

甘蔗磷酸丙糖/磷酸转运蛋白基因 *ShTPT* 的克隆与表达分析

赵雪婷^{1,2}, 赵婷婷^{1,2}, 冯翠莲^{1,2}, 高利燕^{1,2}, 林继山^{1,2}, 冯小艳^{1,2},
王文治^{1,2}, 沈林波^{1,2}, 张树珍^{1,2}, 王俊刚^{1,2*}

1. 热带作物生物育种全国重点实验室/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/海南热带农业资源研究院/海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室/中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572024

摘要: 磷酸丙糖/磷酸转运蛋白 (triose-phosphate/phosphate translocator, TPT) 是一种磷酸丙糖转运蛋白, 在植物碳代谢途径以及非生物胁迫中发挥重要作用。蔗糖具有广泛的食用价值和重要的经济价值, 甘蔗是制糖的主要原料, 蔗糖占中国产糖量的 80% 以上, 因此实现甘蔗高产高抗目标至关重要。本研究以甘蔗品种新台糖 22 号 (ROC22) 为材料, 克隆获得甘蔗磷酸丙糖/磷酸转运蛋白基因 *ShTPT*, 利用生物信息学方法对 *ShTPT* 进行蛋白理化性质、保守结构域、跨膜结构预测和蛋白序列比对。结果显示: *ShTPT* 基因 CDS 全长 1221 bp, 编码 406 个氨基酸, 蛋白分子量为 43.63 kDa, 等电点 (pI) 为 9.80, 富含丙氨酸、亮氨酸, 不稳定系数为 42.51, 亲水系数为 0.583, 是一种不稳定的疏水性蛋白; *ShTPT* 蛋白不含信号肽并具有 9 个跨膜结构域; 保守结构域预测显示 *ShTPT* 含有 1 个 TPT 结构域, 符合 TPT 家族特征; 进化分析结果显示, *ShTPT* 与高粱 *SbTPT* (XP_002454867.1)、玉米 *ZmTPT* (NP_001105497.1) 聚在一起, 同源性分别为 97.04% 和 94.13%。进一步对 *ShTPT* 进行亚细胞定位分析发现 *ShTPT* 定位在叶绿体。甘蔗组织表达模式分析表明, *ShTPT* 主要在叶片中表达, 在根部和茎中的表达量极低。在 PEG 模拟的干旱胁迫条件下 *ShTPT* 的表达量表现出升-降-升的趋势, 表明其响应干旱胁迫。该研究结果表明 *ShTPT* 是一个定位于叶绿体的跨膜转运蛋白, 可能参与甘蔗叶片中的原初碳代谢化合物的转运, 响应干旱胁迫。本研究初步确定甘蔗 *ShTPT* 基因在叶片中碳同化物的转运和非生物胁迫方面发挥重要作用, 为进一步研究其功能提供理论依据。

关键词: 甘蔗; 磷酸丙糖/磷酸转运蛋白 (TPT); 亚细胞定位; 干旱胁迫; 表达分析

中图分类号: S566.1

文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of the Phosphate Triose/Phosphate Transporter Gene *ShTPT* in Sugarcane

ZHAO Xueting^{1,2}, ZHAO Tingting^{1,2}, FENG Cuilian^{1,2}, GAO Liyan^{1,2}, LIN Jishan^{1,2}, FENG Xiaoyan^{1,2},
WANG Wenzhi^{1,2}, SHEN Linbo^{1,2}, ZHANG Shuzhen^{1,2}, WANG Jungang^{1,2*}

1. National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Institute of Tropical Agricultural Resources / Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province / Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China

Abstract: The triose-phosphate/phosphate translocator (triose-phosphate/phosphate translocator, TPT) is a triose phosphate transporter that plays an important role in plant carbon metabolism pathways as well as abiotic stresses. Sucrose has a wide range of edible value and important economic value. Sugarcane is the main raw material for sugar production, and sucrose from sugarcane accounts for more than 80% of China's sugar production, so it is very important to achieve

收稿日期 2024-05-17; 修回日期 2024-06-05

基金项目 海南省基础与应用基础研究计划 (自然科学领域) 高层次人才项目 (No. 320RC711); 国家重点研发计划项目 (No. 2022YFD2301102); 三亚市科技创新专项 (No. 2022KJCX17)。

作者简介 赵雪婷 (1997—), 女, 硕士, 研究方向: 甘蔗基因资源挖掘与利用。*通信作者 (Corresponding author): 王俊刚 (WANG Jungang), E-mail: wangjungang@itbb.org.cn。

the goal of high yield and high resistance of sugarcane. In this study, the sugarcane variety ROC22 was used as the material to clone the sugarcane triose/phosphate transporter gene *ShTPT*, and the physicochemical properties, conserved domains, transmembrane structure prediction and protein sequence comparison of *ShTPT* were carried out by bioinformatics methods. The results showed that the CDS of *ShTPT* was 1221 bp, encoding 406 amino acids, the molecular weight of the protein was 43.63 kDa, and the isoelectric point (pI) was 9.80. It was rich in alanine and leucine, its instability coefficient was 42.51, and its hydrophilic coefficient was 0.583, which was an unstable hydrophobic protein. *ShTPT* did not contain signal peptides but had 9 transmembrane domains. Conserved domain prediction showed that *ShTPT* contained a *tpt* domain, which was consistent with the characteristics of the TPT family. The results of phylogenetic analysis showed that *ShTPT* was clustered with *Sorghum bicolor* *SbTPT* (XP_002454867.1) and *Zea mays* *ZmTPT* (NP_001105497.1) with homology of 97.04% and 94.13%, respectively. Further subcellular localization analysis of *ShTPT* showed that *ShTPT* was localized in chloroplasts. Tissue expression pattern analysis of sugarcane showed that *ShTPT* was mainly expressed in leaves, and the expression level in roots and stems was very low. Under the drought stress conditions simulated by PEG, the expression of *ShTPT* showed an upward trend, indicating that it responded to drought stress. The results of this study suggest that *ShTPT* is a chloroplast-localized transmembrane transporter, which may be involved in the transport of primary carbon metabolic compounds in sugarcane leaves and responsive to drought stress. This study preliminarily determined that *ShTPT* gene plays an important role in the transport of carbon assimilates in leaves and abiotic stress, which provides a theoretical basis for further study of its function.

