

扁果枸杞肌动蛋白基因片段的克隆及其表达特征分析

袁惠君^{1*} 李学勇¹ 高泽¹ 王春梅² 李虎军³

1(兰州理工大学 生命科学与工程学院,甘肃 兰州 730050)

2(中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所,甘肃 兰州 730050)

3(兰州大学 草地农业科技学院 草地农业生态系统国家重点实验室,甘肃 兰州 730020)

摘要 为克隆扁果枸杞(*Lycium barbarum* Bianguo)肌动蛋白基因作为基因表达模式分析的内参基因,根据几种茄科植物肌动蛋白氨基酸序列保守区设计引物,以扁果枸杞3周龄叶总RNA为模板,采用RT-PCR的方法扩增肌动蛋白基因片段并连接到pMD18-T载体上,阳性克隆经PCR检测后测序。结果表明,该基因片段长598 bp,编码198个氨基酸,与枸杞(*Lycium chinense*)核苷酸序列的相似度和同源性分别达97%和100%,说明是肌动蛋白基因片段,命名为*LbACT*。荧光定量PCR分析表明,盐处理下*LbACT*基因在各器官中的*Ct*值稳定,可作为内参基因用于研究扁果枸杞功能基因的表达模式分析。

关键词 扁果枸杞;肌动蛋白;基因克隆;序列分析;RT-PCR

扁果枸杞(*Lycium barbarum* Bianguo)是宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的一个品种,其干燥果实具有极高的营养价值,枸杞多糖和还原型V_C含量分别达11.18 mg/100 g和1 234.64 mg/100 g,远高于宁杞1号、宁杞7号、宁杞0901等常规栽培品种^[1-3]。同时,扁果枸杞还具有极强的抗旱耐盐特性,在渗透胁迫下能通过体内积累适量的Na⁺,调控体内渗透平衡,改善细胞水分状况,维持其正常的生长^[4],是研究植物抗逆机理和挖掘抗逆基因资源用于作物遗传育种的研究材料。

肌动蛋白(actin)ACT基因是真核生物细胞中一种普遍存在的组成型表达的看家基因,编码的肌动蛋白是细胞骨架中微丝的主要组分,参与细胞分裂、内吞、信号传导、顶端生长、细胞器运动等多种生命活动^[5]。ACT基因表达量高且稳定,序列高度保守^[6],是用于基因表达分析的理想内参基因^[7-9],但有关扁果枸杞ACT基因克隆未见报道。本研究用RT-PCR法克隆扁果枸杞ACT基因核心片段,并进行一系列序列分析,为深入研究宁夏枸杞功能基因和果实品质改良奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

扁果枸杞种子于2013年7月采自白银市景泰县玉杰农贸有限公司枸杞引种示范基地,以3周龄幼苗为实验材料。

pUC18-T载体、UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒、T-载体PCR产物克隆试剂盒、4S Red Plus Nucleic Acid Strain、6×Loading Buffer、X-gal、IPTG、Amp、V(氯仿):V(异戊醇)=24:1、无水乙醇等均购自上海生工生物工程有限公司。大肠杆菌菌株DH5α、PrimeScriptTM II第一链cDNA合成试剂盒和PCR扩增试剂盒均购自大连TAKARA生物工程有限公司。DNA marker购自北京天根生化科技有限公司。琼脂糖购自Sigma公司。其他试剂均为国产分析纯,样品测序由华大基因完成。

1.2 仪器与设备

DYY-6C型电泳仪,北京市六一仪器厂;Genesy 96T型PCR扩增仪,西安天隆科技有限公司;5424R型高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;Nichipet Ex II型移液枪,日本立洋公司;7500 Real-Time PCR System,Life Technologies Holdings Pte Ltd.;HH-S6型电加热恒温水浴锅,北京科伟永兴仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 材料培养

第一作者:博士 副教授(本文通讯作者 E-mail:gsyhj@163.com)。
基金项目:国家自然科学基金(31460629);中国农业科学院科技创新工程专项资金项目(CAAS-ASTIP-2016-LHPS-08)
收稿日期:2018-10-08 改回日期:2018-11-20

