

马尾松水通道蛋白 *PmPIP1* 基因克隆及在干旱胁迫下的表达分析

蔡琼^{1,2}, 丁贵杰^{1,2}, 文晓鹏³

(1. 贵州省森林资源与环境研究中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 林学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州大学 贵州省农业生物工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 克隆马尾松 *Pinus massoniana* 水通道蛋白(AQP), 并对其生物信息学与干旱胁迫表达模式进行分析。采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)以及互补脱氧核糖核酸(cDNA)末端快速扩增(RACE)方法克隆马尾松水通道蛋白基因。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析其在干旱胁迫下的响应模式。结果克隆到一个马尾松水通道蛋白基因, 命名为 *PmPIP1* (GenBank 登录号为 KF582038)。此基因 cDNA 全长序列为 1 301 bp, 包括 867 bp 的完整开放阅读框, 99 bp 的 5' 末端非翻译区和 335 bp 的 3' 末端非翻译区。编码 288 个氨基酸残基, 分子量为 30.86 kD, 等电点(pI)8.48。PmPIP1 与菠菜 *Spinacia oleracea* (2b5fA) 水通道蛋白结构相似。PmPIP1 含有 6 个跨膜区, 具有膜内在蛋白(MIP)家族信号序列、高等植物高度保守序列 HINPAVTFG 和 2 个天门冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸(NPA)保守肽段。*PmPIP1* 基因属质膜内在蛋白(PIPs)亚族, 与挪威云杉 *Picea abies* 水通道蛋白基因亲缘关系最近, 同源性达 95%。qRT-PCR 表明 *PmPIP1* 受干旱胁迫诱导表达。马尾松 *PmPIP1* 的克隆丰富了植物 AQP 基因的资料库, 同时推测 *PmPIP1* 基因可能参与了马尾松干旱胁迫过程。图 8 表 1 参 39

关键词: 植物学; 马尾松; 水通道蛋白; 克隆; 表达

中图分类号: S791.248 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0191-10

Cloning of the *PmPIP1* gene from *Pinus massoniana* and its expression with drought stress

CAI Qiong^{1,2}, DING Guijie^{1,2}, WEN Xiaopeng³

(1. Institute of Forest Resources and Environment, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: The aquaporin (AQP) gene plays an important role in plants adapting to abiotic stresses. To predict the AQP gene function and provide basal data for mechanism of *Pinus massoniana*'s drought resistance, the sequence characteristics of the AQP gene from *P. massoniana* were analyzed and its expression profiling was studied after drought-stress treatment. The AQP gene was cloned using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) ends (RACE). The expression of the AQP gene was then performed using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The full-length cDNA of the AQP gene from *P. massoniana*, designated *PmPIP1* with a registered number in GenBank KF582038, was obtained. Results of the sequence analysis showed that the size

收稿日期: 2015-04-10; 修回日期: 2015-05-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260183); “十二五”国家科技支撑计划项目(2015BAD09B0102); 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划)项目(2011AA10020301); 贵州省重大专项(黔科合重大专项字[2012]6001号); 贵州省人才基地建设项目(黔人领发[2009]9号)

作者简介: 蔡琼, 从事林木栽培生理生态与分子生物学研究。E-mail: dukecq@sina.com。通信作者: 丁贵杰, 教授, 博士生导师, 从事森林培育和人工林稳定性等研究。E-mail: gjdinggz@126.com

of *PmPIP1* was 1 301 bp, containing an 867 bp open reading frame that encoded 288 amino acid residues with 30.86 kDa molecular weight and an 8.48 isoelectric point, a 99 bp 5' terminal untranslated regions (UTR), and a 335 bp 3' terminal UTR. The *PmPIP1* 3D structure had a strong similarity to *Spinacia oleracea* (2b5fA). *PmPIP1* exhibited a typical structure with six transmembrane domains, and had the consensus sequence HIN-PAVTFG of membrane intrinsic protein (MIP) family and two highly conserved peptides Asn-Pro-Ala (NPA). The evolutionary analysis revealed that *PmPIP1* shared a 95% identity with *Picea abies* and belonged to PIPs. The *PmPIP1* expression patterns with drought conditions showed that drought did induce *PmPIP1*. In conclusion, cloning of the *PmPIP1* gene from *P. massoniana* enriched the plant aquaporin gene database, and the qRT-PCR analysis indicated that the *PmPIP1* gene may be involved in the response related to drought stress. [Ch, 8 fig. 1 tab. 39 ref.]

Key words: botany; *Pinus massoniana*; aquaporin; cloning; expression

水通道蛋白(AQP)是指细胞膜上能选择性地高效转运水分子的膜转运蛋白^[1]。自1993年Maurel等^[2]从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中分离到第1个植物水孔蛋白 γ -TIP 以来,已在细菌、古生菌、真菌、动物和植物等几乎所有生物中发现 AQP^[3-5]。在植物中,拟南芥^[6]和水稻 *Oryza sativa*^[7-8]等 AQP 基因的研究较为清楚。根据水通道蛋白的亚细胞定位,结合序列同源性分为4种类型:质膜内在蛋白(PIP),液泡膜内在蛋白(TIP),类结瘤蛋白(NIP)及小碱性膜内蛋白(SIP)^[9-10]。AQP 属跨膜通道的膜内在蛋白(MIP)家族,具有转运水、甘油、小分子溶质的功能,在植物应对水分不足的响应机制中起着重要作用^[11]。马尾松 *Pinus massoniana* 因适生能力强、速生、丰产、综合利用程度高等优良特性,成为中国南方最主要用材树种之一^[12]。以往关于马尾松林的研究主要集中在林木栽培技术^[13]、栽培机制^[14-15]、连栽生态系统变化^[16]、合理采伐年龄^[17]、人工林生长规律^[18]等方面,而对其分子生物学相关研究甚少^[19]。干旱是影响林木正常生长发育的一个最重要的逆境因子。克隆马尾松抗旱相关基因以及研究其表达调控,对揭示马尾松抗旱分子机制具有十分重要的意义。其中,水通道蛋白 PIPs 亚型基因在植物干旱分子调控机制中是一个重要的调控基因,其不仅受胁迫表达变化,而且转运活性受磷酸化调控^[20],参与非生物胁迫的响应。CUI等^[21]发现过表达 *VjPIP1* 的拟南芥增强了植株的抗旱能力。ZHOU等^[22]研究表明小麦 *Triticum aestivum* *TaAQPI*(*PIP2*) 在聚乙二醇(PEG)处理后表达量上调,在番茄 *Solanum lycopersicum* 中过量表达同样增强了其抗旱性。目前,马尾松水通道蛋白 PIPs 基因克隆和功能分析至今未见研究报道。因此,对马尾松水通道蛋白 PIPs 基因进行克隆并分析其在干旱胁迫下的响应模式,为马尾松抗旱基因工程和遗传改良提供可资利用的基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用高抗旱马尾松优良家系1年生幼苗为供试材料。植株平均高度为17.2 cm。培养容器为塑料盆(27 cm × 18 cm × 25 cm),按 V(黄壤):V(河砂)=9:2 混合构成。设对照(土壤相对含水量为 70% ± 5%)和中度胁迫(土壤相对含水量为 40% ± 5%)2个处理。每天通过称量法维持土壤相对含水量在试验设计的范围内。干旱胁迫实施0, 3, 5, 10, 15, 20, 25 d分根、茎、叶取试材,迅速彻底去除细土和其他杂物,液氮冷冻,保存于-80 °C,作为实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)的试验材料。

