

豌豆肌动蛋白异型体 *PEAc3* 在不同干旱条件下的表达分析

张美华, 崔月, 张少斌

(沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以豌豆幼苗为试材,采用半定量和实时荧光定量 RT-PCR 技术,研究了不同浓度 PEG 6000 对肌动蛋白异型体 *PEAc3* 表达的影响,为深入了解豌豆幼苗抗旱分子机理以及筛选耐旱豌豆品种奠定基础。结果表明:与正常供水处理相比,15% PEG 6000 处理下 *PEAc3* 基因的表达量略有升高,20% PEG 6000 处理下 *PEAc3* 基因的表达量显著升高,低于 10% PEG 6000 处理, *PEAc3* 的表达量基本没有变化,而 25% PEG 6000 处理下 *PEAc3* 基因的表达量则有所下降。不同干旱条件下 *PEAc3* 基因表达量不同这一结果表明, *PEAc3* 基因可能参与豌豆幼苗适应干旱胁迫的生理生化过程,该基因有可能用于豌豆抗旱性强弱的分子筛选。

关键词:豌豆;肌动蛋白异型体;实时荧光定量 RT-PCR

中图分类号:S 643.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0107-04

肌动蛋白最早是在动物肌肉细胞中发现的,是参与肌肉收缩运动的主要蛋白质之一,在进化上其序列和功能非常保守^[1-2],目前已知肌动蛋白在植物、动物、微生物等各类生物细胞中广泛存在^[3]。阎隆飞等^[4]首次在烟草、南瓜的维管束中以及黑藻的叶片中发现肌动蛋白的存在,标志着植物肌动蛋白

研究的开始。肌动蛋白存在于植物细胞的细胞骨架中,是构成细胞骨架的主要组成成分,在植物的生长发育和形态构建过程中发挥至关重要的作用^[5]。在植物中,通过微丝定位和肌动蛋白抑制剂特异性处理确定了肌动蛋白的部分功能,它是微丝的主要组分^[6],在肌动蛋白结合蛋白的调控下指导细胞伸长与分裂、胞吞作用、细胞信号传导、重力感应、顶端生长以及细胞程序性死亡等细胞内重要的生理活动^[5,7-8]。肌动蛋白还具有马达驱动性,它在驱使细胞器的运动和细胞质的流动中发挥重要作用^[9]。花粉是肌动蛋白的丰富来源,它在该组织中占可溶性蛋白质的 2%~20%,顶端花粉管中生殖细胞和膜囊泡也是受到肌动蛋白的驱动才得以移动^[10]。

高等植物肌动蛋白的编码和调节受多个基因家

第一作者简介:张美华(1990-),女,河南商丘人,硕士研究生,研究方向为植物生物化学与分子生物学。E-mail:601849776@qq.com.

责任作者:张少斌(1973-),男,辽宁彰武人,博士,副教授,现主要从事蛋白质工程与作物生物技术等研究工作。E-mail:zsb010024@163.com.

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(2013020072)。

收稿日期:2016-12-16

Abstract: Seeds, seedling and plantlets of *Prunus sibirica* were used as materials and treated by different concentrations of wood vinegar, to study the effects of wood vinegar on the rapid propagation of *Prunus sibirica*. The germination rate, germination energy and the root comprehensive quality were calculated. The results showed that, the effect was obvious on seed germination and plantlet rooting, 3 000 times dilution of wood vinegar was the best on plantlet rooting, 700 times dilution of wood vinegar was the best on seed germination; the germination rate was 76.67%, 500 times dilution of wood vinegar was the best on seedling rooting when the sand was used as substrate. There was no significant difference between treatments when the substrates were edible fungus and waste tailings mixed with 1:1.