参考文献方法^[4],挑选籽粒饱满的种子用体积分数 2% 次氯酸钠消毒后,铺在有湿润滤纸的平皿里,待种子萌发后种于蛭石中,浇灌 1/2 Hoagland 营养液,每 3 d 换 1 次营养液,温室的昼夜温度分别为 (24 ± 2) °C, (18 ± 2) °C,光照时间 16 h/d,光照强度约 600 μmol/(m² · s),相对湿度约为 50%。挑选生长健壮的 3 周龄幼苗用于实验。

1.3.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 3 周龄幼苗的根、茎和叶 80 ~ 100 mg,置于液氮中速冻并研磨后,按照 RNA 抽提试剂盒说明提取总 RNA。将提取到的总 RNA 在使用和保存之前取 2 μL 用核酸定量仪检测总 RNA 纯度和浓度,取 A₂₆₀/A₂₈₀ 的值在 1.8 ~ 2.0 的 RNA 样本根据测定出的 RNA 浓度计算下一步合成 cDNA 所需模板的用量。cDNA 第一链合成按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 引物设计与合成

从 NCBI 数据库下载番茄、马铃薯、烟草等茄科植物已知 ACT 基因的序列,进行同源性比较后筛选高度保守的区段,利用 DNAMAN 6.0 和 Primer 5.0 生物软件设计一对引物 P1、P2。用该引物扩增扁果枸杞 ACT 基因片段,预测所得片段长度为 598bp。引物由上海生工合成。P1:5'-GTGGTCGTACAACAGGTATTGTG-3'; P2:5'-GAACCTCCAATCCAGACACTG-3'。

1.3.4 RT-PCR 扩增

以扁果枸杞叶反转录得到的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,25 μL 反应体系包含 2 μL cDNA、引物 P1、P2 各 1 μL、0.5 μL dNTP (10 mmol/L)、2.5 μL 缓冲液、0.2 μL Taq 酶,加 17.8 μL ddH₂O 补足体系。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s;56.5 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后切下目的条带,用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收片段。根据 T-载体 PCR 产物克隆试剂盒说明,将回收片段重组入 pMD18-T 载体,再用热激法将连接产物转化 DH5α 感受态细胞,并接种到含有 X-gal、IPTG、Amp 的 Luria-Bertani (LB) 固体培养基上,37 °C 培养过夜,随机挑取白色菌斑接入 1 mL 含有 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养 8 ~ 12 h 后离心并收集菌体,用菌液 PCR 的方法筛选出阳性克隆,送至华大基因北京测序部进一步测序鉴定。

1.3.5 序列分析

从 NCBI 数据库下载其他植物 ACT 蛋白的氨基酸序列,用 DNAMAN 生物分析软件进行多重比对,并用

MEGA 5.1 软件进行系统发育分析和进化树构建,用 Neighbor joining 法构建进化树,自展次数为 1 000 次。

1.3.6 盐处理下 LbACT 表达特性分析

盐处理如下,用含有 0 (对照)、50、100、150、200 mmol/L NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液处理 3 周龄扁果枸杞幼苗 24 h 后,分别取根、茎、叶提取总 RNA。每个处理 3 个重复,每个重复包括 2 ~ 3 株幼苗。

根据已经得到的 LbACT 基因片段的序列设计 LbACT 实时定量引物 QA1:5'-CTATGAGTTGCCAGATGGACAG-3'; QA2:5'-TGGCTGGAAAAGGACTTCTG-3'。参照 TAKARA PrimeScript™ eRT reagent Kit with gDNA Eraser (perfect real time) 反转录试剂盒说明书,合成第一链 cDNA,并根据 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书以第一链 cDNA 为模板,建立 20 μL 实时定量 PCR 反应体系:10.0 μL 的 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 ×)、引物 QA1 和 QA2 各 0.8 μL、0.4 μL 的 ROX Reference Dye (50 ×)、2.0 μL 的 cDNA 模板及 6.0 μL 灭菌水。由 7500 Real-Time PCR 系统进行 PCR 反应后,用 SPSS 17.0 和 Microsoft Excel 2013 软件对仪器自动得出各样品 Ct 值进行统计分析和作图。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及检测

