

素心蜡梅水孔蛋白基因的克隆与序列分析

方子义, 宋晓惜, 赵世萍, 王倩丽, 赵凯歌, 陈龙清

(华中农业大学, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘 要:以素心蜡梅为试材, 根据已建立的素心蜡梅转录组数据库已知序列设计特异引物, 采用 PCR 技术, 克隆并分析了素心蜡梅盛花期花被片水孔蛋白基因序列和氨基酸结构特征, 对得到的基因和数据库中的 cDNA 进行比对, 并通过多种生物信息学方法对其编码序列、蛋白结构和进化关系进行了分析预测。结果表明:该试验成功克隆得到长 2 264 bp 的水孔蛋白基因, 命名为 *CpAQP3*。经序列比对, 蜡梅 *CpAQP3* 基因含 5' 非编码区 50 bp, 3' 非编码区 165 bp, 开放阅读框长 2 049 bp, 编码 248 个氨基酸。该基因含 2 个内含子, 长度分别为 708 bp 和 594 bp, 3 个外显子, 长度分别为 127、250、370 bp。预测该蛋白有多个跨膜螺旋结构, 具较强疏水性。该基因属于 MIP 家族中的 TIP 亚族, 具有家族典型的保守结构域, 预测其结构与运输水分具有显著关系。该试验首次从素心蜡梅中克隆得到水孔蛋白基因序列, 与已知从馨口腊梅中获得的水孔蛋白序列有明显不同。

关键词:素心蜡梅; 水孔蛋白; 基因克隆; 序列分析

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)21-0099-06

蜡梅特产于我国, 为我国传统名花, 是寒冬少花时期重要的观赏植物。蜡梅具有耐寒、耐旱、耐修剪三大特点, 具有很强的抗胁迫能力。研究蜡梅的抗寒、抗旱机理, 挖掘优质种质资源进行观赏植物抗逆育种, 可为蜡梅耐寒机制及蜡梅花被片水分调控机理提供依据, 对观赏植物的抗逆改良具有参考价值。水孔蛋白 (Aquaporin, AQP) 是位于细胞膜上具有选择性地高效转运水分子的膜内在蛋白, 分子质量 23~31 ku^[1]。AQP 属于跨膜通道蛋白 MIP (Major Intrinsic Protein) 大家族, 植物 AQP 大多存在于细胞质膜和液泡膜部位, Johansson 等^[2]根据亚细胞定位和序列同源性分析, 将其分为 4 类: 植物液泡膜内在蛋白 (Tonoplast Intrinsic Proteins, TIPs)、质膜内在蛋白 (Plasma Membrane Intrinsic Proteins, PIPs)、类 Nodulin26 膜内在蛋白 (NOD26-like MIP) 和小的基本膜内在蛋白 (Small and Basic Intrinsic Proteins, SIPs)。Agre 研究小组于 1988 年第 1 次从人红细胞质膜中分离并获得 AQP, 即 AQP1^[3]。1992 年他们首次在分子水平上验证了存在于细胞膜上蛋白质介导的水分跨膜转运机制^[4]。植物界中第 1 个水孔蛋白 γ -TIP 是

Maurel 等^[5]1993 年从拟南芥中分离获得的。大量研究表明, 细菌、真菌、动植物等生物中均有 AQP 的存在^[6-8], 植物水孔蛋白对于根、茎、叶、花等器官中的水分运输起关键作用, 同时通过参与矿质营养运输, 生长发育, 非生物胁迫反应和碳、氮的固定等参与植物的生理活性^[9]。这表明 AQP 对于生物本身的生存和发展具有重要作用。传统认为, 植物花器官为自身抗胁迫能力最差的部分, 低温、干旱胁迫下会导致细胞内大量的水分流失, 破坏植物体内水分平衡, 造成植物低温和干旱伤害^[10]。蜡梅花被片盛开于低寒的环境中, 表现出极强的抗冻和抗旱能力, 这很可能与 AQP 调控细胞内水分运输有关。该研究在课题组已建的素心蜡梅转录组数据库基础上, 查找 AQP 相关序列, 利用 PCR 技术分离克隆蜡梅水通道蛋白基因 *CpAQP3* 的 gDNA 全长。运用生物信息学分析该基因的氨基酸序列特征, 预测相关结构域和功能。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为华中农业大学校园素心蜡梅 (*Chimonanthus praecox* cv. *Luteus*) 标本盛花期花被片。该课题组素心蜡梅转录组数据库由华大基因测序完成, 感受态为全式金公司 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell, pMD18-T 克隆试剂盒购于大连宝生物, 引物由武汉擎科创新生物科技有限公司合成。PCR Mix, DNA 纯化回收试剂盒、Marker 购于东盛生物公司, 其它生物学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

