

玉米液泡膜焦磷酸酶基因 *ZmVPP1* 的克隆 及逆境下的表达分析

朱春利^{1,2}, 张登峰¹, 刘颖慧^{1,3}, 石云素¹, 宋燕春¹, 杜金友², 王天宇¹, 黎裕¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ²河北科技师范学院, 秦皇岛 066004; ³河北北方学院, 张家口 075000)

摘要: 采用同源克隆的方法在玉米中得到一个与拟南芥耐盐基因 *AVP1* 类似的基因。BLAST 分析表明, 该基因编码蛋白属于质子泵焦磷酸酶家族 (H₂PPase superfamily) 中的 I 型 VPP, 将其命名为 *ZmVPP1*。 *ZmVPP1* 包含一个 2301bp 的开放阅读框, 编码 766 个氨基酸残基。蛋白比对结果表明, 该蛋白在不同植物中相当保守。实时荧光定量 PCR 检测发现, *ZmVPP1* 基因在成熟叶片中高丰度表达, 在生殖器官中表达量较少。脱水、高盐、低温等逆境胁迫条件和 ABA 处理下的表达分析表明, *ZmVPP1* 基因受逆境的诱导表达, 属于不依赖于 ABA 的途径。由此推断, *ZmVPP1* 可能参与玉米对 Na⁺ 的隔离, 从而起到耐盐的作用。

关键词: 玉米; VPP; H₂PPase; 逆境; 耐盐

Cloning and Expression Analysis of *ZmVPP1* under Stresses in Maize (*Zea mays* L.)

ZHU Chun-li^{1,2}, ZHANG Deng-feng¹, LIU Ying-hui^{1,3}, SHI Yun-su¹, SONG Yan-chun¹,
DU Jin-you², WANG Tian-yu¹, LI Yu¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing 100081; ²Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066004; ³Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract In this study a gene from maize based on *AVP1* of *Arabidopsis* by the homology-based cloning was gained. Blast searches indicated that this gene encodes a vacuolar membrane pyrophosphatase (VPP)-like protein belonging to the H₂PPase superfamily, therefore named with *ZmVPP1*. The cDNA contains an uninterrupted open reading frame of 2301 bp coding for a polypeptide of 766 amino acids. Multiple sequence alignment revealed that the protein is highly conserved in the plants. Real-time quantitative PCR was used to analyze expression patterns of *ZmVPP1* in different organs and under different stresses. We found that *ZmVPP1* was mainly expressed in mature leaves but lower in reproductive organs such as young ear, indicating that *ZmVPP1* may play some roles in sequestration of Na⁺ in the vacuole of mature leaves and protect young tissues. Expression under dehydration, PEG, NaCl, cold and ABA showed that *ZmVPP1* was response to the stresses rather than ABA. The results suggest that *ZmVPP1* is involved in salt tolerance.

Keywords Maize; VPP; H₂PPase; Stress; Salt tolerance

土壤盐渍化是影响农业发展的关键问题之一。我国的盐渍化土壤约占可耕地面积的 25%, 包括 2000 万 hm² 盐荒地和 667 万 hm² 盐渍化土壤^[1], 并

且由于各种原因, 盐渍化土壤面积有进一步扩大的趋势, 严重影响到作物的生长发育^[2]。研究表明, 作物的耐盐能力大小与其液泡膜拒 Na⁺ 特性有

收稿日期: 2010-04-15 修回日期: 2010-07-18

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA10Z188); 国家自然科学基金项目 (30730063); 河北省教育厅项目 (2008499)

作者简介: 朱春利, 在读硕士, 主要从事玉米抗逆基因相关研究。E-mail: zhuchunli@gmail.com

通讯作者: 王天宇, 研究方向为玉米基因资源。E-mail: wangtianyu@263.net djinyou@sina.com

关^[3]。液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白能够把细胞质中多余的 Na^+ 泵入液泡中加以隔离,使细胞质中盐浓度降低,减少对细胞的毒害,达到耐盐的效果^[4,5]。 Na^+/H^+ 逆向转运所需动力来自于液泡膜上的 ATP 酶和焦磷酸酶所产生的跨膜质子梯度^[6-7]。

