

西洋梨水孔蛋白基因家族的全基因组鉴定及表达分析

冉 昆, 孙 岩, 孙晓莉, 魏树伟, 王宏伟, 张 勇, 王少敏

(山东省果树研究所, 泰安 271000)

摘要: 水孔蛋白 (AQP, aquaporins) 是高效转运水分子的膜内在蛋白, 具有丰富的多样性, 在调控植物的水分关系中有重要作用。本研究利用西洋梨 (*Pyrus communis* L. 'Bartlett') 基因组数据库, 通过生物信息学手段鉴定西洋梨 *PcAQPs* 基因家族成员; 并利用 MEGA 6.0.5 软件, 采用邻接法构建系统发育树; 利用 GSDS 2.0 软件进行基因结构分析, MEME 程序进行 Motif 分析, AgBase v2.00 程序进行 GO 分析; 采用半定量 RT-PCR 技术研究 *PcAQPs* 基因组织表达情况。结果表明, 西洋梨基因组中共有 54 个 *PcAQPs* 家族成员, 均含有 AQP 特征结构域和保守的 Motif 基序, 根据基因结构及系统进化分析可分为 PIP、TIP、NIP 和 SIP 等 4 个亚家族。不同基因间结构差别较大, 但聚类关系较近的基因其结构类似。GO 分析发现, 多数 *PcAQPs* 基因具有转运蛋白活性, 参与物质转运、应激反应、发育和代谢等生物学过程, 但不同亚家族成员构成的细胞组分及参与的生物学过程具有明显差异。半定量结果表明, 大多数 *PcAQPs* 基因在根、茎、叶和果实中均有表达, 而且不同基因家族、不同基因间的组织表达模式存在差异。该研究为今后西洋梨 *PcAQPs* 基因的克隆和功能分析奠定了基础。

关键词: 西洋梨; 水孔蛋白; 全基因组分析; 表达分析

Identification and Expression Analysis of the AQP Gene Family in *Pyrus communis*

RAN Kun, SUN Yan, SUN Xiao-li, WEI Shu-wei, WANG Hong-wei, ZHANG Yong, WANG Shao-min

(Shandong Institute of Pomology, Tai'an 271000)

Abstract: Aquaporins (AQPs) are the members of the major intrinsic proteins (MIPs) family with extraordinary ability to transport water, and play important roles in modulation of water relationships in plants. In this study, based on the genome database of *Pyrus communis* L. 'Bartlett' (http://www.rosaceae.org/species/pyrus/pyrus_communis/genome_v1.0), the AQPs gene family of *Pyrus communis* were identified and the sequences characteristic, phylogenetic trees, gene structure, GO function and expression profiles were analyzed. The phylogenetic tree was constructed using MEGA 6.0.5 software with neighbor-joining method. The structure of the genes were analyzed by GSDS 2.0 software, the motif was analyzed by MEME program, and GO analysis was carried by AgBase v2.00 software. Their expression patterns in different tissues were studied with semi RT-PCR. The results showed that there were 54 *PcAQPs* genes which containing AQP feature domains and conserved motifs were identified systematically in *Pyrus communis*. According to the gene structure, conserved domains and phylogeny relationship, the *PcAQPs* proteins were classified into 4 subfamilies (PIP, TIP, NIP and SIP) and the structure difference was larger between different subfamily genes, however, the genes with close relationship cluster had similar structure. GO analysis showed that the majority of *PcAQPs* gene had transporter activity, involved in substance transportation, stress response, growth, metabolism and other biological processes, but there were obvious differences in cellular components and biological processes between different subfamily members. Semi RT-PCR results showed that most of *PcAQPs* genes

收稿日期: 2015-03-24 修回日期: 2015-04-29 网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1520.010.html>

基金项目: 山东省农业科学院青年科研基金 (2015YQN41); 山东省良种工程项目 (梨优质矮化、多抗功能基因挖掘与种质创新利用 2014); 现代农业 (梨) 产业技术体系 (CARS-29); “十二五”农村领域国家科技计划 (2014BAD16B034); 山东省自然科学基金 (ZR2015YL075)

第一作者主要从事梨抗逆生理与分子生物学研究。E-mail: rkl001@126.com

通信作者: 王少敏, 主要从事梨栽培与育种研究。E-mail: sdipwsm@163.com

were expressed in roots, stems, leaves, and fruits, and the expression patterns of different genes and different subfamilies were different. These results laid foundation for cloning and functional analysis of *PcAQP*s gene in *Pyrus communis*.

Key words: *Pyrus communis*; aquaporins; whole genome analysis; expression analysis

跨膜运输途径,即水分跨过液泡膜和质膜的运输途径,是水分在植物组织内运输的主要方式之一。水分跨膜运输以两种方式进行:通过脂双层的自由扩散运输和水孔蛋白的跨膜运输^[1]。水孔蛋白,又称水通道蛋白(AQPs, aquaporins),是植物中定位于特定的细胞核膜区域的一类高效转运水分子的小分子跨膜蛋白,具有丰富的多样性,其介导的水分跨膜运输是水分子进出细胞的主要途径,在调控植物的水分关系中有重要作用。研究表明,AQPs 属于 MIP(major intrinsic protein)超家族,分子量一般 23 ~ 31 kD^[2-3]。除水分子外,AQPs 还允许一些小的溶质经过细胞膜,如甘油、CO₂、NH₃、尿素、硼和 H₂O₂等^[4]。根据序列同源性和定位的不同,AQPs 可分为液泡膜内在蛋白(TIPs, tonoplast intrinsic proteins)、质膜内在蛋白(PIPs, plasma membrane intrinsic proteins)、NOD26-like 内在蛋白(NIPs, NOD26-like intrinsic proteins)和小的内在蛋白(SIPs, small and basic intrinsic proteins)等 4 个亚家族^[3]。AQPs 不仅在调控植物的水分关系及生长发育过程中起着重要的作用,还可以参与矿质营养运输,花粉开裂,非生物胁迫响应以及碳、氮的固定等生理活动^[5-6]。目前的研究主要集中在 AQPs 与植物激素、种子萌发、果实成熟和植物的抗逆性等方面^[7-9]。植物能够通过调节 AQPs 的活性响应各种逆境胁迫,在许多植物中 AQPs 在植物发育过程中具有独特的表达模式并且响应环境的刺激,在植物中过量表达 *AQP* 基因能够提高转基因植物对干旱等逆境胁迫的耐受性^[10-11]。

