

## · 药材与资源 ·

## 刺五加液泡膜内在蛋白基因的克隆与表达分析

邢朝斌, 刘 岩, 周 秘, 龙月红, 吴 鹏

河北联合大学生命科学学院, 河北 唐山 063000

**摘要:** 目的 克隆刺五加的液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic proteins, TIP) 基因, 并对其进行生物信息学和表达分析。方法 采用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆刺五加 TIP 基因 cDNA 的全长序列。以 GAPDH 为内参照基因, 通过 RT-PCR 法检测 TIP 基因在不同生长发育时期和器官中的表达情况。结果 刺五加 TIP 基因 cDNA 的全长 1 080 bp, 开放阅读框长 756 bp, 编码 251 个氨基酸的蛋白, 该蛋白包含 TIP 家族的标志性序列。刺五加的 TIP 蛋白具有 6 个跨膜螺旋, 定位于液泡膜。表达分析结果显示, 刺五加 TIP 基因在不同生长发育时期和不同器官中均有表达, 但表达量具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。其中盛花期的表达量最高, 是最低量果实快速生长期的 2.07 倍; 各器官中, 叶片的表达量最高, 是最低量根的 1.73 倍。结论 首次分离到刺五加 TIP 基因的 cDNA 全长序列, 并证实其在盛花期的叶中表达量最高, 为进一步研究 TIP 基因对刺五加水代谢的影响奠定基础。

**关键词:** 刺五加; 液泡膜内在蛋白; 克隆; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)02-0250-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.018

## Cloning and expression analysis of tonoplast intrinsic proteins gene in *Eleutherococcus senticosus*

XING Zhao-bin, LIU Yan, ZHOU Mi, LONG Yue-hong, WU Peng

College of Life Science, Hebei United University, Tangshan 063000, China

**Abstract: Objective** To clone tonoplast intrinsic proteins (TIP) gene from *Eleutherococcus senticosus* and to analyze its bioinformatics and expression. **Methods** Full length cDNA of TIP gene was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). Taking GAPDH gene as reference gene, the expression of TIP in different organs of *E. senticosus* at various growing periods was detected by RT-PCR. **Results** The full length cDNA of TIP gene was 1 080 bp containing a 756 bp open reading frame (ORF) that encoded a protein of 251 amino acids including the typical sequences of TIP family. TIP gene was located in tonoplast with six transmembrane domains. The result of expression analysis indicated that TIP gene expressed in different growth periods and organs of *E. senticosus*, and the expression amount differed significantly ( $P < 0.05$ ). The highest content of the expression showed up at full opening flower stage, which was 2.07 times as much as that in the lowest at rapid fruit growth stage. The highest content of the expression was in the leaves which was 1.73 times as much as that of the lowest in roots. **Conclusion** We have first extracted the full length cDNA of TIP gene in *E. senticosus*, which proves that the highest content of the expression is in the leaves at full opening flower stage. This work provides a foundation for the further investigation on the effect of water metabolism in *E. senticosus*.

**Key words:** *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.; tonoplast intrinsic proteins; clone; bioinformatics; expression analysis

水孔蛋白 (aquaporin) 是存在于植物细胞膜和液泡膜上能选择性地高效转运水分子的膜内在蛋白, 属于主要内在蛋白 (major intrinsic protein, MIP) 超家族<sup>[1]</sup>。在植物体中介导细胞与介质间的快速被动水分运转, 参与水分的长距离运输、单个细胞扩

展及渗透调节等许多生理过程, 是水分进出细胞的主要途径<sup>[2]</sup>。根据氨基酸序列的同源性及其结构特征, 通常将植物水孔蛋白分为质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic proteins, PIP)、液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic proteins, TIP)、类 Nod26 膜内在

收稿日期: 2013-10-16

基金项目: 河北省自然科学基金——石药集团医药联合研究基金项目 (H2012401006); 河北联合大学培育基金 (GP201306)

