

朱守晶, 肖祥云, 史文娟. 苎麻 *BnNramp2* 基因的克隆与生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(3): 749-752.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.03.035

苎麻 *BnNramp2* 基因的克隆与生物信息学分析

朱守晶^{1,2}, 肖祥云¹, 史文娟¹

(1. 宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000; 2. 江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西 宜春 336000)

关键词: *NRAMP2* 基因; 克隆; 序列分析; 苎麻

中图分类号: S563.101

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019)03-0749-04

Cloning and bioinformatic analysis of *BnNramp2* from ramie (*Boehmeria nivea* L.)

ZHU Shou-jing^{1,2}, XIAO Xiang-yun¹, SHI Wen-juan¹

(1. College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University, Yichun 336000, China; 2. Jiangxi Province Key Laboratory of Controlling and regulating of Crop Growth and Development, Yichun 336000, China)

Key words: *NRAMP2*; cloning; sequence analysis; *Boehmeria nivea*

重金属是主要的环境污染物之一,所有重金属对生物都有潜在的危害作用^[1-6]。天然抗性相关巨噬细胞蛋白家族(Natural resistance-associated macrophage protein, *NRAMP*)是一类广泛存在于微生物、植物、动物中的古老且高度保守的膜整合蛋白家族,参与大多数有机体的金属离子(如 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Al^{3+})的运输^[7-9]。目前,已在许多高等植物中发现了 *NRAMP* 家族基因。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)基因组中,分别存在6和7个 *NRAMP* 家族成员,其中一些 *NRAMP* 基因的功能已经比较清楚。拟南芥中的 *Nramp1*、*Nramp3* 和 *Nramp4* 基因可以转运 Mn 、 Fe 和 Cd ^[10-12],而 *Nramp6* 只能转运 Cd ^[13]。在水稻中也有相关报道,Takahashi 等研究发现 *OsNramp1* 基因与水稻根系对镉的吸收和转运过程密切相关,该基因在水稻根部表达量的差异也导致水稻品种间的镉积累量呈现差异^[14]。Sasaki 等将敲除了 *Nramp5* 基因的水稻突变体与野生型水稻植株同时种植在含锰和镉的培养基中,发现突变体根中锰和镉的含量及其净吸收量都显著低于野生型^[15]。这些发现促进了对植物 *Nramp* 基因转运金属离子的研究,也表

明 *Nramp* 基因在重金属抗性中起着重要作用。

苎麻(*Boehmeria nivea* L.)为荨麻科苎麻属多年生宿根性草本植物^[16]。许多研究结果表明,苎麻对重金属镉(Cd)具有较强的耐受和富集能力^[17-20]。虽然对其他植物的研究结果表明,*NRAMP* 家族基因在植物对镉的吸收和转运过程中起着关键作用,但目前在苎麻中尚未得到克隆。本研究在苎麻转录组测序的基础上^[21],筛选与拟南芥 *Nramp2* 基因同源性较高的苎麻 *Nramp* 基因,设计引物通过 RT-PCR 克隆该基因的开放读码框,并对其进行生物信息学分析,以期为后续的表达分析及功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料为耐镉性较强的苎麻栽培品种中苎一号,种植于宜春学院苎麻资源圃。在苎麻旺长期,选择生长健壮、无病虫害的植株,剪取根部和叶片,液氮速冻,然后置于 -80°C 超低温冰箱保存,用于 RNA 的提取。

1.2 生化试剂

RNA 提取试剂 RNeasy pure plant kit 购自天根生化科技(北京)有限公司,PrimeScriptTM RT reagent kit with gDNA eraser 和 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司(日本),Trans2K plus II DNA marker,TransTaq[®] HiFi DNA polymerase、大肠杆菌化学感受态细胞、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京全式金

收稿日期:2018-08-05

基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ161008);江西省作物生长发育调控重点实验室开放基金项目(KFJJ201703)

作者简介:朱守晶(1985-),男,安徽淮南人,博士,讲师,主要从事苎麻耐镉分子机理研究。(E-mail)zhushj85@sina.com

生物技术有限公司,其余试剂均为国产分析纯或者化学纯。引物合成和测序由上海生工生物技术服务有限公司完成。

1.3 RNA提取及cDNA合成

按照天根 RNAprep pure plant kit 试剂盒说明书提取苎麻样品总 RNA。按照 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA eraser 试剂盒说明书将 RNA 反转录为第一链 cDNA。

