

## • 药材与资源 •

三七液泡膜内在蛋白基因 *PnTIP1;3* 的酵母异源表达及其砷转运功能解析

郑泰雄<sup>1,2,3,4</sup>, 张兴开<sup>1</sup>, 唐树爽<sup>1</sup>, 魏富刚<sup>5</sup>, 王艳林<sup>5</sup>, 龙仙女<sup>1</sup>, 曹冠华<sup>1,2,3,4\*</sup>, 贺森<sup>1,2,3,4\*</sup>

1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500
2. 云南中医药大学中药学院暨云南省南药可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650500
3. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700
4. 云南中医药大学 中药研究国际科技合作基地, 云南 昆明 650500
5. 文山苗乡三七科技有限公司, 云南 文山 663108

**摘要:** 目的 基于砷(As)胁迫下三七 *Panax notoginseng* 根的转录组数据, 克隆液泡膜内在蛋白基因 *PnTIP1;3*, 通过生物信息学分析和酵母异源表达实验, 解析其在 As 转运过程中的功能特性。方法 利用生物信息学工具分析基因 *PnTIP1;3* 的序列特征及其启动子区顺式作用元件; 构建酵母异源表达体系, 通过表型实验、ICP-MS 测定细胞内 As 含量与亚细胞分布, 并检测相关抗氧化指标, 系统评估 *PnTIP1;3* 在细胞 As 转运中的功能。结果 克隆获得三七液泡膜内在蛋白基因 *PnTIP1;3*, 其开放阅读框为 750 bp, 编码 250 个氨基酸, 系统进化分析表明其属于 TIP1 亚族。启动子分析显示其含有多个激素、生长发育及胁迫响应相关的顺式作用元件。As 耐性实验表明, 异源表达 *PnTIP1;3* 的酵母转化子 (*TPnTIP1;3*) 的 EC<sub>50</sub> 为 5.36 mmol/L, 略高于空载对照 (5.03 mmol/L)。As 处理对 2 种菌株生长均产生抑制, 但对空载菌株的抑制更为显著。ICP-MS 分析显示, *TPnTIP1;3* 菌株中总 As 积累量显著高于对照, 亚细胞组分中 As 含量表现为细胞壁 > 液泡 > 细胞质。在 As 胁迫下, *TPnTIP1;3* 中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), 而超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性以及谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 含量均显著上升 ( $P < 0.05$ )。相关性分析进一步表明, 这些抗氧化指标与总 As 含量及细胞壁 As 浓度呈显著正相关。结论 三七液泡膜内在蛋白基因 *PnTIP1;3* 属于 TIP1 亚族, 其异源表达可促进酵母对 As 的积累与液泡区隔化储存, 并通过激活宿主抗氧化系统增强对 As 胁迫的耐受能力。

**关键词:** 三七; 水通道蛋白; 砷; 生信分析; 异源表达; 抗氧化系统

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)10-3926-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.10.021

## Heterologous expression of *Panax notoginseng* tonoplast intrinsic protein gene *PnTIP1;3* in yeast and its role in arsenic transport

ZHENG Taixiong<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Xingkai<sup>1</sup>, TANG Shushuang<sup>1</sup>, WEI Fugang<sup>5</sup>, WANG Yanlin<sup>5</sup>, LONG Xiannv<sup>1</sup>, CAO Guanhua<sup>1,2,3,4</sup>, HE Sen<sup>1,2,3,4</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China
2. Yunnan Key Laboratory of Southern Medicine Sustainable Utilization, School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China
3. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China
4. Chinese Pharmaceutical Research International Science and Technology Cooperation Base of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

收稿日期: 2025-11-02

**基金项目:** 云南省基础研究计划重点项目 (202501AS070141); 国家自然科学基金项目 (82260743); 国家自然科学基金项目 (82360750); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302-2404-05); 云南省“万人计划”青年拔尖人才专项 (YNWR-QNBJ-2020-279); 云南省“兴滇英才支持计划”青年人才项目 (XDYC-QNRC-2023-0526); 云南省科技厅-云南省国际科技特派员(个人)项目 (202403AK140080); 云南省中医药应用基础研究联合专项 (202101AZ070001-014, 202001AZ070001-009); 云南省教育厅科学研究基金研究生项目 (2025Y0604)

**作者简介:** 郑泰雄, 硕士研究生, 研究方向为中药资源开发。E-mail: 2558707769@qq.com

**\*通信作者:** 曹冠华, 正高级实验师, 硕士生导师, 主要从事中药资源与菌根微生物的研究。E-mail: cgh20031695@163.com

贺森, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药资源与分子生物学的研究。E-mail: sunbelt123@163.com

5. Wenshan Miaoxiang Sanqi Technology Co., Ltd., Wenshan 663108, China

**Abstract: Objective** Based on transcriptome data from roots of *Panax notoginseng* under arsenic (As) stress, the tonoplast intrinsic protein gene *PnTIP1;3* was cloned. Its functional characteristics in As transport were investigated through bioinformatic analysis and heterologous expression in yeast. **Methods** Bioinformatic tools were used to analyze the sequence features and promoter *cis*-acting elements of *PnTIP1;3*. A yeast heterologous expression system was constructed, and the role of *PnTIP1;3* in cellular As transport was systematically evaluated through phenotypic assays, intracellular As content and subcellular distribution measurement by ICP-MS, and analysis of relevant antioxidant indicators. **Results** The tonoplast intrinsic protein gene *PnTIP1;3* was cloned, with an open reading frame of 750 bp encoding 250 amino acids. Phylogenetic analysis indicated that it belongs to the TIP1 subfamily. Promoter analysis revealed the presence of multiple *cis*-acting elements related to hormones, growth and development, and stress responses. As tolerance assays showed that the half-maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ) of yeast transformants heterologously expressing *PnTIP1;3* (*TPnTIP1;3*) was 5.36 mmol/L, higher than that of the empty vector control (5.03 mmol/L). As treatment inhibited the growth of both strains, but the empty vector control was more severely affected. ICP-MS analysis indicated that total As accumulation was significantly higher in *TPnTIP1;3* than in the control, and the subcellular distribution of As followed the pattern: cell wall > vacuole > cytoplasm. Under As stress, reactive oxygen species (ROS) levels were significantly decreased ( $P < 0.001$ ) in *TPnTIP1;3*, while the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as the contents of glutathione (GSH) and metallothionein (MT), were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Correlation analysis further demonstrated significant positive relationships between these antioxidant indicators and both total As content and cell wall As concentration. **Conclusion** The *P. notoginseng* tonoplast intrinsic protein gene *PnTIP1;3*, a member of the TIP1 subfamily, enhances yeast tolerance to As stress by promoting As accumulation and vacuolar sequestration, and through activation of the host antioxidant system.

**Key words:** *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen; aquaporin; arsenic; bioinformatics analysis; heterologous expression; antioxidant system

三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 为五加科人参属多年生草本植物, 又名田七、金不换和参三七, 主要以其干燥主根入药, 位居云南省“十大云药”之首<sup>[1]</sup>。三七主产于云南、广西等地, 其中云南省文山壮族苗族自治州为三七主要和道地产区, 市场占有率高达 90%, 被誉为“三七之乡”<sup>[2]</sup>。调查显示, 云南文山州及外延地区三七种植区土壤砷 (arsenic, As) 超标问题严重, 超标率达 65.0%, 且红河玉溪片区 > 昆明曲靖片区 > 文山片区 > 大理保山片区<sup>[3]</sup>。三七对 As 具有一定的耐性和富集特性, 对 27 个三七样品 As 含量检测分析, 发现 37.04% 的块根样品, 48.15% 的叶样品 As 含量均超过 2 mg/kg 的限量标准<sup>[4]</sup>, 存在较高的药用、食用安全风险。As 作为人体非必需元素, 被国际癌症研究机构归类为 I 类致癌物, 长期食用被 As 污染的物质会引发癌症等疾病<sup>[5]</sup>。

目前, 诸多研究聚焦采用生物、非生物手段降低三七 As 吸收积累的可行性, 并取得了一定的效果。Li 等<sup>[6]</sup>研究发现, 在三七根部接种根际细菌 *Delftia acidovorans* (BC2) 可显著抑制 As 在植株体内的转运效率。李泽东<sup>[7]</sup>研究发现, 磷酸盐转运蛋白 (phosphate transporter, PHT) 是磷酸盐和砷酸盐

共同转运载体, 施加充足的磷酸盐可抑制三七对砷酸盐的吸收。此外, Zeng 等<sup>[8]</sup>研究报道适量施加硫酸盐也可有效减少三七中 As 的积累。然而, 关于三七 As 吸收、积累和亚细胞分布机制的研究相对较少。有研究指出, 水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 和 PHT 是植物吸收、转运 As 的主要载体<sup>[9-10]</sup>, 但关于 AQPs 吸收转运 As 机制的研究较少, 尤其关于由其介导的 As 亚细胞分布及宿主 As 耐性的改变更是鲜有报道。

AQPs 是主要内在蛋白 (major intrinsic proteins, MIPs) 超家族成员, 在动物和植物中普遍存在。在高等植物中, 根据序列相似性和定位, MIP 可分为 5 个 AQP 亚家族, 分别为质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)、液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic proteins, TIPs)、类 NOD26 膜内在蛋白 (nodulin 26-like intrinsic proteins, NIPs)、小分子碱性内在蛋白 (small basic intrinsic proteins, SIPs) 和 X-内源蛋白 (X-intrinsic proteins, XIPs)<sup>[11]</sup>。TIPs 作为 MIPs 中重要的一个分枝, 具有典型的 “Asn-Pro-Ala” NPA 基序和芳香/精氨酸 (Ar/R) 选择性过滤器以及唯一的 Froger 位点<sup>[12]</sup>。研究发现, TIPs 除参与甘油、氨、尿素和过氧化氢等营养物质的转运外, 还在黑麦草<sup>[13]</sup>、

