

浙麦冬 HMA 基因家族鉴定及镉胁迫响应分析

王智慧¹, 牛二利², 高远亮¹, 朱倩¹, 叶子弘³, 俞晓平³, 赵倩^{1*}, 黄俊^{1*}

1 浙江科技大学 生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023

2 浙江省农业科学院 作物与核技术利用研究所, 浙江 杭州 310021

3 中国计量大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310018

王智慧, 牛二利, 高远亮, 朱倩, 叶子弘, 俞晓平, 赵倩, 黄俊. 浙麦冬 HMA 基因家族鉴定及镉胁迫响应分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 771-790.

WANG Zhihui, NIU Erli, GAO Yuanliang, ZHU Qian, YE Zihong, YU Xiaoping, ZHAO Qian, HUANG Jun. Identification of HMA gene family and response to cadmium stress in *Ophiopogon japonicus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 771-790.

摘要: 土壤镉污染是当前全球面临的重要环境问题之一。浙麦冬(*Ophiopogon japonicus*)作为一种多功能植物, 不仅在传统医学中广泛应用, 其在环境修复领域中的应用潜力也逐渐受到关注。本文旨在探讨浙麦冬在不同浓度镉胁迫下的镉富集规律, 鉴定和分析浙麦冬重金属 ATP 酶(heavy metal ATPase, HMA)家族成员。研究发现浙麦冬富集系数高达 2.75, 在土壤镉污染修复中显示出良好的镉富集潜力。基于前期转录组数据鉴定出 9 个浙麦冬 P1B 型重金属 ATP 酶(P1B-ATPases)家族成员, 其中 OjHMA1–OjHMA6 属于锌/钴/镉/铅 ATP 酶(Zn/Co/Cd/Pb-ATPases), OjHMA7–OjHMA9 则属于铜/银 ATP 酶(Cu/Ag-ATPases)。在镉胁迫下, *OjHMA1*、*OjHMA2*、*OjHMA3* 和 *OjHMA7* 等基因表达显著上调, 表明其在镉离子的吸收和转运过程中发挥核心作用。拓扑结构分析揭示了 HMA 蛋白具有该家族典型的跨膜(transmembrane, TM)片段以及调节离子吸收与释放的 A、P 和 N 功能域, 跨膜片段上存在着金属离子结合位点(M4、M5、M6)。根据跨膜域数目及金属结合位点上氨基酸的不同, 可将植物的 HMA 家族蛋白分为 3 个亚组: P1B-1 ATPases、P1B-2 ATPases 和 P1B-4 ATPases。P1B-1 ATPases 亚组包含的 TM4(CPC)、TM5(YN[X]₄P)和 TM6(M[XX]SS)基序, P1B-2 ATPases 亚组的 TM4(CPC)、TM5(K)以及 TM6(DKTGT)基序, P1B-4 ATPases 亚组的 TM4 中的 SPC 和 TM6 中的 HE[X]GT 基序, 都是其蛋白发挥功能的关键。在此基础上, 利用分子对接对金属离子结合位点进行了详细解析, 揭示了 CPC/SPC、DKTGT 和 HE[X]GT 等关键保守序列在金属离子配位和稳定中的重要作用。本研究结果不仅提供了通过基因工程提高浙麦冬对镉吸附和耐受性的分子靶点, 也为培育具有高镉吸附能力的新品种提供了理论基础。

资助项目: 浙江省高层次人才特殊支持计划(2022R52024); 浙江省“领雁”计划(2020C02024)

This work was supported by the Special Support Program for High Level Talents in Zhejiang Province (2022R52024) and the “Leading Goose” Research and Development Program of Zhejiang Province (2020C02024).

*Corresponding authors. E-mail: ZHAO Qian, zhaoq@zust.edu.cn; HUANG Jun, hjunl@163.com

Received: 2024-06-07; Accepted: 2024-10-08; Published online: 2024-10-09

关键词：浙麦冬；HMA 家族；镉胁迫；富集系数；分子对接

Identification of HMA gene family and response to cadmium stress in *Ophiopogon japonicus*

WANG Zhihui¹, NIU Erli², GAO Yuanliang¹, ZHU Qian¹, YE Zihong³, YU Xiaoping³, ZHAO Qian^{1*}, HUANG Jun^{1*}

1 School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China

2 Institute of Crop and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China

3 College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: Soil cadmium (Cd) pollution is one of the major environmental problems globally. *Ophiopogon japonicus*, a multifunctional plant extensively used in traditional Chinese medicine, has demonstrated potential in environmental remediation. This study investigated the Cd accumulation pattern of *O. japonicus* under cadmium stress and identified the heavy metal ATPase (HMA) family members in this plant. Our results demonstrated that *O. japonicus* exhibited a Cd enrichment factor (EF) of 2.75, demonstrating strong potential for soil Cd pollution remediation. Nine heavy metal ATPase (HMA) members of P1B-ATPases were successfully identified from the transcriptome data of *O. japonicus*, with OjHMA1–OjHMA6 classified as the Zn/Co/Cd/Pb-ATPases and OjHMA7–OjHMA9 as the Cu/Ag-ATPases. The expression levels of *OjHMA1*, *OjHMA2*, *OjHMA3*, and *OjHMA7* were significantly up-regulated under Cd stress, highlighting their crucial roles in cadmium ion absorption and transport. The topological analysis revealed that these proteins possessed characteristic transmembrane (TM) segments of the family, along with functional A, P, and N domains involved in regulating ion absorption and release. Metal ion-binding sites (M4, M5, and M6) existed on the TM segments. Based on the number of transmembrane domains and the residues at metal ion-binding sites, the plant HMA family members were categorized into three subgroups: P1B-1 ATPases, P1B-2 ATPases, and P1B-4 ATPases. Specifically, the P1B-1 ATPase subgroup included the motifs TM4(CPC), TM5(YN[X]₄P), and TM6(M[XX]SS); the P1B-2 ATPase subgroup featured the motifs TM4(CPC), TM5(K), and TM6(DKTGT); the P1B-4 ATPase subgroup contained the motifs TM4(SPC) and TM6(HE[X]GT), all of which were critical for protein functions. Molecular docking results revealed the importance of conserved sequences such as CPC/SPC, DKTGT, and HE[X]GT in metal ion coordination and stabilization. These findings provide potential molecular targets for enhancing Cd uptake and tolerance of *O. japonicus* by genetic engineering and lay a theoretical foundation for developing new cultivars with high Cd accumulation capacity.

Keywords: *Ophiopogon japonicus*; HMA family; cadmium (Cd) stress; enrichment factor (EF); molecular docking

土壤重金属污染是一个全球性的生态与环境问题。我国耕地表层土壤中重金属镉超标问题较为严重,超标率高达 18.03%,成为导致我国耕地表层土壤重金属污染的首要因素^[1]。镉的富集主要通过损伤植物光合作用、呼吸作用以及营养代谢等生理过程抑制植物生长,并且其在生物体内的半衰期长,生物毒性极强,甚至可通过食物链传递危害人类健康^[2]。在过去 10 年中,超富集植物因其在植物修复中的潜在用途备受关注。为此,不少学者利用超富集植物对土壤中的镉进行吸附,以实现土壤修复,目前已有约 450 种植物被证实具有重金属富集能力,并在实践中得到日益广泛的应用^[3],包括龙葵^[4]、景天^[5]和宝山堇菜^[6]等。

浙麦冬(*Ophiopogon japonicas*)是百合科沿阶草属植物,始载于《神农本草经》,是我国临床常用的中药之一,现收录于 2020 年版《中国药典》,在中国、韩国、日本等东亚国家广泛种植^[7]。除药用价值外,麦冬还因其常绿、耐寒、耐旱、抗病虫害等特性以及其发达的根系,在绿化中广泛应用。研究表明,麦冬与其他植物如白蜡和紫叶李组成的乔草型组合对重金属的总贮量最大^[8]。镉可通过植物吸收在麦冬体内积累,其积累量与土壤中镉含量成正比。即使在高浓度镉污染土壤中(1.5 mg/kg)麦冬仍能正常生长,具有较强的镉耐受性^[9]。本课题组前期研究发现,浙麦冬在镉污染土壤(0.38 mg/kg)中生长 90 d 后,整个植株的富集系数达到 2.34,表明浙麦冬具较强的镉富集能力,提示其在修复镉污染方面具有潜力^[10]。

重金属 ATP 酶(heavy metal ATPase, HMA) 又称 P1B-ATPases,是植物中一类重要的阳离子转运蛋白,在吸收和转运金属元素中发挥核心作用。P1B-ATPases 具有 6 个核心螺旋跨膜片段(TM1-TM6)以及 3 个功能域(A、P、N)^[11],

并且存在 N 端或 C 端可溶性金属结合域(metal binding domain, MBD)^[12]。根据不同的分类标准, P1B-ATPases 展现出多样化的分类方式。依据转运金属底物的特异性, P1B-ATPases 可分为 Zn/Co/Cd/Pb-ATPases (Zn 亚类)和 Cu/Ag-ATPases (Cu 亚类)^[13],这 2 个亚类具有 E1-E2₂-ATPase 和 Hydrolase 结构域,而 HMA 结构域则是 Cu 亚类特有的^[14]。此外,基于跨膜片段中的底物特异性和保守氨基酸序列, P1B-ATPases 可被细分为 P1B-1 至 P1B-7 这 7 个亚组^[15],其中在植物中仅存在 P1B-1、P1B-2 和 P1B-4 这 3 个亚组^[16]。目前, HMA 基因家族已在拟南芥、水稻等多种植物中被鉴定出来,其在植物生长发育及逆境胁迫响应中的作用也在多种模式植物中得到了深入研究。例如, AtHMA3 和 OsHMA3 被证实能促使植物将 Zn²⁺、Co²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 储存于液泡中^[17]。AtHMA3 不仅在此过程中发挥作用,还是导致拟南芥叶片镉积累的重要转运蛋白。同样,拟南芥 AtHMA2 和 AtHMA4 以及水稻 OsHMA2 主要负责将根中 Zn²⁺ 和 Cd²⁺ 从根细胞转运至地上部分^[18]。过表达 OsHMA3 和 OsHMA2 会显著增加根液泡中 Cd²⁺ 含量,从而减少 Cd²⁺ 在谷粒中的积累^[19]。水稻 OsHMA9 定位在质膜上,主要在根部、叶片的维管束和花药中表达,其表达量随着 Cu²⁺、Zn²⁺ 和 Cd²⁺ 浓度的升高而增加,可促使金属离子排出胞外^[20]。

目前,关于重金属胁迫对浙麦冬影响的研究主要集中在探究其生理响应等方面,而针对浙麦冬镉富集机制及其关键调控基因仍缺乏深入研究。本研究以浙麦冬‘ZMD’为供试材料,分别实施不同浓度的镉胁迫处理,解析浙麦冬对镉的富集和迁移特征。结合本课题前期转录组数据,鉴定 OjHMA 基因家族成员,并对其理化性质、进化关系、结构域、保守基序

及重金属胁迫的响应表达分析。在此基础上,利用分子对接等方法解析候选基因在转运镉离子时的关键活性位点,以期为浙麦冬性状改良、培育高镉吸附的新品种提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 供试材料

浙麦冬‘ZMD’和浙麦冬 1 号‘ZMD-1’采自浙江省慈溪市,以《土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准(试行)》(GB15618—2018)中规定的镉污染风险筛选值(0.3 mg/kg)为标准,设置 Cd-CK (0.14 mg/kg)、Cd-1 (0.35 mg/kg)和 Cd-2 (0.61 mg/kg)这 3 种不同浓度的镉胁迫处理(表 1)。于温室中进行统一管理,种植 90 d 后收集根和叶片样本,用于镉富集和转运能力测定。

不同重金属胁迫处理在浙麦冬生长中期(约种植后 120 d)进行,包括 Cu、Fe、Mn 和 Zn 等重金属胁迫。金属浓度设置为 Cu-L (10 mg/kg)、Cu-H (100 mg/kg)、Fe-L (2 mg/kg)、Fe-H (20 mg/kg)、Mn-L (10 mg/kg)、Mn-H (100 mg/kg)、Zn-L (25 mg/kg)、Zn-H (250 mg/kg)。其中,Cu-H、Fe-H、Mn-H 和 Zn-H 的含量根据《土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准(试行)》(GB15618—2018)中规定的风险筛选值设定,Cu-L、Fe-L、Mn-L 和 Zn-L 的含量分别为对应重金属元素风险阈值的 1/10。重金属胁迫处理 6 d 后,收集根和叶片样本,经液氮速冻后置于-80 °C 冰箱中保存备用。

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of the test soil

Soil	Cd concentration (mg/kg)	Moisture content (%)	pH	Total nitrogen (g/kg)	Available phosphorus (mg/kg)	Available potassium (mg/kg)
Cd-CK	0.14±0.01c	27.73±0.02	6.00±0.14	1.63±0.10	22.00±1.41	112.00±5.89
Cd-1	0.35±0.01b	25.60±0.02	6.03±0.22	1.65±0.06	23.00±2.16	113.51±3.42
Cd-2	0.61±0.02a	26.98±0.02	6.08±0.10	1.65±0.06	22.75±2.99	111.52±2.52

Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ level of different treatments.