以扁果枸杞根、茎和叶为材料提取的总 RNA,经过琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰(图 1),前者亮度约是后者的 2 倍,说明提取的 RNA 完整性较好,可用于 RT-PCR 扩增。

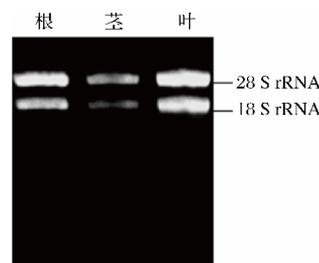


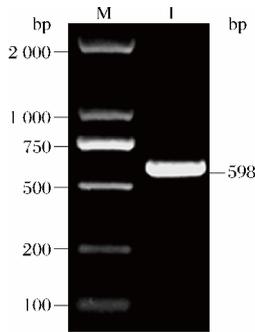
图 1 扁果枸杞根、茎和叶总 RNA 提取

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA from root, stem and leaf in *L. barbarum* Bianguo

2.2 RT-PCR 扩增及阳性克隆的鉴定

以扁果枸杞叶总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板,用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增,得到的产物经琼脂糖凝胶电泳(图 2),在 500 bp ~ 750 bp 有一条亮带,且上下无杂带,与预测的目的片段大小

一致,表明该条带可能是目的基因片段,有待进一步测序鉴定。

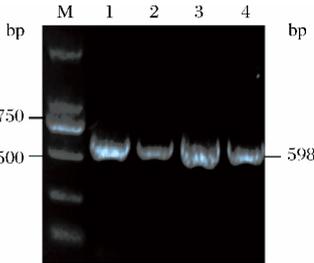


M-DNA Marker; 1-PCR 扩增产物

图2 扁果枸杞 *LbACT* 基因片段的 PCR 产物凝胶电泳

Fig.2 Electrophoresis of the fragments of *LbACT* gene by PCR

目的片段经回收、连接到 pMD18-T 克隆载体,并转化大肠杆菌 DH5 α 。从转化平板上随机挑取 8 个菌斑培养后,用菌液 PCR 的方法扩增目的片段,并经琼脂糖凝胶电泳检测,选择在 500 ~ 750 bp 出现一条亮带(图 3)与预测目的片段大小一致的菌斑初步确定为阳性克隆。



M-DNA Marker; 1~4-PCR 扩增产物

图3 扁果枸杞 *LbACT* 基因片段 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 Electro

扁果枸杞 <i>LbACT</i>	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
枸杞 <i>LcACT</i> (AHE41423)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
马铃薯 <i>StACT</i> (ACU27904)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
玉兰 <i>MdACT</i> (AAF87302)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
水稻 <i>OsACT</i> (AAO62546)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
长穗偃麦草 <i>TeACT</i> (AHL58686)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
小花碱茅 <i>PtACT</i> (ACL80038)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
冰草 <i>AcACT</i> (ACV71031)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
小麦 <i>TaACT</i> (BAD23897)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
拟南芥 <i>AtACT-1</i> (AEC09427)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
玉米 <i>ZmACT</i> (ACG39191)	GRTTGIVLDSGDVSHTPPIYEGYLPHAILRLDLAGRDTLMLKILTERGYMFTTTAEREIVRD	66
Consensus	grttgivldsgdvshtpiyegy lphailrl lagrd tdlmkiltergy mftttaereivrd	
扁果枸杞 <i>LbACT</i>	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
枸杞 <i>LcACT</i> (AHE41423)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
马铃薯 <i>StACT</i> (ACU27904)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
玉兰 <i>MdACT</i> (AAF87302)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
水稻 <i>OsACT</i> (AAO62546)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
长穗偃麦草 <i>TeACT</i> (AHL58686)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
小花碱茅 <i>PtACT</i> (ACL80038)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
冰草 <i>AcACT</i> (ACV71031)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
小麦 <i>TaACT</i> (BAD23897)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
拟南芥 <i>AtACT-1</i> (AEC09427)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
玉米 <i>ZmACT</i> (ACG39191)	YKEKLYALDYQCELETAKSSSSVEKNYELPDGQVITIGERFRCPEVLRQPSFMGMENAGIHEI	132
Consensus	kekl v aldy qd e sss ek ye pdgqv itig erfrcpevl r qps f gm en agi he i	

