

百脉根液泡膜 H⁺-PPase 基因的 cDNA 克隆与分析

孙艳香¹, 王勇^{2,*}

¹ 廊坊师范学院生物系, 河北廊坊 065000; ² 南开大学生命科学学院, 天津 300071

摘要: 采用 EST 电子克隆和 RACE 技术从豆科模式植物百脉根中克隆到一个液泡膜 H⁺-PPase 基因的 cDNA, 命名为 *LcVPI*。该 cDNA 长为 2 962 bp, 含 2 304 bp 的完整开放阅读框, 编码 767 个氨基酸, 其推测的氨基酸序列与绿豆、拟南芥等 I 类液泡膜 H⁺-PPase 的氨基酸序列同源性在 80% 以上, 且有很高的功能区段保守性。该 cDNA 序列已提交 GenBank, 登录号为 EF440187。半定量 RT-PCR 表明, *LcVPI* 在根、茎、叶中的表达不同, 叶中表达最多, 茎中最少。

关键词: 百脉根; 液泡膜 H⁺-PPase; *LcVPI*

Cloning and Analysis of cDNA Encoding a Tonoplast H⁺-PPase from *Lotus corniculatus* L.

SUN Yan-Xiang¹, WANG Yong^{2,*}

¹Department of Biology, Teachers College of Langfang, Langfang, Hebei 065000, China; ²College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: A tonoplast H⁺-PPase cDNA, named *LcVPI*, was cloned from a model legume *Lotus corniculatus* L. by EST *in silico* cloning and RACE. The cDNA contained 2 962 bp with an open reading frame (ORF) of 2 304 bp and encodes 767 amino acids. The deduced amino acid sequence showed more than 80% similarity to homologues from other plants such as *Vigna radiata* and *Arabidopsis thaliana*, and highly conserved functional domains of the gene class. This cDNA has been registered in GenBank with accession number EF440187. Semiquantitative RT-PCR analysis indicated that *LcVPI* expressions were different in roots, stems and leaves, and richer in leaves, poor in stems.

Key words: *Lotus corniculatus* L.; tonoplast H⁺-PPase; *LcVPI*

液泡膜 H⁺-PPase, 又称液泡膜 H⁺ 转运无机焦磷酸酶(H⁺-pyrophosphatase, H⁺-PPase, EC3.6.1.1), 是一种广泛存在于植物、少数藻类、原生动物、细菌以及原始细菌中的独特的H⁺转运酶(Maeshima 2000; Drozdowicz 和 Rea 2001)。在液泡膜上, 液泡膜 H⁺-PPase 能将 PPi 水解为 2 个 Pi, 不仅削弱 PPi 浓度过高对胞质中生物大分子合成的影响, 还可用 PPi 水解产生的自由能, 催化 H⁺ 由胞质向液泡的运输, 与液泡膜 H⁺-ATPase 一起建立跨液泡膜质子驱动力, 为各种溶质分子(如阳离子、阴离子、氨基酸和糖类等)的跨液泡膜主动运输提供驱动力(Buchanan 等 2000; Blumwald 1987; 包爱科等 2006)。自 1975 年 Karlsson 在甜菜(*Beta vulgaris*)根部匀浆中首次发现 K⁺ 激活的 H⁺-PPase 以来, 近年来的生理生化以及分子生物学研究证明其不仅在植物细胞抗缺氧胁迫、冷胁迫、干旱和盐胁迫过程中起作用, 而且与生长素的极性运

输相关(王延枝 1990; 赵利辉和刘友良 1999; 王宝山和邹琦 2000; Karlsson 1975; Maeshima 2000; Gaxiola 等 1999; Li 等 2005)。迄今, 人们已成功地从多种植物中分离到液泡膜 H⁺-PPase 的 cDNA (Sarafian 等 1992; Tanaka 等 1993; Sakakibara 等 1996; Nakanishi 和 Maeshima 1998; Fukuda 等 2004; Brini 等 2005; Gao 等 2006), 其中一些已通过基因工程手段用于植物抗盐和耐旱能力的改良研究并取得显著效果(Gaxiola 等 2001; Park 等 2005; Gao 等 2006)。

