

水分亏缺条件下玉米根系 *PIP2-5* 基因的表达

吴安慧^{1,2,3} 张岁岐^{1,*} 邓西平¹ 山仑¹

¹中国科学院水利部水土保持研究所黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室, 陕西杨凌 712100; ²中国科学院研究生院, 北京 100039; ³西北农林科技大学植物保护资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西杨凌 712100

提要 在 PEG-6000 模拟水分亏缺条件下, 以微管蛋白基因为内参基因, 水通道蛋白基因 *PIP2-5* 为检测基因, 采用半定量逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)体系检测 *PIP2-5* 基因在玉米根系中的表达的结果表明, 人工模拟水分亏缺条件下 *PIP2-5* 基因表达量高于正常水分条件下的。这暗示, 水分亏缺条件下细胞-细胞途径对根系吸水的贡献可能增大。

关键词 玉米; 根系; 水通道蛋白; 半定量 PCR

Expression of *PIP2-5* in Maize Root Systems under Water Deficit

WU An-Hui^{1,2,3}, ZHANG Sui-Qi^{1,*}, DENG Xi-Ping¹, SHAN Lun¹

¹State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau, Institute of Water and Soil Conservation, Chinese Academy of Sciences, Ministry of Water Resources, Yangling, Shaanxi 712100, China; ²Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; ³Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract To detect the expression of *PIP2-5* in maize root systems under water deficit, semi-quantitative PCR was used. The reference gene was *tubulin*. Maize seedlings were planted under the condition of hydroponics culture in growth chamber. Water deficit was simulated by using PEG-6000. The results showed that *PIP2-5* was up-regulated under water deficit, which supported the theory that the contribution of cell-to-cell pass-way for root systems uptake maybe increased under water deficit.

Key words maize; root systems; water channel protein; semi-quantitative PCR

植物根系的抗旱性可以从生理、形态、解剖三个方面来研究。近年来发现质膜和液泡膜上专一性、高效性水分跨膜运输的通道——水通道蛋白(aquaporin, AQP), 它介导细胞或细胞器与介质之间快速被动的水的运输, 是水分进出细胞的主要途径, 一些水通道蛋白是组成型表达, 也有一些受植物体内外在因子调节(如干旱、盐、激素、蓝光)。Steudle和Henzler (1995)以及Steudle和Heydt (1997)认为, 水通道蛋白可能起阀门的作用, 它能可逆地提高水力导度, 并在不利的条件下促进植物吸水。其水分运输活性有受细胞生理活动的调节的特点。因此人们对水分跨膜转运应重新加以认识, 这样才可以正确阐明植物的抗旱机制, 也可为改良作物抗旱性开拓新的思路。

玉米水通道蛋白家族由14个质膜水通道蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs), 13个液泡膜水通道蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIPs), 5个NOD26类似物(NOD26-like intrinsic proteins, NIPs)和3个碱性的小分子量水通道蛋白

(small basic intrinsic proteins, SIPs)组成。但这个家族基因的表达和调节以及相应的蛋白质功能的信息依然有限。仅有4个玉米水通道蛋白的运输活性已经得到检验: ZmPIP2-5和ZmTIP1-1表现高度水分运输活性, 而ZmPIP1-1和ZmPIP1-2的水分运输活性尚未检测到(Gaspar等2003)。本文以微管蛋白基因(*tubulin*)为内参照基因, 玉米根系中高丰度表达的水通道蛋白基因 *PIP2-5* 为检测基因, 研究人工模拟水分亏缺条件下 *PIP2-5* 基因在玉米根系中的表达情况。

材料与amp;方法

材料为黄土高原主栽玉米(*Zea mays* L.)品种

收稿 2005-10-24 修定 2006-03-13

资助 国家自然科学基金(30571127)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX3-SW-444)和中国科学院水利部水土保持研究所学科前沿科研专项经费。

*通讯作者(E-mail: sqzhang@ms.iswc.ac.cn, Tel: 029-87010897)。

‘户单四号’(抗旱), 由西北农林科技大学玉米研究所育种室提供。试剂有 Trizol、RNasin、M-MLV、Taq DNA 聚合酶、凝胶回收试剂盒等主要购自 Promega 公司、Takara 公司和东洋坊公司。pMD-18T 质粒购自 Takara 公司, 受体大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 由西北农林科技大学植物保护资源与病虫害治理教育部重点实验室保存。

