

油莎豆 *CePIP2;1* 的克隆、亚细胞定位与表达分析

邹 智, 郑玉皎, 常丽丽, 赵永国

热带作物生物育种全国重点实验室/中国热带农业科学院热带生物技术研究所/中国热带农业科学院三亚研究院, 海南海口 571101

摘 要: 油莎豆是一种在块茎中高水平积累油脂的草本油料作物, 其未成熟块茎的含水量高达 85%, 水分平衡对于块茎的发育与代谢至关重要。质膜内在蛋白 (PIP) 是介导细胞间水分跨膜运输的主要通道。本研究报道 1 个块茎高水平表达的 PIP 基因 *CePIP2;1*, 该基因含有 3 个内含子, 预测编码 288 个氨基酸 (aa), 其理论分子量 (MW) 为 30.34 kDa, 等电点 (pI) 为 8.60, 总平均疏水指数 (GRAVY) 为 0.529, 不稳定系数 (II) 为 29.60, 属于典型的稳定、碱性、疏水型蛋白。*CePIP2;1* 含有保守的 MIP 结构域, ar/R 选择性滤器为 F-H-T-R, Froger 位点为 Q-S-A-F-W, 符合高水分转运活性 PIP 的特征。进化分析显示, *CePIP2;1* 与 *OsPIP2;1*、*OsPIP2;2* 和 *OsPIP2;3* 聚在一起, 序列相似性分别为 91.72%、90.31% 和 84.98%, 支持其归为 PIP2 亚类。亚细胞定位分析显示, *CePIP2;1* 定位在烟草叶片的细胞膜。进一步的表达分析显示, 虽然 *CePIP2;1* 为主要的块茎表达 PIP 基因, 但其在叶片、叶鞘、匍匐茎和根等组织中的表达丰度更高, 最高的为叶片, 而在芽尖中的表达丰度与块茎相当; 在块茎的 4 个典型发育时期 ($S_1 \sim S_4$) 中, *CePIP2;1* 基因呈现先升后降的钟形趋势, 表达丰度最高的是 S_2 。这些结果解析油莎豆的水分平衡机制奠定基础。

关键词: 油料作物; 块茎; 水通道蛋白; 质膜内在蛋白; 亚细胞定位; 表达模式

中图分类号: S565.9

文献标志码: A

Cloning, Subcellular Localization, and Expression Analysis of *CePIP2;1*, an Aquaporin Gene from Tigernut (*Cyperus esculentus* L.)

ZOU Zhi, ZHENG Yujiao, CHANG Lili, ZHAO Yongguo

National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Sanya Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Tigernut (*Cyperus esculentus* L.) is an herbaceous oil crop uniquely accumulating a high level of oil in the underground tubers. Water, which accounts for approximately 85% of immature tubers, is essential for tuber development and metabolism. Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) represent the main channel that mediates the efficient water transport across the cell membrane. This study presents the characterization of *CePIP2;1*, a PIP gene highly abundant in tigernut tubers. This gene with three introns was shown to encode 288 amino acids with the theoretical molecular weight of 30.34 kDa, the isoelectric point of 8.60, the grand average of hydropathicity of 0.529, and the instability index of 29.60, implying it's stable, basic and hydrophobic characteristics. The protein was shown to possess one conservative MIP (major intrinsic protein) domain, and presence of the F-H-T-R ar/R selectivity filter and Q-S-A-F-W Froger's positions implies a putatively efficient water transport activity. Phylogenetic analysis revealed that *CePIP2;1* clusters with *OsPIP2;1*, *OsPIP2;2*, and *OsPIP2;3* with the similarities of 91.72%, 90.31% and 84.98%, respectively, supporting its assignment into the PIP2 group of the PIP subfamily. Subcellular localization analysis showed that *CePIP2;1* was localized to the cell membrane of *Nicotiana benthamiana* leaves. Although *CePIP2;1* was characterized as a dominant isoform in tubers, expression analysis indicated that its transcripts were relatively more in leaves, leaf

收稿日期 2023-06-27; 修回日期 2023-07-18

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2024XDNY171); “崖州湾” 菁英人才科技专项 (No. SCKJ-JYRC-2022-66); 国家自然科学基金项目 (No. 31971688)。

作者简介 邹 智 (1982—), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 基因组进化与油脂调控; E-mail: zouzhi2008@126.com。

sheaths, rhizomes, and roots with the most in leaves, in contrast to a comparable level to that in shoot apices. Among four typical stages (S_1 – S_4) of tuber development examined in this study, *CePIP2;1* was shown to exhibit a bell-shaped expression pattern, peaking at S_2 . These results laid a solid foundation for further uncovering the mechanism of water balance in tigernut.

