

甘蔗 *ScHAK9* 基因克隆及表达分析

罗海斌¹, 黄诚梅¹, 蒋胜理¹, 曹辉庆¹, 邓智年², 吴凯朝², 徐林², 陆珍¹, 魏源文¹

(¹广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007;

²广西农业科学院甘蔗研究所/农业部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室, 南宁 530007)

摘要: KUP/HAK/KT 家族基因在介导细胞内钾的积累及维持植物的生长发育中起重要作用, 本研究以新台糖 22 号 (ROC22) 甘蔗为研究材料, 采用同源克隆技术获得钾转运 *ScHAK9* 基因的完整编码序列 (CDs), 并利用生物信息学软件对蛋白质结构和功能进行预测分析, 同时利用 qPCR 技术分析基因的组织特异性表达以及在不同干旱条件下的表达情况。结果表明, *ScHAK9* 基因的 cDNA 完整编码区长度为 2352 bp, 编码 783 个氨基酸, 属于碱性疏水蛋白, 结构中包含了 12 个跨膜结构域, 蛋白主要定位在细胞质膜上; 蛋白质二级结构主要由 α 螺旋结构、无规则卷曲结构和扩展长链组成; 系统发育树分析显示 *ScHAK9* 与玉米 *ZmHAK9* 基因同源性较高。qPCR 分析结果表明, *ScHAK9* 基因在不同组织间的相对表达量具有明显差异, 叶片中表达最高, 其次是茎, 根系中表达最低, 具有组织特异性; 干旱胁迫可以诱导 *ScHAK9* 基因表达, 其表达量随着胁迫程度加重表现出升高趋势, 且在复水后才有所下降。初步推测该基因可能在甘蔗发育和抵御干旱胁迫中起着重要作用, 本研究为进一步阐明 *ScHAK9* 的功能及作用机制奠定了分子基础。

关键词: 甘蔗; 钾转运蛋白 (HAK); 基因克隆; 生物信息学分析; 基因表达

Molecular Isolation and Expression Analysis of *ScHAK9* Gene from Sugarcane

LUO Hai-bin¹, HUANG Cheng-mei¹, JIANG Sheng-li¹, CAO Hui-qing¹, DENG Zhi-nian²,

WU Kai-chao², XU Lin², LU Zhen¹, WEI Yuan-wen¹

(¹Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007;

²Sugarcane Research Institute Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement (Guangxi), Ministry of Agriculture, Nanning 530007)

Abstract: The KUP/HAK/KT family gene plays an important role in regulation of potassium accumulation. In this research, we isolated the complete coding sequence of *ScHAK9* and investigated the transcriptional levels in ROC22. *ScHAK9* gene was composed of 2352 nucleotides that encodes 783 amino acids with 12 predictable transmembrane domains. The deduced protein was predicted to be a basic dewatering protein and localized to the cytoplasmic membrane. The secondary structure consisted of alpha spiral structure, irregular curling structure and extended long chain. *ScHAK9* gene showed highly sequence identity with the homologous genes as compared with *ZmHAK9* gene (*Zea mays* L.). Real-Time PCR showed that the *ScHAK9* gene highly expressed in the leaves, followed by the stem and the root at last. *ScHAK9* gene expression was induced under drought stress, and the higher expression decreased after re-watering. Thus, our work provided first insight about *ScHAK9*, which might play a role in drought stress resistance.

Key words: sugarcane; Potassium transporter (HAK); gene cloning; bioinformatics analysis; gene expression

收稿日期: 2018-01-24 修回日期: 2018-03-02 网络出版日期: 2018-05-29

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180529.1127.001.html>.

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2014GXNSFAA118081, 2013GXNSFAA019077); 广西农业科学院基本科研业务专项项目 (2015YT96、桂农科 2017YM35)

第一作者研究方向为作物分子育种。E-mail: dld_128@126.com

通信作者: 魏源文, 研究方向为作物基因克隆与转基因。E-mail: yw-wei@126.com

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)为禾本科甘蔗属植物,主要在热带和亚热带地区种植,是中国乃至世界上第一大糖料作物^[1],广西是中国甘蔗种植第一大省,蔗糖业是广西经济的支柱产业之一。广西90%以上的蔗区分布在缺乏良好灌溉条件,土壤贫脊的旱坡地上,致使蔗株遭受干旱、低温、盐害等环境胁迫伤害,最终造成总产量和品质的下降^[2-4]。钾素是植物生长发育的必需元素之一,与碳水化合物形成以及抗倒伏、抗旱、抗病有密切关系。高亲和性钾转运体基因(*HAK*)在植物吸收、利用钾素过程中有十分重要的作用,克隆分析甘蔗*HAK*基因,弄清*HAK*基因在不同组织以及不同干旱条件下的表达特性,对进一步解析*HAK*基因在甘蔗钾素利用和应答干旱胁迫中的作用具有重要意义。

植物对 K^+ 的吸收和传输主要有钾离子通道和钾离子转运载体两种类型,可归为离子通道蛋白家族(*Shaker*和*KCO/TPK*家族)和转运体家族(*KUP/HAK/KT*,*HKT*和*CPA*家族)。其中*KUP/HAK/KT*基因家族主要介导高亲和性 K^+ 吸收,并积累钾离子维持植物的生长发育^[5-6]。目前已发现*KUP/HAK/KT*基因存在于多个物种中,包括拟南芥、玉米、水稻、冰叶日中花、杨树等植物^[7-11]。在结构上*KUP/HAK/KT*基因家族存在相似的保守结构域,例如KQXXALGCFPKXKIVHTSXKXXGQIYIPENWILM^[12]以及GXXXGDXXXSPLY^[13]。另外还具有数目不等的跨膜区,在部分物种的跨膜区之间还有一个长的胞质环结构^[14]。*KUP/HAK/KT*基因在植物上具有组织特异性表达。如拟南芥中*AtKUP1*基因在嫩叶中的表达量较高,而在老叶中未检测到其表达^[15],Zou等^[16]研究发现*AtKT3/AtKUP4*在拟南芥根冠的表达量很高,将其敲除后根毛的生长受到阻碍,这说明*HAK*基因通过不同部位的特异性表达调控着植物钾元素的吸收,促进植物生长。干旱胁迫下,植物通过调控钾转运基因表达来调节气孔的闭合^[17]。*KUP/HAK/KT*家族作为 K^+ 的运输载体在植物抗旱调节机制中也发挥了重要的作用,*KUP/HAK/KT*家族中*KAT1*和*KAT2*主要负责 K^+ 流入驱动的气孔开启,*GORK*基因主要负责由 K^+ 外排造成的气孔关闭^[18]。干旱条件下,植物体内降低*KAT*的活性,另一方面激活*GORK*造成 K^+ 从保卫细胞外排,两个因素共同作用造成气孔关闭^[19]。Osakabe等^[17]发现在干旱胁迫下拟南芥突变体(*KUP6*基因缺失)相比野生型拟南芥存活率更低,

