

花椰菜 *BobACT* 基因的克隆及其作为内参基因的研究

林 琿, 朱海生, 温庆放, 黄丽芳

(福建省农业科学院作物研究所 / 福建省农业科学院蔬菜研究中心 / 福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要: 实时荧光定量 PCR 技术是探索植物基因功能和调节机理的有效手段。选择合适的内参基因是获得实时荧光定量 PCR 准确性数据的必备条件。*ACT* 基因高度保守且表达稳定, 常作为内参基因被广泛应用。为了获得花椰菜 *ACT* 基因, 以转录组测序和 RT-PCR 方法为手段克隆得到花椰菜肌动蛋白基因 *Actin*。该基因等电点为 5.395, 理论分子量为 41.77 kD; 其 cDNA 开放阅读框长 1134 bp, 编码氨基酸 377 个, GenBank 登录号为 MG598643。Wolf Psort 分析发现, *BobActin* 蛋白亚细胞定位于细胞质基质中。Motif Scan 分析显示, *BobActin* 蛋白质的氨基酸序列 4~377 位为 *Actin* 保守结构域。进化分析表明, 同源序列基因编码的蛋白质与同为十字花科的甘蓝、芜菁和油菜同源蛋白的相似性达到 90% 以上, 具有高度的保守性。在此基础上, 设计了 1 对荧光定量 PCR 引物, 分析显示, 该引物具有较高的特异性和扩增效率, 在花椰菜根、茎、花、花球、叶片等不同组织和低温、高温、盐处理、干旱处理、ABA 处理等胁迫处理下均能稳定表达, 适合在花椰菜基因表达研究中作为内参基因, 为开展花椰菜重要功能基因的挖掘、表达模式以及调控机理的研究提供参考。花椰菜在内参基因方面的研究还处于初步阶段, 今后可继续克隆其他内参基因, 丰富花椰菜的内参基因库, 从而进一步提高花椰菜基因表达分析研究的稳定性、重复性和准确性。

关键词: 花椰菜; *actin*; 基因克隆; 表达分析; 内参基因

Molecular Cloning of *Actin* Gene and Study on This Gene as Reference Gene in Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.)

LIN Hui, ZHU Hai-sheng, WEN Qing-fang, HUANG Li-fang

(Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013)

Abstract: Real-time fluorescence quantitative PCR is an effective method to quantify the transcriptional profile of target genes. Use of proximal gene as internal reference is essential when performing qRT-PCR experiments. The *Actin* (*ACT*) gene is highly conserved cross species and expressed stably and is often used as an internal control. In order to obtain the *ACT* gene of cauliflower, the *ACT* gene of cauliflower was cloned by RT-PCR method (GenBank ID: MG598643). The open reading frame (ORF) is 1134 bp, encoding 377 amino acids with a predicted molecular weight of 41.77 kD and a hypothetical isoelectric point of 5.395. Wolf Psort analysis indicated that *BobActin* protein was located in the cytoplasmic matrix, and Motif Scan analysis showed that *BobActin* protein had the conserved actin at position of 4-377 sites. *BobActin* shared 90% identity with the homologous proteins from genus *Brassicaceae*, such as *Brassica oleracea* L. var. *oleracea*, *Brassica rapa* L. and *Brassica napus* L.. A pair of qRT-PCR primers was designed from the *BobActin* gene sequence, and this combination showed high specificity and amplification efficiency. qRT-PCR analysis indicated that the *BobActin*

收稿日期: 2018-09-18 修回日期: 2018-10-19 网络出版日期: 2018-11-22

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181121.1530.002.html>

第一作者研究方向为蔬菜分子生物学, E-mail: lhlzl540@163.com

通信作者: 朱海生, 研究方向为蔬菜育种, E-mail: zhs0246@163.com; 温庆放, 研究方向为蔬菜育种, E-mail: fjvrc@163.com

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项 (2018R1026-10); 国家大宗蔬菜产业体系 (CARS-23-G-53)

Foundation project: Fujian Provincial Public Welfare Research Institute Basic Scientific Research Project (2018R1026-10); National Bulk Vegetable Industry System (CARS-23-G-53)

gene was stably expressed in tissues of cauliflower, including root, stem, flower ball, leaf, even under various stress treatments (low temperature, high temperature, salt, drought and ABA). Thus, this gene might serve as an internal reference being suitable for gene expression in cauliflower.

Key words: *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.; *actin*; gene clone; expression analysis; reference gene

近年来,分子生物学科进入快速上升通道,基因组研究进入一个新阶段,挖掘未知基因,明确其生物学功能和在有机体代谢过程中的调控机理是科研工作者的重要任务^[1]。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR, realtimequantitative PCR) 是一种新型核酸定量技术,它重复性好、反应灵敏度高、特异性强,是在普通 PCR 基础上发展起来研究机体中不同组织基因表达的重要生物学手段之一^[2-4]。实时荧光定量 PCR 实验获得的数据,容易受到 PCR 扩增效率、逆转录、RNA 纯度及 cDNA 合成等要素的干扰,使得获得的数据和检测基因的真实数据有所偏差。为了解决这个关键问题,内参基因作为校正和标准化数据,被应用到实际操作中,以减小样品数据的误差^[5-7]。一般来说,理想的内参基因是在不同的 RNA 提取方法下、在有机体的不同器官、不同的发育时期都能稳定表达的一类看家基因^[8]。常见的内参基因包括肌动蛋白基因 (*ACT*, *actin*)、泛素基因 (*UBQ*, *ubiquitin*)、微管蛋白基因 (*TUB*, *tubulin*)、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶基因 (*GAPDH*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) 等^[9-10]。Actin 作为细胞骨架蛋白分子存在于高等植物有机体中,它在细胞进化过程中高度保守^[11-12]。Actin 基因在植物体内的不同器官和组织,特殊处理或正常环境下都可稳定高水平表达,易于被引物扩增,且具有高度保守性。因此,Actin 基因可作为内参基因应用于植物的基因表达研究中^[13]。

花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) 起源于地中海地区,19 世纪传入我国南方沿海城市,是十字花科芸薹属甘蓝中的变种,以花球为食用器官,在南方福建、浙江、江苏等地均有栽培^[14-15]。花椰菜含有碳水化合物、可食性纤维、植物蛋白、脂肪酸、微量元素等多种营养物质,食用价值极高。此外,它还含有类黄酮化合物、硫代葡萄糖苷、黑子芥酶等多种生物活性成分^[16]。花椰菜作为药食兼用的蔬菜深受消费者喜爱。随着生物技术发展的日新月异,花椰菜基因组学在深度和广度上不断拓展,目的基因表达分析是其中必不可少的研究项目之一。目前,还未见关于花椰菜内参基因筛选的报道,也没有关于花椰菜 *actin* 的克隆及其作为内参基因的研