1.2 浙麦冬镉富集和转运能力的测定

取不同镉胁迫处理下的浙麦冬根和叶片样本,经流水冲洗干净后置于 20 mmol/L 的 EDTA 中浸泡 15 min,彻底去除黏附的重金属离子,超纯水冲洗 3 遍,吸干水分后快速置于 105 °C 烘箱中杀青 10 min,之后 80 °C 烘干至恒重。烘干的样品经研钵研磨过筛之后,采用浓硝酸和过氧化氢消解后利用电感耦合等离子体质谱法(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)测定 Cd 含量^[21],每个处理设 3 个重复。植物中 Cd 的富集系数和转运系数根据如下公式计算:

富集系数(enrichment factor, EF)=植物地上或地下部分 Cd 含量/土壤中 Cd 含量;

转运系数(translocation factor, TF)=植物地上部分 Cd 含量/根部 Cd 含量。

1.3 OjHMA 基因家族成员鉴定和蛋白特征分析

基于 GSA 数据库(<https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa/>)中前期已完成的不同镉浓度水培处理(Cd_0: 0 mg/L; Cd_M: 1 mg/L 和 Cd_H: 10 mg/L)浙麦冬转录组数据(GSA 数据库登录号: CRA008254)^[10],对原始数据进行过滤处理,包括去除接头序列、低质量序列以及重复序列等。因尚无可利用的参考基因组,因此先将原始序列拼接成转录本,并用 Corset 程序对转录本进行层次聚类,将聚类后的序列作为参考序列。随后,采用 RSEM 软件中的 Bowtie2 参数将质控后的测序数据与参考序列进行比对,确定测

序片段的位置。完成比对后,采用 Trinity 软件进行转录本的组装,并计算每个基因的每千个碱基的转录每百万映射读取的片段值(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM),进行基因表达量的标准化,最后使用生物信息学工具将转录本序列翻译成蛋白质序列,作为后续分析的序列。

通过拟南芥基因组数据库 TAIR (<http://www.arabidopsis.org>)获取拟南芥 HMA 蛋白序列,以此为查询序列对浙麦冬进行序列相似性(basic local alignment search tool, BLAST)搜索(相似度 $\geq 50\%$ 、E-value $\leq 10^{-10}$)。同时,借助 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载 HMA 蛋白家族的特征结构域 E1-E2_ATPase (Pfam 数据库登录号: PF00122)、Hydrolase (Pfam 数据库登录号: PF00702)和 HMA (Pfam 数据库登录号: PF00403),利用隐马尔科夫模型(hidden Markov model, HMM)进行同源搜索(E-value $\leq 10^{-5}$)。经以上 2 种方式鉴定后借助在线工具 Smart (<https://smart.embl.de/>)进行结构域校验,删除结构域缺失的序列,最终获得浙麦冬 HMA 基因家族成员。运用 ExpASy (<https://www.expasy.org>)和 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)进行蛋白长度、分子量大小、等电点、稳定性、平均亲水系数和跨膜结构等蛋白特征分析,并进一步借助 Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml>)预测其亚细胞定位。收集浙麦冬 HMA 家族基因在不同浓度镉胁迫下的 FPKM 值,使用 TBtools 软件^[22]中 HeatMap 绘制表达热图,选用 Log Scale 参数进行对数转换,采用 Row Scale 进行归一化,归一化方法选择 Zero To One,并进行 Cluster Rows 行聚类,其他参数设置为默认值。

1.4 系统发育树构建与保守基序分析

按照上述基因家族鉴定方法筛选水稻

(*Oryza sativa*)、伴矿景天(*Sedum plumbizincicola*)、苜蓿(*Medicago truncatula*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、芦笋(*Asparagus officinalis*)和三七(*Panax notoginseng*)的 HMA 蛋白成员。采用 MEGA 内置的 ClustalW 程序对来自浙麦冬、拟南芥、伴矿景天、芦笋、水稻、苜蓿、三七、玉米、大豆、大麦的 114 个 HMA 蛋白序列进行多重序列比对,以邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树,步长(bootstrap)值设定为 1 000^[23],最后导入 iTOL 在线工具(<https://itol.embl.de/>)进行美化。使用 MEME (<https://meme-suite.org>)分析浙麦冬 HMA 蛋白的保守基序,通过 Pfam 数据库中的序列搜索获取其结构域信息,分析结果借助 TBtools 工具进行可视化^[22]。

1.5 浙麦冬 HMA 蛋白结构预测

利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)和 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>)分别构建 HMA 蛋白的二级结构和三维结构。从 Protein Data Bank 数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取 HMA 蛋白 3 个代表性结晶结构 P1B-1 ATPases (LpCopA, PDB 数据库登录号: 3RFU)、P1B-2 ATPases (ZntA, PDB 数据库登录号: 4UMW)和 P1B-4 ATPases (Czcp, PDB 数据库登录号: 4U9R)作为参考,使用 Pymol 软件可视化蛋白质结构,通过用户界面或命令行界面修改模型颜色以更好地呈现蛋白质结构;利用泊松-玻尔兹曼方程(adaptive Poisson-Boltzmann solver, APBS)计算表面静电势能,使用 Plugin-Legacy Plugins-Caver 插件探索潜在的蛋白通道^[24]。

1.6 实时荧光定量聚合酶链式反应分析

利用 Trizol 植物 RNA 提取试剂盒(TaKaRa Biotechnology)提取浙麦冬叶片和根系的 RNA,

通过 Nano-300 超微量分光光度计测定 RNA 的浓度和质量, 并采用 PrimeScript™ RT reagent kit 反转录试剂盒(TaKaRa Biotechnology)合成 cDNA。借助 Premier5.0 软件设计基因特异性引物(表 2), 使用 SYBR Green Master Mix 试剂盒(Toyobo Co., Ltd.)进行实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析。以 *RPL35* (GSA 数据库登录号: Cluster_21637.81227)作为内参基因, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各基因的相对表达量^[25], 每组实验包含 3 个生物学重复。

1.7 数据处理与分析

所有试验数据采用 Microsoft Excel 和 SPSS 软件进行统计分析和显著性检验, 数据以 3 次生物重复的平均值±标准差(mean±SD)表示, 并采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)进行不同处理之间的显著性分析($P < 0.05$), 最终借助 Origin 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 镉胁迫处理下浙麦冬的镉富集迁移特征分析

对浙麦冬‘ZMD’和浙麦冬 1 号‘ZMD-1’进行不同浓度镉处理[0.14 mg/kg (Cd-CK)、0.35 mg/kg

(Cd-1)和 0.61 mg/kg (Cd-2)], 由表 3 可知, 土壤中镉污染程度与浙麦冬不同组织中镉积累程度显著相关。随着镉胁迫浓度的增加, 浙麦冬对镉的积累呈现递增趋势, 且根部的镉含量积累显著高于叶片。就不同品种而言, Cd-2 处理下, ‘ZMD-1’品种的根部镉含量显著高于‘ZMD’, 而在叶片中则表现相反。富集系数是评价植物对重金属吸收和富集能力的重要指标, 在 2 种不同浓度的 Cd 胁迫下, ‘ZMD’和‘ZMD-1’的根部和总的富集系数均大于 1。尤其在 Cd-2 处理组中, ‘ZMD-1’品种根部的富集系数可达 2.50, 显著高于‘ZMD’品种; 而在叶片中的富集系数则表现相反。然而, 这 2 个品种在此浓度下的总富集系数并无显著差异, 这一现象与转运系数有关。在不同镉浓度处理下, ‘ZMD’品种的根-叶的转运系数均显著高于‘ZMD1’, 表明‘ZMD’具有较强的镉离子转运/迁移能力。

2.2 浙麦冬 HMA 基因家族鉴定及蛋白理化性质分析

以拟南芥 HMA 蛋白序列为参考, 借助 BLAST 和 HMM 方法筛选并鉴定获得 9 个浙麦冬 HMA 家族蛋白, 命名为 OjHMA1–OjHMA9 (表 4)。系统发育分析表明, 在 9 个物种中, 浙麦冬与大豆和芦笋 HMA 家族成员的进化分支

表 2 qRT-PCR 的引物序列

Table 2 Primer sequences of qRT-PCR

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>RPL35</i>	CGCCTCTCTCATCTTGCACT	CTTTAGCGACACGGAGGAGG
<i>OjHMA1</i>	TTGGCTTGATGCTAGGTGGG	CTTCTTGACACCGGGACGAA
<i>OjHMA2</i>	GGCGCTCCTCTCTTTGTTCT	TCAGAACCAGGCATGTCACC
<i>OjHMA3</i>	AGGTCTTTCTGCAACACTTT	GTTTTTCATGGCTTCCTTTAT
<i>OjHMA4</i>	TTGTTTTGGCTGCCTGTGAC	TATCCTTTGAGCGGTATTTG
<i>OjHMA5</i>	GAAAAAAATCCAGGAAAAGA	CAGGACTGAGAGAAAACCA
<i>OjHMA6</i>	TGAACCAAAGCACAAGCAAG	GCAATACCAATATCAGCCAA
<i>OjHMA7</i>	CTCCTTCACTCCTCCCCAGT	CTCGGAATTGCCCTTGAGGA
<i>OjHMA8</i>	GGAAACTCATTGCTCCTAAG	AAAACATCACCTCCTCTAAC
<i>OjHMA9</i>	ATGGAGAAGACAATCTAAAA	GAAACTACACAAGAGGCACA

表 3 镉胁迫处理下浙麦冬的镉含量和富集系数、转运系数

Table 3 Cadmium content, enrichment, and transport coefficients of *Ophiopogon japonicus* under cadmium stress treatments

Cultivar	Soil	Cd content (mg/kg)			Enrichment factor			Translocation factor
		Root	Leaf	Total	Root	Leaf	Total	
ZMD	Cd-CK	0.02±0.00 ^c	0.04±0.00 ^c	0.06±0.00 ^d	0.12±0.01 ^f	0.10±0.01 ^c	0.21±0.00 ^d	0.83±0.13 ^a
	Cd-1	0.48±0.02 ^d	0.30±0.01 ^b	0.79±0.02 ^b	1.14±0.05 ^d	0.72±0.02 ^b	1.86±0.04 ^b	0.63±0.04 ^b
	Cd-2	0.98±0.02 ^b	0.60±0.00 ^a	1.58±0.02 ^a	1.70±0.04 ^b	1.05±0.00 ^a	2.75±0.04 ^a	0.62±0.02 ^b
ZMD-1	Cd-CK	0.03±0.00 ^e	0.01±0.00 ^f	0.05±0.00 ^d	0.19±0.01 ^e	0.07±0.00 ^f	0.26±0.01 ^d	0.35±0.03 ^c
	Cd-1	0.57±0.02 ^c	0.09±0.00 ^d	0.66±0.02 ^c	1.35±0.04 ^e	0.20±0.01 ^d	1.55±0.04 ^c	0.15±0.01 ^d
	Cd-2	1.43±0.02 ^a	0.16±0.00 ^c	1.59±0.02 ^a	2.50±0.03 ^a	0.28±0.00 ^c	2.78±0.03 ^a	0.11±0.00 ^d

Different lowercase letters of superscript indicate significant difference between tissues ($P < 0.05$).