第一作者简介:方子义(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为园林植物种植资源创新及利用。

责任作者:赵凯歌(1975-), 女, 博士, 副教授, 中国花协荷花分会副秘书长, 现主要从事园林植物种质资源调查收集和评价与保存及种质创新等工作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31272207;30800762)。

收稿日期:2013-06-19

1.2 试验方法

1.2.1 蜡梅基因组 DNA 的提取 利用 CTAB 法提取蜡梅花被片基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.2.2 PCR 反应 根据素心蜡梅转录组数据库水孔蛋白基因序列,利用 Primer 5 软件设计并合成 1 对引物, TIP-F: 5'-CGAGATATCCTCCTCTAGTTTTTGATCT-TG-3', TIP-R: 5'-GAGGACCATACTCAATTTCAA-CATCCACTG-3',PCR 扩增体系(25 μ L)为:PCR Mix 10 μ L, ddH₂O 13 μ L, TIP-F 1 μ L, TIP-R 1 μ L, gDNA 1 μ L。PCR 反应程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,60℃ 15 s,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 10 min。

1.2.3 产物测序 得到 PCR 特异产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶试剂盒回收、纯化目的片段,插入 pMD18-T 克隆载体,用热激法导入 Trans1-T1 感受态细胞中,进行 Amp 抗性筛选和 X-gal 和 IPTG 蓝白斑筛选。挑白色单菌落先做菌落 PCR,将菌落 PCR 检测的阳性克隆送华大基因(武汉)有限公司测序,3 次重复。

1.2.4 生物信息学分析 测序结果提交 NCBI GenBank 进行同源性分析,使用 DNAMAN 与素心蜡梅转录组数据库中水孔蛋白的 cDNA 序列比对,确定是否含内含子。使用 Primer 5 将核苷酸序列转换为氨基酸序列通过各专业生物信息学网站对所获得的核苷酸序列和氨基酸序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 素心蜡梅 AQP 基因结构分析

用 CTAB 法提取素心蜡梅盛花期花被片总 DNA,电泳结果见图 1。由图 1 可知,素心蜡梅总 DNA 长度大于 2 000 bp,条带清晰,提取的 DNA 完整,可满足 PCR 扩增要求。

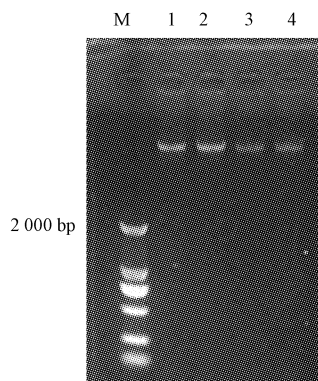


图 1 素心蜡梅总 DNA 的提取

注:M;2 000 bp marker;1~4;素心蜡梅 gDNA。

Fig. 1 Total DNA extracted from *C. praecox* cv. Luteus

Note:M;2 000 bp marker;1~4;Total gDNA extracted from *C. praecox* cv. Luteus.

