

铁皮石斛蔗糖转运蛋白基因的分离和表达分析

张 岗^{1,2}, 刘阿萍¹, 邵庆庆¹, 杨文婷¹, 李 雪¹, 郭顺星^{2*}

1. 陕西中医药大学药学院/陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 西安 712046

2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 分离珍稀濒危药用植物铁皮石斛蔗糖转运蛋白(sucrose transporter, SUT)基因(DoSUT1)并进行生物信息学和表达模式分析。方法 采用 RT-PCR 和 RACE 技术获基因全长; 利用生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域和亚细胞定位等分子特性; 用 DNASTAR 6.0 和 MEGA 4.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 借助实时定量 PCR 检测基因表达模式。结果 分离到 DoSUT1 (GenBank 注册号 KF876842), cDNA 全长 1 920 bp, 编码一条由 538 个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量 57 400, 等电点 9.61; DoSUT1 蛋白含 12 个跨膜域, 具有高等植物蔗糖/H⁺共转运家族和协助扩散超家族的保守结构域(60-524、63-531); DoSUT1 与多种植物 SUT 基因编码蛋白有较高的一致性, 与玉米、大麦等单子叶植物 SUT 亚家族中的 SUT4 聚类在一起; DoSUT1 基因具有组织表达特异性, 其转录本在石斛叶和茎中表达量较高, 分别为根中的 2.783 和 2.150 倍。结论 DoSUT1 基因的分子特征为进一步研究其在铁皮石斛糖代谢调控中的作用奠定基础。

关键词: 铁皮石斛; 蔗糖转运蛋白; 基因克隆; 序列分析; 实时定量 PCR

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)20-3688-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.20.022

Isolation and expression analysis of a sucrose transporter gene in *Dendrobium officinale*

ZHANG Gang^{1,2}, LIU A-ping¹, SHAO Qing-qing¹, YANG Wen-ting¹, LI Xue¹, GUO Shun-xing²

1. Shaanxi Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Basis & New Drugs Research, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To isolate and characterize a sucrose transporter (SUT) gene DoSUT1 in a rare endangered medicinal orchid species *Dendrobium officinale*. **Methods** RT-PCR and RACE technologies were used to isolate the full length cDNA of DoSUT1. Characteristics of physiochemical properties, conserved domains, and subcellular localization of the deduced DoSUT1 protein were determined using a series of bioinformatics tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using DNASTAR 6.0 and MEGA 4.0 softwares, respectively. Real time quantitative PCR was used for gene expression analysis. **Results** The full length cDNA of DoSUT1 was 1 920 bp in length and encoded a 538-aa protein with molecular weight of 57 400 and isoelectric point of 9.61; The deduced DoSUT1 protein, with 12 transmembrane regions, contained the sucrose/H⁺ symporter (SUC/SUT) and the major facilitator superfamily, (MFS) conserved domains (60-524 and 63-531). DoSUT1 had high identities with SUTs proteins from various plants; DoSUT1 belonged to the 1b subgroup of SUT evolutionary tree, and was closely related to the monocot maize and barley SUT4. DoSUT1 was differentially expressed in the three included organs. The transcripts were the most abundant in the leaves with 2.783 folds over that in the roots, followed by that in the stems with 2.150 fold. **Conclusion** Molecular characterization of DoSUT1 will be useful for further functional determination of the gene involving in the regulation of sugar metabolism of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; sucrose transporter; gene cloning; sequence analysis; real time quantitative PCR

收稿日期: 2016-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070300, 81473331); 陕西省教育厅自然专项(15JK1198); 陕西省青年科技新星项目(2012KJXX-44)

作者简介: 张 岗, 男, 博士, 教授, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

*通信作者 郭顺星, 男, 博士, 研究员, 主要从事药用植物菌根生物学研究。Tel/Fax: (010)62829619 E-mail: sxguo1986@163.com

糖类物质主要来源于植物光合作用, 其种类丰富多样、分布广泛, 对生物体的生命活动至关重要^[1-3]。植物经光合作用产生的淀粉是所有生命体的必需能源物质; 植物细胞合成的纤维素、半纤维素和果胶等是构成细胞壁的主要组分; 糖类还是重要的代谢中间物, 在体内转变为氨基酸、核苷酸、脂肪酸等; 某些糖亦可作为信号分子介导细胞基因表达与调控; 糖也能作为渗透物质调节水分生理进而参与器官发育。然而, 糖类在植物等生命体中的有效作用, 密切依赖于细胞中糖转运蛋白的表达与精细调控。

