

· 基础研究 ·

甘肃特产药材红芪 *actin* 基因片段的克隆及序列分析[△]

何军刚, 强正泽, 马冬妮, 冯晓莉, 李成义*

甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的: 研究红芪 *Hedysari Radix* 次生代谢产物与基因表达的相关性, 克隆红芪的肌动蛋白基因(*actin*)并进行序列分析和定量研究。方法: 通过查找 GenBank 中的其他豆科植物的编码序列(CDS)设计简并引物, 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术克隆红芪 *actin* 基因的核心片段, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析该基因在不同部位中的稳定性表达。结果: 克隆出了长度 946 bp 的红芪 *actin* 基因, 其中编码蛋白框 855 bp, 编码 284 个氨基酸, 经 Blast 比对序列, 红芪的 *actin* 基因与甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、花苜蓿 *Medicago ruthenica* (L.) Trautv.、红车轴草 *Trifolium pratense* L. 的核苷酸序列同源性分别为 95.44%、94.42%、94.20%, 氨基酸序列的相似性也高达 97% 以上, 红芪 *actin* 基因在根、茎、叶不同部位中的表达量基本稳定。结论: 首次在国内成功克隆出了红芪的 *actin* 基因, 并且证实了该基因可作为红芪其他优良基因表达调控的内参基因, 为红芪质量研究提供参考。

[关键词] 红芪; 肌动蛋白基因; 克隆; 序列分析; 逆转录-聚合酶链式反应

[中图分类号] R282.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)12-1972-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20200226002

Cloning and Sequence Analysis of *Actin* Gene Fragment of Gansu Specialty Medicinal Material *Hedysari Radix*

HE Jun-gang, QIANG Zheng-ze, MA Dong-ni, FENG Xiao-li, LI Cheng-yi*

Gansu University of Chinese medicine, Lanzhou 730000, China

[Abstract] **Objective:** To study the relationship between the secondary metabolites and gene expression of *Hedysari Radix*, *actin* gene of *Hedysari Radix* was cloned and carried out sequence analysis and quantitative study. **Methods:** By searching for CDS sequences of other legume plants in GenBank, we designed degenerate primers, cloned the core fragment of *Hedysari Radix actin* gene by RT-PCR technology, and analyzed the stable expression of this gene in different organs by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Results:** The *actin* gene of *Hedysari Radix* with a length of 946 bp was cloned, of which 855 bp encodes a protein box and encodes 284 amino acids. After blast alignment, the *Actin* gene of *Hedysari Radix* has 95.44%, 94.42% and 94.20% homology with the nucleotide sequences of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Medicago ruthenica* (L.) Trautv. and *Trifolium pratense* L. respectively. The similarity of amino acid sequence is over 97%, the expression level of *Hedysari Radix actin* gene in different organs was basically stable. **Conclusion:** This study successfully cloned the *actin* gene of *Hedysari Radix* for the first time in China, and it was confirmed that this gene can be used as an internal reference gene for regulating the expression of other excellent genes of *Hedysari Radix*, laying a foundation for the research of quality and efficiency improvement of *Hedysari Radix*.

[Keywords] *Hedysari Radix*; *actin* gene; clone; sequence analysis; RT-PCR

目前, 有关植物次生代谢产物的机制研究是分子生物学研究的热点领域之一。其主要是对野生植物资源中的优异基因进行鉴定和途径解析, 通过实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)技术检测其表达量, 此时首先需要确定一个表达稳定的内参基

因^[1]。肌动蛋白(*actin*)是真核生物细胞中最丰富的蛋白质之一, 是细胞骨架的重要微丝组分, 参与细胞分裂、内吞、信号传导等细胞内多种生命运动^[2]。*Actin* 基因具有高度保守以及表达量稳定的特点, 常被当作基因表达检测的内参基因^[3]。相关研究已从金银

[△] [基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(81860683); 甘肃中医药大学科学研究与创新基金(2019KCYB-2)

* [通信作者] 李成义, 教授, 研究方向: 中药品种与质量研究; Tel: (0931) 8765385, E-mail: gslchengyi@163.com

