

## 黑果枸杞外整流钾离子通道 *SKOR* 基因的克隆及表达分析

刘丽萍<sup>1,2</sup>, 戴逢斌<sup>1,2</sup>, 张冲<sup>1,2</sup>, 田菊<sup>3</sup>, 陈金焕<sup>1,2</sup>

(1. 北京林业大学 林木育种国家工程实验室, 北京 100083; 2. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 3. 内蒙古自治区和盛生态科技研究院, 内蒙古 呼和浩特 011517)

**摘要:** 黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* 为多年生野生灌木, 由于其珍贵的营养价值和强非生物胁迫抗性受到广泛关注。为研究黑果枸杞钾离子(K<sup>+</sup>)/钠离子(Na<sup>+</sup>)选择性运输的分子机制, 从转录组数据中筛选出拟外整流 K<sup>+</sup>通道基因, 提取黑果枸杞根系总 RNA 为模板, 采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法分离出该拟似 *SKOR* 基因。序列分析显示: 该基因序列长 2 448 bp, 编码 815 个氨基酸。通过比对发现: 该基因与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等植物中已报道的 *SKOR* 基因编码的氨基酸序列同源性在 60%以上, 与几种茄科 Solanaceae 植物的 *SKOR* 同源性高达 90%以上。进一步对该基因进行表达分析, 结果显示: *LrSKOR* 被盐碱处理强烈诱导而被高盐处理微弱诱导, 盐碱处理是高盐处理的 6.81 倍, 是对照的 23.79 倍, 说明 *LrSKOR* 的表达受到盐以及盐碱胁迫调控, 并且 pH 值对其表达水平有显著影响。图 4 参 27

**关键词:** 林木育种学; 黑果枸杞; *SKOR* 基因; K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>比; pH 值; 耐盐性

**中图分类号:** S722.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2018)01-0104-08

## Cloning and expression analysis of the *SKOR* gene for an outward-rectifying K<sup>+</sup> channel in *Lycium ruthenicum*

LIU Liping<sup>1,2</sup>, DAI Fengbin<sup>1,2</sup>, ZHANG Chong<sup>1,2</sup>, TIAN Ju<sup>3</sup>, CHEN Jinhuan<sup>1,2</sup>

(1. National Engineering Laboratory of Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Inner Mongolia Hesheng Institute of Ecological Science & Technology, Huhhot 011517, Inner Mongolia, China)

**Abstract:** To determine the molecular mechanism of *Lycium ruthenicum*, a perennial shrub species that has attracted great interest in recent years due to its nutritional value and abiotic stress resistance, with its high salt tolerance capability, a potential outward-rectifying potassium channel gene was cloned based on a transcriptome sequencing database analysis. Analyses also included real time (RT)-polymerase chain reaction (PCR), a homology comparison analysis, and a gene expression analysis. Results of the RT-PCR indicated that the length of this potential *L. ruthenicum SKOR* (*LrSKOR*) gene was 2 448 bp encoding 815 amino acids. The homology comparison analysis showed that the *SKOR* gene shared more than a 60% amino acid sequence similarity with reported plants, such as *Arabidopsis thaliana*, and had over 90% similarity with other Solanaceae plants. Gene expression analysis with RT-PCR showed that the *LrSKOR* gene was strongly induced by NaHCO<sub>3</sub> stress and weakly induced by NaCl stress; its expression level with NaHCO<sub>3</sub> stress was 6.81 times higher than NaCl stress and 23.79 times higher than the control. Thus, expression of *LrSKOR*, regulated by both saline and saline-alkali stress, with pH imposed a strong influence on its expression. The results could help in *LrSKOR* gene function prediction as well as lay a foundation for further research of high salinity stress response in *L. ruthenicum*.

收稿日期: 2017-01-13; 修回日期: 2017-03-02

基金项目: 北京林业大学青年教师科学研究中长期项目(2016ZCQ05); 国家自然科学基金面上项目(31370597, 31670610); 内蒙古自治区科技重大专项(2014)

作者简介: 刘丽萍, 从事经济林育种研究。E-mail: liuliping@bjfu.edu.cn。通信作者: 陈金焕, 博士, 从事林木遗传育种研究。E-mail: chenjh@bjfu.edu.cn

[Ch, 4 fig, 27 ref.]

