

麻疯树水通道蛋白新基因 *JcPIP* 干旱胁迫下的功能分析

王云霄¹, 张颖², 江璐玳¹, 牛蓓¹, 陈放^{1*}

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 海南师范大学生物系, 海口 571158)

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 从大戟科(Euphorbiaceae)耐旱植物麻疯树(*Jatropha curcas*)cDNA 中克隆得到了一个麻疯树质膜内蛋白(PIP)新基因, 命名为 *JcPIP*。聚类分析表明, 麻疯树 PIP 蛋白与蓖麻、葡萄和菠菜的 PIP 蛋白在进化上有最近的亲缘关系。将 *JcPIP* 基因在非洲爪蟾卵母细胞(xenopus oocytes)中异源表达发现细胞膨胀率扩大了 10 倍, 表明 *JcPIP* 基因编码的是一个水通道蛋白。合成亲水性、抗原性好的 *JcPIP* 保守序列多肽, 制备并纯化 *JcPIP* 多克隆抗体。Western-blot 检测显示 *JcPIP* 蛋白富集在 29 kDa 区段, 且在麻疯树各组织中均有大量表达。PEG-6000 干旱胁迫下麻疯树叶片 *JcPIP* 蛋白丰度增加, 复水后丰度开始下降, 表明 *JcPIP* 与麻疯树的耐旱性相关。

关键词: 麻疯树; 水通道蛋白; 聚类分析; Western-blot; 功能分析; 干旱胁迫

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)04-0289-07

Cloning of a New Aquaporin Gene (*JcPIP*) from *Jatropha curcas* and Analysis of Its Function under Drought Stress

WANG Yun-xiao¹, ZHANG Ying², JIANG Lu-ding¹, NIU Bei¹, CHEN Fang^{1*}

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Department of Life Science, Hainan Normal University, Haikou 571168, China)

Abstract: cDNA of *Jatropha curcas* was amplified by PCR with degenerated primers, a new plasma membrane intrinsic protein gene (*JcPIP*) was cloned. Phylogenetic analysis indicated that PIPs of *Jatropha curcas* was closer relationship to those in *Ricinus communis*, *Vitis vinifera* and *Spinacia oleracea*. The cRNA of *JcPIP* was hetero expression in xenopus oocytes as a water channel and increased swelling rate by 10 times. A 13 amino acid sequence peptide was selected from the hydrophilic conserved peptides. Then a high titer polyclonal antibody was obtained by immunizing rabbits with the peptide. ELISA analysis showed the titer of rabbit serum against anti-peptide of *JcPIP* was up to 10⁴. The location of *JcPIP* in *Jatropha curcas* was analysed with western-blot. *JcPIP* was major in 29 kDa band and located in all plant tissues. Treated with PEG-6000, the amount of *JcPIP* increased, however, decreased under the condition of rewater. It suggested that *JcPIP* related with drought tolerance of *Jatropha curcas*.

Key words: *Jatropha curcas*; Aquaporin; Phylogenetic analysis; Western-blot; Function analysis; Drought stress

水是生命之源。植物的固着生活决定了自身对水分的强依赖性。从水分长距离运输到单个细胞扩展以及渗透调节等许多生理过程都离不开水分的跨膜运输。在水分的跨膜运输过程中, 植物水

通道蛋白(Aquaporin)起到非常重要的作用。它们介导细胞与介质之间快速的被动的水分运输, 是水进出细胞的主要途径。在植物中, 水通道蛋白属于多基因家族。目前, 已经从模式植物拟南芥

(*Arabidopsis thaliana*)中克隆了 35 个水通道蛋白同系物,它们在种子萌发、细胞伸长、气孔运动及逆境应答等过程的水分运输中起着关键作用,对水通道蛋白的含量及活性的调控可能是生物体在水分亏缺条件下调控水分交换的方式之一^[1]。因此,植物水通道蛋白作为与抗旱相关的重要基因受到了广泛的关注^[2]。