将*KUP6*基因在拟南芥中进行超量表达后发现,转基因植株在干旱胁迫下的耐受能力更强。进一步研究发现*KUP6*编码的蛋白被ABA信号受体磷酸化后,通过介导信号传导关闭植物气孔,减少植物体内水分流失。目前关于甘蔗*HAK*蛋白家族的研究多集中在低钾环境下的吸收利用机制上,还很少有对干旱情况下钾转运蛋白基因调控的研究。甘蔗作为糖料作物的典型代表,在前期干旱胁迫cDNA文库获得*HAK*基因的基础上^[20],对其结构和表达特性进行研究,促进*HAK*基因在甘蔗育种上的应用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料种植与处理 试验甘蔗材料为新台糖22号(ROC22),由广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室提供。在避雨大棚中进行桶栽培,甘蔗栽培管理按常规桶栽方法进行。将处理好的桶栽苗置于苗圃大棚温室中(平均温度为26℃,相对湿度为80%±5%),常规培养30d后,停止浇水使培养土含水量自然消耗。在不同干旱阶段取样,每处理选取长势较一致的苗期甘蔗,剪取试验所需材料(根、茎、叶),3次重复取样,材料封入密封袋中,分别编号,液氮速冻,于-80℃超低温冰箱中保存备用。土壤水分测定标准参考韦丽君^[21]的方法,分别设置正常处理组(绝对含水量20%以上)、干旱早期(绝对含水量15%~20%)、干旱中期(绝对含水量10%~15%)、干旱后期(绝对含水量5%以下)和复水期(按正常水分管理,土壤含水量控制在20%~30%)处理。以甘蔗根、茎、叶等部位进行组织特异性检测。

1.1.2 试剂 RNA提取试剂盒(Plant RNA Kit)购自OMEGA生物公司,cDNA合成试剂盒(Transcript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix)、克隆载体试剂盒(pEASY-Blunt Simple Cloning Kit)购自北京全式金生物技术有限公司,KOD-FX聚合酶购自东洋纺(上海)生物科技有限公司,实时荧光定量AceQ™ qPCR Probe Master Mix购自南京诺唯赞生物科技有限公司,DL2000 DNA Marker购自宝生物工程(大连)有限公司。扩增引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取与反转录 采用RNA提取试剂盒进行甘蔗叶片总RNA提取。RNA的浓度及

完整性分别用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳 (1.2% 浓度) 检测。参照 Trans-Script One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒方法合成 cDNA 第一链。

1.2.2 引物设计及目的基因克隆 筛选甘蔗 cDNA 文库中的测序序列结果, 获得与高粱、玉米 *HAK* 基因高度相似的序列, 暂时命名为 *ScHAK9*, 并参考高粱 *SbHAK9* 序列, 设计 1 对特异性引物 (*ScHAK9*-F: 5'-ATGGATCCCGAGTTTCGGCGT-3', *ScHAK9*-R: 5'-TCACAGCACGTACACCATGC-3')。PCR 反应体系: 2 × PCR Buffer 12.5 μL, dNTP Mixture (2 mmol/L) 5 μL, *ScHAK9*-F (10 μmol/L) 0.75 μL, *ScHAK9*-R (10 μmol/L) 0.75 μL, KOD-FX 聚合酶 (1 U/μL) 0.5 μL, cDNA 模板 3.0 μL, ddH₂O 2.5 μL, 总体积 25.0 μL。扩增程序: 94℃ 预变性 2 min; 98℃ 10 s, 61℃ 30 s, 72℃ 3 min, 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.2% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测, 确认目标条带后使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。回收产物连接 pEASY-Blunt Simple Cloning 载体后转化大肠杆菌 T1 感受态细胞, 37℃ 培养过夜, 筛选阳性克隆送至金开瑞生物公司测序。

1.2.3 *ScHAK9* 的生物信息学分析 运用 NCBI 在线程序 BLAST 对目的基因进行同源比对分析; 利用 Prot-Param (<http://web.expasy.org/protparam>) 在线工具预测蛋白的理化特性; 利用 ProtScale (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) 计算蛋白的亲/疏水性; 利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测蛋白信号肽构成; 蛋白的二级和三级结构预测推导分别在 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopm.pl) 和 SWISS-ODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 中完成; 利用 PROTTTER (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) 建立蛋白跨膜结构模型; 利用 PSORT Prediction (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 在线软件进行亚细胞定位预测; 利用 ProtFun 2.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun>) 预测推导蛋白功能; 以 MEGA6.06 软件的邻近算法 (NJ, neighbor joining) 构建目的基因系统发育进化树; 利用 Clustal X 软件进行氨基酸序列对比。

1.2.4 干旱胁迫下 *ScHAK9* 的表达分析 根据克隆得到的甘蔗 *ScHAK9* 核酸序列, 设计荧光定量引物 *ScHAK9*-F (CCTCGCCTTCTTCCTCTTCT) 和 *ScHAK9*-R (GCATGTCGTACTCGTACTTCTTG), 并以

25S-F (ATAACCGCATCAGGTCTCCAAG) 和 25S-R (CCTCAGAGCCAATCCTTTTCC) 为荧光定量的内参引物。采用荧光定量 PCR 仪 (ABI7500, 美国) 检测不同干旱时期甘蔗叶的 *ScHAK9* 转录水平。荧光定量 PCR 体系为: SYBR Green 荧光染料 10 μL, 上、下游引物各 0.8 μL, 稀释 10 倍的 cDNA 1 μL, 用已灭菌的 ddH₂O 补足至 20 μL。扩增程序为 95℃ 10 min; 95℃ 10 s; 60℃ 34 s; 90℃ 15 s; 40 个循环。以不加模板 cDNA 为阴性对照, 3 孔重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。组织特异性表达分析中, 参考苏炜华等^[22]的方法, 将 *ScHAK9* 基因在根中的表达量定义为 1, 以此计算其他组织中该基因的相对表达量。在 ABI PRISM7500 软件上对定量数据初步分析, 将结果导入 Microsoft Excel 工作表, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法分析实时荧光定量 PCR 试验结果, 计算 3 次重复数据的标准误差后绘图。