龙葵<sup>[14]</sup>和杨树<sup>[15]</sup>等植物中对镍 (nickel, Ni)、镉 (cadmium, Cd)、锌 (zinc, Zn) 等重金属的吸收与转运中发挥关键作用,并可介导增强植株对重金属的耐受性。He 等<sup>[16]</sup>通过酵母和拟南芥的异源表达实验证实,异源表达蜈蚣草 *TIP4;1* 基因能够显著提高宿主对 As 的胁迫抗性。

目前关于三七 As 吸收转运的分子机制多有不明,尤其是关于 TIPs 在其中的功能和作用机制更是鲜有报道。基于课题组前期转录组,本研究以一条显著响应 As 诱导而显著上调表达的 *TIP* 基因为标靶,对其进行系统生信分析,并通过酵母异源表达,考察其对酵母细胞 As 积累、亚细胞分布及抗氧化系统的影响。本研究为明确 *TIP* 基因作用机制提供了数据支持,对解决三七 As 超标问题具有一定的参考价值。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

样品经云南中医药大学曹冠华教授鉴定为一年生三七 *P. notoginseng* (Burk) F. H. Chen 须根,经 10 mg/kg Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 处理 6 个月,在云南省文山州苗乡三七科技示范园处理完成。尿嘧啶合成缺陷型酵母突变菌株 INVSc1 为实验室保藏;pYES2 质粒购于北京酷来搏科技有限公司。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购于全式金生物技术有限公司;克隆载体购自翊圣生物科技(上海)股份技术有限公司 Hieff Clone<sup>®</sup>Zero TOPO-Blunt Simple Clonin Kit。

### 1.2 仪器与试剂

Proflex 型 PCR 扩增仪,美国应用生物系统公司;FD50A 型立式高压灭菌锅,厦门致微仪器有限公司;JBZL-08 型智能恒温摇床,常州普天仪器制造有限公司;WD-9403X 型电泳槽,北京六一生物科技有限公司;UV2355 型紫外分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;FlexA-200 酶标仪,杭州奥盛仪器有限公司;电感耦合等离子体质谱仪 ICP-MS (iCAP RQ, Thermo Fisher Scientific, 美国)。

《活性氧 ROS 酶联免疫分析试剂盒》(批号 202501,晶美生物科技有限公司)、《超氧化物歧化酶 SOD 活性检测试剂盒》(批号 10125081150,北京盒子生工科技有限公司)、《过氧化氢酶 CAT 活性检测试剂盒》(批号 10125061420,北京盒子生工科技有限公司)、《谷胱甘肽 GSH 活性检测试剂盒》(批号 101250728100,北京盒子生工科技有限公司)、《植物金属硫蛋白 MT 酶联免疫分析试剂盒》(批号 202505,晶

美生物科技有限公司)。Trizol 裂解液,上海玉博生物科技有限公司;cDNA 第一链合成试剂盒、反转录试剂盒、长链高保真酶、限制性内切酶和 T4 连接酶,宝日医生物技术有限公司;质粒小提试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC),西格玛里奇(上海)贸易有限公司;DNA 纯化试剂盒,北京博迈德基因技术有限公司;Mix 酶,南京诺唯赞生物技术有限公司;SC 和 SD/-Ura 培养基,北京酷来搏科技有限公司;半乳糖,昆明硕阳科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 目的基因生物信息学分析

目标基因 *PnTIP1;3* 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 全长序列通过 NCBI ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线工具获取。目标基因 *PnTIP1;3* 所编码蛋白的亲疏水性、氨基酸个数、蛋白相对分子量、等电点、不稳定指数和脂肪指数等理化性质的预测通过 ExPASy (<https://www.expasy.org/>) 在线工具包完成;跨膜结构域预测通过 TMHMM 2.0 在线网站 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 完成。亚细胞定位则使用在线网站 <https://psort.hgc.jp/> 进行预测。磷酸化位点分析通过 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 在线网站上完成。同源性氨基酸序列比对通过 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo?stype=protein>) 完成,并使用 Jalview 2.11 软件对结果进行可视化美化。系统发育树使用 MEGA 11 软件邻位相接法,重复 1 000 次计算引导值构建,并通过 iTOL (<https://itol.embl.de/help.cgi>) 在线软件进行美化。保守基序分析采用 MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>),蛋白结构域分析则利用 NCBI CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 完成,两者的可视化均通过 TBtools-II 软件实现。基于转录组数据库和 NCBI 获取目的基因及其同源基因启动子序列(起始密码子上游 2 000 bp 处),利用 PlantCARE 数据库 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对其顺式作用元件进行预测,并通过 TBtools-II 软件进行可视化分析。

### 2.2 目的基因的克隆

采用 Trizol 法提取三七根样总 RNA,并以此为模板反转录组成 cDNA,具体参考宝日医生物技术

有限公司反转录试剂盒(6120A)说明书。

目的基因 *PnTIP1;3* 的全长引物序列分别为 *PnTIP1;3\_F* 5'-ATGCCGAGAATTGCTGTC-3' 和 *PnTIP1;3\_R* 5'-TTAGTAATCCGTAATTGG-3', 由北京擎科生物科技有限公司合成。扩增体系为: PrimeSTAR Max Premix (2×) 12.5 μL、正、反引物各 1 μL、cDNA 1 μL、加 ddH<sub>2</sub>O 补至 25 μL。PCR 扩增程序为: 变性 98 °C、10 s; 退火 58 °C、15 s; 延伸 72 °C、1 min; 35 循环。将琼脂糖凝胶电泳检测合格的 PCR 产物进行回收, 使用 Hieff Clone®Zero TOPO-TA Cloning Kit 零背景 TOPO-TA 克隆试剂盒进行连接反应, 并将连接产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。转化完成后, 挑取阳性克隆送至北京擎科生物科技有限公司进行测序验证。

### 2.3 转化子 *TPnTIP1;3* 的制备

重组质粒的构建和转化子的制备参考曹冠华等<sup>[17]</sup>所述方法进行。根据目标基因和表达载体质粒 pYES2 位点信息, 设计并合成引入 EcoRI 和 XbaI 酶切位点的引物, 分别为 *PnTIP1;3\_F*: 5'-GCGA-ATTCATGCCGAGAATTGCTGCT-3' 和 *PnTIP1;3\_R*: 5'-CGTCTAGATTAGTAATCCGTAATTGG-3'; 使用含有 EcoRI 和 XbaI 酶切位点的引物进行 PCR 扩增, 并利用这 2 种限制性内切酶对目的基因 *PnTIP1;3* 和表达载体 pYES2 进行双酶切。酶切产物纯化后, 在 T4 DNA 连接酶作用下以 3:1 的物质的量比(目的片段:载体片段)进行连接, 并将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 中, 从而构建出重组质粒 pYES2\_ *PnTIP1;3*。随后, 使用电激法将该重组质粒转化至尿嘧啶合成缺陷型酵母突变菌株 INVSc1 中, 经测序验证后获得所需转化子 INVSc1::pYES2\_ *PnTIP1;3*, 并将其命名为 *TPnTIP1;3*。同时以转入空载 pYES2 的转化子 INVSc1::pYES2 作为空白对照。

### 2.4 转化子细胞 As 半数效应浓度的测定

取处于对数生长期 ( $A_{600}=1.7$ ) 的转化子菌株 *TPnTIP1;3* 及空载对照菌株 INVSc1::pYES2 菌液各 100 μL, 分别接种至 10 mL 含不同浓度砷酸盐 (0、1、2、4、6、8 mmol/L) 的 SG/-Ura 液体培养基 (含 2% 半乳糖, 作为诱导剂) 中。在培养 24 h 后测定各组菌液  $A_{600}$ 。随后以砷酸盐浓度为横坐标, 相应  $A_{600}$  为纵坐标绘制生物量-As 浓度效应曲线, 并基于曲线拟合结果分别计算不同转化子菌株半数效应浓度 (median effect concentration, EC<sub>50</sub>)。

### 2.5 As 胁迫下转化子细胞生长曲线的测定

取处于对数生长期 ( $A_{600}=1.7$ ) 的转化子菌株 *TPnTIP1;3* 及空载对照菌株 INVSc1::pYES2 菌液各 200 μL, 分别接种至 200 mL 含 5 mmol/L 砷酸盐的 SG/-Ura 液体培养基 (2% 半乳糖) 中, 以不含砷酸盐培养基作为培养对照, 每隔 3 h 测定 1 次吸光度 ( $A_{600}$ ) 值, 直至稳定期结束, 绘制转化子酵母生长曲线。通过比较 As 胁迫下 *TPnTIP1;3* 转化子酵母菌株及空载菌株 INVSc1::pYES2 生长曲线特征差异, 解析 As 胁迫下异源表达 *PnTIP1;3* 对酵母生长的影响。

### 2.6 As 胁迫下转化子细胞总 As 及亚细胞组分 As 含量的测定

取处于对数生长期 ( $A_{600}=1.7$ ) 的转化子菌株 *TPnTIP1;3* 及空载对照菌株 INVSc1::pYES2 菌液各 30 mL, 分别接种至 300 mL 含 5 mmol/L 砷酸盐的 SG/-Ura 液体培养基 (2% 半乳糖) 中振荡培养 3 d, 8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体备用。酵母亚细胞组分的分离参照曹冠华等<sup>[17]</sup>和 Zhang 等<sup>[18]</sup>方法进行, 通过差速离心法将其分为细胞壁和非细胞壁组分 (液泡、细胞质)。酵母细胞总 As 含量及亚细胞组分 As 含量的测定采用电感耦合等离子体质谱联用技术 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 进行测定, 拜伦检测 (济南) 中心。

