

研究报告 Original Papers

二色补血草液泡膜 H^+ -ATP 酶 C 亚基(LbVHA-C)基因克隆和表达分析

蒋丽丽, 杨传平, 徐晨曦, 马辉, 王玉成*

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 从二色补血草 cDNA 文库中分离出一个 V- H^+ -ATP 酶 C 亚基(LbVHA-C)基因全长 cDNA 序列。该基因全长为 729 bp。其中, 开放读码框(ORF)为 498 bp, 编码 165 个氨基酸, 预测编码蛋白的分子量为 16.6 kDa, 理论等电点为 8.62。用实时定量 RT-PCR 方法进一步研究二色补血草在 NaCl、NaHCO₃ 和 Na₂CO₃ 胁迫下的不同时间内该基因表达模式的结果表明, NaCl 强烈诱导二色补血草叶组织中 LbVHA-C 基因的表达, 但其根部的表达变化不明显。NaHCO₃ 胁迫下 LbVHA-C 基因在根部组织的表达受抑制。Na₂CO₃ 胁迫 24 h 时的 LbVHA-C 基因在根和叶部组织中的表达都强烈受抑制, 随后在根和叶组织的表达量逐步升高。

关键词: 二色补血草; V- H^+ -ATP 酶 C 亚基基因; 实时定量 RT-PCR; 基因表达

Cloning and Expression Analysis of LbVHA-C Gene from *Limonium bicolor* (Bunge) Kuntze

JIANG Li-Li, YANG Chuan-Ping, XU Chen-Xi, MA Hui, WANG Yu-Cheng*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: A novel vacuolar H^+ -ATPase gene (LbVHA-C) was cloned from a cDNA library of *Limonium bicolor*. Sequence analysis showed that the LbVHA-C gene was 729 bp in length, including 498 bp of open reading frame (ORF), and encodes a protein of 165 amino acids with a predicted molecular mass of 16.6 kDa and pI of 8.62. The expression of LbVHA-C gene of *L. bicolor* in response to NaCl, NaHCO₃ and Na₂CO₃ were investigated by real-time RT-PCR. The result showed that the expression of LbVHA-C gene was strongly induced by NaCl in leaves of *L. bicolor*, but not highly changed in roots. Under NaHCO₃ stress, the expression of LbVHA-C gene was inhibited in roots. And the expression of LbVHA-C gene were also strongly inhibited in both roots and leaves under Na₂CO₃ stress for 24 h, then the expression increased.

Key words: *Limonium bicolor*; vacuolar H^+ -ATPase gene (LbVHA-C); real time RT-PCR; gene expression

二色补血草又名付氏矾松、草原干枝梅, 是蓝雪科补血草属的二年生草本植物, 多生于滩地、湖盆、石质山坡、流动沙丘等干旱荒漠生境, 可在强的盐碱化(pH 值 8.5~9)土地上正常生长, 是一种泌盐植物, 有较强的抗旱和耐盐能力, 是碱化较严重地区的理想绿化植物, 不必改良土壤即可以直接种植(韩军丽和赵可夫 2001; 鲁丽丽等 2006)。此外, 膜质子泵是一种推动质子跨膜运动的 ATP 酶系统, 广泛存在于细胞中(王延枝和许献忠 1993)。迄今, 已知的膜质子泵 ATP 酶分为三类: 质膜上的 P-ATP 酶(plasma membrane H^+ -ATPase)、线粒体上的 F-ATP 酶(F-type ATP synthase)以及液泡膜上的 V-ATP 酶 (vacuolar H^+ -ATPase) (蔡惠罗 1994; 祝雄

伟等 1997)。C 亚基是目前 V- H^+ -ATP 酶中研究得最为广泛的亚基之一, 是 V- H^+ -ATP 酶 V₀ 域的组成部分, V- H^+ -ATP 酶可以水解 ATP 所释放出来的能量, 将 H^+ 泵到液泡中, 从而维持胞质中 pH 的平衡, 形成跨膜的电化学势梯度, 并参与质子通道的形成, 在驱动质子转运中起作用(Magnin 等 1995; Perera 等 1995)。V- H^+ -ATP 酶为细胞生理活动的正常进行, 以及各种离子和代谢物的转运提供必不可少的

