

荔波连蕊茶肌动蛋白基因全长 cDNA 的克隆及其表达分析

肖 政, 李纪元*, 范正琪, 殷恒福

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要:根据植物肌动蛋白(*Actin*)基因编码区的保守序列设计引物,以山茶属植物荔波连蕊茶幼嫩茎段为材料,提取总 RNA,进行 RT-PCR。采用 RACE 技术扩增获得 1 631 bp 的 *Actin* 基因全长 cDNA 序列,命名为 *ClActin1* (GenBank 登录号 KF366912)。序列分析表明,*ClActin1* 开放阅读框(ORF)为 1 134 bp,编码 377 个氨基酸,5' 非编码区 90 bp,3' 非编码区 407 bp。预测的 *ClActin1* 蛋白分子量为 41.69 kD,理论等电点为 5.31,具有 *Actin* 超基因家族的保守结构域和肌动蛋白家族特有的特征信号序列。*ClActin1* 与 GenBank 中收录的其它植物肌动蛋白核苷酸序列的相似性在 82% 以上,氨基酸序列的相似性在 97% 以上。与其它植物肌动蛋白比较并构建系统进化树,结果显示山茶肌动蛋白与茶树和杨树的肌动蛋白的亲缘关系最为密切。实时荧光定量 PCR 结果显示,该基因在荔波连蕊茶不同组织器官及不同发育时期的表达量稳定,表明 *ClActin1* 基因可作为内参基因。

关键词:荔波连蕊茶;肌动蛋白基因;序列分析;克隆

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

Cloning and Expression Analysis of Full Length cDNA of *Actin* Gene from *Camellia lipoensis*

XIAO Zheng, LI Ji-yuan, FAN Zheng-qi, YIN Heng-fu

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: In this study, the *actin* gene was cloned from the stems of *Camellia lipoensis* using RT-PCR and RACE methods. The full length of the *actin* gene, named *ClActin1*, was 1 631 bp (GenBank accession No. KF366912), which contains a 1 134 bp open reading frame (ORF) encoding 377 amino acid residues, contains a 5'-UTR with 90 bp and 3'-UTR with 407 bp. The putative protein molecular weight is 41.69 kD and its theoretical isoelectric point is 5.31. The sequence includes *actin* superfamily domain and the characteristic *actin* family signature sequences. Homologous alignment shows that it shares over 82% of nucleotide identities and over 97% of amino acid identities with *actins* from other plants in GenBank. The phylogenetic tree constructed on the basis of amino acid sequences suggests that the relationship of *actins* from *C. lipoensis* is most intimate with that from *C. sinensis* and *Populus trichocarpa*. The results from the analysis on tissue specific expression show that the endogenous *actin* gene expression level in the root, stem, leaf and seed of *C. lipoensis* is identical. It can be served as inner control to determine the relative expression amount of target genes from *Camellia plants*.

Key words: *Camellia lipoensis*; *actin* gene; sequence analysis; cloning

收稿日期:2013-07-17

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划课题(2012BA01B0703);国家国际科技合作项目(2011DFA30490);浙江省花卉新品种选育重大科技专项(2012C12909-6);浙江省省院合作林业科技项目(2012SY02)

作者简介:肖 政(1984—),男,福建三明人,在读博士生,主要从事花卉分子育种研究

* 通讯作者:研究员,博士生导师. E-mail:jiyuan_li@126.com

植物肌动蛋白 (*Actin*) 是真核生物细胞中普遍存在的一种重要蛋白质,构成细胞骨架中的微丝系统,参与细胞分裂、细胞运动、细胞空间形状维持、物质运输等生命活动^[1]。肌动蛋白在分子水平上还参与其它重要的生理过程,如基因转录控制、信号转导、mRNA 加工和运输等^[2]。由于肌动蛋白基因表达水平受环境影响较小且在各生长阶段均持续表达,被视为真核细胞生理过程中的看家基因,在对基因的表达研究中被广泛用作分子内标^[3]。

自从 1963 年阎隆飞第一次从烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 和南瓜 (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poiret) 的叶柄维管束中提取到肌动蛋白开始^[4],目前已经有多种植物的肌动蛋白基因被发现,如毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr & Gray)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Heynh)、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[5]、棉花 (*Gossypium hirsutum* L.)^[6]、白桦 (*Betula platyphylla* Suk.)^[7]、苧麻 (*Boehmeria nivea* Gaud.)^[8]、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)^[9]、结缕草 (*Zoysia japonica* Steud.)^[10]、桑树 (*Morus alba* L.)^[11] 和角倍 (*Schlechtendalia chinensis* Bell.)^[12] 等。以植物肌动蛋白为主形成的动态微丝骨架系统已成为植物细胞生物学研究领域的热点之一^[13]。

