

高粱 MATE 基因的克隆及在酵母中的重金属耐受性分析

张苹^{1,2,3}, 张源^{1,2}, 王慧春¹, 王文颖^{1*}, 徐进^{1,2*}

(1. 青海师范大学生命与地理科学学院, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223;
3. 荒漠与绿洲生态国家重点实验室, 中国科学院新疆生态与地理研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 从高粱 Zn 缺乏处理的深度测序数据中, 得到一个差异表达显著的基因 Sb04g031980, 序列分析表明, 该基因编码一个 MATE 家族转运蛋白, 故命名为 *SbMATE*。为揭示该基因在高粱 Zn 响应中的功能, 将 *SbMATE* 基因置于酵母表达启动子之下, 构建酵母表达载体, 并将其转入重金属敏感型酵母突变体。酵母中亚细胞定位分析表明, *SbMATE* 定位于酵母细胞的液泡中。酵母重金属耐受性实验表明, *SbMATE* 在酵母中的过量表达提高了酵母细胞对 Zn²⁺ 毒害的耐受性, 表明 *SbMATE* 在植物细胞对 Zn²⁺ 吸收和耐性中发挥了重要作用。

关键词: 高粱; MATE; 基因克隆; 酵母表达

中图分类号: Q78; S514 文献标识码: A 文章编号: 1671-8151(2015)04-0342-08

DOI: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.2015.04.002

Cloning of MATE Gene from *Sorghum* and Analysis of Heavy Metal Tolerance in YeastZhang Ping^{1,2,3}, Zhang Yuan^{1,2}, Wang Huichun¹, Wang Wenyong^{1*}, Xu Jin^{1,2*}

(1. College of Life Science and Geography, Qinghai Normal University, Xining Qinghai 810008, China;
2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, China;
3. State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

Abstract: A Zn-responsive gene, Sb04g031980, was obtained by the deep sequencing of differential gene expression analysis in *Sorghum bicolor*. The sequence analysis showed that the gene encoded a MATE subfamily transporter, named *SbMATE*. For elucidating the function of the gene, the yeast-expressed plasmids with *SbMATE* were constructed and transferred into heavy metal sensitive yeast mutant cells. The subcellular localization analysis by the fused-GFP protein expression showed that *SbMATE* was localized in vacuolar of yeast cell. Further study about the growth pattern of *SbMATE*-expressed yeast indicated that overexpression of *SbMATE* improved Zn²⁺ toxicity resistance in the yeast cells, suggesting that *SbMATE* plays a role in Zn accumulation and tolerance in plant.

Key words: *Sorghum bicolor*; MATE; Gene cloning; Yeast expression.

MATE 转运蛋白 (multidrug and toxic compound extrusion transporter) 是一类多药耐药性家族转运蛋白, 它们的活性依赖于跨膜电势提供的能量^[1]。在拟南芥中至少有 56 个基因属于 MATE 基因, 在水稻基因组中也至少发现了 50 个 MATE 基因^[2]。MATE 家族在植物中的序列多样性以及表达模式的差异, 决定了它们的功能差异性。最初发现, MATE 家族的基因在细胞解毒机

制中起重要作用。近年来发现, 该家族基因在植物响应重金属毒害过程中也可能发挥重要作用^[3]。

当今世界, 重金属污染对农业和人类生活带来的影响日趋严重。一些重金属元素如 Cu、Fe、Mn、Mo、Ni 和 Zn 是植物的必需元素, 缺乏这些元素会导致作物减产^[4,5], 然而, 浓度过高时则对植物造成伤害。Zn 主要来源于采矿、电镀和冶炼行业污染物的排放。土壤中 Zn 超过 200 mg · kg⁻¹ 时则

收稿日期: 2015-03-30 修回日期: 2015-04-30

作者简介: 张苹(1987-), 女(汉), 山东济南人, 硕士, 研究方向: 植物分子生物学

* 通讯作者: 王文颖, 教授。Tel: 0871-65140420; E-mail: 1714565575@qq.com;

徐进, 研究员。Tel: 0871-65140420; E-mail: xujin@xtbg.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金(31170228, 31272239); 河北省自然科学基金杰出青年基金(C2013503042); 荒漠与绿洲国家重点实验室基金(2013-01-01)。

可能对植物生长造成危害,过量 Zn 可以直接导致植物发生 Zn 中毒^[6]。研究植物对 Zn 吸收、运输和累积的生理与分子机理,鉴定植物中的 Zn 转运蛋白,对于我们利用生物技术手段培育 Zn 高效利用作用,以及植物修复技术均有重要的意义。高粱是一种重要的能源经济作物,具有较高的重金属耐受性。为分离鉴定高粱中 Zn 响应的基因,我们通过深度测序技术,分析了高粱根系中差异表达的基因,发现了一个显著受 Zn 缺乏诱导的 MATE 家族基因 *SbMATE*。我们利用酵母功能互补试验对该基因的功能进行了初步分析,为进一步探明该基因在植物 Zn 吸收和 Zn 毒害耐受中的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

植物材料高粱品种 BTx623 由中科院景海春研究员馈赠。酵母菌株 YK44 (*ura3-52 his3-200, ΔZRC, ΔCot1, mating type α*) 为 Zn/Cd/Ni/Co 敏感型,受赠于德国 Dietrich H. Nies 教授。穿梭表达载体 pYES2 带有 GAL1 启动子,用于在酵母中高效表达 *SbMATE*。