Keywords: oil crop; tuber; aquaporin; plasma membrane intrinsic protein; subcellular localization; expression profile

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.07.005

质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic protein, PIP) 隶属于水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 家族, 其以定位在细胞膜且具有高效的水分转运活性而著称^[1]。除水分外, PIP 还可以转运尿素、硼酸、 CO_2 、 H_2O_2 、 O_2 和 Na^+ ^[2]。在高等植物中, PIP 亚族的成员数介于 2~28 个不等, 可以分为 PIP1 和 PIP2 两个进化小组^[3-9]。目前晶体结构已解析的有菠菜 (*Spinacia oleracea*) PIP2;1、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) PIP2;1 (PIP2 或 PIP2A) 和 AtPIP2;4 (PIP2F)^[10-12]。研究表明, PIP 在细胞膜上以四聚体的形式起作用, 每个单体包含 6 个跨膜螺旋 (TM1~TM6) 和 5 个连环 (LA、LB、LC、LD 和 LE), 其中, LB、LD、N 端和 C 端位于胞质, 而 LA、LC 和 LE 位于胞外; LB 和 LE 折向膜内形成 2 个半螺旋, 半螺旋的顶端含有高度保守的 NPA 基序, 起排斥质子并决定通道大小的作用; 位于 TM2、TM5 和 LE 上的 4 个保守残基 (H2、H5、LE1 和 LE2) 决定了底物特异性, 因 H2 和 LE2 分别为芳香氨基酸和精氨酸而被称为 ar/R 选择性滤器^[10]。此外, FROGER 等^[13]从甘油通道蛋白 (glyceroporin, GLP) 中鉴定到区别于 AQP 的 5 个残基, 即 P1 为芳香氨基酸、P2 为酸性氨基酸、P3 为碱性氨基酸、P4 为脯氨酸以及 P5 为非芳香氨基酸。除转录外, PIP 还受翻译后修饰 (如磷酸化、甲基化、乙酰化、泛素化、糖基化、脱酰胺基)、二聚化、转运、门控 (如二价阳离子、pH、磷酸化) 和蛋白互作等调控^[10-11, 14]。位于 SoPIP2;1 LA 的 C⁶⁹ 为二聚体的形成所必须; 位于 LD 的 H¹⁹³ 和 L¹⁹⁷ 为门控位点; 位于 LB 的 S¹¹⁵、LD 的 S¹⁸⁸ 以及位于 C 端的 S²⁷⁴ 为门控调控磷酸化位点^[10]。

油莎豆 (*Cyperus esculentus* L.), 俗称黄色道格拉斯 (yellow nutsedge)、虎坚果 (tigernut), 是一种隶属于禾本目莎草科的新型草本油料作物^[15-19]。不同于传统油料作物在种子中积累油脂, 油莎豆是迄今唯一已知在块茎中高水平积累

油脂的作物, 这使其成为研究营养组织油脂代谢与调控的模式^[20-23]。块茎起源于地下匍匐茎, 其发育过程可分为起始、膨大和成熟等 3 个主要阶段; 前 2 个阶段的含水量高达 85%, 而在成熟期发生类似种子的脱水过程, 含水量逐渐降低到 45% 以下^[17, 20]。水分平衡对于块茎的发育乃至油脂和淀粉等储藏物的积累至关重要^[20], 因而挖掘块茎中的关键 PIP 基因具有重要的理论意义和应用价值。本研究对 1 个块茎高水平表达的 PIP 基因进行了克隆和初步鉴定, 以期揭示块茎的水分平衡机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

研究所用油莎豆品系为热研 3 号, 植株种植于中国热带农业科学院文昌实验基地^[21], 待块茎起始后分别采集 1 d (起始期, S_1)、20 d (膨大中期, S_2)、25 d (膨大晚期, S_3) 和 35 d (成熟期, S_4) 的样本, 每样本 3 次生物学重复。本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 用小钵种在中国热带农业科学院热带生物技术研究所温室^[24]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和含 pSoup-P19 的农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 感受态均由本实验室制备和保存; 亚细胞定位载体 pNC-HbPIP2;3-RFP^[25]和 pNC-Cam1304-SubN 由本实验室保存; 各类酶、试剂盒和生化试剂购自相应的试剂公司。本研究所用数据库、软件及其网址详见表 1。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与反转录 采用天根植物多糖多酚 RNA 提取试剂盒提取上述块茎的总 RNA, 经浓度和完整性检测合格后用赛默飞反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, 用于后续的基因克隆与表达分析。

1.2.2 基因克隆与载体构建 前期通过分析油莎豆的转录组数据^[21], 发现 1 个在块茎中高水平表

表 1 研究所用数据库、软件及其网址
Tab. 1 Databases, software and related websites used in this study

数据库/软件 Database/software	网址 Website	用途 Application
Araport11	https://www.arabidopsis.org/	拟南芥 <i>PIP</i> 基因下载
RGAP7	http://rice.plantbiology.msu.edu/	水稻 <i>PIP</i> 基因下载
CNGBdb	https://db.cngb.org/search/assembly/CNA0051961/	油莎豆基因组数据下载
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	转录组数据和 <i>PIP</i> 基因下载
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	核苷酸和蛋白序列比对
StringTie	https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/	转录组数据的比对
GSDS2.0	http://gsds.gao-lab.org/	基因结构展示
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	蛋白理化特性分析
WoLF PSORT	https://www.genscript.com/wolf-psort.html	亚细胞定位预测
CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd	保守结构域预测
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html	二级结构预测
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/interactive	3D 结构预测
MEGA6.06	https://mega6.software.informer.com/	多序列比对和进化树的构建

