

文章编号: 1674-7054(2016)01-0076-06

低氮胁迫下香蕉硝酸盐转运蛋白 *MaNRT2* 基因的克隆与表达分析

贺瑞彭 刘扬 曾灿彬 徐敏 齐钊,
闫臻 骆娟 阮云泽 何朝族 汤华

(海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/农学院,海口,570228)

摘要: 氮素是植物生长发育所必需的大量元素,也是限制植物产量的首要因素,硝酸盐转运蛋白 NRT 是植物吸收和利用氮素的重要蛋白。笔者以香蕉为实验材料,通过 RNA-Seq 测序,筛选得到一个显著差异表达的高亲和硝酸盐转运蛋白基因 *NRT2*;通过 PCR 克隆获得 1 509 bp 的 cDNA 序列,生物信息学预测其编码 502 氨基酸,含有 MFS 结构域,属于 NRT2 基因家族,命名为 *MaNRT2*;RNA-Seq 和 qRT-PCR 的结果显示,*MaNRT2* 基因的表达具有显著的组织特异性,在根中远高于叶片;低氮胁迫处理后,*MaNRT2* 在叶片中表达量上升,在根中表达量反而下降,表明 *MaNRT2* 与香蕉氮元素的吸收转运密切相关。

关键词: 香蕉;低氮胁迫;硝酸盐转运蛋白 2;转录组测序;基因表达分析

中图分类号: S 668.1 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.01.013

香蕉消费遍及全球,种植地遍及 130 多个国家,是热带地区的重要食物来源,在世界水果生产中占有十分重要的地位^[1]。香蕉株型高大,果实硕大,需要大量的氮素营养,在高产栽培中,常采用大水大肥模式,氮肥的施用量大,但氮素的利用率不足 30%,大部分淋溶流失,造成严重的经济损失和环境污染。培育和筛选低氮耐受型的香蕉品种,是提高氮素利用率的有效途径之一,有利于提高香蕉氮素利用率,减少氮肥施用量,改善生态环境。硝酸盐转运蛋白(Nitrate transporter, NRT)在植物体内介导根系对 NO₃⁻的吸收以及在不同组织、器官间的转运。高等植物共有 2 个家族的转运蛋白: NRT1 和 NRT2^[3],分别与低亲和硝态氮转运系统(LATS)和高亲和硝态氮转运系统(HATS)有关。自 1983 年在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中发现和鉴定了高亲和硝酸盐转运蛋白后^[3-4],对于 NRT 的研究就不断深入。例如,关于 NRT 基因的表达部位、氮营养调控、植株发育和抗逆等方面均有研究^[5]。然而,对于 NRT 在香蕉响应低氮胁迫方面的研究还未见报道。笔者以香蕉为材料,对其进行低氮胁迫处理,通过高通量 RNA-Seq 测序技术,对 NRT 基因进行克隆和差异表达分析,为研究 NRT 基因在吸收和转运氮素机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料培养与试验处理 取生长良好、大小一致的巴西蕉组培幼苗(4 叶龄),在不损伤根系的情况下将泥土洗净,然后沙培(沙子洗净,基本不含营养)。先用 1/4 的 Hoagland 培养液预培养 2 周,然后分 2 组处理,1 组正常氮供给,为对照处理组;1 组用去氮素的 Hoagland 营养液胁迫处理,为低氮处理组,每组处理各 20

收稿日期: 2015-11-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31360364);教育部热带作物新品种选育工程中心与作物学重点学科联合资助项目(lhxm-2012-2);海南省自然科学基金(311025);海南省重大科技项目(ZDZX2013023);“中央财政支持中西部高校提升综合实力专项”香蕉子课题

作者简介: 贺瑞(1989-),女,海南大学农学院 2013 级硕士研究生, E-mail: hrnjfzx326@163.com

通信作者: 汤华(1974-),男,海南大学农学院教授,博士,研究方向:作物遗传育种与分子生物学, E-mail: thti-ger@163.com

株 实验设 3 次重复。栽培后,置于通风良好,采光充足,温度适宜的大棚内。2 d 浇 1 次培养液,每次每株浇灌量相同,待幼苗长大后,视情况 1 d 浇 1 次,连续处理 25 d。每 3 天记录 1 次植株的表型性状,包括叶片黄化程度、缺素症状、叶片数等。当胁迫表现出显著症状时,取正常处理的叶片 (CL) 和根 (CR)、低氮处理的叶片 (NL) 和根 (NR),液氮冷冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保藏备用;其中一部分组织样品送往深圳华大基因公司,进行 RNA-Seq 测序。

