

水分亏缺条件下豌豆肌动蛋白异型体 *PEAcII* 基因的表达

张少斌¹ 刘 曦¹ 赵依诗¹ 汪 澈¹ 刘国琴²

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院 辽宁 沈阳 110161; 2. 中国农业大学 植物生理学与生物化学国家重点实验室 北京 100094)

摘要:以培养3~4 d的豌豆幼苗为试验材料,以18S rRNA基因为内参基因,豌豆幼肌动蛋白异型体 *PEAcII* 基因为检测基因,在PEG6000模拟水分亏缺条件下,采用半定量逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)体系检测肌动蛋白异型体 *PEAcII* 基因在豌豆幼苗中的表达情况。在正常供水条件下, *PEAcII* 在处理的第8 h表达量最高,水分胁迫下, *PEAcII* 基因在处理的0.5 h表达量下降,在处理的1 h时表达量最高,而后下降。无论是正常供水还是水分胁迫条件下, *PEAcII* 基因的表达都是一个动态变化的过程。试验结果表明,肌动蛋白异型体 *PEAcII* 表达量的高低可能与豌豆幼苗适应水分亏缺的生理过程有关,这对于研究豌豆幼苗抗旱性机理以及检测豌豆幼苗的抗旱性强弱具有重要意义。

关键词:豌豆;幼苗;肌动蛋白异型体;半定量 RT-PCR

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2010)03-0001-04

Expression of *PEAcII* in Pea under Water Deficit

ZHANG Shao-bin¹, LIU Xi¹, ZHAO Yi-shi¹, WANG Che¹, LIU Guo-qin²

(1. Biological Science and Technology College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

(2. State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Plant actins play an important role in many living activity. There are three classes of actin isoforms in pea, different actin isoform perhaps display variant actions in adapting the condition of water deficit. To detect the expression of pea actin isoforms in pea tender under water deficit, semi-quantitative PCR was used. The reference gene was 18S rRNA. Pea seedlings were cultured for 3-4 days in growth chamber. In our experiment, PEG6000 was used to produce water deficit. According to figure 4 and 5, the results showed that the expression products of *PEAcII* was most in the tender after treated 8 h under normal water conditions. The expression of *PEAcII* was down-regulated after treated 0.5 h and up-regulated after treated 1 h under water deficit. The mRNA of *PEAcII* was a dynamic process under the two different water conditions. The results demonstrated that the amount of the expression products of *PEAcII* perhaps is related to the drought resistance of pea, which is of great importance to study the mechanism or detect the drought resistance of pea tender.

Key words: Pea; Tender; Actin isoform; Semi-quantitative RT-PCR

水是影响植物生长和作物产量的主要环境因素之一,干旱往往造成农业减产甚至绝收。通过研究植物抗旱的分子机理,提高植物的抗旱能力对于解决干旱问题具有重要意义。目前,植物对逆境胁迫响应的分子机制已经获得了广泛研究,与干旱胁迫相关的分子包括脱落酸(ABA)、蛋白磷酸化酶、各种转录因子以及细胞骨架相关蛋白等^[1]。

细胞骨架参与许多重要的生理活动,如细胞分

裂、花粉管伸长、胞内物质运输、信号转导等,包括参与生物体对干旱胁迫的应答反应^[2]。Furuhashi等^[3]的研究表明,多头绒泡菌在干旱胁迫条件下会处于休眠状态(菌核),细胞内的肌动蛋白微丝发生解聚,原因在于肌动蛋白发生了磷酸化(Thr203),处于磷酸化的肌动蛋白不能聚合^[3]。陈志玲等^[4]对仙鹤藓(*Atrichum undulatum*)原丝体细胞中微管骨架在干旱胁迫中的动态变化进行了研究,证明微

收稿日期:2010-04-10

基金项目:植物生理学与生物化学国家重点实验室开放课题(PPB08003);辽宁省教育厅项目(2008663);沈阳农业大学中青年导师基金项目(2007001)

