

西葫芦 *CpActin* 内参基因的分离及其作为内参基因的初步应用

刘建汀, 朱海生, 王 彬, 李永平, 陈敏氩, 张前荣, 温庆放

(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: 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 是研究分子生物学中基因表达的一种新型核酸定量技术, 具备快速高效、特异性强、重复性好、灵敏度高和自动化程度高等优点, 因而根据相应的实验材料选择适宜的内参基因对于提高 qRT-PCR 分析的准确性显得尤为重要。Actin 基因表达范围广且表达稳定, 常常作为内参基因应用于 qRT-PCR 表达分析中。前期利用转录组测序 (RNA-seq) 技术获得了西葫芦低温弱光转录组数据库, 本研究从中筛选到 1 条长达 2543 bp 的 cDNA, 并对其进行了序列分析。生物信息学分析结果表明, 该序列包含 1 个开放读码框 (ORF), 大小为 2064 bp, 预测编码氨基酸数为 682 个, 理论分子大小约为 79.67 kD, 蛋白质等电点为 6.28。Wolf Psort 分析发现, *CpActin* 蛋白亚细胞定位于细胞核中。Motif Scan 分析显示, *CpActin* 蛋白质的氨基酸序列 207~406 位和 558~682 位分别为 Actin 的中端和 C 端保守区域。同源性分析表明, 基因编码的蛋白质与同为南瓜属的中国南瓜和印度南瓜同源蛋白的相似性达到 99%, 具有高度的保守性。基于所获得的基因全长 cDNA 序列, 设计了基因 ORF 全长引物对 *CpActin*-F、*CpActin*-R, 经 PCR 扩增得到一条特异、明亮的条带, 经测序验证, 序列与 RNA-seq 数据库的 cDNA 序列一致, 基因命名为 *CpActin*, GenBank 登录号为 MH211008。在此基础上, 设计了一对荧光定量 PCR 引物 *CpActin*-Fq、*CpActin*-Rq, 分析显示, 该引物具有较高的特异性和扩增效率, 且在西葫芦不同组织 (根、茎、花和果) 和不同胁迫处理 [正常 (25 °C, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)、低温处理 (4 °C, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)、弱光处理 (25 °C, 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)、低温弱光处理 (4 °C, 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)、强光处理 (25 °C, 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 和高温处理 (38 °C, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)] 叶片中均能稳定表达, 适合在西葫芦基因 qRT-PCR 表达分析的研究中作为候选内参基因。

关键词: 西葫芦; 内参基因; *CpActin*; 表达分析

Isolation of *CpActin* Gene from *Cucurbita pepo* L. and It's Preliminary Application as an Internal Standard

LIU Jian-ting, ZHU Hai-sheng, WANG Bin, LI Yong-ping, CHEN Min-dong,
ZHANG Qian-rong, WEN Qing-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: Quantitative real-time PCR (i.e., qRT-PCR), as one of nucleic acid quantification technologies used for analyzing gene expression in molecular biology, has provided the advantage of high efficiency, high specificity, good repeatability, high sensitivity and high degree of automation. Therefore, selecting suitable

收稿日期: 2018-06-07 修回日期: 2018-07-12 网络出版日期: 2018-09-13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180912.1533.003.html>

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种与分子生物学研究, E-mail: ljt338625@163.com

通信作者: 朱海生, 主要从事园艺植物生理生化与分子生物学研究, E-mail: zhs0246@163.com

温庆放, 主要从事蔬菜遗传育种, 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 (2018R1026-5); 福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”(YC2017-5); 福建省农业科学院蔬菜科技创新团队 (STIT2017-1-2); 国家大宗蔬菜产业技术体系福州综合试验站 (CARS-23-G-53)

Foundation project: Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2018R1026-5), Fujian Academy of Agricultural Sciences "Youth Science and Technology Talents Program" (Grant No.YC2017-5), Fujian Academy of Agricultural Sciences Vegetable Science and Technology Innovation Team (Grant No.STIT2017-1-2), Experimental Station of Fuzhou of China Commodity Vegetable Industry System (CARS-23-G-53)

internal reference genes based on the corresponding experimental materials is particularly important for ensuring the accuracy of qRT-PCR analysis. Since the *Actin* gene expresses consistently without tissue specificity, it has been often used as internal reference for normalizing the gene expression. Previously, we generated the early low-temperature and low-light transcriptome datasets of *Cucurbita pepo* L. using transcriptome sequencing (i.e., RNA-seq) technology. Here we identified a 2543 bp cDNA from this database, with a size of 2064 bp open reading frame (i.e., ORF) encoding 682 amino acids. This deduced protein showed a theoretical molecular weight of 79.67 kD and a protein isoelectric point (i.e., PI) of 6.28. Wolf Psort analysis indicated that *CpActin* protein was located in the nucleus, and Motif Scan analysis showed that *CpActin* protein had the Mid-end and C-end domains of conserved Actin in the position of 207-406 and 558-682 sites, respectively. *Cpactin* shared 99% identity on amino acids with the homologous proteins from the relatives *Cucurbita moschata* Duchesne and *Cucurbita maxima* Duchesne, proving that this protein was highly conservative. By using a pair of primers that was designed for amplifying the full-length ORF, we re-generated and verified the *CpActin* fragment (Genbank ID: MH211008). What's more, a pair of qRT-PCR primers *CpActin*-Fq and *CpActin*-Rq were designed. The analysis showed that the pair primers has high specificity and amplification efficiency, which can be stably expressed in different tissues (i.e., root, stem, flower, fruit) and different stress treatments [i.e., normal (25 °C, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$), low temperature treatment (4 °C, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$), low light treatment (25 °C, 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$), low temperature and low light treatment (4 °C, 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$), high light treatment (25 °C, 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) and high temperature treatment (38 °C, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)] leaves of *Cucurbita pepo* L.. And it was suitable for use as a candidate internal reference gene in the study of qRT-PCR expression analysis of *Cucurbita pepo* L.. Thus, this study provided a reference gene *CpActin* being suitable for qRT-PCR analysis of important functional genes of *Cucurbita pepo* L..

Key words: *Cucurbita pepo*; internal reference gene; *CpActin*; expression analysis

西葫芦 (*Cucurbita pepo* L.) 又称茭瓜、白瓜、角瓜, 是我国主要的传统瓜类蔬菜栽培种之一, 具有生长性强、分布范围广、种类繁多、营养丰富等优点, 广受人们喜爱。生产过程中, 西葫芦容易受低温天气影响, 造成落花落果、病害和果实畸形等生理障碍, 导致其产量与品质严重下降^[1-2]。因此, 研究低温胁迫对西葫芦栽培生理的影响以及培育耐低温品种成为当前亟需解决的问题。然而, 至今仍然不清楚西葫芦对低温响应生理机制及其调控机理, 同时也缺乏确实有效的防控措施。

随着分子生物学研究的发展, 基因表达分析逐渐被应用于西葫芦抗性调控研究。在基因表达分析时, 为了消除不同材料细胞间 RNA 提取的质量和完整性、初始 cDNA 模板质量和数量、目的基因 PCR 扩增效率等产生的偏差, 有必要选择合适的内参基因来校正靶基因的表达水平, 从而减少样本本身对定量结果的影响^[3-5]。理想的内参基因在任何实验情况和条件下都能够稳定表达, 实际研究中常选择稳定表达的看家基因, 如肌动蛋白基因 (*ACT*)、25S 和 18S 核糖体 RNA 基因 (25S *rRNA*, 18S *rRNA*)、微管蛋白基因 (*TUA*, *TUB*)、泛素类蛋

白基因 (*UFP*, *UBI*) 以及甘油醛-3-磷酸-脱氢酶基因 (*GAPDH*) 等作为内参基因^[6-8]。研究表明, 在高等植物细胞中 *Actin* 蛋白普遍存在, 并广泛参与真核生物细胞中, 细胞有丝分裂、细胞器运动、细胞形状变化、胞内物质运输、细胞内信号传导以及花粉管生长等诸多重要的生命活动, 是构成细胞骨架中微丝系统的主要成分^[9-12]。迄今为止, 人们已相继从拟南芥^[13]、水稻^[14]、烟草^[15]、芍药^[16]和百合^[17]等高等植物中克隆出肌动蛋白基因。研究表明, 高等植物细胞中的肌动蛋白为单一多肽链形成的球状蛋白质, 占细胞总蛋白的 1%~5%, 其表达量大且基本恒定, 因此在半定量 RT-PCR 及定量 PCR 分析时常作为内参基因, 已应用于人参^[18]、黄瓜^[19]、西瓜^[20]、甜瓜^[21]和中国南瓜^[22]等多种高等植物功能基因的表达分析研究。这些 *Actin* 蛋白在进化水平上高度保守, 其蛋白序列在一级结构上具有很高的同源性, 然而, 由于存在个别氨基酸位点变化也会导致蛋白二级结构和高级结构呈现出较大差异, 导致不同植物体中 *Actin* 蛋白所发挥的作用不尽相同, 因此, 在不同植物体中 *Actin* 作为内参基因并不具有通用性。