1.2 方法

1.2.1 *SbMATE* 基因的克隆、测序及同源性分析

通过高通量的差异基因表达分析测序技术(DGE 技术),我们鉴定了高粱根系中 Zn 缺乏下差异表达的基因,发现了一个 MATE 家族基因 Sb04g031980 显著受 Zn 缺乏的诱导,故命名为 *SbMATE*。在 NCBI 核酸数据库中进行同源核苷酸检索,并进行蛋白质同源性比较,通过 Treeview 进行系统进化树分析。测序和引物合成由上海生工和北京中美泰和公司完成。

1.2.2 酵母菌株、质粒及酵母表达载体的构建

以 *HindIII*/*Bam*HI 为酶切位点设计引物,分别构建 pYES2-*SbMATE* 和 pYES2-*SbMATE*-*GFP* 穿梭表达载体。并构建 pYES2-*GFP* 穿梭表达载体作为基因在酵母中亚细胞定位的对照。

采用醋酸锂法转化酵母菌株 YK44,通过尿嘧啶营养缺陷培养基筛选阳性克隆,并通过菌落 PCR 进行鉴定。

在 YPD 培养基(1%酵母浸提液、2%蛋白胨、2%葡萄糖,pH5.8)中添加响应浓度的重金属,进

行胁迫处理试验。

1.2.3 酵母细胞中 *SbMATE* 亚细胞定位

将转化 pYES2-*SbMATE*-*GFP* 和 pYES2-*GFP* 穿梭表达载体的酵母 YK44 阳性菌株,在激光共聚焦显微镜下观察 GFP 荧光,分析 *SbMATE* 在酵母细胞中的亚细胞定位情况。

1.2.4 酵母重金属耐受试验

YK44-pYES2、YK44-pYES2-*SbMATE* 在 SD-*ura* 培养基中培养生长 1 d,OD600 达到 0.2,取 100 uL 培养物接种到 10 mL SD-*ura* (2%半乳糖) + CdCl₂ (0.01~0.05 mmol·L⁻¹) 或 ZnCl₂ (0.04~0.20 mmol·L⁻¹) 或者 CoCl₂ (0.1~0.5 mmol·L⁻¹) 的含有不同浓度的重金属的培养基中,30 °C,250 r·min⁻¹,培养 36 h 后测定 600 nm 吸光值,试验取 3 个酵母阳性克隆,每个克隆做 3 个重复,取平均值并计算标准误差。

2 结果和分析

2.1 高粱 *SbMATE* 基因的克隆与相似性分析

为了分离和鉴定高粱中 Zn 响应的基因,通过深度测序技术,我们分析了高粱根系中差异表达的基因,发现了一个受 Zn 缺乏显著诱导的 MATE 家族转运蛋白基因 Sb04g031980。序列分析表明,该片段长 1 704 bp,经 DNAMAN 软件分析,证明该序列编码了一个完整的读码框(图 1),含有一个 1 704 bp 的 ORF,编码一个由 567 个氨基酸组成的蛋白质,分子量 53.9 kD。其蛋白含有两个 MATE 结构域,分别位于 88~248 bp 和 310~472 bp 处。我们将该基因命名为 *SbMATE*。

