

文章编号: 1674-7054(2020)02-0138-07

## 盐胁迫下拟南芥 *SCAMP* 基因克隆和 表达的生物信息学分析

白雪杨<sup>1</sup>, 陈秀珍<sup>1</sup>, 黄天帆<sup>1</sup>, 江行玉<sup>1</sup>, 周 扬<sup>2</sup>

(1. 海南大学 热带作物学院/海南省耐盐作物生物技术重点实验室, 海口 570228;

2. 海南大学 园艺学院, 海口 570228)

**摘 要:** 为探究分泌载体膜蛋白(Secretory carrier membrane protein, SCAMP)的功能, 采用 PCR 方法从模式植物拟南芥中克隆到 5 个 *SCAMP* 基因, 进行生物信息学分析, 并通过实时荧光定量 PCR 技术分析 5 个 *SCAMP* 基因在盐胁迫下的表达模式。结果显示, 拟南芥 SCAMP 蛋白的相对分子量为 30.1~33.2 kDa, 等电点为 6.60~9.18, 属于不稳定性疏水蛋白, 二级蛋白结构中主要包含 4 种构象:  $\alpha$ -螺旋(Alpha helix, Hh)、无规则卷曲(Rand coil, Cc)、直链延伸(Extended strand, Ee)和  $\beta$ -折叠(Beta turn, Tt), 其中以  $\alpha$ -螺旋为主, 包含 4 个跨膜结构域, N 端和 C 端均在细胞膜内。实时荧光定量 PCR 结果表明, *AtSCAMPs* 的表达量均受盐胁迫诱导上调表达, *AtSCAMP1*, *AtSCAMP3*, *AtSCAMP4*, *AtSCAMP5* 基因在叶中的表达明显高于根, 且 *AtSCAMP4* 和 *AtSCAMP5* 在叶中受盐胁迫变化最明显。

**关键词:** 盐胁迫; 拟南芥; 分泌载体膜蛋白; 基因克隆; 表达分析; 生物信息学

中图分类号: Q 785; Q 786

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.02.003

植物在生长过程中会受到生物胁迫与非生物胁迫的影响。盐碱胁迫是非生物胁迫的一种, 不但制约植物生长, 同时也严重影响土地的利用。土壤的盐碱化是一个全球性的环境问题, 据联合国教科文组织和粮农组织的不完全统计, 世界上盐碱地已达到约  $9.5 \times 10^8 \text{ hm}^2$ , 相当于全球陆地总面积的 7.23%, 并且人类活动不断占用土地导致耕地面积逐渐减少, 土壤盐碱化的程度正在逐年增加。中国是一个农业大国, 盐碱地分布广泛, 总面积约有  $9.9 \times 10^7 \text{ hm}^2$ , 土壤的盐碱化问题非常严峻<sup>[1]</sup>。土壤中可溶性盐分含量过高会对植物造成盐害, 大部分植物在含盐量达 0.3% 的土壤会受到伤害<sup>[2]</sup>。盐胁迫对植物造成的伤害主要有渗透胁迫、质膜伤害、离子平衡失调以及代谢紊乱<sup>[3]</sup>。在面对盐胁迫时, 植物会采取一些相应的应答机制以减少对自身的危害, 植物的应答机制是将细胞质内过多的  $\text{Na}^+$  排出细胞外或将细胞质内的  $\text{Na}^+$  区隔到液泡中来维持细胞质内正常的  $\text{Na}^+$  浓度<sup>[4]</sup>。质膜上的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆转运蛋白 SOS1(salt overly sensitive 1) 将  $\text{Na}^+$  排出细胞, 即 SOS 途径; 而液泡膜上的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆转运蛋白 NHX 将  $\text{Na}^+$  区隔到液泡中, 即 NHX 途径<sup>[5]</sup>。植物利用 PM-ATPase 或 V-ATPase 和 V-PPase 所产生的跨膜  $\text{H}^+$  浓度梯度, 将细胞质中的  $\text{Na}^+$  排到细胞外部或将其隔离到液泡中, 从而调节细胞内  $\text{Na}^+$  的浓度, 调节细胞质的酸碱值及维持细胞内离子的稳态<sup>[6]</sup>。在植物中,  $\text{Na}^+$  区隔化是植物抵抗盐碱的重要过程, 主要依赖于液泡膜上的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白, 同时液泡膜上的  $\text{H}^+$ -ATPases 和 PPases 水解 ATP 释放的能量将  $\text{H}^+$  泵出膜外, 产生跨膜的电化学梯度, 进而驱动  $\text{Na}^+$  的逆向转运<sup>[7]</sup>。超表达液泡膜上  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因 *AtNHX1* 的拟南芥耐盐性得到明显提高<sup>[8]</sup>。将拟南芥 *AtNHX1* 基因转入棉花后, 转基因植株能够在高浓度 NaCl 条件下正常生长<sup>[9]</sup>。将绿豆

