

# 小麦铝胁迫基因 *TaAIP* 的克隆、表达分析及亚细胞定位

尹丽娟<sup>1</sup>, 卢盼盼<sup>1,2</sup>, 刘沛<sup>1</sup>, 陈明<sup>1</sup>, 李连城<sup>1</sup>, 徐兆师<sup>1</sup>, 马有志<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/农业部麦类生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081;  
<sup>2</sup> 西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 以小麦抗逆相关蛋白 TaMAPK2 作为诱饵, 利用酵母双杂交系统进行筛库, 获得互作蛋白 TaAIP。氨基酸序列分析发现 TaAIP 具有 wali 保守区, 并且与一些物种的铝诱导蛋白相似。实时荧光定量 PCR 分析显示, *TaAIP* 基因受到铝、干旱以及高盐胁迫上调表达。半定量 RT-PCR 结果表明, *TaAIP* 在小麦茎中表达, 在根部、叶片以及花中没有表达。亚细胞定位试验发现, TaAIP 定位在细胞膜上。这些结果为深入分析 *TaAIP* 的抗逆性作用机理奠定基础。

**关键词:** 小麦; 逆境胁迫; 表达模式分析; 酵母双杂交; 亚细胞定位

## Cloning, Expression Analysis and Subcellular Localization of Aluminum-induced Gene *TaAIP* in Wheat

YIN Li-juan<sup>1</sup>, LU Pan-pan<sup>1,2</sup>, LIU Pei<sup>1</sup>, CHEN Ming<sup>1</sup>, LI Lian-cheng<sup>1</sup>, XU Zhao-shi<sup>1</sup>, MA You-zhi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Triticeae Crops, Ministry of Agriculture, Beijing 100081;  
<sup>2</sup> College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100)

**Abstract:** TaAIP was obtained as the interaction protein of wheat stress-related TaMAPK2, which was used as bait protein to screen the wheat cDNA library by yeast-two-hybrid system. TaAIP, containing a wali domain, was similar to some aluminum-induced proteins. Real-time PCR showed that the expression of *TaAIP* was up-regulated by the imposition of aluminum, high-salt, and drought stress. Semi-quantitative RT-PCR analysis indicated *TaAIP* was a stem-specific gene, not expressed in root, leaves, and flower. The subcellular localization assay indicated that TaAIP located on plasma membrane. These results provided the foundation for further analysis of *TaAIP* resistance mechanisms.

**Key words:** wheat; stress; expression profile; yeast-two-hybrid; subcellular localization

各种生物胁迫和非生物胁迫, 如植物病虫害、干旱、高盐以及高温等, 严重影响植物的生长和产量。植物在长期进化过程中形成了一套完善的信号传递机制, 能够感受外界胁迫信号并传递到细胞内, 从而在分子水平上产生一系列应答响应, 激活下游抗逆相关基因的表达, 保障细胞正常的生命活动。研究植物对逆境信号的感知、传递以及适应性响应的分子机制, 对于阐明植物适应逆境机制, 提高植物抗性有重要的理论和应用价值<sup>[1]</sup>。

铝毒害已成为酸性土壤中植物生长主要的限制因素<sup>[2]</sup>。铝毒害破坏植物细胞结构, 抑制根系对营养元素的吸收, 影响光合作用, 导致植物正常生理活动至关重要的酶活性改变, 最终造成植物产量降低<sup>[3]</sup>。农业生产上通常依靠在酸性土壤中施加生石灰来中和游离铝离子, 然而这种方法只能改良耕地的表层土壤, 并不能改变深层土壤的酸性, 且造成大量的财力和人力的消耗<sup>[4]</sup>。因此, 在解决酸性土壤问题的同时, 挖掘植物自身的抗铝潜力, 获得耐铝

收稿日期: 2013-03-19      修回日期: 2013-05-16      网络出版日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1446.025.html>

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31171546); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610032011011)

