

红树林植物木榄水通道基因的克隆和表达

祝艺懿¹, 韩渊怀¹, 李正国¹, 陈国平¹, Donald Grierson², 殷幼平^{1,*}

¹重庆大学生物工程学院基因工程研究中心, 重庆市高校功能基因及调控技术重点实验室, 重庆 400044; ²Plant Sciences Division, University of Nottingham, Britain

摘要: 根据植物水通道基因保守区设计简并引物, 采用 RT-PCR 方法, 从木榄树叶中分离出水通道基因的 cDNA 片段; 3' RACE 获得 3' 端 cDNA 序列; 再经 5' RACE 获得 5' 端部分 cDNA 序列, 命名为 *PIP2*, GenBank 登录号为 EF126757。该基因全长 843 个碱基, 编码 281 个氨基酸, 具有典型的植物水通道基因结构。该基因编码的蛋白质与含羞草(*PIP2;5*)、欧洲葡萄(*PIP*)、拟南芥(*PIP3*)等水通道蛋白的同源性分别为 90%、91%、88%。Northern 杂交分析表明, 该基因在木榄树不同器官中的表达差异明显: 根部有较高的表达水平, 茎部较弱, 而在叶中只能检测到微弱的信号。

关键词: 木榄; 水通道基因; NPA 盒; 基因表达

Cloning and Expression of a New Aquaporin Gene from *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam

ZHU Yi-Yi¹, HAN Yuan-Huai¹, LI Zheng-Guo¹, CHEN Guo-Ping¹, Donald Grierson², YIN You-Ping^{1,*}

¹Key Laboratory of Functional Gene and Regulation Technologies, Chongqing Municipal Education Commission, Genetic Engineering Research Center, College of Bio-Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; ²Plant Sciences Division, University of Nottingham, Britain

Abstract: The aquaporin (AQP) gene of *Bruguiera gymnorhiza*, named *PIP2* (plasma membrane intrinsic protein 2), was cloned from leaf by the methods of RT-PCR, 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) and 5' RACE using degenerate primers designed according to the conserved region of aquaporin protein family. GenBank accession number was EF126757. This gene contained an open reading frame (ORF) of 843 bp coding a polypeptide 281 amino acids. The predicted amino acid sequence of *PIP2* show 90% sequence identity to AQP *PIP2;5* (*Mimosa pudica*), 91% to *PIP* (*Vitis vinifera*), 88% to *PIP3* (*Arabidopsis thaliana*), respectively. Northern-hybridization showed that the expression of *PIP2* was significantly different in different organs. The transcription level of *PIP2* in root was significantly higher than that in stem and leaf, respectively.

Key words: *Bruguiera gymnorhiza*; aquaporin gene; NPA-box; gene expression

植物水通道蛋白(aquaporin, AQP)在植物体内形成水选择性通道, 在植物种子萌发、细胞生长、气孔运动、受精等过程中调节水分的快速跨膜运输, 有些水通道蛋白还在植物逆境应答中起作用(于秋菊等 2002)。根据水通道蛋白的亚细胞定位, 结合序列同源性, 所有植物的水通道蛋白均分为质膜上质膜内蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)、液泡膜上液泡膜内蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIPs)及类结瘤蛋白(nodulin-like MIPs, NLMs)三大类(张军锋等 2002)。此外, Chaumont 等(2001)研究玉米膜内蛋白(membrane intrinsic proteins, MIPs)结构与分类时, 发现一类新的 MIP, 即 SIP。其序列与 PIP 和 MIP 相似, 但在细胞中的定位和功能了解较

少。水通道蛋白家族具有保守的结构模式, 含有 6 个跨膜的螺旋区和 2 个膜内区, 其 N 端和 C 端都在胞内, 水通道蛋白具有其特定的特征基序 NPA (NPG), 该基序被认为与水通道蛋白的功能密切相关(Park 和 Saier 1996)。植物水通道蛋白广泛分布于各种组织和器官, 存在于发育的各个时期, 暗示它在整个生命活动中的地位重要。

