

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2021)02-0118-09

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2021.02.003

马铃薯脯氨酸转运体 StProT3 的序列结构及表达分析

王 明¹, 王万兴², 何长征¹, 胡新喜¹, 熊兴耀², 秦玉芝^{1*}

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 依据马铃薯转录组数据, 鉴定马铃薯脯氨酸转运体(Proline transporter, ProTs)在逆境中的作用。以马铃薯 GS393(*Solanum commersonii*-LZ3.4-Wisconsin, United States)为材料, 采用实时荧光定量 PCR 对 *StProT3* 基因在不同组织及激素、重金属、盐、干旱和低温处理下的表达模式进行分析。该基因 CDS 长度为 1 317 bp, 编码 438 个氨基酸。序列比对显示与 SlyProT3 有 96% 的相似性, 因而命名为 *StProT3* (NCBI 登陆号为 MH027990.1)。 *StProT3* 基因在马铃薯根、茎、叶、匍匐茎以及块茎中均有表达, 其中根中表达量最高; 重金属(氯化汞、氯化镉、氯化铜、氯化铝)、干旱、盐渍、激素(IAA、GA₃、6-BA)处理能诱导该基因表达, 而低温和 ABA 处理则抑制该基因表达, 这表明 *StProT3* 基因参与了马铃薯的激素信号传导以及非生物胁迫响应。

关键词: 马铃薯; 脯氨酸转运体; 实时荧光定量; 非生物胁迫

Sequence Structure and Expression Analysis of Potato Proline Transporter StProT3

WANG Ming¹, WANG Wanxing², HE Changzheng¹, HU Xinxi¹, XIONG Xingyao², QIN Yuzhi^{1*}

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: GS393 (*Solanum commersonii*-LZ3.4-Wisconsin, United States) was used as the material, and the expression pattern of *StProT3* gene in different tissues and under the treatments of hormones, heavy metals, salt, drought and low temperature was detected by real-time fluorescent quantitative PCR in order to understand the role of potato proline transporter (ProTs) in stress, based on potato transcriptome data. The CDS of this gene was 1 317 bp in length and encoded 438 amino acids. The sequence alignment showed 96% similarity to SlyProT3 and was named *StProT3* (NCBI accession number MH027990.1). The *StProT3* gene was expressed in potato roots, stems, leaves, stolons and tubers, with the highest expression in roots. Heavy metals (mercury chloride, cadmium chloride, copper chloride, and aluminum chloride), drought, salt, hormone treatment with (IAA, GA₃ and 6-BA) induced expression of the gene. However, low temperature and ABA treatment inhibited expression of the gene. The *StProT3* gene is involved in the hormone signaling and abiotic stress response of potato.

Key Words: potato; proline transporter; real-time fluorescence quantification; abiotic stress

脯氨酸是植物对逆境胁迫响应的重要生理指标^[1], 随着脯氨酸的积累。关于脯氨酸积累对植物保护作用在干旱^[2]、高温、低温、盐渍等不利环境下, 伴用的机制有多种说法, 如作为渗透调节剂、自由基

收稿日期: 2019-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371683)。

作者简介: 王明(1994-), 女, 硕士研究生, 主要从事逆境生理与蔬菜遗传育种研究。

*通信作者(Corresponding author): 秦玉芝, 博士, 副教授, 主要从事逆境生理与蔬菜遗传育种研究, E-mail: qyuz@163.com。

清除剂或大分子结构保护剂等来维持植物正常的代谢^[3]。Kemble 和 Macpherson^[4]发现多年生黑麦草脯氨酸的抗旱机制, 在干旱胁迫下其叶片累积脯氨酸, 脯氨酸的含量随着胁迫时间的延长而增多。Hadi 和 Fuller^[5]研究表明脯氨酸含量与干旱($R^2 = 0.524$)和盐($R^2 = 0.786$)耐受性呈显著正相关。前期研究发现, 细胞质和液泡中的脯氨酸的分布约为 15~98:1。盐和干旱胁迫下, 脯氨酸首先在细胞质中积累, 当细胞转至渗透下, 液泡中的脯氨酸含量开始下降^[6]。无论哪种逆境, 脯氨酸在植物中的积累, 可以比原始含量增加数十至数百倍。尽管不同组织或部位游离脯氨酸的变化存在差异, 但其含量与其抗逆性呈正相关^[7-13], 这也说明脯氨酸对植物各部位的自我保护起着重要作用。

越来越多的研究表明, 脯氨酸转运体可能在脯氨酸积累过程中起重要作用。脯氨酸转运体 ProT1、ProT2 和 ProT3 相继在拟南芥中鉴定出来, 其中 AtProT1 在全株韧皮部或韧皮部薄壁组织细胞中均有表达, 说明其在相容性溶质的长距离运输中起作用^[14]。在植物中, 有多个氨基酸转运蛋白家族, 如氨基酸通透酶家族(AAPs)、赖氨酸组氨酸转运蛋白家族(LHTs)和脯氨酸转运体家族(ProTs)参与脯氨酸在各个器官间的运输^[15]。脯氨酸的合成与降解在细胞内呈区室化分布, 胁迫条件下脯氨酸积累, 而胁