收稿日期: 2020-02-19

修回日期: 2020-02-23

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFE0207203-2); 国家自然科学基金(31660253); 海南大学科研团队项目(hdkytg201706); 海南大学科研启动项目(KYQD(ZR)1845)

第一作者: 白雪杨(1989-), 女, 海南大学热带作物学院 2017 级硕士研究生. E-mail: abbybai2020@163.com

通信作者: 周扬(1988-), 男, 博士, 讲师. 研究方向: 植物抗逆分子生物学. E-mail: zhouyang@hainanu.edu.cn

*VrNHX1* 基因导入拟南芥, 转基因拟南芥的耐盐性显著提高<sup>[10]</sup>。在番茄中超表达 *AtNHX1* 基因, 可以促进番茄细胞在盐胁迫下  $K^+$  从地下部向地上部运输, 提高液泡中  $K^+$  含量, 使  $K^+/Na^+$  提高, 减轻  $Na^+$  毒害<sup>[11]</sup>。Paulo 等用酵母双杂交的方法从人脑 cDNA 文库中找到 NHE7 的互作用蛋白, 又用免疫共定位/沉淀的方法确定了其与 SCAMP2 可以相互作用<sup>[12]</sup>。GRAHAM 等论证了哺乳动物中 NHE5 可以与 SCAMP2 相互作用<sup>[13]</sup>。之后在小麦中 TaSCAMP1 被证实可以与液泡膜的  $Na^+/H^+$  逆向转运蛋白发生相互作用, 并被推测与植物耐盐相关<sup>[14]</sup>, 而在拟南芥中, 利用 BiFC 实验和泛素酵母双杂实验证明 AtSCAMP3 可以与 AtNHX2 互作<sup>[15]</sup>。以上研究结果表明细胞中  $Na^+/H^+$  逆向转运蛋白的功能受到分泌载体膜蛋白 SCAMP 的调控。分泌载体膜蛋白 (Secretory carrier membrane protein, SCAMP) 是生物体内一种非常重要的膜蛋白, 存在于许多真核生物中<sup>[16]</sup>。哺乳动物有 5 个 SCAMP 基因 SCAMP1-SCAMP5, 研究证明, 哺乳动物中的 SCAMP 基因与神经递质的传递有关系, 且涉及神经递质信号传递中膜的去极化和突触前膜分泌突触小泡或密集核心小泡 (DCV)<sup>[17-18]</sup>。SCAMP3 控制着晚期质体腔内囊泡的形成和多囊泡质体以及溶酶体的分化<sup>[19]</sup>, 还在调节早期内体形成中起到重要作用<sup>[20]</sup>。植物 SCAMP 定位在根和花粉管等部分的质膜、初级质体或者反面高尔基体中<sup>[21]</sup>。为探究分泌载体膜蛋白 (Secretory carrier membrane protein, SCAMP) 的功能, 笔者采用 PCR 技术, 从模式植物拟南芥中克隆出了 5 个 SCAMP 基因, 利用生物信息技术对拟南芥 AtSCAMP 蛋白家族结构进行了预测, 并利用荧光定量 PCR 技术研究了它们在盐胁迫下的表达模式, 旨在为进一步研究和完善植物的耐盐机理提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 植物材料为哥伦比亚型拟南芥 (Col-0), 由本实验室保存。取野生型拟南芥种子清洗后用水浸泡, 遮光放于 4 °C 冰箱中 3 d, 然后把种子播种到 1/2 MS 固体培养基上, 竖直培养 10 d 后, 移栽幼苗至含有 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 1/2 MS 培养基上盐胁迫培养, 于盐胁迫培养 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 h 时分别取幼苗的根和叶, 并立即放入液氮中速冻, -80 °C 保存以备提取 RNA。

**1.2 拟南芥 RNA 的提取和 cDNA 反转录** 依据说明书, 使用植物总 RNA 提取试剂盒 (RNAplant Plus Reagent, DP437; TIANGEN 公司生产) 提取 RNA; 采用 TransScript One-Step gDNA Removal 和 cDNA Synthesis SuperMix 进行 RNA 反转录 (TaKaRa, R047A)。将样品用手拨打轻轻混匀后 42 °C 反应 15 min; 85 °C 反应 5 s; 4 °C 保存。获得的 cDNA 用 *Actin*<sup>[22]</sup> 引物扩增, 以检测 cDNA 的质量。

