 2004, 14(6): 646-654.(in Chinese)
- [23] Nairn C J, Winesett L, Ferl R J. Nucleotide sequence of an *Actin* gene from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetic*, 1988, 65(2): 247-257.
- [24] Shah D M, Hightower R C, Meagher R B. Genes encoding actin in higher plants: Intron positions are highly conserved but the coding sequences are not [J]. *J Mol Appl Genet*, 1983, 2(1): 111-126.
- [25] Meagher R B, McKinney E C, Kandasamy M K. Isovariant dynamics expands and buffers the responses of complex systems: The diverse plant *Actin* family [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(6): 995-1005.
- [26] 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: 1541-1554.