西洋梨作为梨重要的栽培种,在世界范围内具有广泛分布,并且因其浓郁的香气和艳丽的外观在我国具有广阔的发展前景。2014 年,西洋梨(*Pyrus communis* L. 'Bartlett')基因组测序计划完成,为 *AQPs* 基因家族的全基因组分析奠定了基础^[12]。目前,关于 AQPs 的研究在拟南芥等模式植物中较多,而在木本植物中研究很少,迄今,笔者尚未见有关西洋梨 *AQPs* 基因家族的研究报道。本研究采用生物信息学分析的方法,鉴定西洋梨 *PcAQP*s 基因家族,从基因组水平上对西洋梨 *PcAQP*s 家族基因的基因

结构、系统发育、GO 功能和组织表达模式等进行研究,对于进一步解析梨 *AQP* 基因家族的功能及未来利用基因工程手段培育高水分利用效率的新种质具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究于 2014 年在山东省果树研究所和山东农业大学作物生物学国家重点实验室进行。供试材料为国家梨产业体系泰安综合试验站核心示范园 4 年生巴梨,取新生根系、一年生枝条(茎)、嫩叶和果实于液氮中速冻, -80℃ 保存备用,以便提取 RNA 进行组织表达分析。西洋梨(*Pyrus communis* L. 'Bartlett')全基因组数据下载于 GDR 数据库(<http://www.rosaceae.org/>)^[13]。拟南芥 *AtAQP*s 基因序列和蛋白序列下载自 TAIR(<http://www.arabidopsis.org/>)^[14]。

1.2 *PcAQP*s 基因家族的鉴定

首先下载西洋梨全基因组序列,构建本地 BLAST 数据库,以巴梨 *AQP* 序列(GenBank 登录号 BAB40142.1)作为查询序列执行本地 BLAST(1e-003)搜索;同时使用 SMART 工具(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)建立西洋梨全基因组蛋白结构域模型^[15],利用 perl 程序筛选含有典型结构域的蛋白序列。合并上述两部分结果,删除重复基因^[16-17]。利用 ExPASy Proteomics Server(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测西洋梨 *PcAQP*s 氨基酸序列的理化性质,包括蛋白大小、分子量及等电点等^[18]。通过 WoLF PSORT(<http://wolfpsort.org/>)进行亚细胞定位分析。

1.3 系统发育树的构建

使用 Clustal X 软件对西洋梨 *PcAQP*s 蛋白进行氨基酸序列比对,采用 MEGA 6.0.5 软件包中的邻接法(NJ, neighbor-joining)构建系统发育树,校验参数 Bootstrap 重复 1000 次,通过随机逐步比较的方法搜索最佳系统进化树^[19]。

1.4 基因结构、Motif 及 GO 分析

利用 Perl 程序解析西洋梨基因组信息文件(assembly gff3 file),选取 *AQP* 基因的结构信息,利用

GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 进行基因外显子-内含子作图^[20]。用 MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>) 程序对西洋梨 PcAQPs 家族进行 Motif 分析以发现共有序列。

利用 AgBase v2.00 (<http://agbase.msstate.edu/index.html>) 程序对西洋梨 PcAQPs 家族进行 GO 分析。首先,利用 Goanna (<http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/GOanna.cgi>) 对 PcAQPs 蛋白进行 Blast P 分析,数据库选择 Uniprot,然后利用 GOanna2ga 程序 (<http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/GOanna2ga.cgi>) 将比对结果转换为基因关联文件;其次,利用 GOSlim Viewer (http://agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goslimviewer_select.pl) 产

表 1 引物序列

Table 1 Primers for AQP_s gene sequences

名称 Name	上游引物(5'-3') Sense primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Anti-sense primer(5'-3')
PCP029326.1	AGGACTTGGTGCTGAGAT	CTGCTTGTGTAGATGATGG
PCP022830.1	CCTATTCTCTACATCACAATC	TCTCAGCACCAAGTCCTT
PCP029575.1	GCAAGGAAGAAGATGTGAAG	CAGGAAGGTGGCAATGAA
PCP030098.1	CAGACAGACAAGGACTACAA	GACAGTGAGGACAGTGATG
PCP003791.1	GCCACCATTCCAATCACT	AGGTCCAAGCCAGAAGAT
PCP017287.1	ACTGGAACGGCATCAAC	GAATGTATTGGTGGTAGAAGG
PCP027590.1	TTCGTAGCCACTCTTCTCT	TAATCTCAGCAGCCAATCC
PCP015172.1	CCACTCTTCTCTTCCTCTAC	CAATAATCTCAGCAGCCAAT
PCP010719.1	TGTCTTCTCTGCCACTGA	AGCCTTGTCATTGTGTAGA
PCP010720.1	TTCTACAGAGCCATCATAGC	AACGAAGGTGCCAACAAT
PCP039945.1	CGTTCTACAGAGCCATCAT	CAATACCAAGAATGCCAACA
PCP006385.1	TTCGTCCTCGTCTACTGTA	GAGTTGTAGTTGTGCTTCTG
PCP000331.1	CCTTCGTCCTCGTCTACA	GTTGATTCCAGTTCCAGTA
PCP040067.1	TGTATATGGTGGCTCAGTTG	CAAGACAGTGTAGACAAGAAC
PCP016651.1	CGTCATCCGTCACAAGAA	TGCCAGGAGTGTAGTAGTAA
PCP043824.1	TCTTGCTCCAATGCTTCTT	CGTGTAGTAGTAATGTTCCATC
PCP023975.1	ACAATCTTGACGGTGATGG	GGAACATGCGAGTCTCTG
PCP032036.1	CGTCTATATCTTGAGCCAATG	CCGCAACTATTCGATGA
PCP040190.1	CAGTTGGAGGAAGTTGTGA	AGGAAGGCTATGATGAAGAC
PCP014763.1	TGCCTTGCTTGTGATTATAC	CCAACTGTTGTGCCAATT
PCP008934.1	CATCCATCATAGCCTCGTT	CCTCTCAGCATAATCACAAG
PCP013451.1	CTTCGTCTTCACCGTCAT	CGTTGCCAGGATTCATTG

生蛋白功能注释概要,GOSlim Set 选择 Plant;最后,将所得数据拷贝到 Excel 作图^[21]。

1.5 组织表达分析

RNA 的提取采用 QIAGEN 公司 RNeasy Plant Mini Kit (74903),用反转录试剂盒 PrimeScript[™] 1ST Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。采用 *PcActin* (AB190176.1) 作为内参基因。RT-PCR 反应体系为 25 μL。循环参数为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 25 s;58℃ 退火 25 s;72℃ 延伸 30 s;目的基因为 35 个循环,内参基因为 28 个循环;最后 72℃ 延伸 8 min。每一基因的 RT-PCR 反应均为 3 次重复,引物设计避开其保守结构域,所用引物序列详见表 1,引物名称来源于 GDR 数据库。

表 1(续)