**1.3 *AtSCAMP* 基因的克隆** 根据拟南芥基因组网站 (www.arabidopsis.org) 上公布的 *AtSCAMP* 基因序列 [*AtSCAMP1* (基因登录号: AT1G61250), *AtSCAMP2* (基因登录号: AT1G11180), *AtSCAMP3* (基因登录号: AT2G20840), *AtSCAMP4* (基因登录号: AT1G03550), *AtSCAMP5* (基因登录号: AT1G32050)] 设计全长引物。引物序列为: *AtSCAMP1*-F: ATGGCTAATCGTTATGATCC, *AtSCAMP1*-R: TCAAACAGCGGCTC TCAAG; *AtSCAMP2*-F: ATGGGTGGTCGTTACGAT, *AtSCAMP2*-R: TCATATGGCAGCTCTCATG; *AtSCAMP3*-F: ATGTCTCGCTACCAGTCTC, *AtSCAMP3*-R: TCAGAGAGCTGCCATCATT; *AtSCAMP4*-F: ATGGCAGACACGATCCT, *AtSCAMP4*-R: TCATAGTGCACGCATCAAGGT; *AtSCAMP5*-F: ATGAA TCGCCACCACGATC, *AtSCAMP5*-R: TCACTTGTTCCCTAAAGTAG。将 1.2 中得到的 cDNA 混合作为模板进行扩增。将片段进行胶回收后连接 T 载体, 转化大肠杆菌后选取菌落 PCR 正确的样品进行测序。

**1.4 生物信息学分析** 采用 ProtParam 在线软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析 SCAMP 蛋白理化性质。采用 SOPMA 在线软件 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)) 预测 SCAMP 蛋白的二级结构。采用 TMHMM 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测 SCAMP 蛋白的跨膜结构。采用 MEGA7.0 软件对 SCAMP 蛋白做进化树分析。

**1.5 实时荧光定量 PCR** 利用 oligo7 软件设计 *AtSCAMP* 基因的荧光定量 PCR 引物 (表 1)。以 *Actin* 作为内标基因进行荧光定量 PCR 分析。采用染料法实时荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa, SYBR Premix EX Taq™ (Perfect Real time), R820A) 进行试验, 反应体系按照说明书进行。实时荧光定量 PCR 的扩增条件

表1 实时荧光定量PCR引物

Tab. 1 Primer sequence for real-time quantitative PCR

名称Primer	引物序列Primer sequence	
Actin	F: TATGAATTACCCGATGGGCAAG	R: TGGAACAAGACTTCTGGGCAT
<i>AtSCAMP1</i> -qPCR	F: TCGACCACTCTACCGTGCCTTC	R: TCGCTGCTTCCCGTCTCATTTC
<i>AtSCAMP2</i> -qPCR	F: CTTTGCTCCCGAACCTGCTG	R: CCAAGCGGTAGTAACGGCGATG
<i>AtSCAMP3</i> -qPCR	F: TTGCGGCGGTGGCTCCTC	R: GCCTCCTGCTTCATCTCTGCTG
<i>AtSCAMP4</i> -qPCR	F: ACGTGTCCACATCGCGTTCTG	R: TGCCACTCCCTCGGAAGTATGC
<i>AtSCAMP5</i> -qPCR	F: GCTTGCTGACTGGGAAGCTGAG	R: TCCTCATGGCTCGGTAGAGTGG

为 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环, 结束后读取荧光信号: 95 °C, 15 s; 60 °C, 15 s; 95 °C, 15 s。采用比较 CT 法计算目的基因的相对表达量, 目的基因的相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 其中  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{对照组}$ 。进行 3 次生物学重复, 取平均值进行作图。

## 2 结果与分析

**2.1 RNA 提取及 cDNA 反转录** 提取的 RNA 用 1% 的琼脂糖检测 (图 1A), 从图 1A 可见, 叶片中的 RNA 的 28S 和 18S 完整, 说明 RNA 质量比较好。用反转录试剂盒进行 cDNA 反转录, 得到的 cDNA 用内参基因 *Actin* 引物进行扩增 (图 1B), 从图 1B 可见, 产物没有非特异性扩增或者引物二聚体, 表明反转录得到的 cDNA 质量较好。

