

K⁺ 通道基因 *MIRK* 在网纹甜瓜植株中的表达分析

张屹东^{1,2,3}, 黄丹枫¹, 牛庆良¹, 左开井³

(1. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 201101; 2. 上海交通大学 生命科学技术学院, 上海 200030;
3. 复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心, 上海 200030)

摘要:在网纹甜瓜(*Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud.) 叶片中克隆了一个 cDNA 片段, 片段长 1 330 bp。这段 cDNA 序列及由此推测的氨基酸序列分析和多序列比对表明扩增的片段是编码 K⁺ 通道 *MIRK* (Melon Inward Rectifying K⁺ Channel) 基因的 5' 端。由此 cDNA 片段推测的氨基酸序列包含了 6 个跨膜片段 S1 到 S6, 其间有一个对离子选择性有重要作用的特征序列结构 GYGD (Gly-Tyr-Gly-Asp)。进化树分析显示 *MIRK* 属于 KAT1 亚家族, 和在葡萄叶片中克隆的 K⁺ 通道 *SIRK* 最相近。半定量 RT-PCR 试验表明, *MIRK* 在甜瓜植株中根、茎、叶、花、果实等各器官中均有表达, 主要在叶片和初期发育的果实中表达, 在雌花和茎中也有表达, 在根中的表达量最低。*MIRK* 在甜瓜不同器官中的表达模式显示 *MIRK* 可能在甜瓜植株发育过程中起重要作用。

关键词: 网纹甜瓜; K⁺ 通道基因; *MIRK*; 序列分析; 表达模式

中图分类号: S652.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0046-06

Expression of K⁺ Channel Gene *MIRK* in Muskmelon

ZHANG Yi-dong^{1,2,3}, HUANG Dan-feng¹, NIU Qing-liang¹, ZUO Kai-jing³

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China;

2. School of Life Sciences and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China;

3. Fudan-SJTU-Nottingham Plant Biotechnology R&D Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: A 1 330 bp cDNA fragment of K⁺ channel gene *MIRK* (Melon Inward Rectifying K⁺ Channel) was isolated from leaves of muskmelon (*Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud.). The nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence analysis displayed that the cDNA fragment was located in the 5'-terminal of *MIRK* gene and contained six transmembrane segments S1-S6 and a GYGD (Gly-Tyr-Gly-Asp) motif. Phylogenetic analysis showed that *MIRK* was belonged to the KAT1 sub-family and most close to the *SIRK* of *Vitis vinifera*. The results of semi-quantitative RT-PCR displayed that *MIRK* was preferentially expressed in leaves and fruits, and also expressed in female flowers and shoots, but nearly not expressed in roots, indicating that *MIRK* might play a key role in the muskmelon development.

Key words: Muskmelon (*Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud.); K⁺ channel gene; *MIRK*; Sequence analysis; Expression pattern

钾是植物细胞中含量最丰富的阳离子, 在生长发育过程中起着重要作用。植物对 K⁺ 吸收和转运的跨膜运输蛋白主要有 K⁺ 载体蛋白 (Carrier protein) 和 K⁺ 通道 (Channel protein), 离子通道的转运速率主要受扩散限制, 其转运速率比转运体高近千倍^[1], K⁺ 通道是植物吸收转运大量钾的主要方

式^[2]。随着 K⁺ 通道基因 *KATI*^[3] 和 *AKTI*^[4] 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 上的克隆鉴定, 植物 K⁺ 通道的研究开始进入到分子水平, 一批 K⁺ 通道基因在拟南芥和其他植物中也被陆续克隆鉴定^[5]。这些 K⁺ 通道根据其组成及作用被分为 AKT1 类、KAT1 类、AKT2 类、AtKC 类和 SKOR 类等亚家族, 这些都

收稿日期: 2006-12-06

基金项目: 国家“863”项目 (2004AA247010); 上海市科委基础研究项目 (04JC14056)

作者简介: 张屹东 (1971-), 男, 河南济源人, 博士, 主要从事植物生物化学与分子生物学研究工作

通讯作者: 黄丹枫 (1956-), 女, 上海人, 博士, 博导, 主要从事植物种苗、生理生态及数字农业等研究工作。

属于离子通道 Shaker 家族^[5]。随着对这些基因的深入研究, K^+ 通道的复杂性和一些重要生理功能被揭示, 使我们可以进一步从分子水平上深入了解和认识一些 K^+ 通道和 K^+ 有关的植物生理现象。

