

白菜 *NRT2* 基因的克隆及表达模式分析

孔 敏, 杨学东, 侯喜林*, 刘同坤, 任 君

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 南京 210095)

摘 要: 以白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 品种 ‘苏州青’ 为试材, 采用 RT-PCR 技术, 获得 1 个高亲和硝酸盐转运蛋白基因 (*NRT2*) 的 cDNA 序列, 全长 1 593 bp, 推断其编码 530 个氨基酸, 命名为 *BcNRT2*。序列分析表明: *BcNRT2* 基因与甘蓝型油菜 *BnNRT2* 基因和拟南芥 *AtNRT2.1* 基因核苷酸序列的相似性分别为 98% 和 90%, 氨基酸序列的相似性分别为 99% 和 95%, 表明植物中 *NRT2* 基因保守度较高。实时定量 PCR 表达分析表明, *BcNRT2* 在白菜根部的表达量最高, 为诱导型表达。低浓度 NO_3^- ($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$) 处理 0.5 h 后其表达量迅速上升, *BcNRT2* 可能为 NO_3^- 感受器。高浓度 NO_3^- ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$) 处理后其表达量更高, 持续时间较长, 可能是受到低亲和硝酸盐转运蛋白 *NRT1.1* 的调控而产生的高水平响应。原生质体的瞬时表达显示, *BcNRT2* 蛋白位于细胞膜上。

关键词: 白菜; 硝酸盐; *NRT2*; 实时定量 PCR; 亚细胞定位

中图分类号: S 634.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 12-2309-08

Cloning and Expression Pattern Analysis of *NRT2* Gene in Non-heading Chinese Cabbage

KONG Min, YANG Xue-dong, HOU Xi-lin*, LIU Tong-kun, and REN Jun

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, a full-length of cDNA sequence of a high-affinity nitrate transporter gene *BcNRT2* was cloned from non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) cultivar ‘Suzhouqing’ using reverse transcript PCR (RT-PCR). Sequence analysis showed that the length of nucleotide sequence of this gene is 1 593 bp, containing a complete open reading frame to encode 530 amino acids. Nucleotide and amino acid sequence comparison indicates that *BcNRT2* has a certain high similarity with the orthologous gene *BnNRT2* in *Brassica napus* (98%, 99%) and *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana* (90%, 95%), respectively. Conclusion was made that *NRT2* gene is highly conserved among several plant species. Quantitative real-time PCR analysis showed that the expression of *BcNRT2* has the highest level in root cells, and expression pattern of this gene belongs to induced system. After 0.5 h treatment of low concentrations of NO_3^- ($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$), the expression of *BcNRT2* was up-

收稿日期: 2011-09-20; 修回日期: 2011-11-25

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2009BADB8B03-1); 江苏省自然科学基金项目 (BK2009311); 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX (09) 604]

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hxl@njau.edu.cn)

regulated rapidly in root and shoot, suggested that BcNRT2 may acts as a NO_3^- sensor or signal transducer. After treatment of high concentrations of NO_3^- ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$), the expression of *BcNRT2* was highly up-regulated and lasted longer in root and shoot, which may be resulted from a high-level response of the regulation of a low-affinity nitrate transporter NRT1.1. BcNRT2 protein was located at the plasma membrane supported by subcellular localization assays experiment.

Key words: non-heading Chinese cabbage; nitrate; *NRT2*; real-time RT-PCR; subcellular localization

白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 原产中国, 是中国南方地区普遍种植的蔬菜, 在蔬菜的周年供应中起着举足轻重的作用 (侯喜林, 2003)。研究其 NO_3^- 吸收、转运及累积的机制, 对于提高其 NO_3^- 的利用效率, 降低植株中 NO_3^- 含量, 对保障食品安全和保护环境, 具有重要的理论和实际意义。

根系中 NO_3^- 吸收与转运是由硝酸盐转运体 (Nitrate transporters, NRTs) 实现的 (Chapman & Miller, 2011)。植物生理学研究表明, 植物形成了 3 个 NO_3^- 转运系统来应对复杂多变的 NO_3^- 供给, 这 3 个 NO_3^- 转运系统协调植物从土壤溶液中吸收 NO_3^- 及其在植物体内的分布 (Crawford & Glass, 1998; Daniel-Vedele et al., 1998; Tsay et al., 2007)。当可利用的 NO_3^- 浓度低时 ($< 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 其吸收通过两个可饱和的高亲和系统 (high-affinity transport system, HATS) 完成。当外界 NO_3^- 浓度高于 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 低亲和系统 (low-affinity transport system, LATS) 实现对 NO_3^- 的吸收 (Crawford & Glass, 1998)。

