

## 缺Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>对水稻*OsNRAMP*家族基因表达与主要金属离子吸收的影响

孙丽娟, 程龙军\*

浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江临安311300

**摘要:** 对野生型水稻进行缺Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>处理, 利用定量RT-PCR技术分析*OsNRAMP*家族不同基因的表达情况, 并采用ICP-MS技术检测在水稻根、茎叶中Fe、Zn、Cu和Mn等元素的积累情况。结果表明水稻中*OsNRAMP*家族有9个基因, 可分为3个亚类; *OsNRAMP5*可能参与了Cu<sup>2+</sup>的吸收和转运, 而*OsNRAMP2*和*OsNRAMP3*可能参与Zn<sup>2+</sup>吸收和转运。同时缺Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>能刺激Fe<sup>2+</sup>离子在水稻根和茎叶中的积累, 减缓Mn<sup>2+</sup>离子在根中的吸收; 而缺Cu<sup>2+</sup>减缓水稻中Zn<sup>2+</sup>离子的吸收。这些金属离子吸收的情况和*OsNRAMP*家族可能存在密切关系。

**关键词:** *OsNRAMP*; Cu<sup>2+</sup>; Zn<sup>2+</sup>; 金属离子吸收; 水稻

## Effects of Deficiency of Copper and Zinc on *OsNRAMPs* Expression and Main Metal-Ions Uptake in *Oryza sativa* L.

SUN Li-Juan, CHENG Long-Jun\*

College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China

**Abstract:** The expression of *OsNRAMP* family were analyzed by quantity RT-PCR with deficiency of copper and zinc in rice, the accumulation of iron, zinc, copper and magnesium were also measured by ICP-MS. The results showed *OsNRAMP* family of nine genes could be divided into three sub-categories. *OsNRAMP5* was possibly involved in the uptake and transportation of copper, and *OsNRAMP2* and *OsNRAMP3* also played an important role in the uptake and transportation of zinc. The deficiency of copper and zinc could stimulate the accumulation of iron and decrease the uptake of manganese, and the deficiency of zinc also slowed down the accumulation of copper. *OsNRAMPs* family may be closely related to the metal-ions uptake.

**Key words:** *OsNRAMP*; Cu<sup>2+</sup>; Zn<sup>2+</sup>; metal-ion uptake; *Oryza sativa* L.

植物中金属离子的运输和平衡对其生长和发育以及抗逆具有非常重要的作用。研究参与这个过程基因尤其是编码转运体蛋白相关的基因, 对了解植物体吸收、运输、分配金属离子的机制意义重大(Clemens 2001; Curie等2000)。NRAMP (natural resistance associated macrophage protein)基因家族编码的蛋白就是生物中参与金属离子转运和分配功能的重要成员之一。该类基因首先在哺乳动物中发现并克隆, 在细菌、藻类和植物中也广泛存在, 且进化保守。研究发现他们具有非常广谱的二价金属离子运输功能, 包括Fe<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>和Pb<sup>2+</sup>等, 而且能同时运输它们中的两种或两种以上, 运输模式采用质子共运输的形式(Gunshin等1997; Nevo和Nelson 2006)。同时, NRAMP转运体还负责生物体内的金属离子平衡作用。

Cu和Zn都是植物中重要的营养元素, 同时它

们的过度积累又会对植物造成伤害, 因此植物在这些金属元素的吸收、运输和贮存方面必须保持平衡, 这对植物的生长发育也至关重要。植物中转运金属离子的载体很复杂, NRAMP家族的基因就是其中的重要一类。但目前针对NRAMP家族基因与Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>吸收转运的关系仍缺乏相应的研究。Belouchi等(1997)首先从水稻中克隆了3个NRAMP基因*OsNRAMP1*、*OsNRAMP2*和*OsNRAMP3*。本研究以此为基础, 进一步在全基因组水平搜寻了NRAMP基因的同源基因, 研究了在缺Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>条件下这些基因的表达, 以及Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>在水稻中的吸收和转运, 为进一步研究水稻NRAMP基因的功能以及金属元素吸收

