江西农业大学学报　2024,46(3)　　http://xuebao.jxau.edu.cn
Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis　　https://doi.org/10.3724/aauj.2024051

陈叶丹,赵小艳,黑晶莹,等.筇竹钾离子通道*QtSKOR1*基因的克隆及表达分析[J].江西农业大学学报,2024,46(3):572-581.
CHEN Y D,ZHAO X Y,HEI J Y,et al.Cloning and expression analysis of *QtSKOR1* gene of *Qiongzhuea tumidinoda* potassium ion channel[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2024,46(3):572-581.

筇竹钾离子通道*QtSKOR1*基因的克隆及表达分析

陈叶丹[1],赵小艳[1],黑晶莹[1],王　澍[1,2],芮　蕊[1,2*]

(1.西南林业大学 云南省林下资源保护与利用重点实验室,云南 昆明 650224;2.,西南林业大学 西南山区森林资源保护与利用教育部重点实验室,云南 昆明 650224)

摘要:【目的】外向整流型钾离子通道SKOR(Stelar K+ outward rectifier)家族是参与植物钾离子转运和分配的重要通道,且K^+在植物生理过程和响应非生物胁迫中有决定性作用。旨在研究外向整流型钾离子通道*SKOR*在富含钾元素的筇竹(*Qiongzhuea tumidinoda*)发育及受到盐胁迫过程中的功能。【方法】利用RACE技术从筇竹的幼苗中获得*SKOR*基因并命名为*QtSKOR1*(基因号:MT078984),并对其进行生物信息分析及表达特征分析。【结果】*QtSKOR1*基因开放阅读框(1 923 bp)编码了641个氨基酸。QtSKOR1蛋白存在环核苷酸(cNMP)和锚蛋白重复结构域(ANK)属于Shake亚家族,其相对分子质量为157.27 kD,理论等电点为4.94,含有3个跨膜区但不存在信号肽,属于疏水性蛋白。亚细胞定位分析表明QtSKOR1蛋白主要定位于线粒体(30.4%)和细胞质(26.1%)中。同源分析和进化分析显示,*QtSKOR1*与二穗短柄草(*Brachypodium distachyum*)和玉米(*Zea mays*)的同源性较高,分别为89.06%和87.91%。qPCR结果显示,*QtSKOR1*基因在筇竹所有组织中均有表达,且表达量从高到低依次为叶、根、茎、笋。与对照相比,随着钾胁迫时间的增加,*QtSKOR1*的表达量在根中显著增加,而在茎叶中显著降低。随着钠胁迫时间的增加,*QtSKOR1*的表达量在根茎叶中均呈下降趋势。【结论】*QtSKOR1*基因属于Shake亚家族,均参与了筇竹各个组织特别是叶的钾运输。同时,在钾胁迫下*QtSKOR1*基因在根中发挥了积极作用。

关键词:筇竹;K^+通道蛋白;*QtSKOR1*基因;基因克隆;表达分析
中图分类号:S795　　**文献标志码:**A　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID):**
文章编号:1000-2286(2024)03-0572-10

Cloning and expression analysis of *QtSKOR1* gene of *Qiongzhuea tumidinoda* potassium ion channel

CHEN Yedan[1],ZHAO Xiaoyan[1],HEI Jingying[1],WANG Shu[1,2],RUI Rui[1,2*]

(1.Key Laboratory of In-forest Resource Protection and Utilization in Yunnan Province,Southwest Forestry University,Kunming 650224,China;2.Education Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China,Southwest Forestry University,Kunming 650224,China)

收稿日期:2023-10-26　　**修回日期:**2024-01-08
基金项目:云南省万人计划青年拔尖人才项目(YNWR-QNBJ-2019-028)
Project supported by the Yunnan Ten Thousand Plan Youth Top Talent Project(YNWR-QNBJ-2019-028)
作者简介:陈叶丹,硕士生,orcid.org/0009-0001-4106-0857,1336057093@qq.com;*通信作者:芮蕊,助理研究员,主要从事园林植物研究,orcid.org/0009-0009-8455-7941,61353561@qq.com。
©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND协议

Abstract: [**Objective**] The *SKOR* (Stelar K^+ outward rectifier) family of potassium channels is an important channel involved in the transport and distribution of potassium ions. Furthermore, K^+ plays a decisive role in plant physiological process and response to abiotic stress. The aim is to investigate the function of outward rectifying potassium ion channel *SKOR* in the development and salt stress process of potassium rich *Q. tumidinoda*. [**Method**] *SKOR* gene was cloned from the seedlings of *Q. tumidinoda* by RACE technique and called *QtSKOR1* (gene number: MT078984). Then analyzed its biological information and gene expression characteristics. [**Result**] The results showed that the open reading frame (1 923 bp) of the *QtSKOR1* gene encodes 641 amino acids. QtSKOR1 protein has cNMP and ankyloprotein repeat domain (ANK), belonging to Shake subfamily, and its relative molecular weight is 157.27 kD. The theoretical isoelectric point is 4.94, it contains 3 transmembrane regions, but there is no signal peptide, and it is a hydrophobic protein. In addition, Subcellular localization analysis showed that QtSKOR1 protein mainly existed in mitochondria (30.4%) and cytoplasm (26.1%). Homology and evolutionary analyses showed that *QtSKOR1* had high homology with *Brachypodium distachyum* and *Zea mays*, with 89.06% and 87.91%, respectively. The qPCR results showed that the *QtSKOR1* gene was expressed in all tissues of *Q. tumidinoda*, and the expression levels was in the order of leaf>root>stem>shoot from high to low. Compared with the control, with the increase of potassium stress time, the expression level of *QtSKOR1* was significantly increased in roots and significantly decreased in the stems and leaves. With the increase of sodium stress time, the expression level of *QtSKOR1* showed a decreasing trend in roots, stems, and leaves. [**Conclusion**] The *QtSKOR1* gene belongs to the Shake subfamily and is involved in potassium transport in various tissues of *Q. tumidinoda*, especially in leaves. At the same time, the *QtSKOR1* gene played an active role in root under potassium stress.