甜瓜(*Cucumis melo* L.) 是世界十大果品之一, 是我国重要的设施栽培作物。网纹甜瓜(*Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud.) 在基质栽培条件下, 钾能促进植株对其他矿质元素如 N, P 等的吸收^[6], 适宜的钾素水平显著提高了叶片净光合速率、果实总糖、鲜味氨基酸、甜味氨基酸以及醋酸盐类香气组分——戊基醋酸盐、丁基醋酸盐等的含量, 改善网纹甜瓜品质^[7,8]。甜瓜的营养生理研究很多^[6-8], 但关于甜瓜营养的分子生物学研究在国内却鲜有报道。我们在甜瓜设施栽培营养生理研究的基础上, 在网纹甜瓜中首次克隆了 K^+ 通道基因 *MIRK* (Melon Inward Rectifying K^+ Channel) 的 cDNA 片段, 利用生物信息学方法对这个片段进行了分析, 并研究了 *MIRK* 在甜瓜植株中的主要表达部位和表达特性, 初步在分子水平上对 K^+ 通道基因在甜瓜发育过程中所起的作用进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 材料

网纹甜瓜(以下简称甜瓜) 品种为春丽 1 号(上海农业科学院园艺所)。基因克隆扩增所用试剂为 SMARTTM RACE kit (Clontech Laboratories INC, USA)。植物 RNA 抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; RT-PCR 采用 TaKaRa One Step RNA PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 亚克隆连接载体采用 pGEM-T Easy Vector (Promega 公司); 所用引物由上海生工生物工程服务公司合成。大肠杆菌菌株 DH5 α 为复旦—交大—诺丁汉植物生物技术研究中心实验室保存。

1.2 甜瓜植株总 RNA 的提取

甜瓜出苗后在正常栽培条件下用 1/2 Hoagland 培养液进行培养至结果后, 根据试验取甜瓜根、茎、叶雌花和发育两周的甜瓜果实等不同器官, 用液氮速冻后, -70°C 保存。所保存的样品在液氮下研磨, 分别抽提 RNA, 抽提方法按试剂盒说明书。试验所有的操作在本实验室 RNA 室进行。

1.3 甜瓜 K^+ 通道基因 cDNA 片段的克隆

1.3.1 甜瓜 K^+ 通道基因保守片段的克隆 根据 SMARTTM RACE 试剂盒使用说明, 利用叶片总 RNA 合成甜瓜 5' 和 3' 第一链 cDNA。按已克隆的其他植物的 K^+ 通道基因的保守区域设计简并引物^[3-5],

正向引物 MF1 为: 5'-CATGCTGAGAA (C/T) (T/C) CAAGAGA (G/A) ATG-3'; 反向引物 MR1 为: 5'-GAAACCA (GA) (CT) TG (AG) AA (GAT) AGGAAGT-3', 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。以甜瓜叶片总 RNA 为模板合成的 3' 端第一链 cDNA 为模板, 以 MF1 和 MR1 为引物进行 PCR 反应, 反应体系为 50 μL , 包含 2 μL cDNA、20 μmol MF1、20 μmol MR1、10 μmol dNTPs、1 \times Ex PCR buffer 和 5 U Ex *Taq* Polymerase。反应条件为: 94°C 3 min, (94°C 40 s, 58°C 40 s, 72°C 60 s) 35 个循环, 72°C 延伸 8 min。

1.3.2 甜瓜 K^+ 通道基因 5' 端片段的克隆 根据中间片段的序列, 设计引物 MR2: 5'-TGCGACTAGT-GCAATGAACGAG-3', 结合末端引物 UPM (由试剂盒提供), 以 5' 端第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 反应体系同上。反应条件为: 94°C 3 min, (94°C 40 s, 54°C 40 s, 72°C 90 s) 35 个循环, 72°C 延伸 8 min。反应结束后, 以 MR2 和 NUP (由试剂盒提供) 为引物, 以刚结束的 PCR 反应液为模板进行第 2 轮 PCR 反应, 反应体系同上, 反应条件为: 94°C 3 min, (94°C 40 s, 60°C 40 s, 72°C 90 s) 35 个循环, 72°C 延伸 8 min。