目前,对于西葫芦低温弱光相关的研究主要集中在常规育种和生理生化水平,在西葫芦低温弱光调控机理分子水平方面的研究相对薄弱。国内外鲜见关于 *Actin* 等基因的全长克隆、序列分析及其作为内参基因在不同温度和光照胁迫条件下的表达分析等综合性的研究报道,这极大地限制了西葫芦分子生物学的研究^[23-24]。本研究根据前期通过 RNA-seq 技术构建的西葫芦低温弱光测序数据库,从中筛选得到一条在西葫芦对照组、低温组、弱光组和低温弱光组叶片中均能稳定表达的 *Actin* 基因序列,通过设计基因的开放读码框(ORF)全长引物对获得序列进行了测序验证,在此基础上,对 *Actin* 基因的序列特征及其在西葫芦不同组织以及不同温度和光照胁迫处理条件下的表达模式进行了分析,从而为研究其他重要功能基因在西葫芦中的表达模式及其响应低温弱光调控的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试西葫芦(*Cucurbita pepo* L.)材料由福建省农业科学院蔬菜工程技术研究中心提供。采集西葫芦商品期(授粉后 20 d)的根、茎、花、果实作为不同组织材料;待西葫芦幼苗第 3 片真叶完全展开,采集正常(25 °C, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)叶片、低温处理(4 °C, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)叶片、弱光处理(25 °C, 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)叶片、低温弱光处理(4 °C, 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)叶片、强光处理(25 °C, 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)叶片以及高温处理(38 °C, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)叶片作为不同处理试验材料^[5, 25]。以上实验样品的采集共做 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。

1.1.2 仪器和试剂 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪、PCR 扩增仪(ABI ProFlex 96-well)产自美国 ABI 公司。总 RNA 提取试剂盒为北京百泰克生物技术有限公司产品, RNA 逆转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA)、DNA 扩增试剂盒(Takara Ex Taq® DNA Polymerase)、Premix Taq™(Version 2.0 plus dye) PCR 扩增试剂盒均为宝生物工程(大连)有限公司产品,胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品,引物合成和克隆测序委托尚亚生物技术(福州)有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 西葫芦 *CpActin* 基因的 ORF 扩增 参考 Zhu 等^[26]和刘建汀等^[27]的方法,根据获得的西葫

芦低温弱光 RNA-seq 数据库,筛选得到一条稳定表达的 *Actin* 基因全长序列。设计西葫芦的 *Actin* 基因 ORF 扩增引物,正向引物 F: 5'-CTT CCA AGT ATG GGT ACT CAT GGC C-3', 反向引物 R: 5'-GTG TTA CCT GCG GTA ACG ATA TCG C-3'。提取 1.1 中所有西葫芦样品的总 RNA,并按照反转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit)中提供的方法将提取的西葫芦不同组织和不同处理材料的总 RNA 反转录为形成 cDNA 第一链。参考 DNA 扩增试剂盒(Takara Ex Taq® DNA Polymerase)说明书,以所得 4 μL (50 ng/ μL) cDNA 为模板(阴性对照为灭菌超纯水)、正向引物 *CpActin*-F (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL 和反向引物 *CpActin*-R (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL 、dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 2 μL 、5 U/ μL Taq DNA 聚合酶 0.25 μL 、20 mmol/L MgCl_2 的 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL 、加灭菌超纯水至总体积为 25 μL 。PCR 扩增程序为:预变性 3 min,反应温度为 98 °C;变性 30 s,反应温度为 94 °C,退火 30 s,反应温度为 58 °C,延伸 80 s,反应温度为 72 °C,共 30 个循环;最后,72 °C 下延伸 5 min,用于后续的凝胶电泳实验。

1.2.2 *CpActin* 基因生物信息学分析 西葫芦 *CpActin* 基因序列的理化性质分析采用 EditSeq(版本 5.01)软件;基因引物设计采用 Oligo Analyzer 3.1 在线软件(<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>);*CpActin* 基因和蛋白序列使用在线分析软件(<http://www.bio-software.net/sms/index.html>);*CpActin* 的同源蛋白多序列比对采用 MEGA(版本 4.0)软件和 Clustal W2 软件;*CpActin* 蛋白保守结构域分析采用 SMART 在线分析软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>);*CpActin* 蛋白质翻译后修饰采用 MotifScan 在线软件(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan);*CpActin* 的亚细胞定位采用 Wolf Psort 在线软件(http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html);*CpActin* 一级结构分析采用 ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)和 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)在线软件,*CpActin* 的二级结构预测采用 CFSSP(<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>)在线软件;*CpActin* 三级结构建模采用在线软件 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)。

1.2.3 *CpActin* 基因引物设计与常规 PCR 检测 利用在线软件 Oligo Analyzer 3.1,设计出 1 对具有特异性的 PCR 引物(Mg^{2+} 浓度为 2 mmol/L),上

游引物 *CpActin*-Fq: 5'-CAC ACA GGA TAC GAG TGG -3', 下游引物 *CpActin*-Rq: 5'- GCA ATA TCC TCA TAC GGT GG -3'。参考 DNA 扩增试剂盒 (Takara Ex Taq[®] DNA Polymerase) 说明书, 以 4 μ L (对照组为灭菌超纯水) 反转录好的西葫芦 cDNA 作为模板、引物 *CpActin*-Fq 1 μ L 和引物 *CpActin*-Rq 1 μ L、dNTP 混合液 2 μ L、PCR 缓冲液 2.5 μ L、Taq 酶 0.25 μ L, 加灭菌超纯水至总体积为 25 μ L, 并进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 预变性 30 s, 反应温度为 98 $^{\circ}$ C; 变性 30 s, 反应温度为 94 $^{\circ}$ C, 退火 30 s, 反应温度为 58 $^{\circ}$ C, 延伸 14 s, 反应温度为 72 $^{\circ}$ C; 最后, 72 $^{\circ}$ C 反应延伸 5 min, PCR 反应循环数为 30 个, 并于 4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

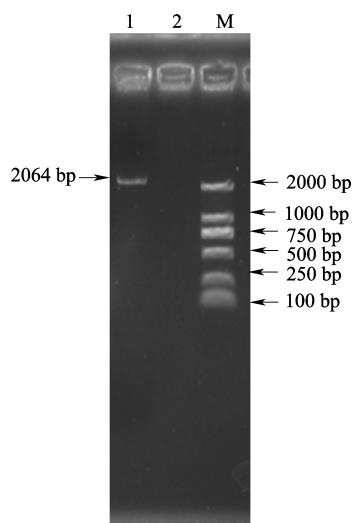
1.2.4 荧光定量引物 PCR 检测 以反转录的西葫芦 cDNA 第 1 链作为模板, 根据 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 荧光定量 PCR 试剂盒提供的说明书进行 PCR 扩增, 反应体系为: cDNA 模板 4 μ L、荧光染料试剂 (SYBR[®] Premix) 12.5 μ L、正向扩增引物 *CpActin*-Fq 0.4 μ L、反向扩增引物 *CpActin*-Rq 0.4 μ L, 补足灭菌超纯水至 25 μ L。PCR 扩增程序如下: 预变性 30 s, 反应温度为 95 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 共 40 个循环, 最后添加融解曲线, 每个反应重复 3 次。

1.2.5 西葫芦 *CpActin* 基因表达稳定性分析 提取西葫芦根、茎、花、果实、正常 (25 $^{\circ}$ C, 300 μ mol/m²·s) 叶片、低温处理 (4 $^{\circ}$ C, 300 μ mol/m²·s) 叶片、弱光处理 (25 $^{\circ}$ C, 80 μ mol/m²·s) 叶片、低温弱光处理 (4 $^{\circ}$ C, 80 μ mol/m²·s)、强光处理 (25 $^{\circ}$ C, 2000 μ mol/m²·s) 叶片及高温处理 (38 $^{\circ}$ C, 300 μ mol/m²·s) 叶片的总 RNA, 之后分别反转录形成 cDNA 第 1 链, 将获得的 cDNA 浓度调平至 50 ng/ μ L 左右; 利用实时荧光定量特异引物 Fq/Rq 为引物对, 以上述 10 种 cDNA 为模板, 分别进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系参考 Premix Taq[™] (Version 2.0 plus dye) 试剂盒说明, 扩增体系包含 50 ng/ μ L 的 cDNA 模板 2 μ L (阴性对照为灭菌超纯水)、0.5 μ L 正向引物 *CpActin*-Fq、0.5 μ L 反向引物 *CpActin*-Rq、12.5 μ L Premix Taq 混合液 (内含 Taq 酶、dNTP、PCR 缓冲液等), 加灭菌超纯水 9.5 μ L。PCR 扩增程序为: 预变性 3 min, 反应温度为 98 $^{\circ}$ C; 变性 30 s, 反应温度为 94 $^{\circ}$ C, 退火 30 s, 反应温度为 58 $^{\circ}$ C, 延伸 14 s, 反应温度为 72 $^{\circ}$ C, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min, 并于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 用于后续的凝胶电泳实验。

