



陆地棉耐盐相关基因(*GhVP*)的克隆及分析

宋丽艳, 叶武威*, 赵云雷, 王俊娟, 樊保香, 王德龙

中国农业科学院棉花研究所 / 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南 安阳 455000

摘要:液泡膜质子转运无机焦磷酸酶(V-PPase)酸化植物液泡并为液泡的次级转运系统提供能量。本研究根据棉花耐盐抑制消减(SSH)文库中的一个 EST 序列设计特异性引物,利用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术首次克隆了陆地棉焦磷酸酶基因,将其命名为 *GhVP*。生物信息学分析显示,该基因包含一个 2301 bp 的完整开放读码框,编码 766 个氨基酸的多肽,与拟南芥和烟草的同源性分别达 90%和 93%。RT-PCR 结果显示,*GhVP* 的表达丰度随着盐处理时期的增加而变化,盐处理 6 h 表达量最高,随后开始下降,这一结果与 *Thellungiella halophila* 中的研究相似,该研究将有助于了解非盐生植物的耐盐特性。

关键词: H⁺-PPase; 陆地棉; RACE; RT-PCR

中图分类号: S562.035.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2010)03-0285-04

Isolation and Analysis of Salt Tolerance Related Gene(*GhVP*) from *Gossypium hirsutum* L.

SONG Li-yan, YE Wu-wei*, ZHAO Yun-lei, WANG Jun-juan, FAN Bao-xiang, WANG De-long

(Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement of Agricultural Ministry, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: Vacuolar proton-translocating inorganic pyrophosphatase acidify the vacuoles and power the vacuolar secondary active transport systems in plants. In the study, a gene, named *GhVP*, was isolated firstly by Rapid Amplification of cDNA End (RACE) from the EST sequences of the Suppression Subtractive Hybridization (SSH) library. Analysis of bioinformatic showed that the gene contains a uninterrupted open reading frame of 2301 bp, encoding for a polypeptide of 766 amino acids. Homology alignment revealed that the protein has higher homology with that from *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tobacum* etc. The result of RT-PCR showed that the expression of *GhVP* varied under salt stress, which has the highest expression at 6 h after salt treatment and then decreased. The result was similar with that of *Thellungiella halophila*. Our study will contribute to understanding the salt-tolerance characteristic of glycophytic.

Key words: H⁺-PPase; upland cotton; RACE; RT-PCR

在灌溉农业地区和半干旱地区,土壤表层积累了大量盐分,这些盐分通过渗透胁迫和离子毒害对植物产生毒害作用,严重影响着农作物的产量^[1]。为了适应盐胁迫,植物在进化过程中形成了适应高盐环境的机制。在植物液泡膜中,存在着大量的 H⁺ 无机焦磷酸酶(H⁺-PPase),它是由大约 71~80 kDa 分子量的单一多肽链组成^[2]。盐胁迫条件下,V-PPase 为液泡中离子和其他溶质的积累提供驱动力^[3]。研究表明盐胁迫下 V-PPase 的活性增加^[4,5],这表明 V-PPase 在植物耐盐性方面起

着重要作用。同时,在大麦根细胞中,V-PPase 和 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的活性是共协调的,这进一步证明了它的重要性^[6]。

V-PPase 是一类新的离子转运酶,自从在拟南芥中第一个克隆了该基因以来,研究者已经在许多物种相继克隆了 V-PPase 基因,基因工程方面利用该基因提高植物耐盐和抗旱能力的改良研究也有报道^[6,7]。目前,H⁺-PPase 基因的研究主要集中在盐生植物中,至今尚未见陆地棉液泡膜 H⁺-PPase 基因的相关报道。因为棉花没有盐腺,

收稿日期:2009-12-24

作者简介:宋丽艳(1981-),女,在读硕士,yoyoyehan@163.com; *通讯作者,yeww@cricaas.com.cn,yew158@gmail.com

基金项目:转基因生物新品种培育科技重大专项“转基因耐旱耐盐碱棉花新品种培育”(2008ZX005-004)

所以在盐胁迫条件下棉花必须将 Na^+ 区隔化到液泡中, H^+ -PPase 起着关键作用。我们在陆地棉中克隆了 H^+ -PPase 基因, 并进行了相关分析, 这将有助于理解非盐生植物的耐盐特性。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

以陆地棉中 9835 为实验材料, 采用砂培法育苗。三叶期时采用 0.4% 的盐量胁迫法^[6]进行盐处理。分别在盐处理 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、18 h 后, 缓慢冲掉发芽盒中的沙子, 保留完整的根部, 液氮速冻, 置于 -70°C 保存备用。