作者简介:张少斌(1973-),男,辽宁彰武人,副教授,博士,主要从事植物细胞骨架研究。

通讯作者:汪 澈(1976-),女,天津人,讲师,博士,主要从事植物细胞骨架研究。

管骨架在仙鹤藓适应干旱胁迫中具有重要作用。Salekdeh 等^[5]发现,水稻在干旱诱导下,一个肌动蛋白解聚因子的表达量显著增加,而肌动蛋白解聚因子主要是调节肌动蛋白的聚合解聚^[6]。上述研究表明,由肌动蛋白相关蛋白调节的动态细胞微丝骨架与生物体适应干旱胁迫密切相关。

植物肌动蛋白含有多种异型体,如拟南芥中有 8 个大量表达的肌动蛋白异型体,它们的表达具有组织器官和发育阶段特异性^[7]。豌豆中有三类肌动蛋白异型体(PEAcI,PEAcII,PEAcIII),它们主要在营养器官中表达,在幼嫩荚果中的表达次之,在花粉中的表达最弱。PEAcI 和 PEAcII 在不同组织器官中都有表达,但表达的时间和表达的量有一定差异,而 PEAcIII 仅在快速生长的组织中表达^[8]。本试验以培养 3~4 d 的豌豆幼苗为材料,以 18S rRNA 基因为内参照基因,由于 PEAcII 的编码区完全相同,差别仅在于 3'非翻译区的长度不同^[9],因此本研究以肌动蛋白异型体 PEAcII 为检测基因,比较了人工模拟水分亏缺条件下肌动蛋白异型体 PEAcII 的表达情况,为研究豌豆肌动蛋白异型体在豌豆适应干旱胁迫中的作用提供试验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 豌豆(*Pisum sativum*) 为中豌 4 号,由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 TRIZOL、M-MLV、MOPS、DNase I 购自 Promega 公司,HRPI、dNTP 购自 Takara 公司,Taq DNA 聚合酶、凝胶回收试剂盒等购自上海生工生物工程有限公司。

1.1.3 大肠杆菌 XL-BLUE 菌株由本实验室保存,载体 pGEM-T easy 购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 材料培养 挑选外形饱满的豌豆种子经自来水、蒸馏水、去离子水洗涤,70%乙醇消毒 1 min,无菌水冲洗,0.1% HgCl₂ 溶液消毒 15 min,无菌水反复冲洗,在无菌水中吸胀 2 h,然后盖上湿润的无菌纱布,每 8 h 用无菌水洗一次,25℃暗培养 48 h,然后放在光下培养 24 h。设对照(CK)和用 20%PEG6000 模拟干旱胁迫处理。分别在处理的 0.5,1,2,4,8,24 h 取样。每个处理选取 3 株生长良好,根和芽长势均衡的幼苗,称重后液氮速冻,置-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 总 RNA 的提取及逆转录反应 按照 Trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取,为避免 DNA 污

染,提取的 RNA 经 DNase I 处理。1.2%琼脂糖凝胶甲醛变性电泳检测所提取的 RNA 无明显降解,核酸蛋白微量测定仪 ND1000 检测纯度在 1.8~2.0 后,进行以下逆转录反应,1 μL Oligo-d(T) 16 (1 μg/μL),1 μg 总 RNA 加水至 8.5 μL,0.5 μL HRPI,65℃加热 10 min,冰浴冷却 2 min,再加 5×第一链缓冲液 3 μL,10 mmol/L dNTPs 1.5 μL,M-MLV 逆转录酶 0.5 μL(200 U/μL),轻轻混匀,42℃孵育 90 min;95℃加热 5 min 终止反应。

1.2.3 PCR 反应条件及体系的建立 参考 GenBank 查询的序列设计引物,引物合成由上海生工生物工程有限公司完成;18S rRNA 的引物上游为 5'-CCAGGTCCAGACATAGTAAGGATTG-3',下游为 5'-CGGTGTGTACAAAGGGCAGG-3',产物长度 432 bp。PEAcII 基因的引物上游为 5'-TTGGAAACTGCTA-AGACTAGCTCAGC-3';下游为 5'-GAACATTGTG-GAACCACCACTCAAG-3',产物长度 242 bp。

取上述逆转录产物 1 μL,加入上下游引物进行 PCR 反应,于 94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 30 个循环;72℃充分延伸 5 min,用于 PCR 扩增。