迫消除时脯氨酸迅速降解, 说明细胞内脯氨酸的转运体在逆境中起重要作用。另外, 脯氨酸转运体同样存在于细胞间, 缺水条件下白三叶草的韧皮部出现高浓度的脯氨酸积累^[16]。

农业生产中马铃薯经常遭受干旱、盐碱和极端温度等非生物胁迫, 而关于马铃薯 ProT 家族的生物信息学分析以及非生物胁迫相关性研究尚且不多。本研究采用 RT-PCR 技术, 从马铃薯 GS393 中克隆了 1 个 ProT 家族基因 *StProT3*, 对其核酸及蛋白质序列结构进行系统分析, 同时研究了 *StProT3* 基因的组织表达特异性及其在不同非生物胁迫下的表达。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试材料为马铃薯 GS393(*Solanum commersonii* - LZ3.4 - Wisconsin, United States)。

主要试剂: 植物去多糖多酚总 RNA 提取试剂盒和 2 000 bp DNA Ladder, 购自北京天根生化科技有限公司, Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit, PCR Master Mix, 2 × T5 Fast qPCR Mix, pClone007 Vector 及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 购自北京擎科新业生物技术有限公司; IAA、GA₃、ABA、6-BA 和聚乙二醇 6000(PEG-6000)购自 Sigma。相关引物(表 1)由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

表 1 马铃薯 *StProT3* PCR 扩增引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR amplification of potato *StProT3*

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
StProT3-CDS-F	GGAGGAAGCAAGTGGGACAA	序列验证
StProT3-CDS-R	CCCAAAAGATGGGTAAATTATCACT	
StProT3-F	AGGAAGCAAGTGGGACAACAA	表达分析
StProT3-R	CTATGGCTTCCCCTCCTCCTC	
Actin-F	AGCATCCTGTCTCCTAACTGA	扩增内参
Actin-R	ACACCATCACCAGAGTCCAAC	

1.2 方 法

1.2.1 材料处理和采集

用 MS 固体培养基(MS 液体培养基 + 0.7% 琼脂粉 + 3% 蔗糖, pH 5.8 ~ 6.0)培养马铃薯 30 d, 选择具有相同生长势的组培苗, 分别进行处理。将

样品包裹在锡箔纸中, 在液氮中快速冷冻并储存在 -80℃ 冰箱中备用。将组培苗用漂浮板将根部浸泡在氯化汞(200 mg/L)、氯化镉(200 mg/L)、氯化铜(200 mg/L)、氯化铝(200 mg/L)、NaCl(11.7 g/L)和 PEG-6000(20 g/L)中, 蒸馏水为对照; 将组培苗

放置霜冻箱中4℃处理;重金属和低温处理均按0, 2, 8, 24, 36和48 h取样。用IAA(100 mg/L)、GA₃(100 mg/L)、ABA(100 mg/L)、6-BA(100 mg/L)喷施GS393组培苗,每瓶喷施3 mL,均按0, 2, 8, 24和36 h取样。每组处理设置3个重复。

1.2.2 马铃薯总RNA提取及基因ORF的扩增

马铃薯总RNA提取采用植物去多糖多酚总RNA提取试剂盒,用微量紫外分光光度计测量浓度和纯度。RNA反转录用Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit试剂盒(北京擎科新业生物技术有限公司)完成。根据实验室转录组测序所得到的*StProT3*的5'和3'的序列,利用Primer 5.0设计在基因*StProT3*的ORF起始子ATG和终止子TAA处设计特异引物。以上述反转录的cDNA为模板进行PCR。反应体系为Mix 12.5 uL,上、下游引物各1 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR扩增条件:98℃运行2 min, 98℃运行30 s, 55℃运行30 s, 72℃运行30 s, 72℃运行10 min, 10℃保存。对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,切胶、回收后连接载体pClone007,并转化到大肠杆菌DH5α感受态,37℃过夜培养,经菌落PCR检测筛选阳性克隆后送至测序。

1.2.3 *StProT3*序列的生物信息学分析

利用DNAMAN 6.0软件,对CDS序列进行翻译和蛋白质序列多重比对,并对蛋白质分子式、等电点、疏水性和蛋白分子量等理化性质进行预测分析;通过NCBI中的Protein blast进行相似蛋白的搜索,并下载茄科植物的ProT蛋白序列;利用TMHMM判定是否为膜蛋白;利用SMART预测蛋白质的功能结

构域;采用SWISS-MODEL在线预测蛋白质的三级结构;用MEGA 7.0构建氨基酸序列系统进化树;通过PlantCare对*StProT3*基因进行启动子调控元件分析。

1.2.4 基因表达模式分析

荧光定量仪器使用Applied Biosystems Q5型定量PCR仪,基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算,分析基因*StProT3*的表达情况。用Primer 5.0设计基因*StProT3*荧光定量引物,并以Actin作为内参对照。以上述反转录cDNA为模板,反应体系为20 uL,参照2 × T5 Fast qPCR Mix荧光定量试剂盒,反应程序为95℃运行1 min, 95℃运行10 s, 60℃运行15 s, 40个循环。每个样品均设置3个重复。