1.2 香蕉总 RNA 提取与反转录 使用改良的 CTAB 法^[6]提取香蕉叶片和根中的总 RNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,用紫外分光光度计测定浓度和纯度。将合格的 RNA 纯化后,用 PrimeScript RT reagent 试剂盒反转录合成 cDNA,用于后续实验。

1.3 *MaNRT2* 基因的表达分析与 qRT-PCR 验证 以 $\text{FDR} \leq 0.001$ 且 $\log_2\text{Ratio} \geq 1$ 作为显著差异表达基因的筛选条件^[7] 筛选出 GSMUA_Achr8T14230_001 为研究对象,GenBank 的登录号为 XM_009414871.1,命名为 *MaNRT2*。利用香蕉基因组数据库(<http://banana-genome.cirad.fr/>)找到基因 *MaNRT2* 的 CDS 序列。

为了验证 RNA-Seq 的测序结果,采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 对目的基因的表达量进行分析。使用软件 Premier 5.0 设计引物,用香蕉 β 肌动蛋白基因 (β -actin) 设立阳性对照并用于基因表达标准化,操作步骤参照 SYBR Green Real-time PCR 试剂盒。为避免实验操作引起的误差,实验设 3 个生物学重复,每个反应做 3 个复孔,结果使用 $2^{-\Delta\text{CTACT}}$ 方法计算。引物序列如下: β -actin-F (5'-GGTATCGTGTGGATTCTGGA-3'); β -actin-R (5'-GTAGTCTCATGGATACCTGC-3'); GSMUA_Achr8T14230_001-F (5'-GATGCCAGTGGGGGTTTG-3'); GSMUA_Achr8T14230_001-R (5'-CCCCTCGGTATCTTGTIT-3')。

1.4 *MaNRT2* 基因的克隆 设计 *MaNRT2* 基因的 cDNA 扩增引物, *MaNRT2*-F (5'-ATGGCGGAAG-GACTCGG-3') 和 *MaNRT2*-R (5'-TCAGACGTTGGTAGGGGATGCG-3') 按照 pEASY-T1 试剂盒的使用说明书克隆目的基因。扩增完毕后,1% 琼脂糖凝胶电泳检查,使用 AXYGEN 试剂盒进行切胶回收。连接 T 载体,转化大肠杆菌,挑取阳性克隆送上海生物工程公司测序。

1.5 *MaNRT2* 基因的生物信息分析 根据测序结果,进行序列多重比对,并对功能结构域、跨膜结构域、亚细胞定位、疏水性和 2 级结构等生物信息学预测分析。

2 结果与分析

2.1 RNA-Seq 中硝酸盐转运蛋白基因的表达情况 通过对香蕉进行低氮胁迫处理后,分别对根和叶片取样,进行转录组测序,研究基因的差异表达情况。结果表明,硝酸盐转运蛋白 2 基因 (*MaNRT2*) 的表达情况如表 1 所示,表现出显著的组织差异性,总体而言,该基因在根中的表达量显著高于叶片中的表达量,在正常对照处理中,两者相差 65 倍,在低氮胁迫处理时,两者相差 2.3 倍。在低氮胁迫实验中,在叶片和根中表现出不同的变化趋势,叶片中表现为上调,上升 3.6 倍;根中表现为下调,下降 7.8 倍。

表 1 香蕉硝酸盐转运蛋白基因在不同组织、不同处理中的测序表达量

Tab.1 The RNA-Seq results of *MaNRT2* gene in different tissues and treatments

不同组织 Tissue	对照处理的表达量 (control) FPKM	低氮处理的表达量 (low N) FPKM	FDR	$\log_2\text{Ratio}$ (NR/CR)	变化趋势 Change
叶片 Leaf	2.93	10.54	4.31E-06	1.84	Up
根 Root	189.80	24.22	1.68E-191	-2.97	Down