2 结果与分析

2.1 西葫芦 *CpActin* 基因 ORF 序列扩增

利用设计的 *CpActin* 基因 ORF 全长引物对 *CpActin*-F、*CpActin*-R 进行 PCR 扩增, 获得 1 个单一且明亮的条带 (图 1)。回收纯化 *CpActin* 基因片段, 并进行 TA 克隆, PCR 检测后送至尚亚生物技术 (福州) 有限公司测序, 经测序, 序列的长度为 2064 bp, 利用 DNAMAN 软件比较所测得序列与 RNA-seq 数据库中筛选出 cDNA 中的 ORF 核苷酸序列一致。



M: TaKaRa DL 2000 marker; 1: 引物 *CpActin*-F 和 *CpActin*-R 扩增片段; 2: 阴性对照

M: TaKaRa DL 2000 marker, 1: Fragment of primer *CpActin*-F and *CpActin*-R amplification, 2: Negative control

图 1 西葫芦 *CpActin* 基因 ORF 扩增片段

Fig.1 The full-length ORF fragment of *CpActin* gene in *Cucurbita pepo* L.

2.2 西葫芦 *CpActin* 基因生物信息学分析

2.2.1 *CpActin* 基因编码蛋白质的一级结构 序列分析发现, *CpActin* 含一个长达 2543 bp 的 cDNA 序列 (图 2), 其编码区的 GC 含量为 44.61%, 预测编码 682 个 AA, 理论分子量 (Mw) 为 79.67 kD, 等电点为 6.28, pH=7.0 时的带电荷数为 -7.89; 在构成 *CpActin* 蛋白的 20 种氨基酸中, 谷氨酸 (Glu, E) 含量最高 (13.0%), 精氨酸 (Arg, R) 次之 (9.5%), 色氨酸 (Trp, W) 含量最低 (1.3%); 分析发现, *CpActin* 蛋白质包含 129 个疏水氨基酸、140 个极性氨基酸、178 个碱性氨基酸和 150 个酸性氨基酸。*CpActin* 蛋白质预测为亲水性蛋白质, 总平均疏水性为 -1.150, 其不稳定系数 (II) 为 69.13, 脂肪族指数 (AI) 为 61.66。


```

1  gaaaaatcgggtcgtcttagaaaaaatcgggttgccagattttatggtaccctaactggcaaccccaaatctccgatcaaattctctct
91  tggtcggacctcttatttcgtcttccgggaacctcgatcaaccctagcagcttctctgtcactgacggcgctgtagcagcattttagt
181  ttctcttccaagtATGGTACTCATGCGCGAAGCAGTGAGAGAAAGAAAGAGAAGACGTCATCTTCGAGGAGACGTAGCAGAAAGGTC
1  M G T H G R S S S E R K K E K T S S S R R R S R R S
271  TGACGACTCTGAAATCTGATTCCGACGACTCAGATAGCCGGGATTTCATCTCCAGTGGGAGCTCCCGGAAGCGCAGGGAAGACTCGGTGG
27  D D S E S D S D S D S R D S S P V A S S R K R R E R L G G
361  TACGAGGAGTAGTCACCGGAGTAGACGAAGGAGCTCTCTCTGTTGGCGGGATTCTGAGAGACGATAGTTGGAATGATAGTTATGGCAGCGA
57  S R S S H R S R R R S S S R G R D S G D D S S N D S Y G S D
451  TGATGGTGGTCGCAAGAGAGTAAGTCTTCCAGGAAAGTTACTGAAGAGGAAATAGCGAATCTTGGCCAAAGAGGCGAGAAAAAGGC
87  D G G R K K S K S S R K V T E E E I S E Y L A K K A Q K K A
541  CTTCGAGTTGCCAAGAAATGAAATGCCAGACGGTTTCTGGTTATTCCAAAGATTGGAATCCATTCGGCGATTCCAAATCAATGAAAA
117  L R V A K K L K S Q T V S G Y S N D S N P F G D S N L N E K
631  ATTTGATGGCGAAAGAAAAATTGAGCGTAGTGTACTCAAGGCGTGTGCTAGATGCTTTTCAATGAAGTCGAGAAAAAGACAGAG
147  F V W R K K I E R D V T Q G V S L D A F S M K S E K K R Q R
721  AGAAAGAAATGGCAGAGATTGAAAGGTAAGAAAAAGGAGGAGGAGGAGGCTCTTGAAGGACCAACATGAGGAGGAAATGCAATTGCT
177  E R M A E I E K V K K R R E R A L E K A Q H E E M A L L
811  AGCTAGAGAACGTGCTCGTCTGAATTTACGATTGGGAGAAAAAGGAGAGTTCCATTITGATCAAGCAAAATCAGATCAGAGAT
207  A R E R A R A E F Q D W E K K E E E F H F D Q S K I R S E I
901  AAGAGTTGCTGATGGCGTTCGAAAGCCTATTGATATTCATCAAGCAACTGAATGGAATGGAATGATTTGATATAGTAATCAATGAGCC
237  R V R D G R S K P I D I L S K Q L N G S D D F D I V I N E P
991  ATACACTGTATTCAAGGGCTTGACTGTGAAGAAATGGAAGAGCTTCGTGATGACATCAAAATGCAATCTTGATCTGGACAGGGGAGCGCC
267  Y T V F K G L T V K K M E E L R D D I K M H L D L D R A T P
1081  TACACATATCGAGTATTGGGAGGCATCTCTGCTAGTTTGTGATTGGGAACCTAGCTGAAGCTCGAAAAAGGATGCTCTGATAGAGCCAG
297  T H I E Y W E A L L V V C D W E L A E A R K K D A L D R A R
1171  AGTTGCTGGTGGAGGAGCCTCTCTGCTGAGTTGCTTGCAGAAAGGAGGCTGCTGCTTCTAGCATTGAAACAGATGTCAAAAATCTTCTGGA
327  V R G E E P P A E L L A E E R G L H S S I E T D V K N L L E
1261  AGGAAAGACTTATGGTGAATTTGAGGCAATACAAATCTCAGATTGAGTCACAGATGCGATCTGGAAGTCAAGGTTGGTTGAGTACTGGGA
357  G K T Y G E L E A L Q S I E S Q M R S G T A K V V E T A
1351  GGCTGTAATAAGCGCCCTTCATATATCAAGGGAAGGCTTGTCTGAAGGAGATTCAAGAAAAAGCTGATGAGCATCTTGTAAGCCT
387  A V I K R L H I Y K A K A C L K E I H T K K L H E H L V R L
1441  TGAGCGCCTTTTGAAGATGATGAAGAAAGGTAAGACCGGAAATCGAGATGGAAGCTGAAAGCTGCTTTGCAAGTGAAAGCTGAAGAGGA
417  E Q P F E D D E E K V D Q E I E M E T E R S L Q V K A E E E
1531  AGAGCTTGATATTAGAGCAGCGAACAATATTCCTGATCTCCTTGAAGAAAGAGAAATGAAGAGCTGATCATTTTACCGGAACCT
447  E L D I R A A E T Y S P D L L E E E E N E E A G S F S P E L
1621  TATTCATGGTATGAAGATGAACAGGCGATTGATCTGAGGAGATAGGCGCATCTGGAAGCTAAACGAATTGCTGCTTGGGAAGACA
477  I H G D E D E Q A I D P E E D R A I L E R K R I A V L E E Q
1711  GCAGAGACGATTCAAGAAAGCAATGCCAAAAAGCTGCTCCACAGAGGATAATTGAGCTTAAAGCTCAAAAGCAATGGAGTCAT
507  Q R R I Q E A M A T K P A P P E D N F E L K A S K A M G V M
1801  GGAGGAAGCGATGCAATTTTGGATCTGGTCTGAAGTGAACCTGGATTACAGGTATATTGGTGGCATGACAAATATCTGCTCAAGAAA
537  E E G D A V F G S G A E V N L D S Q V Y W W H D K Y R P R K
1891  ACCAAAATATTTCATCGGTTCCACACAGGATACGAGTGAACAAATACAAACAGACTCACTATGATCATGACAAATCCACCTCCAAAGAT
567  P K Y F N R V H T G Y E W N K Y N Q T H Y D H D N P P K I
1981  TGTCGAAGGATATAAGTTTAAACATCTTCTATCCAGACCTTGTGACAAGACAAAAGCTCAACTTACACCATGAAAAGGATGGAACAG
597  V Q G Y K F N I F Y P D L V D K T K A P T Y T I E K D G N S
2071  CACCGAGACATATCATATAAGTTCCACGCGGGGCGCACGTATGAGGATATTGGTTTCAATTGTAACAAAGAAATGGGAGTACTCTCA
627  S E T C I I R F H A G P P Y E D I A F R I V N K E W E Y S H
2161  TAAGAGGGTTTAAGTGACATTTGAGCGTGTATTITGCAGTATATCTCAACTTTAAGCGATATGTTACCGCAGGTAACacaatgc
657  K K G F K C T F E R I L H V Y F N F K R Y R Y R *
2251  tagtcatagcacgtgttcttctgttggcgcatgttgcctggtactatctcttcgaggtcttgggttgaacttcaccaactagattga
2341  aagcatccatcgcaaaagtcttctgttaagttaaatgatgaccaataatagatatccaaactccctctctgagtcattcattatca
2431  ctctcaaatcgcaatctggcaatcacaaaatagttagatccgtgaaaattttaaaactattgcttccagcattctctttaccttctagctg
2521  tcaggttttgattctccactctct