究。本试验克隆了花椰菜肌动蛋白基因作为内参基因,在此基础上设计了 1 对实时荧光定量 PCR 引物,并评估该基因表达的稳定性,旨在为开展花椰菜重要功能基因的挖掘、表达模式以及调控机理的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

花椰菜庆农 65 天于 2017 年 8 月中旬播种于福建省农业科学院作物所蔬菜中心研究基地,10 月上旬定植于基地大棚中。采集花椰菜根、茎、花、花球、正常温度 (25 °C, 光照 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) 叶片、低温处理 (4 °C, 光照 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) 叶片、高温处理 (38 °C, 光照 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) 叶片、盐处理 (NaCl, 300 mol/L) 叶片、干旱处理 5 d 的叶片以及 ABA 处理 (100 mol/L) 叶片作为试验材料。以上试验样品的采集共做 3 次独立重复,液氮速冻,并于超低温冰箱 (-80 °C) 中保存,用于后续 RNA 提取试验。

1.2 Actin 引物的设计及 PCR 扩增

参考 Zhu 等^[17] 和刘建汀等^[18] 的方法,根据获得的花椰菜 RNA-seq 数据库,筛选得到 1 条稳定表达的 *Actin* 基因全长序列。设计花椰菜的 *Actin* 基因 ORF 扩增引物,上游为 BobACT-F: 5'-CCAATCATACTCAAAGAAGAGTT-3', 下游引物为 BobACT-R: 5'-AGGATTCATCCAGCCACAGGTT-3', 可获得完整的 *Actin* 的核心片段碱基序列。反应体系为: 100 ng DNA、正反向引物各加至 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、1.0 U Taq DNA 聚合酶、0.2 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL , 剩余体积由灭菌的超纯水补足到 25 μL 。PCR 反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖电泳回收,连接到 pMD19-T 载体上送公司测序,接着使用生物学软件对所得的基因碱基序列全长进行数据分析。

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN V6 软件对花椰菜 *ACT* 序列核苷酸和蛋白质同源性比较分析; 使用 MEGA 5.02 软件绘制进化树; 运用 EditSeq 5.01 软件分析序列编

码氨基酸;采用 Motif Scan 在线软件分析翻译后蛋白修饰;应用 WoLF PSORT 在线预测分析进行亚细胞定位;蛋白的一级结构分析采用 ProtScale 软件;应用 PRABI 在线软件进行二级结构预测;蛋白质三级结构运用 SWISS-MODEL 在线软件建模^[19]。

1.4 花椰菜 *BobACT* 基因引物设计与常规 PCR 检测

利用 Primer Premier 5.0 软件,设计出 1 对荧光定量特异引物,正向引物为 *BobACT*-Fq: 5'-ATCCTCAGCGAGACGAAG-3', 反向引物为 *BobACT*-Rq: 5'-TTGTCACAGACGATGGGT-3'。按照百泰克公司通用植物总 RNA 提取试剂盒的方法提取花椰菜总 RNA, 并按照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的方法合成 cDNA 第一链。PCR 反应体系: 反应体系的总体积为 25 μ L, 含 25 ng 模板、0.4 μ mol/L 正向引物、0.4 μ mol/L 反向引物、0.15 mmol/L dNTP、1 U Taq DNA 聚合酶、1.5 mmol/L MgCl₂ 的 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L、其余成分为灭菌的超纯水;PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 7 min;于 4 $^{\circ}$ C 下保存。

1.5 荧光定量引物 PCR 检测

以反转录的花椰菜 cDNA 第一链作为模板,根据 SYBR[®] Premix Ex Taq™ 荧光定量 PCR 试剂盒提供的说明书进行 PCR 扩增,反应体系为: 总体积为 25 μ L, 12.5 μ L Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, 1 μ L 模板,实时荧光定量 PCR 引物的正向引物 0.5 μ L (浓度为 10 μ mol/L), 反向引物 0.5 μ L (浓度为 10 μ mol/L), 补蒸馏水至总体积 25 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 共 40 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存; 每个反应做 3 个重复。

1.6 花椰菜 *BobACT* 基因表达稳定性分析

提取花椰菜根、茎、花、花球、正常叶片、低温处理叶片、高温处理叶片、盐处理叶片、干旱处理 5 d 的叶片以及 ABA 处理叶片的总 RNA, 之后分别反转录形成 cDNA 第一链, 将获得的 cDNA 浓度调平至 50 ng/ μ L 左右; 利用实时荧光定量 PCR 引物 Fq/Rq 为引物对, 以上述 cDNA 为模板, 根据 SYBR[®] Premix Ex Taq™ 荧光定量 PCR 试剂盒提供的说明书进行 PCR 扩增, 花椰菜样品总 RNA 的提取和 cDNA 的合成按照试剂盒里的描述方法进行。实时荧光定量 PCR 反应体系为: 4 μ L cDNA, 正反向引

物各 0.4 μ L, 10 μ L SYBR[®] Premix, 0.4 μ L Rox, 添加灭菌水至 25 μ L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。以上反应均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 花椰菜 *ACT* 基因的扩增

根据本课题组对花椰菜花球转录组高通量深度测序的数据, 筛选得到 1 条 *ACT* 基因全长, 在此基础上, 设计 *ACT* 基因 ORF 引物进行验证(图 1)。将目的条带送至尚亚生物技术(福州)有限公司测序, 测序结果发现得到的基因序列全长为 1134 bp, 与 RNA-seq 数据库中筛选出 cDNA 中的 ORF 核苷酸序列一致。该花椰菜 *ACT* 基因命名为 *BobACT*, 提交 GenBank 获得登录号为: MG598643。