表 4 浙麦冬 HMA 蛋白理化性质分析

Table 4 Physicochemical properties of HMA proteins in *Ophiopogon japonicus*

Protein name	Amino acids (aa)	MW (kDa)	pI	Instability index	Gravy	Transmembrane domain	Subcellular localization
OjHMA1	1 031	113.24	6.22	32.86	0.155	8	Plasma membrane
OjHMA2	934	101.03	4.95	41.55	0.178	9	Plasma membrane
OjHMA3	837	89.06	8.29	34.73	0.237	4	Chloroplast
OjHMA4	876	94.66	5.07	34.56	0.350	6	Plasma membrane
OjHMA5	1 042	114.47	6.12	30.37	0.190	10	Endoplasmic reticulum
OjHMA6	907	99.20	5.65	39.28	0.001	5	Plasma membrane
OjHMA7	1 020	111.15	6.30	42.20	0.075	6	Plasma membrane
OjHMA8	893	95.04	6.28	34.42	0.215	3	Chloroplast
OjHMA9	994	107.31	5.58	37.90	0.183	7	Plasma membrane

距离相对较短,提示其亲缘关系较近(图 1)。系统发育树中所有的 HMA 家族成员被划分为 Zn 亚类和 Cu 亚类,并形成 7 个进化分支(I-VII)。其中,浙麦冬 9 个蛋白聚类在 5 个分支中。具体来说, OjHMA1、OjHMA2、OjHMA4、OjHMA5 和 OjHMA6 归类于 I 分支, OjHMA3 位于 III 分支,属于 Zn 亚类; OjHMA7、OjHMA8 和 OjHMA9 则分别位于 VII、IV 和 VI 分支,属于 Cu 亚类。

蛋白特征分析表明(表 4),9 个浙麦冬 HMA 蛋白的长度在 837–1 042 个氨基酸之间,分子量在 89.06–114.47 kDa 之间, OjHMA3 的序列最短,而 OjHMA5 的序列最长。等电点预测分析结果表明,除 OjHMA3 外其余 HMA 成员的

等电点均小于 7,为酸性蛋白, OjHMA3 为碱性蛋白。大部分成员的不稳定系数均小于 40,只有 OjHMA2 和 OjHMA7 家族成员的编码蛋白表现出较低稳定性。所有成员的平均亲水系数均为正值,这意味着其均为疏水蛋白,只是疏水程度有所不同。亚细胞定位预测显示, OjHMA1、OjHMA2、OjHMA4、OjHMA6、OjHMA7 和 OjHMA9 定位于质膜上, OjHMA3 和 OjHMA8 定位于叶绿体,而 OjHMA5 定位于内质网。TMHMM 预测发现 HMA 家族均具有跨膜结构域,数目为 3–10。

2.3 浙麦冬 HMA 蛋白结构域和保守基序分析

为揭示浙麦冬 HMA 蛋白的结构多样性和

功能特征,进行了蛋白结构域和保守基序分析(图 2)。所有 HMA 蛋白均具有典型的 E1-E2_ATPase 和 Hydrolase 结构域,二者与金属离子的转运过程密切相关。在亚类分布上,Zn 亚类的 OjHMA3 只包含 E1-E2_ATPase 和 Hydrolase

这 2 种结构域,而 Cu 亚类的 OjHMA7、OjHMA8 和 OjHMA9 则同时包含 HMA 结构域,显示其可能在 Cd^{2+} 或 Zn^{2+} 的结合及重金属稳态和解毒的调节中具有特定功能^[26]。此外, OjHMA5 和 OjHMA6 蛋白不仅具有 E1-E2_ATPase、Hydrolase

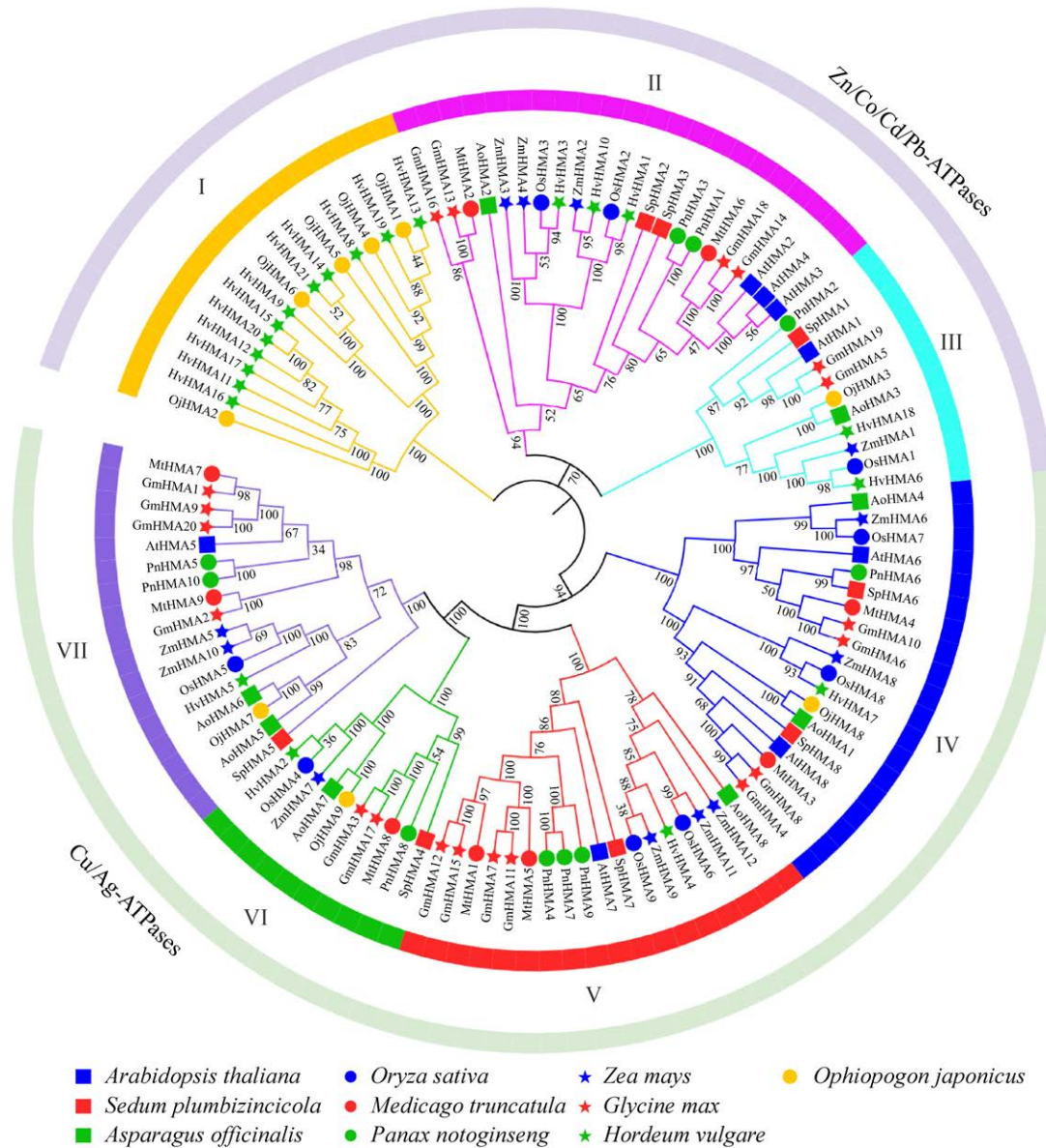


图 1 不同植物 HMA 基因家族的系统发育树 植物物种包括浙麦冬(Oj)、拟南芥(At)、伴矿景天(Sp)、芦笋(Ao)、水稻(Os)、苜蓿(Mt)、三七(Pn)、玉米(Zm)、大豆(Gm)、大麦(Hv)。

Figure 1 Phylogenetic tree of HMA family in *Ophiopogon japonicus* (Oj), *Arabidopsis thaliana* (At), *Sedum plumbizincicola* (Sp), *Asparagus officinalis* (Ao), *Oryza sativa* (Os), *Medicago truncatula* (Mt), *Panax notoginseng* (Pn), *Zea mays* (Zm), *Glycine max* (Gm), and *Hordeum vulgare* (Hv).