2.3 序列分析

随机挑取阳性克隆培养后进行测序和分析,得到一段长度为 598 bp 的序列,编码 198 个氨基酸(图 4)。

P1	
1	G T G G T C G T A C A A C A G G T A T T G T G T T G G A C T C T G G T A T G T G G T G A G T C A C A C T G T G C C T A
	G R T T G I V L D S G D G V S H T V P 19
61	T C T A T G A A G G T T A T G C I T T G C C C A T G C T A T T C T G C I T T G G A T C T T G C T G G C C G T G A C T
	I Y E G Y A L P H A I L R L D L A G R D 39
121	T A A C T G A T A G C C T T A T G A A G A T C C T C A C T G A G A G G T T A C A T G T T C A C C A C C A C T G C T G
	L T D S L M K I L T E R G Y M F T T A 59
181	A A C G G A A A T T G T C C G T G A C A T G A A G G A A A A A C T T G C T A T G T C G C T T G A C T A T G A G C
	E R E I V R D M K E K L A Y V A L D Y E 79
241	A G G A G C T T G A A A C T G C C A A G A G C A G C T C T C C G T T G A A A A A C T A T G A G T T G C C A G A T G
	Q E L E T A K S S S S V E K N Y E L P D 99
301	G A C A G G T A T T A C T A T T G G T G C T G A G A G G T T C C G T T G C C C A A G A G T C C T T T T C A C C A G C A T
	G Q V I T I G A E R F R C P E V L F Q P 119
361	C C A T G A T T G G G A T G G A A G C T G C G G G T A T C A T G A G A C T A C C T A A C C A T C A T G A A G T
	S M I G M E A A G I H E T T Y N S I M K 139
421	G T G A T G C G A T A T T A G G A A G A C C T G T A T G G A A A T A T T G T G C T C A G T G G T G C C T C C A C T A
	C D V D I R K D L Y G N I V L S G G S T 159
481	T G T C C C T G G C A T T G C T G A T C G A A T G A G C A A G G A A A T T A C T G C I T T G C T C C T A G T A G C A
	M F P G I A D R M S K E I I A L A P S S 179
541	T G A A G A T T A A G G T T G T T G C T C C C C G G A G A G A A A A T C A G T G C T G G A T T G G A G G T T G
	M K I K V V A P P E R K Y S V W I G G 198

图4 扁果枸杞 *LbACT* 基因片段的核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig.4 Nucleic acid sequence and deduced amino acid sequence of actin gene fragment from leaf in *L. barbarum* Bianguo

Blast 比对结果表明,该片段与其他 100 种植物 ACT 基因核苷酸序列的相似性在 87% ~ 97%,其中与枸杞 (*Lycium chinense*) 核苷酸序列的同源性达到 100%。将预测的扁果枸杞氨基酸序列片段和其他 11 种植物肌动蛋白基因的氨基酸序列进行多重比较,发现其保守氨基酸多达 167 个,而非保守氨基酸仅有 31 个(图 5)。

```

扁果枸杞LbACT      TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
枸杞LcACT (AHE41423) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
马铃薯StACT (ACU27904) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
玉兰MdACT (AAF87302) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
水稻OsACT (AAO62546) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
长穗堰麦草TeACT (AHL58686) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
小花碱茅PtACT (ACL80038) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
冰草AcACT (ACV71031) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
小麦TaACT (BAD23897) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
拟南芥AtACT-1 (AEC09427) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
玉米ZmACT (ACG39191) TYN SIMKCEVDIRKDL YGNIVLSGGSTMFPGIADRSKEITALAFSSMIRKVVAPPERRKYSVWIGG 198
Consensus      tynsimkedvirkdlygn vlsggstmfpgiadrmskeitalafssmirkv apperrkysvwigg
    
```