山茶属 (*Camellia* L.) 植物不仅具有重要的经济利用价值,如茶饮、榨油、药用等,而且大多数种类具有观赏价值^[14]。荔波连蕊茶 (*C. liponesis* Chang et Xu) 属山茶科 (*Theaceae*) 山茶属,为我国特有植物,灌木至小乔木^[14],树型美,花密、具芳香,是一种优良景观树种,广泛应用于园林绿化。目前在山茶中关于 *Actin* 基因的研究还少见报道。本研究以荔波连蕊茶的幼嫩茎段为材料,采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆出肌动蛋白的 cDNA 基因全长(命名为 *ClActin1*),利用生物信息学方法对其序列进行分析,并对该基因在植株不同组织器官及器官不同发育阶段的表达特异性进行了初步研究,为下一步山茶肌动蛋白基因的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

荔波连蕊茶种植于中国林业科学研究院亚热带林业研究所山茶花种质苗圃。取当年抽生的幼嫩茎段,液氮速冻后,置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 的提取

采用北京天恩泽基因科技有限公司柱式 RNA

提取试剂盒提取总 RNA,用 Thermo scientific 公司(美国)的 NanoDrop ND-2000 超微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度和纯度,用 1.0% 的变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,将 RNA 保存于 -80 °C 冰箱备用。

1.3 *Actin* 基因 cDNA 全长的克隆

根据 GenBank 上已公布的 *Actin* 基因的 mRNA 序列信息,通过比对分析,查找 *Actin* 基因保守区,用 Primer5.0 软件设计正、反向引物 P1: CACGGTATT-GTCAGCAA-CTGGGATGAC, P2: GCGATACCGGG-GAACATAGTTGAACC,扩增获得该基因片段并测序。根据这段序列信息,设计 3'-RACE 特异引物 GSP1: TGTGCTGGATTCTGG-TGATGGTGTGA, 5'-RACE 特异引物 GSP2: GGAACAGGACT-TCAGGGCAACGGAATC。以新稍茎段的 RNA 为材料,按照 Clontech 公司(美国)的 SMART RACE 试剂盒说明书进行 3'-RACE-PCR 和 5'-RACE-PCR 反应,扩增出目的基因 3' 和 5' 端序列。PCR 产物用浓度 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析,利用 Axygen 公司(美国)的 DNA 回收试剂盒回收纯化目的条带,连接至 pGEM-T Easy 载体 4°C 过夜,转化大肠杆菌 *E. Coli* DH5 感受态细胞,挑选阳性克隆送上海华大基因测序。为保证测序的准确性,每次挑取 2 个独立克隆进行双向测序。将测序结果与初步得到 *Actin* 片段序列进行电子拼接,最终获得山茶 *Actin* 基因的 cDNA 全长序列。

1.4 *Actin* 基因序列分析

利用 NCBI 提供的 Blast 程序进行同源搜索和预测保守结构域,ORF Finder 查找 *Actin* 基因 cDNA 开放阅读框。用 ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 计算蛋白质的相对分子量,理论等电点和稳定性^[15]。用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行信号肽预测^[16];利用 HNN 软件 (http://npsa-phl.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_hnn.pl) 进行二级结构分析^[17],用 MEG4 软件构建进化树^[18]。

1.5 *Actin* 基因在植株中的荧光定量表达分析

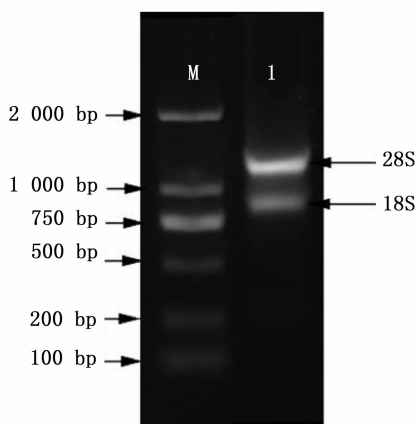
分别采集荔波连蕊茶的新稍顶端茎段、新稍顶端第 1、2 片嫩叶及成熟叶片、2 年生茎段、根和种子,用北京天恩泽基因科技有限公司柱式 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。取 1 μg 总 RNA,用 TaKaRa 公司(日本)的荧光定量反转录试剂盒获得 cDNA。根据获得的 *Actin* 基因序列,按照荧光定量引物要求,

