

百合肌动蛋白基因 *lilyActin* 的克隆与表达分析

梁云, 袁素霞, 冯慧颖, 徐雷锋, 袁迎迎, 刘春, 明军*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 为了在百合功能基因表达研究中选择一个理想内参基因, 依据岷江百合 cDNA 文库所获得的百合肌动蛋白 (Actin) 基因的 EST 序列, 采用 RACE 技术进行该基因 cDNA 全长克隆, 并利用实时荧光定量 PCR 分析其在不同组织中的表达模式, 获得百合肌动蛋白基因 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: JX826390), 命名为 *lilyActin*。该基因 cDNA 全长 1 367 bp, 其中, 5'非编码区 91 bp, 3'非编码区 233 bp, 开放读码框 1 134 bp, 编码 377 个氨基酸。序列比对发现, 该基因与其它 15 种植物肌动蛋白核苷酸序列的相似性均在 80%以上, 氨基酸序列的相似性达 98%。进化分析显示, 百合肌动蛋白与郁金香肌动蛋白的亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 结果显示, 该基因在百合的花蕾、叶片和鳞片组织中恒定表达, 表明相对于其他物种的内参基因, *lilyActin* 更适宜作为百合属植物的内参基因。

关键词: 百合; Actin 基因; 基因克隆; 表达分析; 内参基因

中图分类号: S 682.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 07-1318-09

Cloning and Expression Analysis of Actin Gene (*lilyActin*) from Lily

LIANG Yun, YUAN Su-xia, FENG Hui-ying, XU Lei-feng, YUAN Ying-ying, LIU Chun, and MING Jun*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In this study, the objective is to provide a reference gene for gene expression studies of *Lilium*. Based on the actin gene EST sequence of the cDNA library of *Lilium regale* Wilson, a full-length cDNA sequence was cloned from *Lilium regale* Wilson through rapid amplification of cDNA ends (RACE) method and the gene expression characters were analyzed by the real time PCR. The full-length cDNA sequence (GenBank: JX826390) designated as *lilyActin* from *Lilium regale* Wilson was 1 367 bp in length, contains a 1 134 bp open reading frame (ORF) encoding a 377 amino acid proteins, with 91 bp in the 5' UTR and 233 bp in the 3' UTR. Homologous alignment shows that it shares over 80% nucleotide sequence similarity and over 98% amino acid sequence similarity with actins in other plants. The phylogenetic tree reconstructed on the base of amino acid sequences suggests that the relationship of actin between *Lilium regale* and *Tulipa gesneriana* is the most intimate. Real time PCR analysis revealed that *lilyActin* was constantly expressed in various organs of *Lilium regale* Wilson such as flowers, leaves, bulbs. The results

收稿日期: 2013-02-28; **修回日期:** 2013-05-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272205); 国家科技支撑计划项目 (2012BAD01B07); 国家社会公益研究专项项目 (2005DIB3J022); 国家 '863' 计划项目 (2011AA100208); 国家公益性行业 (农业) 科研专项项目 (200903008-06, 200903020); 北京市花卉重点项目 (YLHH2006001, YLHH201200101); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: mingjun@caas.cn)

showed that relative to other reference gene *lilyActin* can be more appropriate for *Lilium*.

Key words: lily; Actin gene; gene clone; expression analysis; reference gene

肌动蛋白 (Actin) 基因通常作为研究其他基因或外源基因表达的内标基因之一, 是相关功能基因表达研究的基础。由于百合的基因组很大, 约为 13.399 ~ 46.846 Gbp (Zonneveld et al., 2005), 背景复杂, 相关研究薄弱, 目前已有报道均借用其他物种的内参基因, 仅在 GenBank 中有 1 个百合 actin-like mRNA 片段记录, 尚未见有关百合 Actin 基因克隆和应用研究的报道。因此, 获取百合属植物的 Actin 基因, 分析测定其表达稳定性, 以确定适宜百合属植物的内标, 对今后百合重要功能基因表达的研究具有重要意义。

肌动蛋白 (Actin) 是真核生物细胞中普遍存在的重要蛋白质, 构成细胞骨架中的微丝 (microfilament) 系统。高等植物的肌动蛋白是单一多肽链的球状蛋白质, 由 375 ~ 377 个氨基酸组成, 分子量约 42 kD (Kost et al., 1999)。迄今为止, 已相继从水稻 (Reece et al., 1990)、大豆 (Shah et al., 1992)、拟南芥 (Kandasamy et al., 2002)、烟草 (Yasuda et al., 2005)、花生 (杨丽霞和李玲, 2006)、海棠 (徐锦涛等, 2008)、玉米 (Alexandrov et al., 2009)、苧麻 (唐守伟等, 2010)、结缕草 (王舟等, 2010)、番木瓜 (申艳红等, 2010)、豌豆 (张磊等, 2010)、桑树 (李军等, 2011)、萼脊兰 (袁秀云等, 2012) 等高等植物中克隆出肌动蛋白基因。这些基因相似度高, 由共同的祖先通过不断复制和分化遗传而来, 在进化过程中保持着高度的保守性和同源性。而百合属植物 Actin 基因还未被克隆。

