

• 生物技术与方法 •

马铃薯 *StZnT11* 的电子克隆、表达及生物信息学分析

尉瑞敏*, 常燕楠*, 庞鹏湘, 索艳云, 郜刚

山西师范大学 生命科学学院, 山西 临汾 041000

尉瑞敏, 常燕楠, 庞鹏湘, 等. 马铃薯 *StZnT11* 的电子克隆、表达及生物信息学分析. 生物工程学报, 2020, 36(2): 362–371.
Yu RM, Chang YN, Pang PX, et al. *In silico* cloning, expression and bioinformatics analysis of *StZnT11* in *Solanum tuberosum*.
Chin J Biotech, 2020, 36(2): 362–371.

摘要: 马铃薯锌转运蛋白 (*Solanum tuberosum* zinc transporter 11, *StZnT11*) 对于维持细胞中锌稳态至关重要。通过研究 *StZnT11* 在非生物胁迫和生物胁迫下的表达情况, 为验证马铃薯 *StZnT11* 在青枯菌生物胁迫过程中的作用奠定了基础。从前期工作获得的表达文库中得到 EST 序列, 利用 NCBI 中的 Blast 工具, 对原始序列进行同源性分析, 选择与原始序列的相似度、覆盖度、e 期望值最高的一条同源对象序列。通过电子克隆, 得到 *StZnT11* 基因。采用生物信息学方法对 *StZnT11* 基因的基因序列及编码的氨基酸组成、理化性质、分子进化、磷酸化位点、高级结构等多角度进行分析。结果表明, 该基因 cDNA 全长 1 300 bp, 编码 348 个氨基酸, 编码蛋白含 23 个磷酸化位点, 有 1 个信号肽, 有 9 个跨膜区域, 是定位在质膜上的疏水性蛋白。通过氨基酸序列比对, *StZnT11* 蛋白与烟草、番茄和辣椒等植物中的锌转运蛋白同源性较高。实时荧光定量聚合酶链反应检测结果表明, *StZnT11* 在不同浓度的外源植物激素脱落酸 (ABA) 的作用下上调。组织定位检测提示 *StZnT11* 主要表达于特定组织 (茎维管系统的韧皮部和叶片维管束)。这些结果为进一步进行该基因的实验克隆及功能验证研究提供了理论依据。

关键词: 马铃薯, 锌转运蛋白 11, 生物信息学, 实时荧光定量 PCR

In silico cloning, expression and bioinformatics analysis of *StZnT11* in *Solanum tuberosum*

Ruimin Yu*, Yannan Chang*, Pengxiang Pang, Yanyun Suo, and Gang Gao

College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041000, Shanxi, China

Abstract: *Solanum tuberosum* Zinc transporter 11 (*StZnT11*) is very important for maintaining zinc homeostasis in cells. The study on the expression of *StZnT11* under abiotic stress and biotic stress laid a foundation for verifying the role of potato *StZnT11* in the process of biotic stress of *Ralstonia solanacearum* species complex. According to the designated EST sequence, the homology of the original sequence was analyzed by using the Blast tool in NCBI, and a homologous object

Received: May 15, 2019; **Accepted:** July 25, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31771858).

Corresponding author: Gang Gao. Tel: +86-357-2051197; E-mail: gaogang@sxnu.edu.cn

*This authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 31771858) 资助。

网络出版时间: 2019-08-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190805.1059.005.html>

sequence with the highest similarity, coverage and e expectation value was selected. *StZnT11* gene is obtained by Silico Cloning. The sequence and coding amino acid composition, physicochemical properties, molecular evolution, phosphorylation site and advanced structure of *Solanum tuberosum StZnT11* gene were analyzed by bioinformatics method. The results showed that the cDNA gene is 1 300 bp in length, encoding a protein containing 348 amino acid residues, including 23 phosphorylation sites, one signal peptide and nine transmembrane regions, and is a hydrophobic protein located on the plasma membrane. Through amino acid sequence alignment, *StZnT11* protein has a high homology with zinc transporter from tobacco, tomato, pepper and other plants. The results of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction showed that, *StZnT11* is up-regulated by different concentrations of exogenous plant hormone abscisic acid (ABA). Tissue localization showed that *StZnT11* was mainly expressed in specific tissues (phloem and leaf vascular bundles of stem vascular system). These results provide a theoretical basis for further experimental cloning and functional verification of the gene.