Keywords: sugarcane; triose-phosphate / phosphate translocator (TPT); subcellular localization; drought stress; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.11.004

光合器官通过卡尔文循环将 CO_2 同化为有机化合物, 为地球上所有生命提供必不可少的基础物质。在植物和藻类中, 固定的碳以磷酸丙糖的形式通过磷酸丙糖转运体 (triose-phosphate/phosphate translocator, TPT) 从叶绿体输出。TPT 在叶绿体内膜上催化无机磷酸盐 (Pi) 与三磷酸甘油醛 (3-GAP)、二羟丙酮磷酸 (DHAP) 与 3-磷酸甘油醛等三磷酸酯的交换运输^[1-4], 磷酸丙糖转运体属于质体磷酸盐转运体 (pPTs) 家族, 能够与 Pi 对向转运磷酸化 C3、C5 和 C6 化合物^[5], 其成员在所有光合生物真核生物和其他具有质体的生物中广泛分布, 多数被子植物基因组中有 2 个 *TPT* 基因, 而苋科 (Amaranthaceae) 和十字花科 (Brassicaceae) 物质只有 1 个 *TPT* 基因^[6-7]。陆生植物拥有 4 个 pPT 亚型, 包括磷酸丙糖/磷酸转运体 (TPT)、磷酸烯醇丙酮/磷酸转运体 (PPT)、葡萄糖-6-磷酸/磷酸转运体 (GPT) 和木糖醇-5-磷酸/磷酸转运体 (XPT), 分别转运不同的糖磷酸并在各种代谢途径中发挥关键作用^[8-9], 因此它们被视为用于改善作物产量的基因操纵的主要目标^[10-11]。

在过去的几十年里, 对 TPT 的生理功能进行了比较详细的研究。通过敲除植物体内 *TPT* 基因和减少其表达量, 发现植株的表型均无明显变化。进一步的研究发现, TPT 活性降低能够促进

同化物向临时储存淀粉转化, 并在光照阶段同时增加淀粉的转化率, 从而弥补了 TPT 活性的缺失, 此过程代谢中间产物释放无机磷 (Pi), 以维持光合碳同化过程^[12-14]。而在水稻 (*Oryza sativa*) 的突变 *TPT* 基因植株叶片中蔗糖浓度升高、淀粉和可溶性糖含量减少、植物光合速率降低, 且植株生长矮小, 表明通过临时淀粉储存不能补偿水稻 *TPT* 突变带来的影响^[4]。

甘蔗 (*Saccharum* spp.) 叶片淀粉含量相对较低, 因此可能无法利用这种淀粉储备来循环 Pi 以缓解当蔗糖合成受限时的光合抑制。在本研究中, 基于本课题组前期的转录组数据, 从新台糖 22 号 (ROC22) 中克隆得到磷酸丙糖转运体基因 *ShTPT*, 利用生物信息学方法对该基因的理化性质进行预测, 并分析其亚细胞定位情况。同时, 采用 qRT-PCR 技术分析 *ShTPT* 基因在干旱和非生物胁迫条件下的表达模式, 以期探明 *ShTPT* 与光合作用直接的关系。本研究结果将为甘蔗抗逆性遗传改良提供重要的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试材料为甘蔗品种新台糖 22 号 (ROC22)。基因表达分析材料为 ROC22 成熟期苗, 种植于中国热带农业科学院文昌基地;

PEG 胁迫处理材料为 ROC22 组培苗, 由本实验室提供。所有材料均用液氮速冻备用。

1.1.2 载体及菌株 DH5 α 感受态购自上海唯地生物技术有限公司, pMD-19T 购自 TaKaRa 公司, pBWA (V) HS-ccdb-GLosgfp 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 *ShTPT* 基因全长 CDS 克隆 取 0.1 g ROC22 叶片, 充分研磨, 利用 Omega 公司 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 并用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) 合成 cDNA 第一链, 具体方法参照试剂盒说明书, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。根据甘蔗转录组数据利用 NCBI 网站设计特异性引物 *ShTPT*-F/R (表 1), 以 cDNA 为模板, 利用高保真酶 2 $\times$ Phanta Max Master Mix (Vazyme) 进行 PCR 扩增, 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min ; 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳验证后, 回收纯化后利用 TA 克隆与 pMD-19T 载体连接, 转化 DH5 α 大肠杆菌感受态, 通过氨苄霉素筛选以及菌液 PCR 进行验证, 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序验证。

1.2.2 *ShTPT* 生物信息学分析 对获得的 *ShTPT* 序列进行生物信息学分析。利用 SnapGene 软件得到 *ShTPT* 氨基酸序列, 在 NCBI 网站进行序列相似性比对后用 DNAMAN 软件进行多重序列比对, 进一步用最大似然法在 MEGA 7.0 软件中构建系统进化树。用 Prot Param (<http://web.expasy.org/protparam>) 在线软件推导 *ShTPT* 蛋白的分子质量等理化性质, 并用 NPSA-PRABI (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线软件对其二级结构和三级结构进行预测。用 NetPhos 3.1 Server 软件对 *ShTPT* 进行磷酸化位点预测。