第一作者主要从事植物抗逆分子生物学的研究。E-mail: chenyangrz@126.com; 卢盼盼为共同第一作者

通信作者: 徐兆师, 主要从事植物抗逆分子生物学的研究。E-mail: xuzhaoshi@caas.cn

能力强的植物品种,对耐铝品种的开发和利用无疑是更有效地解决酸性土壤问题的途径。

蛋白的磷酸化/去磷酸化修饰在信号传递过程中起到开关的作用,调控生物个体对外界胁迫的响应<sup>[5-6]</sup>。近几年研究表明,促分裂原活化蛋白激酶(MAPK, mitogen-activated protein kinase)参与各种非生物胁迫反应。如水稻 *OsMAPK5* 受盐和旱诱导表达,其在水稻中超表达能够显著提高对盐和旱的抗性<sup>[7]</sup>;在高盐和渗透胁迫下,烟草 *CsNMAPK* 的表达量显著提高,且在高盐及渗透胁迫处理条件下转基因烟草种子的萌发率要明显高于对照<sup>[8]</sup>。本试验利用酵母双杂交技术,以 *TaMAPK2*<sup>[9]</sup> 作为诱饵蛋白,从小麦 cDNA 文库中筛选到一个与 *TaMAPK2* 可能互作的蛋白 *TaAIP*,研究显示 *TaAIP* 定位在细胞膜上,受胁迫诱导表达,这些结果为深入分析 *TaAIP* 的作用机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及胁迫处理

普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 农家种小白麦由中国农业科学院作物科学研究所景蕊莲研究员提供。将室温 25 ℃ 光照培养 10 d 左右的小麦幼苗分别进行干旱(幼苗置于干燥的滤纸上)、高盐(100 mmol/L NaCl 溶液)和铝(100 mmol/L)胁迫处理,在处理 0、0.5、1、3、6、12 和 48 h 时取样,样品经液氮速冻后于 -80 ℃ 保存备用。

### 1.2 *TaAIP* 基因的克隆及生物学分析

根据 *TaMAPK2* 基因的序列及 pGBKT7 (Clontech, 美国)的克隆位点,在基因的两端分别引入 *EcoRI* 和 *BamHI* (Promega, 美国)酶切位点。酶切、In-fusion 连接 (TaKaRa, 大连)到质粒 pGBKT7。测序验证融合质粒 pGBKT7::*TaMAPK2* 克隆正确。将 pGBKT7::*TaMAPK2* 作为诱饵载体对小麦 cDNA 文库进行筛选,从中得到了一个可能与 *TaMAPK2* 互作的蛋白 *TaAIP* 的全长 cDNA。以小麦 cDNA 为模版,用 *TaAIP* 的特异引物(上游引物 5'-GTTTGATCTGTGAAAATGTTG-3';下游引物 5'-CAGAATGTACATTGCCAAAG-3')扩增程序为 95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 45 s,60 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min 得到 *TaAIP* 基因全长。

根据 *TaAIP* 的全氨基酸序列,在 NCBI 上进行 Blastp 同源性搜索,并进行蛋白家族预测;为进一步研究 *TaAIP* 同源蛋白的进化关系,根据 NCBI 中 9 个植物物种的同源基因使用 DNAMAN 进行蛋白同

源比对,做系统发育树分析。

### 1.3 RNA 提取和组织表达分析

按照 Trizol 试剂盒 (TIANGEN, 北京)提取小麦根、茎、叶和花的总 RNA,使用 RNA kit ver. 3.0 cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa, 大连)进行第一链 cDNA 的合成。以均一化的小麦 cDNA 为模板,用 *TaAIP* 基因的特异引物(上游引物 5'-GTTCTGCGGGCTGGACGACA-3';下游引物 5'-GAAGACGACGAAGGCGAAGGAG-3')进行 PCR 扩增,以小麦 *Actin* 基因作为内参(上游引物 5'-TGGGGAAAATATGGCATC-3';下游引物 5'-CCAGCAAGGTCCAAACGA-3')。

### 1.4 RNA 提取和荧光定量 PCR 分析

用 Trizol 试剂盒 (TIANGEN, 北京)分别提取 3 种胁迫下不同时间样品的总 RNA,按照 RNA kit ver. 3.0 cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa, 大连)合成第一链 cDNA 为模板。用 *TaAIP* 基因非保守区的特异引物(上游引物 5'-GTTCTGCGGGCTGGACGACA-3';下游引物 5'-GAAGACGACGAAGGCGAAGGAG-3')以小麦 *Actin* 基因作为内参,利用实时荧光定量 PCR 仪 (BioRad iCycle, CA, USA)检测 *TaAIP* 在不同胁迫下的表达模式。反应体系为:2 × Taq PCR MasterMix (含荧光染料)10 μL,10 μmol/L 引物各 0.5 μL,cDNA 模板 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 8 μL。扩增程序为 95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 20 s,56 ℃ 退火 25 s,72 ℃ 延伸 20 s,40 个循环;循环结束后,利用溶解曲线检测产物特异性。

