

甜瓜钾离子通道MIRK受Na⁺抑制的分子机理

王黎敏¹, Anne-Aliénor Véry², 张屹东¹, 邓扬悟¹, 黄丹枫^{1*}

¹上海交通大学农业与生物学院, 植物科学研究所, 上海200240; ²法国国家农业部植物生物化学与分子生理学中心, 法国蒙彼利埃34060

摘要: 甜瓜钾离子通道MIRK受Na⁺抑制, 本研究通过钾离子通道氨基酸序列比对, 发现MIRK与其他钾离子通道在3个位点上有较明显差异。采用基因定点突变方法获得3个MIRK突变体, 将突变体在非洲爪蟾卵母细胞(*Xenopus laevis* oocytes)中表达后利用双向电压钳技术研究了Na⁺对MIRK通道电流的调整作用, 以探索MIRK受Na⁺抑制的可能氨基酸位点。结果显示, MIRK受外界Na⁺的抑制不是由其单一氨基酸引起, 可能涉及MIRK第232~234位丝氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺及第241位天冬酰胺等多个氨基酸的共同调节。

关键词: 甜瓜钾离子通道MIRK; 突变体; 外界Na⁺; 抑制; 电生理

Molecular Mechanism of Melon Potassium Channel MIRK Inhibited by Na⁺

WANG Li-Min¹, Anne-Aliénor Véry², ZHANG Yi-Dong¹, DENG Yang-Wu¹, HUANG Dan-Feng^{1*}

¹Institute of Plant Science, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; ²Biochemistry and Plant Molecular Physiology, French National Institute for Agricultural Research, Montpellier 34060, France

Abstract: Melon potassium channel MIRK, after heterologous expression in *Xenopus laevis* oocytes was found an inhibition by external Na⁺. In order to investigate the effect of external Na⁺ on MIRK and explore the molecular base of blockage site(s), we proceeded our research by performing site-directed mutagenesis experiment after amino acid align and obtained three mutants of MIRK, then, used double electrode voltage clamp techniques as a research tool in this study. The results indicated that the depressing effect was not determined by single amino acid but might involve serine, lysine, glutamine combination from 232–234 sites and asparagines at a 241-site.

Key words: melon potassium channel MIRK; mutant; external Na⁺; inhibition; electrophysiology

通过拟南芥中KAT1和AKT1的克隆, 人们开始认识和了解植物中的钾离子通道。随着研究深入, 发现钾离子通道除主要参与钾离子的吸收转运外, 还有其他一些生理功能, 如气孔的开放、胞间信号传导及根毛生长等(Maathuis等1997; Schroeder等1994; Thiel和Wolf 1997)。除此之外, 调整植物对于逆境的适应, 也是钾离子通道的主要功能之一。目前, 盐渍化威胁着世界近7%的耕地土壤, 成为最受关注的逆境之一(Shabala和Cuin 2007)。因此, 目前更多研究聚集到钾离子转运体/通道与耐盐性之间的关系。当超表达钾离子通道OsKAT1于水稻细胞中可提高耐盐性(Obata等2007), PutAKT1转至拟南芥中也起同样作用(Ardie等2010), 但关于钾离子通道在耐盐方面的作用机理研究还不很深入(Su等2001; Fuchs等2005; Zhang等2006; Shabala和Pottosin 2010)。

MIRK (melon inward rectifying K⁺ channel)是从网纹甜瓜‘春丽’中克隆的钾离子通道基因, 当表达于非洲爪蟾卵母细胞和钾离子缺陷性酵母中时, 表现出所有植物钾离子通道所没有的一个新的特性: 受外界Na⁺的抑制, 并且该抑制效应依赖于胞外Na⁺/K⁺。根据MIRK受Na⁺抑制表现出的电生特征, 推测在孔道区外部开口处可能存在一个Na⁺结合位点(Zhang等2010)。同时, 谢亚丽等(2009)将该基因超表达于拟南芥中时, 可明显提高植物的耐盐性。

