

# 玉米 *ZmCLCa* 基因克隆及其对氮素吸收的功能验证

曾廷儒<sup>1,2</sup>, 张 静<sup>1,2</sup>, 张登峰<sup>2</sup>, 杜金友<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北科技师范学院生命科技学院, 昌黎 066600; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:**提高玉米的氮素吸收效率具有重要的意义。鉴于 CLC 蛋白家族具有运输 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的特性, 本研究通过同源克隆的方法, 克隆了玉米 CLC 家族基因 *ZmCLCa*。该基因所编码的蛋白含有一个电压门控的氯离子通道 (chloride channel) 结构域, 亚细胞定位结果显示该蛋白位于细胞膜上。在 200 mmol/L 的 KNO<sub>3</sub> 处理条件下, 拟南芥转基因过表达株系中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的含量明显高于野生型对照。因此, *ZmCLCa* 基因很可能在玉米的氮素吸收利用过程中具有重要作用。

**关键词:** 玉米; *ZmCLCa*; 基因克隆; 硝酸盐; 亚细胞定位

## Cloning of *ZmCLCa* Gene in Maize and Its Functional Characterization of Nitrogen Absorption

ZENG Ting-ru<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Deng-feng<sup>2</sup>, DU Jin-you<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600;

<sup>2</sup> Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** It has important significance to improve the efficiency of nitrogen absorption in maize. In consideration of the characteristics of transportation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in CLC protein family, we used the means of homology-based cloning in this study to clone the CLC family genes *ZmCLCa* of maize. We found that the protein had a voltage-gated chlorine ion channel structure domain and subcellular localization result showed that the protein was located on the cell membrane. Under 200 mmol/L KNO<sub>3</sub> processing conditions, the content of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in transgenic *Arabidopsis* of strain was obviously higher than that in wild *Arabidopsis*. Therefore, *ZmCLCa* gene likely played an important role in the process of nitrogen absorption of maize.

**Key words:** maize; *ZmCLCa*; gene cloning; nitrate; subcellular localization

玉米是我国第一大作物,也是消耗氮肥最多的作物。氮素作为植物生长发育所必须的大量元素之一,对作物的最终产量贡献在 40% ~ 50%<sup>[1-3]</sup>。玉米在整个生育期中对氮肥的利用率仅为 44%,大部分氮素均残留在了土壤中<sup>[4-6]</sup>。另外,过量施用氮肥容易引起土壤板结与酸化、水体的富营养化等环境问题<sup>[7]</sup>。因此,提高氮素的吸收利用效率对于提高玉米产量、减少环境污染具有重要意义。

目前关于植物对氮素吸收利用机制的研究已经取得了一些进展,研究发现, NRT1 (Nitrate transporter

1)、NRT2 (Nitrate transporter 2)、AMT (Ammonium transporter) 等家族的基因在植物的氮素吸收利用方面具有重要作用<sup>[8-9]</sup>。近年研究发现, CLC (Chloride channel) 家族基因也参与了植物对氮素的吸收<sup>[10]</sup>。世界上第一个 CLC 基因是在电鳗 (*Torpediniformes*) 的电器官中克隆获得的, 目前的研究表明 CLC 家族基因存在于绝大部分动植物中<sup>[11]</sup>。CLC 家族蛋白通常具有 10 ~ 12 个跨膜结构域, 由 2 个相同的独立亚单位构成<sup>[12-13]</sup>。在植物细胞中, CLC 家族蛋白有多种生理功能, 比如维持细胞内的离子平衡和质子

收稿日期: 2016-03-01 修回日期: 2016-05-09 网络出版日期: 2016-12-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161214.1009.014.html>

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2012407002); 转基因重大专项 (2015ZX08003-004)

第一作者主要从事功能基因挖掘。E-mail: zengtingru@163.com

通信作者: 杜金友, 主要从事作物抗逆育种研究。E-mail: djinyou@sina.com

张登峰, 主要从事玉米种质资源研究。E-mail: zhangdengfeng@caas.cn

梯度、调节气孔的开闭、多种离子在根部的运输等。正是具有这些功能,CLC 家族蛋白对于调节植物新陈代谢有着不可替代的作用,而这些生理功能的基础即为 CLC 家族蛋白能够介导一价阴离子的跨膜运输<sup>[10]</sup>。最初,人们认为该家族蛋白作为氯离子通道只参与  $\text{Cl}^-$  的运输,之后研究者们通过对拟南芥 *CLCa* 突变体的研究发现其能够作为一个转运蛋白在液泡膜上介导  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{H}^+$  的运输<sup>[10,13-14]</sup>。在该实验中,拟南芥 *CLCa* 突变体在液泡中积累的硝酸盐比野生型减少了 50%,因此该基因在拟南芥吸收硝酸盐的过程中起到了主要作用<sup>[15-16]</sup>。另外,A. Nakamura 等<sup>[17]</sup> 研究人员通过对水稻 *OsCLC-1* 和 *OsCLC-2* 的研究,发现该家族基因在调节植物细胞渗透压方面能够起到一定作用。