1.2.3 构建 *ShTPT*-GFP 融合表达载体对 *ShTPT* 进行亚细胞定位 设计 *ShTPT* 开放阅读框扩增引物 *ShTPT*-G-F/R (表 1), 引物两端引入 *Bsa* I 酶切位点, 下游引物去除终止密码子, 以 *ShTPT*-19T 为模板, 经 PCR 扩增后酶切, 与线性化的 pBWA (V) HS-ccdb-GLosgfp 质粒连接, 转化大肠杆菌后通过卡那霉素筛选, PCR 鉴定后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

将水稻培养至 7~15 日龄, 按照 YOO 等^[15]方法提取水稻叶片的原生质体, 将构建好的

pBWA (V) HS-*ShTPT*-GLosgfp 融合质粒转入原生质体进行瞬时表达, 最后通过激光共聚焦显微镜 (Nikon, C2-ER) 进观察 *ShTPT* 蛋白亚细胞定位结果并拍照。

1.2.4 甘蔗 *ShTPT* 的差异表达分析 选用田间生长至成熟期的 ROC22 植株研究 *ShTPT* 在甘蔗不同部位的表达情况, 分别取其-1 叶 (IL)、+1 叶 (ML)、1-2 节茎 (S1)、4-5 节茎 (S2)、7-8 节茎 (S3)、10-11 节茎 (S4)、12-13 节茎 (S5)、14-15 节茎 (S6) 和根 (RS)。干旱胁迫处理选用生长至 6~7 叶的 ROC22 甘蔗组培苗, 在含有 20% PEG6000 的 MS 液中进行胁迫处理, 处理时间分别为 0、6、12、24、48、72、96 h 时取样, 整株取样后迅速用液氮固定。每个处理设置 3 个生物学重复, 样品的总 RNA 提取及反转录方法同 1.2.1。

根据获得的 *ShTPT* 序列设计特异引物 *ShTPT*-Q-F/R (表 1), 以磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*) 为内参基因并设计甘蔗内参引物 *GADPH*-F/R (表 1)。利用 Roche 罗氏 qPCR 仪 Light Cyclor 96 进行 RT-qPCR, 反应体系: 2 $\times$ Q3 SYBR qPCR Master Mix 10 μL 、上/下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL 、cDNA 模板 1 μL 、ddH $_2\text{O}$ 7 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。每个样品设置 3 个重复。根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算 *ShTPT* 相对表达量。采用 IBM SPSS Statistics 25 软件通过单因素的方差分析对 *ShTPT* 的表达水平的差异显著性进行检验。

表 1 引物信息
Tab. 1 Primer information

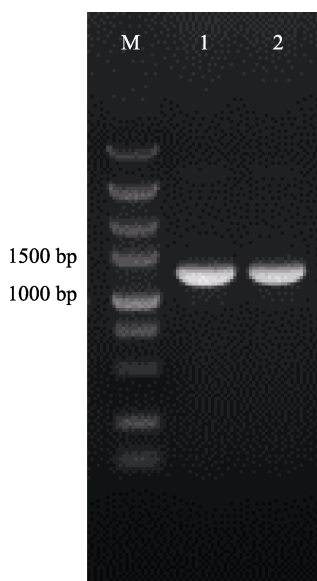
引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
ShTPT-F	CTCCACAGACTCCACTTCC	基因克隆
ShTPT-R	GTCGACGATGTTGTGTCCGA	
ShTPT-G-F	CAGTGGTCTCACAAATGTCGGC GCTCGGAA	
ShTPT-G-R	CAGTGGTCTCATACATGCGCTCTT TTTCCTTTTCTCC	亚细胞定位
ShTPT-Q-F	CATGCTGTCGGCAATGTGTT	
ShTPT-Q-R	CAAAGCAACACCCGCTATGG	定量表达
GADPH-F	CACGGCCACTGGAAGCA	
GADPH-R	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC	内参基因

2 结果与分析

2.1 *ShTPT* 基因克隆

以甘蔗品种 ROC22 叶片的 cDNA 为模板, 利用特异性引物进行扩增, 获得 1300 bp 左右的条

带(图 1)。测序结果显示其与参照序列一致。利用 BioMX 2.6 软件对 *ShTPT* 核酸序列进行分析, CDS 长 1221 bp, 编码 406 个氨基酸。



M: DL5000 DNA marker.

图 1 *ShTPT* 的克隆

Fig. 1 Cloning of *ShTPT*

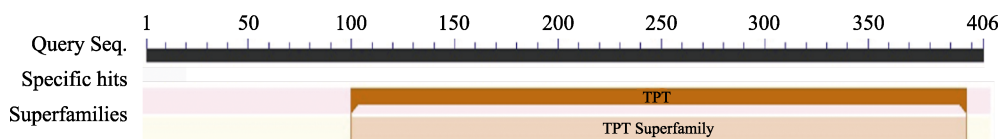


图 2 *ShTPT3* 蛋白保守结构

Fig. 2 Conserved domains of *ShTPT* protein

蛋白三级结构预测结果显示 *ShTPT* 具有跨膜结构, 包含 α -螺旋、无规则卷曲和延伸链, 且主要以 α -螺旋的形式完成跨膜(图 5), 与蛋白二级结构预测结果一致。

利用在线软件 TMHMM 对 *ShTPT* 蛋白的跨膜结构进行预测, 发现其具有 9 个典型的跨膜结构域(图 6A), 与 *ShTPT* 三级结构预测结果一致。利用 SignalP-5.0 在线软件进行信号肽预测结果显示该蛋白不含有信号肽结构, 表明 *ShTPT* 是一个不具有信号肽的跨膜蛋白。