MATE 在生物体的生命活动中起着重要的作用,其结构和功能非常保守。将 *SbMATE* (Sb04g031980) 编码区序列经 GenBankBlast 比对后,发现与大多数高等植物 MATE,如玉米、粟等同源性都很高,大于 90%。其编码蛋白质一级序列更显示了其蛋白质的保守性,ClustalW 分析(图 2)显示该蛋白质与玉米 GRMZM2G135175 和小米 Si016794m 编码的蛋白质在其两个 MATE 结构域内同源性高于 98%。在高粱的 MATE 家族中进化关系如图 3 所示,*SbMATE* (Sb04g031980) 与另一个 MATE 家族转运蛋白 Sb06g025870 位于同一个分支上。

```

1 ATGTCGTCTTGCGCCGGCGCCACGGTGGCGCTCCGGGATGCCGCC
M S S C A G A T V A L R D A A
46 GAGGAGGCCCTCAACGCCTCTCTGCTCTCCAAAGCGGACGTCCGG
E E A L N A S L L S K A D V R
91 CTACCGGTGGAGGACGTGCCGCGGTGCTCACGAGCAAGCCGCCA
L P V E D V P P V L T S K P P
136 GGCCGGTTCCGCGGGTGAAGGAAGCCTGGTCCGTCTCGCTG
G R F A R A V K E A W S V S L
181 TCCGTACATTCCCCATGATGCCGTCCATGTCGGCCGGCGCCGG
S V T F P M M P S M S A G A A
226 GGCGCGGAGGCGCGGTCCATCCTGGGCCTCGCGCTGCCGATGAT
G A E A R S I L G L A L P M I
271 CTCACGGGCTGCTCCTCTACCTCCGCTCCATGATCTCGATGCTC
L T G L L L Y L R S M I S M L
316 TTCCTCGGTGCGCTCGGCGGGCTGGCGCTCGCCGGCGGCTCCCTC
F L G R L G G L A L A G G S L
361 GCCATCGGCTTCGCCAACATCACGGGATACTCTGTGCTGTCCGGG
A I G F A N I T G Y S V L S G
406 CTCGCCATGGGCATGGAACCAATCTGCGGGCAGGCCTTCGGCGGG
L A M G M E P I C G Q A F G A
451 GGCCATTACGAGCTCCTCGGCGTCACCACGAGCGGCGCTGCTG
G H Y E L L G V T T Q R A V L
496 ATGCTGCTCGCGGCCCGGTGCCCATCGGCGGCCTGTGGGTGCAC
M L L A A A V P I G G L W V H
541 ATCCGGCTCTGCTCCTGCTCTGCGGCCAGGACGCCGGCATCGCC
I R P L L L L C G Q D A G I A
586 GCGGTGCGCGAGACATACATTCTTGCCTCCCTACGGGACCTACTC
A V A E T Y I L A S L P D L L
631 CTCCAGGCGTTCCTCCACCCCGTCCGCATCTACCTCCGGACGCAG
L Q A F L H P V R I Y L R T Q
676 TCCATCAACCTGCCGCTCACGCTGTGCGCGCGCTCGCCATTGGG
S I N L P L T L C A A L A I A
721 CTCCACCTCCCCATCAACTACGTGCTCGTCTCCGTCTCGGCCTC
L H L P I N Y V L V S V L G L
766 GGCATCAGCGGGGTGGCATTGGCCTCCGTGCTCGCCAACCTCAAC
G I S G V A L A S V L A N L N
811 CTCCTCCTCTTTCTCTTGGCTTACATCCTCTTCAAGGGCGTCCAC
L L L F L L A Y I L F K G V H
856 AAGCGCACCGGGCGGCTCGCGCTCTCGGCCGAGAGCTTCCGGGG
K R T G G L A L S A E S F R G
901 TGGGGCGAGCTCGTCAGCCTCGCGCTGCCGAGCTGCGTCAAGCTC
W G E L V S L A L P S C V S V
946 TGCCTCGAGTGGTGGTGGTACGAGATCATGATCCTCCTGTGCGGC
C L E W W W Y E I M I L L C G
991 CTGCTCGCGAACCACCGCAGGCAACGGTGGCCAGCATGGGCATCCTC
L L A N P Q A T V A S M G I L
1036 ATCCAGACAACGTCACCTCATCTACATCTTCCCGTCCCTCGCTCGGC
I Q T T S L I Y I F P S S L G
1081 TTCGGGCTCTCGACGCGCTCAGCAACGAGCTCGGGCGGAACCGG
F G V S T R V S N E L G A N R
1126 CCCGACCACGCGCGCGCGGCCACGGTCGGCCTCATGCTCGGG
P D H A G R A A T V G L M L G
1171 TTCGCGTTCGGTGGCGTGGCGTCCGCGTTCGGTACCTCGTGGCC
F A F G G V A S A F A Y L V R
1216 GGCGCGTGGGCGACCATGTTACGGCGGACCCGGCGATCGTCCGG
G A W A T M F T A D P A I V A
1261 CTCACCGCGTCCGTGCTGCCGATCCTGGGCGCTTGGCAGCTCGGC
L T A S V L P I L G A C E L G
1306 AACTGCCCGCAGACGACCGGCTGCGGCGTGTGCGGGGCAGCGCG
N C P Q T T G C G V L R G S A
1351 CGGCCCCAAGGACGCCCGCAGCATCAACCTCCGGTCTCTTACCTG
R P K D A A S I N L R S F Y L
1396 GTGGGCACGCCCGTGGCGCTCGTCCTCGCCTTCTGGTACCACTAC
V G T P V A L V L A F W Y H Y
1441 GACTTCCAGGGCCTGTGGCTGGGCCTCCTCGGGCGCAGGCGGAC
D F Q G L W L G L L A A Q A T
1486 TGCGTGGTGGCATGCTGCTGGTGGTATCGGGAGGACGGATTGGGCC
C V V R M L L V I G R T D W A
1531 GCCGAGGCCAAGCGCGCGCAGCAGCTCACCGGAGCAGGCACGGTG
A E A K R A Q Q L T G A G T V
1576 GAGGAGACCAAGACAAAGAGAGCAGCGGCAAGGGCAGTCATGCC
E E T K D K E S S G K G S H A
1621 AGTAAAGTACAGCAGCCGGCGGAGACGAGGAGCTGGGCTTGCC
S K V T A A G G D E E L G L P
1666 ATCGACGTTGTGATCGAGAGACCAAGGATCAGTGTGA 1704
I D V V I E R P K D Q C *