名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
Name	Sense primer(5'-3')	Anti-sense primer(5'-3')
PCP001378. 1	GGCTATGTGGCTTCTCTT	GGCGTCTCTGTTGCTATG
PCP008764. 1	GGCTCTGTTCTTGCTCTT	CGTTAATGCTGGCTGAGA
PCP026373. 1	CACATTCGGAGCCTTCAT	GACCAGAGCGTTCCATAC
PCP000936. 1	GTTCATCTCAGTCTCATCTT	CCACAGCGTTCCATACTC
PCP030846. 1	GCAGGATTCTCACTATCGT	TAGACAAGAGCCGAATG
PCP005727. 1	TTCATCGGCGGCAATATC	TGGTGACGAACTTGAGGA
PCP004198. 1	CCAACTCACCATCCTCAC	CAAGTCCACCACCAATGA
PCP011132. 1	GTTAGTAGCCATTGCCATTG	AGAAGATGCCAGTGAGGAT
PCP026337. 1	GGCAACATCACCATCCTC	ACACCTTCAATAGCACCTAC
PCP015768. 1	ACTACCTTCCTCTTCGTCTT	GTGACCGCCAGATATGTG
PCP034656. 1	GTGGCGGATTGACTACTC	AGCATAGACTGTGAATAGCA
PCP038322. 1	TTGTGTTGCTGTTGTTG	TCATCTCTCCGTGATTCC
PCP043758. 1	TTCAGCAAGCAGTCACTC	AGTAGCAGATGGCATTGAG
PCP018963. 1	CCACTGATGCCAAGAGAA	GCTCGGATGACTATCTGAT
PCP024094. 1	CTGCCATCATCTACAACAAG	AATCCCTGGTCTTGAATGG
PCP042412. 1	GATGACCACTGGATCTTCT	GACAGATTGAGATACACCATAG
PCP032463. 1	GAGCTTCCATGAATCCTACA	CAGCACAATAGCAGCAATG
PCP003523. 1	CGACCAAGACAGTATTCAAG	TACACCATAGTAGCAGCAAT
PCP037248. 1	TGATGACATTACTCTGGACTC	CACCACAGTAGCAGCAAT
PCP013661. 1	CGTTGGACCACTGATAGG	TTGCTGTCGCTCTTGATT
PCP017687. 1	GAGACTACAGCAACTAATGGA	CAATGGTGACAGCAGGATT
PCP036631. 1	CCAGCAAGAAGCATAGGAC	TAGACCAAGGCACCACTC
PCP026167. 1	ACTACAGCGACTAATGGAAT	ATGGTGACAGCAGGATTG
PCP044370. 1	CCAGAGATTGTTCAACTTACC	GCCAACGGAATAGACCAT
PCP018042. 1	TCCACTCCAGATGAATCCA	ATGCCATAGATATGCCTTCC
PCP044056. 1	ATCAATATCTGCCTCGTTCA	AGGTTGTCCATTGCTGTC
PCP008003. 1	ATCACAATCCGCAGTCAC	CCGACCGCATAGATCATC
PCP028213. 1	GGTGTGATGATTGTGATTCTC	GTAGGAGCCACGAGGTATA
PCP001192. 1	AGTACAACGGAGCAGAGA	AGCACTGACAACGAACAA
PCP030985. 1	GCAGTGATGGCACTGATT	TTGGCAATGGCTAACAGAT
PCP034487. 1	GAGGTGGAGTGACAGTTC	CTTGACAGCCGTATAGGTT
PCP030984. 1	AGACGAAGACGAAGAAGATT	CAACGGCAGTGACAGTAA
PcActin	GGCTCCTCTCAATCCTAAG	TTGGCAGTCTCAAGTTCTT

2 结果与分析

2.1 西洋梨 *PcAQP*s 基因家族成员及系统进化分析

利用生物信息学的方法,从西洋梨基因组中鉴定到 54 个 *PcAQP*s 成员。通过 SMART 和 NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行蛋白结构分析,结果表明 54 个西洋梨 *PcAQP*s 蛋白均含有 AQP 特征结构域。通过 ExPASy 工具,对 *PcAQP*s 成员进行蛋白大小、分子量、等电点等属性分析,发现最大的蛋白 (PCP018042.1) 包含 381 个氨基酸残基,最小的蛋白 (PCP032463.1) 仅含有 73 个氨基酸残基;其等电点范围从 4.96 (PCP026373.1) 到 10.06 (PCP014763.1) (表 2)。

对西洋梨 *PcAQP*s 基因家族成员构建系统进化树(图 1),结果显示,54 个 *PcAQP*s 成员可分为 4 个

亚家族,分别为质膜内在蛋白 (PIP)、液泡膜内在蛋白 (TIP)、NOD26-like 内在蛋白 (NIP) 和小的内在蛋白 (SIP)。其中,NIP 类最多共 19 个(蓝色标记),其次为 PIP 类共 17 个(浅绿色标记),TIP 类共 13 个(黄色标记),SIP 类有 5 个(粉红色标记)(图 1)。

利用 WoLF PSORT 程序进行亚细胞定位分析,结果表明,定位于细胞膜上的 AQP 蛋白数量最多,为 18 个,其中 12 个属于 PIP 亚家族,5 个属于 NIP 亚家族,1 个属于 SIP 亚家族。另外,16 个定位于液泡,其中 7 个属于 TIP 亚家族,6 个属于 NIP 亚家族,2 个属于 SIP 亚家族,1 个属于 PIP 亚家族。11 个定位于细胞质,其中 6 个属于 TIP 亚家族,4 个属于 NIP 亚家族,1 个属于 SIP 亚家族。4 个定位于叶绿体,其中 2 个属于 TIP 亚家族,1 个属于 SIP 亚家族,1 个属于 NIP 亚家族。具体信息见表 2。

表 2 西洋梨 *AQP* 基因家族信息
Table 2 The information of *PcAQP*s gene family in *Pyrus communis*