在高等植物中, 糖转运蛋白按其运输产物差异分为单糖转运蛋白和二糖转运蛋白 2 类^[4-5]。前者转运底物种类较多, 亦可分为己糖转运蛋白、肌醇转运蛋白等; 目前发现二糖转运蛋白, 除了少数转运麦芽糖外, 一般高度专性转运蔗糖, 其中研究最多当属蔗糖转运蛋白 (sucrose carrier/transporter, SUC/SUT)。根据基因结构、功能差异和分子进化, 其可分为 SUC2/SUT1、SUC3/SUT2、SUC4 3 个亚家族, 均属寡聚糖/H⁺共转运家族 (oligosaccharide/H⁺ symporter, OHS)。单糖、二糖转运蛋白的三维结构较相似, 含有 12 个跨膜结构域, N 端和 C 端一致性较高且均在胞质一侧, 属于协助扩散超家族 (major facilitator superfamily, MFS)^[4]。

1992 年, 自菠菜 SUT 基因 SoSUT1^[6]克隆研究以来, 已从十字花科、豆科、茄科、杨柳科及禾本科等科的多种植物中鉴定大量糖转运蛋白基因, 包括拟南芥、玉米、水稻、油菜、蒺藜苜蓿和杨树等^[7-12]。研究发现, 这些基因在染色体、转录、翻译及翻译后修饰等水平进行不同层次精细调控, 参与植物细胞各种生理生化代谢过程。拟南芥单糖转运基因 AtSTP4 基因在根尖分生组织中表达, 维持渗透势作为细胞伸长生长的驱动力^[13]。拟南芥 AtSTP11 基因花粉管中特异表达, 参与其生长发育^[14]。马铃薯 StSUT1 基因参与韧皮部装载^[15]。东方山羊豆 GoSUT 基因在 PEG、NaCl 等胁迫处理下上调^[16]。此外, 有研究还发现蒺藜苜蓿 MtST1 基因受球囊菌门真菌侵染诱导表达^[17]。可见, 糖转运蛋白基因在植物细胞生长发育、植物与微生物互作以及植物抗逆胁迫等方面发挥极其重要的作用。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生草本植物, 药用部位为新鲜或干燥

茎, 具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳、明目强身等作用, 是石斛属药用植物中最为珍稀名贵的种^[18]。石斛属植物主要含有多糖、生物碱、萜类、酚类以及木质素类等多种活性成分, 具有重要的药理活性。石斛多糖作为一类免疫增强剂, 具有促进淋巴细胞产生淋巴因子, 增强机体体液、细胞免疫, 以及抗肿瘤、抗氧化、抑制自由基和自由基等作用, 因而是石斛类药材质量鉴定的主要标准之一^[19]。前期, 本课题组利用 SSH 技术富集菌根真菌侵染铁皮石斛根的差异表达基因^[20], 分离得到一条 379 bp 的 EST, BLASTx 分析显示其与 SUT (GenBank 注册号 AAD55269) 一致性较高 (81%)。鉴于 SUTs 在植物糖生理中的重要作用, 该差异基因可能在石斛多糖代谢与调控中起重要作用。本研究利用 RACE 技术从铁皮石斛分离到一个蔗糖转运蛋白基因 DoSUT1 的全长 cDNA, 并进行生物信息学及表达模式分析, 为进一步揭示其在石斛多糖运输及各器官分配等方面的生物学作用奠定基础。

1 材料

样品采自云南西双版纳, 经笔者鉴定为野生铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, 取石斛根、茎、叶组织样品, 液氮速冻后置 -80 °C 保存备用。

2 方法

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab) 操作说明制备各样品总 RNA, NanoDropTM 2000 分光光度计 (Thermo Fisher) 分析 RNA 质量、纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测完整性。按照 M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega, USA) 操作说明, 逆转录合成 cDNA 第 1 链, -20 °C 保存备用。