对 *ShTPT* 磷酸化进行位点分析发现, *ShTPT* 蛋白有 20 个 Ser(丝氨酸)位点、9 个 Thr(苏氨酸)位点、2 个 Tyr(酪氨酸)位点可发生磷酸化修饰(图 6B), 推测 *ShTPT* 翻译后可能通过磷酸化修饰发挥其功能。

2.3 *ShTPT* 蛋白的系统进化分析

通过 Blast 比对在数据库中获取了 10 条与甘

2.2 生物信息学分析

通过 ProtParam 在线软件对 *ShTPT* 蛋白进行理化性质分析, 结果显示, *ShTPT* 蛋白分子量为 43.63 kDa, 等电点(pI)为 9.80, 分子式 $C_{2038}H_{3184}N_{512}O_{526}S_{11}$, 含有丙氨酸(13.8%)、亮氨酸(11.3%)等 20 种氨基酸, 不稳定系数为 42.51, 亲水系数为 0.583, 是一种不稳定的疏水性蛋白。

ShTPT 蛋白具有一个 TPT 结构域, 起止氨基酸为 103—401 位, *ShTPT* 蛋白具有植物 TPT 家族特有的典型保守区域(图 2)。在 NCBI 网站下载其同源序列进行比对发现, 甘蔗 *ShTPT* 与高粱 *SbTPT*、水稻 *OsTPT*、柳枝稷 *PvTPT*、玉米 *ZmTPT* 等蛋白都具有相同的保守结构域, 但不同物种之间存在少数氨基酸的差异, 其中甘蔗 *ShTPT* 与高粱 *SbTPT* 同源性达到 97.04%(图 3)。

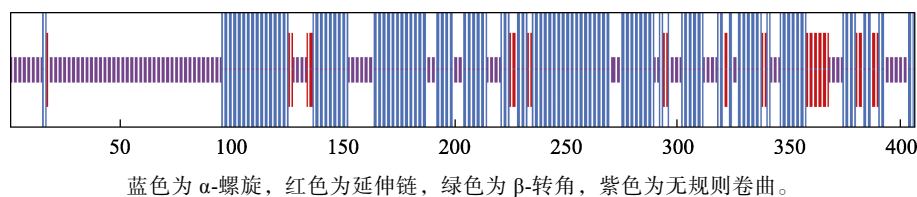
蛋白二级结构预测结果显示, *ShTPT* 蛋白中的 α -螺旋(alpha helix, Hh)占比 51.48%, 无规则卷曲(random coil, Cc)占比 40.39%, 延伸链(extended strand, Ee)占比 8.13%, 无 β -转角(beta turn, Tt)和其他元件(图 4)。

甘蔗 *ShTPT* 蛋白同源性较高的蛋白序列, 使用 MEHA 7.0 软件通过邻接法(neighbor-joining algorithm)构建系统进化树。聚类结果表明, 甘蔗 *ShTPT* 与高粱 *SbTPT* 同源性极高, 被聚类在一小支, 序列比对后发现同源性高达 97.04%。另外 *ShTPT* 与同属禾本科的玉米 *ZmTPT*、粟 *SiTPT*、黍 *PmTPT*、柳枝稷 *PvTPT*、水稻 *OsTPT*、小麦 *TaTPT* 的亲缘关系较近, 被聚类在同一簇中。而属于双子叶植物的豌豆 *PsTPT*、拟南芥 *AtTPT* 与菠菜 *SoTPT* 则被聚类于另一簇, 与甘蔗 *ShTPT* 亲缘关系较远(图 7)。

2.4 *ShTPT* 亚细胞定位

利用 Plant-mPLoc 在线网站预测 *ShTPT* 的亚细胞定位, 结果显示甘蔗 *ShTPT* 定位在叶绿体。为了验证预测结果, 构建了 pBWA(V)HS-*ShTPT*-GLOsgfp 融合表达载体, 与 pBWA(V)HS-ccdb-GLOsgfp(对照)分别转入水稻原生质体

