

秦子禹,张向昆,王娜,等. 苹果 *Actin* 基因片段克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(1):66-70.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.01.011

# 苹果 *Actin* 基因片段克隆及序列分析

秦子禹,张向昆,王娜,项殿芳

(河北科技师范学院园艺科技学院,河北昌黎 066600)

**摘要:**以红富士苹果叶片为材料,提取总 RNA,利用反转录 PCR(reverse transcriptase PCR,RT-PCR)技术扩增得到长度约 1 000 bp 的基因片段,对其进行回收、克隆后测序并进行序列分析。结果表明,该基因片段长度为 1 048 bp,编码 348 个氨基酸,其核苷酸序列与白梨 *Actin* 基因的同源性达 99%,与桃、中国李、欧洲甜樱桃、枣 4 种果树 *Actin* 基因的同源性在 90% 以上,其编码的氨基酸序列与其他植物肌动蛋白的同源性达 97% 以上,说明克隆得到的片段为苹果 *Actin* 基因,具有较高的保守性和同源性。

**关键词:**苹果;*Actin* 基因;克隆;序列分析;RT-PCR

**中图分类号:**S661.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)01-0066-04

在植物基因表达研究中,通常需要引入内参基因来矫正系统误差。常用的内参基因有肌动蛋白基因(*Actin*)、微管蛋白基因(*Tubulin*)、泛素基因(*Ubiquitin*)、18S rRNA、组蛋白基因(*Histone*)等。肌动蛋白(*Actin*)是普遍存在于真核生物中的一种蛋白质,也是细胞骨架的重要组成成分,它主要参与细胞的变形运动、胞吞与胞吐、细胞分裂、花粉管生长、细胞内物质运输、细胞形状变化、细胞内信号转导以及基因表达与调控等过程<sup>[1-3]</sup>。此外,*Actin* 基因在核苷酸和氨基酸水平上具有高度的保守性和同源性,据此可将其用于研究不同物种之间的亲缘关系和分化时间<sup>[4-5]</sup>。目前,已经成功克隆了鸭梨<sup>[6]</sup>、葡萄<sup>[7]</sup>、枣<sup>[8]</sup>、火龙果<sup>[9]</sup>、香蕉<sup>[10]</sup>等果树的 *Actin* 基因。

苹果是世界四大水果之一,也是我国栽培面积和产量最大的果树<sup>[11]</sup>。近年来,探究苹果矮化、抗逆性、果实品质形成等方面的分子机制成为研究热点,而寻找到稳定的内参基因是开展相关研究的必备条件之一。鉴于 *Actin* 基因的保守性,且已被作为

内参基因成功应用在不同作物的分子生物学研究中<sup>[12-14]</sup>,本研究以我国栽培面积最大的红富士苹果的叶片为材料,采用反转录 PCR(reverse transcriptase PCR,RT-PCR)方法,对苹果 *Actin* 基因片段进行克隆和生物信息学分析,旨在为深入研究 *Actin* 基因的结构和功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料、试剂和仪器

红富士苹果叶片采自河北科技师范学院园艺科技学院试验站(119.17°E,39.70°N)。

RNAiso Plus、RNAiso-mate、Recombinant DNase I 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒及 pEASY-T<sub>3</sub> Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司;2×ES TaqMasterMix 购自北京康为世纪生物科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

Bio-Rad S1000 PCR 仪、凝胶成像系统 Universal Hood II 为美国 Bio-Rad 公司产品。

### 1.2 试验方法

1.2.1 引物设计与合成 通过比对 GenBank 中已发表的高等植物肌动蛋白基因(*Actin*)的核苷酸序列,找到保守区域,采用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增引物,将上游引物标记为 *Act-sta-F*: TGCTGAAGGCTGGATTGCT;下游引物标记为 *Act-sta-R*: GACTCGTCATACTCACCCTTGG,预期扩增

收稿日期:2018-11-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31872050);河北省高校园艺作物育种应用技术研发中心项目(编号:182511);河北省秦皇岛市重点研发计划(编号:201803B005)。