麻疯树 (*Jatropha curcas*) 是大戟科 (Euphorbiaceae) 的一种油脂植物, 在我国的云南、四川、贵州、广东、广西、海南、福建和台湾都有大量分布, 具有较大经济开发潜力。种仁含油率高达 50%, 可用来研制生物柴油。汁液含有大量毒蛋白、麻疯酮等抗病毒、抗肿瘤成分。由于繁殖生长快, 喜暖热气候, 尤其耐干旱、贫瘠, 麻疯树已成为我国干热河谷地区荒山绿化、保水固土的重要树种。本实验室克隆了一个麻疯树水通道蛋白新基因 *JcPIP* (*Jatropha curcas* Plasma membrane intrinsic protein), 并对编码蛋白的结构进行了分析。在异源表达系统非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵母细胞 (xenopus oocytes) 中对编码蛋白的功能进行了鉴定, 发现该基因编码一个功能水通道蛋白。对其在干旱胁迫及复水条件下的蛋白丰度情况进行了研究, 以进一步探讨麻疯树的抗旱机理, 为麻疯树的育种工作提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

从四川省攀西地区采集麻疯树 (*Jatropha curcas*) 幼嫩叶片、幼茎、幼根、花、幼嫩果皮、成熟胚乳, 用液氮保存。收集成熟麻疯树种子用于温室培养。非洲爪蟾卵母细胞 (xenopus oocytes) 由四川大学华西实验室培养。成年雄性新西兰兔购于华西实验动物中心, KLH 和 ProteinG 蛋白柱料购自 Pierce 公司, 多肽合成于成都川抗派德生物医药科技有限公司。弗氏佐剂购自 Sigma 公司。

1.2 RNA 提取

按皂土法^[3]从麻疯树幼嫩叶片、幼茎、幼根、花、幼嫩果皮、成熟胚乳中提取总 RNA。

1.3 PCR 和 RT-PCR 扩增

RT-PCR 按 TaKaRa 公司 AMV 反转录酶操作手册进行。cDNA 第一链合成之后, 室温放置 10 min, 再按常规 PCR 法扩增 cDNA 第二链, 合成的

cDNA 作为 PCR 反应的模板。基于对高等植物水通道蛋白基因序列进行分析, 设计 1 对简并引物用于 PCR 和 RT-PCR 的扩增。其序列分别是: P1: 5'-CGG(C/T)ATA(A/T)CTGG(A/T)GG(A/T)C-3', P2: 5'-CACCGAA(G/C)CT(A/T/C)CT(C/T)GC-3'。扩增体系为 5 μ l 10 \times PCR buffer, 1 U *ExTaq*TM 聚合酶、0.2 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTPs 引物各 150 ng、100 ng 模板、双蒸水加至总量为 50 μ l。*ExTaq*TM 聚合酶等试剂购自大连宝生物工程有限公司。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后 4 $^{\circ}$ C 保存。反应在 Icyler Thermalcycler (Bio-RAD) 中进行。cDNA 全长由 Gene RacerTM Kit (Invitrogen 公司) 获得。

1.4 扩增产物回收及克隆测序

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用上海华舜小量胶回收试剂盒回收。将回收 DNA 片段连接到 pMD18-T 载体上 (TaKaRa 公司), 并转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 中, 挑起经菌落 PCR 验证确认含有插入目的片段的菌落作穿刺培养 (37 $^{\circ}$ C, 12 h)。将培养物送上海生物工程技术公司测序。

1.5 蛋白同源性分析

将推测得到的氨基酸序列在 NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源搜索, 进行同源分析比较。

1.6 质粒的构建, 体外转录、加帽合成 cRNA

用带 *Kpn* I 酶切位点的上游引物 DP1: 5'-GCGGTACCATGGCCAAG-3' 和 *Sca* II 酶切位点的下游引物 DP2: 5'-GCCCCGCGTTGGTGGG-3' 从麻疯树 cDNA 中扩增 *JcPIP* 开放阅读框序列。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用上海华舜小量胶回收试剂盒回收。将此回收小片段插入经过 *Kpn* I 和 *Sca* II (TaKaRa 公司) 双酶切处理过的 pBluescript SK (TaKaRa 公司) 真核体外转录质粒中, 通过 PCR 及酶切鉴定, 获得起点位于 T7 侧的 pBluescript SK-*JcPIP2* 体外转录质粒。用 *Kpn* I 酶切质粒成线性, 再回收、定量作为体外转录模板。