甘蔗_ShTPT	MSALGILTCGAGVSGILRLRR...RAAPAFATAAPSHL...FAGTAKCAA...LPDAAPTVWGRQIRFA...LIIPAAIIIES	71
高粱_SbTPT	MSAAGILTCGAGVSGILRLRR...RAAPAFATAAPSHL...FAGTAKCAA...LPDAAPTVWGRQIRFA...LIIPAAIIIES	71
水稻_OsTPT	MSALGILTCGAGVSGILRLRR...RAAPAFATAAPSHL...FAGTAKCAA...LPDAAPTVWGRQIRFA...LIIPAAIIIES	82
柳枝稷_PvTPT	MSALGILTCGAGVSGILRLRR...RAAPAFATAAPSHL...FAGTAKCAA...LPDAAPTVWGRQIRFA...LIIPAAIIIES	69
谷子_SiTPT	MSALGILTCGAGVSGILRLRR...RAAPAFATAAPSHL...FAGTAKCAA...LPDAAPTVWGRQIRFA...LIIPAAIIIES	69
小麦_TaTPT	MSALGILTCGAGVSGILRLRR...RAAPAFATAAPSHL...FAGTAKCAA...LPDAAPTVWGRQIRFA...LIIPAAIIIES	66
玉米_ZmTPT	MSALGILTCGAGVSGILRLRR...RAAPAFATAAPSHL...FAGTAKCAA...LPDAAPTVWGRQIRFA...LIIPAAIIIES	72
甘蔗_ShTPT	SCPAKHNIRPFAAAASAGFAK...GFIIPKYPATITGFFFMWYFINVTFNTINKKTYNYFFYFYFVS...THIVGVVAYCIVG	151
高粱_SbTPT	SCPAKHNIRPFAAAASAGFAK...GFIIPKYPATITGFFFMWYFINVTFNTINKKTYNYFFYFYFVS...THIVGVVAYCIVG	151
水稻_OsTPT	SCAARRCAIRPFAAATS...GEAKFAGTIPKYPATITGFFFMWYFINVTFNTINKKTYNYFFYFYFVS...THIVGVVAYCIVS	162
柳枝稷_PvTPT	CFARRHAIIRPFAAAS...GEAKFAGTIPKYPATITGFFFMWYFINVTFNTINKKTYNYFFYFYFVS...THIVGVVAYCIVS	149
谷子_SiTPT	SCAARRCTIRPFAAASA...GEAKFAGTIPKYPATITGFFFMWYFINVTFNTINKKTYNYFFYFYFVS...THIVGVVAYCIVS	149
小麦_TaTPT	CAS...KRIITIRPFAASAFPAAGKSPGIIIPKYPATITGFFFMWYFINVTFNTINKKTYNYFFYFYFVS...THIVGVVAYCIVS	147
玉米_ZmTPT	ICPARRHITIRPFAAASAGFAKSVGELIKYPATITGFFFMWYFINVTFNTINKKTYNYFFYFYFVS...THIVGVVAYCIVS	154
甘蔗_ShTPT	WSLIGIPKRAPINNTI...KLIIFVVAICGCHVTSNVSEFAAVSFAHTTKAIEFFFNAAATCFVILGCOVPISTWISLAPVVG	233
高粱_SbTPT	WSVGIIPKRAPINNTI...KLIIFVVAICGCHVTSNVSEFAAVSFAHTTKAIEFFFNAAATCFVILGCOVPISTWISLAPVVG	233
水稻_OsTPT	WTVGIIPKRAPINNTI...KLIIFVVAICGCHVTSNVSEFAAVSFAHTTKAIEFFFNAAATCFVILGCOVPISTWISLAPVVG	244
柳枝稷_PvTPT	WSVGIIPKRAPINNTI...KLIIFVVAICGCHVTSNVSEFAAVSFAHTTKAIEFFFNAAATCFVILGCOVPISTWISLAPVVG	231
谷子_SiTPT	WSLIGIPKRAPINNTI...KLIIFVVAICGCHVTSNVSEFAAVSFAHTTKAIEFFFNAAATCFVILGCOVPISTWISLAPVVG	231
小麦_TaTPT	WSVGIIPKRAPINNTI...KLIIFVVAICGCHVTSNVSEFAAVSFAHTTKAIEFFFNAAATCFVILGCOVPISTWISLAPVVG	229
玉米_ZmTPT	WSVGLIPKRAPINNTI...KLIIFVVAICGCHVTSNVSEFAAVSFAHTTKAIEFFFNAAATCFVILGCOVPISTWISLAPVVG	236
甘蔗_ShTPT	VSMASITELSENWIGFINAMISNISFTYRSIYSSKAMTDMESTNVYAYISITAIIVCIPFALIFEGPOLMCHGFSATAKVG	315
高粱_SbTPT	VSMASITELSENWIGFINAMISNISFTYRSIYSSKAMTDMESTNVYAYISITAIIVCIPFALIFEGPOLMCHGFSATAKVG	315
水稻_OsTPT	VSMASITELSENWIGFINAMISNISFTYRSIYSSKAMTDMESTNVYAYISITAIIVCIPFALIFEGPOLMCHGFSATAKVG	326
柳枝稷_PvTPT	VSMASITELSENWIGFINAMISNISFTYRSIYSSKAMTDMESTNVYAYISITAIIVCIPFALIFEGPOLMCHGFSATAKVG	313
谷子_SiTPT	VSMASITELSENWIGFINAMISNISFTYRSIYSSKAMTDMESTNVYAYISITAIIVCIPFALIFEGPOLMCHGFSATAKVG	313
小麦_TaTPT	VSMASITELSENWIGFINAMISNISFTYRSIYSSKAMTDMESTNVYAYISITAIIVCIPFALIFEGPOLMCHGFSATAKVG	311
玉米_ZmTPT	VSMASITELSENWIGFINAMISNISFTYRSIYSSKAMTDMESTNVYAYISITAIIVCIPFALIFEGPOLMCHGFSATAKVG	318
甘蔗_ShTPT	ITKFSVSTIFVGLFYHLYNOATNTIERVAPI...THAVGNVIRKRVFVIGFSTIVFGNKTITCTGIGTSTATACVATYSYTKAKT	397
高粱_SbTPT	ITKFSVSTIFVGLFYHLYNOATNTIERVAPI...THAVGNVIRKRVFVIGFSTIVFGNKTITCTGIGTSTATACVATYSYTKAKT	397
水稻_OsTPT	ITKFSVSTIFVGLFYHLYNOATNTIERVAPI...THAVGNVIRKRVFVIGFSTIVFGNKTITCTGIGTSTATACVATYSYTKAKT	408
柳枝稷_PvTPT	ITKFSVSTIFVGLFYHLYNOATNTIERVAPI...THAVGNVIRKRVFVIGFSTIVFGNKTITCTGIGTSTATACVATYSYTKAKT	395
谷子_SiTPT	ITKFSVSTIFVGLFYHLYNOATNTIERVAPI...THAVGNVIRKRVFVIGFSTIVFGNKTITCTGIGTSTATACVATYSYTKAKT	395
小麦_TaTPT	ITKFSVSTIFVGLFYHLYNOATNTIERVAPI...THAVGNVIRKRVFVIGFSTIVFGNKTITCTGIGTSTATACVATYSYTKAKT	393
玉米_ZmTPT	ITKFSVSTIFVGLFYHLYNOATNTIERVAPI...THAVGNVIRKRVFVIGFSTIVFGNKTITCTGIGTSTATACVATYSYTKAKT	400
甘蔗_ShTPT	EEFKRKSA	406
高粱_SbTPT	EEFKRKSA	406
水稻_OsTPT	EEFKRKSA	417
柳枝稷_PvTPT	EEFKRKSA	404
谷子_SiTPT	EEFKRKKS	404
小麦_TaTPT	EEFKRAKAA	402
玉米_ZmTPT	EEFKRKSA	409

图 3 *ShTPT* 氨基酸序列比对Fig. 3 Amino acid sequence alignment of *ShTPT*

蓝色为 α -螺旋, 红色为延伸链, 绿色为 β -转角, 紫色为无规则卷曲。
The blue is α -helix, red is extended-strand, green is beta turn, and purple is random coil.