达的 *PIP* 基因，根据序列特征和进化关系将其命名为 *CePIP2;1*。为克隆该基因，采用 Primer Premier 5.0 设计如表 2 所示的引物对，首先用 *CePIP2;1F/R* 扩增其 1127 bp 的全长 cDNA，接着以稀释 100 倍的首轮 PCR 产物作为模板、*CePIP2;1HF/R* 为引物扩增 907 bp 的全长编码区（CDS）。反应体系：模板 0.5 μL、引物各 0.5 μL、PrimeSTAR Max DNA Polymerase 12.5 μL，加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 扩增程序：95 ℃预变性 1 min；94 ℃变性 30 s、50 ℃退火 2 min，35 个循环；72 ℃延伸 5 min。亚细胞定位载体 pNC-Cam1304-*CePIP2;1* 的构建参照 NC 克隆试剂盒说明书。

表 2 研究所用引物
Tab. 2 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')
CePIP2;1F	CACACATCACTCTTGCTCT
CePIP2;1R	GCGAGCAACAGAGACTACTA
CePIP2;1HF	AGTGGTCTCTGTCCAGTCCTATGTCCAAG GAGGTGAGTGAGG
CePIP2;1HR	GGTCTCAGCAGACCACAAGTTTACGCATT GCTGCGGAAC
CeUCE2Fq	ATCATCAAGGAGACCCAGCG
CeUCE2Rq	CTTAGGGGCAGCCATAGGA
CeTIP41Fq	CGGCGAGCGACCTGAA
CeTIP41Rq	CAGCGGCAGAGTTGAGAATG
CePIP2;1Fq	GGTGCCATTGCGGTGTC
CePIP2;1Rq	CCCTTGAGTAGCCGTGTGC

1.2.3 基因和蛋白结构分析 采用 BLASTn 将基因的转录本序列比对到基因组，然后用 GSDS 2.0 软件展示基因结构。分别采用 Protparam、CDD、SOPMA、SWISS-MODEL、WoLF PSORT 等软件分析 *CePIP2;1* 编码蛋白的理化特性、保守结构域、二级结构、3D 结构和亚细胞定位。跨膜螺旋和半螺旋区及保守氨基酸基于与 *SoPIP2;1*、*AtPIP2;1* 和 *AtPIP2;4* 的序列比对进行确定。

1.2.4 多序列比对和进化分析 多序列比对采用 MUSCLE 软件，选用默认参数；进化树的构建采用 MEGA 6.06 软件，选用最大似然法，1000 次重复，其他用默认参数。

1.2.5 亚细胞定位分析 以先前报道的 pNC-*HbPIP2;3-RFP*^[25]为阳性对照，参照文献[24]进行农杆菌的转化、培养及浸染液的制备。将含 pNC-Cam1304-*CePIP2;1* 的实验组与阳性对照菌液等量混合后采用微量注射器注射 4 周龄的烟草叶片，转化 48 h 后用激光共聚焦显微镜 Zeiss LMS880 观察荧光在细胞内的位置。

1.2.6 基因表达分析 为分析基因的组织特异性，参照文献[23]，采用 StringTie（v2.2.0）软件将不同组织的转录组数据（PRJNA703731）比对到基因组，基因的相对表达丰度用 FKPM（fragments per kilobase of exon per million fragments mapped）法进行均一化。荧光定量分析以先前报道的 *CeUCE2* 和 *CeTIP41*^[18]作为内参基因，利用引物对 *CePIP2;1Fq/Rq* 进行 qRT-PCR 分

析，数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法，统计分析采用 SPSS 20 软件，采用邓肯法进行单因素多样本间差异显著性方差分析。

2 结果与分析

2.1 *CePIP2;1* 基因的克隆与序列分析

经过 2 轮巢式 PCR 扩增，成功分离到 *CePIP2;1* 的 CDS 序列，并采用无缝克隆技术将其克隆到亚细胞定位载体，构建重组质粒 *pNC-Cam1304-CePIP2;1*。通过将克隆到的序列比对到基因组，发现其与 *CePIP2;1* 基因的对应区域完成一致；*CePIP2;1* 位于 Scaffold9 正向链的 879960~884243 位，基于转录组的转录区界定显示基因全长为 5752 bp，包含 3 个内含子，其长度分别为 806、1745、866 bp；5'和 3' UTR 分别为 119、1349 bp（图 1A）。