### 1.5 酵母双杂交验证互作

将 pGBKT7::*TaMAPK2* 以及 pGADT7::*TaAIP* 质粒共转化入酵母菌株 AH109 中。将转化后的酵母菌株于 SD/-Trp/-Leu 平板上划线培养。若酵母细胞在 SD/-Trp/-Leu 平板上生长则证明 pGBKT7::*TaMAPK2* 和 pGADT7::*TaAIP* 的质粒均转入酵母细胞中。挑取 SD/-Trp/-Leu 平板上的单克隆菌株于 1 mL YPDA 液体培养基中,30 ℃ 下振荡培养 2 d,吸取 1 μL 酵母菌液于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 平板上,置于 30 ℃ 培养 3~4 d 后观察菌落显蓝情况。

### 1.6 16318hGFP::*TaAIP* 融合表达载体的构建与原核质体的亚细胞定位分析

设计带有 *HindIII* 和 *BamHI* (Promega, 美国)酶切位点的特异引物(上游引物 5'-ATTAAGCTTATGTTGCCATCTTCCAGAAG-3';下游引物 5'-AAAGATCCTCTGATGGCGGCTTCGT-3'),将扩增得到的产物与 16318h-GFP 载体一同酶切,该载体包含

CaMV35S 启动子和绿色荧光蛋白 GFP 编码序列。T4 连接酶 (TaKaRa, 大连) 连接, TaAIP 插入到 CaMV35S 启动子和绿色荧光蛋白 GFP 编码序列之间,测序正确后将重组质粒和对照空载体利用瞬时转染法导入小麦原生质体,室温培养过夜,在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光。

2 结果与分析

2.1 TaAIP 的克隆及生物信息学分析

用 TaMAPK2 为诱饵,利用酵母双杂交系统筛选小麦 cDNA 表达文库,获得互作蛋白 TaAIP。设计特异性引物,以小麦 cDNA 为模板扩增 TaAIP 基因,并克隆到 pEASY-Blunt (Transgen, 北京) 载体上,测序正确。TaAIP 基因大小为 795 bp,编码 265 个氨基酸。

TaAIP 蛋白序列在 NCBI 中结构预测结果显示, TaAIP 蛋白具有 wali7 保守域,是 Gn\_AT\_II 超家族中 Gn\_AT\_II 家族的一个成员,含有谷氨酸氨转移酶的保守结构域, TaAIP 与 Gn\_AT\_II 家族中 AsnB 成员有部分同源域(图 1)。在 NCBI 中用 Blastp 搜索,发现 TaAIP 蛋白与玉米、大豆、蓖麻和黄瓜等茎部特异性表达蛋白的蛋白序列具有较高的相似性,其中与玉米、大豆茎部特异性表达蛋白相似性分别为 77% 和 61%;另外与拟南芥和紫茉莉等的铝诱导蛋白以及蒺藜苜蓿和油棕的天冬酰胺合成酶蛋白也具有较高相似性(大于 50%)(图 2)。进化树分析表明(图 3),TaAIP 与玉米的茎部特异性表达蛋白和油棕的天冬酰胺合成酶蛋白进化关系较近,聚为一类。

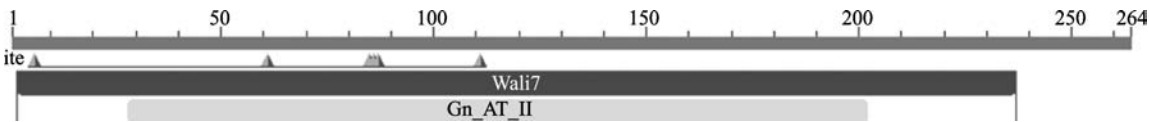


图 1 TaAIP 蛋白功能域预测  
Fig. 1 Domains prediction of TaAIP protein



小麦 (*Triticum aestivum*):gi|257135793|;玉米 (*Zea mays*):gi|413919985|,gi|226499994|;油棕 (*Elaeis guineensis*):gi|50404475|;大豆 (*Glycine max*):gi|356543282|;拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*):gi|18416995|,gi|15228883|;蓖麻 (*Ricinus communis*):gi|255556005|;紫茉莉 (*Mirabilis jalapa*):gi|220702721|;黄瓜 (*Cucumis sativus*):gi|449433863|;大豆 (*Glycine max*):gi|356549369|;蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*):gi|357446503|