```

图中起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)分别用方框标出

The initiation codon (ATG) and termination codon (TAA) were labeled by boxes, respectively

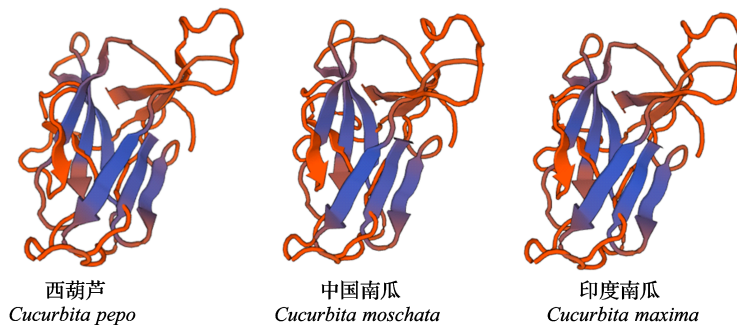
图2 *CpActin* 基因全长序列及氨基酸序列

Fig.2 The full coding sequence and the deduced amino acid sequence of *CpActin* gene

2.2.2 *CpActin* 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, *CpActin* 基因编码的蛋白质包含有一个保守的激动蛋白结构域(207~406位, E 值为 $3.1e-101$)。分析发现, 88~91 位为酰胺化位点; 80~83、133~136、254~257、583~586 和 625~628 位为 N-糖基化位点; 19~22、23~26、64~67、90~93、97~100 位为酪氨酸磷酸化位点; 29~32、74~77、78~81、100~103、274~277、297~300、345~348、359~362、368~371、545~548、575~578 和 585~588 位为蛋白激酶 II 磷酸化位点; 55~60、84~89、342~347 和 546~551 位为 N-豆蔻酰化位点; 8~10、17~19、22~24、46~48、60~62、63~65、68~70、95~97、167~169、170~172、274~276、

378~380、406~408、435~437 和 655~657 位为蛋白激酶 C 磷酸化位点; 352~360 位为酪氨酸激酶磷酸化位点; 10~27、50~67 和 172~189 位为核信号位点。此外, 利用 Wolf Psort 在线对蛋白质亚细胞定位预测表明, *CpActin* 蛋白位于细胞核中。

2.2.3 *CpActin* 蛋白质的二级、三级结构分析 西葫芦 *CpActin* 蛋白质的二级结构分析表明, α 螺旋是最大量的结构元件, 所占比例为 70.8%, 其次为 β 折叠和 β 转角, 分别占 42.7% 和 14.4%。利用 SWISS-MODEL 在线软件对西葫芦 *CpActin* 蛋白的三级结构进行建模预测, 结果如图 3 所示, 该蛋白与中国南瓜和印度南瓜的 Actin 同源蛋白的三级空间高度相似。

图3 *CpActin* 及其同源蛋白三级结构预测图Fig.3 Prediction of tertiary structure of *CpActin* and its homologous protein

2.2.4 *CpActin* 蛋白质的同源比对 对西葫芦 *CpActin* 基因编码蛋白质同源性分析表明, *CpActin* 与中国南瓜 (*Cucurbita moschata* Duchesne, XP_022946832.1)、印度南瓜 (*Cucurbita maxima* Duchesne, XP_023005736.1)、苦瓜 (*Momordica charantia* L., XP_022144570.1)、黄瓜 (*Cucumis sativus* L., XP_004137859.1) 和甜瓜 (*Cucumis melo* L.,

XP_008442772.1) 氨基酸序列编码的同源蛋白质相似性分别为 99%、99%、93%、93% 和 93%, 暗示它们具有相近或者相似的功能。另外, 对 *CpActin* 的结构域分析发现, 207~406 位为 Actin 蛋白中端保守结构, 558~682 位为 Actin 蛋白 C 端保守结构域 (图 4)。因此确认所获得的序列为西葫芦 *CpActin* 基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: MH211008)。