**Key words:** forest tree breeding; *Lycium ruthenicum*; *SKOR*;  $K^+/Na^+$  ratio; pH; salt response ability

植物中的 Shaker 家族是迄今为止研究最深入的钾转运家族之一, 被认为在植物钾离子( $K^+$ )吸收以及转运方面起到至关重要的作用<sup>[1-2]</sup>。最早报道的拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 内向整流  $K^+$ 通道 *AKT1* 属于 Shaker 家族, 它具有双亲和钾吸收特性, 主要在拟南芥根部表皮细胞和皮层细胞中表达, 在拟南芥吸收  $K^+$ 过程中起到关键作用。随后已陆续从其他植物中克隆得到该基因, 均表现出明显的组织特异性表达, 如 *OsAKT1* 主要在水稻 *Oryza sativa* 根中表皮和维管组织中表达<sup>[3]</sup>; *ZMK1* 主要在玉米 *Zea mays* 胚芽鞘皮层中表达<sup>[4]</sup>; *SeAKT1* 在盐角草 *Salicornia europaea* 成苗的根和冠中均有表达, 但在根中表达量略高<sup>[5]</sup>; *GkKT2* 在三叶期棉花 *Gossypium hirsutum* 根、茎、叶和顶芽等各部位均有表达, 但在叶中表达量较大<sup>[6]</sup>等。Shaker 通道家族也包括外整流  $K^+$ 通道, 但目前针对它的研究较少。*SKOR* 与 *AKT1* 在跨膜区具有很高的同源性, 但 C 端比 *AKT1* 多约 200 个氨基酸及 6 个锚蛋白重复基序(ankyrin repeat motif, AR)<sup>[7-8]</sup>。据报道<sup>[9]</sup>: 胞内  $K^+$ 浓度可以调节 *SKOR* 活性, 而对  $K^+$ 的感受性就是依赖 C 端结构域部分感应细胞内外电压差而实现的, *AKT1* 对于细胞内的  $K^+$ 却没有响应。GAYMARD 等<sup>[10]</sup>首次从拟南芥中克隆到编码外整流  $K^+$ 通道的基因 *SKOR*, 并发现它在根中柱组织特异表达, 且能被脱落酸(ABA)抑制, 其介导根细胞中的  $K^+$ 向木质部外流的转运。在玉米根皮层及中柱细胞中也检测到了外整流  $K^+$ 通道, 并确定其介导  $K^+$ 从中柱细胞外排到木质部汁液中, 外整流  $K^+$ 通道基因的这一功能在大麦 *Hordeum vulgare* 中也得到了验证<sup>[11-12]</sup>。另外, Shaker 钾离子通道的孔结构域和蛋白质氨基酸序列上的组氨酸残基高度保守, 这决定了其通道活性在很大程度上受细胞内外酸碱度调节, 比如, *KAT1* 活性在细胞膜内外低 pH 值的情况下被激活<sup>[13]</sup>, *SKOR* 的活性受酸碱度影响较大<sup>[14-16]</sup>。小白菜 *Brassica chinensis* 花粉质膜外整流  $K^+$ 通道受细胞内外 pH 值的影响, 从而影响花粉萌发和花粉管的伸长<sup>[17]</sup>。黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* 为茄科 Solanaceae 枸杞属 *Lycium* 多年生野生盐生类灌木, 主要生长在中国西北青海、新疆、甘肃等地的荒漠地区, 不但具有极强的耐旱、耐盐碱性, 还具有重要的经济价值和药用价值, 在生态建设和经济发展中有巨大的应用前景, 也是研究多年生植物抗逆机制的优良植物材料。已有研究结果表明<sup>[18]</sup>: 与宁夏枸杞 *Lycium barbarum* 相比, 黑果枸杞具有更强的耐盐能力。在盐分胁迫下, 黑果枸杞各器官中钠离子( $Na^+$ )和氯离子( $Cl^-$ )相对含量均增加, 叶片中积累最多,  $K^+/Na^+$ 比均下降, 在根中比值比地上部分高。但与宁夏枸杞相比, 黑果枸杞各器官中的  $K^+$ 含量下降相对较少, 积累的  $Na^+$ 和  $Cl^-$ 含量也相对较少, 甚至在  $450\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  氯化钠高盐胁迫下, 各器官中  $K^+/Na^+$ 比下降的幅度仍小于宁夏枸杞, 其中叶片组织中  $K^+/Na^+$ 比值显著高于同浓度胁迫下的宁夏枸杞, 但与拟南芥等传统植物相比, 黑果枸杞耐盐碱基因尤其是钾吸收相关基因的鉴定未见报道。为进一步深入研究黑果枸杞的耐盐机制, 本研究采用反转录聚合酶链式反应(reverse transcription PCR, RT-PCR)方法克隆了黑果枸杞 *SKOR* 基因并分析其序列特征, 研究了不同 pH 值的高盐环境对 *SKOR* 基因表达丰度的影响, 为以后研究外整流  $K^+$ 通道 *SKOR* 在黑果枸杞体内能否维系高  $K^+/Na^+$ 比, 进而在提高植株耐盐性中发挥重要作用而奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

黑果枸杞种子采自青海省大格勒乡, 在北京林业大学林木育种国家工程实验室温室内进行播种培养。具体方法: 挑选籽粒饱满的黑果枸杞种子播种在以  $m$ (花卉土): $m$ (蛭石): $m$ (珍珠岩)=3:2:1 混合后的穴盘中, 每天定时喷施无菌水至发芽后, 配制 Hoagland 营养液进行浇灌。温室温度为  $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 光照  $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ , 空气相对湿度控制在 70%左右。以生长 4 周的黑果枸杞幼苗为实验材料。

### 1.2 总 RNA 的提取

取 4 周龄黑果枸杞幼苗的根系, 加入液氮研磨至粉末状。根据改进的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计法鉴定其完整性和质量。