挑选外形饱满的玉米种子经 0.1% 的 HgCl_2 溶液消毒 10 min 后, 用自来水反复冲洗, 再用蒸馏水冲洗几遍, 在蒸馏水中吸胀 6 h, 然后放入蛭石与石英沙(2:3)混合的培养介质中, 在 25°C 培养箱萌发。出苗大约 3 d, 当种子根长至 5~6 cm 时, 将苗移入高 20 cm, 直径 18 cm 的塑料桶中培养(苗基部用脱脂棉裹住, 桶上部用泡膜作支架), 塑料桶外部用双层黑塑料布遮光。每桶留苗 3 株, 每处理重复 6 次。起初在桶中装入蒸馏水, 植株适应生长 24 h 后换成营养液。营养液为 1/2 Hoagland 全营养液。2 个水分处理: 无水分胁迫(对照)和用 -0.2 MPa PEG-6000 模拟干旱胁迫。

塑料桶放入日产 KG-206SHL-D 型人工气候室中培养, 白天光照为 $250\sim 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光暗周期为 1 h/10 h, 昼夜温度为 27°C/20°C, 空气相对湿度(RH)为 60%~70%。每天用加氧泵向溶液中通气 3~4 次, 每次 60 min, 保证根系良好生长。每 48 h 换 1 次营养液。幼苗长到第 11 天时于当天上午 10 点用 -0.2 MPa PEG-6000 模拟干旱胁迫, 处理 3.5、4.5 和 5.5 h 后, 选取 3 株生长良好, 颜色鲜白且未接触桶底的对照和 PEG 胁迫植株根系, 快速称取 0.1 g, 液氮速冻后, 置于 -80°C 冰箱中保存备用(通气适宜、生长良好的根系无论是主根还是侧根都幼嫩鲜白, 活力强)。未胁迫处理的材料与胁迫 4.5 h 的材料于同一时间取材, 从正常水分供应植株中选取, 取样方法与前面相同。

总 RNA 的提取按照 Trizol 说明书进行。0.1% 普通琼糖凝胶电泳检测所提取的 RNA 无明显降解, 紫外分光光度计检测 $\text{OD}_{260/280}$ 达到 1.8~2.0 后, 进行以下逆转录反应: 1 μL oligo-d(T)18 ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 2 μg 总 RNA 加水至 12 μL , 70°C 加热 10 min, 冰浴冷却 5 min, 然后加入 4 μL 5 \times 第一链缓冲液、2 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、1 μL

RNasin ($30 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 和 1 μL M-MLV 逆转录酶 ($200 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 轻轻混匀, 37°C 中孵育 60 min; 70°C 中加热 15 min 后终止反应。

PCR 反应条件及体系的建立参考 GenBank 登录的序列自行设计引物, 引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。PIP2-5 基因的引物为: 上游引物, 5' CTCGTCTACACCGTCTTCTC 3'; 下游引物, 5' ATAACGACGCATGGCTAGAGG 3', 产物长度 430 bp。微管蛋白基因的引物为: 上游引物, 5' ACATCTGCCGCCGCTCCCTT 3'; 下游引物, 5' GCGCTGTTGGTGATTTCG 3', 产物长度 253 bp。然后取 1 μL 上述逆转录产物, 加入上下游引物进行 PCR 反应, 于 94°C 中预变性 2 min; 94°C 变性 50 s, 56°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72°C 充分延伸 10 min, 用于 PCR 扩增。

PIP2-5 基因的克隆与测序中的凝胶产物回收和连接到 pMD-18T 质粒分别参照 Takara 公司凝胶回收试剂盒和 pMD-18T 质粒试剂盒的说明书进行。感受态大肠杆菌的制备和转化参照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克和拉塞尔 2002) 操作程序进行, 重组质粒转化至感受态宿主菌 JM109 中后, 根据蓝/白斑筛选, 挑取白色菌落, 菌落 PCR 及抽提质粒 PCR 初鉴。阳性菌株测序由上海生工生物工程有限公司进行。