```

图1 高粱 SbMATE (Sb04g031980)基因及编码蛋白
Fig 1 Gene and protein sequences of SbMATE (Sb04g031980)

```

GRMZM2G080992      -GRLATAVKEALSIVSLGAAPFMTPLVSSSDAHAEARSILGLALPMLTGLLLYLRSISM 116
GRMZM2G006212      -GRLATAVREALSVSLGVAFPPTPLVSSSEARGEARSILGLALPMLTGLLLYLRSISM 118
Sb06_g025870       -GRLATAVKEALFVFLGMAFPKTPVSSSDARGEARSILGLALPMLTGLLLYLRSISM 117
Si009730m          -GRFTAAVKEAVSLFPGFEFPT-----DARGEARSILALALPMLTGLLLYLRSISM 111
Pavirv00030493m    -GRLAAAKEAVSLSLGFAPPTPSVSSSDARGEARSILALALPMLTGLLLYLRSISM 221
Bradi5g18830       -GKLAKAVKEAWSVSLGIALPMMPPVSATAARDEARSILGLAFPMLTGLLLYLRSISM 117
LOC_0s04g48290     -GRLAKAVNEAWSVSLGVAFPVTPSMFTCSARGEARSILGLAFPMLTGLLLYLRSISM 107
Sb04_g031980       -GRFARAVKEAWSVLSVTFPMMPSMSAGAAGAEARSILGLALPMLTGLLLYLRSISM 104
GRMZM2G135175      -GRFARAVKEAWSVLSVTFPMMPSMSAGAAGAEARSILSLALPMLTGLLLYLRSISM 107
Pavirv00045772m    -GRLARAVKEAWSVLSVTFPMAPSVSAAAAGAEARSILGLALPMLTGLLLYLRSISM 101
Pavirv00002093m    -GRLARAVKEAWSVLSVTFPMAPSVSAAAAGAEARSILGLALPMLTGLLLYLRSISM 108
Si016794m          -GRLARAVKEAWSVLSVTFPMMPSMSAGAAGAEARSILGLALPMLTGLLLYLRSISM 111
Bradi3g51590       ADRLARAVKEAWSVLSVTFPMLPSMSAAAAGEEARSILGLAMPMLTGLLLYLRSISM 115
LOC_0s02g45380     -GRFARAVKEAWSVP----FPMMPSMSAGAAGAEARSILGLALPMLTGLLLYLRSISM 108

```

```

...:*.** : :* * *****.**:*****

```

```

GRMZM2G080992      LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGNFSLLGITMQRTV 176
GRMZM2G006212      LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGNFPLLGVTTQRTV 178
Sb06_g025870       LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGNFSLLGITMQRTV 177
Si009730m          LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGHYSLGITMQRTV 171
Pavirv00030493m    LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGNFSLLGITMQRTV 281
Bradi5g18830       LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGNYALLGVTVQRTV 177
LOC_0s04g48290     LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGNYALLGVTVQRTV 167
Sb04_g031980       LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGHYELLGVTTQRAV 164
GRMZM2G135175      LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGHYELLGVTTQRTV 167
Pavirv00045772m    LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGHYELLGVTTQRTV 161
Pavirv00002093m    LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGHYELLGVTTQRTV 168
Si016794m          LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGHYELLGVTTQRTV 171
Bradi3g51590       LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGHYELLGVTVQRTV 175
LOC_0s02g45380     LFLGRLGGLALAGGSLAIGFANITGYSVLSGLAMGMEPICGQAFGAGHYDILLGVTMQRTV 168

```

```

*****.*****:*** ** *

```

```

GRMZM2G080992      LLLTAAAVPIGGLWMHMRPLLLLCQDAGIAAVALAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRA 236
GRMZM2G006212      LLLVAAAVPIGGLWMHMRPLLLLCQDGTGIAVAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRA 238
Sb06_g025870       LLLTAAAVPIGGLWMHMRPLLLLCQDGTGIAVAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRA 237
Si009730m          LLLTAAAVPIGGLWMHMRPLLLLCQGEASTAAAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRT 231
Pavirv00030493m    LLLAAAAPVIGGLWMHMRPLLLLCQGEASTAAAETTYILASLPDLALQAFIHPVRIYLRT 341
Bradi5g18830       LLLTAAAVPIGGLWMHMRPLLLLCQDAAIAAVALAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRM 237
LOC_0s04g48290     LLLTAAAVPIGGLWVQMRPLLLFCQDAAIAAVALAETTYIFASLPDLVLQAFIHPVRIYLRT 227
Sb04_g031980       LMLLAAAVPIGGLWVHIRPLLLLCQDAGIAAVALAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRT 224
GRMZM2G135175      LMLLAAAVPIGGLWVHIRPLLLLCQDAGIAAVALAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRT 227
Pavirv00045772m    LMLLAAAVPIAGLWAHMRPLLLLCQDAGIAAVALAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRA 221
Pavirv00002093m    LMLLAAAVPIGGLWAHMRPLLLLCQDAGIAAVALAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRA 228
Si016794m          LMLLAAAVPIGGLWAHMRPLLLLCQDAGIAAVALAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRT 231
Bradi3g51590       LLLVAAAVPIGGLWMHMRPLLLLCQDVGIAAVALAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRT 235
LOC_0s02g45380     LLLVAAAVPIAGLWVHIRPLLLLCQDAAIAAVALAETTYILASLPDLVLQAFIHPVRIYLRT 228

```

```

*** **:* ** :***:***:***.***.*****:*****

```

```

GRMZM2G080992      QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVTVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLVAYILFKSV 296
GRMZM2G006212      QSINLPLTVCAALAIATHLPVNYVLVTVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLAYILFRGV 298
Sb06_g025870       QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVTVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLLYIFPMGV 297
Si009730m          QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVTVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLAYIFPKGV 291
Pavirv00030493m    QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVTVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLAYILFKGV 401
Bradi5g18830       QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVTVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLAYIFPKGV 297
LOC_0s04g48290     QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVLVVLGLGIRGVAFASVLANLNLVFLAYIFLKG 287
Sb04_g031980       QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVLVVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLAYILFKGV 284
GRMZM2G135175      QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVLVVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLAYILFKGV 287
Pavirv00045772m    QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVLVVLGLGIRGVAFASVLANLNLVFLAYILFRGV 281
Pavirv00002093m    QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVLVVLGLGIRGVAFASVLANLNLVFLAYILFRGV 281
Si016794m          QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVLVVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLAYILFKGV 298
Bradi3g51590       QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVLVVLGLGIRGVAFASVLANLNLFLAYILFKGV 295
LOC_0s02g45380     QSINLPLTVCAALAIATHLPINYLVAVVLGLGIRGVAFASVLANLNLVFLAYIFPKGV 288

