

羊草水孔蛋白基因*LcPIP*的克隆与表达分析

张畅, 孙天旭, 汤明威, 郭勃予, 解莉楠, 李玉花*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

摘要: 本研究基于羊草水孔蛋白EST序列, 应用RACE克隆技术从盐胁迫的羊草中克隆了cDNA全长为1 204 bp的水孔蛋白基因, 其GenBank登录号为KJ459872。经生物信息学分析, 该基因开放阅读框为879 bp, 其编码的蛋白含有292个氨基酸, 蛋白质分子量为30.93 kDa, 理论等电点(pI)为7.00, 与已知的小麦、大麦和玉米等单子叶植物来源的同类基因同源性较高, 相似性为80%~98%, 与小麦TaPIP1的遗传关系最近, 与PIP1家族聚为一类。荧光定量PCR分析显示, 在200 mmol·L⁻¹的Na₂CO₃胁迫不同时间后, 羊草根中*LcPIP*基因的表达量在6 h时受到抑制, 12~24 h之间表达量明显上升, 但胁迫持续48 h后, *LcPIP*表达量降至极低水平。羊草叶片的*LcPIP*基因表达量逐渐上升, 48 h达到最高峰, 72 h表达量下降。

关键词: RACE; 质膜内在蛋白; 生物信息学; 羊草; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of *LcPIP* cDNA from *Leymus chinensis*

ZHANG Yang, SUN Tian-Xu, TANG Ming-Wei, GUO Bo-Yu, XIE Li-Nan, LI Yu-Hua*

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Based on the PIP EST sequence of *Leymus chinensis*, a full length cDNA named *LcPIP* from *L. chinensis* under salinity stress was cloned by RT-PCR RACE. Sequence analysis indicated that the gene contained 1 024 bp nucleotide, and an open reading frame (ORF) encoding 292 amino acids. The molecular weight of the protein was 30.93 kDa and theoretical pI was 7.00. Homology analysis showed that the deduced amino acid sequence of *LcPIP* shared 85%–98% identity with PIP from monocotyledon, such as *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* and *Zea mays*, had a closest genetic relationship with wheat TaPIP1, belonged to the PIP1 family. The expression of *LcPIP* was analyzed by fluorogenic quantitative PCR under Na₂CO₃ stress. With the extension of Na₂CO₃ stress time, the expression of *LcPIP* dropped from 0 to 6 h in the roots, and then decreased, the peak of expression level arrived at 12 h; but dropped after 24 h. In the leaves, the expression of *LcPIP* decreased gradually, and the peak of expression level arrived at 48 h; and then the *LcPIP* expression dropped after 48 h.

Key words: RACE; *PIP*; bioinformatics; *Leymus chinensis*; expression analysis

植物质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic protein, PIP)是能够选择性地高效跨膜转运水分子的水孔蛋白(aquaporin, AQP)的亚类, 因与膜内在蛋白(membrane intrinsic protein, MIP)具有较高的序列同源性和结构相似性, 属于MIP超家族(李红梅等2010; 阮想梅等2009)。PIP的主要功能是增加细胞质膜对水分的通透性, 促进水分快速的跨膜转运, 有效调节细胞的渗透势。在植物生长发育的过程中, PIP参与转运其它具有重要生理学意义的中性代谢分子, 例如参与CO₂的跨膜转运, 进而会影响到植物的光合作用(Gomes等2009; Uehlein等2008; Flexas等2006)。当植物抵御干旱胁迫、盐胁迫和渗透胁迫时, 植物细胞的PIP通过发生表达水平、蛋白活性和蛋白结构等不同的适应性改变, 从而发挥着重要的作用(张渝洁等2006)。

植物PIP的表达和活性的调控机制大致可以分为转录水平的调控和转录后水平的调控。植物PIP转录水平上的调节是通过控制蛋白质的合成速率来实现, 受到诸多因素的影响, 如植物不同的组织部位、生长发育阶段和外界环境因子等(Mae-shima和Ishikawa 2008; Li等2008)。磷酸化、糖基化、质子化(pH)和Ca²⁺的调控等转录后水平的调控能够快速调节蛋白转运活性, 应答外界环境因子的变化(Temmei等2005; Tournaire-Roux等2003; Törnroth-Horsefield等2006)。

收稿 2014-07-31 修定 2014-08-27

资助 “十二五”农村领域国家科技计划课题项目(2013AA102706)。

* 通讯作者(E-mail: lyhshen@126.com; Tel: 0451-82191783)。

羊草为多年生根茎型禾本科牧草,广泛分布于我国北方天然草地,具有一定的耐盐碱性,在土壤盐分总量0.1%~0.14%、pH 8.3~8.9、碱化度13.5%~40.9%的生境上都能正常生长。长期的进化过程中具备了一系列适应盐碱环境的优良特性,其中蕴涵了丰富的抗逆基因。本研究以盐胁迫的羊草为试材,利用RACE技术克隆了羊草水孔蛋白PIP基因。通过运用不同的生物信息工具对羊草的PIP基因及其编码蛋白序列进行了生物信息学分析,预测它们潜在的生物学功能,同时利用盐胁迫下的羊草叶片,探讨了LcPIP的表达模式,为后期基因的功能研究提供理论参考。