在真核生物中第一个克隆到的 *NRT2* 基因是真菌构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的 *nrtA* 基因 (Unkles et al., 1991)。之后, 又从单细胞绿藻莱茵衣藻中 (*Chlamydomonas reinharti*) 分离到两个 *nrtA* 的同源基因 *CrNRT2.1* 和 *CrNRT2.2* (Quesada et al., 1993, 1994)。目前已在高等植物中陆续分离到几十个 *NRT2* 基因。已知, *NRT1* 和 *NRT2* 基因家族分别属于 LATS 和 HATS。最近的研究还表明, *NAR2* 基因家族也参与了高亲和力转运系统。拟南芥中有 7 个 *NRT2* 基因。其中, *NRT2.1* 蛋白位于质膜 (Chopin et al., 2007), 是 HATS 的重要组成部分 (Orsel et al., 2004)。最近在拟南芥和大麦中的研究发现, *NRT2.1* 在硝酸盐转运过程中不能单独起作用, 还需要另一个蛋白 *NAR2* (拟南芥中又称为 *AtNRT3.1*) (Tong et al., 2005; Okamoto et al., 2006; Orsel et al., 2006)。此外, *NAR2* 可能参与了 *NRT2.1* 的稳定性 (Wirth et al., 2007)。近来研究发现, *NAR2* 与 *NRT2.1* 在细胞膜上物理性结合, 组成了活跃的 *AtNRT2.1* 和 *AtNAR2.1* 的四聚物的 NO_3^- 转运体 (Yong et al., 2010)。对小麦 *TaNRT2.1* 的研究表明其蛋白在 HATS 中发挥功能, 且根部 mRNA 积累 (Yin et al., 2007)。许多证据推测, 在侧根形成中 *AtNRT2.1* 是 NO_3^- 转运依赖感受角色 (Chapman & Miller, 2011)。

作者对白菜 *NRT2* 基因进行克隆和表达模式分析, 为白菜 NO_3^- 吸收转运积累机制的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及其硝酸盐处理

供试白菜品种为‘苏州青’自交系, 由南京农业大学园艺学院白菜课题组提供。

种子经双蒸水浸泡 4 h 后在 25°C 培养过夜, 将露白的种子播种于营养土穴盘中, 出苗后浇去离子水, 7 d 后浇 Hoagland 营养液。待幼苗第 3 片叶完全展开后挑选生长良好, 发育状态一致的幼苗进行处理。

将幼苗置于 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 琥珀酸铵培养液 (pH 6.5) 中生长 10 d, 接着转入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 琥珀酸铵培养液 (pH 5.5) 中处理过夜 16 h, 然后转入新鲜的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 琥珀酸铵培养液 (pH 5.5) 中处理 3 h。之后, 将植株分别转入含有 20 和 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、pH 5.5 的培养液中, 以含有 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$ 、pH 5.5 的培养液为对照。在处理 0、0.25、0.5、1、2 和 4 h 时, 采集各处理根、嫩叶作为试验材料, 提取 RNA 进行基因的表达分析 (Ho et al., 2009)。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用 RNAsimple Total RNA Kit (Tiangen) 从白菜根和嫩叶中提取总 RNA。用 PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) 将提取的总 RNA 反转录成 cDNA。

1.3 白菜 *NRT2* 基因的克隆

根据 GenBank 中甘蓝型油菜 *BnNRT2* (登录号: AJ293028) 设计 1 对简并引物 (BcNRT2-F1 和 BcNRT2-R1) (表 1)。以 cDNA 第 1 链为模板进行扩增, PCR 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 60 s, 共 30 个循环; 72°C 10 min。反应产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳回收后, 连接 pMD18-T 载体并转化 *E. coli* DH5 α , 提取质粒经 PCR 鉴定后委托南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.4 序列分析

拟南芥、大麦等 *NRT2* 基因的核苷酸序列来自于 NCBI 数据库。使用 BLAST 进行序列比对, 蛋白质预测分析使用 ffPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>), 进化树分析使用 MEGA version 5.05。