1.2.4 基因的克隆与测序 凝胶产物的回收和与 pGEM-T easy 连接分别参照试剂盒的说明。

将重组质粒转化至感受态宿主菌 XL-BLUE 后,经蓝/白斑筛选,挑取白色菌落,菌落 PCR 及抽提质粒 PCR 鉴定正确后,阳性菌株送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.5 半定量 RT-PCR 分析 PEAcII 的表达 采用上述 PCR 体系,分别采用 20,25,30,35,40,45 个循环,确定指数扩增期。根据确定的反应体系,同时扩增 18S rRNA 和 PEAcII,扩增产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳,扫描的图像使用 Bio-Rad 软件 Quantity One 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果

1.2%琼脂糖甲醛变性电泳图显示提取的 RNA 较完整,28S 和 18S rRNA 亮度比例基本符合 2:1,5S rRNA 条带也比较完整(图 1)。

2.2 PCR 扩增豌豆 PEAcII 及其特异性

PCR 扩增豌豆 PEAcII 得到约 430 bp 的扩增产物(图 2),胶回收扩增产物,连接到 pGEM-T 载体,转化 *E. coli* XL-BLUE,阳性克隆经测序证实所扩增的序列与 GeneBank 登录序列完全相符(图 2)。为了验证引物扩增的特异性,分别以实验室保存的含

有 *PEAcI* (*PEAc1*) 和 *PEAcII* (*PEAc14*) 的质粒为模板进行扩增, 结果都没有扩增产物。

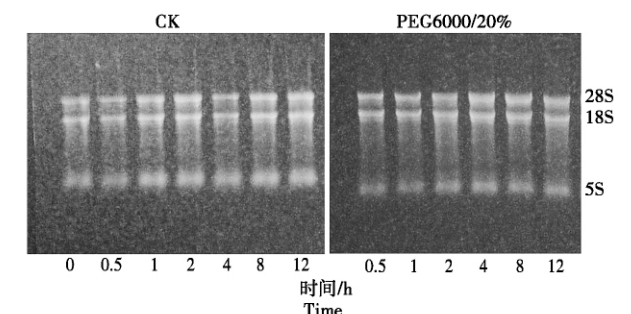


图1 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agrose gel electrophoregram of RNA

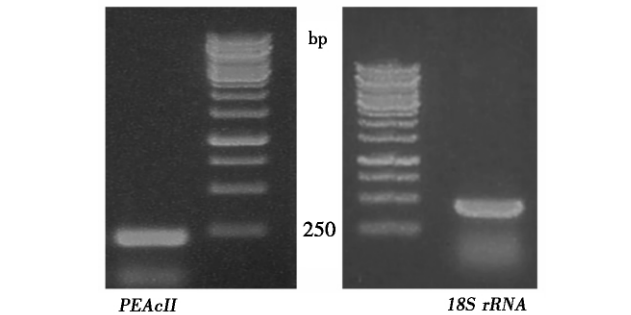


图2 PCR 扩增 *PEAcII* 和 *18S rRNA* 产物电泳图

Fig.2 Electrophoregram of *PEAcII* and *18S rRNA*

2.3 PCR 扩增豌豆 *18S rRNA*

PCR 扩增豌豆 *18S rRNA*, 得到约 430 bp 的扩增产物(图2)。胶回收扩增产物, 连接到 pGEM-T 载体, 转化 *E. coli* XL-BLUE, 阳性克隆经测序证实所扩增的序列与 GeneBank 登录序列完全相符(图2)。

2.4 mRNA 表达的半定量分析

分别在 20, 25, 30, 35, 40, 45 个循环下扩增, 结果如图3所示。*PEAcII* 在 35 个循环后达到饱和, 而 *18S rRNA* 在 40 个循环后达到饱和, 在 30 个循环时两者都处于指数扩增初期(图3)。

