

实时定量 PCR 检测豌豆黄化苗中肌动蛋白异型体 II 的表达

张少斌¹, 赵依诗¹, 刘曦¹, 汪澈¹, 刘国琴²

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院 辽宁 沈阳 110161; 2. 植物生理学与生物化学国家重点实验室 北京 100094)

摘要: 以 18S rRNA 为内参照基因, 利用实时定量 PCR 方法检测了豌豆黄化苗在生长过程中肌动蛋白异型体 II (*PEAcII*) 的表达情况。结果表明: 豌豆黄化苗中 *PEAcII* 的表达量在检测的第 1 小时明显升高, 约为起始表达量的 2 倍。随着培养时间延长, 表达量下降, 第 12 小时的表达量约为起始表达量的 0.6 倍。与光照培养下的正常苗相比, 黄化苗中 *PEAcII* 的表达量较高, 在检测的第 8 小时, 约为正常苗表达量的 2.4 倍。该试验建立的实时定量 PCR 方法可有效地用于豌豆肌动蛋白异型体基因表达的定量分析。

关键词: 豌豆; 肌动蛋白异型体; 黄化苗; 实时定量 PCR

中图分类号: Q 522 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0110-04

自从阎龙飞等在烟草和南瓜维管束中发现植物中存在收缩蛋白^[1]、Condeelis 证明在孤挺花的花粉管和原生质体中存在肌动蛋白以来^[2], 陆续在小麦胚芽^[3]、大豆幼苗^[4]、番茄果肉^[5]、玉米黄化苗线粒体^[6]、绿豆和花椰菜线粒体^[7]中都发现了肌动蛋白的存在。目前, 已经认识到肌动蛋白广泛存在于植物界^[8], 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、茎形成层等组织中都存在肌动蛋白^[9]。植物肌动蛋白是微丝的主要组分, 在各种肌动蛋白结合蛋白的调节下, 几乎参与细胞内所有的生理活动, 如: 细胞形状的维持、胞质环流、细胞与细胞器运动、细胞分裂与分化、细胞内物质运输、细胞信号转导等^[10]。

植物肌动蛋白是由肌动蛋白多基因家族编码的, 因而产生了多种肌动蛋白异型体^[8]。在拟南芥中克隆了 10 个肌动蛋白异型体基因, 其中 8 个在植物体内大量表达并表现出特定的功能。根据其不同的时空表达模式, 将 8 个异型体基因分为营养型和生殖型^[11]。不同肌动蛋白异型体具有不同的生物功能。有研究表明, *ACT7* 在正常愈伤组织形成过程中发挥着重要作用^[12], *ACT2* 在根毛的突出位点选择以及根尖的顶端生长中有重要作用^[13]。Cao 等从豌豆卷须的 cDNA 文库中克隆了 18

个肌动蛋白异型体基因^[14]。根据限制性内切酶酶切图谱, 将它们分为 I 类(*PEAcI*)、II 类(*PEAcII*)和 III 类(*PEAcIII*)异型体^[15]。豌豆三类肌动蛋白异型体基因在根、茎、叶、卷须、花粉和幼嫩果实中均表达, 但在发育时间上以及表达强度上存在明显差异, 而且具有明显的组织特异性^[16]。

目前有关肌动蛋白异型体表达特异性的研究主要集中在不同组织器官和不同发育阶段的差异, 使用的试验方法也主要是传统半定量 RT-PCR 和 Southern blotting 等, 定量的准确性有限。现采用实时定量 PCR 技术, 以 18S rRNA 为内参照基因, 研究了豌豆黄化苗中肌动蛋白异型体 *PEAcII* 的表达情况。一方面为研究黑暗或弱光条件下, 肌动蛋白异型体在豌豆萌发和幼苗生长过程中的作用提供理论依据, 另一方面建立的实时定量 PCR 体系也为定量研究其他相关基因的表达提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

豌豆 (*Pisum sativum*) 为中豌 4 号, 由该实验室保存。大肠杆菌 XL-BULE 菌株由该实验室保存, 载体 pGEM-T easy 购自 Promega 公司。

主要试剂: TRIZOL, M-MLV, MOPS, DNase I 购自 Promega 公司, HRPI, dNTP, SYBR Premix Ex Taq 购自 Takara 公司, Taq DNA 聚合酶, 凝胶回收试剂盒等购自上海生物工程公司。

