



# 盐生植物小花碱茅外整流 $K^+$ 通道 *SKOR* 基因片段的克隆及序列分析

王茜, 王沛, 王锁民

(兰州大学草地农业科技学院 草地农业系统国家重点实验室, 甘肃 兰州 730020)

**摘要:**为研究小花碱茅(*Puccinellia tenuiflora*)  $K^+$ / $Na^+$  选择性运输的分子机制, 根据已知的外整流  $K^+$  通道高度保守区设计一对简并性引物, 以小花碱茅根总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法克隆 *SKOR* 基因片段。序列分析结果表明, 该基因片段长度为 555 bp, 编码 185 个氨基酸; 该序列与其他已报道的高等植物 *SKOR* 核苷酸序列的同源性在 66% 以上, 氨基酸序列同源性在 55% 以上。

**关键词:**小花碱茅; *SKOR* 基因;  $K^+$ / $Na^+$  选择性运输; 序列特征; 耐盐性

**中图分类号:** S543+.903; Q943.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-0629(2012)08-1218-06

$Na^+$  是广泛存在于土壤以及土壤溶液中的元素。但是, 不论甜土植物还是盐生植物, 其细胞质酶都对  $Na^+$  有高度的敏感性<sup>[1-3]</sup>。过量的  $Na^+$  会对植物生长产生各种不利影响, 甚至导致植物死亡<sup>[4]</sup>。盐生植物在进化过程中, 形成了特殊的耐盐机制, 对其耐盐机理研究以及耐盐相关功能基因的挖掘在农作物和优良牧草耐盐性的遗传改良方面有十分重要的应用价值。

小花碱茅(*Puccinellia tenuiflora*) 为禾本科碱茅属多年生牧草, 耐盐碱, 能够在高浓度的  $Na^+$  环境下维持体内很低的  $Na^+$  水平<sup>[5-8]</sup>。Wang 等<sup>[9]</sup> 的研究发现, 小花碱茅具有极强的  $K^+$ / $Na^+$  选择性运输能力, 从而能够在盐胁迫下维持地上部稳定的高  $K^+$  含量, 可见, 限制  $Na^+$  内流, 同时提高地上部  $K^+$  的积累, 进而维持植株体内高的  $K^+$ / $Na^+$  是增强植物耐盐性的关键<sup>[10]</sup>。研究表明,  $K^+$  在植物地上部的积累主要是通过将根部吸收的  $K^+$  经木质部装载, 在蒸腾拉力作用下, 随木质部流进入地上部完成的, 外整流  $K^+$  通道在此运输过程中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。

外整流  $K^+$  通道属于 Shaker 通道家族, 目前针对它的研究涉及甚少。Wegner 和 Raschke<sup>[12]</sup> 通过

膜片钳技术在大麦(*Hordeum vulgare*) 根离体的木质部薄壁细胞的原生质体中首次发现了外整流  $K^+$  通道的活性, 将其称为 KORC ( $K^+$ -selective Outwardly Rectifying Conductance)。随后, 在玉米(*Zea mays*) 根皮层及中柱细胞中也检测到了外整流  $K^+$  通道, 并确定其介导  $K^+$  从中柱细胞外排到木质部汁液中<sup>[13-14]</sup>, 这一功能在大麦中也得到了验证<sup>[13]</sup>。Gaymard 等<sup>[11]</sup> 从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 中首次克隆到编码外整流  $K^+$  通道的基因, 并发现其在根中柱组织特异表达, 且能被 ABA 抑制, 将其命名为 *SKOR* (Stelar  $K^+$  Outward Rectifier), 在突变体中的研究也证实了 *SKOR* 的上述功能。由此猜测, 在小花碱茅体内, 外整流  $K^+$  通道 *SKOR* 可能在维持其体内高的  $K^+$ / $Na^+$ , 进而在提高植株耐盐性中发挥重要作用。本研究采用 RT-PCR 方法克隆拒盐型盐生植物小花碱茅 *SKOR* 基因片段并分析其序列特征, 以期小花碱茅 *SKOR* 基因全长的克隆、表达调控、RNAi 等研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料 植物材料为 4 周龄小花碱茅幼