2 结果与分析

2.1 *ScHAK9* 基因克隆与序列分析

以提取好的甘蔗叶片总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增获得一条约 2400bp 长度的单一条带 (图 1), 其序列分析结果显示, 该片段大小 2352bp, 包含一个基因的完整编码区 (图 2)。将克隆获得的基因序列提交至 GenBank 进行 BLAST 比对分析, 该序列与玉米、小米、芦苇、水稻和大麦等植物 *HAK* 基因的一致性在 84% ~ 94% 之间, 推测克隆获得的甘蔗基因属于 *HAK* 家族基因成员, 命名为 *ScHAK9* (登录号 MG564720)。

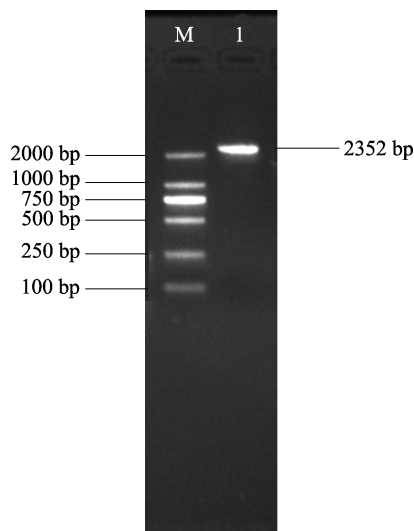


图 1 *ScHAK9* 基因的 RT-PCR 扩增电泳结果

Fig. 1 PCR amplification of *ScHAK9* coding sequence


```

1 M D P E F G V G T A P R K R E P W R T T L L L A Y Q S L G V
1 ATGGATCCCGAGTTCGGCGTGGGCACGGCGCCACGAAAGAGGGAGCCGTGGCGGACGACGCTGCTGCTGGCGTACAGAGCTCGGCGTG
31 V Y G D L S I S P L Y V Y K S T F A E D I T H S K G N E E I
91 GTGTACGGCGACCTCAGCATCTCGCCGCTGTACGTGTACAAAGACACCTTCGCGGAGGACATCAGCACTCCAAGGGCAACGAGGAGATC
61 Y G A L S F V F W T L T L I P L L K Y V T I L L R A D D N G
181 TACGGCGCCCTCTCCTTCGCTTCTGTGACGCTACCCCTCATCCCGCTCCTCAAGTACGTCACCATCTCCTGCGCGCCGACGATAACGGC
91 E G G T F A L Y S L I C R H A N V S L L P N R Q V A D E E L
271 GAGGGTGGCAGCTTCGCGCTCTACTCCCTCATTTGCGGCCACGCCAATGTACGCTCCTCCCCAACCGCCAGGTGCGCGACGAGGAGCTC
121 S T Y R L E C P P E A A G R S G V K A W L E K H T K L H T A
361 TCCACCTACAGGCTGGAGTGGCGGCTGAGGCGCGGGAGGTCCGGCGTCAAGGCTGGTGGAGAAGCACCAAGCTGCACACCGCG
151 L L V M V M I G T C M V I G D G V L T P A I S V F S A V S G
451 CTGCTCGTCATGGTCATGATCGGCACCTGCATGGTCATTGGCGACGGCGCTCCTACGCGCCGCTATCCGCTGTTCTCCGCGCTCAGGG
181 L E L S L S K D Q H E Y A V I P I T C A I L V F L F A L Q H
541 CTCGAGCTCTCCTTGTCCAAGGATCAGCATGAATATGCCGTTCATTCCGATAACCTGCGCCATACTGGTATTCTGTTGCGCTCCAGCAC
211 Y G T H R V G F L F A P I I L A W L L C M S T I G L Y N I I
631 TATGGCACCCACCGCTAGGATTCTCTTCGCGCCGATCATCTCGCTGGCTGCTGTGATGAGCAGCATCGGCTGTACAACATCATC
241 R W N P Q V Y T A L N P S Y M I R F L R K T K K S G W M S L
721 CGCTGGAACCCCGAGTCTACACGGCACTCAATCCCTCTACATGATCAGATTCTCAGGAAGACCAAGAAGTCTGGCTGGATGTCCTG
271 G G I L L C M T G S E A M F A D L G H F S Y S A I Q L A F T
811 GGAGGAATTCTGCTGTGATGACAGGATCTGAAGCGATGTTGCGCGATCTTGGACACTTCTCTACAGCGGCAATTGAGTTGCTTTCCT
301 S L V Y P S L I L G Y M G Q A A Y L S Q H H N L D A S Y Q I
901 TCTTTATGTATCCCTTCACTGATCCTGGGTACATGGGCCAAGCTGCTTATTTGTCCGAGCACCACCACTTGAGCAAGCTCAACATC
331 G I Y I L A V P E S V R W P V L V L A I L A S V V G S Q A I I
991 GGATTCTACATTGCACTTCTGAGAGTGTGAGGTGGCTGTGCTAGTGTGGCGATCTTGGCGTGGTGGTGGCGGAGGCGGAGGCTATC
361 S G T F S I I S Q S Q S L S C F P R V K V V H T S D K V H G
1081 AGCGGCAGCTTCTCCATCATCAGCCAGAGCCAGTCTCTGAGCTGCTTCCCGAGGTTGAAAGTCTGTCACACGCTCTGACAAAGTTCATGGC
391 Q I Y I P E V N W I L M V L C I A V T V G F R N T K H M G N
1171 CAGATATACATCCCTGAGGTCAACTGGATCCTCATGGTCTCTGCACTTGTCTGCTGTTGGTTCGTAACACCAAGCACATGGGAAAC
421 A S G L A V I T V M L V T T C L M S L V I M L C W D R S P W
1261 GCATCTGGCTTGGCGGTGATCAGCGTGATGCTGGTGACGACGCTCATGTCCTAGTGATCATGCTGTGCTGGGACCGGTCCCATGG
451 L A L A F F L F F G S I E A L Y F S A S L I K F L E G A W L
1351 CTGGCCCTCGCCTTCTTCTTCTTCTGCGCTCCATCGAGGCGCTCTACTTCTCGGCGTCTGCTGATCAAGTCTCTGGAAGGCGCTGGCTG
481 P I L L A L I L A I M F V W H H T T I K K Y E Y D M H N K
1441 CCGATCCTCTCGGCGCTCATCTTCTCGCCATCATGTTCTGTGTGGCACCACACGACGATCAAGAAATACGAGTACGAGATGCACAAACAG
511 V T L E W L L A L G D K L G M V R V P G G I G L V Y T D L T S
1531 GTGACCCTGGAGTGGCTGCTGGCGCTGGCGACAGCTGGGCATGCTGCGCTCCCGGGGATCGGCTCTGCTACACCGACCTCACTCC
541 G V P A N F S R F V T N L P A F H R V L V F V C V K S V T V
1621 GCGTGCGCCGCAACTTCTCCGCTTCGTCAACCACTGCCGCGCTTCCACCGGGTCTGGTCTTCTGCTGCTCAAGTCCGTTGACGGTG
571 P H V L P A E R Y L V G R V G P P G H R S Y R C I Y D M H N K
1711 CGGCACGTGCTTCCCGCCGAGCGCTACCTGCTGGCGGTGCTGGCGCCGCGGGACACCGCTCTACCGCTGATCGTGGCGTACGGCTAC
601 R D V H Q D V D S F E T E L V E S L A T F I K L D A L F R C
1801 CGGCAGGTGCACAGGACGTGGACTCCTTCGAGACGGAGCTCGTCGAGAGCCTCGCCACGTTTCATCAAGCTGGAGCGCTGTTCCGCTGC
631 S D A G G E Q R D S S Y Y E R E N A L T V I G S N P L R R H
1891 AGCGACGCCGCGGCGAGCAGCGGACAGCAGCTACTACGAGCGCGAGAGCGCGTACGCGTCAITGGGAGCAACCCGCTGCGGCGCCAC
661 M G L G Y D D S H D G A S S G S D R V D G I E L A A A P A V
1981 ATGGGCTGGGCTACGACGACTCCACGACGCGCGCTGCTGGCTGACCGCTGGACGGCATAGAGCTCGCGCGCGCGCGCGGCTC
691 V K K Q V R F A V P P P R S P G V D E S V L E E L H E L C
2071 GTCAAGAAGCAGGTGAGGTTGCGGTGCCGCGCGCCAGGAGCCCTGGCGTGGACGAGAGCGTGTGGAGGAGCTGCACGAGCTGTGCGAG
721 A R E A G T A F I L G H S H V K T K P G S S L L K R L A I G
2161 GCGCGGGAGCCGCGACGCGCTTCACTCTTGGGCACTCGCACGTGAAGACCAAGCCGCGGTGCTGCTCTCAAGAGGTTGGCCATCGGC
751 V G Y N F L R R N C R G P D V S L R V P P A S L L E V G M V
2251 GTCCGCTACAACCTTCTGCGCGGAACTGCCGCGCCGCGACGTGTCGCTGCGCGTGGCGCGGCGTCTGCTCGAGGTGGGCGATGGT
781 Y V L *
2341 TACGTGCTGTGA