```

```

*****:*** **:* ** * ** * :***:***:***:***.***.*****:*** **

```

```

GRMZM2G080992      HKRTGG-FLLSRESFRGWGELVSLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLLNPNQATVASMG 355
GRMZM2G006212      HRRTGG-FVLSRESFRGWGELVSLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLLNPNQATVASMG 357
Sb06_g025870       HRRTGG-FVLSRESFRGWGELASLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLLNPNQATVASMG 356
Si009730m          HKRTGG-FAFSRENFRGWGELVSLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLLNPNQATVASMG 350
Pavirv00030493m    HKRTGG-FALSGRESFRGWGELISLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLLNPNQATVASMG 460
Bradi5g18830       HKRTGSFFMLSMESFRGWGELITLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLLNPNQATVASMG 357
LOC_0s04g48290    HKRTGG-FLLSABESFRGWGELISLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLLNPNQATVASMG 346
Sb04_g031980       HKRTGG-LALSABESFRGWGELVSLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLANPNQATVASMG 343
GRMZM2G135175      HKRTGG-FALSABESFRGWGELVSLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLANPNQATVASMG 346
Pavirv00045772m    HRRTDG-FALSPRESFRGWGELAGLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLANPNQATVASMG 340
Pavirv00002093m    HRRTGG-FALSABESFRGWGELAGLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLANPNQATVASMG 347
Si016794m          HRRTGG-FALSABESFRGWGELAGLALPSCVSVCLEWWWYEMILLCGLLADPNQATVASMG 350
Bradi3g51590       HRRTGSFFALSADSFRGWGELVSLALPSCVGVCLEWWWYEMILLCGLLANPNQATVASMG 355
LOC_0s02g45380    HKRTGG-FALSADCLRGWGELVSLALPSCISVCLEWWWYEMILLCGLLANPNQATVASMG 347
*****
GRMZM2G080992      ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRPEEASRAAAVGLMLGFAGGLASAF AFL 415
GRMZM2G006212      ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRPEEASRAAAVGLVLFAGSGLASAF AFL 417
Sb06_g025870       ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRPEEASRAATVGLMLGFAGGLASAF AFA 416
Si009730m          ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGAGQPEEASRAATVGLMLGFAGGFATAF AFL 410
Pavirv00030493m    ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGAGQPEEASRAATVGLMLGFAGGFASAF AFL 520
Bradi5g18830       ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGAGRTQEASRAATAGIMLGLAFAGAFASAF AFL 417
LOC_0s04g48290    ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGAGQPEEASRAATVGLVLFAGGFASAF AFL 406
Sb04_g031980       ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRPDHAGRAATVGLMLGFAGGFASAF AYL 403
GRMZM2G135175      ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRPDHAGRAATVGLMLGFAGGFASAF AYL 406
Pavirv00045772m    ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRPAHAARAATVGLVLFAGGGAASAF AYL 400
Pavirv00002093m    ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRPAHAARAATVGLVLFAGGFVASTF AYL 407
Si016794m          ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRPDQAGRAATAGLMLGFAGGFASAF AYL 410
Bradi3g51590       ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRAERAGRAATVGLMLGFAGGGAASAF AYA 415
LOC_0s02g45380    ILIQTTSLIYIFPSSLSFGVSTRVSNELGANRPERACRAATVGLMLGFAGGFASAF ACH 407
*****
GRMZM2G080992      VRNVWASMFTADPAIALTASVLPILGLCELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 475
GRMZM2G006212      VRNVWASMFTADPAIVALTASVLPILGLCELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 477
Sb06_g025870       VRNVWASMFTADPAIALTASVLPVILGLCELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 476
Si009730m          VRNVWASMFTADPAIALTASVLPILGLCELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 470
Pavirv00030493m    VRNVWASMFTADPAIALTASVLPILGLCELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 580
Bradi5g18830       VRNVWASMFTADPAIALTASVLPILGLCELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 477
LOC_0s04g48290    VRNVWASMFTADPAIVALTASVLPILGLCELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 466
Sb04_g031980       VRGAWATMFTADPAIVALTASVLPILGACELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 463
GRMZM2G135175      VRGAWATMFTADPAIVALTAAVLPILGACELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 466
Pavirv00045772m    VRGAWAAMFTADPAIVALTASVLPILGACELGNCPQTAGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 460
Pavirv00002093m    VRGAWAAMFTADPAIVALTASVLPILGACELGNCPQTAGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 467
Si016794m          VRGAWATMFTADPAIVALTASVLPILGACELGNCPQTAGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 470
Bradi3g51590       VRGSWAAMFTADPAIVALTASVLPILGACELGNCPQTAGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 475
LOC_0s02g45380    VRGAWATMFTADPAIVALTASVLPILGACELGNCPQTTGCGVLRGSARPKDAASINLRSF 467
*****
GRMZM2G080992      YLVGTPVALVLAFLWYHDFKGLWGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRSRQLT--G 533
GRMZM2G006212      YLVGTPVALVLAFLWYHDFKGLWFGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRSREL TGAG 537
Sb06_g025870       YLVGTPVALVLAFLWYHDFKGLWFGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRSRQLT G-- 534
Si009730m          YLVGTPVALGLAFWFHYDFKGLWGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRSRQLT GAG 530
Pavirv00030493m    YIVGTPVALLLAFWFYQYDFKGLWGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRSRLT GA- 639
Bradi5g18830       YLVGTPVALVLAFLWFHYDFKGLWFGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRSRQLT GAG 537
LOC_0s04g48290    YLVGTPVALVMAFWFHLDFRGLWFGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRSRQLT GAG 526
Sb04_g031980       YLVGTPVALVLAFLWFHYDFQGLWGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRAQQLT GAG 523
GRMZM2G135175      YLVGTPVALVLAFLWFHYDFQGLWGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRAQQLT GAR 526
Pavirv00045772m    YLVGTPVALVLAFLWFHYDFQGLWGLLAAQAACVVRMLLVIGRTDWAEEAKRAQQLAGAG 520
Pavirv00002093m    YLVGTPVALVLAFLWFHYDFQGLWGLLAAQAACVVRMLLVIGRTDWAEEAKRAQQLAGAG 527
Si016794m          YLVGTPVALVLAFLWFHYDFQGLWGLLAAQAACVVRMLLVIGRTDWAEEAKRAQQLAGAA 530
Bradi3g51590       YLVGTPVALVLAFLWFHYDFQGLWGLLAAQAACVVRMLLVIGRTDWAEEAKRAQQLT AAG 535
LOC_0s02g45380    YLVGTPVALVLAFLWFHYDFRGLWGLLAAQATCMVRMLLVIGRTDWAEEAKRAQQLT GA- 526
*****