本实验室前期对玉米 CLC 家族基因的研究发现,*ZmCLCa* 能够积极响应硝酸盐浓度的变化。本实验通过同源克隆的方法在玉米自交系 B73 中克隆了玉米 *ZmCLCa* 基因,通过亚细胞定位结果显示 *ZmCLCa* 基因主要在细胞膜上起作用,通过转基因拟南芥研究结果显示该基因可能在氮素的吸收利用上具有重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

玉米(*Zea mays* L.) 自交系 B73。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 哥伦比亚生态型(Col-0)。

### 1.2 *ZmCLCa* 基因序列分析

利用在线工具 SMART 进行结构域分析。通过 Clustalx 和 MEGA5.1 软件构建 *ZmCLCa* 和拟南芥中 *AtCLC* 家族系统发育树。

### 1.3 *ZmCLCa* 的亚细胞定位

根据 *ZmCLCa* 序列设计带有 *Xba* I 和 *EcoR* V 酶切位点的引物(表 1)扩增 *ZmCLCa* 目的片段,并用 *Xba* I 和 *EcoR* V 双酶切目的片段和 pGreen 载体,用  $\text{T}_4$  DNA 连接酶得到 *ZmCLCa*-GFP 瞬时表达载体,转入 TOP10 感受态细胞中,PCR 筛选阳性克隆并进行测序验证。将验证过的载体用 PEG 渗透法转化玉米原生质体<sup>[18]</sup>,在 25 °C 下培养 16 h。绿色荧光蛋白的信号用激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 710)观察并记录,激发光设置为 488 nm 和 633 nm。

### 1.4 转 *ZmCLCa* 基因拟南芥的获得

设计带有 *Bgl* II 和 *Bst* EII 酶切位点的引物(表 1)扩增 *ZmCLCa* 目的片段,片段连接到克隆载体 pZeroBack/Blunt Vector 后进行双酶切。利用  $\text{T}_4$  连接酶连

接 *ZmCLCa* 与 pCAMBIA3301 双酶切片段并将重组连接产物转化大肠杆菌细胞,提取重组质粒。将构建好的 pCAMBIA3301 载体转化农杆菌 GV3101,利用农杆菌蘸花侵染法侵染正常生长至花蕾期的拟南芥<sup>[19]</sup>。转基因  $\text{T}_0$  种子经灭菌处理(75% 乙醇 1 min, 0.5% 次氯酸钠 10 min)并用蒸馏水冲洗 3~4 遍,播种于含有草丁膦(PPT, phosphinothricin)的 MS 培养基上,4 °C 春化 2~3 d 后转移至光周期 16 h 光照/23 °C,8 h 黑暗/18 °C,空气相对湿度 50%~60% 的培养室中。1 周后将培养基中长出 2 片绿叶的幼苗移栽至含有蛭石和营养土 1:1(v/v)的混合基质中。正常条件下培养并收获  $\text{T}_3$  种子。

### 1.5 转 *ZmCLCa* 基因拟南芥的功能鉴定

将拟南芥种植在营养土和蛭石(1:1)混合的红色育苗盆里,置于培养室中培养(22 ± 2 °C),每盆 4 株。正常生长 3 周的转基因和野生型拟南芥分别进行  $\text{KNO}_3$  (200 mmol/L) 溶液处理和水处理(对照),并分别在处理 0 h、1 h、4 h、8 h、16 h、24 h 时取样,每个处理取 5 株,分为地上和地下两个部分放入液氮中保存,用于 RNA 提取和  $\text{NO}_3^-$  含量测定。

### 1.6 硝酸根含量的测定

取适量拟南芥的根或叶片组织,剪碎加入 10 mL 去离子水,置入沸水中 30 min,用滤纸过滤,反复冲洗提取液至容量瓶中定容,重复 3 次。取适量样品液加入 0.4 mL 水杨酸-硫酸溶液(5%),充分混匀室温放置 20 min,再缓慢加入 9.5 mL 8% 的 NaOH 溶液。以去离子水为空白对照,在 410 nm 波长下测其 OD 值。每个样品重复 3 次,用得到的样品 OD 值代入标准曲线得出样品的含氮量<sup>[20]</sup>。