```

图2 *ScHAK9* 基因编码区的核酸序列及其推导氨基酸序列Fig. 2 The coding sequence of *ScHAK9* gene and its deduced amino acids

2.2 *ScHAK9* 编码蛋白的生物信息学分析

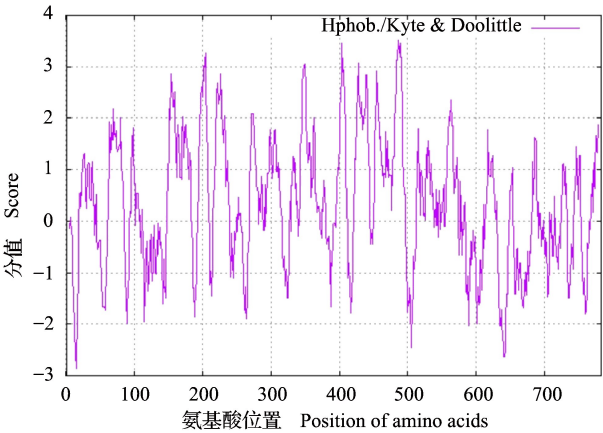
2.2.1 *ScHAK9* 蛋白的理化性质及亲/疏水性预测

结果 利用 ProtParam 工具在线分析可知, *ScHAK9* 基因编码 783 个氨基酸, 分子式为 $C_{3964}H_{6191}N_{1023}O_{1080}S_{35}$, 相对分子量 86.582 kD, 等电点 (pI) 7.87, 不稳定指数 41.09, 推测该蛋白属于不稳定蛋白, 酸性氨基酸残基总数 (Asp + Glu) 为 63, 碱性氨基酸残基总数 (Arg + Lys) 为 65, 平均亲水系数 (GRAVY) 0.346, 推断该蛋白为碱性疏水蛋白。蛋白中丙氨酸 (Ala, 7.7%)、亮氨酸 (Leu, 12.9%)、甘氨酸 (Gly, 7.5%)、丝氨酸 (Ser, 8.0%)、谷氨酸 (Glu, 7.7%) 和缬氨酸 (Val, 9.3%) 这 6 种氨基酸所占比例达 53.1%, 而色氨酸 (Trp) 所占比例最低, 仅占 1.7%。

利用 ProtScale 计算 *ScHAK9* 蛋白的疏水性图谱, 结果显示, *ScHAK9* 蛋白中亲水性氨基酸占 26.8%, 疏水性氨基酸占 46.3%, 疏水区域分布面积较广, 所占比例高; 亲水区域较少, 所占比例较低 (图 3)。表明 *ScHAK9* 蛋白为疏水性蛋白。

2.2.2 *ScHAK9* 蛋白的跨膜区域与信号肽预测

分析结果 利用 SignalP 4.1 Server 和 PROTTER 分析预测发现, *ScHAK9* 蛋白具有 12 个跨膜结构区, 未发现信号肽结构, 推断该蛋白为非分泌蛋白, 表明蛋白在细胞质中合成后不能被转运, 有可能是作为运输载体存在, 另外, 对 *ScHAK9* 基因编码蛋白的跨膜结构预测分析结果显示, 在第 2 个和第 3 个跨膜区之间拥有一个较长的环状结构 (表 1, 图 4)。



疏水和亲水位点分别在零水平线的上方和下方
the hydrophobic position and hydrophilic position were
plotted above and below the ordinate respectively

图3 *ScHAK9* 蛋白的亲/疏水性预检测结果

Fig. 3 Bioinformatic prediction for hydrophility/
hydrophobicity of *ScHAK9* protein