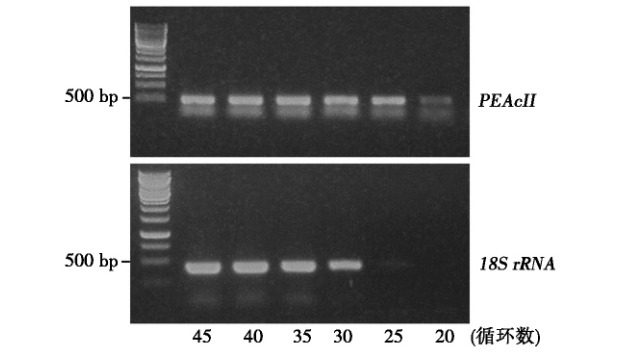


图3 不同循环数扩增 *18S rRNA* 和 *PEAcII*

Fig.3 Amplification of *18S rRNA* and *PEAcII* under different cycles

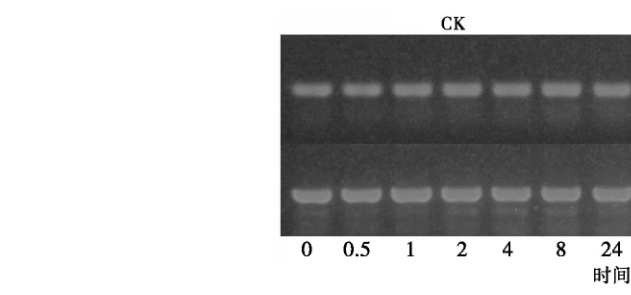


图4 不同供水条件下扩增 *18S rRNA* 和 *PEAcII*

Fig.4 Amplification of *18S rRNA* and *PEAcII* under difereent water supply conditions

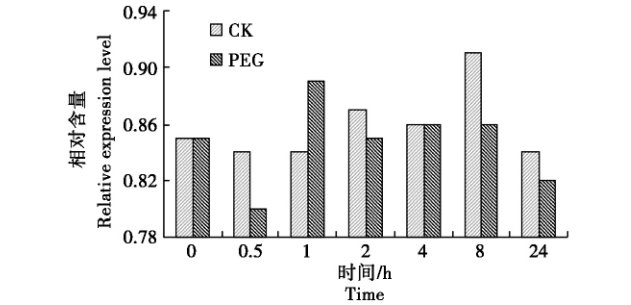


图5 不同供水条件下 *PEAcII* 的相对表达量

Fig.5 The relative expression level of *PEAcII* under different water supply conditions

在 30 个循环条件下扩增, 调整 cDNA 模板量一致, 同时扩增 *18S rRNA* 基因和 *PEAcII* (图4)。利用软件分析 *PEAcII* 和 *18S rRNA* 的相对表达量(图5)。由图4和图5可知, 正常供水条件下(CK), *PEAcII* 在处理的第2 h 表达量开始增加, 在第8 h 表达量最

多, 而再次下降。而 *PEAcII* 在干旱处理的 0.5 h 表达量明显下降, 在处理 1 h 时表达量明显增加, 然后逐渐下降。

3 讨论

植物肌动蛋白是微丝的主要组分, 很多重要的生理过程依赖于单体肌动蛋白的聚合、聚合微丝网络的形成与定位、微丝的解聚以及单体肌动蛋白库的维持^[10]。植物细胞对内外环境的信号刺激产生反应的过程, 直接与微丝骨架密切相关, 肌动蛋白通常作为植物激素(如 ABA)、 Ca^{2+} 、 PIP_2 及 cAMP 所引发的级联信号反应的下游响应元件之一^[11-14], 而在动物肾脏细胞中发现微丝骨架可以调控水通道蛋白对水的运输^[15]。在植物细胞适应干旱胁迫的过程中发生一系列的信号转导过程, 由肌动蛋白所构