收稿 2011-05-31 修定 2011-08-31

资助 浙江省自然科学基金(Y3090249)。

\* 通讯作者(E-mail: ljcheng@zju.edu.cn; Tel: 0571-63742885)。

之间的关系奠定了基础。

## 材料与方法

### 1 供试材料和试剂

水稻(*Oryza sativa* L.)为野生型材料‘日本晴’(Nippobare)。实验生化试剂主要购自TAKARA公司, RNA提取Trizol试剂购自Invitrogen公司。其他实验试剂均为国产试剂。

### 2 方法

#### 2.1 *OsNRAMP*基因的生物信息学分析

分别以*OsNRAMP1*、*OsNRAMP2*和*OsNRAMP3*的蛋白序列在NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行tblastn比对, 搜寻与它们同源性较高的基因, 并利用PFAM蛋白数据库对结果中的蛋白进行功能预测。然后, 将这些基因利用CLASTALW软件进行多序列联配, 分析它们的同源特征。并用MEGA和PHYLP软件构建*OsNRAMP*基因家族的进化树, 对其进行进化上的分类。

#### 2.2 缺Cu<sup>2+</sup>和缺Zn<sup>2+</sup>条件下不同*OsNRAMP*基因的定量RT-PCR表达分析

水稻培养液按国际水稻所标准营养液配方(Yoshida等1976)进行配制。溶液配好后, 调溶液pH值为5.5。取发芽的野生型种子在生长箱中培养, 培养温度: 白天30 °C, 夜晚22 °C; 相对湿度80%; 光照强度450 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。正常水稻培养液中生长20 d至4叶期, 然后转移至不加Cu<sup>2+</sup>或不加Zn<sup>2+</sup>水稻培养液中进行培养, 以正常培养的作为对照。培养3 d后, 用Trizol试剂提取水稻的根和茎叶组织中RNA, 进行逆转录, 作为模板, 设计定量RT-

PCR引物(表1)后, 以*OsACTIN*为内参基因在Bio-Rad CFX96定量PCR仪上进行基因定量表达实验, 每个处理重复3次。根据相对定量表达公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算不同基因的相对表达结果。

#### 2.3 缺Cu<sup>2+</sup>和缺Zn<sup>2+</sup>条件下水稻根、茎叶中Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>含量的测定

将缺Cu<sup>2+</sup>、缺Zn<sup>2+</sup>和正常培养的水稻苗继续培养18 d, 分别取地上部分和根用去离子水冲洗3次, 然后在70 °C烘箱中烘烤2 d至重量不再改变, 然后粉碎或研磨成粉。称取500 mg左右粉末, 加5 mL的HNO<sub>3</sub> (11 mol·L<sup>-1</sup>), 在150 °C下消化5 h, 用去离子水定容至50 mL (Takahashi等2003)。用ICP-MS (Agilent7500ce, Santa Clara, CA, US)分析样品中的Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>金属离子含量。试验重复3次。

## 结果与讨论

### 1 *OsNRAMP*基因的生物信息学分析

以已知的*OsNRAMP1*、*OsNRAMP2*、*OsNRAMP3*蛋白序列在NCBI进行tblastn比对, 结合PFAM蛋白数据库对结果蛋白功能的预测, 最终选择与其同源性较高的6个基因, 以这9个基因作为研究对象。在RGAP网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)上, 这9个基因的座位号分别为*OsNRAMP1* (LOC\_Os07g15460)、*OsNRAMP2* (LOC\_Os03g-11010)、*OsNRAMP3* (LOC\_Os06g-46310)、*OsNRAMP4* (LOC\_Os02g03900)、*OsNRAMP5* (LOC\_Os07g15370)、*OsNRAMP6* (LOC\_Os01g31870)、*OsNRAMP7* (LOC\_Os012g-