花 *Lonicera japonica* Thunb.^[4]、太子参 *Pseudostellaria heterophylla* (Mig.) Pax. ex Pax. et Hoffm.^[3]、浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Mig.^[5]、山药 *Dioscorea opposita* Thunb.^[6]、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels^[7]、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.^[8] 等植物中克隆出了 *actin* 基因, 该基因在此类植物中均呈现高度保守。

红芪 *Hedysari Radix* 为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根, 是甘肃省的特产药材。其功效与黄芪相似, 中医临床常用于治疗气虚下陷、痈疽疮疡、久溃不敛等证^[9]。现代药理研究表明, 红芪具有抗癌、抗氧化、抗炎、抗病毒等药理作用。此外, 红芪还可以提高周围神经再生期间扩增^[10-11]、增强放射敏感性^[12]、延缓肺纤维化^[13]、防治肝纤维化^[14]及抗骨质疏松^[15]。长期以来, 对红芪的研究主要集中在对其活性成分的分析 and 分离中, 但是关于红芪 *actin* 基因的研究尚未见报道。本研究主要通过逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术和 T-载体 PCR 克隆技术, 首次克隆出了红芪的 *actin* 基因片段, 为深入研究红芪其他优异功能基因的表达以及调控提供参考。

1 材料

1.1 试药

红芪种子于 2019 年 3 月购于甘肃陇南武都区红芪种植农户, 经甘肃中医药大学李成义教授鉴定为多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的种子, 剥去荚膜, 挑选种粒均匀饱满、没有虫害破洞的种子作为培育材料。将种子用 2% 次氯酸灭菌浸泡 5 min, 然后用 75% 的浓硫酸浸泡 4 min 打破休眠, 再用流水冲洗 30 min, 最后将处理过的种子摆放在润湿滤纸的培养皿上, 放在人工植物培养箱中发芽 (温度 25 ℃, 湿度 65% ~ 80%, 光照 8 h·d⁻¹)。待到种子发芽, 将其移栽至装有蛭石和珍珠岩 (5:1) 混合基质的花盆中, 用不含琼脂的 MS 培养基溶液灌溉以保证其养分。以生长 7 周的幼苗作为提取 RNA 的实验材料。

植物总 RNA 小量抽提试剂盒 (Magen 生物有限公司); cDNA 合成试剂盒、核酸染料 Gelview、PCR 扩增试剂盒、50 × TAE Buffer、快捷型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA Marker DL5000 (北京 Bio Teke 有限公司); T-载体 PCR 克隆试剂盒、感受态细胞、SOC 培养基 (TaKaRa 公司); Evo M-MLV 反

转录试剂预混液、SYBR Green[®] Premix Pro Taq HS qPCR Kit (湖南艾科瑞生物工程有限公司); 其他试剂均为分析纯, 购于 Biosharp 公司; 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.2 仪器

Nano Drop 2000c 型超微量分光光度计 (上海土森视觉科技有限公司); EC250-90 型凝胶电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); ChemiDoc XRS + 型凝胶成像分析系统 (北京龙跃科技发展有限公司); FTC-8000 型 PCR 仪 (加拿大枫岭生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 红芪总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取生长 7 周的红芪幼苗 100 ~ 150 mg, 置于液氮中迅速研磨成细粉末, 按照植物总 RNA 小量抽提试剂盒说明书步骤提取总 RNA, 吸取 RNA 1.5 μL 在超微量分光光度计上检测其质量分数和纯度, 将剩余的 RNA 分装置于 200 μL 的无酶离心管中, 置于 -80 ℃ 冰箱保存。取 RNA 5 μL 用 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。cDNA 模板的合成参照说明书步骤进行, 产物在 -20 ℃ 保存。