植物中的焦磷酸酶可分为 2 种:可溶性焦磷酸酶和膜结合焦磷酸酶(VPP)^[8]。VPP 结合在液泡膜上,兼具焦磷酸酶活性和质子泵功能。Nakanishi 等^[9]对 11 个陆生植物的氨基酸序列分析发现其一致性高达 86%~91%,认为不同植物中的焦磷酸酶结构高度保守,它们一般含有 14 个跨膜区域和 3 个保守片段^[10]。

目前,已从水稻^[11]、大麦^[12]、甜菜^[13]等多种植物中克隆到 VPP 基因,并且一些 VPP 已经进行了转基因研究^[14-15]。但是,有关 VPP 基因的组织特异性表达及其逆境胁迫下的表达报道较少,玉米中 VPP 的耐盐研究及启动子分析未见报道,本研究从玉米中克隆到一个 VPP 基因,并且通过胁迫诱导表达、组织特异性表达及其启动子序列进行分析,结果表明它参与了对逆境胁迫的反应。

1 材料与方法

1.1 试验设计与材料处理

玉米自交系 CN165 于正常时期播种于中国农科院试验基地,分别取抽雄吐丝期的主根、气生根、成熟叶片、雄穗、雌穗、花丝、幼胚,用于提取不同组织的 RNA。

同时,将 CN165 播种于蛭石中,浇水,置于人工气候室(28℃/16h,22℃/8h)。10d 后将幼苗取出,用蒸馏水洗去蛭石,分别进行脱水、低温(4℃)、PEG6000(20%)、NaCl(200mmol/L)等胁迫处理和 ABA(100μmol/L)处理。取处理后 0、1、2、5、10、24h 的地上部和根,立即用液氮速冻,于 -80℃ 保存备用。并取未经处理的幼叶以提取基因组 DNA。

1.2 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

采用 TrizolA⁺ TotalRNA Reagent(天根生化公司,北京)提取玉米不同组织总 RNA,经过 DNase I(TaKaRa 大连)消化后,合成 cDNA 第一链((Invitrogen, USA)。

1.3 ZmVPP1 基因的克隆

利用拟南芥基因 *AVP1* (GenBank 登录号为 A38230)在 NCBI 玉米 EST 数据库中进行 TBLASTN

同源检索,将所得序列用 BioEdit(Ver 7.0.1)软件进行拼接,得到重叠群 contig 重复多次直至没有更多的重叠 EST 被检出。将所得序列利用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)预测开放式阅读框,用预测产物搜索玉米基因组数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/static/MVP/blast.shtml?4577>)验证序列的正确性。最后利用 Primer Premier(Ver 5.0)设计引物 F: 5'-CCTACCGCTGTGGGAGTAGCCT-3', R: 5'-GGCCTTTATCCTGCGTCTCTCG-3'。利用生长 10d 的玉米幼苗 cDNA 为模版进行 PCR 扩增,程序为 95℃预变性 5min, 95℃变性 40s, 58℃退火 40s, 72℃延伸 150s 共计 30 个循环;最后 72℃延伸 10min。PCR 产物经胶回收后连接至 pMD18-T 载体,测序。

1.4 实时荧光定量 PCR

以玉米组成型表达基因 *GAPDH* (GenBank 登录号为 U45856)为内部参照,利用 STBR Premix Ex Taq(Takara 大连)及 Icyler real time PCR system (Bio-Rad)PCR 仪进行实时荧光定量 PCR。设计引物 qF: 5'-GTATTCATCGGGCTTATTGTCGGT-3', qR: 5'-ACTTCCTCCACCATCTTGAGCG-3', 扩增片段长度为 120bp。GAPDH 引物为 GF: 5'-CCCTTCATCACCA CGGACTAC-3', GR: 5'-AACCTTCTTGGCAC-CACCCT-3', 扩增片段长度为 258bp。

1.5 生物信息学分析

ZmVPP1 蛋白的基本理化性质由 ProtParam 工具(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)预测,利用 CD-Search 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsch.cgi>)检验 ZmVPP1 蛋白的保守结构域,利用 TMpred 工具(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)分析蛋白的跨膜区和跨膜方向。多序列比对由 Clustalx 程序(Ver 1.83)和 GeneDoc 程序(Ver 2.7)完成,MEGA(Ver 4.0)用于构建系统进化树。