Keywords: *Qiongzhuea tumidinoda*; K^+ channel protein; *QtSKOR1* gene; gene cloning; expression analysis

【研究意义】筇竹(*Qiongzhuea tumidinoda*)又叫罗汉竹,是禾本科筇竹属的一种植物。具有较高的经济、生态和观赏价值,是我国西南地区特有的中小型三级重点保护竹种[1-2]。钾元素是衡量竹笋营养成分的重要指标之一,且其含量是其他微量元素含量的100~1 000倍。研究表明筇竹中K^+含量为6 877.76 mg/kg,在竹类植物中最高[3-4]。同时,K^+在植物的生理过程(植物细胞伸长、植物体内长距离运输、光合作用、渗透调节和酶激活)和响应非生物胁迫(盐胁迫、营养胁迫和干旱胁迫)中起着决定性的作用[5-8]。植物对K^+的吸收和运输主要由定位在质膜上的K^+转运蛋白或钾离子通道完成的,K^+不但可以提高植物的耐受性和抗性[9-11],而且K^+的缺失会导致农作物产量的下降和种子品质的降低[12],因此,研究钾离子通道在参与植物钾运输和胁迫条件下的响应是十分必要的。【前人研究进展】K^+通道主要包含3类:Shaker型K^+整流通道、两孔K^+通道(tandem-pore K^+ channel, TPK)和两孔通道(two-pore channel, TPC)[13-14]。其中,Shaker型K^+整流通道中的4个亚群是参与植物K^+转运和分配的重要通道[15-16]。该家族中的外向整流通道以*AtSKOR*[9]和*AtGORK*[17]为代表基因,主要发挥将K^+由胞内排至胞外的作用[18-19]。外向整流K^+通道基因*SKOR*首次在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中被克隆出来[9],随后在不同植物中鉴定到更多的*SKOR*基因,如在小花碱茅(*Puccinellia tenuiflora*)[20]、木豆(*Cajanus cajan*)[21]和绿豆(*Vigna radiata*)[22]的根中分别鉴定出*PtSKOR*、*CcSKOR*和*VrSKOR*基因,也在枸杞(*Lycium barbarum*)[23]和黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)[24]的根和叶中分别鉴定出*LbSKOR*和*LrSKOR*基因和在紫柳(*Salix purpurea*)的根、叶、雌蕊和花瓣均检测出*SpuSKOR*基因[25]。*SKOR*基因在不同植物的不同组织及不同胁迫条件下表达存在差异。唐高红等[26]发现*OsSKOR.1*和*OsSKOR.2*基因在水稻根部的表达显著高于叶片和叶鞘,同样在山新杨*PdbSKOR*[27]、烟草*NtSKOR1*[28]、甜瓜*CmSKOR*[29]、小花碱茅*PtSKOR*[20]和葡萄*VviSKOR*[15]等植物中也发现基因在植株根部的表达量高于其他组织。此外,在钾胁迫条件下,随着胁迫时间的增加,烟草*NtSKOR1*基因和山新杨*PdbSKOR*基因呈先降低后升高的表达模式[27-28],而小花茅碱根部*PtSKOR*[20]基因呈逐渐下调的趋势。此外,在盐胁迫条件下,随着胁迫时间的增加,甜菜*BvSKOR*基因的表达量呈倒U型的变化趋势[30],长穗偃麦草*EeS-*

KOR[31]和黑果枸杞*LrSKOR*[32]基因的表达量则呈现V型的趋势。由此可见，*SKOR*基因的表达受钾或盐胁迫的影响，且与植物种类和胁迫时长相关[18-19,33]。

【本研究切入点】前人研究表明，*SKOR*属于Shaker家族，该家族K^+通道对植物吸收和转运K^+有重要作用[30]，且该基因表达量的上升能够增强植物的盐耐性[34]。关于K^+运输*SKOR*基因在筇竹耐盐中是否起重要作用的研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】本研究以筇竹实生苗为研究对象，克隆分析*QtSKOR1*基因，并在非生物胁迫下（NaCl、KCl）研究分析筇竹3个组织（根，茎，叶）的表达特征，为*QtSKOR1*在调节K^+运输和筛选鉴定耐盐性更强的优良筇竹提供理论基础和科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料和试验处理

以西南林业大学后山1年生的筇竹实生苗为试验材料，选取长势一致、无病虫害的3株筇竹植株。分别选取筇竹的根、茎、叶等器官，混匀后用液氮速冻，存放于-80 ℃冰箱用于后续提取RNA。根据课题组前期试验结果，设置钾、钠胁迫处理：采用1/2 Hoagland营养液对筇竹实生苗进行培养2周（2天更换1次营养液），再对实生苗分别进行处理（在1/2 Hoagland培养液中添加50 mmol/L KCl溶液和500 mmol/L NaCl溶液）[3]。在处理0，12，24 h时分别将取植株的根、茎、叶保存于-80 ℃冰箱用于后续荧光定量分析。

1.2 筇竹总RNA的提取与逆转录cDNA的合成

称取0.5 g的组织样品用液氮充分研磨，参照RNA植物提取试剂盒（OMEGA）的说明书提取总RNA。经质量检测完整的RNA利用试剂盒（Takara）合成第一链cDNA。反应体系和步骤如下：1 μL Oligo dT primer、1 μL dNTP Mixture、4.0 μL模板RNA，然后用ddH_2O补足至20 μL，将PCR管置于PCR仪中65 ℃孵育5 min后，迅速在冰上冷却，随后在PCR管中再次配制20 μL的反应体系：10 μL预混液，4.0 μL 5× Prime Script Ⅱ Buffer，0.5 μL RNase Inhibitor、4.0 μL Prime Script Ⅱ Rtase和1.5 μL RNase free H_2O，然后进行反转录、冰浴，最后置于-20 ℃冰箱备用。

1.3 筇竹QtSKOR1基因扩增与克隆

根据Genebank中已知拟南芥以及禾本科植物水稻、玉米、小麦等物种的*SKOR*基因序列，利用VectorNTI进行序列分析比对，设计特异性引物，引物序列如表1所示。通过引物*QtSKOR1*-F和引物*QtSKOR1*-R扩增cDNA片段，反应体系共25 μL：1 μL cDNA模板，12.5 μL Premix Taq，上游、下游引物各

表1 PCR扩增的相关引物和序列

Tab.1 Related primers and sequences of PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence（5′-3′）
QtSKOR1-F	5′-GCAACAAATCCAGGCTAA-3′
QtSKOR1-R	5′-AGGTACAGAAAGAACTGTC-3′
QtSKOR1-3′-F	5′-GCTTCCCACCAAGGAGTTAT-3′
QtSKOR1-3′-R	5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3′
QtSKOR1-3′-F1	5′-GGATAATCACGAGCACCA-3′
QtSKOR1-3′-R2	5′-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3′
QtSKOR1-5′-F	5′-CGTTTGAAGAACACCACCT-3′
QtSKOR1-5′-R	5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3′
QtSKOR1-5′-F1	5′-TACGTCGAAACCGTTTAGCTC-3′
QtSKOR1-5′-R2	5′-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3′
QtSKOR1-F1	5′-GCAACAAATCCAGGCTAA-3′
QtSKOR1-R1	5′-AATCAAGTACACGTGCATCTG-3′
QtSKOR1-F2	5′-CTTTCGTCTTCACCGGCAT-3′
QtSKOR1-R2	5′-AGAAATACAGTCCCGGCAAC-3′
NTB-F	5′-TCTTGTTTGACACCGAAGAGGAG-3′
NTB-R	5′-AATAGCTGTCCCTGGAGGAGTTT-3′