表1 *OsNRAMP*基因家族定量RT-PCR引物

Table 1 Primers for qRT-PCR of *OsNRAMPs*

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>OsACTIN</i>	TCAGCAACTGGGATGATATGGAG	GCCGTTGTGGTGAATGAGTAAC
<i>OsNRAMP1</i>	ATCGGCTAATCTTGGAGTGGT	TTTGCTGATGCGGGTGTATTC
<i>OsNRAMP2</i>	ATGGAGTGAGAAAATTGGAAGC	CAGCCCAATAGCCCAGATATAC
<i>OsNRAMP3</i>	TGGTGTGGTGTCTGATAACTG	CAATTCATCTGGTCTTCAGGAC
<i>OsNRAMP4</i>	TCTGATGACATTCCTGAAGTGT	CGATGAATGCAAGACTACACTC
<i>OsNRAMP5</i>	AGTGGTTACAGGGAGGCATC	GTCTTCCTCGATAGCACCAAG
<i>OsNRAMP6</i>	GTTACAAGGATATGGGGCTCGG	CGGCAAATGAGAGATTGTTGGC
<i>OsNRAMP7</i>	CACACAATGTGTTTCTCCATTC	GGATCTGAATTGATTGAAGCAC
<i>OsNRAMP8</i>	GGTTTTATGGAACCAAAGAAG	CTCGGACCTATCTTAAACACTC
<i>OsNRAMP9</i>	TACGCTGTTCTGGCTGTCACT	GAGTGCCATGACCAGACTCCAC

39180)、*OsNRAMP8* (LOC\_Os03g41064)和*OsNRAMP9* (LOC\_Os03g49400)。这9个OsNRAMP蛋白的序列比对结果(图1)发现, *OsNRAMP1*与*OsNRAMP3*、*OsNRAMP4*、*OsNRAMP5*和*OsNRAMP6*的序列同源性比较高, 分别达到了56.67%、55.38%、52.94%和49.21%。而*OsNRAMP2*与*OsNRAMP7*、*OsNRAMP8*同源性较高, 分别为76.13%和71.69%。PFAM蛋白数据库的预测结果表明, *OsNRAMP9*具有NRAMP蛋白结构特征, 但它同样具有乙烯响应不敏感蛋白结构的特征, 而其他*OsNRAMP*则没有这个特点。*OsNRAMP9*与*OsNRAMP2*、*OsNRAMP3*的同源性比较低, 分别为34.88%和36.62%, 而与*OsNRAMP1*的同源性只有24.09%。但此蛋白仍被认为

可能是NRAMP家族的一个新成员(Belouchi等1997)。

用MEGA 4构建的系统进化树(图2)显示, 这9个基因分为3个亚类, 其中*OsNRAMP9*与其他成员的关系最远, 独立作为一个亚类; 而*OsNRAMP1*、*OsNRAMP3*、*OsNRAMP4*、*OsNRAMP5*和*OsNRAMP6*在进化上关系比较近, 同属于一个亚类; 而*OsNRAMP2*、*OsNRAMP7*和*OsNRAMP8*同属于一个亚类。这与蛋白序列对比的结果是相同的。

**2 缺Cu<sup>2+</sup>和缺Zn<sup>2+</sup>条件下不同OsNRAMP基因的定量RT-PCR表达分析**

图3表明, 缺Cu<sup>2+</sup>条件下, 在根中除了*OsNRAMP5*表现出上调外, *OsNRAMP1*、*OsNRAMP2*、*OsNRAMP8*和*OsNRAMP9*都有下调现象; 在茎叶中, 除