收稿 2010-11-24 修订 2010-12-24

资助 上海市科委基础研究重点项目(09JC1408500)、上海市蔬菜学重点学科(B209)、高等学校博士点专项科研基金(20090073110047)和“Arcus 2006 Languedoc-Roussillon/China”项目。

* 通讯作者(E-mail: hdf@sju.edu.cn; Tel: 021-34206943)。

根据氨基酸比对, 本实验通过基因定点突变方法获得3个MIRK突变体, 并在非洲爪蟾卵母(*Xenopus laevis* oocytes)细胞中表达, 然后结合双向电压钳技术探索调控该效应的可能氨基酸位点, 为进一步了解MIRK在植物耐盐上的调控作用提供研究基础。

材料与方法

1 基因定点突变

利用BLAST软件比对MIRK同源的钾离子通道氨基酸序列, 寻找不同的氨基酸位点。利用Vector NTI软件设计引物(表1), 并以构建于载体pGEMX-

表1 基因定点突变使用的引物

Table 1 Primers in site-directed mutagenesis process

基因	引物	序列
L252-R	MIRK L252-R F	5' GAAGAAAGTTTATGGAACCGTTACATTACTTC 3'
	MIRK L252-R R	3' GAAGTAATGTAACGGTTCATAAACTTTCTTC 5'
N241-Y	MIRK N241-Y F	5' CATGGATTGGTGTGTGTACCCTAATTTCAAAG 3'
	MIRK N241-Y R	3' CTTTGAAATTAGGGTACACAGCACCAATCCATG 5'
S232KQ-PRK	MIRK S232KQ-PRK F	5' GTATCCAGATCCAAGAAAAACATGGATTGGTGC 3'
	MIRK S232KQ-PRK R	3' GCACCAATCCATGTTTTTCTGGATCTGGATAC 5'

ho (双酶切位点为*Bam*HI和*Not*I)的MIRK cDNA为模板(Zhang等2010), 在高保真酶(pfu ultra)的作用下进行基因定点突变。突变产物转化到Top10感受态细胞(Invitrogen, 美国), 提取质粒, 经酶切(*Sac*I)检验为阳性的质粒片段, 利用表1中引物进行PCR扩增后测序, 得到正确无误的突变体。

2 MIRK cRNA及其突变体cRNA的制备

利用mMESSAGE mMACHINE试剂盒(Ambion Inc., Austin, 美国), 将构建于载体pGEMXho的cDNA线性化后, 经体外转录制备cRNA, 用DEPC处理的双蒸水稀释至浓度为1 ng·L⁻¹, 储存在-70 °C冰箱备用。

3 卵母细胞的采取

非洲爪蟾(*Xenopus laevis* Daudin)冰浴麻醉(约30 min)后, 将其背部置于手术器械盘内, 除下腹部外其他部位用冰覆盖, 在下腹部外侧做长度为0.8~1.0 cm的切口, 打开腹腔, 拉出子宫瓣, 剪下1~3个卵叶。子宫轻放回腹部, 分层缝合体壁肌肉及皮肤, 待动物苏醒后放回池中。

将成簇卵母细胞, 置于含胶原酶(1~2 g·mL⁻¹)的OR2溶液中消化30~60 min, 于20 °C下缓慢振荡, 以去除卵巢膜和滤泡膜。用ND96液[96 mmol·L⁻¹ NaCl, 2 mmol·L⁻¹ KCl, 1.8 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 1

mmol·L⁻¹ MgCl₂, 2.5 mmol·L⁻¹ Na-pyruvate, 5 mmol·L⁻¹ HEPES-NaOH, 50 mg·mL⁻¹庆大霉素(pH 7.5)]冲洗, 在显微镜下挑选动植物极境界分明、成熟的IV~V期卵母细胞用于注射。

4 微注射

在解剖显微镜下通过微量注射仪(Nanoliter 2000, WPI公司)将cRNA按每个卵母细胞50 nL注射。注射后的卵母细胞用ND96培养液在恒温20 °C条件下孵育3~4 d, 每天换液, 并去除坏死细胞。