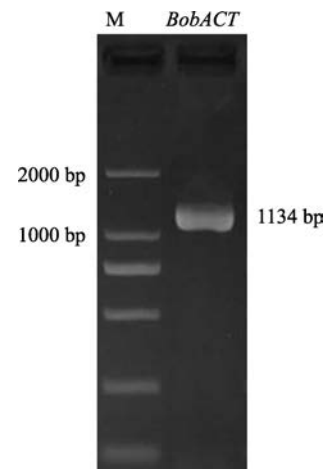


图 1 *BobACT* 基因的 PCR 产物扩增图

Fig.1 PCR amplification of *BobACT*

2.2 *BobACT* 基因生物信息学分析

2.2.1 *BobACT* 基因编码蛋白质的一级结构 核苷酸分析表明, *BobACT* 含 1 个长 1134 bp 的 ORF 序列(图 2), 其编码区的 GC 含量为 52.65%, EditSeq 5.01 生物学软件预测编码 377 个氨基酸, 理论分子量为 41.77 kD, 等电点为 5.396; 就氨基酸组成而言, 在构成该蛋白的 20 种氨基酸中, 丙氨酸 (Ala) 和甘氨酸 (Gly) 含量最高 (7.7%), 半胱氨酸 (Cys) 和色氨酸 (Trp) 含量最低 (1.1%); 从氨基酸的特征来说, 该蛋白包含 50 种强酸性氨基酸 (D, E), 38 种强碱性氨基酸 (K, R), 126 种疏水氨基酸 (A, I, L, F, W, V), 87 种极性氨基酸 (N, C, Q, S, T, Y), 脂肪族指数 (AI) 为 85.09, 不稳定系数 (II) 为 37.97, 将此蛋白质分类为稳定的蛋白质。

```

1 acgttatctgttcttgggtcgaatgattcgtccctgtcgattattattttttgaaaggccgaaataaagtgtacagataata
91 aaccgcctatttaaatcaacattgttttccctctttgaattgtctctcgttatcctcagcagacgaagaagaaagagagagagag
181 agagaggaagactaagcagagaagaagagagagagagagaatcgtcttgattccttagttcttcttcgatctcttcttcttccgac
271 tttctaattcaagcttattaaaaaaATGGCTGAGGCTGATGACATTCAACCCATCGTCTGTGACAATGGTACCGAATGGTCAAGGCTGG
1 M A E A D D I Q P I V C D N G T G M V K A G
361 TTTCGCCGGCAGCATGCTCCAGGGCTGTTTTCCCAAGTGTGTGGCAGGCCAAGGCATCACGGTGTGATGGTGGGATGAACCAGAA
23 F A G D D A P R A V F P S V V G R P R H H G V M V G M N Q K
451 GGATGCCTACGTCGGTGACGAGGCACAGTCCAAGAGAGGTATCCTCACCTTGAAGTACCCGATCGAGCACGGTGTGTGAGCAACTGGGA
53 D A Y V G D E A Q S K R G I L T L K Y P I E H G V V S N W D
541 TGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACTTTTACAATGAGTCCGTATCGCTCCTGAAGAGACCCGGTCTTCTTACCAGGGCTCCTCT
83 D M E K I W H H T F Y N E L R I A P E E H P V L L T E A P L
631 TAACCCAAAGGCTAACAGAGAGAAGATGACTCAGATCATGTTTAAACTTTCAACTCTCCGGCTATGTATGTTGCTATTCAAGCTGTTCT
113 N P K A N R E K M T Q I M F E T F N S P A M Y V A I Q A V L
721 CTCTTGTACGCCAGTGGGCTACCACCGTATTGTGCTGACTCTGGTGTGTTGTCTCACACCGTCCGATCTACGAGGGTATGC
143 S L Y A S G R T T G I V L D S G D G V S H T V P I Y E G Y A
811 TCTTCTCAGCTATCCTCCGTCTCGATCTCGGGTCCGGACCTCACTGATTCCCTGATGAAGATTCTCACCGAGAGAGGTACATGTT
173 L P H A I L R L D L A G R D L T D S L M K I L T E R G Y M F
901 CACCACCACCGCAGCGAGAAATCGTCCGTGACATTAAGAGAAGCTTGCTTACGTGGCTCTCGACTACGAGCAAGAGCTGGAGACGGC
203 T T T A E R E I V R D I K E K L A Y V A L D Y E Q E L E T A
991 TAAGAGCAGTTCTTCGGTGGAGAAGAAGTACGAGTACCTGATGGACAAGTATCACCATCGGAGCTGAGAGATTCGTTGCCCTGAAGT
233 K S S S S V E K N Y E L P D G Q V I T I G A E R F R C P E V
1081 ACTCTCCAGCCGCTCGCTCGTGGGATGGAAGCTCCTGGAATCCATGAGACAACCTACAACCTCCATCATGAAGTGTGATGGATATCAG
263 L F Q P S L V G M E A P G I H E T T Y N S I M K C D V D I R
1171 GAAGGATCTGTATGAAACATCGTCCCTCAGTGGTGGTTCGACCATGTTCCCTGGAATCGCTGACCGTATGAGCAAAGAGATCACGGCGCT
293 K D L Y G N I V L S G G S T M F P G I A D R M S K E I T A L
1261 CGCACCAAGCAGCATGAAGATCAAGGTGGTCGCACCCGCTGAGAGGAAGTACAGTGTCTGGATTGGAGATCCATCCTTGCATCCCTCAG
323 A P S S M K I K V V A P P E R K Y S V W I G G S I L A S L S
1351 CACTTTCCAACAGATGTGGATCTCGAAGGGAGAGTACGATGAGTCCGTTCCATCCATCCACAGGAAATGCTTCAAgtgtttctgcc
353 T F Q Q M W I S K G E Y D E S G P S I V H R K C F *
1441 ttctgttctgtgtgtgagtgtgttacgatctatattccatccccctgttgagatggggattgaaactatattgtttattgtgtgtt
1531 tctttttattatttttgggtctcttagaaccccttttgaatgtctctcagtcctttctatgtacttttagttttacctttgtttcttatt
1621 tctctttaaggatgcttgtgatgatgctctgttccttaagtaagcaaaaaaaaaaaagtcattttatattttgcagtcttttggttttc
1711 tttttgccgctggttaacaatttttaattttgatttgacaactgcccatattcttcaattgctatgcagtattatggttaattgttatcc
1801 tcgacatat

```

图中方框内是起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)

