

青海野生中国沙棘 AQP 基因的扩增及序列分析

马玉花, 冶贵生, 张亚波, 刘宝尧

(青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016)

摘要:以青海野生中国沙棘的嫩叶为材料, 扩增其 AQP 基因并测序。结果表明, 所得中国沙棘 AQP 基因的碱基数量为 481 个, 其中 A 碱基 103 个, T 碱基 143 个, G 碱基 126 个, C 碱基 109 个。序列分析表明, QP 基因片段编码 160 个氨基酸, 其中强碱性氨基酸有 10 个, 强酸性氨基酸有 7 个, 疏水性氨基酸有 73 个, 亲水性氨基酸有 31 个。同源性比对表明, 中国沙棘与杨、山核桃、栎树、葡萄等植物的 AQP 基因具有较高的同源性。为深入研究青海野生中国沙棘在干旱胁迫下的抗旱分子机制及沙棘抗旱分子改良积累了资料。

关键词:中国沙棘; AQP 基因; 扩增; 序列分析

中图分类号:S718.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2014)06-0090-04

Amplification and Sequence Analysis of AQP Gene in *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* in Qinghai

MA Yu-hua, YE Gui-sheng, ZHANG Ya-bo, LIU Bao-yao

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: The fragment of AQP gene of wild *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* occurring in Qinghai Province was amplified by the specific primers and sequenced, then the nucleotide sequence and amino acid sequence of AQP gene was identified and summarized. The sequence analysis indicated that the total length of AQP gene was 481 bp, and the nucleotide composition analysis showed that the number of A, T, G, C were 103, 143, 126 and 109, respectively. The analysis of the amino acid sequence of AQP gene indicated that the total length of amino acid of AQP gene was 160, and the amino acid composition analysis showed that there were 10 strongly basic amino acids, 7 strongly acidic amino acids, 73 hydrophobic amino acids and 31 polar amino acids. This results would lay a foundation for the further study on the molecular mechanism of drought resistance of wild *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* in Qinghai under drought stress and accumulate the information for the improvement of drought resistance of *H. rhamnoides*.

Key words: *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*; AQP; amplification; sequence analysis

沙棘为胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属(*Hippophae*)植物的统称, 落叶灌木或乔木, 广泛分布于亚欧两洲的温带地区^[1]。全世界沙棘属植物共 7 种 11 亚种^[2], 中国不仅是世界上沙棘属植物类群分布最多的国家, 也是沙棘属植物类群最富集的地区^[3], 素有沙棘王国的美誉, 青海省是我国沙棘资源的重要分布区, 其境内分布有种类和数量可观的沙棘资

源。中国沙棘作为青海省主要的乡土树种之一, 因其优良的生物学特性而被广泛应用于生态环境建设中, 又因其优越独特的营养、药用及观赏价值等而产生巨大的经济效益与潜力巨大的社会效益。青海野生中国沙棘对恶劣的高原气候及贫瘠的土壤等不利生境条件的良好适应性得益于其强抗逆能力, 目前有关沙棘抗旱生理的研究有大量的文献报道^[4-7]但

收稿日期: 2013-12-12 修回日期: 2014-01-13
基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目(2009)。
作者简介: 马玉花, 女, 回族, 博士, 副教授, 研究方向: 干旱区植被恢复理论与技术、青藏高原特色植物资源开发利用。
E-mail: sphere8@163.com

有关沙棘属植物抗旱相关基因的研究未见报道。

水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一种功能性的跨膜输水蛋白,属跨膜通道的膜内在蛋白家族^[8],水通道蛋白介导水分以及小分子物质的跨膜运输,同时在维持细胞水分平衡中具重要的作用。通过对青海野生中国沙棘 AQP 基因的扩增及序列分析,以期为深入研究中国沙棘在干旱胁迫下的抗旱分子机制及促进沙棘品种抗旱性改良积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*)的种子采自青海省大通县(101°37. 596'E, 37°25. 920'N)。供试土壤为园土:泥炭,体积比 1:2。2012 年 9 月中旬采集中国沙棘的种子,带回实验室后经消毒和催芽处理后播种到 30 cm(高)×25 cm(内径)的花盆中,在苗木生长期保持充足的养分和水分供应。待沙棘苗木长到 10 cm 左右时采集位于中上部的幼嫩叶片进行总 RNA 的提取。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒为北京艾德莱公司 RN38-EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒,反转录酶及试剂、Taq DNA 聚合酶及 PCR 试剂, RNA 酶抑制剂均为大连宝生物工程有限公司产品。