图 5 扁果枸杞 LbACT 氨基酸序列与其他植物 Actin 氨基酸序列多重比较

Fig. 5 Multiple comparison in amino acid sequence of actin between leaves of *L. barbarum* Bianguo and other plants

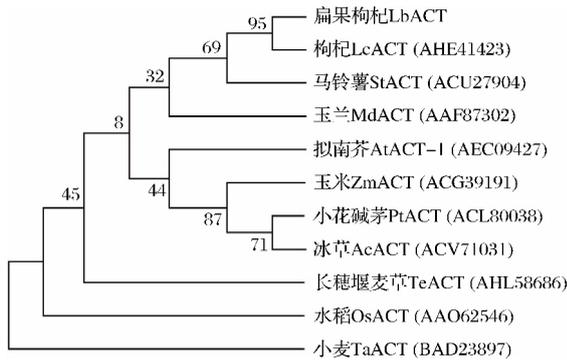


图 6 Neighbor joining 法构建 LbACT 氨基酸序列进化树
Fig. 6 Phylogenetic tree of Actin amino acid sequence of LbACT by Neighbor joining method

Neighbor joining 法构建进化树也表明,该氨基酸序列与枸杞 LcACT 同源性达 95%,但与其他植物进化较

远(图 6)。这些结果表明克隆的基因片段为扁果枸杞肌动蛋白基因片段,命名为 *LbACT*。根据其核苷酸序列预测的氨基酸序列是扁果枸杞肌动蛋白的高度保守区域。

通过 BlastP 对 *LbACT* 基因编码的蛋白进行保守区预测表明,*LbACT* 属于 NBD sugar-kinase HSP70 actin superfamily 家族(图 7)。

2.4 盐处理下 *LbACT* 基因的表达特征分析

如图 8 所示,不同浓度 NaCl 处理 24 h 后在 0、100 和 150 mmol/L NaCl 处理时叶、茎、根的 *LbACT* 的 *Ct* 平均值差异不显著;在 50 mmol/L NaCl 处理时,根的 *Ct* 值高于茎和叶,在 200 mmol/L NaCl 处理时,茎的 *Ct* 值低于根;频数分布特征为,*Ct* 平均值是 19.85,变异系数为 2.22,峰度系数为 1.68,属于尖峰分布,表明整体 *Ct* 值集中,波动范围小。

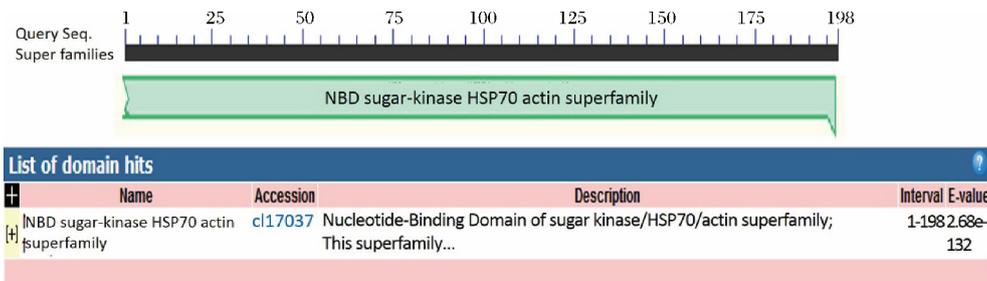


图 7 扁果枸杞 *LbACT* 保守区结构域预测

Fig. 7 Conserved domains of *LbACT* protein from *L. barbarum* Bianguo

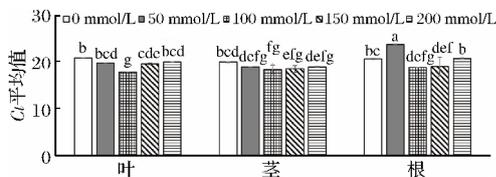


图 8 qRT-PCR 分析扁果枸杞 *LbACT* 的表达特征
Fig. 8 Expression characters of *LbACT* gene by qRT-PCR analysis