作者简介:秦子禹(1978—),男,河北成安人,博士,副教授,主要从事果树育种及分子生物学研究,E-mail:ziyuqin2004@126.com;张向昆(1993—),女,河北邯郸人,硕士研究生,主要从事果树分子生物学研究,E-mail:1169806059@qq.com。

通信作者:王娜,博士,副教授,主要从事果树育种及分子生物学研究。E-mail:wangna5531@126.com。

产物长度为 1 048 bp,由生工生物工程(上海)有限公司合成。

**1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成** 称取 0.1 g 苹果叶片,利用 RNAiso Plus、RNAiso - mate 试剂盒,按照试剂盒说明书提取总 RNA。再利用 Recombinant DNaseI 试剂盒对得到的总 RNA 进行纯化,然后以 Oligo(dT) 18 为引物采用 TransScript One - Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒进行反转录合成 cDNA。

**1.2.3 Actin 基因的 PCR 扩增** 以 Act - sta - F、Act - sta - R 为引物,以苹果叶片 cDNA 为模版进行 Actin 基因的 PCR 扩增。扩增体系为 cDNA 模板 1  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,2  $\times$  ES Taq MasterMix 12.5  $\mu$ L,RNase - free Water 9.5  $\mu$ L,共计 25  $\mu$ L。反应条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环;72  $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。

**1.2.4 Actin 基因的克隆与鉴定** PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统中观察到符合预期大小(1 000 bp 左右)的目标片段,利用 DNA 凝胶回收试剂盒对其进行切胶回收并纯化后连接到 pEASY - T<sub>3</sub> 载体上,转化至 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,于 37  $^{\circ}$ C 下在含有氨苄青霉素、X - gal、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)的 LB 固体培养基上培养 8 ~ 14 h 后,挑取阳性单克隆菌落进行增菌培养,用质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒,并进行 PCR 扩增和酶切鉴定,同时送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

### 1.3 生物信息学分析

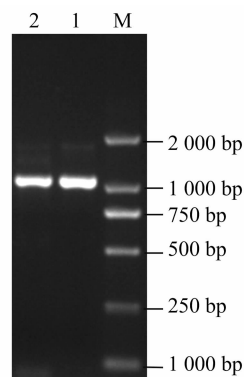
将测序结果在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)网站上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行 BLAST 同源性分析及保守域查找,然后利用 DNAMAN8、MEGA5 软件对克隆序列进行氨基酸保守性分析,并构建系统进化树。

## 2 结果与分析

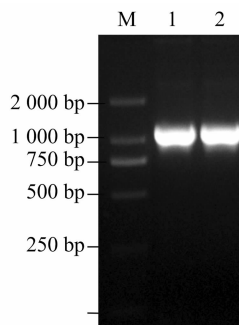
### 2.1 Actin 基因的克隆

以从苹果叶片中提取的总 RNA 为模板,进行反转录合成 cDNA 后,利用引物 Act - sta - F、Act - sta - R 进行 PCR 扩增,获得 1 条长度为 1 000 bp 左右的基因片段(图 1),与预期大小相符。将其回收纯化后,连接到 pEASY - T<sub>3</sub> 载体上,转化至 *E. coli*

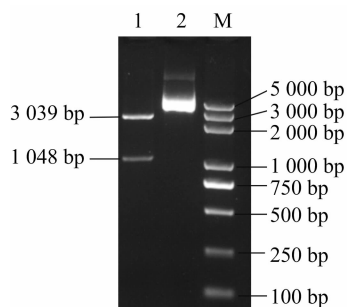
DH5 $\alpha$  感受态细胞中,按照“1.2.4”节中的方法培养后,挑取阳性单克隆菌落进行增菌培养,用质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒后,进行 PCR 扩增和酶切鉴定,均得到长度为 1 000 bp 左右的特异片段(图 2、图 3),表明该基因片段已被成功克隆,可以进行测序。