序列分析显示，*CePIP2;1* 编码 288 个氨基酸（表 3），其中，A 和 G 的含量最高，分别占 12.50% 和 12.20%，这与 *SoPIP2;1*、*AtPIP2;1* 和 *AtPIP2;4* 类似（图 1B）；*CePIP2;1* 的理论分子量（MW）为 30.34 kDa、等电点（pI）为 8.60、脂肪族指数（AI）为 103.02、总平均疏水指数（GRAVY）为 0.529、不稳定系数（II）为 29.60，表明其为稳定的碱性疏水型蛋白；CDD 分析显示蛋白的 32~269 位为 MIP 结构域（图 1C），略长于 *SoPIP2;1*、*AtPIP2;1* 和 *AtPIP2;4*（表 3）；*CePIP2;1* 与 *SoPIP2;1*、*AtPIP2;1*、*AtPIP2;4* 的序列相似性分别为 84.88%、84.14%、84.35%，其结构包括 TM1~TM6 等 6 个典型的跨膜螺旋、HB 和 HE 2 个半螺旋、2 个典型的 NPA 基序、多个磷酸化位点（S¹⁰⁵、S¹²⁴、S²⁸³ 和 S²⁸⁶）；ar/R 选择性过滤器（F⁹⁰-H²¹⁹-T²²⁸-R²³⁴）和对应于 *SoPIP2;1* C⁶⁹ 的二聚化位点、S¹¹⁵ 的磷酸化位点及 H¹⁹³ 和 L¹⁹⁷ 门控位点在所比较的 4 个蛋白中完全一致；在 5 个 Froger 位点中，仅 P1 存在差异，*SoPIP2;1* 为 M¹⁴¹-S²²⁶-A²³⁰-F²⁴⁵-W²⁴⁶，而 *CePIP2;1* 为 Q¹⁵⁰-

S²³⁵-A²³⁹-F²⁵⁴-W²⁵⁵（图 1D）。

为揭示 *CePIP2;1* 的进化关系，将其与 *SoPIP2;1* 及水稻、拟南芥中的所有 PIP 构建如图 1E 所示的进化树。多数成员按物种聚在一起，暗示相关成员在物种分化之后产生。*CePIP2;1* 与 *OsPIP2;1*、*OsPIP2;2*、*OsPIP2;3* 聚在一起，其序列相似性分别为 91.72%、90.31%和 84.98%。二级结构预测显示，*CePIP2;1* 以无规则卷曲（45.49%）和 α -螺旋为主（29.51%），其次是延伸链（20.83%），最低的为 β -转角（4.17%），与 *SoPIP2;1*、*AtPIP2;1* 和 *AtPIP2;4* 类似（表 3）。基于 *SoPIP2;1* 的同源建模显示，*CePIP2;1* 可以形成同源四聚体（图 1F）。

2.2 亚细胞定位分析

与其他 PIP 蛋白类似^[24-25]，WoLF PSORT 在线软件预测显示 *CePIP2;1* 定位在细胞膜。为验证该结果，本研究以先前报道的 *HbPIP2;3*^[25]作为阳性对照，将含 *pNC-HbPIP2;3-RFP* 和 *pNC-Cam1304-CePIP2;1* 的农杆菌工程菌等量混合后微量注射烟草叶片。共聚焦观察结果显示，GFP-*CePIP2;1* 的绿色荧光信号出现在细胞膜，并与 *HbPIP2;3-RFP* 的红色荧光信号高度重合，这表明 *CePIP2;1* 确实是定位在细胞膜（图 2）。