```

图 2 高粱 MATE 基因编码的氨基酸序列与其他植物 MATE 基因编码氨基酸序列比较
 Fig 2 Comparative analysis of protein sequence of SbMATE and their plant MATEs

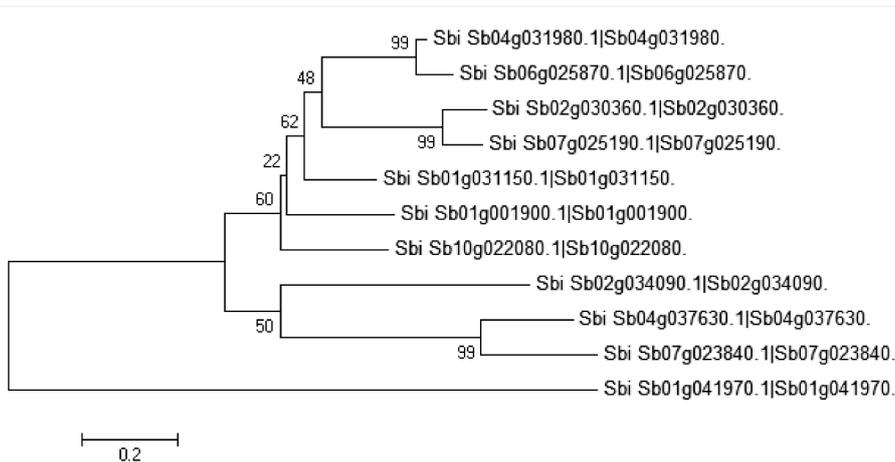


图 3 高粱 MATE 蛋白质序列系统进化树
Fig 3 Phylogenetic tree of Sorghum MATE protein

2.2 pYES2-SbMATE 和 pYES2-SbMATE-GFP 表达载体的构建、酵母转化及阳性克隆的筛选

为了进一步研究 *SbMATE* 在酵母细胞中的亚细胞定位,以及在重金属胁迫下的作用,将 *Sb-*

MATE 经 *Hind*III/*Bam*HI 双酶切后,插入 pYES2 的 P_{GAL1} 之后,构建酵母表达载体 pYES2-*SbMATE*-GFP 和 pYES2-*SbMATE*,转化酵母。载体信息如图 4,通过 PCR 分析鉴定阳性克隆,确认载体构建成功。