图 2 TaAIP 蛋白保守区多序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of TaAIP conserved domain

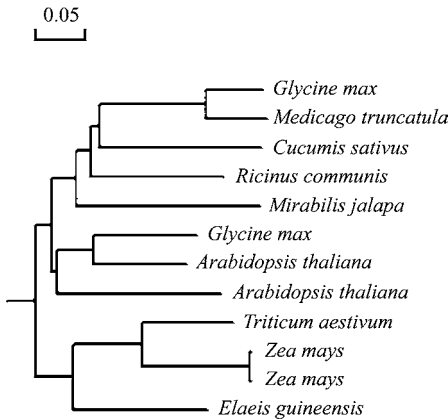


图 3 TaAIP 与其他物种的系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of TaAIP with other species

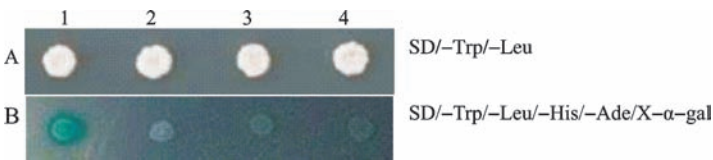
2.2 TaMAPK2 和 TaAIP 在酵母中的互作验证

pGBKT7::TaMAPK2 和 pGADT7::TaAIP 重组质粒共转化进入酵母细胞,酵母菌株在 SD/-Trp/-Leu 平板上生长证明两个质粒已经全部转化进入酵母细胞中。吸取菌液微量点到营养缺陷型 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 培养基上培养,结果显示酵母菌落能正常生长且菌落呈蓝色(图 4)。初步证实 TaMAPK2 和 TaAIP 蛋白发生了相互作用。

2.3 TaAIP 的组织特异性表达

以 Actin 作对照,通过半定量 PCR 法,研究 TaAIP 基因在小麦植株不同部位的表达。结果显示在





1:AD-TaAIP + BD-TaMAPK;2:TaMAPK2 + BD;3:TaAIP + AD;4:AD + BD  
A:菌落正常生长呈白色表示4组质粒均转化入酵母细胞中;B:1号菌落正常生长呈蓝色,2、3、4号菌落均不能正常生长  
A:The 4 groups of reconstruct vector were transformed into the yeast cell;B:Colony 1 grew strongly and was blue,and colonies 2,3,and 4 grew abnormally

图4 TaAIP与TaMAPK的互作验证

Fig. 4 Identification of interaction between TaAIP and TaMAPK

正常生长条件下,TaAIP在小麦茎中表达,在根部、叶片以及花中没有表达(图5)。

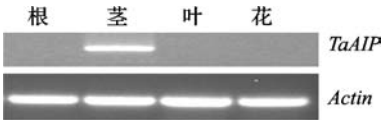
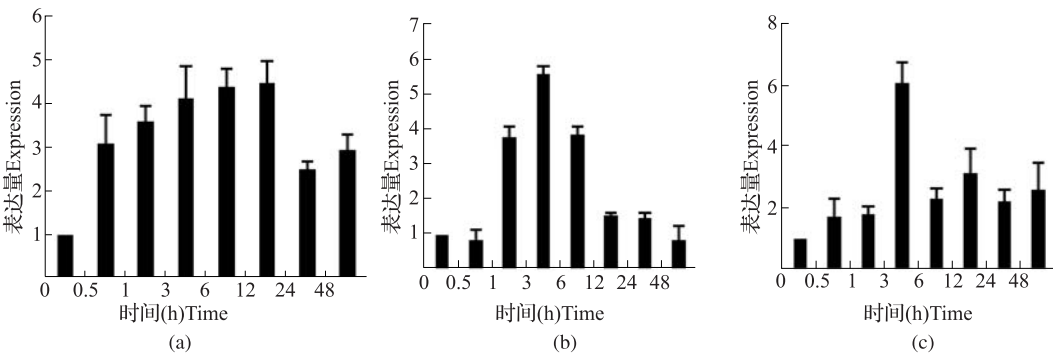