百脉根为一种世界范围内广泛种植的多年生豆科牧草, 在西方国家还经常作为路旁和庭院观

收稿 2007-03-05 修定 2007-06-19

资助 廊坊师范学院博士专项基金项目(LSZB200603)和天津市科技厅项目(043123711)。

* 通讯作者(E-mail: wangyong@nankai.edu.cn; Tel: 022-23504382)。

赏植物。因其具有基因组小、植株再生容易以及易于遗传转化等特点,近几年已用来作为豆科中的模式植物进行分子生物学研究(Jiang和Gresshoff 1997)。至今尚未见关于百脉根中液泡膜 H^+ -PPase的报道。本文通过EST电子克隆并结合RACE技术扩增到百脉根液泡膜 H^+ -PPase基因cDNA序列,定名为*LcVPI*,并对该基因表达产物的特征进行了预测分析。

材料与方 法

百脉根(*Lotus corniculatus* L.)种子采自南开大学试验田。植株种植于温室中,取其顶部幼嫩叶片为试材提取总RNA。RNA提取试剂盒为TIANGEN公司的“RNAlant植物RNA提取试剂盒”,提取的总RNA经DNase (TaKaRa公司)处理后取1 μ g用于反转录合成cDNA第一链。cDNA合成试剂盒购自Promega公司,dNTP和Taq plus DNA聚合酶购自上海生工,引物合成和DNA测序委托上海生工完成。

RT-PCR扩增百脉根液泡膜 H^+ -PPase的cDNA中间片段时,首先根据已报道的绿豆(*Vigna radiata*)液泡膜 H^+ -PPase基因VVP2 (GenBank登录号AB009077)对NCBI中EST数据库进行Blast分析,比对结果发现一条登记号为CB828572、功能尚未鉴定的百脉根EST序列。以此EST序列为种子序列,再次对NCBI中EST数据库进行Blast分析并进行电子延伸,最后在对6条EST电子克隆基础上得到了一条长为2109 bp的cDNA片段序列信息。据此设计2个PCR引物, P_1 :5'-CCA-TCAACCTGTTCCAGA-3'; P_2 :5'-CGTCATCA-

TCAACCAACC-3'。以反转录合成的cDNA第一链为模板,反应体系为5 μ L 10 \times 缓冲液;2.5 μ L 2.5 mmol \cdot L $^{-1}$ dNTP;2.5 μ L 4 μ mol \cdot L $^{-1}$ P_1 引物;2.5 μ L 4 μ mol \cdot L $^{-1}$ P_2 引物;2.5 μ L cDNA第一链模板;Taq plus DNA聚合酶2 U;最后以蒸馏水补足体积至50 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性4 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1.5 min,30个循环,然后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳检查后,切下目的条带,用PCR产物纯化试剂盒回收DNA。与pGM-T Vector (TIANGEN公司)连接,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α ,鉴定并测序。

为了得到百脉根液泡膜 H^+ -PPase基因全长编码序列,根据测序得到的序列信息,采用Clontech公司SMARTTM RACE Kit进行cDNA第一链的合成及RACE实验。在3' RACE过程中合成2个基因特异引物:GSP $_1$,5'-TATTGGTTCTGCTGCCCTTGTGTC-3';NGSP $_1$,5'-TGGTGACACCATTGGAGACCCTC-3',后者用于Nest-PCR。在5' RACE实验中设计2个基因特异引物,分别为:GSP $_2$,5'-GAGAGGGTACAGCATGGCAGTAAAC-3';NGSP $_2$,5'-CCCCAACATTGTCACCAACATTATCAGC-3',后者用于Nest-PCR。严格依试剂盒说明进行操作。PCR扩增产物的回收、连接、转化和测序同上。

获得全长cDNA序列信息后设计引物用于开放阅读框(ORF框)片段的扩增。为了后续实验的方便在上下游引物的5'端分别引入2个限制性内切酶的酶切位点,引物名称和序列如下:

上游引物, S_1 , 5'-TTAGGTACCCCGGGATGGGTGCAGTCCTTC-3'