以提取的总 DNA 为模板,用特异引物 TIP-F 与 TIP-R 进行 PCR 特异扩增,获得 1 条 gDNA 片段(图 2)。将该基因命名为 *CpAQP3*,利用 ORF Finder 分析发现,该基因大小为 2 264 bp,含 5'非编码区为 50 bp,3'非编码区为 165 bp,开放阅读框长 2 049 bp,编码 248 个氨基酸,其中内含子 1 302 bp,外显子 962 bp(图 3)。

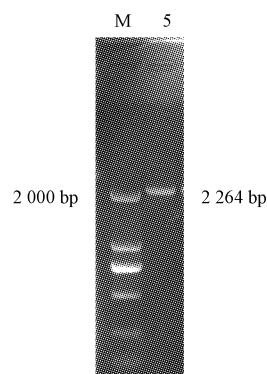


图 2 素心蜡梅 *CpAQP3* 基因全长 gDNA PCR 结果

注:M;2 000 bp marker;5;*CpAQP3*。

Fig. 2 The full-length gDNA of *CpAQP3* gene in *C. praecox* cv. Luteus

Note:M;2 000 bp maker;5;*CpAQP3*。

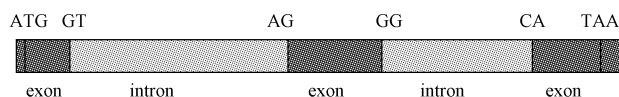


图 3 *CpAQP3* gDNA 结构示意图

Fig. 3 *CpAQP3* gDNA structure diagram

通过 NCBI 中 Conserved Domains 对 *CpAQP3* 基因进行蛋白保守区预测。结果表明有 2 个与该基因匹配蛋白保守区域,均为 MIP(Major intrinsic protein),表明该基因属于水孔蛋白家族,且与该蛋白同源性较高的均为 TIPs 类亚族,初步判断该蛋白属于 TIPs 类亚族。

2.2 *CpAQP3* 基因生物信息学分析

利用 Primer 5 将核苷酸序列转换为氨基酸序列,结果见图 4,通过 ProtParam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析,结果表明该序列表达的蛋白分子量(Molecular weight)为 25 092.1,理论等电点(Theoretical pI):5.59,带负电荷的氨基酸残基总数(Asp+Glu)为 11,带正电荷的氨基酸残基总数(Arg+Lys)为 7,不稳定系数(Instability index):28.46,表明该蛋白为稳定蛋白。脂肪系数(Aliphatic index):113.75,总平均亲水性[Grand average of hydropathicity(GRAVY)]:0.947,表明此蛋白为疏水蛋白。用 SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)检测不含信号肽序列,无分泌蛋白^[11]。