\* 收稿日期: 2011-07-17 接受日期: 2011-08-19

基金项目: 国家自然科学基金(31072073); 教育部博士学科点专项科研基金(20090211110001)

作者简介: 王茜(1984-), 女, 甘肃兰州人, 在读博士生, 主要从事植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail: wangqian2008@lzu.edu.cn

共同第一作者: 王沛(1987-), 男, 甘肃庆阳人, 在读硕士生, 主要从事植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail: wp\_10@lzu.edu.cn

通信作者: 王锁民 E-mail: smwang@lzu.edu.cn

苗,种子采自甘肃省张掖市临泽县。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株为草地农业系统国家重点实验室保存。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 材料培养** 参照王生银等<sup>[15]</sup>的方法。挑选籽粒饱满的小花碱茅种子播种在铺有吸水纸的筛网架上,然后置于白瓷盘中暗培养,25℃,浇蒸馏水发芽,约7 d后浇灌 Hoagland 营养液(5 mmol·L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>,0.5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.25 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,1.5 mmol·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O,0.5 mmol·L<sup>-1</sup> Fe-citrate,92 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,18 μmol·L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O,1.6 μmol·L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.6 μmol·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O,0.7 μmol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O)。营养液约5 d更换一次。培养室昼/夜温度为(28±2)℃/(23±2)℃,光照16 h·d<sup>-1</sup>,光强约为600 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,空气相对湿度为60%~80%。

**1.2.2 总 RNA 的提取** 参照王生银等<sup>[15]</sup>的方法。将4周龄小花碱茅幼苗经25 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl与10 mmol·L<sup>-1</sup> KCl处理48 h,取其根系,加入液氮研磨至粉末状,按照 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒的操作说明书提取根系总 RNA。用1.0%甲醛变性凝胶电泳鉴定其完整性和质量。

**1.2.3 引物的设计与合成** 参照王生银等<sup>[15]</sup>的方法。通过对其他植物 SKOR 核苷酸序列进行同源性比较,找出高度保守的区段,根据同源性高和简并性低的原则,利用 DNAMAN 和 Primer 5.0 软件设计一对简并性引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub>,用于扩增小花碱茅 SKOR 基因片段,推测目的片段的长度为566 bp,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

P<sub>1</sub>:5'-TACCTG(A/G)TCGG(C/G)AACAT-GACGGCG-3';

P<sub>2</sub>:5'-GATGCT(A/G)GTCA(A/G)GGA(C/U)TGCTTGTC-3'。

**1.2.4 RT-PCR 扩增** 参照王生银等<sup>[15]</sup>的方法。PCR 扩增反应体系:在200 μL PCR 管中依次加入10×PCR Buffer 5 μL、25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 3 μL、2 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 5 μL、10 μmol·L<sup>-1</sup> P<sub>1</sub> 1 μL、

10 μmol·L<sup>-1</sup> P<sub>2</sub> 1 μL、5 U·μL<sup>-1</sup> Taq DNA polymerase 0.5 μL、cDNA 4 μL,加纯水至50 μL。反应条件:94℃预变性2 min;94℃变性30 s、56℃退火50 s、72℃延伸60 s,30个循环;最后72℃延伸10 min。PCR 扩增产物用1.2%琼脂糖凝胶检测,目的片段的回收和纯化按照 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒操作说明进行。

**1.2.5 阳性克隆的筛选与鉴定** 参照王生银等<sup>[15]</sup>的方法。将回收的 PCR 产物连接到 pUCm-T 载体,转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,用含有50 μg·mL<sup>-1</sup>氨苄青霉素的 LB 固体培养基进行蓝白斑筛选,转化白斑菌株经质粒 PCR 鉴定确认阳性克隆后,送至北京华大基因科技股份有限公司测序。

**1.2.6 序列分析** 参照王生银等<sup>[15]</sup>的方法。序列的比较、翻译等在 DNAMAN 生物软件上进行,Blast 搜索在 NCBI (www. ncbi. nlm. nih. gov/BLAST)网站上进行。

## 2 结果

**2.1 RT-PCR 扩增** 以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板,用 SKOR 基因的简并性引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 进行 PCR 扩增(图1)。扩增产物经凝胶电泳检测发现约在560 bp处有一条亮带,且上下无杂带,与目的片段的大小一致,推测可能是小花碱茅 SKOR 基因片段。