### 1.7 转 *ZmCLCa* 基因拟南芥在低氮条件下的表型分析

将转基因和野生型拟南芥种子消毒后分别点在含有 0.18 mmol/L  $\text{KNO}_3$  的改良霍格兰营养液培养基中,置于培养室培养 2 周后观察表型。

表 1 实验中所用的引物列表

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')
GQ1F	CCATCCAATTGCTTGCTTCAG
GQ1R	AAGGATCGAAGTGCGAGCAG
SLGQF	TTTTCTAGAGATGGAGGAAGAGCAG
SLGQR	TTTGATATCCGTGTACTTTCTTTTGT
3301-GQF	TAGATCTATGGAGGAAGAGCA
3301-GQR	TGGTGACCTTAGTGTACTTTCC

## 2 结果与分析

### 2.1 *ZmCLCa* 基因的克隆

前期通过玉米 CLC 基因家族对硝酸盐吸收的研究,发现 *ZmCLCa* 能够积极响应硝酸盐浓度的变化,在 200 mmol/L 硝酸盐浓度下表达量显著升高,因此本研究决定进一步克隆该基因。以玉米自交系 B73 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,得到一条约 2400 bp 的片段(图 1)。回收该目的片段并测序,经过测序验证明确该片段为 *ZmCLCa* 基因的编码区全长。

### 2.2 *ZmCLCa* 基因的序列分析

用在线工具 SMART 软件对 *ZmCLCa* 进行蛋白结构域的分析发现,*ZmCLCa* 基因所编码的蛋白含有 1 个电压门控氯离子通道(voltage-gated chloride channel)。其次还有 1 个 CBS (cystathionine beta-synthase) 结构域以及一些其他的结构单元(图 2)。这与其作为运输  $\text{NO}_3^-$  的阴离子通道蛋白的功能是

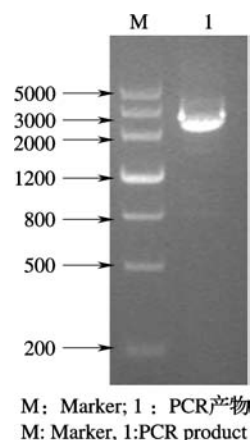


图 1 *ZmCLCa* 基因的克隆

Fig.1 Cloning of *ZmCLCa* gene

相一致的。用 Clustalx 和 MEGA5.1 软件构建系统发育树,将 *ZmCLCa* 与拟南芥 CLC 家族基因所编码的蛋白序列进行比对,结果显示该基因与 *AtCLCa* 同源性最高(图 3)。

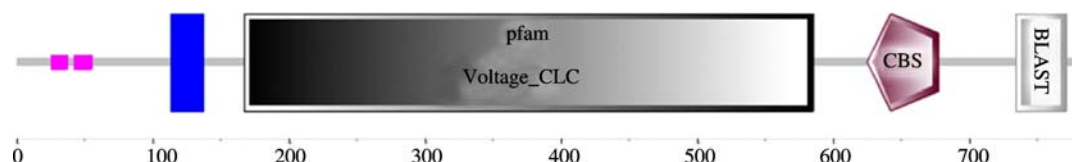


图 2 *ZmCLCa* 的蛋白结构域分析

Fig.2 Structure domain analysis of *ZmCLCa* protein

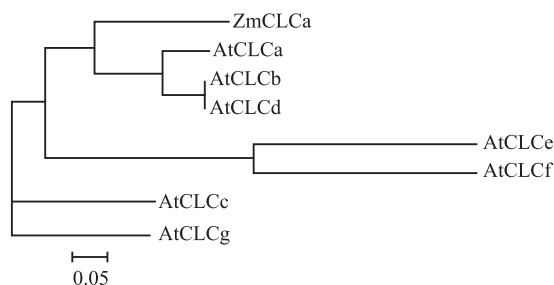


图 3 *ZmCLCa* 与拟南芥 CLC 家族基因的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of *ZmCLCa* and CLC family gene in *Arabidopsis*