登录号	Scaffold 定位	大小(aa)	分子式	分子量(D)	等电点	亚细胞定位
Accession No.	Scaffold location	Size	Formula	Molecular weight	Isoelectric point	Sublocation
PCP029326.1	scaffold00339;154,235..155,727	289	C1433H2210N362O387S5	30861.8	9.21	细胞膜
PCP022830.1	scaffold00175;68,746..70,262	289	C1431H2206N360O388S6	30853.8	9.18	细胞膜
PCP029575.1	scaffold00719;144,126..146,660	318	C1591H2449N403O427S9	34342.9	8.87	细胞膜
PCP003791.1	scaffold00263;187,836..190,025	281	C1412H2149N347O376S6	30194.0	7.65	细胞膜
PCP017287.1	scaffold01611;53,646..55,280	281	C1406H2144N348O373S6	30082.9	8.25	细胞膜
PCP027590.1	scaffold00158;71,317..74,547	283	C1410H2150N348O371S6	30105.0	8.77	细胞膜
PCP015172.1	scaffold00530;97,026..100,446	270	C1316H2004N330O360S6	28400.7	7.04	细胞膜
PCP010719.1	scaffold01227;66,316..68,110	211	C1066H1647N269O292S4	23031.6	6.40	细胞膜
PCP010720.1	scaffold01227;78,926..80,740	285	C1398H2156N352O382S7	30231.0	8.58	细胞膜
PCP039945.1	scaffold01227;66,362..66,715	117	C588H903N141O164S5	12731.7	5.47	细胞膜
PCP006385.1	scaffold17944;386..1,674	281	C1384H2119N359O368S5	29835.5	9.08	细胞膜
PCP000331.1	scaffold00101;195,684..197,087	281	C1389H2120N360O368S6	29942.6	9.20	细胞膜
PCP030098.1	scaffold04759;3,076..4,660	196	C964H1483N243O266S8	20989.3	8.73	细胞质
PCP016651.1	scaffold00311;218,167..219,737	180	C886H1413N247O241S7	19605.9	9.51	细胞质
PCP040067.1	scaffold51627;19..1,077	167	C811H1279N201O219S6	17541.6	9.35	液泡
PCP043824.1	scaffold01440;17,755..21,140	189	C919H1450N248O249S7	20181.5	9.41	胞外基质
PCP023975.1	scaffold23115;1..1,797	338	C1688H2619N445O469S9	36939.6	9.32	内质网
PCP008934.1	scaffold00826;85,606..86,465	240	C1182H1861N291O300S13	25365.3	9.92	液泡
PCP013451.1	scaffold00349;47,464..49,087	207	C995H1574N248O275S7	21635.3	8.76	液泡
PCP032036.1	scaffold03121;7,026..9,483	301	C1503H2360N380O393S11	32394.2	8.62	细胞膜
PCP040190.1	scaffold00468;86,211..87,499	304	C1460H2332N370O406S17	32109.8	6.58	细胞质
PCP014763.1	scaffold00150;70,216..71,084	240	C1193H1867N293O300S12	25499.4	10.06	叶绿体

表 2(续)

登录号	Scaffold 定位	大小(aa)	分子式	分子量(D)	等电点	亚细胞定位
Accession No.	Scaffold location	Size	Formula	Molecular weight	Isoelectric point	Sublocation
PCP001378.1	scaffold03161;1..2,117	255	C1237H1913N323O333S5	26798.0	7.10	液泡
PCP026373.1	scaffold00457;31,619..33,147	252	C1217H1855N291O329S4	25955.1	4.96	液泡
PCP000936.1	scaffold00801;79,904..81,507	252	C1221H1861N293O327S4	26005.2	5.33	液泡
PCP004198.1	scaffold00803;34,167..36,347	248	C1189H1813N283O318S2	25224.3	5.53	液泡
PCP011132.1	scaffold11887;1,006..2,134	136	C663H1023N159O175S3	14117.5	7.90	液泡
PCP026337.1	scaffold00397;156,486..158,220	248	C1184H1807N275O320S3	25110.2	5.09	液泡
PCP015768.1	scaffold02350;18,327..20,047	248	C1223H1872N294O321S5	25990.3	5.83	液泡
PCP008764.1	scaffold00506;8,934..10,487	256	C1259H1941N325O334S5	27134.5	7.10	细胞质
PCP030846.1	scaffold00400;147,526..149,535	252	C1210H1838N302O327S6	26040.0	5.78	细胞质
PCP005727.1	scaffold00624;147,678..148,907	252	C1210H1826N298O333S5	26035.9	4.98	细胞质
PCP034656.1	scaffold00050;197,511..199,348	209	C1007H1565N247O274S6	21708.3	5.55	细胞质
PCP038322.1	scaffold00142;339,561..340,974	256	C1183H1840N302O336S14	26118.2	6.24	叶绿体
PCP043758.1	scaffold00560;63,914..65,204	259	C1200H1867N307O341S17	26595.9	6.88	叶绿体
PCP042412.1	scaffold18075;303..747	116	C622H919N147O143S6	12936.4	7.79	液泡
PCP003523.1	scaffold00083;210,403..212,697	274	C1325H2123N333O367S13	29007.2	9.08	液泡
PCP013661.1	scaffold00589;256..1,330	124	C585H915N151O166S4	12847.8	9.58	液泡
PCP028213.1	scaffold01098;17,876..25,272	298	C1403H2211N367O397S14	31021.0	8.85	液泡
PCP034487.1	scaffold00889;54,902..58,050	306	C1447H2279N371O410S11	31785.9	8.68	液泡
PCP030984.1	scaffold00600;35,906..38,395	228	C1128H1754N298O323S7	24882.5	8.87	液泡
PCP037248.1	scaffold00938;33,993..38,647	198	C957H1517N257O263S5	21005.6	9.59	细胞膜
PCP044370.1	scaffold00244;124,615..125,838	265	C1307H2054N324O357S11	28371.3	8.42	细胞膜
PCP044056.1	scaffold00041;195,811..198,993	282	C1365H2135N347O380S10	29790.8	8.98	细胞膜
PCP001192.1	scaffold01561;9,726..14,611	284	C1330H2083N347O373S12	29286.9	8.88	细胞膜
PCP030985.1	scaffold00600;40,686..42,130	266	C1254H1966N330O355S7	27569.8	7.87	细胞膜
PCP024094.1	scaffold96335;166..670	82	C428H652N108O102S2	9006.6	8.26	细胞质
PCP036631.1	scaffold00976;34,897..35,826	103	C491H782N134O136S4	10866.6	9.89	细胞质
PCP017687.1	scaffold45451;3..944	117	C567H878N144O162S6	12496.4	6.38	细胞质
PCP008003.1	scaffold23305;1..1877	126	C615H932N160O173S5	13495.4	6.19	细胞质
PCP018963.1	scaffold03552;12,622..13,867	149	C734H1130N194O195S1	15824.2	9.01	胞外基质
PCP032463.1	scaffold00083;246,453..246,787	73	C354H581N87O96S2	7656.1	9.60	叶绿体
PCP026167.1	scaffold00237;139,728..142,047	271	C1309H2048N336O364S10	28637.2	8.81	细胞骨架
PCP018042.1	scaffold00172;265,099..270,607	381	C1864H2898N488O537S23	41473.8	8.72	细胞核

2.2 西洋梨 *PcAQP*s 基因结构分析

对西洋梨 *PcAQP*s 基因家族成员的基因结构进行分析,结果表明,不同 *PcAQP*s 成员基因间结构差别较大,内含子分布为 0~8 个,但多数含有 1~3 个内含子,其中 19 个成员含有 2 个内含子,13 个成员含有 3 个内含子,10 个成员含有 1 个内含子。进一