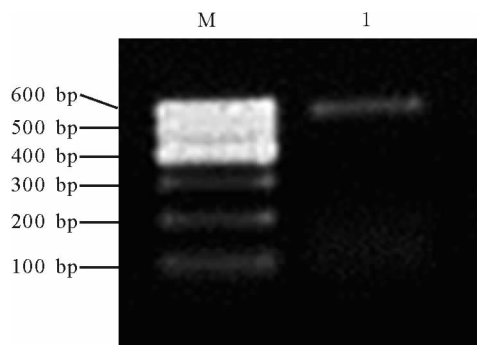


图1 RT-PCR 产物凝胶电泳图

**Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products**  
注:M,DNA marker;1,SKOR 基因片段 RT-PCR 产物。  
Note:M,DNA marker;1,RT-PCR product of SKOR gene fragment.

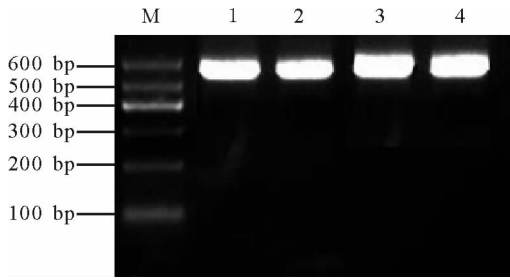


图2 阳性克隆的PCR鉴定

Fig. 2 PCR identification of positive clones

注: M, DNA marker; 1, 2, 3, 4, 阳性克隆。

Note: M, DNA marker; 1, 2, 3, 4, positive clones.

**2.2 阳性克隆的鉴定** 将回收纯化的目的片段连接到 pUCm-T 克隆载体上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。从转化的平板上随机挑取4个白色菌斑并

提取质粒, 进行 PCR 扩增, 得到的扩增片段大小约为 560 bp(图 2), 与 RT-PCR 结果一致, 表明这些克隆为阳性克隆。

**2.3 SKOR 基因片段序列分析** 测序结果显示, 该阳性克隆序列长度为 555 bp, 推测其编码 185 个氨基酸(图 3)。Blast 比较结果表明, 该片段与玉米 (AY899 922. 1)、拟南芥 (NM\_111 153. 3)、葡萄 (*Vitis vinifera*) (AJ490 336)、蓖麻 (*Ricinus communis*) (XM\_002 533 405) 和胡杨 (*Populus euphratica*) (EU382 997. 1) 等植物外整流 K<sup>+</sup> 通道基因的核苷酸序列的同源性均在 66% 以上, 与禾本科模式植物水稻 (*Oryza sativa*) 推测的外整流 K<sup>+</sup> 通道基因的 (GQ355 585. 1) 核苷酸序列的同源性最高, 达到 82%。表明本研究克隆到的片段为外整流 K<sup>+</sup>