材料与方法

1 材料

试验材料羊草 [*Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel.] 选取黑龙江省青冈县(东经126°06", 北纬46°41")天然盆碱地(pH 9.5)草场生长的羊草草种,栽培基质采用草炭土为主,温度25 °C,光照强度400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,相对湿度65%~75%,生长到8周龄时,用200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 分别处理0、6、12、24、48及72 h将草的叶片及根部剪下,每组同时取3次样用于实验重复,用液氮速冻,于-80 °C冰箱保存备用。

2 羊草RNA的提取与反转录

采用Invitrogen公司的Trizol试剂提取羊草地上部总RNA。按照说明书进行提取,灭菌去离子水溶解RNA,利用分光光度计测量样品的OD₂₆₀和OD₂₈₀值计算浓度,并用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。取5 μg 的RNA利用Invitrogen的Super-Script® III First-Strand Synthesis System试剂盒进行反转录。

羊草PIP基因克隆引物通过Primer Primer 5软件设计并由上海生工生物工程技术有限公司进行合成。引物序列见表1。

3 羊草PIP基因的克隆及序列测定

对于羊草PIP基因3'端序列的克隆,根据羊草抑制性差减杂交文库中已获得的PIP基因的EST序列(518 bp),设计2条3' RACE上游引物GSP3'1和GSP3'2,然后以反转录的cDNA为模板进行巢式PCR扩增。第一轮PCR反应引物用GSP3'1及AP1,反应程序为94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C

表1 羊草PIP基因克隆引物

引物名称	核苷酸序列(5'→3')
GSP3'1	CGGGTTCGCCGTGTTCTGGT
GSP3'2	CTGGCGACGATCCCCATCACG
GSP5'1	GCCGATGAACGGACCCACCC
GSP5'2	GCTTCTGTGTAGATGATGGCG
AP1	GTACTAGTCGACGCGTGGCCTTTTTTTTTTTTTT
AP2	GTACTAGTCGACGCGTGGCC
PIP-LF	TGAACCATCCAACATCTCC
PIP-LR	AAATACAGAAGACTCCATCCAC

1 min, 30个循环; 72 °C 7 min。第二轮PCR反应引物用GSP3'2及AP2,反应程序为94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 10 s, 72 °C 30 s, 30个循环; 72 °C 7 min。

对于羊草PIP基因5'端序列的克隆,根据羊草抑制性差减杂交文库中已获得的PIP基因的EST序列,设计2条5' RACE下游引物GSP5'1和GSP5'2,首先对反转录产物利用Roche公司High Pure PCR Product Purification Kit进行纯化,然后利用Takara公司的末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TDT)及dATP对反转录产物进行加尾,最后以加尾后的cDNA为模板进行巢式PCR扩增。第一轮PCR反应引物用GSP5'1及AP1,反应程序为94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C延伸7 min。第二轮PCR反应引物用GSP5'2及AP2,反应程序为94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 10 s, 72 °C 30s, 30个循环; 72 °C 7 min。

对于克隆得到羊草PIP 3'和5'端的基因片段测序并拼接,并在NCBI网站上利用ORF (open reading frame finder)软件预测氨基酸序列,并根据ORF两端序列设计特异引物PIP-LF和PIP-LR扩增羊草PIP基因的编码区。反应程序为94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C 7 min。

将所有PCR产物利用购自盖宁生物科技有限公司琼脂糖凝胶DNA快速纯化回收试剂盒对电泳后产物进行回收纯化,并与购自Promega公司的pGEM-T载体进行连接,转化到购自QianGen公司的TOP10大肠杆菌感受态细胞中,利用QianGen公司的质粒小提试剂盒提取重组质粒,经过PCR检测后送北京六合华大基因进行测序。

4 荧光定量PCR分析羊草PIP基因表达特性

分别取200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 处理0、6、

12、24、48和72 h的羊草叶片及根,液氮速冻-80 °C冰箱保存备用,采用Invitrogen公司的Trizol提取RNA,将所提取羊草总RNA稀释为 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,并以此为模板,利用Applied Biosystems公司的高容量cDNA Reverse Transcription Kit试剂盒进行反转录反应。在已获得的*LcPIP*基因序列的3'末端特异区域设计荧光定量PCR引物(表2),分别为*LcPIP*-RTF和*LcPIP*-RTR,其目的片段大小为126 bp。利用设计好的引物进行预PCR扩增,反应程序为94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30个循环; 72 °C, 7 min。电泳检测,并将PCR产物进行电泳检测和测序,进一步验证引物的特异性。