1.2 方法

1.2.1 总核糖核酸(RNA)的提取 参照 Plant RNA Reagent 与 RNAPrep pure Plant Kit 说明书进行。

1.2.2 目的基因克隆 根据美国生物技术信息中心(NCBI)数据库中已报道的 AQP 基因序列,设计简并引物 M1 与 M2(表1),获得 *PmPIP1* 基因中间片段。聚合酶链式反应(PCR)反应体系(25.0 μL):模板 1.0 μL,引物各 1.0 μL, MasterMix 12.5 μL,重蒸水 9.5 μL。PCR 反应条件:预变性 94 °C 3 min,变性 94 °C 30 s,退火 48.7 °C 30 s,延伸 72 °C 1 min,35个循环,后延伸 72 °C 10 min。在此片段基础上,设计 5'-RACE 特异性引物 GSP1, GSP2 和 GSP3(表1),参照 5'-RACE system for rapid amplification of cDNA ends 说明,扩增目的基因 5'端序列。设计 3'-RACE 特异性引物 M3 与 M4(表1),参照 3'-Full

RACE core set with prime Script™ RTase 说明, 扩增目的基因 3' 端序列。设计特异性引物 M5 与 M6(表 1), 验证 *PmPIP1* 基因互补脱氧核糖核酸(cDNA)全长序列。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下切下相应条带, 按照 DNA Purification Kit 试剂盒说明进行胶回收, 与 pMD18-T Vector 连接, 转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆子, 送至北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。

表 1 *PmPIP1* 基因克隆及表达使用的引物

Table 1 PCR primers used to the cloning and expression of *PmPIP1*

引物	引物序列 5'→3'	作用
M1	GGNGGNCAAYATAAAYCCNGC	扩增保守片段
M2	GGNCCNACCCARAADATCCA	
GSP1	CTCCCAAGCACTGACA	
GSP2	CAGCCCGGGCAGAGACAGA	5'-RACE 扩增 5'末端序列
GSP3	GCCAAGAACAGCCCAAAGGT	
M3	CATCACTGGAAGTGGCATCAACCTG	3'-RACE 扩增 3'末端序列
M4	GCTGCCATCATCTACAACAAGTCTCG	
M5	ATGGAAGGAAAAGAAGAAGACG	全长 cDNA 扩增
M6	CTAGGAGCGAGTTTTGAAGGGAATG	
18S-F	TTAGGCCATGGAGGTTTGAG	扩增内标
18S-R	GACTTGATGACACGGCTTA	
UBC-F	AGGATCATCAGGATTTGGGT	
UBC-R	GATTTATTTTCATTGGCAGGC	
M7	TAACCCAGCACTGACCTTT	检测 <i>PmPIP1</i>
M8	TCCCACAATCTCAGCACCC	

1.2.3 序列分析 测序结果采用 DNASTar 进行拼接, 并与美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库进行局部序列比对基本检索工具(BLAST)比对, 利用 ProtScale Sever 软件分析蛋白亲水/疏水性; 利用 ExPASy ProtParam tool 计算蛋白的等电点和分子量; 利用 TMHMM 预测跨膜区; 利用 Signal P 预测信号肽; 利用 SWISS-MODEL 预测三级结构; 利用 DNAMAN 软件进行蛋白质序列的多重比对并构建基因的系统进化树。

1.2.4 基因表达分析 设计特异引物 M7 和 M8(表 1)作为 RT-qPCR 引物, 马尾松 18S和泛素(UBC)(表 1)基因为内标基因, 进行 RT-qPCR 反应, 重复 3 次·反应⁻¹。PCR 反应体系为 2 \times 荧光定量预混试剂增强版(super real premix plus)10.0 μ L, 正、反向引物各为 0.6 μ L, cDNA 模板 0.5 μ L, 重蒸水 8.3 μ L, 终体积 20.0 μ L。扩增程序 95 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 32 s, 共 35 个循环。基因相对表达量的计算采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法^[23]。采用 SPSS16.0 软件进行数据统计分析, 用方差分析(ANOVA)模块分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 马尾松 *PmPIP1* 基因 cDNA 全长的克隆

以 cDNA 为模板, 用简并引物进行 PCR 扩增, 获得 1 个 458 bp 的中间片段(图 1A)。在此基础上, 进行 5'端与 3'端 PCR 扩增。结果显示: 5'-RACE 在 520 bp 左右获得 1 条亮带(图 1B), 3'-RACE 在 460 bp 左右获得 1 条亮带(图 1C)。PCR 产物经回收、连接、转化、测序及拼接, 获得 *PmPIP1* 基因序列。为验证 *PmPIP1* 序列准确性, 进行基因全长 PCR 扩增, 在 867 bp 左右获得 1 条亮带, 大小与拼接得到的 *PmPIP1* 基因的完整开放阅读框大小一致(图 1D)。阳性克隆经测序证实扩增序列与拼接结果一致。此基因已登录 GenBank, 登录号为 KF582038。对 *PmPIP1* 基因全长序列分析表明: 全长 cDNA 为 1 301 bp, 含 1 个完整开放阅读框 867 bp, 5'末端非翻译区 99 bp, 3'末端非翻译区 335 bp, 在 100 bp 处发现起始密码子 ATG, 964 bp 处发现终止密码子 TAG, 编码 288 个氨基酸(图 2)。利用 NCBI 的 BLAST 对 *PmPIP1* 进行蛋白保守区预测(图 3), 结果显示: *PmPIP1* 有 1 个 MIP 保守区。*PmPIP1* 的氨基酸残基在 MIP 匹配区内与 MIP 蛋白保守区序列完全一致, 可以推测 *PmPIP1* 基因是水通道蛋白基因家族一员。