步分析发现,PIP 亚家族中的 17 个成员中有 10 个成员含有 3 个内含子,TIP 亚家族中的 13 个成员中有 11 个成员含有 2 个内含子,SIP 亚家族中有 2 个成员含有 2 个内含子,2 个成员不含内含子,而 NIP 亚家族成员中内含子数量和分布都较分散。总体而言,聚类关系较近的基因其结构类似(图 1)。

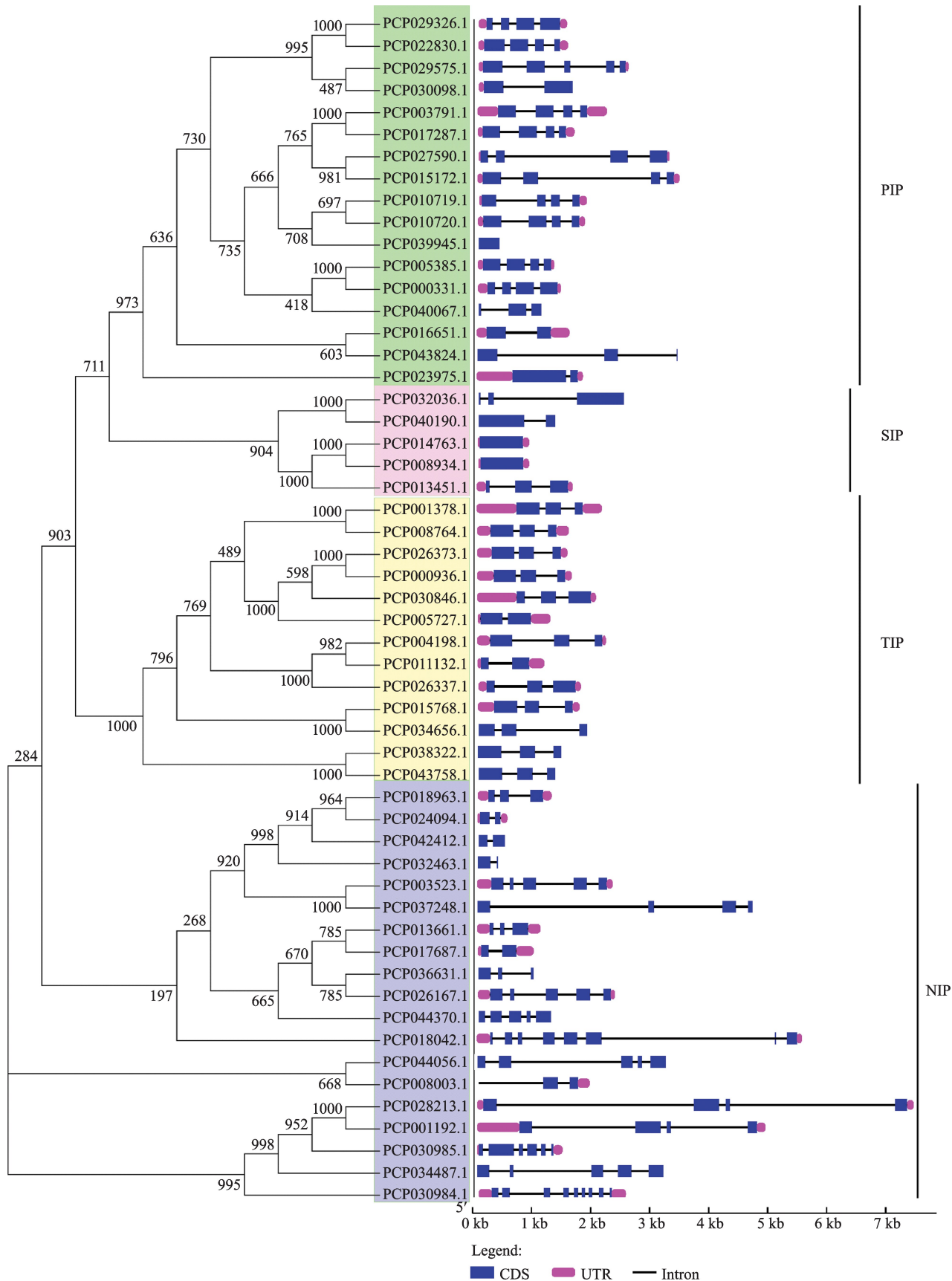


图 1 西洋梨 *PcAQP*s 家族进化树及基因结构

Fig. 1 The neighbor-joining phylogenetic tree and gene structure of *PcAQP*s family in *Pyrus communis*

2.3 西洋梨 *PcAQP*s 基因家族的 GO 分析

为了解 *PcAQP*s 在西洋梨生长发育和环境适应中的作用,对西洋梨 *PcAQP*s 基因家族进行 GO 功能分析。结果表明,*PcAQP*s 基因家族成员多属于细胞膜、质膜和液泡组分,具有转运蛋白活性,少数具有蛋白结合活性,主要参与转运、细胞生长和分化、有机体发育和代谢等生物学过程,还参与胁迫反应、应激反应、细胞通讯等过程。其中,NIP 亚家族成员多属于质膜和细胞膜等组分,主要参

与转运、细胞通讯、多细胞有机体发育、外部刺激响应等生物过程;PIP 亚家族成员多属于质膜、细胞膜和质体等组分,主要参与转运、应激反应、胚后发育、细胞生长等生物学过程;TIP 亚家族成员多属于胞质、液泡、细胞膜和高尔基体等组分,无蛋白结合活性,主要参与转运、细胞分化与生长等细胞进程;而 SIP 亚家族成员构成膜等细胞组分,主要参与次生代谢过程和能量的生成等生物学过程(图 2)。