1.2.5 数据分析

利用DPS 7.05软件进行数据统计分析,采用GraphPad Prism 6制图。

2 结果与分析

2.1 基因的克隆及序列分析

通过比对马铃薯转录组数据库,并以PCR验证,获得的目的基因含完整CDS序列,目的基因CDS大小为1 317 bp(图1),编码438个氨基酸,位于染色体ch05上。分子式为C₂₂₆₆H₃₄₄₉N₅₅₇O₅₇₈S₁₅。生物信息学分析结果显示,该序列编码的蛋白相对分子量为48 223.60 Da,理论等电点为9.32;不稳定指数为31.56,属于稳定蛋白。脂肪指数为110.53,亲水性的平均值是0.596,属于疏水性蛋白。结构域预测分析表明,该蛋白存在12个跨膜结构域(图2),还含

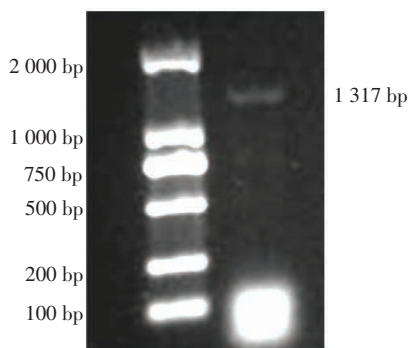
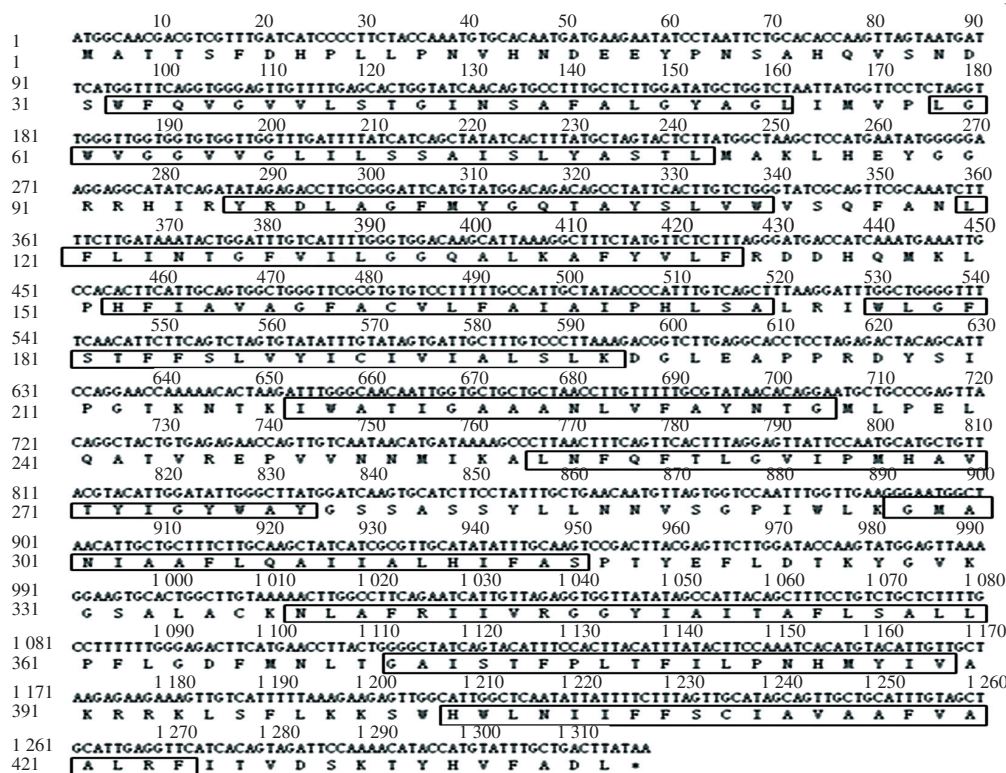


图1 *StProT3*的PCR扩增产物电泳检测

Figure 1 Electrophoretic detection of PCR amplification products of *StProT3*

MODEL 3D 结构进行预测的结果表明, StProT3 蛋白主要由 46.35% 的 α 螺旋, 22.60% 的延伸链, 4.34% 的 β 折叠和 26.71% 的无规则卷曲组成(图 3)。



