

肌动蛋白基因在豌豆幼苗的发育阶段 和器官特异性表达^①

黄绍兴^②

刘俊君

阎隆飞

彭学贤

(中国农业大学)

(中科院微生物所)

(中国农业大学)

(中科院微生物所)

摘 要 从豌豆幼苗及开花植株各器官提取总 RNA,以豌豆肌动蛋白基因(PEAC1)为探针,鉴定肌动蛋白基因在不同器官的表达。Northern 和 Dot blot 结果表明,肌动蛋白基因在豌豆中的表达具有发育阶段特异性,它倾向于在豌豆 5 天苗的芽和 2 天苗的根中特异表达。

关键词 肌动蛋白; 肌动蛋白基因; 豌豆幼苗; 器官特异性表达

中图分类号 Q753

Developmental-Stage and Organ-Specific Expression of Actin Genes in Seedlings of *Pisum sativum*

Huang Shaoxing¹ Liu Junjun² Yan Longfei¹ Peng Xuexian²

¹ (China Agricultural University)

² (Institute of Microbiology, CAS)

Abstract Total RNAs were isolated from various organs of pea (*Pisum sativum*) seedlings and flowering plants, then the actin gene of pea (PEAC1) was used as probe to characterize the expression of actin gene in different organs. Results of Northern and Dot blot analysis indicated that the expression of actin gene in pea has shown developmental-stage specificity. It tends to express specifically in shoots of 5 day old seedlings and roots of 2 day old seedlings of pea.

Key words actin; actin gene; pea seedling; organ-specific expression

肌动蛋白是构成脊椎动物骨骼肌的重要成分。动植物非肌细胞中也普遍存在肌动蛋白,它是细胞骨架的重要成分。已经从大豆^[1]、玉米^[2]、豌豆^[3]等植物中分离出肌动蛋白基因,并测定了它们的核苷酸序列。Mascarenhas^[4]用紫鸭跖草和玉米研究了花粉中肌动蛋白基因的表达。Northern 杂交结果表明,肌动蛋白基因在四分体和小孢子中是不转录的,直到花粉形成的早期才开始表达,出现 mRNA 并且不断积累,在成熟花粉中达到高峰。据报道,水稻肌动蛋白基因家族的不同成员在植物发育过程的特定时期和器官表现发育时期和器官特异

收稿日期: 1995-10-30

①国家自然科学基金资助项目 39370162

②黄绍兴,北京阜城门外花园村首都师范大学,100037

性表达^[5]。曹晓风等^[3]从豌豆卷须分离出肌动蛋白的 cDNA。本试验以该基因为探针,首次分析了肌动蛋白基因在豌豆幼苗发育过程的器官特异性表达。Northern 和 Dot-blot 结果表明,肌动蛋白基因在豌豆幼苗中表现出发育阶段和器官特异性表达。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本试验使用的豌豆(*Pisum sativum*)为中豌 4 号品种。将种子在温室培养,取发芽不同时间幼苗的根、下胚轴、芽、子叶、茎、叶片和开花植株的茎、叶片、卷须等器官,贮存于 -70°C ,用于提取 RNA。

1.2 总 RNA 提取

采用 Vernomerd 等^[6]的方法。最后用紫外分光光度计测定 RNA 含量。

1.3 Northern 和 Dot-blot 分析

将 RNA 进行甲醛变性电泳,每一泳道加 $10\ \mu\text{g}$ 总 RNA,然后转移到尼龙膜上。进行 Dot-blot 时,将 RNA 固定于尼龙膜上,每一点加 $10\ \mu\text{g}$ 总 RNA。用 Random Primer 法^[7]对豌豆肌动蛋白 cDNA(PEAC1)进行 ^{32}P -标记,在标准条件^[7]下进行杂交。

1.4 RNA 相对含量分析

用岛津(Shimadzu)CS-910 薄层扫描仪,在单波长 $590\ \text{nm}$ 下对 X 光片进行透射扫描。将所得数据绘成直方图,以显示 RNA 在不同组织中的相对含量。