### 2.7 As 胁迫下转化子菌株抗氧化系统的测定

转化子菌株 *TPnTIP1;3* 及空载对照菌株 INVSc1::pYES2 氧化应激物质活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、抗氧化酶超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 及金属络合物质谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 的测定均采用试剂盒法。

### 2.8 数据处理与分析

数据统计处理与标准化通过 WPS Office (12.1.0) 中的 Excel 和 SPSS 27.0 软件完成。当影响因子  $\geq 3$  时, 采用 SPSS 27.0 的单因素方差分析中的 Turkey HSD 检验进行差异显著性分析; 在分析 2 个因子差异时, 则使用独立样本 T 检验。图形绘制借助 Origin 2021 软件完成; 相关性分析及数据可视化则通过 R 语言编程环境 (RStudio) 中的皮尔逊相关系数进行分析和可视化。

## 3 结果与分析

### 3.1 目的基因的筛选及生物信息学分析

#### 3.1.1 基因 *PnTIP1;3* 在三七根转录组中相对表达

量分析 基于三七须根转录组数据库, 筛选获得一条响应 As 胁迫而显著上调表达的 *TIP* 基因。与无 As 处理 (-As) 相比, 目的基因在 As 胁迫 (+As) 下显著上调, 上调倍数为 1.3 倍 (图 1), 故选取其为目的基因进行深入研究, 记为 *PnTIP1;3*。

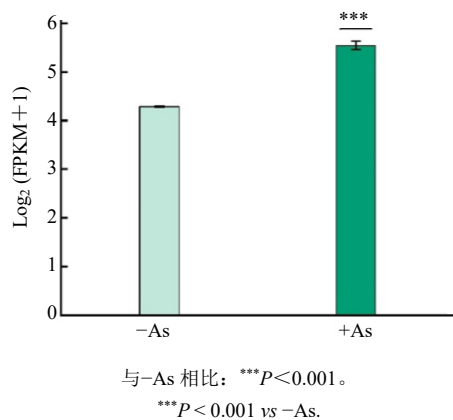


图 1 As 胁迫下三七液泡膜内在蛋白基因 *PnTIP1;3* 相对表达量

Fig. 1 Relative expression of *P. notoginseng* tonoplast intrinsic protein gene *PnTIP1;3* under As stress

**3.1.2 基因 *PnTIP1;3* 的理化性质预测** 基因 *PnTIP1;3* 编码的氨基酸个数、蛋白质理论等电点、相对分子量、跨膜结构域、亲疏水性、亚细胞定位等理化性质进行预测, 结果显示, 基因 *PnTIP1;3* 共编码 250 氨基酸, 相对分子质量为 25 600, 分子式为  $C_{1193}H_{1811}N_{285}O_{324}S_8$ , 含 3 261 个原子, 脂肪指数为 106.67, 疏水性总平均值为 0.910, 不稳定指数 (II) 为 25.49, 为稳定疏水性蛋白。理论等电点 (pI) = 5.61, 带负电荷残基总数 (天冬氨酸 + 谷氨酸) 为 11, 正电荷残基总数 (精氨酸 + 赖氨酸) 为 7, 该蛋白质整体带负电性, 为酸性蛋白, 在生理环境下易吸引阳离子或正电分子。信号肽预测结果显示, 该基因编码蛋白不含有信号肽结构。跨膜结构域预测结果显示, 该蛋白含有 7 个跨膜结构域, 属于典型的跨膜蛋白。亚细胞预测结果显示, 目标蛋白 *PnTIP1;3* 定位位于液泡膜上。

**3.1.3 磷酸化位点分析** 磷酸化位点是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 在参与植物生长发育、细胞周期、新陈代谢及逆境响应等生命过程中发挥着关键调控作用<sup>[18]</sup>。磷酸化位点预测为深入研究蛋白质磷酸化过程提供了重要的理论依据和筛选手段, 为进一步探究蛋白 *PnTIP1;3* 的生物学功能, 利用 NetPhos 3.1 对蛋白 *PnTIP1;3* 进行磷酸化位点预测

(图 2), 结果显示蛋白 *PnTIP1;3* 含有 16 个磷酸化位点, 其中丝氨酸 12 个, 苏氨酸 4 个, 未发现酪氨酸位点。这些位点可被 7 种蛋白激酶磷酸化激活, 分别为钙和磷脂依赖的蛋白激酶 PKC、环磷酸腺苷依赖性蛋白激酶 PKA、细胞周期依赖性蛋白激酶 cdc2、DNA 依赖性蛋白激酶、酪蛋白激酶 CKI、CKII 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶。酪蛋白激酶 CKI 和 CKII 作为植物中广泛存在且高度保守的 Ser/Thr 类蛋白激酶, 在植物抗病、环境胁迫响应及激素信号转导等过程中发挥关键作用<sup>[19-21]</sup>。

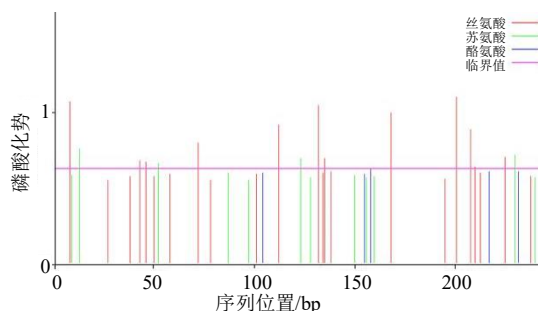


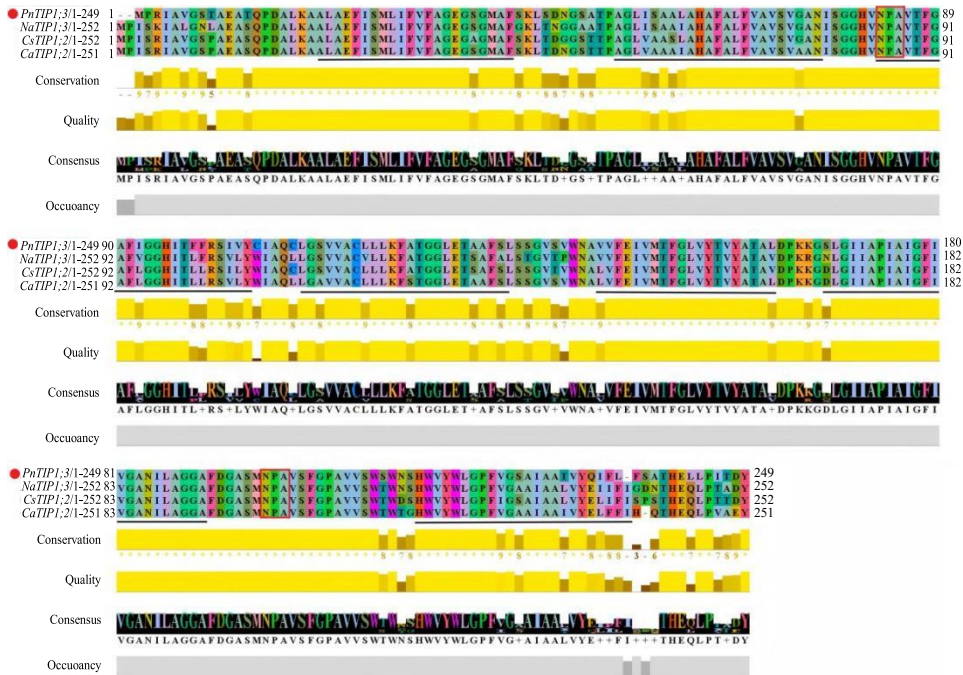
图 2 蛋白 *PnTIP1;3* 磷酸化位点预测分析

Fig. 2 Prediction of phosphorylation sites in *PnTIP1;3* protein

**3.1.4 氨基酸序列同源比对及系统发育树分析** 蛋白 *PnTIP1;3* 氨基酸序列同源比对结果如图 3 所示, 与其一致性较高的其他物种 TIP 蛋白序列分别为来源于茶树 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze CsTIP1;2 (86.9%) 和咖啡树 *Coffea arabica* L. CaTIP1;2 (85.66%), 渐狭叶烟草 *Nicotiana attenuate* Torr. ex S.Watson NaTIP1;3 (84.13%), 且这些氨基酸序列具有高度的保守性, 均含有 2 个“天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸 Asn-Pro-Ala (NPA)”保守基序, 该保守基序是水通道蛋白 AQP 家族的典型保守结构域<sup>[22]</sup>。

将目的基因 *PnTIP1;3* 编码的氨基酸序列与其他物种分类和功能相对明确的 MIP 超家族 (包括 TIP、SIP、PIP、XIP 和 NIP 家族) 氨基酸序列进行比对, 构建系统进化树。系统发育树结果显示 (图 4), TIP 家族包含相互独立的 TIP1、TIP2、TIP3、TIP4 和 TIP5 5 个亚族, 目的蛋白 *PnTIP1;3* 与索斯诺夫斯基独活草 *Heracleum sosnowskyi* Manden. HsTIP1;2 较为接近, 聚为一支, 为 TIP 家族中的 TIP1 亚族。

**3.1.5 保守基序与蛋白质结构域分析** 为更好地了解蛋白 *PnTIP1;3* 结构和进化, 利用 MEME 在线软件



红框为“天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸 (NPA)”保守基序；黑色下划线为跨膜结构域。

The red box indicates the conserved “asparagine-proline-alanine (NPA)” motif; black underlining indicates transmembrane domains.