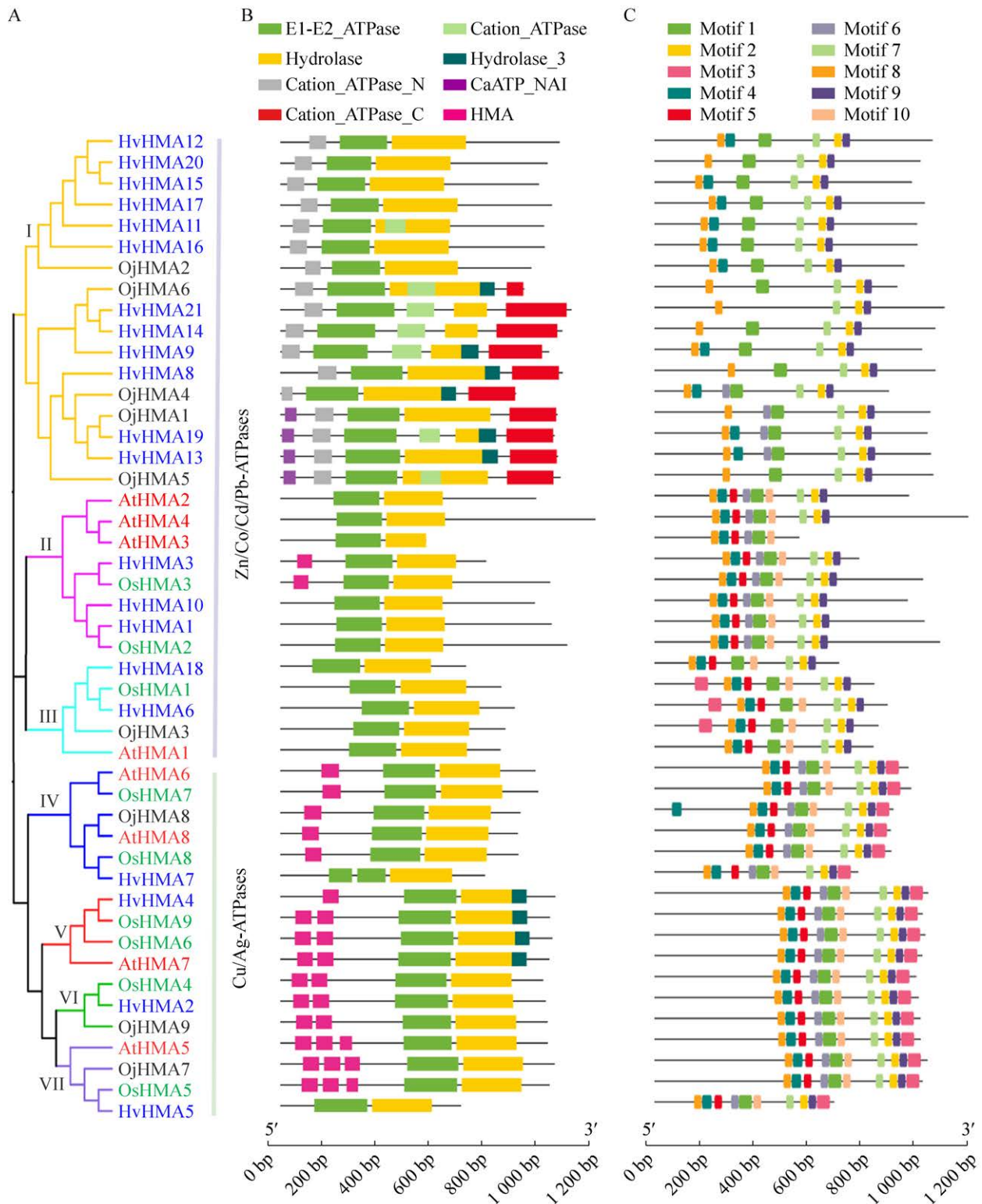


图 2 浙麦冬、拟南芥、水稻和大麦 HMA 基因家族的系统发育树(A)、结构域(B)及保守基序(C)

Figure 2 Phylogenetic tree (A), structural domains (B), and conserved motifs (C) of HMA family in *Ophiopogon japonicas*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Hordeum vulgare*.

结构域,还包括 Cation_ATPase 结构域,该结构域通过磷酸化调节 P 型 ATPase 的功能^[27]。OjHMA1、OjHMA4、OjHMA5 和 OjHMA6 含有 Cation_ATPase_N 和 Cation_ATPase_C 特异结构域,该结构域参与磷酸酶的形成和离子的结合与释放^[28]。相比之下,OjHMA2 仅含有 Cation_ATPase_N 结构域,提示其功能可能受限于缺失 C-末端的调控结构。OjHMA1 和 OjHMA5 还包括 CaATP_NAI 结构域,该结构域是 Ca²⁺-ATPase 的一个独特的 N 端结构域,参与调控 Ca²⁺与 ATP 酶的结合^[29]。OjHMA4 和 OjHMA6 蛋白包括 Hydrolase_3 结构域,这是卤代酸脱卤酶水解酶的一部分,参与特定的水解反应^[30]。保守基序分析显示,motif 1、motif 2、motif 7、motif 8、motif 9 在所有家族成员中高度保守,表明这些基序在 HMA 蛋白功能中扮演重要的角色(图 2)。不同亚类分支的基序间存在明显差异,如第 II-VII 分支中 OjHMA 蛋白存在 motif 3、motif 5 和 motif 10,表明这些基序可能在金属离子转运和功能调控过程中发挥特定作用。

2.4 浙麦冬 HMA 蛋白结构预测和拓扑结构分析

二级结构预测分析显示,浙麦冬 HMA 蛋白主要由 α -螺旋、 β -转角、无规卷曲和延伸链

等结构组成(表 5),其中 α -螺旋结构在 HMA 蛋白中的占比均超过 40%,而 β -转角结构占比较低,不超过 10%。该结构特征表明 HMA 蛋白在保持结构稳定性和功能多样性方面具有独特优势。进一步拓扑结构分析显示,除 6 个核心螺旋(TM1-TM6)外,P1B-1 ATPases 和 P1B-2 ATPases 还有 2 个额外的螺旋(TMA 和 TMB),TM4 中的特征序列以及 TM5 和 TM6 中的氨基酸可以确定离子选择性。A 功能域位于 TM2 和 TM3 之间,包含一个小胞质环,类似于闸门机制,主要负责调控离子的吸收与释放;P 功能域和 N 功能域形成一个大的胞质环,位于 TM4 和 TM5 螺旋之间,共同完成磷酸化和 ATP 结合,为跨膜运输提供能量^[13]。在浙麦冬中,OjHMA7、OjHMA8、OjHMA9 属于 P1B-1 ATPases 亚组,而 OjHMA3 属于 P1B-4 ATPases 亚组,未发现任何浙麦冬 HMA 蛋白成员归类于 P1B-2 ATPases 亚组(图 3)。P1B-1 ATPases 亚组的特征在于 TM4(CPC)、TM5(YN[X]₄P)和 TM6(M[XX]SS)特征基序(其中“X”可以是任何残基);P1B-2 ATPases 有 TM4(CPC)、TM5(K)中的保守赖氨酸以及 TM6(DXTG)基序,并含有独特的 C 端金属结合域(C-terminal metal binding domain, C-MBD);浙麦冬 OjHMA3 编码的 P1B-4

表 5 浙麦冬 HMA 蛋白的二级结构

Table 5 Secondary structure of the HMA protein in *Ophiopogon japonicas*

Protein name	Metal specificity	Alpha helix (%)	Beta turn (%)	Extended strand (%)	Random coil (%)	Secondary structure element distribution
OjHMA1	Zn/Co/Cd/Pb	43.94	7.47	18.43	30.16	
OjHMA2	Zn/Co/Cd/Pb	47.97	4.82	14.67	32.55	
OjHMA3	Zn/Co/Cd/Pb	42.17	5.85	16.01	35.96	
OjHMA4	Zn/Co/Cd/Pb	41.78	7.08	21.80	29.34	
OjHMA5	Zn/Co/Cd/Pb	43.95	7.01	18.33	30.71	
OjHMA6	Zn/Co/Cd/Pb	44.65	6.28	15.88	33.19	
OjHMA7	Cu/Ag	41.08	7.65	18.53	32.75	
OjHMA8	Cu/Ag	41.99	6.61	17.02	34.38	
OjHMA9	Cu/Ag	40.85	8.65	18.41	32.09	

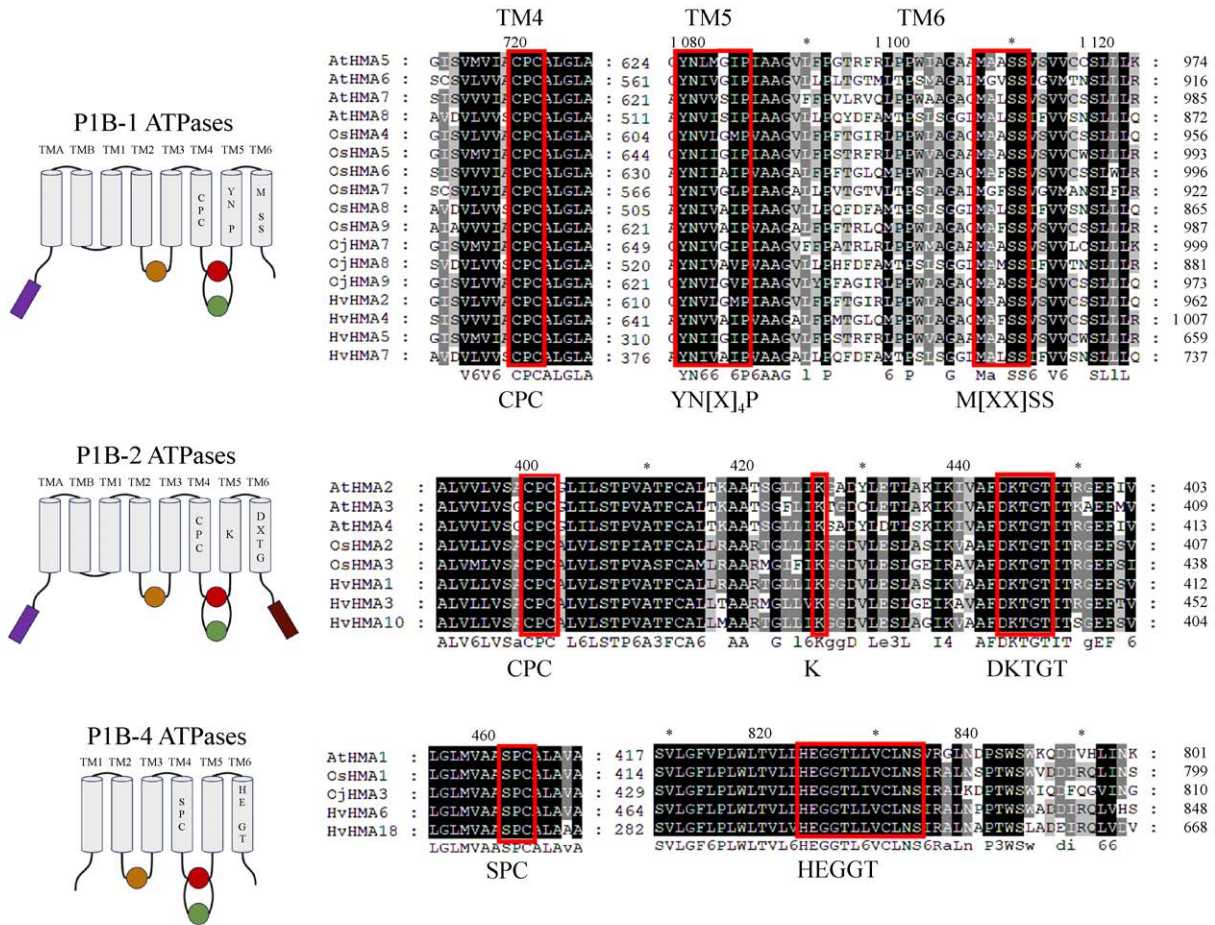


图3 浙麦冬、拟南芥、水稻和大麦 HMA 蛋白的拓扑结构 红框表示保守结构域。

Figure 3 Topology of the HMA protein in *Ophiopogon japonicas*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Hordeum vulgare*. The red box indicated conserved domains.