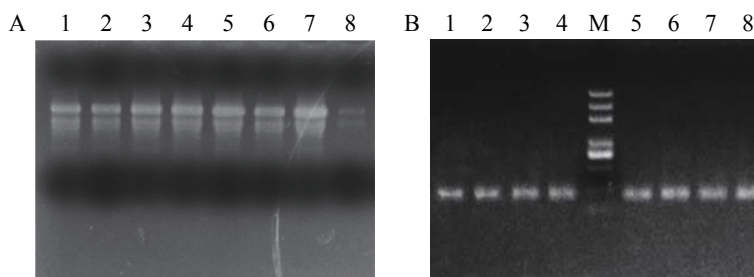


图1 拟南芥叶片中的 RNA 及 cDNA 扩增

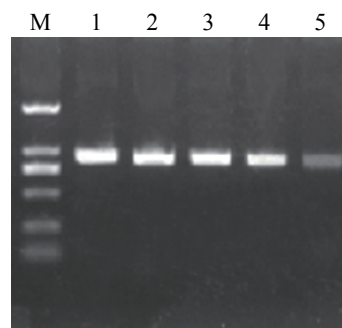
A: 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理叶片中的 RNA; 1~8: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 h 叶中 RNA。B: 内标基因 *Actin* 检测 cDNA 的扩增结果; M: 2 000 marker plus; 1~8: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 h cDNA 扩增结果。

Fig. 1 RNA and cDNA amplification of *Arabidopsis thaliana* leaves

A: RNA from *A. thaliana* leaves under 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl treatment; 1-8: RNA from leaves under 50 mM NaCl treatment at different hours (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 h). B: PCR amplification of *Actin* from leaf cDNA; M: 2 000 marker plus; 1-8: PCR product of cDNA under 50 mM NaCl at different hours (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 h).

**2.2 *AtSCAMP* 家族基因的克隆** 在拟南芥基因组网站 (www.arabidopsis.org) 上查找公布的 *AtSCAMP* 基因序列设计引物, 扩增得到长度为 750 ~ 1 000 bp 之间的片段 (图 2)。测序结果表明得到的目的片段分别为 870, 894, 849, 852, 795 bp, 与 *AtSCAMP1-5* 序列比对正确, 基因克隆成功。

**2.3 拟南芥 SCAMP 的生物信息学分析** *AtSCAMP1-5* 蛋白的氨基酸组成见表 2, 用 ProtParam 在线软件分析 *AtSCAMP1-5* 蛋白的理化性质。预测结果: *AtSCAMP1-5* 蛋白质相对分子量分别约为 32.6, 33.2, 32, 31.9, 30.1 kDa; *AtSCAMP1-5* 蛋白质等电

图2 *AtSCAMP* 基因扩增

M: DL2000 marker; 1~5: *AtSCAMP1-5* 基因的扩增产物

Fig. 2 Amplification of *AtSCAMP* genes

M: DL2000 marker; 1-5: PCR products of *AtSCAMP1-5*

表 2 拟南芥 SCAMP 蛋白氨基酸组成  
Tab. 2 Amino acid composition of SCAMP proteins in *Arabidopsis thaliana*

SCAMP	Ala(A)	Arg (R)	Asn (N)	Asp (D)	Cys (C)	Gln (Q)	Glu (E)	Gly (G)	His (H)	Ile (I)	%
AtSCAMP1	11.4	6.20	2.80	3.80	1.00	3.50	5.50	6.90	1.40	6.90	
AtSCAMP2	11.4	2.80	3.70	5.10	1.00	3.40	3.70	8.40	1.00	7.10	
AtSCAMP3	9.6	3.80	2.10	3.50	1.10	2.80	6.00	6.40	1.80	9.60	
AtSCAMP4	10.6	1.00	3.90	3.20	1.10	2.50	6.70	6.40	2.10	7.80	
AtSCAMP5	8.3	3.50	3.00	5.70	1.90	2.70	4.20	6.80	2.70	9.50	

SCAMP	Leu (L)	Lys (K)	Met (M)	Phe (F)	Pro (P)	Ser (S)	Thr (T)	Trp (W)	Tyr (Y)	Val (V)	%
AtSCAMP1	9.30	4.50	1.40	7.60	6.60	3.50	2.80	2.40	4.20	8.30	
AtSCAMP2	10.80	4.00	1.70	7.40	5.40	4.40	2.70	2.00	4.00	6.10	
AtSCAMP3	8.20	5.70	3.20	7.40	6.40	5.70	3.90	2.50	3.90	5.70	
AtSCAMP4	9.90	4.90	1.80	7.10	7.10	3.20	5.30	2.10	3.90	6.00	
AtSCAMP5	10.20	6.10	1.90	8.00	5.30	4.90	2.30	2.70	3.80	6.10	