### 1.3 引物的设计与合成

利用拟南芥等其他植物的 *SKOR* 核苷酸序列在实验室前期建立的本地黑果枸杞转录组数据库中进行

Blast 分析, 得到 1 条长度为 2 500 bp 左右的拟 *SKOR* 基因。根据转录组数据库中的片段利用 Primer 5.0 软件设计引物 P<sub>1</sub>(5'-ATGCACATTAATAATGGAGGAG-3')和 P<sub>2</sub>(5'-AGTTGATTCATTGTTCAAGTACAA-3'), 由上海生工生物工程技术服务公司合成引物后, 用于该黑果枸杞拟 *SKOR* 基因序列全长的扩增。

#### 1.4 RT-PCR 扩增

采用 RT-PCR 法进行基因克隆, PCR 扩增反应体系: 2× PCR Mix 10 μL, 上游引物和下游引物各 1 μL, cDNA 1 μL, 双蒸水 7 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 10 °C 保存。PCR 产物用体积分数为 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒操作说明书进行目的片段的回收和纯化。

#### 1.5 阳性克隆的鉴定与序列分析

将回收的 PCR 产物连接到 PMD18-T 载体上, 转化 Top10 大肠埃希菌 *Escherichia coli* 感受态细胞, 在含 50 mg·L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 LB 固体平板培养基上进行蓝白斑阳性克隆筛选, 筛选出的阳性克隆经 PCR 鉴定后, 送至上海生工生物工程技术服务公司测序。所测序列的比对分析在 DNAMAN 6.0 生物软件上进行, 在美国生物技术信息中心 (NCBI) 网站 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) 上进行 Blast 搜索。利用 NCBI ORFfinder 工具确定基因的开放阅读框。蛋白质亲/疏水性预测用 ExPASy 网站的在线软件 ProtScale 分析, 以 Hphob.Kyte& Doolittle 为默认值。进化树分析先使用 Clustal X 2.1 软件对来自番茄 *Solanum lycopersicum*, 马铃薯 *Solanum tuberosum*, 胡杨 *Populus euphratica* 等物种的 *SKOR* 成员进行序列比对, 然后使用 MEGA 5.1 Beta 3 软件用邻接法构建。

#### 1.6 基因表达分析

对 4 周龄的黑果枸杞苗分别用 300 mmol·L<sup>-1</sup> 氯化钠与 450 mmol·L<sup>-1</sup> 碳酸氢钠 (pH 9.0) 处理 6 h, 利用天根生化科技有限公司 Real Master Mix (SYBR Green) PCR 试剂盒, 采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 法, 检测 *LrSKOR* 基因的相对表达量。扩增目标 *LrSKOR* 基因引物设计为 *LrSKOR*-F: 5'-ATGCACATTAATAATGGAGGAG-3' 和 *LrSKOR*-R: 5'-AGTTGATTCATTGTTCAAGTACAA-3'; 以黑果枸杞延伸因子 1α 基因 *EF1α*<sup>[19]</sup> 作为内参基因, 其引物为 *EF1α*-F: 5'-GAAGGGTGTCCCTCAGATCA-3' 和 *EF1α*-R: 5'-CCGTCC ATGTCGTCTCTTTT-3', 对反转录所得的 cDNA 按照 1, 1/10, 1/100, 1/1 000, 1/10 000 进行稀释, 绘制相对标准曲线。实时荧光定量设置反应程序为: 94 °C 2 min, 94 °C 20 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 设置 36 个循环, 各轮循环第 3 步进行荧光采集, 最后 95 °C 变性 1 min, 退火至 55 °C。根据荧光值, 绘制熔点曲线。内参基因的表达与 *LrSKOR* 基因按照同样的反应程序同时测试。独立提取 3 次待测样品的 RNA 作为生物学重复, 设置技术性重复 3 次·样品<sup>-1</sup>。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 的提取及 *LrSKOR* 基因的克隆及鉴定

取生长 4 周的黑果枸杞幼苗根部作为实验材料, 提取总 RNA, 凝胶电泳检测结果显示 28 S RNA 条带亮度约为 18 S RNA 的 2 倍, 表明所提取的黑果枸杞总 RNA 完整性较好。进一步用紫外分光光度计检测得出  $D_{(260)}/D_{(280)}$  为 2.1, 说明所提取的 RNA 纯度较好, 可用于进一步实验。

按照反转录试剂盒操作说明, 以总 RNA 反转录得到第 1 链 cDNA 后, 以该 cDNA 为模板, 以拟 *SKOR* 基因的引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 进行 PCR 扩增。扩增产物经凝胶电泳检测发现亮带, 且上下无杂带, 与预期片段大小一致, 推测可能是目的基因。将连接有纯化目的片段的 PMD18-T 克隆载体转化大肠埃希菌 Top10 后, 从转化的平板上随机挑取 6 个白色菌斑振摇过夜培养, 进行 PCR 扩增, 得到的扩增条带大小与 RT-PCR 结果一致, 表明这些克隆为阳性克隆。