CGAGATATCCTCCTCTAGTTTGTGATCTTGAGAGGTCTCTCAATCCCATCC

1 M A G I A F G R F D D S F S L G S L K A Y L A E F

1 ATGGCTGGAATTGCTTTCGGGCGTTTTGATGATTCTTTCAGCTTAGGCTCTCTCAAGGCCTACCTTGCAGAAATTC

26 I S T L L F V F A G V G S A I A Y N K L T S S A A

76 ATCTCAACCCCTACTCTTTGTTTTGCTGGAGTTGGATCTGCCATTGCTTACAACAAGTTGACATCGAGCGCAGCT

51 L D P A G L V A I A V C H G F A L F V A V S V G A

151 CTTGATCCGGCCGGGCTCGTTGCAATTGCTGTTTGCCATTGGATTGCACTCTTTGTCGCTGTCTCCGTGGGTGCA

76 N I S G G H V N P A V T F G L A L G G H I T V L T

226 AACATCTCCGGCGGCCATGTCAATCCAGCTGTACCTTTGGATTGGCTCTCGGTGGCCATATCACGGTCTCACC

101 G I F Y W I A Q L V G A I V A C F L L K A V T G N

301 GGAATCTTCTACTGGATTGCCCAGCTTGTAGGCGCCATTGTTGCTTGTTCCTCCTCAAGGCAGTTACAGAAAT

126 M A I P T H N V A A G V G A I E G V V M E I I I T

376 ATGGCAATTCCCACCCACAACGTTGCTGCCGGAGTCGGAGCCATTGAAGGAGTGGTGATGGAGATTATCATTACC

151 F A L V Y T V Y A T A A D P K K G S L G T I A P I

451 TTTGCTTGGTCTACACTGTCTATGCAACTGCTGCAGACCCAAAGAAGGGTTCATTGGGCACAATTGCACCCATT

176 A I G F I V G A N I L A A G P F S G G S M N P A R

526 GCCATTGGTTTCATAGTTGGTGCAACATCCTAGCCGCTGGGCCTTTCTCAGGTGGGTCCATGAACCCAGCCCGA

201 S F G P A V A S G D F T D N W I Y W V G P L I G G

601 TCGTTTGGGCTGCAGTTGCAAGCGGAGACTTCACTGATAACTGGATCTACTGGGTGGGCCTCTTATTGGTGA

226 G L A G L I Y G N V F I S S E H V P V S N D F *

676 GGCTAGCTGGTCTTATCTATGGCAATGTGTTTCATTCATCTGAGCATGTTCCTGTCTCCAACGATTCTAA

TTTCCATCTTCTCCGAATAATCTATTGAAAAAATAAAACCCCTTTTGGGTCTTCTTTTCTTTGATTTCTCTTTG

TTTTAATTGTAAATAGACATGGAAAGCCCTTGTGTTGGGACCAATGTTGCTTTGTTCTTTGCAGTGGATGTTGA

AATGAGTATGGTCCTC

图4 *CpAQP3* 基因的核苷酸及氨基酸序列

注:终止子用“*”表示。

Fig. 4 The nucleotide and deduced amino acids sequence of *CpAQP3* gene

Note: Terminator is indicated by asterisk.

2.3 蛋白质跨膜区分析

蛋白质跨膜结构对于蛋白质结构与功能有重要意义,通过 TMpred 软件(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)对 *CpAQP3* 进行分析。由图 5 可知,*CpAQP3* 蛋白由外膜到内膜和内膜到外膜

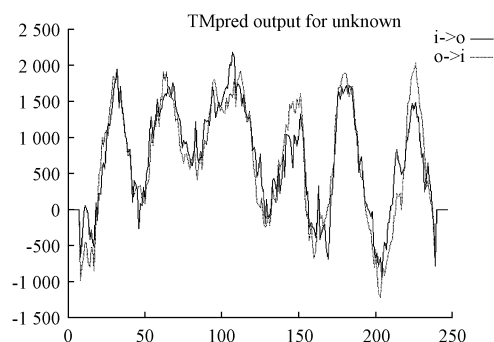


图5 跨膜区预测结果

Fig. 5 Predicted results of *CpAQP3* transmembrane domain

分别存在 6 个显著跨膜结构,表明该蛋白很可能为膜蛋白。此外通过 PSORT II Prediction 软件(<http://psort.hgc.jp/form2.html>)对 *CpAQP3* 蛋白进行亚细胞定位预测。结果表明该蛋白亚细胞定位于细胞质膜上。

2.4 蛋白质磷酸化位点分析

蛋白质磷酸化主要发生在 2 种氨基酸上,一种是丝氨酸(包括色氨酸),另一种是酪氨酸。对 AQPs 磷酸化位点进行分析有助于阐明该蛋白磷酸化的机制与功能。利用 NetPhos 2.0 (<http://www.ebs.dtu.dk/services/NetPhos2.0>)分析得到 *CpAQP3* 蛋白存在 5 个丝氨酸位点。

2.5 *CpAQP3* 蛋白质同源性分析

用 Protein blast 进行比对,找出蓖麻(*Ricinus communis*)、栎树(*Quercus petraea*)、油桐(*Vernicia fordii*)、楸子(*Malus prunifolia*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)、烟草(*Nicotiana glauca*)、扁桃(*Prunus persica*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)9 个与 *CpAQP3* 同源性较高的序列,同时加上馨口蜡梅

CpAQP1、CpAQP2 氨基酸序列,构建系统树,进行生物信息学分析。由图 7 可知,素心蜡梅(CpAQP3)与棉花、毛果杨同源性较高,与已知的馨口蜡梅的 2 个水孔蛋白