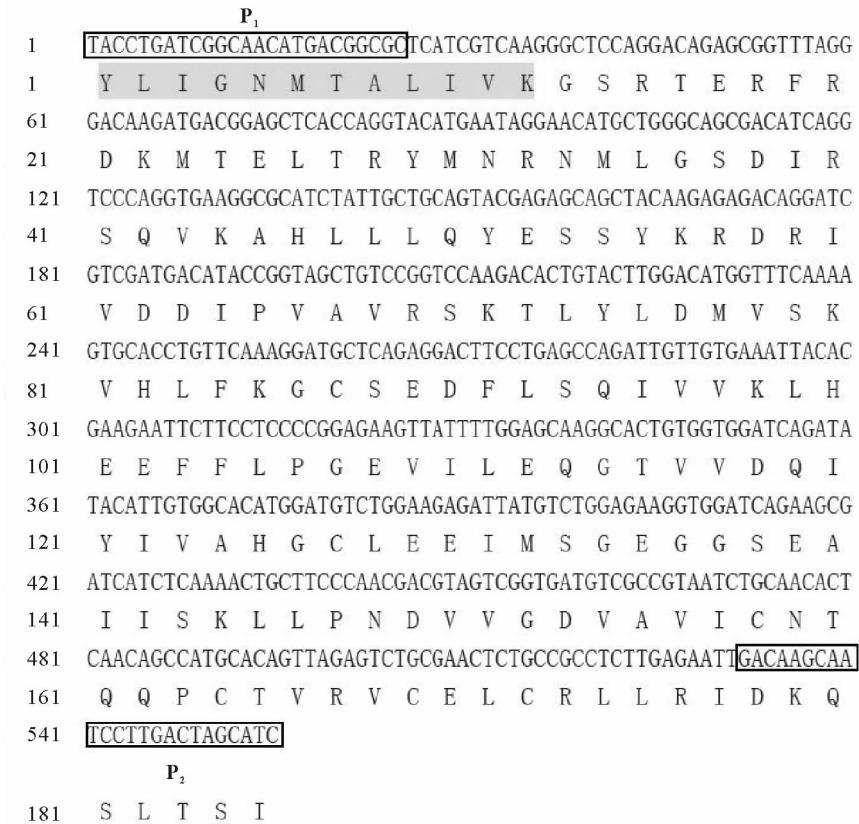


图3 小花碱茅 *PtSKOR* 核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *PtSKOR* fragment from *Puccinellia tenuiflora*

注: 加框表示引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 序列。阴影表示跨膜区。

Note: Nucleotides in frame indicate primers P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> sequence, respectively. Amino acids in shading indicate the transmembrane domain.

通道基因片段,将其命名为 *PtSKOR*。

多重比较及系统进化分析表明,小花碱茅 *PtSKOR* 片段与禾本科植物水稻推测的外整流  $K^+$  通道 *OsSKOR*(ADF28 806. 1)的进化关系非常近,氨基酸同源性高达 83%;与其他单子叶植物如玉米 *ZmZKOR*(AM746 987. 1)的进化关系相对较远,同源性为 61%;与双子叶植物如拟南芥 *AtSKOR*(NP\_

186 934. 1)、葡萄 *VvSOR*(CAD35 400. 1)、胡杨 *PeORK*(ABY86 890. 1)、蓖麻 *RcSKOR*(XP\_002 533 451. 1)等同源性分别为 61%、60%、55%和 55%(图 4、图 5)。序列比对及疏水性分析表明,本研究得到的小花碱茅 *PtSKOR* 片段的氨基酸序列起始于最后一个跨膜区(S6)中段,与非跨膜区相比,该跨膜区在结构上高度保守(图 3、图 4)。