木榄属于红树科木榄属, 生长于热带和亚热带陆海交汇的海湾河口潮间带。它在维护海岸生态平衡, 防风减灾, 护堤保岸, 环境污染监测、

收稿 2007-01-04 修定 2007-05-08

* 通讯作者(E-mail: yinyouping@cqu.edu.cn; Tel: 023-65120489)。

净化与防治中均起作用。近10年中,对红树林植物的研究主要集中在生理和生态特点上,作为一种生长在高盐、高渗透压下的盐生木本植物,有关木榄水通道基因表达分析的报道几乎没有。本文采用cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE),从木榄叶中克隆出一个水通道基因,命名为 *PIP2* (plasma membrane intrinsic protein 2),并用 Northern 杂交方法对其在各部位表达情况作了检测,现报道如下。

材料与方法

木榄 [*Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam] 采自福建龙海浮宫(24°24')红树林自然保护区,摘取同一母树上发育良好、无病虫害和机械损伤的叶、嫩茎、主根和侧根,液氮处理后,于-80℃下冻存备用。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株为 JM109。质粒载体为 pMD18-T Vector, 衍生自 pUC18, 用于 PCR 产物的 T/A 克隆[宝生物工程(大连)有限公司]。

总 RNA 的提取采用 CTAB-LiCl 法(方孝东等 1998), 稀释 50 倍后, 用岛津 4500 分光光度计测其 230、260 和 280 nm 处的 OD 值, 并取 2 μL 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取质量。

根据 GenBank 中登录的其他植物水通道蛋白基因保守序列设计简并引物: 引物 S, 5' CTT-GTTTACTGCACTGCYGGHAT 3'; 引物 A, 5' CCCAGAADATCCANTGDTCCATCCCA 3'。用 M-MLV 反转录酶进行反转录。然后以反转录液为模板, 用引物 S 和引物 A 进行 PCR 反应, 反应条件为: 94℃ 5 min 预变性后, 94℃ 30 s、52℃ 30 s、72℃ 30 s 循环 30 次, 72℃ 延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收 478 bp 简并引物合成片段, 克隆到 pMD18-T Vector, 测序(上海英骏生物技术公司)。

获取 3'端 cDNA 片段时, 取 1~2 μg 木榄幼叶总 RNA, 用引物 Z₉ (5' TGGATCCGCTG-AAACTCTAGGT₉ 3', 包含有 *Bam*HI 酶切位点的 PolyT 引物)反转录合成 cDNA 第一条链, 以此链为模板进行 PCR 扩增。5'端引物为 i-F: 5' TCCGCTACCGATCCCAAG 3'; 3'端引物为 Z₁₀: 5' TGGATCCGCTGAAACTCTAGGT 3'。PCR 条

件为: 94℃ 5 min 预变性后, 94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 45 s 循环 30 次, 72℃ 终延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收 546 bp 3'端延伸片段, 克隆到 pMD18-T Vector, 测序(上海英骏生物技术公司)。

5'端 cDNA 片段获取, 采用 TaKaRa 公司 5'-Full RACE Core Set 试剂盒, 以木榄幼叶总 RNA 为模板, 以 5'端磷酸化的 RT 引物(5' pCAGAAGATCCATTG 3')反转录合成 cDNA 的第一条链, 然后用 RNase 酶除去 RNA, 用 RNA 连接酶形成首尾连接物。第一次 PCR 用基因特异的内引物 S₁ (5' TGCCCTTGTTGTAGCCAG 3')和 A₁ (5' TCCGCTACCGATCCCAAG 3')扩增。取第一次 PCR 反应产物, 分别稀释 10 和 100 倍作为模板, 以基因特异引物 S₂ (5' CAAGAATAAGCCG-AAAGTGA 3')和 A₂ (5' TCCACAACAATGACAAAAT 3')扩增, 回收 394 bp 5'端延伸片段, 克隆到 pMD18-T Vector, 测序(上海英骏生物技术公司)。

Northern 杂交时, 取 -80℃ 下冻存的叶、嫩茎、主根及侧根样品, 均按 1.2 的方法分别抽提其总 RNA, 各取 20 μg 上样, 经甲醛凝胶电泳后, 用毛细管转移法转移至尼龙膜上, 将简并引物合成的 DNA 片段以 ³²P 进行标记, 制备探针进行分子杂交。杂交程序按 Sambrook 等(1996)书中的方法进行。