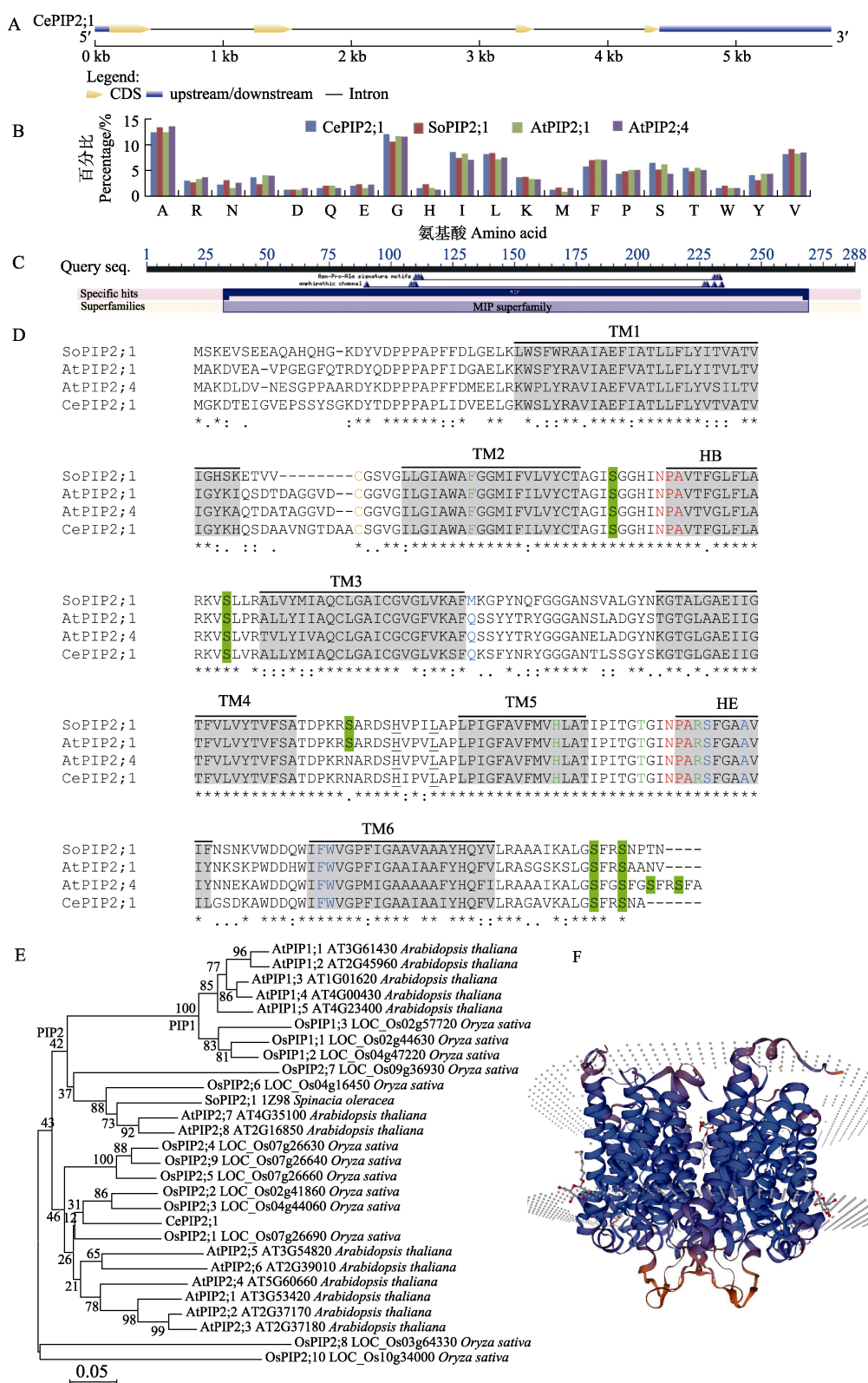
2.3 基因表达分析

为揭示 *CePIP2;1* 基因表达的组织特异性，利用转录组数据分析其在幼嫩叶片、成熟叶片、叶鞘、根、匍匐茎、芽尖和块茎等主要组织中的表达模式。结果显示，*CePIP2;1* 在这些组织中均高水平表达，丰度最高的是叶片（幼嫩和成熟叶片差异不显著），最低的为芽尖，其与块茎丰度相当（图 3A）。

为揭示基因表达与不同发育时期块茎含水量之间的相关性，挑选自块茎形成起始期（S₁）、膨大中期（S₂）、膨大晚期（S₃）和成熟期（S₄）等 4 个典型时期，其含水量分别为 83.7%、86.0%、74.8%和 48.3%^[17]。qRT-PCR 分析结果如图 3B 所示，*CePIP2;1* 基因呈先升后降的趋势，峰值出现

表 3 *CePIP2;1* 与 *SoPIP2;1*、*AtPIP2;1*、*AtPIP2;4* 理化特性和二级结构比较
Tab. 3 Comparison of physicochemical properties and secondary structure of *CePIP2;1*, *SoPIP2;1*, *AtPIP2;1* and *AtPIP2;4*

蛋白名称 Protein name	AA	MW/kDa	pI	GRAVY	AI	II	MIP	α -螺旋 Alpha helix/%	延伸链 Extended strand/%	β -转角 Beta turn/%	无规则卷曲 Random coil/%
<i>CePIP2;1</i>	288	30.34	8.60	0.529	103.02	29.60	32~269	29.51	20.83	4.17	45.49
<i>SoPIP2;1</i>	281	29.90	9.03	0.579	102.81	27.81	31~260	36.65	18.15	2.14	43.06
<i>AtPIP2;1</i>	287	30.47	8.60	0.506	97.94	30.27	30~266	40.42	16.72	4.88	37.98
<i>AtPIP2;4</i>	291	30.95	8.22	0.490	96.29	29.29	30~266	30.24	20.96	5.15	43.64



A: *CePIP2;1* 的基因结构; B: *CePIP2;1* 与 *SoPIP2;1*、*AtPIP2;1*、*AtPIP2;4* 的氨基酸组成比较; C: *CePIP2;1* 的保守结构域预测; D: *CePIP2;1* 与 *SoPIP2;1*、*AtPIP2;1*、*AtPIP2;4* 的多序列比对; E: *CePIP2;1* 与 *SoPIP2;1*、水稻、拟南芥中的 PIP 蛋白的进化分析; F: *CePIP2;1* 的 3D 结构预测。

A: Gene structure of *CePIP2;1*; B: Comparison of amino acid composition of *CePIP2;1*, *SoPIP2;1*, *AtPIP2;1* and *AtPIP2;4*; C: Predicted conservative domain of *CePIP2;1*; D: Multiple sequence alignment of *CePIP2;1*, *SoPIP2;1*, *AtPIP2;1* and *AtPIP2;4*; E: Phylogenetic analysis of *CePIP2;1*, *SoPIP2;1*, and PIPs present in *O. sativa* and *A. thaliana*; F: Predicted 3D structure for *CePIP2;1*.