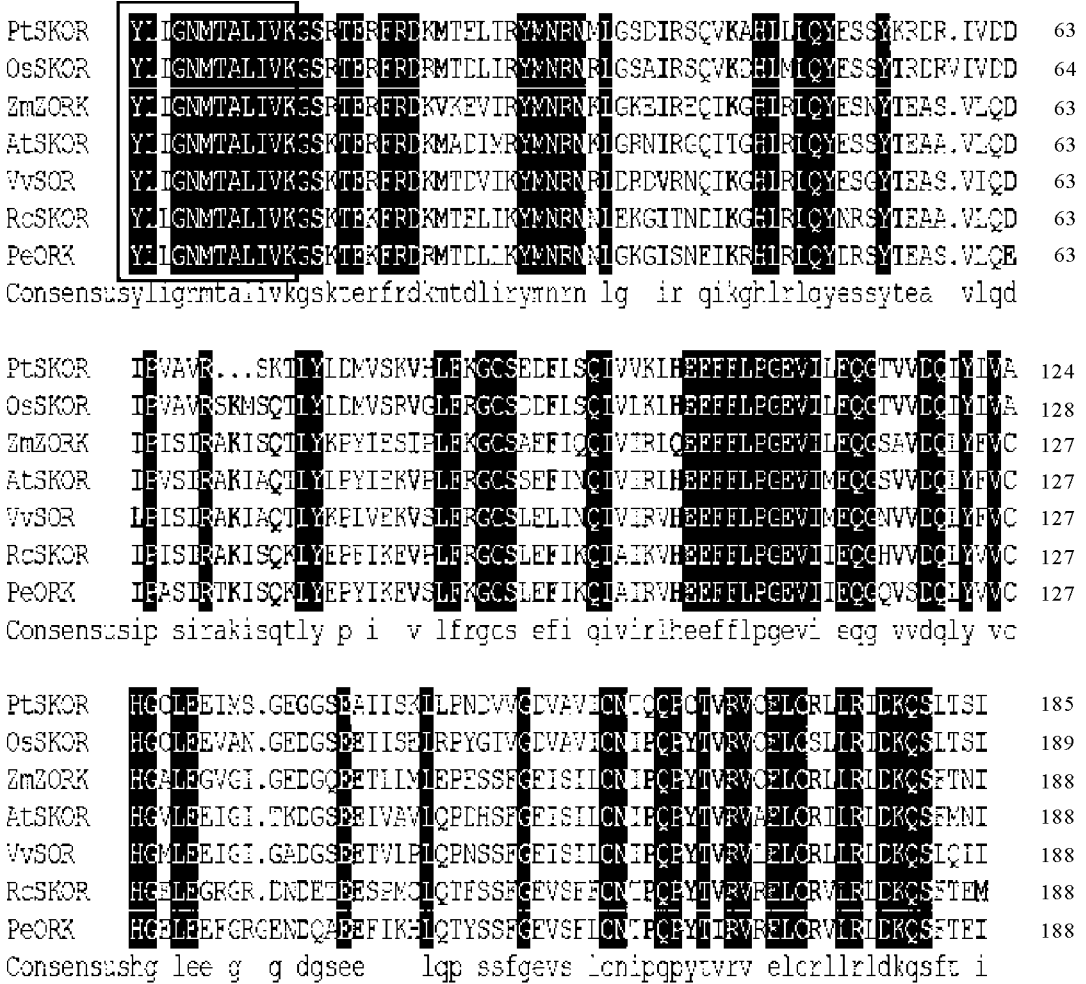


图 4 *PtSKOR* 氨基酸序列与其他植物 *SKOR* 氨基酸序列的多重比较

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of *PtSKOR* with those from other plants

注:多重比较采用 DNAMAN 程序进行。外整流  $K^+$  通道(*SKOR*)氨基酸序列的来源和基因库登录号分别为水稻 *OsSKOR* (ADF28 806. 1)、玉米 *ZmZKOR*(AM746 987. 1)、拟南芥 *AtSKOR* (NP\_186 934. 1)、葡萄 *VvSOR*(CAD35 400. 1)、蓖麻 *RcSKOR*(XP\_002 533 451. 1)、胡杨 *PeORK*(ABY86 890. 1)。方框表示跨膜区。

Note:The multiple alignments were generated using DNAMAN program. The sources and GenBank accession numbers of *SKOR* are as follows: *OsSKOR* (ADF28 806. 1), *ZmZKOR* (AM746 987. 1), *AtSKOR* (NP\_186 934. 1), *VvSOR* (CAD35 400. 1), *RcSKOR*(XP\_002 533 451. 1), *PeORK*(ABY86 890. 1). The transmembrane domain was framed with gray lines.

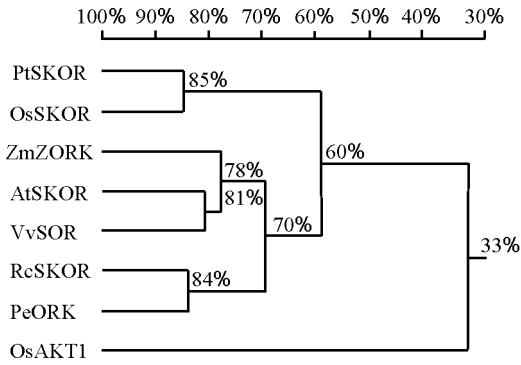


图5 PtSKOR 蛋白质序列与其他植物外整流 K<sup>+</sup> 通道的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of PtSKOR and outward rectifier K<sup>+</sup> channel from other plants

注:系统树分析采用 DNAMAN 进行。图中 OsAKT1 (AY065 970)代表水稻内整流 K<sup>+</sup> 通道,其他英文缩写同图 4。

Note: The multiple alignments were generated using DNAMAN program. OsAKT1 (AY065 970) shows an inward rectifier K<sup>+</sup> channel in *Oryza sativa*, and other abbreviations are the same as Fig. 4.