2.2 引物设计与合成

在美国国家生物信息中心 (NCBI) 网上找到甘草 (*G. uralensis* Fisch., EU190972)、大豆 [*Glycine max* (L.) Merr., NM_001358094]、红车轴草 (*Trifolium pratense* L., AY372368)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* L., XM_024774779)、柠条锦鸡儿 (*Caragana korshinskii* Kom., FJ485727) 等豆科植物 *actin* 基因 CDS 序列进行同源比对, 找出高度保守区段, 利用 Primer 6.0 软件设计引物。引物序列为 *actin*-F: 5'-ATGGTTGGGATGGGTCAAAAGG-3'; *actin*-R: 5'-TGTT GGAAGG TGCTGAGGGATG-3'。推测其片段长度 950 bp 左右。

2.3 RT-PCR 扩增

以上述反转录得到的 cDNA 为 PCR 扩增模板, 50 μL 反应体系包括 2 × Super Taq PCR MasterMix 25 μL、上下游引物各 5 μL (10 μmol·L⁻¹)、cDNA 模板 15 μL。反应程序: 95 ℃ 起始模板变性 3 min; 95 ℃ 变性 30 s、60 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 1 min, 33 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束得到的 PCR 产物经过 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像

分析系统检测目的片段位置,然后用快捷型琼脂糖DNA回收试剂盒回收片段。

2.4 阳性克隆的筛选与鉴定

根据T-载体PCR产物克隆试剂盒说明书,将回收片段与pMD19-T Vector连接,加入等量的Solution I 16℃反应30 min,然后将连接产物转化至JM109感受态细胞100 μL中,冰浴30 min,42℃热击42 s,再冰浴1 min,加入SOC培养基890 μL,37℃振荡60 min,并接种到含有氨苄青霉素的LB琼脂平板培养基上,37℃过夜。次日早上随机挑取白色菌落7株,进行菌落PCR鉴定阳性克隆,用1%非变性琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果,挑选阳性菌株用无菌水稀释,送至西安擎科泽西生物科技有限责任公司进行测序。

2.5 Actin 基因表达特性分析

用qRT-PCR技术分析红芪 *actin* 基因在根、茎、叶中的相对表达水平。取用MS营养液处理过的7周龄红芪的根、茎、叶,分别提取总RNA,通过Evo M-MLV反转录试剂盒合成cDNA。设计qRT-PCR引物为 *actin*-F: 5'-CAACCCAAAGGCCA ACAGA-3', *actin*-R: 5'-CACACCATCACCA GAGTCCAA-3'。25 μL反应体系为2×SYBR® Green Pro Taq HS Premix 12.5 μL,上下游引物各0.5 μL, cDNA模板1 μL,无酶水10.5 μL。反应程序:95℃,30 s;95℃,5 s,60℃,30 s,循环40次;熔解阶段设置成FTC-8000 PCR仪默认值。数据分析采用FTC-8000型PCR仪系统软件和Excel 2016。

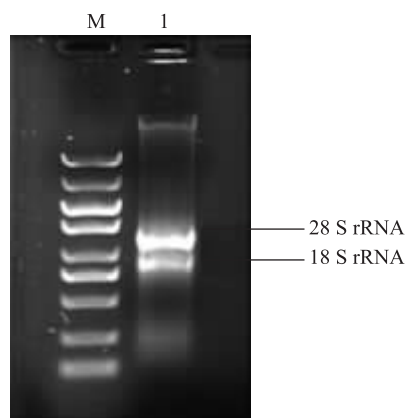
3 结果与分析

3.1 RNA 纯度检测

实验采用7周红芪幼苗提取的总RNA,使用微量紫外分光光度计测得 A_{260}/A_{280} 值为2.03(A表示吸光度),经1%非变性琼脂糖凝胶电泳结果显示,28 S RNA和18 S RNA条带清晰可见(见图1),没有杂带,并且前者的荧光强度约为后者的2倍,则说明本实验提取的总RNA纯度较高,可以用于后续RT-PCR。