图 1 *CePIP2;1* 的生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of *CePIP2;1*

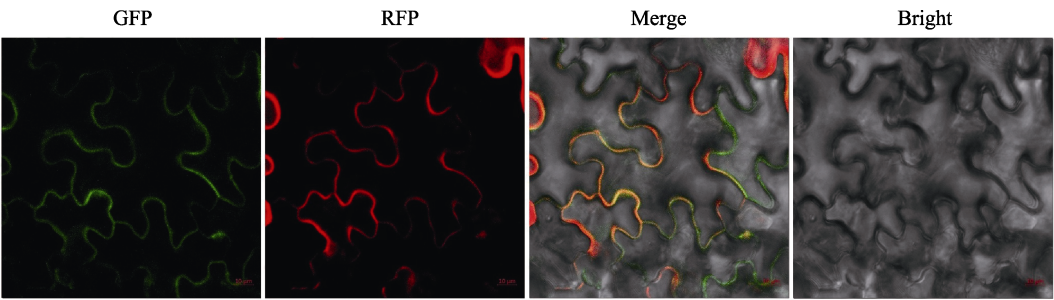
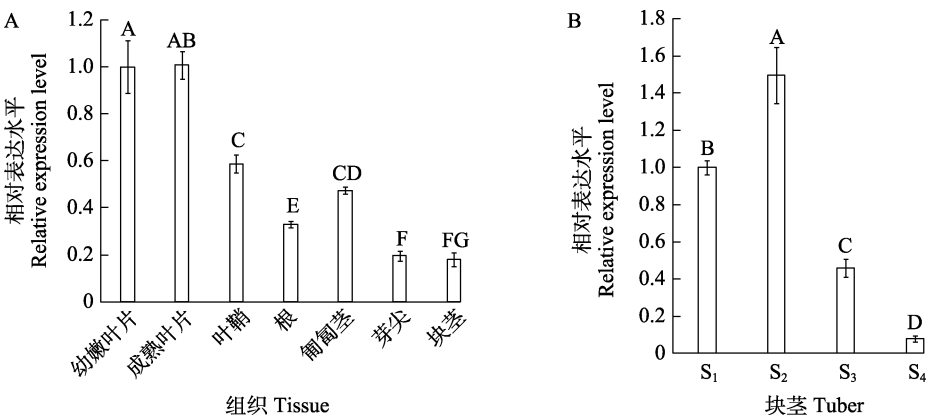


图 2 *CePIP2;1* 的亚细胞定位
Fig. 2 Subcellular localization analysis of *CePIP2;1*



不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。
Different capital letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$).

图 3 *CePIP2;1* 的表达模式
Fig. 3 Expression profiles of *CePIP2;1*

在 S₂, 约为 S₁ 的 1.5 倍; 丰度最低的是 S₄, 仅为 S₁ 的 8%; S₃ 仅为 S₂ 的 30%。

3 讨论

水是生命的主要存在形式, 广泛参与体内的各项生理生化反应, 为植物的生长发育和代谢活动所必需^[2]。研究表明, 植物细胞间水分的跨膜运输主要由细胞膜定位的 PIP 介导^[1, 2]。进化分析显示, PIP 高度保守, 仅包含 PIP1 和 PIP2 两个亚类; 虽然他们早在苔藓中就已分化形成, 但二者之间的序列相似性一般在 70% 以上^[3-9, 26]。PIP 通常具有高效的水分转运活性^[2]。虽然有研究表明 PIP1 亚类在酵母和蟾蜍卵母细胞等体外体系中无活性或活性很低, 主要归因于其自身不能有效定位到细胞膜^[27-28]。在植物体内, PIP2 的存在可以介导 PIP1 的有效定位^[27-29]。

在前期的研究中, 本团队系统分析了块茎的发育特征及发育过程中的含水动力学, 发现在我国海南地区块茎的整个发育期约为 35 d, 其中, 前、中期伴随着细胞的快速分裂和扩张, 水分含

量一直维持在 85%, 而后期随着块茎的成熟, 水分含量逐步降低, 25 d 和 35 d 分别为 74.8% 和 48.3%^[17], 发生类似种子的脱水过程^[17, 30]。虽然如此, 至今对油莎豆块茎发育的水分平衡机制知之甚少。

本研究首次报道了 1 个油莎豆 PIP2 基因 *CePIP2;1*。与大多数 PIP 基因类似^[3-9], *CePIP2;1* 含有 3 个内含子; 其编码蛋白包含 AQP 家族特有的 MIP 结构域, 分子量为 30.76 kDa, 与先前的报道相似^[5-9, 25-26]。*CePIP2;1* 具有较高的脂肪族指数 (95.28), 且总平均疏水指数>0、等电点>7.0、不稳定系数为<40, 属于典型的稳定、碱性、疏水型蛋白。在水稻的 13 个 PIP 蛋白中, *CePIP2;1* 与 *OsPIP2;1* 的序列相似性最高 (91.72%), 略高于与 *OsPIP2;2* 的 90.31%, 但远高于与 *OsPIP1* 的 72.19%~74.59%, 这与本研究的结果一致, 支持其划归为 PIP2 亚类。此外, *CePIP2;1* 具有 *SoPIP2;1*^[10]、*AtPIP2;1*^[11] 和 *AtPIP2;4*^[12] 相似的结构特征, 其中包括典型的 NPA 基序、F-H-T-R ar/R 选择性滤器、Q-S-A-F-W Froger 位点、位于 LA