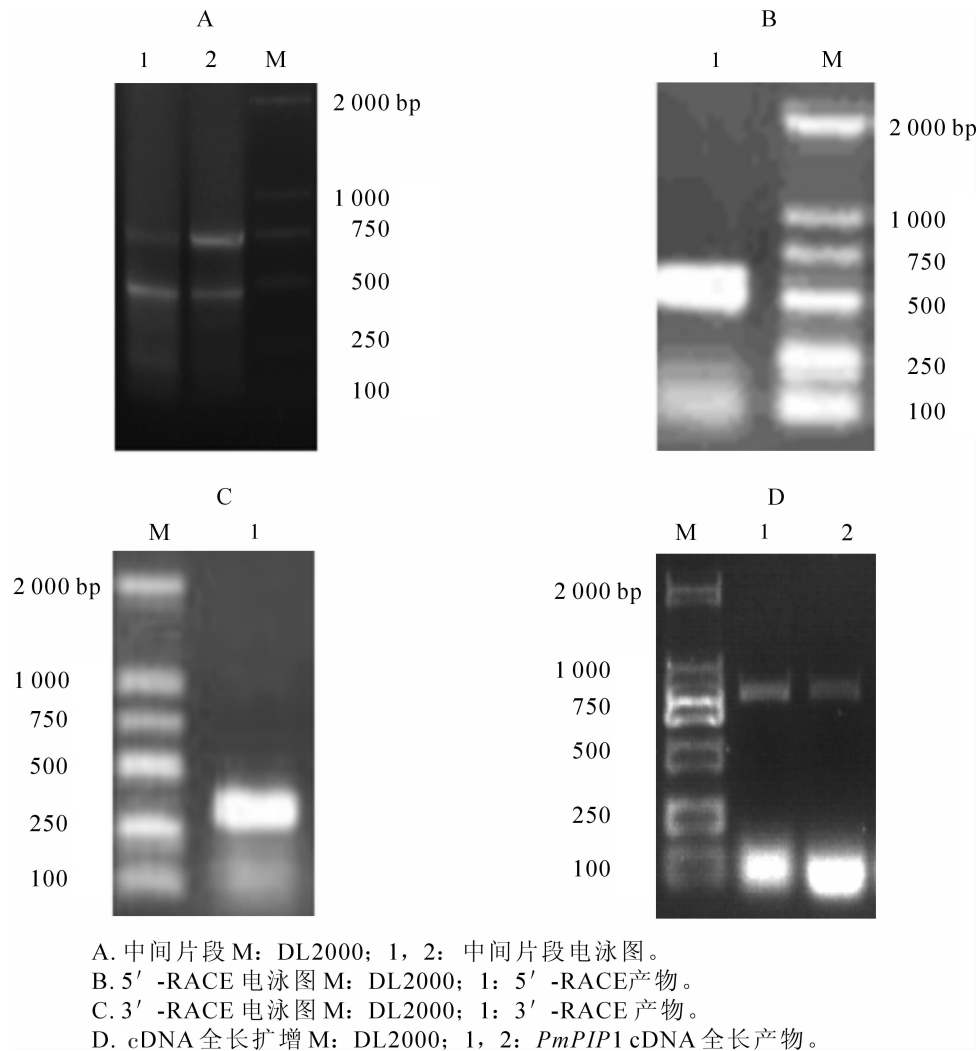


图1 琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis results

2.2 生物信息学分析

ProtParam 分析表明 *PmPIP1* 蛋白分子量为 30.86 kD, 理论等电点为 8.48。此蛋白中相对含量比较多的氨基酸是甘氨酸 Gly(G)和丙氨酸 Ala(A), 分别为 36 和 34 个; 蛋白质不稳定指数为 30.91, 属于稳定蛋白。经 Signal P 分析, 没有信号肽切割位点, 说明此蛋白为非分泌蛋白。ProtScale 表明此转运蛋白符合膜蛋白的特征, 具有较强的疏水性。Predictprotein 显示 *PmPIP1* 蛋白含有 1 个依赖于 cAMP and cGMP 蛋白激酶磷酸化位点、2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 10 个肉豆蔻酰化位点。蛋白激酶 C 在许多信号通路中的功能与膜结合密切相关, N-豆蔻酰化一般被认为是一个组成性的过程和一个永久性的修饰, 起开关作用^[24]。这些位点可能与 *PmPIP1* 调控关系密切。

运用 TMHMM Server 软件对 *PmPIP1* 进行跨膜区分析, 膜螺旋中氨基酸期望值高达 127.431 43, 且具有水通道蛋白典型的 6 个跨膜区(TM1~TM6), 由膜两侧的 5 个亲水环(Loop A, B, C, D, E)连接, A, C 和 E 环在细胞膜外, B, D 环及 N, C 末端都位于细胞膜内(图 4)。TM2 和 TM3 之间, TM5 与 TM6 之间, 各包含有 1 个天门冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸 Asn-Pro-Ala(NPA)保守结构域, NPA 高度保守, 几乎所有的 MIP 均具有此结构域。*PmPIP1* 具有质膜水通道蛋白 C 环和 E 环的特征序列(GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN)以及水通道形成有关的高度保守的 EXXTXXF/L 单元, 这与已经证明具有水通道蛋白功能的 *AtPIP1* 功能区的氨基酸序列高度一致。N 末端 53 个氨基酸, C 末端 9 个氨基酸, 符合植物水通道蛋白 PIP1 亚家族成员的 N-端长、C-端短的特点, 因此, 推测 *PmPIP1* 基因属于 PIP1 亚家族成员。