2.2 低氮处理对 *MaNRT2* 基因表达量的影响 通过 qRT-PCR 进行 *MaNRT2* 基因的表达验证,结果表明,低氮处理后,在叶片中,*MaNRT2* 基因的表达量是对照处理的 4.00 倍,与 RNA-Seq 的测序结果 3.60 接近;在根中,低氮处理的表达量是对照处理的 0.17 倍,与 RNA-Seq 的测序结果 0.13 基本吻合。由此可见,低氮处理后,*MaNRT2* 基因在叶片中表达量增加,在根中却下降,低氮胁迫促使 *MaNRT2* 基因的表达量发生显著变化,且具有明显的组织特异性。

2.3 *MaNRT2* 基因的克隆和序列分析 PCR 扩增得到 *MaNRT2* 完整的 CDS 序列(图 2),连接 T 载体,转化大肠杆菌,送公司测序,序列分析表明,该序列长 1 509 bp(图 3),编码 502 个氨基酸,其中酸性氨基酸 30 个,碱性氨基酸 40 个,相对分子质量 54.05 kDa,等电点 9.10,亲水系数 0.323,不稳定系数 41.46 > 40,为稳定蛋白。

在 NCBI 上对蛋白功能结构域进行分析,结果表明 *MaNRT2* 有 1 个 MFS 结构域(图 3),表明该基因属于 MFS 超基因家族^[8]。

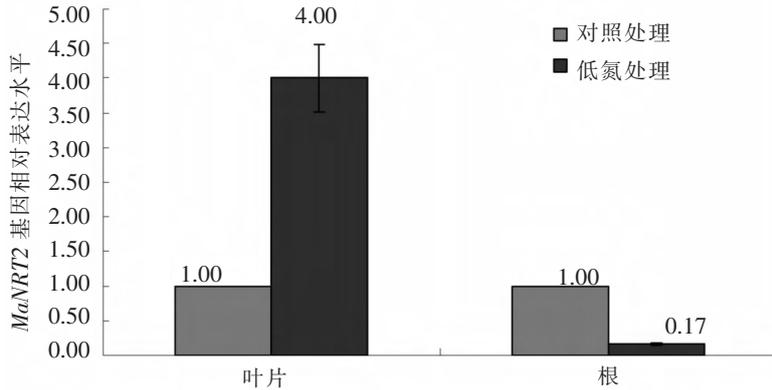


图 1 对照和低氮处理后叶片和根中 *MaNRT2* 基因相对表达水平
Fig.1 Relative expression level of *MaNRT2* between control and low nitrogen treatments

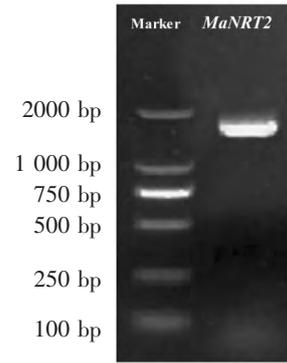


图 2 *MaNRT2* 基因 cDNA 扩增产物
Fig.2 PCR products of *MaNRT2* cDNA

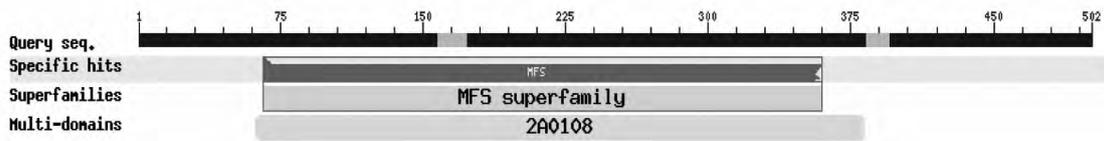


图 3 *MaNRT2* 的 MFS 结构域预测

Fig.3 MFS domain analysis of *MaNRT2* protein

2.4 *MaNRT2* 蛋白跨膜结构域与亚细胞定位预测 跨膜区域是转运蛋白行使生物学功能的重要结构。使用 TMHMM 软件对 *MaNRT2* 基因编码的蛋白进行跨膜结构域预测,显示有 12 个跨膜结构域(图 4)。使用 PSORT 软件对蛋白质亚细胞定位进行预测,显示 *MaNRT2* 蛋白定位在细胞质膜上。