5 电生理记录

将2个玻璃微电极(电阻为0.5~1.5 MΩ)通过微操纵器, 插入卵母细胞内, 电极内液为3 mol·L⁻¹的KCl溶液, 电极外液为以下几个处理溶液分别持续灌流(表2)。

在电流测定时, 钳制电压为-20 mV, 给予波600 ms, 超级化电压从-25 mV到-175 mV, 阶跃为-15 mV, 后将膜电位钳制在-20 mV, 记录600 ms。采用双电极电压钳放大器(GeneClamp 500B, 美国), 经pClamp10程序将信号记录入计算机内。

6 数据分析

实验数据用Excel、Sas 9.13和SigmaPlot 11.0进行统计分析和制图, 实验结果以均数±标准差表示。

表2 6种处理溶液成分及浓度

Table 2 Components and concentrations of six external solutions

成分	溶液1 (K ₁₀ Li ₉₀)	溶液2 (K ₁₀ Na ₉₀)	溶液3 (K ₁ Li ₉₉)	溶液4 (K ₁ Na ₉₉)	溶液5 (K _{0.1} Li _{99.9})	溶液6 (K _{0.1} Na _{99.9})
KCl/mmol·L ⁻¹	10	10	1	1	0.1	0.1
NaCl/mmol·L ⁻¹	0	90	0	99	0	99.9
LiCl/mmol·L ⁻¹	90	0	99	0	99.9	0

实验所用的基本溶液含1 mmol·L⁻¹ CaCl₂、2 mmol·L⁻¹ MgCl₂和10 mmol·L⁻¹ Mes, 用Tris调pH至6.0。用基础液为底液配制表中的6种电解液。

实验结果

1 氨基酸比对结果

用BLAST软件比对MIRK与其他shaker家族成员中连接第五跨膜片段S5与P-功能区的氨基酸序列, 结果如图1。以KAT1 (已知的不受Na⁺抑制的钾离子通道)为主要对照, 其中黑色虚框标记为感兴趣的氨基酸位点, 分别为第232~234位的丝氨酸-赖氨酸-谷氨酰胺、第241位天冬酰胺及第252位亮氨酸。根据此对比结果设计基因定点突变的引物(表1), 将第232~234位、第241位及第252位氨基酸突变为脯氨酸-精氨酸-赖氨酸、酪氨酸及精氨酸。

	232-234	241	252	
CmMIRK	SKQTWIGAVNPNFKEESLWNLY	ITSIYWSITLTTTGYDLHAENPR		
StKST1	SKKTWIGAVYPDFKQLSVGDRY	ITSLYWSIVLTTTGYDLHAENSR		
WsIRK	PERTWIGAVYPNFKEENLWDRYVTS	IYWSITLTTTGYDLHAENPR		
AtKAT1	PRKTWIGAVYPNFKEASLWNRVVTALY	WSITLTTTGYDFHAENPR		
AtKAT2	PPTKWIGAVYPNFKETSVWSRYVTALY	WSITLTTTGYDLHAENPR		
	S5-P linker		P-domain	

图1 MIRK与其他shaker家族成员氨基酸对比
Fig.1 Comparison of amino acid of MIRK and other shaker members

2 MIRK cRNA及其突变体cRNA的电泳结果

图2为经线性化后, 构建于载体pGEMXho (3 044 bp)上的MIRK (约2 000 bp)及突变体的cRNA凝胶电泳图。图上仅为一条带, 表示线性化结果很好。同时5 kb条带表示MIRK及其突变体成功构建于载体pGEMXho。

3 MIRK及其突变体电生理特征比较

图3示MIRK及其突变体钾离子通道尾电流的I-V曲线。以K₁Li₉₉为外液且经激活脉冲-175 mV

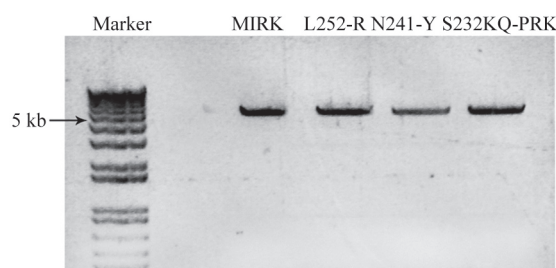


图2 线性化后的MIRK及其突变体的cRNA电泳图
Fig.2 Electrophoretogram of linearizing MIRK and mutants cRNA