图3 蛋白 PnTIP1;3 氨基酸序列与其他物种 TIP 氨基酸同源性比对结果

Fig. 3 Homology comparison of amino acid sequence of PnTIP1;3 with TIP amino acids from different species

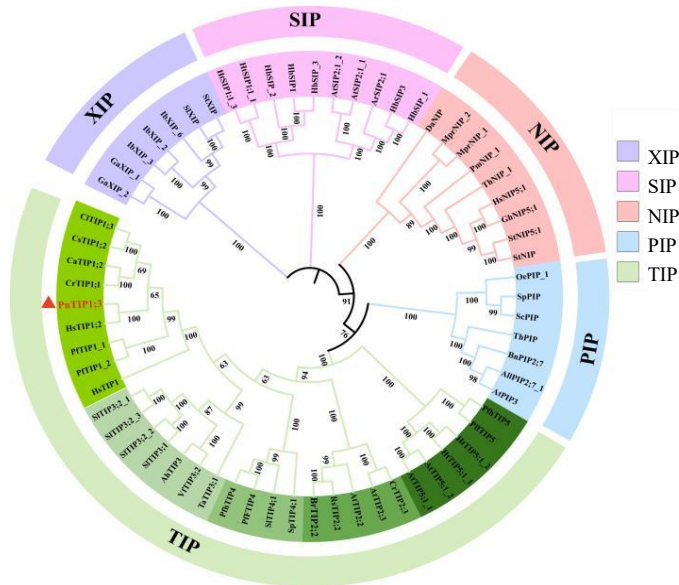


图4 蛋白 PnTIP1;3 氨基酸序列与其他物种 MIP 超家族成员系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of PnTIP1;3 amino acid sequence with members of MIP superfamily from other species

及 TBtools 对靶标蛋白及其他物种 TIP 蛋白进行了保守基序预测分析, 结果如图 5 所示, 共鉴定出 6 个基序, 命名为 Motif 1~Motif 6 (图 5-a), 其中 Motif 2 是含 NPA 的保守基序, Motif 1、Motif 3、Motif 4、Motif 5 和 Motif 6 则为含有 Ar/R 过滤器的保守基序,

均为 TIP 家族的高度保守基序。此外, 基于 NCBI-CDD 数据库, 对靶标蛋白 PnTIP1;3 和同源基因编码蛋白的保守结构域进行了分析, 结果显示 (图 5-b) 所有供分析蛋白均具有 PLN00027 和 MIP 保守结构域, 再次确认靶标蛋白 PnTIP1;3 为水通道蛋白。

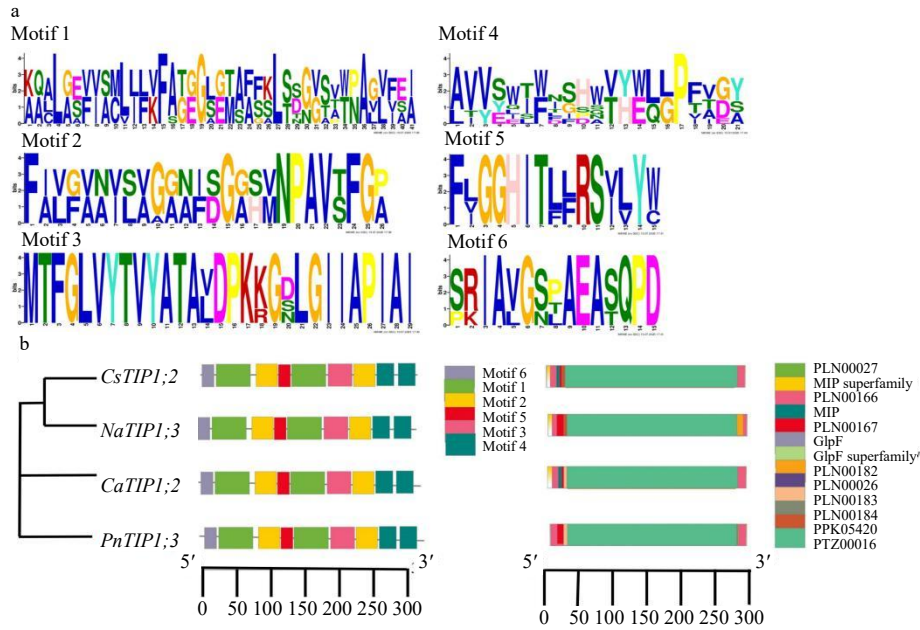


图 5 目的蛋白 PnTIP1;3 与其他物种同源 TIP 蛋白保守基序 (a)、蛋白质结构域 (b) 分析

Fig. 5 Analysis of conserved motifs (a) and protein domains (b) in target protein PnTIP1;3 and its homologous TIP proteins from other species

3.1.6 基因 *PnTIP1;3* 启动子区顺式作用元件分析  
 为更深入了解 *PnTIP1;3* 潜在生物学功能，利用 PlantCARE 和 TBtools-II 对 *PnTIP1;3* 基因上游启动子顺式作用元件进行预测及可视化分析。由图 6 可知，目标基因 *PnTIP1;3* 及其他物种 TIP1 亚族基因

上游启动子均含有丰富的顺式作用元件，但有所差异。*PnTIP1;3* 启动子主要包含植物激素响应元件：赤霉素响应元件 (gibberellin response element, P-box)、脱落酸响应元件 (cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness, ABRE)；胁迫应

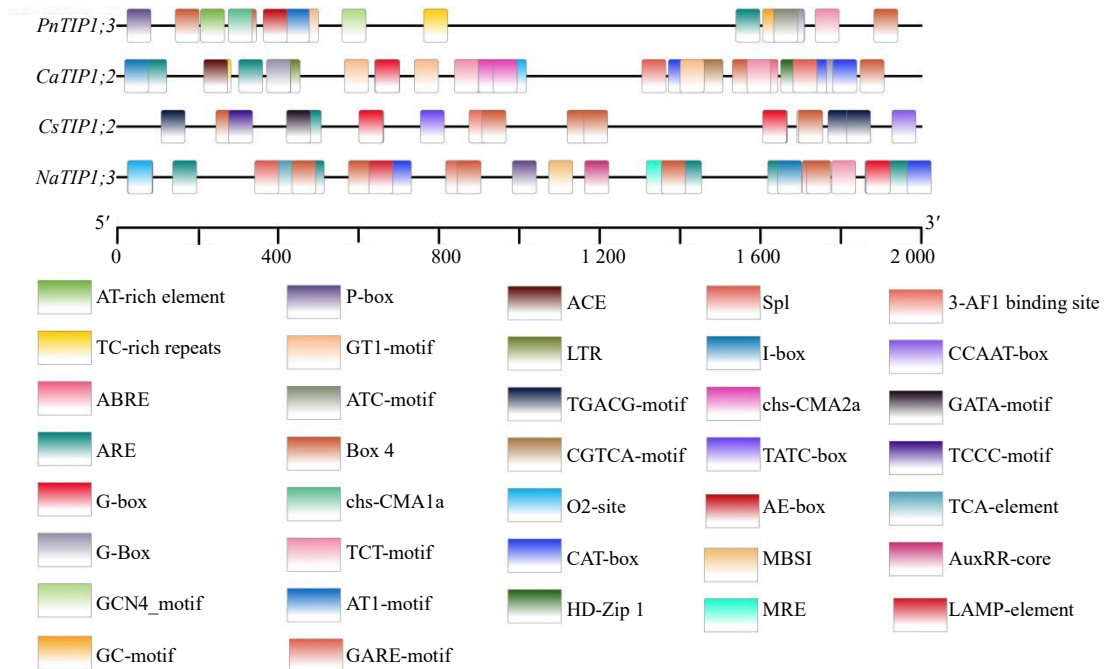


图 6 *PnTIP1;3* 及同源基因启动子顺式作用元件预测分析

Fig. 6 Prediction analysis of cis-acting elements in promoters of *PnTIP1;3* and its homologous genes

激与防御响应元件: AT-富集 DNA 结合蛋白(ATBP-1)的结合位点(binding site of AT-rich DNA binding protein ATBP-1, AT-rich element)、防御胁迫响应顺式作用元件(cis-acting element involved in defense and stress responsiveness, TC-rich repeats); 低氧胁迫响应元件: 厌氧诱导必需顺式作用调控元件(cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction, ARE)、缺氧特异性诱导增强子元件(enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility, GC-motif); 生长发育相关元件: 胚乳表达顺式调控元件(GCN4-motif)以及光响应顺式作用元件(G-box、GT1-motif、ATC-motif、Box 4、chs-CMA1a、TCT-motif、AT1-motif 和 AE-box)。源于渐狭叶烟草的 NaTIP1;3、茶树的 CsTIP1;2、咖啡树的 CaTIP1;2 同源基因启动子顺式作用元件主要包括: 响应植物激素元件, 如水杨酸响应顺式作用元件(cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness, TCA-element)、脱落酸响应顺式作用元件(cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness, ABRE)、生长素响应顺式作用调控元件(cis-acting regulatory element involved in auxin responsiveness, AuxRR-core), 茉莉酸甲酯响应顺式作用调控元件(cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness, TGACG/CGTCA-motif); 以及玉米醇溶蛋白代谢调控顺式作用调控元件(cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation, O2-site)、与分生组织表达相关顺式作用调控元件(cis-acting regulatory element related to meristem expression, CAT-box)、MYB 结合位点, 参与类黄酮生物合成(MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation, MBSI)、MYB 结合位点, 参与光响应性(MYB binding site involved in light responsiveness, MRE)。综合来看, *PnTIP1;3* 及其他物种同源基因上游启动子均含有激素、胁迫响应等顺式作用元件, 推测其编码蛋白具有参与调控植物生长、胁迫等多种生物功能的潜力。

### 3.2 目的基因 *PnTIP1;3* PCR 扩增、重组质粒构建及转化子筛选

经 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测和碱基测序, 确证成功克隆获得 *PnTIP1;3* ORF 全长序列, 与转录组提供的碱基序列一致, 长度为 750 bp, 如图 7-a 所示。