1.2 RNA 的提取

采用改良的 CTAB 法^[9]提取不同盐处理时期的根系 RNA。

1.3 目的基因的克隆与分析

本实验室已成功构建一个陆地棉耐盐性抑制消减文库^[10], 我们从中挑取一个 EST 序列设计特异性引物 GPS1: 5'-GTTGGTGTCTGATCTCGTAGGAAAGGT-3' 和 GPS2: 5'-TAAGTCCAGCCAGAGACCAACACC-3', 以盐处理材料的 cDNA 为模板进行 RACE 扩增, 反转录及基因扩增操作均按照试剂盒说明进行。回收 3' 和 5' PCR 扩增产物并连接到克隆载体上, 菌液 PCR 筛选阳性克隆, 将其送到上海英俊生物技术有限公司测序。利用 DNAStar 软件将测序产物进行拼接和组装, 再设计长距离 PCR 引物 (LongUpper: ATCTCTTTCTGCTGCGGT 和 LongLower: GATGCTAACCAGCCTTCC) 进行目的基因全长的扩增, 将扩增产物克隆并测序, 所得序列进行 nucleotide BLAST 和 BLASTX 比对, 发现其为焦磷酸酶基因的全长序列。利用生物信息学软件对获得的基因进行了跨膜分析, 疏水性分析, 并构建

了系统发育树。

1.4 半定量 RT-PCR 检测

采用 RT-PCR 技术检测盐处理 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、18 h 根系 *GhVP* 的表达量差异, 反转录操作按照试剂盒说明进行。引物序列为 Forward: TATGGTGATGACTGGGAAGG, Reverse: GAT-ACAACATGCCCCGTGAAG, 内参基因为 *actin*, 引物序列为 Forward: 5'-ATCCTCCGTCTTGACCTTG-3', Reverse: 5'-TGTCGTCAGGCAACT-CAT-3'。

2 结果分析

2.1 RNA 提取和目的基因的克隆

1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测显示, 提取的根系 RNA 具有清晰的 28 s 和 18 s 条带, 且 28 s 较 18 s 条带亮, 具有轻微弥散, 证明 RNA 完整性较好 (图 1), 满足后续试验的要求。取 $5 \mu\text{L}$ 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增产物进行电泳检测, 结果表明扩增产物与预计片段大小相一致 (图 2)。取 $5 \mu\text{L}$ 长距离 PCR 产物检测 (图 3), 得到了大于 2 kb cDNA 片段, 将其回收并测序, 得到长为 2679 bp cDNA, 在 NCBI 网站上进行 BLASTN 比对, 结果显示, 其与拟南芥 (AB015138.1) 的同源性达到 86%, 与烟草 (DO630713.1) 同源性为 83%。利用 NCBI 网站在线 ORF Finder 软件分析, 得到一条长 2301 bp 的完整开放阅读框, 推测的蛋白质序列含有 766 个氨基酸, BLASTP 比对结果显示, 其与 *Arabidopsis thaliana*、*Nicotiana tabacum*、*Vigna radiata*、*Oryza sativa*、*Triticum aestivum* 的一致性分别达到 89.7%、91.5%、90.2%、87.6%、85.0%。利用在线服务软件 (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) 推测其编码蛋白的理论分子量为 80.43 KD, 等电点为 5.38。

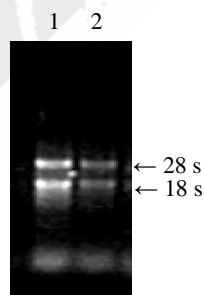


图 1 RNA 电泳图
Fig.1 The gel analysis of RNA

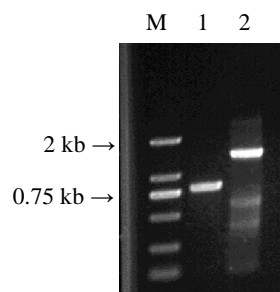


图 2 5'和 3' RACE 产物
Fig.2 The produce of PCR amplification of 5' and 3'

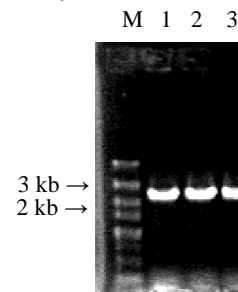


图 3 基因扩增 PCR 产物
Fig.3 The produce of PCR amplification of V-PPase gene

2.2 生物信息学分析

使用生物信息学软件 TopPred (<http://us.expasy.org>)对该基因编码的氨基酸序列进行跨膜结构分析(图 4),结果表明 *GhVP* 蛋白包含 14 个跨膜结构域,该预测结果与前人的报道^[2]相似。利用 BioEdit 程序的 Kyte&Doolittle 对 H^+ -PPase 进