L252-R为第252位亮氨酸突变为精氨酸的突变体, N241-Y为第241位天冬酰胺突变为酪氨酸的突变体, S232KQ-PRK为第232~234位丝氨酸-赖氨酸-谷氨酰胺突变为脯氨酸-精氨酸-赖氨酸的突变体。以下同。

后的尾电流值来标准化所有尾电流, 以避免由于各个卵母细胞基因表达量的不同而引起的差异。从图中可以看出电压MIRK及其突变基因编码的钾离子通道电流呈现电压依赖性, 即随电压改变, 电流值发生改变。在不同外界K⁺浓度下, 虽然MIRK及突变体电流值存在差异, 但都具有依赖于胞外K⁺浓度的特性, 即随浓度改变, 电流值改变。上面两点说明突变体未改变MIRK钾离子通道的基本特性。

为了解MIRK及突变体对胞外K⁺的敏感性, 利用欧姆定律 $G_{\text{kout}}=G_{\text{K}}=I/(E-E_{\text{K}})=N \cdot P_0 \cdot g$, (G_{K} 为钾离子通道电导值, I 为经过通道的电流值, E 为钳制电压值, E_{K} 为平衡电压值, N 为单个卵母细胞上的钾离子通道总数, P_0 为开放概率, g 为单个通道的电导)计算电导值。同样利用外液为K₁Li₉₉且经激活脉冲-175 mV后的尾电流值来标准化所有尾电流以避免由于各个卵母细胞基因表达量的不同而引