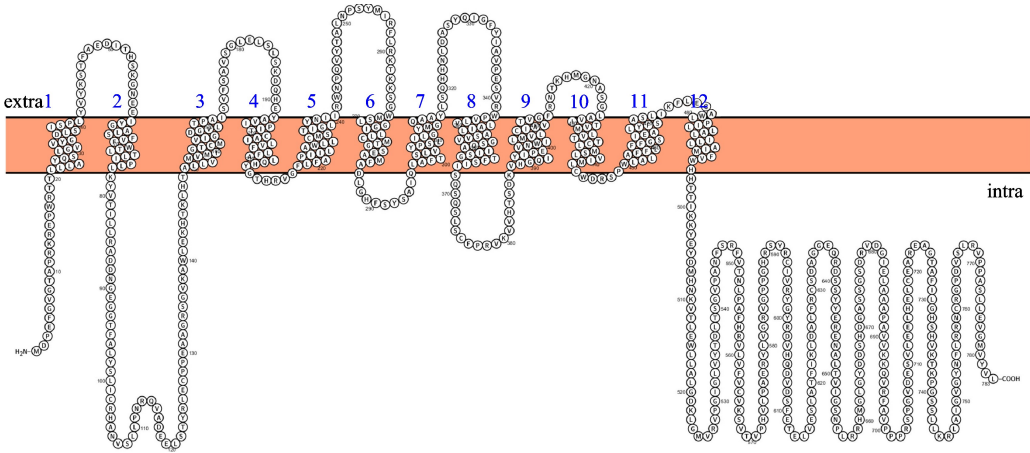
表1 利用 SignalP 4.1 Server 分析 *ScHAK9* 信号肽

Table 1 *ScHAK9* signal peptide analyzed by SignalP 4.1

项目	位点	分值	有无信号肽
Item	Site	Value	Signal peptide
max. C	34	0.26	
max. Y	34	0.209	
max. S	10	0.287	
Mean S	1-33	0.18	
D	1-33	0.198	without

max. C:原始剪切位点;max. S:信号肽;max. Y:综合剪切位点;mean
S:从 N 端氨基酸开始到剪切位点处各氨基酸的平均 S 值;D Value:
mean S 和 max. Y 分值的加权平均值

max. C:putative cleavage site;max. S: signal peptide, max. Y: synthesis
cleavage site,mean S:the average S value of amino acid from the N termi-
nal amino acid to the shear site,D value:a weighted average of the mean
S and the max Y scores



extra 表示细胞质膜外;intra 表示细胞质膜内

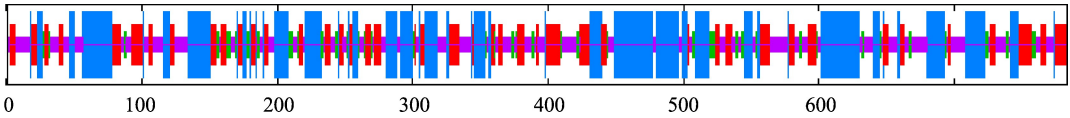
extraindicated plasma membrane extra membrane;intra indicated plasma membrane intramembrane

图4 *ScHAK9* 基因编码蛋白跨膜结构模型

Fig. 4 Transmembrane model of *ScHAK9* protein

2.2.3 蛋白的二级结构预测 利用 SOPMA 在线
工具分析蛋白的二级结构组成,结果显示蛋白二级
结构主要由 36.53% (286 个氨基酸残基)的 α 螺旋
结构(Alpha helix),30.78% (241 个氨基酸残基)的

无规则卷曲结构(Random coil),24.01% (188 个氨
基酸残基)的扩展长链(Extended strand)和 8.68%
(68 个氨基酸残基)的 β -转角结构(Beta turn,t)构
成(图 5)。



横轴表示氨基酸位置;蓝色表示 α 螺旋;紫色表示无规则卷曲;红色表示延伸链;绿色表示 β 转角

Horizontal axis indicated amino acid position;the blue part indicated alpha helix;the purple indicated random
coil;the red part indicated extended strand;the green partindicated beta turn

图5 *ScHAK9* 蛋白的二级结构预测结果

Fig. 5 Predicted secondary structure of *ScHAK9* protein

2.2.4 蛋白的三维结构预测 采用 SWISS-MODEL 同源建模方法得到 ScHAK9 蛋白的三维预测模型 (图 6), 发现该蛋白质主要由 α 螺旋、扩展长链和无规则卷曲构成, 与二级结构预测结果基本一致。

2.2.5 蛋白的活性位点分析 利用在线 NPS 网站的 Prosite Scan 程序对 ScHAK9 蛋白进行活性位点分析, 结果表明该蛋白包含一类糖基化位点、三类磷酸化位点和一类豆蔻酰化位点 (表 2)。

表 2 利用 NPS 对 ScHAK9 蛋白活性位点的预测分析

Table 2 Scanning of ScHAK9 protein for the site/signatures against Proscan database in NPS

活性位点 Active sites	序列号 Prosite access NO.	膜体类型 Motif model	氨基酸序列 Amino acid sequence	概率值 Randomized probability
n-糖基化位点 N-glycosylation site	PS00001	N-{P}-[ST]-{P}	106-109 NVSL 420-423 NASG 545-548 NFSR	5.138e-03
蛋白激酶 c 磷酸化位点 Protein kinase C phosphorylation site	PS00005	[ST]-x-[RK]	122-124 TYR 213-215 THR 262-264 TTK 339-341 SVR 385-387 SDK 499-501 TIK 591-593 SYR 676-678 SDR 766-768 SLR	1.423e-02
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 Casein kinase II phosphorylation site	PS00006	[ST]-x(2)-[DE]	46-49 TFAE 179-182 SGLE 278-281 TGSE 641-644 SYYE 674-677 SGSD 710-713 SVLE 773-776 SLLE	1.482e-02
酪氨酸激酶磷酸化位点 Tyrosine kinase phosphorylation site	PS00007	[RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y	55-61 GNEEYIY	4.074e-04
豆蔻酰化位点 N-myristoylation site	PS00008	G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}	29-34 GVVYGD 92-97 GGTFAL 180-185 GLELSL 272-277 GILLCM 419-424 GNASGL 460-465 GSIEAL 532-537 GLVYTD 541-546 GVPANF 671-676 GASSGS 681-686 GIELAA 706-711 GVDESV 750-755 GVGYNF	1.397e-02

2.2.6 蛋白的亚细胞定位和功能分类 利用 PSORT Prediction 在线软件进行蛋白的细胞定位分析发现, 蛋白定位在细胞质膜中的可能性为 65.2%, 在内质网中的可能性为 17.4%, 而在细胞核、高尔基体以及液泡中可能性均小于 10%, 推测