ATPases 则表现出广泛的金属离子转运特性，其特征在于 TM4 中的 SPC 基序和 TM6 中的 HE[X]GT 基序。

2.5 OjHMA 对不同重金属处理的响应特征分析

为了筛选镉胁迫下参与镉离子转运调控的关键基因，对不同浓度的镉胁迫处理下 OjHMA 的表达响应进行了热图分析，结果显示，OjHMA6、OjHMA8 和 OjHMA9 表达模式一致，在中镉和高镉胁迫下的表达量均显著下调(图 4)。而 OjHMA1、OjHMA2、OjHMA3 和 OjHMA7 在中镉和高镉胁迫下的表达量明显上调，且

OjHMA1 和 OjHMA7 在高镉胁迫后的上调倍数高于中镉胁迫。同时使用 qRT-PCR 方法对这 9 个 OjHMA 基因的表达进行检测发现，qRT-PCR 检测结果与转录组分析结果呈高度一致， R^2 达到 0.80。在此基础上，进一步对土壤条件下不同浓度镉胁迫后 OjHMA1、OjHMA2、OjHMA3 和 OjHMA7 基因表达进行了验证，结果表明(图 5)，在 Cd-1 和 Cd-2 胁迫下这 4 个基因的表达量均显著增加，与水培结果高度一致。因此，初步推测 OjHMA1、OjHMA2、OjHMA3 和 OjHMA7 是响应浙麦冬中参与镉吸收、转运和富集的关键基因。

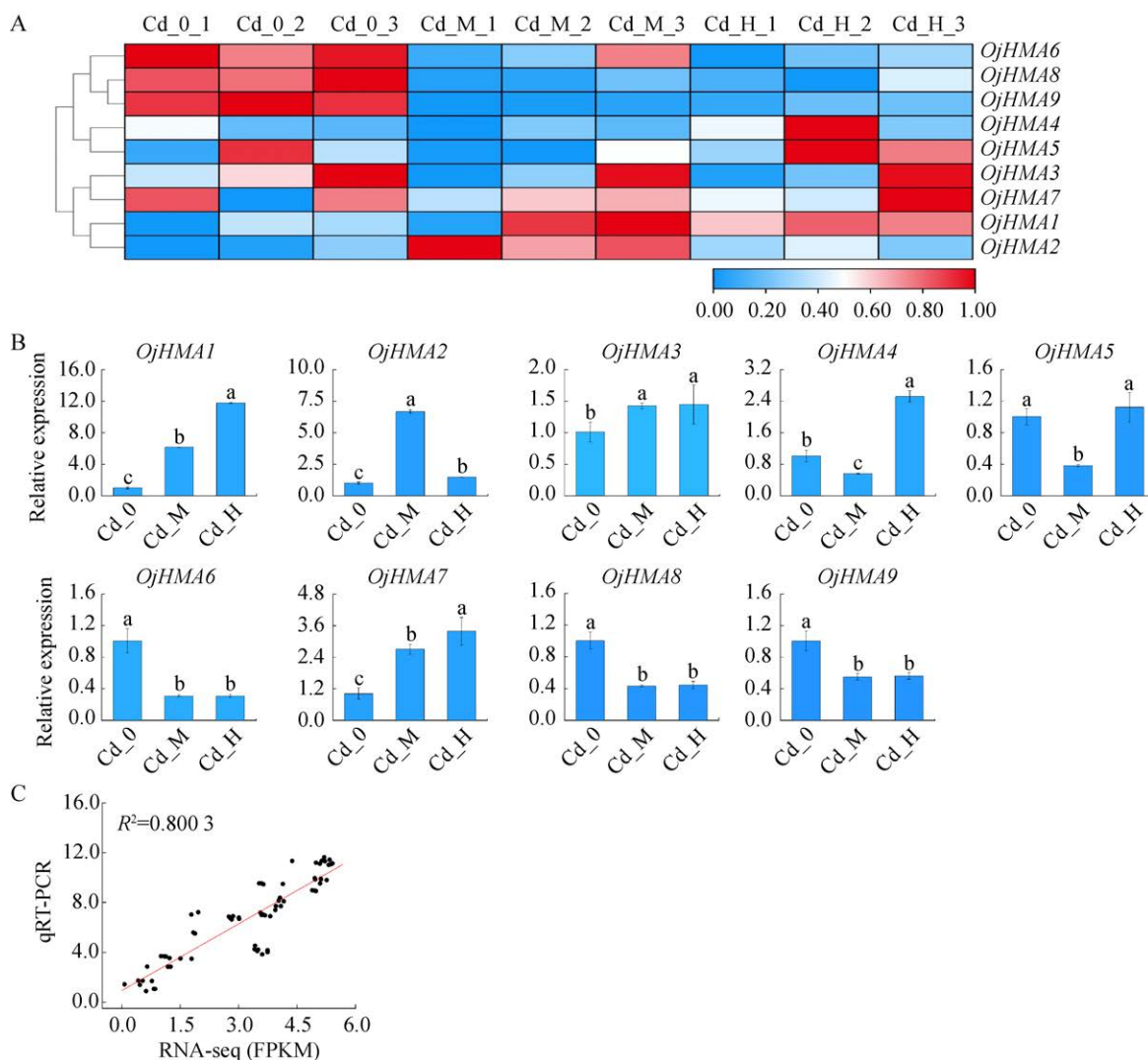


图 4 镉胁迫水培条件下 **OjHMA** 基因的表达模式 A: 转录组分析镉胁迫下 **OjHMA** 基因的表达趋势。转录组水平的表达通过 FPKM 值进行归一化。B: RNA-seq 与 qRT-PCR 基因表达比值比较。Cd_0、Cd_M 和 Cd_H 分别代表对照组(0 mg/L)、中度(1 mg/L)和高度(10 mg/L)镉胁迫组。qRT-PCR 表达量以 *RPL35* 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算, 不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。C: RNA-seq 与 qRT-PCR 基因表达数据相关性分析。x 轴和 y 轴分别表示以转录组和 qRT-PCR 测定的各基因表达水平, R^2 表示 qRT-PCR 和 RNA-seq 的相关系数。

Figure 4 Expression pattern of OjHMA genes in cadmium-stressed hydroponic condition. A: Transcriptomes and analysis of OjHMA gene expression trends under cadmium stress. Transcriptome level expression was normalized by FPKM value. B: Comparison between the gene expression obtained from RNA-seq and qRT-PCR. Cd_0, Cd_M and Cd_H represent control (0 mg/L), moderate (1 mg/L) and high (10 mg/L) cadmium stress groups, respectively. qRT-PCR expression was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, using *RPL35* as the internal reference. Different letters indicated significant differences between treatments ($P<0.05$). C: Correlation coefficient between RNA-seq and qRT-PCR. The x-axis and y-axis represent the expression levels of genes measured by transcriptome and qRT-PCR, respectively, and R^2 represents the correlation coefficients of qRT-PCR and RNA-seq.

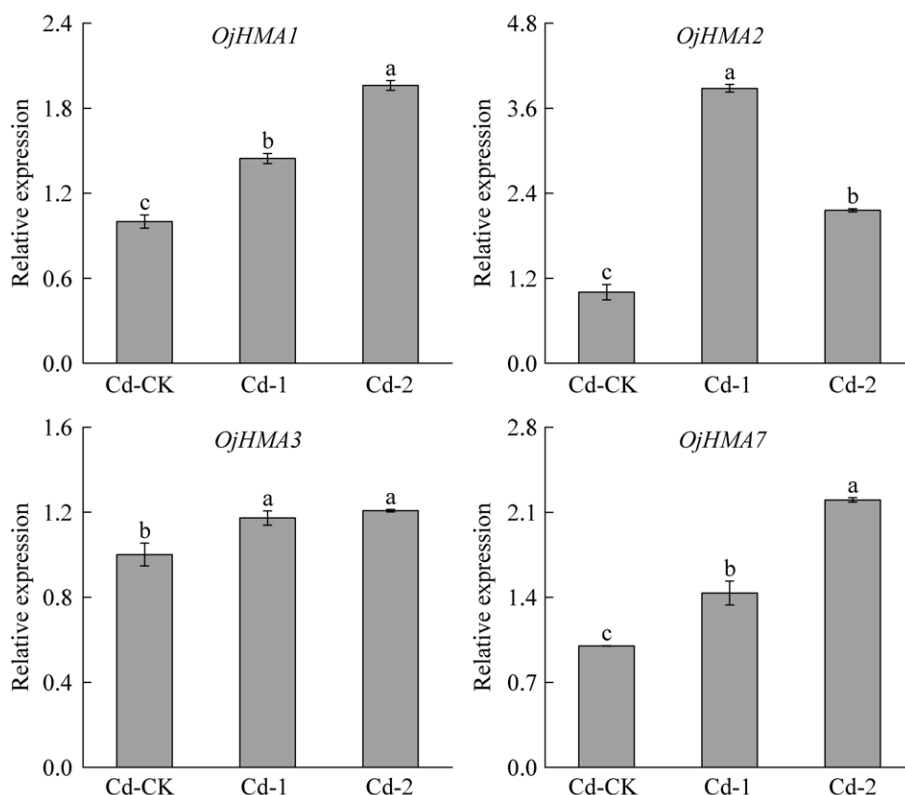


图5 镉胁迫土培条件下 *OjHMA1*、*OjHMA2*、*OjHMA3* 和 *OjHMA7* 基因的表达趋势 Cd-CK、Cd-1 和 Cd-2 表示镉含量分别为 0.14 mg/kg、0.35 mg/kg 和 0.61 mg/kg 的土壤培养处理。每组测定包含 3 次重复，不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Figure 5 Expression trend of *OjHMA1*, *OjHMA2*, *OjHMA3*, and *OjHMA7* genes in cadmium-stressed soil culture. Cd-CK, Cd-1, and Cd-2 denote soil cultivation treatments of 0.14 mg/kg, 0.35 mg/kg, and 0.61 mg/kg Cd. Each assay contained 3 replicates, with different letters indicating significant differences between treatments ($P < 0.05$).

为了解析候选基因 *OjHMA1*、*OjHMA2*、*OjHMA3* 和 *OjHMA7* 在其他重金属胁迫时的响应表达模式，对浙麦冬实施了铜、铁、锌和锰等多种重金属胁迫处理，包括 Cu-L (10 mg/kg)、Cu-H (100 mg/kg)、Fe-L (2 mg/kg)、Fe-H (20 mg/kg)、Mn-L (10 mg/kg)、Mn-H (100 mg/kg)、Zn-L (25 mg/kg)、Zn-H (250 mg/kg)。qRT-PCR 结果表明，*OjHMA1*、*OjHMA2*、*OjHMA3* 和 *OjHMA7* 在响应 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 重金属胁迫时，表现出明显的器官差异性(图 6)，大多数基因在叶片中表达呈多样变化趋势，而在

根部除 Zn-H 处理外，4 个候选基因均呈现显著上调表达，这可能由于 Zn-H 浓度已超出植株根可承受的范围。以上结果表明，*OjHMA1*、*OjHMA2*、*OjHMA3* 和 *OjHMA7* 可能参与了重金属在浙麦冬体内的转运和耐受机制。

2.6 OjHMA 金属离子结合与释放位点分析

为进一步分析 HMA 转运金属离子的关键活性位点，首先对浙麦冬 HMA 蛋白的三级结构进行了预测，该蛋白家族成员的空间结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成， β -转角和延伸链

分布于整个蛋白序列中,起辅助修饰作用(图 7)。所有 HMA 蛋白均为单体蛋白且结构相似。为明确 HMA 蛋白中参与金属离子结合的关键残基,选择 P1B-1 ATPases 亚组中的浙麦冬 *OjHMA7*、P1B-4 ATPases 亚组中的浙麦冬 *OjHMA3*,并以水稻 *OsHMA3* 作为 P1B-2 ATPases 亚组代表,进行离子进出结合位点的详细分析(图 8)。跨膜结构域 TM4、TM5 和 TM6 中的残基在金属离子的高亲和力结合过程中起关键作用,而 TM1、TM2 则发挥“看门人”作用,防止金属离子从高亲和力位点逆流^[31]。跨膜片段上存在着与金属离子结合位点以及调节转运金属离子的结构域序列,这些关键的功能位点决定了其转运金属

离子的类型。在浙麦冬中, *OjHMA3* 的高亲和力结合位点包括 S422、C424 和 H778,金属离子与这些结合位点发生相互作用; *OjHMA7* 中由 C642、C644、Y955 和 M984 形成的高亲和力位点可能促进金属伴侣的结合。金属离子的释放通常发生在蛋白质的内部结构中,通过特定的通道或依赖蛋白质的构象变化来实现。在浙麦冬 *OjHMA* 蛋白家族中,金属离子的释放可能通过 TM5 和 TM6 共同排列形成的通道来实现。通过这些精确的进入、结合和释放位点, P1B-ATPases 重金属转运蛋白高效地实现了金属离子的转运与调控,对细胞内金属离子的平衡和稳定性至关重要。