2.2 3'-RACE 反应

序列分析表明, 原始 EST 的编码肽段包含 N 末端 89 个氨基酸, 因此只需进行 3'-RACE 反应。故在该序列起始密码子上游设计 2 条 3'-RACE 引物: SUT1-F1 为 5'-GAATCTGCTGTGATCTTCATCTCCCG-3'; SUT1-F2 为 5'-IGTIGATCTTCATCTCCCGCCCG-3' (下划线为 2 个引物的重合序列), 按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本) 说明书, 分别与试剂盒中提供的 3'-CDS 引物 (能够实现 3'-末端扩增) 组合进行 2 次巢式 3'-RACE。扩增产物即包含完成的编码区和 3'-polyA 尾巴, 无需再进行 RT-PCR 全长验证。

2 次 RACE-PCR 反应体系均为 25 μL , 包括 10 \times Advantage[®] 2 PCR buffer 2.5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL , SUT1-F1 或 SUT1-F2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 10 \times NUP 0.5 μL , 5'-RACE ready cDNA (第 1 次 PCR 模板) 或第 1 次 PCR 产物 (第 2 次 PCR 模板) 各 1.0 μL , 50 \times Advantage[®] 2 Polymerase Mix (5 U/L) 0.5 μL , ddH₂O 19.5 μL 。PCR 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, TianGen 胶回收试剂盒 (TianGen, China) 纯化目的条带, 连接至 pMD18-T vector (Takara, 中国), 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞, 随机挑选 3 个克隆并送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

2.3 序列分析

使用一系列网络在线工具进行 DoSUT1 基因核酸及编码蛋白的生物信息学序列分析。利用 NCBI 的 BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析 cDNA 序列; 用 ExPASy Proteomics Server 的 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan/>) 和 PROSITE SCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_proscan.html) 分析 DoSUT1 蛋白质的结构域和基元; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 分析蛋白质理化性质和二级结构; 采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三维建模分析; SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测蛋白质信号肽和跨膜区域; PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) 进行蛋白质亚细胞定位分析。用 DNASTAR 6.0 进行氨基酸序列比对; 借助 MEGA 4.0 构建系统进化树。

2.4 实时定量 PCR 分析

分别用 2 μg 根、茎、叶样品总 RNA 反转录合成 cDNA, EF1 α 作为内参基因^[21], qPCR 分析 DoSUT1 基因的组织表达模式。qPCR 引物 SUT1-S 5'-GGGTAGTGTCTGGGCTATGCT-3' 和 SUT1-AS 5'-TCCAATCAGTGTCAAAGAGGGT-3' 的扩增产物长 350 bp。用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行 qPCR。反应体系 25 μL 包括 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Master

Mix (Takara, 中国) 12.5 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , ROX 0.5 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 9 μL 。每个反应重复 3 次, 包括不加模板的对照, 实验重复 3 次。PCR 程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 40 个循环, 反应结束绘制熔解曲线。根据 ABI PRISM 7500 SDS 软件 (Applied Biosystems, USA) 生成的循环阈值 (Cycle threshold, Ct), 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法^[22] 计算基因的相对表达量。

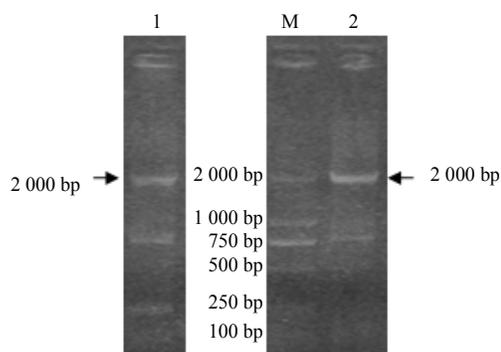
3 结果与分析

3.1 DoSUT1 基因全长克隆

经过 2 次巢式 3'-RACE 反应, 扩增产生长度约为 2 000 bp 的目标条带 (图 1), 克隆、测序获得 1 920 bp 的序列, 拼接分析获得了一条 1 999 bp 的 cDNA。BLASTx 分析表明其与 GenBank 中已注册的多种植物 SUT 有很高的相似性 (63%~71%)。该 cDNA 序列包含的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长 1 671 bp, 5'-UTR 长 110 bp, 3'-UTR 长 273 bp, 具有真核生物 mRNA 加尾信号 "AATAA" 以及 polyA 尾巴, 起始密码子附近碱基序列 GAAATGG (即 A/GNNATGG)^[23], 因此将其定名为 DoSUT1, 提交 GenBank 获得注册号 KF876839。