注:不同小写字母表示不同器官各 NaCl 处理间的差异显著性($P < 0.05$)。

相关性分析表明,在叶和茎中,不同浓度 NaCl 处理 0、12、24、72 h 下,*Ct* 值与 NaCl 浓度无关;在根中,仅在不同浓度 NaCl 处理 12 h 时影响 *Ct* 值(表 1)。上述结果均表明,盐处理下 *LbACT* 基因在各器官中的 *Ct* 值稳定。

表1 扁果枸杞 *LbACT* 的 C_t 值与不同浓度 NaCl 处理的相关性分析Table 1 Correlation analysis between the C_t value of *LbACT* and the concentration of NaCl treatments

器官	NaCl 处理时间/h	<i>LbACT</i> 的 C_t 值与 NaCl 浓度的相关系数	差异显著性
叶	0	-0.391	$P > 0.05$ 不相关
	12	0.477	$P > 0.05$ 不相关
	24	-0.264	$P > 0.05$ 不相关
	48	0.787**	$P < 0.05$ 相关
	72	0.054	$P > 0.05$ 不相关
茎	0	-0.161	$P > 0.05$ 不相关
	12	-0.349	$P > 0.05$ 不相关
	24	-0.499	$P > 0.05$ 不相关
	48	-0.791**	$P < 0.05$ 相关
	72	-0.036	$P > 0.05$ 不相关
根	0	-0.039	$P > 0.05$ 不相关
	12	-0.714**	$P < 0.05$ 相关
	24	-0.333	$P > 0.05$ 不相关
	48	0.399	$P > 0.05$ 不相关
	72	-0.203	$P > 0.05$ 不相关

注 “*”表示差异显著 ($P < 0.05$), “**”表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

高等真核生物肌动蛋白参与多种重要的生命活动,其基因也是由肌动蛋白多基因家族编码,因而形成了多种肌动蛋白异型体^[10],已知茄科植物中的马铃薯至少有 5 个编码肌动蛋白的基因^[11],茄有 10 个^[12]。植物肌动蛋白异型体的表达虽然具有组织和器官特异性,但在一级结构上有很高的同源性^[13-15],具备作为内参基因的良好条件。宁夏枸杞根、叶、果实均可入药或食用^[16-18],是甘肃、宁夏、内蒙古、青海等西北半干旱地区重要的经济植物^[16,19]。但是,不同地区、品种的宁夏枸杞在抗逆性、营养成分含量上存在显著差异^[4,16,20],目前对其分子机理知之甚少,克隆内参基因并验证其表达稳定性是分析基因表达丰度和模式,进一步解析植物基因功能、探索植物复杂代谢网络必不可少的工作。本文克隆了宁夏枸杞一个抗逆品种——扁果枸杞的肌动蛋白基因片段,该片段长 598 bp,满足半定量 PCR 和实时荧光定量 PCR 分析基因表达的引物设计需要;同时,其核苷酸序列与其他植物的相似性达 87%~97%,具有极高的保守性;不同浓度盐处理下,*LbACT* 基因在各器官中的 C_t 值稳定。这些特征都表明,*LbACT* 基因是研究扁果枸杞功能基因的表达模式分析的良好内参基