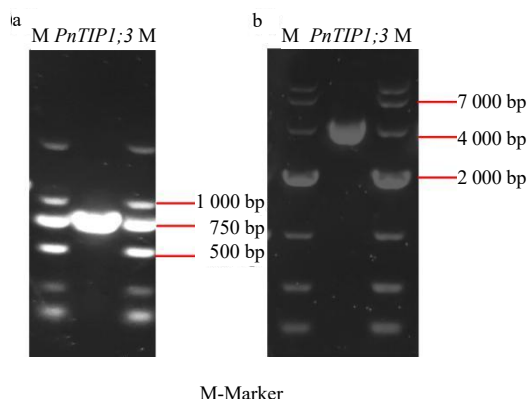


图 7 *PnTIP1;3* PCR 扩增产物 (a) 及重组表达载体质粒 (b) 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of *PnTIP1;3* PCR amplification product (a) and recombinant expression plasmid (b)

为探讨蛋白 *PnTIP1;3* 功能, 将 *PnTIP1;3* 采用双酶切 (*Xba*I 和 *Eco*RI) 法连接至酵母表达载体 pYES2, 获得了重组载体 pYES2-*PnTIP1;3* (图 7-b), 其长度位于 4 000~7 000 bp, 符合要求。采用电激法结合尿嘧啶合成缺陷成功筛选获得转化子酵母, 记为 TPnTIP1;3; 以转入空载 pYES2 的酵母为空白对照, 记为 INVSc1::pYES2。

### 3.3 转化子 TPnTIP1;3 As 的 EC<sub>50</sub> 测定及 As 耐受性分析

采用浓度梯度法测得空载菌株 (INVSc1::pYES2) 和转化子酵母 (TPnTIP1;3) 的生物量-As 浓度效应曲线 (拟合曲线), 并通过回归方程确定了 As 胁迫下各自的 EC<sub>50</sub> 值。结果如图 8 所示, 随着 As 浓度的增加, INVSc1::pYES2 和 TPnTIP1;3 的

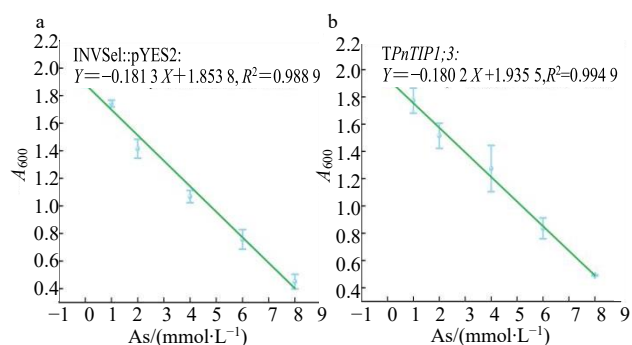


图 8 As 胁迫下 INVSc1::pYES2 (a) 和 *TPnTIP1;3* (b) As 浓度-生物量关系拟合曲线及回归方程

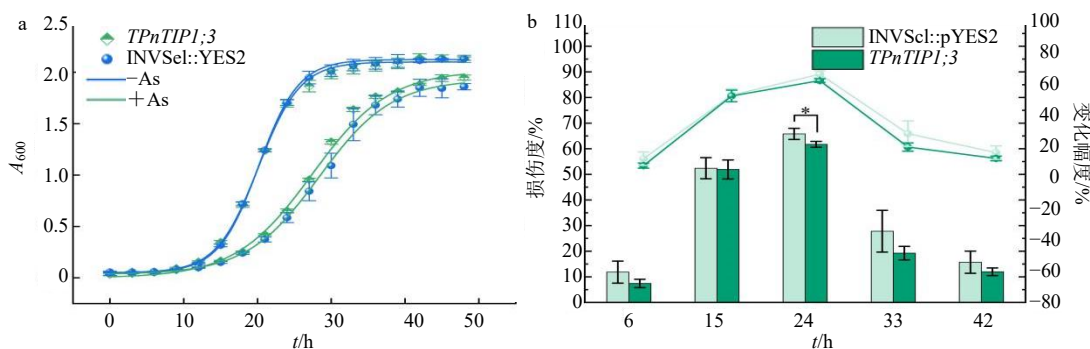
Fig. 8 Fitting curves and regression equations for As concentration-biomass relationship of INVSc1::pYES2 (a) and *TPnTIP1;3* (b) under As stress

$A_{600}$  值逐渐减小, 其对应的回归方程分别为  $Y = -0.1813X + 1.8538$ ,  $R^2 = 0.9889$ ;  $Y = -0.1802X + 1.9355$ ,  $R^2 = 0.9949$ , 并由此算得 INVSc1::pYES2 和 TPnTIP1;3 的  $EC_{50}$  值分别为 5.03 mmol/L 和 5.36 mmol/L。由此可知, TPnTIP1;3 As 耐性略高于 INVSc1::pYES2, PnTIP1;3 的表达在一定程度上增强了酵母细胞在 As 胁迫环境下的生存能力。

以 5 mmol/L 砷酸盐 (+As) 与无 As (-As) 处理为因子, 分别测得转化子 TPnTIP1;3 和 INVSc1::pYES2 0~48 h 内的生长曲线, 由图 9-a 可知, 在无 As 条件下, 转化子酵母 TPnTIP1;3 和空载菌株 INVSc1::pYES2 生长趋势基本一致, 迟缓期、对数期和稳定期均较为相似。在砷酸盐胁迫下, 2 种菌株的生长均受到明显的抑制, 但空载菌株

INVSc1::pYES2 表现出更为严重的适应性损伤, 其迟缓期、对数期及稳定期起始时间进一步延迟。由图 9-b 可知, 在不同时间点下, 转化子酵母 TPnTIP1;3 损伤度 [损伤度 = (对照组  $A_{600}$  - 处理组  $A_{600}$ ) / 对照组  $A_{600}$ ] 均低于空载菌株 INVSc1::pYES2; 在 24 h 时, 二者损伤度达到峰值, 分别为 61.7% 和 65.8% ( $P < 0.05$ ), 之后逐渐下降。

总体来说, 在 As 胁迫条件下, 转化子酵母 TPnTIP1;3 和空载菌株 INVSc1::pYES2 均具有一定的 As 耐性, 且前者强于后者。As 的添加对二者生长均造成一定的损伤, 使其生长滞后, 但对空载菌株 INVSc1::pYES2 的损伤度和生长抑制作用更为明显, 推测异源表达 PnTIP1;3 可以降低 As 对酵母细胞生命物质合成及生长的影响。



不同处理组之间相比, \* $P < 0.05$ 。  
Comparison among different treatment groups \* $P < 0.05$ .

图9 有As或无As胁迫下转化子酵母TPnTIP1;3和空载菌株INVSc1::pYES2生长曲线(a)及As对酵母细胞生长损伤度分析(b)  
Fig. 9 Growth curves (a) and analysis of degree of growth damage to yeast cells by As (b) of transgenic yeast strain TPnTIP1;3 and empty vector strain INVSc1::pYES2, in presence or absence of As stress

### 3.4 转化子 TPnTIP1;3 As 积累特征分析

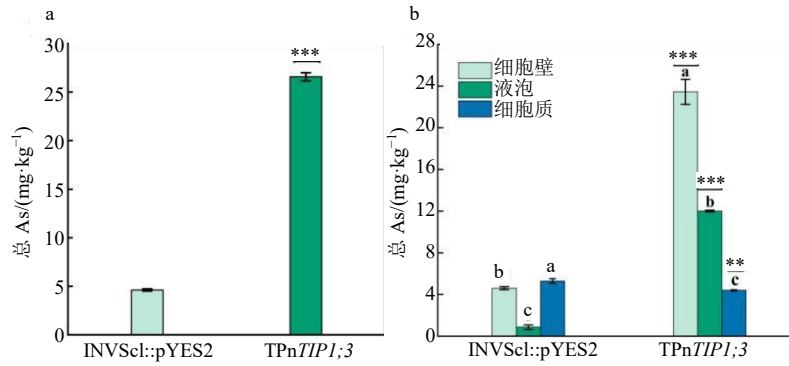
为解析目的基因 PnTIP1;3 编码蛋白在酵母 As 积累和区隔化分布中的功能, 本研究测定了 TPnTIP1;3 和 INVSc1::pYES2 总 As 及亚细胞组分 (细胞壁、液泡、细胞质) As 含量。由图 10-a 可知, TPnTIP1;3 总 As 含量显著高于空载菌株 INVSc1::pYES2 ( $P < 0.001$ ), 说明异源表达 TPnTIP1;3 大幅增强了酵母对 As 的吸收或滞留能力。亚细胞组分 As 含量结果显示 (图 10-b), As 在酵母亚细胞组分中的分布存在着明显的区室化差异。空载菌株 INVSc1::pYES2 中 As 主要富集于细胞壁和细胞质中, 二者 As 累积量分别是液泡 As 含量的 5.36 倍和 6.15 倍。相比之下, 转化子酵母 TPnTIP1;3 的 As 分布模式发生显著改变, 主要蓄积区为细胞壁和液泡, 二者 As 累积量分别为细胞质

As 含量的 5.87 倍和 2.73 倍。此外, 与空载菌株 INVSc1::pYES2 相比, 转化子酵母 TPnTIP1;3 液泡中 As 含量极显著提高了 13.97 倍 ( $P < 0.001$ ), 而细胞质 As 含量则显著降低了 16.82% ( $P < 0.01$ )。

综合来看, 异源表达 PnTIP1;3 可以显著提高转化子细胞总 As 含量, 并改变亚细胞组分中的分布。结合亚细胞定位结果, 说明定位于液泡膜的 PnTIP1;3 蛋白很可能直接参与了 As 向液泡的主动转运和区隔化过程, 从而导致细胞质中的 As 含量降低, 液泡中 As 含量升高, 进而增强酵母细胞的 As 耐受性。