点 (pI) 分别是 8.87, 9.18, 8.32, 6.60, 7.66; AtSCAMP1-5 蛋白质元素组成分别是  $C_{1526}H_{2321}N_{389}O_{392}S_7$ ,  $C_{1536}H_{2354}N_{402}O_{404}S_8$ ,  $C_{1491}H_{2274}N_{368}O_{389}S_{12}$ ,  $C_{1485}H_{2264}N_{372}O_{393}S_8$ ,  $C_{1409}H_{2135}N_{349}O_{361}S_{10}$ ; AtSCAMP1-5 蛋白质亲水性分别是 0.185, 0.162, 0.179, 0.120, 0.233, 属于疏水蛋白, 不稳定指数均大于 40, 表明它们均为不稳定蛋白。

用 SOPMA 在线软件对 AtSCAMP 家族蛋白二级结构进行预测, 分析发现, AtSCAMP 蛋白家族二级结构中都包含有 4 种构象:  $\alpha$ -螺旋 (Alpha helix, Hh),  $\beta$ -折叠 (Beta turn, Tt), 直链延伸 (Extended strand, Ee), 无规则卷曲 (Random coil, Cc), 其中含量最高的是  $\alpha$ -螺旋 (Hh), 约占蛋白质二级结构总量 44% ~ 50%, 含量第 2 的是无规则卷曲 (Cc), 约占总量 32% ~ 36%, 含量第 3 的是直链延伸 (Ee), 约占 11% ~ 16%, 含量最少的蛋白二级结构是  $\beta$ -折叠 (Tt), 含量约为 4% ~ 6% (表 3)。

表 3 拟南芥 AtSCAMP 蛋白家族二级结构含量  
Tab. 3 Contents of secondary structures of AtSCAMP proteins in *Arabidopsis thaliana*

AtSCAMP	$\alpha$ -螺旋(Hh)	$\beta$ -折叠(Tt)	直链延伸(Ee)	无规则卷曲(Cc)	%
AtSCAMP 1	49.48	5.88	11.76	32.87	
AtSCAMP 2	45.79	5.72	13.47	35.02	
AtSCAMP 3	48.94	6.03	15.25	29.79	
AtSCAMP 4	47.00	3.89	14.49	34.63	
AtSCAMP 5	44.70	4.55	14.77	35.98	

通过 TMHMM 在线软件对 AtSCAMP 蛋白家族进行跨膜结构域的预测, 结果 (图 3) 表明, AtSCAMP1-5 蛋白均具有 4 个跨膜结构域, N 端和 C 端均在细胞膜内。

通过 MEGA7.0 软件对 AtSCAMP 蛋白家族进行序列比对, 结果 (图 4) 可见, AtSCAMP1 与 AtSCAMP2 蛋白在进化关系上比较近, AtSCAMP3 与 AtSCAMP4 蛋白在进化关系上较近, 而 AtSCAMP5 蛋白与其他蛋白进化关系最远。

**2.4 AtSCAMP 基因在盐胁迫下的表达分析** 使用 qRT-PCR 方法研究 AtSCAMP 基因在  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 胁迫下的表达情况。结果 (图 5) 表明, 在  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 胁迫下, AtSCAMP1-5 基因在拟南芥的根、叶中都呈上调表达, 其中 AtSCAMP1, AtSCAMP3, AtSCAMP4, AtSCAMP5 基因在叶中的表达明显高于根中。AtSCAMP1 在叶中初期表达量随时间升高而升高, 3 h 达到第 1 个峰值, 约为起始表达量的 9 倍,