1.4 产物的亚克隆及测序

PCR 的产物经胶回收纯化后与 pGEM-T Easy 载体在 16°C 连接 16 h 后 (连接体系及方法见试剂盒说明书), 转化大肠杆菌 DH5 α 宿主感受态, 过夜培养后, 经 PCR 筛选后, 对重组质粒进行鉴定测序。测序在上海华诺生物科技有限公司和上海鼎安生物科技有限公司进行。

1.5 生物信息学分析

测序结果的同源性分析采用网上 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。序列翻译用 DNAMAN 软件, 多序列比对用 CLUSTAL W 和 GENEDOC 软件^[9], 基因进化树的构建并分析用软件 MEGA 2^[9,10], 进化树构建方法采用 MEGA 软件的 NJ 法 (Neighbor Joining Method), bootstrap 值由 1 000 次重复得到。基因跨膜片段的预测采用网上 TMpred (Transmembranes prediction) 程序 (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED-form.html>)。

1.6 基因表达分析

用半定量 RT-PCR 分析 *MIRK* 在甜瓜根、茎、叶、花、果实等植株不同部位的表达。根据已克隆的 cDNA 片段设计特定引物, 正向引物 MF3 为: 5'-ATGCGAAGCTCTTGTGTACAAAGG-3', 反向引物 MR3 为: 5'-TGCGACTAGTCCAATGAACGAG-3'。每个样品用 50 ng RNA, 对照为 *actin* 基因。*actin* 基因正向引