设计一对引物 AP1: CCGTTGCCCTGAAGTCCTG 和 AP2: CACAATGTT- GCCATAGAGGTCC。反应在 ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪上进行,采用 SYBR Green I 染料法,按照 TaKaRa 公司的 SYBR Green PrimeScript RT-PCR 试剂盒说明进行实时荧光定量 PCR 反应。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 30 s,接着进行 40 个循环,每个循环采用两步法:95℃ 变性 5 s,60℃ 延伸 31 s。每个样本设 3 个平行重复试验。试验数据用 ABI7300 实时荧光定量 PCR 系统软件和 Excel 2003 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 荔波连蕊茶茎段总 RNA 提取

将提取的荔波连蕊茶茎段总 RNA 进行电泳检测,电泳显示 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰,浓度比约为 2:1(图 1),说明提取的 RNA 完整性较好,能够满足后续试验的要求。



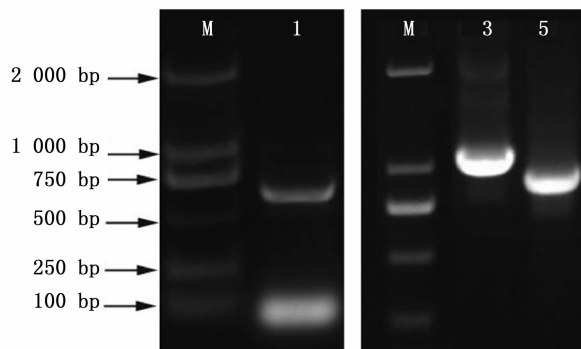
M:DNA Marker DL2000;1:RNA样品

图1 荔波连蕊茶茎段总 RNA 提取

2.2 *Actin* 基因 cDNA 全长的克隆

采用同源克隆方法,从荔波连蕊茶中得到一个长为 713 bp 目的 cDNA 片段(图 2)。根据此片段设计 RACE 特异引物 GSP1 和 GSP2,PCR 扩增得到 3' 端序列和 5' 端序列。将测序得到的中间片段,5' 端序列和 3' 端序列进行电子拼接,得到全长为 1 631 bp 的 cDNA。

用 ORF 软件对该序列进行分析,5'端(5'-UTR)有 90 bp 的非编码区,3'端(3'-UTR)有 407 bp 的非编码区,序列末端含有 poly(A) 结构,开放阅读框长 1 134 bp,编码 377 个氨基酸(图 3)。在起始密码子 ATG 上游-3 位核苷酸为 A, +4 位为 G,这一典型的 Kozak 结构对于蛋白质合成的 40S 起始复合物正确



M:DNA marker DL2 000;1: *Actin* 基因特异片段;3: 3' 端扩增序列;5: 5' 端扩增序列

图2 荔波连蕊茶 *Actin* 基因扩增电泳图

识别启动密码子具有重要的作用;在终止密码子后可见 21 bp 的 PolyA 尾。*ClActin1* 基因已在 GenBank 登录,登录号为 KF366912。

2.3 *Actin* 蛋白结构分析

ClActin1 基因通过 ProtParam 软件预测蛋白分子量为 41.69 kD,理论等电点(PI)为 5.31,酸性氨基酸残基总数(Asp + Glu)为 50,碱性氨基酸残基总数(Arg + Lys)为 38,分子式为 $C_{1852}H_{2920}N_{492}O_{559}S_{21}$,不稳定系数为 36.86,表明该蛋白为稳定蛋白。Prosite 软件分析显示,该序列具有肌动蛋白的特征信号序列 YVGDEAQS. KRG(55 ~ 65)、WISKgEYDE(358 ~ 366),及肌动蛋白和肌动蛋白类似蛋白的特征序列 LLTEAPLNPKANR(106 ~ 118)(图 3)。利用 NCBI Conserved Domain Search 进行保守域分析,发现 *ClActin1* 基因编码的蛋白属于 *Actin* 超家族。