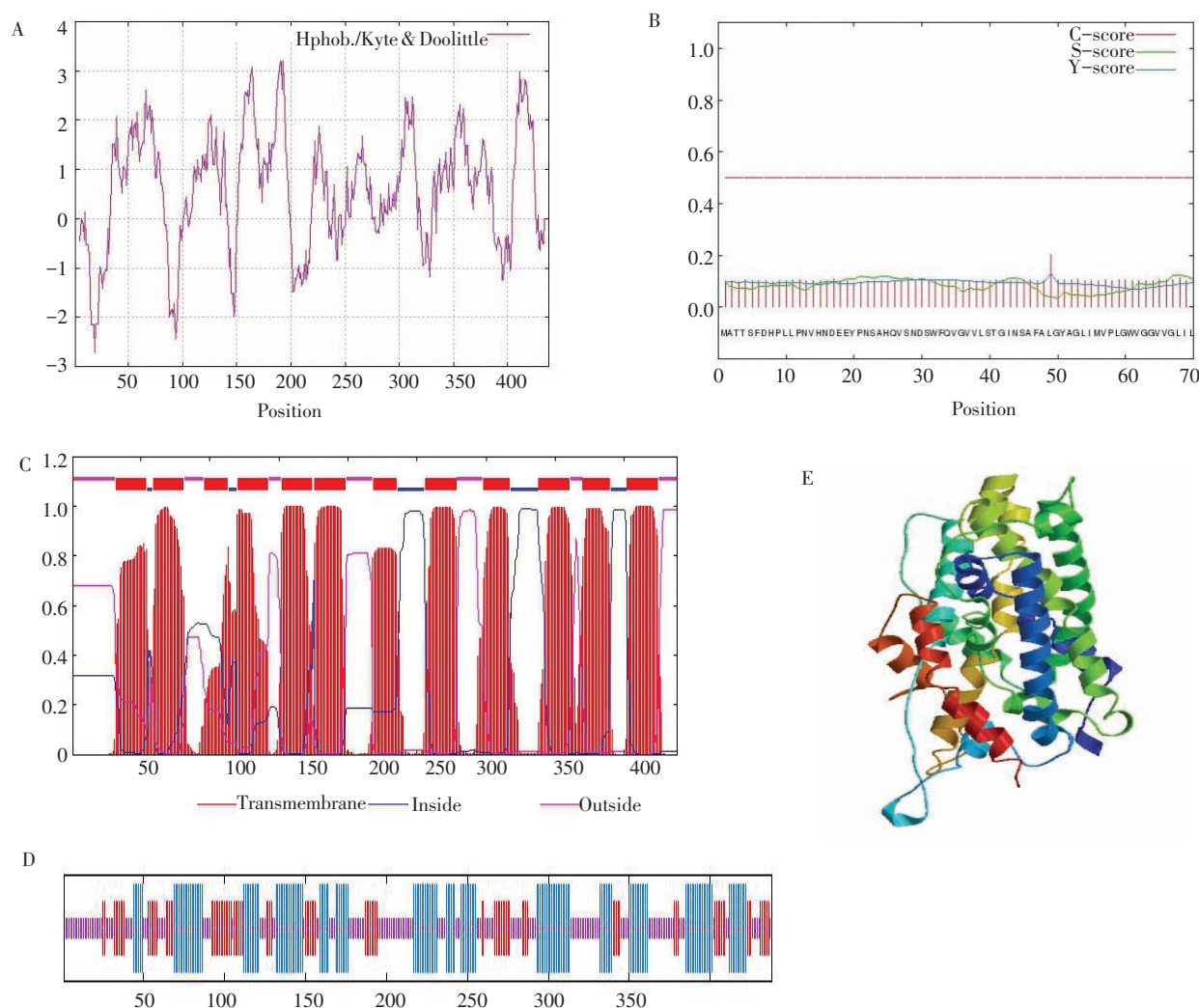
Note: Box is a transmembrane domain, and * is a terminator.

Figure 2 Amino acid sequence analysis of *StProT3* gene

和辣椒 ProT3 蛋白亲缘关系最近。

2.3 基因 *StProT3* 启动子元件分析

在 <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> 马铃薯数据库里查找 *StProT3* 基因的启动子序列，截取起始子 ATG 上游区域约 1 500 bp 启动子序列，通过 PlantCare 预测表明基因 *StProT3* 在翻译起始子上游含有光响应元件 Box 4、Gap-box、I-box 和 Sp1，低温响应元件 LTR，MYB 结合位点参与干旱诱导的顺式作用元件 MBS，以及参与昼夜控制的顺式作用调节元件 circadian。具体顺式作用元件见图 6。



注: A. 疏水性; B. 信号肽; C. 跨膜区; D. 二级结构; E. 三级结构。

Note: A. Hydrophobic; B. Signal peptide; C. Transmembrane region; D. Secondary structure; E. Tertiary structure.

图3 *StProT3*的生物信息学分析

Figure 3 Bioinformatics analysis results of *StProT3*

2.4 *StProT3*组织表达特异性

组织表达分析结果(图 7A) ($P < 0.05$)表明, *StProT3*在马铃薯根、茎、叶、匍匐茎和块茎中皆有表达,其中,表达量最高的组织是根,茎次之,表达量最低的组织是匍匐茎。

2.5 *StProT3*的非生物胁迫表达分析

*StProT3*的重金属诱导表达分析结果显示(图 7B) ($P < 0.01$),马铃薯中*StProT3*受汞胁迫诱导最大,在48 h内处在上调阶段,表达量在24 h最高。基因

*StProT3*受Al胁迫诱导较明显,在48 h是对照10.2倍。在CdCl₂处理24 h时, *StProT3*显著高于对照,为对照的4倍,48 h时,该基因的表达基本恢复到与对照相近的水平。CuCl₂处理2 h时表达量达到最高,约为对照的25.3倍,处理24 h时,该基因的表达低于对照达到最低,为对照的0.7倍,之后恢复到对照相近的水平。