### 3.5 As 胁迫对转化子 TPnTIP1;3 抗氧化系统的影响

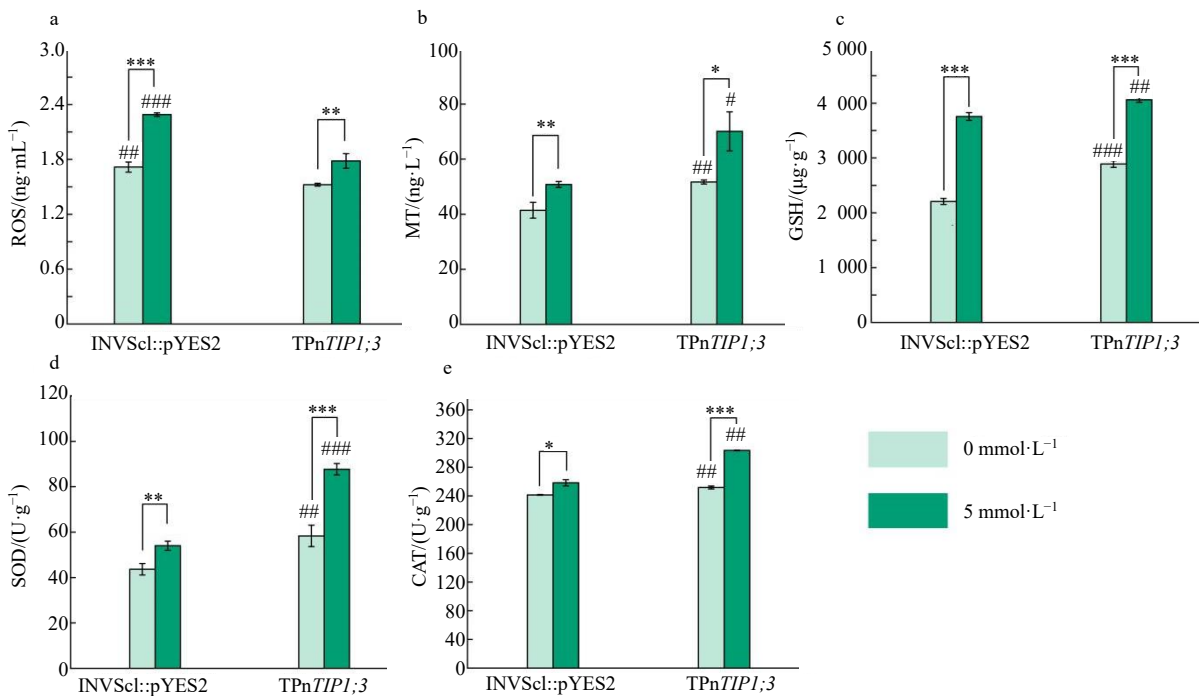
由图 11 可知, 与无 As 处理组相比, As 胁迫会显著提升转化子 TPnTIP1;3、INVSc1::pYES2 抗



不同处理组之间相比, \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 不同的小写字母表示同一类型酵母菌株中不同亚细胞组分 As 浓度之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。 Comparison among different treatment groups \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) in As concentrations among different subcellular fractions of the same type of yeast strain.

图 10 异源表达 *PnTIP1;3* 对酵母总 As 含量 (a) 及其在亚细胞分布 (b) 的影响

Fig. 10 Effect of heterologous expression of *PnTIP1;3* on total As content (a) and subcellular distribution (b) in yeast



不同处理组之间比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 相同处理组之间比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ , 下图同。

Comparison among differences between treatment groups: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; same treatment group: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ , same as below.

图 11 As 胁迫对转化子酵母 *TPnTIP1;3*、*INVSc1::pYES2* ROS (a)、MT (b)、GSH (c) 浓度及 SOD (d)、CAT (e) 酶活性的影响

Fig. 11 Effects of As stress on transgenic yeast strain *TPnTIP1;3* and *INVSc1::pYES2* ROS concentration (a), MT content (b), GSH level (c), SOD activity (d), and CAT activity (e)

氧化酶 SOD、CAT 活性, 氧化应激物质 ROS 浓度及 As 螯合蛋白 GSH、MT 浓度 ( $P < 0.05$ ), 表明 As 胁迫会强化酵母自身的抗氧化系统, 以抵御 As 的氧化损伤。在 As 胁迫处理下, 转化子 *TPnTIP1;3* 与 *INVSc1::pYES2* 抗氧化系统之间呈现明显的差异。空载菌株 *INVSc1::pYES2* ROS 浓度极显著高于

转化子 *TPnTIP1;3* ( $P < 0.001$ ), 说明其细胞内氧化应激状态更为严重。与 *INVSc1::pYES2* 相比, 转化子 *TPnTIP1;3* 表现出更强的抗氧化防御能力, 其 As 螯合蛋白 MT 和 GSH 浓度分别显著提高 1.38 倍 ( $P < 0.05$ ) 和 1.08 倍 ( $P < 0.01$ ), SOD、CAT 活性分别显著提高了 1.62 倍 ( $P < 0.001$ ) 和 1.14 倍 ( $P < 0.01$ )。

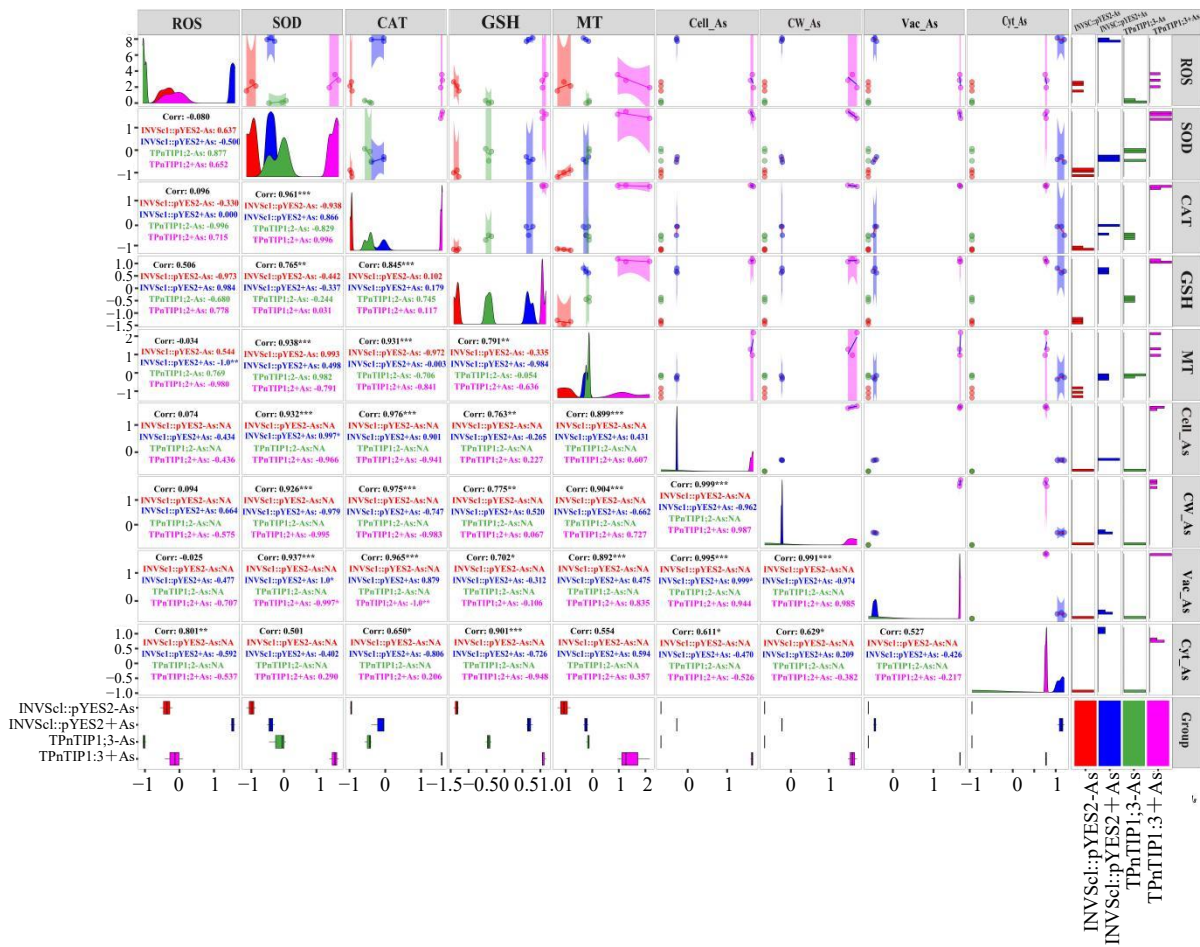
综上, *PnTIP1;3* 的过表达不仅增强了酵母对 As 的积累, 还可能间接诱导宿主细胞合成更多的 MT 和 GSH, 以络合经由蛋白 *PnTIP1;3* 吸收来的“多余”的 As。同时, 该基因过表达还可能间接通过增强 SOD 和 CAT 活性来提升了 ROS 的清除能力, 以抑制脂质过氧化和蛋白质氧化等氧化损伤进程, 从而增强酵母细胞在胁迫环境中的 As 耐性。

### 3.6 氧化应激响应指标与 As 浓度相关性分析

为建立由 *PnTIP1;3* 介导的酵母细胞 As 积累与氧化应激响应之间的关系, 本研究利用 RStudio 软件对转化子 *TPnTIP1;3*、*INVSc1::pYES2* 氧化应激响应指标 (ROS、SOD、CAT、MT、GSH)、总 As 含量及亚细胞组分 As 含量之间的关联进行了皮尔逊相关性和可视化分析。由图 12 可知, 相关性分析结果显示, 2 种转化子在 As 胁迫下具有不同的响应模式。转化子 *TPnTIP1;3* 抗氧化酶 SOD 和 CAT 活