1.4 BnNramp2 基因的克隆

基于苎麻镉胁迫转录组中的 Unigene 拼接序列,利用 Primer Premier 5.0 软件在开放读码框外侧设计一对特异性引物 *BnNramp-F* (5'-CGGCATCGCGCTCGGCAATCTCCC-3') 和 *BnNramp-R* (5'-GCTATTTGTGCTCGCACTTCTTCT-3'),以苎麻 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系为:第一链 cDNA 1.0 μl, Buffer 2.5 μl, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μl, dNTP (2.5 μmol/L) 2.0 μl, TransTaq® HiFi DNA polymerase 0.2 μl, ddH₂O 17.5 μl。反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,32 个循环;72℃ 延伸 7 min,最后 4℃ 保温。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶回收目的条带,将回收产物连接至 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌感受态细胞,经 PCR 鉴定后,送阳性克隆至上海生工生物技术服务有限公司进行序列测定。

1.5 BnNramp2 基因的生物信息学分析

通过 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 数据库的 ORF Finder 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对 *BnNramp2* 基因的开放读码框进行查找,并将其翻译成氨基酸序列;利用 ExPASy 数据库的 ProtParam 工具 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 对 *BnNramp2* 编码氨基酸的组成和理化性质进行分析;利用 ExPASy 数据库的 TMPred 工具 (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) 对蛋白质的跨膜结构域进行预测;利用 WoLF PSORT 在线软件 (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 预测 *BnNramp2* 蛋白的亚细胞定位;采用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线软件对蛋白质的信号肽序列进行预测;用 SOPMA 在线软件 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) 预测分析蛋白质的二级结构;在 NCBI 数据库中对氨基酸序列进行 BLAST 相似性检索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);利用 NCBI 数据库的 Conserved domain search 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质保守功能域预测;在 DNAMAN 8.0 软件中进行氨基酸序列的多重比对;利用 MEGA 5.0 软件采用 Neighbor-Joining 方法构建蛋白质系统进化树,Bootstrap 统计学检验次数为 500。

2 结果与分析

2.1 苎麻 BnNramp2 基因的克隆

按照试剂盒说明书提取耐镉苎麻品种中苎一号根部和

叶片总 RNA,经过 1% 琼脂糖凝胶电泳后,可以看到清晰的 28S 和 18S 条带,且 28S 条带亮度是 18S 的 2 倍左右,基本没有降解,可以满足下一步试验要求。将根部和叶片总 RNA 等量混合,反转录为 cDNA 模板。采用 *BnNramp-F* 和 *BnNramp-R* 引物进行 PCR 扩增,得到 1 条 1 800 bp 左右的特异性条带。切胶回收后连接至 pMD18-T 载体,送至上海生工生物技术服务有限公司进行测序。采用 NCBI 网站的 ORF Finder 软件对测得的序列进行 ORF 查找,结果表明苎麻 *BnNramp2* 基因含有一个长度为 1 596 bp 的开放读码框,位于 92~1 687 bp 处,编码 531 个氨基酸,与 GenBank 已登录的其他植物的 *Nramp2* 基因相似性较高,将其命名为 *BnNramp2*。

2.2 苎麻 BnNramp2 蛋白基本性质预测

利用 ExPASy 数据库的 ProtParam 工具对 *BnNramp2* 基因推导的氨基酸序列进行分析,发现该蛋白质的分子量为 5.874×10^4 ,等电点为 5.36,含有 20 种氨基酸,含量最高的为亮氨酸 (13.6%),含量最低的为半胱氨酸 (0.9%),分子式为 C₂₇₀₉H₄₂₃₉N₆₇₇O₇₄₂S₁₈。蛋白质不稳定系数为 40.18,为不稳定蛋白质。利用 TMPred 工具对 *BnNramp2* 的跨膜结构域进行预测,结果表明,*BnNramp2* 蛋白含有 12 个可能的跨膜区域,对应的氨基酸残基区域分别为 72~90、106~123、149~173、180~201、211~228、255~274、302~321、347~368、391~412、424~443、460~477、484~508。利用 WoLF PSORT 软件对 *BnNramp2* 的亚细胞定位进行预测,结果表明 *BnNramp2* 蛋白质定位于质膜处。SignalP 4.1 Server 软件分析结果表明,*BnNramp2* 蛋白不含信号肽序列,不属于分泌型蛋白质。

2.3 苎麻 BnNramp2 蛋白二级结构预测

利用 PRABI 网站的 SOPMA 程序 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) 对 *BnNramp2* 蛋白进行二级结构预测,推测该蛋白质主要由 α 螺旋 (α-helix)、延伸链 (Extended strand)、β-转角 (Beta turn) 和无规则卷曲 (Random coil) 结构组成,比例分别为 54.80%、12.62%、3.01% 和 29.57%。