由以上分析推测在网纹甜瓜叶片中克隆得到的 cDNA 序列可能是网纹甜瓜中编码 K^+ 通道基因的序列片段。

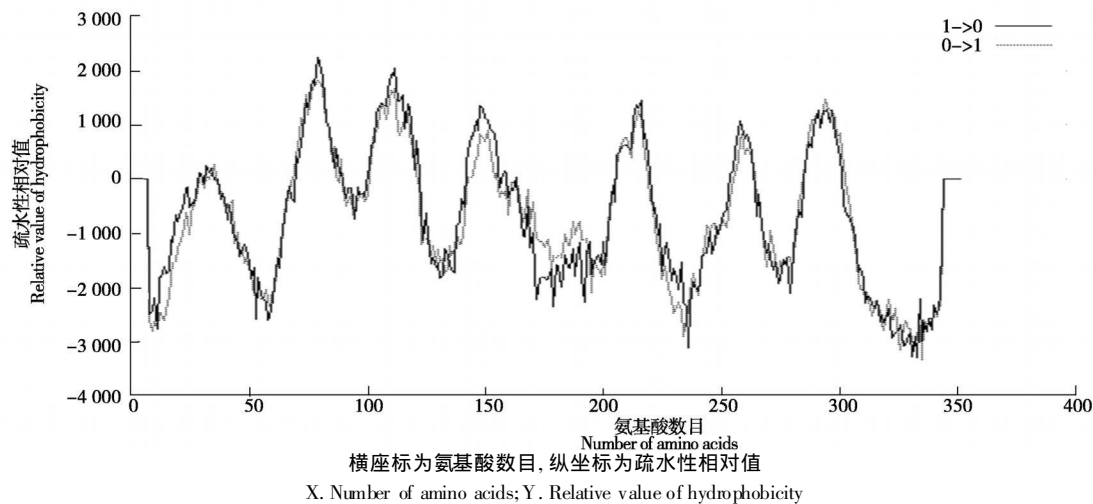
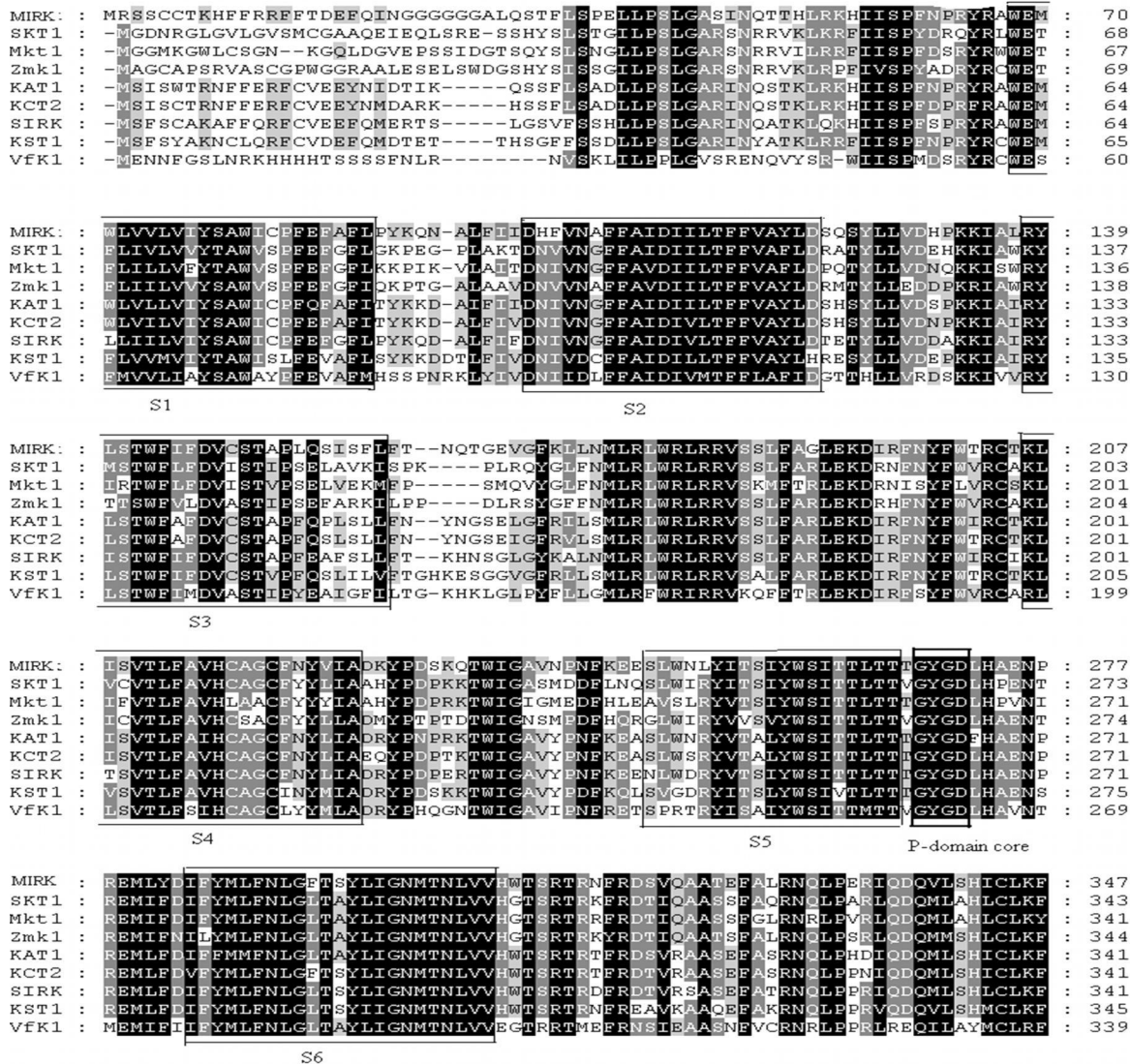


图2 甜瓜 K⁺通道蛋白 *MIRK* 氨基酸序列跨膜区预测分析
Fig.2 The hydrophobicity and orientation of *MIRK* from muskmelon are predicted by TMpred program



The accession numbers are SKT1, T07651; MKT1, AF267753; Zmk1, T03939; SIRK, AF359521; KAT1, S32816; KCT2, AY796219; KST1, S55349. VK1, T12177

图3 推测的 *MIRK* 氨基酸序列片段和其他已知的 K⁺通道蛋白的比较

Fig.3 Partial of deduced amino acids sequence of *MIRK* is compared with that of other potassium channels