同源性很低。出现此现象一方面可能为物种间遗传信息差异导致,也有可能为水孔蛋白家族成员较多,多态性大。

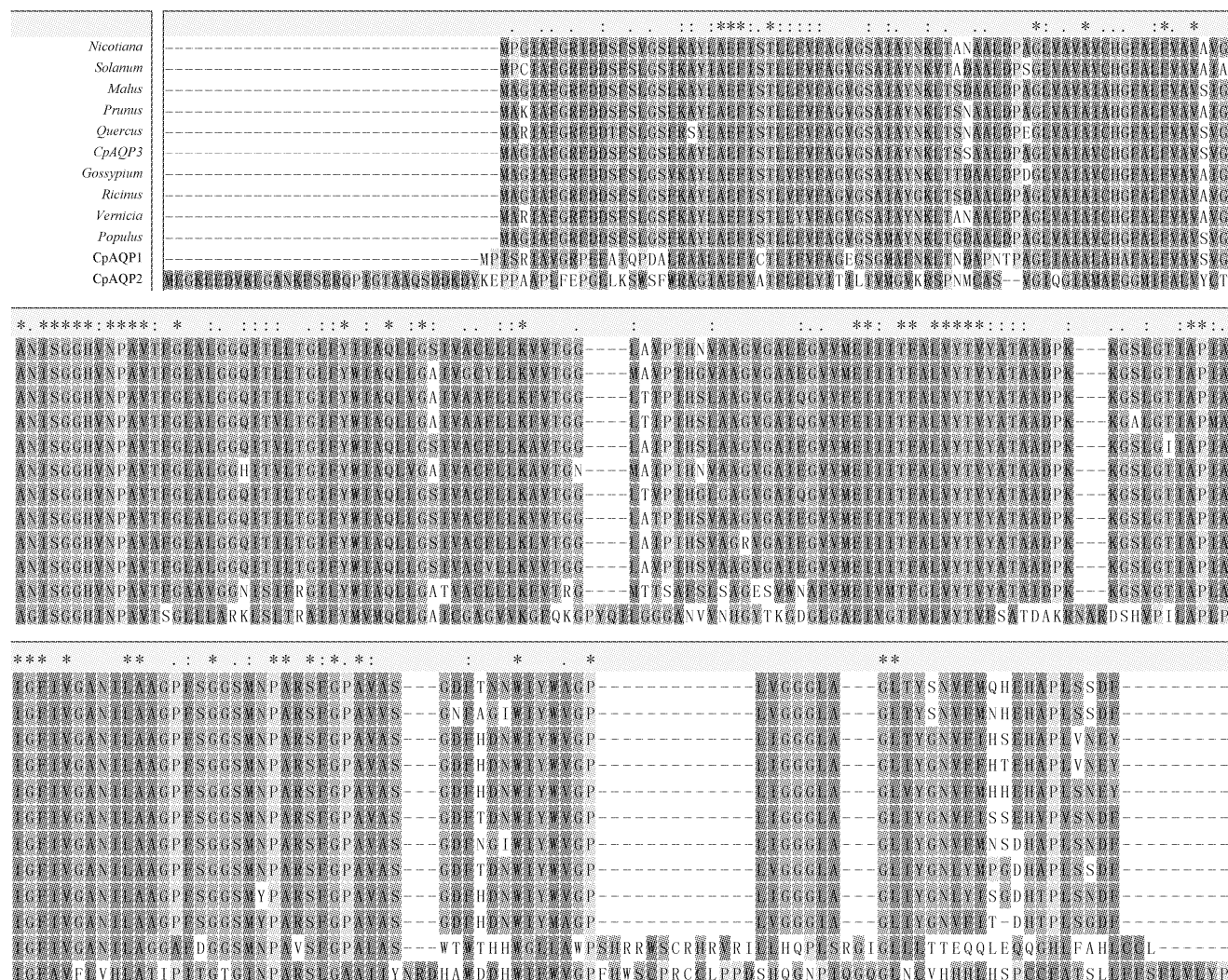


图 6 CpAQP3 氨基酸序列与 11 个物种 TIPs 同源性分析

注:“*”指整个蛋白质链中相同的或保守的氨基酸;“:”指保守的替代片段;“.”指半保守的替代片段。

Fig. 6 Alignment of deduced amino acid sequence of CpAQP3 gene and the other eleven plants TIPs

Note: Identical or conserved amino acids in all of the aligned proteins are indicated by an asterisk (*); a colon (:) indicates conserved substitutions; a dot (.) indicates semi-conserved substitutions.