0.5 μL,10.5 μL ddH_2O。PCR 扩增程序为:94 ℃ 2 min,35 cycles,94 ℃ 30 s,50 ℃ 50 s,72 ℃ 10 min。目的条带采用 Mini BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 试剂盒进行胶回收,再连接载体(pMD-19 vector)后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,再涂布于带有氨苄(Amp)的 LB 固体培养基上培养(时间:16 h,温度:37 ℃),挑取单个菌落进行 PCR 鉴定,选取阳性克隆菌液送上海生工测序。利用 5′-RACE 和 3′-RACE 快速扩增试剂盒中的特异性引物与 5′-RACE 和 3′-RACE 引物对 *QtSKOR1* 的 5′-RACE 和 3′-RACE 片段进行扩增。利用 Vector NTI 12 拼接序列全长后,利用 *QtSKOR1*-F1 和 *QtSKOR1*-R1 对全长进行扩展。

1.4　筇竹 *QtSKOR1* 基因的表达特性分析

为探究筇竹 3 个组织 *QtSKOR1* 的表达特征,设计引物 *QtSKOR1*-F2 和 *QtSKOR1*-R2 对样品进行分析(表 1)。反应体系共 20 μL(10 μL TB Green Premix ExTaq II,上下游引物各 0.8 μL,2.0 μL cDNA 模板,6.4 μL ddH_2O),扩增程序为:95 ℃,5 s 57 ℃,30 s,40 cycles,95 ℃,5 s 60 ℃,1 min 95 ℃,50 ℃,30 s。*NTB*(基因登录号:gil242381788)作为管家基因也同时进行扩增,最后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达水平[2]。

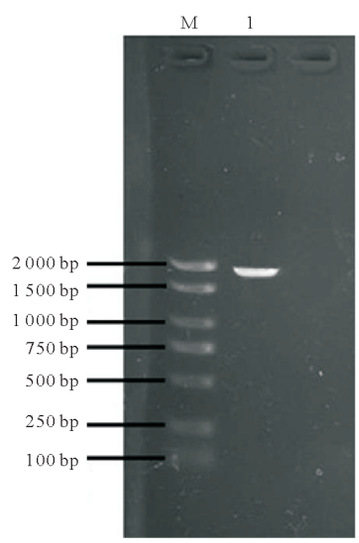
1.5　生物信息学分析

用 DNAMAN9.0 软件对氨基酸序列进行同源比较分析。利用 ProtParam(http://web.Expasy.Org/protparam/)预测 QtSKOR1 的基本理化性质[30]。通过 Signal IP5.0(http://www.cbs.dut.dk/services/SignalP/)、TMHMM2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/.)、ProtScale(https://web.expasy.org/protscale/)、Predit-protein(http://www.predictprotein.org/)、SMART(http://smart.embl-heidelberg.de/)分别预测 QtSKOR1 蛋白的信号肽、跨膜结构、进行亲水性分析、二级结构和保守结构域分析[28]。使用 MEGA 6.0 软件构建不同植物氨基酸序列的分子系统发育树[2]。

2　结果与分析

2.1　筇竹 *QtSKOR1* 基因全长 cDNA 的获得及序列分析

研究利用 RACE 方法从筇竹实生苗的 cDNA 模板扩增出 *QtSKOR1* 中间片段,然后通过两轮 PCR 分别扩增两边的片段,PCR 产物检测凝胶电泳获得一条大小为 1 900 bp 左右的特异性条带(图 1),最后通过拼接获得基因全长。如图 2 所示,*QtSKOR1* 基因全长为 2 150 bp(注册号:MT078984),包括开放阅读框为 1 923 bp,编码 641 个氨基酸残基。



M:2000 bp DNA Marker;1:PCR 产物。
M:2000 bp DNA Marker;1:PCR products.
图 1　*QtSKOR1* 基因扩增电泳分析
Fig.1　*QtSKOR1* gene amplification electropherogram

2.2　QtSKOR1 蛋白的生物信息学分析

SMART 分析表明 QtSKOR1 蛋白的保守结构域存在环核苷酸(cNMP)和锚蛋白重复结构域(ANK),属于 Shake 亚家族(图 3)。QtSKOR1 蛋白的分子式为 $C_{5743}H_{9565}N_{1923}O_{2393}S_{419}$,相对分子质量为 157.27 kD,等电点(pI)为 4.94,亲水系数为 0.776(图 4A),不稳定性指数(II)为 47.75,隶属不稳定的排水性蛋白。如图 4B 可知,QtSKOR1 蛋白不存在信号肽,但共有 3 个跨膜区(在第 23-45、80-102、109-131 氨基酸之间)。k-NN 算法对亚细胞预测结果显示,该蛋白主要存在于线粒体(30.4%)和细胞质(26.1%)中。