KpnI *SmaI*

下游引物, A_1 , 5'-GGCTTCTAGAGGATCCTTAGATCTTGAAGAGTAAGC-3'

XbaI *BamHI*

PCR反应体系和扩增程序同上。PCR扩增产物回收、连接、转化后正反向测序。

测序结果用DNAMAN软件进行分析并通过国际生物技术信息中心网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)分析其基因同源性。应用EBI的

ClustalW软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/>)在线进行多序列比对。

分析*LcVPI*在各组织中表达时,挑选饱满整齐的百脉根种子,经表面消毒后放入无生长调节剂的MS培养基中,培养21 d后分别取其根、茎、

叶提取总 RNA, 用中间编码区引物 LcSD1 (5'-GGGCTTATCATTTGGATTTGTAAGT-3') 和 LcSD2 (5'-GAACCTCCTCAACCATCTTCAG-3') 进行 RT-PCR, 分析 *LcVPI* 在各组织中的表达差异。PCR 扩增条件同上, 循环数改为 25, 目的片段长度为 582 bp。反转录产物稀释 50 倍后用于内参泛素基因的扩增, 引物为 LcUB1 (5'-GGGAGGTATGCA-GATCTTTGTG-3') 和 LcUB2 (5'-CCTTCCAACCTA-GAATCCAC-3'), 循环数为 25, 目的片段长度为 249 bp。本文中显示的结果经过 3 次自 RNA 提取开始独立的重复实验, 结果一致。

实验结果

1 百脉根液泡膜 H⁺-PPase 基因 cDNA 序列信息的获得

根据 EST 电子克隆得到的百脉根 cDNA 片段信息设计特异引物 P₁ 和 P₂, 通过 RT-PCR 扩增得到一条大约为 1 900 bp 的条带, 将此条带回收、克隆并测序, 测序结果与预期的目的片段序列相似(图 1-a), 此片段为百脉根液泡膜 H⁺-PPase 基因的中间部分序列。

根据上述扩增片段的测序结果进行 3' RACE 和 5' RACE 实验后分别得到 728 bp 和 920 bp 的序列信息(图 1-b、c), 为百脉根液泡膜 H⁺-PPase 基因的 3' 端和 5' 端, 分别与上述中间序列存在 377 bp、237 bp 的交叠区。

将上述 3 个片段的序列进行拼接, 最终得到一具有完整开放阅读框的 cDNA 序列信息。再进一步依据所得到的序列信息用引物 S₁ 和 A₁ 扩增(图 1-d)并测序后, 得到长度为 2 304 bp ORF 框序列, 与预期的序列完全一致。

2 百脉根液泡膜 H⁺-PPase 基因 cDNA 序列分析

拼接后得到的 cDNA 全长序列如图 2。该 cDNA 全长为 2 962 bp, 包含一个长 2 304 bp 的开放阅读框, 起始于序列的 56 bp, 终止于 2 359 bp, 5' 端非编码区长度为 55 bp, 3' 端非编码区长度为 603 bp, 在 poly(A) 上游 42 bp 处有典型的真核生物基因 poly(A) 的加尾信号序列 AATAA。

用 DNAMAN 软件分析其推断的编码产物为一长 767 个氨基酸的多肽链, 理论分子量为 80 kDa, 等电点为 5.02。Multiple Alignment 分析其与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小麦(*Triticum aestivum*)、绿豆(*Vigna radiata*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、水稻(*Oryza sativa*) 等其他植物中功能已鉴定的液泡膜 H⁺-PPase 的同源性, 显示其与同属于 I 类(K⁺ 激活型)的 VVP2 (GenBank 登录号 AB009077)、AVP1 (GenBank 登录号 M81892)、HVP1 (GenBank 登录号 AB032839)、HVP2 (GenBank 登录号 D13472)、OVP1 (GenBank 登录号 D45383)、OVP2 (GenBank 登录号 D45384) 及 TVP1 (GenBank 登录号 AY296911) 的同源性为 85.7%~93.5%, 而与属于 II 类(K⁺ 迟钝型) AVP2