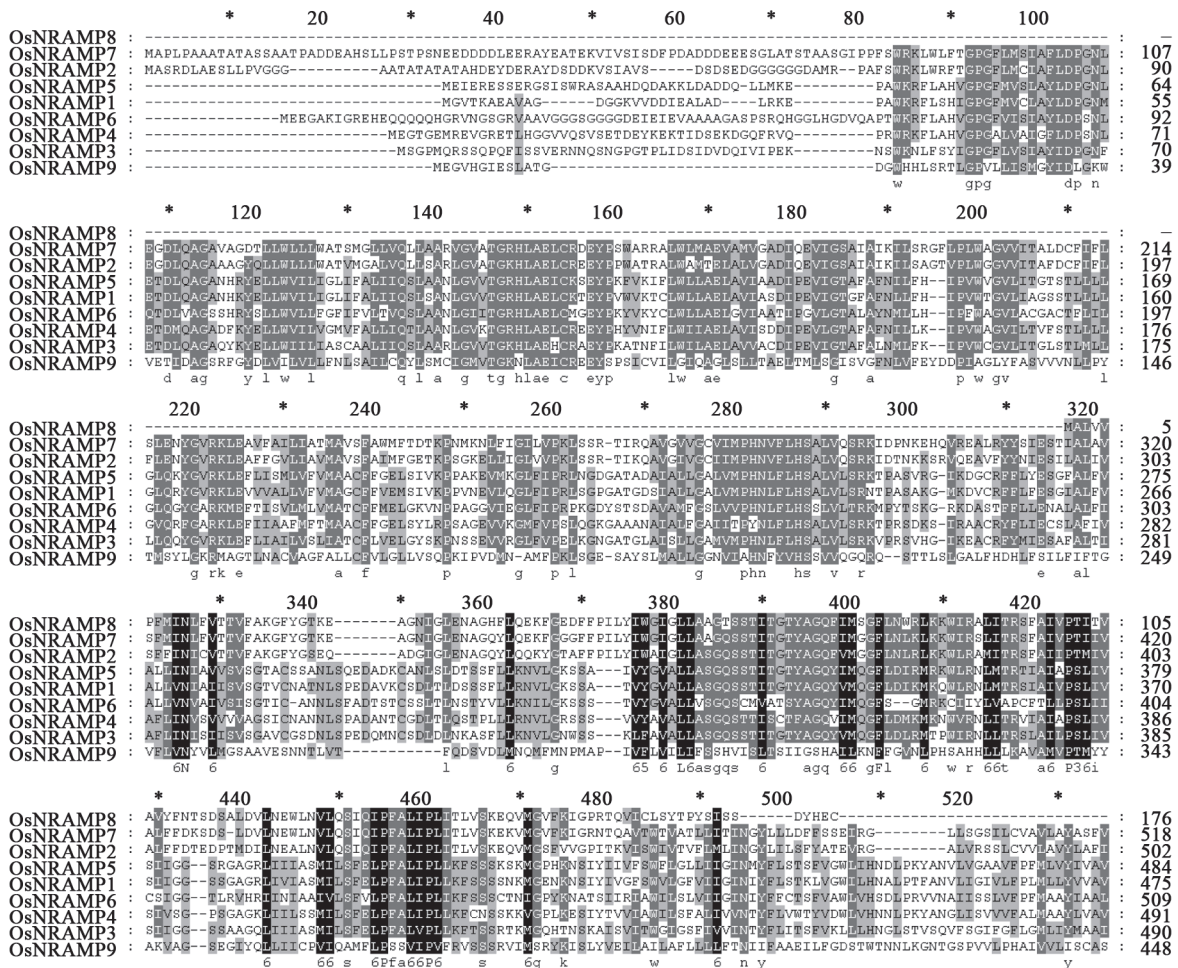


图1 水稻NRAMP基因家族编码的蛋白序列比对

Fig.1 Sequence alignment of proteins encoded by *OsNRAMP* family  
图中黑色区域代表100%的同源性, 灰色区域代表至少60%的同源性。