二级及三级结构预测表明(图 5),QtSKOR1 蛋白主要由 α-螺旋(305 个)构成,占二级结构总比例的 47.66%,同时,含有 27.66% 的无规则卷曲(177 个)、15.94% 的延伸链(102 个)和 8.75% 的 β-转角(56 个)。

```
1       ATGAAGGTCGCAGAATTCTTCAAGAGTTTGGAAAAGGACATCCGTGTGAATTACCTGTTCACAAGGATAGTGAAA
1        M  K  V  A  E  F  F  K  S  L  E  K  D  I  R  V  N  Y  L  F  T  R  I  V  K
76      CTCATAGTTGTGGAGCTCTACTGCACACACACAGCAGCGTGTATCTTCTATTACCTGGCCACGACACTTCCTGAA
26       L  I  V  V  E  L  Y  C  T  H  T  A  A  C  I  F  Y  Y  L  A  T  T  L  P  E
151     TCAATGGAAGGGTATACATGGATAGGGAGTTTGCAGTTGGGAGACGACAACTATTCTGATTTCAGGGAGATTGAT
51       S  M  E  G  Y  T  W  I  G  S  L  Q  L  G  D  D  N  Y  S  D  F  R  E  I  D
226     CTTGCCAAGCGTTATATAACATCATTGTACTTTGCCATTGTCACCATGGCTACTGTCGGTTACGGTGACATTCAC
76       L  A  K  R  Y  I  T  S  L  Y  F  A  I  V  T  M  A  T  V  G  Y  G  D  I  H
301     GCTGTAAATATCAGGGAAATGATGTTTATCATGATTTATGTTTCCTTTGATATGATTATTGGAGCTTACCTCATC
101      A  V  N  I  R  E  M  M  F  I  M  I  Y  V  S  F  D  M  I  I  G  A  Y  L  I
376     GGTAACATGACTGCACTTATTGTCAAAGGCTCGAAAACCGAGCGATTTAGGGACAAAATGAAAGAAGCTATCAGG
126      G  N  M  T  A  L  I  V  K  G  S  K  T  E  R  F  R  D  K  M  K  E  A  I  R
451     TATATGAACAGAAATAAACTTGGAAAGGACATAAGAGAACAGATCAAGGGACACTTGAGGTTGCAGTATGAGAGC
151      Y  M  N  R  N  K  L  G  K  D  I  R  E  Q  I  K  G  H  L  R  L  Q  Y  E  S
526     AGCTACACTGAAGCTTCCGTACTTCAGGATATCCCAATTTCTATTCGTGCAAAGATTTCTCAAACACTGTACAAG
176      S  Y  T  E  A  S  V  L  Q  D  I  P  I  S  I  R  A  K  I  S  Q  T  L  Y  K
601     CCATATATTGAAAGCATTCCACTGTTCAAAGGGTGTTCAGCAGAATTCATTCAACAGATTGTGATCAGGCTGCAA
201      P  Y  I  E  S  I  P  L  F  K  G  C  S  A  E  F  I  Q  Q  I  V  I  R  L  Q
676     GAAGAGTTCTTCCTACCAGGAGAGATTATTTTGGAGCAAGGAAGCGCAGTTGATCAGTTATACTTTGTCTGTCAT
226      E  E  F  F  L  P  G  E  I  I  L  E  Q  G  S  A  V  D  Q  L  Y  F  V  C  H
751     GGTGCGCTGGAAGGTGTTGGCATTGGTGAAGATGGTCAAGAAGAGACCATTTTAATGCTGGAGCCTGAGAGTTCT
251      G  A  L  E  G  V  G  I  G  E  D  G  Q  E  E  T  I  L  M  L  E  P  E  S  S
826     TTCGGAGAAATTGCTGTTCTTTGCAATATTCCACAGCCCTACACTGTTCGTGGCTGCGAACTTTGTCGGCTCTTG
276      F  G  E  I  A  V  L  C  N  I  P  Q  P  Y  T  V  R  G  C  E  L  C  R  L  L
901     CGGCTCGATAAACAGTCCTTCACAAACATATTGGAGATCTATTTCGTTGACGGAAGAAAAATTTTGAGCAACCTT
301      R  L  D  K  Q  S  F  T  N  I  L  E  I  Y  F  V  D  G  R  K  I  L  S  N  L
976     TCTGAGAGCAATGAATATGGTGGGAGGATCAAACAACTAGAACCCGATATCACATTCCATATAGGGAAGCAAGAG
326      S  E  S  N  E  Y  G  G  R  I  K  Q  L  E  P  D  I  T  F  H  I  G  K  Q  E
1051    GCGGAGCTCACCTTAAGAGTAAATAGTGCAGCCTTTTACGGTGACCTTCATCAGCTCAAAAGTTTAATCCGGGCT
351      A  E  L  T  L  R  V  N  S  A  A  F  Y  G  D  L  H  Q  L  K  S  L  I  R  A
1126    GGAGCGGATCCAAAGAACACTGATTATGATGGGCGATCTCCTCTGCATCTTGCAGCTTCCAAAGGGTACGAAGAT
376      G  A  D  P  K  N  T  D  Y  D  G  R  S  P  L  H  L  A  A  S  K  G  Y  E  D
1201    GTCGTGCAGTTCCTTATCCACGAAGGGGTTGATATCGATCTTACCGATAAATTTGGGAACACACCCTTGCTGGAG
401      V  V  Q  F  L  I  H  E  G  V  D  I  D  L  T  D  K  F  G  N  T  P  L  L  E
1276    GCAGTCAAGCAGGGGCATGACCGGGTGGCCACACTGCTCTTTAGCAAAGGAGCTCAACTGATCCTCAAGAATGCT
426      A  V  K  Q  G  H  D  R  V  A  T  L  L  F  S  K  G  A  Q  L  I  L  K  N  A
1351    GGCAGCCATCTCTGCACGGAAGTTTCAAAGGGAGACTCGGATTTCATTCGGAGGGCTCTAACTTATGGCGTCGAC
451      G  S  H  L  C  T  E  V  S  K  G  D  S  D  F  I  R  R  A  L  T  Y  G  V  D
1426    CCAAACTCGAAAGACTACGACCACCGCACTCCTCTCCACATAGCCGCTGCGGAGGGCTTGTATCTGATCGCAAAG
476      P  N  S  K  D  Y  D  H  R  T  P  L  H  I  A  A  A  E  G  L  Y  L  I  A  K
1501    ATGCTGATAGACGCAGGCGCAAGCGTGTTCGCAACAGACAGATGGGGCACCACTCCACTTGACGAAGGGCGCAAG
501      M  L  I  D  A  G  A  S  V  F  A  T  D  R  W  G  T  T  P  L  D  E  G  R  K
1576    TGTGGTAGCAAGTCGCTGATGCTGCTGCTGGAACAAGCGAAAGCCGACGAGCTCTCCAAGTTCCCCACACGCGGC
526      C  G  S  K  S  L  M  L  L  L  E  Q  A  K  A  D  E  L  S  K  F  P  T  R  G
1651    GAAGAAATGAGAGATAAAATGCACCCAAGACGATGCTCGTTGTTCCCTTACCATCCATGGGACGCTGATGACAAA
551      E  E  M  R  D  K  M  H  P  R  R  C  S  L  F  P  Y  H  P  W  D  A  D  D  K
1726    CGGAAAGAAGGGGTGGTTCTGTGGATTCCTCACACGATCGAGGGACTCATCAGGTCAGCCCAGGAGAAGCTCAAC
576      R  K  E  G  V  V  L  W  I  P  H  T  I  E  G  L  I  R  S  A  Q  E  K  L  N
1801    TTTTCCGGCTCATGCCTGCGCTTGCTCTGCGAGGATGGAGCGAGGGTACAGGACGTGGACATGGTCAATGACGGC
601      F  S  G  S  C  L  R  L  L  C  E  D  G  A  R  V  Q  D  V  D  M  V  N  D  G
1876    CAGAAGCTGTACCTGGTCGGAGGCGAGGGCACGGAGCAGAGCGACTAG
626      Q  K  L  Y  L  V  G  G  E  G  T  E  Q  S  D  *
```

图2 筚竹 *QtSKOR1* 基因的核苷酸序列和预测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of *QtSKOR1* in *Q. tumidinoda*