目前百合基因表达研究中应用的内参基因有: 其他植物的组成表达型 actin 基因 (吴小萍等, 2006)、actin-like mRNA 片段 (王爱菊等, 2008)、18S rRNA (Wang et al., 2011)、18S 基因 (易瑾等, 2012)。但是, 在植物细胞中, 由于肌动蛋白是由多基因家族编码, 会产生多种肌动蛋白异型体 (Clark et al., 2007), 虽然植物 Actin 异型体在一级结构上的同源性很高, 但其时空表达具有组织和器官特异性, 因而可能执行不同的功能 (Kandasamy et al., 2009)。因此, 获得百合属植物自己的 Actin 基因作为研究百合基因表达模式的内参基因, 才符合一个理想内标基因的标准。

本研究中基于岷江百合 cDNA 文库获得的 EST 序列, 通过 RACE 技术克隆该基因的全长, 并运用实时荧光定量 PCR 测定其在百合不同组织中的表达情况, 以期为进一步开展百合其他重要功能基因的表达模式分析和调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以中国农业科学院蔬菜花卉研究所百合课题组收集保存的野生型岷江百合 (*Lilium regale* Wilson) 作供试材料, 分别取鳞茎、叶片、不同发育时期的花蕾, 经液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱中备用。

大肠杆菌 TOP10 购自诺维森 (北京) 生物技术有限公司; 原核表达载体 pMD18 购自 TaKaRa 公司; 第一链 cDNA 合成试剂盒和 RACE 试剂盒购自 invitrogen 公司; 荧光定量试剂盒购自 life technology 公司; 引物合成和基因测序由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

根据已构建的岷江百合 cDNA 文库获得的 EST 序列和 Invitrogen GeneRacer™ Kit 要求设计 5'RACE 基因特异引物 (GSP) 和巢式基因特异引物 (GSP Nested)。引物序列由 Primer 5.0 引物设计软件评价生成, 并委托北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。P1 (5'GSP): 5'TGGAAAGTGC

TCAAGGAAGCCAAGAT3'及巢式基因特异引物 P2 (5'GSP Nested): 5'ATGTAGCCCCTCTCA GTCAGGATTT3'; 3'RACE 基因特异引物 P3 (3'GSP): 5'TGTCAGCCACACAGTGCCAATC3'及巢式基因特异引物 P4 (3'GSP Nested): 5'GCCACACAGTGCCAATCTATGA3'。根据获得的基因全长序列设计实时荧光定量 PCR 的引物 P5: 5'GCATCACACCTTCTACAACG3'及 P6: 5'GAAGAGCATAA CCCTCATAGA3'。

百合肌动蛋白基因 *lilyActin* 的克隆与表达分析试验于 2012 年 5—10 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所进行。

1.2 方法

1.2.1 百合 RNA 提取

百合鳞片、叶片、花蕾总 RNA 的分离分别按照百泰克多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒、艾德莱 RNAPure 超纯总 RNA 提取试剂盒、EASYspin Plus 植物 RNA 提取试剂盒的说明书进行。用分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值, 并根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值判断 RNA 的质量, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 5'和 3'RACE 扩增

将提取的叶片总 RNA 按照 Invitrogen GeneRacer™ Kit 说明书进行处理后合成 cDNA 第一链, 引物使用随机引物 olig(dT)18。

5'和 3'扩增按 Invitrogen GeneRacer™ Kit 所提供的试剂和说明书要求进行, 使用 Invitrogen Taq DNA Polymerase 酶进行扩增。PCR 扩增条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 72 °C 1 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 1 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 65 ~ 60 °C 复性 30 s, 每个循环退火温度降 0.5 °C, 68 °C 1 min, 10 个循环; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 68 °C 1 min, 20 个循环; 72 °C 10 min。5'/3'RACE 巢式 PCR 以第一次 PCR 产物为模板进行反应, 扩增程序为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 68 °C 2 min, 25 个循环; 68 °C 10 min。

PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 扩增产物回收、连接及转化

目的片段的回收和纯化按诺维森的小量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒操作说明书进行, 将回收的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 16 °C 连接过夜后进行转化测序。

1.2.4 序列分析

通过 DNASTAR 软件对所得的片段的核苷酸序列进行拼接, 获得全长 cDNA 序列。应用 NCBI 的 ORF 程序对所得全长序列进行分析, 得出该基因的开放阅读框 (ORF) 及其 5'非编码区和 3'非编码区, 并推导出其氨基酸序列。分别用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 计算蛋白的分子量及等电点, 使用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白质的疏水性, 应用 SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽。