表2 羊草*PIP*基因荧光定量PCR引物

引物名称	核苷酸序列(5'→3')
<i>LcPIP</i> -RTF	AACAAGAAGCAGGCGTGGG
<i>LcPIP</i> -RTR	GCGGCTCTGAAGGGGATT
<i>ACTIN</i> -F	CATTGTGCTCAGTGGTGGGT
<i>ACTIN</i> -R	ATCTCCTTGCTCATAACGGTCAG

将反转录得到的cDNA产物稀释20倍为模板,参照Applied Biosystems公司的荧光定量试剂盒Power SYBR Green PCR Master Mix进行操作,反应在96孔板中进行,每个模板做3组试验重复,内参做3组试验重复。加完试剂后贴好贴膜,除去孔内气泡,瞬时离心后,采用Applied Biosystems公司的7500型实时荧光定量PCR仪进行试验。

荧光定量PCR扩增反应体系: Power SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , cDNA模板8.4 μL , 引物-F ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL , 引物-R ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL 。反应程序为50 °C 2 min, 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1

min, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 溶解曲线制作。使用Microsoft Excel软件进行数据处理。

5 羊草*PIP*基因的生物信息学分析

使用BLASTx程序对测序所得的羊草*PIP*基因序列与GenBank数据库中序列进行相似性分析;应用NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中的Conserved Domains工具和ORF finder程序分析保守功能区、基因开放阅读框(ORF)并推导氨基酸序列;使用Scan Prosite (<http://us.expasy.org/tools/secondary>)进行蛋白结构域预测;利用ExPASy ProtParam程序(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>)计算蛋白的理论分子量、等电点和不稳定系数等;利用ClustalX 1.8软件将推导的氨基酸序列与数据库中的其他序列进行同源序列比对;用MEGA 4软件的邻位相连法(neighbor-joining, NJ)构建系统树,参数设定1 000个抽样重复进行Bootstrap验证,泊松校正(poisson correction)作为计算距离的方法。

实验结果

1 羊草*PIP*基因全长cDNA的克隆和序列分析

以盐胁迫羊草地上部的RNA为模板,采用RACE方法扩增羊草*PIP*基因5'和3'端未知序列。5'巢式PCR扩增获得约850 bp的1条亮带(图1-A)。3'巢式PCR扩增得到约450 bp的1条亮带(图1-B)。将PCR产物凝胶回收,连接pGEM-T载体后,转化TOP10感受态细胞,选取阳性克隆进行测序。对5'和3'端序列测序结果进行序列分析拼接后,设计*LcPIP*基因cDNA全长引物,经RT-PCR扩增获得特异条带约1 100 bp并进行克隆测序(图1-C)。

测序后经序列比对分析,获得羊草中含有完整编码区的基因序列。其cDNA全长1 204 bp,包含一个完整开放阅读框为879 bp,编码292个氨基

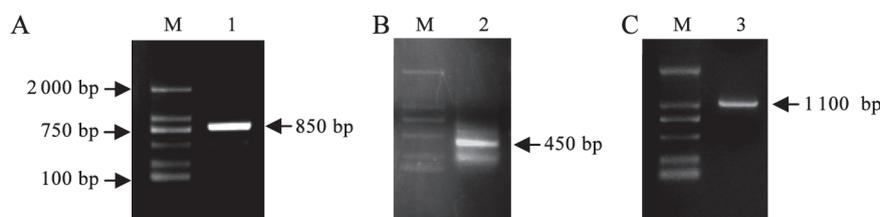


图1 PCR产物检测

Fig.1 The detection of PCR product

M: DL2000 marker; A: 5' RACE产物; B: 3' RACE产物; C: CDS产物。

酸。5'端非编码区(5' UTR) 79 bp, 起始密码子ATG附近具有5' CAGCATGG 3'序列结构, 与真核生物中普遍存在的高效起始序列5' CA/GNNATGG 3'一致, 符合典型的KOZAK序列规则。3'端非编码区(3' UTR) 246 bp, 具有poly (A)结构(图2)。将此基