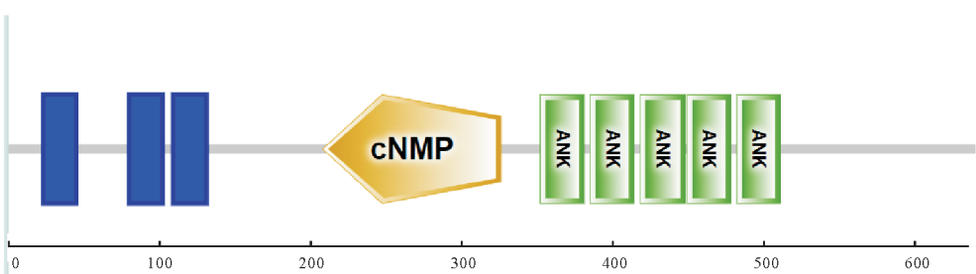


图3 筚竹 QtSKOR1 保守结构域分析

Fig.3 QtSKOR1 conserved domain analysis of *Q. tumidinoda*

2.3 QtSKOR1 蛋白的氨基酸序列分析和系统进化树分析

同源性分析结果显示，QtSKOR1 氨基酸序列与二穗短柄草（*Brachypodium distachyum*）、玉米（*Zea mays*）、水稻（*Oryza sativa*）、节节麦（*Aegilops tauschii*）、黍属（*Panicum miliaceum*）、小米（*Setaria italica*）、糜子（*Panicum hallii*）和大麦（*Hordeum vulgare*）的同源性较高，分别为 89.06%，87.91%，87.84%，87.21%，86.57%，87.21%，87.17% 和 82.81%。但和菠萝（*Ananas comosus*）、芦笋（*Asparagus officinalis*）的同源性较低，分别为 78.13% 和 72.17%（图 6）。

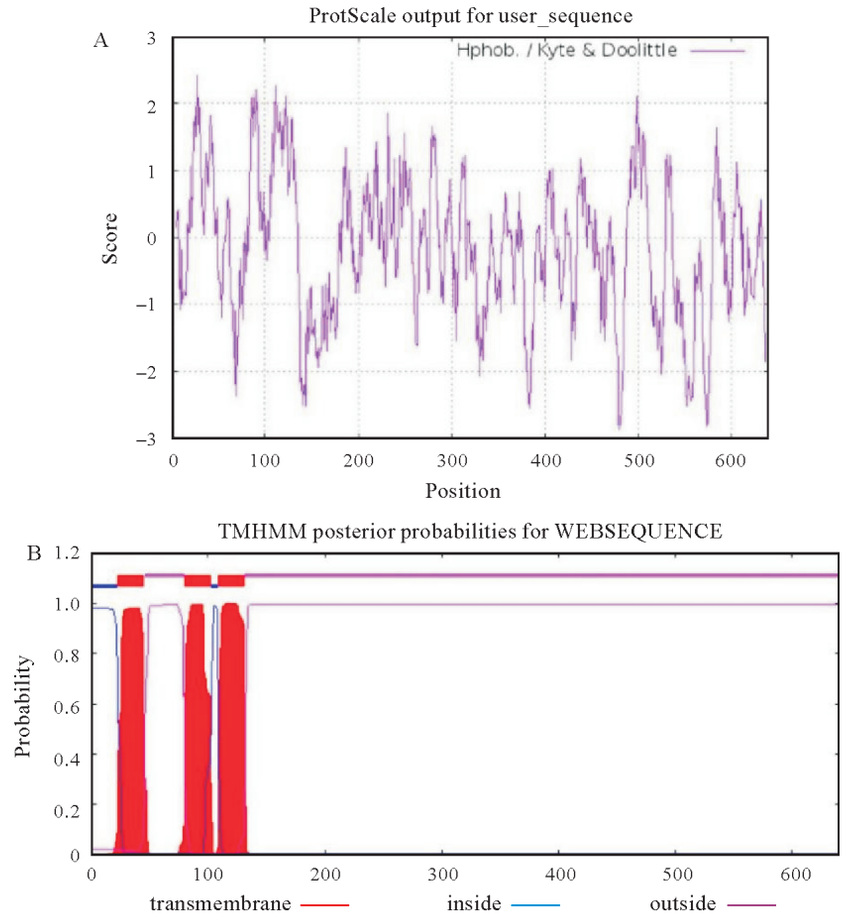
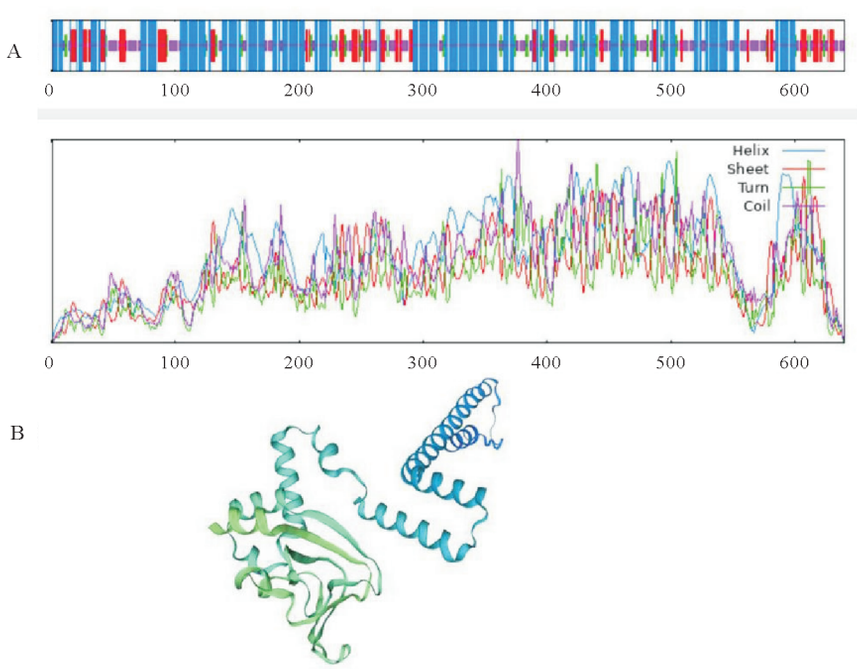


图 4　筇竹 QtSKOR1 蛋白的亲水性预测(A)和氨基酸序列跨膜区预测(B)

Fig.4　Prediction of hydrophilicity(A)and transmembrane amino acid sequence(B)of QtSKOR1 protein



A 中 α-螺旋用蓝色表示,β-转角用绿色表示,延伸链用红色表示,无规则卷曲用紫色表示。

In Fig.A, the α-Spiral is shown in blue, the β-corner is shown in green, the extended chain is shown in red, and the irregular curl is shown in purple.