使用 NCBI 中的 Blast 对所得基因的核苷酸序列与氨基酸序列进行比对, 根据结果选取各种植物的 Actin 氨基酸序列, 采用 Clustalx1.83 软件进行多重比对, 并将比对结果用 Mega 5.0 软件采用 Bootstrap 算法绘制成系统发育树。

1.2.5 基因表达及差异分析

分别提取百合鳞片、叶、花蕾的 RNA, 用吸光值法测定不同组织的 RNA 量。不同组织取等量的 RNA 进行逆转录, 然后进行实时荧光定量 PCR。

实时荧光定量 PCR 反应体系为 15 μL: Mix 7.5 μL, P5 0.15 μL; P6 0.15 μL; cDNA 1.5 μL; Sterile Water 补至 15 μL。

ABI7900HC PCR 仪上扩增程序为: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 循环数 40 个。PCR 扩增产物先用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。表达水平计算方法为 ΔCT , 计算公式为: 表达水平 = $2^{-\Delta CT}$ 。应用 SPSS 软件进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 百合 Actin 基因全长 cDNA 序列的克隆

分别提取百合花蕾、叶片和鳞片的总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 28S RNA 和 18S RNA 的亮度比例达到 2:1, 说明 RNA 的完整性较好, 可以用于后续试验。

根据已经获得的 556 bp 片段序列设计基因特异引物 (GSP) P1/P3 和巢式基因特异引物 (GSP Nested) P2/P4, 以百合叶片 RNA 为模板, 采用 5' RACE 方法扩增 *Actin* 的 5' 端, 得到一条约为 700 bp 的 DNA 片段 (图 1)。

另外, 设计 GSP 引物 P3 和 NGSP 引物 P4, 采用 3' RACE 的方法扩增 *Actin* 的 3' 端, 得到一条约为 1 000 bp 的 DNA 片段 (图 2), 测序后经 NCBI BLAST 比对证实为 *Actin* 的 5' 端和 3' 端序列。使用 DNASTAR 软件对所获得的基因序列进行拼接后, 获得了全长 cDNA 序列, 将其命名为 *lilyActin*。

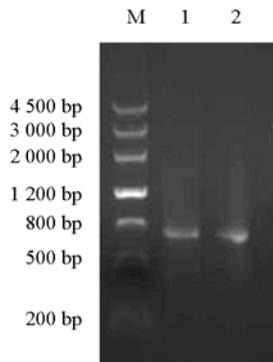


图 1 5'RACE 结果

M: Marker III; 1: 以 P1 为引物第一次扩增;
2: 以 P2 为引物巢式 PCR。

Fig. 1 5'RACE amplification product

M: Marker III; 1: The first amplification product of 5'RACE;
2: The second amplification product of 5'RACE.

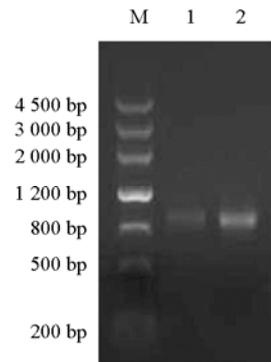


图 2 3'RACE 结果

M: Marker III; 1: 以 P3 为引物第一次扩增;
2: 以 P4 为引物巢式 PCR。

Fig. 2 3'RACE amplification product

M: Marker III; 1: The first amplification product of 3'RACE;
2: The second amplification product of 3'RACE.

2.2 测序结果及序列分析

百合 *Actin* 基因全长 cDNA 序列为 1 367 bp, 应用 NCBI 的 ORF 程序显示 5' 非编码区 91 bp, 3' 非编码区 233 bp, 开放读码框为 1 134 bp, 编码 377 个氨基酸 (图 3)。将其序列提交到 GenBank 数据库中, 登录号为 JX826390。