将 *PmPIP1* 与已知的其他植物水通道蛋白进行氨基酸序列多重比对分析, 结果表明: *PmPIP1* 与挪威

```

1   TTGATCACACATTTCATTTCATTTCGCTATTTCGCTACTATTTGGCTTTGTTTCGACTGAGTTCAGACAGTCTCGGAATCCTCTGGTTCTTTGTGTGAA
100  ATG GAA GGA AAA GAA GAA GAC GTT AAG CTC GGG GCG AAC AAG TAT TCC GAG AGG CAG CCG CTG GGG ACT GCG GCA
1   M   E   G   K   E   E   D   V   K   L   G   A   N   K   Y   S   E   R   Q   P   L   G   T   A   A
                                     N端(1~53aa)
175  CAG ACG AGG GAA AAG GAT TAC AAG GAG CCG GGT CCC GCG CCA CTG TTC GAA CCC GGG GAG TTG GCG TCA TGG TCC
26   Q   T   R   E   K   D   Y   K   E   P   G   P   A   P   L   F   E   P   G   E   L   A   S   W   S
250  TTC TGG AGG GCG GGT ATT GCA GAG TTC ATG GCG ACT TTC TTG TTT CTT TAC ATC ACG ATC CTC ACG GTC ATG GGT
51   F   W   R   A   G   I   A   E   F   M   A   T   F   L   F   L   Y   I   T   I   L   T   V   M   G
                                     TM1(54~76aa)
325  GTC AAG AGG GCC GAC AAT GTT TGC ACT GGA TCT GTT GGA ATT CAG GGG ATT GCA TGG GCC TTT GGG GGA ATG ATC
76   V   K   R   A   D   N   V   C   T   G   S   V   G   I   Q   G   I   A   W   A   F   G   G   M   I
                                     A环(77~90aa)
400  TTC TGT CTC GTC TAT TGC ACA GCC GGT ATT TCA GGT GGT CAT ATT AAC CCA GCA GTG ACC TTT GGG CTG TTC TTG
101  F   C   L   V   Y   C   T   A   G   I   S   G   G   H   I   N   P   A   V   T   F   G   L   F   L
                                     TM2(91~113aa)                                     B环(114~133aa)
475  GCC AGA AAG CTG TCT CTG CCC CGG GCT GTG TTC TAC ATG ATA TGT CAG TGC TTG GGA GCC ATC TGT GGC GCT GGT
126  A   R   K   L   S   L   P   R   A   V   F   Y   M   I   C   Q   C   L   G   A   I   C   G   A   G
550  GTT GTG AAG GGC TTC ATG GAA GGC GAG TAC CAA GCG GAC GGT GGA GGT GCT AAC TCT GTG GCT CAT GGC TAC ACC
151  V   V   K   G   F   M   E   G   E   Y   Q   A   D   G   G   G   A   N   S   V   A   H   G   Y   T
                                     TM3(134~156aa)                                     C环(157~178aa)
625  AAG GGA GAT GGC TTG GGT GCT GAG ATT GTG GGA ACC TTC GTT CTG GTC TAC ACC GTT TTC TCT GCT ACC GAT GCC
176  K   G   D   G   L   G   A   E   I   V   G   T   F   V   L   V   Y   T   V   F   S   A   T   D   A
                                     TM4(179~196aa)                                     D环(197~208aa)
700  AAA CGA AGC GCC CGG GAT TCT CAC GTT CCT CTG CTA GCA CCA CTT CCA ATA GGG TTT GCA GTT TTT CTG GTT CAC
201  K   R   S   A   R   D   S   H   V   P   L   L   A   P   L   P   I   G   F   A   V   F   L   V   H
775  CTT GCC ACA ATT CCT ATC ACT GGA ACT GGC ATC AAC CCT GCC CGA AGC TCG GGA GCT GCC ATC ATC TAC AAC AAG
226  L   A   T   I   P   I   T   G   T   G   I   N   P   A   R   S   S   G   A   A   I   I   Y   N   K
                                     TM5(209~231aa)                                     E环(232~256aa)
850  TCT CGT GTT TGG GAT GAC CAT TGG ATT TTC TGG GTC GGT CCA TTC TTG GGC GCT GGC TTG GCA GCT ATT TAC CAC
251  S   R   V   W   D   D   H   W   I   F   W   V   G   P   F   L   G   A   G   L   A   A   I   Y   H
925  CAG ATG ATC ATT CGT GCC ATT CCC TTC AAA ACT CGC TCC TAG AAACAGCCAGCCTAGCCAGCATATTGGAGAGGGGGCTTAA
276  Q   M   I   I   R   A   I   P   F   K   T   R   S   *
TM6(257~279aa)                                     C端(280~288aa)