The initiation codon(ATG)and termination codon(TAA)were labeled by box

图2 *BobACT* 基因全长序列及氨基酸序列

Fig.2 Full sequence and corresponding amino acid sequence of *BobACT* gene

2.2.2 *BobACT* 蛋白质翻译后修饰、结构域及亚细胞定位分析 Motif Scan 在线软件分析显示, *BobACT* 基因编码的蛋白质包含 1 个保守的 ACT 结构域(4~377 位, E 值为 $2.4e-240$)。分析发现, 14~17 为 N-糖基化位点; 337~340 为 cAMP 和 cGMP 蛋白激酶磷酸化位点; 193~200 和 212~220 为酪氨酸激酶

磷酸化位点; 79~82、204~207、236~239 和 360~363 为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; 62~64、68~70、147~149、196~198、231~233 和 326~328 为蛋白激酶 C 磷酸化位点。另外, WoLF PSORT 在线预测分析显示, *BobACT* 定位于细胞质基质中。

2.2.3 *BobACT* 蛋白质的二级、三级结构分析 *BobACT*

蛋白无规则卷曲占 57.82%、延伸链占 14.59%、 α -螺旋占 27.59%，表明无规卷曲属于该蛋白质的主要二级结构。利用 SWISS-MODEL 对 *BobACT* 蛋白质

的三级结构进行在线预测,结果如图 3 所示,该蛋白与甘蓝、芜菁和油菜的 *ACT* 同源蛋白的三级空间高度相似。

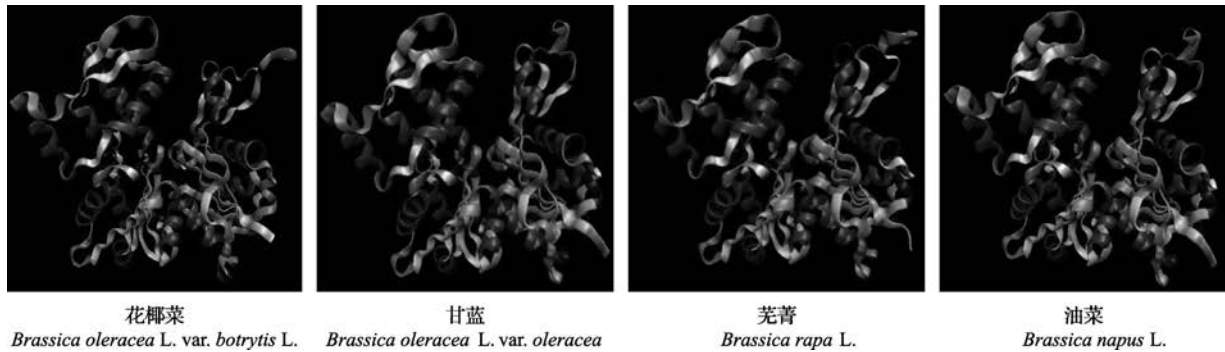


图 3 *BobACT* 及其同源蛋白三级结构预测图

Fig.3 Predicted tertiary structure of *BobACT* and its homologous proteins

2.3 *BobACT* 基因的同源性分析和系统进化分析

对花椰菜 *BobACT* 基因编码蛋白质同源性分析表明(图 4),*BobACT* 与甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var.*oleracea* XM_013765231.1) 的同源性高达 95%,和油菜 (*Brassica napus* L., NM_001316010.1)、芜菁 (*Brassica rapa* L., XM_009127097.2)、萝卜 (*Raphanus*

sativus L., XM_018615718.1) 等的氨基酸序列编码的同源蛋白质相似性分别达到 94%、93%、91%,暗示它们具有相近或者相似的功能。因此确认所获得的序列为花椰菜 *BobACT* 基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: MG598643)。