M—DNA ladder marker; 1、2—Actin 基因  
图1 Actin 基因的 PCR 扩增



M—DNA ladder marker;  
1、2—Actin 基因重组质粒 PCR 扩增产物  
图2 重组质粒的 PCR 鉴定



M—DNA ladder marker;  
1—Actin 质粒的双酶切产物; 2—Actin 质粒  
图3 重组质粒的酶切鉴定

### 2.2 Actin 基因的测序结果及序列分析

测序结果(图 4)表明,本研究克隆的基因片段长度为 1 048 bp。通过 BLAST 软件搜索比对发现,该序列与其他植物的 Actin 基因具有高度同源性,其中与白梨(*Pyrus x bretschneideri*)的同源性高达 99%(图 5),与核果类果树桃(*Prunus persica*)、中国李

```
1   TGGTGAAGGCTGGATTGCTGGTGATGATGCTCCCAGGGCTGTGTTTCCTAGTATTGTTG
1   V K A G F A G D D A P R A V F P S I V

61  GTCGACCACGGCACACTGGTGTGTCATGGTTGGTATGGGTCAGAAGGATGCCTACGTAGGTG
20  G R P R H T G V M V G M G Q K D A Y V G

121 ATGAAGCACAGTCGAAAAGAGGTATCCTTACCTTGAAGTATCCCATTGAGCACGGCATAG
40  D E A Q S K R G I L T L K Y P I E H G I

181 TGAGCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACTTTCTACAATGAACTTCGTG
60  V S N W D D M E K I W H H T F Y N E L R

241 TTGCTCCCGAAGAACACCCAGTTCTGCTCACAGAGGCTCCTCTTAACCCTAAGGCCAACA
80  V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N

301  GAGAAAAGATGACCCAAATCATGTTTGAGACCTTCAATGTGCCTGCCATGTATGTTGCCA
100 R E K M T Q I M F E T F N V P A M Y V A

361  TCCAGGCTGTTCTCTCACTGTACGCCAGTGGTCGTACAACCTGGTATTGTGCTGGACTCTG
120 I Q A V L S L Y A S G R T T G I V L D S

421  GTGATGGTGTGAGTCACACTGTGCCAATCTATGAAGGTTATGCCCTCCCTCATGCCATCC
140 G D G V S H T V P I Y E G Y A L P H A I

481  TTCGTCGGACCTTGCTGGTCGTGACCTCACAGATTCTTTGATGAAAATTCTCACTGAAA
160 L R L D L A G R D L T D S L M K I L T E

541  GAGGGTACATGTTCACTACTGCTGAACGGGAAATTGTCCGTGATATGAAGGAGAAGC
180 R G Y M F T T T A E R E I V R D M K E K

601  TTGCATATGTTGCTCTGGACTATGAGCAAGAACTTGAGACTGCCAAGAGCAGCTCTTCAG
200 L A Y V A L D Y E Q E L E T A K S S S S

661  TTGAGAAGAACTATGAGCTTCCCGATGGCCAAGTCATCACAATTGGAGCTGAGAGATTCC
220 V E K N Y E L P D G Q V I T I G A E R F

721  GGTGCCCAGAAGTCCTCTTTCAACCATCTCTTATTGGAATGGAAGCTGCTGGCATTTCATG
240 R C P E V L F Q P S L I G M E A A G I H

781  AGACTACTTACAACCTCTATCATGAAGTGTGATGTGGATATCAGAAAAGACCTATATGGAA
260 E T T Y N S I M K C D V D I R K D L Y G

841  ACATCGTGCTCAGTGGTGGGTCAACTATGTTCCCTGGTATTGCAGACCGTATGAGCCGGG
280 N I V L S G G S T M F P G I A D R M S R

901  AGATCACTGCTCTTGCTCCAAGCAGCATGAAGATTAAGGTTGTAGCTCCACCAGAGAGAA
300 E I T A L A P S S M K I K V V A P P E R

961  AGTACAGTGTCTGGATTGGAGGGTCCATCCTTGTCATCCCTCAGTACCTTCCAACAGATGT
320 K Y S V W I G G S I L A S L S T F Q Q M

1021 GGATTTCGAAGGGTGAGTATGACGAGTC
340 W I S K G E Y D E
```