1.5 实时定量 PCR 反应

实时定量 PCR (Relative quantitative real-time RT-PCR) 是采用 ABI 7500 Real-time PCR System 和 7500 System software version 1.2.3。用白菜 *actin* 基因作为参考基因, 与目标基因一起扩增。根据基因序列设计引物, *BcNRT2* (BcNRT2-F2 和 BcNRT2-R2) 和 *actin* (ACT-F 和 ACT-R) 的引物见表 1。实时定量 PCR 使用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒, 按照操作说明进行。相对定量使用参照基因的 ΔC_T 法, 诱导率等于 $2^{-\Delta C_T}$, $\Delta C_T = C_{T, \text{目标基因}} - C_{T, \text{actin}}$ 。相对定量是基于处理和对照之间, 目标基因对参考基因的表达量的比较 (Pfaffl, 2001)。

表 1 *BcNRT2*cDNA 克隆和实时定量 PCR 引物

Table 1 Primer sequences for *BcNRT2*cDNA cloning and relative quantitative real-time RT-PCR

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequence
BcNRT2-F1	ATGGGTGATTCTACTGG
BcNRT2-R1	TCAAACATTGTTKGGTGT
BcNRT2-F2	GTGCAACACCCTCGTTACTGC
BcNRT2-R2	GAGCCCTGACCCAAAGTTTCCT
ACT-F	GTTGCTATCCAGGCTGTTCT
ACT-R	AGCGTGAGGAAGAGCATAAC
BcNRT2-F3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGGTGATTCTACTGGCGA
BcNRT2-R3	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAACATTGTTGGTGTGTTCT

1.6 黄色荧光蛋白 (YFP) 融合载体的构建

用于原生质体转化的载体按照 Invitrogen Gateway system 说明书的步骤构建。不含终止子的 BcNRT2 DNA 使用引物 BcNRT2-F3 和 BcNRT2-R3 (表 1) 预扩增得到含有 pDONR vector 的定向重组位点 attB1 和 attB2 的 *BcNRT2* 全长。RT-PCR 产物经纯化后与 pDONRTM221 载体进行 BP 反应, 获得入门克隆, 热激转化 *E. coli* DH5 α , 经抗性筛选, 挑取单克隆, 用上述基因特异引物进行菌落

PCR 鉴定。鉴定出阳性克隆, 抽取质粒, 取适量阳性质粒与目的载体 pEarleyGate104 按 Gateway LR reaction 试剂盒程序进行 LR 反应, 获得表达载体, 热激转化 *E. coli* DH5 α , 经抗性筛选, 挑取单克隆, 再次用基因特异引物进行菌落 PCR 鉴定 (Earley et al., 2006)。

1.7 白菜原生质体分离和转化

从 3 ~ 4 周大的幼苗上选择充分展开的嫩叶片, 切成 1 mm 左右的细条, 浸入酶解液, 抽真空 30 min, 室温暗培养 6 h。按照拟南芥原生质体提取的方法, 获得白菜原生质体。原生质体转化的方法按照 PEG 转化拟南芥原生质体的方法 (Yoo et al., 2007)。转化细胞经过 24 h 室温暗培养后, 用激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP2) 观察细胞中的荧光分布。以 pEarleyGate104 空载体作为对照。