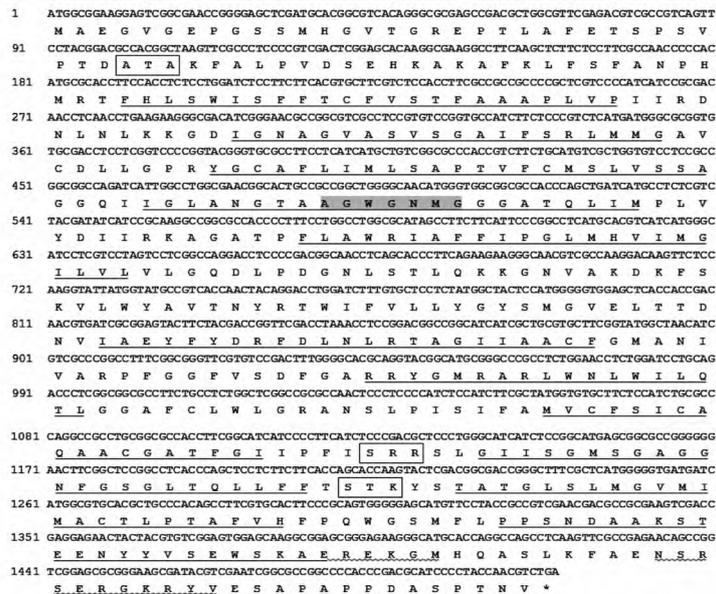


图 4 *MaNRT2* 的核苷酸和预测的氨基酸序列

下划横线部分为跨膜结构域,下划波浪线部分为亲水区域,方框内为蛋白激酶 C 的识别位点(S/T-X-R/K),阴影部分为“A-G-W/L-G-N-M-G”共识别序列

Fig.4 Nucleotide and predicted amino acid sequences of *MaNRT2*

The underline is transmembrane domain, the way line is hydrophilic domain, the words in the box is the recognition site(S/T-X-R/K) of protein kinase C, and the shaded area is co-recognition sequence A-G-W/L-G-N-M-G

2.5 *MaNRT2* 蛋白疏水性预测 使用 ProtScale 软件对 *MaNRT2* 蛋白疏水性预测发现, *MaNRT2* 氨基酸链第 211 位的异亮氨酸疏水性最强, 疏水值 3.411; 第 482 位的谷氨酸亲水性最强, 亲水值 -2.689, 整个氨基酸链疏水区多于亲水区, 表现为疏水性(图 5), 与跨膜蛋白的特性高度吻合。