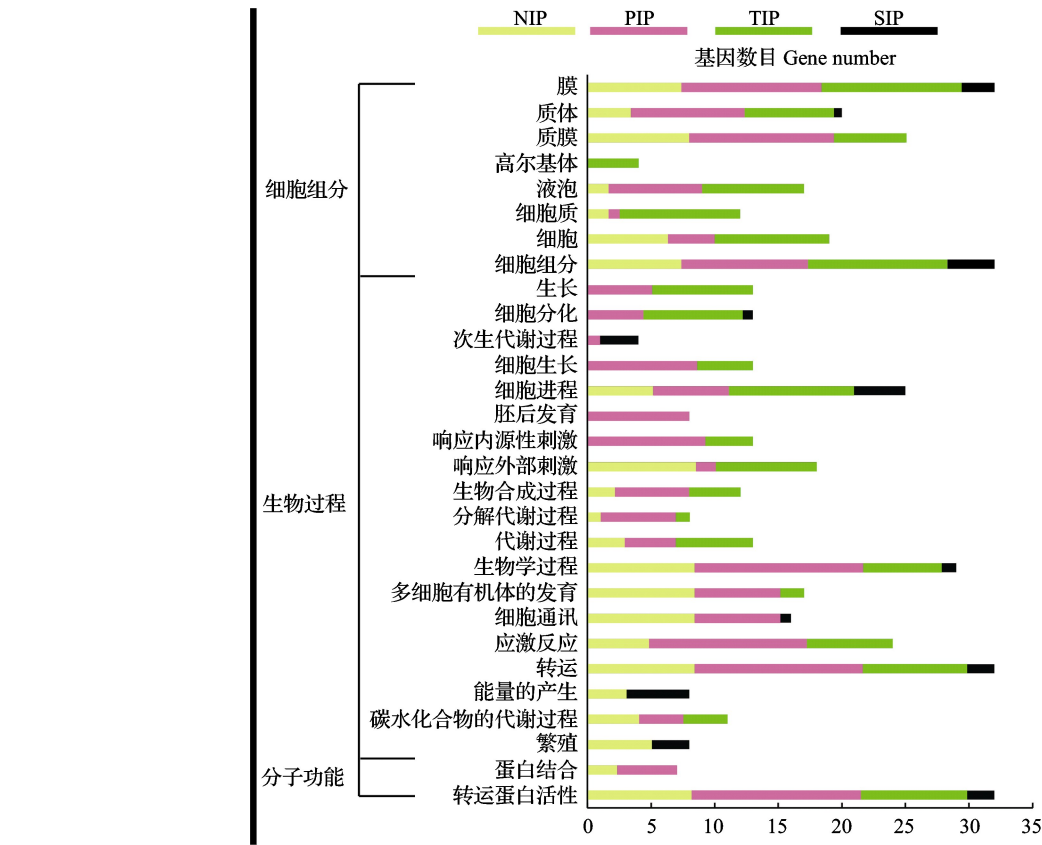


图 2 西洋梨 *PcAQP*s 基因的 GO 分析

Fig. 2 GO analysis of *PcAQP*s gene family in *Pyrus communis*

2.4 西洋梨 *PcAQP*s 基因家族的 Motif 分析

通过 MEME 程序对西洋梨 *PcAQP*s 基因家族进行 Motif 分析,结果表明,*PcAQP*s 家族成员共有 3 个保守的 Motif 基序,且同一亚家族 Motif 的分布较一致。进一步分析表明,NIP 亚家族中有 10 个成员含有 2 个 Motif 基序,9 个成员含有 1 个 Motif 基序;PIP 亚家族中有 9 个成员含有 3 个 Motif 基序,5 个成员含有 2 个 Motif 基序;TIP 亚家族中有 12 个成员含有 2 个 Motif 基序;而 SIP 亚家族中有 3 个成员含有 1 个 Motif 基序,2 个成员含有 2 个 Motif 基序(图 3)。

2.5 西洋梨 *PcAQP*s 基因家族的组织表达分析

利用半定量 RT-PCR 技术分析西洋梨 *PcAQP*s 基因家族不同成员的组织表达情况。结果显示,PIP、TIP、NIP 和 SIP 类成员在根、茎、叶片和果实中均有表达,但不同基因家族、不同基因间的组织表达模式存在差异。其中,PIP 亚家族中的多数成员在叶、茎和根中的表达水平较高,在果实中的表达水平较低;SIP 亚家族中的多数成员在根、茎、叶片和果实中表达水平均较低;TIP 亚家族中的多数成员在叶和茎中的表达水平较高,在根和果实中的表达水平较低;NIP 亚家族中的多数成员在叶和根中的表达水平较高,在茎和果实中的表达水平较低(图 4)。