利用 *ZmVPP1* 序列搜索玉米基因组数据库,得到基因上游 2200bp 的序列。并由 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)和 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare>)完成启动子顺式调控元件的预测。

2 结果与分析

2.1 ZmVPP1 基因的克隆与序列分析

用同源克隆的方法得到一段 2356bp 的序列

(图 1), 包含 2301bp 的开放阅读框, 经与基因组序列比对发现, 该基因有 8 个外显子。搜索玉米基因组数据库 (<http://www.maizgedb.org/blast.php>) 发现, 位于遗传图谱的 5.04bin 的 AC202920 位点, 第 5 号染色体的长臂中接近着丝粒的位置。该基因编码 766 个氨基酸残基, 预测分子量 8.01433×10^4 , 等电点 5.18。TmPred 工具分析结果表明 *ZmVPP1* 蛋白含有 14 个跨膜结构域 (图 2), 与家族特征吻合^[16]。利用 CD-Search 分析的结果验证了 *ZmVPP1*

属于 H₂PPase superfamily (GenBank 登录号为 cll1452)。

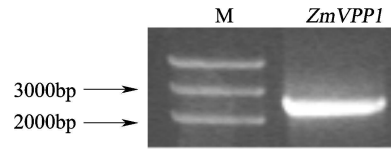


图 1 *ZmVPP1* 基因的扩增

Fig 1 Amplification of *ZmVPP1*

M: DNA 标记。M: DNA marker

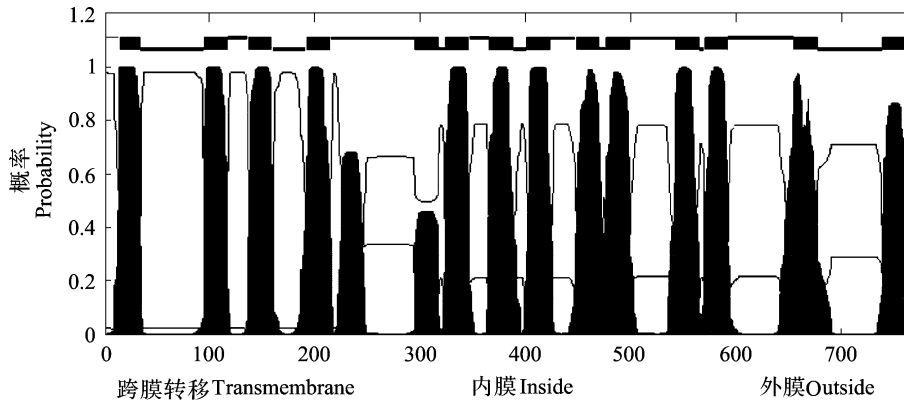


图 2 *ZmVPP1* 蛋白跨膜区预测

Fig 2 Putative transmembrane predictions of *ZmVPP1* protein

2.2 *ZmVPP1* 基因在胁迫条件下的表达分析

为检测 *ZmVPP1* 基因对逆境的响应情况, 本实验采用荧光定量的方法分析了该基因在多种胁迫条件下的表达量变化。实验结果表明该基因能够对脱水、PEG 模拟干旱、盐胁迫、低温等不同的逆境条件作出响应 (图 3)。玉米经脱水处理后, 根中 *ZmVPP1* 基因的表达量先上调, 在处理 10h 后达到峰值, 然后下调。PEG 处理能够引发与脱水类似的响应趋势, 根部开始也是上调表达, 处理后 2h 达到峰值, 然后下调表达。PEG 处理还能够引起地上部的变化, 先下调表达, 在处理 2h 达到最低值, 然后上调。对盐胁迫的响应与渗透胁迫相比, 根部的总体趋势类似, 在处理 10h 明显上调表达并达到峰值, 然后下调。但是从开始到第 5h 出现不明显的小幅变化, 可能有其他响应盐胁迫的途径在起作用。盐处理后地上部在 0~1h 之间明显下调并达到峰值, 一直持续下去。说明盐胁迫信号能更迅速地引发地上部 *ZmVPP1* 基因的响应。低温胁迫能在 0~1h 之间引发地上部上调表达, 随后下调, 至 2~24h 之间稳步上调, 到 10h 明