图 5　筇竹 QtSKOR1 蛋白的二级结构分析(A)和三级结构预测(B)

Fig.5　Secondary structure analysis(A)and tertiary structure prediction(B)of QtSKOR1 protein

进化树分析显示，11 种植物的 SKOR 基因蛋白分为 4 类。筇竹 QtSKOR1 与黍属、糜子、小米和玉米的蛋白相似度最高，说明其亲缘关系相对较近，而与芦笋的亲缘关系最远（图 7）。

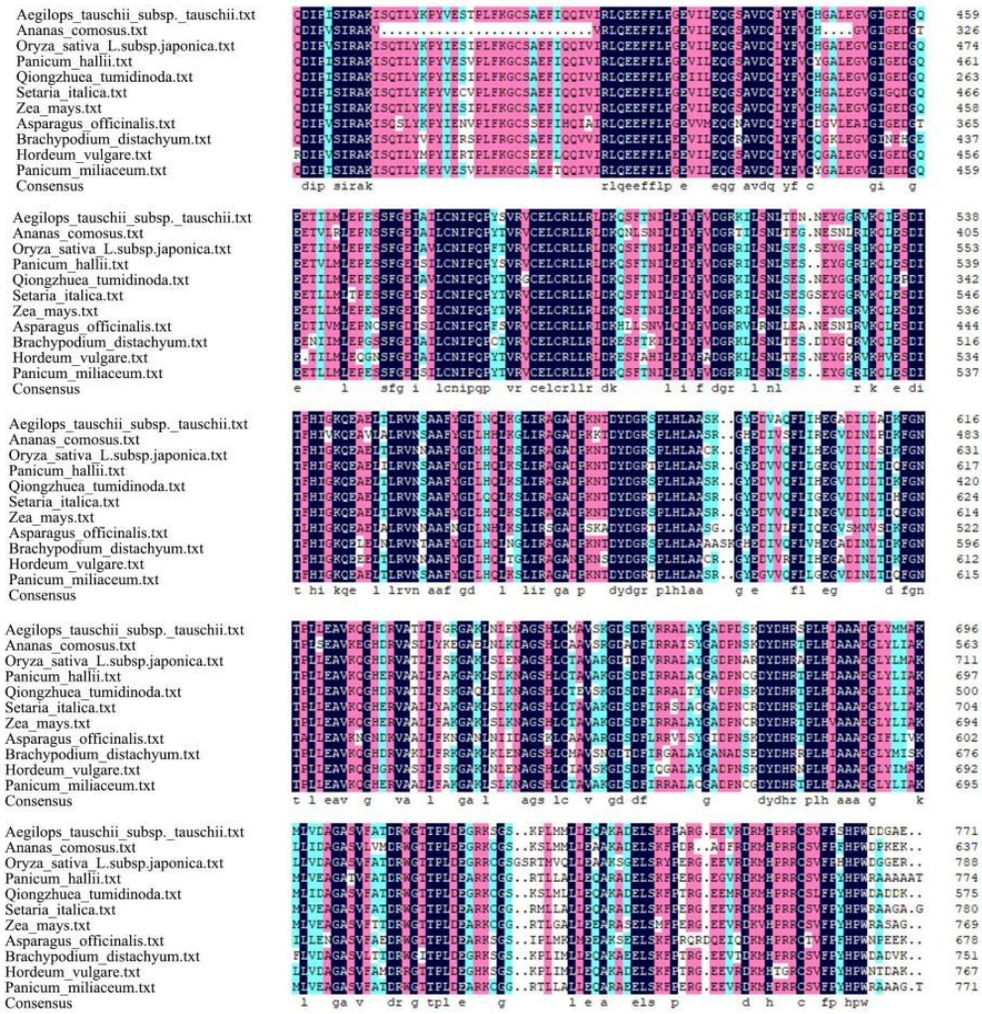


图 6 筇竹 QtSKOR1 氨基酸序列比对

Fig.6 Alignment of QtSKOR1 amino acid sequence of *Q. tumidinoda*

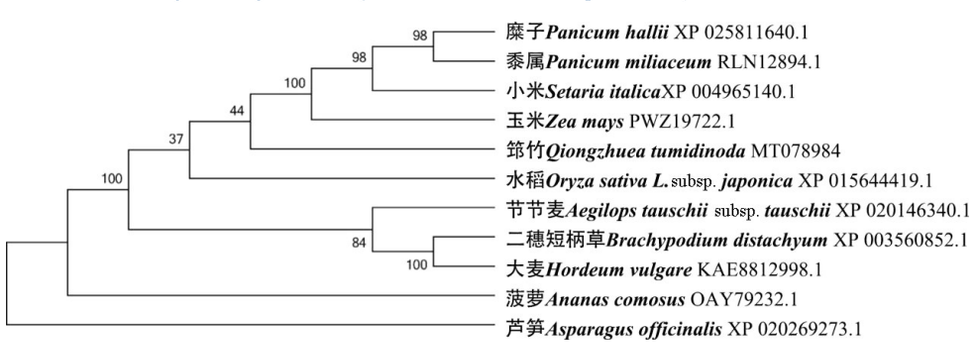


图 7 筇竹 QtSKOR1 蛋白与其他植物同源蛋白的进化树分析

Fig.7 Phylogenetic tree analysis of QtSKOR1 protein and other plant homologous proteins

2.4 筇竹 *QtSKOR1* 基因的表达特性分析

Q-PCR 结果显示，*QtSKOR1* 基因在筇竹所有组织中均有表达，且表达量由高到低依次是叶、根、茎、笋（图 8），说明 *QtSKOR1* 是非诱导表达，且其基因具有组织表达特异性。与对照相比，50 mmol/L KCl 胁迫处理下，*QtSKOR1* 基因在筇竹根中的表达量显著增加，而在叶中的表达量显著下降。这说明根在钾胁迫中发挥了重要作用。同时，在 500 mmol/L NaCl 胁迫处理下，筇竹根、茎和叶的 *QtSKOR1* 的表达量均呈显著下降的趋势。

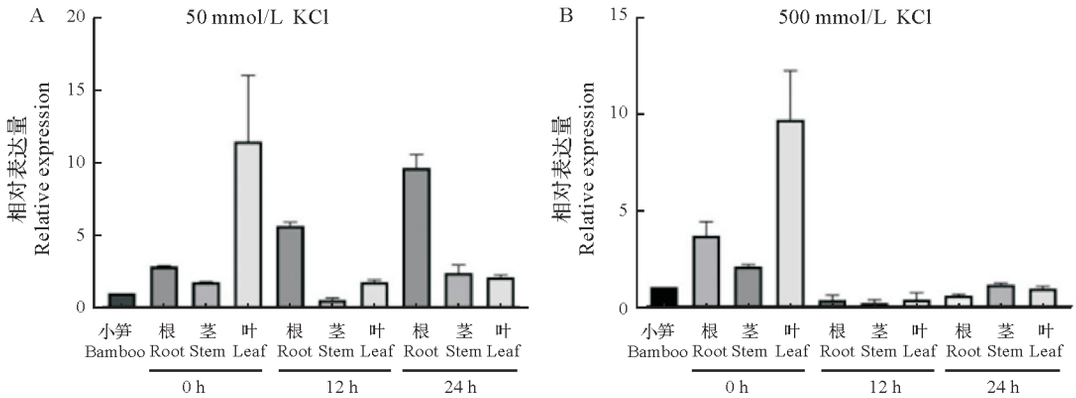


图 8　50 mmol/L KCl(A)和 500 mmol/L NaCl(B)短期处理下 *QtSKOR1* 的表达

Fig.8　Expression of *QtSKOR1* under short-term treatments of 50 mmol/L KCl(A)and 500 mmol/L NaCl(B)