按照 RiboMAXTM 体外转录试剂盒 (Promega 公司) 说明进行体外转录反应, 应用 Ribo m⁷ G Cap Analog 进行体外加帽反应, 采用 20 μ l 体系, 37 $^{\circ}$ C 反

应 6 h。在反应 4 h 时再加入 1 次 RNA 聚合酶, 来增加 RNA 产量。然后应用无 RNase 的 DNase 消化模板 DNA, 酚氯仿抽提, 乙醇沉淀 3 次, 最后得到纯化 cRNA。将纯化产物用 DEPC 水稀释至 $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ 。

1.7 非洲爪蟾卵母细胞的准备, 显微注射及渗透通透性分析

于实验前一天晚上在非洲爪蟾背部卵黄囊注射人绒毛膜促性腺激素 800 U (美国 UCL 公司), 人工促排卵。次日清晨收卵, 仔细去除死卵和坏卵。选取 V 或 VI 期卵母细胞用 2% 半胱氨酸 (pH 7.8) 去胶膜。进行显微注射, 每个爪蟾卵母细胞注入 cRNA (50 ng), 对照细胞注入相同体积的水。将处理细胞转入培养液 [88 mmol/L NaCl, 1 mmol/L KCl, 2.4 mmol/L NaHCO_3 , 10 mmol/L HEPES-NaOH, 0.33 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.41 mmol/L CaCl_2 , 0.82 mmol/L MgSO_4 , pH 7.4] 渗透压摩尔浓度 Osm 为 200 mosmol 中 18℃ 悬浮培养 3 d。然后将培养液稀释至渗透压摩尔浓度 Osm 为 40 mosmol。由科学级 CCD 摄像机每隔 5 s 捕捉一张细胞体积变化的图片, 摄取图像并存入计算机中, 再通过 Imaging Pro III 数字图像处理分析软件计算细胞的面积和体积。根据公式: $P_f = V_0[d(V/V_0)/d_t]/[S \times V_w \times (Osm_{in} - Osm_{out})]$ 计算细胞渗透性水通透系数 P_f (Osmotic water permeability), 其中: d 为细胞直径, V/V_0 为相对体积比, S 为细胞表面积, Osm 为渗透压摩尔浓度。细胞最初体积: $V_0 = 8.87 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$; 细胞最初表面积: $S = 0.042 \text{ cm}^2$; 水分子体积: $V_w = 18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ [4]。

1.8 多肽设计、偶联

用 DNA Star 软件设计多肽氨基酸序列为 CSGGGANSVNTGYS, 并在其 N 端增加一个半胱氨酸残基, 以利于偶联载体。此多肽与 KLH 偶联 [5], 方法见 Pierce 偶联试剂盒说明。

1.9 抗多肽抗体的制备和 ELISA 效价测定

2.5 kg 成年雄性新西兰兔, 初次免疫用 1 mg 多肽-KLH 偶联物与等体积弗氏完全佐剂 (FCA) 充分乳化后, 于背部皮下多点注射。初次免疫后分别于 20 d, 40 d, 60 d 用弗氏不完全佐剂 (FIA) 完全乳化的抗原 1 mg 进行加强免疫。每次免疫后 7~10 d, ELISA 方法检测血清效价, 结果判断标准为: (待测血清 $A_{405} - \text{空白对照 } A_{405}$) / (阴性对照 $A_{405} - \text{空白对$

照 A_{405}) ≥ 2.1 判定为阳性反应, 反之为阴性反应。测定结果取 4 个孔的平均值。效价达到 1×10^4 时, 放血分离血清, 用 protein G 亲和层析法, 纯化抗肽抗体 IgG, 并保存于 0.01 mol/L 的 PBS 中。