激素胁迫处理表明(图 7C) ($P < 0.05$),在36 h内ABA抑制基因*StProT3*的表达,36 h时最低,是对照的0.04倍。6-BA处理24 h时, *StProT3*的表达

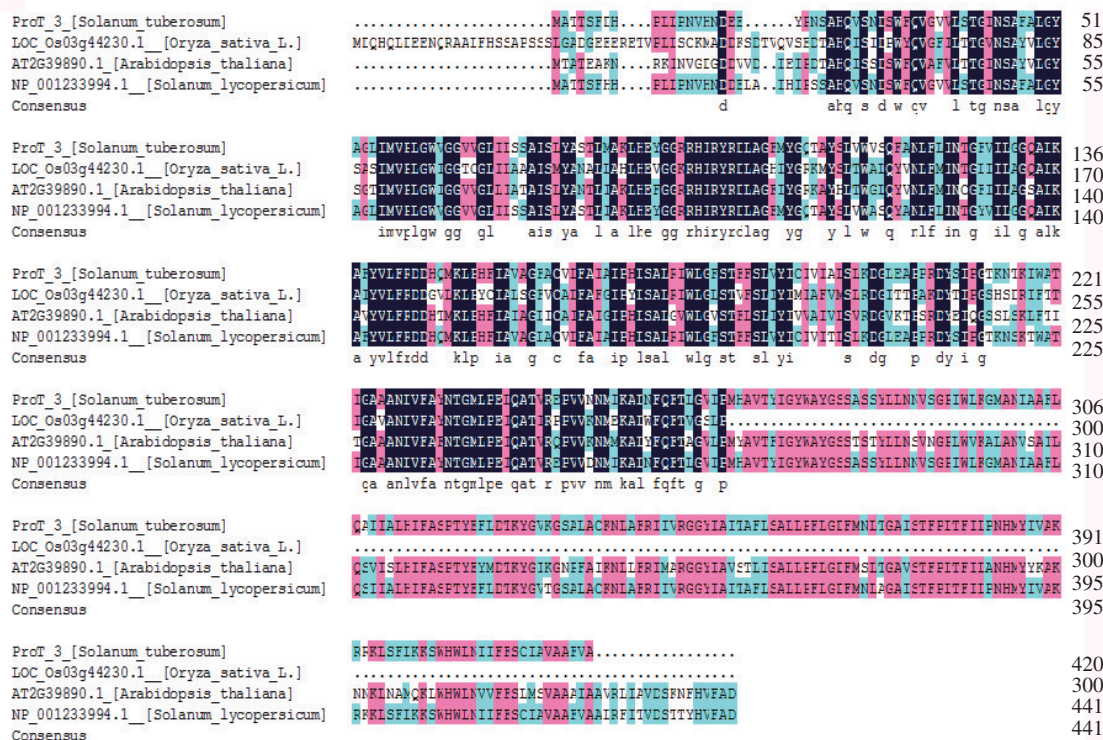


图4 茄科不同物种ProT氨基酸序列的多重比对

Figure 4 Multiple alignment of ProT amino acid sequences in different species of Solanaceae