结果与讨论

1 全序列分析

序列(图 1)分析表明, 该片段全长 1068 bp, 包含一个 843 bp 完整开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码 281 个氨基酸。5'端非编码区和 3'端非编码区分别为 24 和 201 bp。从起始氨基酸甲硫氨酸(M)开始, 在第 100 和 221 氨基酸处发现 2 个 NPA 盒, 在 90 和 95 氨基酸处分别存在对汞敏感氨基酸 Cys-90 和水通道基因高度保守序列 SGXHXNPAVT。

2 同源性分析

将推测的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast X 搜索, 发现它属于 *PIP* 基因亚家族 II 类, 与含羞草(*Mimosa pudica*, PIP2;5, BAD90701)、欧洲

```

1   AGACAGAGAACTGCTATAACATTTATGGCAAAGGAAGTGAGTGAGGAGGGGCATGCCCCC
1   R Q R T A I T F M A K E V S E E G H A P
61  CATGGAAGGACTACGTAGATCCACCACCGCACCCTGATCGACTGGGCTGAGCTCAAG
21  H G K D Y V D P P P A P L I D W A E V K
121 CTCTGGTCTTCTACAGGGCTGTCATAGCCGAGTTCATTGCTACCCTGCTCTCCTCTAC
41  L W S F Y R A V I A E F I A T L L F L Y
181 GTCCTATTGCTACTGTTATCGGCCACAAGAAGCAAACCGGGCTTGTGATGGCGTTGGC
61  V T I A T V I G H K K Q T G P C D G V G
241 CTTCTGGGTATTGCATGGGCATTTGGTGGCATGATCTTTATCCTCGTCTACTGCACTGCT
81  L L G I A W A F G G M I F I L V Y C T A
301 GGCATCTCTGGTGGTCATATTAACCCCTGCAGTCACTTTCGGCTTATCTTGGCCCGGAAA
101 G I S G G H I N P A V T F G L F L A R K
361 GTGTCCTCATCAGGGCCCTGGCTTACATGGTTGCCAGTCTGGGTGCTATATGCGGT
121 V S L I R A L A Y M V A Q C L G A I C G
421 GTGGGCTTGGTCAAGGCTTTATGAAGCATTCCTACAACCTTTGGGCGGTGGTCCAAC
141 V G L V K A F M K H S Y N S L G G G A N
481 TTTGTAATGCTGGCTACAACAAGGCCACAGCTTTGGGTGCTGAGATTATGGCACCTTT
161 F V N A G Y N K G T A L G A E I I G T F
541 GTGCTTGTCTACACTGTTTTCTCCGCTACCGATCCCAAGAGGAGCGCCGGGATTCTCAT
181 V L V Y T V F S A T D P K R S A R D S H
601 GTCCCGTGTGGCTCCCTTCTATTGGATTTGCGGTGTTTCATGGTCCATTGGCCACG
201 V P V L A P L P I G F A V F M V H L A T
661 ATCCCCATAACTGGAATCAACCCCGCAAGGAGCTTTGGTGTGCTGTCATCCAC
221 I P I T G T G I N P A R S F G A A V I H
721 ACAATGACAAAATCTGGGATGATCAATGGATCTTCTGGCTTGGACCATTGTGGAGCA
241 N N D K I W D D Q W I F W V G P F V G A
781 CTCGGGCAGCTGCGTACCACCAGTACATACTGAGAGCAGCAGCGATCAAGGCTTTGGGA
261 L A A A A Y H Q Y I L R A A A I K A L G
841 TCTTCCGAGCAACCGCTCCAACAAAGGAAAACAAAAGGCTGTCTTACCCCTCTACT
281 S F R S N R S N * G K Q K A V F T P S T
901 TTTCTATTGGTTCTTTGTGTATGAGAGGATTGTTATGATCCATCTTTTCTATCT
301 F L Y W F L C V Y E R I V M I H L F L S
961 TCTTTTAACTTTTCATATCTTTTGTATTATAATTAATATCTTTATTGGCTAGTT
321 S F L T F H I F L F I I I * Y L Y W L V
1021 TGGCTGTGTAACAATCATATTGCAATTGAGTAGTTAATATCTTTCTAAAAA
341 W L C N N H H C N * V V N I F L
1081 AAAAACCTAGAGTTTCAGCGGATCCA