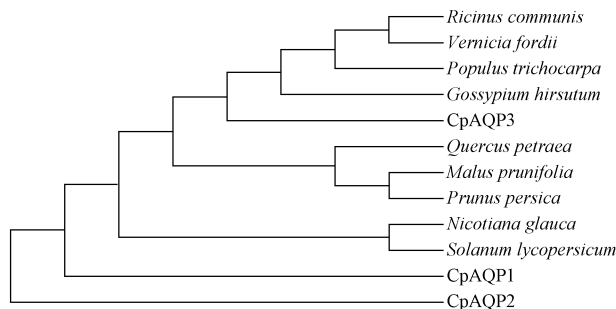


图 7 利用 Clustal X 构建的 CpAQP3 与已知 AQP 类基因氨基酸同源性聚类树状图

Fig. 7 Phylogenetic tree based on alignment of CpAQP3 gene and eleven published previously AQP genes by Clustal X

3 讨论与结论

水是生物体内必不可少的组成物质,对于生物的生长、发育起到关键的作用,水分以水势梯度为驱动力并由 AQP 被动运输^[12],AQP 可以高效转运水分子并在植物生长发育和逆境胁迫过程中起积极作用^[13]。AQP 自发现以来备受人们关注,它使细胞水分的调控变为可控性。现已发现 AQP 在维管束组织、导管和韧皮部等涉及水分运输的相关细胞和组织中优先表达,表明 AQP 对植物体内水分的运输具有重要作用^[14-16]。AQP 可以有效调节水分的快速跨膜运输、保持细胞内外的渗透平衡,保证了细胞内水分的有效利用和快速调节,这对于植物的生理活动起着关键的作用。

张迷^[17]从馨口蜡梅中克隆得到的 2 个水孔蛋白 CpAQP1 和 CpAQP2,均无内含子。该试验从素心蜡梅中克隆得到的 CpAQP3 基因序列和已报道的馨口蜡梅 AQP 结构完全不同,不仅具有内含子,且内含子占开放阅读框的绝大部分。分析原因可能是不同物种间 AQP 基因内含子的缺失或获得所导致。CpAQP3 基因 2 个内含子分布均匀符合多细胞生物内含子分布规律^[18],其中 1 个符合传统“GT-AG”剪接规则,另 1 个则为“GG-CA”剪切。内含子的大量存在会增加基因的突变型,增强物种适应环境的能力;同时内含子在选择性剪接扮演重要角色,一个基因可根据需要产生多种不同的蛋白质。

通过生物信息学分析,CpAQP3 蛋白在细胞外膜和内膜上存在较多的跨膜区域,这很可能与 AQP 调控细胞内水分的运输密切相关。庞永奇等^[19]认为,在亚细胞水平,定位于质膜的 AQP 主要负责水分的吸收和外排,定位于液泡膜的 AQP 则在调节膨压方面发挥功能。CpAQP3 蛋白通过亚细胞定位预测定位于细胞质膜上,这说明 CpAQP3 蛋白对于维持细胞的水分平衡起重要作用,同时蜡梅 AQP 存在于细胞膜上对于调控细胞水分更为有效和方便。

大量研究表明,植物通过调控 AQP 的活性来抵御各种外界胁迫。当生物处于逆境时,大多数 AQP 表达呈下降趋势,甚至有些消失^[20-21]。但刘祥^[22]通过对 CpAQP1 实时荧光定量分析证明,AQP 基因在低温时蜡梅盛花期花被片中特异性大量表达。植物 AQP 的特异性分布,表明该区域发生了强烈的水分跨细胞流动,AQP 的表达时期和存在的部位决定其生理功能的发挥^[19],前人也早已证明细胞内水分的含量多少对于植物的抗寒性等抗逆性密切相关^[23]。说明 AQP 基因对于蜡梅盛花期花被片水分的调节起到了关键作用,蜡梅 AQP 基因可能存在其特有的调控机制,推测 AQP 基因的大量表达导致蜡梅花被片中水分产生特异运输,调控蜡梅花被片中自由水分含量减少,进而提高自身的抗寒能力。