经 ProtParam 程序预测 *lilyActin* 编码的蛋白质分子量为 41.6 kD, 等电点为 5.31。SignalP4.0 预测无信号肽序列, 为非分泌蛋白。*lilyActin* 的氨基酸疏水性分析采用 DNAMAN 软件进行, 结果表明, 其亲水氨基酸含量高于疏水性氨基酸含量, 这说明 *lilyActin* 具有很强的亲水性, 不具明显的跨膜区。

```

1      GAAAGTTCTCTCTCATCGTCTCCGCCGGCGAAGCGAAGGAGCTCCGACTCGGGTGC
61     CCGTCTTCAAGGGTTAGATAAACTATAAAGCCATGGCTGATGCCGAGGATATTCAGCC
        H A D A E D I Q P L
121    TGTCTGCGACAATGGTACTGGAATGGTGAAGGCTGGATTTGCTGGAGATGATGCCCAAG
        V C D N G T G M V K A G F A G D D A P R
181    GGCTGTTTTCCCAAGTATTGTTGGCCGACCCCGCCACACTGGTGTTCATGGTTGGGATGG
        A V F P S I V G R P R H T G V M V G M G
241    TCAGAAAGATGCTTATGTTGGTGATGAGGCCCAATCCAAGAGAGGTATCCTTACTTTGAA
        Q K D A Y V G D E A Q S K R G I L T L K
301    GTACCCTATCGAACACGGAAATGTCAGTAAGTGGGATGACATGGAGAAGATTTGGCATCA
        Y P I E H G I V S N W D D M E K I W H H
361    CACCTTCTACAACGAGCTTCGTGTTGCCACCAGAAGAATCCAGTCTTCTCACAGAAGC
        T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A
421    CCCACTCAACCCCAAGGCCAACAGGGAGAAGATGACACAAATCATGTTTGAGACCTTCAA
        P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F N
481    TGTCCCTGCCATGTATGTGCCATTTCAGGCTGTCCCTCTCCCTGTATGCCAGTGGTGTAC
        V P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T
541    AACAGGTATCGTGTGGATTCTGGTGATGGTGTACGCCACACAGTGCCTATATGAGGG
        T G I V L D S G D G V S H T V P I Y E G
601    TTATGCTCTCCGCATGCCATTCTGAGGCTTGACCTCGCTGGCAGGGATCCTTACTGACTC
        Y A L P H A I L R L D L A G R D L T S
661    CCTCATGAAAATCCTGACTGAGAGGGGCTACATGTTTCAAACTACAGCTGAACGGGAAAT
        L M K I L T E R G Y M F T T T A E R E I
721    TGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTTGCATATGTGGCTCTGGATTATGAGCAGGAGCTAGA
        V R D I K E K L A Y V A L D Y E Q E L E
781    GACTGCAAAGAGCAGCTCATCAGTTGAGAAGAATTACGAGCTGCCTGATGCCAGGTCAT
        T A K S S S S V E K N Y E L P D G Q V I
841    CACCATTTGGAGCTGAGCGCTTCAGATGCCCGGAGGTCCTCTTCCAGCCTTCACTCATTGG
        T I G A E R F R C P E V L F Q P S L I G
901    AATGGAAGCTGCTGGCATCCACGAGACCACCTATAATTCAATCATGAAGTGTGATGTCGA
        M E A A G I H E T T Y N S I M K C D V D
961    TATCAGGAAGGATCTATATGGGAACATCGTTCCTTAGTGGTGGATCGACGATGTTCCCGGG
        I R K D L Y G N I V L S G G S T M F P G
1 021  CATTGTGACCGTATGAGCAAGGAGATCACTGCCTGCTCCTAGCAGCATGAAGATTAA
        I A D R M S K E I T A L A P S S M K I K