1.3 引物

根据已发表的植物 AQP 基因的核苷酸序列,设计出 1 对 AQP 引物,引物由大连宝生物工程有限公司合成,预期的目的片段长度分别为 481 bp。引物序列为:

AQP-F:5'-CTYGTYTACTGCACHGCGY-3'

AQP-R:5'-CCVACCCARAADATCCAN-3'

1.4 中国沙棘总 RNA 的提取

参照试剂盒说明提取沙棘总 RNA。

1.5 目的基因的获得

1.5.1 RT-PCR 取提取的沙棘总 RNA 5 μL,下游引物 4 μL, dNTP Mixture 3 μL, RNase-Free ddH₂O 3 μL, 70 °C 预热 5 min,立即冰浴 2 min,加入 5 倍的反转录缓冲液 4 μL,反转录酶 1 μL,置于 42 °C 水浴 50 min, 95 °C 5 min,补加 RNase-Free ddH₂O 至总体积为 20 μL。得到的 cDNA 于 -20 °C 保存。

1.5.2 PCR 扩增 上述反转录产物 2 μL, 10 倍的 PCR 缓冲液 5 μL, MgCl₂ 3 μL, dNTP 4 μL, 上下游引物各 2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,加 RNase-Free ddH₂O 至 50 μL 后进行扩增。PCR 扩增程

序:94 °C 预变性 5 min 后,94 °C 变性 1 min,61 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。

1.6 序列测定与分析

AQP 基因序列由宝生物工程(大连)有限公司完成,序列用 DNASTar 软件进行分析,用 Blast 进行序列同源性分析。

2 结果与分析

通过试剂盒的提取,获得了条带清晰、完整的沙棘总 RNA(图 1)。所得沙棘总 RNA 的 28S、18S 条带清晰,28S 的量为 18S 的 2 倍左右,未降解,可进行后续试验。

将提取的总 RNA 经反转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增,由 AQP 基因的电泳鉴定(图 2)可见,扩增产物条带约 481 bp。

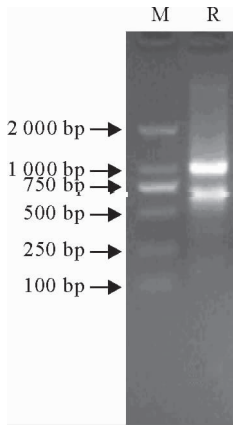


图 1 中国沙棘总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis*

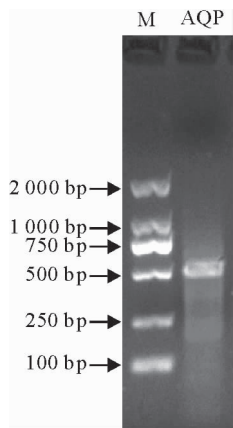


图 2 中国沙棘 AQP 电泳图

Fig. 2 Amplified results of AQP *H. rhamnoides* subsp. *sinensis*

PCR 产物进行序列测定,由 AQP 基因的核苷酸序列(图 3)可见,获得的 AQP 基因片段长度为 481 bp,核苷酸分析表明,481 个碱基中 A 碱基 103

个,占碱基总数的 21.41%,T 碱基 143 个,占碱基总数的 29.73%,G 碱基 126 个,占碱基总数的 26.20%,C 碱基 109 个,占碱基总数的 22.66%。

另外,(A+T)的含量占 51.14%,(G+C)的含量占 48.86%。

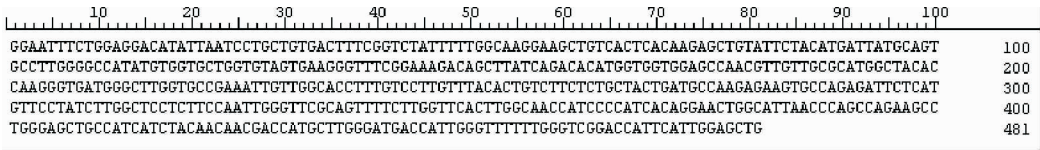


图3 中国沙棘 AQP 基因序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of AQP of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis*