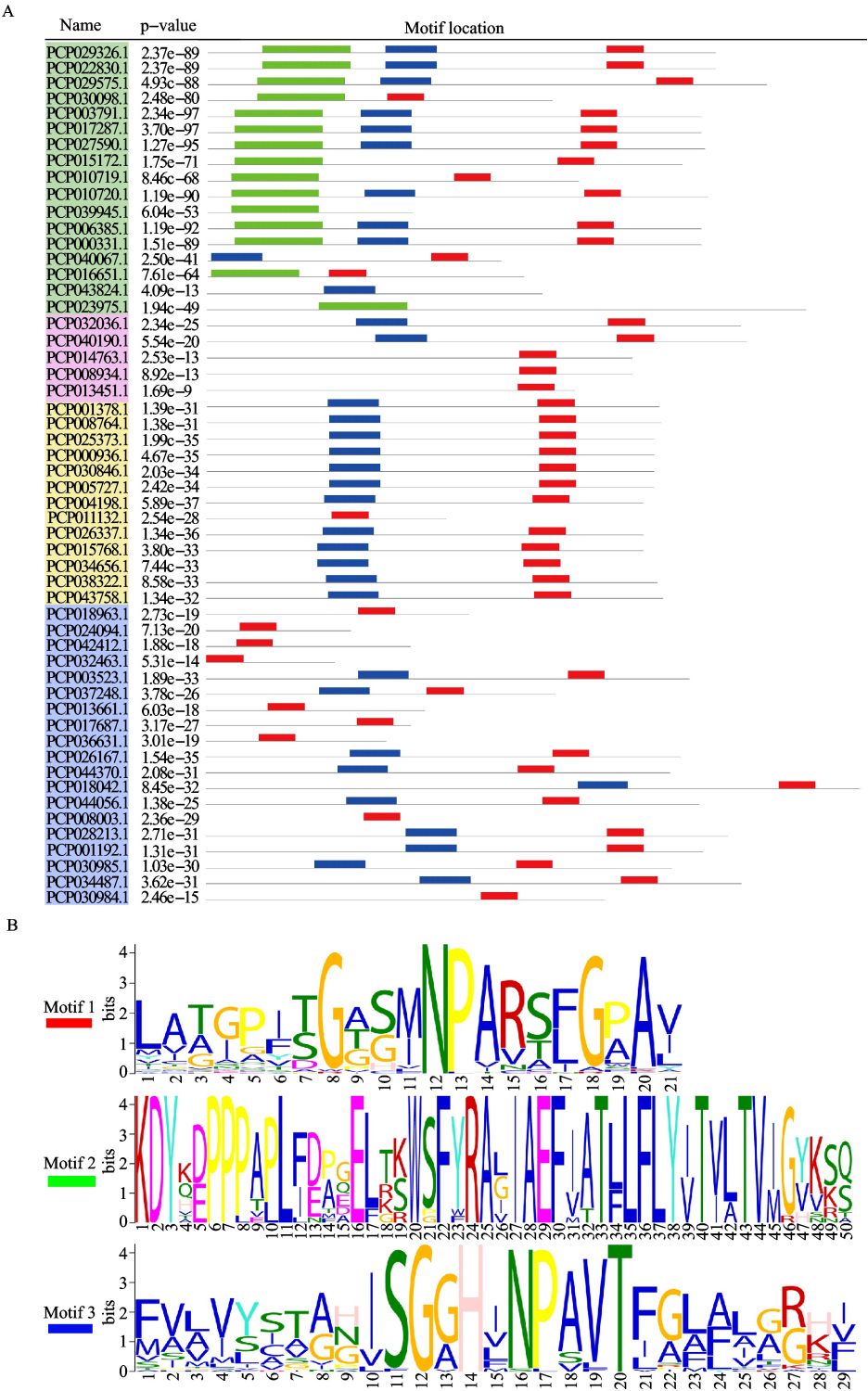


图 3 西洋梨 AQP_s 基因家族 Motif 分析
Fig. 3 Motif analysis of AQP_s gene family in *Pyrus communi*

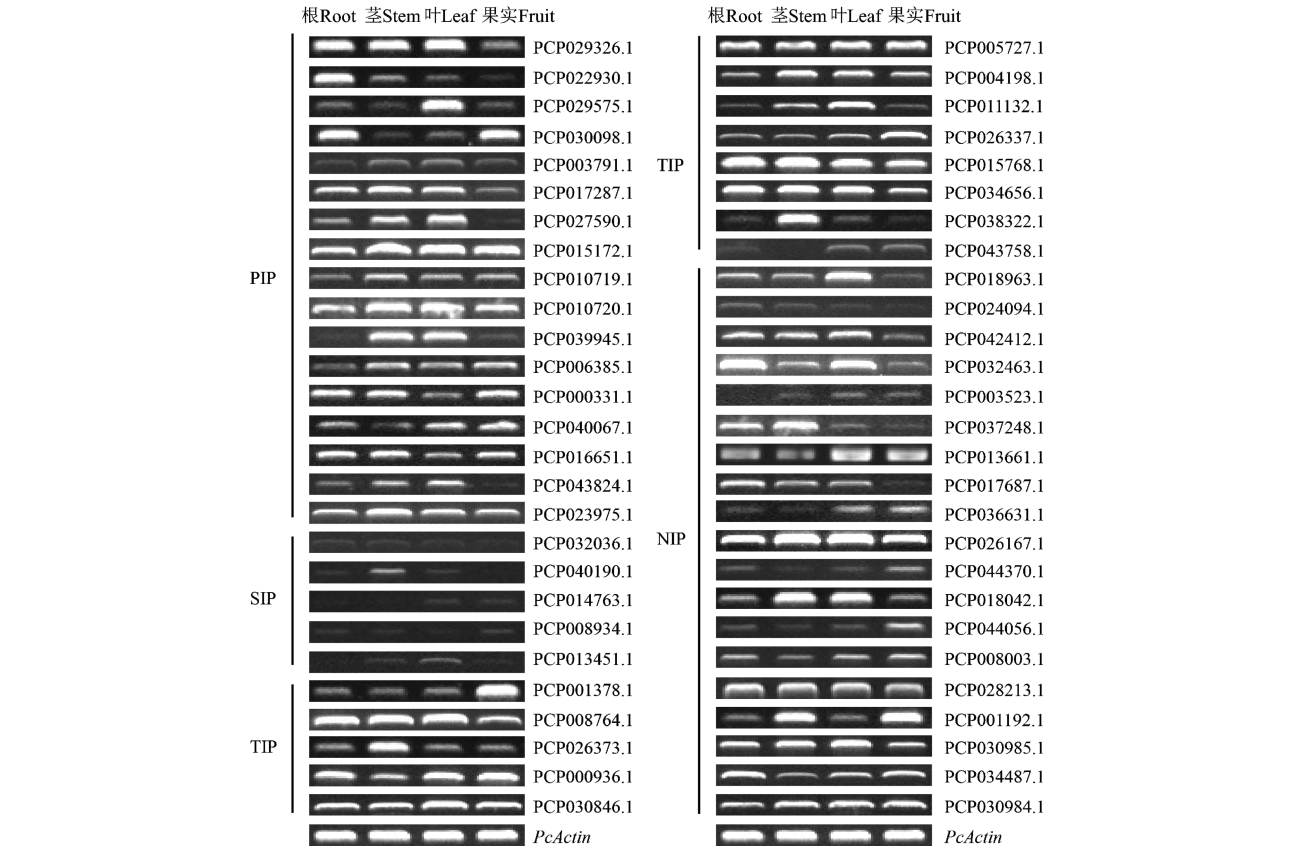


图 4 *PcAQP*s 基因在不同组织中的表达模式

Fig. 4 Expression profile of *PcAQP*s gene in different tissues

3 讨论

研究表明, AQP 在植物中分布广泛, 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, 保证细胞内水分的有效利用和快速调节, 在调控植物的水分关系及生长发育过程中起着重要的作用, 是当前生物研究的热点^[22]。目前已在拟南芥、水稻、番茄、菠菜、荔枝、桃、唐菖蒲等植物中克隆并研究了 AQP 基因的功能^[23-27], 但在全基因组层面系统研究 AQP 基因家族尚未见报道。笔者曾对 22 种植物 AQP 蛋白理化性质及其结构特征进行了生物信息学分析, 为在西洋梨中鉴定 AQP 基因家族奠定了基础^[28]。随着多个物种基因组计划的完成, 从全基因组层面鉴定和研究基因家族的分类、序列特点、进化特征和功能预测等已成为生物学领域关注的重要问题。2014 年, 西洋梨 (*Pyrus communis* L. ‘Bartlett’) 基因组计划完成, 使在全基因组层面鉴定 AQP 基因家族成为了可能。

本研究通过对西洋梨进行全基因组生物信息学分析, 共鉴定出 4 类共 54 个 *PcAQP*s 基因家族成员, 氨基酸序列长度在 73 ~ 381 之间, 等电点范围为

4.96 ~ 10.06, 而且不同成员间的理化性质存在差异 (表 2), 这反映了其在植物生长发育过程中可能具有多重功能。系统进化分析表明, 与其他植物一样, 西洋梨 *PcAQP*s 基因家族可以分为 PIP、TIP、NIP 和 SIP 等 4 个亚家族, 相同类型的 *PcAQP* 基因聚类在一起, 其中 NIP 类有 19 个、PIP 类共 17 个、TIP 类有 13 个、SIP 类有 5 个。基因结构分析显示, 西洋梨 *PcAQP*s 基因间结构差别较大, 但聚类关系较近的基因其结构类似。另有研究表明, 在生物系统进化方面, 植物 AQPs 中新成员 (XIPs 和 HIPs) 的序列分析及功能鉴定可有助于更好地理解 AQPs 整个进化分类过程^[24]。