Keywords: potato, zinc transporter 11, bioinformatics, real-time fluorescent quantitative PCR

锌是生物体中必需的微量元素,广泛参与各种生物过程。在酶催化、基因调控、大分子稳定性等方面发挥着尤为重要的作用。锌也是一种新兴的调节生理和病理事件的信号分子^[1]。锌通过锌转运蛋白进入细胞。据估计,人类基因组编码的蛋白质中有 10%是锌结合蛋白^[2]。锌在行使细胞功能和调控高浓度的毒性方面都是必需的,因此严格控制锌稳态对细胞活力至关重要^[3-4]。锌转运蛋白是跨膜蛋白,被称为阳离子转运促进剂,主要将锌转运到细胞外,或通过细胞内的储存细胞器积累多余的锌来控制细胞内锌的含量^[5-6]。这些锌转运蛋白通过不透水的膜屏障运输 Zn^{2+} 。据研究,锌转运蛋白有两个蛋白家族,SLC39(也称为 ZIP)和 SLC30(也称为 ZnT)。ZIP 家族和 ZnT 家族分别负责锌的流入和流出^[7-9],在相反方向起作用以维持细胞锌稳态^[10]。这些转运体存在于生物膜上^[11-13]。

锌转运蛋白在植物发育中发挥重要作用。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中,锌转运蛋白在根中表达以响应锌缺乏,比如 ZIP1、ZIP3 和 ZIP4 等锌转运蛋白。这些蛋白质负责植物中的锌摄取。过量表达锌转运蛋白还可以增加种子中锌的含量,从而增加谷物微量元素含量。拟南芥对 ZIP 蛋白家族的研究作出了重大贡献^[8]。在水稻 *Oryza sativa* L.中,OsZIP4 的过表达导致水稻植株锌分布紊乱^[14]。OsZIP5 的表达对水稻中锌分布起重要作用^[15]。在

烟草 *Nicotiana tabacum* 中,将克隆的粗糙脉孢菌锌转运蛋白基因 (*Tzn1*) 引入烟草中,其表达增强了植物锌的积累^[16],并且研究发现含有 *Tzn1* 基因的转基因烟草植株具有较好的抗氧化能力。在小麦 *Triticum aestivum* L.中,TdZIP1 (ZIP1 转运体)通过转运 Zn^{2+} 可以改善小麦缺锌耐受性^[17]。在苜蓿 *Medicago Sativa* Linn 中,MtZIP2 在根和茎中表达,并且通过 Zn^{2+} 施肥上调^[18]。综上所述,锌转运蛋白在植物细胞中对锌稳态的调节至关重要。研究发现,锌在细胞内信号通路中也起重要作用^[19]。锌被认为是一种重要的信号分子,在正常细胞生理和病理生理学中发挥作用。正常情况下,锌被证明可以调节几种磷酸化依赖的信号级联反应,包括 MAPKs 和 Akt,在细胞发育、增殖和死亡中发挥着重要作用。锌信号是由细胞内锌稳态控制的,而锌稳态又受到锌转运蛋白的调控,特别是 ZIP 和 ZnT 两个锌转运蛋白家族。因此,对于锌转运蛋白的研究是非常必要的。植物激素 ABA 在非生物胁迫反应中发挥重要的作用,特别是在干旱和盐碱胁迫中^[20],并且 ABA 被认为是植物免疫的重要参与者^[21]。Audenaert 等证明在番茄中 ABA 对灰霉病的免疫力有负面影响。这在拟南芥中也得到了支持,在拟南芥中 ABA 生物合成突变体 *aba2-12* 和 *aao3-2* 对灰霉病杆菌也表现出增强的抗性^[22]。然而,关于马铃薯 *StZnT11* 的表达、功能以及抗病方

面的相关研究尚未见报道。

本研究利用马铃薯接种青枯菌,通过构建消减文库^[23],从中选取表达量较高的 *StZnT11* 的 EST 序列。以 NCBI 数据库为基础,利用电子克隆得到马铃薯中编码 *StZnT11* 基因的序列。采用生物信息学方法,对此基因所编码的蛋白质从氨基酸组成、理化性质、分子进化、磷酸化位点等多角度进行了分析并预测蛋白质的结构,进行定量表达分析与组织定位分析。为后续研究该基因的结构和功能奠定基础,并且为马铃薯在青枯病抗性分子机理研究方面提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 植物与菌株

本研究采用的马铃薯(二倍体基因型 ED13)植株和青枯菌菌株 PO41 由中国农业科学院提供。马铃薯 ED13 基因型对青枯病具有抗性。将无菌块茎 ED13 种植到装有 450 mL 泥炭和蛭石(3:1,体积比)的花盆中(直径 10 cm,高度 15 cm)。在光照强度、光照时间和温度为 2 000–3 000 lx、16 h/8 h(昼/夜)、23 °C/18 °C(昼/夜)的光照培养室中培养。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 基因克隆