2 结果与分析

2.1 白菜 *BcNRT2* 基因全长的 cDNA 克隆和序列分析

从白菜中克隆了硝酸盐转运蛋白基因 *BcNRT2* 并测序, GenBank 登录号: JN182862。序列分析表明, *BcNRT2* 有 1 593 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 530 个氨基酸, 预测其蛋白质分子量为: 132.45 kD (图 1), 属于 MFS 超基因家族, 含有 1 个 “A-G-W/L-G-N-M-G” 共识识别序列。从根据氨基酸序列预测的 *BcNRT2* 的拓扑图 (图 2) 可以看出, 该序列有 12 个跨膜结构域, 具有很长的亲水 C 端, 可能伸向细胞质。

```

1  ATGGGTGATTCTACTGGGAGCGGGAGCTCCATGCATGGAGTGACCGGTAGAGAACAAACATTGCTTCTCGGTGGCTTACCGGAT
M G D S T G E P G S S M H G V [T G R] E Q T F A F S V A S P I
91  GTCCCAACCGACAAGACGCAAGTTGACCTGCGGCTGGAGTCCGAGCATAAGGCAACGGTTTCAAGCTCTCTCTGCGCAACCT
V P [T D K] [T A K] F D L P V D S E H K A T V F K L F S F A K P
181  CACATGAGAACGTTCCATCTCTCGTGGATCTCTTCTCCACATGTTTGTCTCGAGCTTGGGCTGACCACTGTCCCATCATCCGG
H M R T F H L S W I S F S T C F V S T F A A A P L V P I I R
271  GAGAACTCAACCTCAAAAACAGACATCGTAACGCTGGAGTTGCGTCCGCTCTCGGGAGTATCTTCTAGGCTGGTATGGGAGCA
E N L N L T K Q D I G N A G V A S V S G S I F S R L V M G A
361  GTGTGTGATCTTCTAGGTCCAGTTACGGCTGTGCTTCTTGTATGCTTTCGACCAACGGTGTCTCAATGAGCTTCGTGAGTGGGA
V C D L L G P R Y G C A F L V M L S A P T V F S M S F V S G
451  GCGGAGGGTTCATAACGGTGGGTTTCATGATTGGGTTCTGCTAGCGAGCTTGTGTCTGTCAATATTGGATGAGTACTATGTTCAAT
A G G F I T V R F M I G F C L A T F V S C Q Y W M S T M F N
541  AGTCAGATCATCGTCTGCTGACCGTACAGCGCGGGTGGGAAACATGGGTGGTGCATAACGAGTGTCTCATGCTATTGTCTAT
S Q I I G L V N G T A A G W G N M G G G I T Q L L M P I V Y
631  GAAATCATTAGGCGTTGTGGTCAACAGCGTTCAAGCGCTGGAGGCTTGCCTTCTCTGCTCGTGGTGTGACATCATCATGGAGTC
E I I R R C G A T A F T A W R L A F F V P G W L H I I M G V
721  TTGTGCTCAATCTAGTCAAGATCTGCCAGATGGTAACGAGTGCCTTGGAGAAAAAGGAGAGTGTCCAAAGACAAATTCGAAAG
L V L N L G Q D L P D G N R S A L E K K G E V A K D K F G K
811  ATTATGTGTAGCGCGTCAAACTACAGGACTTGGATCTTGTCTCTCTATGATACTCATGGAGTTGAGCTGAGCACTGACAAAT
I M W V A V T N Y R T W I F V L L Y G V S M G V E L S T D N
901  GTTATCGCGAGTACTTCTTGCAGGTTCCACTTGAAGCTTACACAGCTGGAATCATAGCAGCATGTTTCGGAATGGCAACTCTTT
V I A E Y F F D R F H L K L H T A G I I A A C F G M A N F F
991  GCTGTCAGCAGGAGGCTATGATCTGACCTTGACGCAAACTTCCGGATGAGAGGAGGTTATGGGCGTGTGGATCATTCAGACA
A R P A G G Y A S D L A A K Y F G M R G R L W A L W I I Q T
1081  GCAGGTGGTCTCTTCTGGGTGGGCTGGGCGTGCAACACCTCGTTACTGCGGTGTAGCTATGGTCTCTCTCTTTAGGAGCACAA
A G G L F C V W L G R A N T L V T A V V A M V L F S L G A Q
1171  GCGCTGTGGAGCCACCTTCGCAATCGTTCCTTGTCTCGGCGAGCGCTTGGTATCATCTCAGGTTTAAACGGTGTGGAGGAAC
A A C G A T F A I V P P V [S R R] A L G I I S G L T G A G G N
1261  TTTGGTCAGGGCTCACACAGCTCATCTTCTTCTGACCTCAAGGTTCAACCGAACAAGGGTAAACATGGAGTGGAGTGATGATGTT
F G S G L T Q L I F F S [T S R] F T T E Q G L T W M G V M I V
1351  GCGTCAGCTTGCCTGTGACTTAAATCCACTTCCCTCAGTGGGAAGCATGTTCTTGCCTCTCTACCGATCCAGTCAAGGTACGGAG
A C T L P V T L I H F P Q W G S M F L P P S T D P V K G T E
1441  GAGCATATTATGCTTCAAGTGAATGAGCAGGAGGAGGAAGAACATGCATCAGGGAAGCTCAGGTTTCTAAGAACGCCAAGTCT
E H Y Y A S E W N E Q E K E K N M H Q G [S L R] F A K N A K S
1531  GAGGCGGTGCGGTGTGCTGCTGCTACCGCGCTGAGAACACCAACCAATGTTGA
E G G R R V R S A A T P P E N T P N N V *

```

图 1 *BcNRT2* 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

BcNRT2 的翻译起始密码子 ATG、终止密码子 TGA 和 12 个跨膜域用下划线标出, 方框内为保守的蛋白激酶 C 的识别位点 (S/T-X-R/K), 阴影部分为 NNP 家族的特征基元。

Fig. 1 Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *BcNRT2*

The translation start conrdon ATG, termination cordon TGA and 12 putative transmembrane domains labeled by underlines, conserved protein kinase C recognition motifs (S/T-X-R/K) were boxed. Signature motif for NNP (nitrate/nitrite porter) was shaded.