1.2 试验方法

1.2.1 材料培养 豌豆种子经蒸馏水充分洗涤, 70%乙醇消毒 1 min, 无菌水冲洗, 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 15 min, 无菌水反复冲洗, 在无菌水中吸胀 2 h, 然后盖上湿润的无菌纱布, 每 8 h 用无菌水洗 1 次, 25℃ 暗培养

第一作者简介: 张少斌(1973-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事生化与分子生物学相关的教学与科研工作, 研究方向为植物细胞骨架。E-mail: zsb20022001@yahoo.com.cn

通讯作者: 刘国琴(1956-), 女, 博士, 教授, 研究方向为植物细胞骨架。E-mail: liu@cau.edu.cn

基金项目: 植物生理学与生物化学国家重点实验室开放课题资助项目(PPB08003); 辽宁省教育厅资助项目(2008663); 沈阳农业大学中青年导师基金资助项目(2007001)。

收稿日期: 2009-12-31

72 h, 此时已经长出胚芽和胚根(去掉子叶的重量在 50~100 mg), 此时开始取样, 同时取出一半放在光下培养作为对照。分别在 0、0.5、1、2、4、8、12 h 取样。每个处理选取 3 株生长良好, 根和芽长势均衡的幼苗, 称重后液氮速冻, 置 -80°C 冰箱保存备用。

1.2.2 总 RNA 的提取 将去掉子叶的胚芽和胚根, 迅速加液氮冷冻研磨成细粉末状, 按照 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA, 提取的 RNA 再经 DNaseI 处理(按照试剂盒说明), 用 NanoDrop 核酸蛋白微量测定仪 ND 1000 测定其浓度和纯度, 最后用经 DEPC 处理过的 ddH₂O 将 RNA 浓度稀释到 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 部分产物直接用于反转录, 其余置 -80°C 冰箱保存备用。

1.2.3 反转录合成 cDNA 第一链 取各样品 RNA 1 μL (1 μg), 加入 1 个 DEPC 处理过的离心管中, 再加 ddH₂O 7.5 μL , Oligo-d(T)16 1 μL (1 μg), HRPI 0.5 μL , 65°C 加热 10 min, 冰浴冷却 2 min, 再加 5 \times 第一链缓冲液 3 μL , 10 mmol/L dNTPs 1.5 μL , M-MLV 逆转录酶 0.5 μL (100 U), 轻轻混匀, 42°C 孵育 90 min; 95°C 加热 5 min 终止反应, 降温到 4°C 后, 部分产物直接用于 PCR, 其余置 -80°C 冰箱保存备用。

1.2.4 *PEAcII* 和 18S rRNA 基因的克隆 根据 GenBank 查询的序列设计引物, 引物合成由上海生工生物工程有限公司完成; *PEAcII* 基因的引物上游为: 5'-TTGGAAACTGCTAAGACTAGCTCAGC-3'; 下游为: 5'-GAACATTGTGGAACCACTCAAG-3', 产物长度 242 bp。18S rRNA 的引物上游为: 5'-CCAGGTC-CAGACATAGTAAGGATTG-3' 下游为: 5'-CGGTGTG-TACAAAGGGCAGG-3', 产物长度 432 bp。取上述逆转录产物 1 μL , 加入上下游引物进行 PCR 反应, 于 94°C 预变性 5 min; 95°C 变性 20 s, 60°C 退火 20 s, 72°C 延伸 20 s 共 30 个循环; 72°C 充分延伸 5 min, 用于 PCR 扩增。扩增产物经过凝胶回收, 与 pGEM-T easy 连接, 重组质粒转化大肠杆菌 XL-BLUE 感受态细胞, 经菌落 PCR 及抽提质粒 PCR 鉴定正确后, 阳性菌株送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.5 荧光定量 PCR 荧光定量 PCR 在 ABI 7500 Real-Time PCR System 上进行。在定量 PCR 专用的反应管中加入 SYBRPremix EX Taq 10.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物各 0.4 μL , ROX Reference Dye II 0.4 μL , 各反应管中加入 RT 产物 cDNA 各 2 μL , 总反应体系为 20 μL , 每个样品做 3 次重复。采用二步法 PCR 扩增标准程序: 95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 5 s, 60°C 复性和延伸 34 s 40 个循环。结束后做 $95\sim 60^{\circ}\text{C}$ 的熔解曲线分析。反应结束后通过荧光定量 PCR 仪给出的 C_t 值, 利用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t} = [(C_t \text{ 目标} - C_t \text{ 内参}) \text{ time-X} - (C_t \text{ 目标} - C_t \text{ 内参}) \text{ time-Y}]$ 计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取