对获得的中国沙棘 AQP 基因的氨基酸序列信息进行分析,由氨基酸编码信息(图 4)可见,所得 AQP 基因片段共编码 160 个氨基酸,其中强碱性氨基酸有 10 个,占氨基酸总数的 6.25%,强酸性氨基酸有 7 个,占氨基酸总数的 4.38%,疏水性氨基酸有 73 个,占氨基酸总数的 45.63%,亲水性氨基酸有 31 个,占氨基酸总数的 19.38%。另外,对中国

沙棘 AQP 基因编码的氨基酸的密码子进行分析表明不同的密码子因为其简并性可以编码同一氨基酸,但是同一氨基酸其编码密码子的出现频率是不同的,如 20 个编码 Ala 的密码子中,GCA 出现 3 次,GCC 出现 7 次,GCG 出现 1 次,而 GCU 出现 9 次,编码 Gly 的 23 个密码子中,GGA 出现 9 次,GGC 出现 3 次,GGG 出现 3 次,GGU 出现 8 次。

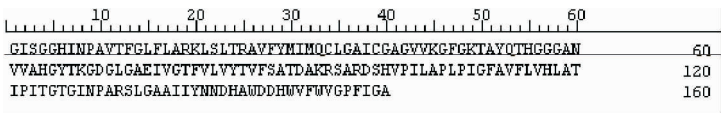


图4 氨基酸序列

Fig. 4 Amino acid sequence of AQP of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis*

将获得的中国沙棘 AQP 基因序列与 NCBI 登录的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、蜡梅 (*Chimonanthus praecox*)、杨 (*Populus trichocarpae*)、山核桃 (*Carya cathayensis*)、大豆 (*Glycine max*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、无梗花楸 (*Quercus*

petraea)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 的 AQP 基因序列进行同源性比对分析,结果显示中国沙棘与上述植物的 AQP 基因具有较高的同源性(图 5),其中与山核桃的 AQP 基因的序列同源性最高,为 83.8%。

同源性(Percent Identity)									
分歧度(Divergence)	1	2	3	4	5	6	7	8	
	1		60.3	56.6	59.4	78.4	55.5	58.4	1 拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
	2	40.5		72.5	63.8	83.4	63.1	71.4	2 蜡梅(<i>Chimonanthus praecox</i>)
	3	41.9	32.6		75.8	83.8	74.4	82.6	3 山核桃(<i>Carya cathayensis</i>)
	4	38.8	34.0	27.7		81.9	64.7	67.2	4 大豆(<i>Glycine max</i>)
	5	26.6	18.9	19.7	21.9		82.7	83.6	5 中国沙棘(<i>Hippophae rhamnoides</i>)
	6	48.0	36.2	34.0	34.5	21.2		72.2	6 毛果杨(<i>Populus trichocarpa</i>)
	7	40.4	33.4	19.2	27.0	18.4	31.2		7 无梗花楸(<i>Quercus petraea</i>)
	8	42.5	32.6	25.5	28.5	21.5	31.0	29.0	8 葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)
		1	2	3	4	5	6	7	8

图5 AQP 基因同源性比对结果

Fig. 5 Results of homologous alignment analysis

3 结论与讨论

自 1988 年第一个水通道蛋白被发现以来^[9],已在很多植物中发现了水通道蛋白的存在,植物处于低温、干旱、盐碱等逆境时可通过水通道蛋白调控水分运输以维持胞内渗透压,从而使植物适应各种逆

境^[10-13]。可见 AQP 基因作为抗逆基因是广泛分布于高寒干旱的青海地区的植物中,其具备抗旱性及能适应高原极端气候的重要原因之一,而环境胁迫(干旱、盐碱、低温等)条件下,AQP 基因的表达调控是植物适应干旱的一种积极反应。在前期的中国沙棘抗旱生理机理的研究^[14-15]基础上,通过对 AQP

基因的扩增和序列分析,所得中国沙棘 AQP 基因片段长度为 481bp,共编码 160 个氨基酸。另外,将获得的青海野生中国沙棘序列 AQP 基因序列与 NCBI 登录的其他植物的 AQP 基因序列进行同源性比对分析,表明获得的序列与其他植物的 AQP 基因具有较高的同源性。这为 AQP 的蛋白结构与功能的研究奠定基础,进而为改良青海本地沙棘及引种沙棘的抗旱性,培育并推广优质高产的转基因沙棘品种积累资料。

参考文献:

[1] 刘振山,史文彬.沙棘[J].生物学通报,1995,30(6):48.

[2] 陈学林,马瑞君,孙坤,等.中国沙棘属种质资源及其生境类型的研究[J].西北植物学报,2003,23(3):451-455.