从前期工作^[23]获得的表达文库中得到 EST 序列,利用 NCBI 中的 BLAST 工具,对 EST 进行同源性分析,选择与原始序列的相似度、覆盖度、e 期望值最高的一条同源对象序列(XM 015308168.1)。通过 BioEdit 软件拼接序列,得到新基因序列(*StZnT11*)。

1.2.2 基因序列分析

该基因的同源序列、编码蛋白的理化性质、跨膜结构域、亚细胞定位、信号肽分析、磷酸化位点分析利用在线工具^[24] ExPASy、TMHMM Server V.2.0、PSORT、SignalP 4.1 Server、NetPhos 软件

完成;蛋白质二级及三级结构的预测利用 PSIPRED 和 SWISS models 等在线工具完成^[25]。

1.2.3 基因的系统进化树构建

利用 NCBI 中 BLAST 程序对 *StZnT11* 蛋白进行检索,并选择与该蛋白同源性高的不同物种构建系统进化树。将包括番茄、烟草等不同物种植物在内的 11 条 *ZnT11* 蛋白序列放在同一个 txt 文档,然后再另存为 fasta 格式。最后利用 MEGA 7.0 软件建立 *StZnT11* 蛋白进化树。

1.2.4 基因的启动子分析

用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 搜索 *StZnT11* 启动子的 1 500 bp 序列,定位潜在的顺式作用元件^[25]。

1.3 激素处理

马铃薯植株长至 7–8 叶龄期,用 100 μmol/L ABA 处理,方法参考前人工作^[26]。处理后 0、12、24、48、60、72 h 时间点^[27]分别取样,液氮冷存,用于制备 RNA。每次处理重复 3 次。

1.4 青枯菌处理

实验取 9–10 叶龄期的马铃薯幼苗,用 10⁸ CFU/mL (*OD*₆₀₀=0.2) 菌液处理,伤根灌菌法^[28]接种。对照组用水处理。处理后 0、6、12、24、36、48、60、72、84、96、108 h 时间点分别取样,液氮冷存,用于制备 RNA。每次处理重复 3 次。

1.5 用 RT-qPCR 测定 *StZnT11* 基因表达

1.5.1 RNA 制备

苗期马铃薯经激素处理和青枯菌诱导后取样用于总 RNA 制备,操作如下:取 100 μg 茎、叶组织,液氮速冻,研磨至粉状,加 Trizol 试剂 4 °C 静置 5 min,振荡混匀,室温静置 5 min。加 1/5 体积氯仿,振荡混匀,室温静置 5 min。12 000 r/min、4 °C 离心 10 min。取上清,加等体积异丙醇,混和均匀,静置 10 min。重复离心操作,弃上清取沉

淀,用75%乙醇漂洗后置 DEPC 水保存备用。用 LabChip GXII Touch 微流控毛细管电泳系统测 RNA 的 RIN 值,用 NanoDrop2000C 超微量分光光度计测 RNA 的 A_{260}/A_{280} 和浓度。

1.5.2 cDNA 全长的获得

取 2 μg 总 RNA 按照 TransScript II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒操作,进行反转录成 cDNA。反转录反应体系包括 Total RNA、5 \times TransScript II All-in-One SuperMix for qPCR、gDNA Remover、RNase-free 水,体积分别为 1 μg 、4 μL 、1 μL 、反应体系总体积 20 μL 。反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 15 min;在 85 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 5 s。

1.5.3 Real-time PCR

以马铃薯 *Actin* 基因为内参,引物为 *Actin-F*: 5'-TATAACGAGCTTCGTGTTGCAC-3'和 *Actin-R*: 5'-ACTGGCATAACAGCGAAAGAACA-3'。靶基因 *StZnT11* 特异正向引物和反向引物分别为 *StZnT11-F*: 5'-GTTGCCATCGGAATCATAATCG-3'和 *StZnT11-R*: 5'-ATGAGACTTGTCAATCGAGACC-3'。Real-time PCR 反应体系包括正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ,反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , 2 \times TransStart Top GreenSuperMix qPCR 10 μL ,模板 (cDNA) 2 μL ,加 ddH₂O 至终体积为 20 μL 。RT-PCR 使用以下程序执行:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,45 个循环;实验重复 3 次。