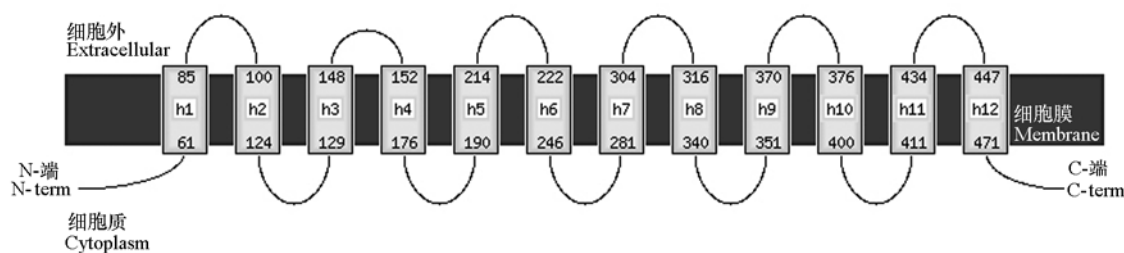


图 2 BcNRT2 跨膜结构预测

Fig. 2 Prediction of transmembrane structure of BcNRT2

将 BcNRT2 与 GenBank 中登录的其它物种的部分 NRT2 家族成员的氨基酸序列进行比对, 构建进化树 (图 3)。结果显示植物的 NRT2 蛋白可以分成 3 支: 双子叶植物 (I)、单子叶植物 (II)、起源古老的一类 (III)。氨基酸序列比对表明, BcNRT2 与已知 NRT2 具有较高的同源性, 氨基酸一致性分别与甘蓝型油菜 99%, 拟南芥 95%, 大豆 80%, 烟草 78%, 大麦 73%, 小麦 73%, 水稻 72%, 玉米 71%。

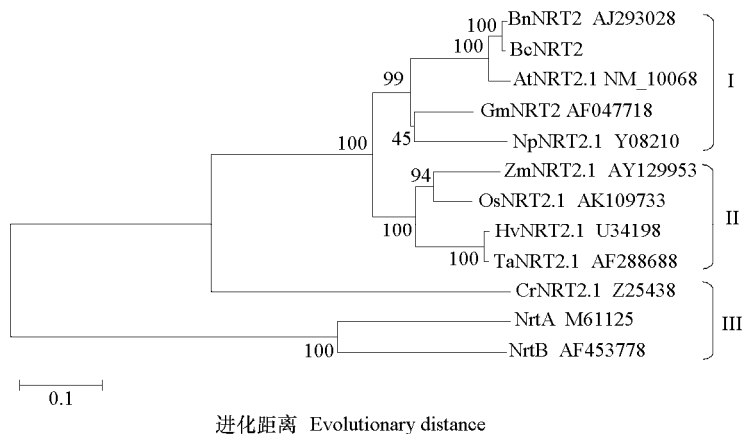


图 3 部分物种的 NRT2 氨基酸序列的系统进化树

物种缩略词如下: At, 拟南芥; Bc, 白菜; Bn, 甘蓝型油菜; Cr, 莱茵衣藻; Gm, 大豆; Hv, 大麦; Np, 烟草; Os, 水稻; Ta, 小麦; Zm, 玉米。NrtA、NrtB 来自构巢曲霉。

Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acid sequences of the NRT2 from several plant species

Species abbreviations are: At, *Arabidopsis thaliana*; Bc, *Brassica campestris*; Bn, *Brassica napus*;

Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Gm, *Glycine max*; Hv, *Hordeum vulgare*;

Np, *Nicotiana plumbaginifolia*; Os, *Oryza sativa*; Ta, *Triticum aestivum*;

Zm, *Zea mays*. NrtA and NrtB are

from *Aspergillus nidulans*.