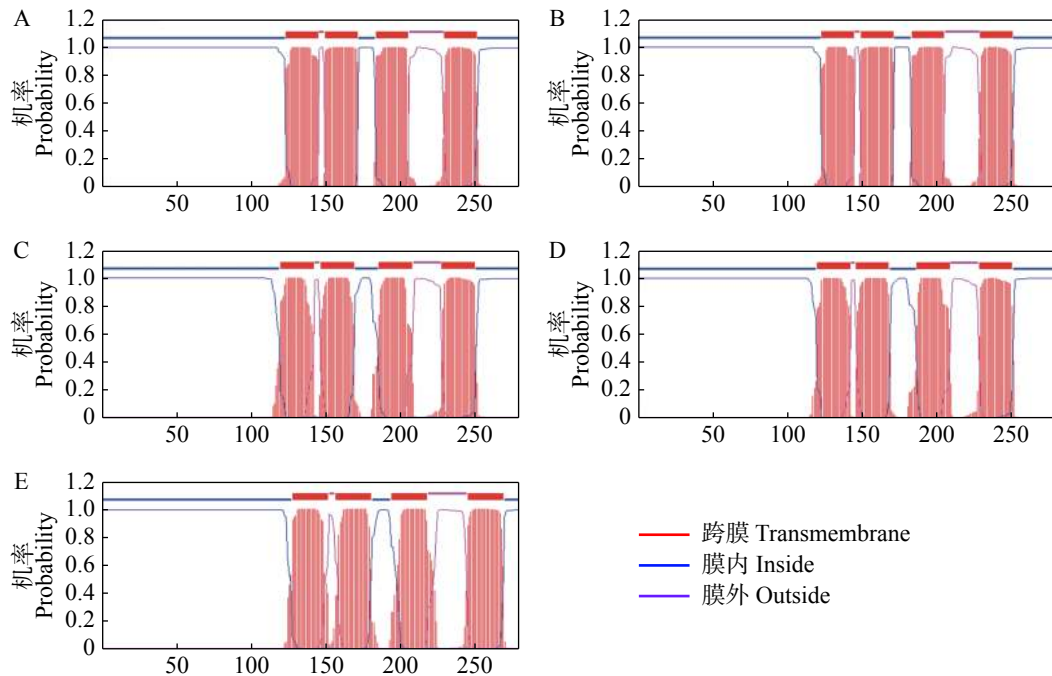


图3 拟南芥 SCAMP 蛋白跨膜结构域预测

Fig. 3 Transmembrane domain prediction of SCAMP proteins in *Arabidopsis thaliana*

A: *AtSCAMP1*; B: *AtSCAMP2*; C: *AtSCAMP3*; D: *AtSCAMP4*; E: *AtSCAMP5*

此后表达量下降,在盐胁迫诱导 9 h 后表达量又逐渐上升;而根中 *AtSCAMP1* 基因的表达量没有明显的变化(图 5A)。 *AtSCAMP2* 在叶中表达量高于根,初期随处理时间增加而增加,相对于其他 *AtSCAMP* 基因, *AtSCAMP2* 在根和叶中的表达量受盐胁迫的变化都不太明显(图 5B)。 *AtSCAMP3* 在根和叶中受盐胁迫诱导表达的模式与 *AtSCAMP1* 比较类似(图 5C)。叶中 *AtSCAMP4* 和 *AtSCAMP5* 基因受盐胁迫诱导变化明显,盐胁迫处理后表达量

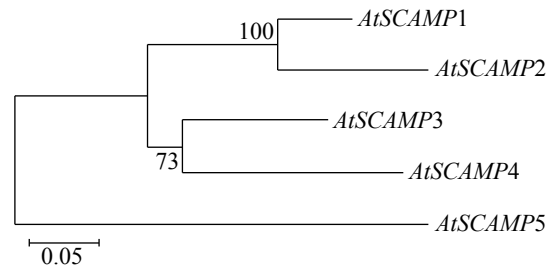


图4 拟南芥 SCAMP 蛋白的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of SCAMP proteins in *Arabidopsis thaliana*

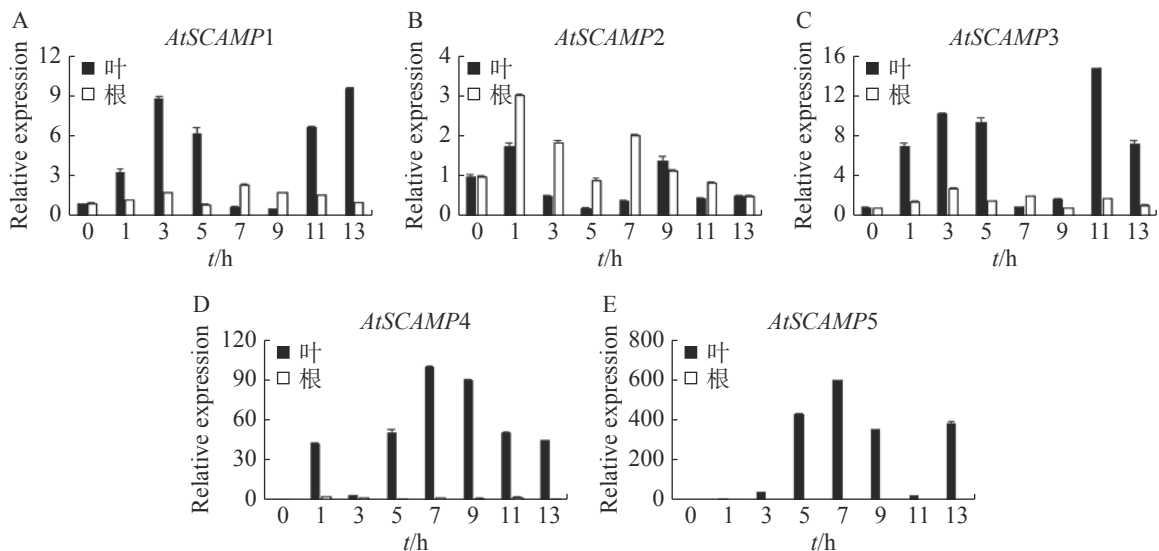


图5 盐胁迫下 *AtSCAMP* 基因的表达分析

Fig. 5 The expression analysis of *AtSCAMP* under salt stress

迅速上升, 而根中这 2 个基因在  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$  处理后的表达量变化都不明显(图 5D-E)。