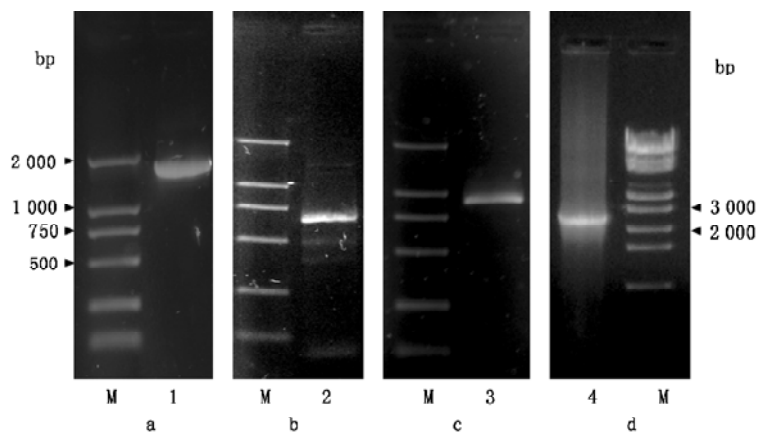


图 1 百脉根液泡膜 H⁺-PPase 基因 cDNA 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR products of tonoplast H⁺-PPase gene cDNA in *Lotus corniculatus*