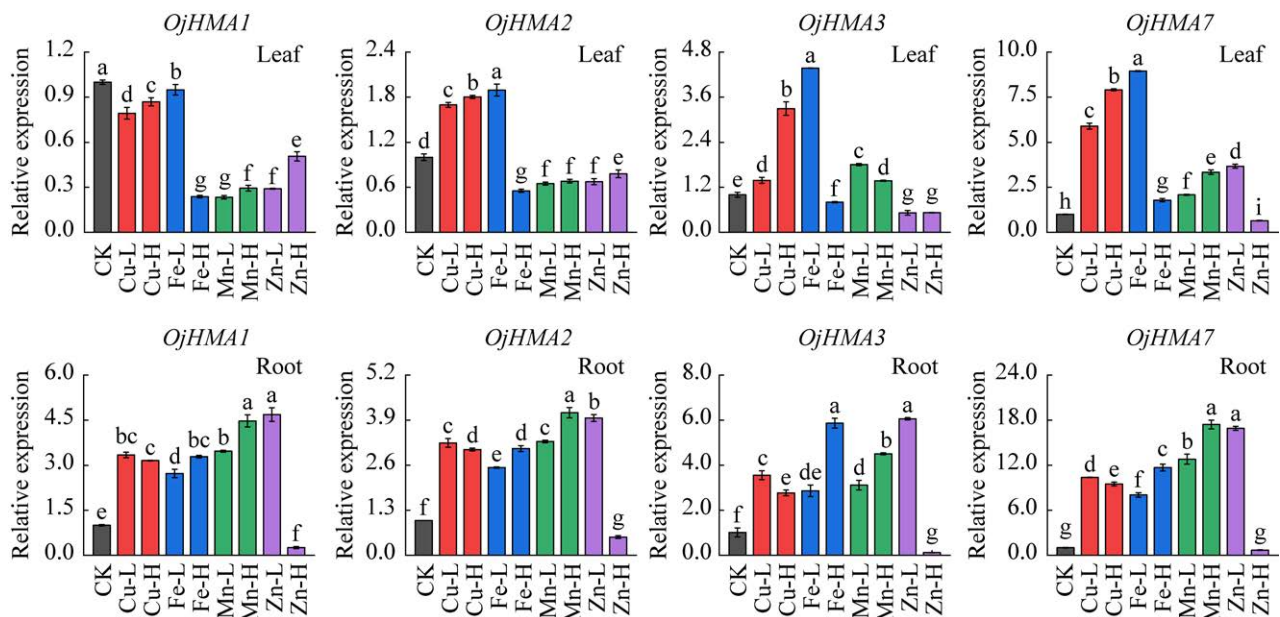


图 6 *OjHMA1*、*OjHMA2*、*OjHMA3* 和 *OjHMA7* 基因在重金属处理下的表达变化 铜、铁、锌和锰等重金属处理包含 Cu-L (10 mg/kg)、Cu-H (100 mg/kg)、Fe-L (2 mg/kg)、Fe-H (20 mg/kg)、Mn-L (10 mg/kg)、Mn-H (100 mg/kg)、Zn-L (25 mg/kg)和 Zn-H (250 mg/kg)。每组测定包含 3 次重复,不同字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 6 Expression changes of *OjHMA1*, *OjHMA2*, *OjHMA3*, and *OjHMA7* genes under heavy metal treatment. Copper, iron, zinc, and manganese treatment including Cu-L (10 mg/kg), Cu-H (100 mg/kg), Fe-L (2 mg/kg), Fe-H (20 mg/kg) mg/kg, Mn-L (10 mg/kg), Mn-H (100 mg/kg), Zn-L (25 mg/kg), and Zn-H (250 mg/kg). Each assay contained 3 replicates, with different letters indicating significant differences between treatments ($P < 0.05$).

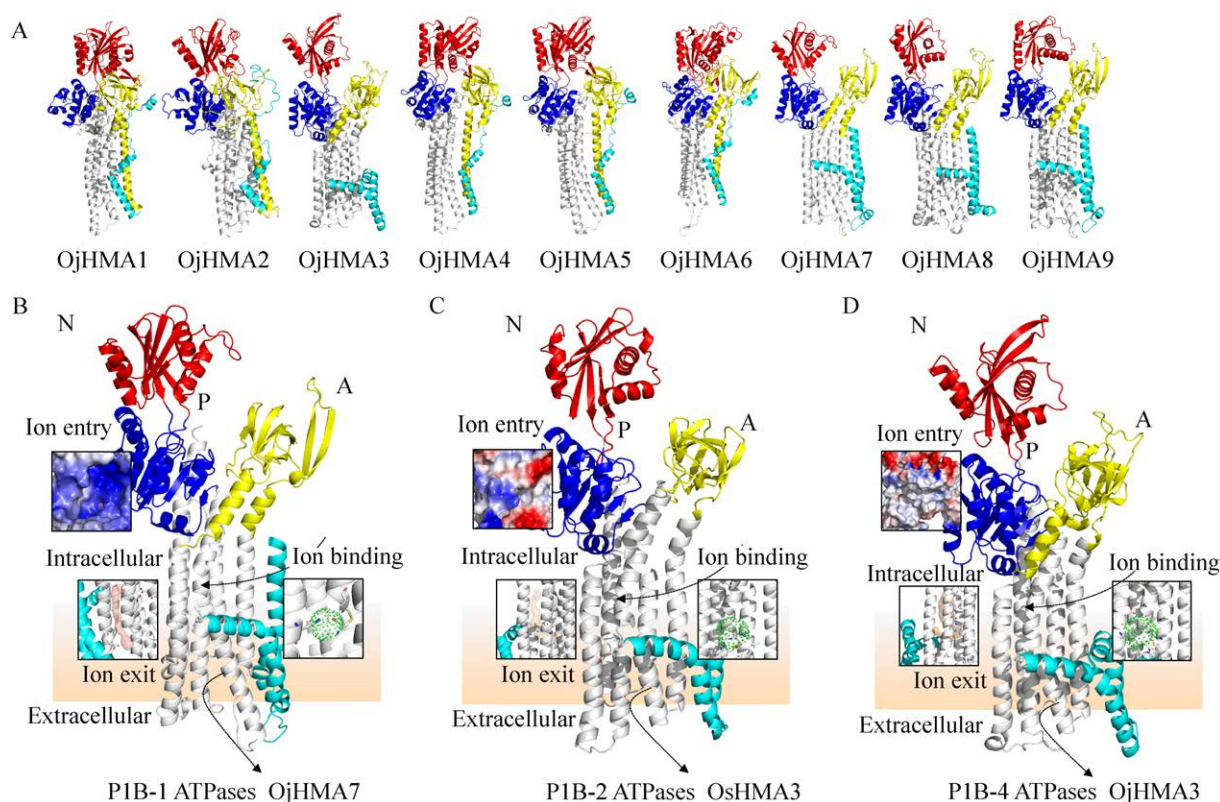


图7 浙麦冬 HMA 家族的三维结构(A)及 P1B-1 ATPases (B)、P1B-2 ATPases (C)、P1B-4 ATPases (D) 蛋白结构 跨膜结构域 TMA、TMB 用青色标出, TM1-TM6 的螺旋用灰色标出, A、P 和 N 功能域分别用黄色、蓝色和红色标出。

Figure 7 Tertiary structure of HMA family members of *Ophiopogon japonicas*(A) and protein structures of P1B-1 ATPases (B), P1B-2 ATPases (C), and P1B-4 ATPases (D). The transmembrane structural domains TMA, and TMB are indicated in cyan, the helices of TM1-TM6 are indicated in gray, the A, P, and N functional domains are indicated in yellow, blue, and red, respectively.

3 讨论

浙麦冬以其多重生态优势如常绿性、耐寒、耐旱及抗病虫害特性,加之其发达的根系系统,成为城市绿化的优选植物。本研究在前期研究基础上进一步探讨了镉胁迫条件下浙麦冬的富集与迁移特征。本研究中的 2 个浙麦冬品种的总富集系数均在 2.75 以上,具有较强的镉富集能力。此外,随着土壤中镉浓度的提高,浙麦冬的根部和叶片的镉积累量均显著增加,特别是根部的积累量显著高于叶片。这一结果与蓖麻^[32]和茶树^[33]的相关研究结果相似,表明植物

根系对镉具有较强的富集能力。在镉胁迫处理下,油菜的根部、茎叶和籽粒的富集系数均表现出较强的镉富集能力^[34]。在本研究中,这 2 个品种相比较,浙麦冬 1 号‘ZMD-1’在 Cd-2 胁迫下的根部富集系数显著高于浙麦冬,表明其可能具有更优越的镉稳定性和富集能力。两个品种在镉胁迫处理下总富集系数并无显著差异,这可能归因于‘ZMD-1’品种中较低的根-叶转运系数。此外,与前人在八宝景天和龙葵上的研究结果相比,‘ZMD’和‘ZMD-1’这 2 个品种的镉转运系数均较低^[35-37]。据报道,一些植物在根部积累大量重金属离子,限制重金属离子向

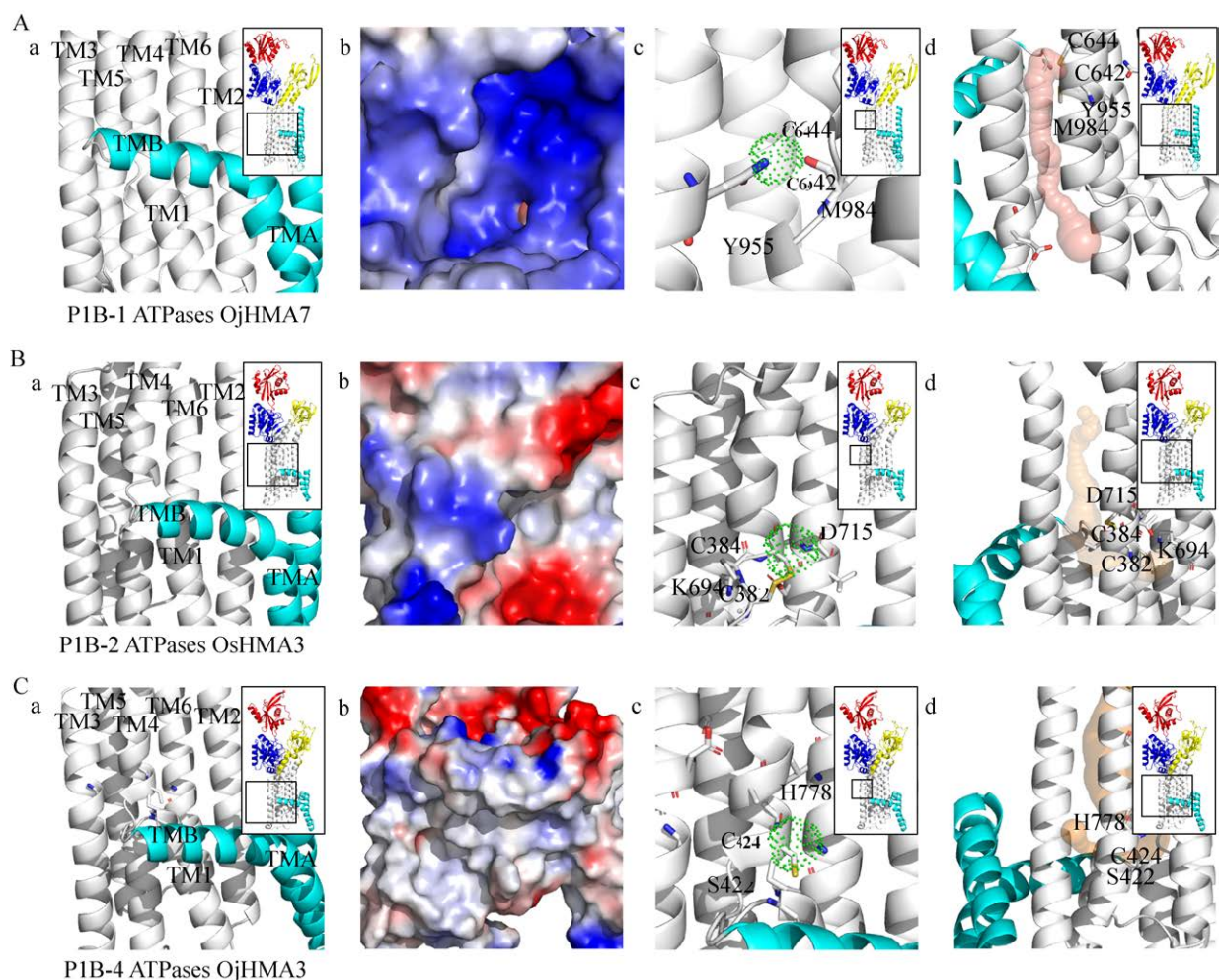


图 8 P1B-1 ATPases (A)、P1B-2 ATPases (B)和 P1B-4 ATPases (C)的关键残基 a: 蛋白质结构; b: 离子进入; c: 离子结合; d: 离子释放。