图5 TaAIP基因的RT-PCR扩增

Fig. 5 RT-PCR amplification of TaAIP gene

2.4 TaAIP在铝、干旱以及盐胁迫下的表达模式

在重金属胁迫下,发现TaAIP受铝的诱导表达。在铝胁迫下,TaAIP在处理30 min后表达量就明显提高,12 h达到最高,比对照高4倍,随后降低。在非生物胁迫下,发现TaAIP受盐和干旱的诱导表达,分别比对照高5倍和6倍。在盐胁迫下,TaAIP在处理1 h后,表达量超过对照3倍以上;而在干旱处理下,TaAIP在3 h后表达量才明显提高(图6)。以上结果表明,TaAIP基因参与了铝、盐以及干旱等胁迫响应。



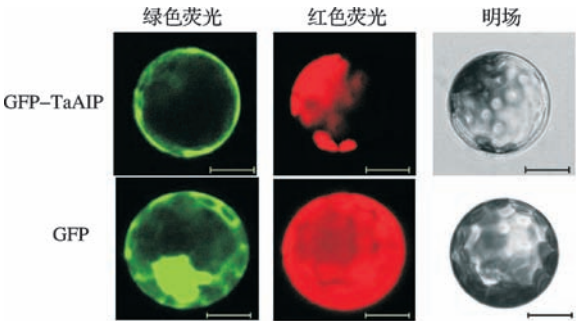
a:铝胁迫;b:盐胁迫;c:旱胁迫 a:Aluminum stress,b:High-salt stress,c:Drought stress

图6 TaAIP基因在铝、高盐和干旱胁迫下的表达

Fig. 6 The expression profiles of TaAIP under aluminum,high-salt,and drought stresses

2.5 TaAIP的亚细胞定位分析

16318hGFP::TaAIP融合表达载体和对照空载体利用瞬时转染法导入小麦原生质体,绿色荧光蛋白(GFP)基因在小麦原生质体中获得高效瞬时表达,绿色荧光蛋白在475 nm蓝光激发下产生509 nm的绿色荧光。对照GFP蛋白无定位功能,在细胞膜、细胞核内和细胞质中都可以观察到GFP的绿色荧光信号(图7),将TaAIP基因插入到35S启动子和绿色荧光蛋白基因之间形成融合蛋白后,仅在细胞膜上产生绿色荧光(图7),表明TaAIP蛋白定位在细胞膜上。



GFP-TaAIP定位在细胞膜上;对照CFP分布在整个细胞中  
GFP-TaAIP was localized on the plasma membrane,  
the control GFP was distributed in the cell

图7 TaAIP蛋白在小麦原生质体中的定位分析  
Fig. 7 Subcellular localization analysis of TaAIP in wheat protoplasts

3 讨论

受胁迫诱导表达的基因在提高植物抗性上发挥

着重要作用。如小麦 R2R3 类 MYB 转录因子 *TaMYB30-B* 能够被干旱诱导表达,该基因在拟南芥中的超表达能够提高拟南芥对干旱的抗性<sup>[10]</sup>;苜蓿 *MsALMT1* 在烟草中超表达能够提高烟草对铝胁迫的抗性<sup>[11]</sup>;烟草 *Tsi1* 基因的超表达提高了辣椒对细菌和病毒的抗性<sup>[12]</sup>。转小麦 *TaERF1* 基因的拟南芥提高了对低温、干旱、高盐以及灰霉病(*Botrytis cinerea*)的抵抗力,转 *TaERF1* 基因的烟草增加了植株的抗盐性和对野火病(*Pseudomonas syringae*)的抗病性<sup>[13]</sup>。因此研究胁迫诱导表达的基因可为植物改良提供依据,同时对于阐明植物抗性机理有重要意义。

铝对植物的毒害是酸性土壤中限制植物生长的重要因素。植物自身的耐铝机制很多,ALMT 和 MATE 家族的基因编码膜蛋白,使有机阴离子如苹果酸、柠檬酸排出,结合铝离子,使植物免受铝离子的毒害<sup>[14]</sup>。高粱 *SbMATE* 编码一个柠檬酸盐运输蛋白结合铝离子从而减轻铝离子对植物的毒害<sup>[15]</sup>;过表达 *TaALMT1* 基因的小麦,提高了小麦对铝离子的抵抗能力<sup>[16]</sup>。此外,基因突变<sup>[17]</sup>或者过表达细胞膜上与生理和应激反应相关的基因<sup>[18-19]</sup>以及过表达新陈代谢过程中的目标基因<sup>[20-21]</sup>都能够提高植株对铝胁迫的耐受性。寻找铝胁迫抗性基因对于提高植物对铝毒胁迫有重要的分子育种意义。