1 081  GGTGGTTGCCCCACCGGAGAGGAAGTACGGTGTCTGGATTGGAGGGTCAATCTTGGCTTC
        V V A P P E R K Y G V W I G G S I L A S
1 141  CTTGAGCCTTTCCAACAGATGTGGATATCGAAGGCCGAGTTTGATGAATCTGGTCCAGC
        L S T F Q Q M W I S K A E F D E S G P A
1 201  CATCGTCCACAGGAAGTGCTTCTAAGGTGTTTCTTCTGGTTCATTGGTTCCTTGGTGTATT
        I V H R K C F
1 261  TCATCTATACTATGGTGTTCGTTATCTAGTATGGTAGGTGGCTTGTGTGAGGATATTC
1 361  TTGTTTGGCAATTTGTTTTTGGTGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图3 百合 *lilyActin* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

箭头分别代表起始密码子和终止密码子。

Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *lilyActin* from *Lilium regale* Wilson.

The arrows are separately initiation codon and termination codon.

将此序列在 NCBI 网站上进行 Blast X 比对分析, 结果显示, 序列中含有多个 Actin 基因家族的特异性结合位点。 *lilyActin* 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NP196543.1) 等 15 种植物 Actin 核苷酸序列的相似性均在 82% 以上, 其中, 与棉花 (*Gossypium hirsutum*, AAP73457.1) Actin 的同源性高达 99%, 与含羞草 (*Mimosa pudica*, BAA89214.1)、大豆 (*Glycine max*, XP003523242.1) 及蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*, XP003602545.1) 等植物 Actin 的同源性高达 98%, 说明该基因为肌动蛋白基因。

将百合 *lilyActin* 推导的氨基酸序列与在 NCBI 数据库中筛选出的与其相似性较高 15 种植物的 Actin 蛋白进行了多序列比较分析 (图 4), 结果是, 不同植物的 Actin 蛋白氨基酸序列只有在个别位置有突变发生, 说明了植物肌动蛋白基因高度保守, 这与它参与细胞的重要生命活动是密切相关的。

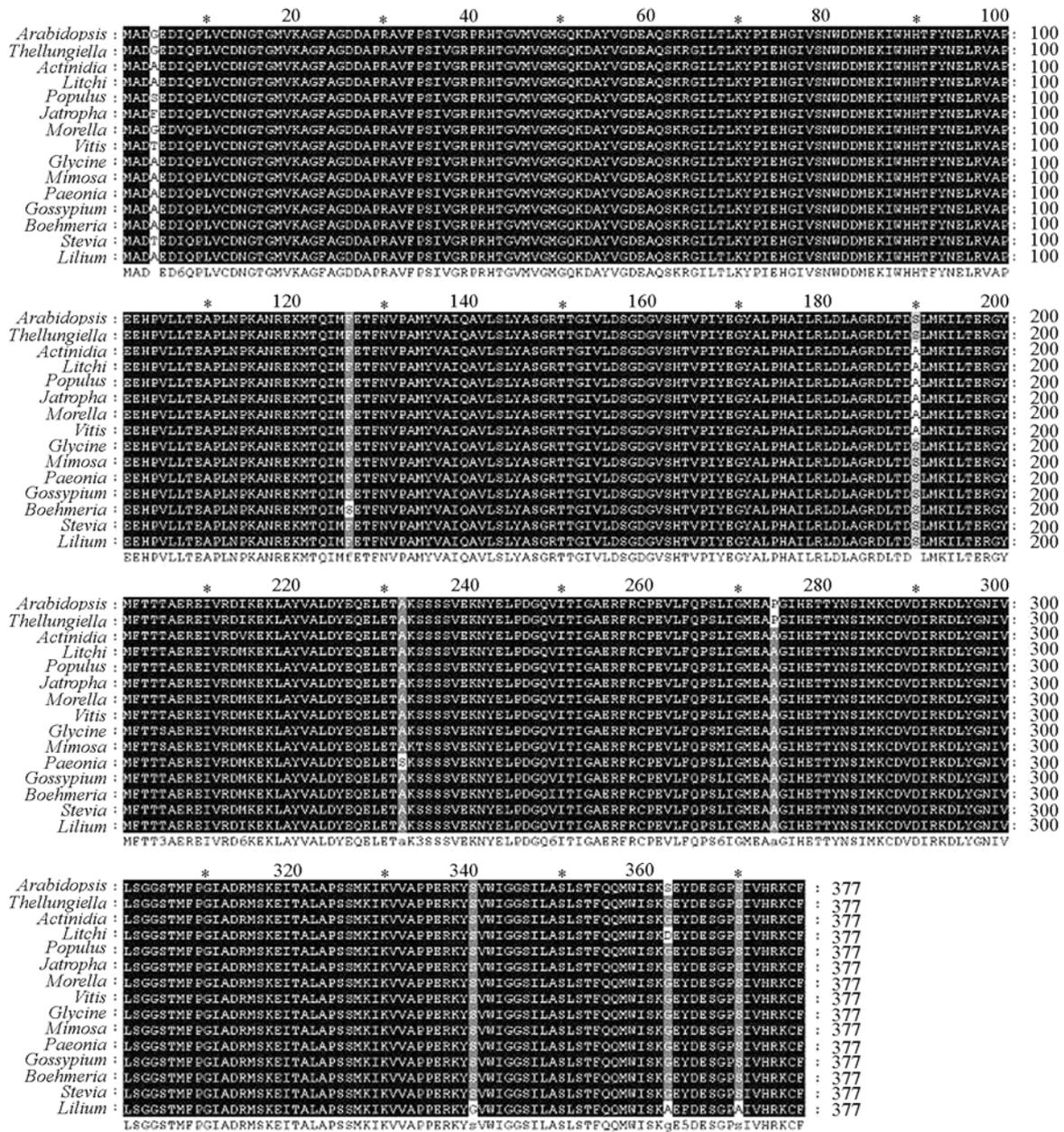


图 4 百合 *lilyActin* 与其它 15 种植物 Actin 的氨基酸序列比对

Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of *lilyActin* and other actins from 15 kinds of plants

根据多序列比对的的结果将其绘制成进化树(图 5), 结果显示: 百合肌动蛋白与郁金香肌动蛋白 (*Tulipa gesneriana*, BAH98157.1) 的亲缘关系最近, 并与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NP196543.1)、小盐芥 (*Thellungiella halophila*, BAJ34498.1) 肌动蛋白具有相对较近的亲缘关系, 与含羞草 (*Mimosa pudica*, BAA89214.1)、大豆 (*Glycine max*, XP003523242.1)、苜蓿 (*Medicago truncatula*, XP003602545.1) 及小麦 (*Triticum aestivum*, AAW78915.1) 肌动蛋白组成的小进化群体亲缘关系较远。这说明百合与其他植物 Actin 基因之间的进化是在多个核苷酸产生了突变。但是其他植物肌动蛋白基因之间如杨梅 (*Morella rubra*, BAK57343.1) 与荔枝 (*Litchi chinensis*, ADV17460.1)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*,

XP 002331880.1)、葡萄 (*Vitis vinifera*, XP 002282516.1) 与麻枫 (*Jatropha curcas*, ADH82414.1) 等都相对比较集中的分布在小进化群中, 这说明植物 Actin 基因之间的进化可能只是在少数核苷酸产生了突变。

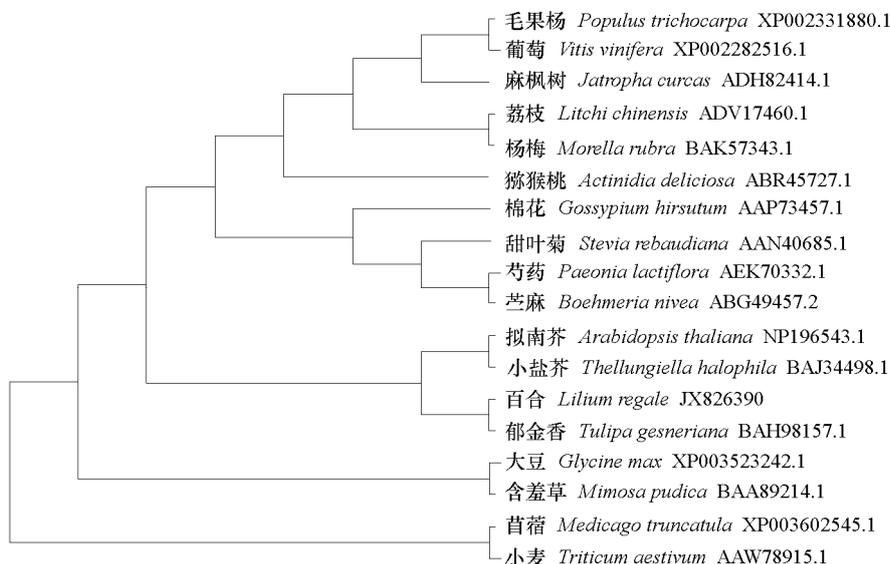