### 2.2 核酸序列及基因编码蛋白的理化性质分析

将 PCR 产物进行测序, Genbank 登录号为 KY563342。测序所得到的 *SKOR* 基因序列全长为 2 448 bp, 包括 1 个完整的开放阅读框, 其编码的 *SKOR* 蛋白包含 815 个氨基酸残基。在 NCBI 数据库进行 Blast 序列比对分析结果显示, 该基因序列与拟南芥 (NM\_111153.3), 葡萄 *Vitis vinifera* (AJ490336), 蓖麻 *Ricinus communis* (XM\_002533405) 和胡杨 (EU382997.1) 等植物外整流 K<sup>+</sup> 通道基因的核苷酸序列的同源性均在 65% 以上, 其中与葡萄推测的外整流 K<sup>+</sup> 通道基因的核苷酸序列的同源性达到 70.36%; 通过和

茄科植物马铃薯(XM\_006352418.2), 番茄(XM\_004250158.3), 甜辣椒 *Capsicum annuum*(XM\_016696732.1) 等比对同源性很高, 其中与马铃薯全长同源性最高, 达到 90.31%, 表明本研究已克隆到外整流 K<sup>+</sup>通道基因全长, 将其命名为 *LrSKOR*。用 ExPASy 网站分析该蛋白的理化性质, 得到其相对分子量约为  $9.33 \times 10^4$ , 理论等电点为 6.32, 其中数量最丰富的氨基酸依次是亮氨酸(Leu), 异亮氨酸(Ile)和丝氨酸(Ser), 分别占 11.2%, 8.6%和 7.2%, 色氨酸(Trp)含量最少, 只占 1.2%。

### 2.3 蛋白质的保守结构域预测和亲/疏水性分析

利用 NCBI 网站 Conserved Domain 工具对 *LrSKOR* 氨基酸结构域进行预测。结果表明: *LrSKOR* 蛋白序列在 258~315 位存在 1 个与离子通道 Ion\_trans\_2 相似的保守结构域, Ion\_trans\_2 是 Ion\_trans\_2 超家族的一个成员。在 561~716 和 741~810 氨基酸序列位点还分别存在 1 个与 K<sup>+</sup>运输有关的离子通道的锚蛋白区(ANK)和 KHA(钾离子通道的四聚化结构域), KHA 在植物中一般位于 C 末端区。

运用 ExPASy 网站的在线分析软件 ProtScale, 以 Hphob. Kyte & Doolittle 为默认值对 *LrSKOR* 编码的蛋白质进行亲/疏水性预测, 得到 *LrSKOR* 的亲/疏水信号图。疏水性分析结果表明: *LrSKOR* 编码蛋白多肽链的第 113 号位点的缬氨酸(Val)疏水性最强, 具有最高的分值 3.167; 第 321 号的精氨酸(Arg)亲水性最强, 具有最低的分值 -2.956。从整个肽链上氨基酸分布来看, 亲水性氨基酸均匀分布在整个肽链中, 且多于疏水性氨基酸, 认为该蛋白是亲水性蛋白(图 1)。

用 DNAMAN 6.0 软件对 *LrSKOR* 的氨基酸全长序列与多种植物 SKOR 的氨基酸序列进行多序列比对。结果表明: 黑果枸杞 *LrSKOR* 与茄科植物甜辣椒、马铃薯、番茄等的外整流 K<sup>+</sup>通道的亲缘关系非常近, 氨基酸同源性高达 90% 以上, 分别为 90.05%, 90.70% 和 90.47%; 与拟南芥 *AtSKOR*, 苜蓿 *Medicago truncatula* 的 *MtSKOR*, 玉米的 *ZmZORK* 等的亲缘关系相对较远, 同源性为 62.36%~69.12%(图 2)。

为了分析黑果枸杞与其他植物中的 SKOR 系统发育进化关系, 利用 MEGA 5.1 Beta 3 软件对黑果枸杞 *LrSKOR* 与茄科及其他物种的蛋白氨基酸序列构建了进化树。由图 3 进化树可知: 黑果枸杞与茄科植物如番茄、马铃薯、甜辣椒等聚在一起, 表明它们之间亲缘关系较近, 而与胡杨、蓖麻、玉米等分类在不同分支上, 表示它们之间进化关系相对较远。

### 2.4 盐胁迫下 *LrSKOR* 基因的表达分析

由于 *LrSKOR* 基因可能参与调节黑果枸杞根部的离子选择性吸收, 本研究提取黑果枸杞根部总 RNA, 用荧光定量 PCR 法研究了该基因在高盐和盐碱不同胁迫下的诱导表达情况, 以 *EFl $\alpha$*  在根中的表达量定为“1”。按照相对定量公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  作图(图 4)。可以看出, *LrSKOR* 基因在对照、高盐胁迫以及盐碱胁迫下均有表达。高盐和盐碱胁迫下的表达量明显高于对照, 在盐碱胁迫下的表达丰度最高, 是高盐处理的 6.81 倍, 是对照的 23.79 倍。这表明 *LrSKOR* 基因参与高盐及盐碱环境胁迫响应, 并且与环境 pH 值之间可能存在较为紧密的关系。