因序列及其推导的氨基酸序列在NCBI的数据库中进行BLASTn和BLASTp比对分析, 该基因与单子叶植物来源的PIP基因具有极高的相似性, 因而将该基因片段命名为*LcPIP*, GenBank登录号为KJ459872。

```

1 tgaaccatccaacatctcctcctcctcctcaaccaaaacaagccaagctaaccagctcaagctcaagctcaagcgcagc
80 atggaggcaaggaggaggagcgtgcgcctggcgcaaacggtactcggagcaccagcctatcggcacggcgcgaggcgcgcg
  ■ E G K E E D V R L G A N R Y [S] E H Q P I G T A A Q G G G A
170 gacgagaaggactacaaggagcctccccggccccctcttcgaggcggaggagctcacctcctggctctctaccgggcccgcacgccc
  D E K D [Y] K E P P P A P L F E A E E L [T] [S] W S F Y R A G I A
260 gagttcctggccaccttctcttctctacatcagcgtcctcaccgtatggcggtgggcaaccggtcggggtccaagtgcgggacc
  E F L A T F L F L Y I S V L [T] V ■ G V V G N P S G [S] K C G T
350 gtgggcatccaggcatcgcctggagcttcggcgcatgatctcgtgctcgtccactgcaccgcccggcatctccggcgccacatcaac
  V G I Q G I A W S F G G ■ I F V L V H C T A G I S G G [H] [I] [N]
440 ccggggtcaccttcgggctggtcctggcccgaagctgctgcctcaccaggcgctcttctacatggtgatgcagtgccctggcgcgata
  P A V T F G L F L A R K L [S] L T R A V F Y ■ V ■ Q C L G A I
530 tgcgggctggggtgtcaaggggtccagaccacgctgtaccagggcaacggcgggcgccaactccgtcgcgccgggtacaccaag
  C G A G V V K G F Q T [T] L [Y] Q G N G G G A N S V A P G [Y] T K
620 ggagacgggctcggggccgagatcgtcggcacgttcgtgctggtttacaccgtgtctccgccaccgacccaagcgcagcgcagagac
  G D G L G A E I V G T F V L V Y T V F [S] A T D A K R [S] A R D
710 tcacagctccccatttggcgccgcttccgatcgggttcgagtggttctggtagcactggcgagatccccatcaccgggaccggcatc
  [S] H V P I L A P L P I G F A V F L V H L A T I P I T G T G I
800 aacccggcgaggctccctcggcgccgcatcatctacaacaagaagcaggcgtgggacgaccactggatcttctgggtgggtccgttcatc
  N P A R [S] L G A A I I Y N K K Q A W D D H W I F W V G P F I
890 ggcgacgctggggccatctaccagtggtggtgatcagggcaatccccttcaagagccgactag
  G A A L A A I Y H V V I R A I P F K S R D *
959 tcaaacctcaatctgccgactgtgatggagtcttctgtattttgctatattttctccttgccttgaatgtatttttcatcatatag
1049 ctattttctagttttgaaagcttttcgggtcagcgtttccgggtgcaattttcaaacccggtaaaatagatgtaaaatgtgtttggatt