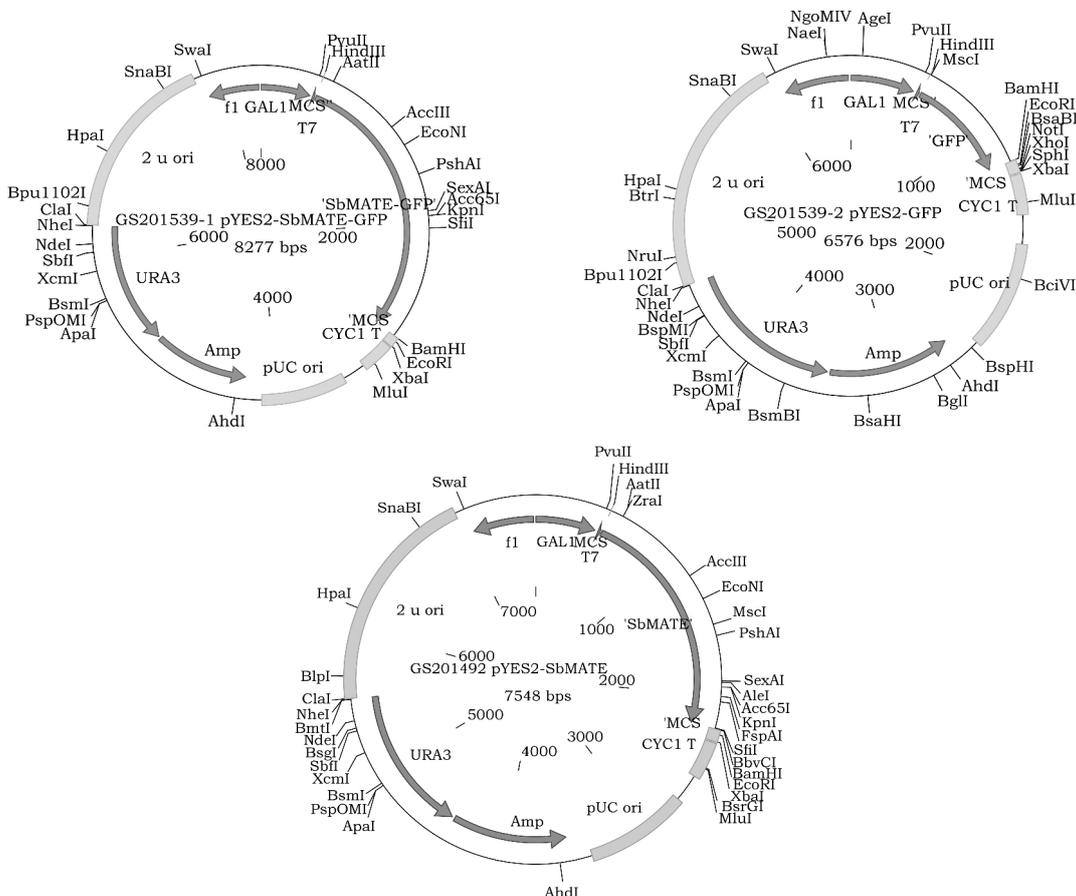


图 4 pYES2-SbMATE、pYES2-SbMATE-GFP 和 pYES2-GFP 表达载体图谱
Fig 4 Vector profile of pYES2-SbMATE, pYES2-SbMATE-GFP and pYES2-GFP

2.3 *SbMATE* 在酵母细胞中的亚细胞定位分析

利用 YK44-pYES2-*SbMATE*-GFP 转基因酵母细胞,我们对 *SbMATE* 在酵母中的亚细胞定位

进行了观察。如图 5 所示,*SbMATE* 蛋白定位在酵母细胞的液泡中。

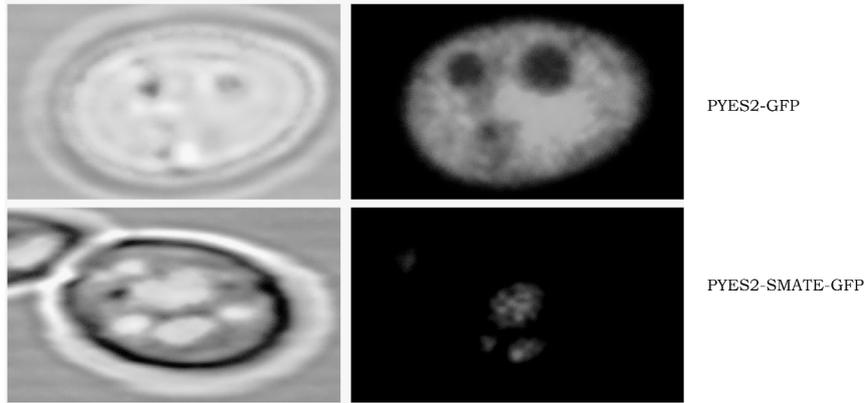


图 5 *SbMATE* 在酵母细胞中的亚细胞定位观察
Fig 5 Subcellular localization of *SbMATE* in yeast cell

2.4 转 *SbMATE* 基因酵母重金属耐受性分析

以转空载体 pYES2 的酵母为对照,分别用不同浓度的 Zn、Co、Ni、Cd 胁迫处理 *SbMATE* 转基因酵母菌株。如图 6,结果表明,半乳糖诱导下,所有测试浓度的 Ni、Co 和 Cd 处理下的 *SbMATE* 转

基因酵母生长状况均与对照差异不显著。但在 0.05~0.10 mmol · L⁻¹ ZnCl₂ 处理下,*SbMATE* 转基因酵母细胞的生长状况明显优于对照酵母细胞。这表明,*SbMATE* 的过表达增强了酵母细胞对 Zn 毒害的耐受性。

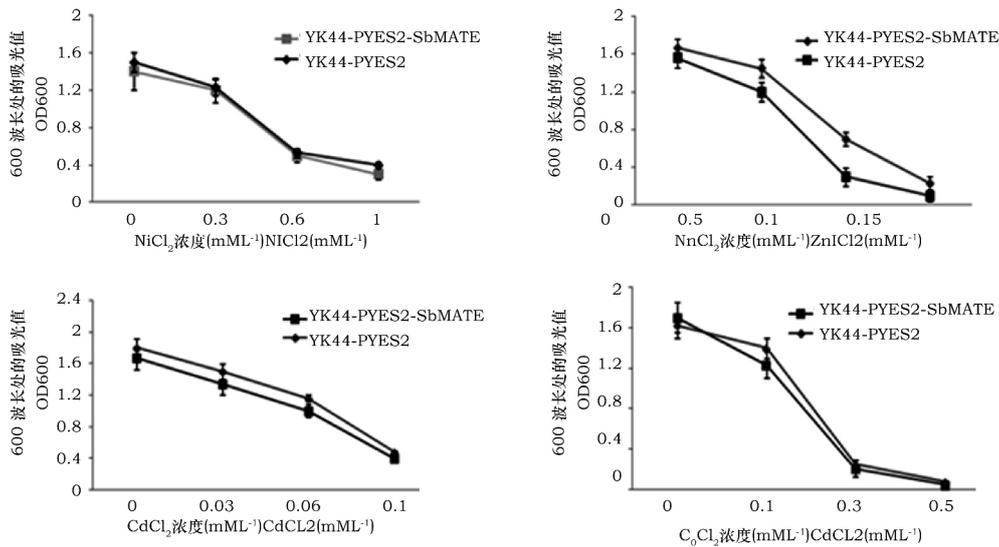


图 6 *SbMATE* 在酵母细胞中的重金属耐受性分析
Fig 6 Heavy metal tolerance analysis of *SbMATE* in yeast cells