建立半定量 PCR 体系时采用上述的 PCR 体系和循环参数, 分别采用 25、28、31 个循环, 确定指数扩增期。再采用 28 个循环, 扩增微管蛋白基因, 调整 cDNA 加入量, 直至扩增出来的条带在琼脂糖凝胶上看起来亮度一致为止。在 28 个循环条件下, 扩增目的基因 PIP2-5。

实验结果

1 PCR 扩增片段的克隆与鉴定

以 PIP2-5 基因引物进行 PCR 扩增玉米根系 cDNA, 得到约 430 bp 的扩增产物(图 1)。切胶回收扩增产物, 连接 pMD18-T 质粒, 转化大肠杆菌 JM109, 阳性克隆经测序证实所扩增的 PIP2-5 基因片段与已知基因完全相符(图 2)。

2 微管蛋白基因的 PCR 扩增

以微管蛋白基因引物进行 PCR 扩增玉米根系

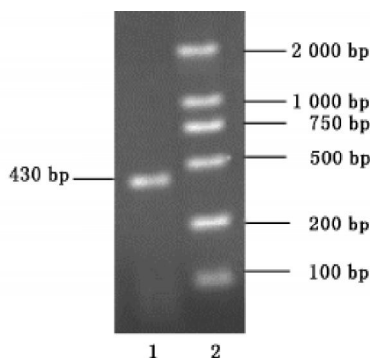


图1 *PIP2-5*扩增电泳图谱
Fig.1 Electrophoresis of *PIP2-5*
1: *PIP2-5*条带; 2: 分子量标记。

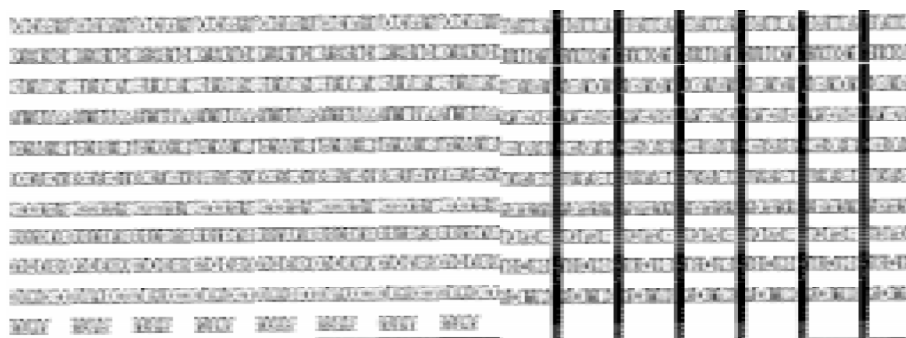


图2 PCR扩增获得的*PIP2-5*基因部分序列分析
Fig.2 Analysis of partial sequence of *PIP2-5* amplified from PCR

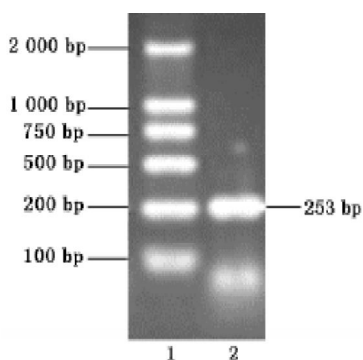


图3 微管蛋白基因扩增电泳图谱
Fig.3 Electrophoresis of *tubulin*
1: 分子量标记; 2: 微管蛋白基因。

所下降,但仍略高于正常供水条件下*PIP2-5*的表达量(图5)。这说明*PIP2-5*是水分亏缺条件下根系吸水有关的水通道蛋白基因,在水分亏缺条件下其表达量增加,据此认为细胞-细胞途径对根系吸水的贡献可能增大。

cDNA,得到约253 bp的扩增产物,与预期微管蛋白基因扩增产物长度相符合(图3)。

3 mRNA表达的半定量分析

分别在25、28、31个循环下扩增,证明28个循环处于指数扩增初期(图4)。在28个循环数下扩增,调整cDNA加入量,至微管蛋白基因扩增产物条带达到亮度一致为止,确定扩增目的基因*PIP2-5*时cDNA加入量后,再扩增目的基因*PIP2-5*的结果表明:用PEG处理3.5 h后*PIP2-5*表达量增长。PEG处理4.5 h的*PIP2-5*表达量进一步明显增大。PEG处理5.5 h的*PIP2-5*表达量有