图 4 *ShTPT* 蛋白质二级结构预测Fig. 4 Prediction of secondary structure of *ShTPT* protein

进行瞬时表达, 研究 *ShTPT* 的亚细胞定位。结果显示, 含 GFP 空载体使水稻原生质体的细胞核、细胞膜、叶绿体等部位均有荧光, *ShTPT*-GFP 融合蛋白只在叶绿体部位发出荧光 (图 8), 表明 *ShTPT* 是一种叶绿体定位蛋白, 与预测结果一致。

2.5 *ShTPT* 基因的表达分析

通过对甘蔗 *ShTPT* 基因进行荧光定量 PCR

分析发现, 该基因主要在甘蔗叶片中表达, 在茎和根中的表达量极低 (图 9)。在 20% PEG6000 模拟的干旱胁迫下, *ShTPT* 的表达呈现升-降-升的趋势, 在 24 h 达到最高, 为 0 h 表达量的 2.2 倍, 48 h 时降为 0 h 的 1.3 倍, 96 h 时又回升至 0 h 的 2 倍以上 (图 10)。表明 *ShTPT* 响应干旱胁迫。

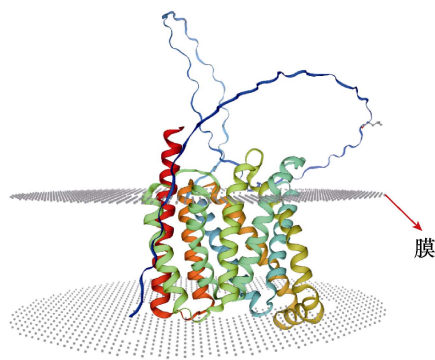
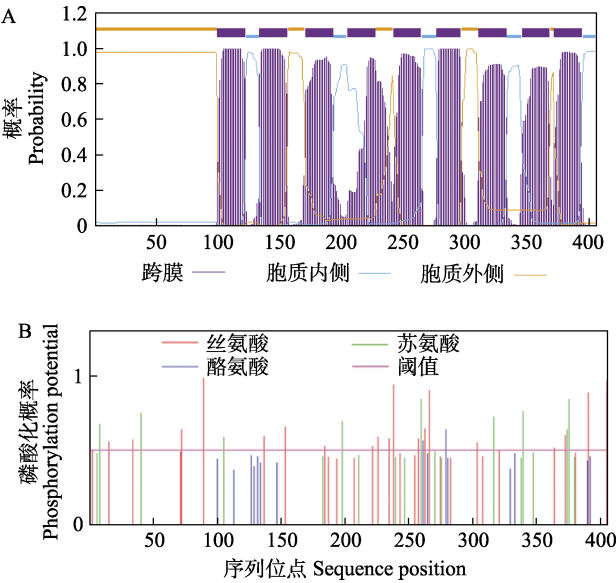


图 5 ShTPT 蛋白质三级结构的预测

Fig. 5 Prediction of the tertiary structure of ShTPT protein



A: ShTPT 跨膜结构预测; B: ShTPT 磷酸化位点预测。
A: ShTPT transmembrane structure prediction diagram;
B: Prediction of phosphorylation sites.

图 6 ShTPT 蛋白理化性质分析

Fig. 6 Analysis of physical and chemical properties of ShTPT Protein

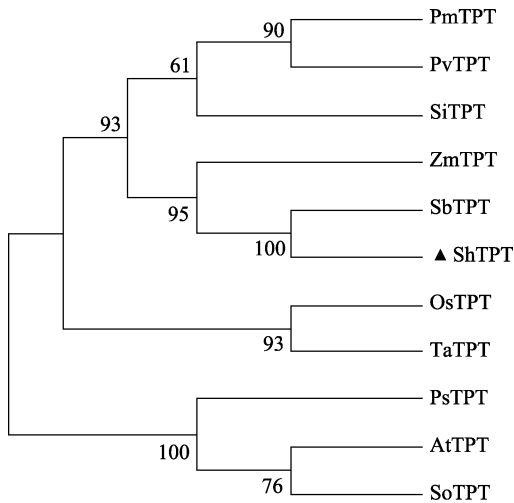


图 7 TPT 蛋白系统进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree of TPT protein