Keywords: wood vinegar; *Prunus sibirica*; rapid propagation

族控制,因此一种植物中存在多种异形体^[11],如拟南芥中有 10 个肌动蛋白异形体,其中 8 个能够大量表达且具有功能特异性^[12]。豌豆中的肌动蛋白异型体分为 3 类,即 PEA_c I(I类)、PEA_c II(II类)和 PEA_c III(III类),它们表达于不同的组织器官中,且在表达时间和表达水平上存在明显差异^[13]。

植物肌动蛋白骨架已被证明在植物激素、生物和非生物胁迫响应中发挥重要作用^[14-15]。KATAM 等^[16]研究表明,花生受到干旱胁迫时,肌动蛋白(ACT12)表达量提高 2.33 倍,肌动蛋白异型体 B 表达量提高 3.23 倍。HUANG 等^[17]将水稻 *O_sADF3* 基因转入拟南芥过表达,在干旱条件下提高了水稻的发芽率、主根长度和存活率,表明 *O_sADF3* 基因能提高植物的抗旱性。张少斌等^[18]研究表明,PEG 模拟干旱条件下豌豆肌动蛋白异型体 PEA_cII 基因的表达量与对照相比发生了显著变化,说明 PEA_cII 基因含量的改变可能是为了缓解豌豆幼苗因失水造成的影响,帮助幼苗适应干旱胁迫。全球范围内干旱严重,已大大影响了植物的生长和生存,严重降低了作物产量。水分缺乏会诱导植物一系列的形态、结构、生理生化和分子上的反应,造成植物机能受损^[19]。为深入探讨豌豆幼苗抗旱的分子机制,该试验采用不同浓度 PEG 6000 处理豌豆幼苗,以 18S rRNA 基因为内参基因,研究豌豆肌动蛋白异型体 PEA_c3 的表达量高低与干旱程度之间的关系,以期研究豌豆肌动蛋白异型体的抗旱功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“中豌 4 号”豌豆(*Pisum sativum*)由沈阳农业大学生物化学实验室保存。

RNA 提取所用的 Trizol、cDNA 逆转录合成试剂盒、DNA 降解所用的 DNase I 均购自 Promega 公司,聚合酶链式反应(PCR)所用试剂(dNTP, *Taq* DNA Polymerase)、琼脂糖凝胶 DNA 胶回收试剂盒等购自上海生工生物工程有限公司。

供试载体和菌株:克隆载体 pGEM-T easy 购自 Promega 公司,大肠杆菌克隆菌株 XL-BLUE 由该实验室保存。

1.2 试验方法

豌豆培养与干旱处理:参照张少斌等^[18]的方法对豌豆种子进行预处理和萌发。对萌发生长 72 h 的豌豆幼苗进行干旱处理 24 h,所用的聚乙二醇 6000 (PEG 6000)浓度分别为 0%(CK)、5%、10%、15%、

20%和 25%。处理后的豌豆苗用液氮速冻后放在 -80 °C 冰箱保存。

豌豆 RNA 的提取并反转录为 cDNA:豌豆总 RNA 的提取采用 Trizol 法, RNA 的纯化与鉴定参照张少斌等^[18]的方法进行。cDNA 的合成按照试剂盒说明书进行。

豌豆肌动蛋白异型体 PEA_c3 基因表达量分析:参照张少斌等^[18,20]的方法进行 PCR 引物设计与 PEA_c3 的半定量 RT-PCR 分析,以 1 μL 逆转录产物为模板,扩增 30 个循环,将 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,参照张少斌等^[21]的方法进行 PEA_c3 的实时荧光定量 RT-PCR 分析,以 18S rRNA 作为内参基因,利用实时荧光定量 PCR 仪(ABI7500)给出的 Ct 值,利用标准公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出 PEA_c3 的相对表达量^[21],分析不同 PEG 6000 浓度模拟干旱条件下 PEA_c3 基因的表达量变化。

2 结果与分析

2.1 豌豆幼苗总 RNA 的提取与鉴定

采用 Trizol 法提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定纯度在 $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,将浓度统一调整为 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,经琼脂糖甲醛变性电泳检测,结果如图 1 所示,各个样品均含有典型的真核生物 3 条主要 RNA 条带,分别为 28S、18S 和 5S rRNA,条带较为清晰完整,可用于后续 RNA 定量分析试验,利用逆转录酶合成互补 cDNA 后,作为半定量和荧光定量 PCR 的模板。