表 3 ScHAK9 蛋白功能分类结果

Table 3 Functional category for ScHAK9 protein

功能分类 Functional category	概率 Prob	比值 Odds	基因本体分类 Gene ontology category	概率 Prob	比值 Odds
运输和结合 Transport and binding	0.773	1.885	电压门控性离子通道 Voltage-gated ion channel	0.279	12.682
嘌呤和嘧啶 Purines and pyrimidines	0.331	1.362	转录 Transcription	0.219	1.711
辅酶合成 Biosynthesis of cofactors	0.210	2.917	信号传导 Signal transducer	0.205	0.958
脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism	0.017	1.308	离子通道 Ion channel	0.169	2.965
运输 Translation	0.071	1.614	阳离子通道 Cation channel	0.146	3.174



图 6 ScHAK9 蛋白的三级结构预测结果

Fig. 6 Predicted tertiary structure of ScHAK9 protein

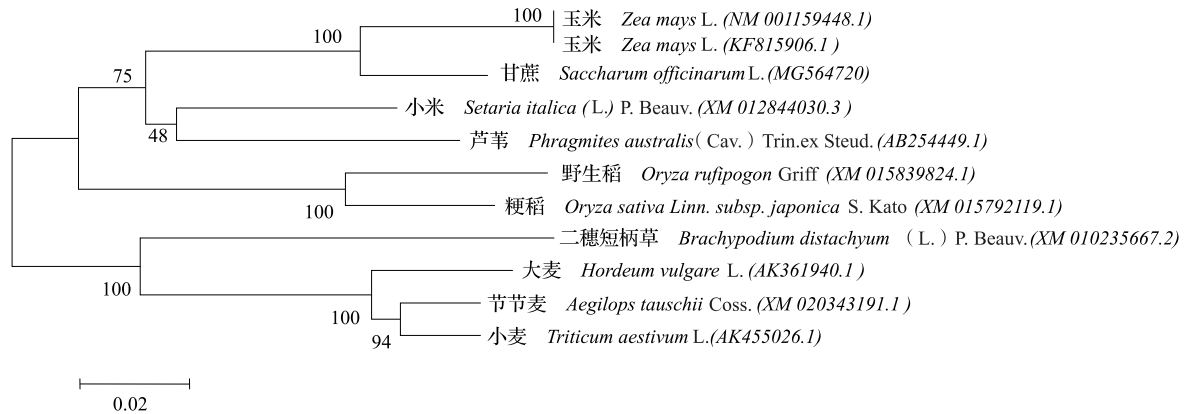
蛋白有较大概率定位在细胞质膜中。

利用 ProtFun 2.2 Server 对 ScHAK9 蛋白进行功能分类预测, 结果显示该蛋白与运输结合功能相关, 而本体分类进一步预测显示该蛋白属于阳离子通道蛋白, 并在转录、信号传导等功能中均有可能参与 (表 3)。

2.2.7 *ScHAK9* 遗传进化树分析

采用 MEGA 6.06 中的 NJ 法构建基因的系统发育进化树,结果

显示,甘蔗 *ScHAK9* 基因与玉米的 *ZmHAK* 基因亲缘关系最近,与 BLAST 比对分析结果一致(图 7)。



置信度采用 500 次重复计算,分子节点的数值代表置信度,标尺代表每个核苷酸位置发生 0.02 次替代
The bootstrap values calculated from 500 resamplings. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values, The scale bar represents 0.02 substitution per nucleotide position