```

图1 木榄 *PIP2* 基因 cDNA 核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence of *B. gymnorhiza-PIP2* cDNA and deduced amino acid sequence
下划线表示引物位置, 阴影部分表示汞敏感氨基酸 Cys 和 NPA-box, 虚线下划线表示水通道基因高度保守区。

葡萄(*Vitis vinifera*, PIP, ABH09327)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, PIP3, NP195236)氨基酸水平的同源性分别为 90%、91%、88%。同源性比较结果表明, 这几类物种该基因的 NPA 盒、汞敏感 Cys 残基、高度保守序列都处于相同或相

近位置。该基因已命名为 *PIP2* 并提交 GenBank, 登录号为 EF126757。结果见图 2。

3 木榄不同器官中 *PIP2* 基因的表达

提取木榄叶、嫩茎、主根及侧根样品的总 RNA, 以 ^{32}P 标记简并引物合成的 DNA 片段为探

木榄	MSKEVSEEGHAP..HGKDYVDPPPAPLIDWAELRLWAFVRAVIAEFATLL	49
含羞草	MSKEVSEEGQTQHHGKDYVDPPPAPLIDMAELRLWAFVRAVIAEFATLL	50
欧洲葡萄	MSKEVSEEGQS..HGKDYVDPPPAPLIDIAEIKLWAFVRAVIAEFATLL	48
拟南芥	MSKEVSEEGKTH.HGKDYVDPPPAPLIDMCFLKSWAFVRAVIAEFATLL	49
Consensus	m kevseeg hgkdyvdpppapl d e w fyra iaefiatll	
木榄	FLYVTTATVIGIKKQTCPCDGVGLLGTAWAFGGMIFVLVYCTAGTSGGHI	99
含羞草	FLYITVATVIGIKKQSCPCDGVGLLGTAWAFGGMIFVLVYCTAGTSGGHI	100
欧洲葡萄	FLYITVATVIGIKKQSDPCCGVGLLGTAWAFGGMIFVLVYCTAGTSGGHI	98
拟南芥	FLYVTTATVIGIKKQTCPCDGVGLLGTAWAFGGMIFVLVYCTAGTSGGHI	99
Consensus	fly t atvig kkq pc gvgl lg aw fggmif lvyctagisgghi	
木榄	NPAVTFGLFLARKVSLIRALAYMVAQCLGATCGVGLVKAFMKHSYNSLGG	149
含羞草	NPAVTFGLFLARKVSLIRALAYMVAQCLGATCGTGLVKAFMKHSYNSLGG	150
欧洲葡萄	NPAVTFGLFLARKVSLIRALAYMVAQCLGATCGVGLVKAFMKSFYNSLGG	148
拟南芥	NPAVTFGLFLARKVSLIRALAYMVAQCLGATCGVGLVKAFMKTFYNSLGG	149
Consensus	npavtfglflarkvsl ral ay m aqclgaicg g vkafmk yn lgg	
木榄	GANFVNAGYNKGTALGAEIIGTFVLVYTVFSAIDPKRSARDSHIPVLAPL	199
含羞草	GANEVNSGYSKGTALGAEIIGTFVLVYTVFSAIDPKRSARDSHIPVLAPL	200
欧洲葡萄	GANSVAAGYNKGTALGAEIIGTFVLVYTVFSAIDPKRSARDSHIPVLAPL	198
拟南芥	GANTVADGYSKGTALGAEIIGTFVLVYTVFSAIDPKRSARDSHIPVLAPL	199
Consensus	gan v gy kgtalgaeeigtflvlytvfisa dpkrsardsh pvlapl	
木榄	PIGFVAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIMNNEKAWDDWIFWVGPF	249
含羞草	PIGFVAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIMNNEKAWDDWIFWVGPF	250
欧洲葡萄	PIGFVAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIMNNEKAWDDWIFWVGPF	248
拟南芥	PIGFVAVFMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIMNNEKAWDDWIFWVGPF	249
Consensus	pigfavfmvhlatispitgtginparsfgaavi nn k wdd wifwvgpf	
木榄	VGALAAAAYHQYILRAAIAIKALGSFRSNRS	279
含羞草	VGALAAAAYHQYILRAAIAIKALGSFRSNPT	280
欧洲葡萄	VGALAAAAYHQYILRAAIAIKALGSFRSNPT	278
拟南芥	VGALAAAAYHQYILRAAIAIKALGSFRSNAT	279
Consensus	galaaaayhqyilraa aikalg sfrsn	