2.2 硝酸盐处理对 *BcNRT2* 表达的影响

分别提取根、嫩叶的 RNA 进行实时荧光定量 RT-PCR 分析, 分析 *BcNRT2* 在高 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、低 ($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 两种浓度 NO_3^- 处理后不同组织的表达模式。由图 4 可知, 在 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个浓度的 NO_3^- 处理后, *BcNRT2* 在根部的相对表达值在不同时间点均高于嫩叶几十倍, 表明其在根部特异表达。在低浓度 NO_3^- 处理后, *BcNRT2* 在根和嫩叶中的相对表达值在 0.5 h 时迅速上升, 之后下降 (图 4), 表明低浓度 NO_3^- 可以在很短的时间内诱导其表达至峰值, *BcNRT2* 应该是诱导型的。高浓度 NO_3^- 处理后, *BcNRT2* 在根部和嫩叶的表达量约在 0.5 h 后迅速上升, 高表达量持

续至 2 h, 之后表达量开始下降 (图 4)。高、低浓度 NO_3^- 处理相比, 高浓度 NO_3^- 处理后表达量更高, 高表达量持续时间更长。

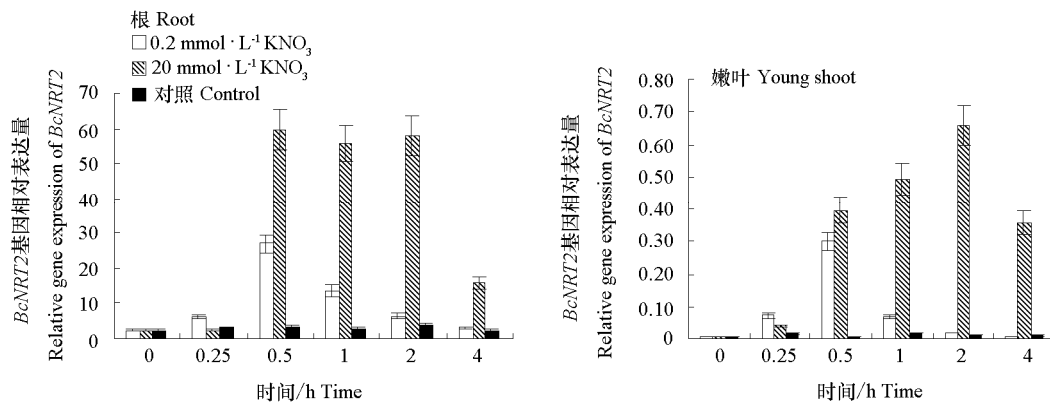


图 4 NO_3^- 处理后白菜根和嫩叶中 *BcNRT2* 基因相对表达量

Fig. 4 After treatment of NO_3^- , relative expression of *BcNRT2* in root and shoot in non-heading Chinese cabbage plant

2.3 *BcNRT2* 蛋白质的原生质体亚细胞定位

为了研究 *BcNRT2* 在活细胞中的发生功能的部位, 构建了 1 个由 CaMV 35S 启动子驱动的包含 *BcNRT2* 融合 YFP 的载体, 让其在叶片原生质体中瞬时表达。如图 5 所示, 对照转化 YFP 空载体的原生质体细胞的黄色荧光分散在整个细胞中。相比之下, 融合了 *BcNRT2* 的 YFP 载体, 其 YFP 信号仅出现在细胞膜上 (图 5)。