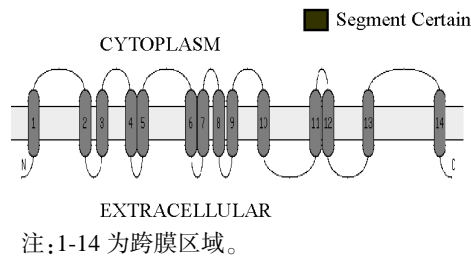


图 4 陆地棉 H^+ -PPase 氨基酸序列跨膜结构模式

Fig.4 Tonographic model of *Gossypium hirsutum* H^+ -PPase amino acid sequence by the program of TopPred

利用 MEGA4.1 软件构建了包括 *GhVP* 蛋白在内的 14 个物种的系统发育树(图 6),采用的分析方法为邻接法 (neighbor-joining method, NJ),结果表明,14 个物种的 H^+ -PPase 的系统发育树聚合 5 个大支,*GhVP* 与 *Beta vulgaris*、*Arabidopsis thaliana*、*Nicotiana tabacum* 的该蛋白亲缘关系最近,被分在一支中。分析中用到的序列有:*Hordeum vulgare* (BAA02717.2), *Beta vulgaris*(AAA61609.1), *Nicotiana tabacum*(CAA54869.1), *Oryza sativa* (BAA08232.1), *Vigna radiata* (BAA 23649.1), *Cucurbita moschata* (BAA33149.1), *Rhodospirillum rubrum* (AAC38615.2), *Acetabularia mediter-*

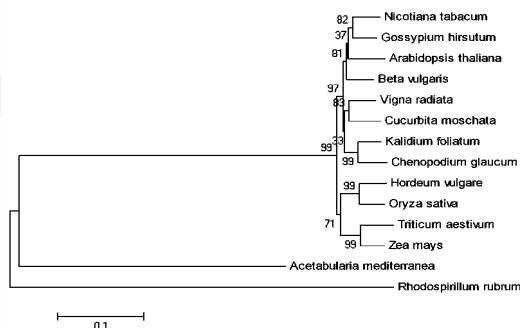


图 6 不同物种 VP 蛋白序列进化树分析

Fig.6 A phylogenetic tree of putative H^+ -PPase from different species by program MEGA4.1

3 讨论

我们在陆地棉中克隆了 V -PPase 基因,推测

行疏水性分析(图 5),结果表明,位于正值区域内的氨基酸残基的分数较大,说明 *GhVP* 的疏水性较强,亲水性较弱。疏水性较强的氨基酸残基,位于该蛋白质的一个跨膜区,在 H^+ -PPase 蛋白的折叠中,这些残基可能暴露在表面以行使其功能。

Kyte & Doolittle Scale Mean Hydrophobicity Profile
Scan-window size=13

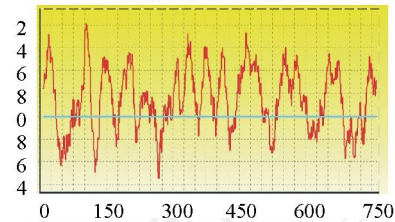


图 5 陆地棉 H^+ -PPase 氨基酸序列疏水性分析

Fig.5 Hydrophobicity plot of H^+ -PPase amino acid sequence from *Gossypium hirsutum*

ranea (BAA83103.1), *Arabidopsis thaliana* (AAA 32754.1), *Triticum aestivum* (ABX10014.1), *Zea mays* (CAG29370.1), *Kalidium foliatum* (A BK 91685.1), *Chenopodium glaucum*(ABD98735.1).

2.3 RT-PCR 检测

从盐处理后 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、18 h 根系中提取总 RNA,以 Action 基因作为内部参照标准(~300 bp)进行半定量分析。结果显示,随着盐处理时期的增加,*GhVP* 的表达量有所增加,6 h 时达到最大。随后 *GhVP* 的表达丰度开始下降(图 7),这一结果与盐生植物小盐芥中的研究相类似。

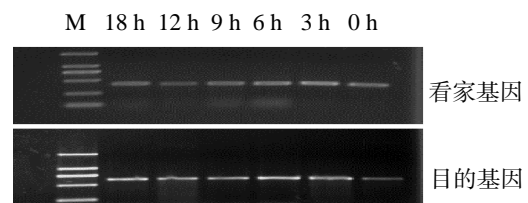


图 7 H^+ -PPase 在盐胁迫下的半定量 RT-PCR 分析

Fig.7 Expression analysis of H^+ -PPase by semi-quantitative RT-PCR in *Gossypium hirsutum* under salt stress

的多肽序列由 766 个氨基酸残基组成,其与拟南芥和烟草的同源性分别为 90%和 93%。前人研究表明 (E/D)(X);KXE 基序为 PPase 的催化位点,