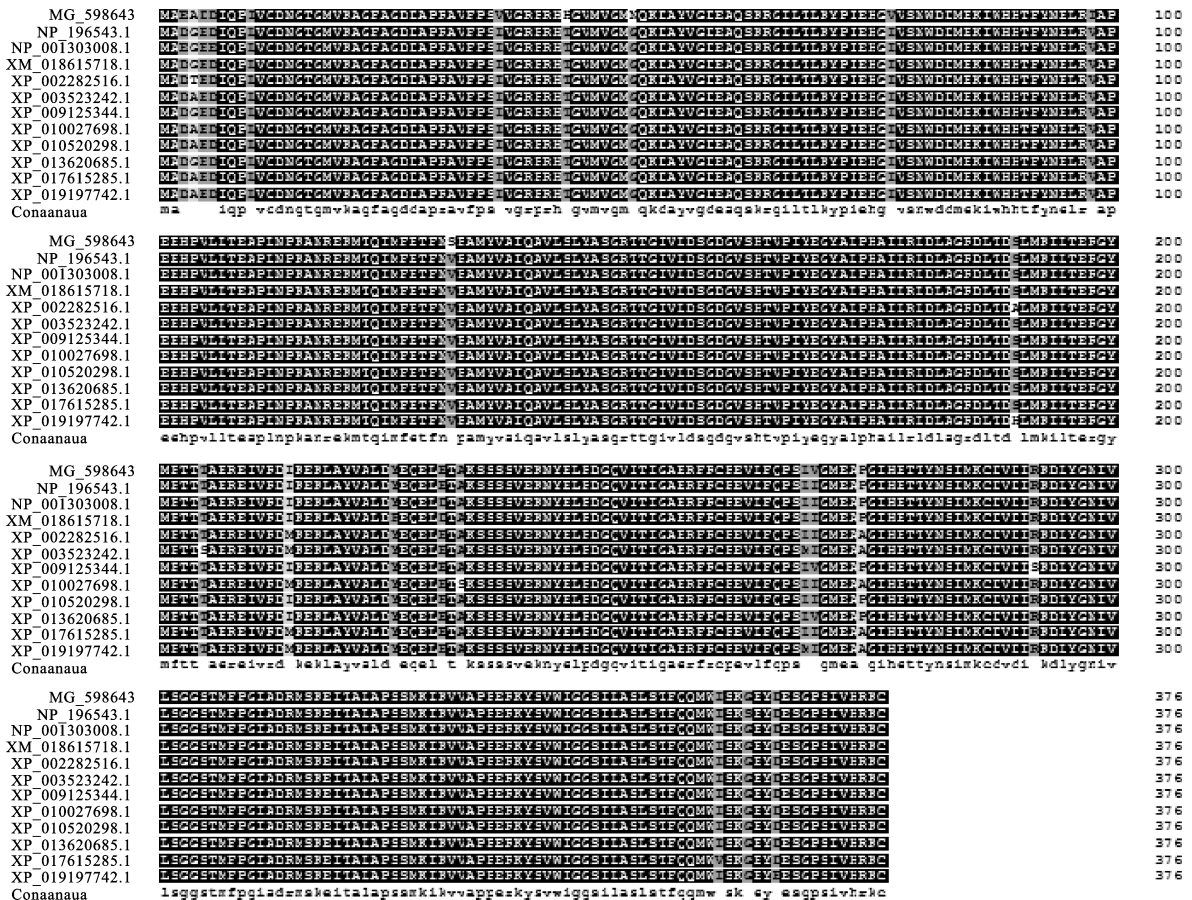


图 4 *BobACT* 与其他物种中的同源蛋白的多重比对

Fig.4 Multiple sequence alignment of *BobACT* with other homologous sequences

为了进一步明确花椰菜 *BobACT* 基因的功能与进化关系, 研究将 *BobACT* 的蛋白序列同 NCBI 中的蛋白数据库进行比较 (BLASTp), 并从中下载了其他物种的 14 个 Actin 同源蛋白。利用 MEGA5.02 软件将 15 种植物蛋白分为 4 组: 分别为来自十字花科 (Brassicaceae) 的花椰菜 (MG_598643, *Brassica oleracea* var. *botrytis* L.)、甘蓝 (XP_013620685.1, *Brassica oleracea* L. var. *oleracea*)、芜菁 (XP_009125344.1, *Brassica rapa* L.)、油菜 (XP_013680302.1, *Brassica napus* L.)、萝卜 (XP_018476330.1, *Raphanus sativus* L.)、拟南芥 (NP_196543.1, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), 锦葵科 (Malvaceae) 的木本棉 (XP_017610955.1, *Gossypium arboreum* L.)、陆地棉 (NP_001313698.1,

Gossypium hirsutum L.), 大戟科 (Euphorbiace) 的蓖麻 (NP_001310669.1, *Ricinus communis* L.)、橡胶树 (ADV72541.1, *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.)、麻风树 (NP_001295657.1, *Jatropha curcas* L.)、豆科 (Leguminosae) 的大豆 (XP_003523242.1, *Glycine max* (L.) Merr.)、扇豆 (XP_019459019.1, *Lupinus angustifolius* L.)、木豆 (XP_020211203.1, *Cajanus cajan* (L.) Huth)、蠶豆 (RDX67328.1, *Mucuna pruriens* (L.) DC.)。具体结果如图 5 所示分析发现, *BobActin* 与十字花科的 5 种 Actin 的亲缘关系最为接近, 暗示它们具有相似或者相近的功能, 其次为锦葵科和大戟科的 5 个同源蛋白, 与豆科的 4 个 Actin 的亲缘关系较远。

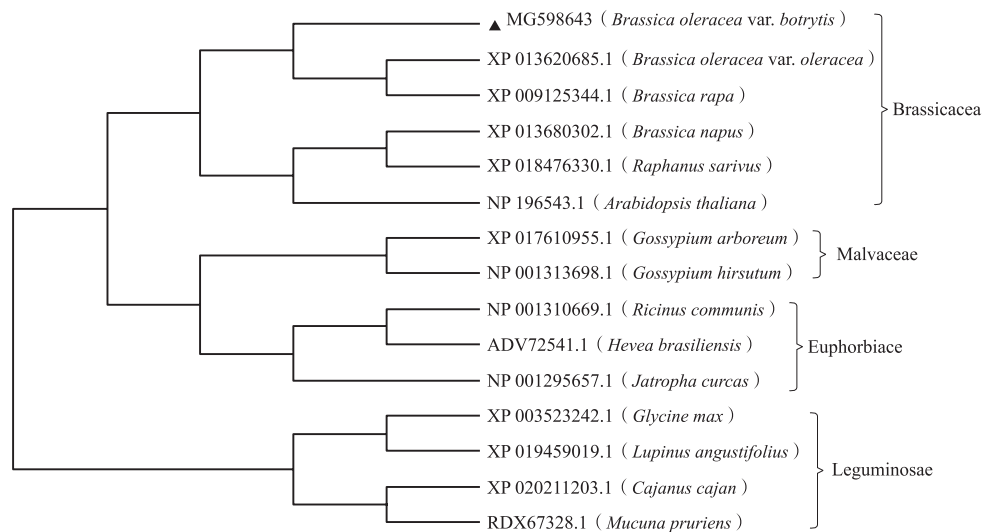


图 5 *BobACT* 与其他植物 Actin 的进化树

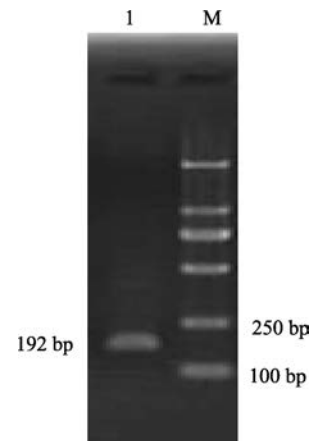
Fig.5 Phylogenetic tree constructed by actin from Cauliflower and other plants

2.4 花椰菜 *BobActin* 基因引物设计及常规 PCR 检测

利用荧光定量特异引物对 *BobActin-Fq*、*BobActin-Rq*, 以花椰菜叶片 cDNA 第一链作为模板进行 PCR 扩增, 经 1.5% 凝胶电泳检测 (图 6), 得到 1 条明亮的单一一条带, 未出现非特异性扩增条带, 经测序大小为 192 bp, 与 RNA-Seq 数据库中筛选得到的花椰菜 *BobActin* 基因 (GenBank 登录号为 MG598643) 的同源性为 100%。

2.5 花椰菜 *BobACT* 基因荧光定量 PCR 引物检测

以花椰菜叶片 cDNA 第 1 链为模板, 利用引物 *BobACT-Fq*、*BobACT-Rq* 进行实时荧光定量 PCR 扩增反应。结果显示, 3 次重复的荧光定量 PCR 扩增曲线均很好, 且为检验反应的特异性 (图 7); 3 次重复的溶解温度 (T_m 值) 均为 80.21 °C, 且均只有 1 个特异峰, 无引物二聚体, 扩增条带单一, 没有非特异性扩增出现 (图 8), 表明所设计的引物特异性强、重复性高, 能够用于花椰菜荧光定量 PCR 的内参引物试验。