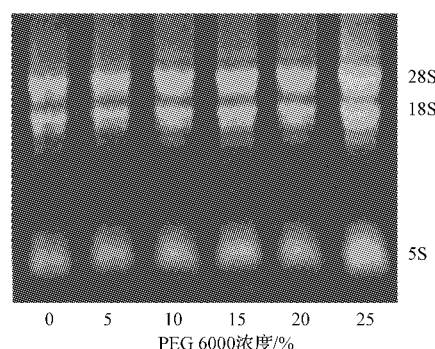


图 1 干旱条件下豌豆总 RNA 电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis of pea RNA under drought condition

2.2 半定量 RT-PCR 检测 PEA_c3 的表达

由图 2 可知,不同 PEG 6000 浓度条件下, PEA_c3 条带亮度不同。为了精确定量,进一步使用生物信息学分析软件 Quantity-one 对比了 PEA_c3 相对于 18S rRNA 的相对表达量。从图 3 可以看出,

PEG 6000 模拟干旱条件下, *PEAc3* 表达量与 PEG 6000 浓度密切相关, 与正常供水(PEG 6000 浓度为 0)相比, 在 5%、10% 和 25% PEG 6000 条件下 *PEAc3* 表达量变化较小, 但在 15%、20% PEG 6000 条件下 *PEAc3* 表达量显著升高, 尤以 20% PEG 6000 条件下 *PEAc3* 的表达量达到最高。

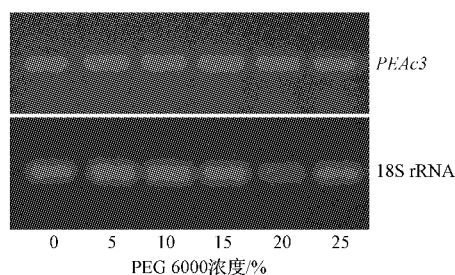


图 2 RT-PCR 扩增 18S rRNA 和 *PEAc3* 的凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of 18S rRNA and *PEAc3* amplified by RT-PCR

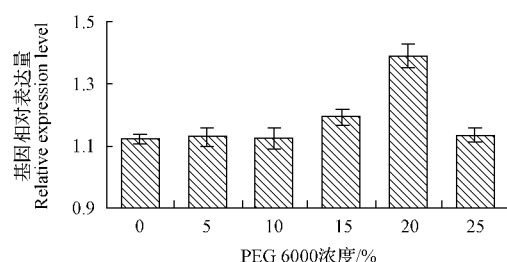


图 3 不同浓度 PEG 6000 条件下 *PEAc3* 的相对表达量

Fig. 3 Relative expression level of *PEAc3* under different concentration of PEG 6000

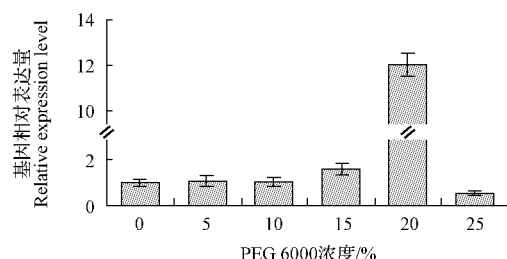


图 4 实时荧光定量 PCR 检测 *PEAc3* 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of *PEAc3* using real-time PCR

2.3 实时荧光定量 PCR 分析 *PEAc3* 的表达

在半定量 RT-PCR 基础上, 进一步采用实时荧光定量 PCR 的方法, 分析 *PEAc3* 在干旱条件下表达变化。由图 4 可以看出, *PEAc3* 表达量变化趋势基本与半定量 RT-PCR 相似, 但结果更为精确。与正常供水(PEG 6000 浓度为 0)相比, 15% PEG 6000 条件下, *PEAc3* 表达量提高近 2 倍, 而在 20% PEG 6000 处理条件下, *PEAc3* 表达量提高近 12 倍。而当