提取 RNA 的 A_{260}/A_{280} 均在 2.0 左右, 初始浓度在 1.6~3.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (数据未给出), 经过甲醛变性电泳分析较为完整(如图 1), 可用于进一步试验。将 1 μg RNA 进行反转录获得 15 μL cDNA, 用作荧光定量 PCR 的模板。

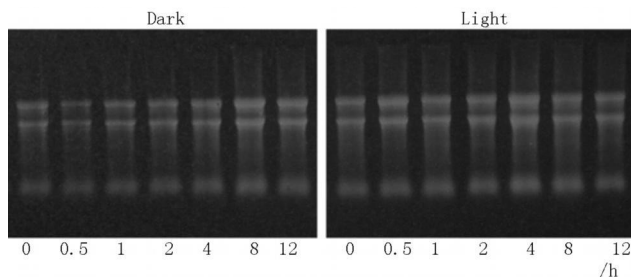


图 1 样品 RNA 的电泳

2.2 PCR 扩增 *PEAcII* 和 18S rRNA 特异性与重复性

利用设计的 *PEAcII* 引物, 以实验室保存的 *PEAcI* (*PEAcI*) 和 *PEAcIII* (*PEAcI4*) 质粒为模板进行扩增, 没有扩增信号(数据未给出), 说明 *PEAcII* 扩增的特异性。*PEAcII* 和 18S rRNA 的扩增曲线如图 2 所示, 样品在 15~25 个循环之间处于指数扩增期。扩增产物的溶解曲线(如图 3)显示为 1 个峰值, 也说明了扩增产物为均一的目标产物, 没有非特异性扩增产物。试验设置的 3 次重复的 C_t 值差异很小, 经过计算的基因相对表达量标准偏差在 0.02~0.06 之间(如图 4), 表明试验的重复性较好。

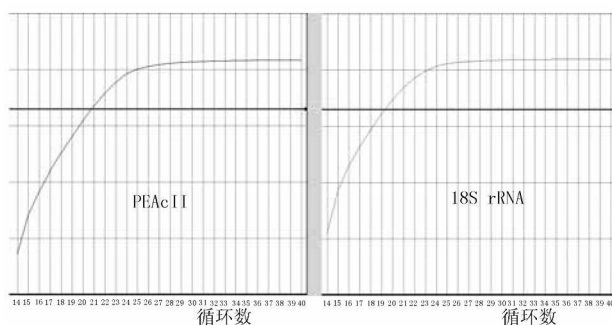
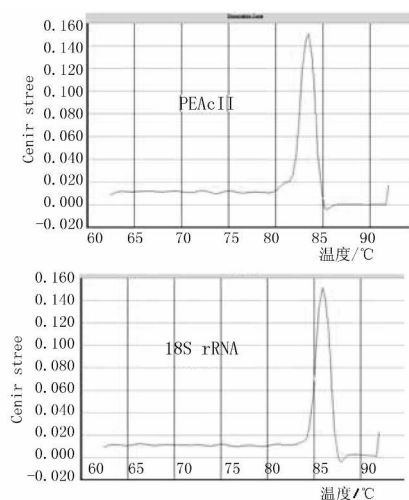
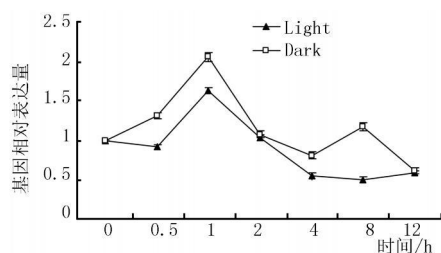


图 2 *PEAcII* 和 18S rRNA 的扩增曲线

2.3 *PEAcII* 基因相对表达量检测

豌豆苗在暗处培养 72 h 后开始检测 *PEAcII* 相对表达量。利用荧光定量 PCR 仪给出的 C_t 值, 利用公式计算基因的相对表达量, 如图 4 所示。

由图 4 可知, 暗培养的黄化苗在检测的第 1 小时, *PEAcII* 相对表达量明显增加, 约为起始表达量 2 倍, 而后表达量下降, 在检测的第 12 h 叶表达量约为起始表达

图3 *PEAcII* 和 18S rRNA 的溶解曲线图4 *PEAcII* 和 18S rRNA 相对表达量

量的 0.6 倍。同时在光照条件下培养的正常苗中, *PEAcII* 相对表达量的变化趋势基本与黄化苗相同, 但表达量略低于黄化苗, 尤其在检测的第 8 小时, 黄化苗 *PEAcII* 相对表达量约为正常苗表达量的 2.4 倍。

