

姜 骁, 吴拥军, 杨 亚, 等. 烟草钾外流通道基因 *NTORK1* 的启动子克隆及激素诱导分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 274-277.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.006

烟草钾外流通道基因 *NTORK1* 的启动子克隆及激素诱导分析

姜 骁¹, 吴拥军¹, 杨 亚¹, 赵杰宏²

(1. 贵州大学生命科学学院/贵州省农业生物工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省烟草科学研究院/烟草行业分子遗传重点实验室, 贵州 贵阳 550081)

摘要: 为研究烟草钾外流通道基因 *NTORK1* 的启动子的表达特征, 以烟草 K326 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增获得 *NTORK1* 的启动子片段, 该启动子片段为 2 111 bp, 包含多个转录因子结合域。构建了 *NTORK1* 启动子驱动的 *GUS* 基因表达载体, 在烟草 K326 叶片中进行瞬时表达分析。结果显示, *NTORK1* 启动子受低浓度 NAA (5.4 $\mu\text{mol/L}$) 和高浓度 SA (500 $\mu\text{mol/L}$) 的诱导表达。

关键词: 烟草; 钾外流通道基因 *NTORK1*; 启动子; 激素

中图分类号: S572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)02-0274-04

Cloning and phytohormone induction of the promotor of potassium outward channel gene *NTORK1* from tobacco

JIANG Xiao¹, WU Yong-jun¹, YANG Ya¹, ZHAO Jie-hong²

(1. College of Life Science, Guizhou University/Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Academy of Tobacco Science/Key Laboratory of Molecular Genetics of CNTC, Guiyang 550081, China)

Abstract: To characterize the expression of the promotor of potassium outward channel gene *NTORK1*, a upstream fragment of *NTORK1* was amplified from *Nicotiana tabacum* K326 genome, containing 2 011 nucleotides and multiple transcription factor binding domain. The plant expression vector pBI121-*NTORK1* was introduced into K326 leaf for transient expression. The promotor of *NTORK1* was expressed under the induction of hormones NAA (5.4 $\mu\text{mol/L}$) and SA (500 $\mu\text{mol/L}$).

Key words: tobacco; potassium outward channel gene *NTORK1*; promoter; phytohormone

烟草作为重要的经济作物, 打顶是烟叶生产中的重要步骤, 但打顶往往造成烟叶钾含量降低和品质下降^[1-2]。土壤中的 K^+ 是通过植物根系 K^+ 通道或转运蛋白的吸收进入根系的^[3], 许多 K^+ 通道和转运蛋白已在植物中被发现和克隆, 其中最具代表性的是 Shaker 家

族通道蛋白和 KUP/HAK/KT 家族转运蛋白^[3-5]。在拟南芥中已发现 9 种 Shaker 家族通道蛋白, 其中 *AKT1* 是主要的钾离子吸收通道^[6-7], *GORK* 介导钾离子外流^[8]。在烟草中也发现了类似通道蛋白, 并命名为 *NTK1* 和 *NTORK1*^[9]。目前, *NTORK1* 是已报导的根系主要钾离子外流通道蛋白^[10]。Dai 等^[11]发现打顶导致烟叶钾含量降低的同时, 根系的 *NTORK1* 基因表达增加且内源 IAA 含量升高。因此, 推测烟草根系 *NTORK1* 基因的启动子可能受 NAA 等植物激素的诱导, 并可以通过筛选适宜的激素来调控 *NTORK1* 基因表达, 从而改善烟叶钾含量。本研究通过克隆 *NTORK1* 基因的启动子, 并深入分析其功能, 研究激素对其的影

收稿日期: 2015-11-03

基金项目: 中国烟草总公司科技重大专项 [110201401007 (JY-07)]; 中国烟草总公司科技重大专项 (Ts-02-20110013); 贵州省农业攻关科技计划项目 [黔科合 NY(2013)3020 号]

作者简介: 姜 骁 (1990-), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学与基因工程。(E-mail) 15066223517@163.com

通讯作者: 赵杰宏, (E-mail) zhaojiehong@126.com

响,为烟草根系钾外流研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

烟草 K326 由本实验室提供。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 以及质粒 pBI121 等均由本实验室保存。限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、PCR 反应相关试剂和 DNA 回收试剂盒等购自宝生物工程(大连)有限公司,T4 DNA 连接酶等购自 NEB 公司(NEW ENGLAND BioLabs),GUS 染色液购自南京森贝伽生物科技有限公司,植物激素(NAA、6-BA、SA)购自北京索莱宝科技有限公司。