1.10 叶相对含水量的测定

相对含水量 (RWC) 按 $\text{RWC}(\%) = [(\text{鲜重} - \text{干重}) / (\text{饱和重} - \text{干重})] \times 100\%$ 公式计算。剪下叶后马上称鲜重, 然后放入装有蒸馏水的烧杯中, 黑暗处放置 24 h 后称饱和重, 之后在鼓风烘箱中于 80℃ 烘干 48 h 称干重。实验重复 3 次。

1.11 PEG-6000 干旱处理麻疯树幼苗以及膜蛋白的分离

选取优质种子播种于花盆中, 25℃ 下培养 1 个月, 其间对苗木进行正常的浇水管理。在实验前几天对幼苗进行连续浇水处理, 使花盆中的土壤处于饱和含水状态, 然后挑选生长一致的幼苗分别进行浇水处理 (对照) 和 30% PEG-6000 浇灌处理 3 d, 再复水 1 d。每天收集叶片进行实验, 重复 3 次。

采用两相法从麻疯树幼苗组织中提取质膜囊泡组织, 再进行质膜内膜蛋白的分离。质膜囊泡的制备: 将幼嫩的麻疯树幼苗在冰上剪碎, 加预冷的匀浆液 (330 mmol/L 蔗糖, 100 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris, 0.05% MES (2-N-吗啡啉-乙磺酸), 5 mmol/L 二硫苏糖醇, 完全蛋白抑制剂 (Roche, Mannheim, Germany), 2 mmol/L DTT, pH 7.5) [6], 于组织匀浆器中打磨 4~5 次。用四层纱布过滤, 滤液于 $10\,000 \times g$ 下离心 10 min, 收集上清液于 $150\,000 \times g$ 下离心 30 min, 沉淀用少量预冷的粗膜缓冲液 (10 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 1 mmol/L DTT, 0.25 mol/L 蔗糖) 悬浮。得到粗膜制剂即微粒体 (15 ml)。粗膜沉淀 10 ml 与两相系统液 (3.0 g PEG-3350, 3.0 g 右旋糖苷 T-500, 28 ml 蔗糖-KP 缓冲液, 4.8 ml 300 mmol/L NaCl) 混匀, 冰上激烈搅拌 5 min, 然后于 $10\,000 \times g$ 下离心 4 min。吸取上清液用纯膜悬浮液 (0.25 mol/L 山梨醇, 1 mmol/L EGTA, 20 mmol/L Tris-acetate, 2 mmol/L DTT, 2 mmol/L MgCl_2) 稀释, 然后于 $150\,000 \times g$ 下离心 30 min。沉淀悬浮于相同的缓冲液中即为质膜, 贮于 -70℃。质膜内膜蛋白的分离: 根据 Javot 的方法 [7] 将质膜提取物加入蛋白增溶缓冲液 (5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 4 mol/L 尿素, 和 5 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5) 于冰上放置 10 min。然后在 $100\,000 \times g$

下离心 30 min。再用缓冲液(20 mmol/L NaOH, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Tris-HCl, pH 8)抽提沉淀物几次, 以去掉膜组织。最后用缓冲液(9 mmol/L KCl, 300 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L Na₂EDTA, 50 mmol/L NaF, 5 mmol/L DTT, 2 μg ml⁻¹亮抑酶肽(Leupeptin), 10 mmol/L Tris-borate, pH 8.3)溶解沉淀物并储存在 -70℃ 备用。

1.12 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western 免疫印迹实验

利用 Bio-Rad Mini Protein System, 分离胶浓度为 15%。将蛋白液在 100 000 × g 下离心 30 min 收集沉淀。样品在上样前加入 1% (W/V) SDS 和 100 mmol/L 1,2-二巯基乙烷于 37℃ 下温育 30 min, 以用来分离植物水通道蛋白的二聚体。每个上样孔的蛋白量大约为 15 μg。