高度保守的 C 残基、可形成四聚体, 并且被实验证实定位在烟草叶片的细胞膜, 这些均表明 *CePIP2;1* 可能具有高效的水分转运活性。虽然 *CePIP2;1* 首先是作为 1 个块茎高丰度 *PIP* 基因而被关注, 但组织特异性分析显示它在其他组织中的表达丰度更高, 暗示其功能的重要性。在块茎的发育过程中, *CePIP2;1* 呈现先升后降的表达模式, 即随着细胞的快速分裂和扩张, *CePIP2;1* 的表达迅速上调, 至膨大中期达到峰值, 而在成熟过程中逐渐下调, 这与相应时期的水分含量趋势基本一致^[17]。虽然如此, *CePIP2;1* 具体是如何调控块茎及其他组织的水分平衡还有待深入研究, 比如门控调控、翻译后修饰、蛋白互作模式以及调控其转录的上游转录因子。

综上, 本研究完成了块茎高水平表达 *CePIP2;1* 基因的克隆与初步鉴定, 明确了其基因结构、序列特征、进化关系、亚细胞定位和表达特性, 这为进一步的功能分析及油莎豆遗传改良奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] DANIELS M J, MIRKOV T E, CHRISPEELS M J. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(4): 1325-1333.
- [2] TYERMAN S D, MCGAUGHEY S A, QIU J, YOOL A J, BYRT C S. Adaptable and multifunctional ion-conducting aquaporins[J]. *Annual Review Plant Biology*, 2021, 72: 703-736.
- [3] JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, GUSTAVSSON S, SJÖVALL S, FRAYSSE L, WEIG A R, KJELLBOM P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(4): 1358-1369.
- [4] SAKURAI J, ISHIKAWA F, YAMAGUCHI T, UEMURA M, MAESHIMA M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(9): 1568-1577.
- [5] ZOU Z, GONG J, AN F, XIE G, WANG J, MO Y, YANG L. Genome-wide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethephon stimulation in the laticifer, a rubber-producing tissue[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 1001.
- [6] ZOU Z, GONG J, HUANG Q, MO Y Y, YANG L F, XIE G S. Gene structures, evolution, classification and expression profiles of the aquaporin gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0141022.
- [7] ZOU Z, YANG L F, GONG J, MO Y Y, WANG J K, CAO J H, AN F, XIE G S. Genome-wide identification of *Jatropha curcas* aquaporin genes and the comparative analysis provides insights into the gene family expansion and evolution in *Hevea brasiliensis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 395.
- [8] ZOU Z, YANG J H. Genome-wide comparison reveals divergence of cassava and rubber aquaporin family genes after the recent whole-genome duplication[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20: 380.
- [9] ZOU Z, ZHENG Y J, XIE Z N. Analysis of *Carica papaya* informs lineage-specific evolution of the aquaporin (AQP) family in Brassicales[J]. *Plants (Basel)*, 2023, 12(22): 3847.
- [10] TORNROTH-HORSEFIELD S, WANG Y, HEDFALK K, JOHANSON U, KARLSSON M, TAJKHORSHID E, NEUTZE R, KJELLBOM P. Structural mechanism of plant aquaporin gating[J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 688-694.
- [11] VERDOUCQ L, GRONDIN A, MAUREL C. Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons[J]. *The Biochemical Journal*, 2008, 415(3): 409-416.
- [12] WANG H, SCHOEBEL S, SCHMITZ F, DONG H, HEDFALK K. Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2020, 1862(2): 183065.
- [13] FROGER A, TALLUR B, THOMAS D, DELAMARCHE C. Prediction of functional residues in water channels and related proteins[J]. *Protein Science*, 1998, 7(6): 1458-1468.
- [14] QIU J, MCGAUGHEY S A, GROSZMANN M, TYERMAN S D, BYRT C S. Phosphorylation influences water and ion channel function of AtPIP2;1[J]. *Plant Cell and Environment*, 2020, 43(10): 2428-2442.
- [15] 肖艳华, 邹智, 赵永国, 郭安平, 张丽. 油莎豆乙酰乳酸合酶基因 *CeALS* 的克隆与分析[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(4): 184-192.
- [16] XIAO Y H, ZOU Z, ZHAO Y G, GUO A P, ZHANG L. Molecular cloning and characterization of an acetolactate synthase gene (*CeALS*) from tigernut (*Cyperus esculentus* L.)[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(4): 184-192. (in Chinese)
- [16] 邹智, 肖艳华, 张丽, 赵永国. 油莎豆 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶基因 *CeEPSPS* 的克隆与分析[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(1): 26-34.
- [16] ZOU Z, XIAO Y H, ZHANG L, ZHAO Y G. Cloning and characterization of *CeEPSPS*, a gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from tigernut (*Cyperus esculentus* L.)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023,