收稿 2009-06-30 修定 2009-11-08

资助 黑龙江省青年科技专项(QC07C56)和教育部科学技术研究重点项目(107037)。

* 通讯作者(E-mail: wangyucheng1029@yahoo.com.cn; Tel: 0451-82190607)。

条件(Ratajczak 2000; 夏朝晖和陈珈1998), 因此, 其在生命活动中的功能日益引起人们的普遍关注(Magnin 等 1995; Zhang 等 2004)。

本文从二色补血草中克隆了一条V-H⁺-ATP酶基因, HMMTOP预测显示该蛋白共有4个跨膜螺旋区, 提示其在跨膜运输中起作用。用实时定量PCR技术研究了不同胁迫条件下该基因在二色补血草叶片及根部组织中的表达, 从而为进一步研究LbVHA-C基因的抗逆功能提供了基础资料。

材料与amp;方法

二色补血草[*Limonium bicolor* (Bunge) Kuntze]种子种植在温室的花盆中, 其生长基质为草炭土与沙(1:3), 温室的相对湿度为70%~75%, 平均温度24℃, 日平均光照时间14 h, 光照强度为340 μmol·m⁻²·s⁻¹。以二月龄的二色补血草幼苗为试材, 分别用0.2 mol·L⁻¹ NaCl、0.2 mol·L⁻¹ NaHCO₃和0.2 mol·L⁻¹ NaCO₃溶液浇灌进行胁迫处理, 同时以生长在正常条件下的二色补血草作为对照。在胁迫后0、6、12、24、48 h后, 每个处理至少取20株二色补血草的叶片和根部组织, 用双蒸水清洗, 充分混合后, 迅速置于液氮中冷冻, 并置于-70℃下保存, 供基因表达分析用。

以构建的0.4 mol·L⁻¹ NaHCO₃胁迫48 h下二色补血草叶组织的cDNA文库(Wang 等 2008), 通过对文库的随机测序和EST分析获得V-ATP酶C亚基(LbVHA-C)基因的全长cDNA序列。采用NCBI的开放阅读框寻找程序(ORF finder)确定该基因的开放阅读框, 用NCBI的Conserved Domains工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对蛋白的分子量和理论等电点进行在线计算(<http://us.expasy.org/tools/pitool.htm>)。用ProScale程序(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)预测蛋白的疏水性。利用HMMTOP软件预测该蛋白的跨膜区。通过BLASTX程序对NCBI的NR数据库进行同源性比对, 并对具有同源

性的不同植物来源的LbVHA-C蛋白用Clustal X1.83进行多序列比对。用Prosite软件在线分析该蛋白质的基本结构域。

采用CTAB法(王玉成等 2003)提取二色补血草总RNA, 并用DNA酶I (Promega)消化, 去除DNA。然后取5 μg总RNA, 加入2 μL 10×RT缓冲液、1 μL RNA酶抑制剂、1.5 μL oligd(T) (10 mmol·L⁻¹)、3 μL dNTP (10 mmol·L⁻¹)、2 U AMV反转录酶(杭州博日公司)、1 μL 9 bp随机引物(10 mmol·L⁻¹), 用水补足体积20 μL。反应程序为: 25℃ 5 min; 42℃ 60 min。将逆转录产物稀释10倍, 用作定量RT-PCR模板。

实时定量RT-PCR反应试剂盒为SYBR Green Realtime PCR Master mix (Toyobo Co., Ltd, Osaka, Japan)。反应体系为: 10 μL 2×SYBR Green Real-time PCR Master Mix、引物各0.3 μL (20 mmol·L⁻¹)、6.9 μL水、2.5 μL模板; 体积共20 μL。定量PCR反应条件为: 94℃预变性30 s; 94℃ 12 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 78.4℃读板1 s, 45个循环。然后在荧光定量PCR仪上完成RT-PCR。用18S rRNA (EU039827)和β-Tublin (EH793552)基因作为内参基因。引物(上海生物工程公司合成)序列见表1。用2^{-ΔΔCT}方法(Livak和Schmittgen 2001)进行基因的相对定量分析。

结果与amp;讨论

1 LbVHA-C基因全长cDNA的获得及序列分析

通过对二色补血草cDNA文库克隆的随机测序, 获得了二色补血草液泡膜H⁺-ATP酶C亚基基因(LbVHA-C)的cDNA序列(GenBank登录号GQ404375), 去除载体和polyA后该序列全长729 bp, 开放阅读框自158位的ATG起, 止于655位的TAA, 全长498 bp, 共编码165个氨基酸, 蛋白的分子量为16.6 kDa, 理论等电点为8.62。负电荷氨基酸总数(Asp+Glu)是7; 正电荷氨基酸总数(Arg+Lys)是9。