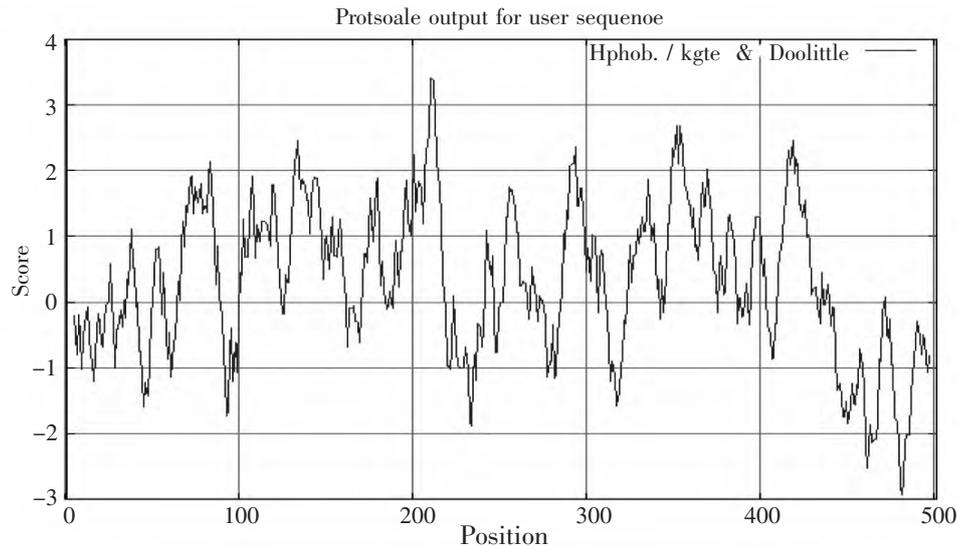


图 5 *MaNRT2* 蛋白疏水性预测

Fig. 5 Hydrophobicity prediction of *MaNRT2* protein

2.6 *MaNRT2* 蛋白 2 级结构预测 使用 SOPMA 软件对 *MaNRT2* 蛋白进行结构预测, 显示, *MaNRT2* 蛋白中有 175 个 α -螺旋, 占 34.86%; 116 个延伸主链, 占 23.11%; 51 个 β -折叠, 占 10.16%; 160 个无规卷曲, 占 31.87%(图 6)。

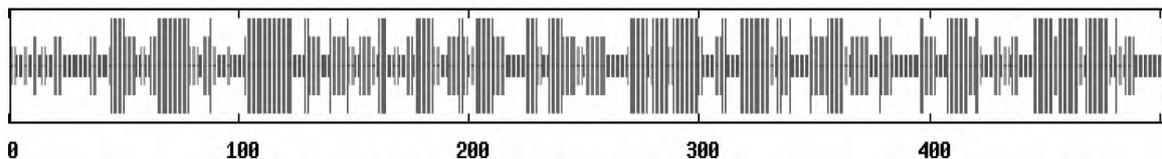


图 6 *MaNRT2* 蛋白 2 级预测

Fig. 6 Secondary structure prediction of *MaNRT2* protein

2.7 *MaNRT2* 蛋白同源比对 用 MEGA5.0 软件的 Neighbor-joining 算法, 选取了 11 个物种(At 拟南芥; Bn 甘蓝型油菜; Np 烟草; Sl 番茄; Gm 大豆; Ma 香蕉; Hv 大麦; Ta 小麦; Os 水稻; Zm 玉米; Cr 莱茵衣藻)的 *NRT2* 基因序列, 构建进化树, 用 Bootstrap 检验, 自展重复抽样 1 000 次。发育分析结果(图 7)显示, 香蕉位于双子叶植物和单子叶植物之间的位置。

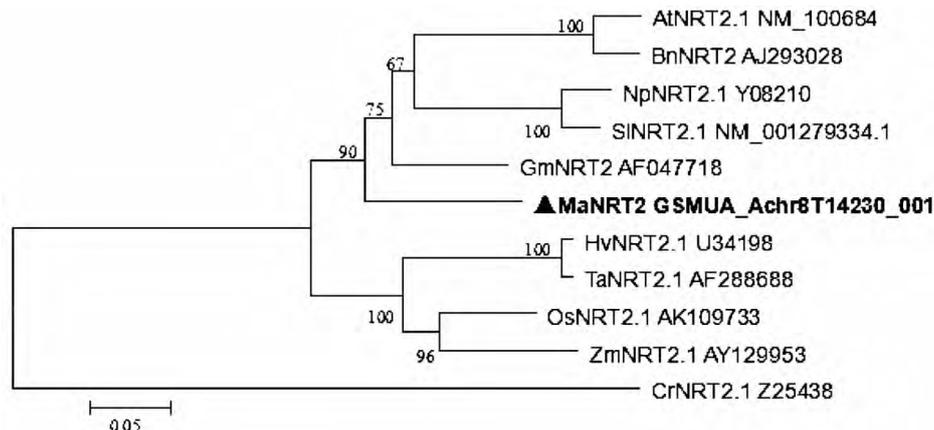


图 7 部分物种的 *NRT2* 氨基酸序列的系统进化树(加粗处为香蕉的 *NRT2* 序列)

Fig. 7 Phylogenetic tree of amino acid sequences of the *NRT2* from several plant species