作者简介: 邢朝斌 (1975—), 男, 副教授, 研究方向为分子药理学、药用植物细胞工程。

Tel: (0315)3725859 Fax: (0315)3726341 E-mail: xzbheuu@126.com

蛋白 (nodulin 26-like intrinsic proteins, NIP)、小分子碱性膜内在蛋白 (small and basic intrinsic proteins, SIP) 和 GlpF 膜内在蛋白 (GlpF-like intrinsic proteins, GIP), 共 5 类<sup>[3-4]</sup>, 对 PIP 的研究较多。但最近发现 TIP 的导水性能是 PIP 的上千倍, 更利于水分的快速转移, 因而其在细胞渗透压及植物水分代谢的快速调节中可能起着更为重要的作用<sup>[5-6]</sup>。目前已经从部分植物中克隆到其 TIP 基因。刺五加是我国传统的珍贵药用植物, 近期, 参与其次生代谢调控的关键酶基因相继被克隆<sup>[7]</sup>, 但尚未见其 TIP 基因的相关报道。本研究采用 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术首次克隆到刺五加 TIP 基因的 cDNA 全长序列, 并分析了其在不同生长发育时期、不同器官中的表达, 为深入研究刺五加的水分代谢及其对次生代谢的影响奠定了基础。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. 采自黑龙江省鸡西市, 经河北联合大学生命科学学院邢朝斌副教授鉴定。分别以 4 月 26 日 (萌芽期)、5 月 26 日 (叶片完全展开期)、6 月 26 日 (盛花期)、7 月 26 日 (果实快速生长期)、8 月 26 日 (果实基本成熟期)、9 月 26 日 (叶片衰老期) 的叶片和 8 月 16 日的叶片、叶柄、幼茎和根 (编号为 1~10) 为提取 RNA 的试材。

### 1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、LA Taq DNA 聚合酶、PrimeScript 逆转录酶、TdT、3'-Full RACE core set Ver.2.0 购自 Takara 公司。植物总 RNA 提取试剂盒、TOP-10 感受态细胞和 PGM-T 克隆试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。质粒小提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Biomiga 公司。RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo 公司。IPTG、dCTP、X-gal、dNTPs 购自北京拜尔迪生物技术有限公司。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, PAGE 纯化。

## 2 方法

### 2.1 刺五加总 RNA 的提取和 TIP 基因保守区的获得

根据试剂盒的说明, 分别提取 1~10 号刺五加样本的总 RNA, 并逆转录为 cDNA。利用简并上游

引物 TIPS1: 5'-AACATCTCCGG(C/T)GG(A/T/G/C)-CA-3' 和简并下游引物 TIPX1: 5'-GCCCCAGTA(C/T)-ACCCA(G/T)TG-3', 以逆转录获得的刺五加 cDNA 为模板, PCR 扩增刺五加 TIP 基因的保守区核苷酸序列。反应体系 50  $\mu$ L, 其中上下游引物各 1.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 4  $\mu$ L, 10 $\times$ LA Taq 缓冲液 5  $\mu$ L, LA Taq 酶 0.5  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 补 dd H<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L。反应条件为 95  $^{\circ}$ C、3 min; 95  $^{\circ}$ C、30 s; 53  $^{\circ}$ C、30 s; 72  $^{\circ}$ C、40 s。35 个循环后 72  $^{\circ}$ C 补充延伸 10 min。扩增产物经电泳、回收后, 克隆入 PGM-T 质粒载体, 转化大肠杆菌 TOP-10。将验证转化成功的菌株送 Invitrogen 公司测序。

### 2.2 RACE 技术获取刺五加 TIP 基因 cDNA 的末端序列

根据“2.1”项中所获得的刺五加 TIP cDNA 的保守区核苷酸序列, 设计 5'RACE 扩增刺五加 TIP 基因 5' 末端序列的特异性引物 TIP52: 5'-CAAAGCTGGCCCAAATGAAACG-3' 和 TIP51: 5'-CGGATAGAGCAAATGCGGTTGT-3', 及 3'RACE 扩增刺五加 TIP 基因 3' 末端序列的特异性引物 TIP32: 5'-CAACAACCGCATTTGCTCTATCC-3' 和 TIP31: 5'-GATTGTGGGAGCCAACATTCTCG-3'。参照罗聪等<sup>[8]</sup>的方法, 利用 AUP1 引物, 取刺五加总 RNA 2  $\mu$ L, 逆转录合成 cDNA 第 1 链后利用 LA Taq DNA 聚合酶 5'RACE 扩增 TIP 基因 cDNA 的 5' 末端序列。参照 3'-Full RACE core set Ver.2.0 试剂盒说明书的要求, 进行 3'RACE 扩增。产物参照“2.1”项中的方法电泳、回收、克隆、测序。