性与液泡 As 含量呈现出极显著负相关关系 (相关系数分别为  $-0.997$ 、 $P < 0.05$ 、 $-1.000$ 、 $P < 0.001$ ), 表明该基因过表达可能将 As 高效地区隔化于液泡中, 从而极大地缓解了 As 对细胞质造成的氧化胁迫。与之形成鲜明对比的是, 转化子 *INVSc1::pYES2* 呈现出完全相反的趋势, 其抗氧化酶 SOD 与酵母总 As 含量和液泡 As 含量呈显著正相关关系 (相关系数分别为  $0.997$ 、 $P < 0.05$ 、 $1.0$ 、 $P < 0.05$ ), 且酵母总 As 含量与液泡 As 含量之间也呈显著正相关 (相关系数  $0.999$ 、 $P < 0.05$ ), 这一系列正相关表明, 对照组 *INVSc1::pYES2* 酵母细胞缺乏主动的 As 区隔化能力, 液泡中的 As 积累仅可能是被动地反映了外界胁迫的强度; As 在细胞质中大量累积引发了严重的氧化应激, 迫使酵母细胞上调 SOD 等抗氧化酶的表达以维持酵母细胞氧化应激稳态, 但其解毒效果远不如转化子 *TPnTIP1;3* 菌株。

此外, 转化子 *TPnTIP1;3* MT 与液泡 As 含量



Cell\_As 表示酵母细胞总 As 含量, CW\_As 表示细胞壁 As 含量, Vac\_As 表示液泡 As 含量, Cyt\_As 表示细胞质 As 含量。

Cell\_As, cellular total As content; CW\_As, cell wall As content; Vac\_As, vacuolar As content; Cyt\_As, cytoplasmic As content.

图 12 氧化应激物质与总 As 及亚细胞 As 含量相关性分析

Fig. 12 Correlation analysis of oxidative stress markers with total As and subcellular As distribution

呈现强正相关(相关系数为 0.835,  $P > 0.05$ ), 同时 GSH 与细胞质 As 含量呈极强负相关(相关系数为 -0.984,  $P > 0.05$ ), 而 ROS 与亚细胞各组分 As 含量均呈负相关, 表明 *TPnTIP1;3* 可能协同 MT 和 GSH 促使 As 在液泡中富集, 同时降低细胞质中的 As 毒性, 进而整体缓解氧化应激。相比之下, 空载菌株 INVSc1::pYES2 MT 与细胞壁 As 含量呈负相关(相关系数为 -0.662,  $P > 0.05$ ), 且 ROS 与细胞壁 As 含量呈正相关(相关系数为 0.664,  $P > 0.05$ ), 显示其 As 固定能力不足且可能引发 2 次氧化应激, 最终导致抗氧化系统解毒能力降低。

由上可知, 转化子 *TPnTIP1;3* 氧化应激响应指标(SOD、CAT)与亚细胞组分 As 含量存在负相关性, 确证异源表达 *PnTIP1;3* 可改变亚细胞组分分布, 将 As 更多的贮存于液泡中, 有效降低 As 带来的毒性效应。同时, 该转化子可能间接调控抗氧化系统以增强酵母细胞的整体防御能力, 最终缓解因 As 吸收增加而带来的氧化损伤。

#### 4 讨论

As 是土壤中存在的一种类金属有毒物质, 严重威胁动植物的生长发育<sup>[23]</sup>。研究表明, As 污染会显著抑制三七的生长及光合作用, 导致其地下部分 As 累积量增加<sup>[24]</sup>。为应对 As 的胁迫, 三七通过多种生理机制减轻毒害, 如细胞壁固定、区室化分隔、抗氧化系统激活以及上调磷酸盐转运蛋白表达等<sup>[25-26]</sup>。值得注意的是, 由 TIPs 介导的液泡区室化作用也被认为是植物降低重金属胁迫毒性的重要途径之一, 在植物抵御重金属胁迫中发挥着关键作用<sup>[27]</sup>。

课题组对三七根转录组数据库分析发现, 水通道蛋白基因 *PnTIP1;3* 可以响应 As 胁迫而显著上调表达, 故以此为靶基因, 对其 As 吸收和区隔机制进行研究探讨。首先对基因 *PnTIP1;3* 进行系统生物信息学分析, 结果显示, 该基因编码的蛋白含有两个典型的保守结构域 NPA 和 7 个跨膜结构域, 并且定位于液泡膜上。这一结果与来自大豆 *GmTIP2*<sup>[28]</sup>、桉树的 *EgTIP2*<sup>[29]</sup> 基因及编码蛋白生信分析基本一致, 均为定位于液泡膜的 TIP 家族基因。对 *PnTIP1;3* 启动子区域的分析发现, 该启动子区域包含多种胁迫响应及植物激素相关的顺式作用元件, 如 AT-rich element、TC-rich repeats、ABRE 和 P-box。该预测结果与 Kurowska<sup>[30]</sup> 等和 Hussain 等<sup>[12]</sup> 分别在大麦 *HvTIP* 基因和鹰嘴豆 *CaTIP* 基因启动子研究

中的报道一致。陈静等<sup>[31]</sup> 研究发现, 施加外源脱落酸(abscisic acid, ABA)可降低甘蓝型油菜中 Cd 的积累。熊明彪等<sup>[32]</sup> 也报道外源赤霉素能减少油菜对铅(plumbum, Pb)和 Cd 的吸收。因此, 推测脱落酸响应元件 ABRE 和赤霉素响应元件 P-box 可能作为上游信号分子, 通过调控基因 *PnTIP1;3* 的表达参与降低三七 As 的积累。

为解析基因 *PnTIP1;3* 对 As 吸收与分布的影响, 本研究构建了酵母异源表达系统, 开展了系列实验, 结果显示异源表达 *PnTIP1;3* 能够增强酵母对 As 的吸收和积累, 并改变其亚细胞分布, 由对照组(INVSc1::pYES2)的“细胞质>细胞壁>液泡”趋势, 转变为: 细胞壁>液泡>细胞质, 表明蛋白 *PnTIP1;3* 会强化 As 向液泡的主动转运和区隔化过程, 从而导致细胞质中的 As 含量降低, 液泡中 As 含量升高, 进而增强酵母细胞的 As 耐受性。这与 Karle 等<sup>[33]</sup> 在水稻中的研究一致, 其发现过表达 *OsTIP1;2* 也能增加酵母液泡中 As 含量, 并改变亚细胞分布。此外, Wang 等<sup>[34]</sup> 发现, 拟南芥 *AtTIP2;2* 可将 Zn 固定在根细胞液泡中, 而非以细胞壁为主要存储部位。这些结果表明 TIP 家族基因在宿主 As、Zn 等重金属的吸收、转运和亚细胞分布发挥着重要作用。

与 INVSc1::pYES2 相比, *PnTIP1;3* 的过表达显著增强了转化子 *TPnTIP1;3* 细胞对 As 的耐受性, 该生理效应与 As 的积累、分布及宿主抗氧化防御系统的激活密切相关。本实验发现, 异源表达 *PnTIP1;3* 使酵母细胞壁 As 含量和与液泡 As 含量显著增加, 而细胞质中 As 含量则明显降低, 该趋势与水稻 *OsTIP2;1* 突变株中 A 的细胞壁固定及液泡转运、区隔结果相类似<sup>[35]</sup>。这暗示了定位于液泡膜的 *PnTIP1;3* 蛋白可能直接或间接参与 As 从细胞质向液泡转运和区隔的过程, 从而降低重金属对酵母细胞的氧化损伤。对转化子细胞抗氧化酶活性的检测发现, 转化子 *TPnTIP1;3* 的 SOD 和 CAT 活性显著增强, ROS 水平则显著降低。这一发现与 Sun 等<sup>[36]</sup> 的研究相符, 在拟南芥中过表达竹子液泡膜蛋白基因 *PeTIP4;1\_1* 同样能显著提升 SOD、CAT 等抗氧化酶的活性。两者共同表明, TIP 家族蛋白的过表达可能通过激活宿主的酶促抗氧化防御系统, 从而有效缓解其氧化损伤。在研究中, 进一步对比分析了转化子 *TPnTIP1;3*、INVSc1::pYES2 细胞中非酶抗氧化剂金属络合蛋白 MT 和 GSH 含量, 结

果显示, 转化子 *TPnTIP1;3* 细胞中的 MT 和 GSH 含量显著高于对照组。MT 和 GSH 是公认的重要解毒物质, 而 GSH 不仅是 MT 合成的硫供体, 其本身也能直接与 As 络合<sup>[37]</sup>。推测 *TPnTIP1;3* 可能通过调控细胞内硫代谢稳态, 增强 GSH 的合成能力, 促进 MT 的生成以强化 As 的螯合。这一机制与多种植物在重金属胁迫下激活硫代谢途径并积累含硫配体的响应模式相一致<sup>[38]</sup>。而相关性分析显示, 转化子 *TPnTIP1;3* MT 与液泡 As 含量呈强正相关, GSH 则与细胞质 As 含量呈负相关, 推测 GSH 和 MT 可能协同参与了液泡区隔化过程。该现象与 Pang 等<sup>[39]</sup>的研究相似, 拟南芥液泡膜水通道蛋白 AtTIP5;1 通过将硼区隔化至液泡中, 有效降低了其在细胞质中的浓度, 从而增强了植物的耐受性。