### 3 讨论

长期以来,有关外整流 K<sup>+</sup> 通道蛋白的研究主要集中在模式植物拟南芥上。科学家们在拟南芥中提出的假说认为,盐胁迫下,随着木质部薄壁细胞中 Na<sup>+</sup> 不断积累,引起薄壁细胞质膜去极化,激活外整流 K<sup>+</sup> 通道蛋白(SKOR)或非选择性离子外整流通道蛋白(NOR)活性,进而将 K<sup>+</sup> 装载到木质部向地上部运输<sup>[14,16]</sup>。Gaymard 等<sup>[11]</sup>从拟南芥中分离到 K<sup>+</sup> 外整流通道蛋白基因 *AtSKOR*,通过非洲爪蟾卵母细胞(*Xenopus oocytes*)异源表达和突变体 *atskor* 试验证明,*AtSKOR* 介导 K<sup>+</sup> 从木质部薄壁细胞向木质部的装载。可见,SKOR 在植物地上部 K<sup>+</sup> 积累方面的作用不容忽视。Wang 等<sup>[9]</sup>在拒盐牧草小花碱茅中的研究证明,其地上部 K<sup>+</sup> 的含量不受外界盐分浓度及处理时间的影响,并维持植株地上部高的 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>。由此推测,小花碱茅 PtSKOR 作为外整流 K<sup>+</sup> 通道,对其耐盐性发挥着重要作用。

本研究得到的 *PtSKOR* 片段与拟南芥、葡萄、胡杨、蓖麻等双子叶植物的外整流 K<sup>+</sup> 通道相比同源性较低,介于 55%~61%;与单子叶植物水稻推测的外整流 K<sup>+</sup> 通道 OsSKOR 同源性达到 83%,但与其内整流 K<sup>+</sup> 通道 AKT1 同源性仅为 33%(图

5),因此推测此通道为小花碱茅外整流 K<sup>+</sup> 通道。PtSKOR 与玉米 ZORK 同源性却仅有 61%,这可能是由于玉米 ZORK 基因主要表达于根外皮层及保卫细胞中<sup>[17]</sup>,与已知的其他植物的外整流 K<sup>+</sup> 通道分属不同类。

植物外整流 K<sup>+</sup> 通道 SKOR 结构与 KAT1、AKT1 等内整流 K<sup>+</sup> 通道类似,具有 6 个疏水性跨膜区域(S1~S6)<sup>[11]</sup>。本试验克隆获得的 PtSKOR 片段起始于最后一个跨膜区(S6)中段。S6 跨膜区及其细胞内扩展区域具有高度的序列保守性(图 4),与通道阻断剂的相互作用是 K<sup>+</sup> 通道电压门控的重要机制<sup>[18]</sup>。此外,PtSKOR 与已报道的 AtSKOR 一致,在近 C 端含有环核苷酸结合序列(Cyclic Nucleotide-Binding Site, CNBS),与环核苷酸的调控有关<sup>[19]</sup>。然而,各类 K<sup>+</sup> 通道在 C 端的结构差异较大,如 KAT1 与 SKOR 在跨膜区具有很高的同源性,但 C 端比 SKOR 少约 200 个氨基酸及 6 个锚蛋白重复基序(Ankyrin Repeat Motif, AR)<sup>[20-21]</sup>。因此,KAT1 对于细胞内的 K<sup>+</sup> 没有响应,而 SKOR 的 C 端非跨膜区对于其感受细胞内 K<sup>+</sup> 信号起着关键作用。可见,*PtSKOR* 基因的研究为阐明盐生植物小花碱茅 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 选择性运输机制提供分子层面的依据,对于改良作物耐盐碱性奠定了理论基础。