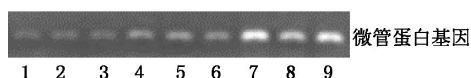


图4 不同循环数扩增微管蛋白基因
Fig.4 Amplification of *tubulin* under different cycles
1~3: 25个循环; 4~6: 28个循环; 7~9: 31个循环。

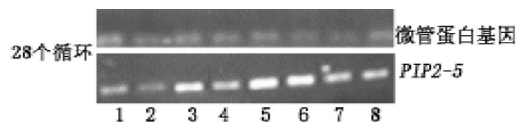


图5 28个循环下调整模板并扩增*PIP2-5*
Fig.5 Adjustment of template by *tubulin* and amplification of *PIP2-5* under 28 cycles
1、2: 对照; 3、4: PEG胁迫3.5 h; 5、6: PEG胁迫4.5 h; 7、8: PEG胁迫5.5 h。

讨 论

水分胁迫条件下,细胞和单根水导的调控主要是通过调节原生质膜上水通道蛋白的密度和活性

实现的, 并且这种调节主要发生在具有高丰度转录物的水通道蛋白中(Zhang 和 Tyerman 1999; Clarkson等2000; Henzler和Stuedle 2000; Lopez等 2004)。玉米水通道蛋白基因 *PIP2-5*、*PIP2-1*、*PIP1-1*、*PIP1-2*、*PIP1-5* 分别为 *ZmPIP2* 和 *ZmPIP1* 亚族中在根系中高丰度表达的基因(Hukin等 2002; Lopez等 2003)。Lopez等(2003)的结果表明, *ZmPIP2* 亚族对昼夜循环过程中水分跨细胞运输的昼夜波动起主要作用。本文结果表明, PEG处理5.5 h的玉米根系 *PIP2-5* 表达量略高于正常供水条件下的 *PIP2-5* 表达量, 而PEG处理3.5和4.5 h的 *PIP2-5* 表达量明显高于正常供水条件下 *PIP2-5* 的表达量。虽然个别时间点上受PEG胁迫的 *PIP2-5* 表达量也微有增加, 但总的来说, 人工模拟的水分亏缺比正常水分条件下的 *PIP2-5* 基因表达量有增加的趋势。这暗示水分亏缺条件下, 细胞-细胞输水途径对根系输水的贡献可能增大, *PIP2-5* 基因是水分亏缺条件下根系吸水有关的基因, 其表达量的高低有可能与根系吸水能力的强弱以及作物抗旱性的强弱有关, 关于这一点, 我们正在作进一步验证。

参考文献

- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 黄培堂译(2002). 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 96~99
- Clarkson DT, Carvajal M, Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Cooke DT, Stuedle E (2000). Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J Exp Bot*, 51: 61~70
- Lopez F, Bousser A, Sissoëff I, Gaspar M, Lachaise B, Hoarau J, Mahé A (2003). Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant Cell Physiol*, 44 (12): 1384~1395
- Lopez F, Bousser A, Sissoëff I, Hoarau J, Mahé A (2004). Characterization in maize of ZmPIP2-3, a root-specific tonoplast intrinsic protein exhibiting aquaporin activity. *J Exp Bot*, 55 (396): 539~541
- Henzler T, Stuedle E (2000). Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J Exp Bot*, 51: 2053~2066
- Hukin D, Doering-Saad C, Thomas CR, Pritchard J (2002). Sensitivity of cell hydraulic conductivity to mercury is coincident with symplastic isolation and expression of plasmalemma aquaporin genes in growing maize roots. *Planta*, 215: 1047~1056
- Gaspar M, Bousser A, Sissoëff I, Roche O, Hoarau J, Mahé A (2003). Cloning and characterization of *ZmPIP1-5b*, an aquaporin transporting water and urea. *Plant Sci*, 165: 21~31
- Stuedle E, Henzler T (1995). Water channels in plants: do basic concepts of water transport change? *J Exp Bot*, 46: 1067~1076
- Stuedle E, Heydt H (1997). Water transport across tree roots. In: Rennenberg H, Eschrich W, Ziegler H (eds). *Trees-contributions to modern tree physiology*. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publ, 239~255
- Zhang WH, Tyerman SD (1999). Inhibition of water channels in intact wheats root cells by Hg. *Plant Physiol*, 120: 849~858