植物 AQPs 在不同组织以及器官中的表达模式存在差异性。对唐菖蒲 *GhPIP1 ;1* 的研究表明, 其在花瓣、雄蕊、雌蕊、茎、苞片和叶片等均有表达, 但表达量以花瓣中最高, 叶片中最低^[26]。对荔枝 *LcPIP* 基因的组织表达分析表明, 9 个 *LcPIPs* 在荔枝的不同组织中均有表达, 但表达模式存在差异性, 其中 *LcPIP1-1* 在茎中相对较高, *LcPIP1-2* 在果肉中较高, 而 *LcPIP2-3* 在果皮中特异表达, 且在所有成员中表达量最高, 可能与果皮组织水分运输有

关^[27]。本研究表明,大多数西洋梨 *PcAQP*s 基因在根、茎、叶和果实中均有表达,但不同基因的表达模式不同,而且,有些基因呈微弱表达或未检测到表达,说明该基因的表达具有时空特异性,暗示其在不同发育进程或生理活动中承担的转运功能也不尽相同。另外,植物 AQP 的表达定位与生理功能有着紧密联系^[24],本研究亚细胞定位分析结果表明, *PcAQP*s 蛋白具有多样的亚细胞定位,其中定位于细胞膜上数量最多,其次为液泡。GO 分析发现,西洋梨 *PcAQP*s 家族中多数蛋白具有转运蛋白活性,参与转运、细胞生长和分化、胁迫反应、有机体发育和代谢等生物学过程,这进一步表明 *PcAQP*s 蛋白可能具有多重生理功能。本研究中, *PcAQP*s 基因的表达与亚细胞定位结果不尽一致,这一方面可能是因为生物信息学分析手段本身存在局限性,另一方面可能是基因表达后还需进一步经过翻译后修饰等过程才能最终行使功能,因此对每个基因的具体功能还需进行进一步的试验验证。另外,在活性调控方面,植物 AQP 的活性受多种方式调控,在逆境胁迫(盐胁迫、冷害、干旱、高温等)及免疫应答过程中起到重要作用,但所涉及信号通路以及转录后的调控机制还不明确^[29]。

作为重要的膜功能性蛋白,近年来植物 AQP 的研究备受关注,随着越来越多的植物 AQP 分离、功能鉴定以及调控机理的深入解析,人们逐步对其在物质跨膜转运和生理代谢过程中的重要作用有了深入了解。本研究通过对西洋梨 AQP 基因家族进行保守结构域、进化关系、基因结构、组织表达模式等分析,可以更好地对其生物学功能进行鉴定,为在梨中进一步鉴定 AQP 基因的功能奠定基础,同时为鉴定其他果树 AQP 基因家族提供有价值的信息。

参考文献

- [1] Kaldenhoff R, Eckert M. Features and functions of plant aquaporins [J]. J Photoch Photobio B, 1999, 52: 1-6
- [2] Zardoya R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family [J]. Biol Cell, 2005, 97: 397-414
- [3] Maurel C, Verdoucq L, Luu D T. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions [J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 595-624
- [4] Kjellbom P, Larsson C, Johansson I, et al. Aquaporins and water homeostasis in plants [J]. Trends Plant Sci, 1999, 4(8): 308-314
- [5] Sade N, Gebretsadik M, Seligmann R, et al. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress [J]. Plant Physiol, 2010, 152: 245-254
- [6] Hove R M, Bhavé M. Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences [J]. Plant Mol Biol, 2011, 75: 413-430
- [7] Kaldenhoff R, Fischer M. Aquaporins in plants [J]. Acta Physiol, 2006, 187: 169-176
- [8] Bienert G P, Schjoerring J K, Jahn T P. Membrane transport of hydrogen peroxide [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758: 994-1003
- [9] Horie T, Kaneko T, Sugimoto G, et al. Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots [J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52: 663-675
- [10] Hu W, Yuan Q, Wang Y, et al. Overexpression of a wheat aquaporin gene, *TaAQP8*, enhances salt stress tolerance in transgenic tobacco [J]. Plant Cell Physiol, 2012, 53: 2127-2141
- [11] Zhou S, Hu W, Deng X, et al. Overexpression of the wheat aquaporin gene, *TaAQP7*, enhances drought tolerance in transgenic tobacco [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52439
- [12] Chagné D, Crowhurst R N, Pindo M, et al. The draft genome sequence of European pear (*Pyrus communis* L. 'Bartlett') [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e92644
- [13] Jung S, Ficklin S P, Lee T, et al. The genome database for Rosaceae (GDR): year 10 update [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42: 1237-1244
- [14] Poole R L. The TAIR database [J]. Methods Mol Biol, 2007, 406: 179-212
- [15] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015 [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: 257-260
- [16] Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, et al. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41: 348-352
- [17] 王小非, 刘鑫, 苏玲, 等. 番茄 LBD 基因家族的全基因组序列鉴定及其进化和表达分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(12): 2501-2513
- [18] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server [M]. Totowa: Humana Press, 2005: 571-607
- [19] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Mol Biol Evol, 2013, 30: 2725-2729
- [20] 郭安源, 朱其慧, 陈新, 等. GSDS: 基因结构显示系统 [J]. 遗传, 2007, 29(8): 1023-1026
- [21] McCarthy F M, Gresham C R, Buza T J, et al. AgBase: supporting functional modeling in agricultural organisms [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39: 497-506
- [22] Johansson I, Karlsson M, Johanson U, et al. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1465: 324-342
- [23] Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, et al. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize [J]. Plant Physiol, 2001, 12: 1206-1215
- [24] Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, et al. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function [J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46: 1568-1577
- [25] 罗静, 刘正富, 武峥, 等. 桃水孔蛋白基因克隆及序列分析 [J]. 经济林研究, 2012, 30(1): 77-80
- [26] 林燕飞, 李红梅, 丁岳练, 等. 唐菖蒲质膜水孔蛋白基因 *Gh-PIPI1* 的克隆及表达分析 [J]. 园艺学报, 2013, 40(1): 145-154
- [27] 王凌云, 孙进华, 刘保华, 等. 荔枝水孔蛋白基因 *LcPIP* 的克隆与组织特异性表达研究 [J]. 园艺学报, 2013, 40(8): 1456-1464
- [28] 冉昆, 魏树伟, 王宏伟, 等. 22 种植物水孔蛋白理化性质及其结构特征的生物信息学分析 [J]. 植物生理学报, 2015(1): 97-104
- [29] 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