## 3 讨论

植物体内丰富的 K<sup>+</sup>主要由植物根部从土壤中吸收而获得。研究表明<sup>[19]</sup>: 根部吸收 K<sup>+</sup>后经木质部装载, 在蒸腾拉力作用下, 随木质部流入地上部完成 K<sup>+</sup>在地上部分的积累, 外整流 K<sup>+</sup>通道在此运输过程中发挥重要作用。目前, 有关模式植物拟南芥的外整流 K<sup>+</sup>通道蛋白的研究最为集中, 而其他植物的外整流 K<sup>+</sup>通道蛋白的研究还较少。GAYMARD 等<sup>[10]</sup>从拟南芥中分离得到 K<sup>+</sup>外整流通道蛋白基因 *AtSKOR*, 通过非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 卵母细胞异源表达和突变体 *atskor* 试验证明, *AtSKOR* 介导 K<sup>+</sup>从木质部薄壁细胞向木质部的装载。沙冬青 *Ammopiptanthus mongolicus* 保卫细胞外整流 K<sup>+</sup>通道 *AmGORK* 也被克

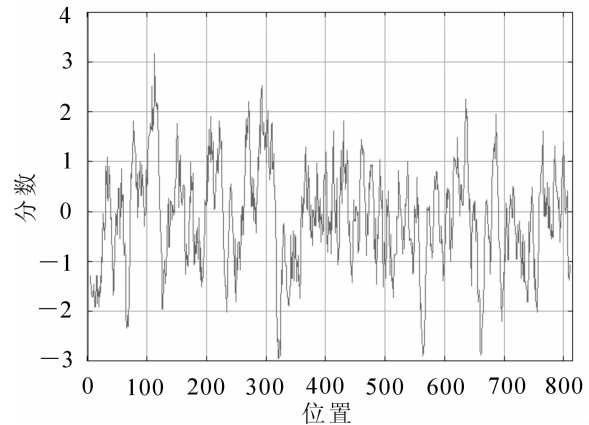
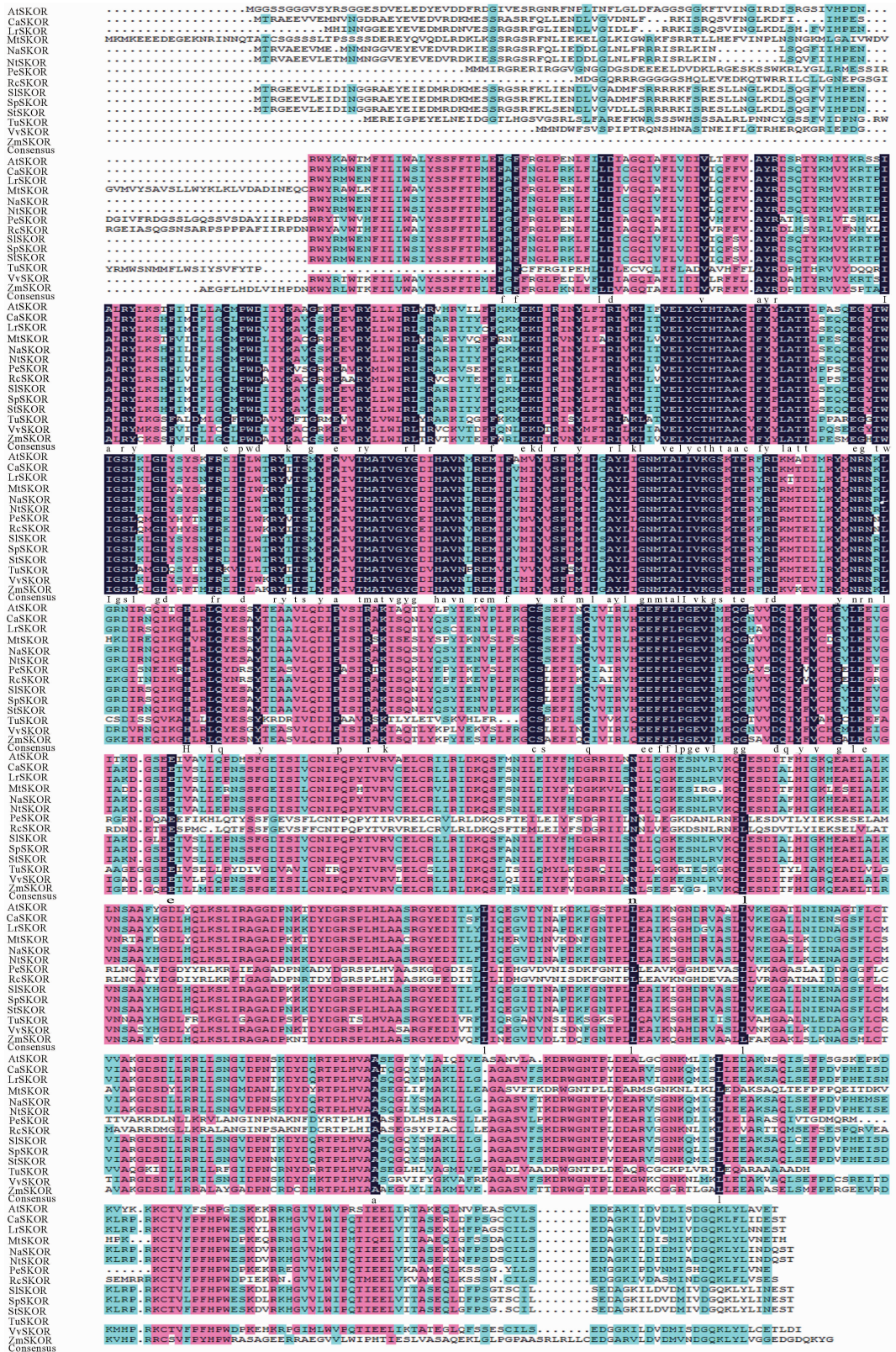