表1 实时定量PCR所用引物序列

Table 1 The primer sequences for real-time RT-PCR

引物名称	引物序列	
VHA-C	5' ATGTCTTCTACCTTCAGTGGCG 3'	5' CTTTGGTTGCTGGGCATTGG 3'
18S rRNA	5' CCGTCTTAGTTGGTGGAG 3'	5' CTCGTTGAATACATCAGTGTAG 3'
β-Tublin	5' GGTTGAGTGAGCAGTTTAC 3'	5' GATAACCAGACCACACCTTAGC 3'

2 LbVHA-C蛋白的疏水性预测

用 ProScale 程序预测蛋白的疏水性(图1)。可以看到, 1~160个氨基酸的区域共有5个较强的疏水区, 由此认为该蛋白为疏水蛋白, 属于膜蛋白。

3 LbVHA-C蛋白的跨膜区预测

以往的研究表明, V-H⁺-ATP酶C亚基是一个疏水亚基, 分子量约为16 kDa, 其2/3的氨基酸残基构成4个跨膜的 α 螺旋(Perera等1995)。与此相似, 本文用 HMMTOP 软件预测该蛋白的跨膜区的结果表明, 二色补血草 V-H⁺-ATP酶C亚基分别在氨基酸残基13~35、55~77、94~116和131~153之间共有4个跨膜 α 螺旋区(图2), 说明该蛋白具有典型的V-H⁺-ATP酶C亚基结构。

4 LbVHA-C蛋白序列的保守性分析

由于不同种属间V-H⁺-ATP酶C亚基的同源性大大超过了65%。因此, 认为它是目前已知的最为保守的膜蛋白(Perera等1995)。本文中, BlastX 同源性搜索, 在GenBank的Nr数据库中共有100个与其匹配的序列, 同源性都很高。随机选择的8个不同物种V-H⁺-ATP酶C亚基的氨基酸序列, 并用多序列联配程序[Clustalx (1.83)]对这9个物种的氨基酸序列进行多序列比对结果(图3)的表明, 二色补血草V-H⁺-ATP酶C亚基蛋白与其他8个物种的同源性很高, 最高的为100%, 最低的为95%, 而且氨基酸个数差别不大, 说明二色补血草V-H⁺-ATP酶C亚基氨基酸序列在进化上非常保守的。