3.2 DoSUT1 基因的编码蛋白理化特性分析

ProtParam 预测 DoSUT1 基因编码的蛋白质的分子式为 C₂₆₄₁H₄₁₇₅N₆₈₉O₇₀₃S₁₈, 包含 538 个氨基酸残基, 相对分子质量 57 400, 等电点 9.61; DoSUT1 蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 为 44, 负电残基 (Asp+Glu) 为 29。该蛋白的不稳定系数为 37.64, 脂肪系数为 109.87, 亲水性系数为 0.459。SOPMA 分析表明, DoSUT1 蛋白二级结构主要由 α 螺旋 (alpha



1-1 次 3'-RACE 产物 2-2 次 3'-RACE 产物 M-Marker
1-1st round 3'-RACE product 2-2nd round 3'-RACE product M-Marker

图 1 铁皮石斛 DoSUT1 基因全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Clone of full length cDNA of DoSUT1 gene in *D. officinale*

helix, 38.29%)、随机卷曲 (random coil, 33.21%)、延伸链 (extended strand, 20.33%) 和少量的 β 转角 (beta turn, 8.17%) 组成。

3.3 DoSUT1 蛋白结构域、定位和跨膜区分析

InterProscan 分析结果显示, DoSUT1 蛋白含有高等植物蔗糖/H⁺共转运家族 (sucrose/H⁺ symporter, SUC/SUT) 和协助扩散超家族 (major facilitator superfamily, MFS) 的保守结构域 (60-524、63-531), 具备高等植物蔗糖转运蛋白的典型结构域特征。PROSITE SCAN 分析表明, DoSUT1 蛋白含有数目不等的功能基元, 包括 N-糖基化位点 (187-190)、酰胺化位点 (129-132)、RGD 细胞附着位点 (345-347)、亮氨酸拉链 (365-386) 和脯氨酸富集位点 (44-45) 各 1 个, 5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (34-36、122-124、202-204、276-278、455-457), 7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (26-29、34-37、202-205、276-279、287-290、288-291、332-335) 和 17 个 N-豆蔻酰化位点 (74-79、94-99、157-162、223-228、231-236、357-362、364-369、389-394、422-427、427-432、440-445、462-467、464-469、466-471、497-502、505-510、512-517)。

3.4 DoSUT1 蛋白亚细胞定位、信号肽和跨膜域预测

PROSITE 预测 DoSUT1 蛋白定位在叶绿体类囊体膜的可能性最高为 85.4%, 定位于质膜为 60%, 定位于高尔基体、内质网的几率分别为 40% 和 30%。ChloroP 1.1 分析结果显示, DoSUT1 蛋白具有叶绿体转运肽, 表明 DoSUT1 可能是一个叶绿体蛋白。SignalP 4.0 分析 DoSUT1 蛋白不含信号肽, 图 2 TMHMM 分析显示 DoSUT1 具有 12 个跨膜结构域 (64-86、99-121、134-156、171-190、211-233、258-277、306-328、356-378、390-412、427-449、461-483、498-520), 这与已报道的植物 SUT 蛋白结构 (12 个跨膜区) 一致^[4,7]。

3.5 DoSUT1 与植物 SUTs 蛋白的氨基酸序列比对分析

运用 DNASTAR 6.0 中的 MegAlign 程序, 对 DoSUT1 基因编码蛋白与代表性植物的 7 个蔗糖转运蛋白进行多序列比对。图 3 结果显示, 铁皮石斛 DoSUT1 蛋白与高粱 *Sorghum bicolor* (L.) Moench SbSUT4 (ACX71839)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh AtSUC4 (NP_172467) 和大麦 *Hordeum*