a: RT-PCR 产物; b: 3' RACE PCR 产物; c: 5' RACE PCR 产物; d: ORF 框。1: 中间扩增片段; 2: 3' RACE 片段; 3: 5' RACE 片段; 4: ORF 框片段; M: 分子质量标准。

```

1                                  etetttcnateccettettettettettettettettettettettetteteenacnac
56  ATGGGTGCGAGTCCCTCTCCAGATCTCGGAACCGAGATTTTGATTCCCCTCTGGCCGTCATTGGAATCGTCTTC
1  M G A V L L P D L G T E I L I P V C A V I G I V F
131 GCTCTCTCCAGTGGTTCCTTGTCTCCAAGGTTAAGATCACCGCCGCCACCAGAGACGCCGCTTCCCCGAGCC
26  A L F Q W F L V S K V K I T A A T R D A A S P D A
206 GCCGGTAAGAATGGCTACAACGATTACCTCATCGAGGAAGAGGAAGGTATCAACGACCAGAACGTTGTTCTCAA
51  A G K N G Y N D Y L I E E E E G I N D Q N V V L K
281 TGCGCTGAAATCCAGCAAGCTATCTCTGAAGGAGCAACCTCTTCCCTTTCCTGAGTACAAGTATGTTGGTATC
76  C A E I Q Q A I S E G A T S F L F T E Y K Y V G I
356 TTCATGGTCTCTTGGCATTGTGATAITTCCTTTCCTGGCTCCGTGGAAGGATTTCAGCACAAGCCACCGCTT
101  F M V F F A I V I F L F L G S V E G F S T S H Q P
431 TGCAATATGATGAAACTAAGATTTGCAAGCCAGCTCTGCGACCAGCCCTTTTCAGTACAATTTCTTCGTGCTT
126  C K Y D E T K I C K P A L A T A L F S T I S F V L
506 GGTGGCATCACATCAGTTGTTTCTGGTTCCTTGGAATGAAAATGCAACTTATGCCAATGCTAGAACCACCGTG
151  G G I T S V V S G F L G M K I A T Y A N A R T T L
581 GAGGTAGAAAGGTTGGGAAGGCTTTCATTACAGCATTTAGATCAGGTGCTGTCAATGGATTTTGTTCGA
176  E A R K G V G K A F I T A F R S G A V M G F L L A
636 GCCAATGGCCTTTTGGTCTTACATTACCATCAACCTGTTCCAGATTTACTACGGTGGGAGTGGGGTGGTCTT
201  A N G L A L V L Y I T I N L F Q I Y Y G E D W G G L
731 TTTGAGGCCACTCAGTTATGGTCTTGGTGGCTCTTCATGGCTTTCATGGCTTTCGTTGGAAGAGTTGCTGGAGTCTAT
226  F E A I T G Y G L G G S S M A L F G R V A G G T Y
806 ACTAAGCCCGCTGATGTGGTGTCTGTCGCGCAAGGTAGAAGAAACATTCTGAGGATGACCACCAGAAAT
251  T K A A D V G A D L V G K V E R N I P E D D P R N
881 CCAGCTGTGATTGCTGATAATGTTGGTGACAATGTTGGGGATATGCTGGTATGGGATCTGATCTTTTGGTCTT
276  P A V I A D N V G D N V G D I A G M G S D L F G S
956 TATGCTGAGGCGTCAATGCTGCTCTTGTGTTGCTTCCATCTTCTTTCGTTGGATTATACAGGTTTACTGCC
301  Y A E A S C A A L V A S I S S F G I N H E F T A
1031 ATGCTGTAACCTCTCATTGTCTGTCTGTTGGGTATCATTGTTGTCTGATAACCACCTTATTTGCAACTGACATT
326  M L Y P L I V S S V G I I V C L I T T L F A T D I
1106 TTTGAGATTCAAGCTCGTAAAAGAAATGAGCCAGCTTGAIAAACAACCTGTTATTTCAACAGTGTGAGTACT
351  F E I K L V K E I E P A L K K Q L V I S T V L M T
1181 GTTGGGATGCAATTGTTAGTTGGATTGCCTCCATCTTCTTCACTATCTCAATTTTGGAGTGCAGAAAGGAT
376  V G I A I V S W I A L P S S F T I F N F G Q K D
1256 GTCAAGAACTGGCAGTATTCTGTGTGTGGCTTTGGTCTTGGCCAGGCTTATCATTGGATTGTAACGTAG
401  V K N W Q L F L C V A V G L W A G L I I G F V T E
1331 TACTATACTAGCAATGCATACAGTCTGTGCAAGATGTTGCTGATTCCTGCAGGACTGGTGTCTACCAATGTT
426  Y Y T S N A Y S P V Q D V A D S C R T G A A T N V
1406 ATATTGGCCTTGGCCTTGGGATACAAGTCTGTTATTAATCCAAATTTTGGTATTTGCAATTAGTATTTTGTAGT
451  I F G L A L G Y K S V I I P I F A I A I S I F V S