CpActin	MGTHGRSSSEKKKEKTSRRSRSSDSESDSDSDSDSDSPVASRRKRERLGGSSSHRSRRSSSRGRDSDGDDSSNYSYSDGGRKKSKSRKVT	100
XP_022946832.1	MGTHGRSSSEKKKEKTSRRSRSSDSESDSDSDSDSDSPVASRRKRERLGGSSSHRSRRSSSRGRDSDGDDSSNYSYSDGGRKKSKSRKVT	100
XP_023005736.1	MGTHGRSSSEKKKEKTSRRSRSSDSESDSDSDSDSDSPVASRRKRERLGGSSSHRSRRSSSRGRDSDGDDSSNYSYSDGGRKKSKSRKVT	100
XP_004137859.1	MGTHGRSSSEKKKEKTSRRSRSSDSESDSDSDSDSDSPVASRRKRERLGGSSSHRSRRSSSRGRDSDGDDSSNYSYSDGGRKKSKSRKVT	99
XP_008442772.1	MGTHGRSSSEKKKEKTSRRSRSSDSESDSDSDSDSDSPVASRRKRERLGGSSSHRSRRSSSRGRDSDGDDSSNYSYSDGGRKKSKSRKVT	100
XP_022144570.1	MGTHGRSSSEKKKEKTSRRSRSSDSESDSDSDSDSDSPVASRRKRERLGGSSSHRSRRSSSRGRDSDGDDSSNYSYSDGGRKKSKSRKVT	100
CpActin	EEEISEYLAKKAQKALRVAKKLSQTVSGYSNDSNPFPGDSNLNEKFVWRKKIERDVTQGVSLDAFSMKSEKK-RORERMAIEKVKKKREERALEKAQH	199
XP_022946832.1	EEEISEYLAKKAQKALRVAKKLSQTVSGYSNDSNPFPGDSNLNEKFVWRKKIERDVTQGVSLDAFSMKSEKK-RORERMAIEKVKKKREERALEKAQH	199
XP_023005736.1	EEEISEYLAKKAQKALRVAKKLSQTVSGYSNDSNPFPGDSNLNEKFVWRKKIERDVTQGVSLDAFSMKSEKK-RORERMAIEKVKKKREERALEKAQH	199
XP_004137859.1	EEEISEYLAKKAQKALRVAKKLSQTVSGYSNDSNPFPGDSNLNEKFVWRKKIERDVTQGVSLDAFSMKSEKK-RORERMAIEKVKKKREERALEKAQH	198
XP_008442772.1	EEEISEYLAKKAQKALRVAKKLSQTVSGYSNDSNPFPGDSNLNEKFVWRKKIERDVTQGVSLDAFSMKSEKK-RORERMAIEKVKKKREERALEKAQH	200
XP_022144570.1	EEEISEYLAKKAQKALRVAKKLSQTVSGYSNDSNPFPGDSNLNEKFVWRKKIERDVTQGVSLDAFSMKSEKK-RORERMAIEKVKKKREERALEKAQH	199
CpActin	EEEMALLARERARAEFQDWEKKEEFHFDQSKIRSEIRVRDGRSKPIDILSKQLNGSDDFDIVINEPYTVFKGLTVKEMEELRDDIKMHLDDRATPTHI	299
XP_022946832.1	EEEMALLARERARAEFQDWEKKEEFHFDQSKIRSEIRVRDGRSKPIDILSKQLNGSDDFDIVINEPYTVFKGLTVKEMEELRDDIKMHLDDRATPTHI	299
XP_023005736.1	EEEMALLARERARAEFQDWEKKEEFHFDQSKIRSEIRVRDGRSKPIDILSKQLNGSDDFDIVINEPYTVFKGLTVKEMEELRDDIKMHLDDRATPTHI	299
XP_004137859.1	EEEMALLARERARAEFQDWEKKEEFHFDQSKIRSEIRVRDGRSKPIDILSKQLNGSDDFDIVINEPYTVFKGLTVKEMEELRDDIKMHLDDRATPTHI	298
XP_008442772.1	EEEMALLARERARAEFQDWEKKEEFHFDQSKIRSEIRVRDGRSKPIDILSKQLNGSDDFDIVINEPYTVFKGLTVKEMEELRDDIKMHLDDRATPTHI	300
XP_022144570.1	EEEMALLARERARAEFQDWEKKEEFHFDQSKIRSEIRVRDGRSKPIDILSKQLNGSDDFDIVINEPYTVFKGLTVKEMEELRDDIKMHLDDRATPTHI	299
CpActin	EYWEALLVVCWDLAEARKKDALDRARVRGEEPPPELLAEERGLHSSITDVKNNLEGTGYGEALQSQIESQMRSGTAKVVEYWEAVIKRLHIYKAKA	399
XP_022946832.1	EYWEALLVVCWDLAEARKKDALDRARVRGEEPPPELLAEERGLHSSITDVKNNLEGTGYGEALQSQIESQMRSGTAKVVEYWEAVIKRLHIYKAKA	399
XP_023005736.1	EYWEALLVVCWDLAEARKKDALDRARVRGEEPPPELLAEERGLHSSITDVKNNLEGTGYGEALQSQIESQMRSGTAKVVEYWEAVIKRLHIYKAKA	399
XP_004137859.1	EYWEALLVVCWDLAEARKKDALDRARVRGEEPPPELLAEERGLHSSITDVKNNLEGTGYGEALQSQIESQMRSGTAKVVEYWEAVIKRLHIYKAKA	398
XP_008442772.1	EYWEALLVVCWDLAEARKKDALDRARVRGEEPPPELLAEERGLHSSITDVKNNLEGTGYGEALQSQIESQMRSGTAKVVEYWEAVIKRLHIYKAKA	400
XP_022144570.1	EYWEALLVVCWDLAEARKKDALDRARVRGEEPPPELLAEERGLHSSITDVKNNLEGTGYGEALQSQIESQMRSGTAKVVEYWEAVIKRLHIYKAKA	399
CpActin	CLKEIHTKKLHEHLVLEQPED-DEKVDQIEIEMETRSLOVKADEELIDRAEATYSPDLLLEENEEAGSFSPELIHGDEDECAIDPEEDRAILERK	498
XP_022946832.1	CLKEIHTKKLHEHLVLEQPED-DEKVDQIEIEMETRSLOVKADEELIDRAEATYSPDLLLEENEEAGSFSPELIHGDEDECAIDPEEDRAILERK	498
XP_023005736.1	CLKEIHTKKLHEHLVLEQPED-DEKVDQIEIEMETRSLOVKADEELIDRAEATYSPDLLLEENEEAGSFSPELIHGDEDECAIDPEEDRAILERK	498
XP_004137859.1	CLKEIHTKKLHEHLVLEQPED-DEKVDQIEIEMETRSLOVKADEELIDRAEATYSPDLLLEENEEAGSFSPELIHGDEDECAIDPEEDRAILERK	497
XP_008442772.1	CLKEIHTKKLHEHLVLEQPED-DEKVDQIEIEMETRSLOVKADEELIDRAEATYSPDLLLEENEEAGSFSPELIHGDEDECAIDPEEDRAILERK	499
XP_022144570.1	CLKEIHTKKLHEHLVLEQPED-DEKVDQIEIEMETRSLOVKADEELIDRAEATYSPDLLLEENEEAGSFSPELIHGDEDECAIDPEEDRAILERK	499
CpActin	RAVLEEQQRRIQEAMATKP-APPEDNFELKASKAMGVMEEGDAVFGSGAEVNLDSQVYWHDKYRPRKPKYFNVRVHTGYEWNKYNQTHYDHDNPPPKIV	597
XP_022946832.1	RAVLEEQQRRIQEAMATKP-APPEDNFELKASKAMGVMEEGDAVFGSGAEVNLDSQVYWHDKYRPRKPKYFNVRVHTGYEWNKYNQTHYDHDNPPPKIV	597
XP_023005736.1	RAVLEEQQRRIQEAMATKP-APPEDNFELKASKAMGVMEEGDAVFGSGAEVNLDSQVYWHDKYRPRKPKYFNVRVHTGYEWNKYNQTHYDHDNPPPKIV	597
XP_004137859.1	RAVLEEQQRRIQEAMATKP-APPEDNFELKASKAMGVMEEGDAVFGSGAEVNLDSQVYWHDKYRPRKPKYFNVRVHTGYEWNKYNQTHYDHDNPPPKIV	596
XP_008442772.1	RAVLEEQQRRIQEAMATKP-APPEDNFELKASKAMGVMEEGDAVFGSGAEVNLDSQVYWHDKYRPRKPKYFNVRVHTGYEWNKYNQTHYDHDNPPPKIV	598
XP_022144570.1	RAVLEEQQRRIQEAMATKP-APPEDNFELKASKAMGVMEEGDAVFGSGAEVNLDSQVYWHDKYRPRKPKYFNVRVHTGYEWNKYNQTHYDHDNPPPKIV	599
CpActin	OQYKFNIFYPDLVDKTKAPTYYIEKDGNSSETCIIRFHAGPPYEDIAFRIVNKEWEYSHKKGFKCTFERGILHVYFNFKRYRYRR	682
XP_022946832.1	OQYKFNIFYPDLVDKTKAPTYYIEKDGNSSETCIIRFHAGPPYEDIAFRIVNKEWEYSHKKGFKCTFERGILHVYFNFKRYRYRR	682
XP_023005736.1	OQYKFNIFYPDLVDKTKAPTYYIEKDGNSSETCIIRFHAGPPYEDIAFRIVNKEWEYSHKKGFKCTFERGILHVYFNFKRYRYRR	682
XP_004137859.1	OQYKFNIFYPDLVDKTKAPTYYIEKDGNSSETCIIRFHAGPPYEDIAFRIVNKEWEYSHKKGFKCTFERGILHVYFNFKRYRYRR	681
XP_008442772.1	OQYKFNIFYPDLVDKTKAPTYYIEKDGNSSETCIIRFHAGPPYEDIAFRIVNKEWEYSHKKGFKCTFERGILHVYFNFKRYRYRR	683
XP_022144570.1	OQYKFNIFYPDLVDKTKAPTYYIEKDGNSSETCIIRFHAGPPYEDIAFRIVNKEWEYSHKKGFKCTFERGILHVYFNFKRYRYRR	684

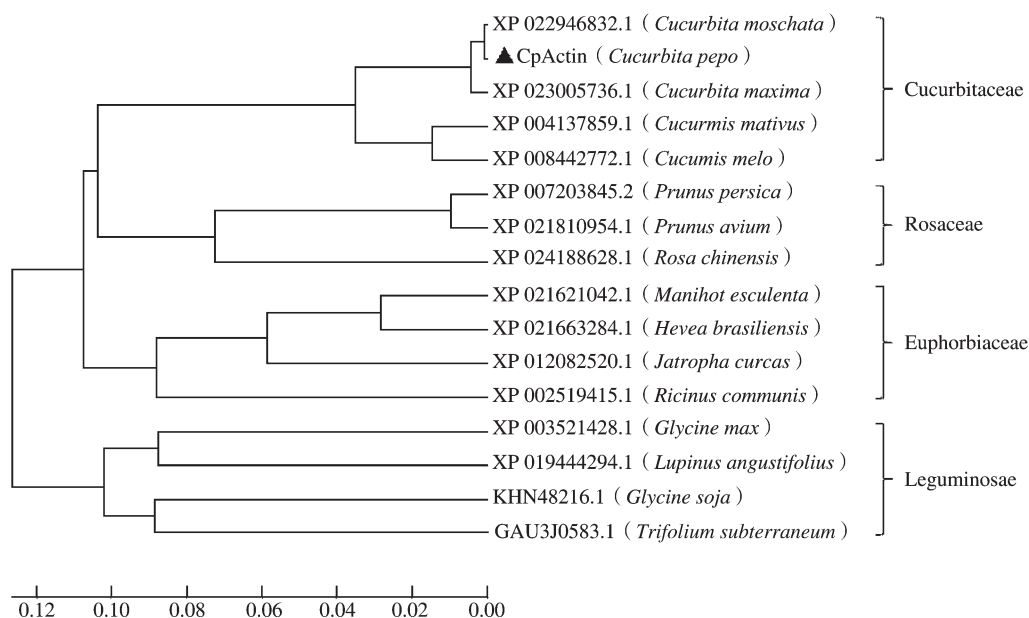
中端肌动蛋白保守结构域用红色方框表示, C 端肌动蛋白保守结构域用蓝色方框表示。CpActin: 西葫芦 Actin; XP_022946832.1: 中国南瓜 Actin; XP_023005736.1: 印度南瓜 Actin; XP_004137859.1: 黄瓜 Actin; XP_008442772.1: 甜瓜 Actin; XP_022144570.1: 苦瓜 Actin