表 1 引物序列

Table 1 The sequence of the primers

引物名称	引物序列(5'→3')
启动子克隆引物 P _{tork} .FP	CCC <u>AAGCTT</u> TTTTTGCTCTTCCTCAATCTTCTT (下划线为 <i>Hind</i> III 酶切位点)
启动子克隆引物 P _{tork} .RP	CGGGATCCCATCGACATCTTCAACCGC (下划线为 <i>Bam</i> H I 酶切位点)
检测引物 Tork_check.FP	TCACATACATTTTCGTGCTCAAG
检测引物 Tork_check.RP	AAAGGGAAGGAGGAGGGA
检测引物 GUS_check.FP	TGGGCATTCAGTCTGGATCG
检测引物 GUS_check.RP	AGTCCCGCTAGTGCCTTGTG

1.2.2 pBI121-*NTORK1* 载体构建 使用 *Bam* H I 和 *Hind* III 分别双酶切 pB10 与 pBI121,胶回收 *NTORK1* 启动子片段和切除 35S 启动子的 pBI121 载体大片段,使用 NEB T4 DNA ligase 连接 *NTORK1* 启动子片段和切除 35S 启动子的 pBI121 载体大片段。连接条件为 30 ℃ 1 h,16 ℃ 16 h,获得质粒 pBI121-*NTORK1*。使用 *NTORK1* 检测引物和 *GUS* 基因检测引物通过 PCR 阳性鉴定。*NTORK1* 检测引物 PCR 反应程序:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。*GUS* 基因检测引物 PCR 程序:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。*NTORK1* 检测引物预期扩增片段大小为 251 bp,*GUS* 基因检测引物扩增片段预期大小为 645 bp。*NTORK1* 检测引物和 *GUS* 基因检测引物序列见表 1。

1.2.3 烟草 K326 的遗传转化 将表达载体 pBI121、pBI121-*NTORK1* 分别通过冻融法转化根癌农杆菌 EHA105。质粒 PCR 鉴定阳性的根癌农杆菌菌落 28 ℃ 培养过夜。二次活化 EHA105 至 $OD_{600} \approx$

1.2 试验方法

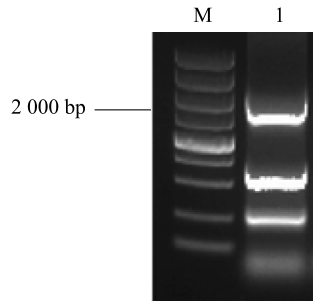
1.2.1 *NTORK1* 启动子的克隆 *NTORK1* (GenBank:AB196792.1) 采用电子克隆其上游核苷酸序列,并设计一组 5'引入 *Hind* III,3'引入 *Bam* H I 酶切位点的引物,PCR 扩增后与 Promega T 载体连接,测序。以烟草 K326 基因组 DNA 为模板,PCR 克隆 *NTORK1* 基因上游序列,预期克隆片段大小为 2 111 bp,通过 TA 克隆将产物连接到克隆载体上得到含 *NTORK1* 启动子片段的 T 载体 pB10,然后菌落 PCR 筛选阳性克隆并将质粒送上海捷瑞生物技术公司测序。PCR 反应程序为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min 30 s;35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增引物序列见表 1。

0.8。将无菌培养的 4~5 叶期烟草的叶片切成 0.5 cm² 的小块,在 MS 固体培养基预培养 2 d 后,分别在 2 种菌液中侵染 5~10 min。用灭菌滤纸吸干叶片表面菌液,置于 MS 培养基上暗培养 2 d。用含羧苄青霉素(100 mg/L)和头孢霉素(100 mg/L)的水将叶片除菌后,分别置于含有不同激素(5.4 μ mol/L NAA、54.0 μ mol/L NAA、4.4 μ mol/L 6-BA、44.0 μ mol/L 6-BA、50 μ mol/L SA、500 μ mol/L SA)的 MS 培养基上培养 3 d,然后进行 GUS 染色。

2 结果与分析

2.1 *NTORK1* 启动子的克隆

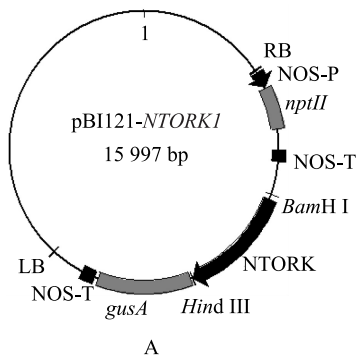
以烟草 K326 基因组 DNA 为模板,使用特异引物扩增得到 3 个条带(250 bp、500 bp、2 000 bp),(图 1)。回收其中 2 000 bp 左右的条带后,与 Promega T 载体连接成 pB10,提取质粒进行测序,测序结果显示该片段长 2 111 bp,序列与预期拼接序列一致,使用 BLAST 与拼接片段比对,结果显示同源性为 99%,仅 2 个碱基不同。