3 结论与讨论

在 PCR 反应过程中, 每增加 1 轮循环, 理论上目标基因增加 1 倍, 随着循环数增加, 目标基因以指数方式扩增, 但是, 当目标基因达到一定数量后, 目标基因不再以指数方式增长, 从而进入平台期。因此, 在传统半定量 RT-PCR 中, 通过比较 PCR 终产物的方法来表示起始模板数目的差异就可能产生一定的误差。在实时荧光定量 PCR 中, 荧光染料 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后会发出荧光, 随着循环数增加, 荧光强度不断增加, 因此, 通过检测反应体系中 SYBR Green I 的荧光强度就可以检测目标基因扩增的过程。这样, 可以在 PCR 反应处于指数期的某一点时来检测 PCR 产物的量, 并且由此来推断模板最初的含量, 这样的定量结果更为准确^[17]。将每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数定义为 *Ct* 值 (*Cycle threshold*)。 *Ct* 值与该反应管内模板的初始拷贝数的对数为线性关系, 利用已知初始拷贝数的标准品制作标准曲线, 通过未知样

品的 *Ct* 值, 就可从标准曲线上计算出该样品的初始拷贝数, 这既为绝对定量。在没有标准品的情况下, 也可通过比较样品的 *Ct* 值进行相对定量。实时荧光定量 PCR 技术具有高扩增效率, 高扩增灵敏度, 高扩增特异性, 实时定量等优点。该试验就是通过相对定量的方法比较了光照和黑暗培养条件下豌豆幼苗 *PEAcII* 的表达量差异。为减少试验操作造成的误差, 在配制荧光定量 PCR 反应体系时, 先将 SYBR Green I, ROX Reference Dye II, 上下游引物 and 无菌水混匀, 然后分装到 96 孔 PCR 板中, 最后再加入模板, 同时每个样品做 3 次重复, 以上所有操作均在冰上进行, 加完样品后, 使用离心机对 PCR 板进行轻微离心, 以使反应混合液均沉降在 PCR 管底部, 同时排除气泡。

目前, 植物肌动蛋白常常作为内参照基因用于研究其它基因的相对表达量, 而实时荧光定量 PCR 技术用于植物基因相对表达量的报道较少^[18]。该试验首次运用此技术对萌发 3~4 d 的豌豆幼苗中 *PEAcII* 在转录水平上的相对表达量进行分析, 研究结果表明 *PEAcII* 的表达量是一个动态变化的过程, 在黑暗条件下, 该基因的表达量有所增加。已知植物肌动蛋白与花粉管细胞的伸长密切相关, 而豌豆黄化苗相对于正常苗, 植株长的更高, 因此, *PEAcII* 可能与黄化苗的细胞伸长密切相关, 详细作用机理有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 阎隆飞, 石德权. 高等植物中的收缩蛋白[J]. 生化与生物物理学报, 1963(3): 490-495.
- [2] Condeelis J S. The identification of F-actin in the pollen tube and protoplast of *amaryllis belladonna* [J]. *Expt Cell Res* 1974; 88: 435-439.
- [3] Ilker R A, Breidenbach R W, Murphy T M. Partial purification of actin from wheat germ. [J]. *Phytochemistry* 1979; 18: 1781-1783.
- [4] Metcalf T N, Szabo L J, Schubert K R et al. Immunochemical identification of an actin-like protein from soybean seedlings [J]. *Nature*, 1980; 285: 171-172.
- [5] Vahey M, Titus M R, Trautwein, et al. Tomato actin and myosin: Contractile proteins from a higher land plant [J]. *Cell Motility*, 1982(2): 131-147.
- [6] 阎隆飞, 邹喻萍, 李复生, 等. 玉米线粒体中的肌动蛋白[J]. 科学通报, 1982(4): 244-246.
- [7] 阎隆飞, 邹喻萍, 张和民, 等. 植物线粒体中的肌动蛋白[J]. 生物化学与生物物理学报, 1984; 16(4): 23-28.
- [8] 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): 1-12.
- [9] Lloyd C W. The plant cytoskeleton [J]. *Curr Opin Cell Biol* 1989(1): 30-35.
- [10] Vidali L, Gisbergen P A C, Guerin C, et al. Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth [J]. *PNAS*, 2009; 106(32): 13341-13346.
- [11] Kandasamy M K, McKinney E C, Meagher R B. Functional nonequivalency of actin isoforms in *Arabidopsis* [J]. *Mol Biol Cell*, 2002(13): 251-261.