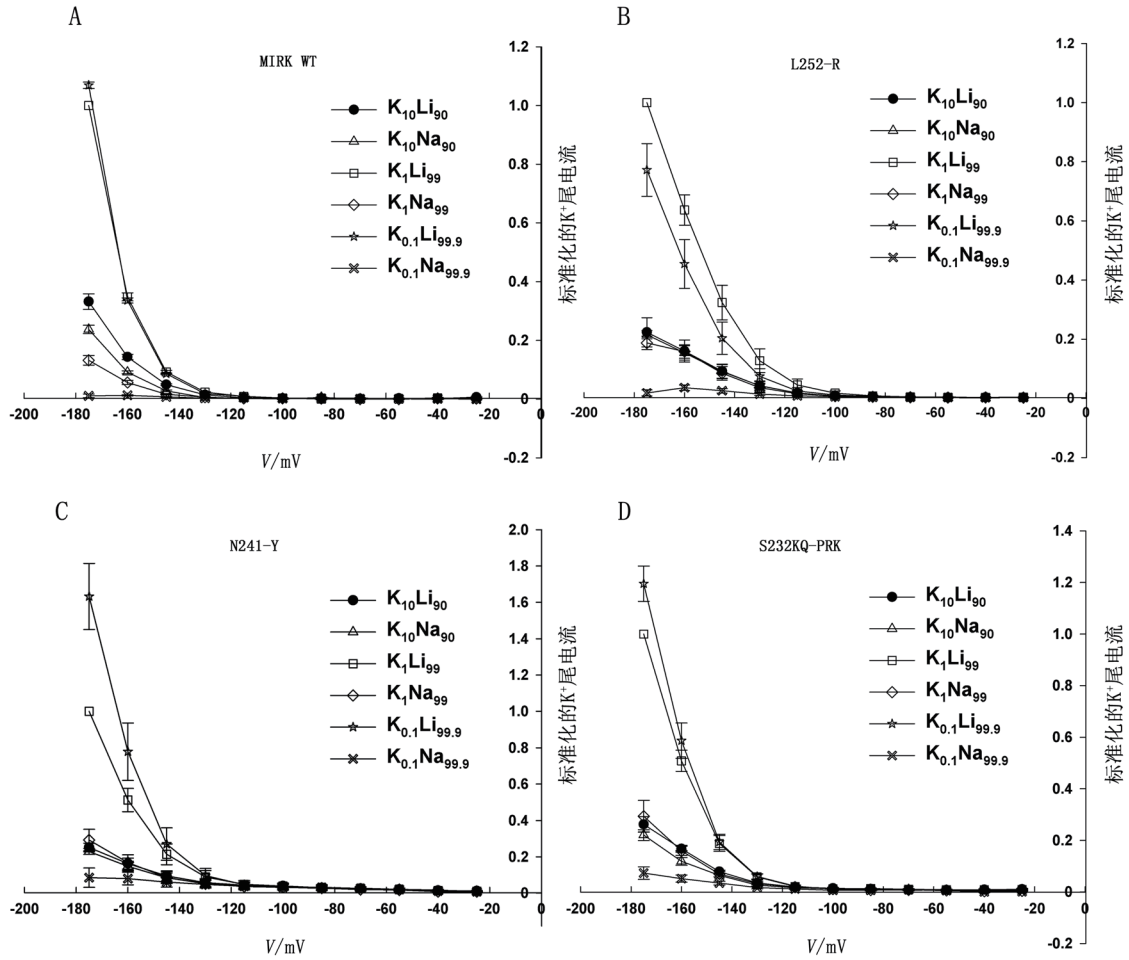


图3 标准化后的钾离子通道尾电流与电压的关系曲线图

Fig.3 Normalized potassium tail current-Itail/V curve

起的差异。当通道在一个指定电位被激活后,在充分去极化的电位下测量的外向钾离子通道电导值应该保持恒定,且不依赖于外界 K^+ 浓度,除非胞外 K^+ 浓度能调节开放通道的数目。从图4的结果可以看出MIRC及突变体电导值都是随胞外 K^+ 浓度的改变而改变,因此外界 K^+ 浓度能调节开放通道的数目。但相应氨基酸位点的改变也导致对外界 K^+ 敏感度发生变化。在 $1\sim 10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,所有突变点对 K^+ 敏感度增加,而在 $0.1\sim 1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,突变体S232KQ-PRK和N241-Y对 K^+ 敏感度降低。

图5为MIRC及其突变体的门控特征曲线图,钾离子通道的开放概率($P_o/P_{o\max}$)可由失活外向尾电流计算得到,其与电压的曲线关系应用波尔兹

曼分布 $I=I_{\max}/\{1+\exp[Z_g F(E-Ea50)/RT]\}$ 进行拟合,并估计门控参数 Z_g 和 $Ea50$ 。其中 Z_g 为等价门控电荷, $Ea50$ 为半激活电压, E 为静息电位, F 为法拉第常数, R 为波尔兹曼常数, T 为绝对温度。从图中看出,MIRC半激活电压为 -188 mV ,突变体L252-R为 -176 mV ,N241-Y为 -196 mV ,S232KQ-PRK为 -167 mV 。N241-Y和L252-R的门控电荷数明显小于对照。

4 外界 Na^+ 对突变后MIRC钾离子通道的影响

以胞外浓度 Na^+ 及 Li^+ 为 $99\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的电流曲线图为例,说明 Na^+ 对MIRC及其突变基因编码的钾离子通道电流的影响(图6)。从图中可以明显看出,突变体钾离子通道电流在外界存在 Na^+ 的情况下内向电流或是尾电流均明显小于无 Na^+ 下的