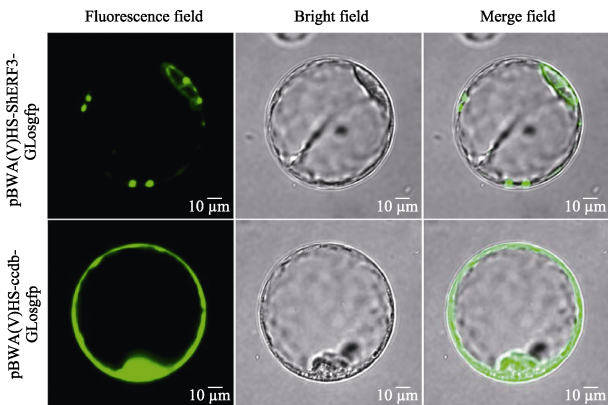
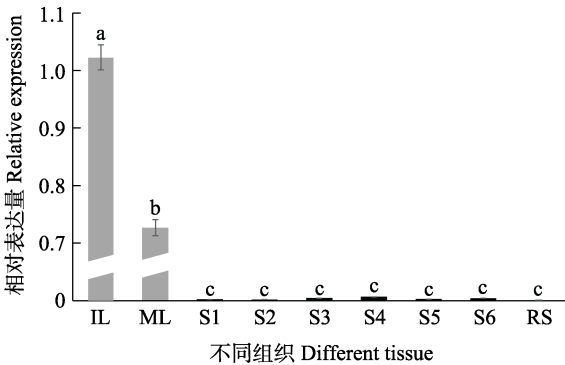


图 8 ShTPT 亚细胞定位

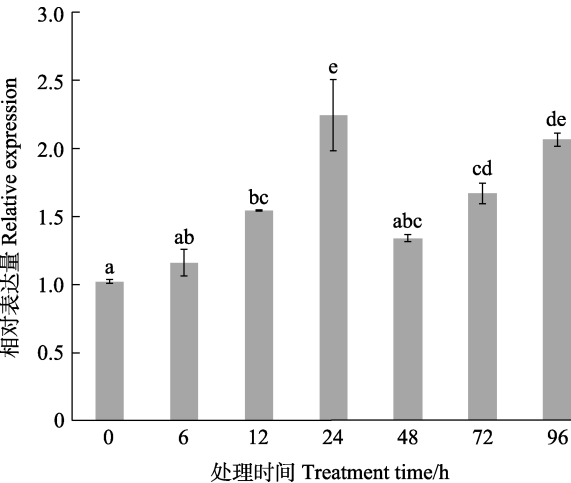
Fig. 8 Subcellular localization results of ShTPT



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 9 ShTPT 基因在甘蔗不同组织的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of *ShTPT* gene in different tissues of sugarcane



不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different lowercases indicate significant difference at the level 0.05.

图 10 ShTPT 在干旱胁迫下的表达

Fig. 10 Expressions of *ShTPT* gene under drought stress

3 讨论

植物中缺乏 TPT 引起的效应几乎可以通过植

物夜间淀粉的转化途径完全补偿, 该途径促使淀粉降解为葡萄糖和麦芽糖的形式, 并通过麦芽糖转运蛋白 (MEX1) 和葡萄糖转运蛋白 (pGlcT) 输出叶绿体^[16-17]。此外, 在植物中, 淀粉的降解也可能发生在光照时期, 与淀粉的合成同时进行^[13-14]。与藻类相比, 植物细胞运输固定碳的能力似乎更为灵活, 且大多数被子植物一般含有较多数量的 pPTs (5~16 个)^[7], 拟南芥有 6 个 pPTs, 包括 1 个 TPT、2 个 GPTs、2 个 PPTs、1 个 XPT^[7], 而藻类有 4 个 pPTs, 其中有 2 个 TPTs, 1 个推测的 PPT, 以及 1 个推测的 GPT/XPT^[18]。TPTs 白天在植物叶绿体中导出碳的过程中发挥着重要作用, 而 XPT 已被证明在中低光和高光条件下运输三磷酸甘油醛, 并在一定程度上补偿了 TPT 功能的丧失^[9, 19], 因此植物中固定碳输出的途径是相互合作的, 涉及使用各种糖、糖磷酸和三磷酸甘油醛的转运蛋白, 而干旱胁迫可能对碳同化代谢途径产生影响, 从而调控磷酸丙糖转运体的表达。

本研究从甘蔗品种 ROC22 中克隆了含有完整 cDNA 序列的 *ShTPT* 基因, 对其编码的氨基酸序列进行生物信息学分析发现, *ShTPT* 蛋白具有 1 个 TPT 结构域, 具有植物 TPT 家族特有的典型保守区域。*ShTPT* 的亚细胞定位结果也显示此蛋白定位在叶绿体, 在叶片中表达高, 此与其他作物的研究结果一致, 可能能够快速响应非生物胁迫^[20-21]。干旱胁迫降低了光合速率, 同时卡尔文循环相关基因下调, 碳的同化效率下降, 参与碳水化合物代谢的干旱响应基因 *HxK*、*FK*、*SuT*、*GPT*、*FBPA*、*SuS*、*SPP*、*PFP* 均发生显著的变化^[22-24], 碳同化的减少将减少从叶绿体到细胞质的三磷酸盐的输出, 而在睡茄 (*Withania somnifera*) 中磷酸丙糖转运体的基因在干旱胁迫早期和后期的叶片中显著下调。这表明在干旱胁迫下, 对三磷酸盐输出的需求减少^[21]。而本研究中发现, 干旱胁迫后磷酸丙糖转运体基因呈现先升后降的趋势, 和其他研究有些不同。甘蔗为异源同源多倍体, 相同的基因家族可能存在协同机制, 相同的功能蛋白不同的基因表达存在差异, 在玉米 (*Zea mays*) 的干旱处理磷酸丙糖转运体基因表达也出现不一致的趋势^[20], 另外甘蔗为叶片淀粉含量较低的单子叶植物, 不同物种磷酸丙糖转运体功能可能会体现不同的差异性, 如水稻中磷酸丙糖转运体突变能够造就表型的巨大变

化, 而在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中没有观测到此变化^[4, 25]。以上结果可以推测甘蔗 *ShTPT* 可能参与甘蔗干旱和盐胁迫应答, 而其作用机制有可能有其特异性, 下一步对其功能的详细解析, 将来可作为甘蔗抗旱性工程的候选新基因。