### 3 讨 论

研究植物的耐盐机制有助于培育耐盐植物新品种, 提高盐碱地中植物的产量, 合理利用盐碱地。*SCAMP* 蛋白被证实是一种分泌载体膜蛋白质, 不论在哺乳动物中还是植物中都被证明可以与  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  转运蛋白进行互作, 且生化分析显示 NHE7 的 C 端和 *SCAMP* 第 2 个、第 3 个跨膜结构域中的细胞质环优先结合, *SCAMP2* 中缺少这一段的蛋白与 NHE7 的结合明显减弱<sup>[12-13]</sup>。笔者发现, *AtSCAMP* 蛋白具有 4 个跨膜结构域, 其 N 端和 C 端均在膜内, 为此推测其定位在膜上, 说明它们与细胞膜上的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白互作是有可能的。已有研究<sup>[23-27]</sup> 表明, 植物体内液泡膜上的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白 (NHX) 和细胞质膜上的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白 (SOS1) 都在植物耐盐机制中发挥着重要的作用。小麦 *SCAMP* 基因转化到拟南芥和水稻中能够明显提高转基因拟南芥和水稻的耐盐抗性<sup>[15]</sup>。笔者发现从拟南芥中克隆的 5 个 *SCAMP* 基因均在受到盐胁迫诱导后上调表达(图 5), 由此推测 *SCAMP* 基因与植物耐盐性相关。

有研究<sup>[5]</sup> 表明 *SCAMP3* 在调节早期内体形成中起到重要作用。笔者通过对盐胁迫下 *SCAMP* 基因表达量具体分析发现, 在盐胁迫初期时, *SCAMP1-5* 基因都呈现上升趋势, 与该结果相似; 实时荧光定量 PCR 结果还显示在盐胁迫下 *SCAMP* 基因表达量在开始上升后都存在 1 次下降趋势, 由此推测 *SCAMP* 可能在应对盐胁迫时并没有单独发挥作用, 而是可能与其他蛋白互作。文献 [15] 也发现在拟南芥中 *AtSCAMP3* 可以与 *AtNHX2* 互作。文献 [14] 也发现在小麦中 *TaSCAMP1* 可以与  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白产生荧光发生相互作用, 且表达量在盐处理时升高。这些结果都说明, *AtSCAMP* 可能参与了植物的耐盐调控途径。本研究克隆得到的 *AtSCAMP1-5* 基因均已构建到植物表达载体和酵母表达载体中, 本实验室下一步将深入研究这些基因的功能。

### 参考文献:

- [1] 胡举伟, 张会慧, 孙广玉.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  胁迫对青龙桑、蒙古桑叶片生理和叶片光系统 II 活力的影响[J]. 中南林业科技大学学报, 2015, 35(5): 51-58.
- [2] 王培培, 宋萍, 张群. 磷脂酶 D 信号转导与植物耐盐研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(10): 58-65.
- [3] 陈永快, 王涛, 廖水兰, 等. 逆境及生长调节剂对作物抗逆性的影响综述[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(23): 68-72.
- [4] KRONZUCKER H J, BRITTO D T. Sodium transport in plants: a critical review [J]. *New Phytologist*, 2011, 189(1): 54-81.
- [5] 周扬, 胡艳平, 杨成龙, 等. 盐生植物海马齿 *SpCBL10* 基因的克隆及结构预测[J]. 分子植物育种, 2014, 12(4): 765-771.
- [6] 毛桂莲, 许兴, 徐兆桢. 植物耐盐生理生化研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(1): 48-51.
- [7] DEINLEIN U, AARON B, STEPHAN, et al. Plant salt-tolerance mechanisms [J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(6): 371-379.
- [8] GAXIOLA R, RAO R, SHERMAN A, et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, *AtNhx1* and *Avp1*, can function in cation detoxification in yeast [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1480-1485.
- [9] HE C, YAN J, ZHANG H, et al. Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field [J]. *Plant Cell Physiology*, 2005, 46(11): 1848-1854.
- [10] MISHRA S, ALAVILLI H, LEE B, et al. Cloning and functional characterization of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene from mungbean (*VrNHX1*) and its ectopic expression enhanced salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): 1-14.
- [11] RODRÍGUEZ-ROSALES M P, JIANG X Y, GALVEZ F J. Overexpression of the tomato  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter *LeNHX2* confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization [J]. *New Phytologist*, 2008, 179(2): 366-377.
- [12] LIN P, WILLIAMS W, LUU Y, et al. Secretory carrier membrane proteins interact and regulate trafficking of the organellar  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$  exchanger NHE7 [J]. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(9): 1885-1897.
- [13] DIERING G H, CHURCH J, NUMATA M. Secretory carrier membrane protein 2 regulates cell-surface targeting of brain-enriched  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger NHE5 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 284(20): 13892-903.
- [14] 王莉. 小麦耐盐基因的克隆与功能研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2010.
- [15] 李杰辉. 拟南芥 *AtSCAMP* 家族的功能研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2011.
- [16] BRAND S H, LAURIE S M, MIXON M B, et al. Secretory carrier membrane proteins 31-35 define a common protein com-