### 2.3 *ZmCLCa* 的亚细胞定位

构建一个由 35S-Omega 作为启动子的 *ZmCLCa*-GFP 表达载体,将其转入玉米芽尖原生质体细胞中,观察其表达部位。在激光共聚焦显微镜下,可以清楚的看到 *ZmCLCa*-GFP 融合蛋白在细胞质膜上表达,而作为对照的 CK(载体中只有 GFP),其发出的绿色荧光充满整个原生质体(图 4)。实验结果显示 *ZmCLCa* 基因所编码的蛋白位于细胞膜上。

### 2.4 *ZmCLCa* 基因过量表达对拟南芥中 $\text{NO}_3^-$ 含量的影响

用 200 mmol/L 的  $\text{KNO}_3$  溶液处理野生型和转基因拟南芥后,检测拟南芥叶片和根中硝酸盐的含量(图 5A,B)。从图中可以明显看出,正常生长 3 周后不论在转基因拟南芥的叶片还是根中其硝酸盐的含量均高于野生型,尤其在根中,转基因拟南芥的硝酸盐含量几乎达到了野生型的 3 倍。在 200 mmol/L 的  $\text{KNO}_3$  溶液处理 24 h 后,虽然野生型和转基因拟南芥根、叶中的硝酸盐含量均升高,但是转基因拟南芥不论叶片还是根中的硝酸盐含量均比野生型的高,说明 *ZmCLCa* 基因可以促进转基因植株对  $\text{NO}_3^-$  的吸收。

### 2.5 低氮条件下转 *ZmCLCa* 基因拟南芥的表型鉴定

将在正常 MS 培养基条件下发芽 1 周的幼苗移栽至含有 0.18 mmol/L 的 MS 培养基上进行培养,生长 2 周后,发现转 *ZmCLCa* 基因拟南芥和野生型对照叶片逐渐黄化,但是转基因株系较野生型对照生长迅速,叶片数目较对照明显增多,根系也较对照发达,这可能是转基因株系在低氮条件下对氮素的吸收和利用效率较高所致(图 6)。

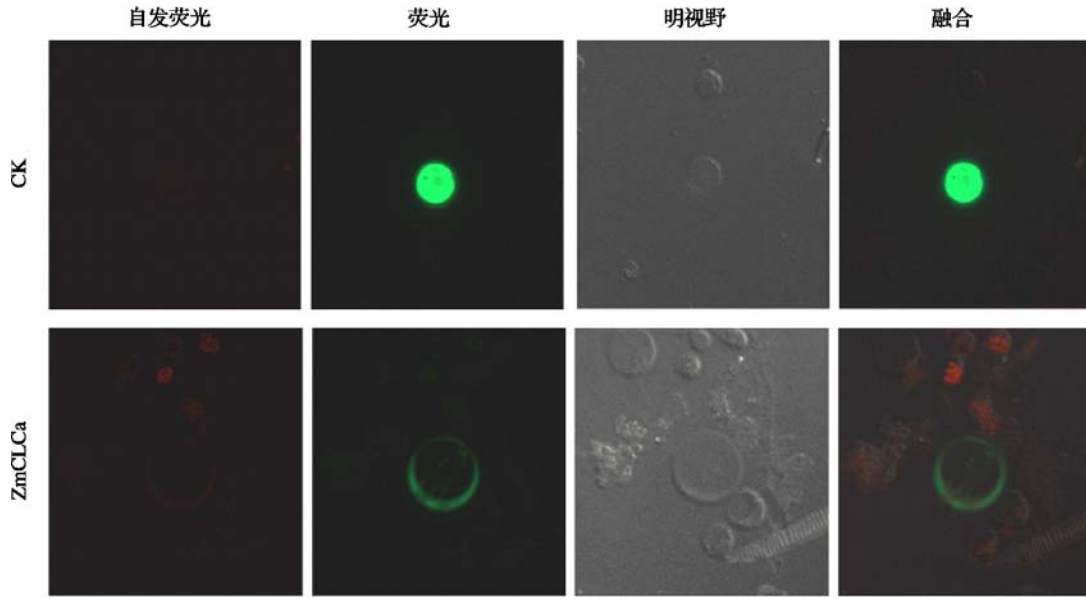
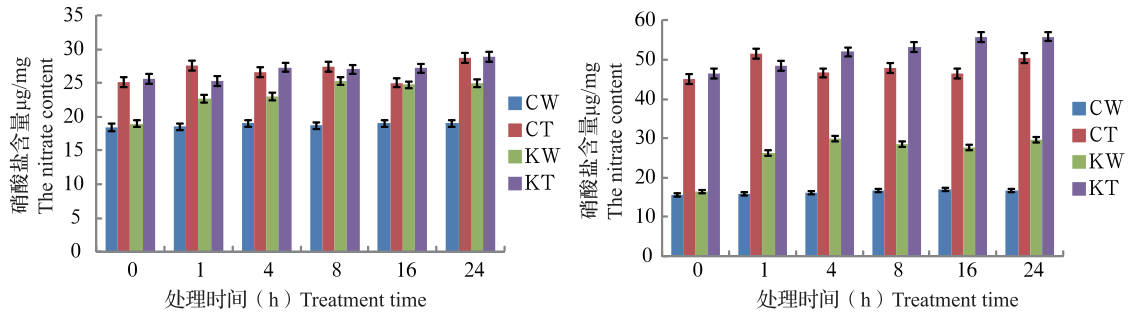