本研究在甘蔗中克隆 *ShTPT* 基因, 对其基因序列及对应蛋白结构进行解析, 并对其在甘蔗不同组织部位中的表达以及干旱条件下的表达模式进行探究, 为后续甘蔗高产抗逆育种提供参考。

参考文献

- [1] BASSHAM J A. Photosynthetic carbon metabolism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971, 68(11): 2877-2882.
- [2] FLÜGGE U I, WEBER A, FISCHER K, LOTSPEICH F, ECKERSKORN C, WAEGEMANN K, SOLL J. The major chloroplast envelope polypeptide is the phosphate translocator and not the protein import receptor[J]. Nature, 1991, 353(6342): 364-367.
- [3] FLÜGGE U I, FISCHER K, GROSS A, SEBALD W, LOTSPEICH F, ECKERSKORN C. The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts[J]. The EMBO Journal, 1989, 8(1): 39-46.
- [4] LEE S K, EOM J S, VOLL L M, PRASCH C M, PARK Y I, HAHN T R, HA S H, AN G, JEON J S. Analysis of a triose phosphate/phosphate translocator-deficient mutant reveals a limited capacity for starch synthesis in rice leaves[J]. Molecular Plant, 2014, 7(11): 1705-1708.
- [5] FLÜGGE U I, HÄUSLER R E, LUDEWIG F, FISCHER K. Functional genomics of phosphate antiport systems of plastids[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118(4): 475-482.
- [6] WEBER A P M, LINKA N. Connecting the plastid: transporters of the plastid envelope and their role in linking plastidial with cytosolic metabolism[J]. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62(1): 53.
- [7] BOCKWOLDT M, HEILAND I, FISCHER K. The evolution of the plastid phosphate translocator family[J]. Planta, 2019, 250(1): 245-261.
- [8] FISCHER K, KAMMERER B, GUTENSOHN M, ARBINGER B, WEBER A, HÄUSLER R E, FLÜGGE U I. A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter[J]. Plant Cell,

- 1997, 9(3): 453-462.
- [9] EICKS M, MAURINO V, KNAPPE S, FLÜGGE U I, FISCHER K. The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants[J]. *Plant Physiology*, 2002, 128(2): 512-522.
- [10] WEBER A P M, BRÄUTIGAM A. The role of membrane transport in metabolic engineering of plant primary metabolism[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24: 256-262.
- [11] WANG Y, LONG S P, ZHU X G. Elements required for an efficient NADP-malic enzyme type C4 photosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(4): 2231-2246.
- [12] RIESMEIER J W, FLÜGGE U I, SCHULZ B, HEINEKE D, HELDT H W, WILLMITZER L, FROMMER W B. Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90(13): 6160-6164.
- [13] HÄUSLER R E, SCHLIEBEN N H, SCHULZ B, FLÜGGE U I. Compensation of decreased triose phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco[J]. *Planta*, 1998, 204(3): 366-376.
- [14] WALTERS R G, IBRAHIM D G, HORTON P, KRUGER N J. A mutant of *Arabidopsis* lacking the triose-phosphate/phosphate translocator reveals metabolic regulation of starch breakdown in the light[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 891-906.
- [15] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [16] NIITTYLÄ T, MESSERLI G, TREVISAN M, CHEN J, SMITH A M, ZEEMAN S C. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves[J]. *Science*, 2004, 303(5654): 87-89.
- [17] CHO M H, LIM H, SHIN D H, JEON J S, BHOO S H, PARK Y I, HAHN T R. Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*[J]. *New Phytologist*, 2011, 190(1): 101-112.
- [18] HUANG W, KRISHNAN A, PLETT A, MEAGHER M, LINKA N, WANG Y, REN B, FINDINIER J, REDEKOP P, FAKHIMI N, KIM R G, KARNIS D A, BOYLE N, POSEWITZ M C, GROSSMAN A R. *Chlamydomonas* mutants lacking chloroplast TRIOSE PHOSPHATE TRANSPORTER3 are metabolically compromised and light sensitive[J]. *Plant Cell*, 2023, 35(7): 2592-2614.
- [19] HILGERS E J A, STAEHR P, FLÜGGE U I, HÄUSLER R V E. The xylulose 5-phosphate/phosphate translocator supports triose phosphate, but not phosphoenolpyruvate transport across the inner envelope membrane of plastids in *Arabidopsis thaliana* mutant plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1461.
- [20] ZHANG Q, LIU H, WU X, WANG W. Identification of drought tolerant mechanisms in a drought-tolerant maize mutant based on physiological, biochemical and transcriptomic analyses[J]. *Nature Public Health Emergency Collection*, 2020, 20(1): 315.
- [21] SINGH R, GUPTA P, KHAN F, SINGH S K, MISHRA T, KUMAR A, DHAWAN S S, SHIRKE P A. Modulations in primary and secondary metabolic pathways and adjustment in physiological behaviour of *Withania somnifera* under drought stress[J]. *Plant Science*, 2018, 272: 42-54.
- [22] XUE G P, MCINTYRE C L, GLASSOP D, SHORTER R. Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(3): 197-214.
- [23] VALENTINA T N Z, OZTURK H J, BOHNERT R T. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(2): 229-240.
- [24] WANG J P, BUGHRARA S S. Monitoring of gene expression profiles and identification of candidate genes involved in drought responses in *Festuca mairei*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2007, 277: 571-587.
- [25] ZIRNGIBL M E, ARAGUIRANG G E, KITASHOVA A, JAHNKE K, ROLKA T, KÜHN C, NÄGELE T, RICHTER A S. Triose phosphate export from chloroplasts and cellular sugar content regulate anthocyanin biosynthesis during high light acclimation[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(1): 100423.