- 44(1): 26-34. (in Chinese)
- [17] ZOU Z, ZHAO Y G, ZHANG L, XIAO Y H, GUO A P. Analysis of *Cyperus esculentus* SMP family genes reveals lineage-specific evolution and seed desiccation-like transcript accumulation during tuber maturation[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 187: 115382.
- [18] ZOU Z, XIAO Y H, ZHANG L, ZHAO Y G. Analysis of *Lhc* family genes reveals development regulation and diurnal fluctuation expression patterns in *Cyperus esculentus*, a Cyperaceae plant[J]. Planta, 2023, 257(3): 59.
- [19] ZOU Z, ZHENG Y J, CHANG L L, ZOU L P, ZHANG L, MIN Y, ZHAO Y G. TIP aquaporins in *Cyperus esculentus*: Genome-wide identification, expression profiles, subcellular localizations, and interaction patterns[J]. BMC Plant Biology, 2024, 24(1): 298.
- [20] TURESSON H, MARTTILA S, GUSTAVSSON K E, HOFVANDER P, OLSSON M E, BÜLOW L, STYMNE S, CARLSSON A S. Characterization of oil and starch accumulation in tubers of *Cyperus esculentus* var. sativus (Cyperaceae): a novel model system to study oil reserves in nonseed tissues[J]. American Journal of Botany, 2010, 97(11): 1884-1893.
- [21] 邹智, 赵永国, 张丽, 孔华, 郭运玲, 郭安平. 基于单分子实时测序的油莎豆全长转录组分析[J]. 中国油料作物学报, 2021, 42(2): 229-235.
- ZOU Z, ZHAO Y G, ZHANG L, KONG H, GUO Y L, GUO A P. Single-molecule real-time (SMRT)-based full-length transcriptome analysis of tigernut (*Cyperus esculentus* L.)[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2021, 43(2): 229-235. (in Chinese)
- [22] 徐硕, 邹智, 肖艳华, 张丽, 孔华, 郭静远, 郭安平. 油莎豆块茎油脂积累相关基因 *CeWRI1* 的克隆与功能分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(5): 923-929.
- XU S, ZOU Z, XIAO Y H, ZHANG L, KONG H, GUO J Y, GUO A P. Cloning and functional characterization of *CeWRI1*, a gene involved in oil accumulation from tigernut (*Cyperus esculentus* L.) tubers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(5): 923-929. (in Chinese)
- [23] ZOU Z, ZHENG Y J, ZHANG Z T, XIAO Y H, XIE Z N, CHANG L L, ZHANG L, ZHAO Y G. Molecular characterization of oleosin genes in *Cyperus esculentus*, a Cyperaceae plant producing oil in underground tubers[J]. Plant Cell Reports, 2023, 42(11): 1791-1808.
- [24] 乔雪莹, 郑玉皎, 阳江华, 曾长英, 邹智. 橡胶树 *HbPIP1;1* 基因的克隆及蛋白的亚细胞定位与多聚化分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(12): 2405-2412.
- QIAO X Y, ZHENG Y J, YANG J H, ZENG C Y, ZOU Z. Gene cloning, subcellular localization and multimerization analysis of *HbPIP1;1* from *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(12): 2405-2412. (in Chinese)
- [25] 邹智, 乔雪莹, 郑玉皎, 阳江华. 橡胶树 *HbPIP2;3* 的亚细胞定位与多聚化分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(3): 443-449.
- ZOU Z, QIAO X Y, ZHENG Y J, YANG J H. Subcellular localization and multimerization analyses of *HbPIP2;3*, an efficient water transporter from *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(3): 443-449. (in Chinese)
- [26] DANIELSON J A, JOHANSON U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8(1): 45.
- [27] ZELAZNY E, MIECIELICA U, BORST J W, HEMMINGA M A, CHAUMONT F. An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins *ZmPIP2;4* and *ZmPIP2;5* to the plasma membrane[J]. Plant Journal, 2009, 57(2): 346-355.
- [28] FETTER K, VAN WILDER V, MOSHELION M, CHAUMONT F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity[J]. The Plant Cell, 2004, 16(1): 215-228.
- [29] ZELAZNY E, BORST J W, MUYLAERT M, BATOKO H, HEMMINGA M A, CHAUMONT F. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(30): 12359-12364.
- [30] NIEMEYER P W, IRISARRI I, SCHOLZ P, SCHMITT K, VALERIUS O, BRAUS G H, HERRFURTH C, FEUSSNER I, SHARMA S, CARLSSON A S, DE VRIES J, HOFVANDER P, ISCHEBECK T. A seed-like proteome in oil-rich tubers[J]. Plant Journal, 2022, 112(2): 518-534.