1481 TTCAGTTTGGCCAGTGTACGGTATCGCTGTTGTCTGCACTTGAATGCTGAGTACCATAGCCACCGGATTGGCC
476  F S F A A M Y G I A V A A L G M L S T I A T G L A
1556 ATTTGATGCATATGGTCCAATCAGTACAATGCTGGAGGATTTGGTGTGAGATGGCTGGGATGAGTACAGAAATGCA
501  I D A Y G P I S D N A G G I A E M A G M S H R I R
1631 GAGAGAAGTGTGATGCCCTTGATGCTGCAGGAACACCCTGCTGCTATTGGGAAGGGGTTTGTATTTGGTCTGT
526  E R T D A L D A A G N T T A A I G K G F A I G S A
1706 GCCCTGTGCTCCCTGGCCCTTTCGTTGCTTTCGAGCCAGCTAATATCACACAGTTGATGCTGACTCCA
551  A L V S L A L F G A F V S R A N I T T V D V L T P
1781 AAGGTTTTTTCATCGGTTTTCATCGTTGGGTGCTATGCTTCTTACTGGTCTCTGCCATGACCATGAAGAGTGGGA
576  K V F I G L I V G A M L P Y W F S A M T M K S V G
1856 AAAGCCGCACTGAAGATTGTTGAGGAGGTTCCGAGGCAATTAACACCATTCCAGGGTTGATGGAGGGAAGCTGCT
601  K A A L K M V E E V R R Q F N T I P G L M E G T A
1931 AAGCTGACTACCCACATGTGTTAAGATCTCCACTGATGCTTCTATTAAGAAATGATCCACCCGGTGCTCTT
626  K P D Y A T C V K I S T D A S I K E M I P P G A L
2006 GTCATGCTACACCCCTCATCGTAGGAATCTTTTTCGGTGTCGAAACACTTTTCGGTGCTCCGCGGATCTCTG
651  V M L T P L I V G I F F G V E T L S G V L A G S L
2081 GTGCTGGTGTACAGATTGCTATCTGTCATCCAACACTGCTGGTCTGCGGATAATGCCAAGAAGTACATTGAG
676  V S G V Q I A I S A S N T G G A W D N A K K Y I E
2156 GCTGGTGTCTGCAACATGCCAGAAAGCCTGGTCTAAAGGCTCAGATTTCACAAAAGCTGCTGTATTGGTGTGAC
701  A G A S E H A R S L G P K G S D C H K A A V I G D
2231 ACCATTGGAGACCCCTTAAGGATACATCTGGTCCCTCACTTAACATCCATCAAGCTAATGGCTTGTGACTCT
726  T I G D P L K D T S G P S L N I L I K L M A V E S
2306 CTCGTGTTCCGACCCCTTCTTCGCTACCCATGGTGGCTTACTCTCAAGATCTAAGatttggcacaanaagagcatg
751  L V F A P F F A T H G G L L F K I *
ccccataaallletataaactgcagaacagggaanaacacatalellletgltlagtelgactellletgt
gatgctgattctattggtttttagaatecttcccccccaccccgaatcaagtaatgttttgtctcatctgtaga
gctgagattctcaattacgatgaatctgcagaaaaacttcttctagtgaggttggtgatgatgacgatca
tattttattctacaatctcttctgtgaacatttttactattgttattatattatggttcagatgaccaa
aattttgagctggtttgttattatattatagagcagagctattattattttcattatatttaatactactat
cttttctegtggttcaatttlettataantgtttteagetaccctgtttgatttaattattagacacagatatacaa
ttggcattttetagtatatttccetttggcttatatccgttggaaacegaagtgatgaaaggatgg[aaat]
lgtllattlgacalgalggatttgggttaaatlalllletcaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图2 *LcVP1* 的 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide acid sequence and deduced amino acid sequence of *LcVP1* cDNA

* 处为终止密码子, 加框处为加尾信号。

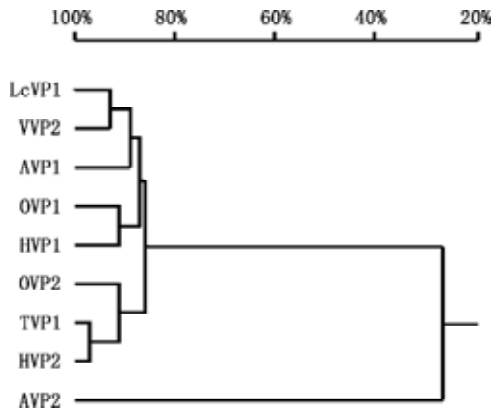


图3 百脉根LcVPI蛋白序列与其他植物同源蛋白序列的进化树分析

Fig.3 Homology-tree analysis of LcVPI with homologous proteins from other plants

LcVPI 来源于百脉根(*Lotus corniculatus*); VVP2 (AB009077)来源于绿豆(*Vigna radiata*); AVP1 (M81892)和 AVP2 (AF182813)来源于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*); HVP1 (AB032839)和 HVP2 (D13472)来源于大麦(*Hordeum vulgare*); TVP1 (AY296911)来源于小麦(*Triticum aestivum*); OVP1 (D45383)和 OVP2 (D45384)来源于水稻(*Oryza sativa*)。