将麻疯树各组织部位的膜蛋白、经干旱胁迫处理的叶和对照膜蛋白分别在 15% SDS-PAGE 上电泳分离后, 转移至硝酸纤维素膜上, 按 Towbin^[8]的方法进行抗体结合和酶显色反应。一抗为 JcPIP 多肽抗体的抗血清, 工作浓度为 1: 1000, 二抗为碱性磷酸酯酶(AP)偶联的山羊抗兔 IgG, 工作浓度为 1: 1000, AP 的反应底物为氯化硝基四氮唑蓝(NBT)和 5-溴-4-氯-3-噻磷酸甲苯胺蓝(BCIP)。

2 结果和分析

2.1 JcPIP 基因 cDNA 的克隆

从麻疯树幼嫩叶片中提取总 RNA 作为反转录的模板合成 cDNA。用简并引物 P1, P2 及反转录

产物进行 PCR 扩增, 经琼脂糖电泳检测, 得到一条近 400 bp 的单一带, 和预计的片段相符合。将其胶回收后与载体 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 JM109。经菌落 PCR 验证, 测序和序列分析表明该片段长 407 bp, 属植物水通道蛋白家族中质膜内膜蛋白(PIPs)基因的保守区序列。用 GeneRacerTM Kit 得到 5'端和 3'端的序列, 从而得到全长 cDNA 序列为 933 bp, 基因登录号为 EF030420, 命名为 JcPIP(麻疯树质膜内膜蛋白基因)。该基因编码 280 个氨基酸, 成熟肽含有 224 个氨基酸, 在 N 端有一个含 56 个氨基酸的信号肽。在多肽的 N 末端和 C 末端较对称分布着两个 Asprargines-Proline-Alanine (NPA)基序, 它们是水通道蛋白所共有的特征序列, 保持水分转运活性的必需氨基酸基序^[9]。在第 148 个氨基酸处有一个 GGGANXXXXGY 基序, 第 218 个氨基酸处有一个 TGI/FGAAVI/YN 基序, 是所有高等植物 PIPs 所共有的两个高度保守基序^[9]。由氨基酸序列推断 JcPIP 蛋白的分子量为 29.9 kDa, 等电点 PI 值为 9.1, 属于碱性多肽。

2.2 JcPIP 蛋白同源性分析

以推导的 JcPIP 氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast, 发现 JcPIP 蛋白和其它高等植物的 PIPs 氨基酸序列有非常高的同源性。其中同源性最高的是蓖麻(*Ricinus communis*)PIP, 有 90% 的氨基酸序列同源; 葡萄(*Vitis vinifera*) PIP (88%)。其次是菠菜(*Spinacia oleracea*) SoPIP2; 1 (Genbank 登录号: AAA99274)(87%) (图 1)。同源性最低的是小麦(*Triticum aestivum*), 也有近 60% 的氨基酸序列同源。

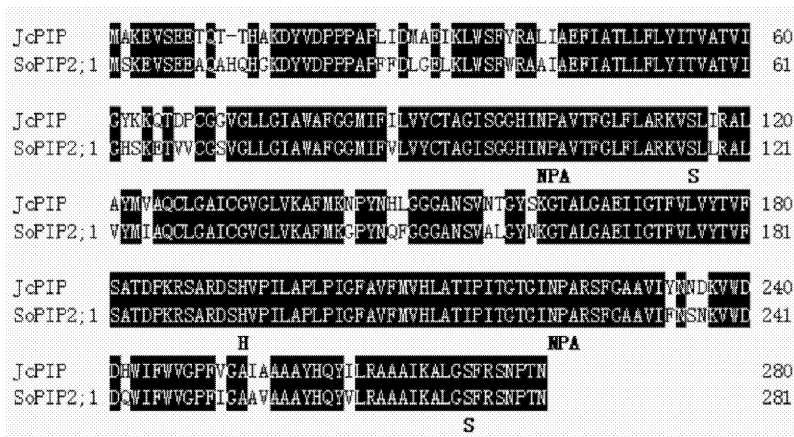


图 1 JcPIP 推导的氨基酸序列与 SoPIP2;1 的比对

Fig. 1 Comparison of the deduced amino acid sequence of JcPIP and SoPIP2;1

2.3 *JcPIP* 基因在非洲爪蟾卵母细胞中的表达

JcPIP cRNA 注入非洲爪蟾卵母细胞后改变了细胞膜的水通透性。表达 *JcPIP* 基因的细胞膨胀率为 0.082 U min^{-1} , 比对照细胞高 10 倍以上, 这说明 *JcPIP* 基因编码的蛋白是一个水通道蛋白。由公式计算得到表达 *JcPIP* 基因的细胞渗透性水通透系数 P_f 为 0.0125 cm s^{-1} , 对照细胞为 0.0012 cm s^{-1} 。