### 2.3 刺五加 TIP 基因全长的拼接、验证与生物信息学分析

利用 DNAMAN 6.0 软件将获得的刺五加 TIP 基因保守区序列、5' 和 3' 末端序列进行拼接, 获得刺五加 TIP 基因 cDNA 的全长序列。根据拼接获得的序列, 设计扩增包含 TIP 基因起始密码子的上游引物 TIPQS: 5'-CTTGATTTCCGGCGATGC-3' 和包含终止密码子的下游引物 TIPQX: 5'-CAAACA-GTGACCCAACCTTGAC-3', 预计扩增 916 bp。反应条件为 95  $^{\circ}$ C、3 min; 95  $^{\circ}$ C、30 s; 54  $^{\circ}$ C、40 s; 72  $^{\circ}$ C、1 min。30 个循环后 72  $^{\circ}$ C 补充延伸 10 min。PCR 扩增体系与“2.1”项相同, 利用 TIPQS 和 TIPQX 引物对, PCR 扩增 TIP 基因的 cDNA 全长序列。参照文献方法<sup>[9]</sup>, 利用 DNAMAN 6.0、ProtParam、PROSITE、SOPMA、PSORT 和 SWISS-MODEL 软

件进行生物信息学分析。利用 Clustal W 软件进行氨基酸序列的对比分析后,使用 MEGA 5.21 软件中的 Neighbor-joining 法,替换模型选择 Poisson model,运算 1 000 次获得系统发育树。

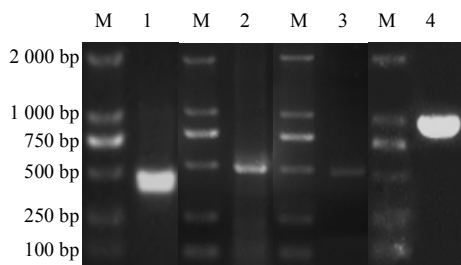
### 2.4 刺五加 TIP 基因的表达分析

参照文献方法<sup>[9]</sup>,以逆转录获得的 1~10 号刺五加样本的 cDNA 为模板,利用预计扩增 TIP 基因长度为 253 bp 的上游引物 TIPRTS: 5'-ATTTGCTC-TATCCGCGGTGTC-3',下游引物 TIPRTX: 5'-CCAGTGGTTGGTCCAGTCCC-3',以及预计扩增刺五加 GAPDH 基因长度为 134 bp 的引物 RGS 和 RGX,进行表达量分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 刺五加 TIP 基因的克隆

以刺五加的 cDNA 为模板,利用简并引物 TIPS1 和 TIPX1 进行 RT-PCR 扩增后,测序获得一条长 428 bp 的条带(图 1)。经 NCBI 的 BLAST 比对,确定该序列为刺五加 TIP 基因 cDNA 的部分序列。利用 TIP52 和 TIP51 引物,5'RACE 扩增后,测序获得一条长 480 bp 的 TIP 基因 5'末端 cDNA 序列(图 1)。利用 TIP32 和 TIP31 引物,3'RACE 扩增后,测序获得一条长 469 bp 的 TIP 基因 3'末端 cDNA 序列(图 1)。将所获得的保守区片段、5'和 3'末端 cDNA 序列进行拼接,发现该序列包含刺五加 TIP 基因的完整开放阅读框(ORF)。以刺五加的 cDNA 为模板,利用 TIPQS 和 TIPQX 引物,PCR 扩增获得 916 bp 的一条带(图 1),与预期大小相符。测序结果显示,该序列与拼接获得的序列完全相同。



1-TIP 基因保守区的 PCR 扩增 2-TIP 基因的 5'RACE 3-TIP 基因的 3'RACE 4-TIP 基因 cDNA 全长的 PCR 扩增 M-Marker  
1-PCR amplification of TIP gene conserved sequence 2-5'RACE of TIP gene 3-3'RACE of TIP gene 4-PCR amplification of full sequence of TIP gene cDNA M-Marker