M:DL5000 分子量标准;1:PCR 扩增烟草 K326 基因组获得 *NTORK1* 启动子。

图 1 *NTORK1* 启动子的 PCR 扩增

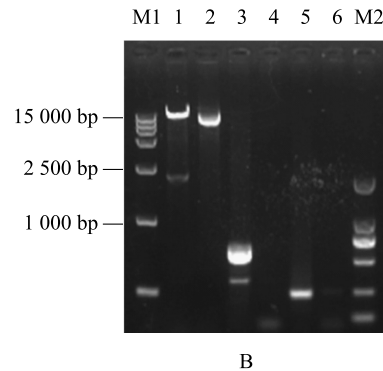
Fig.1 PCR amplification of *NTORK1* promoter



A

2.2 pBI121-*NTORK1* 载体构建

将质粒 B10 和质粒 pBI121 使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,回收 pB10 小片段和 pBI121 大片段,连接转化感受态,通过菌落 PCR 筛选后获得载体 pBI121-*NTORK1* (图 2A)。使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切载体 pBI121-*NTORK1*,载体被切成 1 条约 15 000 bp 和 1 条约 2 100 bp 的条带;使用 *GUS* 基因和 *NTORK1* 启动子片段检验引物进行 PCR 验证,分别得到 1 条 645 bp 和 1 条 251 bp 的条带(图 2B),和预期结果一致,表明载体构建正确。



B

A:pBI121-*NTORK1* 质粒图谱;B:pBI121-*NTORK1* 分子检测。M1:DL15000 标准分子量;M2:DL2000 标准分子量;1:质粒 pBI121-*NTORK1* 双酶切(*Bam*H I 和 *Hind* III);2:质粒 pBI121-*NTORK1* 阳性对照;3:pBI121-*NTORK1* 质粒 *GUS* 基因 PCR 检测;4:*GUS* 基因 PCR 检测阴性对照;5:pBI121-*NTORK1* 质粒 *NTORK1* 启动子 PCR 检测;6:*NTORK1* 启动子 PCR 检测阴性对照。

图 2 pBI121-*NTORK1* 质粒图谱和分子检测

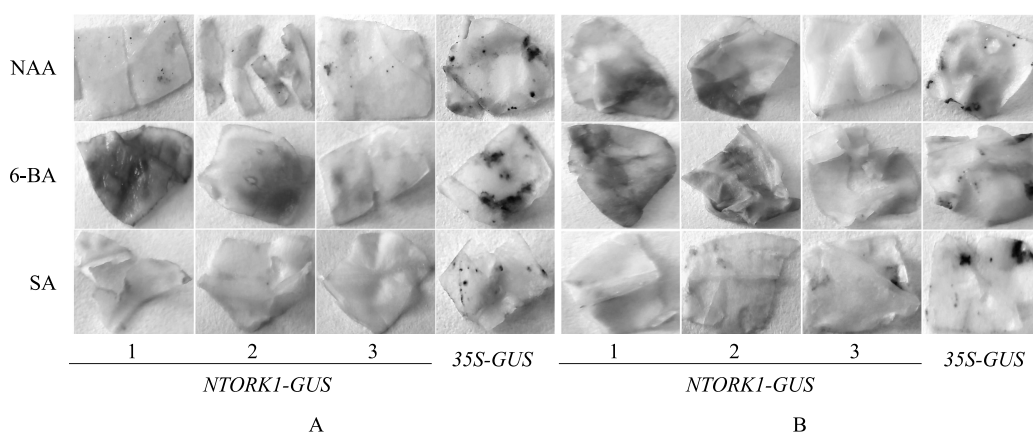
Fig.2 The sketch map and molecular detection of plasmid pBI121-*NTORK1*

2.3 pBI121-*NTORK1* 瞬时表达分析

将叶片浸没在 *GUS* 染色液中并使用乙醇脱色去除叶绿素后拍照观察,发现对照 pBI121 在 6 种不同浓度激素环境中均明显变蓝(图 3),表明农杆菌介导的瞬时表达系统正常。同时,在含 NAA 培养基上,*GUS* 基因均有表达,其中 5.4 μ mol/L 的 NAA 中 *GUS* 表达量明显高于 54.0 μ mol/L;在含 6-BA 的培养基上,*GUS* 基因均未见表达;在含 SA 的培养基上,*GUS* 基因在低浓度(50 μ mol/L)时未见表达,在高浓度(500 μ mol/L)时表达明显。结果表明,NAA 对 *NTORK1* 启动子有诱导作用,低浓度(5.4 μ mol/L)比高浓度(54.0 μ mol/L)的诱导效果更明显;SA 在高浓度(500 μ mol/L)时对 *NTORK1* 启动子有诱导作用;6-BA 对 *NTORK1* 启动子无诱导作用(图 3)。