蛋白质磷酸化作为最常见、最重要的蛋白质翻译后修饰方式之一,可有效调控蛋白质活力和功能,并在细胞信号转导过程中起重要作用。研究表明,很多 AQP 在生物体内都会发生磷酸化,且发生在丝氨酸(Serine, Ser)残基上的概率最大^[24-25]。CpAQP3 蛋白具有 5 个丝氨酸位点,这可增强 AQP 调解途径的多样性。多个磷酸化位点的存在可能在植物胁迫和亚细胞定位中起着重要作用。Guenther 等^[25]研究发现,大豆 NOD26 通过位点磷酸化来提高细胞膜对水分的通透性,保证植物在胁迫环境下能够快速的调节自身的渗透压,增强自身抗胁迫能力。Azad 等^[26-27]研究认为温度与 AQP 磷酸化与去磷酸化调控有关,郁金香的 AQP 磷酸化与去磷酸化之后导致水通道活性有明显不同,进而导致郁金香花瓣的开与关,这为蜡梅寒冬低温时开花的机理提出了另一条解释途径。

该研究得到的 CpAQP3 属于 MIP 家族中的 TIP 亚族,通过与馨口蜡梅已获得的 2 条水孔蛋白序列对比分析,其核苷酸序列、蛋白质结构域都大不相同,一种原因可能为物种间差异的存在导致水孔蛋白基因序列的不同,还可能因为植物水孔蛋白基因具有丰富的多样性和极高的丰度,其差异性较大^[28]。

利用素心蜡梅 cDNA 文库通过 PCR 技术在素心蜡梅品种中克隆得到水通道蛋白基因 CpAQP3 gDNA 的全长序列,该基因属于 MIP 蛋白家族,TIP 亚族一类,具有典型的功能域和保守部分。素心蜡梅水孔蛋白 gDNA 序列全长 2 264 bp,通过测序鉴定为目标片段。该基因含 2 个内含子,3 个外显子。内含子长度分别为 708、594 bp,外显子长度分别为 127、250、370 bp。进化分析表明,素心蜡梅 CpAQP3 与棉花、毛果杨的相似性最高,与已知馨口蜡梅的水孔蛋白基因序列有明显不同和很低的同源性。该研究从分子水平上为蜡梅花被片水分调控机理和低温下蜡梅开花机制做了前期研究铺垫,为种植资源创新,获得抗寒性园林植物新品种提供了理论依据。

参考文献

- [1] Maurel C, Verdoucq L, Luu D T, et al. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions[J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59:595-624.
- [2] Johansson I, Karlsson M, Johanson U, et al. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2000, 1465(1-2):324-342.
- [3] Denker B M, Smith B L, Kuhajda F P, et al. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules[J]. J Biol Chem, 1988, 263(30):15634-15642.
- [4] Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, et al. Appearance of water-channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein[J]. Science, 1992, 256(5055):385-387.
- [5] Maurel C, Reizer J, Schroeder J I, et al. The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes*[J]. Embo J, 1993, 12