图 4 玉米芽尖原生质体中 *ZmCLCa* 的亚细胞定位

Fig.4 Subcellular localization of *ZmCLCa* in the maize plasma of shoot



CW: 正常条件下的野生型拟南芥; CT: 正常条件下的转基因拟南芥; KW:  $KNO_3$  处理下的野生型拟南芥; KT:  $KNO_3$  处理下的转基因拟南芥

CW: Wild-type *Arabidopsis* under normal condition, CT: Transgenic *Arabidopsis* under normal condition, KW: Wild-type *Arabidopsis* under  $KNO_3$  treatment, KT: Transgenic *Arabidopsis* under  $KNO_3$  treatment

图 5  $KNO_3$  处理下拟南芥叶片 (A) 和根 (B) 中硝酸盐的含量

Fig. 5 The nitrate content in *Arabidopsis* leaves (A) and roots (B) under  $KNO_3$  processing

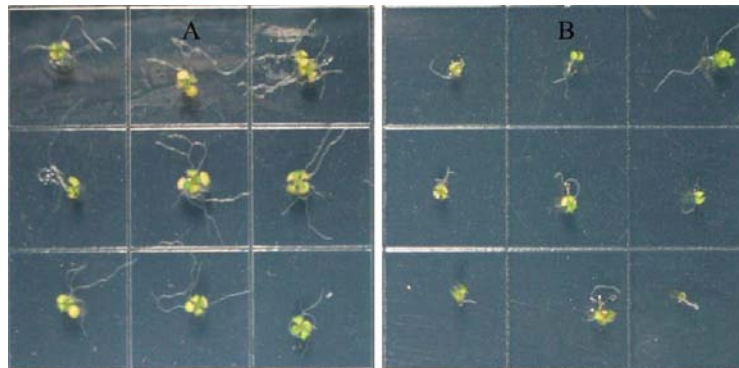


图 6 *ZmCLCa* 转基因拟南芥 (A) 和野生型拟南芥 (B) 在低氮条件下的表型鉴定

Fig. 6 Phenotype of transgenic *Arabidopsis* of *ZmCLCa* (A) and wild-type *Arabidopsis* (B) in low nitrogen concentration



### 3 讨论

拟南芥中的7个CLC家族基因(*AtCLCa-AtCLCg*)已经被发现并进行了相应的研究,发现通过过表达*AtCLCa*能够使得拟南芥根和芽中的硝酸盐含量增加<sup>[10]</sup>。通过电生理分析证实:*AtCLCa*转运阴离子的顺序为 $\text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{B}^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{glutamate}^-$ ,为典型的 $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ 转运体蛋白<sup>[10,15-16]</sup>。本研究发现*ZmCLCa*与*AtCLCa*同源性最高,并且*ZmCLCa*基因的过量表达可以显著提高转基因拟南芥对硝酸盐的吸收。

氮素对于植物生长发育具有重要作用,其作为主要元素参与了蛋白质、核酸等重要物质的合成过程。土壤中的氮素以硝态氮和铵态氮两种形式存在,在正常通气的土壤中,硝态氮的浓度大于铵态氮,因此提高植物对硝态氮的吸收效率对于植物生长具有重要作用<sup>[2-3]</sup>。前人对于拟南芥中*AtCLCa*的研究结果表明,该基因在液泡膜上介导 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{H}^+$ 的运输,能够提高拟南芥对硝酸盐的吸收。在本实验中,过表达*ZmCLCa*基因能够提高拟南芥根和叶中的硝酸盐含量,这与前人研究结果相一致<sup>[10]</sup>。但是,本研究结果显示*ZmCLCa*基因所编码的蛋白很可能在细胞膜上起作用,而拟南芥中*AtCLCa*基因所编码蛋白在液泡膜上起作用,这可能与*AtCLC*基因家族在不同物种中进化过程有关<sup>[21-22]</sup>。