1:011 CTTTAAAGGCTGAGAGTCTGTTAAGCAGTGTGATTTGTCGTCTGATAAATGGTTTACAGGATGGATGATATCCATATATATGTTTAAAGTGTGATTTA
1:111 GGCCAGCGGAAGCCTCTGGCAGATTCTGCTCTCGTGGGCTTCAGTGGAGTGTATTATTCCTCTGTGTAAAATAATGGACTCTTTGGCTGTTCACACTCAGT
1:211 GGGTCTGTCTGTAATTTCTGCTTTATCTTTCTTTTAAATGGAAGTTATAGCCAGTGTGGTTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

下划线为跨膜区；虚线为质膜水通道蛋白家族的特征序列；方框部分为 NPA box；阴影部分表示环；终止密码子用“*”标注。

图 2 *PmPIP1* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide sequence and amino acid sequence of the *PmPIP1* gene

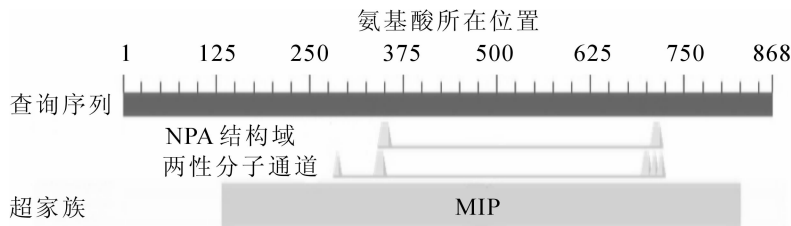


图 3 *PmPIP1* 核酸序列的保守结构域

Figure 3 Conserved domains of nucleic acid sequences of *PmPIP1*

云杉 *Picea abies* 具有极高的同源性，可达 95%，与拟南芥，葡萄 *Vitis vinifera*，陆地棉 *Gossypium hirsutum*，无梗花栎 *Quercus petraea*，野茶树 *Camellia sinensis*，小果野芭蕉 *Musa acuminata*，烟草 *Nicotiana tabacum*，白花柽柳 *Tamarix albiflorum* 等植物的同源性达 83%~87% (图 5)。由此可以看出：水通道蛋白基因家族编码蛋白氨基酸序列的保守性非常强，不同植物的水通道蛋白序列具有高度的同源性。

将 *PmPIP1* 氨基酸序列与其他植物 AQP 基

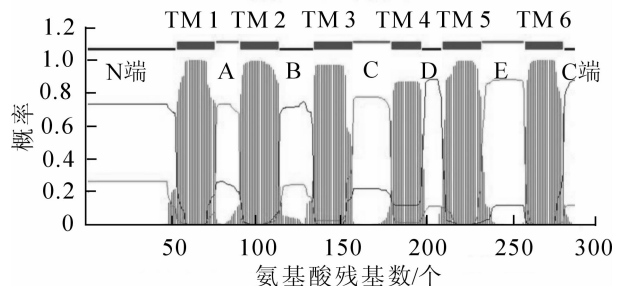
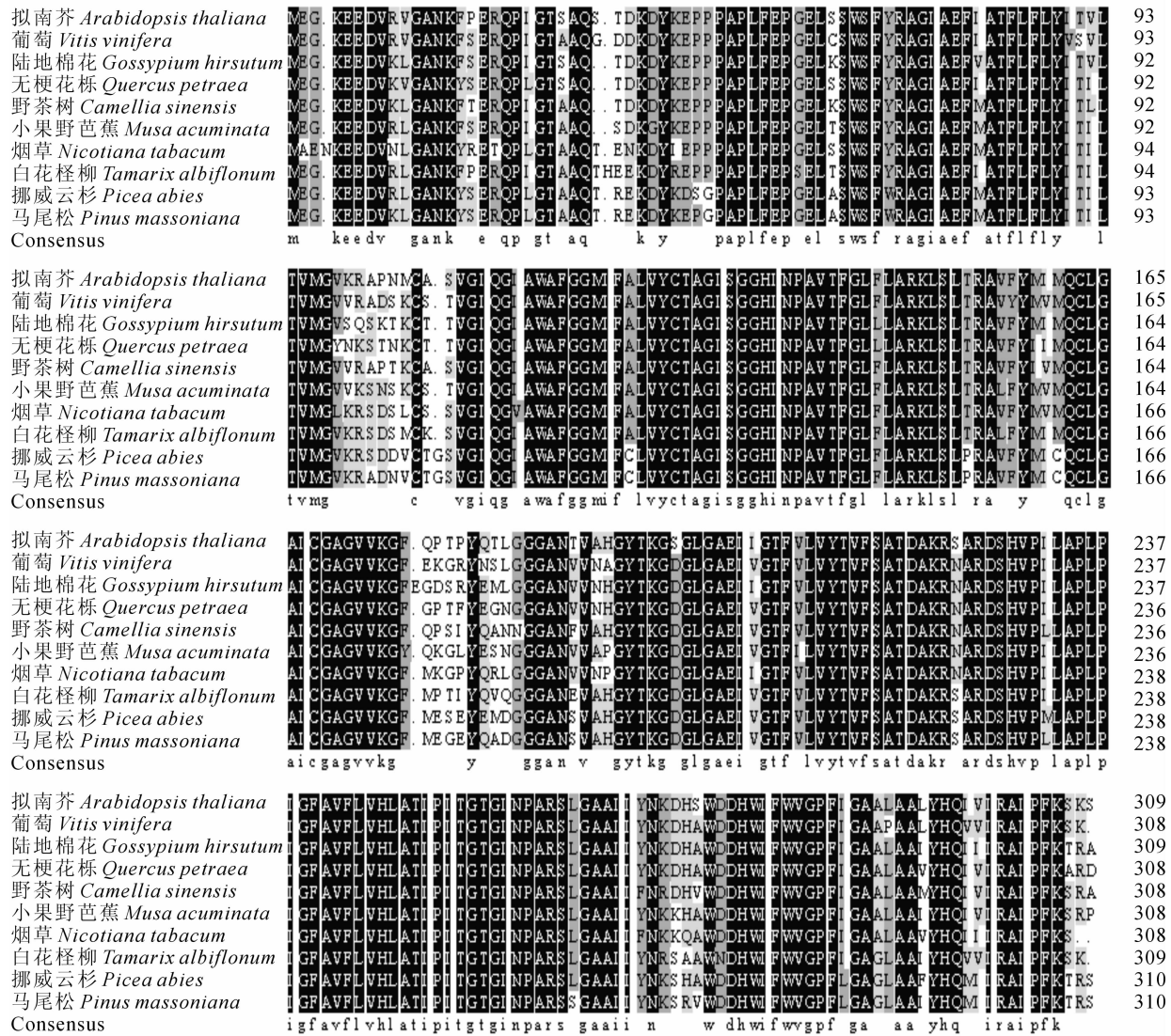


图 4 *PmPIP1* 蛋白跨膜区的预测

Figure 4 Prediction model for transmembrane domain of *PmPIP1* protein



AQP基因的来源和GenBank 登陆号:

拟南芥 NM_116268; 葡萄 DQ834694; 陆地棉花 DQ402075; 无梗花栎 JQ846271; 野茶树 KC008722; 小果野芭蕉 KC969669; 烟草 AF440271; 白花怪柳 DQ_660891; 挪威云杉 Z83830; 马尾松 KF582038.

图5 PmPIP1 氨基酸序列与其他植物 AQP 基因的氨基酸序列多重比对

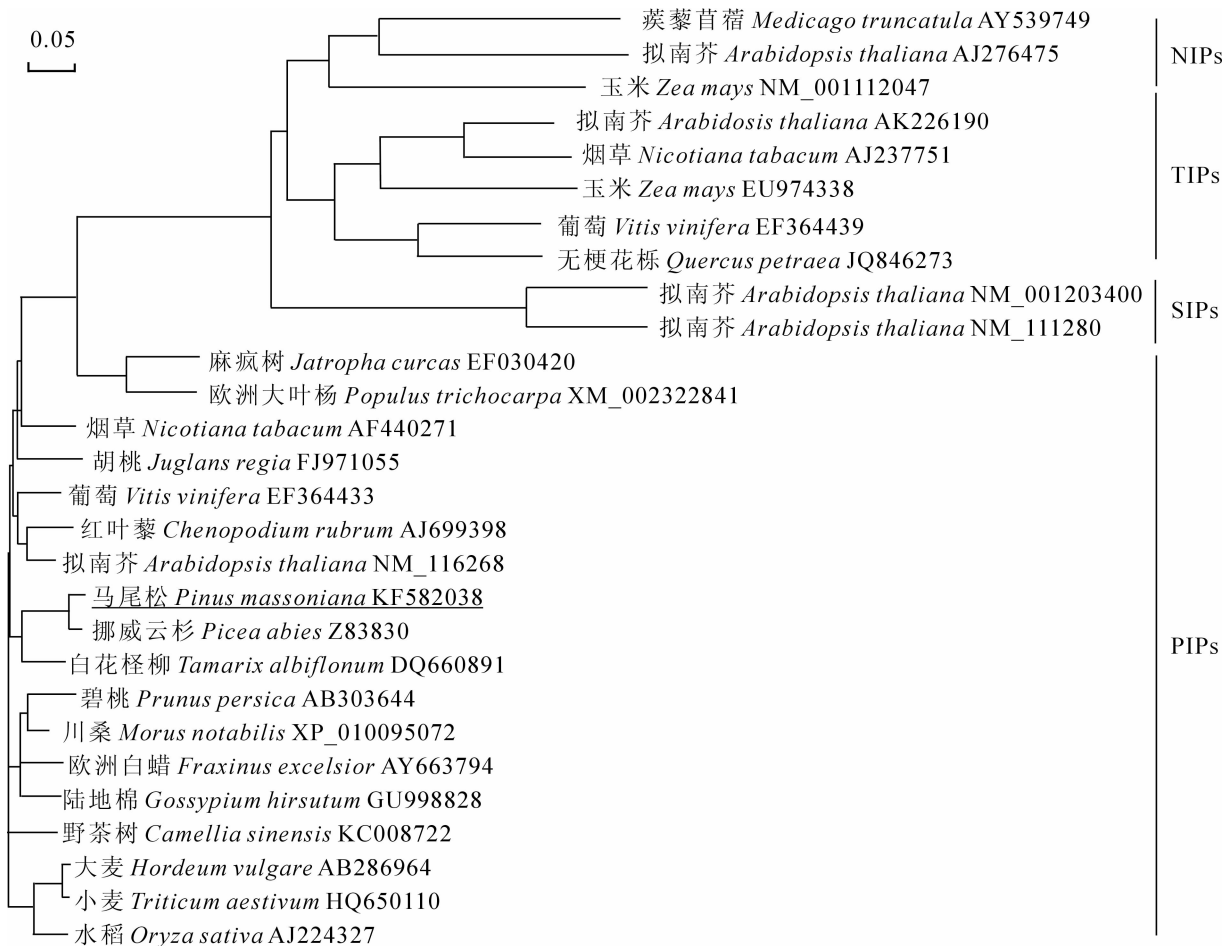
Figure 5 Multi-comparison in amino acid sequence of AQP gene between *Pinus massoniana* and other plant species

因进行系统进化树分析(图6)。结果表明: PmPIP1 与挪威云杉亲缘关系最近, 而且明显可以看出 PmPIP1 与 PIPs 蛋白聚为一类, 与 NIPs, TIPs, SIPs 蛋白等进化距离较远(图6)。因而推测 PmPIP1 在 PIPs 蛋白进化上是保守的。

经 SWISS-MODEL 模型, 采用自动搜索模式对 PmPIP1 氨基酸三级结构进行预测。结果显示: 模型残基从 44~278 bp, 三级结构预测的模板是菠菜 *Spinacia oleracea*(2b5fA), 序列同源性 77.872%。经 Rasmol 查看, 发现两者的结构十分相似(图7)。

2.3 PmPIP1 基因在马尾松各组织中的表达及干旱胁迫下的表达分析

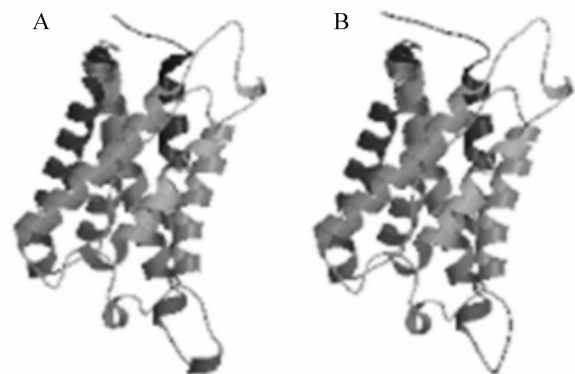
分别以马尾松根、茎和叶 cDNA 为模板, 进行 PmPIP1 基因的 RT-PCR 反应, 18S 作为内参基因, 结果如图 8A 所示。PmPIP1 在根、茎、叶中均有表达, 根中表达量最高, 其次是茎和叶。为明确干旱胁迫对 PmPIP1 基因表达的影响, 使用 qRT-PCR 技术研究马尾松根、茎和叶表达模式。在干旱胁迫下, 以 18S 为内参分析(图 8B), PmPIP1 基因在根、茎中表达水平基本逐步升高, 且在第 10 天表达程度最为强烈, 而后开始降低; 叶中表达量差异不大。以 UBC 为内参分析(图 8C), 在根、茎、叶中表达水平趋势基本与以 18S 为内参的结果基本一致。上述结果暗示, PmPIP1 基因的表达与干旱胁迫相关。

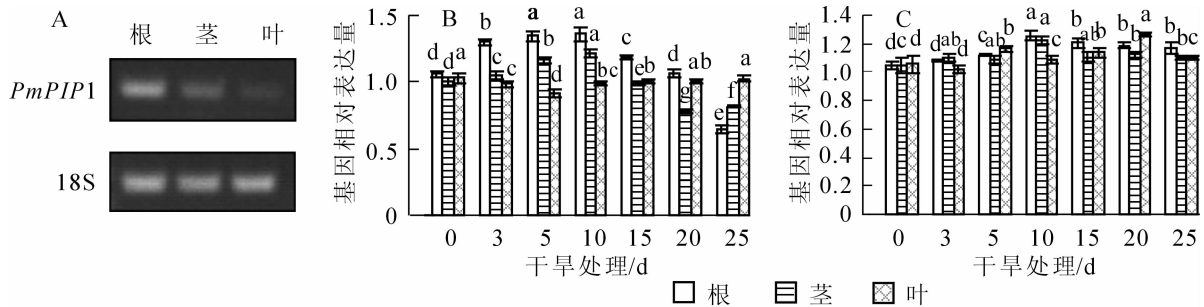
图 6 *PmPIP1* 蛋白的系统进化分析Figure 6 Phylogenetic analysis of *PmPIP1* and other plant species

3 讨论

马尾松是荒山造林的先锋树种，同时也是一种非常重要的耐旱树种，可能蕴含着丰富的抗逆基因资源。为了在分子水平上深入研究马尾松抗旱分子机制，本研究对马尾松重要的耐旱相关基因-水通道蛋白基因开展了研究。

通过 RT-PCR 及表达序列标签(EST)序列拼接，获得 *PmPIP1* 基因，该基因具有 MIP 家族典型的保守氨基酸序列 HINPAVTFG，2 个 NPA 保守肽段，6 个跨膜结构域，较长的 N 端和较短的 C 端，说明该蛋白属于水通道蛋白基因家族一员。聚类分析表明：*PmPIP1* 与挪威云杉同源关系达 95%，与其他 8 种植物 AQP 基因同源性达 83%~87%。将 *PmPIP1* 与其他植物 AQP 基因构建系统进化树分析，进一步推测 *PmPIP1* 属于质膜水通道蛋白 PIPs 亚家族，与挪威云杉亲缘遗传距离最近。三级结构预测表明：*PmPIP1* 与已登陆的菠菜(2b5fA) AQP 三级结构极为相似。大量研究已表明，AQP 是调节水分在细胞间以及植物整个体内水分平衡分子基础^[25]，其中大约 70%~90% 的水分受到水通道蛋白基因的表达调控^[26]。*PmPIP1* 基因与 AQP 基因的同源保守性以及基本结构的相吻合意味着 *PmPIP1* 在功能上可能具

A: *PmPIP1* 蛋白三维结构图；B: 菠菜 *Spinacia oleracea* AQP(2b5fA) 蛋白三维结构图。图 7 *PmPIP1* 蛋白三维结构预测与菠菜 AQP (2b5fA) 蛋白三维结构预测Figure 7 The 3-dimensional prediction of the *PmPIP1* and the spinach aquaporin (2b5fA)



A: *PmPIP1* 基因组织表达分析; B: 以18S为内标 *PmPIP1* 基因的相对表达量分析; C: 以UBC为内标 *PmPIP1* 基因的相对表达量分析。小写字母表示不同时间条件下基因表达的差异显著性($P < 0.05$)。