3 讨论

试验结果表明,*NTORK1* 具有激素诱导性,并受激素种类和浓度的影响而效果不同。其中高浓度(500 μ mol/L)SA 对 *NTORK1* 有诱导,而低浓度(50 μ mol/L)SA 条件下 *NTORK1* 的表达量很低,与 Jayakannan 等^[11]在拟南芥中用定量 PCR 证明小于 100 μ mol/L 的 SA 能抑制盐胁迫诱导的 *GORK* 表达,而大于 500 μ mol/L 的 SA 没有抑制作用的试验结果较一致。试验中以 NAA 代替 IAA 模拟 IAA 对 *NTORK1* 基因进行诱导,结果表明低浓度(5.4 μ mol/L)NAA 比高浓度(54.0 μ mol/L)NAA 对 *NTORK1* 的诱导性更强,与 Sano 等^[12]证明烟草 BY-2 悬浮细胞中 *NTORK1* 受 5.4 μ mol/L 的 NAA 诱导表达的结果一致。打顶导致烟草根系内源 IAA 增



A: 5.4 $\mu\text{mol/L}$ NAA, 4.4 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA, 50 $\mu\text{mol/L}$ SA; B: 54 $\mu\text{mol/L}$ NAA, 44 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA, 500 $\mu\text{mol/L}$ SA。 *NTORK1-GUS* 表示质粒 pBI121-*NTORK1*; *35S-GUS* 表示 pBI121。

图3 烟草叶片 pBI121-*NTORK1* 瞬时表达和 GUS 染色

Fig.3 Transient expression of pBI121-*NTORK1* and GUS staining in tobacco leaves

加^[1,13],这可能会通过影响烟叶 *NTORK1* 的表达而导致烟叶 K^+ 含量变化。这为进一步筛选有效抑制 *NTORK1* 表达,降低烟草根系 K^+ 外流的激素种类和剂量提供理论依据。推测低剂量 SA 有助于降低烟叶 K^+ 外流。*NTORK1* 作为烟草主要钾离子外流通道基因,研究它的调控机制对降低烟叶钾外流和提升烟叶品质的意义重大,并对改善其他作物的钾含量有重要的借鉴意义。

参考文献:

- [1] DAI X Y, SU Y R, WEI W X, et al. Effects of top excision on the potassium accumulation and expression of potassium channel genes in tobacco[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(1): 279-289.
- [2] 韩锦峰,朱大恒,刘华山,等. 我国烤烟含钾量低的原因及解决途径[J].河南农业科学, 2010(2):32-36.
- [3] WANG Y, WU W H. Potassium transport and signaling in higher plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 451-476.
- [4] LEBAUDY A, VÉRY A A, SENTENAC H. K^+ channel activity in plants: genes, regulations and functions[J]. FEBS Letters, 2007, 581(12): 2357-2366.
- [5] GAMBALE F, UOZUMI N. Properties of Shaker-type potassium channels in higher plants[J]. The Journal of Membrane Biology, 2006, 210(1): 1-19.
- [6] 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(5365): 918-921.
- [7] REINTANZ B, SZYROKI A, IVASHIKINA N, et al. AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel α -subunit modulates root hair K^+ influx[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(6): 4079-4084.
- [8] GAYMARD F, PILOT G, LACOMBE B, et al. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem sap[J]. Cell, 1998, 94(5): 647-655.
- [9] SANO T, BECKER D, IVASHIKINA N, et al. Plant cells must pass a K^+ threshold to re-enter the cell cycle[J]. The Plant Journal, 2007, 50(3): 401-413.
- [10] LEBAUDY A, VÉRY A A, SENTENAC H. K^+ channel activity in plants: genes, regulations and functions[J]. FEBS Letters, 2007, 581(12): 2357-2366.
- [11] JAYAKANNAN M, BOSE J, BABOURINA O, et al. Salicylic acid improves salinity tolerance in *Arabidopsis* by restoring membrane potential and preventing salt-induced K^+ loss via a GORK channel[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(8): 2255-2268.
- [12] SANO T, KUTSUNA N, BECKER D, et al. Outward-rectifying K^+ channel activities regulate cell elongation and cell division of tobacco BY-2 cells[J]. The Plant Journal, 2009, 57(1): 55-64.
- [13] FU Y, GUO H, CHENG Z, et al. NtNAC-R1, a novel NAC transcription factor gene in tobacco roots, responds to mechanical damage of shoot meristem[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 69: 74-81.

(责任编辑:陈海霞)