快速微量提取番茄 DNA 及 SSR-PCR 反应体系的优化

贾俊忠¹, 田丽萍², 位江静¹, 张超¹, 魏亦农¹, 吴晓刚¹

(1. 石河子大学 生命科学院 新疆 石河子 832000 2. 石河子大学 药学院 新疆 石河子 832000)

摘要:以番茄叶片为试材,采用改进的 CTAB 法,电钻研磨,提取过程中加入醋酸铜,设计 4 因素 3 水平的正交试验对 PCR 反应体系进行优化,同时利用梯度 PCR 对退火温度进行选择选择。结果表明:优化的 10 μ L 反应体系含:1 \times buffer, 1.2 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 mmol/L dNTPs, 1.2 μ mol/L 引物, 0.75 U *Taq* DNA 聚合酶, 10 ng 模板 DNA。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 49.2 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。优化的反应体系可以用于 SSR 分子标记机的研究,在所有 SSR 引物中基本都能有效扩增;改进的 CTAB 法提取的 DNA 纯度更高。

关键词:番茄;DNA 微量提取;PCR 反应体系优化;分子标记

中图分类号:S 641.203.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2010)08-0113-03

第一作者简介:贾俊忠(1983-),男,山西人,硕士研究生,从事生物化学与分子生物学的研究。

通讯作者:薛琳(1964-),男,研究员,硕士生导师,主要从事蔬菜分子标记的研究。

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BA B01 A7-3-09)。

收稿日期:2010-01-11

分子标记辅助育种已成为现代番茄育种中一种极为重要的辅助工具。遗传连锁图谱的绘制, QTL 等分子标记工,常常需要在短期内对几百甚至上千株植物提取 DNA^[1],因此采用一种快速、高效的 DNA 提取方法非常重要^[25]。现利用电钻研磨,采用改进的 CTAB 法,加入醋酸铜,有效地去除了植物叶片中含有的酚类物质,防止了 DNA 褐化,在棉花中同样适用^[68]。利用 SSR 分子

[12] Kandasamy M K, Gilliland L U, McKinney E G et al. One plant actin isoform, ACT7, is induced by auxin and required for normal callus formation [J]. *Plant cell* 2001(13): 1541-1554.

[13] Nishimura T, Yokota E, Wada T, et al. An Arabidopsis ACT2 Dominant-Negative Mutation which Disturbs F-actin Polymerization, Reveals its Distinctive Function in Root Development [J]. *Plant Cell Physiol* 2003; 44: 1131-1140.

[14] Cao X F, Wang R C, Yen L F et al. Construction of a pea tendrill cDNA library and sequence analysis of a pea actin cDNA, PEA cI [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1994, 39(4): 332-337.

[15] 胡松年, 阎隆飞. 豌豆卷须肌动蛋白 II 类异型体 cDNA 克隆的序列分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* 1999 15(6): 857-860.

[16] Jiang Y Q, Zhao W L. Expression and phylogenetic analysis of pea actin isoforms [J]. *Acta Botanica Sinica* 2002 44(12): 1456-1461.

[17] Gibson U E, Heid C A, Williams P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR [J]. *Genome Res* 1996, 6(10): 995-1001.

[18] 朱华, 吴耀生. 实时荧光定量 PCR 检测三七 SS 基因表达的初步实践 [J]. *广西植物*, 2008, 28(5): 703-707.

Quantitative Detection of Actin Isoform(*PEAcII*) Gene Expressions in Etiolated Seedling of Pea (*Pisum sativum*) by Real-Time PCR Analysis

ZHANG Shao-bin¹, ZHAO Yi-shi¹, LIU Xi¹, WANG Che¹, LIU Guo-qin²

(1. Biological Science and Technology College, Shenyang Liaoning Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161; 2. State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: Actins are considered the important genes in many living activities. A relative quantification method for gene expression in pea using real-time PCR analysis was established, and the expression of actin isoform PEA cII genes in etiolated seedling was determined using 18S rRNA as the reference gene. The results indicated that the expression level at 1 h become high about 2 times of that at beginnings. With time elapsed, the expression level become down, and the expression level at 12 h become low about 0.6 times of that at beginnings. The expression level of PEA cII in etiolated seedling was higher than that in normal seedling in light, and which was about 2.4 times at 8 h. The method in this experiment could be effectively used to detect actin isoforms gene expression quantitatively in pea.

Key words: pea; actin isoform; etiolated seedling; real-time PCR