图 7 基于 HAK 基因构建的系统发育进化树

Fig. 7 Phylogenetic analysis of *ScHAK9* and its sequence homologs

2.3 *ScHAK9* 同源蛋白的多序列比对分析结果

利用 Clustal X 软件对 *ScHAK9* 与植物 HAK 蛋白进行氨基酸序列比对,发现 *ScHAK9* 蛋白与禾本

科作物的钾转运蛋白序列相似性很高,并具有 HAK 钾转运蛋白家族特征序列 GVVYGDLSISPLY (下划线为高度保守氨基酸)^[13] (图 8)。

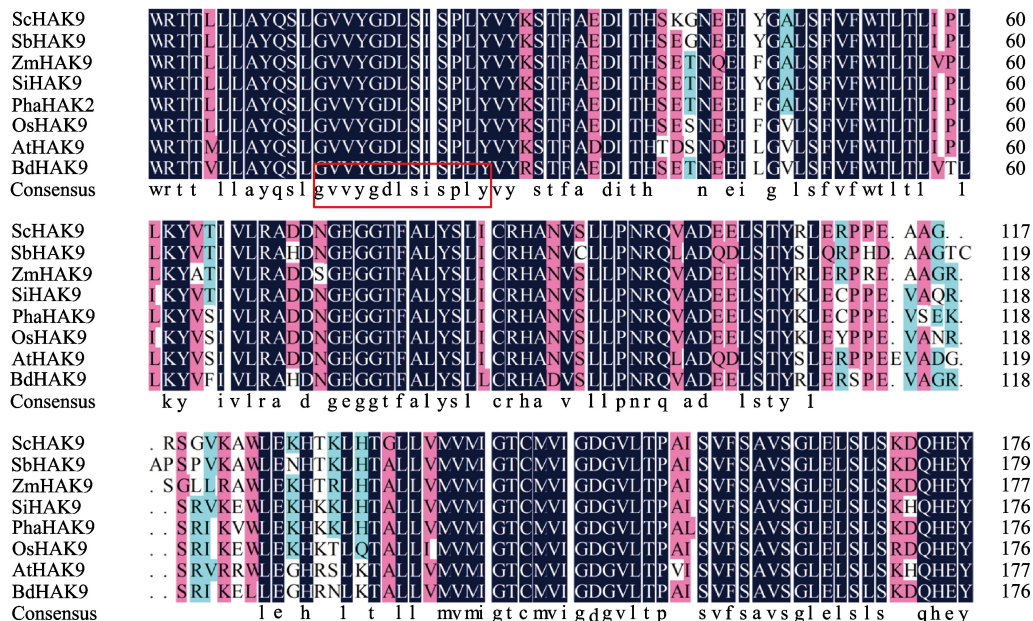


图 8 *ScHAK9* 与其他植物 HAK 蛋白的序列比对

Fig. 8 Multiple-alignment of *ScHAK9* with other HAK proteins

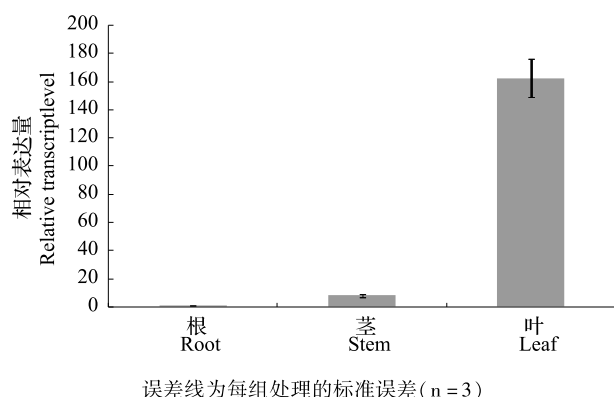
2.4 *ScHAK9* 组织特异性表达

利用 qPCR 技术检测甘蔗不同组织中 *ScHAK9* 基因的特异性表达。结果显示,*ScHAK9* 在叶片中的相对表达量最高,在茎中表达量相对较低。叶中的相对表达量是其在根系中的 160 倍以上,茎中的相对表达量是根系的 8 倍以上,在根中的相对表达量

最低,仅有微弱的基因表达(图 9)。说明 *ScHAK9* 在甘蔗中的表达具有组织特异性。

2.5 干旱胁迫对 *ScHAK9* 基因表达的影响

通过 qPCR 技术分析干旱胁迫下甘蔗中 *ScHAK9* 基因的表达量变化趋势发现,干旱处理前期 *ScHAK9* 基因的表达受到抑制,相对表达量下降,达

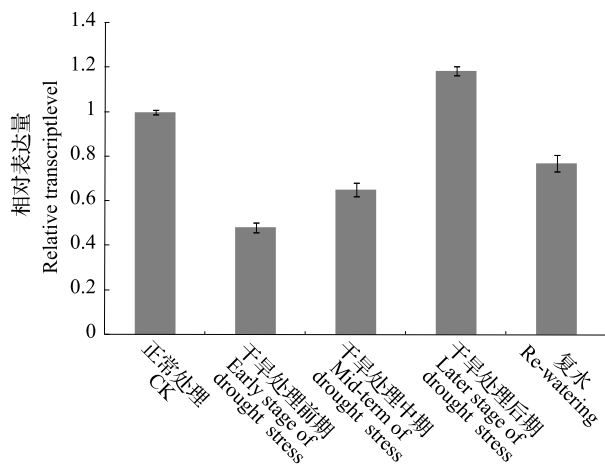


Error bars represent the standard error of each treating group (n=3)

图9 甘蔗 *ScHAK9* 基因在不同组织中的表达

Fig. 9 Relative expression of *ScHAK9* gene in different tissues of sugarcane

到正常处理(CK)的0.048倍;干旱处理中期和处理后期,该基因的相对表达量出现上调,干旱处理后期基因相对表达量上调最高,达到CK的1.18倍;总体上呈现先下调后上调的趋势。复水后,基因相对表达量下降,约为CK的0.7倍(图10)。



误差线为每组处理的标准误差 (n=3)

Error bars represent the standard error of each treating group (n=3)

图10 *ScHAK9* 基因在干旱胁迫下表达变化

Fig. 10 The transcriptional profile of *ScHAK9* under drought stress

3 讨论

HAK 钾转运蛋白基因家族在植物中主要的功能是介导植物对钾离子的吸收和转运。目前 HAK 基因已在多个作物中克隆和鉴定,然而甘蔗中关于 HAK 基因家族的研究还不够充分。本试验利用同源克隆技术从甘蔗中克隆获得 *ScHAK9* 基因,通过核苷酸序列和氨基酸序列两方面比对显示该基因与

禾本科 HAK 家族基因同源率很高;该基因编码的蛋白同样具有标志性的保守区域。本研究发现 *ScHAK9* 蛋白二级结构具有 12 个跨膜区和环状结构,鲁黎明等^[23] 研究发现 HAK 家族基因在结构上存在数目不等的跨膜区和拥有一个较长的标志性的环状结构,表明 *ScHAK9* 基因可能是甘蔗 KUP/HAK/KT 家族基因成员。同时,生物信息学预测 *ScHAK9* 蛋白定位在细胞质膜上,具有明显的跨膜特征,推测 *ScHAK9* 蛋白可能作为物质的载体,用于运输离子等物质,说明这与其作为钾转运载体的功能是一致的。蛋白质的磷酸化修饰是生物体内一种较普遍的调控手段,同时也是最主要的信号转导方式之一,可以调节钾离子在细胞中的运输^[24], *ScHAK9* 蛋白同样具有多类磷酸化位点。综上所述,可以判断 *ScHAK9* 基因是 HAK 家族基因的成员,并参与了甘蔗体内钾离子运输过程。

植物 HAK 基因在植物体内广泛分布,并参与到植物生长发育过程中,如介导 K^+ 的吸收和根的伸长,在叶片中促进细胞的扩张生长^[25],但基因在不同组织上具有表达差异性。Gierth 等^[26] 发现 *AhHAK5* 主要在根系大量表达,而在其他组织中的表达量很低;晁毛妮等^[27] 研究表明 *GmHAK30* 为根中超量表达基因,表达量是其他组织的 500 倍;*GmHAK15* 在花中大量表达,而在其他组织中表达较低。本试验中 *ScHAK9* 基因在不同组织的表达也具有差异性,不同组织上基因表达量具有较大区别,表明 *ScHAK9* 基因通过组织上表达差异影响甘蔗对钾元素的吸收和分配,满足甘蔗不同组织生长发育的需要。

干旱环境下,植物利用钾离子信号传导促使相关基因快速表达,进而实现植物气孔的关闭,维持膨压以及减少蒸腾等生理功能,维持植物正常生长^[28]。HAK 基因家族作为植物体内的 K^+ 运输载体在抗旱过程中发挥非常重要的作用,一方面通过促进 ABA 合成和信号途径以及保卫细胞钾离子外排,提高气孔的闭合来增强植物的耐旱能力^[18];另一方面提高植物对水分的利用率,增强烟草对于干旱胁迫的抗性^[29]。本研究中 qPCR 结果表明,*ScHAK9* 基因的表达受干旱胁迫的诱导,相对表达量随干旱胁迫时间的延长呈现先降后升的趋势,复水后表达开始下降。黄莹等^[30] 发现钾能促进甘蔗光合能力,缓解干旱胁迫对甘蔗造成的损害。我们推测在干旱胁迫条件下,该基因表达量的增加促进甘蔗对钾的吸收,从而能够缓解干旱胁迫对植物生长的影响。