图8 *PmPIP1* 基因的相对表达量分析

Figure 8 Analysis of relative expression level of *PmPIP1*

有与其他物种非常相近的作用模式^[27-28]。

植物 AQP 的转运活性受磷酸化调控, 是细胞信号转导与水分运输调节的媒介, 磷酸化时水通道蛋白水转运活性增加, 直接就近参与原位的快速、直接、可逆的门控^[20,25], 促进上调水通道的活性^[29]。*PmPIP1* 蛋白包括 5 个色氨酸(Ser), 2 个苏氨酸(Thr)和 2 个酪氨酸(Tyr)。这些位点可能成为蛋白激酶磷酸化位点, 直接或间接参与 *PmPIP1* 对水分或其他物质运输的调节。

在研究植物抗旱分子机制的过程中, 从干旱诱导的基因中已分离出很多水通道蛋白基因^[30-31]。AQP 蛋白受环境条件和植物激素的调节, 有些组成型表达, 有些特异性表达, 参与根叶生长、有性繁殖及非生物胁迫等过程^[32-34], 表达方式也存在显著差异^[35]。Marc 等^[36]研究表明, *PIP1* 和 *PIP2* 基因在生殖器官中的表达水平不同, *PIP1* RNA 在柱头累积, *PIP1* 和 *PIP2* RNA 在花粉囊的几乎所有组织中多有表达。*JcPIP* 在植株的整个生长发育期都有表达, 在干旱胁迫下表达量增加^[32]。*PIP2* 在木榄树 *Bruguiera gymnorhiza* 根中表达量明显强于嫩茎和叶^[37]。本研究发现 *PmPIP1* 基因在马尾松的根、茎、叶中均有表达, 根中表达量最高, 茎次之, 叶最低。水通道蛋白在不同组织中的含量不同, 并随细胞生理状态和环境与刺激产生波动^[38]。*PmPIP1* 基因在干旱胁迫不同时期的表达特性分析显示, *PmPIP1* 在根、茎中表达水平首先呈上升趋势, 表明干旱初期随着时间延长, *PmPIP1* 受到水分亏缺的诱导, 表达量增加, 到第 10 天表达量达到最高值, 随后由于 *PmPIP1* 无法再适应干旱的加剧, 于是呈现下降趋势; 叶中表达量差异不大。推测 *PmPIP1* 基因的这种表达模式可能与植物在干旱胁迫下首先由根系从土壤中吸收水分, 再经木质部导管向上运输最后由叶片蒸腾散失的生理现象相关。

XU 等^[39]分离到 *MaPIP1;1* 基因, 并且在拟南芥中过表达 *MaPIP1;1* 增强了转基因植株的耐盐和渗透胁迫能力。因此将 *PmPIP1* 转入模式植物(拟南芥、烟草等)并验证是否能提高转基因植株抗旱能力需要进一步验证。本实验室目前正在进行转基因研究, 以期为该基因在植物中的进一步利用奠定基础。

4 参考文献

- [1] MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU D T, *et al.* Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, **59**: 595 - 624.
- [2] MAUREL C, REIZER J, SCHROEDER J I, *et al.* The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes* [J]. *EMBO J*, 1993, **12**(6): 2241 - 2247.
- [3] LUDEWIG U, DYNOWSKI M. Plant aquaporin selectivity: where transport assays, computer simulations and physiology meet [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(19): 3161 - 3175.
- [4] PIEŃKOWSKA, J R, KOSICKA E, WOJTKOWSKA M, *et al.* Molecular identification of first putative aquaporins in snails [J]. *J Membrane Biol*, 2014, **247**(3): 239 - 252.
- [5] 邹智, 王丹华, 莫业勇, 等. 橡胶死皮相关液泡型水通道蛋白基因 *TIP1* 的克隆与序列分析[J]. *安徽农业科学*, 2013, **41**(36): 13851 - 13854.
ZOU Zhi, WANG Danhua, MO Yeyong, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of a tonoplast aquaporin gene *TIP1* associated with tapping panel dryness in *Hevea brasiliensis* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, **41**(36): 13851 -

- 13854.
- [6] ALEXANDERSSON E, FRAYSSE L, SJÖVALL-LARSEN S, *et al.* Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, **59**(3): 469 – 484.
- [7] LIAN Hongli, YU Xin, YE Qin, *et al.* The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, **45**(4): 481 – 489.
- [8] LI Guowei, PENG Yanhui, YU Xin, *et al.* Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice [J]. *J Plant Physiol*, 2008, **165**(18): 1879 – 1888.
- [9] JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, *et al.* The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic protein in plants [J]. *Plant Physiol*, 2001, **126**(4): 1358 – 1369.
- [10] CHAUMONT F, BARRIEU F, WOJCIK E, *et al.* Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize [J]. *Plant Physiol*, 2001, **125**(3): 1206 – 1215.
- [11] SUGA S, IMAGAWA S, MAESHIMA M. Specificity of the accumulation of mRNAs and proteins of the plasma membrane and tonoplast aquaporins in radish organs [J]. *Planta*, 2001, **212**(2): 294 – 304.