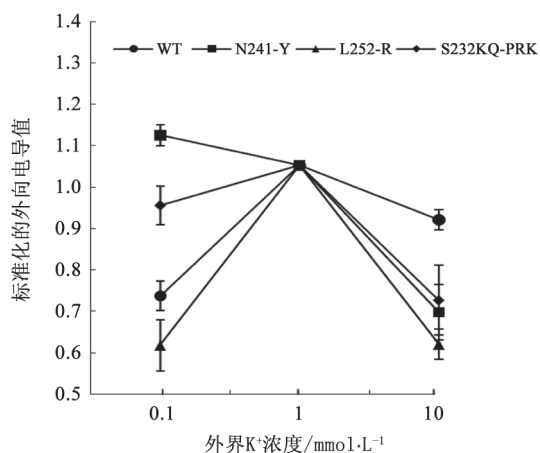


图4 标准化外向电导值的比较
Fig.4 Comparison of outward conductance

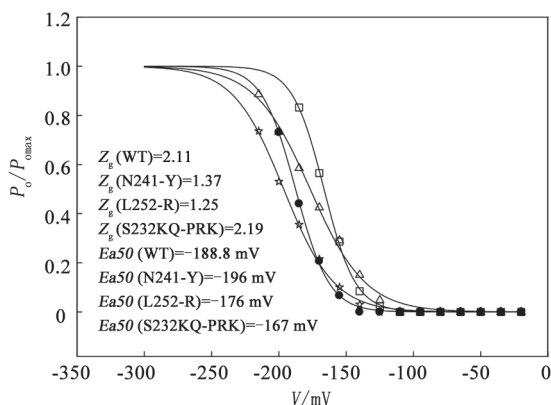


图5 MIRK及其突变体的门控特征
Fig.5 Gating properties of MIRK and mutants

膜电流, 表现为外源Na⁺依旧抑制MIRK钾离子通道电流, 但抑制程度有所差异。

图7反应了在-175 mV下受Na⁺抑制程度。可以看出, 与未突变MIRK一致, 突变体受外界Na⁺抑制效应均随着Na⁺/K⁺比率的升高而增大。当Na⁺/K⁺达到999时, 抑制效率可达95%以上。突变体L252-R不论在任何浓度的Na⁺作用下, 其抑制率对比MIRK的不存在显著性差异。而N241-Y及S232KQ-PRK则所有处理浓度下受Na⁺抑制的程度与MIRK的相比, 存在显著差异。在外界Na⁺/K⁺浓度比为9时, 抑制率分别减少了19.5%和19.4%; 当比率升高为99时, 抑制率同时减少了16.1%; 当达到999时, 抑制率分别减少了8.5%和7.7%。

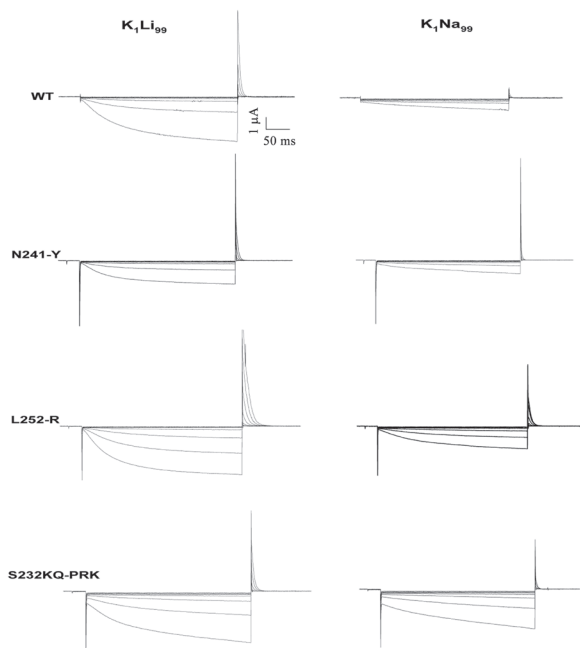


图6 卵母细胞表达的钾离子通道内向电流及外向失活电流
Fig.6 Current trace of MIRK and mutants with and without external Na⁺
左侧为无Na⁺处理, 右侧为Na⁺处理。

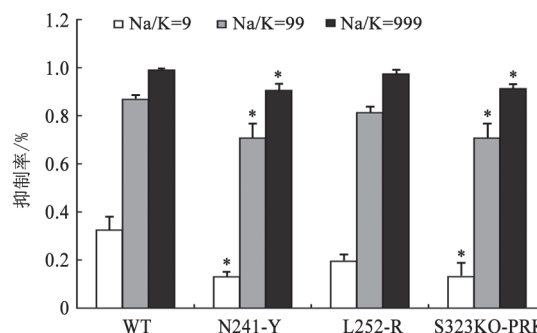


图7 外源Na⁺对MIRK及其突变体钾离子通道电流的影响
Fig.7 Effect of external Na⁺ on K⁺ current of MIRK and mutants
*表示与WT相比差异显著, P<0.05。