图 1 *LrSKOR* 蛋白亲水/疏水性分析

Figure 1 Hydrophobicity/phdrophilicity prediction of *LrSKOR* protein



图中LrSKOR为黑果枸杞外整流K<sup>+</sup>通道。用于对比的氨基酸序列分别来自拟南芥AtSKOR, 甜辣椒CaSKOR, 苜蓿MtSKOR, 烟草NaSKOR, 普通烟草NtSKOR, 胡杨PeSKOR, 蓖麻RcSKOR, 番茄SISKOR, 潘那利番茄SpSKOR, 马铃薯StSKOR, 小麦TuSKOR, 葡萄VvSKOR, 玉米ZmSKOR

图2 LrSKOR与其他植物SKOR开放阅读框氨基酸的多序列比对

Figure 2 Amino sequence alignment of LrSKOR with other plants SKOR

隆, 其活性与拟南芥 SKOR 一样对细胞外 pH 值很敏感, 在 2 个 pH 单元的酸化程度下活性被降低了

70%<sup>[20]</sup>。另有研究认为, 盐分胁迫下的外整流 K<sup>+</sup>通道蛋白 SKOR 可能是唯一对木质部汁液中钾分泌起作用的 Shaker K<sup>+</sup>通道, 它的活性可由木质部薄壁细胞中 Na<sup>+</sup>不断积累引起的薄壁细胞质膜去极化而被激活, 进而将 K<sup>+</sup>装载到木质部运往地上部芽<sup>[21-22]</sup>。木本植物霸王 *Zygophyllum xanthoxylum* 的 *ZxSKOR* 研究表明<sup>[23]</sup>: *ZxSKOR* 主要在根和茎中表达, 且其表达水平随叶片中 K<sup>+</sup>的浓度增加而显著提高, 并认为盐分胁迫下, 根和茎中的 *ZxSKOR* 相互协调很好地起到对 K<sup>+</sup>的长距离运输的作用。因此, *SKOR* 在植物地上部分 K<sup>+</sup>积累方面的作用不容忽视, 但关于它是如何参与 K<sup>+</sup>向木质部的运输还没有明确的证据。WANG 等<sup>[24]</sup>在小花碱茅 *Puccinellia tenuiflora* 中的研究证明, 其地上部分 K<sup>+</sup>的含量不受外界盐分浓度及处理时间的影响, 这是小花碱茅维持植株地上部高 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>比的重要原因之一。目前, 已克隆得到小花碱茅的外整流 K<sup>+</sup>通道 *PtSKOR* 基因片段<sup>[25]</sup>, 这将为进一步研究小花碱茅耐盐机理奠定基础。关于黑果枸杞耐盐生理生态机制的研究结果表明, Na<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>主要分布在黑果枸杞地上部分, 但根中 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>比值比叶片中高, 与其他积盐盐生植物盐爪爪 *Kalidium foliatum* 和白刺 *Nitraria tangutorum* 相比, 黑果枸杞的 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>比值高于这两者, 从而表现出相对较强的耐盐能力<sup>[26]</sup>, 由此看出, K<sup>+</sup>的积累和运输在表现黑果枸杞耐盐性方面扮演及其重要的角色, 但目前关于黑果枸杞 K<sup>+</sup>积累与运输的分子机制尚不清楚。