本研究从小麦中克隆出一个胁迫诱导的 *TaAIP* 基因,蛋白序列比对发现,*TaAIP* 蛋白与一些物种铝诱导蛋白具有相似性,而且 *TaAIP* 与小麦 *wali7* 和谷子 *Si69* 同属于 Gn\_AT\_II 家族的成员,包含 *wali7* 保守域。小麦 *wali7* 和谷子 *Si69* 能够受铝胁迫的诱导表达<sup>[22-23]</sup>。*Si69* 在拟南芥中的超表达提高了植物对铝的抗性<sup>[22]</sup>。铝胁迫下,*TaAIP* 在处理早期被高效诱导表达,说明 *TaAIP* 在重金属胁迫下可能快速的发挥作用。

蛋白激酶催化的蛋白磷酸化和蛋白磷酸酶催化的去磷酸化作用在植物细胞感受各种环境信号及其信号传导与放大过程中起着重要作用,其中 MAPKs 的作用已成为一个研究热点。研究发现,MAPK 不仅参与了植物的生长发育过程和激素调控,还在逆境胁迫应答过程中起着重要的作用。利用酵母双杂交系统初步验证了 *TaAIP* 与 *TaMAPK2* 的互作。*TaAIP* 除了受到铝胁迫诱导外,还受到干旱和盐胁迫的诱导表达。推测 *TaAIP* 参与胁迫诱导的信号转导,且与 MAPK 级联途径存在交叉,对提高小麦非生物逆境抗性有重要作

用,其机制需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. Trends Plant Sci, 2001, 6(2): 66-71
- [2] Delhaize E, Ryan P R. Aluminum toxicity and tolerance in plants[J]. Plant Physiol, 1995, 107(2): 315
- [3] 郭天荣, 张国平, 卢王印, 等. 铝胁迫对不同耐铝大麦基因型干物质积累与铝和养分含量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(3): 324-330
- [4] 肖厚军, 王正银. 酸性土壤铝毒与植物营养研究进展[J]. 西南农业学报, 2007, 19(6): 1180-1188
- [5] Hunter T. A thousand and one protein kinases[J]. Cell, 1987, 50(6): 823
- [6] Zhang S, Klessig D F. MAPK cascades in plant defense signaling[J]. Trends Plant Sci, 2001, 6(11): 520-527
- [7] Xiong L, Yang Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase[J]. Plant Cell, 2003, 15(3): 745-759
- [8] Xu H, Li K, Yang F, et al. Overexpression of *CsNMAPK* in tobacco enhanced seed germination under salt and osmotic stresses[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(7): 3157-3163
- [9] 刘沛, 徐兆师, 晏月明, 等. 小麦 *TaMAPK2* 激酶基因的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 92-95
- [10] Zhang L, Zhao G, Xia C, et al. A wheat R2R3-MYB gene, *TaMYB30-B*, improves drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. J Exp Bot, 2012, 63(16): 5873-5885
- [11] Chen Q, Wu K H, Wang P, et al. Overexpression of *MsALMT1*, from the aluminum-sensitive *Medicago sativa*, enhances malate exudation and aluminum resistance in tobacco[J]. Plant Mol Biol Rep, 2013, 31(3): 769-774
- [12] Shin R, Park J M, An J M, et al. Ectopic expression of *Tsi1* in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens[J]. Mol Plant Microbe In, 2002, 15(10): 983-989
- [13] Xu Z S, Xia L Q, Chen M, et al. Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (*TaERF1*) that increases multiple stress tolerance[J]. Plant Mol Biol, 2007, 65(6): 719-732
- [14] Ryan P R, Tyerman S D, Sasaki T, et al. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils[J]. J Exp Bot, 2011, 62(1): 9-20
- [15] Magalhaes J V, Liu J, Guimaraes C T, et al. A gene in the multi drug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum[J]. Nat Genet, 2007, 39(9): 1156-1161
- [16] Pereira J F, Zhou G, Delhaize E, et al. Engineering greater aluminium resistance in wheat by over-expressing *TaALMT1*[J]. Ann Bot, 2010, 106(1): 205-214
- [17] Rounds M A, Larsen P B. Aluminum-dependent root-growth inhibition in *Arabidopsis* results from AtATR-regulated cell-cycle arrest[J]. Curr Biol, 2008, 18(19): 1495-1500
- [18] Ezaki B, Gardner R C, Ezaki Y, et al. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress[J]. Plant Physiol, 2000, 122(3): 657-666