讨 论

本实验门控曲线中反应的L252-R和S232KQ-PRK半激活电压的减少, 表明孔道区外部氨基酸可能与电压器直接相互作用或是通过离子渗透反馈到电压器, 从而改变其半激活电压(Becker等1996)。

同时, 电生理实验结果表明, 外界Na⁺仍抑制MIRK突变体编码的内向钾离子通道电流, 但抑制

程度存在差异。其中第252位亮氨酸对该效应不起调控作用。而第232~234位丝氨酸-赖氨酸-谷氨酰胺,第241位天冬酰胺的突变明显降低了通道受 Na^+ 抑制的作用,说明这几个位于P区与S5跨膜片段连接处的氨基酸的改变,可能会导致 Na^+ 结合位点蛋白质构像发生改变,进一步作用于孔道的过滤器,使得钾的吸收增加。同时,说明了并不是单一的氨基酸位点调控 Na^+ 抑制的效应。

MIRK对 Na^+ 的敏感性的氨基酸位点存在于孔道外部开口的假设,可以进一步通过结合以上的多个氨基酸位点或是所有氨基酸位点的突变证实。或者通过将整个KAT1(已知不受外界 Na^+ 抑制)孔道区替换到MIRK序列上来验证其是否存在于孔区外。

参考文献

- 谢亚丽, 张屹东, 季凯莉, 黄丹枫(2009). 转甜瓜钾离子通道基因MIRK拟南芥植株的耐盐性分析. 上海交通大学学报(农业科学版), 27(5): 441~447
- Ardie SW, Liu S, Takano T (2010). Expression of AKT1-type K^+ channel gene from *Puccinellia tenuiflora*, *PutAKT1*, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 29: 865~874
- Becker D, Dreyer I, Hoth S, Reid JD, Busch H, Lehnen M, Palme K, Hedrich R (1996). Changes in voltage activation, Cs^+ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K^+ channel KAT1. *Plant Biol*, 93: 8123~8128
- Fuchs I, Stölzle S, Ivashikina N, Hedrich R (2005). Rice K^+ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress. *Planta*, 221: 212~221
- Maathuis FJM, Sanders D, Schroeder JI (1997). Roles of higher plant K^+ channels. *Plant Physiol*, 114: 1141~1149
- Obata T, Kitamoto HK, Nakamura A, Fukuda A, Tanaka Y (2007). Rice shaker potassium channel OsKAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells. *Plant Physiol*, 144: 1978~1985
- Schroeder JI, Ward JM, Gassmann W (1994). Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K^+ channels in higher plants: biophysical implications for K^+ uptake. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23: 441~471
- Shabala S, Cuin TA (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant*, 133: 651~669
- Shabala S, Pottosin II (2010). Potassium and potassium-permeable channels in plant salt tolerance. In: Demidchik V, Maathuis F (eds). *Ion Channels and Plant Stress Responses*. Berlin: Springer-Verlag, 87~110
- Su H, Gollmack D, Katsuhara M, Zhao C, Bohnert HJ (2001). Expression and stress-dependent induction of potassium channel transcripts in the common ice plant. *Plant Physiol*, 125: 604~614
- Thiel G, Wolf AH (1997). Operation of K^+ -channels in stomatal movement. *Trends Plant Sci*, 2: 339~345
- Zhang Y, Véry A-A, Wang L, Deng Y, Sentenac H, Huang D (2010). A K^+ channel from salt-tolerant melon inhibited by Na^+ . *New Phytol*, 189: 856~868
- Zhang Y, Wang Z, Zhang L, Cao Y, Huang D, Tang K (2006). Molecular cloning and stress-dependent regulation of potassium channel gene in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*). *Plant Physiol*, 163: 968~978