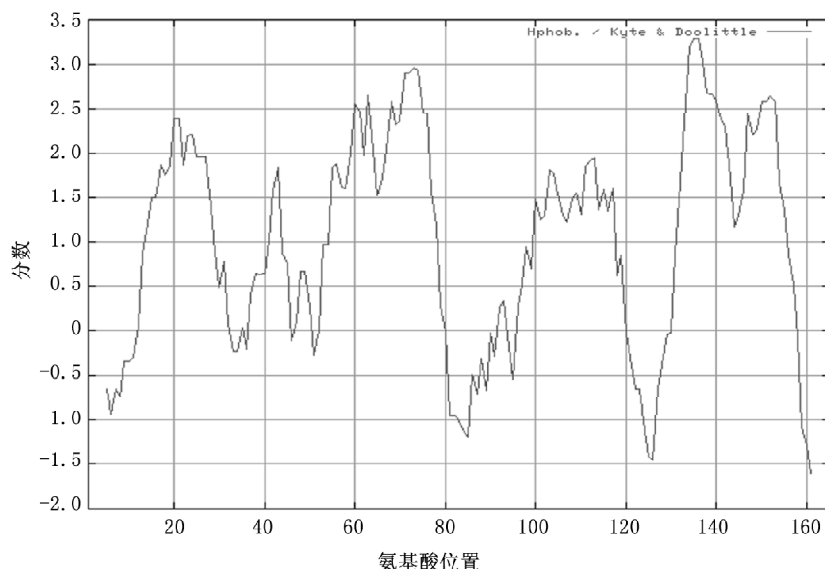


图1 二色补血草V-H⁺-ATP酶C亚基疏水性预测

Fig.1 Prediction of hydrophobic in V-H⁺-ATPase from *L. bicolor*

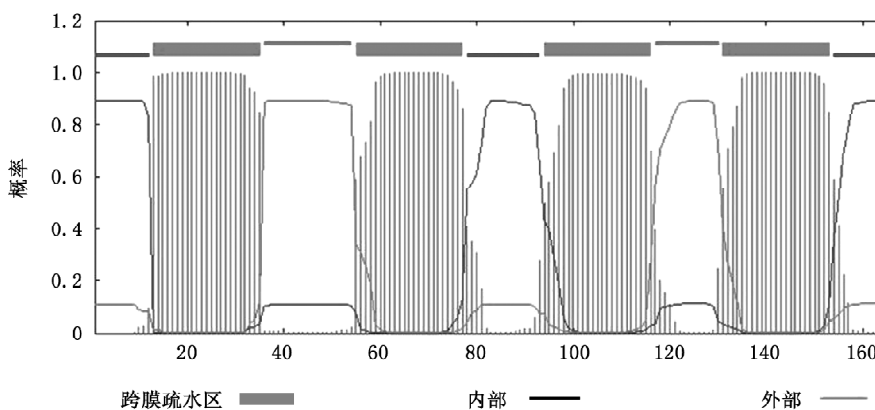
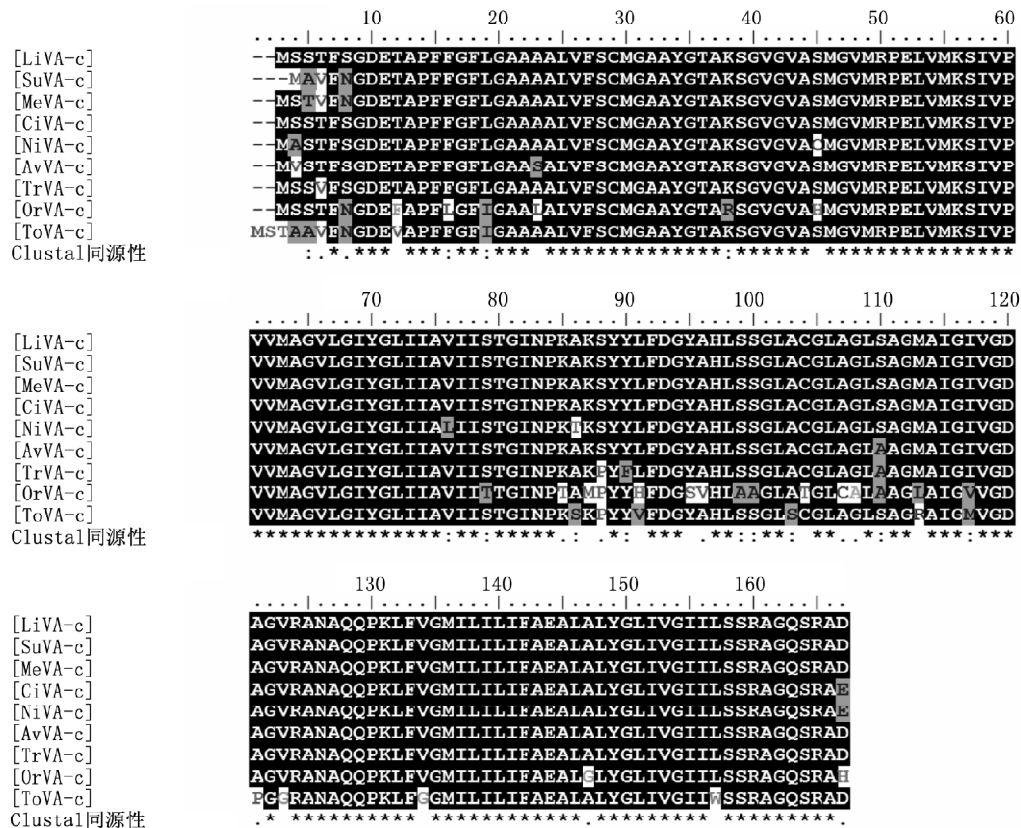


图2 二色补血草V-H⁺-ATP酶C亚基跨膜区预测

Fig.2 Predictability of transmembrane domain of V-H⁺-ATPase from *L. bicolor*

图3 9种植物V-H⁺-ATP酶C亚基蛋白的多序列比对Fig.3 Multiple sequence alignments of V-H⁺-ATPase protein from 9 plant species