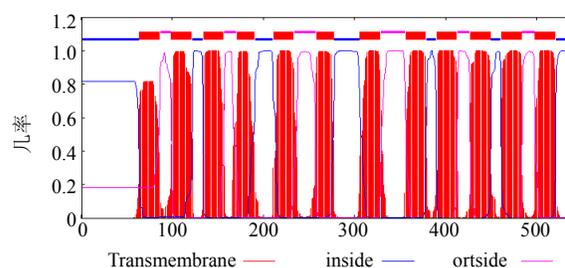


图 2 TMHMM 分析 DoSUT1 蛋白的跨膜域

Fig. 2 Transmembrane region of deduced DoSUT1 protein analyzed by TMHMM

vulgare L. HvSUT2 (CAB75881) 相似性较高, 分别为 61.5%、59.4%、58.3%; 与拟南芥 *AtSUC1* (AEE35247) 和烟草 *Nicotiana tabacum* L. NtSUT (BAO47334) 相似性为 47.6% 和 46.5%; 与高粱 *SbSUT1* (ACY69230) 和水稻 *Oryza sativa* L. OsSUT1 (Q9LKH3) 的相似性较低为 39.5% 和 39.0%。DoSUT1 蛋白含植物蔗糖转运蛋白普遍存在的 12 个保守跨膜域, 其中, 除 VI 和 IX 跨膜域与其他植物 SUC/SUTs 蛋白差异较大, 其余相对高度保守。

3.6 DoSUT1 基因编码蛋白的系统进化树分析

为分析铁皮石斛 DoSUT1 基因编码蛋白的分子进化关系, 从 GenBank 数据库中选取具有代表性的 7 个物种的 33 条糖转运蛋白序列, 利用 MEGA 6.0 构建 DoSUT1 蛋白的系统进化树。

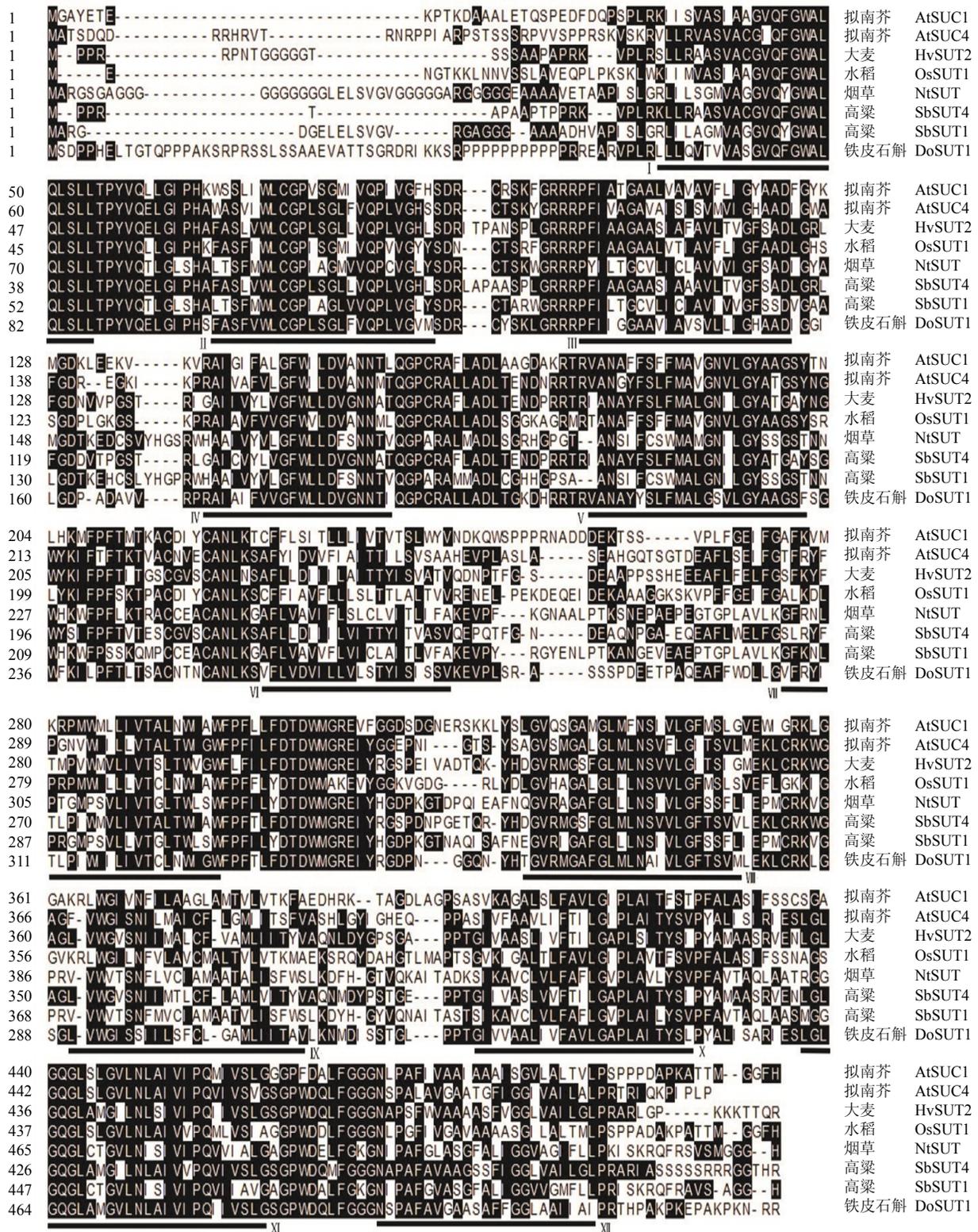
图 4 结果表明, 34 个糖转运蛋白基因分为 2 个大群, 即单糖转运蛋白 (MSTs) 与 SUT。其中 SUT 分为 3 个亚族, 分别为 SUC2/SUT1、SUC3/SUT2、SUC4。DoSUT1 与玉米 *ZmSUT4* (AAT35810)、大麦 *HvSUT2* (CAB75881)、高粱 *SbSUT4* (*Sorghum bicolor* ACX71839) 等单子叶植物亲缘关系最近且聚在一起, 所在分支隶属植物 SUT SUC4 亚族。