这一结果表明 *BcNRT2* 蛋白位于质膜上, 将软件预测的 *BcNRT2* 蛋白定位于细胞膜上的预测得以验证。

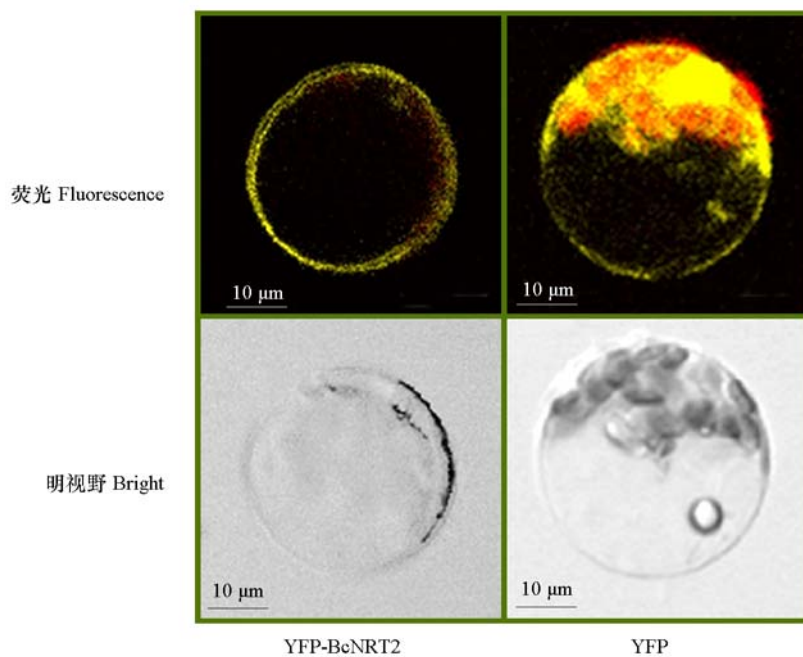


图 5 *BcNRT2* 蛋白在白菜原生质体中的亚细胞定位

Fig. 5 The subcellular localization of the *BcNRT2* protein in non-heading Chinese cabbage protoplasts

3 讨论

本试验中通过 RT-PCR 从白菜中克隆到 *NRT2* 基因。*BcNRT2* 包含 *NRT2* 家族的典型特征, 含有一个“A-G-W/L-G-N-M-G”共识序列, 可能起底物识别序列的作用 (Trueman et al., 1996)。*BcNRT2* 具有保守的丝氨酸残基位点, 其中一个位于第 11 个跨膜结构域之前。这些丝氨酸残基是潜在的蛋白激酶 C 磷酸化位点, 且在光合生物 (包括莱茵衣藻 *C. reinhardtii*) 的 *NRT2* 蛋白中表现出高度的保守性 (Quesada et al., 1994)。研究发现, *NRT* 中第 2 和第 8 个跨膜域的精氨酸残基, 对于保持高亲和特征具有重要作用; 点突变使上述位点的精氨酸改变, 转运蛋白转运硝酸盐的能力由高亲和转变为低亲和 (Unkles et al., 2004)。本研究中, *BcNRT2* 在第 2、8 个跨膜域中含有维持高亲和所需的精氨酸残基 (R115 和 R332), 从结构上表明 *BcNRT2* 属于高亲和特征的 *NRT*。氨基酸序列比对显示, *BcNRT2* 推导的氨基酸序列与各种其他物种的 *NRT2* 具有 31%~99% 的一致性。*BcNRT2* 与甘蓝型油菜 *BnNRT2* (99%), 拟南芥 *AtNRT2.1* (95%) 具有高度的一致性; 与莱茵衣藻 *CrNRT2.1* (50%), *NrtA* (34%), *NrtB* (31%) 具有较低的一致性, 这些低同源性可能反映出这些生物与白菜之间存在很远的进化距离。这与进化树的聚类结果是一致的。

实时定量 RT-PCR 结果表明, *BcNRT2* 的表达模式与报道的小麦 (Yin et al., 2007)、拟南芥 (Zhuo et al., 1999) 的 *NRT2.1* 基因类似, NO_3^- 诱导 *BcNRT2* 位于根部, 且高浓度和低浓度 NO_3^- 都可以诱导。在高低两种浓度的 NO_3^- 介质中根系的 *BcNRT2* 均具有较高水平的表达量, 表明该基因具有双亲和的表达特征。有关该基因编码蛋白亲和 NO_3^- 的分子机制有待进一步探讨。许多证据推测, 在侧根形成中 *AtNRT2.1* 是一个 NO_3^- 转运依赖感受角色 (Crawford & Glass, 1998; Forde, 2000; Little et al., 2005; Wirth et al., 2007)。*AtNRT2.1* 突变体 *lin1* 的研究表明, *AtNRT2.1* 具有 NO_3^- 感受器或者信号传感器的功能 (Little et al., 2005)。本研究中, 在 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NO}_3^-$ 处理 30 min 后, *BcNRT2* 的表达量迅速上升, 表明其可能是 NO_3^- 感受器, 但是其在感受 NO_3^- 中的作用仍需证据。*AtNRT1.1* 的研究表明, 在高低浓度 NO_3^- 处理后, 受到低亲和硝酸盐转运蛋白 *AtNRT1.1* 的调控, *AtNRT2.1* 会产生高低两种水平的响应 (Ho et al., 2009)。在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NO}_3^-$ 处理后, *BcNRT2* 的表达量持续上升 2 h, 高表达量持续时间较长, 可能是响应高浓度 NO_3^- , 受到 *NRT1.1* 的调控而产生的高水平响应。