LiVA-C: 二色补血草(*Limonium bicolor*); SuVA-C: 碱蓬(*Suaeda maritime*, 登录号 AAP15165); MeVA-C: 冰花(*Mesembryanthemum crystallinum*, 登录号 CAA64455); CiVA-C: 蜜柑(*Citrus unshiu*, 登录号 BAA75542); NiVA-C: 烟草(*Nicotiana tabacum*, 登录号 CAA65063); AvVA-C: 白骨壤(*Avicennia marina*, 登录号 AAK01292); TrVA-C: 小麦(*Triticum aestivum*, 登录号 ABG23316); OrVA-C: 水稻(*Oryza sativa*, 登录号 BAB63620); ToVA-C: 念珠藻(*Tortula ruralis*, 登录号 AAL09329)

5 LbVHA-C 基因应答盐碱胁迫的表达模式

以往的研究表明, V-H⁺-ATP酶C亚基是对逆境胁迫反应最敏感的亚基,在胁迫发生后, C亚基的数量以及其mRNA的水平都明显而迅速的增加,说明C亚基在植物响应逆境胁迫过程中具有举足轻重的作用(Tyagi等2005; Tsiantis等1996; Chen等2002)。在本文中,为了研究V-H⁺-ATP酶C亚基在NaCl、NaHCO₃、Na₂CO₃胁迫处理下二色补血草中的表达模式,我们进行了实时荧光定量RT-PCR,用18S rRNA和β-Tublin作内参,数据为3次重复的平均值(图4)。

总之,在NaCl胁迫的6~48 h内,叶组织中的LbVHA-C基因被强烈诱导,并在胁迫48 h内始终保持高的表达水平,是胁迫前的630~1782倍;而根部组织中,LbVHA-C基因的表达与胁迫前(0 h)的差异不大(图4-a)。这与Tsiantis等(1996)抗逆的

NaCl胁迫下,冰草(*Mesembryanthemum crystallinum*)的V-H⁺-ATP酶C亚基在叶片中受强烈诱导,并且该基因主要在叶片组织中表达。以及夏朝晖等(2000)等抗逆的高盐胁迫下,燕子掌(*Crassula argente*)的V-H⁺-ATP酶C亚基的蛋白表达量在叶片中显著增加的结果相似。据此可以推测其可能在植物耐盐中起作用。在NaHCO₃胁迫6 h, LbVHA-C基因的表达在叶片组织中受到轻微的抑制,并且在胁迫6~48 h内的表达量变化较小;但NaHCO₃胁迫使得该基因在根部组织中的表达受到强烈抑制(图4-b)。Na₂CO₃胁迫使LbVHA-C基因产生明显地差异表达。在Na₂CO₃胁迫12~24 h时,叶及根部的表达量均下降(图4-c)。因此说明,LbVHA-C基因可对NaCl、NaHCO₃和Na₂CO₃胁迫作出应答。因此认为,该基因可能与抗各种盐胁迫相关,在二色补血草抗逆胁迫中起作用。