2.4 BnNramp2 蛋白氨基酸序列比对和结构域分析

利用 DNAMAN 8 软件对苎麻 *BnNramp2* 蛋白和其他植物物种的 *Nramp* 蛋白进行多序列比对,发现苎麻 *BnNramp2* 蛋白与拟南芥、川桑、山黄麻、桃和梅 *Nramp2* 蛋白的相似性较高,相似度分别为 80%、86%、84%、83% 和 83%。利用 NCBI 的 CD-search 和 ExPASy 数据库 PROSITE 软件分析氨基酸序列的保守结构域,发现 *BnNramp2* 蛋白的第 92~455 位氨基酸残基为典型的 *Nramp* 结构域,同时第 410~413 氨基酸残基处存在一个 N-糖基化位点 (N-glycosylation site),属于 *Nramp* 超家族。

2.5 苎麻 BnNramp2 蛋白系统进化分析

为进一步研究苎麻 *BnNramp2* 蛋白在物种中的进化位置和亲缘关系,利用 MEGA 5.0 软件对苎麻、川桑、山黄麻、水稻、玉米等不同植物物种的 *Nramp2* 氨基酸序列进行进化树分析比较。结果表明,单子叶和双子叶植物 *Nramp2* 蛋白

明显被聚成 2 类。苧麻 *BnNramp2* 与同为荨麻目的川桑、山黄麻亲缘关系最近,聚为一个亚类,而与单子叶的水稻、玉米的亲缘关系最远。蔷薇目的桃、梅和甜樱桃,锦葵目的棉花、长蒴黄麻,豆科的花生、野生大豆,十字花科的拟南芥、天蓝遏蓝菜和油菜,均分别聚为一个亚类。

3 讨论

植物对土壤中矿质营养元素的吸收与重金属元素的吸收积累关系密切。以往的研究结果表明,砷、镉等有毒重金属元素是通过矿质营养元素的吸收运输通道进入并在植物体中进行分布的^[14-15,22]。转运蛋白不仅在植物矿质营养元素的运输过程中起到重要作用,同时也可转运重金属元素。*Nramp* 是一类古老的膜整合蛋白家族,虽然经过长期进化,*Nramp* 基因在各物种之间仍保持着高度的保守性,并在植物吸收转运重金属的过程中起到十分重要的作用^[13-15,23]。虽然目前已在一些植物中克隆了多个 *Nramp* 家族基因,但在苧麻中至今未见报道。本研究采用 RT-PCR 技术,首次从耐镉苧麻品种中苧一号中成功克隆了 *BnNramp2* 基因的全长编码序列。

Nramp 家族成员均为具有膜整合蛋白特征的多肽分子,通常含 10~12 个跨膜区、1~2 个糖基化位点和 1 个具有转运蛋白特征的结构域^[24]。本研究对苧麻 *BnNramp2* 基因推导的氨基酸序列进行了分析,发现第 92~455 氨基酸残基含有一个 *Nramp* 蛋白结构域,并在第 410~413 氨基酸残基处存在一个 *N*-糖基化位点。对 *BnNramp2* 跨膜结构域的预测结果表明,*BnNramp2* 蛋白含有 12 个可能的跨膜区域。亚细胞定位预测结果表明,*BnNramp2* 蛋白定位于质膜。以上结果说明,苧麻 *BnNramp2* 具有 NRAMP 蛋白家族的重要特征,是一个典型的 *Nramp* 蛋白家族成员。

序列相似性比对和系统进化树分析结果显示,苧麻 *BnNramp2* 蛋白与其他植物 *Nramp2* 蛋白的相似性及同源性较高,很有可能为 *Nramps2* 家族成员。Gao 等^[25]研究了 Cd 超积累和非超积累 2 种类型东南景天在 Cd 诱导下的基因表达差异,发现在正常生长条件下,*Nramp2* 基因在 2 种生态型东南景天中表达差异并不显著,但在 Cd 诱导条件下,*Nramp2* 基因在超积累东南景天中的表达水平要显著高于非超积累生态型,转运蛋白基因在超积累植物中的超量表达可能是其超积累 Cd 的关键。赵首萍等^[26]研究了高 Cd 积累和低 Cd 积累 2 种基因型番茄对 Cd 胁迫响应的差异,发现高 Cd 积累型番茄的根系对离子态 Cd 的高吸收速率与 *Nramp2*、*Nramp3* 和 *ZIP* 基因的高表达量有关,可能是其获得高镉积累量的原因之一。这些结果表明,*Nramp2* 基因参与了 Cd 的吸收转运,因此 *BnNramp2* 基因可能与苧麻体内重金属 Cd 的吸收转运有关。

参考文献:

[1] 陈怀满.土壤-植物系统中的重金属污染[M].北京:北京出版

社,1996.