图 1 刺五加 TIP 基因的克隆

Fig. 1 Clone of TIP gene from *E. senticosus*

### 3.2 刺五加 TIP 基因的生物信息学分析

刺五加 TIP 基因全长 1 080 bp(GenBank 登录号: KF498593),其中 5'端非翻译区(5'UTR)长 69 bp,3'端非翻译区(3'UTR)长 255 bp,终止密码子为 TAG,ORF 长 756 bp,编码 251 个氨基酸残基构成的蛋白质,3'端具有 polyA 尾。预测的蛋白质相对分子质量为 25 703.8,理论等电点(pI)为 7.01。氨基酸序列与人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.、胡萝卜 *Daucus carota* L. 和烟草 *Nicotiana tabacum* L. 的同源性分别达到 92.4%、92.3%和 89.7%。通过 NCBI 的 BLAST 比对发现,刺五加的 TIP 蛋白与蛋白质数据库中其他物种的 TIP 具有相似的功能结构域。刺五加 TIP 的 84~92 [HVNPAVTFG] 氨基酸残基处为 TIP 家族的标志性序列,86~88 和 199~201 氨基酸残基处,对称地分布着 TIP 高度保守的 [NPA] 基序。通过 TMHMM 软件分析得知,刺五加 TIP 蛋白在 24~43、58~80、105~127、142~164、171~193 和 217~239 氨基酸残基处分别存在 6 个跨膜螺旋,定位于液泡膜。刺五加 TIP 蛋白的二级结构中含有 94 个  $\alpha$  螺旋,占 37.45%; 48 个延伸链,占 19.12%; 14 个  $\beta$  折叠,占 5.58%; 95 个无规则蜷曲,占 37.85%。刺五加 TIP 蛋白的三维结构见图 2。

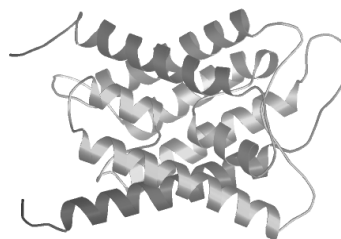


图 2 刺五加 TIP 蛋白三级结构同源建模

Fig. 2 3D structure of TIP from *E. senticosus* predicted by Swiss-model

### 3.3 TIP 蛋白的分子系统进化分析

利用 MEGA 5.21 软件,将 GenBank 中登载的 10 个物种的 TIP 蛋白与刺五加的 TIP 蛋白进行聚类分析,构建 TIP 蛋白的系统进化树(图 3)。刺五加与同为五加科的人参首先聚为一支,进而与同为伞形目的胡萝卜聚在一起。单子叶植物单独聚为一个分支,之后与双子叶植物聚在一起。

### 3.4 刺五加 TIP 基因的表达分析

刺五加 TIP 基因在不同生长发育时期和器官中的表达变化如图 4 所示。自萌芽开始的整个生长期中,TIP 基因均有表达,但表达量差异显著( $P < 0.05$ )。在整个生长期中,TIP 的表达呈现高-低-高-

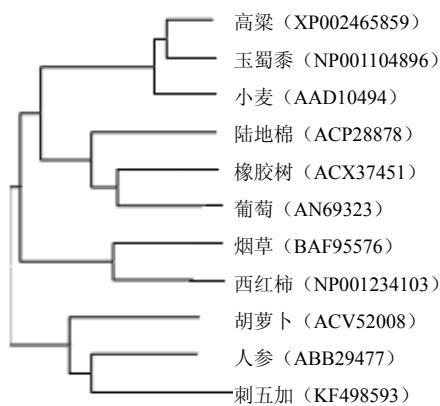
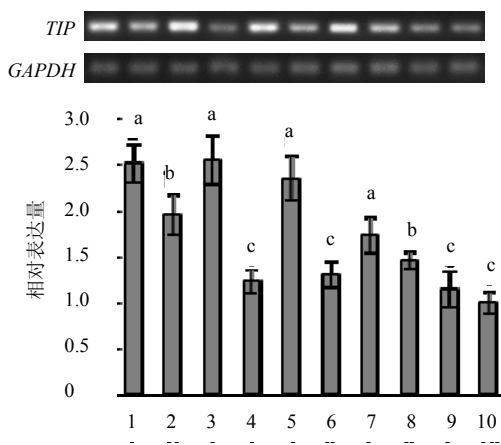


图3 TIP蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of TIP protein



1-萌芽期 2-叶片完全展开期 3-盛花期 4-果实快速生长期 5-果实基本成熟期 6-叶片衰老期 7-叶柄 8-叶柄 9-幼茎 10-根  
不同小写字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )

1-germination stage 2-leaf fully extended stage 3-flowering stage  
4-fruit rapid growth stage 5-fruit elementary mature stage 6-leaf senescence stage 7-blade 8-petiole 9-tender stems 10-roots  
Lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

图4 刺五加不同生长发育时期及器官中 TIP 基因的表达变化  
Fig. 4 Expression variations of TIP gene during different growth and development stages and in various organs of *E. senticosus*