3.7 基因表达模式分析

分别提取石斛根、茎、叶等样品总 RNA, 利用 qPCR 技术检测 DoSUT1 的组织表达模式。图 5 结果表明, DoSUT1 在 3 种器官中为组成型表达, 但相对表达量存在差异。以根为校正样本, DoSUT1 转录本在石斛叶中的表达量较高, 为根中的 2.783 倍; 茎中次之, 为根中的 2.150 倍。

4 讨论

SUC/SUTs 蛋白介导了蔗糖在植物细胞间短距离或植物体内长距离运输, 通过调节糖在源-库器官

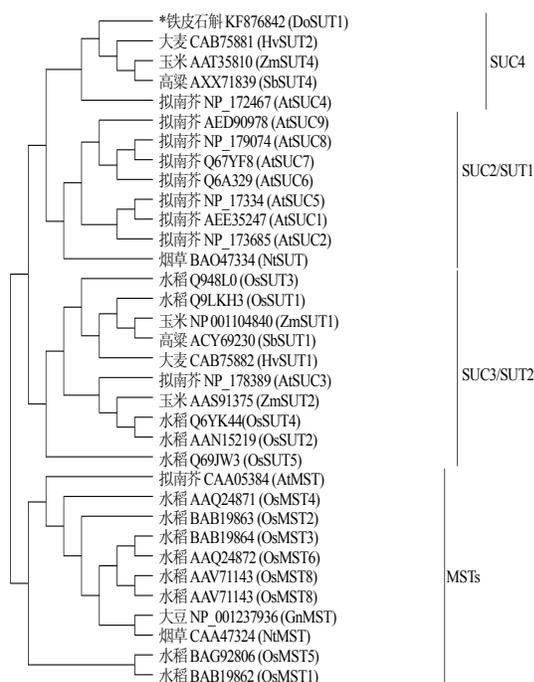


下划线 I~XII 为 SUT 的 12 个保守跨膜域

I—XII show the 12 underlined transmembrane regions conserved among SUC/SUT proteins

图 3 DoSUT1 与植物 SUC/SUT 蛋白的多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of DoSUT1 and SUC/SUT proteins from other plants



SUC2/SUT1、SUC3/SUT2 和 SUC4 为 SUT 3 个亚家族
SUC2/SUT1, SUC3/SUT2, and SUC4 represent the three subfamilies of sucrose carrier/transporter (SUC/SUT)

图 4 DoSUT1 与不同物种糖转运蛋白的进化树分析
Fig. 4 Phylogenetic tree of DoSUT1 with sucrose carrier/transporters from other species

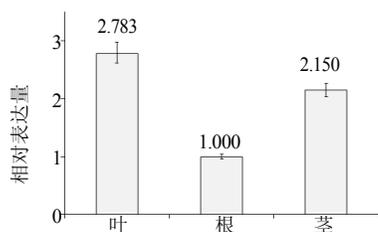


图 5 利用 qPCR 分析 DoSUT1 基因的组织表达模式
Fig. 5 Tissue-specific expression pattern of DoSUT1 gene using qPCR analysis