综上所述, 本研究从三七中克隆并鉴定出一条 As 耐性相关液泡膜内在蛋白基因 *PnTIP1;3*。生物信息学分析显示, 其编码蛋白具有典型的 TIP 家族特征, 且启动子区富含多种与非生物胁迫及激素响应相关的顺式作用元件。酵母异源表达实验证实, *PnTIP1;3* 能显著提高宿主对 As 的耐受性, 其作用机制可能与增强 As 在细胞壁的固定、促进其液泡区隔化以及激活宿主的抗氧化系统密切相关。

## 5 结论

本研究首次从三七根中克隆获得一条液泡膜内在水通道蛋白基因 *PnTIP1;3*, 其编码的蛋白具有典型的 TIP 家族保守结构域; 上游启动子含多重胁迫响应顺式元件。异源表达 *PnTIP1;3* 可以显著增强酵母细胞对 As 的吸收积累, 并可改变 As 亚细胞分布, 增加液泡 As 浓度, 表明定位于液泡膜的 *PnTIP1;3* 蛋白可能直接参与了 As 向液泡的主动转运和区隔化过程。氧化应激物质含量的降低、抗氧化酶活性和金属络合物浓度的升高及其与总 As、液泡 As 浓度的高度负相关结果表明, *PnTIP1;3* 可介导转化子细胞的抗氧化系统, 提高其抗氧化能力, 降低氧化损伤。本研究对明确三七 As 吸收机制, 探索三七 As 耐性基因资源具有一定的参考意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

[1] Ji C, Zhang Q, Shi R, et al. Determination of the authenticity and origin of *Panax notoginseng*: A review [J]. *J Aoac International*, 2022, 105(6): 1708-1718.

[2] 张丹, 冯丽颖, 高立志. 三七生物资源研究与利用进展 [J]. *生物资源*, 2020, 42(1): 61-66.

[3] 吴涵, 何忠俊, 孟溪, 等. 三七-土壤系统重金属分布特征及健康风险评估 [J]. *农业环境科学学报*, 2023, 42(7): 1477-1486.

[4] 陶亮, 包立, 刘源, 等. 云南不同产地三七的重金属吸收累积特征研究 [J]. *中国农学通报*, 2018, 34(34): 74-81.

[5] Garbinski L D, Rosen B P, Chen J. Pathways of arsenic uptake and efflux [J]. *Environ Int*, 2019, 126: 585-597.

[6] Li J J, Yang L, Miao C P, et al. Impact of rhizosphere microorganisms on arsenic (As) transformation and accumulation in a traditional Chinese medical plant [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2021, 28(43): 60923-60934.

[7] 李泽东. 不同磷水平处理对三七砷吸收的影响及调控机制研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2019.

[8] Zeng X C, Jiang Y X, Fan X T, et al. Effects of sulfate application on inhibiting accumulation and alleviating toxicity of arsenic in *Panax notoginseng* grown in arsenic-polluted soil [J]. *Water Air Soil Pollut*, 2016, 227(5): 148.

[9] Deng F L, Liu X, Chen Y S, et al. Aquaporins mediated arsenite transport in plants: Molecular mechanisms and applications in crop improvement [J]. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2020, 50(16): 1613-1639.

[10] Xi Y M, Han B L, Kong F T, et al. Enhancement of arsenic uptake and accumulation in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* through heterologous expression of the phosphate transporter DsPht1 [J]. *J Hazard Mater*, 2023, 459: 132130.

[11] Kumar K, Mosa K A, Meselhy A G, et al. Molecular insights into the plasma membrane intrinsic proteins roles for abiotic stress and metalloids tolerance and transport in plants [J]. *Indian J Plant Physiol*, 2018, 23(4): 721-730.

[12] Hussain A, Tanveer R, Mustafa G, et al. Comparative phylogenetic analysis of aquaporins provides insight into the gene family expansion and evolution in plants and their role in drought tolerant and susceptible chickpea cultivars [J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 263-275.

[13] Salehi M. Epichloe endophyte modifies antioxidative defense and aquaporin genes expression in response to Ni contamination in *Lolium perenne* [J]. *J Plant Process Funct*, 2021, 10(43): 55-63.

[14] Zhang L D, Song L Y, Dai M J, et al. Cadmium promotes the absorption of ammonium in hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. mediated by ammonium transporters and aquaporins [J]. *Chemosphere*, 2022, 307(Pt 3): 136031.

[15] Ariani A, Barozzi F, Sebastiani L, et al. AQUA1 is a mercury sensitive poplar aquaporin regulated at transcriptional and post-translational levels by Zn stress

- [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2019, 135: 588-600.
- [16] He Z Y, Yan H L, Chen Y S, *et al.* An aquaporin PvTIP4;1 from *Pteris vittata* may mediate arsenite uptake [J]. *New Phytol*, 2016, 209(2): 746-761.
- [17] 曹冠华, 张兴开, 柏旭, 等. 三七细胞色素 P450 酶基因 PnCyp450\_3 响应丛枝菌根真菌诱导的表达特性分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(21): 6848-6856.
- [18] Zhang W J, Zhou Y W, Zhang Y, *et al.* Protein phosphorylation: A molecular switch in plant signaling [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(7): 112729.
- [19] 王海波, 吴贞莹, 郭俊云. 小桐子植物特异性酪氨酸激酶 PS-CK1-5 基因的克隆及原核表达分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2024, 32(1): 93-100.
- [20] 冯燕, 吴志会, 曹雨欣, 等. 小麦酪氨酸激酶 TaCK2  $\alpha$  启动子的克隆与启动活性分析 [J]. *河北农业大学学报*, 2025, 48(2): 54-61.
- [21] Zhu J, Wang W S, Yan D W, *et al.* CK2 promotes jasmonic acid signaling response by phosphorylating MYC<sub>2</sub> in *Arabidopsis* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(2): 619-630.
- [22] 贲琳丽. 水稻水通道蛋白 TIP 和 PIP 家族对非生物胁迫的响应及 OsTIP1; 2 的表达特征 [D]. 扬州: 扬州大学, 2024.
- [23] Khan I, Awan S A, Rizwan M, *et al.* Arsenic behavior in soil-plant system and its detoxification mechanisms in plants: A review [J]. *Environ Pollut*, 2021, 286: 117389.
- [24] 柯汉玲, 祖艳群. 三年生三七生长、光合特征及砷含量对土壤砷胁迫的响应 [J]. *云南农业大学学报: 自然科学*, 2016, 31(6): 1065-1072.
- [25] Lu T Q, Wang X N, Cui X L, *et al.* Physiological and metabolomic analyses reveal that Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles ameliorate cadmium and arsenic toxicity in *Panax notoginseng* [J]. *Environ Pollut*, 2023, 337: 122578.
- [26] Cao G H, Bai X, Zhang C R, *et al.* Physiological response and transcriptome profiling reveal phosphate-mediated amelioration of arsenic accumulation and toxicity in *Panax notoginseng* [J]. *Environ Exp Bot*, 2023, 206: 105136.
- [27] Handa N, Gupta P, Khanna K, *et al.* Aquaporin-mediated transport: Insights into metalloids trafficking [J]. *Physiol Plant*, 2022, 174(3): e13687.
- [28] Feng Z J, Liu N, Zhang G W, *et al.* Investigation of the AQP family in soybean and the promoter activity of TIP2;6 in heat stress and hormone responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 262.
- [29] Rodrigues M I, Bravo J P, Sasaki F T, *et al.* The tonoplast intrinsic aquaporin (TIP) subfamily of *Eucalyptus grandis*: Characterization of EgTIP2, a root-specific and osmotic stress-responsive gene [J]. *Plant Sci*, 2013, 213: 106-113.
- [30] Kurowska M M, Wiecha K, Gajek K, *et al.* Drought stress and re-watering affect the abundance of TIP aquaporin transcripts in barley [J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e0226423.
- [31] 陈静, 赵玉全, 黄锡金, 等. 外源脱落酸对甘蓝型油菜镉胁迫的生理响应及基因表达分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2024, 25(12): 2107-2121.
- [32] 熊明彪, 饶逸驰, 王乾鑫, 等. 铅、镉胁迫下蜀葵喷施赤霉素与油菜间作对油菜重金属积累的影响 [J]. *北方园艺*, 2022(17): 17-25.
- [33] Karle S B, Kumar K. Rice tonoplast intrinsic protein member OsTIP1;2 confers tolerance to arsenite stress [J]. *J Hazard Mater*, 2024, 465: 133078.
- [34] Wang Y Q, Kang Y, Yu W C, *et al.* AtTIP2;2 facilitates resistance to zinc toxicity via promoting zinc immobilization in the root and limiting root-to-shoot zinc translocation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 233: 113333.
- [35] Zhang W Y, Yang S H, Feng Y M, *et al.* The tonoplast-localized OsTIP2;1 is involved in aluminum detoxification in rice [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2024, 215: 109063.
- [36] Sun H Y, Li L C, Lou Y F, *et al.* The bamboo aquaporin gene PeTIP4;1-1 confers drought and salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(4): 597-609.
- [37] Wu Z C, Liu S, Zhao J, *et al.* Comparative responses to silicon and selenium in relation to antioxidant enzyme system and the glutathione-ascorbate cycle in flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*) under cadmium stress [J]. *Environ Exp Bot*, 2017, 133: 1-11.
- [38] Kim Y O, Gwon Y, Kim J. Exogenous cysteine improves mercury uptake and tolerance in *Arabidopsis* by regulating the expression of heavy metal chelators and antioxidative enzymes [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 898247.
- [39] Pang Y Q, Li L J, Ren F, *et al.* Overexpression of the tonoplast aquaporin AtTIP5;1 conferred tolerance to boron toxicity in *Arabidopsis* [J]. *J Genet Genomics*, 2010, 37(6): 389-397.

[责任编辑 时圣明]