3 讨论

硝态氮的吸收是植物硝态氮利用过程的第1步,为了适应环境中不同的氮素水平,植物进化出2种硝酸盐转运系NRT1和NRT2。与NRT1相比,NRT2基因家族编码的蛋白参与高亲和性硝酸盐转运系统,能够在植物处于低氮的逆境下发挥功能,是植物氮素吸收体系的关键生物大分子之一^[9]。本研究首次从香蕉中克隆得到*MaNRT2*基因,编码503个蛋白,含有MFS结构域、1个“A-G-W/L-G-N-M-G”共识区、12个跨膜结构域,属于疏水性蛋白,定位在细胞质膜上。*MaNRT2*的结构特征全部符合NRT2基因家族的共同特征^[10]。RNA-Seq测序和qRT-PCR表明,*MaNRT2*基因的表达水平具有显著的组织特异性,无论正常处理还是低氮处理,在根中的表达量均高于叶片中的,这与Orsel等^[11]在拟南芥中研究结果一致。笔者在研究中还发现,低氮处理后,叶片中的表达量升高,而根中的会下降,笔者推测,当土壤中的氮素严重匮乏时,根系无法从外界获取充足的氮素营养,只能利用植物地上部分组织中的氮素养分,加快体内的氮素转运,满足生命活动需求,从而表现出缺氮处理后期,叶片中*MaNRT2*表达量增加,而根中减少的现象。

目前,虽然研究者持续不断的发现NRT2家族新成员,然而,该基因家族在不同物种的数量是多少,该基因如何行使功能,这些都还未知,有待深入研究。笔者在研究中首次从香蕉中克隆得到*MaNRT2*基因,丰富了NRT2家族的物种来源多样性,对了解香蕉硝酸盐吸收转运的分子机理、筛选氮高效利用的香蕉品种等提供了基因资源和理论依据。

参考文献:

- [1] Alghuthaymi M A, Bahkali A H. Toxigenic profiles and trinucleotide repeat diversity of species isolated from banana fruits [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2015, 29(2): 324-330.
- [2] Charrier A, Berard J B. High-affinity nitrate/nitrite transporter genes (Nrt2) in *Tisochrysis lutea*: identification and expression analyses reveal some interesting specificities of Haptophyta microalgae [J]. *Physiol Plant*, 2015, 154(4): 572-590.
- [3] Brownlee A G, Arst H N. Nitrate uptake in *Aspergillus nidulans* and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster [J]. *Bacteriol* 1983, 155(3): 1138-1146.
- [4] Unkles S E, Hawker K L. *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(1): 204-208.
- [5] 汪进, 添先凤. 茶树硝酸盐转运蛋白基因的克隆和表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2014, 50(7): 983-988.
- [6] Zhao L Q, Ding. An improved CTAB-ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(6): 647-650.
- [7] Leng N J, Dawson A. EBSseq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(8): 1035-1043.
- [8] Forde B G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465(1/2): 219-235.
- [9] 袁丁. 5种木本植物NRT2基因家族的生物信息学分析与分子进化研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [10] Nakamura Y, Umemiya Y. Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding a putative Nrt2 nitrate transporter from peach [J]. *Tree Physiol*, 2007, 27(4): 503-510.
- [11] Orsel M, Chopin F. Nitrate signaling and the two component high affinity uptake system in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signal Behav* 2007, 2(4): 260-262.

Cloning and Expression Analysis of Nitrate Transporter Gene *MaNRT2* in Banana under Low Nitrogen Stress

HE Rui , PENG Yun , LIU Yang , ZENG Canbin , XU Min , QI Zhao ,
YAN Zhen , LUO Juan , RUAN Yunze , HE Chaozu , TANG Hua

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources , College of Agronomy , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China)

Abstract: Nitrogen is a necessary macro-element for plant growth and development , and is also a key factor limiting plant yield. High affinity nitrate transporter NRT2 is an important protein involved in nitrate nitrogen assimilation. In this study , banana was selected as experimental material , from which a differentially expressed NRT2 gene was identified by Illumina RNA-Seq. The whole cDNA sequence was obtained via PCR. Through bioinformatics , it was predicted that its length was 1 509 bp which encoded 503 amino acids , contained a MFS domain and belonged to NRT2 gene family named as *MaNRT2*. The results of RNA-Seq and qRT-PCR showed that *MaNRT2* was significantly tissue specific , with its expression being higher in root than in leaf. After the banana was treated with low nitrogen stress , the *MaNRT2* expression level rose up in leaf but declined in root. This indicated that *MaNRT2* gene had close relationship to nitrogen absorption and transport in banana.

Keywords: banana; low nitrogen stress; nitrate transporter 2; RNA-Seq; gene expression analysis