中的有效合理分布及其利用,进而在植物生长发育、抗逆生理、植物微生物互作等方面发挥着极其重要的作用^[4-5,24]。SUC/SUTs 基因系统性分析多来自模式植物和农作物研究,药用植物中尚未见报道。植物 SUC/SUTs 呈多基因家族,拟南芥、水稻、玉米和蒺藜苜蓿等已鉴定有 9、5、6 和 4 个成员^[9,11,25]。本研究利用 RACE 技术首次从珍稀濒危铁皮石斛中分离到一个 DoSUT1 基因 cDNA 全长其编码蛋白具有高等植物 SUT 典型的协助扩散超家族、蔗糖/H⁺共转运保守结构域和多个基序。DoSUT1 与多种植

物 SUT 基因一致性较高,分子进化属于 SUC4 亚家族^[26],与玉米、大麦、高粱等单子叶植物亲缘关系较近。这些说明 DoSUT1 是编码铁皮石斛 SUT 新的重要基因。

蛋白质结构域和基元是决定其发挥生物学功能的重要基础。系统性研究发现,SUC/SUTs 家族是协助扩散超家族的成员之一,属寡聚糖/H⁺共转运家族^[16],佐证了 DoSUT1 蛋白 InterProScan 预测结构域的正确性。SUC/SUTs 蛋白典型结构都具有 12 个跨膜结构域和 11 突环,其 N 端和 C 端均在细胞质一侧,N 端氨基酸序列与 SUT 对蔗糖亲和力有重要关联^[26],而 TMHMM 分析揭示 DoSUT1 蛋白存在 12 跨膜域,多序列比对显示,DoSUT1 蛋白 N 端与多种植物已知 SUT N 端保持高度一致,这些特征均与 SUC/SUTs 蛋白典型结构相一致。已报道的绝大多数 SUC/SUTs 蛋白的亚细胞定位尚不清楚,一般为生物信息学预测分析结果。番茄 LeSUT4 (属 SUC4 亚族)被定位于筛分子质膜^[27],SUC4 亚族中一些成员定位于液泡膜^[26]。PROSITE 预测 DoSUT1 蛋白定位在叶绿体内囊体膜上的几率高达 85.4%,结合 ChloroP 1.1 分析其包含叶绿体转运肽,说明 DoSUT1 蛋白定位与内囊体膜上执行糖转运功能。分子系统学研究揭示植物 SUT 包含 SUC2/SUT1、SUC3/SUT2、SUC4 3 个亚家族,单子叶植物仅含有 SUC3/SUT2 和 SUC4 2 个亚族^[26],DoSUT1 属 SUC4 亚家族,与单子叶植物聚类在一起符合进化关系。DoSUT1 基因的这些分子特征为其生物学功能研究提供参考。

植物 SUC/SUTs 基因的组织表达模式存在较大差异。不同植物或同一植物的不同器官,SUC/SUTs 基因的表达部位和表达量都有差异。拟南芥 AtSUT2 基因的启动子在叶的维管组织中表达^[28],水稻 OsSUT1 基因的启动子在从旗叶到正在灌浆的谷粒中都有表达,表明基因参与糖的长距离运输^[29]。玉米 SUT 基因 ZmERD6 基因在不同组织中差异表达,ZmERD6-L 基因在花丝和籽粒中相对表达量最高,未成熟胚和根中较高,而在叶中最低。ZmERD6-S 基因在各个组织中都有表达,但是表达量较低,说明这 2 个转录本差异表达决定他们的功能不同^[25]。本研究 qPCR 分析结果显示,DoSUT1 基因为组成型表达,在石斛叶、茎中表达量显著高于根中。铁皮石斛的药用部位是富含生物碱和多糖等有效成份的直立茎,DoSUT1 基因在石斛茎中的