Figure 8 Key residues of P1B-1 ATPases (A), P1B-2 ATPases (B), and P1B-4 ATPases (C). a: Protein structure; b: Ion entry; c: Ion binding; d: Ion release.

地上部运输,从而使地上部分的器官免受重金属毒害,一定程度上提高了植物的重金属耐受性^[38]。浙麦冬较低的转运系数提示其可能通过限制镉向地上部分的转运来减少镉的毒性效应,从而提高对镉的耐受性,结合其较强的镉富集能力,浙麦冬在土壤镉污染修复中显示出良好的镉富集潜力。

通过对浙麦冬转录组数据的挖掘,鉴定了9个浙麦冬HMA蛋白成员,分为Zn和Cu亚类,与拟南芥^[13]、水稻^[13]、伴矿景天^[39]、苜

蓿^[40]和大豆^[41]等其他植物物种中的HMA家族分类一致。在镉胁迫处理下,*OjHMA1*、*OjHMA2*、*OjHMA3*和*OjHMA7*的表达量显著上调,提示这些基因可能直接参与镉的吸收、转运和富集过程。其中,*OjHMA1*和*OjHMA2*与已知具有 Cd^{2+} 转运潜能的大麦*HvHMA*基因处于同一进化分支,进一步提示其在 Cd^{2+} 转运中存在潜在作用^[42]。此外,*OjHMA3*与*AtHMA1*亲缘关系密切,后者已在酵母中被发现能够参与重金属解毒并减轻高浓度 Cd^{2+} 对细胞的危

害; 并且 *AtHMA1* 在 $\Delta ycf1$ 突变酵母中表达增强, 对 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 的抗性提高, 且这些金属离子能够激活 *AtHMA1* 的 ATP 酶活性^[43]; 同样, *OsHMA1* 也显示出在 Cd^{2+} 诱导下表达上调的特性, 这一结果与 *OjHMA3* 在镉胁迫下表达量显著上调的定量检测结果一致^[44], 表明 *OjHMA3* 可能参与 Cd^{2+} 的转运。

浙麦冬 HMA 蛋白均为单体蛋白, 主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成, β -转角和延伸链分布于整个蛋白序列中, 起辅助修饰作用。HMA 蛋白的二级和三级结构表现出高度保守性, 这一特征赋予了 HMA 蛋白优异的结构稳定性和功能多样性。在浙麦冬中, *OjHMA7*、*OjHMA8*、*OjHMA9* 属于 P1B-1 亚组, 而 *OjHMA3* 属于 P1B-4 亚组, 没有相应的 HMA 成员归属在 P1B-2 亚组(图 3)。拓扑结构分析结果显示, 浙麦冬 *OjHMA* 蛋白都含有 HMA 家族特有的 N 端或 C 端可溶性金属结合域, 以及负责调节离子吸收与释放的 A 功能域, 该功能域位于跨膜螺旋 TM2 和 TM3 之间的小胞质环。同时, P 功能域和 N 功能域主要集中在 TM4 和 TM5 之间, 这些域负责磷酸化和 ATP 结合, 为跨膜运输提供必要的能量。跨膜结构域 TM4、TM5 和 TM6 的残基在金属离子的结合过程中扮演着关键角色。这些残基表现出与金属离子的高亲和力, 这一机制可能受到蛋白特有电负性结构的影响, 形成一个高效的离子捕获通道(图 8)。此外, TM1 和 TM2 区域的残基具有“看门人”的功能, 防止已结合的金属离子逆流, 确保离子的单向传递(图 8)。金属离子的释放过程同样关键, 通常在蛋白质的内部结构通过特定通道进行。在浙麦冬 HMA 中, 金属离子的释放位点可能通过由 TM5 和 TM6 排列的通道完成, 涉及蛋白构象的显著变化。当细胞内金属离子浓度过高或需要将其排出时, 这些构象变化允许金

属离子从高亲和位点解离, 并通过跨膜通道移动到细胞外或细胞内的其他区域(图 8)。这种精确的调控机制不仅保证了细胞内外环境的金属离子平衡, 也是 P1B-ATPases 重金属转运蛋白展现其跨膜转运功能的关键。

针对 P1B-1 ATPases 亚组的浙麦冬 *OjHMA7*、P1B-4 ATPases 亚组的浙麦冬 *OjHMA3*, 以及作为 P1B-2 ATPases 亚组代表的水稻 *OsHMA3* 进行了详细的金属离子结合位点分析, 发现 HMA 蛋白中存在若干保守序列, 如 CPC/SPC、DKTGT 和 HE[X]GT, 这些序列在金属离子配位与转运中起着关键作用。在 P1B-1 ATPases 亚组的浙麦冬 *OjHMA7* 的 TM 螺旋上中存在保守 CPC 序列及 M[XX]SS 保守序列(图 3), 前人报道 CPC 序列的 2 个半胱氨酸残基(Cys)可与 M[XX]SS 中的蛋白氨酸残基(Met)通过三角形配位方式与金属离子形成稳定结合^[45], 在金属离子结合和运输中发挥核心作用。在拟南芥中的研究发现, 该基序的突变会导致 *AtHMA4* 中的转运功能消失^[46]。此外, *HMA7* 中保守序列 YN[X]₄P 中的酪氨酸残基 Tyr 和天冬酰胺残基 Asn, 可以与 M[XX]SS 中的保守蛋氨酸残基 Met 和丝氨酸残基 Ser 共同参与金属离子的结合^[47]。水稻 *OsHMA3* 中的保守基序 DKTGT 中磷酸化的天冬氨酸位点对 HMA 的 ATP 酶催化活性和金属转运活性至关重要, 并被预测为催化过程中由活化酶稳定磷酸化的保守残基^[48]。将保守基序 DKTGT 中的氨基酸 D 突变成 A 之后, 番茄 *SlHMA1* 则丧失了其镉转运活性^[49]。在 P1B-4 ATPases 亚组的浙麦冬 *OjHMA3* 中, TM4 螺旋的 SPC 序列以四面体配位的方式协调金属离子的转运^[50]。此外, 金属结合的机制还涉及到保守基序 SPC 中的半胱氨酸残基 Cys 和 HE[X]GT 中组氨酸残基 His, 据报道 His 基序可提供多个氮原子, 与金属离子形成稳定的配

合物, 扮演金属结合位点的角色, 使其能够与金属离子相互作用, 并实现金属的运输、调控或解毒等功能。这些保守序列和结合位点的深入分析不仅加深了对植物金属离子调控机制的理解, 而且为未来开发和培育具有高效金属离子吸附和耐受性的浙麦冬新品种提供了理论基础和新的研究方向, 有助于促进植物生物技术与环境治理与农业可持续发展中的应用。

4 结论

浙麦冬在镉胁迫下展现出显著的镉富集能力, 特别是其根部具有作为生物修复植物的高效潜力。在浙麦冬共鉴定出 9 个 HMA 基因 *OjHMA1*–*OjHMA9*, 该类基因主要参与植物体内重金属稳态的调控。其中 *OjHMA1*、*OjHMA2*、*OjHMA3* 和 *OjHMA7* 在镉胁迫下显著上调表达, 提示这些基因在镉的吸收和转运过程中起正向调节作用, 同时也受铜、铁、锌和锰等重金属离子的诱导表达。拓扑结构和功能域分析揭示了其特有的金属结合域以及调节离子吸收与释放的 A、P 和 N 功能域。这些功能域内的特定跨膜结构序列, 如 TM4 的 CPC、TM5 的 YN[X]₄P 和 TM6 的 M[XX]SS, 是金属离子结合和稳定的关键。本研究利用分子对接技术解析了这些序列在金属离子配位中的功能, 特别强调了 CPC/SPC、DKTGT 和 HE[X]GT 等关键保守序列在金属离子的高效配位和稳定中扮演的重要角色。下一步将围绕候选基因开展功能验证, 探索对镉吸附和耐受性具有决定作用的分子靶点, 以期为培育具有高镉吸附能力的新品种提供理论支撑。

REFERENCES

- [1] 曾思燕, 于昊辰, 马静, 刘俊娜, 陈浮. 中国耕地表层土壤重金属污染状况评判及休耕空间权衡[J]. 土壤学报, 2022, 59(4): 1036-1047.
- [2] 李静, 岳小琳, 程月红, 鲍连艳, 于艳艳, 任雪梅. 土壤重金属污染现状及其对蔬菜重金属残留影响的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5299-5305.
- [3] 樊霆, 叶文玲, 陈海燕, 鲁洪娟, 张颖慧, 李定心, 唐子阳, 马友华. 农田土壤重金属污染状况及修复技术研究[J]. 生态环境学报, 2013, 22(10): 1727-1736.
- [4] FAN T, YE WL, CHEN HY, LU HJ, ZHANG YH, LI DX, TANG ZY, MA YH. Review on contamination and remediation technology of heavy metal in agricultural soil[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2013, 22(10): 1727-1736 (in Chinese).
- [5] WEI SH, ZHOU QX, KOVAL PV. Flowering stage characteristics of cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their significance to phytoremediation[J]. Science of the Total Environment, 2006, 369(1/2/3): 441-446.
- [6] DENG DM, DENG JC, LI JT, ZHANG J, HU M, LIN Z, LIAO B. Accumulation of zinc, cadmium, and lead in four populations of *Sedum alfredii* growing on lead/zinc mine spoils[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(6): 691-698.
- [7] LI JT, DENG DM, PENG GT, DENG JC, ZHANG J, LIAO B. Successful micropropagation of the cadmium hyperaccumulator *Viola baoshanensis* (Violaceae)[J]. International Journal of Phytoremediation, 2010, 12(8): 761-771.
- [8] CHEN MH, CHEN XJ, WANG M, LIN LG, WANG YT. *Ophiopogon japonicus*: a phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 181: 193-213.
- [9] 唐丽清. 北京城区道路绿地不同绿化模式植物重金属富集效能研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [10] TANG LQ. Study on the enrichment efficiency of heavy metals in plants under different greening patterns in Beijing urban road green space[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2014 (in Chinese).
- [11] 陈雪, 郑志鑫, 石青, 张凤娟. AMF 和植物富集土壤中铅和镉的效应[J]. 菌物研究, 2017, 15(1): 33-38, 52.
- [12] CHEN X, ZHENG ZX, SHI Q, ZHANG FJ. Effect of AMF and plants on accumulation of Pb and Cd in soil[J]. Journal of Fungal Research, 2017, 15(1): 33-38, 52 (in Chinese).
- [13] ZHAO Q, LI Q, LIN ST, HOU RJ, LIU JY, TAO YC, LI Y, ZHOU YF, YE ZH, YU XP, HUANG J. *De novo* transcriptome combined with physiological analyses