(GenBank 登录号 AF182813) (Drozdowicz 等 2000) 的同源性仅为 26.6% (图 3), 暗示着本文中克隆得到的 cDNA 序列编码 I 类液泡膜 H⁺-PPase, 因此将获得的 cDNA 命名为 LcVPI 并提交 GenBank, 获得登录号为 EF440187。

3 LcVPI 编码产物的功能位点分析

在分析 LcVPI 编码产物同源性过程中发现, LcVPI 与绿豆、拟南芥中的同源产物相似, 也具有 “²⁵⁴DVGADLVGKVE²⁶⁴” 结构模序。在陆生植物的可溶性 PPase 和 H⁺-PPase 中, 该模序高度保守, 推测为 PPi 水解过程中的底物结合位点

(Lyndon 1990); 同时存在另一个功能模序 “⁴²⁵EYYTS⁴²⁹”, 该模序也高度保守, 负责 H⁺ 的转运(Drozdowicz 和 Rea 2001; Yokoi 等 2002); 此外, 已有的研究指出, 在所有植物的液泡膜 H⁺-PPase 中均包含着一个非常保守的 E (拟南芥中为 E²²⁹), 该残基在偶联 PPi 的水解和 H⁺ 的跨膜转运过程中发挥作用(Zhen 等 1997), 本文中该残基为 LcVPI 的 227 位氨基酸。根据上述分析, 我们认为本文中获得的 cDNA 是编码百脉根液泡膜 H⁺-PPase 的。

4 百脉根基因组中 LcVPI 基因结构分析

以获得的 LcVPI cDNA 为信息探针在 GenBank 中进行 Blast 分析, 找到一个与之高度匹配的基因组 DNA 序列, 该序列来自百脉根的变种 *Lotus corniculatus* var. *japonicus* 第 4 号染色体的 AP006375.1 克隆。基因结构分析的结果为 LcVPI 在百脉根基因组中为一个包含 8 个外显子和 7 个内含子的基因(图 4), 其外显子与内含子连接区符合经典剪拼序列的 GT...G 规则, 表明本文中获得的基因是一个客观存在的核基因。

5 LcVPI 的组织表达分析

分别取百脉根组培苗的根、茎、叶提取总 RNA, 用中间 582 bp 编码区代表目的基因, 采用半定量 RT-PCR 的方法分析 LcVPI 在各组织中表达差异的结果(图 5) 显示, 正常生长条件下, LcVPI 在叶片中表达量最高, 根中次之, 茎中最低。这说明在未受胁迫的情况下不同组织中的 LcVPI 均有一定的基础表达水平, 且其表达具有组织特异性。

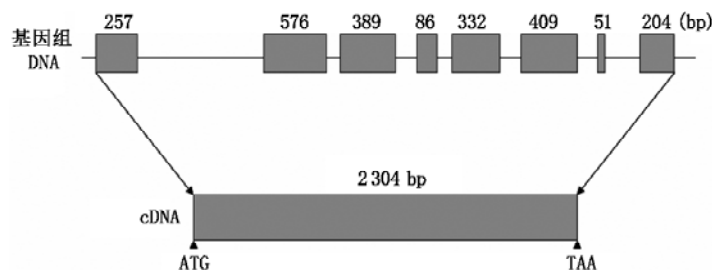


图4 百脉根基因组中 LcVPI 基因结构

Fig.4 The structure of LcVPI gene in *L. corniculatus*

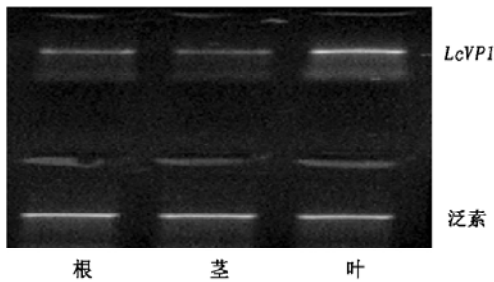


图5 百脉根 *LcVPI* 基因在不同组织中的表达
Fig.5 Tissue-specific expression analysis of *LcVPI* in *L. corniculatus*

讨 论

本文通过 EST 电子克隆并结合 RT-PCR 及 RACE 技术得到了百脉根液泡膜 H^+ -PPase 基因具完整编码区的 cDNA 序列信息。该 cDNA 全长为 2 962 bp, 其中 5' 端非编码区长度为 55 bp, 开放阅读框长度为 2 304 bp, 3' 端非编码区长度 603 bp, 编码产物长度为 767 个氨基酸。该 cDNA 编码的氨基酸序列与绿豆、拟南芥等植物中 I 类 (K^+ 激活型) 液泡膜 H^+ -PPase 的氨基酸序列同源性较高 (>80%), 而与拟南芥 II 类 (K^+ 迟钝型) 液泡膜 H^+ -PPase 同源性较低 (<30%), 据此推测 *LcVPI* 是一个 I 类液泡膜 H^+ -PPase 基因。

正常生长条件下, 百脉根 *LcVPI* 基因在不同组织中均有一定的表达, 这与 Fukuda 等(2004)、Brini 等(2005)在大麦和小麦中的研究结果一致, 暗示液泡膜 H^+ -PPase 对植物体维持正常的生理生化反应是必不可少的, 其可能是通过维持细胞内离子平衡、渗透平衡、参与蔗糖的合成和生长素的极性运输等多个方面发挥功能的(Buchanan 等 2000; Blumwald 1987; 包爱科等 2006)。

此外, 已有的研究显示, 各种逆境条件(如低温、缺氧、盐渍和干旱胁迫等)都影响植物中的液泡膜 H^+ -PPase 活性(赵利辉和刘友良 1999; Maeshima 2000)。这种与植物多种抗逆性相关的特性在农作物的抗逆育种中具有潜在的应用价值。因此, 本文中百脉根液泡膜 H^+ -PPase 基因 *LcVPI* 的克隆对进一步揭示其在抗逆生理中的作用以及进行液泡膜 H^+ -PPase 基因工程操作来说, 可能是有意义的。

参考文献

- 包爱科, 张金林, 郭正刚, 王锁民(2006). 液泡膜 H^+ -PPase 与植物耐盐性. 植物生理学通讯, 42 (4): 777~783
- 王宝山, 邹琦(2000). NaCl 胁迫对高粱根、叶鞘和叶片液泡膜 ATP 酶和焦磷酸酶活性的影响. 植物生理学报, 26: 181~188
- 王延枝(1990). 植物液泡膜上的焦磷酸酶. 植物生理学通讯, (4): 73~76
- 赵利辉, 刘友良(1999). 液泡膜 H^+ -PPase 及其对逆境胁迫的反应. 植物生理学通讯, 35 (6): 441~445
- Blumwald E (1987). Tonoplast vesicles for the study of ion transport in plant vacuoles. *Physiol Plant*, 69: 731~734
- Brini F, Gaxiola RA, Berkowitz GA, Masmoudi K (2005). Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiol Biochem*, 43: 347~354
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 637~638