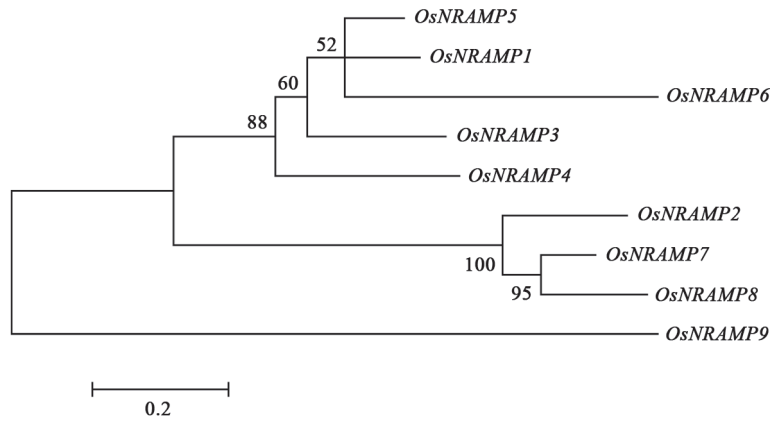


图2 水稻NRAMP基因家族的系统进化分析  
Fig.2 Phylogenetic analysis of *OsNRAMP* family

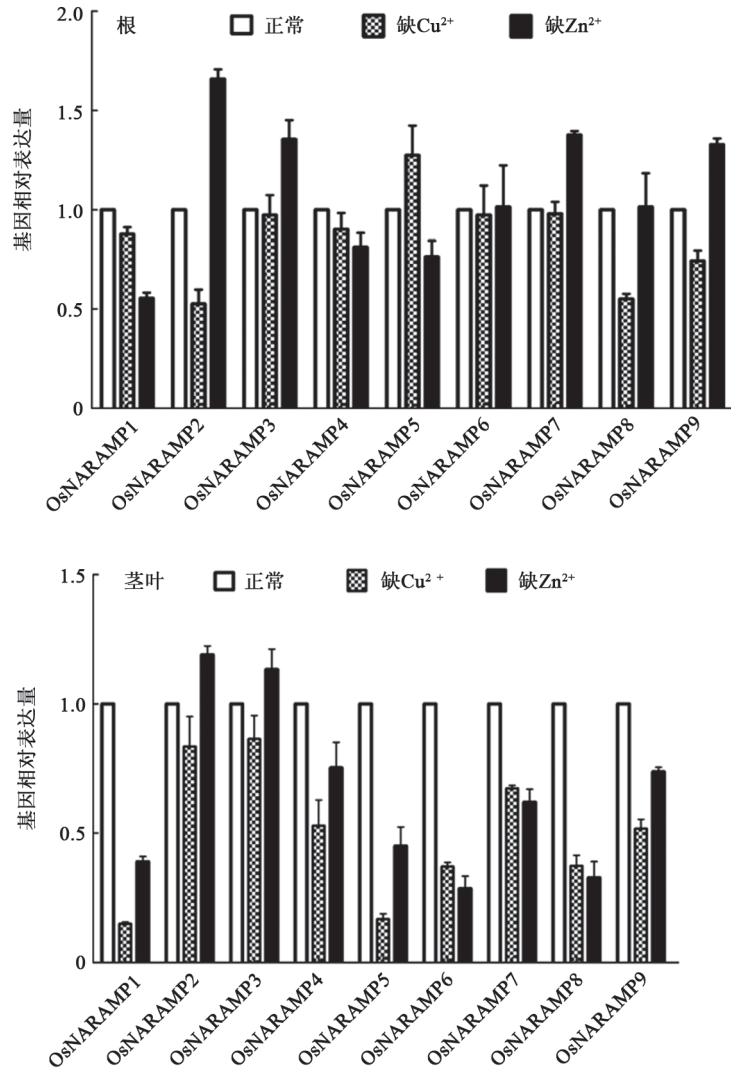


图3 缺Cu<sup>2+</sup>和缺Zn<sup>2+</sup>条件下不同*OsNRAMP*基因在水稻根和茎叶中的定量RT-PCR分析  
Fig.3 RT-PCR analysis of *OsNRAMP* genes in roots and shoots with deficiency of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>