显上调, 24h 达到峰值。低温胁迫对根部该基因的表达影响不明显。低温胁迫下 0~1h 的上调表达说明 *ZmVPP1* 基因的转录水平的调节参与了对低温刺激的早期响应, 目的是触发了其他的调节机制, 包括而后自身的转录水平的提高。

以上结果表明, *ZmVPP1* 基因的表达受逆境影响, 为进一步检测该基因是否参与 ABA 相关途径, 对玉米幼苗进行 ABA 处理, 进行荧光定量 PCR 分析。结果表明 *ZmVPP1* 基因的表达没有明显变化, 受外源 ABA 的影响较小, 推测为非 ABA 依赖途径。

2.3 *ZmVPP1* 基因在玉米不同器官中的表达分析

通过实时荧光定量技术检测了 *ZmVPP1* 基因在玉米不同组织中的 mRNA 水平的表达 (图 4)。结果表明, 在成熟叶片中的表达量远高于在其他组织中的表达量, 有明显的组织特异性。推测其生物学意义是地上部分将多余的 Na^+ 隔离到成熟的叶片中, 从而保护幼嫩组织, 不影响植物整体的正常生长发育。在幼穗、幼胚、花丝中表达最少, 说明植物整体策略同时注重对生殖器官和幼胚的保护。

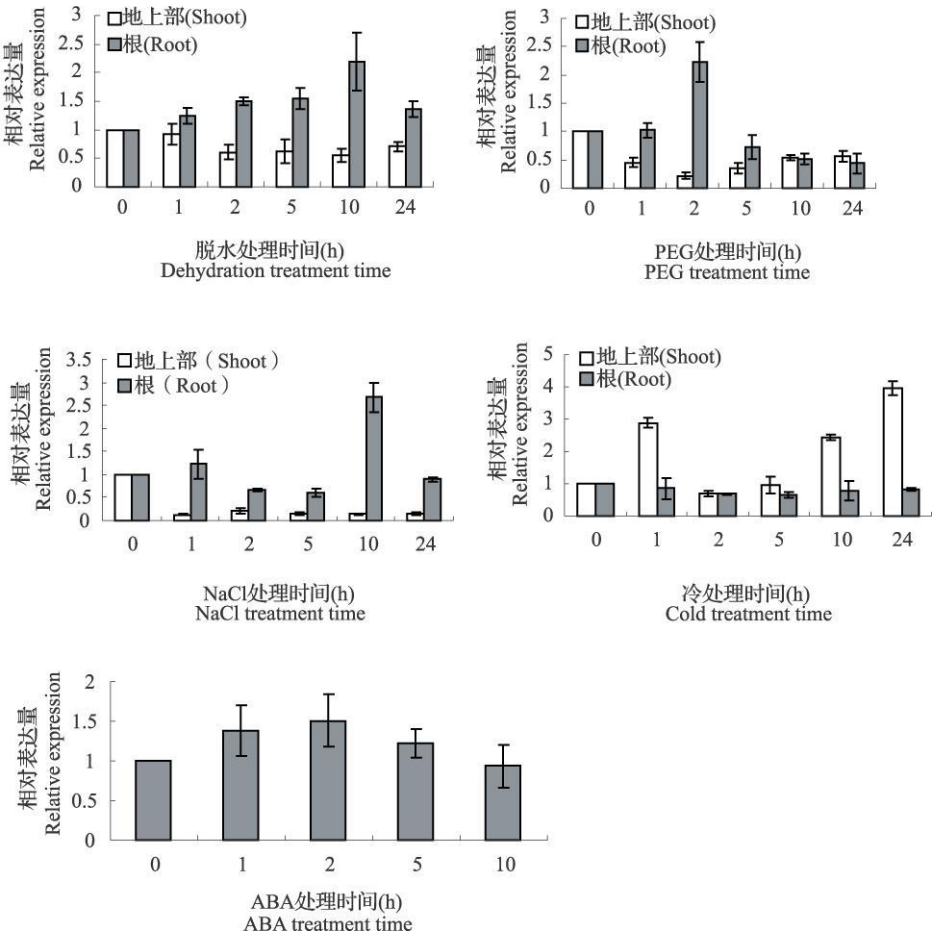


图 3 不同胁迫处理下 *Zm VPP1* 的表达情况

Fig 3 Real time RT-PCR analysis of *Zm VPP1* gene expression under dehydration, PEG, NaCl, cold and ABA treatments