- (6);2241-2247.
- [6] Ludewig U, Dynowski M. Plant aquaporin selectivity; wheretransport assays, computer simulations and physiology meet[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(19):3161-3175.
- [7] Secchi F, Lovisolo C, Uehlein N, et al. Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea* L.) [J]. Planta, 2007, 225:381-392.
- [8] Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, et al. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function[J]. Plant Cell Physiology, 2005, 46:1568-1577.
- [9] Maurel C, Verdoucq L, Luu D T, et al. Plant aquaporins; membrane channels with multiple integrated functions[J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59:595-624.
- [10] Mahantesha N, Khader S, Oommen K, et al. STIFDB2; an updated version of plant stress-responsive transcription factor database with additional stress signals, stress-responsive transcription factor binding sites and stress-responsive genes in arabidopsis and rice[J]. Plant Cell Physiol, 2013, 54(2): 1-15.
- [11] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0; discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods, 2011, 8(10):785-786.
- [12] 于秋菊, 吴铸, 林忠平. 植物水孔蛋白研究进展[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2002, 38(6):855-866.
- [13] 阮想梅, 李登弟, 李学宝. 植物水孔蛋白的功能和调控[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(1):1-7.
- [14] Maurel C, Verdoucq L, Luu D T, et al. Plant aquaporins; membrane channels with multiple integrated functions[J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59:595-624.
- [15] Frayssé L C, Wells B, McCann M C, et al. Specific plasma membrane aquaporins of the PIP1 subfamily are expressed in sieve elements and guard cells[J]. Bio Cell, 2005, 97(7):519-534.
- [16] Sarda X, Tusch D, Ferrare K, et al. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells[J]. Plant J, 1997, 12(5): 1103-1111.
- [17] 张迷. 蜡梅水通道蛋白基因 CpAQP1 和 CpAQP2 克隆及功能初步分析[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [18] Mourier T, Jeffares D C. Eukaryotic intron loss[J]. Science, 2003, 300: 1393.
- [19] 庞永奇, 王高奇, 王旭初, 等. 植物水孔蛋白的亚细胞分布与生理功能研究浅析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(10):962-971.
- [20] Smart L B, Moskal W A, Cameron K D, et al. MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca* [J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42(7):686-693.
- [21] 陈儒钢, 朱文超, 巩振辉, 等. 辣椒水通道蛋白基因 CpAQP3 的克隆与序列分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(20):4323-4329.
- [22] 刘祥. 蜡梅水通道蛋白 CpAQP1 转录水平变化及其启动子活性分析[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [23] Paul E V, Manu A, Surekha K A, et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status[J]. The Plant Journal, 2006, 45:523-539.
- [24] Aroca R, Amodeo G, Fernandez-Illescas S, et al. The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots [J]. Plant Physiol, 2005, 137: 341-353.
- [25] Guenther J F, Nouth C, Galetovic M P, et al. Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals[J]. The Plant Cell, 2003, 15:981-991.
- [26] Azad A K, Sawa Y, Ishikawa T, et al. Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals[J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45:608-617.
- [27] Azad A K, Katsuhara M, Sawa Y, et al. Characterization of four plasma membrane aquaporins in tulip petals; a putative homolog is regulated by phosphorylation[J]. Plant Cell Physiol, 2008, 49:1196-1208.
- [28] Maeshima M, Ishikawa F. ER membrane aquaporins in plants[J]. Pflügers Archive-European Journal of Physiology, 2008, 456(4):709-716.

Cloning and Sequence Analysis of Aquaporins Gene in *Chimonanthus praecox* cv. Luteus

FANG Zi-yi, SONG Xiao-xi, ZHAO Shi-ping, WANG Qian-li, ZHAO Kai-ge, CHEN Long-qing

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology of Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract: Taking *Chimonanthus praecox* cv. Luteus as material, a pair of primers were designed according to the gene sequence in the transcriptome database created, the gene encoding aquaporins in sepals of *Chimonanthus praecox* at peak flowering stage was cloned by PCR and its molecular structure of amino acid was analyzed. Based on sequence alignment in cDNA database and using bioinformatics, the coding sequence, protein structure and evolutionary relationships were analyzed. The results showed that a 2 264 bp gene encoding aquaporins was amplified successfully from genomic DNA of petals of *Chimonanthus praecox* at peak flowering stage, being named CpAQP3. The gene CpAQP3 consisted a 5' untranslated region (UTR) of 50 bp, a single long open reading frame (ORF) of 2 049 bp, and a 3'UTR of 165 bp. The ORF encoded 284 amino acids. This gene include two introns of 708 bp and 594 bp and three exons of 127 bp, 250 bp and 370 bp respectively. An aquaporin gene CpAQP3 was firstly cloned from *Chimonanthus praecox*. The CaAQP gene was a member of the TIP subgroup in MIP protein family and had the typical function region. The CpAQP3 gene may play an important regulating water transportation role. There were significant differences in sequential structure between this gene and the other known aquaporin gene from Xinkou *Chimonanthus praecox*.

Key words: *Chimonanthus praecox* cv. Luteus; aquaporins; gene cloning; sequence analysis