- [12] 丁贵杰, 周志春, 王章荣, 等. 马尾松纸浆用材林培育与利用[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 111.
- [13] 谌红辉, 丁贵杰. 马尾松造林密度效应研究[J]. 林业科学, 2004, **40**(1): 92 – 98.
CHEN Honghui, DING Guijie. Study on planting density effects for Masson pine plantation [J]. *Sci Silv Sin*, 2004, **40**(1): 92 – 98.
- [14] 施积炎, 丁贵杰, 袁小凤. 不同家系马尾松苗木水分参数的研究[J]. 林业科学, 2004, **40**(3): 51 – 55.
SHI Jiyang, DING Guijie, YUAN Xiaofeng. Studies on water parameters in *Pinus massoniana* seedlings of different families [J]. *Sci Silv Sin*, 2004, **40**(3): 51 – 55.
- [15] 徐向华, 丁贵杰. 马尾松适应低磷胁迫的生理生化响应[J]. 林业科学, 2006, **42**(9): 24 – 28.
XU Xianghua, DING Guijie. Physiological and biochemical responses of *Pinus massoniana* to low phosphorus stress [J]. *Sci Silv Sin*, 2006, **42**(9): 24 – 28.
- [16] 何佩云, 丁贵杰, 谌红辉. 连栽马尾松人工林土壤肥力比较研究[J]. 林业科学研究, 2011, **24**(3): 357 – 362.
HE Peiyun, DING Guijie, CHEN Honghui. Comparison on soil fertilities of Masson pine plantations of different generations [J]. *For Res*, 2011, **24**(3): 357 – 362.
- [17] 丁贵杰. 马尾松人工纸浆材林采伐年龄初步研究[J]. 林业科学, 2000, **36**(1): 15 – 20.
DING Guijie. The preliminary study on optimum cutting age of pulpwood stand for Masson pine plantation [J]. *Sci Silv Sin*, 2000, **36**(1): 15 – 20.
- [18] 谌红辉, 丁贵杰, 温恒辉, 等. 造林密度对马尾松林分生长与效益的影响研究[J]. 林业科学研究, 2011, **24**(4): 470 – 475.
CHEN Honghui, DING Guijie, WEN Henghui, *et al.* Effects of planting density on growth and economic benefit of Masson pine plantation [J]. *For Res*, 2011, **24**(4): 470 – 475.
- [19] 王冰梅, 郭晋隆, 叶冰莹, 等. 马尾松银松素合酶基因启动子区的克隆及特征分析[J]. 亚热带农业研究, 2008, **4**(4): 292 – 296.
WANG Bingmei, GUO Jinlong, YE Bingying, *et al.* Molecular cloning and analysis of pinosylvin synthase gene promoter from *Pinus massoniana* [J]. *Subtrop Agric Res*, 2008, **4**(4): 292 – 296.
- [20] 李擎天, 赵宇, 周绮云, 等. 珠眉海棠水通道蛋白 *MzPIP1;1* 基因的克隆与表达分析[J]. 中国农业大学学报, 2012, **17**(3): 63 – 68.
LI Qingtian, ZHAO Yu, ZHOU Qiyun, *et al.* Cloning and expression analysis of *MzPIP1;1* gene from *Malus zumi* Mats [J]. *J China Agric Univ*, 2012, **17**(3): 63 – 68.
- [21] CUI Xianghuan, HAO Fushun, CHEN Hui, *et al.* Expression of the *Vicia faba* *VfPIP1* gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance [J]. *J Plant Res*, 2008, **121**(2): 207 – 214.
- [22] ZHOU Shiyi, HU Wei, DENG Xiaomin, *et al.* Overexpression of the wheat aquaporin gene, *TaAQPT7*, enhances drought tolerance in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e52439. doi: 10.1371/journal.pone.0052439.
- [23] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(9): 2002 – 2007.

- [24] 王垠, 刘关君, 阎秀峰, 等. 西伯利亚蓼 *PsPIP1* 基因的克隆及其在 NaHCO_3 胁迫下的表达[J]. 遗传, 2008, **30**(12): 1621 – 1628.
WANG Yin, LIU Guanjun, YAN Xiufeng, *et al.* Cloning of *PsPIP1* gene from *Polygonum sibiricum* Laxm. and analysis of its expression in response to NaHCO_3 [J]. *Hereditas*, 2008, **30**(12): 1621 – 1628.
- [25] JOHANSSON I, KARLSSON M, JOHANSON U, *et al.* The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2000, **1465**(1/2): 324 – 342.
- [26] HENZLER T, STEUDLE E. Reversible closing of water channels in charainternodes provides evidence for a composite transport mode of the plasma membrane [J]. *J Exp Bot*, 1995, **46**(2): 199 – 209.