1139 ataggggctatgtgccatataaggaataattcctggtataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图2 *LcPIP*全长cDNA序列及其推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *LcPIP* cDNA

虚线框为“MIP”基序; 方框标记为潜在的磷酸化位点; 双下划线部分表示NPA保守域; 单下划线为跨膜结构域(1-6)。

2 *LcPIP*氨基酸序列的组成分析和结构预测

根据ExpASy 网站提供的ProtParam预测显示 *LcPIP*基因编码的蛋白分子式是 $C_{1423}H_{2180}N_{364}O_{391}S_9$, 分子量为30.93 kDa, 理论等电点(pI)为7.00。其不稳定系数为30.75 (<40), 属于稳定蛋白。对*LcPIP*氨基酸组成进行分析可知: *LcPIP*肽链中负电荷残基总数(Asp+Glu)为20, 正电荷残基总数(Arg+Lys)为20。非极性氨基酸(AVLIPFWM) 146个, 占41%。含有半胱氨酸, 形成二硫键结构对于维持蛋白质分子的天然构象和稳定性起到十分重要的作用。

应用NCBI网站中的Conserved Domains工具进行保守功能区分析, *LcPIP*推导氨基酸序列含高

度保守NPA盒(Asn-Pro-Ala, NPA box), 表明该蛋白属于水孔蛋白家族(图3)。ScanProsite预测到该蛋白含有MIP家族特征序列“HINPAVTFG”(118~126)(图2)。

3 羊草*LcPIP*同源性和系统进化分析

*LcPIP*序列BLASTp比对结果显示, 与其他已报道单子叶植物来源PIP1家族蛋白高度同源, 与小麦氨基酸序列同源性高达98%。将PIP与其近源蛋白进行多重氨基酸序列比对分析, *LcPIP*氨基酸序列与来源于小麦、大麦和玉米等PIP家族蛋白具有较高相似性, 尤其是跨膜结构域高度保守, 表明该类蛋白在遗传进化过程中具有较高的保守性(图4)。

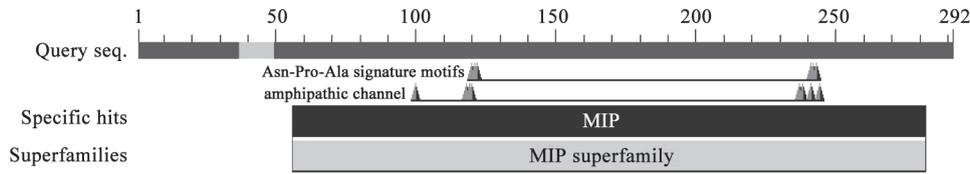


图3 *LcPIP*氨基酸保守区

Fig.3 The conserved domain of *LcPIP*

Asn-Pro-Ala: 天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸, 水孔蛋白保守基序NPA; amphipathic channel: 两性分子通道。

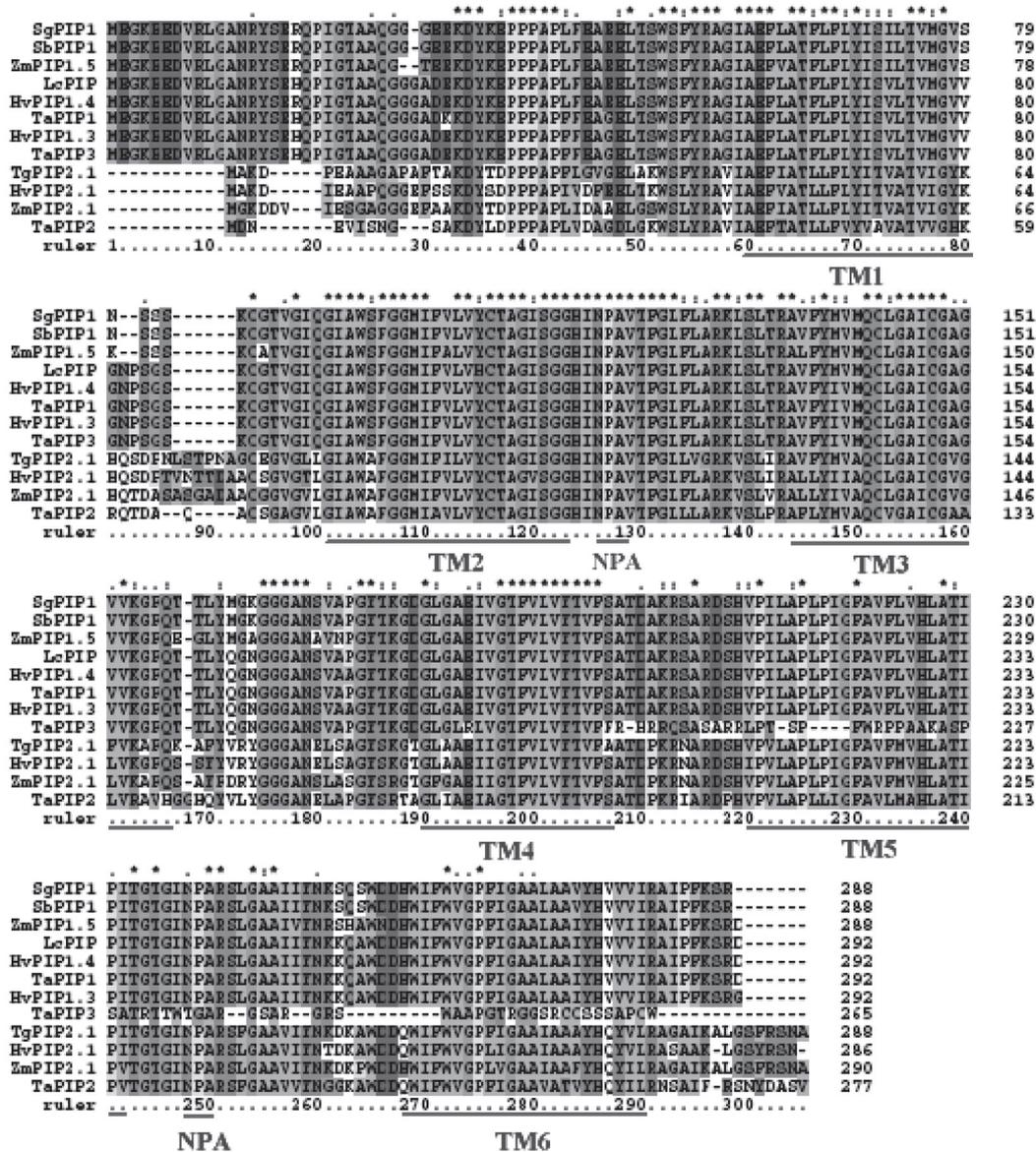


图4 *LcPIP*与其他物种PIP氨基酸序列同源性分析

Fig.4 Alignment of the predicted amino acid sequence of *LcPIP* with other plant PIP proteins

下划线为跨膜结构域(TM1~6)和NPA基序。SgPIP1: 大针茅(ABJ98539); SbPIP1: 长芒草(ABJ98537); ZmPIP1.5: 玉米(AAK26756); HvPIP1.4: 大麦(BAF33068); TaPIP1: 小麦(AAM00368); HvPIP1.3: 大麦亚种(BAA23745); TaPIP3: 小麦(AAF61465); TgPIP2.1: 郁金香(BAG68661); HvPIP2.1: 大麦亚种(BAA23744); ZmPIP2.1: 玉米(AAO86707); TaPIP2: 小麦(AAM00369)。

为研究植物PIP的进化关系,采用Neighbor-Joining方法计算进化距离,在Mega 4软件中构建系统进化树。结果(图5)显示,PIP蛋白在植物中分布广泛,单子叶植物PIP1蛋白与双子叶植物PIP1蛋白在进化支上为同一起源, LcPIP与单子叶植物PIP1, 如TaPIP1;8、TaPIP1;9和HvPIP1;2等亲缘关系较近,其中与小麦PIP1的亲缘关系最近;而与OePIP1、NtPIP1;1、ZmPIP1;2、AtPIP1a和Bo-PIP1b1等双子叶植物PIP1进化距离较远。Bo-PIP3、NtPIP2;1、AtPIP2;3和OePIP2属于双子叶植物PIP2家族,与TgPIP2;1、HvPIP2;1、ZmPIP2;1等单子叶植物PIP2家族为另一个大分支。进化上