参考文献

- [1] 张华,陈如凯. 提升我国甘蔗核心技术竞争力的研究. 甘蔗, 2003,10(3):49-54
- [2] 姚瑞亮,李杨瑞,陈如凯. 广西旱坡地甘蔗高产栽培措施的探讨. 广西农业生物科学,1999,18(Z1):29-31
- [3] 徐超华,李纯佳,苏火生,陆鑫,李旭娟,刘洪博,林秀琴,毛钧,字秋艳,刘新龙. 甘蔗非生物胁迫抗性研究进展. 植物遗传资源学报,2017,18(3):483-493
- [4] 周会,雷敬超,桂意云,贤武,梁强,杨荣仲,李杨瑞. 甘蔗种质资源自然条件下耐寒性评价. 植物遗传资源学报,2012,13(6):968-973
- [5] 马小娟,戚金亮,印莉萍,黄勤妮. 植物钾离子转运相关蛋白及基因研究进展. 首都师范大学学报:自然科学版,2004,25(2):40-45
- [6] Ashley M K, Grant M, Grabov A. Plant responses to potassium deficiencies; a role for potassium transport proteins. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(2):425-436
- [7] Santa-Maria G E, Rubio F, Dubcovsky J, Rodriguea-Navarro A. The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. Plant Cell, 1997, 9(12):2281-2289
- [8] Zhang Z, Zhang J, Chen Y, Li R, Wang H, Wei J. Genome-wide analysis and identification of *HAK* potassium transporter gene family in maize (*Zea mays* L.). Molecular Biology Reports, 2012, 39(8):8465-8473
- [9] Yang Z, Gao Q, Sun C, Li W, Gu S, Xu C. Molecular evolution and functional divergence of *HAK* potassium transporter gene family in rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Genetics and Genomics, 2009, 36(3):161-172
- [10] Su H, Gollack D, Zhao C S, Bohnert H J. The expression of *HAK*-type K^+ transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. Plant Physiol, 2002, 129(4):1482-1493
- [11] He C, Cui K, Duan A, Zeng Y, Zhang J. Genome-wide and molecular evolution analysis of the Poplar *KT/HAK/KUP* potassium transporter gene family. Ecology & Evolution, 2012, 2(8):1996-2004
- [12] Song Z Z, Cong Y, Han L, Wang L, Su Y H. In silico analyses of KUP proteins based on grape genomic data. Genomics and Applied Biology, 2011, 6(30):728-737
- [13] 鲁黎明. 主要农作物钾吸收转运基因及其进化关系分析. 中国农业科学, 2009, 42(7):2271-2279
- [14] Sato Y, Nanatani K, Hamamoto S, Shimizu M, Takahashi M, Tabuchi-Kobayashi M, Mizutani A, Schroeder J I, Souma S, Uozumi N. Defining membrane spanning domains and crucial membrane-localized acidic amino acid residues for K^+ transport of a Kup/HAK/KT-type Escherichia coli potassium transporter. Journal of Biochemist, 2014, 155(5):315-323
- [15] Ahn S J, Shin R, Schachtman D P. Expression of *KT/KUP* genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K^+ uptake. Plant Physiology, 2004, 134(3):1135-1145
- [16] Zou N, Li B, Dong G, Kronzucker H J, Shi W. Ammonium-induced loss of root gravitropism is related to auxin distribution and *TRH1* function, and is uncoupled from the inhibition of root elongation in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(10):3777-3788
- [17] Osakabe Y, Arinaga N, Umezawa T, Katsura S, Nagamachi K, Tanaka H, Ohiraki H, Yamada K, Seo S U, Abo M, Yoshimura E, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis. The Plant Cell, 2013, 25(2):609-624
- [18] 艾兴辉. 小麦转运蛋白基因 *TaBASS2* 和 *TaHAK11* 的功能研究. 济南:山东大学. 2013:20-21
- [19] Sirichandra C, Wasilewska A, Vlad F, Valon C, Leung J. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(5):1439-1463
- [20] 罗海斌,曹辉庆,魏源文,邓智年,潘有强,郭元元,何海波,李杨瑞. 干旱胁迫下甘蔗苗期根系全长 cDNA 文库构建及 EST 序列分析. 南方农业学报, 2012, 43(6):733-737
- [21] 韦丽君. 甘蔗干旱胁迫的形态结构及生理机制研究. 长沙:湖南农业大学. 2014:14-16
- [22] 苏炜华,刘峰,黄珑,苏亚春,黄宁,凌辉,吴期滨,张华,阙友雄. 甘蔗 Ca^{2+}/H^+ 反向转运体基因的克隆与表达分析. 作物学报, 2016, 42(7):1074-1082
- [23] 鲁黎明,杨铁钊. 烟草钾转运体基因 *NtHAK1* 的克隆及表达模式分析. 核农学报, 2011, 25(3):469-476
- [24] 朱晓玲,陈海峰,王程,郝青南,陈李森,郭丹丹,伍宝朵,陈水莲,沙爱华,周蓉,周新安. 大豆钾转运体基因 *GmKT12* 的克隆和信息学分析. 作物学报, 2013, 39(9):1701-1709
- [25] Elumalai R P, Nagpal P, Reed J W. A mutation in the Arabidopsis *KT2/KUP2* potassium transporter gene affects shoot cell expansion. Plant Cell, 2002, 14(1):119-131
- [26] Gierth M, Mäser P, Schroeder J I. The potassium transporter *AtHAK5* functions in K^+ deprivation-induced high-affinity K^+ uptake and *AKT1* K^+ channel contribution to K^+ uptake kinetics in Arabidopsis roots. Plant Physiol, 2005, 137(3):1105-1114
- [27] 晁毛妮,张志勇,宋海娜,李成奇,张新,胡根海,张金宝,王清连. 陆地棉 *Ph1* 家族成员的全基因组鉴定及表达分析. 棉花学报, 2017, 29(1):59-69
- [28] Loutfy N, El-Tayeb M A, Hassanen A M, Moustafa M F, Sakuma Y, Inouhe M. Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). Journal of Plant Research, 2012, 125(1):173 - 184
- [29] 孙洪荣,秦利军,赵丹,谭颖,赵杰宏,赵德刚. 超量表达 *NtHAK1* 基因烟草对不同光辐射的光合响应. 贵州农业科学, 2013(12):24-27
- [30] 黄莹,敖俊华,陈迪文,周文灵,卢颖林,黄振瑞,李奇伟,江永. 钾对水分胁迫下甘蔗幼苗生理和光合特性的影响. 中国农学通报, 2016, 32(6):49-54