*OsNRAMP2*和*OsNRAMP3*基因略有下降, 其他基因都明显下调, 其中*OsNRAMP1*和*OsNRAMP5*分别下调5.69倍和4.96倍。因此推测, *OsNRAMP5*很可能参与了根部Cu<sup>2+</sup>的吸收和转运, 而缺Cu<sup>2+</sup>条件下该基因在茎叶中的下调则可能与缺Cu<sup>2+</sup>时引起的其他金属离子的吸收与平衡有关, 即*OsNRAMP5*在水稻地上部分还可能参与了除Cu<sup>2+</sup>之外的其他金属离子的运输和分配。

在缺Zn<sup>2+</sup>条件下, *OsNRAMP2*、*OsNRAMP3*、*OsNRAMP7*和*OsNRAMP9*在根中都被上调, 其中以*OsNRAMP2*上调幅度最大; 而*OsNRAMP1*、*OsNRAMP4*和*OsNRAMP5*在根中则有所下调。而在茎叶中, 除了*OsNRAMP2*和*OsNRAMP3*有略微上调; 其他基因都表现出下调的趋势, 其中*OsNRAMP1*、*OsNRAMP6*和*OsNRAMP8*分别下调了2.57、3.57和3.05倍。因此, 在水稻*OsNRAMP*基因家族中, *OsNRAMP2*和*OsNRAMP3*参与Zn<sup>2+</sup>吸收转运的可能性比较大。

### 3 缺Cu<sup>2+</sup>和缺Zn<sup>2+</sup>条件下水稻根、茎叶中Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>含量的测定

从图4可见, 在缺Zn<sup>2+</sup>和缺Cu<sup>2+</sup>条件下, 水稻根中Fe<sup>2+</sup>的含量分别提高了26.9%和11.1%; 而茎叶中的则分别提高了24.6%和34.6%。缺Zn<sup>2+</sup>条件下, 水稻茎叶中Zn<sup>2+</sup>的含量没有显著变化, 而根中Zn<sup>2+</sup>的含量减少, 这说明Zn<sup>2+</sup>在水稻不同组织中的移动性比较强。在缺Zn<sup>2+</sup>条件下, 根中Mn<sup>2+</sup>含量明显降低, 幅度达43.3%, 而茎叶中Mn<sup>2+</sup>含量没有明显变化。缺Cu<sup>2+</sup>同样会影响植物对Zn<sup>2+</sup>的吸收, 在根和茎叶中Zn<sup>2+</sup>的含量分别下降57.1%和29.7%。缺Zn<sup>2+</sup>对Cu<sup>2+</sup>的吸收没有太大影响。这些结果说明, Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>这些植物中重要的金属元素在吸收转运中具有明显的互相影响。

缺铁条件能刺激Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>的增加(Cheng等2007; Ishimara等2007), 本文结果表明, 缺Cu<sup>2+</sup>和缺Zn<sup>2+</sup>处理也能刺激Fe<sup>2+</sup>的积累, 但却导致Mn<sup>2+</sup>吸收的下降。*OsNRAMP1*基因已经被证明参与Fe<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>的吸收, 它在缺Zn<sup>2+</sup>和缺Cu<sup>2+</sup>条件下的下调可能与Fe<sup>2+</sup>积累的反馈调控有关, 同时, 它的下调作用导致了Mn<sup>2+</sup>在根中吸收的减少(戚金亮等2003)。但在茎叶中, Mn<sup>2+</sup>的含量并没有显著降低, 暗示茎叶中Mn<sup>2+</sup>的吸收和平衡可能由另外的