图 5 百合 *lilyActin* 与其它植物 Actin 的进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *lilyActin* of *Lilium regale* Wilson and other plants

2.4 *lilyActin* 在不同组织部位的表达

检测 *lilyActin* 在百合鳞片、叶片、花蕾的表达及差异, 结果显示, *lilyActin* 在这些组织中均有表达。

应用 Δ CT 法计算 *lilyActin* 在各组织中的表达量结果, 以叶片的表达量为 1 计算, 鳞片的相对表达量为 0.990, 花蕾的相对表达量为 0.976, 各组织无显著性差异 (图 6)。因此可推断, *lilyActin* 应该为组成型表达的肌动蛋白基因。

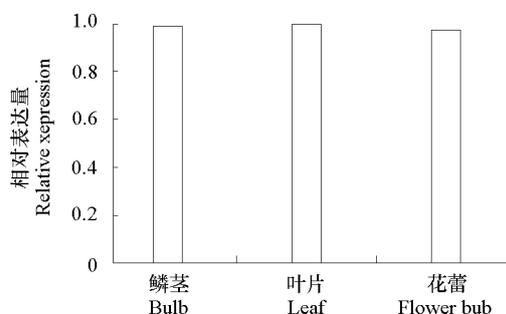


图 6 *lilyActin* 基因不同器官中的表达量

Fig. 6 Expression pattern of *lilyActin* in different tissues

3 讨论

已有的研究表明, Actin 参与真核生物细胞的许多重要的生命活动, 如: 细胞形状的维持、胞质环流、细胞运动、细胞分裂、细胞分化、细胞内的物质运输、极性建成以及信号转导等 (Staiger, 2000)。同时, Actin 基因不论在核苷酸还是氨基酸水平上都具有高度的保守性和同源性, 在各种组织中恒定表达, 因而常被作为研究其他基因的表达模式及调控机制的分子内标, 以比较不同来源的目的基因表达量的差异 (Wasteneys, 2003)。理论上, 一个理想的内参应该在各种不同的细胞类型、

不同发育阶段、采用不同处理方法时都能稳定表达, 一个稳定的内标是确定目标基因相对表达量的基础。植物的 Actin 基因具有序列高度保守、mRNA 表达数量高且稳定的特点, 因此, 常作为内参基因被广泛使用 (胡瑞波 等, 2009)。

本试验克隆得到百合的 1 个肌动蛋白基因 (*lilyActin*) 全长 cDNA 序列。*lilyActin* 基因与 GenBank 收录的其他植物肌动蛋白基因的同源性在 80% 以上, 其氨基酸序列同源性达 98% 以上, 该基因与 Huang (2005) 克隆的 actin-like mRNA 片段 (GenBank: DQ019459) 同源性也很高, 表明高等植物的 Actin 基因是一种高度保守的看家基因。

本试验系统发育树结果显示: 百合肌动蛋白基因 *lilyActin* 与郁金香的肌动蛋白基因亲缘关系最密切, 但多重比较结果显示, 该基因与其他植物的 Actin 基因存在着差异。因此, 若以其他植物的 Actin 基因作为研究百合植物其他基因或外源基因表达的内标基因, 会对基因表达研究的准确性造成一定的影响。本试验中实时荧光定量 PCR 结果显示, *lilyActin* 在各个组织都有稳定的表达, 且表达水平基本一致, 因此推断 *lilyActin* 为组成型表达的肌动蛋白基因, 适宜将其作为研究百合其他功能基因的表达模式及调控机制的内参基因。

本研究以岷江百合叶片材料, 分离出百合的一个 Actin 基因, 至于其是否存在基因家族, 将要在后续研究中加以证实。因此, 后续工作须以百合的不同器官如根、茎、不同时期花蕾等为材料进行更进一步系统研究。*lilyActin* 的克隆不仅填补了百合 Actin 研究领域的空白, 而且丰富了高等植物 Actin 的核酸数据库, 为进一步深入研究 Actin 的功能、保守性、变异性及其与生命起源与进化的关系提供了新的数据。

References

- Alexandrov N N, Brover V V, Freidin S. 2009. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol Biol*, 69 (1 - 2): 179 - 194.
- Clark John R, Stafne Eric T, Hall Harvey K. 2007. Blackberry breeding and genetics// Jules Janiek. *Plant breeding reviews*. Portland: Timber Press: 29: 19 - 144.
- Hu Rui-bo, Fan Cheng-ming, Fu Yong-fu. 2009. Reference gene selection in plant real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11 (6): 30 - 36. (in Chinese)
- 胡瑞波, 范成明, 傅永福. 2009. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择. *中国农业科技导报*, 11 (6): 30 - 36.
- Kandasamy M K, Mc Kinney E C, Meagher R B. 2002. Functional non-equivalency of Actin isoforms in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol Cell*, 13: 251 - 261.