2.4 抗肽抗体的制备以及 ELISA 测定效价

设计的肽段为亲水性、柔韧性、抗原性较好的 13 个氨基酸 CSGGGANSVNTGYS, 且在多肽的 N 端加上一个半胱氨酸以便于耦联。用此多肽到 NCBI 数据库搜索, BLAST 输出结果为片段分值低、期望值高, 说明此肽段不与其他蛋白同源。新西兰兔经 4 次免疫后, 耳缘取血, 分离血清, 常规间接 ELISA 方法检测血清效价, 最大稀释度为 1:51200, 即该抗血清的效价为 10^4 。

2.5 叶的水分变化

对照麻疯树幼苗叶的相对含水量为 92.5%。经 30% PEG-6000 溶液浇灌胁迫后, 相对含水量下降。胁迫处理 3 d 后的幼苗叶片开始发生了萎焉现象。复水 1 d 后, 叶相对含水量上升到 73.2% (图 2)。

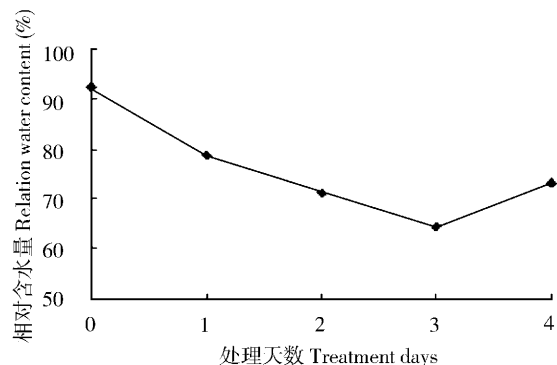


图 2 30% PEG-6000 处理后麻疯树叶片的相对含水量

Fig. 2 The RWC of leaves of *J. curcas* treated with 30% PEG-6000

2.6 水通道蛋白的分布

分别从麻疯树幼茎、幼叶、幼根、花、成熟胚乳、幼嫩果皮提取膜蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析, 用制备的水通道蛋白抗体进行 Western-blot 检测 (图 3)。可见, 在 29 kDa 处检测出了 *JcPIP* 蛋白, 说明 *JcPIP* 蛋白在麻疯树的幼茎、幼叶、幼根、花、成熟胚乳、幼嫩果皮中都有分布。在幼茎中丰度最高, 在成熟胚乳中丰度略低。

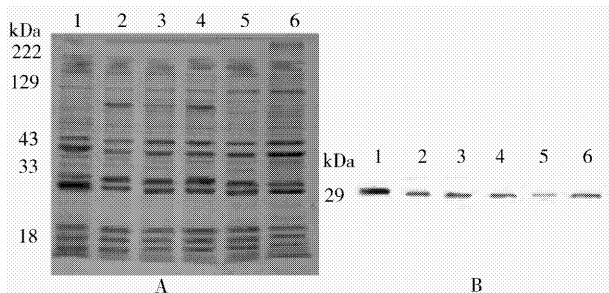


图 3 免疫检测 *JcPIP* 蛋白在麻疯树体内的分布

Fig. 3 The distribution of *JcPIP* in *Jatropha curcas* with immunodetection

1: 幼茎 Young stems; 2: 幼根 Young roots; 3: 幼叶 Young leaves; 4: 花 Flowers; 5: 成熟胚乳 Endosperms; 6: 幼嫩果皮 Young seedcases; A: 膜蛋白 SDS-PAGE 图 SDS-PAGE of plasma intrinsic protein of *J. curcas*; B: 水通道蛋白 Western-blot 杂交斑 Western-blot of *JcPIP*