### 参考文献

- [1] Flowers T J, Troke P F, Yeo A R. The mechanism of salt tolerance in halophytes[J]. *Annual Review Plant Physiology*, 1997, 28: 89-121.
- [2] Flowers T J, Hajibagheri M A, Clipson N J W. Halophytes[J]. *The Quarterly Review of Biology*, 1986, 61: 313-337.
- [3] Greenway H, Munns R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1980, 31: 149-190.
- [4] Pardo M J, Quintero F J. Plants and sodium ions: Keeping company with the energy[J]. *Genome Biology*, 2002(3): 1017-1021.
- [5] 王锁民,朱兴运,舒孝喜. 碱茅离子吸收与分配特性的研究[J]. *草业学报*, 1994, 3(1): 39-43.
- [6] 朱兴运,王锁民,阎顺国,等. 碱茅属植物抗盐性与抗盐机制的研究进展[J]. *草业学报*, 1994, 11(3): 9-15.
- [7] 李剑,赵常玉,吴永娜,等. 小花碱茅 *HKT1; 4* 基因片段的克隆与序列分析[J]. *草业科学*, 2011, 28(6): 969-973.

- [8] 任伟,王志峰,徐安凯. 碱茅耐盐碱基因克隆研究进展[J]. 草业学报,2010,19(5):260-266.
- [9] Wang C M, Zhang J L, Liu X S, *et al.* *Puccinellia tenuiflora* maintains a low Na<sup>+</sup> level under salinity by limiting unidirectional Na<sup>+</sup> influx resulting in a high selectivity for K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup> [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2009, 32:486-496.
- [10] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003(6):441-445.
- [11] Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, *et al.* Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap[J]. *Cell*, 1998,94:647-655.
- [12] Wegner L H, Raschke K. Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots: A procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch-clamp exploration of salt passageways into xylem vessels [J]. *Plant Physiology*, 1994,105:799-813.
- [13] Roberts S K, Tester M. Inward and outward K<sup>+</sup>-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize root cortex and stele[J]. *The Plant Journal*, 1995,8:811-825.
- [14] Roberts S K, Tester M. Permeation of Ca<sup>2+</sup> and monovalent cations through outwardly rectifying channel in maize root stelar cells[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1997,48:839-846.
- [15] 王生银,马清,王锁民. 盐生植物盐地碱蓬质膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因片段的克隆及其序列分析[J]. 草业科学,2012,29(6):918-923.
- [16] Wegner L H, De Boer A H. Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K<sup>+</sup> homeostasis and long-distance signaling[J]. *Plant Physiology*, 1997,115:1707-1719.
- [17] Büchsenstätzer K, Marten I, Becker D, *et al.* Differential expression of K<sup>+</sup> channels between guard cells and subsidiary cells within the maize stomatal complex[J]. *Plant Physiology*, 2005,222:968-976.
- [18] Ding S, Horn H. Effect of S6 tail mutations on charge movement in shaker potassium channels[J]. *Biophysical Journal*, 2003,83(1):295-305.
- [19] Chérel I, Daram P, Gaymard F, *et al.* Plant K<sup>+</sup> channels: Structure activity and function [J]. *Biochemical Society transactions*, 1996,24:964-971.
- [20] Mäser P, Thomine S, Schroeder J I, *et al.* Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2001,126:1646-1667.
- [21] Zimmermann S, Sentenac H. Plant ion channels: From molecular structures to physiological functions [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999(2):477-482.

## Cloning and sequence analysis of outward-rectifying potassium channel *SKOR* gene fragment from halophyte *Puccinellia tenuiflora*

WANG Qian, WANG Pei, WANG Suo-min

(College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University;  
State Key Laboratory of Grassland Farming Systems, Lanzhou 730020, China)

**Abstract:** To investigate molecular mechanism of K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selective transport in *Puccinellia tenuiflora*, degenerate primers were designed based on the conserved sequences of the outward-rectifying potassium channel from other plants. Total RNA was extracted from the roots of *P. tenuiflora*. *SKOR* gene fragment was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), which could provide basis for cloning full-length *SKOR* gene, expression regulation and RNAi. The sequencing result showed that the *SKOR* gene fragment from *P. tenuiflora* contained about 555 bp, encoding 185 amino acids. Homology comparison with *SKOR* gene sequences of other higher plants showed that it shared over 66% nucleotide sequence homology and 55% amino acid sequence homology.

**Key words:** *Puccinellia tenuiflora*; *SKOR* gene; K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selective transport; sequence characteristics; salt