图2 木榄 *PIP2* 基因与其他物种 *PIP* 基因氨基酸序列比较

Fig.2 Amino acid sequence alignment of *B. gymnorhiza-PIP2* and *PIP* from other plants

黑色背景表示序列一致的氨基酸残基, 灰色背景表示序列保守的氨基酸残基。

针, 进行Northern分析, 结果如图3所示。
在总RNA量基本一致的情况下, 木榄侧根和

主根中 *PIP2* 基因的Northern检测信号差异不大,
但明显强于嫩茎和叶。

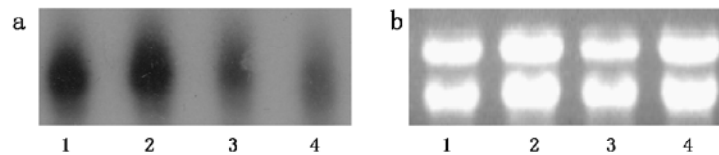


图3 木榄 *PIP2* 基因在不同器官中的表达

Fig.3 The expression of *B. gymnorhiza-PIP2* in different organs

a: Northern 杂交; b: 总RNA电泳。1: 主根; 2: 侧根; 3: 嫩茎; 4: 叶。

讨论

在植物中, 水通道蛋白直接参与根部水分吸收及整个植物的水平衡。由于水通道蛋白的存在, 细胞才可以快速调节自身体积和内部渗透压。由此可见, 水通道蛋白对于生命活动至关重要。

本文从红树植物木榄叶中克隆出一个全长水通道基因, 通过同源性比对, 该基因属于PIP亚家族II类。大多数水通道蛋白均有一个对汞敏感的残基Cys, 位于氨基酸序列的189位, 其临近的NPA盒结合汞后水孔受阻塞(Maurel 1997)。在

本文推导的氨基酸序列中,对汞敏感残基位置为 Cys-90。据 Daniels 等(1996)报道,拟南芥 Δ -72P 及 γ -TIP 的对汞敏感残基分别变为 Cys-116、Cys-118,这些残基位于跨膜区对汞敏感的位点上。这说明,尽管水通道蛋白的 N 端次要氨基酸残基有变化,但并不影响其功能与特性。

高等植物的根是进行水分运输的主要器官。在几乎所有的根细胞中都发现了水通道蛋白,因此水通道蛋白在根吸收水分的功能中可能起作用。本文中,*PIP2* 基因在根中的 Northern 检测信号明显强于嫩茎和叶中。Quigley 等(2001)在研究模式植物拟南芥水通道蛋白基因家族的基础上,认为水通道基因家族的各个成员都有其各自的表达模式,大部分基因在 2 个以上组织中表达,但也有少数基因表现为组织特异性或组织优势表达,其中含有根中优势表达基因(*PIP2;2*、*PIP2;4* 和 *TIP1;2*、*TIP2;2* 等)。针对植物水通道蛋白基因在根中特异表达的研究,我们认为水通道蛋白参与水分吸收和转运过程的分子机制,乃至揭示植物根的发生、分化和发育机制应是今后值得探讨的课题。

参考文献

- 方孝东, 吴多贵, 林栖, 李冠一(1998). 一种适用于盐生植物的 RNA 提取方法. 海南大学学报自然科学版, 16 (4): 311~313
- 于秋菊, 吴铸, 林忠平, 李景富(2002). 植物水孔蛋白研究进展. 北京大学学报, 38 (6): 855~866
- 张军锋, 邓西平, 慕小倩(2002). 植物的水通道蛋白. 植物生理学通讯, 38 (1): 88~91
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol*, 125: 1206~1215
- Daniels MJ, Chaumont F, Mirkov TE, Chrispeels MJ (1996). Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell*, 8: 587~599
- Maurel C (1997). Aquaporin and water permeability of plant membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 399~429
- Park JH, Saier MH Jr (1996). Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol*, 153: 171~180
- Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y, Bohnert HJ (2001). From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol*, 3: 1~17
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis J (1996). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Laboratory, 150~310