3　讨论与结论

SKOR 基因是 Shaker 家族中重要的一类基因,该类基因的主要功能是使根吸收 K^+,随后将 K^+ 转运到木质部进而运输到植物地上部并发挥作用。目前被检测出来的 *SKOR* 亚家族相对较少[9-10,35]。本研究通过从筇竹实生苗中克隆出外向整流型钾离子通道基因并命名为 *QtSKOR1*(GenBank 登录号:MT078984)。*QtSKOR1* 基因序列全长为 1 923 bp,编码 641 个氨基酸,含有 1 个环核苷酸结合结构域和锚蛋白重复结构域。这与其他 *SKOR* 家族具有相同的结构域[35]。此外,序列比对和聚类分析表明 QtSKOR1 蛋白与二穗短柄草和玉米有较高的同源性(89.06% 和 87.91%)。综上,笔者推测 *QtSKOR1* 基因属于 Shaker 家族的 *SKOR* 亚家族。

植物 *SKOR* 通道的表达量受到外界 K^+、Na^+ 浓度的调控[28,30]。Ache 等[17]发现 *SKOR* 亚类主要在植株的根部和叶片中表达,是介导 K^+ 外流的通道。而 Hu 等[36]研究表明,*ZxSKOR* 主要在根、茎中表达,其表达水平与叶片中的 K^+ 浓度成正比。此外,*SKOR* 主要在根部中柱鞘及木薄壁组织细胞中表达,介导 K^+ 外流和长距离运输[20,36]。本研究中 *QtSKOR1* 在筇竹不同组织的表达量由高到低依次为叶片、根部、茎部,这与已报道的 *SKOR* 基因主要在根部表达的研究结果不一致[26-27,36],笔者推测 *SKOR* 基因可能更多地参与调控筇竹叶片发育进程及 K^+ 的运输和吸收。荧光定量结果显示,50 mmol/L KCl 胁迫处理下,*QtSKOR1* 基因的在根中显著上调,而在叶中显著下降。在 500 mmol/L NaCl 胁迫处理下 *QtSKOR1* 基因的在根、茎和叶中均显著下调。这与前人的研究结果部分一致[26-32],表明 Q*tSKOR1* 可能在维持筇竹体内 K^+ 稳态中发挥重要作用,也可能是该基因的表达受到激素的调控[31]。与对照相比,随着胁迫时间的增加,在 500 mmol/L NaCl 胁迫处理下 *QtSKOR1* 基因的在根、茎和叶中均显著下调,这与盐(K^+、Na^+)胁迫下长穗偃麦草 *EeSKOR* 基因[31]和黑果枸杞 *LrSKOR* 基因[32]的表达模式相似。另外,高盐胁迫(250 mmol/L)时,甜菜 *BvSKOR* 基因的表达量在 3 h 时表达量显著上调[30],这说明 *SKOR* 基因对环境的变化非常敏感,可以在短时间内做出相应的调整反应。在本研究中,盐胁迫处理 12 h 时筇竹不同组织 *QtSKOR1* 基因表达下调,推测筇竹对盐胁迫可能已经过渡到适应期,后续为维持细胞内外的离子稳态,*QtSKOR1* 表达量则呈上调趋势。

综上所述,本研究通过 RACE 法从筇竹幼苗中克隆获得 *QtSKOR1*,并对其在筇竹不同组织中受到非生物胁迫(KCl 和 NaCl)调控的表达量进行了探究,这为深入研究 *QtSKOR1* 基因的结构和表达特异性等方面的应用提供理论基础。

参考文献 References:

[1] 李玥,肖如雪,芮蕊,等.筇竹 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因克隆与表达分析[J].分子植物育种,2021,19(10):3235-3242.
LI Y,XIAO R X,RUI R,et al.Cloning and expression analysis on *QtNHX1* gene from *Qiongzhuea tumidinoda*[J].Molecular plant breeding,2021,19(10):3235-3242.

[2] 赵小艳,李倩,王澍.筇竹 *CtHAK1* 基因的克隆及表达分析[J].西部林业科学,2020,49(5):65-73.
ZHAO X Y,LI Q,WANG S.Cloning and expression analysis on *CtHAK1* gene from *Chimonobambusa tumidissinoda*[J].Journal of west China forestry science,2020,49(5):65-73.

[3] 代恩才，赵小艳，何霞红，等.筇竹*QtKQB1*基因的克隆及非生物胁迫下的表达分析[J/OL].分子植物育种，2023：1-14[2024-01-12].http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231218.1428.006.html.
DAI E C，ZHAO X Y，HE X H，et al.Cloning and expression analysis of the *QtKQB1* gene under abiotic stress in *Qiongzhuea tumidinoda*[J/OL].Molecular plant breeding，2023：1-14[2024-01-12].http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231218.1428.006.html.

[4] 贾维嘉，王澍.筇竹种子发芽条件及筇竹笋矿质元素分析[J].种子，2021，40(1)：79-83.
JIA W J，WANG S.Germination conditions of *Qiongzhuea tumidinoda* seed and mineral element analysis of *Qiongzhuea tumidinoda* shoots[J].Seed，2021，40(1)：79-83.

[5] 任盼盼，伍国强，魏明.植物外向整流K^+通道*SKOR*研究进展[J].草业学报，2023，32(2)：178-190.
REN P P，WU G Q，WEI M.Research progress relating to stelar K^+ outward rectifier(*SKOR*)channels in plants[J].Acta prataculturae Sinica，2023，32(2)：178-190.

[6] KUMAR P，KUMAR T，SINGH S，et al.Potassium：a key modulator for cell homeostasis[J].Journal of biotechnology，2020，324：198-210.

[7] 李廷强，王昌全.植物钾素营养研究进展[J].四川农业大学学报，2001，19(3)：281-285.
LI T Q，WANG C Q.Studying proceeding of plant potassium nutrient[J].Journal of Sichuan agricultural university，2001，19(3)：281-285.

[8] 黑晶莹，何霞红，王澍.林下三七*PnKAT3*基因的克隆及表达分析[J/OL].分子植物育种，2023：1-13[2023-10-13].http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230316.1615.018.html.
HEI J Y，HE X H，WANG S.Cloning and expression analysis of *KAT3* in *Panax notoginseng* from the forest understorey[J/OL].Molecular plant breeding，2023：1-13[2023-10-13].http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230316.1615.018.html.

[9] GAYMARD F，PILOT G，LACOMBE B，et al.Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem sap[J].Cell，1998，94(5)：647-55.

[10] WEGNER L H，DE BOER A H.Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K^+ homeostasis and long-distance signaling[J].Plant physiology，1997，115(4)：1707-1719.

[11] HUANG Y H，GUAN C，LIU Y R，et al.Enhanced growth performance and salinity tolerance in transgenic switchgrass via overexpressing vacuolar $Na^+(K^+)/H^+$ antiporter gene(*PvNHX1*)[J].Frontiers in plant science，2017，8：458.