2.7 干旱胁迫的水通道蛋白表达

从干旱胁迫下的麻疯树幼苗与对照的幼叶分别提取质膜内膜蛋白, 用水通道蛋白抗体进行 Western-blot 检测表达差异 (图 4)。干旱胁迫下的麻疯树幼苗叶中的 *JcPIP* 随着干旱胁迫程度的加深蛋白表达量逐渐增加, 在胁迫 3 d 后表现出明显的增加, 第 4 天复水处理后, 蛋白表达量开始下降。

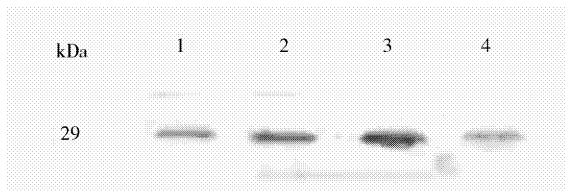


图 4 PEG-6000 干旱处理的 *JcPIP* 蛋白丰度的变化

Fig. 4 Changes in *JcPIP* abundance under drought stress with PEG-6000

1. 对照 Control; 2~3. 干旱胁迫 1 d 和 2 d Drought stress with PEG-6000 for 1 and 2 days, respectively; 4. 复水处理 Rewatered.

3 讨论

植物水通道蛋白是一类能促进水、甘油等小分子代谢物运输的膜通道蛋白家族, 它的发现使人们对细胞内、细胞间水分子运动有了突破性的认识。植物水通道蛋白分为四大类: 质膜内膜蛋白 (PIPs), 液泡膜内膜蛋白 (TIPs), Noduin-26 类似内膜蛋白及 SIP 内膜蛋白 (SIPs)。其中 PIPs 在植物水通道蛋白中占很大比重, 目前在拟南芥中发现的 35 种水通道蛋白就有 13 种是 PIPs 蛋白^[9]。近年来, 从很多物种中克隆出了水通道蛋白基因, 但在麻疯树中还未见报道。在本实验中, 我们克隆了第一个麻疯树

水通道蛋白基因 *JcPIP*, 基因登录号为 EF030420。

植物水通道蛋白的功能检测目前最常用的是非洲爪蟾卵母细胞检测系统, 由于非洲爪蟾卵母细胞具有细胞体积大, mRNA 翻译能力强且质膜水通透性低的特点, 使该系统成为水通道蛋白功能中应用最早且最为成熟的检测技术。本实验在检测 *JcPIP* 蛋白功能时采用了非洲爪蟾卵母细胞检测系统。表达了 *JcPIP* 基因的细胞质膜水通透性提高了 10 倍以上, 这个结果与菠菜 PM28A 蛋白^[10] 和拟南芥 δ -TIP 蛋白^[11] 的表达结果相近。

抗体是研究蛋白质的必不可少的工具之一, *JcPIP* 经生物信息学预测, 其相对分子质量约为 29 kDa, 跨膜结构预测显示具有六次穿膜结构与疏水区预测比较发现, 疏水区序列与跨膜区序列接近重合, 其疏水性很强, 二级结构和三级结构预测进一步展现了其六个跨膜区的空间结构, 属于典型的水通道蛋白特征, 具有此种结构特点的蛋白不易表达和纯化。根据 DNA Star 软件设计出亲水性、抗原性较好的多肽, 制备抗多肽抗体, 是一个快速而有效的方法。经 ELISA 检测证实此抗体效价高, Western-blot 结果条带单一表明此多克隆抗体特异性好。