- [2] 环境保护部,国土资源部.全国土壤污染状况调查公报[J].中国环境管理,2014,6(2):26.
- [3] 公勤,康群,王玲,等.重金属铜对植物毒害机理的研究现状及展望[J].南方农业学报,2018,49(3):469-475.
- [4] TOPPI L S D, GABBRIELLI R. Response to cadmium in higher plants[J]. Environmental and Experimental Botany, 1999, 41(2):105-130.
- [5] CHANEY R L, REEVES P G, RYAN J A, et al. An improved understanding of soil Cd risk to humans and low cost methods to phytoextract Cd from contaminated soils to prevent soil Cd risks[J]. Biometals, 2004, 17(5):549-553.
- [6] SHAH K, NONGKYNRIH J M. Metal hyperaccumulation and bioremediation[J]. Biologia Plantarum, 2007, 51(4):618-634.
- [7] NEVO Y, NELSON N. The NRAMP family of metal-ion transporters[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2006, 1763(7):609-620.
- [8] VIDAL S M, DANIELLE M, KYLE V, et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg[J]. Cell, 1993, 73(3):469-485.
- [9] CELLIER M, BELOUCHI A, GROS P. Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp[J]. Trends in Genetics, 1996, 12(6):201-204.
- [10] CURIE C, ALONSO J M, LE J M, et al. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport[J]. Biochemical Journal, 2000, 347(3):749-755.
- [11] THOMINE S, WANG R, WARD J M, et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(9):4991-4996.
- [12] LANQUAR V, LELIÈVRE F, BOLTE S, et al. Mobilization of vacuolar iron by *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* is essential for seed germination on low iron[J]. Embo Journal, 2005, 24(23):4041-4051.
- [13] CAILLIATTE R, LAPEYRE B, BRIAT J F, et al. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity[J]. Biochemical Journal, 2009, 422(2):217-228.
- [14] TAKAHASHI R, ISHIMARU Y, SENOURA T, et al. The *Os-NRAMP1* iron transporter is involved in Cd accumulation in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(14):4843-4850.
- [15] SASAKI A, YAMAJI N, YOKOSHO K, et al. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice[J]. Plant Cell, 2012, 24(5):2155-2167.
- [16] 李宗道.麻作的理论与技术[M].上海:上海科学技术出版社,1980:124-256.
- [17] 雷梅,岳庆玲,陈同斌,等.湖南柿竹园矿区土壤重金属含量及植物吸收特征[J].生态学报,2005,25(5):1146-1151.
- [18] 朱守晶,史文娟,揭雨成.不同苧麻品种对土壤中镉、铅富集的差异[J].江苏农业学报,2018,34(2):320-326.

- [19] 余 玮,揭雨成,邢虎成,等. 湖南冷水江铋矿区苎麻对重金属的吸收和富集特性[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(1): 91-96.
- [20] 朱守晶,余伟林,石朝燕,等. 苎麻谷胱甘肽还原酶基因(*BnGR1*)的克隆和表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(10):1318-1326.
- [21] SHE W, ZHU S J, JIE Y C, et al. Expression profiling of cadmium response genes in ramie (*Boehmeria nivea* L.) root[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2015, 94(4): 453-459.
- [22] WU Z, REN H, MCGRATH S P, et al. Investigating the contribution of the phosphate transport pathway to arsenic accumulation in rice[J]. Plant Physiology, 2011, 157(1):498-508.
- [23] YANG M, ZHANG Y, ZHANG L, et al. *OsNRAMP5* contributes to manganese translocation and distribution in rice shoots[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(17):4849.
- [24] BOZZI A T, BANE L B, WEIHOFEN W A, et al. Conserved methionine dictates substrate preference in Nramp-family divalent metal transporters[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(37): 10310-10315.
- [25] GAO J, SUN L, YANG X, et al. Transcriptomic analysis of cadmium stress response in the heavy metal hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance[J]. PLoS ONE, 2013, 8(6):e64643.
- [26] 赵首萍,张永志,张 棋,等. 两种基因型番茄对镉胁迫响应差异[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(5):1261-1268.

(责任编辑:张震林)