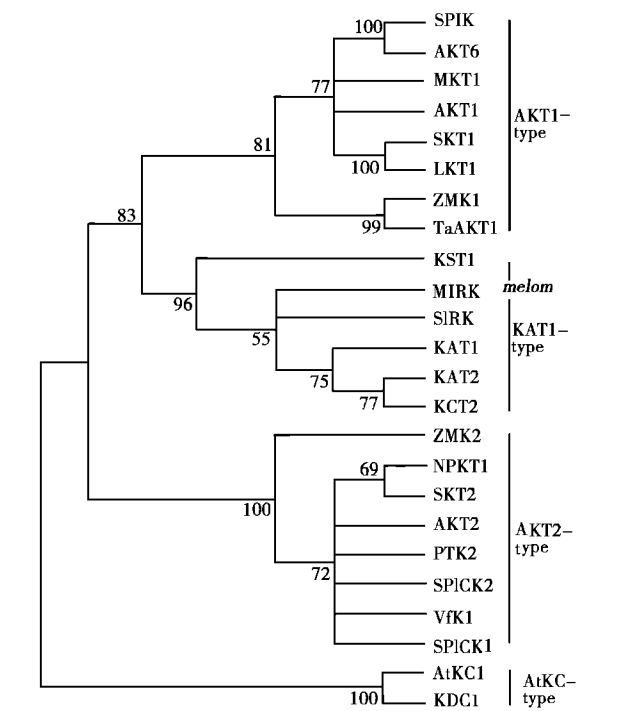
表 1 *MIRK* 的 cDNA 序列推测的氨基酸序列的跨膜片段分析

Tab. 1 Transmembrane segments of the deduced amino acids sequence of *MIRK*

跨膜片段 Transmembrane segment	起始氨基酸 Initiate amino acid	终止氨基酸 Terminate amino acid	片段长度(氨基酸数目) Length of segment (number of amino acids)	跨膜形式(从 N 端到 C 端) From of transmembrane (from N to C)
1	70	90	21	膜内到膜外
2	103	121	19	膜外到膜内
3	139	163	25	膜内到膜外
4	206	226	21	膜外到膜内
5	250	267	18	膜内到膜外
6	284	306	23	膜外到膜内

2.3 甜瓜 K^{+} 通道的进化分析

将推测的甜瓜 K^{+} 通道基因 *MIRK* 的氨基酸序列和其他已知的 K^{+} 通道一起构建的进化树见图 4。这个进化树包括了从拟南芥、马铃薯、葡萄等植物中分离出的 K^{+} 通道基因,分成了 AKT1 类、KAT1 类、AKT2 类和 AtKC 类四个亚家族。结果显示,甜瓜 K^{+} 通道蛋白 *MIRK* 属于 KAT1 亚家族,在这个亚家族中和葡萄叶片中分离的 K^{+} 通道 *SIRK* 最相近。



Protein accession numbers are SPIK, AJ309323; AKT6, CAA 22577; MKT1, AF267753; AKT1, S23606; SKT1, T07651; LKT1, X96390; ZMK1, T03939; TaAKT1, AF207745; KST1, S55349; SIRK, AF359521; KAT1, S32816; KAT2, T04931; KCT2, AY796219; ZMK2, CAB54856; NPKT1, BAA 84085; SKT2, T07052; AKT2, AAA97865; PTK2, AJ271447; SPICK2, AAD39492; VIK1, T12177; SPICK1, AAD16278; AtKC1, U81239; KDC1, AJ249962

图 4 甜瓜钾离子通道 *MIRK* 同其他植物克隆的钾离子通道的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of *MIRK* and other potassium channel proteins