M: DL 2000 marker; 1: 引物 *BobActin-Fq*、*BobActin-Rq* 扩增片段

M: DL 2000 marker, 1: Fragment of primer *BobActin-Fq*,

BobActin-Rq amplification

图 6 引物 *BobActin-Fq*、*BobActin-Rq* 的 PCR 扩增产物
Fig.6 PCR product using primers *BobActin-Fq*/*BobActin-Rq*

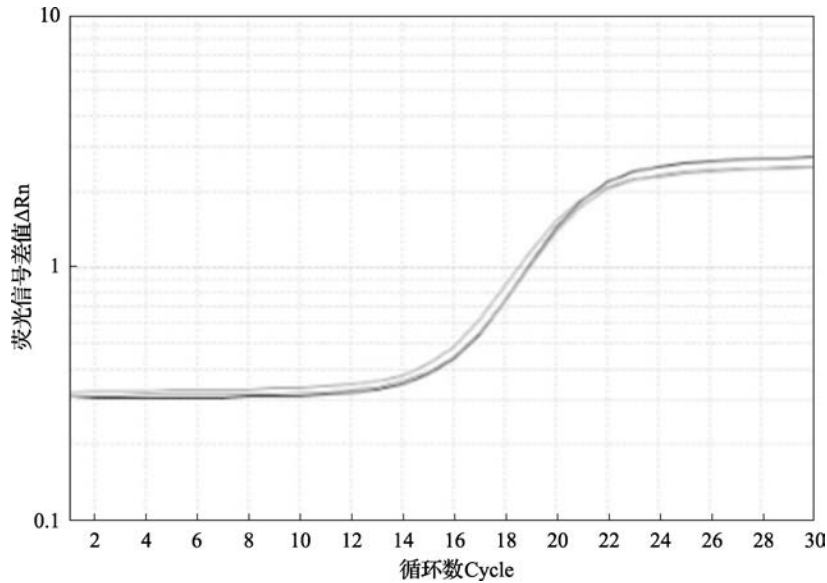


图 7 引物 BobActin-Fq、BobActin-Rq 扩增曲线

Fig.7 The amplification curves of primer BobActin-Fq, BobActin-Rq

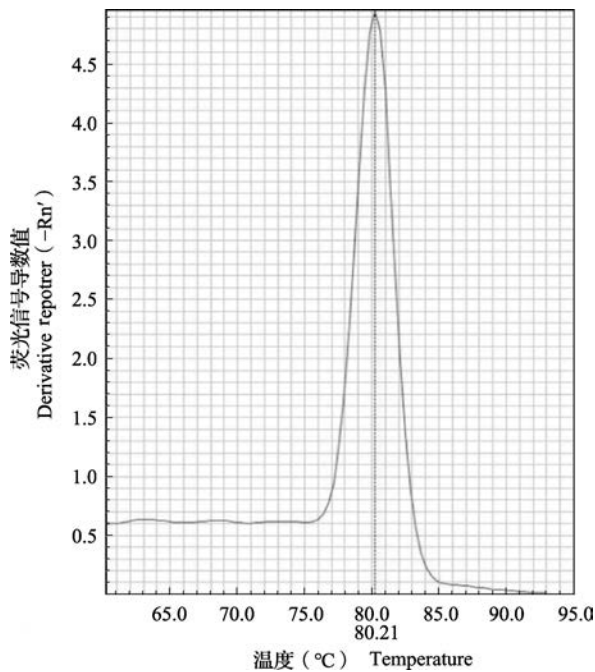
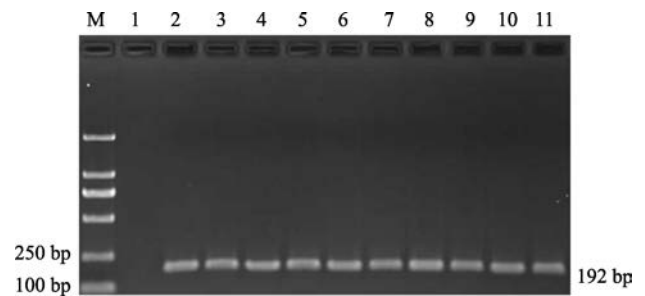


图 8 引物 BobActin-Fq、BobActin-Rq 溶解曲线

Fig.8 The melting curve of PCR product using BobActin-Fq, BobActin-Rq

2.6 花椰菜 *BobACT* 基因表达稳定性分析

利用 RT-PCR 技术分析花椰菜 *BobACT* 基因的表达情况,检测结果如图 9 所示。引物 BobACT-Fq、BobACT-Rq 扩增所得的 10 个条带亮度基本一致,表明 *BobACT* 基因在花椰菜不同组织以及各种胁迫处理的叶片中均能稳定表达,因此, *BobACT* 适合在花椰菜基因表达分析研究中作为内参基因使用。



M: DL 2000 marker; 1: 对照; 2: 根; 3: 茎; 4: 花; 5: 花球; 6: 正常叶片; 7: 低温处理叶片; 8: 高温处理叶片; 9: 盐处理叶片; 10: 干旱处理叶片; 11: ABA 处理叶片

M: DL 2000 marker, 1: Control, 2: Root, 3: Stem, 4: Flower, 5: Flowerball, 6: Normal leaf, 7: Low temperature treatment leaf, 8: High temperature treatment leaf, 9: Drought treatment leaf, 10: NaCl treatment leaf, 11: ABA treatment leaf

图 9 花椰菜 *BobACT* 基因表达稳定性分析Fig.9 The expression stability of *BobACT* gene in different situation of Cauliflower

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术是探索植物基因功能和调节机理的有效手段^[20]。选择合适的内参基因是获得实时荧光定量 PCR 准确性数据的必备条件。 *ACT* 基因高度保守且表达稳定,常作为内参基因被广泛应用,目前已经从多种植物中挖掘^[21-23]。关于花椰菜 *BobACT* 基因的克隆及其作为内参基因的研究尚未见报道。本研究获得了 1 条花椰菜 *BobACT* 基因,该 cDNA 序列全长为 1809 bp,包含 1 个 1134 bp 的 ORF,其编码 ACT 蛋白与甘蓝 (XP_013620685.1, *Brassica oleracea* L.var. *oleracea*)、