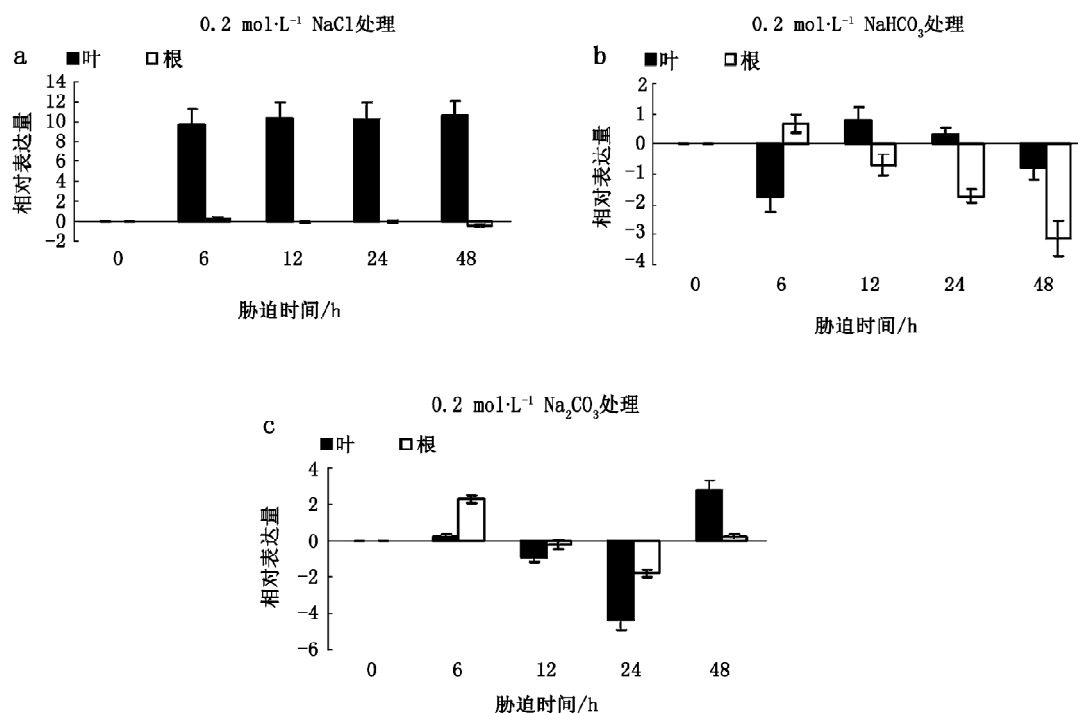


图4 实时定量RT-PCR分析二色补血草中V-H⁺-ATP酶C亚基基因在根、叶中的表达模式
Fig.4 The expression pattern of LbVHA-C gene in leaf and root of *L. bicolor* by real-time RT-PCR analysis

参考文献

- 蔡惠罗(1994). V型ATP酶的分子结构及其药理学意义. 生物化学与生物物理进展, 21 (5): 410~414
- 韩军丽, 赵可夫(2001). 植物盐腺的结构、功能和泌盐机理的探讨. 山东师范大学学报(自然科学版), 2: 75~79
- 鲁丽丽, 刘耕, 李君等(2006). 外源GSH对NaCl胁迫下二色补血草盐害缓冲机理的研究. 山东师范大学学报(自然科学版), 21 (2): 108~111
- 王延枝, 许献忠(1993). 空泡膜类型的V-ATPase的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 20 (1): 19~23
- 王玉成, 薄海侠, 杨传平(2003). 胡杨、柽柳总RNA提取方法的建立. 东北林业大学学报, 31 (5): 99~100
- 夏朝晖, 陈珈(1998). 胁迫反应中的液泡膜H⁺-ATPase. 植物生理学通讯, 34 (3): 168~174
- 夏朝晖, 李晓薇, 余和芬(2000). 盐和干旱胁迫对燕子掌(*Crassula argente* Thunb.)叶片液泡膜H⁺-ATPase活性的影响. 植物生理学报, 26 (5): 433~36
- 祝雄伟, 丁小强, 李如亮, 王延枝(1997). 大豆液泡膜H⁺-ATPase泵质子活性的研究. 生物物理学报, 13 (4): 556~562
- Chen X, Kanokporn T, Zeng Q, Wilkins TA, Wood AJ (2002). Characterization of the V-type H⁺-ATPase in the resurrection plant *Tortula ruralis*: accumulation and polysomal recruitment of the proteolipid c subunit in response to salt-stress. *J Exp Bot*, 53 (367): 225~232
- Magnin T, Fraichard A, Trossat C, Pugin A (1995). The tonoplast H⁺-ATPase of *Acer pseudoplatanus* is a vacuolar-type

- ATPase that operates with a phosphoenzyme intermediate. *Plant Physiol*, 109: 285~292
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} method. *Methods*, 25: 402~408
- Perera IY, Li X, Sze H (1995). Several distinct genes encode nearly identical 16 KDa proteolipids of the vacuolar H⁺-ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Bio*, 29: 227~244
- Ratajczak R (2000). Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. *Biochim Biophys Acta*, 1465: 17~36
- Tsiantis MS, Bartholomew DM, Smith JAC (1996). Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H⁺-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J*, 9: 729~736
- Tyagi W, Rajagopal D, Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK (2005). Cloning, and regulation of a stress-regulated *Pennisetum glaucum* vacuolar ATPase c gene and characterization of its promoter that is expressed in shoot hairs and floral organs. *Plant Cell Physiol*, 46 (8): 1411~1422.
- Wang Y, Ma H, Liu G, Zhang D, Ban Q, Zhang G, Xu C, Yang C (2008). Generation and analysis of expressed sequence tags from a NaHCO₃-treated *Limonium bicolor* cDNA library. *Plant Physio Biochem*, 46 (11): 977~986
- Zhang WH, YU BJ, CHEN Qin, LIU YL (2004). Tonoplast H⁺-ATPase activity in barley roots is regulated by ATP and pyrophosphate contents under NaCl stress. *J Plant Physiol Mol Bio*, 30 (1): 45~52