的不同分支是由于PIP1与PIP2蛋白结构上的差异, PIP1蛋白具有更长的N末端和更短的C末端。因此,推断LcPIP应属于PIP1家族。

4 羊草LcPIP荧光定量PCR结果分析

为了研究LcPIP基因与羊草对盐胁迫条件应答的关系,利用200 mmol·L⁻¹的Na₂CO₃模拟盐胁迫环境,对羊草PIP基因的表达特性进行荧光定量PCR分析。设计的荧光定量PCR引物经预PCR实验检测、测序结果正确,具有良好的特异性,可用于进行荧光定量PCR试验。根的荧光定量PCR结果(图6)显示,在盐胁迫的初级阶段(0~6 h), LcPIP表达受到抑制,但随着时间延长,其表达量逐渐回

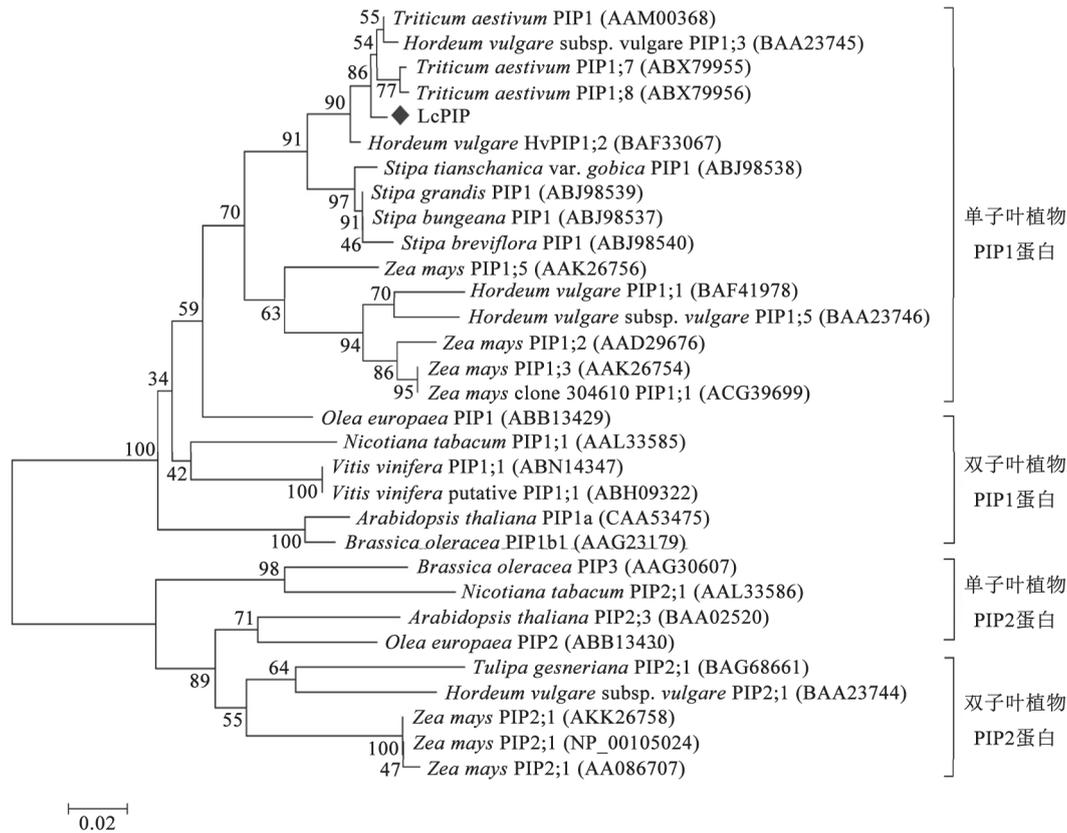


图5 LcPIP与植物中PIP蛋白系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of LcPIP and PIP proteins in plants

树枝数字代表1 000个抽样重复的bootstrap验证中可信度的百分比,比例尺代表遗传距离, LcPIP 蛋白用◆标注。Triticum aestivum PIP1: 小麦PIP1; Hordeum vulgare subsp. vulgare PIP1;3: 大麦亚组; Triticum aestivum PIP1;7: 小麦(ABX79955); Triticum aestivum PIP1;8: 小麦; LcPIP: 羊草; Hordeum vulgare PIP1;2: 大麦; Stipa tianschanica var. gobica PIP1: 戈壁针茅; Stipa grandis PIP1: 大针茅; Stipa bungeana PIP1: 长芒草; Stipa breviflora PIP1: 短花针茅; Zea mays PIP1;5: 玉米; Hordeum vulgare PIP1;1: 大麦; Hordeum vulgare PIP1;5: 大麦亚组; Zea mays PIP1;2: 玉米; Zea mays PIP1;3: 玉米; Zea mays PIP1;1: 玉米; Olea europaea PIP1: 橄榄; Nicotiana tabacum PIP1;1: 烟草; Vitis vinifera PIP1;1: 葡萄; Vitis vinifera putative PIP1;1: 葡萄; Arabidopsis thaliana PIP1a: 拟南芥; Brassica oleracea PIP1b1: 羽衣甘蓝; Brassica oleracea PIP3: 羽衣甘蓝; Nicotiana tabacum PIP2;1: 烟草; Arabidopsis thaliana PIP2;3: 拟南芥; Olea europaea PIP2: 橄榄; Tulipa gesneriana PIP2;1: 郁金香; Hordeum vulgare subsp. vulgare PIP2;1: 大麦亚组; Zea mays PIP2;1: 玉米; Zea mays PIP2;1: 玉米; Zea mays PIP2;1: 玉米。

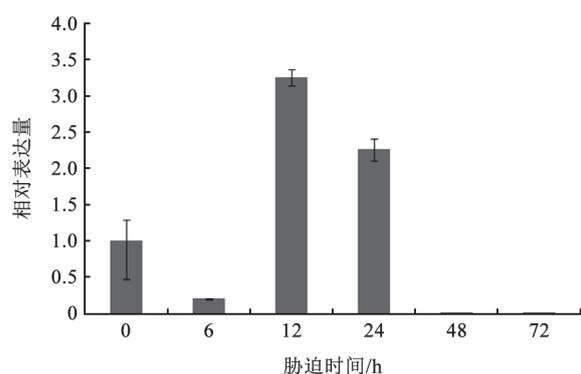


图6 Na_2CO_3 胁迫下羊草根部*LcPIP*基因的表达
Fig.6 *LcPIP* expression in roots of *L. chinensis* under Na_2CO_3 stress

升,胁迫12 h时,*LcPIP*表达量显著上升并达到最大值。但胁迫24 h后,*LcPIP*表达量明显下降。叶片的荧光定量PCR结果(图7)显示,盐胁迫会诱导叶片*LcPIP*表达,并且其表达量随时间的延长呈现出梯度增长,并在48 h达到峰值,表明一定时间的盐胁迫会诱导*LcPIP*基因的高丰度表达。但当胁迫时间至72 h时,*LcPIP*表达量显著下降,同时羊草叶片出现枯黄状态。

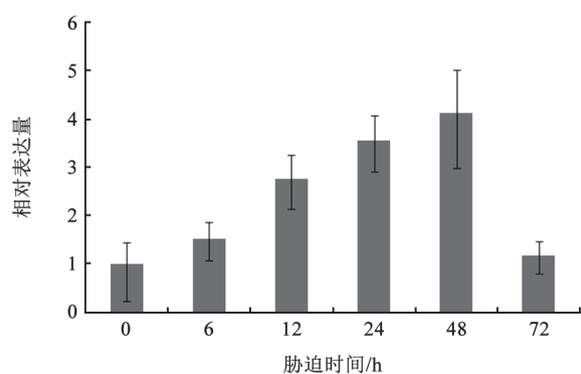


图7 Na_2CO_3 胁迫下羊草叶片*LcPIP*基因的表达
Fig.7 *LcPIP* expression in leaves of *L. chinensis* under Na_2CO_3 stress

讨 论