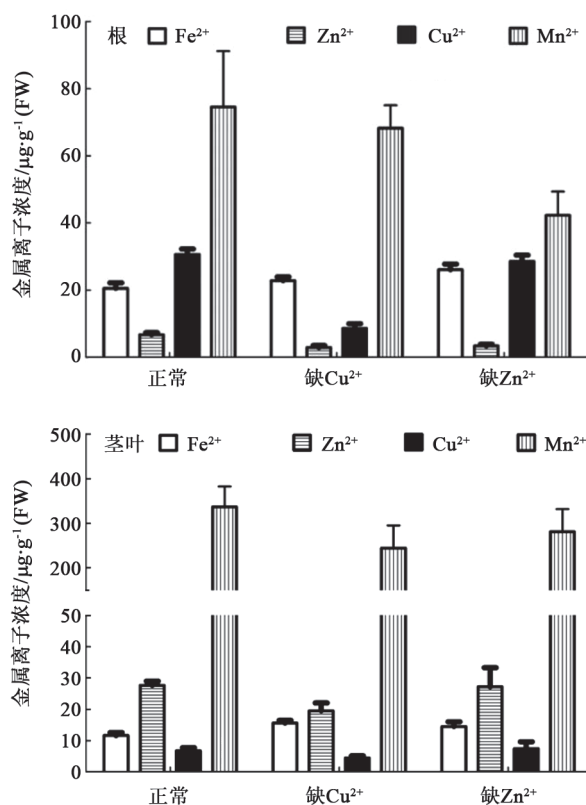


图4 缺Cu<sup>2+</sup>和缺Zn<sup>2+</sup>条件下水稻根和茎叶中Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>的含量

Fig.4 Contents of Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> in roots and shoots with deficiency of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>

基因控制, 而其他在茎叶中下调的基因是否参与了这个过程需要进一步的研究。另外一些*OsNRAMP*基因下调可能与茎叶中Fe<sup>2+</sup>积累的反馈作用有关。缺Cu<sup>2+</sup>条件下, Zn<sup>2+</sup>的吸收也被严重抑制, 这可能与缺Cu<sup>2+</sup>条件下根和茎叶中大量*OsNRAMP*基因的下调有一定的关系。正如拟南芥中*AtNRAMP3*和*AtNRAMP4*能调节Mn<sup>2+</sup>的平衡(Lanqua等2010), *AtNRAMP1*基因超表达转基因植株能提高其对Fe<sup>2+</sup>毒害的抗性(Curie等2000), 而*AtNRAMP6*则可能参与了Cd<sup>2+</sup>在植物细胞内的分配和平衡(Cailliatte等2009)。在水稻中, 不同*OsNRAMP*基因参与多个金属元素的吸收和转运; 并且, 在离子吸收和转运平衡方面发挥了更为重要的作用。

### 参考文献

戚金亮, 王忆, 印莉萍, 韩振海(2003). 与植物铁素营养相关的蛋白. 植物生理与通讯, 39 (3): 294-298

- Belouchi A, Kwan T, Gros P (1997). Cloning and characterization of the *OsNramp* family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Mol Biol*, 33: 1085~1092
- Cailliatte R, Lapeyre B, Briat JF, Mari S, Curie C (2009). The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem J*, 422: 217~228
- Cheng LJ, Wang F, Shou HX, Huang FL, Zheng LQ, He F, Daisei U, Zhao FJ, Ma JF, Wu P (2007). Mutation in nicotianamide aminotransferase stimulated Fe(II) acquisition system and led iron accumulation in rice. *Plant Physiol*, 145: 1647~1657
- Clemens S (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212: 475~486
- Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat JF (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J*, 347: 749~755
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388: 482~488
- Ishimaru Y, Kim S, Tsukamoto T, Oki H, Kobayash T, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2007). Mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil. *Proc Natl Acad Sci*, 104: 7373~7378
- Lanqua V, Ramos MS, Lelièvre F, Barbier-Brygoo H, Krieger-Liszkay A, Krämer U, Thomine S (2010). Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant Physiol*, 152: 1986~1999
- Nevo Y, Nelson N (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1763: 609~620
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK (2003). Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell*, 2003, 15: 1263~1280
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976). Laboratory manual for physiological studies of rice. The International Rice Research Institute, Manila, The Philippines
- Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF (2010). Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Acad Sci*, 107: 18381~18385