- Kandasamy M K, McKinney E C, Meagher R B. 2009. A single vegetative actin isoform overexpressed under the control of multiple regulatory sequences is sufficient for normal *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 21: 701 - 718.
- Kost B, Mathur J, Chau N H. 1999. Cytoskeleton in plant development. *Plant Biol*, (2): 462 - 470.
- Li Jun, Zhao Ai-chun, Wang Xi-ling, Zhang Qiong-yu, Li Qi-you, Jin Xiao-yun, Li Zhen-gang, Yu Mao-de. 2011. Molecular cloning and tissues expression analysis of three actin genes from mulberry (*Morus alba*). *Acta Agronomica Sinica*, 37 (4): 641 - 649. (in Chinese)
- 李 军, 赵爱春, 王茜龄, 张琼予, 黎其友, 金筱耘, 李镇刚, 余茂德. 2011. 三个桑树肌动蛋白基因的克隆与组织表达分析. *作物学报*, 37 (4): 641 - 649.
- Reece K S, McEkoy D, Wu R. 1990. Genomic nucleotide sequence of four rice (*Oryza sativa*) Actin genes. *Plant Mol Biol*, 14 (41): 621 - 624.
- Shah D M, Hightower R C, Meagher R B. 1992. Complete nucleotide sequence of a soybean Actin gene. *Proc Nat Acad Sci (USA)*, 79: 1022 - 1026.
- Shen Yan-hong, Chen Xiao-jing, He Wei-yi, Lu Bing-guo. 2010. Cloning, sequence and express pattern analysis of actin gene from *Carica papaya*. *Journal of Fruit Science*, 27 (6): 924 - 929. (in Chinese)
- 申艳红, 陈晓静, 何玮毅, 卢秉国. 2010. 番木瓜肌动蛋白 CpActin 基因的克隆及其在果肉中的表达. *果树学报*, 27 (6): 924 - 929.

- Staiger C J. 2000. Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Plant Mol Biol*, 51: 257 - 288.
- Tang Shou-wei, Zhu Ai-guo, Wang Yan-zhou, Zhu Si-yuan, Liu Jian-xin, Xiong He-ping. 2010. Cloning and tissue expression of Actin1 gene in different fiber development phases of ramie [*Boehmeria nivea* (Linn.) Gaud]. *Acta Agronomica Sinica*, 36 (1): 101 - 108. (in Chinese)
唐守伟, 朱爱国, 王延周, 朱四元, 刘建新, 熊和平. 2010. 苧麻 Actin1 基因克隆及其在韧皮部纤维不同发育阶段的表达. *作物学报*, 36 (1): 101 - 108.
- Wang Ai-ju, Tang Jin-fu, Zhao Xiang-yun, Zhu Li-huang. 2008. Isolation of LiLFY1 and its expression in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (9): 2755 - 2761. (in Chinese)
王爱菊, 唐金富, 赵祥云, 朱立煌. 2008. 百合 LiLFY1 基因的克隆和表达分析. *中国农业科学*, 41 (9): 2755 - 2761.
- Wang Zhou, Zong Jun-qin, Xuan Ji-ping, Guo Ai-gui, Liu Jian-xiu. 2010. Cloning and sequence analysis of full-length cDNA of an actin gene from zoysia grass (*Zoysia japonica*). *Acta Prataculturae Sinica*, 19 (6): 154 - 163. (in Chinese)