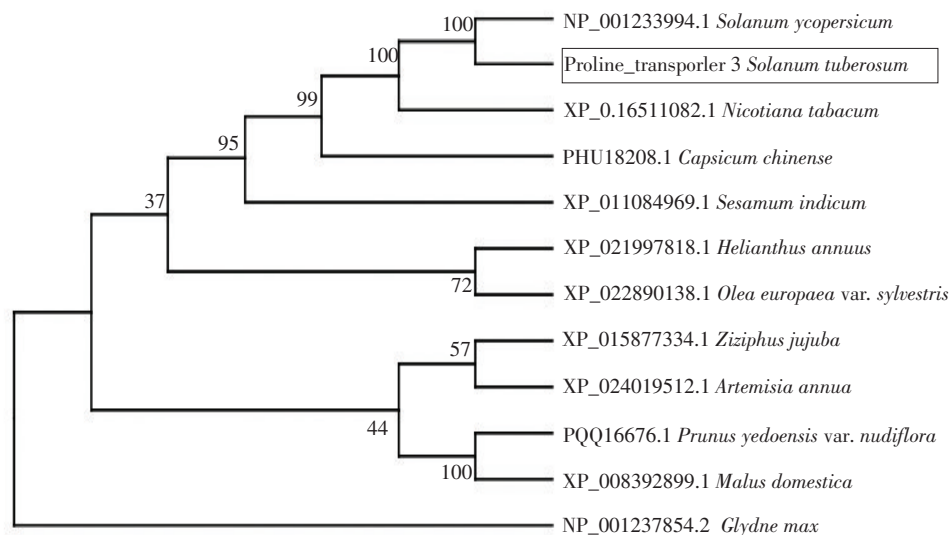
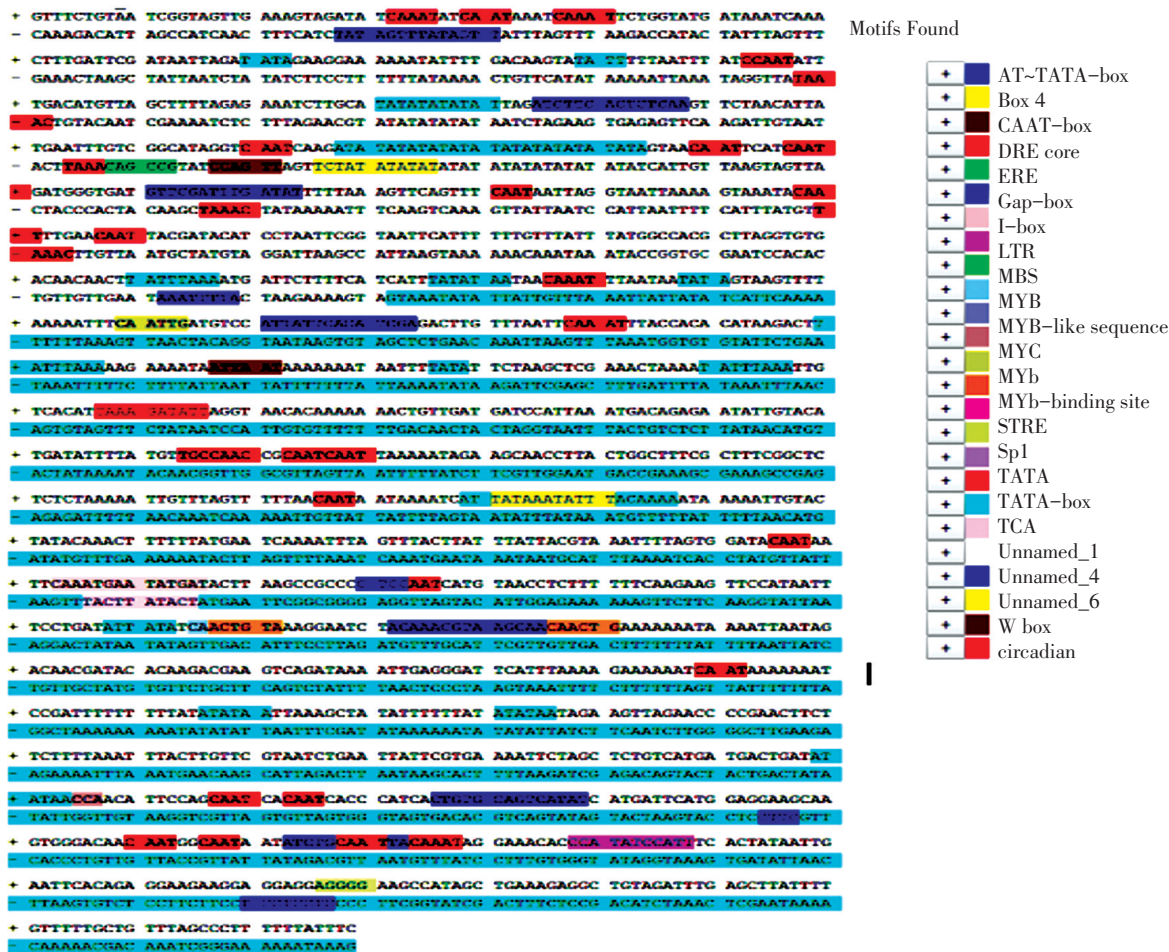


图5 StProT3 氨基酸序列与不同物种ProT氨基酸的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of StProT3 amino acid sequence and ProT amino acids of different species