图4 苹果叶片 *Actin* 基因片段的核苷酸序列及推测其编码的氨基酸序列

(*Prunus salicina*)和欧洲甜樱桃(*Prunus avium*)的同源性均为 94%,与枣(*Ziziphus jujube*)的同源性为 90%,表明克隆得到的基因片段为 *Actin* 基因的一部分,将其命名为 *MdActin1*。

通过 DNAMAN8 软件将该片段翻译成氨基酸序列,并利用 NCBI 网站上的 BLAST 程序对其进行比

对分析。结果(图 4)显示,该序列编码 348 个氨基酸,包括 338 个保守氨基酸,而非保守氨基酸仅为 10 个,与其他植物肌动蛋白的氨基酸同源性达 97% 以上,表明该序列在氨基酸水平上高度保守。对 *MdActin1* 蛋白进行功能保守域分析,结果(图 5)显示,其同时含有 NBD sugar kinase、HSP70、actin

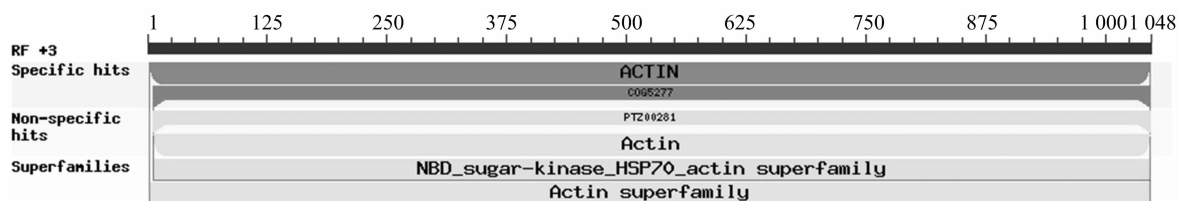


图5 MdActin1 氨基酸序列的保守结构域

superfamily 特异性标签,说明 MdActin1 蛋白为 Actin 蛋白超家族成员之一。

选取经 BLAST 分析得出的同源性高的氨基酸序列,利用 MEGA5 构建系统进化树,结果(图 6)显

示,MdActin1 蛋白与白梨 Actin 蛋白(登录号: NP\_001289215.1)亲缘关系最近,其次为榴莲 Actin 蛋白(XP\_022774869.1),与番茄 Actin 蛋白(登录号:NP\_001295376.1)亲缘关系最远。

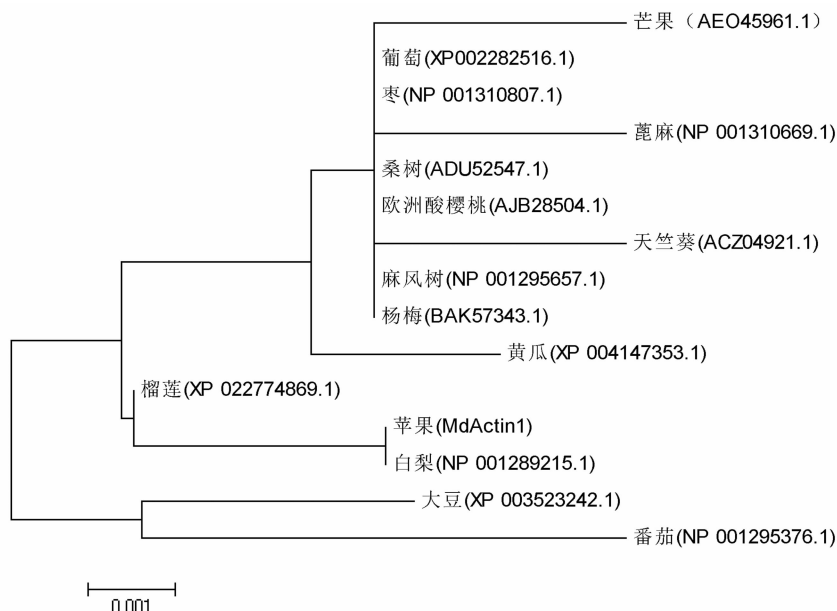


图6 MdActin1 氨基酸序列 NJ 进化树分析

### 3 讨论与结论

高等植物肌动蛋白是由单一多肽链构成的球状蛋白,包含有 375 ~ 377 个氨基酸,广泛分布于植物的各种组织器官中,且所有植物的肌动蛋白均起源于一个共同祖先<sup>[15]</sup>。植物 *Actin* 基因在进化上极为保守,其碱基替换率非常低,为每 1 亿年替换 1%,因此常将其用于分析物种进化和鉴别物种间的亲缘关系<sup>[16]</sup>。此外,也常被作为内参基因用于基因表达研究<sup>[12-14]</sup>。