其根据在于:1) 在可溶性 PPase 和 V-PPase 中都发现了(E/D)(X)₂KXE 序列,推测其为 H⁺-PPase 的催化位点;2) 专一性结合到(E/D)(X)₂KXE 基序的多克隆抗体显著抑制了焦磷酸酶水解的活性和依赖于焦磷酸酶的 H⁺ 转运^[1]。研究中该基序位于 253-263,这表明所克隆的基因具有 V-PPase 的功能。

研究结果显示,盐处理后,根系 GhVP 的表达量上调,可能是由于盐胁迫下 H⁺-PPase 的活性提高,也有可能与 H⁺-PPase 的数量增加有关,这有待于盐胁迫下对该酶进行深入研究。盐生植物能够将 Na⁺ 区隔化到液泡中,以维持胞质中较低的 Na⁺ 浓度 H⁺-PPase 起着关键作用。棉花是较耐盐的非盐生植物,V-PPase 在盐胁迫下起到离子区隔化的作用。前人研究结果表明,盐胁迫下不同物种的 V-PPase 活性变化有所不同,如海蓬子^[9]、向日葵^[12]中该酶的活性增加,而小麦^[13]、绿豆^[14]中则降低,这有待于在盐生植物和非盐生植物中对 V-PPase 的作用和调节机制做进一步的功能研究^[9]。

前人研究已经将 V-PPase 基因转入拟南芥、烟草中^[15],转基因植株的耐盐性有所提高。我们分析了盐胁迫下陆地棉 V-PPase 基因的表达模式,下一步将在拟南芥中过量表达 GhVP,并对转基因植株进行耐盐性分析,以进一步展示 GhVP 在耐盐性方面的特性。

参考文献:

- [1] APSE M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1999, 285(5431): 1256-1258.
- [2] MAESHIMA M. Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1465: 37-51.
- [3] SZE H, Ward J M, Lai S. Vacuolar H⁺-translocating ATPase from plants: structure, function, and isoforms[J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1992, 24(4): 371-381.
- [4] COLOMBO R, Cerana R. Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1993, 142: 226-229.
- [5] FUDUDA A, Chiba K, Maeda M, et al. 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]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(397): 585-594.
- [6] GAO Feng, Gao Qiang, Duan Xiao-Guang, et al. Cloning of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(12): 3259-3270.
- [7] 胡有贞,王 瑜,张富春. 灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因(CgVP1)过表达提高拟南芥的耐盐性[J]. *植物生理学通讯*, 2009,45(5): 449-454.
- HU You-zhen, Wang Yu, Zhang Fu-chun. Overexpression of *Chenopodium glaucum* tonoplast Pyrophosphatase (CgVP1) improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology Communications*, 2009, 45(5): 449-454.
- [8] 叶武威,刘金定. 棉花种质资源耐盐性鉴定技术与应用[J]. *中国棉花*, 1998,25(12): 41.
- YE Wu-wei, Liu Jin-ding. Technique and application on salt-tolerance appraisal of cotton germplasm resources[J]. *China Cotton*, 1998, 25(12): 41
- [9] 蒋建雄,张天真. 利用 CTAB/ 酚法提取棉花组织总 RNA[J]. *棉花学报*, 2003, 15(3): 166-167.
- JIANG Jian-xiong, Zhang Tian-zhen. Extraction of total RNA in cotton tissues with CTAB-acidic phenolic method[J]. *Cotton Science*, 2003, 15(3): 166-167.
- [10] 叶武威,赵云雷,王俊娟,等. 盐胁迫下陆地棉耐盐品种根系的抑制消减文库构建[J]. *棉花学报*, 2009, 21(5): 339-345.
- YE Wu-wei, Zhao Yun-lei, Wang Jun-juan, et al. Construction of SSH Library on root system of salinity-tolerance variety (*G. hirsutum* L.) under the stress of salinity [J]. *Cotton Science*, 2009, 21(5): 339-345.
- [11] TAKASU A, Nakanishi Y, Yamauchi T, et al. Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H⁺-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies[J]. *Journal of Biochemistry*, 1997, 122: 883-889.
- [12] BALLESTEROS E, Donaire J P, Belder A. Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles from sunflower roots[J]. *Physiol Plant*, 1996, 97: 259-268.
- [13] WANG B S, Ratajczak R, Zhang J H. Activity, amount and subunit composition of vacuolar-type H⁺-ATPase and H⁺-Ppase in wheat roots under severe NaCl stress[J]. *Plant Physiol*, 2000, 157: 109-116.
- [14] NAKAMURA Y, Kasamo K, Shimosato N, et al. Stimulation of the extrusion of protons and proton ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high sodium chloride stress and its relation to external levels of calcium ions[J]. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33: 139-149.
- [15] GAXIOLA R A, Li J S, Undurraga S, et al. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVPI H⁺-pump[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2001, 98: 11444-11449. ●