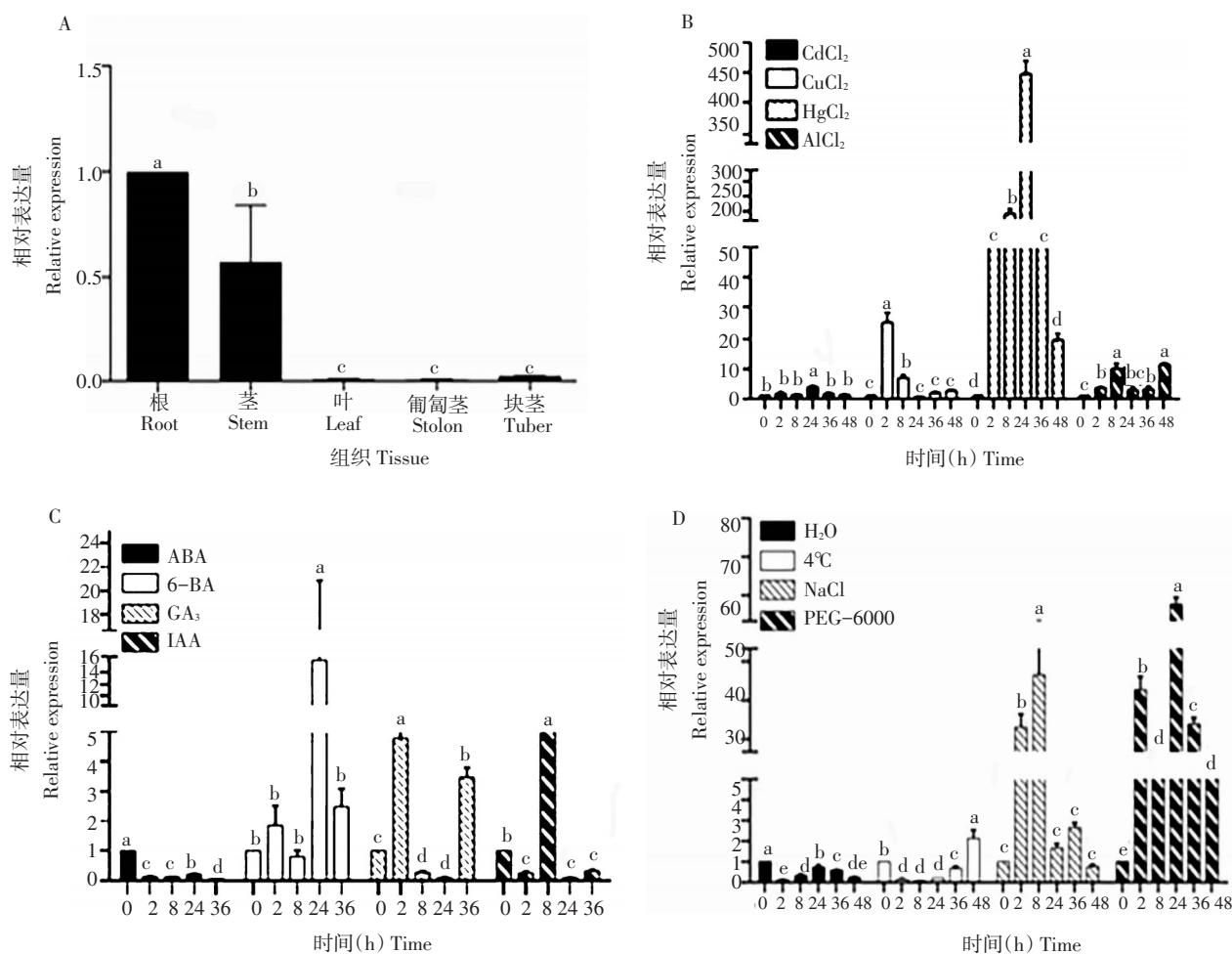
图6 基因 *StProT3* 启动子序列分析Figure 6 Sequence analysis of the gene *StProT3* promoter

显著高于对照, 达到最高峰, 为对照的16倍。在 GA_3 胁迫下基因 *StProT3* 2 h内处于上调, 在2 h时表达量达到最大值, 是对照的4.8倍; 在8~24 h处于下调, 在24 h时表达量达到最小值为对照的0.1倍。在 IAA 处理下, 8 h时基因的表达量达到最高, 约为对照的7.1倍。

图7D结果显示($P < 0.01$), *StProT3* 的表达受低温抑制, 但受盐胁迫和干旱胁迫的诱导。在4℃低温胁迫下, 8 h时表达量达到最低, 约为对照的0.05倍。NaCl处理8 h时, *StProT3* 的表达显著高于对照。PEG-6000处理48 h内基因 *StProT3* 的表达一直处于上调水平, 48 h仍显著高于对照。

3 讨论

StProT3 在马铃薯的根、茎、叶、匍匐茎和块茎中的相对表达量差异显著, 在根中的相对表达量明显高于其他组织, 推测马铃薯根部形态建成可能与 *StProT* 参与有关。Shen 等^[17]在榆钱菠菜中克隆的 *AhProT1* 基因在拟南芥和番茄中表达的 *ProT* 氨基酸序列均含有11个核心跨膜结构域(cTM), 都是高度保守区, 这与前人的研究相一致; Akihiro等^[18]在盐胁迫下也发现 *HvProT* 基因在大麦的根尖部强烈表达, 这与前人的研究相一致。说明 *ProT* 家族蛋白具有分布广和功能多的性质, 其家族基因在植物生长



注: 不同小写字母表示差异达0.05水平显著。采用 Duncan's 法。

Note: Different lowercases show significant difference at 0.05 level of probability using Duncan's method.

图7 *StProT3* 基因在马铃薯不同组织和非生物胁迫中的相对表达量

Figure 7 Relative expression of *StProT3* gene in different tissues and under abiotic stresses of potato

和发育中起重要作用。

本研究的马铃薯被氯化汞、氯化镉、氯化铜、氯化铝、PEG-6000、NaCl、IAA、GA₃、6-BA处理能诱导 *StProT3* 基因表达, 而被低温和ABA处理则抑制表达, 表明 *StProT3* 基因参与了马铃薯的激素信号传导以及非生物胁迫响应。对 *StProT* 的胁迫表达模式研究表明, *StProT3* 基因在盐胁迫、镉胁迫、铜胁迫和IAA胁迫的表达量呈升-降的趋势, 推测该基因表达存在反馈调控。Liu 和 Bush^[19]的结果表明, 在 *StProT3* 和 *AtProT2* 启动子中有1个重要的干旱响