- position among secretory carrier membranes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(28): 18949 – 18957.
- [17] GUO Z, LIU L, CAFISO D, et al. Perturbation of a very late step of regulated exocytosis by a secretory carrier membrane protein (SCAMP2)-derived peptide [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(38): 35357 – 35363.
- [18] BURGESS T L, KELLY R B. Constitutive and regulated secretion of proteins [J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1987, 3(3): 243 – 293.
- [19] FALGUIERES T, CASTLE D, GRUENBERG J. Regulation of the MVB pathway by SCAMP3 [J]. *Traffic*, 2012, 13(1): 131 – 142.
- [20] THOMAS P, WOHLFORD D, QUYEN L. SCAMP 3 is a novel regulator of endosomal morphology and composition [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 478(3): 1028 – 1034.
- [21] WANG H, TSE Y C, ANGUS H Y, et al. Vacuolar sorting receptors (VSRs) and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) are essential for pollen tube growth [J]. *The Plant Journal*, 2010, 61(5): 826 – 838.
- [22] 付乾堂, 余迪求. 拟南芥 *AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在非生物胁迫条件下的表达分析 [J]. *遗传*, 2010, 32(8): 848 – 856.
- [23] 王立光, 叶春雷, 陈军, 等. 植物  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ / $\text{H}^+$ 反向转运体: pH 平衡与囊泡运输 [J]. *生物技术通报*, 2020, 36(4): 1 – 8.
- [24] XU H, JIANG X, ZHAN K, et al. Functional characterization of a wheat plasma membrane  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$  antiporter in yeast [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 473(1): 8 – 15.
- [25] YOKOI S, QUINTERO F J, CUBERO B, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$  antiporters in the salt stress response [J]. *The Plant Journal*, 2002, 30(5): 529 – 539.
- [26] LIU J, ISHITANI M, HALFTER U, et al. The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(7): 3730 – 3734.
- [27] HUANG G T, MA S L, BAI L P, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(2): 969 – 987.

## Cloning and Bioinformatics Analysis of *SCAMP* Genes from *Arabidopsis thaliana* under Salt Stress

BAI Xueyang<sup>1</sup>, CHEN Xiuzhen<sup>1</sup>, HUANG Tianfan<sup>1</sup>, JIANG Xingyu<sup>1</sup>, ZHOU Yang<sup>2</sup>

(1. College of Tropical Crops/Hainan Key Laboratory for Biotechnology of Salt Tolerant Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228;

2. College of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** To investigate the role of secretory carrier membrane protein (*SCAMP*), five *SCAMP* genes were cloned from *Arabidopsis thaliana* by PCR method for bioinformatics analysis, and their expression under salt stress was analyzed by using the real time quantitative PCR (qRT-PCR). Bioinformatics analysis showed that the *AtSCAMP* proteins have a molecular weight of 30.1-33.2 kDa with an isoelectric point (pI) of 6.60-9.18, and hence belong to unstable hydrophobic proteins. The secondary structure of the *AtSCAMP* proteins contains four conformations:  $\alpha$ -helix (Hh), random coil (Cc), extended strand (Ee) and  $\beta$ -turn (Tt), of which  $\alpha$ -helix is the main part. There are four transmembrane domains in the *AtSCAMP* proteins, and the N-terminus and C-terminus are located in the cell membrane. The qRT-PCR results showed that the expression of the *AtSCAMP* genes was all up-regulated in response to salt stress. The expression of *AtSCAMP1*, *AtSCAMP3*, *AtSCAMP4* and *AtSCAMP5* was higher in the leaves of *A. thaliana* than in the roots, and the most significant changes were found in the expression of *AtSCAMP4* and *AtSCAMP5* in leaves under salt stress.

**Keywords:** salt stress; *Arabidopsis thaliana*; secretory carrier membrane proteins; gene cloning; expression analysis; bioinformatics