二级结构预测结果表明,*ClActin1* 蛋白主要以无规则卷曲为主,占 46.42%;其次为 α -螺旋,占 32.10%;延伸链占 21.49%,无 β -转角分布。SignalP4.1 软件分析荔波连蕊茶 *ClActin1* 蛋白的信号肽序列,发现荔波连蕊茶 *ClActin1* 蛋白没有信号肽及其剪切位点,是非分泌型蛋白。蛋白质的功能很大程度上取决于其空间结构,其中 α -螺旋主要对蛋白质骨架起到稳定作用,而无规则卷曲结构决定了蛋白质的功能,特别是酶的功能部位常位于这种区域中。*ClActin1* 蛋白的无规则卷曲结构占了 46.42%,表明该基因在荔波连蕊茶生长发育中具有重要功能。

2.4 *Actin* 基因编码的氨基酸序列同源性及系统进化分析

利用 NCBI 网站的在线 Blast 分析 *ClActin1* 序列,结果表明,该基因与其它植物的肌动蛋白基因高

```

1      AGAGAGAGAGCTAGCCATTGATTTGGACGATCTGCGATCTTCACCCATTTTTGCTCGTCTTCTCTGTCTCCTCACTAT
79     AAGTTATAAAAAGATGGCTGATGCTGAGGATATTCAGCCCTTGTCTGTGACAATGGAAGTGAAGGCTGGG
      M A D A E D I Q P L V C D N G T G M V K A G
157    TTTGCTGGTGATGATGCTCCCAGGGCAGTTTTCCCAGCATTGTAGGTCGACCCAGGCACACTGGTGTGCATGGTTGGG
      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
235    ATGGGCCAGAAAGATGCTTATGTAGGTGATGAAGCCCAATCCAAAAGAGGTATTCTTACCTGAAGTATCCTATTGAA
      G Q K D A Y V G D E A Q S K R G I L T L K Y P I E
313    CACGGTATTGTCAGCAACTGGGATGACATGGAAAAGATCTGGCATCACACATTCTACAATGAGCTCCGTGTTGCTCCT
      H G G I V S N M D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P
391    GAAGAGCATCCAGTGCTTCTTACAGAGGCCACCATCAACCCATAAGCAAACAGAGAAAAGATGACCCAAATTATGTTT
      E E H P V L L T E A A P L N P K A N R E K M T O I M F
469    GAGACTTTTAATGTGCTGCCATGTATGTAGCCATCCAGGCTGTTCTCTCTATATGCCAGTGGTTCGTACAAGTGGT
      E T F N V P A M Y V A I O A Y L S L Y A S G R T T G
547    ATTGTGCTGGATTCTGGTGATGGTGTGAGCCACACCGTGCCTATCTATGAGGGGTATGCTCTTCCCTCATGCTATCCTC
      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
625    CGTCTTGACCTTGCTGGCCGTGATCTAACAGATGCCCTCATGAAAATCCTTACTGAAAGAGGTTACATGTTACCACC
      R L D L A G R D L T D A L M K I L T E R G Y M F T T
703    ACTGCTGAACGGAAATTGTCCGTGACATGAAGGAAAACTTGCATATGTCGCTCTTGACTACGAGCAAGAAGTGGAG
      T A E R E I V R D M K E K L A Y V A L D Y E Q E L E
781    ACTGCGAAGAGCAGCTCCTCGGTTGAAAAGAACTATGAGCTGCCTGATGGTCAGGTCATTACTATTGGTGCTGAGAGA
      T A K S S S S V E K N Y E L P D G Q V I T I G A E R
859    TTCCGTTGCCCTGAAGTCTGTTCCAGCCATCTTTGATTGGAATGGAAGCTGCAGGGATCCACGAGACTACCTACAAC
      F R C P E V L F Q P S L I G M E A A G I H E T T Y N
937    TCCATCATGAAATGTGATGTTGATATCAGGAAGGACCTCTATGGCAACATTGTGCTCAGTGGTGGTTCAACTATGTT
      S I M K C D V D I R K D L Y G N I V L S G G S T M F
1015   CCCGGTATCGCAGACCGTATGAGCAAGGAAATTAAGTCTTGTCTCCAGCAGCATGAAGATCAAGSTTGTGGCACCA
      P 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