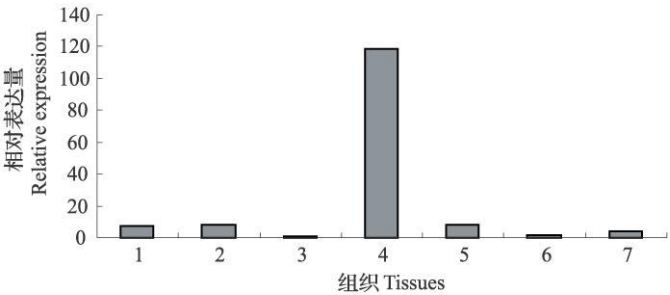


图 4 *Zm VPP1* 在不同组织中的表达

Fig 4 Expression of *Zm VPP1* in different tissues

1: 根 (Root); 2 气生根 (Aerial root); 3 幼叶 (Young ear); 4 成熟叶片 (Mature leaf); 5 雄穗 (Tassel); 6 幼胚 (Young embryo); 7 花丝 (Silk)

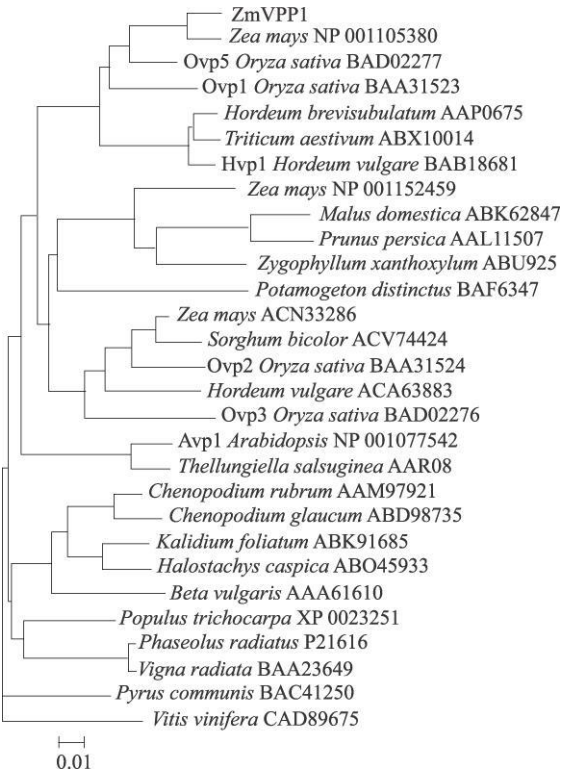


图 5 不同植物中 *ZmVPP1*的进化分析

Fig 5 Phylogenetic analysis of *ZmVPP1* genes in different plants

表 1 玉米 *ZmVPP1* 基因启动子顺式元件预测

Table 1 Predicting cis-acting elements of the *ZmVPP1* gene promoter from maize

调控序列名称	核心序列	作用
Name of regulatory sequence	Core sequence	Function
TATA-box	TAATA	core promoter element around -30 of transcription start
CAAT-box	TGCCAAC	common cis-acting element in promoter and enhancer regions
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
LTR	CCGAAA	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness
ABRE	CACGTG	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
TCA-element	GAGAAG AATA	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
CGTCA-motif	CGTCA	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGACG-motif	TGACG	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
circadian	CAANNNATC	cis-acting regulatory element involved in circadian control
G-Box	CACGTC	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
MNF1	GTGCCC (A/T) (A/T)	light responsive element
AE-box	AGAAACIT	part of a module for light response
GAG-motif	GGAGATG	part of a light responsive element
F-box	GTATAAGGCC	part of a light responsive element
MBSII	AAAAATTAGTTA	MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation
Skn-1-motif	GTCAT	cis-acting regulatory element required for endosperm expression
O2-site	GTTGACGTGA	cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation

3 讨论

自从 1975 年从甜菜中提取到 VPP 以来^[18], 现已在多种植物中克隆到 VPP 基因, 并且有些已经进行了转基因。前人对此进行了大量的研究, 主要集中在焦磷酸酶生理活性的变化和胁迫条件下探究其

2.4 多序列比对及系统发生分析

用 *ZmVPP1* 基因编码的氨基酸序列搜索 NCBI 的蛋白质数据库得到多种植物的 VPP 序列, 将这些序列比对 (图 5), 结果发现 *ZmVPP1* 与拟南芥的 AVP1 序列一致性达 86%, 属于依赖钾离子激活的 I 型 VPP^[17]。并且发现植物中的 I 型 VPP 同源性极高, 但是与同属植物的 II 型 VPP 差别较大。

2.5 *ZmVPP1* 基因的启动子元件分析

在玉米基因组数据库中选取 ORF 上游 2200bp 的序列, 利用启动子在线分析工具 PLACE 及其 PLANTCARE 进行预测 (表 1)。在翻译起始位点上游存在典型的启动子核心元件 TATA-box 及基本元件 CAAT-box。同时发现该启动子中存在逆境胁迫响应序列 TC-rich repeats 及受低温、脱落酸、水杨酸、茉莉酸等诱导的一系列顺式调控元件, 此外还存在响应昼夜节律的 Circadian 及受光诱导 G-Box、MNF1 等顺式作用元件, 和胚乳中特异表达所必需的调控元件 Skn-1 motif 及黄酮类、玉米醇溶蛋白代谢所需的调控元件 MBSII O2-site 等。

他生理指标的变化上, 对逆境胁迫下基因表达量的变化和组织特异性表达研究较少。本研究利用实时定量 PCR 技术检测不同胁迫处理条件下的基因表达量的变化。结果表明, *ZmVPP1* 基因的表达能够对多种胁迫作出响应, 即该酶除在酶活性水平上的调节机制之外, 还有 mRNA 转录水平的调节机制用

以适应胁迫条件。

脱水和 PEG 能引发该基因的表达量变化趋势大致相同,都是根部先上调而后下调。推测是脱水导致渗透压增大,根部上调表达,以使细胞质中浓度相对升高的 Na^+ 进一步隔离到液泡中,来应对渗透胁迫,降低对细胞质的毒害作用。由于根部的上调表达,在根部截留的 Na^+ 增加,从而使运输到地上部的 Na^+ 减少,导致地上部下调表达。结果还发现 PEG 处理引发 *ZmVPP1* 基因表达量的变化,根部与地上部同时达到极限,说明不同部位对脱水的响应速度是较为接近的。但脱水后,根部上调而地上部下调,说明该基因转录水平的变化存在器官差异性,这与包爱科等^[19]的结论是一致的。与对脱水的响应相比,该基因对盐的响应似乎是有所不同。据报道, V-ATPase 为液泡对 Na^+ 的隔离提供主要能量^[20],但当逆境条件下 ATP 不足时,ATP 酶活性下降而 VPP 活性增强^[21]。*ZmVPP1* 在处理第 10h 骤然出现峰值,这可能是根部受到盐胁迫时 V-ATPase 先行应对,消耗掉一定的 ATP 后, VPP 迅速上调,进一步应对盐胁迫。盐旱胁迫下都是根部上调表达而地上部下调表达,显然是由于根部更加严格控制 Na^+ 的吸收导致地上部的 Na^+ 胁迫减少所致。基因对低温的响应速度要比其他胁迫更快,显然是该基因参与对低温的早期响应,但 1h 后表达量的稳步上调反映了适应低温后,随着处理时间的延长而不断积累。该基因的表达能够对多种胁迫作出响应,说明该基因是植物胁迫调节机制中的同时连接多条胁迫信号途经的一个节点之一。

目前,植物 VPP 基因的转基因研究也取得了许多成果,比如拟南芥 *AVP1* 转化匍匐剪股颖、紫花苜蓿,灰绿藜 *CgVP1* 转化拟南芥以及 *AVP1* 在拟南芥本身的过表达,结果都能提高受体的耐盐性^[14-15, 19]。但是将 VPP 基因转化到作物中的研究鲜有报道,所以下一步将把 *ZmVPP1* 转化拟南芥中去验证功能,同时转化玉米使其过量表达,以期耐盐性转基因作物的应用提供支持。