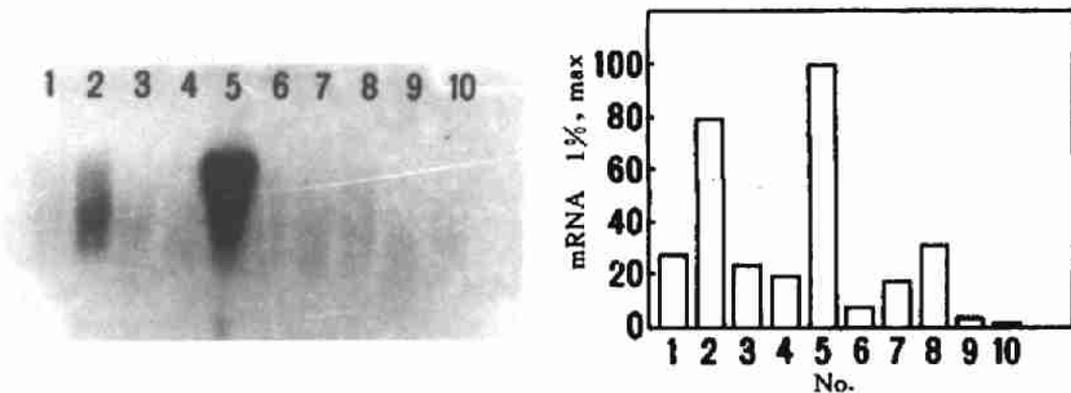


图 1 肌动蛋白基因转录本在豌豆幼苗不同器官的相对含量

左:Northern blot 分析,探针为 PEAC1 基因。

右:直方图表示 Northern blot 结果, RNA 水平以最大量的百分比表示。

总 RNA 从下列器官提取:①干种子; ②2 d 苗的根; ③~⑤5 d 苗的根、下胚轴和芽; ⑥~⑩10 d 苗的根、茎、叶和叶柄; ⑪15 d 苗的幼根。

2 结果

2.1 肌动蛋白基因在豌豆幼苗发育中的时间表达

为了比较肌动蛋白基因是否在豌豆幼苗发育过程中表现发育时期的特异性表达,我们

从未发芽的干种子, 发芽 2 d 的根, 5 d 苗的根、下胚轴和芽, 10 d 苗的根、茎、叶片和叶柄以及 15 d 苗的幼根提取总 RNA, 用 PEAC1 基因为探针进行 Northern blot 分析。结果(图 1)表明, 该基因在豌豆 5 d 苗的芽中表达水平最高, 其次是在发芽 2 d 的根。就幼根而言, 随着发芽时间的延长, 根中的 mRNA 水平逐渐下降。在发芽 10 和 15 d 苗的根中几乎没有检测到该基因的 mRNA。

为进一步比较不同发育时期各器官的 mRNA 相对含量, 我们进行了 RNA 与 DNA 的点杂交(图 2, A1~B3), 并进行定量比较分析(图 3)。如图 2 和图 3 所示, 点杂交的结果与 Northern 印迹的结果基本一致。在种子发芽 2~15 d 的幼苗中, 肌动蛋白基因在 5 d 苗的芽中 mRNA 水平最高, 其次是在发芽 2 d 的根和 10 d 苗的叶片, 它们的 mRNA 水平分别为 5 d 苗的芽的 82% 和 78%。在幼苗的根中, 以 2 d 根的 mRNA 水平最高。此后随着发芽时间的延长, 幼根中 mRNA 水平逐渐下降, 15 d 苗的幼根 mRNA 水平为 5 d 苗的芽的 12%, 比 2 d 根的 mRNA 水平约少 6 倍。在 10 d 苗的各器官中, 以叶片的 mRNA 水平最高, 而叶柄的 mRNA 水平较低, 前者为后者的 4.3 倍。

2.2 肌动蛋白基因在豌豆开花植株的器官特异性表达

从开花植株的茎、卷须、叶片、萼片、花瓣、花丝、心皮和开花后 20 d 的果实提取总 RNA, 以 PEAC1 为探针进行 Northern blot 分析(图 4)。结果表明, 肌动蛋白基因倾向于在心皮和开花后 20 d 的果实中表达, 而在茎、叶片中几乎没有检测到其 mRNA。同时, 取茎、卷须、叶柄、叶片、萼片、花瓣、花丝、心皮、开花后 10 d 和 20 d 的果实以及开花后 20 d 的幼嫩种子提取总 RNA, 进行 RNA 与 DNA 的点杂交(图 2, B4~C7)和定量比较分析(图 5)。从图 2 和图 5 可以看出, 肌动蛋白基因在豌豆成熟植株各器官的表达表现一定程度的器官特异性, 它倾向于在心皮和开花后 20 d 的果实中表达, 它们的 mRNA 水平分别为 5 d 苗的芽的 60% 和 42%。这一结果与 Northern 的结果基本一致。而花丝中 mRNA 水平较低, 仅为 5 d 苗的芽的 14%。在卷须中的 mRNA 水平比叶片中的高, 前者比后者高 4 倍。由上所述, 肌动蛋白基因倾向于在幼苗的幼嫩器官特异表达。