The region of Cactin_mid conservative domain was boxed in red and Cactin-C terminus conservative domain was boxed in blue. CpActin: *Cucurbita pepo* L. Actin, XP_022946832.1; *Cucurbita moschata* Duchesne Actin, XP_023005736.1; *Cucurbita maxima* Duchesne Actin, XP_004137859.1; *Cucumis sativus* L. Actin; XP_008442772.1; *Cucumis melo* L. Actin, XP_022144570.1; *Momordica charantia* L. Actin

图4 *CpActin* 与其他物种中的同源蛋白质的序列比对Fig.4 Multiple sequence alignment of *CpActin* and other homologous sequences

为了进一步明确西葫芦 *CpActin* 的功能与进化关系,研究将 *CpActin* 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 15 个 Actin 同源蛋白。利用 MEGA 和 Clustal W2 作图软件将 16 种植物蛋白分为 4 组:分别为来自葫芦科 (Cucurbitaceae) 的中国南瓜 (XP 022946832.1, *Cucurbita moschata* Duchesne)、黄瓜 (XP 004137859.1, *Cucumis sativus* L.)、印度南瓜 (XP 023005736.1, *Cucurbita maxima* Duchesne) 和甜瓜 (XP 008442772.1, *Cucumis melo* L.);蔷薇科 (Rosaceae) 的水蜜桃 (XP 007203845.2, *Prunus persica* (L.) Batsch)、甜樱桃 (XP 021810954.1, *Prunus avium* (L.) L.) 和月季 (XP 024188628.1, *Rosa chinensis* Jacq.),大戟科 (Euphorbiaceae) 的巴西橡胶树 (XP 021663284.1,

Hevea brasiliensis (Willd.ex A.Juss.) Müll.Arg.)、木薯 (XP 021621042.1, *Manihot esculenta* Crantz)、麻风树 (XP 012082520.1, *Jatropha curcas* L.) 和蓖麻 (XP 002519415.1, *Ricinus communis* L.) 以及豆科 (Leguminosae) 的羽扇豆 (XP 019444294.1, *Lupinus angustifolius* L.)、地三叶 (GAU30583.1, *Trifolium subterraneum* L.)、大豆 (XP 003521428.1, *Glycine max* (L.) Merr.) 和野大豆 (KHN48216.1, *Glycine soja* Siebold & Zucc.)。分析发现, *CpActin* 与葫芦科的 4 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,其次为蔷薇科和大戟科的 7 个同源蛋白,与豆科的 4 个 Actin 的亲缘关系较远,具体结果如图 5 所示。



中国南瓜 (XP 022946832.1)、黄瓜 (XP 004137859.1)、印度南瓜 (XP 023005736.1) 和甜瓜 (XP 008442772.1) 为葫芦科 Actin; 水蜜桃 (XP 007203845.2)、甜樱桃 (XP 021810954.1) 和月季 (XP 024188628.1) 为蔷薇科 Actin; 巴西橡胶树 (XP 021663284.1)、木薯 (XP 021621042.1)、麻风树 (XP 012082520.1) 和蓖麻 (XP 002519415.1) 为大戟科 Actin; 羽扇豆 (XP 019444294.1)、地三叶 (GAU30583.1)、大豆 (XP 003521428.1) 和野大豆 (KHN48216.1) 为豆科 Actin

Cucurbita moschata Duchesne (XP 022946832.1), *Cucumis sativus* L. (XP 004137859.1), *Cucurbita maxima* Duchesne (XP 023005736.1) and *Cucumis melo* L. (XP 008442772.1) are Cucurbitaceae Actin, *Prunus persica* (L.) Batsch (XP 007203845.2), *Prunus avium* (L.) L. (XP 021810954.1) and *Rosa chinensis* Jacq. (XP 024188628.1) are Rosaceae Actin, *Hevea brasiliensis* (Willd.ex A.Juss.) Müll.Arg. (XP 021663284.1), *Manihot esculenta* Crantz (XP 021621042.1), *Jatropha curcas* L. (XP 012082520.1) and *Ricinus communis* L. (XP 002519415.1) are Euphorbiaceae Actin, *Lupinus angustifolius* L. (XP 019444294.1), *Trifolium subterraneum* L. (GAU30583.1), *Glycine max* (L.) Merr. (XP 003521428.1) and *Glycine soja* Siebold & Zucc. (KHN48216.1) are Leguminosae Actin

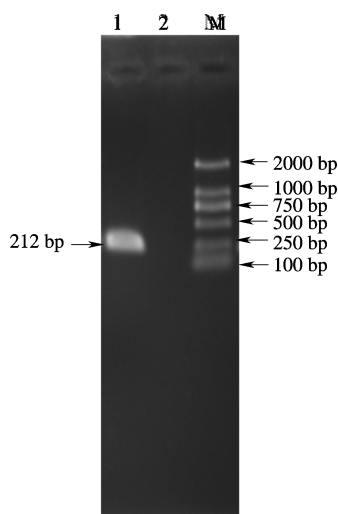
图 5 西葫芦 *CpActin* 与其他 15 种植物同源蛋白的分子进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of *CpActin* and 15 homologous proteins from other plants

2.3 西葫芦 *CpActin* 基因引物设计及常规 PCR 检测

利用荧光定量特异引物对 *CpActin*-Fq、*CpActin*-Rq,以西葫芦叶片 cDNA 第 1 链作为模板进行 PCR 扩增,经 1.25% 凝胶电泳检测 (图 6),得

到 1 条明亮的单一条带,未出现非特异性扩增条带,经测序大小为 212 bp,与 RNA-Seq 数据库中筛选得到的西葫芦 *CpActin* 基因 (GenBank 登录号为 MH211008) 的同源性为 100%。



M: DL 2000 marker; 1: 引物 *CpActin-Fq* 和 *CpActin-Rq* 扩增片段;
2: 阴性对照

M: DL 2000 marker, 1: Fragment of primer *CpActin-Fq* and
CpActin-Rq amplification, 2: Negative control

图6 引物 *CpActin-Fq* 和 *CpActin-Rq* 的 PCR 扩增产物
Fig.6 PCR fragment using the primers *CpActin-Fq*
and *CpActin-Rq*

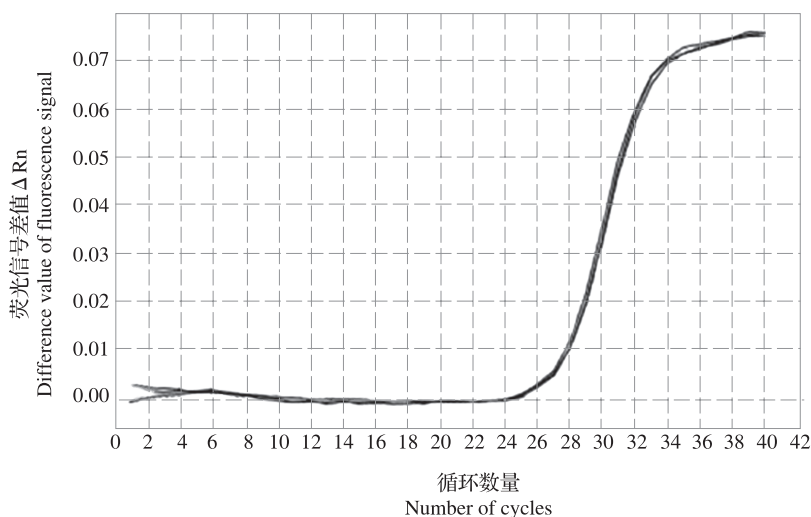


图7 引物 *CpActin-Fq* 和 *CpActin-Rq* 扩增曲线

Fig.7 The amplification curve using the primers *CpActin-Fq* and *CpActin-Rq*

3 讨论

本研究从前期低温弱光转录组数据库中筛选得到一条长达 2543 bp 的全长 cDNA 序列, 包含 1 个 2064 bp 的 ORF, 其编码 Actin 蛋白与中国南瓜 (*Cucurbita moschata* Duchesne, XP_022946832.1) 和印度南瓜 (*Cucurbita maxima* Duchesne, XP_023005736.1) 的同源蛋白的相似性极高, 均达到 99%, 与黄瓜 (*Cucumis sativus* L., XP_004137859.1)、苦瓜 (*Momordica charantia* L., XP_022144570.1) 和甜瓜 (*Cucumis melo* L.,