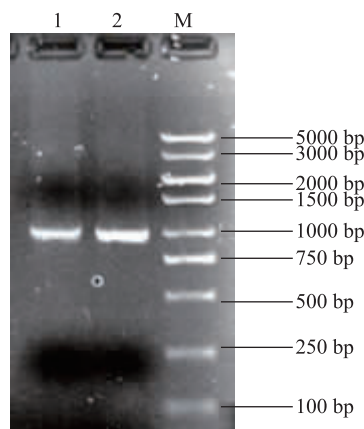
3.2 红芪 *actin* 基因核心片段的克隆

以红芪幼苗总RNA为模板,通过RT-PCR成了1条长度约为950 bp的条带(见图2),并且上下没有杂带,推测该片段就是所要的目的基因,还有待进一步鉴定。



注: M. Marker; 1. 总RNA。

图1 红芪幼苗总RNA电泳图



注: M. Marker; 1~2. RT-PCR产物。

图2 红芪 *actin* 基因核心片段RT-PCR产物电泳图

3.3 阳性克隆鉴定

将回收的目的片段与T载体连接后,次日挑选7株菌落采用通用引物进行扩增,经1%非变性琼脂糖凝胶电泳检测,5株菌落的条带位置在约950 bp,与RT-PCR扩增的位置一致,将这5个阳性克隆菌液送至西安擎科泽西生物科技有限责任公司进行测序,序列见图3。

3.4 序列分析

经过测序得到了一段946 bp的 *actin* 基因片段序列,编码284个氨基酸。将该序列在GenBank进行Blast比对,发现该序列与甘草、花苜蓿、红车轴草的核苷酸同源性分别高达95.44%、94.42%、94.20%,将推测的红芪 *actin* 氨基酸序列与其他10种不同植物的进行多重比对,非保守氨基酸共12个(见图4),相似性高达97%以上。结果表明,本实验所克隆的基因片段是红芪的 *actin* 基因片段,进一步验证了 *actin* 具有高度保守性。

```

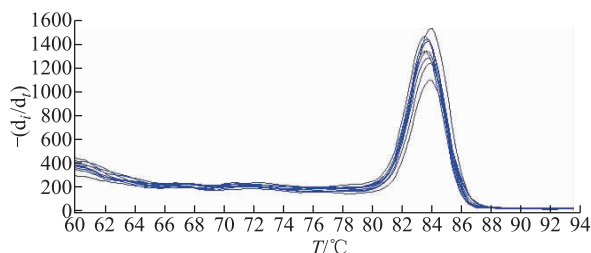
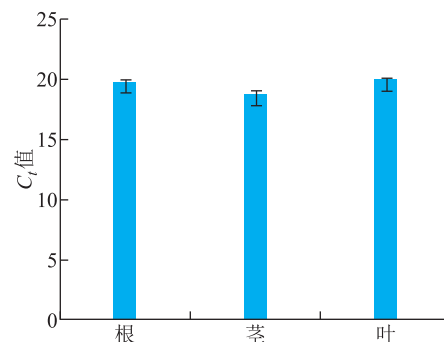
1   ATGGTTGAGATGGGTCAAAAGGATGCCTATGTGGGTGATGAAGCCCAATCAAAGAGAGGT
1   M V E M G Q K D A Y V G D E A Q S K R G
61  ATTCTTACTCTGAAGTACCCAAGTGGTATAGTCAGTAACTGGGATGACATGGAA
21  I L T L K Y P T E H G I V S N W D D M E
121 AAGATCTGGCATCACACATTTTACAATGAATTGCGTGTGCTCCTGAGGAGACCCAGTG
41  K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V
181 CTTCTAACTGAGGCTCCACTCAACCCAAAGGCCAACAGAGAAAAGATGACTCAAATCATG
61  L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M
241 TTTGAGACCTTCAATGTGCCAGCCATGTATGTGGCCATCCAAGCTGTCCTCTCCCTCTAT
81  F E T F N V P A M Y V A I Q A V L S L Y
301 GCAAGTGGACGCACAACCTGGTATTGTCTTGGACTCTGGTGATGGTGGAGTCACACTGTG
101 A S G R T T G I V L D S G D G V S H T V
361 CCAATCTATGAGGGCTATGCACTCCCTCATGCTATCCTTCGGCTGGATCTTGCTGGCCGC
121 P I Y E G Y A L P H A I L R L D L A G R
421 GATCTAACTGATTCTTTGATGAAGATCCTCACTGAGAGAGGATACATGTTCCACCACCTCA
141 D L T D S L M K I L T E R G Y M F T T S
481 GCTGAGCGGGAAATTGTCCGTGACATAGAGGAGAAACTGCATATGTTGCCTTGGATTAT
161 A E R E I V R D I E E K L A Y V A L D Y
541 GAACAAGAACTTGAGACTGCAAAGACCAGTTCTTCAATTGAGAAAACTATGAGCTTCTCT
181 E Q E L E T A K T S S S I E K N Y E L P
601 CATGGACAAGTTATCACAATTGGAGCTGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGTTCTTTTCCAA
201 D G Q V I T I G A E R F R C P E V L F Q
661 CCATCTATGATTGGAATGGAAGCTGCTGGAATTCATGAGACCACCTACAACCTCAATAATG
221 P S M I G M E A A G I H E T T Y N S I M
721 AAGTGTGACGTGGATATCGAAAGGATCTGTATGGCAACATTGTCTTAGTGGTGGCTCA
241 X C D V D I R K D L Y G N I V L S G G S
781 ACTATGTTCCCGGTATTGCTGACCGTATGAGCAAGGAGATCACTGCCCTGCTCCTAGC
261 T M F P G I A D R M S K E I T A L A P S
841 AGCATGAAAAATTA
281 S M K N *