王 舟, 宗俊勤, 宣继萍, 郭爱桂, 刘建秀. 2010. 结缕草肌动蛋白基因全长 cDNA 的克隆及序列分析. *草业学报*, 19 (6): 154 - 163.
- Wasteneys G O. 2003. The cytoskeleton and growth polarity. *Plant Biol*, 3: 503 - 511.
- Wu Xiao-ping, Xi Meng-li, Shi Ji-sen. 2006. Cloning and expression of AMADS box gene LLGLO1 from *lilium longiflorum* Thunb. *Plant Physiology Communications*, 45 (7): 871 - 876. (in Chinese)
吴小萍, 席梦利, 施季森. 2006. 麝香百合 LLGLO1 基因的克隆和表达. *植物生理学通讯*, 45 (7): 871 - 876.
- Xu Jin-tao, Zhang Zhen, Peng Ri-he, Xiong Ai-sheng, Liu Jin-ge, Zhou Jun, Cai Bin, Gao Feng, Fu Xiao-yan, Yao Quan-hong. 2008. Cloning and analysis of MrACT from *Malus micromalus*. *Journal of Fruit Science*, 25 (3): 289 - 292. (in Chinese)
徐锦涛, 章 镇, 彭日荷, 熊爱生, 刘金戈, 周 军, 蔡 斌, 高 峰, 付晓燕, 姚泉洪. 2008. 八棱海棠肌动蛋白基因 (MrACT) 的克隆及分析. *果树学报*, 25 (3): 289 - 292.
- Yang Li-xia, Li Ling. 2006. Clone and sequence analysis of actin gene in peanut leaves. *Journal of Peanut Science*, 35 (4): 6 - 9. (in Chinese)
杨丽霞, 李 玲. 2006. 花生肌动蛋白基因的克隆及序列分析. *花生学报*, 35 (4): 6 - 9.
- Yasuda H, Kanda K, Koiwa H. 2005. Localization of Actin filaments on mitotic apparatus in tobacco BY-2 cells. *Planta*, 222 (1): 118 - 129.
- Yi Jin, Luo Xiao, Cao Xing, Chen Li, Xin Hai-bo, Li Xiao-xin, Chen Jin, Yi Ming-fang. 2012. Cloning and expression analysis of *LIHSF1* from *Lilium longiflorum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (11): 2199 - 2205. (in Chinese)
易 瑾, 罗 弦, 曹 兴, 陈 莉, 辛海波, 李晓昕, 陈 进, 义鸣放. 2012. 百合热激转录因子基因 *LIHSF1* 的克隆与表达分析. *园艺学报*, 39 (11): 2199 - 2205.
- Yuan Xiu-yun, Tian Yun-fang, Jiang Su-hua, Cui Bo. 2012. Cloning and sequence analysis of actin gene fragment from *Sedirea japonica*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 28 (13): 243 - 248. (in Chinese)
袁秀云, 田云芳, 蒋素华, 崔 波. 2012. 萼脊兰 Actin 基因片段的克隆及序列分析. *中国农学通报*, 28 (13): 243 - 248.
- Zhang Lei, Liu Zhi-peng, Zhang Ji-yu, Zhang Miao-qing, Wang Yan-rong. 2010. Cloning and sequencing of two actin genes from *Vicia sativa*. *Biotechnology Bulletin*, (9): 70 - 75. (in Chinese)
张 磊, 刘志鹏, 张吉宇, 张妙青, 王彦荣. 2010. 箭筈豌豆两个肌动蛋白片段的克隆及序列分析. *生物技术通报*, (9): 70 - 75.
- Zonneveld B J M, Leitch I J, Bennett M D. 2005. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Annals of Botany*, 96: 229 - 244.