应元件(DRE)。在干旱时拟南芥为适应环境 *AtProT2* 基因表达上调^[2], 也有文献记载马铃薯在干旱渗透胁迫下显示出较强的适应能力, 短时间内脯氨酸达到对照的300倍左右^[20]。另外, 在铝胁迫和GA₃胁迫下出现的趋势是“升-降-升”, 可能在受到胁迫时, 脯氨酸蛋白维持在较高水平, 使该基因转录受反馈机制调节。重金属胁迫下, *StProT3* 对汞胁迫的响应最剧烈, 高达对照的439倍, 说明 *ProT3* 对汞胁迫更敏感。而在低温下, *StProT3* 基因的表达量下调, 结合其启动子上 LTR 元件说明了该基因具有

响应低温的特性, 调控机制还有待探索。以上印证了 *ProT* 基因存在马铃薯植物各组织中, 而表达水平受渗透胁迫诱导^[21]。越来越多的证据表明, 植物氨基酸转运蛋白基因受到多种环境和发育信号的转录调控^[22]。

诸多研究表明脯氨酸转运体基因是植物体内脯氨酸转运、调配的功能基因^[11,16,17,23]。本研究发现, *StProT* 基因在应对低温、盐、干旱、重金属胁迫和激素处理等非生物胁迫方面起了重要作用, 为进一步研究马铃薯 *StProT* 蛋白家族的生物学功能和机制奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 宋帅杰. 抗蒸腾剂和保水剂对雷竹林抗高温干旱生理的影响 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2015.
- [2] 姜波, 张晓莉, 任珂, 等. 马铃薯不同品种抗旱评价及生化指标 [J]. 中国马铃薯, 2017, 31(2): 71–76.
- [3] Szabados L, Savaure A. Proline: a multifunctional amino acid [J]. 2010, 15(2): 89–97.
- [4] Kemble A R, Macpherson H T. Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting [J]. The Biochemical Journal, 1954, 58(1): 46–49.
- [5] Hadi F, Fuller M P. Chemically induced mutants of *Brassica oleracea* var. *botrytis* maintained stable resistance to drought and salt stress after regeneration and micropropagation [J]. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4(3): 498–507.
- [6] 彭志红, 彭克勤, 胡家金, 等. 渗透胁迫下植物脯氨酸积累的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2002, 18(4): 80–83.
- [7] 余光辉. 水分胁迫下假俭草脯氨酸累积的 ABA, Ca^{2+} 调节 [D]. 广州: 华南师范大学, 2003.
- [8] Grousse C, Bournoville R, Bonnemain J L. Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa [J]. Plant Physiology, 1996, 111(1): 109–113.
- [9] Rentsch D, Hirmer B, Schmelzer E, et al. Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant [J]. Plant Cell, 1996, 8(8): 1437–1446.
- [10] Verslues P E. Proline accumulation in Maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone [J]. Plant Physiology, 1999, 119(4): 1349–1360.
- [11] Ueda A, Shi W, Sanmiya K, et al. Functional analysis of salt-inducible proline transporter of barley roots [J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42(11): 1282–1289.
- [12] 尹智宇, 郭华春, 封永生, 等. 干旱胁迫下马铃薯生理研究进展 [J]. 中国马铃薯, 2017, 31(4): 234–239.
- [13] 陈托兄, 张金林, 陆妮, 等. 不同类型抗盐植物整株水平游离脯氨酸的分配 [J]. 草业学报, 2006, 15(1): 36–41.
- [14] Grallath S, Weimar T, Meyer A, et al. The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns [J]. Plant physiology, 2005, 137(1): 117–126.
- [15] 陈颖, 王婷, 华学军. 脯氨酸转运相关基因的研究进展 [J]. 植物学报, 2018, 53(6): 754–763.
- [16] Lee B R, Jin Y L, Avicé J C, et al. Increased proline loading to phloem and its effects on nitrogen uptake and assimilation in water-stressed white clover (*Trifolium repens*) [J]. New Phytologist, 2009, 182(3): 654–663.
- [17] Shen Y G, Zhang W K, Yan D Q, et al. Overexpression of proline transporter gene isolated from halophyte confers salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(8): 956–962.
- [18] Akihiro U, Yuko Y Y, Tetsuko T. Salt stress enhances proline utilization in the apical region of barley roots [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 355(1): 61–66.
- [19] Liu X, Bush D R. Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants [J]. Amino Acids, 2006, 30(2): 113–120.
- [20] Di Martino C, Pizzuto R, Pallotta M L, et al. Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings [J]. Planta, 2006, 223(6): 1123–1133.
- [21] Igarashi Y, Yoshida Y, Takeshita T, et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding proline transporter in rice [J]. Plant and Cell Physiology, 2000, 41(6): 750–756.
- [22] 王洪春. 植物生理学专题讲座 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 336–341.
- [23] Kishor P B K. Salt stress in cultured rice cells: effects of proline and abscisic acid [J]. Plant Cell and Environment, 1989, 12(6): 629–633.