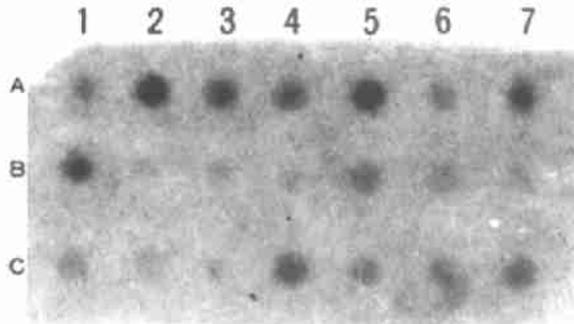


图 2 肌动蛋白基因转录本在豌豆幼苗和开花植株不同器官的点杂交分析探针为 PEAC1 基因

总 RNA 从下列器官提取: A1 干种子; A2 2 d 苗的根; A3, A4, A5 5 d 苗的根、下胚轴和芽; A6, A7, B1, B2 10 d 苗的根、茎、叶、和叶柄; B3 15 d 苗的幼根; B4, B5, B6, B7 开花植株的茎、卷须、叶柄、叶; C1 萼片; C2 花瓣; C3 花丝; C4 心皮; C5 果实(开花后 10 d); C6 果实(开花后 20 d); C7 幼嫩种子(开花后 20 d)。

3 讨论

肌动蛋白基因的转录本已经在大豆和水稻进行了研究^[1-5]。这些研究清楚地表明肌动蛋白基因不仅存在发育调节的差异,而且在不同组织中转录本含量也明显不同。本文结果进一步说明了这一点。另外,还可看出,肌动蛋白基因是受发育调控的,它倾向于在豌豆5 d 苗的芽和2 d 的根中特异表达。此外,肌动蛋白基因在豌豆开花植株的表达具有一定的器官特异性,它倾向于在心皮和开花后20 d 的果实表达。这一结果与我们以后观察到的肌动蛋白基因在黄瓜幼嫩果实中的表达结果相类似。

大豆肌动蛋白基因器官特异性表达的早期研究揭示 Sac4 基因在根、茎、下胚轴表现组成型表达^[6]。但是,后来的研究发现,Sac4 表现组织而不是器官特异性。Sac4 多肽特异抗体倾向于在大豆根尖原表皮组织表达^[9]。研究肌动蛋白基因在豌豆的细胞或组织水平积

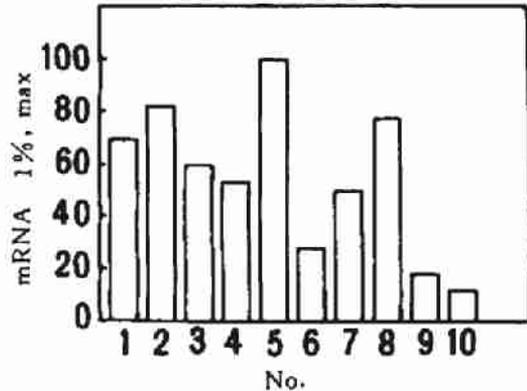


图3 肌动蛋白基因转录本在豌豆幼苗各器官的相对含量

直方图表示 RNA 点杂交结果, RNA 水平以最大量的百分比表示

总 RNA 从下列器官提取: 1 干种子; 2 2 d 苗的根; 3, 4, 5 5 d 苗的根、下胚轴和芽; 6, 7, 8, 9 10 d 苗的根、茎、叶、和叶柄; 10 15 d 苗的幼根。