2.4 西葫芦 *CpActin* 基因荧光定量 PCR 引物检测

以西葫芦叶片 cDNA 第 1 链为模板, 利用引物 *CpActin-Fq*、*CpActin-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 (图 7); 3 次重复的溶解温度均为 81.74 °C, 且均只有一个特异峰, 无引物二聚体, 扩增条带单一, 没有非特异性扩增出现 (图 8), 表明所设计的一对引物特异性强、重复性高, 能够用于西葫芦荧光定量 PCR 的内参引物实验。

2.5 西葫芦 *CpActin* 基因表达稳定性分析

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

XP_008442772.1) 的相似性也均达到 93%。对 *CpActin* 蛋白保守结构域的同源性分析发现, 207~406 位为 Actin 蛋白中端保守结构, 558~682 位为 Actin 蛋白 C 端保守结构域^[28], 西葫芦与中国南瓜和印度南瓜蛋白在两个区域的同源性达到了 100%, 与苦瓜、黄瓜和甜瓜同源蛋白在 C 端保守结构域的同源性也达到 100%, 中端保守结构域也只有 3~5 个氨基酸位点的差异, 表明 Actin 家族在蛋白进化过程中的高度保守性。此外, 通过对 16 种植物同源 Actin 蛋白的系统进化分析也表明, 西葫芦 *CpActin* 与同为葫芦科的中国南瓜、

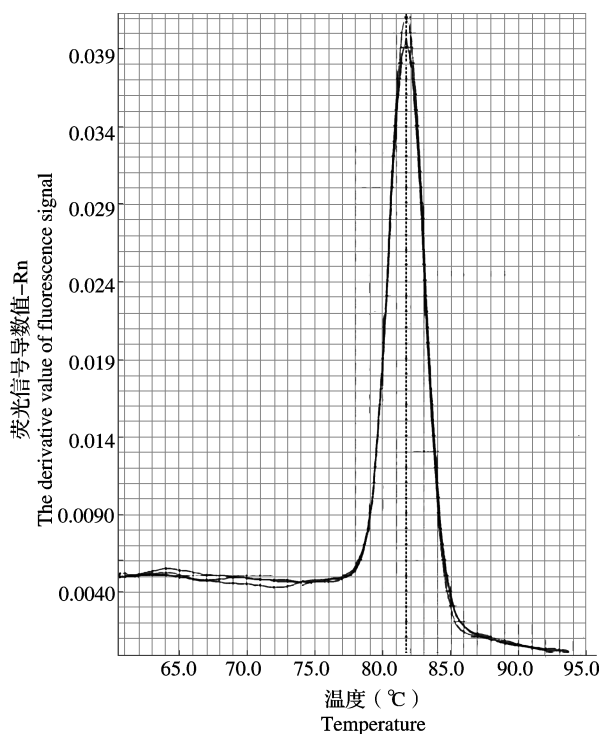
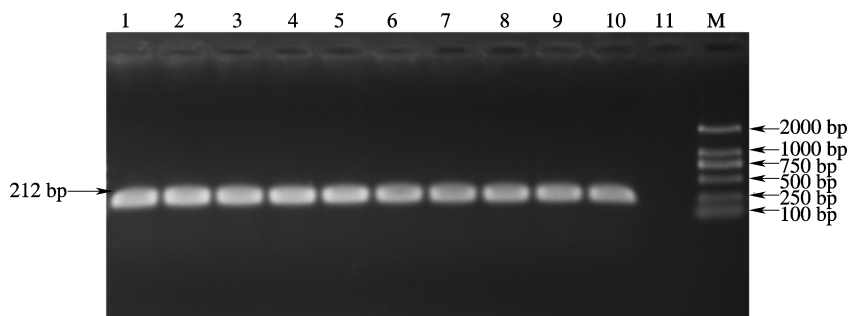


图8 引物 *CpActin-Fq* 和 *CpActin-Rq* 溶解曲线
Fig.8 The melting curve of amplicon using the primers *CpActin-Fq* and *CpActin-Rq*



M: DL 2000 marker; 1: 根; 2: 茎; 3: 花; 4: 果; 5: 正常 (25°C , $300\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 叶片; 6: 低温处理 (4°C , $300\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 叶片; 7: 弱光处理 (25°C , $80\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 叶片; 8: 低温弱光处理 (4°C , $80\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 叶片; 9: 强光处理 (25°C , $2000\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 叶片; 10: 高温处理 (38°C , $300\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 叶片; 11: 阴性对照
M: DL 2000 marker, 1: Root, 2: Stem, 3: Flower, 4: Fruit, 5: No treatment (25°C , $300\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) leaf, 6: Low temperature treatment (4°C , $300\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) leaf, 7: Low light treatment (25°C , $80\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) leaf, 8: Low temperature and low light treatment (4°C , $80\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) leaf, 9: High light treatment (25°C , $2000\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) leaf, 10: High temperature treatment (38°C , $300\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) leaf, 11: Negative control

图9 西葫芦 *CpActin* 基因表达稳定性分析

Fig.9 Test for expression stability using the qRT-PCR primers in different situation of *Cucurbita pepo* L.

研究表明,在基因 qRT-PCR 表达分析实验过程中,同时使用 2 个或多个内参基因可以大幅度地降低系统偏差,从而有助于获得更准确的基因定量表达数据,这对于研究仅有轻微差异的基因表达水平尤为重要。孙美莲等^[32]应用 qRT-PCR 技术对茶树的研究结果表明, *Actin* 基因适合在茶树不同器

印度南瓜、黄瓜和甜瓜 4 种同源蛋白亲缘关系最为接近,推测这些蛋白具有相近或者相似的生物学功能。

Actin 在高等植物内发挥着重要的生物学功能,不同物种间 *Actin* 基因编码蛋白同源性很高 (70%~100%),是研究其他基因表达模式和调控机理中非常重要的分子内标,并常常用于比较不同目的基因表达水平的差异^[29-31]。本研究基于获得的 *CpActin* 基因 (MH211008) 全长 cDNA 序列设计了一对西葫芦 *CpActin* 基因荧光定量 PCR 引物 *CpActin-Fq*、*CpActin-Rq*, PCR 扩增得到 212 bp 大小 DNA 片段。通过荧光定量 PCR 检测发现,引物 *CpActin-Fq*、*CpActin-Rq* 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。另外,本研究的常规 PCR 分析试验结果表明, *CpActin* 基因在西葫芦各个器官组织 (根、茎、花和果) 和不同胁迫处理 (正常、低温、弱光、低温弱光、强光、高温) 叶片中具有稳定的表达水平,推测西葫芦 *CpActin* 属于一种组成型表达基因,因而适宜将其作为研究西葫芦其他重要功能基因的表达分析以及低温弱光调控机理的候选内参^[18]。

官组织的基因定量表达差异中作为校正内参基因,而 *GAPDH* 则适合作为在比较不同发育时期的叶片和愈伤组织的基因定量表达差异中作为校正内参基因。孙亚丽等^[33]的研究表明,8 个候选内参基因 *Actin*、*18S rRNA*、*H2A*、*TUB*、*UBI*、*EF1*、*GAPDH* 和 *CYP* 在不同 Cu^{2+} 浓度中的表达稳定性也各不相同,

单一的内参基因无法达到准确衡量基因表达水平的要求,因此需要使用 *GAPDH* 和 *EF1* 二者组合作为校正内参基因。蒋婷婷等^[34]通过 qRT-PCR 技术综合评价了 *Actin*、 β -*TUB*、*GAPDH*、*UBI* 和 *5S rRNA* 等基因在石蒜属植物中的表达稳定性,并采取了 2 个或多个作为分析不同品种、组织和花期表达的内参基因。针对目前西葫芦中内参基因研究较为薄弱的现状,今后研究将基于西葫芦转录组数据库挖掘西葫芦其他基因如 *GAPDH*、*NADHD*、*18S rRNA*、*TUB*、*UBI* 等,从而发掘出更多更稳定表达的西葫芦内参基因,并筛选出合理的内参基因组合,用于进一步提高西葫芦其他重要功能基因表达分析研究的稳定性、重复性和准确性。