本研究中克隆的红富士苹果叶片 *Actin* 基因序列与白梨 *Actin* 基因的同源性高达 99%,与核果类果树桃、中国李和欧洲甜樱桃 *Actin* 基因的同源性均为 94%,与枣 *Actin* 基因的同源性为 90%,充分证明苹果 *Actin* 基因与其他植物 *Actin* 基因具有较高的同源性。此外,在其编码的氨基酸序列中,保守氨基酸数量为 338 个,而非保守氨基酸仅为 10 个,与其

他植物肌动蛋白同源性达 97% 以上,表明该序列在氨基酸水平上也是高度保守的。该研究结果不仅可丰富高等植物 *Actin* 基因的核酸数据库,还可为进一步深入研究植物 *Actin* 基因的功能并将其作为内参基因应用于苹果基因表达研究中提供依据。

#### 参考文献:

- [1] Vidali L, Hepler P K. Actin and pollen tube growth [J]. *Protoplasma*, 2001, 215 (1/2/3/4): 64 - 76.
- [2] Collings D A, Harper J D, Marc J, et al. Life in the fast lane: actin - based motility of plant peroxisomes [J]. *Canadian Journal of Botany*, 2002, 80 (4): 430 - 441.
- [3] 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, 38 (1): 13 - 15.
- [4] Hightower R C, Meagher R B. The molecular evolution of actin [J]. *Genetics*, 1986, 114 (1): 315 - 332.
- [5] Mangé A, Prudhomme J C. Comparison of *Bombyx mori* and *Helicoverpa armigera* cytoplasmic actin genes provides clues to the evolution of actin genes in insects [J]. *Molecular Biology and*

李隐侠,张俊,钱勇,等. 山羊 *MC1R* 基因克隆、表达及其多态性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(1):70-74.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.01.012

# 山羊 *MC1R* 基因克隆、表达及其多态性研究

李隐侠,张俊,钱勇,孟春花,王慧利,钟声,曹少先

(江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业种质资源保护与利用平台,江苏南京 210014)

**摘要:**为研究黑色素皮质素受体 1 (*MC1R*) 基因与山羊毛色形成的相关性,以苏淮山羊和波尔山羊为研究对象,克隆测序获得了山羊 *MC1R* 基因编码区全序列,实时定量荧光 PCR (Real-Time PCR) 检测其在苏淮山羊和波尔山羊耳组织中的表达水平,DNA 池方法筛选其在山羊群体中的 SNPs 位点。结果发现,*MC1R* 基因在苏淮山羊中全长 954 bp,编码 317 个氨基酸残基。波尔山羊和苏淮山羊 *MC1R* 基因核苷酸和氨基酸序列一致性为 99.79% 和 98.77%;系统进化分析发现,波尔山羊与苏淮山羊聚在一起后再与绵羊聚在一起。在苏淮山羊群体中发现 183C/T 和 748T/G 2 个突变位点,在波尔山羊群体中检测到 701G/A 突变。*MC1R* 基因在波尔山羊耳组织中的表达水平高于苏淮山羊,但差异不显著。该研究显示 *MC1R* 基因可能在调控山羊毛色形成中发挥一定的作用。

**关键词:***MC1R* 基因;实时定量荧光 PCR (Real-Time PCR);被毛;苏淮山羊;波尔山羊

**中图分类号:**S827.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)01-0070-05

*MC1R* (melanocortin-1 receptor, *MC1R*) 基因,也称促黑素细胞激素受体 (*MSHR*) 基因,在哺乳动物中由毛色扩展 (extension) 位点编码,为 G 蛋白偶联受体黑素皮质素受体 (melanocortin receptors, MCRs) 超家族成员之一,只有 1 个编码区,编码蛋白有 7 个跨膜结构域<sup>[1-2]</sup>。研究表明,*MC1R* 基因是控制动物黑色素合成的重要基因,其与编码刺鼠信