白菜原生质体瞬时表达显示, *BcNRT2* 定位于细胞膜, 与拟南芥 *NRT2.1* 位于根皮层和表皮细胞的质膜上的研究结果一致 (Krapp et al., 1998; Chopin et al., 2007), 进一步说明 *BcNRT2* 发生功能的部位是细胞膜。拟南芥 (Orsel et al., 2006) 和大麦 (Tong et al., 2005) 的研究表明, NO_3^- 转运功能需要 *NAR2.1* 蛋白的表达, 在质膜上与 *NRT2.1* 单体结合。在白菜中, *BcNRT2* 转运 NO_3^- 的功能是否也需要 *NAR2.1*, 在质膜上是如何发挥转运功能, 还需要进一步研究。

References

- Chapman N, Miller T. 2011. Nitrate transporters and root architecture // Geisler M, Venema K. Transporters and pumps in plant signaling. Berlin: Springer: 165 - 190.
- Chopin F, Wirth J, Dorbe M F, Lejay L, Krapp A, Gojon A, Daniel-Vedele F. 2007. The *Arabidopsis* nitrate transporter *AtNRT2.1* is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 630 - 635.
- Crawford N M, Glass A D M. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3: 389 - 395.
- Daniel-Vedele F, Filleur S, Caboche M. 1998. Nitrate transport: A key step in nitrate assimilation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 235 - 239.
- Earley K W, Haag J R, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard C S. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45: 616 - 629.
- Forde B G. 2000. Nitrate transporters in plants: Structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 219 - 235.

- Ho C H, Lin S H, Hu H C, Tsay Y F. 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 138: 1184 – 1194.
- Hou Xi-lin. 2003. Advances in breeding of non-heading Chinese cabbage. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 26: 111 – 115. (in Chinese)
- 侯喜林. 2003. 不结球白菜育种研究新进展. *南京农业大学学报*, 26: 111 – 115.
- Krapp A, Fraiser V, Scheible W R, Quesada A, Gojon A, Stitt M, Caboche M, Daniel Vedele F. 1998. Expression studies of Nrt2: 1Np, a putative high affinity nitrate transporter: Evidence for its role in nitrate uptake. *The Plant Journal*, 14: 723 – 731.
- Little D Y, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy J E. 2005. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 102: 13693 – 13698.
- Okamoto M, Kumar A, Li W, Wang Y, Siddiqi M Y, Crawford N M, Glass A D. 2006. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiology*, 140: 1036 – 1046.
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith S J, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller A J. 2006. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiology*, 142: 1304 – 1317.
- Orsel M, Eulenburg K, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2004. Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta*, 219: 714 – 721.
- Pfaffl M W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: e45.
- Quesada A, Galvan A, Fernandez E. 1994. Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 5: 407 – 419.
- Quesada A, Galvan A, Schnell R A, Lefebvre P A, Fernandez E. 1993. Five nitrate assimilation-related loci are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and General Genetics MGG*, 240: 387 – 394.
- Tong Y, Zhou J J, Li Z, Miller A J. 2005. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *The Plant Journal*, 41: 442 – 450.
- Trueman L J, Richardson A, Forde B G. 1996. Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 175: 223 – 231.
- Tsay Y F, Chiu C C, Tsai C B, Ho C H, Hsu P K. 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters*, 581: 2290 – 2300.
- Unkles S E, Hawker K L, Grieve C, Campbell E I, Montague P, Kinghorn J R. 1991. crnA encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 88: 204 – 208.
- Unkles S E, Rouch D A, Wang Y, Siddiqi M Y, Glass A D, Kinghorn J R. 2004. Two perfectly conserved arginine residues are required for substrate binding in a high-affinity nitrate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 101: 17549 – 17554.
- Wirth J, Chopin F, Santoni V, Viennois G, Tillard P, Krapp A, Lejay L, Daniel-Vedele F, Gojon A. 2007. Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 23541 – 23552.
- Yin L P, Li P, Wen B, Taylor D, Berry J O. 2007. Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (*TaNRT2.1*) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other *NRT2* genes. *Plant Science*, 172: 621 – 631.
- Yong Z, Kotur Z, Glass A D. 2010. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 63: 739 – 748.
- Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2: 1565 – 1572.
- Zhuo D, Okamoto M, Vidmar J J, Glass A D. 1999. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2; 1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 17: 563 – 568.