1093   CCTGAGAGAAAAGTACAGTGTCTGGATTGGAGGATCTATCCTTGCATCCGTAAGCACCTTCCAACAGATGTGGATTCA
      P E R K Y S V W I G G S I L A S L S T F Q Q M W I S
1171   AAGGGTGAATATGATGAATCTGGTCCATCCATTGTCCACAGGAAGTGCTTTTTGAGGGTGTGCGATATTGCATTGATGAT
      K G E Y D E S G P S I V H R K C F *
1249   GGTGAGTTTTTCTTTTGCTATCTAGTTGGTTTTTTGTGTTATTTTTCATGATGTCAGTCTGGTTGACATGGAGGTGTT
1327   GAGGTGTGGTTATGAATGGAAGGCAAAATTTGATCGGGATGTATTATCTATCTCTCATTGTAAGACGATGCTGACAT
1405   GTAATGGCTTTCCTGGCCTTGCTCACATGTGGTTCAACCGTCTTTTAGTAGGATGGCTGTAGGTGGAGGAGAGTGC
1483   TTGTGGTTTTCTTTTTGTTTTTTTTGTTTTTAAATTTAATTTGAAGTTTTCTTTTTCTTTTCTTTTTTCTGGGA
1561   ACAATTATGCTAATATTTATTGTATGAAAATTTTTATATTAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

注:数字代表核苷酸的个数;下划线依次分别表示起始密码子和终止密码子。

图3 *ClActin1* 基因全长序列及预测的氨基酸序列

度同源,核苷酸相似性在 82% 以上,其中与茶树(*C. sinensis* (L.) O. Kuntze)肌动蛋白的相似性达到 98%,与葡萄(*Vitis vinifera* L.)肌动蛋白的相似性达到 91%,与毛果杨 *Actin1* 的相似性达到 88%。

将 *ClActin1* 基因编码的氨基酸序列与 NCBI 数据库的 Actin 蛋白氨基酸序列进行比对分析。不同植物的 Actin 蛋白氨基酸序列相似性很高(图 4),达到 97% 以上。选取相似性较高的 12 种植物的 Actin 蛋白氨基酸序列与 *ClActin1* 蛋白氨基酸序列进行比较分析,用相邻连接法绘制进化树。由图 5 可见,*ClActin1* 蛋白与茶树、毛果杨、黄瓜(*Cucumis sativus* L.)和葡萄的 Actin 蛋白聚为一类,其中与茶树的亲缘关系最近。通过以上生物信息学分析,初步确定实验获得荔波连蕊茶的全长肌动蛋白

基因。

2.5 *Actin* 基因在植株不同组织器官及不同发育时期的表达特性分析

采用实时荧光定量 PCR 的方法对荔波连蕊茶不同组织器官及不同发育时期 *ClActin1* 基因的表达进行了检测。从图 6 可以看出,*ClActin1* 基因在植株的各器官中均有表达,由于表达量与 C_T 值成反比例关系,其在种子中的表达量最高,在成熟叶片中表达量最低,在根、幼嫩茎段、2 年生茎段和嫩叶中表达量基本一致。据此推断,*ClActin1* 为组成型表达的肌动蛋白基因。

3 讨论

本研究从荔波连蕊茶获得的 *ClActin1* 基因具有

荔波连蕊茶	MADAEDIQLPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDEAQS	63
茶树	MADAEDIQLPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDEAQS	63
毛果杨	MADAEDIQLPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDEAQS	63
葡萄	MADTEDIQLPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDEAQS	63
拟南芥	MADGEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDEAQS	63
玉米	MADSEDIQLPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPSTIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDEAQS	63
一致序列	mad ediqplvcdngtgmvkagfagddapravfpsi vgrprhtgvmvmgqkdayvgdeaqsk	
荔波连蕊茶	RGILTLKYP IEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMF	126
茶树	RGILTLKYP IEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMF	126
毛果杨	RGILTLKYP IEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMF	126
葡萄	RGILTLKYP IEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMF	126
拟南芥	RGILTLKYP IEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMF	126