芜菁(XM_009127097.2, *Brassica rapa* L.)和油菜(NM_001316010.1, *Brassica napus* L.)的同源蛋白的相似性极高,均达到90%以上。本研究对花椰菜BobACT蛋白保守结构域的同源性分析发现,4~377位为一个ACT结构域,显示出ACT家族蛋白进化的高度保守性。此外,通过对15种植物同源ACT蛋白的系统进化分析也表明,花椰菜BobACT与同为十字花科的甘蓝、芜菁、油菜和萝卜4种同源蛋白亲缘关系最为接近,推测这些蛋白生物学功能极其相似。花椰菜BobACT基因的获得丰富了花椰菜内参基因的选择,为研究花椰菜基因表达提供了更多参考序列和参考依据。

内参基因稳定性不容忽视^[24]。理想的内参基因可作为标准化的内参基因,是在不同试验条件、不同组织或细胞、不同发育时期都可稳定表达^[25]。但实际上,基因的表达在植物不同组织、生长发育过程、不同胁迫条件下都会发生改变^[26],内参基因的稳定性是相对的。根据不同试验材料及条件,筛选合适的内参基因才能保障目标基因表达定量的准确性及可靠性。肌动蛋白(*actin*)是一种高度保守的蛋白之一,在有机体中作为细胞骨架微丝成分控制细胞形状,参与有机体细胞的多个重要的生命活动^[27-28]。由于*Actin*基因同源性和保守性高,在不同细胞组织里恒定表达,因此在多种高等植物中ACT基因常常作为标准基因研究未知基因^[29-31]。本研究基于获得的花椰菜BobACT基因全长cDNA序列,设计了1对花椰菜BobACT基因实时荧光定量PCR引物。通过荧光定量PCR检测发现,该对引物的扩增曲线重复性高且溶解曲线只有单一峰,说明具有较高的特异性和重复性,符合作为荧光定量PCR引物的基本条件。实时荧光定量PCR研究结果表明,BobACT基因在花椰菜不同组织和不同胁迫处理下都能稳定表达。因此,该基因可作为花椰菜的内参基因用于实时荧光定量PCR中标定新基因。在基因表达分析中,2个或2个以上的内参基因更有助于校正基因表达分析的结果,对微小的差异更具灵敏性,这对微小差异的数据就能得出不同结论的荧光定量PCR试验意义重大。但花椰菜在内参基因方面的研究还处于初步阶段,今后可继续克隆如*UBQ*、*TUB*、*18s RNA*、*GAPDH*、*EF-1 α* 等内参基因,丰富花椰菜的内参基因库,从而进一步提高花椰菜基因表达分析研究的稳定性、重复性和准确性。

本研究通过转录组测序和RT-PCR方法,利用Primer 5.0软件设计了1对引物,能够扩增出完整的

*BobACT*的开放阅读框(Open Read Frame)。为了验证内参基因的稳定性,本研究对花椰菜各个器官组织(根、茎、花和花球)和不同胁迫处理(正常、低温、高温、盐处理、干旱、ABA处理)叶片的花椰菜样本进行检测,结果表明,BobACT基因在这些样本中均能稳定表达。因此,该基因可作为花椰菜的内参基因用于荧光定量PCR中标定新基因。花椰菜BobACT基因的获得,为开展花椰菜重要功能基因的挖掘、表达模式以及调控机理的研究奠定基础。

参考文献

- [1] 朱海生,陈敏氢,温庆放,蓝新隆,李永平,王彬,张前荣,吴卫东.丝瓜18S rRNA基因克隆及其作为内参基因的应用.核农学报,2016,30(1):35-41
Zhu H S, Chen M D, Wen Q F, Lan X L, Li Y P, Wang B, Zhang Q R, Wu W D. Cloning of 18S rRNA gene from *Luffa cylindrical* and its application as an internal standard. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(1): 35-41
- [2] 周晓慧,刘军,庄勇.喀西茄内参基因实时荧光定量PCR表达稳定性评价.园艺学报,2014,41(8):1731-1738
Zhou X H, Liu J, Zhuang Y. Selection of appropriate reference genes in *Solanum aculeatissimum* for quantitative gene expression studies under different experimental conditions. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(8): 1731-1738
- [3] 蒋晓梅,张新全,严海东,张瑜,杨盛婷,黄琳凯.柳枝稷根组织实时定量PCR分析中内参基因的选择.农业生物技术学报,2014,22(1):55-63
Jiao X M, Zhang X Q, Yan H D, Zhang Y, Yang S T, Huang L K. Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) root tissue. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(1): 55-63
- [4] Wan H J, Zhao Z G, Qian C T, Chen J F. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. Analytical Biochemistry, 2009, 399: 257-261
- [5] Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Wuytswinkel O. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. The Plant Cell, 2008, 20: 1734-1735
- [6] Goulao L F, Fortunato A S, Ramalho J C. Selection of reference genes for normalizing quantitative real-time PCR gene expression data with multiple variables in *Coffea* spp. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30: 741-759
- [7] Zhu X Y, Li X P, Chen W X, Chen J Y, Lu W J, Chen L, Fu D W. Evaluation of new reference genes in papaya for accurate transcript normalization under different experimental conditions. PLoS One, 2012, 7(8): e44405
- [8] 杨丹,李清,王贵禧,马庆华,朱利泉.平欧杂种榛实时荧光定量PCR内参基因的筛选与体系建立.中国农业科学,2017,50(12):2399-2410
Yang D, Li Q, Wang Q X, Ma Q H, Zhu L Q. Reference genes selection and system establishment for real-time qPCR analysis in Ping'ou hybrid hazelnut (*C. heterophylla* Fisch. \times *C. avellana* L.). Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(12): 2399-2410
- [9] Karuppaiya P, Yan X X, Liao W, Wu J, Chen F, Tang