```

图3 *Actin* 基因片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

3.5 红芪 *actin* 基因在不同部位中的表达

通过 qRT-PCR 法检测红芪 *actin* 基因在根、茎、叶不同部位中的 C_t 值, 每个样品重复 4 次, C_t 值为 18 ~ 19, 利用 Excel 2016 进行 C_t 值数据分析, 计算各样品 C_t 值的标准偏差 (SD), SD 越小, 基因稳定性越好, 若 $SD > 1$, 则认为该基因不稳定^[16-17]。本实验所克隆的 *actin* 基因, 在根、茎、叶不同部位中的 C_t 值的 SD 分别为 0.07、0.16 和 0.08, 远小于 1, 说明该基因在红芪的不同部位中表达稳定, 可以作为研究红芪其他优良基因的内参基因。红芪 *actin* 基因的溶解曲线 (见图 4) 和不同组织中的 C_t 值柱状图 (见图 5) 显示, 该基因溶解曲线有良好的特异性, 表现为单一峰, 无非特异性荧光峰; 且 *actin* 基因在红芪不同部位中表达量差异无统计学意义。

图4 *Actin* 基因溶解曲线图5 *Actin* 基因在红芪不同部位的表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

4 讨论

Actin 是由 375 ~ 377 个氨基酸组成的单一多肽链的球状蛋白^[18], 广泛存在于高等植物的各种组织细胞中, 如根毛、茎韧皮部、叶表皮细胞、叶鞘细胞、花粉、卷须等, 并且在维持植物细胞的正常生长、分化和繁殖等方面都具有重要意义^[19]。Actin 基因是由多基因家族编码的, 因而形成了多种肌动蛋白异型体^[20]。Hightowe 等^[21]研究表明, 大豆与玉米肌动蛋白间存在 8% ~ 10% 的氨基酸取代, 而大豆肌动蛋白异型体之间仅存在 6% ~ 9% 的氨基酸取代, 因此, 植物肌动蛋白具有高度的保守性。大量研究表明, *actin* 基因无论是核苷酸序列还是其编码的氨

基酸序列都具有高度的保守性和同源性。本实验所克隆的红芪 *actin* 基因与其他植物的核苷酸序列相似性在 90% 以上, 其编码的氨基酸序列的相似性在 97% 以上, 这将进一步证实了 *actin* 基因是一种高度保守的管家基因。