PEG 6000 浓度为 25% 时 *PEAc3* 表达量则有所降低, 此时豌豆苗已开始枯萎, 不能正常生长。

3 结论与讨论

传统上认为肌动蛋白是具有许多细胞质功能的丰富的细胞骨架蛋白。然而, 肌动蛋白可以与其它肌动蛋白相关蛋白相互作用来调节其在核质穿梭, 染色质重塑, 基因剪接^[22-24]和抗逆性表达调控功能中的动态性能。植物遭受干旱胁迫时, 由肌动蛋白构成的动态微丝骨架在细胞适应干旱胁迫的过程中发挥着至关重要的作用。KATARZYNA 等^[25]的研究表明, 在遭受干旱胁迫时大麦表皮质膜附近纵向排列的肌动蛋白微丝形成厚束, 肌动蛋白微丝在质膜下面组装, 为失水细胞提供物理支撑。肌动蛋白微丝的这种配置模式类似于垂直“张力纤维”, 这在细胞间期更容易调节细胞的形状和体积^[26], 从而提高了植株的抗旱性。

肌动蛋白微丝可以不断聚合与解聚, 植物气孔开关的运动正是得益于肌动蛋白微丝的这一可逆特性, 当植物遭受干旱胁迫时, 通过调节微丝的状态关闭表皮的气孔, 从而减少水分的流失^[27]。可见, 肌动蛋白的表达量及表达方式与植物抗旱性强弱具有密不可分的关系。然而, 由于肌动蛋白的高度保守性, 在以往的研究中多被用于内参基因, 关于其参与植物抗逆性的研究很少。该研究利用半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 技术检测发现, 豌豆肌动蛋白异形体 *PEAc3* 基因的表达量随干旱程度的变化而变化, 随着 PEG 浓度增大, *PEAc3* 基因表达量呈现先升高后下降的表达模式。在一定干旱胁迫范围内 *PEAc3* 的表达量会随着干旱程度的增大而上升, 过度干旱可能损害了植株的生理机能, 导致 *PEAc3* 的表达量下降。表明 *PEAc3* 可能在豌豆应答干旱胁迫的最初反应中起到了关键作用。因此, 可以通过比较 *PEAc3* 的表达模式及表达量筛选出抗旱性强的豌豆品种, 也可通过一定的科学方法提高 *PEAc3* 的表达量培育抗旱性强的豌豆新品种, 为今后的抗旱育种提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 李培培, 谢礼, 薛进, 等. 一个水稻 β -肌动蛋白基因的克隆及其亚细胞定位[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(6): 828-831.
- [2] UNLU A. Computational prediction of actin-actin interaction[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(1): 355-364.
- [3] 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.
- [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):490-495.