3 结论与讨论

最初发现,MATE 家族基因在细胞解毒机制中起重要作用。例如,最早鉴定出的拟南芥 MA-

TE 家族基因 *ALF5* (At3g23560)是一个四甲铵转运蛋白^[1];而 *TT12* (At3g59030)则编码一个类黄酮转运蛋白,该基因特异性地表达在胚珠和发育中的种子,将类黄酮转运至种子内表皮的液泡中^[2]。

近年来的研究发现, MATE 家族中的一些蛋白在重金属离子的吸收、运输和累积中发挥重要作用。如 *FRD3* (At3g08040) 在根中特异性表达, 该基因在根的木质部装载 Fe 螯合物, 从而将 Fe 运输至地上部叶片中^[3]。水稻 MATE 蛋白属于柠檬酸转运蛋白, 研究发现, *OsFRDL4* 受到 Al 的显著诱导, 参与了植物对 Al 毒害的耐受性。在高粱中还发现一个 MATE 转运蛋白 *AltSB*, 在高粱对 Al 毒害的耐受性中也发挥着重要作用^[7~10]。本研究从高粱 Zn 缺乏响应的差异表达的基因中获得了一个 MATE 家族基因 *SbMATE*, 通过 GFP 亚细胞

定位研究发现, 该基因定位在酵母细胞的液泡中。通过酵母重金属耐性分析研究发现, 该基因增加了 YK44 酵母细胞对 Zn 毒害的耐受性, 表明该基因在重金属耐受和累积过程中可能发挥重要作用。我们推测, 定位于酵母液泡的 *SbMATE* 蛋白, 可能通过将 Zn 吸收进酵母液泡中, 从而降低了过量的 Zn 对细胞的毒害, 因而提高了酵母细胞的耐受性。在今后的研究中, 我们将进一步检测酵母细胞中的 Zn 含量, 并在植物中通过构建过表达和抑制表达的转基因植株, 验证该基因在植物 Zn 毒害和 Zn 缺乏响应中的功能。

参 考 文 献

- [1]Diener AC, Gaxiola RA, Fink GR. Arabidopsis *ALF5*, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(7): 1625-1638.
- [2]Debeaujon I, Peeters AJ, Leon-Kloosterziel KM, et al. The Transparent *Testa 12* gene of Arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(4): 853-871.
- [3]喻丝丝, 魏林艳, 谢华安, 等. MATE 转运蛋白在水稻抗逆作用中的研究进展[J]. *福建农业学报*, 2014, 29(4): 398-405.
- [4]张玉秀, 徐进, 王校, 等. 植物抗旱和耐重金属基因工程研究进展[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(7): 1631-1639.
- [5]王志香, 周光益, 吴仲民, 等. 植物重金属毒害及其抗性机理研究进展[J]. *河南林业科技*, 2007, 27(2): 1003-2630.
- [6]项长兴, 董雅文, 钱君龙, 等. 南京栖霞山铅锌矿区土壤环境质量评价[J]. *土壤*, 1993, 25(6): 319-322.
- [7]Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(9): 1156-1161.
- [8]Xu J, Sun JH, Du LG, et al. Comparative transcriptome analysis of cadmium responses in *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* [J]. *New Phytol*, 2012a, 196: 110-124.
- [9]Xu J, Zhu YY, Ge Q, et al. Comparative physiological responses of *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* to cadmium stress [J]. *New Phytol*, 2012b, 196: 125-138.
- [10]Shi DQ, Zhang Y, Ma JH, et al. Identification of Zinc Deficiency-Responsive MicroRNAs in *Brassica juncea* Roots by Small RNA Sequencing [J]. *J Integrative Agriculture*, 2013, 12(11): 2036-2044.

(编辑: 武英耀)

(上接第 341 页)

- [12]Bacon E, Morre DJ, Plasma membrane NADH oxidase of maize roots responds to gravity and imposed centrifugal forces [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2001, 39(6): 487-494.
- [13]Garcia C, Hicks C, Morre DJ, Plasma membrane NADH oxidase is gravi-responsive [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 1999, 37(7-8): 551-558.
- [14]Poovaiah BW, Yang T, van Loon JJ, Calcium/calmodulin-mediated gravitropic response in plants [J]. *Journal of gravitational physiology*, 2002, 9(1): 211-214.
- [15]Tauchi H, Matsumoto E, Iijima K, et al, Effect of gravity stress on fidelity of DNA double-strand break repair [J]. *Biological sciences in space*, 2003, 17(3): 255-256.
- [16]Pedroso MC, Durzan DJ, Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves [J]. *Annals of Botany*, 2000, 86(5): 983-994.

(编辑: 武英耀)