玉米	RGILTLKYP IEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMF	126
一致序列	rgiltlky piehgivsnwddmekiwhhtfy nelrvapeehpvllteaplnpkanrekmtqimf	
荔波连蕊茶	ETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSH TVP IYEGYALPHAILRLDLAGRDLTD	189
茶树	ETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSH TVP IYEGYALPHAILRLDLAGRDLTD	189
毛果杨	ETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSH TVP IYEGYALPHAILRLDLAGRDLTD	189
葡萄	ETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSH TVP IYEGYALPHAILRLDLAGRDLTD	189
拟南芥	ETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSH TVP IYEGYALPHAILRLDLAGRDLTD	189
玉米	ETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSH TVP IYEGYALPHAILRLDLAGRDLTD	189
一致序列	etf vpamyvaiqavlslyasgrttgivl dsgdgvsh tvp iyegy alphailrldlagrdltd	
荔波连蕊茶	ALMKILTERGYMFTTAEIREIVRDMKEKLA YVALDYEQELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITI	252
茶树	ALMKILTERGYMFTTAEIREIVRDMKEKLA YVALDYEQELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITI	252
毛果杨	ALMKILTERGYMFTTAEIREIVRDMKEKLA YVALDYEQELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITI	252
葡萄	ALMKILTERGYMFTTAEIREIVRDMKEKLA YVALDYEQELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITI	252
拟南芥	SLMKILTERGYMFTTAEIREIVRDMKEKLA YVALDYEQELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITI	252
玉米	SLMKILTERGYMFTTAEIREIVRDMKEKLA YVALDYEQELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITI	252
一致序列	l mkiltergy ftttaeireivrdm keklayvaldyeqeletakssssveknyel pdgqviti	
荔波连蕊茶	GAERFRCPEVLFQPSLIGMEAAGIHE TTYNSIMKCDVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPFIADRM	315
茶树	GAERFRCPEVLFQPSLIGMEAAGIHE TTYNSIMKCDVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPFIADRM	315
毛果杨	GAERFRCPEVLFQPSLIGMEAAGIHE TTYNSIMKCDVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPFIADRM	315
葡萄	GAERFRCPEVLFQPSLIGMEAAGIHE TTYNSIMKCDVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPFIADRM	315
拟南芥	GAERFRCPEVLFQPSLIGMEAAGIHE TTYNSIMKCDVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPFIADRM	315
玉米	GAERFRCPEVLFQPSLIGMEAAGIHE TTYNSIMKCDVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPFIADRM	315
一致序列	gaerfrcpev fqp s ligmae agihet tynsimkcdvdirkdlygnivlsggstmfpgiadrm	
荔波连蕊茶	SKEITAPSSMKIKVWAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWSKGEYDESGPSIVHRKCF	377
茶树	SKEITAPSSMKIKVWAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWSKGEYDESGPSIVHRKCF	377
毛果杨	SKEITAPSSMKIKVWAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWSKGEYDESGPSIVHRKCF	377
葡萄	SKEITAPSSMKIKVWAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWSKGEYDESGPSIVHRKCF	377
拟南芥	SKEITAPSSMKIKVWAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWSKGEYDESGPSIVHRKCF	377
玉米	SKEITAPSSMKIKVWAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWSKGEYDESGPSIVHRKCF	377
一致序列	skeitalapssmkikvwapperkysvwiggsilaslstfqqmws kgeydesgpsivhrkcf	

注:数字代表氨基酸的个数。

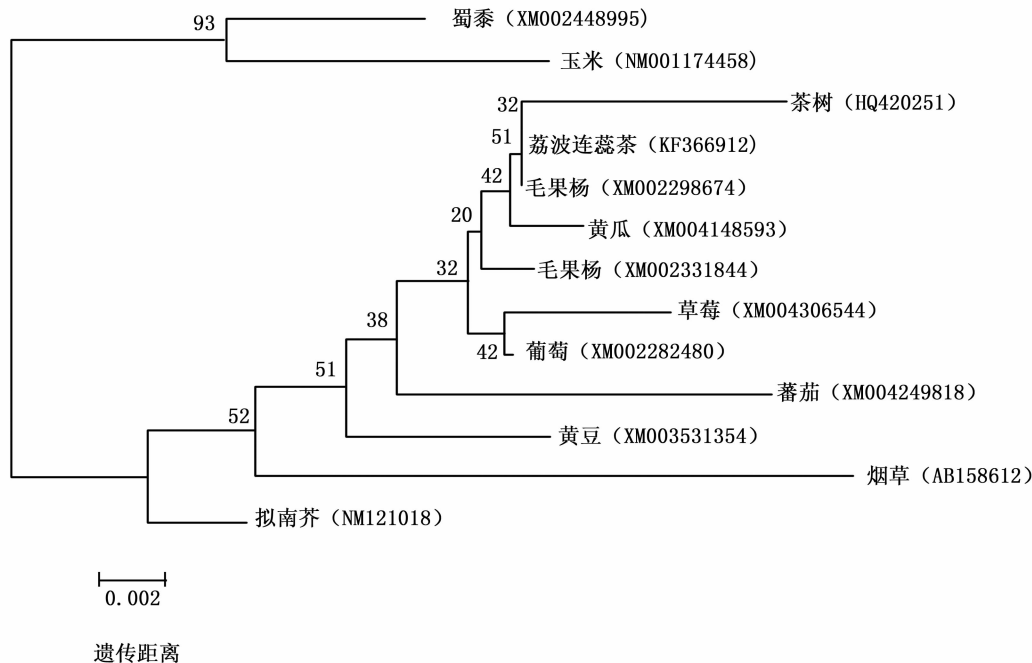
图4 ClActin1 蛋白与其它植物 Actin 蛋白氨基酸序列多重比较

肌动蛋白家族特有的特征序列,通过与 NCBI 已登录的其它植物 Actin 序列比对,核苷酸的同源性达到 82% 以上,蛋白氨基酸序列的相似性达到 97% 以上。生物信息学分析表明试验得到的 ClActin1 基因是肌动蛋白基因。

植物肌动蛋白具有高度保守性,一般由 375 ~ 377 个氨基酸残基组成^[19], Hightower 等认为植物肌动蛋白起源于同一个祖先^[20]。将 ClActin1 与 12 种植物的肌动蛋白进行序列比对,结果显示荔波连蕊茶与这些植物的肌动蛋白核苷酸和氨基酸序列高度同源,只存在少数差异,说明植物的肌动蛋白基因具

有高度的保守性。植物肌动蛋白的核苷酸替换率约为每亿年 1%^[21]。肌动蛋白的高度保守性与其在植物中的重要功能是密切相关的。肌动蛋白构成细胞骨架中的微丝系统,参与细胞的有丝分裂、减数分裂、染色体运动、细胞器运动、胞质流动、顶体运动等生命活动,在生长、发育、授精等过程中起着重要作用^[19]。

由于肌动蛋白基因在进化上的保守性,常被用于物种进化分析,鉴别不同物种间的亲缘关系^[22]。荔波连蕊茶肌动蛋白与其它 12 种植物肌动蛋白构建的系统进化树显示,荔波连蕊茶与茶树亲缘关系



注:蜀黍(*Sorghum bicolor* (L.) Moench);玉米(*Zea mays* L.);草莓(*Fragaria vesca* L.);番茄(*Solanum lycopersicum* L.);黄豆(*Glycine max* (L.) Merr.)。括号中代码为该物种 Actin 蛋白氨基酸序列的 GenBank 登录号。

图5 ClActin1 蛋白与其它植物 Actin 蛋白氨基酸序列的进化树分析

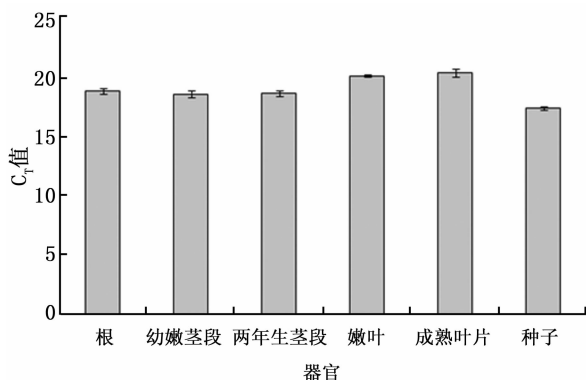


图6 ClActin1 基因在植株不同器官及不同发育时期的表达量

肌动蛋白基因至少 22 个,水稻肌动蛋白基因也不少于 18 个^[5]。高等植物的肌动蛋白基因至少编码两类古老的不同类型的肌动蛋白,即营养型和生殖型^[24]。营养型基因在所有的营养器官和细胞类型中组成型表达,而生殖型基因主要在成熟花粉、生长的花粉管或者胚珠中表达^[25]。实时荧光定量 PCR 实验结果表明,ClActin1 基因在荔波连蕊茶不同组织器官及器官不同发育时期均有表达,表达量相对稳定,属于营养型肌动蛋白基因。获得荔波连蕊茶肌动蛋白基因全长序列,不仅为下一步山茶肌动蛋白基因的功能研究奠定基础,也为研究山茶其它基因的表达调控提供了参考。

最近,其次与毛果杨、黄瓜和葡萄的亲缘关系较近。其中单子叶植物玉米和蜀黍聚为一类,其它双子叶植物聚为另一类,说明肌动蛋白基因的分化可能早于单子叶和双子叶植物的分化,是由一个共同祖先进化而来。根据肌动蛋白序列构建系统进化树,虽然由于目前所获得的植物肌动蛋白序列数量的限制,还无法对物种作出较全面的分类,但是可以为物种的系统分类提供新的参考。

高等植物肌动蛋白基因同动物肌动蛋白基因一样,属于多基因家族,其基因是多拷贝的^[23],如拟南芥肌动蛋白基因在 20 个以上,杨树(*Populus* spp.)

参考文献:

[1] 陈颖,王刚,赵俊霞. 高等植物体内的肌动蛋白[J]. 生物学通报,2003(1):13-15
 [2] 朱筱娟,曾宪录,宋朝霞,等. 细胞核内肌动蛋白及其功能研究进展[J]. 科学通报,2004,49(11):1031-1035
 [3] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 75(2): 291-295
 [4] 阎隆飞,石德权. 高等植物中的收缩蛋白[J]. 生物化学与生物物理学报, 1963, 3(4): 491-496
 [5] 郭景康,陈青云,戴茜,等. 拟南芥、水稻和杨树 ACTIN 家族全基因组分析[J]. 上海大学学报:自然科学版,2009,15(4): 426

- 431