CHEN X L, MA X L, SUNKUN, *et al.* Germplasm resource and habitat types of sea-buckthron in China[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2003,23(3):451-455. (in Chinese)

[3] 陈学林,廉永善.沙棘属植物的分布格局及其成因[J].沙棘,2007,20(4):1-5.

[4] 蔡海霞,吴福忠,杨万勤.干旱胁迫对高山柳和沙棘幼苗光合生理特征的影响[J].生态学报,2011,31(9):2430-2436.

CAI H X, WU F Z, YANG W Q. Effects of drought stress on the photosynthesis of *Salix paraqplesia* and *Hippophae rhamnoides* seedlings[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(9): 2430-2436. (in Chinese)

[5] 韩蕊莲,李丽霞,梁宗锁,等.干旱胁迫下沙棘膜脂过氧化保护体系研究[J].西北林学院学报,2002,17(4):1-5.

HAN R L, LI L X, LIANG Z S, *et al.* Seabuckthorn membrane-lipid peroxidation system under drought stress[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2002, 17(4): 1-5. (in Chinese)

[6] 何海燕,许国辉,马国强,等.青海东部主要造林树种的水分生理研究[J].西北林学院学报,2003,18(2):9-12.

HE H Y, XU G H, MA G Q, *et al.* Studies on water physiology of main afforestation tree in east Qinghai[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2003, 18(2): 9-12. (in Chinese)

[7] 田魏龙,蒋志荣.不同沙棘品种对于干旱胁迫的生理生化响应[J].中国沙漠,2011,31(5):1215-1219.

TIAN W L, JIANG Z R. Physiological and biochemical response of six cultivars of *Hippophae rhamnoides* to drought

stress[J]. Journal of Desert Research, 2011, 31(5): 1215-1219. (in Chinese)

[8] 于利刚,解莉楠,李玉花.植物抗逆反应中水孔蛋白的表达调控研究[J].生物技术通报,2011(8):5-14.

YU L G, XIE L N, LI Y H. Advantages on the expression patterns of aquaporins in plants under abiotic stress[J]. Bio-tech- Nology Bulletin, 2011(8):5-14. (in Chinese)

[9] DENKER B M, SMITH B L, KUHAJDA F P, *et al.* Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr28,000 integral membrane-protein from erythrocytes and renal tubules[J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(30):15634-15642.

[10] WANG L L, CHEN A P, ZHONG N Q, *et al.* The *Thel-lungiella salsuginea* tonoplast aquaporin TsTIP1;2 functions in multiple abiotic stress protection[J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55(1) 148-161.

[11] CHEN K T, WANG X, FESSEHAIE A, *et al.* Is expression of aquaporins (plasma membrane intrinsic protein 2s, PIP2s) associated with thermonasty (leaf-curling) in *Rhododendron*? [J]. J. Plant Physiol. ,2013,170(16):1447-1454.

[12] POU A, MEDRANO H, FLEXAS J, *et al.* A putative role for TIP and PIP aquaporins in dynamics of leaf hydraulic and stomatal conductances in grapevine under water stress and re-watering[J]. Plant Cell and Environ. ,2013,36(4):828-843.

[13] 吴晓静,王学敏,高洪文,等.东方山羊豆水通道蛋白基因的克隆及初步分析[J].草地学报,2011,19(2):331-339.

WU X J, WANG X M, GAO H W, *et al.* Cloning and analysis of the aquaporins gene from *Galega orientalis* [J]. Acta Agrestia Sinica, 2011, 19(2):331-339. (in Chinese)

[14] 马玉花,高英,周至远,等.干旱胁迫对肋果沙棘幼苗生理指标及膜特性的影响[J].青海大学学报:自然科学版,2013,31(2):1-5.

MA Y H, GAO Y, ZHOU Z Y, *et al.* Effects of drought stress on physiological characteristics of *Hippophae neurocarpa* [J]. Journal of Qinghai University: Natural Science, 2013, 31(2):1-5. (in Chinese)

[15] 马玉花,刘品高,高英,等.干旱胁迫下‘肋果沙棘’渗透调节物及保护酶活性变化的研究[J].甘肃农业大学学报,2013,48(4):100-104.

MA Y H, GAO Y, XIANG Q S, *et al.* Changes of the osmoregulation substance and protective enzyme of *Hippophae neurocarpa* under drought stress [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2013, 48(4):100-104 . (in Chinese)