在低氮的培养基上,过表达*ZmCLCa*转基因拟南芥明显比野生型长势好,推测可能是由于*ZmCLCa*基因可以促进拟南芥对硝酸盐的吸收,这对于农业生产具有重要的价值。对于*ZmCLCa*基因在积累硝酸盐过程中的机制以及玉米CLC家族其他基因在氮素吸收利用过程中的具体作用还需进一步研究。CLC家族成员广泛存在于各种作物中,除了具有吸收硝酸盐的功能之外,还能够起到耐盐、抗旱等作用<sup>[17,23]</sup>。

综上所述,CLC家族基因*ZmCLCa*很可能在玉米细胞膜上发挥作用,使植物体内积累较高浓度的硝酸盐,为植物生长发育提供了大量的氮素。因此,该基因可能对于提高玉米氮素利用效率具有重要作用。

#### 参考文献

- [1] Miller C, White M M. Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(9):2772-2775
- [2] 吴巍,赵军. 植物对氮素吸收利用的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(13):75-78
- [3] 王宇通,邵新庆,黄欣颖,等. 植物根系氮吸收过程的研究进展[J]. *草业科学*, 2010, 27(7):105-111
- [4] 王风格,田红丽,赵久然,等. 中国328个玉米品种(组合)SSR标记遗传多样性分析[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(5):856-864
- [5] 李少昆,王崇桃. 我国玉米产量变化及增产因素分析[J]. *玉米科学*, 2008, 16(4):26-30
- [6] 巨晓棠,刘学军,邹国元,等. 冬小麦/夏玉米轮作体系中氮素的损失途径分析[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(12):1493-1499
- [7] 刘钦普. 中国化肥投入区域差异及环境风险分析[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(18):3596-3605
- [8] Hsu P K, Tsay Y F. Two phloem nitrate transporters, *NRT1.11* and *NRT1.12*, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth [J]. *Plant Physiol*, 2013, 163(2):844-856
- [9] Kaiser B N, Rawat S R, M Yaesh S, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* "T-DNA" knockout of the high-affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter *AtAMT1.1* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(3):1263-1275
- [10] De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, et al. The nitrate/proton antiporter *AtCLCa* mediates nitrate accumulation in plant vacuoles [J]. *Nature*, 2006, 442(7105):939-942
- [11] Nguiragool W, Miller C. Uncoupling of a CLC  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  exchange transporter by polyatomic anions [J]. *J Mol Biol*, 2006, 362(4):682-690
- [12] Jentsch T J, Stein V, Weinreich F, et al. Molecular structure and physiological function of chloride channels [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2):503-568
- [13] Jentsch T J. CLC chloride channels and transporters, from genes to protein structure, pathology and physiology [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2008, 43(1):3-36
- [14] Lissal J, Maduke M. Proton-coupled gating in chloride channels [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2009, 364(1514):181-187
- [15] Geelen D, Lurin C, Bouchez D, et al. Disruption of putative anion channel gene *AtCLC-a* in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content [J]. *Plant J*, 2000, 21(3):259-267
- [16] Monachello D, Allot M, Oliva S, et al. Two anion transporters *AtCLCa* and *AtCLCe* fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways [J]. *New Phytol*, 2009, 183(1):88-94
- [17] Nakamura A, Fukuda A, Sakai S, et al. Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(1):32-42
- [18] Lu M, Ying S, Zhang D F, et al. A maize stress-responsive NAC transcription factor, *ZmSNAC1*, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(9):1701-1711
- [19] 宋仲骞,张登峰,李永祥,等. 玉米分子伴侣基因*ZmBiP1*的表达模式和功能研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(3):576-580
- [20] Cataldo D A, Haroon M, Schrader L E, et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1975, 6(1):71-80
- [21] Hechenberger M, Schwappach B, Fischer W N, et al. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a *CLC* gene disruption [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(52):33632-33638
- [22] Marmagne A, Vinauger-Douard M, Monachello D, et al. Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, *AtCLCe* and *AtCLCf*, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(12):3385-3393
- [23] Li W Y F, Wong F L, Tsai S N, et al. Tonoplast-located *GmCLC1* and *GmNHX1* from soybean enhance  $\text{NaCl}$  tolerance in transgenic bright yellow (by)-2 cell [J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29(6):1122-1137