黑果枸杞作为沙漠中可以建群的多年生灌木, 具有很强的抗盐碱能力, 加上繁殖力强的特点, 有望成为耐盐碱研究的模式植物。近年来, 黑果枸杞耐盐碱研究日益受到关注, 本研究以前期测的转录组数据为基础, 从黑果枸杞根系中成功克隆得到 *SKOR* 基因。研究已知, *SKOR* 属于钾转运蛋白中的 Shaker 家族, 典型的植物 Shaker 通道蛋白从 N 末端至 C 末端包括一个大约由 60 个氨基酸组成的细胞质 N 末端区、由 6 个跨膜区构成的疏水核和一个很长序列的细胞质 C 末端区。其中, C 末端区含有调节结构域, 包括一个推测的环核苷酸结合区(CNBD)、一个存在于大部分 Shaker 通道中的锚蛋白区和一个靠近 C 末端的富含疏水性残基区(KHA)<sup>[27]</sup>。本研究对该基因编码的蛋白保守结构域预测, 发现其分别存在一个锚蛋白区和 KHA 四聚化保守结构域, 说明该基因编码的蛋白属于与 K<sup>+</sup>运输有关的 Shaker 家族蛋白。Shaker 通道的一个重要特点是能形成异源四聚体结构, KHA 是钾离子通道蛋白的四聚化结构域, 可能参与了这个过程, 从而使该蛋白起到调节细胞中的 K<sup>+</sup>转运活性的功能; 锚蛋白结合位点可使该蛋白质特异地定位在质膜上, 并潜在地影响蛋白与蛋白之间的相互作用。通过对 *LrSKOR* 编码氨基酸同源性序列比对和系统发育进化分析, 得出 *LrSKOR* 与拟南芥、胡杨、蓖麻等双子叶植物的外整流 K<sup>+</sup>通道相比同源性较低, 但与茄科植物如马铃薯、番茄等同源性达 90% 以上, 构建进化树中聚在一起(图 2), 这表明黑果枸杞与其他茄科植物 *SKOR* 蛋白进化程度相似, *LrSKOR* 同样行使推测的参与 K<sup>+</sup>向木质部运输的功能, 也说明了黑果枸杞与其他茄科植物存在较近的亲缘关系。本研究还发现, *LrSKOR* 在盐碱胁迫下的表达丰度最高, 高盐胁迫下次之, 对照最低。这表明, 黑果枸杞 *LrSKOR* 作为外整流 K<sup>+</sup>通道, 其基因表达除了受盐分胁迫影响外, 与土壤 pH 值还存在密切的联系, 这与很多前人研究的推论相一致。因此, *LrSKOR* 很可能在黑果枸杞耐盐性发挥方面具有重要作用。这也为进一步阐明盐生植物黑果枸杞 K<sup>+</sup>和 Na<sup>+</sup>选择性运输机制提供分子层面的依据,

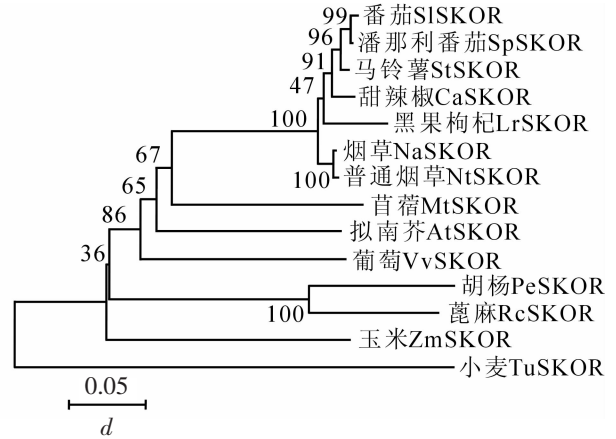


图 3 *LrSKOR* 与其他植物 *SKOR* 的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic analysis of *LrSKOR* with *SKOR* from different plant species