参考文献

- [1] 宋金亮,朱磊,王震,王林忠,孙守如.低温弱光胁迫对西葫芦幼苗生长指标的影响.北方园艺,2017(1):13-17
Song J L, Zhu L, Wang Z, Wang L Z, Sun S R. Effects of low temperature and weak light on growth and physiological index of *Cucurbita pepo* L. Northern Horticulture, 2017(1): 13-17
- [2] 许小江,黄伟忠,何勇.低温弱光下南瓜叶绿素荧光参数等变化及其与品种耐性的关系.核农学报,2015,29(11):2231-2238
Xu X J, Huang W Z, He Y. Changes of chlorophyll fluorescence parameters and correlations between variety tolerance in pumpkin seedlings under chilling and low irradiance conditions. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2015, 29(11): 2231-2238
- [3] Cruz F, Kalaoun S, Nobile P, Colombo C, Almeida J, Barros L M G, Romano E, Grossi-de-Sa M F, Vaslin M, Alves-Ferreira M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. Molecular Breeding, 2009, 23(4): 607-616
- [4] Andersen C L, Jensen J L, Orntoft T F. Normalization of Real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Research, 2004, 64(15): 5245-5250
- [5] 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 cylindrica* and its application as an internal standard. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(1): 35-41
- [6] Chen J H, Sun Y, Sun F, Xia X L, Yin W L. Tobacco plants ectopically expressing the *Ammopiptanthus mongolicus* *AmCBL1* gene display enhanced tolerance to multiple abiotic stresses. Plant Growth Regulation, 2011, 63(3): 259-269
- [7] Zhou L, Wang Y, Peng Z H. Molecular characterization and expression analysis of chalcone synthase gene during flower development in tree peony (*Paeonia suffruticosa*). African Journal of Biotechnology, 2011, 10(8): 1275-1284
- [8] 王彦杰,董丽,张超,王晓庆.牡丹实时定量 PCR 分析中内参基因的选择.农业生物技术学报,2012,20(5):521-528
Wang Y J, Dong L, Zhang C, Wang X Q. Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(5): 521-528
- [9] 陈颖,王刚,赵俊霞.高等植物体内的肌动蛋白.生物学通报,2003(1):13-15
Chen Y, Wang G, Zhao J X. Actin in higher plants. Bulletin of Biology, 2003(1): 13-15
- [10] Dominguez R, Holmes K C. Actin structure and function. Annual Review of Biophysics, 2011, 40: 69-186
- [11] Vidali L, McKenna S T, Hepler P K. Actin polymerization is essential for pollen tube growth. Molecular Biology of the Cell, 2001, 12(8): 2534-2545
- [12] Nadella K S, Saji M, Jacob N K. Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of limk1. European Molecular Biology Organization Report, 2009, 10(6): 599-605
- [13] Kandasamy M K, McKinney E C, Meagher R B. A single vegetative actin isoform overexpressed under the control of multiple regulatory sequences is sufficient for normal *Arabidopsis* development. Plant Cell, 2009, 21: 701-718
- [14] Reece K S, McEkoy D, Wu R. Genomic nucleotide sequence of four rice (*Oryza sativa*) *Actin* genes. Plant Molecular Biology, 1990, 14(41): 621-624
- [15] Yasuda H, Kanda K, Koiwa H. Localization of actin filaments on mitotic apparatus in tobacco BY-2 cells. Planta, 2005, 222(1): 118-129
- [16] 范丙友,李芳,张文婷,史国安.芍药肌动蛋白基因的克隆及表达分析.中草药,2013,44(15):2136-2142
Fan B Y, Li F, Zhang W T, Shi G A. Cloning and expression analysis on actin gene from *Paeonia lactiflora*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(15): 2136-2142
- [17] 梁云,袁素霞,冯慧颖,徐雷锋,袁迎迎,刘春,明军.百合肌动蛋白基因 *lilyActin* 的克隆与表达分析.园艺学报,2013,40(7):1318-1326
Liang Y, Yuan S X, Feng H Y, Xu L F, Yuan Y Y, Liu C, Ming J. Cloning and expression analysis of actin gene (*lilyActin*) from *Lily*. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(7): 1318-1326
- [18] 侯双利,韩梅,刘翠晶,杨利民.人参 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立.中草药,2014,45(17):2530-2533
Hou S L, Han M, Liu C J, Yang L M. Development of real-time fluorescence quantitative RT-PCR assay for β -actin gene of *Panax ginseng*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(17): 2530-2533
- [19] 徐纪明,向太和.全雌性黄瓜中 3 个肌动蛋白基因片段的克隆和表达分析.细胞生物学杂志,2008,30(1):125-130
Xu J M, Xiang T H. Cloning and characterization of three actin genes in gynocercous line cucumber (*Cucumis sativus* L.). Chinese Journal of Cell Biology, 2008, 30(1): 125-130
- [20] 吕品,李娜,刘慧,赵文恩.西瓜八氢番茄红素合成酶基因全长的克隆与表达分析.郑州大学学报:理学版,2014,46(2):104-108
Lv P, Li N, Liu H, Zhao W E. Cloning and expression analysis of phytoene synthase gene in watermelon (*Citrullus lanatus*). Journal of Zhengzhou University: Natural Science Edition,

- 2014, 46(2): 104-108
- [21] 杨瑞平, 刘长命, 莫言玲, 李好, 马建祥, 张勇, 张显. 两个甜瓜材料对白粉病的抗性差异及其生理生化机制研究. 园艺学报, 2016, 43(4): 724-734
Yang R P, Liu C M, Mo Y L, Li H, Ma J X, Zhang Y, Zhang X. Resistance of two different melon varieties against powdery mildew and its physiological and biochemical mechanism. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(4): 724-734
- [22] 王安君, 李玉丹, 黄河勋, 罗少波, 吴廷全, 李任强, 钟玉娟. 南瓜肌醇单磷酸酶基因 *CmIMP1* 和 *CmIMP2* 的克隆与表达分析. 园艺学报, 2016, 43(7): 1315-1325
Wang A J, Li Y D, Huang H X, Luo S B, Wu T Q, Li R Q, Zhong Y J. Cloning and characterization of two genes encoding myo-inositol monophosphatase 1 (*CmIMP1*) and 2 (*CmIMP2*) from pumpkin. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(7): 1315-1325
- [23] 吴洁芳, 纪凯, 冷平, 任杰, 赵胜利, 孙亮. 西葫芦果实 *CpNCED1* 基因 3' 端的克隆及其表达分析. 中国农业大学学报, 2010, 15(5): 25-30
Wu J F, Ji K, Leng P, Ren J, Zhao S L, Sun L. Cloning and analysis of *CpNCED1* gene in zucchini. Journal of China Agricultural University, 2010, 15(5): 25-30
- [24] Obrero A V, Die J, Roman B, Gomez P, Nadal S, Gonzalez-Verdejo C. Selection of reference genes for gene expression studies in zucchini (*Cucurbita pepo*) using qPCR. Journal Agriculture and Food Chemistry, 2011, 59: 5402-5411
- [25] 韩兰兰. 西瓜对低温、弱光及其双重胁迫的响应分析. 武汉: 华中农业大学, 2016
Han L L. Analysis on the responses of watermelon to low temperature, low light density and their dual stresses. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016
- [26] 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
- [27] 刘建汀, 朱海生, 温庆放, 王彬, 张前荣, 陈敏氢, 林琿, 薛珠政. 丝瓜 *WRKY* 转录因子基因的分离与表达分析. 农业生物技术学报, 2017, 25(12): 1950-1960
Liu J T, Zhu H S, Wen Q F, Wang B, Zhang Q R, Chen M D, Lin H, Xue Z Z. Isolation and browning analysis of *WRKY* transcription factor gene of *Luffa* (*Luffa cylindrica*). Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(12): 1950-1960
- [28] Zhang S, Shi L L, Yang Q H, Dong X H, Chi S Y, Liu H Y, Tan B P. Molecular characterization and functional analysis of *Cactin* gene from *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 41: 608-617
- [29] 吴永娜, 胡静, 王引权, 李剑, 张金林. 当归肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析. 中草药, 2012, 43(12): 2485-2489
Wu Y N, Hu J, Wang Y Q, Li J, Zhang J L. Cloning and sequence analysis on actin gene fragment from angelica sinensis. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(12): 2485-2489
- [30] 王洪振, 程焉平. 细胞核内肌动蛋白参与基因转录的研究进展. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2005(2): 34-36
Wang H Z, Cheng Y P. Advances of nuclear actin involving in gene transcription. Jilin Normal University Journal: Natural Science Edition, 2005(2): 34-36
- [31] Wasteney G O. The cytoskeleton and growth polarity. Plant Biology, 2003, 3: 503-511
- [32] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 韦朝领, 高丽萍, 夏涛, 单育, 骆洋. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择. 植物学报, 2010, 45(5): 579-587
Sun M L, Wang Y S, Yang D Q, Wei C L, Gao L P, Xia T, Shan Y, Luo Y. Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis*. Chinese Bulletin of Botany, 2010, 45(5): 579-587
- [33] 孙亚丽, 张德辉, 赵亮, 夏聪聪, 丑敏霞. 铜胁迫下天蓝苜蓿根组织实时定量 PCR 内参基因的选择. 农业生物技术学报, 2014, 22(10): 1223-1231
Sun Y L, Zhang D H, Zhao L, Xia C C, Chou M X. Reference gene selection for real-time quantitative PCR in black medic (*Medicago lupulina* L.) root tissue under copper stress. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(10): 1223-1231
- [34] 蒋婷婷, 高燕会, 童再康. 石蒜属植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择. 园艺学报, 2015, 42(6): 1129-1138
Jiang T T, Gao Y H, Tong Z K. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lycoris*. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(6): 1129-1138