本实验通过RACE法克隆获得*LcPIP*基因cDNA全长序列。由NCBI网站ORF finder程序分析推导的*LcPIP*蛋白氨基酸序列中含有水孔蛋白高度保守的NPA特征性序列和MIP家族结构的典型特征(图2),因此可以认为*LcPIP*是典型的植物

PIP家族成员。在PIP蛋白分类中,PIP1和PIP2的区别在于N端和C端结构上的不同,PIP1比PIP2具有较长的N端和较短的C端。*LcPIP*氨基酸序列同源性比对和系统进化分析显示:*LcPIP*与PIP1家族基因同源性更高,结构更相似,亲缘关系更近。另外利用Prot CompVersion 9.0亚细胞定位预测程序预测*LcPIP*蛋白定位在细胞质膜上,利用TMHMM Server v.2.0程序预测该蛋白具有6个跨膜结构域,ProtFun程序预测该蛋白为疏水性蛋白和利用CBS的ProtFun 2.2 Server程序预测显示基因本体控制着转运子等(数据未列出)。综上所述,*LcPIP*蛋白的功能是与跨膜转运相关的。*LcPIP*基因是在盐胁迫条件下克隆获得的,暗示着该基因在转录水平应受盐胁迫的调节,同时荧光定量PCR的结果也初步显示,*LcPIP*基因的表达受到了 Na_2CO_3 的诱导,参与了植物逆境应答过程,这与大麦、玉米和番茄中PIP基因受盐碱的诱导表达一致(Katsuhara等2003; Zhu等2005; Ouziad等2006)。

从*LcPIP*表达模式上来看,盐胁迫初期阶段,根部*LcPIP*表达量受到明显抑制,这可能是由于在胁迫初期,由于渗透震扰和离子效应导致PIP蛋白在细胞内合成运输及亚细胞定位正常途径受阻,从而导致PIP水孔蛋白活性下降,引起植物吸水能力的下降。但当胁迫延长至12 h后,*LcPIP*基因表达明显上升,这是植物对盐胁迫环境的应答,随着植物体渗透震扰作用和离子效应的适应,自身的调节作用增强,使得PIP蛋白在体内合成及运输加强,*LcPIP*表达量增加,*LcPIP*蛋白活性恢复,植物吸水能力上升(Aroca等2011)。但当盐胁迫时间持续至48 h,*LcPIP*表达量降至低水平,这可能与PIPs间相互作用的减弱相关。在叶片中,随着胁迫时间的延长,*LcPIP*的表达量逐渐上升,这与Qian等(2014)在黄瓜幼苗中的结果相一致。但其表达量在胁迫持续72 h后明显下降。可能与叶片气孔导度等生理过程相关。先前研究证明,PIP1家族成员可以运输其他分子,包括甘油、硼酸、尿素和 CO_2 (Gomes等2009)。因此*LcPIP*在胁迫条件下表达量的上升与 CO_2 摄取是否相关还需进一步验证。NetPhos 2.0 Server程序预测分析发现*LcPIP*中存在多个潜在的磷酸化位点,预示着植物可以通过磷酸化方式来精细调控其蛋白活性,从而影响蛋白在

植物体生理活动中的功能(Horie等2011)。

基于上述研究结果,下一步可以对*LcPIP*基因的启动子进行研究,分析启动子区域是否存在参与植物干旱失水、渗透胁迫等逆境应答相关的顺式作用元件,从而揭示该基因在植物逆境应答中可能发挥的作用。同时可以构建植物表达载体,通过转化盐敏感植物拟南芥来研究其在离子胁迫和渗透胁迫下可能参与的信号转导途径,以此来进一步的功能性鉴定和研究。

参考文献

- 李红梅, 万小荣, 何生根(2010). 植物水孔蛋白最新研究进展. 生物化学与生物物理进展, 37 (1): 29~35
- 阮想梅, 李登弟, 李学宝(2009). 植物水孔蛋白的功能和调控. 植物生理学通讯, 45 (1): 1~7
- 张渝洁, 全先庆, 李新国(2006). 植物水孔蛋白研究进展. 安徽农业科学, 34 (20): 5168~5170
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2011). Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J Exp Bot*, 63 (1): 43~57
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Hanson DT, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R (2006). Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ *in vivo*. *Plant J*, 48 (3): 427~439
- Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, Delrot S, Gerós H, Chaumont F (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *BBA-Biomembranes*, 1788 (6): 1213~1228
- Horie T, Kaneko T, Sugimoto G, Sasano S, Panda MS, Katsuhara M(2011). Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Plant Cell Physiol*, 52 (4): 663~675
- Katsuhara M, Koshio K, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K (2003). Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol*, 44 (12): 1378~1383
- Li DD, Wu YJ, Ruan XM, Li B, Zhu L, Wang H, Li XB (2008). Expressions of three cotton genes encoding the PIP proteins are regulated in root development and in response to stresses. *Plant Cell Rep*, 28 (2): 291~300
- Maeshima M, Ishikawa F (2008). ER membrane aquaporins in plants. *Pflügers Arch-Eur J Physiol*, 456 (4): 709~716
- Ouziad F, Wilde P, Schmelzer E, Hildebrandt U, Bothe H (2006). Analysis of expression of aquaporins and Na⁺/H⁺ transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress. *Environ Exp Bot*, 57: 177~186
- Qian ZJ, Song JJ, Chaumont F, Ye Q (2014). Differential responses of plasma membrane aquaporins in mediating water transport of cucumber seedlings under osmotic and salt stresses. *Plant Cell Environ*, doi: 10.1111
- Temmei Y, Uchida S, Hoshino D, Kanzawa N (2005). Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. *FEBS Lett*, 579 (20): 4417~4422
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439 (7007): 688~694
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Blligny R, Maurel C (2003). Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, 425 (6956): 393~397
- Uehlein N, Otto B, Hanson DT, Fischer M, McDowell N, Kaldenhoff R (2008). Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell*, 20 (3): 648~657
- Zhu CF, Schraud D, Hartung W, Schäffner AR (2005). Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *J Exp Bot*, 56 (421): 2971~2981