4 结论

从玉米自交系材料 CN165 中克隆到的 *ZmVPP1* 基因属于 H-PPase 家族。在成熟叶片中高丰度表达,在生殖器官及幼嫩组织中表达较少,受盐、旱、冷等胁迫条件的诱导表达,说明该基因的主要生理机能之一是参与地上部对 Na^+ 的隔离,进而参与逆境下的调节机制。

参考文献

- [1] 王宝山, 邹琦. NaCl 胁迫对高粱根、叶鞘和叶片液泡膜 ATP 酶和焦磷酸酶活性的影响 [J]. 植物生理学报, 2000, 26(3): 181-188
- [2] Flowers T J, Troke P J, Yeo A R. The mechanism of salt tolerance in halophytes [J]. Annu Rev Plant Physiol 1977, 28: 89-121
- [3] Greenway H, Munns R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes [J]. Annu Rev Plant Physiol 1980, 31: 141-190
- [4] Ballesteros E, Blumwald E, Donaire J P, et al. Na^+/H^+ antiporter activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots by NaCl stress [J]. Physiol Plant 1997, 99: 328-334
- [5] Hamada A, Hino T, Nakamura T, et al. Na^+/H^+ antiporter from *Synechocystis* species PCC 6803 homologous to SOS1, contains an aspartic residue and long C-terminal tail important for the carrier activity [J]. Plant Physiol 2001, 125: 437-446
- [6] Churchill K A, Sze H. Anion sensitive H^+ -pumping ATPase in membrane vesicles from oat roots [J]. Plant Physiol 1983, 71: 610-617
- [7] Yokoi S, Quintero F J, Cubero B, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response [J]. Plant J 2002, 30(5): 529-539
- [8] 王延枝. 植物液泡膜上的焦磷酸酶 [J]. 植物生理学通讯, 1990(4): 73-76
- [9] Nakanishi Y, Maeshima M. Molecular cloning of vacuolar H^+ -pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean [J]. Plant Physiol 1998, 116: 589-597
- [10] Maeshima M. Tonoplast transporters: organization and function [J]. Annu Rev Plant Physiol 2001, 52: 469-497
- [11] Brini E, Gaxiola R A, Berkowitz G A, et al. Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump [J]. Plant Physiol Biochem 2005, 43: 347-354
- [12] Tanaka Y, Chiba K, Maeda M, et al. Molecular cloning of cDNA for vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase in *Hordeum vulgare* [J]. Biochem Biophys Res Commun 1993, 190(3): 1110-1114
- [13] Kim Y, Kim E J, Rea P A. Isolation and characterization of cDNA encoding the vacuolar H^+ -pyrophosphatase of *Beta vulgaris* [J]. Plant Physiol 1994, 106(1): 375-382
- [14] Gaxiola R A, Li J, Undurraga S, et al. Drought and salt tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H^+ -pump [J]. Proc Natl Acad Sci 2001, 98(20): 11444-11449
- [15] 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
- [16] Maeshima M. Vacuolar H^+ -pyrophosphatase [J]. Biochim Biophys Acta 2000, 1465(1-2): 37-51
- [17] Drazlowicz Y M, Rea P A. Vacuolar hpyrophosphatases from the evolutionary backwaters into the mainstream [J]. Trends in Plant Sci 2001, 6(5): 206-211
- [18] Karlsson J M. Membrane-bound potassium and magnesium ion-stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) [J]. Biochim Biophys Acta 1975, 399(2): 356-363
- [19] 包爱科, 张金林, 郭正刚, 等. 液泡膜 H^+ -PPase 与植物耐盐性 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(4): 777-783
- [20] Barkla B J, Apse M P, Manolson M F, et al. The plant vacuolar Na^+/H^+ antiporter [J]. Symp Soc Exp Biol 1994, 48: 141-153
- [21] Carystinos G D, MacDonald H R, Monroy A F, et al. Vacuolar H^+ -translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedling of rice [J]. Plant Physiol 1995, 108(2): 641-649