- Drozdowicz YM, Kissinger JC, Rea PA (2000). AVP2, a sequence-divergent K^+ -insensitive H^+ -translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 123: 353~362
- Drozdowicz YM, Rea PA (2001). Vacuolar H^+ -pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends Plant Sci*, 6: 206~211
- Fukuda A, Chiba K, Maeda M, Nakamura A, Maeshima M, Tanaka Y (2004). Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H^+ -pyrophosphatase, H^+ -ATPase subunit A, and Na^+/H^+ antiporter from barley. *J Exp Bot*, 55 (397): 585~594
- Gao F, Gao Q, Duan XG, Yue GD, Yang AF, Zhang JR (2006). Cloning of an H^+ -PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *J Exp Bot*, 57 (12): 3259~3270
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H^+ -pump. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 11444~11449
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1 can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 1480~1485
- Jiang Q, Gresshoff PM (1997). Classical and molecular genetics of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 10 (1): 59~68
- Karlsson J (1975). Membrane-bound potassium and magnesium ion-stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochim Biophys Acta*, 399: 356~363
- Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL et al (2005). *Arabidopsis* H^+ -PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310: 121~125
- Lyndon RF (1990). Plant development: the cellular basis. In: Black

- M, Chapman J (eds). Topics in Plant Physiology. London: Unwin-Hyman Ltd, 165~189
- Maeshima M (2000). Vacuolar H⁺ pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 1465 (1): 37~51
- Nakanishi Y, Maeshima M (1998). Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. *Plant Physiol*, 116: 589~597
- Park S, Li JS, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang HB, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA (2005). Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (52): 18830~18835
- Sakakibara Y, Kobayashi H, Kasamo K (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H⁺-pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 31: 1029~1038
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA (1992). Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 775~779
- Tanaka Y, Chiba K, Maeda M, Maeshima M (1993). Molecular cloning of cDNA for vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase in *Hordeum vulgare*. *Biochem Biophys Res Commun*, 190: 1110~1114
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant J*, 30: 529~539
- Zhen RG, Kim EJ, Rea PA (1997). Acidic residues necessary for pyrophosphate-energized pumping and inhibition of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase by *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide. *J Biol Chem*, 272: 22340~22348