因,将为进一步开展宁夏枸杞代谢网络研究和品质改良奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 王益民,张珂,许飞华,等. 不同品种枸杞子营养成分分析及评价[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 34-38.
- [2] KULCZYŃSKI B, GRAMZAMICHALOWSKA A. Goji berry (*Lycium barbarum*): Composition and health effects—a review [J]. Polish Journal of Food & Nutrition Sciences, 2016, 66(2): 67-76.
- [3] YAO R, HEINRICH M, WANG Z, et al. Quality control of goji (fruits of *Lycium barbarum* L. and *L. chinense* Mill.): A value chain analysis perspective. [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 10(5): 508-520.
- [4] 袁惠君,刘轲,王春梅,等. 两个宁夏枸杞品种的耐渗透胁迫和耐盐特征比较[J]. 草业科学, 2016, 33(4): 681-690.
- [5] 刘曦,张少斌,汪澈. 植物肌动蛋白功能的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(3): 13-16.
- [6] 王洪振,程焉平. 细胞核内肌动蛋白参与基因转录的研究进展[J]. 吉林师范大学学报:自然科学版, 2005, 26(2): 34-36.
- [7] 丁铃,李军,周涛,等. 太子参 3 个肌动蛋白基因片段的克隆与序列分析[J]. 中草药, 2016, 47(11): 1935-1942.
- [8] FU W, XIE W, ZHANG Z, et al. Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). International Journal of Biological Sciences, 2013, 9(8): 792-802.
- [9] XU R, ZHENG X. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Octopus minor* (Cephalopoda: Octopoda) under acute ammonia stress [J]. Environmental Toxicology & Pharmacology, 2018, 60: 76-81.
- [10] MEAGHER R B, MCKINNEY E C, Kandasamy M K. Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: The diverse plant actin gene family [J]. Plant Cell, 1999, 11(6): 995-1005.
- [11] DROUIN G, DOVER G A. A plant processed pseudogene [J]. Nature, 1987, 328(6130): 557-558.
- [12] BERNATZKY R, TANKSLEY S D. Genetics of actin-related sequences in tomato [J]. Theoretical & Applied Genetics, 1986, 72(3): 314-321.
- [13] 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(7): 1541-1554.
- [14] JIANG Y, ZHAO W. Expression and phylogenetic analysis of pea actin isoforms [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(12): 1456-1461.

- [15] 张少斌,刘国琴. 植物肌动蛋白异型体研究进展[J]. 植物学报, 2006, 23(3):242-248.
- [16] 陈清华,王朝良. 宁夏枸杞产业发展优势和提升出口竞争力的对策[J]. 农业现代化研究, 2008, 29(2): 151-154.
- [17] 张惠玲. 枸杞的综合开发与利用[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(2):223-227.
- [18] HYE W L, YOUNG H K, YUN H K, et al. Discrimination of *Lycium chinense* and *Lycium barbarum* by taste pattern and betaine analysis[J]. International Journal of Clinical & Experimental Medicine, 2014, 7(8): 2 053 - 2 059.
- [19] 郑国琦,胡正海. 宁夏枸杞的生物学和化学成分的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(5):796-796.
- [20] YAO R, HEINRICH M, ZOU Y, et al. Quality variation of Goji (Fruits of *Lycium* spp.) in China: A comparative morphological and metabolomic analysis[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9:151.

Molecular cloning and expression analysis of an actin from *Lycium barbarum* Bianguo

YUAN Huijun^{1*}, LI Xueyong¹, GAO Ze¹, WANG Chunmei², LI Hujun³

1 (School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

2 (Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS, Lanzhou 730050, China)

3 (State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China)

ABSTRACT The gene encoding actin was cloned from *Lycium barbarum* Bianguo and checked to be a potential reference gene to analyze the expression levels of other genes. The primers were designed based on conserved sequences of actin genes from other *Solanaceae* plants. The total RNA isolated from leaves of *Lycium barbarum* Bianguo was used as a template for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The nucleotide fragment was amplified and cloned into pMD18-T. The positive clones were identified by PCR, followed by sequencing. The results revealed that the amplified fragment, named as *LbACT*, contained 598 bp, encoded 198 amino acid residues. The nucleotide sequence was 97% similar to that of *Lycium chinense* actin gene. Meanwhile, fluorescent quantitative PCR showed that salt-treated *LbACT* was stable in all organs. Therefore, *LbACT* could be used as a reference gene to analyze the expressions of functional genes of *Lycium barbarum* Bianguo.

Key words *Lycium barbarum* Bianguo; actin; cloning; sequence analysis; reverse transcription-polymerase chain reaction