成的动态微丝骨架在其中发挥着重要作用。

由多种肌动蛋白结合蛋白参与调节的动态微丝骨架在植物生长发育、植物耐低温等逆境生理中发挥着重要作用^[16,17]。植物在干旱条件下,会通过关闭表皮细胞的气孔来减少水分的蒸腾,而微丝的聚合解聚参与了气孔开关运动的调节^[18-20]。因此,肌动蛋白的表达模式以及表达量的高低对于植物适应干旱胁迫具有重要意义。然而,一方面,在植物基因表达检测中,肌动蛋白常常作为稳定表达的内参照基因^[21],对其表达量变化的研究很少。另一方面,已有的研究大都是针对植物细胞内表达的全部肌动蛋白以及整体微丝骨架的动态变化与功能,对每一种(类)植物肌动蛋白异型体在其中发挥的作用还了解很少。本研究发现,豌豆肌动蛋白异型体 PEA-cII 在正常供水和 PEG 模拟干旱条件下表达模式差别较大。在干旱处理条件下,PEAcII 的表达量有一个先下降后增加,而后再下降的动态变化过程,说明 PEA-cII 可能通过表达量的变化参与豌豆适应干旱胁迫的过程。由此,我们有可能通过调节 PEA-cII 的表达量来提高豌豆的抗旱能力,也可能通过比较 PEA-cII 的表达模式及表达量来反映不同豌豆品种的抗旱能力差异,用于抗旱育种等。

参考文献:

- [1] Ingram J, Barrels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 377 - 403.
- [2] Collings D A, Harper J D I, Marc J *et al.* Life in the fast lane: actin-based motility of plant peroxisomes [J]. *Can J Bot*, 2002, 80: 430 - 441.
- [3] Furuhashi K, Ishigami M, Suzuki M *et al.* Dry stress-induced phosphorylation of physarum actin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 242: 653 - 658.
- [4] 陈志玲, 欧阳浩淼, 刘祥林, 等. 微管骨架在苔藓植物适应干旱胁迫应答中的功能研究 [J]. *生物工程学报*, 2003, 19(3): 317 - 320.
- [5] Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L J *et al.* A proteomic approach to analyzing drought and salt responsiveness in rice [J]. *Field Crops Research*, 2002, 76: 199 - 219.
- [6] Chen H, Bernstein B W, Bambrug J R. Regulating actin-filament dynamics *in vivo* [J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25: 19 - 23.
- [7] Kandasamy M K, McKinney E C, Meagher R B. Functional nonequivalency of actin isoforms in *Arabidopsis* [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 251 - 261.
- [8] Jiang Y Q, Zhao W L. Expression and phylogenetic analysis of pea actin isoforms [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(12): 1456 - 1461.
- [9] 胡松年, 阎隆飞. 豌豆卷须肌动蛋白 II 类异型体 cDNA 克隆的序列分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学*, 1991, 15(6): 857 - 860.
- [10] Wasteneys G O, Galway M E. Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 691 - 722.
- [11] Eun S O, Lee Y. Actin filaments of guard cell are reorganized in response to light and abscisic acid [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 1491 - 1498.
- [12] Wang Y F, Fan L M, Wu W H. Ca^{2+} -permeable channels in the plasma membrane of arabidopsis pollen are regulated by actin microfilaments [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136: 3892 - 3904.
- [13] Braun M, Baluska F, von Witsch M *et al.* Redistribution of actin, profiling and phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate in growing and maturing root hairs [J]. *Planta*, 1999, 209: 435 - 443.
- [14] Moutinho A, Hussey P J, Trewavas A J *et al.* cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 10481 - 10486.
- [15] Klusmann E, Tamma G, Lorenz D *et al.* An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(23): 20451 - 20457.
- [16] Ouellet F, Carpentier E, Cope M G *et al.* Regulation of a wheat actin-depolymerizing factor during cold acclimation [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 360 - 368.
- [17] Orvar B L, Sangwan V, Omann F *et al.* Early steps in cold sensing by plant cells: role of actin cytoskeleton and membrane fluidity [J]. *Plant J*, 2000, 23: 785 - 794.
- [18] Hwang J U, Suh S, Yi H. *et al.* Actin filaments modulate both stomatal opening and inward K^{+} -channel activities in guard cells of *Vicia faba* L [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 335 - 342.
- [19] Hwang J U, Lee Y. Absciscic acid induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 2120 - 2128.
- [20] Huang F, Wang X C, Lou C H. Cytoskeletal inhibitors suppress the stomatal opening of *Vicia faba* L. induced by fusicoccin and IAA [J]. *Plant Sci*, 2000, 156: 65 - 71.
- [21] 李亚青, 葛荣朝, 赵保存, 等. RT-PCR 法半定量检测不同逆境胁迫下 *TaGSKI* 基因的表达 [J]. *华北农学报*, 2007, 22(1): 83 - 85.