在研究植物抗旱分子机理的过程中, 从干旱诱导的基因中已分离出很多水通道蛋白基因, 包括: 豌豆(*Pisum sativum*) *PIP1-7a*, 拟南芥 *PIP2-RD28*^[12] 等。人们认为植物水通道蛋白基因是由于植物对干旱条件的适应而进化来的^[13]。植物水通道蛋白的表达有些是组成型的, 有些只在某一组织表达的, 如大豆(*Glycine max*)的 α -TIP 基因只在种子中表达, 烟草(*Nicotiana tabacum*) *TobRB7* 基因只在根中表达^[14]; 也有的在植物生长期都有表达, 如 *JcPIP* 基因。而多数水通道蛋白是受环境因子如干旱等的调控表达, 并广泛分布于各种组织、器官, 存在于发育的各个时期, 暗示了它们在整个生命活动中的重要地位。近年来, 植物水通道蛋白在干旱胁迫条件下的作用机理成为研究的热点。由于叶是麻疯树主要的干旱胁迫应答器官, 用 PEG-6000 进行胁迫处理, 结果表明, 随着干旱胁迫程度的增加, *JcPIP* 含量明显增加, 但在胁迫 3 d 后进行复水处理 *JcPIP* 表达量有明显下降, 表明 *JcPIP* 蛋白受干旱调控表达。这与拟南芥 *PIP2* 在干旱胁迫下表达量增加的结果一致^[15]。分析干旱胁迫下麻疯树叶片水分变化和 *JcPIP* 表达量变化之间的关系, *JcPIP*

表达丰度与叶片含水量的高低成反比。这可能是由于干旱胁迫下的麻疯树幼苗的叶片从外界吸收水分减少, 叶片细胞为了抵抗这种胁迫作用, 开启细胞膜上的水通道蛋白开关, 让细胞之间水分能够更好的通透。当复水处理后, 细胞所需水分能够得到补充, 水通道蛋白表达量开始下降。

目前水通道蛋白在其行使水转运活力的方式、水通道蛋白的调控性质和其精确细胞定位^[16] 方面还有待研究, *JcPIP* 蛋白在麻疯树中的亚细胞定位还需要进一步的鉴定。水通道蛋白抗体的制备为使用免疫定位方法来研究其定位和功能提供了条件。

参考文献

- [1] Suga S, Imagawa S, Maeshima M. Specificity of the accumulation of mRNAs and proteins of the plasma membrane and tonoplast aquaporins in radish organs [J]. *Planta*, 2001, 212: 294-304.
- [2] Zhang T(张通), Lin Q(林奇). Review of prospects for mechanism of plant drought tolerance [J]. *Hubei Agri Sci* (湖北农业科学), 2005, 4: 107-110. (in Chinese)
- [3] Zhang R(张容), Zheng Y F(郑延锋), Wu Y(吴瑶), et al. A simple and efficient method for preparation of plant RNAs [J]. *Hereditas* (遗传), 2006, 28(5): 583-586. (in Chinese)
- [4] Zhang R B, Verkman A S. Water and urea permeability properties of xenopus oocytes: Expression of mRNA from toad urinary bladder [J]. *Amer J Physiol Cell Physiol*, 1991, 260: C26-C34.
- [5] Czernik A J, Naim A C. Production of phosphorylation state-specific antibodies [J]. *Methods Enzymol*, 1991, 201: 264-283.
- [6] Javot H, Lauvegeat V, Santoni V, et al. Role of a single aquaporin isoform in root water uptake [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 509-522.
- [7] Borgnia M, Nielsen S, Engel A, et al. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 425-458.
- [8] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 435-454.
- [9] Horsefield S T, Wang Y I, Hedfalk K, et al. Structural mechanism of plant aquaporin gating [J]. *Nature*, 2006, 439(9): 688-694.
- [10] Johansson I, Karlsson M, Shukla V K, et al. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 451-459.
- [11] Daniels M J, Chaumont F, Mirkov T E, et al. Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site [J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 587-599.
- [12] Guerrero F D, Jones J T, Mullet J E. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 11-26.
- [13] Bray E A. Plant responses to water deficit [J]. *Trends Plant Sci*, 1997, 2: 48-56.

- [14] Yamamoto Y T, Taylor C G, Acedo G N, et al. Characterization of *cis*-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(4): 371–382.
- [15] Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, et al. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*. Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein [J]. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33: 217–224.
- [16] Fray R G, Wallace A, Grierson D, et al. Nucleotide sequence and expression of ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24(3): 539–543.