近年来红芪在药用和保健品中的应用受到越来越多的重视, 对其品质的要求也在不断提高。目前研究发现, 红芪的主要活性成分属于异黄酮类化合物, 该类化合物在治疗心血管疾病、骨质疏松及神经退行性疾病方面具有良好的效果^[22]。然而在红芪异黄酮类化合物合成机制及一些功能基因表达和调控的深入研究中往往需要内参对照。目前在 NCBI 网上数据库中未能搜索到红芪 *actin* 基因的序列。本实验结果显示, 红芪 *actin* 基因在各部位中的 C_t 值稳定, 保守性高, 因此红芪 *actin* 基因可以作为研究其他优异基因表达的内参基因。本研究结果为红芪其他异黄酮合成酶基因的表达研究及红芪次生代谢产物与基因表达的相关性阐述提供了参考。

参考文献

- [1] 郭艳, 张美, 夏快飞, 等. 厚藤 *Actin* 基因片段的克隆及序列分析[J]. 氨基酸和生物资源, 2016, 38(3): 59-62.
- [2] 袁惠君, 李学勇, 高泽, 等. 扁果枸杞肌动蛋白基因片段的克隆及其表达特征分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 48-53.
- [3] 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.
- [4] 开希武, 徐道华, 于时, 等. 金银花肌动蛋白基因 *LjActin* 的克隆及在花发育过程中的表达分析[J]. 江西农业学报, 2017, 29(3): 90-94.
- [5] 冯亚斌, 施鑫磊, 俞信光, 等. 浙贝母肌动蛋白基因的克隆及生物信息学分析[J]. 中成药, 2017, 39(1): 126-130.
- [6] 龚明霞, 周芸伊, 王爱勤, 等. 山药 *Actin* 基因片段的克隆及表达分析[J]. 生物技术通报, 2016(7): 73-80.
- [7] 吴永娜, 胡静, 王引权, 等. 当归肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2485-2489.
- [8] 王芳. 甘草肌动蛋白基因 *GuActin2* 的克隆和表达分析[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(10): 995-1000.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 152.
- [10] WANG Z Y, ZHANG P X, KOU Y H, et al. Hedysari extract improves regeneration after peripheral nerve injury by enhancing the amplification effect [J]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e67921.
- [11] XU H L, JIANG B G, ZHANG D Y, et al. Compound injection of Radix Hedysari to promote peripheral nerve regeneration in rats [J]. Chin J Traumatol, 2002, 5(2): 107-111.
- [12] KOU W, LI Y D, LIU K, et al. Radix Angelicae Sinensis and Radix Hedysari enhance radiosensitivity of 12C6 + radiation in human liver cancer cells by modulating apoptosis protein [J]. Saudi Med J, 2014, 35(9): 945-952.
- [13] 苏樞, 张毅, 李娟, 等. 红芪有效部位对肺间质纤维化模型大鼠肺组织胶原面积、透明质酸及层黏连蛋白的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(4): 72-76.
- [14] 陈心悦, 柳小亚, 陈亚丽, 等. 红芪药材防治肝纤维化的谱效关系[J]. 色谱, 2015, 33(4): 413-418.
- [15] 陈宇, 薛志远, 师志强, 等. 红芪活性组分抗骨质疏松作用的谱效关系研究[J]. 中草药, 2018, 49(1): 160-166.
- [16] MEHTA R, BIRERDINC A, HOSSAIN N, et al. Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples [J]. BMC Mol Biol, 2010, 11(1): 39.
- [17] 苏晓娟, 樊保国, 袁丽钗, 等. 实时荧光定量 PCR 分析中毛果杨内参基因的筛选和验证[J]. 植物学报, 2013, 48(5): 507-518.
- [18] 吴永娜, 李剑, 许瑞, 等. 党参肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析[J]. 中草药, 2011, 42(12): 2518-2522.
- [19] 王卓, 张少斌, 马镛, 等. 植物肌动蛋白研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(10): 2860.
- [20] 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.
- [21] HIGHTOWE R, MEAGHER R. The molecular evolution of actin [J]. Genetics, 1986, 114: 315-332.
- [22] 佟佳玲, 林森森. 对异黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 当代医药论丛, 2019, 17(7): 36-37.

(收稿日期: 2020-02-26 编辑: 田苗)