号蛋白 (Agouti) 的基因一起调控动物色素合成的数量和分布,从而对动物的毛色形成起到非常重要的作用<sup>[3-4]</sup>。

研究表明,*MC1R* 基因位点的多态性与哺乳动物包括大鼠<sup>[2]</sup>、牛<sup>[5]</sup>、马<sup>[6]</sup>、猪<sup>[7]</sup>、绵羊<sup>[3]</sup>、山羊<sup>[8]</sup> 毛色变异都有很大的相关性。在家畜中,沼泽水牛与白沼泽水牛在 476、618、881、930、931 bp 位点上分别发生了 T/C、G/C、G/A、G/A、A/G 突变,导致沼泽水牛和白沼泽水牛第 159 位氨基酸由丝氨酸变成苯丙氨酸,第 310 位氨基酸由谷氨酸变成丙氨酸,第 294 位氨基酸由天冬氨酸变成丙氨酸,发生了非同义突变<sup>[5]</sup>。在绵羊中 *MC1R* 位点鉴定出 2 个等位基因  $E^D$  和  $E^+$ <sup>[9-10]</sup>, Vage 等研究表明, *MC1R* 中 p. M73K 和 p. D121N 位点是控制黑色性状显著的

收稿日期:2018-11-28

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFD0501902-2);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(18)3004]。

作者简介:李隐侠(1979—),女,河南固始人,博士,副研究员,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:liyhmh@126.com。

通信作者:曹少先,博士,研究员,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:caoshaoxian@163.com。

Evolution,1999,16(2):165-172.

[6] 闫洪波,葛文雅,杨坤,等. 鸭梨肌动蛋白 2 基因克隆和表达分析[J]. 河北农业大学学报,2012,35(1):27-30.

[7] 崔力文,郑婷,张克坤,等. 葡萄 *Actin* 基因家族的鉴定及进化和表达分析[J]. 植物资源与环境学报,2017,26(3):1-10.

[8] 孟玉平,张洁,张春芬,等. 枣树肌动蛋白基因 cDNA 片段的克隆及表达分析[J]. 生物技术通报,2009(11):98-102,107.

[9] 颜凤霞,文晓鹏,高国丽,等. 火龙果 *Actin* 及 *UBQ* 内参基因片段的克隆及序列分析[J]. 贵州农业科学,2013,41(9):1-4.

[10] 徐碧玉,苏伟,张建斌,等. 香蕉果实 SMART cDNA 文库的构建及利用 PCR 方法筛选香蕉 *Actin2* 基因[J]. 热带亚热带植物学报,2005,13(5):375-380.

[11] 翟衡,史大川,束怀瑞. 我国苹果产业发展现状与趋势[J].

果树学报,2007,24(3):355-360.

[12] 王孟东,杨金宇,黄海娜,等. ‘砀山酥梨’褐皮芽变中两个 *ERF* 基因的克隆与表达分析[J]. 热带亚热带植物学报,2015,23(4):379-385.

[13] 张文颖,王晨,朱旭东,等. 葡萄全基因组 DELLA 蛋白基因家族鉴定及其应答外源赤霉素调控葡萄果实发育的特征[J]. 中国农业科学,2018,51(16):3130-3146.

[14] 程杰,张新圣,李安琪,等. 番茄果实成熟过程中 *SISWEET7a* 的功能分析[J]. 中国农业科学,2018,51(15):2958-2968.

[15] 琚泽亮,赵桂琴,周向睿. 燕麦 *Actin* 基因片段的克隆及序列分析[J]. 甘肃农业大学学报,2016,51(3):37-42.

[16] 李宁宁,王雪,郑琳琳,等. 绵刺肌动蛋白基因的分离及特性分析[J]. 基因组学与应用生物学,2017,36(6):2548-2556.