- revealed key genes for cadmium accumulation in Zhe-Maidong (*Ophiopogon japonicus*)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1078330.
- [11] 安鹏虎, 张多民, 周子方, 韩丹, 许自成, 黄五星. 植物重金属转运蛋白 P1B-ATPases 研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3020-3030.
AN PH, ZHANG DM, ZHOU ZF, HAN D, XU ZC, HUANG WX. Advances in plant heavy metal transporter P1B-ATPases[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(9): 3020-3030 (in Chinese).
- [12] ARGÜELLO JM, EREN E, GONZÁLEZ-GUERRERO M. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases[J]. *Biometals*, 2007, 20(3/4): 233-248.
- [13] WILLIAMS LE, MILLS RF. P1B-ATPases—an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(10): 491-502.
- [14] LI DD, XU XM, HU XQ, LIU QG, WANG ZC, ZHANG HZ, WANG H, WEI M, WANG HZ, LIU HM, LI CH. Genome-wide analysis and heavy metal-induced expression profiling of the HMA gene family in *Populus trichocarpa*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1149.
- [15] SMITH AT, SMITH KP, ROSENZWEIG AC. Diversity of the metal-transporting P1B-type ATPases[J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2014, 19(6): 947-960.
- [16] ØSTERBERG JT, PALMGREN M. Heavy metal pumps in plants: structure, function and origin[M]// *Advances in Botanical Research*. Amsterdam: Elsevier, 2018: 57-89.
- [17] SUN CJ, YANG M, LI Y, TIAN JJ, ZHANG YY, LIANG LM, LIU ZH, CHEN K, LI YT, LV K, LIAN XM. Comprehensive analysis of variation of cadmium accumulation in rice and detection of a new weak allele of OsHMA3[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(21): 6389-6400.
- [18] TAKAHASHI R, BASHIR K, ISHIMARU Y, NISHIZAWA NK, NAKANISHI H. The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(12): 1605-1607.
- [19] YAMAJI N, XIA JX, MITANI-UENO N, YOKOSHO K, MA JF. Preferential delivery of zinc to developing tissues in rice is mediated by P-type heavy metal ATPase OsHMA2[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 927-939.
- [20] LEE S, KIM YY, LEE Y, AN G. Rice P1B-type heavy-metal ATPase, OsHMA9, is a metal efflux protein[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(3): 831-842.
- [21] PAN JY, GUAN MY, XU P, CHEN MX, CAO ZZ. Salicylic acid reduces cadmium (Cd) accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) by regulating root cell wall composition via nitric oxide signaling[J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 797: 149202.
- [22] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [23] NEWMAN L, DUFFUS ALJ, LEE C. Using the free program MEGA to build phylogenetic trees from molecular data[J]. *The American Biology Teacher*, 2016, 78(7): 608-612.
- [24] MASAND VH, RASTIJA V. PyDescriptor: a new PyMOL plugin for calculating thousands of easily understandable molecular descriptors[J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2017, 169: 12-18.
- [25] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] HUANG GY, HU YN, LI FX, ZUO XR, WANG XY, LI FY, LI RM. Genome-wide characterization of heavy metal-associated isoprenylated plant protein gene family from *Citrus sinensis* in response to huanglongbing[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1369883.
- [27] 吴博慧, 黎建辉, 卢泳全. 杉木 *CIHA2* 基因的克隆及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(12): 2057-2065.
WU BH, LI JH, LU YQ. Cloning of *CIHA2* gene and its expression analysis in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(12): 2057-2065 (in Chinese).
- [28] RAHIMI MJ, URBAN N, WEGLER M, STICHT H, SCHAEFER M, POPP B, GAUNITZ F, MORLEO M, NIGRO V, MAITZ S, MANCINI GMS, RUIVENKAMP C, SUK EK, BARTOLOMAEUS T, MERKENSCHLAGER A, KOBOLDT D, BARTHOLOMEW D, STEGMANN APA, SINNEMA M, DUYNISVELD I, et al. *De novo* variants in ATP2B1 lead to neurodevelopmental delay[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2022, 109(5): 944-952.
- [29] LIU WZ, LI HL. COVID-19: the CaMKII-like system of S protein drives membrane fusion and induces syncytial multinucleated giant cells[J]. *Immunologic Research*, 2021, 69(6): 496-519.
- [30] YANG YJ, MA KF, ZHANG TX, LI LL, WANG J, CHENG TR, ZHANG QX. Characteristics and expression analyses of trehalose-6-phosphate synthase family in *Prunus mume* reveal genes involved in trehalose biosynthesis and drought response[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(10): 1358.
- [31] SITSEL O, GRØNBERG C, AUTZEN HE, WANG KT, MELONI G, NISSEN P, GOURDON P. Structure and function of Cu(I)- and Zn(II)-ATPases[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(37): 5673-5683.
- [32] 陈亚慧, 刘晓宇, 王明新, 王静, 严新美. 蓖麻对镉的耐性、积累及与镉亚细胞分布的关系[J]. *环境科学学报*, 2014, 34(9): 2440-2446.
CHEN YH, LIU XY, WANG MX, WANG J, YAN XM. Cadmium tolerance, accumulation and relationship with Cd subcellular distribution in *Ricinus communis*

- L.[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(9): 2440-2446 (in Chinese).
- [33] 王峰, 单睿阳, 陈玉真, 林栋良, 臧春荣, 陈常颂, 尤志明, 余文权. 闽中某县茶园土壤-茶树-茶汤中镉含量及健康风险评估研究[J]. *茶叶科学*, 2018, 38(5): 537-546.
- WANG F, SHAN RY, CHEN YZ, LIN DL, ZANG CR, CHEN CS, YOU ZM, YU WQ. A case study of cadmium distribution in soil-tea plant-tea soup system in central Fujian Province and relative health risk assessment[J]. *Journal of Tea Science*, 2018, 38(5): 537-546 (in Chinese).
- [34] 南帅帅, 王亚, 刘强, 刘祺, 李朋朋, 刘智峰. 油菜对铅镉污染土壤的修复效果研究[J]. *环境研究与监测*, 2018, 31(1): 5-8.
- NAN SS, WANG Y, LIU Q, LIU Q, LI PP, LIU ZF. Study on remediation effect of rape on lead and cadmium contaminated soil[J]. *Environmental Study and Monitoring*, 2018, 31(1): 5-8 (in Chinese).
- [35] YANG J, GUO JM, YANG JX. Cadmium accumulation and subcellular distribution in populations of *Hylotelephium spectabile* (Boreau) H. Ohba[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(31): 30917-30927.
- [36] ZHOU C, XIAO XY, GUO ZH, PENG C, ZENG P, FOSUA BRIDGET A. Physiological responses, tolerance efficiency, and phytoextraction potential of *Hylotelephium spectabile* (Boreau) H. Ohba under Cd stress in hydroponic condition[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2021, 23(1): 80-88.
- [37] LI K, YANG BS, WANG H, XU XH, GAO YC, ZHU YD. Dual effects of biochar and hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. on the remediation of Cd-contaminated soil[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6631.
- [38] 吴彬艳, 邵冰洁, 赵惠恩, 万小铭, 雷梅. 11种广义景天属植物对Cd的耐性和积累特性[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(5): 1947-1956.
- WU BY, SHAO BJ, ZHAO HE, WAN XM, LEI M. Cd accumulation and tolerance characteristics of 11 species in *Sedum sensu lato*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(5): 1947-1956 (in Chinese).
- [39] HUANG QY, QIU WM, YU M, LI SC, LU ZC, ZHU Y, KAN XZ, ZHUO RY. Genome-wide characterization of *Sedum plumbizincicola* HMA gene family provides functional implications in cadmium response[J]. *Plants*, 2022, 11(2): 215.
- [40] MA YT, WEI N, WANG QX, LIU ZP, LIU WX. Genome-wide identification and characterization of the heavy metal ATPase (HMA) gene family in *Medicago truncatula* under copper stress[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 193: 893-902.
- [41] FANG XL, WANG L, DENG XJ, WANG P, MA QB, NIAN H, WANG YX, YANG CY. Genome-wide characterization of soybean PIB-ATPases gene family provides functional implications in cadmium responses[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 376.
- [42] ZHANG CR, YANG QH, ZHANG XQ, ZHANG X, YU TY, WU YH, FANG YX, XUE DW. Genome-wide identification of the HMA gene family and expression analysis under Cd stress in barley[J]. *Plants*, 2021, 10(9): 1849.
- [43] MORENO I, NORAMBUENA L, MATURANA D, TORO M, VERGARA C, ORELLANA A, ZURITA-SILVA A, ORDENES VR. AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca²⁺/heavy metal pump[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(15): 9633-9641.
- [44] CONG WX, MIAO YL, XU L, ZHANG YH, YUAN CL, WANG JM, ZHUANG TT, LIN XY, JIANG LL, WANG NN, MA J, SANGUINET KA, LIU B, RUSTGI S, OU XF. Transgenerational memory of gene expression changes induced by heavy metal stress in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 282.
- [45] MATTLE D, ZHANG LM, SITSEL O, PEDERSEN LT, MONCELLI MR, TADINI-BUONINSEGNI F, GOURDON P, REES DC, NISSEN P, MELONI G. A sulfur-based transport pathway in Cu⁺-ATPases[J]. *EMBO Reports*, 2015, 16(6): 728-740.
- [46] VERRET F, GRAVOT A, AUROY P, PREVERAL S, FORESTIER C, VAVASSEUR A, RICHAUD P. Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His11 stretch[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(6): 1515-1522.
- [47] CUBILLAS C, MIRANDA-SÁNCHEZ F, GONZÁLEZ-SÁNCHEZ A, ELIZALDE JP, VINUESA P, BROM SUSANA, GARCÍA-DE LOS SANTOS A. A comprehensive phylogenetic analysis of copper transporting P1B ATPases from bacteria of the Rhizobiales order uncovers multiplicity, diversity and novel taxonomic subtypes[J]. *MicrobiologyOpen*, 2017, 6(4): e00452.
- [48] SAZINSKY MH, MANDAL AK, ARGÜELLO JM, ROSENZWEIG AC. Structure of the ATP binding domain from the *Archaeoglobus fulgidus* Cu⁺-ATPase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(16): 11161-11166.
- [49] 赵曜, 文朗, 骆少丹, 栗子杏, 刘超超. 番茄 HMA 基因家族的鉴定及 *SIHMA1* 镉转运功能研究[J]. *生物技术通报*, 2024, 40(2): 212-222.
- ZHAO Y, WEN L, LUO SD, LI ZX, LIU CC. Identification of HMA gene family and cadmium transport function of *SIHMA1* in tomato[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40(2): 212-222 (in Chinese).
- [50] WANG L, DING YY, ZHANG XX, LI YF, WANG R, LUO XH, LI YN, LI J, CHEN ZX. Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination[J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 416-426.