2.4 甜瓜 K^{+} 通道基因 *MIRK* 的主要表达部位及在果实发育早期的表达

经半定量 RT-PCR 检测发现(图 5),甜瓜 K^{+} 通道基因 *MIRK* 在叶片和发育初期 2 周果实中的表达

量最高,在雌花中的表达量也较高,在茎中的表达量次之,根中的表达量很少,几乎检测不到。

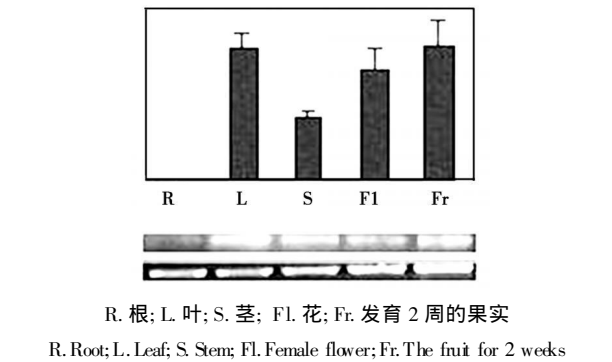


图 5 甜瓜钾离子通道基因 *MIRK* 在不同组织中的表达分析

Fig. 5 Expression of *MIRK* in different tissues of melon (*Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud.)

3 讨论

在拟南芥中 *KAT1* 和 *AKT1* 的克隆,主要是和钾的吸收有关^[3,4]。随着对这两个基因的深入研究,发现钾离子通道还与其他一些生理功能,如气孔的开放、胞间信号传导及根毛生长等有关^[2, 5, 11, 12]。后来陆续在不同植物和植物的不同部位又克隆了一批 K^{+} 通道基因,发现了 K^{+} 通道这一家族在植物的不同部位可能有不同的通道基因在控制着不同的生理作用^[5, 11, 12]。葡萄中的一个 K^{+} 通道基因 *SIRK* 的转录在果实发育过程中有不同的变化,而且主要在果实中的保卫细胞中有表达, *SIRK* 在果实呼吸跃变后, *SIRK* 的转录量急剧下降,推测 *SIRK* 可能在呼吸跃变前调节果实水分和 K^{+} 转运方面起重要作用^[12]。

钾离子通道是大量钾吸收转运的主要方式^[2, 5, 11],通过半定量 RT-PCR 分析发现,在网纹甜瓜上克隆的 K^{+} 通道基因 *MIRK* 在根、茎、叶、花、果实中都有表达,显示这个基因可能在甜瓜整个生长发育过程中起着关键作用。钾对甜瓜果实的发育和品质的形成有很大的影响^[7,8], *MIRK* 在花和刚开始发育的果实中都有较高的表达量(图 5),这个现象

可能与甜瓜果实开始发育时钾的转运量有关, 也可能显示 *MIRK* 对甜瓜果实发育过程中气孔开放、胞质中离子平衡及水分调节等生理过程有较大的影响。这些说明 K⁺ 通道在甜瓜果实发育过程中也起着较为重要的生理作用。 *MIRK* 在果实发育中作用的具体生理过程及分子机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Dreyer I, Horeau C, Lemaillet G, *et al.* Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems[J] . Journal of Experimental Botany, 1999, 50: 1073– 1087.

[2] Hirsch R E, Lewis B D, Spalding E P, *et al.* A Role for the AKT1 Potassium channel in plant nutrition [J]. Science, 1998, 280: 918– 923.

[3] Anderson J A, Huprikar S S, Kochian L V, *et al.* Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae* [J] . PNAS, USA, 1992, 89: 3736– 3740.

[4] Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, *et al.* Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system[J]. Science, 1992, 256: 663– 665.

[5] V ry A A, Sentenac H. Molecular mechanisms and regulation

of K⁺ transport in higher plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 575– 603.

[6] 林 多, 黄丹枫. 基质栽培甜瓜矿质营养吸收规律的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(1): 112– 116.

[7] 林 多, 黄丹枫. 钾素水平对基质栽培网纹甜瓜光合及品质的影响[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 221– 223.

[8] Lin Duo, Huang Dan-feng . Effects of potassium levels on fruit quality of muskmelon in soilless medium culture[J]. Scientia Horticulturae, 2004, 102: 53– 60.

[9] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 4673– 4680.

[10] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J] Bioinformatics, 2001, 17: 1244– 1245.

[11] Maathuis F J M, Ichida A M, Sanders D, *et al.* Roles of higher plant K⁺ channels. Plant Physiology, 1997, 114: 1141 – 1149.

[12] Pratelli R, Lacombe B, Torregrosa L, *et al.* A Grapevine gene encoding a guard cell K⁺ channel displays developmental regulation in the grapevine berry [J]. Plant Physiology, 2002, 128: 564– 577.