- L. Identification and validation of superior reference gene for gene expression normalization via RT-qPCR in staminate and pistillate flowers of *Jatropha curcas*-A biodiesel plant. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172460
- [10] Zhang L C, Liu L, Cheng P, Shen H G, Rong B, Liu W, Yu G H. Identification and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in banana (*Musa* spp.) under *Fusarium* wilt resistance induction conditions. *Journal of Phytopathology*, 2017, 165(11-12): 746-754
- [11] Fu Y, Duan X, Tang C, Li X, Voegelé R T, Wang X, Wei G, Kang Z. Ta ADF7, an actin-depolymerizing factor, contributes to wheat resistance against *Puccinia striiformis* f.sp. tritici. *The Plant Journal*, 2014, 78(1): 16-30
- [12] Dominguez R, Holmes K C. *Actin* structure and function. *Annual review of biophysics*, 2011, 40(1): 69
- [13] 崔力文, 郑婷, 张克坤, 张川, 上官凌飞, 房经贵. 葡萄 *Actin* 基因家族的鉴定及进化和表达分析. *植物资源与环境学报*, 2017, 26(3): 1-10
- Cui L W, Zheng T, Zhang K K, Zhang C, Shanguan L F, Fang J G. Identification, evolution and expression analyses of *Actin* gene family of *Vitis vinifera*. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2017, 26(3): 1-10
- [14] 李文萍, 林俊城, 黄科. 全球花椰菜生产与贸易现状分析. *中国蔬菜*, 2014(9): 5-10
- Li W P, Lin J C, Huang K. Analysis about present status of global cauliflower production and its trade. *China Vegetables*, 2014, (9): 5-10
- [15] 顾宏辉, 金昌林, 赵振卿, 盛小光, 虞慧芳, 王建升. 我国松花菜产业现状及前景分析. *中国蔬菜*, 2012(23): 1-5
- Gu H H, Jin C L, Zhao Z Q, Sheng X G, Yu H F, Wang J S. Status quo and prospect in food industry in China. *China Vegetables*, 2012(23): 1-5
- [16] 丁云花, 何洪巨, 赵学志, 王文琪, 宋曙辉. 不同类型花椰菜主要营养品质分析. *中国蔬菜*, 2016(4): 58-63
- Ding Y H, He H J, Zhao X Z, Wang W Q, Song S H. Analysis of major nutritional quality of different types of cauliflower varieties. *China Vegetables*, 2016(4): 58-63
- [17] Zhu H S, Liu J T, Wen Q F, Chen M D, Wang B, Zhang Q R, Xue Z Z. *De novo* sequencing and analysis of the transcriptome during the browning of fresh-cut *Luffa cylindrica* 'Fusi-3' fruits. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187117
- [18] 刘建汀, 朱海生, 温庆放, 王彬, 张前荣, 陈敏敏, 林琿, 薛珠政. 丝瓜 *LcWRKY21* 转录因子基因的克隆与表达分析. *中国细胞生物学学报*, 2017, 39(10): 1268-1278
- Liu J T, Zhu H S, Wen Q F, Wang B, Zhang Q R, Chen M D, Lin H, Xue Z Z. Cloning and expression analysis of transcription factor *LcWRKY21* gene from *Luffa cylindrical*. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2017, 39(10): 1268-1278
- [19] 温庆放, 刘建汀, 朱海生, 陈敏敏, 王彬, 张前荣. 丝瓜过氧化氢酶基因 *CAT1* 的克隆及表达分析. *园艺学报*, 2016, 43(10): 2039-2048
- Wen Q F, Liu J T, Zhu H S, Chen M D, Wang B, Zhang Q R. Cloning and expression analysis of catalase *CAT1* gene from *Luffa cylindrical*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(10): 2039-2048
- [20] Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, Cillo F. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(6): 805-816
- [21] 秦剑英, 刘灶长, 孔德艳, 周立国, 罗利军. 适合于 miRNA 的荧光定量 PCR 优化体系的建立及其标准. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(3): 435-442
- Qin J Y, Liu Z Z, Kong D Y, Zhou L G, Luo L J. Establishment and Criteria of Optimal Reaction System of RT-qPCR Suitable for miRNA. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(3): 435-442
- [22] 崔艳伟, 李文龙, 常文锁, 李喜焕, 张彩英. 大豆异黄酮合成途径相关基因差异表达分析. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(4): 719-725
- Cui Y W, Li W L, Chang W S, Li X H, Zhang C X. Differential Expression Analysis of Genes Associated with Isoflavone Synthesis in Soybean (*Glycine max* Merr.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(4): 719-725.
- [23] 刘建汀, 朱海生, 王彬, 李永平, 陈敏敏, 张前荣, 温庆放. 西葫芦 CpActin 内参基因的分离及其作为内参基因的初步应用. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(1): 188-198
- Liu J T, Zhu H S, Wang B, Li Y P, Chen M D, Zhang Q L, Wen Q F. Isolation of CpActin Gene and Study on This Gene as Reference Gene in cucurbita pepo. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(1): 188-198
- [24] Udvardi M K, Czechowski T, Scheible W R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1736-1737
- [25] Wrzesnińska B, Kierzek R, Obrepalska-Stepłowska A. Evaluation of six commonly used reference genes for gene expression studies in herbicide-resistant *Avena fatua* biotypes. *Weed Research*, 2016, 56(4): 284-292
- [26] Chen L, Zhong H Y, Kuang J F, Li J G, Lu W J, Chen J Y. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*, 2011, 234(2): 377-390
- [27] Wang P, Hussey P J. Interactions between plant endomembrane systems and the actin cytoskeleton. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6(5): 422-432
- [28] Porter K, Day B. From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(4): 299-311
- [29] 安建平, 宋来庆, 赵玲玲, 由春香, 王小非, 郝玉金. 苹果细胞分裂素响应因子基因 *MdCRF4* 的分离与功能鉴定. *园艺学报*, 2017, 44(11): 2055-2063
- An J P, Song L Q, Zhao L L, You C X, Wang X F, Hao Y J. Molecular cloning and functional characterization of a cytokinin response factor gene *MdCRF4* in apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(11): 2055-2063
- [30] 阚家亮, 马娜, 王彤, 刘廷利, 王金彦, 杨郁文, 蔺经, 常有宏. 豆梨 NAC 转录因子基因 *PcNAC1* 的克隆、亚细胞定位及功能初探. *园艺学报*, 2017, 44(7): 1251-1262
- Kan J L, Ma N, Wang T, Liu T L, Wang J Y, Yang Y W, Lin J, Chang Y H. Cloning, sub-cellular localization and functional analysis of the *PcNAC1* gene with NAC transcription factor from pyrus calleryana. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(7): 1251-1262
- [31] 潘琪, 刘旭旭, 彭浩然, 蒲运丹, 张永至, 叶思涵, 吴根土, 青玲, 孙现超. 番茄 SYTA 的克隆及表达分析. *中国农业科学*, 2017, 50(15): 2936-2945
- Pan Q, Liu X X, Peng H R, Pu Y D, Zhang Y Z, Ye S H, Wu G T, Qing L, Sun X C. Cloning, Expression analysis of *Solanum lycopersicum* SYTA. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(15): 2936-2945