[12] LEIGH R A，WYN JONES R G .A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell[J].New phytologist，1984，97(1)：1-13.

[13] VERY A A，NIEVES-CORDONES M，DALY M，et al.Molecular biology of K^+ transport across the plant cell membrane：what do we learn from comparison between plant species?[J].Journal of plant physiology，2014，171(9)：748-769.

[14] RAGEL P，RADDATZ N，LEIDI E O，et al.Regulation of K^+ nutrition in plants[J].Frontiers in plant science，2019，10：281.

[15] VILLETTE J，CUELLAR T，ZIMMERMANN S D，et al.Unique features of the grapevine VvK5.1 channel support novel functions for outward K^+ channels in plants[J].Journal of experimental botany，2019，70(21)：6181-6193.

[16] PILOT G，PRATELLI R，GAYMARD F，et al.Five-group distribution of the shaker-like K^+ channel family in higher plants[J].Journal of molecular evolution，2003，56(4)：418-434.

[17] ACHE P，BECKER D，IVASHIKINA N，et al.*GORK*，a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*，is a K^+-selective，K^+-sensing ion channel[J].Febs letters，2000，486(2)：93-98.

[18] JOHANSSON I，WULFETANGE K，POREE F，et al.External K^+ modulates the activity of the *Arabidopsis* potassium channel *SKOR* via an unusual mechanism[J].The plant journal，2006，46(2)：269-281.

[19] LIU K，LI L，LUAN S.Intracellular K^+ sensing of *SKOR*，a shaker-type K^+ channel from *Arabidopsis*[J].The plant journal，2006，46(2)：260-268.

[20] 段丽婕，王沛，陈梦词，等.盐生植物小花碱茅外整流K^+通道*PtSKOR*基因的克隆及RNAi载体构建[J].分子植物育种，2015，13(4)：877-886.
DUAN L J，WANG P，CHEN M C，et al.Cloning outward-rectifying potassium channel *PtSKOR* gene and constructing its RNAi vector in halophyte *Puccinellia tenuiflora*[J].Molecular plant breeding，2015，13(4)：877-886.

[21] SIDDIQUE M H，BABAR N I，ZAMEER R.Genome-wide identification，genomic organization，and characterization of potassium transport-related genes in *Cajanus cajan* and their role in abiotic stress[J].Plants，2021，10(11)：2238.

[22] AZEEM F，IJAZ U，ALI M A，et al.Genome-wide identification and expression profiling of potassium transport-related genes

in *Vigna radiata* under abiotic stresses[J].Plants,2021,11(1):2.

[23] ZHANG H Q,WEI S Z,HU W T,et al.Arbuscular mycorrhizal fungus rhizophagus irregularis increased potassium content and expression of genes encoding potassium channels in *Lycium barbarum*[J].Frontiers in plant science,2017,8:440.

[24] 刘丽萍,戴逢斌,张冲,等.黑果枸杞外整流钾离子通道 *SKOR* 基因的克隆及表达分析[J].浙江农林大学学报,2018,35(1):104-111.
LIU L P,DAI F B,ZHANG C,et al.Cloning and expression analysis of the *SKOR* gene for an outward-rectifying K^+ channel in *Lycium ruthenicum*[J].Journal of Zhejiang A&F university,2018,35(1):104-111.

[25] CHEN Y H,PENG X F,CUI J J,et al.Isolation and functional determination of *SKOR* potassium channel in purple osier willow,*Salix purpurea*[J].International journal of genomics,2021,6:1-7.

[26] 唐高红,谢君,于成龙,等.水稻 *OsSKOR* 的生物信息学分析和表达研究[J/OL].分子植物育种,2023:1-23[2023-10-14].http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220427.0951.008.html.
TANG G H,XIE J,YU C L,et al.Bioinformatics and expression analysis of rice *SKOR*[J/OL].Molecular plant breeding,2023:1-23[2023-10-14].http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220427.0951.008.html.

[27] 王力敏,陈亚辉,杨庆山,等.山新杨钾离子通道基因 *PdbSKOR* 的克隆与功能分析[J].林业科学,2021,57(1):53-63.
WANG L M,CHEN Y H,YANG Q S,et al.Cloning and functional analysis of potassium channel gene *PdbSKOR* in *Populus davidiana*×*P. bolleana*[J].Scientia silvae Sinicae,2021,57(1):53-63.

[28] 高玉龙,隋学艺,王丙武,等.烟草 *NtSKOR1* 基因的克隆及功能分析[J].植物学报,2020,40(12):2017-2022.
GAO Y L,SUI X Y,WANG B W,et al.Cloning and function analysis of *NtSKOR1* in tobacco[J].Acta botanica boreali-occidentalia Sinica,2020,40(12):2017-2022.

[29] HUANG L T,ZHAO L N,GAO L W,et al.Constitutive expression of *CmSKOR*,an outward K^+ channel gene from melon,in *Arabidopsis thaliana* involved in saline tolerance[J].Plant science,2018,274:492-502.

[30] 任盼盼.甜菜 Shaker 型 K^+ 通道鉴定及 *BvSKOR* 功能解析[D].兰州:兰州理工大学,2023.
REN P P.Identification of sugar beet shaker-type K^+ channel and *BvSKOR* function analysis[D].Lanzhou:Lanzhou University of Technology,2023.

[31] 张勇,田小霞,郑明利,等.长穗偃麦草 *EeSKOR* 启动子的克隆及功能分析[J].西北植物学报,2021,41(11):1810-1817.
ZHANG Y,TIAN X X,ZHENG M L,et al.Cloning and functional analysis of the *EeSKOR* promoter of *Elytrigia elongata*[J].Acta botanica boreali-occidentalia Sinica,2021,41(11):1810-1817.

[32] HU J,HU X K,ZHANG H W,et al.Moderate NaCl alleviates osmotic stress in *Lycium ruthenicum*[J].Plant growth regulation,2022,96,25-35.

[33] ADAMS E,SHIN R.Transport ,signaling,and homeostasis of potassium and sodium in plants[J].Journal of integrative plant biology,2014,56(3):231-249.

[34] 王佺珍,刘倩,高娅妮,等.植物对盐碱胁迫的响应机制研究进展[J].生态学报.2017;37(16):5565-5577.
WANG Q Z,LIU Q,GAO Y N,et al.Review on the mechanisms of the response to salinity-alkalinity stress in plants[J].Acta ecologiea Sinica,2017;37(16):5565-5577.

[35] LI S Y,YANG F,SUN D M,et al.Cryo-EM structure of the hyperpolarization-activated inwardly rectifying potassium channel *KAT1* from *Arabidopsis*[J].Cell research,2020,30(11):1049-1052.

[36] HU J,MA Q,KUMAR T,et al.*ZxSKOR* is important for salinity and drought tolerance of *Zygophyllum xanthoxylum* by maintaining K^+ homeostasis[J].Plant growth regulation,2016,80:195-205.