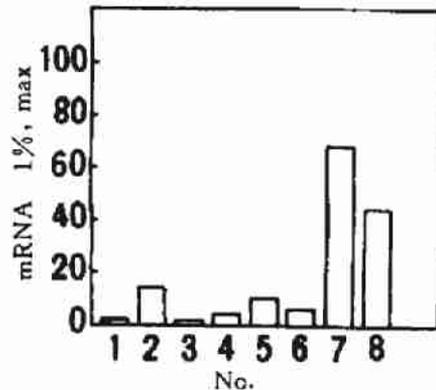
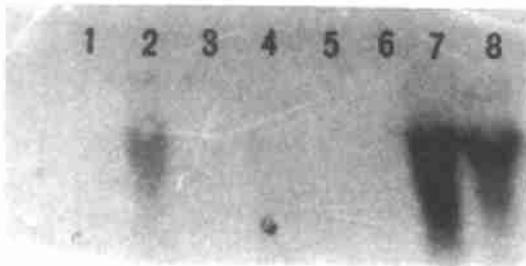


图4 肌动蛋白基因转录本在豌豆开花植株各器官的相对含量

左: Northern blot 分析, 探针为 PEAC1 基因。

右: 直方图表示 Northern blot 结果, RNA 水平以最大量的百分比表示。

总 RNA 从下列器官提取: 1 茎; 2 卷须; 3 叶片; 4 萼片; 5 花瓣; 6 花丝; 7 心皮; 8 果实(开花后 20 d)。

累的可能方法是用基因特异探针进行原位杂交。本实验结果为将来分析肌动蛋白基因在豌豆细胞或组织特异表达提供实验基础。

肌动蛋白不仅是细胞骨架的重要组成部分,参与维持细胞的形状,而且在细胞壁组织和细胞运动如顶端生长、胞质环流中起着重要的作用^[10]。在幼苗发育过程中,幼根和顶芽细胞迅速分裂和伸长,且需要维持一定的细胞形状,较多的肌动蛋白基因的表达为这种活跃的细胞运动提供物质基础。

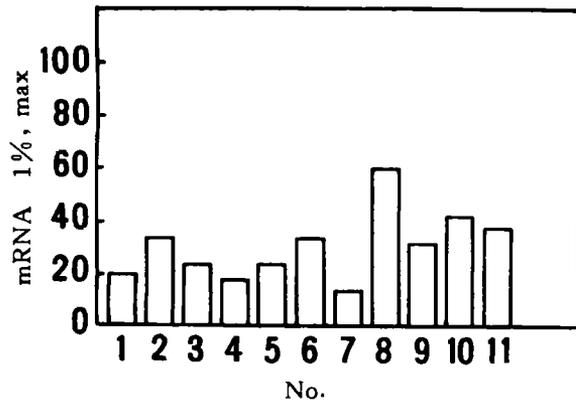


图 5 肌动蛋白基因转录本在豌豆开花植株不同器官的相对含量

直方图表示 RNA 点杂交结果, RNA 水平以最大量的百分比表示。

总 RNA 从下列器官提取: 1. 茎; 2. 卷须; 3. 叶柄; 4. 叶; 5. 萼片; 6. 花瓣; 7. 花丝; 8. 心皮; 9. 果实(开花后 10 天); 10. 果实(开花后 20 天); 11. 幼嫩种子(开花后 20 天)

参 考 文 献

- 1 Shah D M, et al. Complete nucleotide sequence of soybean actin gene. Proc Natl Acad Sci, USA, 1982, 79: 1 022~1 026
- 2 Shah D M, et al. Genes encoding actin in higher plants; intron positions are highly conserved but the coding sequences are not. J Mol Appl Genet, 1983, 2: 111~126
- 3 曹晓凤等. 豌豆卷须 cDNA 文库构建及肌动蛋白基因序列分析. 科学通报, 1993, 38: 1 804~1 808
- 4 Mascarnhas J P. Characterization of genes that are expressed in pollen. In: Goldberg R B ed. The Molecular Basis of Plant Development. New York: Alan R. Liss, Inc, 1989, 99~101
- 5 McElroy D, et al. Characterization of the rice (*Oryza sativa*) actin gene family. Plant Mol Biol, 1990, 15: 257~268
- 6 Vernomer T C, et al. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. Nucl Acid Res, 1989, 17: 2 362
- 7 Mariastis T C, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 Hightower R D, Meagher R B. Divergence and differential expression of soybean actin genes. EMBO J, 1985, 4: 1~8
- 9 Mclean B G, et al. Tissue specific expression of divergent actin gene in soybean root. Plant Cell, 1990, 3: 335~344
- 10 Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y. The actin cytoskeleton in unfixed pollen tube following microwave-accelerated DMSO-permeabilisation and TRIC-Phalloidin staining. Sex Plant Reprod, 1991, 4: 6~11