- [6] Li X B, Fan X P, Wang X L, *et al.* The cotton *ACTIN1* gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation [J]. *The Plant Cell Online*, 2005, 17(3): 859 - 875
- [7] 陈鹏飞, 刘雪梅, 宋福南, 等. 白桦肌动蛋白 (*Actin*) 基因全长 cDNA 克隆与序列分析[J]. *植物研究*, 2009, 29(3): 339 - 345
- [8] 马雄凤, 喻春明, 唐守伟, 等. 苧麻 *Actin1* 基因克隆及其在韧皮部纤维不同发育阶段的表达[J]. *作物学报*, 2010, 36(1): 101 - 108
- [9] 王 芳. 甘草肌动蛋白基因 *GaActin2* 的克隆和表达分析[J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45(10): 995 - 1000
- [10] 王 舟, 宗俊勤, 宣继萍, 等. 结缕草肌动蛋白基因全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. *草业学报*, 2010, 19(6): 154 - 163
- [11] 孔卫青, 杨金宏. 桑树肌动蛋白 *actin* 基因全长序列的克隆与分析[J]. *广西植物*, 2012, 32(3): 362 - 366
- [12] 阮桢媛, 陈晓鸣, 杨子祥. 角倍总 RNA 提取方法建立及 *ACTIN* 基因片段克隆[J]. *林业科学研究*, 2012, 25(5): 551 - 557
- [13] Wasteneys G O, Galway M E. Remodeling the cytoskeleton for growth and form; an overview with some new views[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54(1): 691 - 722
- [14] 张宏达, 任善湘. 中国植物志: 第 49 卷 第 3 分册 山茶科(一) 山茶亚科[M]. 北京: 科学出版社, 1998
- [15] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExpASY server[M]// Walker J M. *The proteomics protocols handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2005: 571 - 607
- [16] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(4): 783 - 795
- [17] Guermeur Y, Pollastri G, Elisseeff A, *et al.* Combining protein secondary structure prediction models with ensemble methods of optimal complexity[J]. *Neurocomputing*, 2004, 56: 305 - 327
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596 - 1599
- [19] 陈 颖, 赵俊霞, 郝丽梅. 花粉肌动蛋白研究进展[J]. *生物学杂志*, 2002, (3): 5 - 8
- [20] Hightower R C, Meagher R B. The molecular evolution of *actin* [J]. *Genetics*, 1986, 114(1): 315 - 332
- [21] Perler F, Efstratiadis A, Lomedico P, *et al.* The evolution of genes: the chicken preproinsulin gene[J]. *Cell*, 1980, 20(2): 555 - 566
- [22] Fletcher L D, McDowell J M, Tidwell R R, *et al.* Structure, expression and phylogenetic analysis of the gene encoding *actin1* in *Pneumocystis carinii*[J]. *Genetics*, 1994, 137(3): 743 - 750
- [23] Firtel R A. Multigene families encoding *actin* and *tubulin* [J]. *Cell*, 1981, 24(1): 6 - 7
- [24] Kandasamy M K, Burgos-Rivera B, McKinney E C, *et al.* Class-specific interaction of profilin and ADF isoforms with *actin* in the regulation of plant development[J]. *The Plant Cell Online*, 2007, 19(10): 3111 - 3126
- [25] 张少斌, 刘国琴. 植物肌动蛋白异型体研究进展[J]. *植物学通报*, 2006(3): 242 - 248