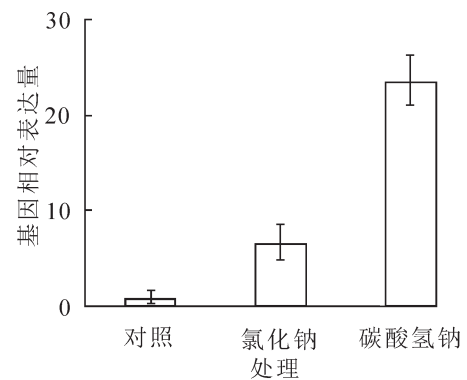


图 4 *LrSKOR* 在不同 pH 值盐分胁迫下的表达分析

Figure 4 Expression level under salt treatment of different pH values

具有重大的研究价值及应用前景。

#### 4 参考文献

- [1] XU Jiang, LI Haodong, CHEN Liqing, *et al.* A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2006, **125**(7): 1347 – 1360.
- [2] LUAN Sheng. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, **14**(1): 37 – 42.
- [3] 龙雨. 水稻钾离子通道 OsAKT1 生理功能及其调控机制的电生理学研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.  
LONG Yu. *Electrophysiological Analysis of Function Molecular Regulatory Mechanism for Rice Potassium Channel Os-AKT1* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [4] 闵水珠. 植物钾离子通道的分子生物学研究进展[J]. 浙江农业学报, 2005, **17**(3): 163 – 169.  
MING Shuizhu. The progress on the molecular biology of the K<sup>+</sup> channels in plants [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2005, **17**(3): 163 – 169. doi:10.3969/j.issn.1004-1524.2005.03.014.
- [5] 商玲. 盐草钾离子通道蛋白基因 *SeAKT1* 的克隆与表达[D]. 大连: 大连理工大学, 2013.  
SHANG Ling. *Cloning and Expression of A K<sup>+</sup> Channel Gene SeAKT1 from Salicornia europaea* [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2013.
- [6] 徐娟. 棉花钾离子通道基因 *GhAKT1* 和转运体基因 *GhKT2* 的克隆及功能分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.  
XU Juan. *Cloning and Functional Characterization of Potassium Channel Gene GhAKT1 and Potassium Transporter Gene GhKT2 from Cotton (Gossypium hirsutum L.)* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [7] MÄSER P, THOMINE S, SCHROEDER J I, *et al.* Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2001, **126**(4): 1646 – 1667.
- [8] ZIMMERMANN S, SENTENAC H. Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, **2**(6): 477 – 482.
- [9] LIU Kun, LI Legong, LUAN Sheng. Intracellular K<sup>+</sup> sensing of SKOR, a shaker-type K<sup>+</sup> channel from *Arabidopsis* [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2006, **46**(2): 260 – 268.
- [10] GAYMARD F, PILOT G, LACOMBE B, *et al.* Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap [J]. *Cell*, 1998, **94**(5): 647 – 655.
- [11] ROBERTS S K, TESTER M. Inward and outward K<sup>+</sup>-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize root cortex and stele [J]. *Plant J*, 1995, **8**(6): 811 – 825.
- [12] ROBERTS S K, TESTER M. Permeation of Ca<sup>2+</sup> and monovalent cations through an outwardly rectifying channel in maize root stelar cells [J]. *J Exp Bot*, 1997, **48**(309): 839 – 846.
- [13] HOTH S, HEDRICH R. Distinct molecular bases for pH sensitivity of the guard cell K<sup>+</sup> channels KST1 and KAT1 [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(17): 11599 – 11603.
- [14] LACOMBE B, PILOT G, GAYMARD F, *et al.* pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR [J]. *FEBS Lett*, 2000, **466**(2/3): 351 – 354.
- [15] GEIGER D, BECKER D, VOSLOH D, *et al.* Heteromeric AtKC1·AKT1 channels in *Arabidopsis* roots facilitate growth under K<sup>+</sup>-limiting conditions [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284**(32): 21288 – 21295.
- [16] HOTH S, DREYER I, HEDRICH R. Mutational analysis of functional domains within plant K<sup>+</sup> uptake channels [J]. *J Exp Bot*, 1997, **48**: 415 – 420.
- [17] FAN Liumin, WANG Yongfei, WU Weihua. Outward K<sup>+</sup> channels in *Brassica chinensis* pollen protoplasts are regulated by external and internal pH [J]. *Protoplasma*, 2003, **220**(3/4): 143 – 152.
- [18] 王龙强, 米永伟, 蔺海明. 盐胁迫对枸杞属两种植物幼苗离子吸收和分配的影响[J]. 草业学报, 2011, **20**(4): 129 – 136.  
WANG Longqiang, MI Yongwei, LIN Haiming. Effect of salt stress on ion absorption and distribution of two *Lycium* seedlings [J]. *Acta Pratac Sin*, 2011, **20**(4): 129 – 136.
- [19] ZENG Shaohua, LIU Yongliang, WU Min, *et al.* Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization and its applications in *Lycium* [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(5): e97039. doi: 10.1371/journal.pone.0097039.
- [20] LI Junlin, ZHANG Huanhao, LEI Han, *et al.* Functional identification of a GORK potassium channel from the an-

- cient desert shrub *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.) Cheng f. [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, **35**(4): 803 – 815.
- [21] ROBERTS S K, TESTER M. Permeation of  $\text{Ca}^{2+}$  and monovalent cations through an outwardly rectifying channel in maize root stelar cells [J]. *J Exp Bot*, 1997, **48**(4): 839 – 846.
- [22] WEGNER L H, de BOER A H. Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in  $\text{K}^+$  homeostasis and long-distance signaling [J]. *Plant Physiol*, 1997, **115**(4): 1707 – 1719.
- [23] HU Jing, MA Qing, KUMAR T, *et al.* *ZxSKOR* is important for salinity and drought tolerance of *Zygophyllum xanthoxylum* by maintaining  $\text{K}^+$  homeostasis [J]. *Plant Growth Regul*, 2016, **80**(2): 195 – 205.
- [24] WANG Chunmin, ZHANG Jinlin, LIU Xuesong, *et al.* *Puccinellia tenuiflora* maintains a low  $\text{Na}^+$  level under salinity by limiting unidirectional  $\text{Na}^+$  influx resulting in a high selectivity for  $\text{K}^+$  over  $\text{Na}^+$  [J]. *Plant Cell Environ*, 2009, **32**(5): 486 – 496.
- [25] 王茜, 王沛, 王锁民. 盐生植物小花碱茅外整流  $\text{K}^+$ 通道 *SKOR* 基因片段的克隆及序列分析[J]. 草业科学, 2012, **29**(8): 1218 – 1223.  
WANG Qian, WANG Pei, WANG Suomin. Cloning and sequence analysis of outward-rectifying potassium channel *SKOR* gene fragment from halophyte *Puccinellia tenuiflora* [J]. *Pratac Sci*, 2012, **29**(8): 1218 – 1223.
- [26] 王龙强. 盐生药用植物黑果枸杞耐盐生理生态机制研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.  
WANG Longqiang. *The Physio-ecological Mechanism of Salt Tolerance of Medicinal Halophyte Lycium ruthenium* [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2011.
- [27] 刘贯山, 王元英, 孙玉合, 等. 高等植物钾转运蛋白[J]. 生物技术通报, 2006(5): 13 – 18.  
LIU Guanshan, WANG Yuanying, SUN Yuhe, *et al.* Proteins for transport of potassium in higher plants [J]. *Biotechnol Bull*, 2006(5): 13 – 18.