- [5] PEI W K, DU F, ZHANG Y, et al. Control of the actin cytoskeleton in root hair development[J]. Plant Sci, 2012, 187: 10-18.
- [6] STAIGER C J, SCHLIWA M. Actin localization and function in higher plants[J]. Protolasma, 1987, 141(1): 1-12.
- [7] LI J, HENTY-RIDILLA J L, HUANG S, et al. Capping protein modulates the dynamic behavior of actin filaments in response to phosphatidic acid in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2012, 24(9): 3742-3754.
- [8] SMERTENKO A, FRANKLIN-TONG V E. Organisation and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death[J]. Cell Death Differ, 2011, 18: 1263-1270.
- [9] WILLAMSON R E. Organelle movements[J]. Plant Mol Biol, 1993, 44: 181-202.
- [10] MASCARENHAS J P. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation[J]. Plant Cell, 1993, 5(10): 1303-1314.
- [11] KANDASAMY M K, MCKINNEY E C, ROY E, et al. Plant vegetative and animal cytoplasmic actins share functional competence for spatial development with protists[J]. The Plant Cell, 2012, 24(5): 2041-2057.
- [12] ORVAR B L, SANGWAN V, OMANN F, et al. Early steps in cold sensing by plant cells: Role of actin cytoskeleton and membrane fluidity[J]. Plant J, 2000, 23: 785-794.
- [13] JIANG Y Q, ZHAO W L. Expression and phylogenetic analysis of pea actin isoforms[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(12): 1456-1461.
- [14] SOLANKE A U, SHARMA A K. Signal transduction during cold stress in plants[J]. Physiol Mol Biol Plants, 2008, 14: 69-79.
- [15] DROBAK B K, FRANKLIN-TONG V E, STAIGER C T. The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling[J]. New Phytol, 2004, 163: 13-30.
- [16] KATAM R, SAKATA K, SURAVAJHALA P, et al. Comparative leaf proteomics of drought-tolerant and susceptible peanut in response to water stress[J]. Journal of Proteomics, 2016, 143: 209-226.
- [17] HUANG Y C, HUANG W L, HONG C Y, et al. Comprehensive analysis of differentially expressed rice actin depolymerizing factor gene family and heterologous overexpression of *OsADF3* confers *Arabidopsis thaliana* drought tolerance[J]. Rice, 2012, 5(33): 1-14.
- [18] 张少斌, 刘曦, 赵依诗, 等. 水分亏缺条件下豌豆肌动蛋白异型体 *PEAcII* 基因的表达[J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 1-4.
- [19] BARTELS D, SUNKAR R. Drought and salt tolerance in plants[J]. Crit Rev Plant Sci, 2005, 24: 23-58.
- [20] 张少斌, 王黎, 刘慧, 等. 豌豆肌动蛋白异型体基因的克隆及生物信息学分析[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(1): 50-53.
- [21] 张少斌, 赵依诗, 刘曦, 等. 实时定量 PCR 检测豌豆黄化苗中肌动蛋白异型体 II 的表达[J]. 北方园艺, 2010(8): 110-113.
- [22] CASTANO E, PHILIMONENKO V V, KAHLE M, et al. Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field[J]. Histochem Cell Biol, 2012, 133: 607-626.
- [23] RANDO O J, ZHAO K, CRABTREE C R. Searching for a function for nuclear actin[J]. Trends Cell Biol, 2000, 10: 92-97.
- [24] VARTIAINEN M K. Nuclear actin dynamics: From form to function[J]. FEBS Lett, 2008, 582: 2033-2040.
- [25] KATARZYNA S, EWA D, MARCIN R. Drought-induced changes in the actin cytoskeleton of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves[J]. Acta Physiol Plant, 2015, 37: 73.
- [26] KOMIS G, APOSTOLAKOS P, GALATIS B. Hyperosmotic stress-induced actin filament reorganization in leaf cells of chlorophyton comosum[J]. J Exp Bot, 2002, 53: 1699-1710.
- [27] HUANG F, WANG X C, LOU C H. Cytoskeletal inhibitors suppress the stomatal opening of *Vicia faba* L. induced by fusicoccin and IAA[J]. Plant Sci, 2000, 156: 65-71.

Expression Analysis of Pea Actin Isoform (*PEAc3*) Under Different Drought Conditions

ZHANG Meihua, CUI Yue, ZHANG Shaobin

(Biological Science and Technology College, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Pea seedlings were used as experimental materials, and the expression of *PEAc3* was studied under different concentrations of PEG 6000 by using semi quantitative RT-PCR and real-time fluorescence quantitative RT-PCR technique, which made a good foundation for understanding the molecular mechanism of drought resistance in pea seedlings and select pea cultivars of drought tolerant. The results showed that compared with the normal water supply, the expression of *PEAc3* gene was significantly increased under 20% PEG 6000 and a slight increase under 15% PEG 6000, and was not changed below 10% PEG 6000. However, the expression of *PEAc3* gene was decreased under 25% PEG 6000. The expression of *PEAc3* gene in different drought conditions showed that the *PEAc3* gene might be involved in the physiological and biochemical process of the pea seedling adaptation to drought stress, and the gene might be used for the molecular screening of the drought resistance of pea.

Keywords: pea; actin isoform; real-time fluorescence quantitative RT-PCR