低-高-低的变化趋势。萌芽期、盛花期和果实基本成熟期的表达量较高，叶片完全展开期次之。其中盛花期的表达量最高，果实快速生长期的表达量最低，前者是后者的 2.07 倍。果实快速生长期和叶片衰老期的表达量间差异不显著。刺五加的 TIP 基因在叶片、叶柄、幼茎和根中均有表达，但表达量具有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。最大表达量出现在叶片中，为最低表达量根的 1.73 倍，叶柄的表达量次之，幼茎和根中 TIP 基因的表达

量间差异不显著。

#### 4 讨论

本实验所克隆的刺五加 TIP 基因与同属伞形目的人参、胡萝卜的 TIP 基因的序列一致性在 90% 以上，其编码蛋白具备 TIP 超家族的标志性序列特征，均属于植物 TIP 家族。刺五加的 TIP 蛋白的 C 端和 N 端分别对称性地分布着与 TIP 家族功能密切相关的特征基序 [NPA]<sup>[10]</sup>，另外刺五加的 TIP 中也具备 6 个跨膜螺旋和植物 TIP 家族的标志性序列 [HVNPAVTFG] 等鉴别植物 TIP 的重要特征<sup>[10]</sup>。同源性与系统进化分析的结果表明，刺五加的 TIP 与人参、胡萝卜等植物的 TIP1 亚型的亲缘关系更近，而与其他类型的亲缘关系均较远，因此初步推断，本实验所克隆的刺五加 TIP 属 TIP1 型。

液泡作为植物细胞中重要的细胞器，在植物生长发育、细胞膨压维持及生物重要分子的代谢等过程中具有重要的作用<sup>[6,11]</sup>。定位于液泡膜的 TIP，使植物细胞可利用体积较大的液泡空间来缓冲细胞质内的渗透压波动以维持其处于稳定状态，因而在细胞渗透压调节中具有关键的作用<sup>[5-6]</sup>。TIP 在植物的不同生长发育时期及不同组织中的表达具有很大差异，以实现其对渗透压的调节。在不同器官中一般表现为在有水分大量流动或含水量较高的组织和器官中 TIP 的表达相对较高<sup>[12]</sup>，刺五加的 TIP 在叶片、叶柄幼茎和根中的表达量依次降低的特点与此相符。而刺五加 TIP 在不同生长发育时期中表现出的开花前表达量较低，盛花期最高，之后迅速降低的特点与月季中表现出的在花朵盛开前期随花朵的开放逐渐升高，达到盛开后迅速下降的特点<sup>[13]</sup>完全一致。

本研究获得的刺五加 TIP 为刺五加中首次获得的水孔蛋白，为进一步开展该基因的功能研究以及深入探讨刺五加水分子代谢调节的分子机制奠定了基础。

#### 参考文献

- Maurel C, Verdoucq L, Luu D T, et al. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 595-624.
- 罗 静, 刘正富, 武 峥, 等. 桃水孔蛋白基因克隆及序列分析 [J]. *经济林研究*, 2012, 30(1): 77-80.
- Wudick M M, Luu D T, Maurel C. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins [J]. *New Phytol*, 2009, 184(2): 289-302.

- [4] 李红梅, 万小荣, 何生根. 植物水孔蛋白最新研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(1): 29-35.
- [5] Sade N, Vinocur B J, Diber A, *et al.* Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2; 2 a key to isohydric to anisohydric conversion? [J]. *New Phytol*, 2009, 181(3): 651-661.
- [6] 李红梅, 丁岳炼, 林燕飞, 等. 麝香百合液泡膜水孔蛋白基因 LITIP2 的克隆及生物信息学分析 [J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1868-1872.
- [7] 邢朝斌, 吴 鹏, 修乐山, 等. 刺五加功能基因密码子偏好性的分析 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 598-603.
- [8] 罗 聪, 何新华, 陈 虎, 等. 一种高效获取基因5'末端的 RACE 方法 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(4): 409-414.
- [9] 邢朝斌, 龙月红, 吴 鹏, 等. 刺五加环阿屯醇合酶基因的克隆及其表达分析 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1387-1392.
- [10] Forrest K L, Bhave M. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype [J]. *Funct Integr Genomics*, 2007, 7(4): 263-289.
- [11] Epimashko S, Meckel T, Fischer-Schliebs E, *et al.* Two functionally different vacuoles for static and dynamic purposes in one plant mesophyll leaf cell [J]. *Plant J*, 2004, 37(2): 294-300.
- [12] Maeshima M, Ishikawa F. ER membrane aquaporins in plants [J]. *Pflugers Arch*, 2008, 456(4): 709-716.
- [13] Ma N, Xue J, Li Y, *et al.* Rh-PIP2;1, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(2): 894-907.