丰度较高, 意味着其可能主要调节茎中糖转运与贮存; 叶中的高丰度表达特征说明 DoSUT1 基因在库器官糖转运中发挥一定作用。

目前, SUC/SUTs 蛋白在多种植物中均有研究, 也发现 SUC/SUTs 蛋白在植物生命活动中具有多种重要作用。随着人们对多糖功效的不断认识, 也加强了人们对 SUC/SUTs 蛋白的高度关注, 目前对其研究多限于模式植物和含糖量较高的植物, 而对于药用植物的研究较少。药用植物药用部位糖分转运与积累必定和 SUT 密切相关。本研究后续将利用 RNAi 或过量表达技术研究 DoSUT1 基因在铁皮石斛蔗糖转运以及多糖积累中的生物学功能, 为通过遗传工程手段改良铁皮石斛种质奠定基础。

参考文献

- [1] Wind J, Smeekens S, Hanson J. Sucrose: metabolite and signaling molecule [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(14/15): 1610-1614.
- [2] Hill L M, Morley-Smith E R, Rawsthorne S. Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(1): 228-236.
- [3] Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2006, 57: 675-709.
- [4] Lorraine E W, Remi L, Norbert S, et al. Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation [J]. *Trends in plants science*, 2000, 5(7): 283-290.
- [5] Chen L Q, Hou B H, Lalonde S, et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens [J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 527-532.
- [6] Riesmeier J W, Willmitzer L, Frommer W B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast [J]. *EMBO J*, 1992, 11(13): 4705-4713.
- [7] Sauer N, Stolz J. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein [J]. *Plant J*, 1994, 6(1): 67-77.
- [8] Barker L, Kühn C, Weise A, et al. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(7): 1153-1164.
- [9] Aoki N, Hirose T, Scofield G N, et al. The sucrose transporter gene family in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(3): 223-232.
- [10] Li F P, Ma C Z, Wang X, et al. Characterization of sucrose transporter alleles and their association with seed yield-related traits in *Brassica napus* L. [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 168-172.
- [11] Doidy J, van Tuinen D, Lamotte O, et al. The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(6): 1346-1358.
- [12] Payyavula R S, Tay K H, Tsai C J, et al. The sucrose transporter family in *Populus*: the importance of a tonoplast PtaSUT4 to biomass and carbon partitioning [J]. *Plant J*, 2011, 65(5): 757-70.
- [13] Kühn C, Hajirezaei M R, Fernie A R, et al. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(1): 102-113.
- [14] Fotopoulos V, Gilbert M J, Pittman J K, et al. The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atbetafruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 821-829.
- [15] Schneidereit A, Scholz-Starke J, Sauer N, et al. AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2005, 221(1): 48-55.
- [16] Harrison M J. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations [J]. *Plant J*, 1996, 9(4): 491-503.
- [17] 李俊, 王学敏, 董洁, 等. 东方山羊豆蔗糖转运蛋白基因克隆及表达载体构建 [J]. 中国草地学报, 2011, 33(3): 39-46.
- [18] 曾淑华, 文国松, 徐绍忠, 等. 铁皮石斛磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 766-771.
- [19] 陈晓梅, 王春兰, 杨俊山, 等. 铁皮石斛化学成分及其分析的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(19): 1634-1640.
- [20] 李标, 唐坤, 张岗, 等. 菌根真菌诱导的铁皮石斛根差减 cDNA 文库构建 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(22): 1790-1795.
- [21] 张岗, 刘思思, 杨新杰, 等. 一个全新的铁皮石斛 *DoSWEET1* 基因的分子克隆与特性分析 [J]. 药学报, 2016, 51(6): 991-997.
- [22] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [23] Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from

- 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(20): 8125-8132.
- [24] Braun D M, Wang L, Ruan Y L. Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(7): 1713-1735.
- [25] 马小龙, 刘颖慧, 袁祖丽, 等. 玉米蔗糖转运蛋白基因 *ZmERD6* cDNAs 的克隆与逆境条件下的表达 [J]. *作物学报*, 2009, 35(8): 1410-1417.
- [26] Shiratake K. Genetics of sucrose transporter in plant [J]. *Genes, Genomes Genomics*, 2007, 1(1): 73-80.
- [27] Weise A, Barker L, Kühn C, *et al.* A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(8): 1345-1355.
- [28] Schulze W, Weise A, Frommer W B, *et al.* Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity [J]. *FEBS Lett*, 2000, 485(2/3): 189-94.
- [29] Gottwald J R, Krysan P J, Young J C, *et al.* Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13979-13984.