- [27] 艾雪, 褚怀亮, 李雪芹, 等. 山核桃水通道蛋白 *CcPIP* 同源基因克隆与表达分析[J]. 福建林学院学报, 2009, **29**(3): 252 – 257.
AI Xue, CHU Huailiang, LI Xueqin, *et al.* The analysis of *Carya carthayensis* plasma membrane intrinsic protein gene *CcPIP* clone and expression [J]. *J Fujian Coll For*, 2009, **29**(3): 252 – 257.
- [28] 林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 中国水仙水通道蛋白基因 cDNA 克隆、序列分析与表达[J]. 福建农业学报, 2011, **26**(3): 371 – 376.
LIN Jiangbo, WANG Weiying, ZOU Hui, *et al.* Cloning, sequence analysis and expression of cDNA encoding aquaporin *NtPIP1* of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2011, **26**(3): 371 – 376.
- [29] CHAUMONT F, MOSHELION M, DANIELS M J. Regulation of plant aquaporin activity [J]. *Biol Cell*, 2005, **97**(10): 749 – 764.
- [30] LI Liang, WANG Weiqi, HUANG Shan, *et al.* Cloning and function analysis of a plasma membrane intrinsic protein gene, *GmPIP* in soybean (*Glycine max* L. Merr) [J]. *Australian J Crop Sci*, 2014, **8**(5): 738 – 746.
- [31] MA Pengda, LIU Jingying. Isolation and characterization of a novel plasma membrane intrinsic protein gene, *LcPIP1*, in *Leymus chinensis* that enhances salt stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, **166**(2): 479 – 485.
- [32] 王云霄, 张颖, 江璐珂, 等. 麻疯树水通道蛋白新基因 *JcPIP* 干旱胁迫下的功能分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, **16**(4): 289 – 295.
WANG Yunxiao, ZHANG Ying, JIANG Luding, *et al.* Cloning of a new aquaporin gene (*JcPIP*) from *Jatropha curcas* and analysis of its function under drought stress [J]. *J Trop & Subtrop Bot*, 2008, **16**(4): 289 – 295.
- [33] 张军锋, 邓西平, 慕小倩. 植物的水通道蛋白[J]. 植物生理学通讯, 2002, **38**(1): 88 – 91
ZHANG Junfeng, DENG Xiping, MU Xiaoqian. Plant aquaporin [J]. *Plant Physiol Commun*, 2002, **38**(1): 88 – 91.
- [34] 刘迪秋, 王继磊, 葛锋, 等. 植物水通道蛋白生理功能的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, **26**(5): 63 – 66.
LIU Diqiu, WANG Jilei, GE Feng, *et al.* Advances in the physiological functions of plant aquaporins [J]. *J Biol*, 2009, **26**(5): 63 – 66.
- [35] 王为, 王长彪, 陈浩东, 等. 棉花水通道蛋白序列生物信息学初步分析[J]. 浙江农业学报, 2013, **25**(1): 14 – 20.
WANG Wei, WANG Changbiao, CHEN Haodong, *et al.* Preliminary bioinformatics analysis of aquaporin sequences available in cotton [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2013, **25**(1): 14 – 20.
- [36] BOTS M, FERON R, UEHLEIN N, *et al.* *PIP1* and *PIP2* aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development [J]. *J Exp Bot*, 2005, **56**(409): 113 – 121.
- [37] 祝艺懿, 韩渊怀, 李正国, 等. 红树林植物木榄水通道基因的克隆和表达[J]. 植物生理学通讯, 2007, **43**(3): 438 – 442.
ZHU Yiyi, HAN Yuanhuai, LI Zhengguo, *et al.* Cloning and expression of a new aquaporin gene from *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam [J]. *Plant Physiol Comm*, 2007, **43**(3): 438 – 442.
- [38] 刘悦霞, 梁卫红, 张利娟. 水稻叶片中水通道蛋白基因 *OsAQP* 的表达分析[J]. 中国水稻科学, 2008, **22**(5): 545 – 547.
LIU Yuexia, LIANG Weihong, ZHANG Lijuan. Expression analysis on *OsAQP* gene in rice leaves [J]. *Chin J Rice Sci*, 2008, **22**(5): 545 – 547.
- [39] XU Yi, HU Wei, LIU Juhua, *et al.* A banana aquaporin gene, *MaPIP1;1*, is involved in tolerance to drought and salt stresses [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, **14**(1): 59. doi:10.1186/1471-2229-14-59.