1.6 荧光原位杂交

用 PO41 菌悬液处理 9–10 叶期的马铃薯幼苗。设置 6、12、24、36、48、60、72、84、96 h 时间点,分别在每个时间点取样,每株幼苗取少量叶片和 2–3 个茎段 (6–7 cm)。取样后置于 10 mL 离心管中,将所取植物材料浸泡在植物固定液 (85 mL 50%乙醇、10 mL 37%甲醛和 5 mL 冰醋酸) 中固定。将经 PCR 扩增的 *StZnT11* 基因片段制成 RNA 探针,标记 5'-FAM,加入到之前制备的样品石蜡切片中。*StZnT11* 探针序列 5'-CATCA GAGAC

CTGTGACTGCCCTTGTGCGACT-3'、探针浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$,并用 FITC (绿光) 标记。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

本实验室前期^[23]获得的 EST 序列在 NCBI 中运行 Blast 搜索到与之相似性较高的 1 条序列 (GenBank 登录号 XM 015308168.1),利用 BioEdit 软件进行电子克隆,得到 1 300 bp 的序列 (图 1)。

StZnT11 蛋白的一级结构经预测,结果显示:分子式为 C₁₇₁₂H₂₆₄₉N₄₃₃O₄₇₅S₁₈,原子总数为 5 287,分子量为 37 474.56 Da,等电点为 5.86,负电荷残基 (Arg+Glu) 为 26,正电荷残基 (Arg+Lys) 为 21,不稳定系数为 32.61,脂肪系数为 106.53,平均总亲水性为 0.558。因此推测该蛋白是一个不稳定的疏水性的脂溶性蛋白。利用 PSORT 软件对 *StZnT11* 蛋白进行亚细胞定位分析。结果表明,该蛋白位于质膜上的分值最高,为 9.27。故推断,*StZnT11* 蛋白可能存在于植物的质膜上,并在质膜行使功能。通过 PSIPRED 软件对 *StZnT11* 蛋白进行二级结构预测,其中 α -螺旋 (Alpha helix) 占 49.28%, β -片层或伸展链 (Extended strand) 占 11.75%,无规则卷曲 (Random coil) 占 38.97%。通过 TMHMM Server V.2.0 软件对 *StZnT11* 蛋白进行跨膜预测,结果显示该蛋白含有 9 个跨膜区域,预测其为跨膜蛋白。通过 NetPhos 软件对 *StZnT11* 蛋白进行磷酸化位点预测,结果表明该蛋白含 23 个磷酸化位点。利用 SignalP 4.1 Server 软件对 *StZnT11* 蛋白进行信号肽预测,发现该蛋白含有 1 个信号肽。故推测,该蛋白为分泌蛋白,在细胞质中合成后,将进行蛋白转运。

2.2 *StZnT11* 蛋白的结构预测和分析

利用 Robetta 软件可以建立一个能够覆盖该蛋白序列全长的三维结构模型,如图 2 所示,可见 *StZnT11* 蛋白的主要空间结构由 α -螺旋和无规则卷曲构成,与其二级结构预测分析一致。

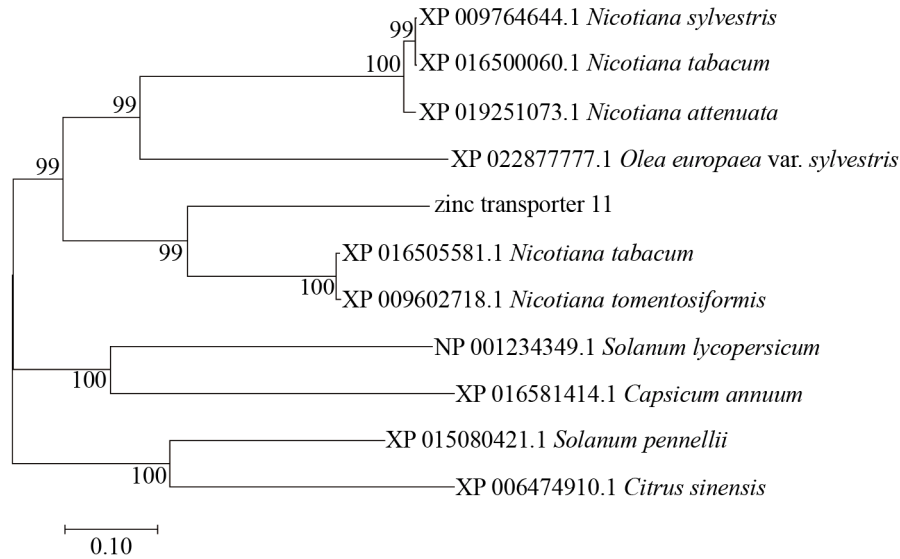


图 3 *StZnT11* 蛋白的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree of *StZnT11* protein. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method^[29]. The optimal tree with the sum of branch length = 2.87 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches^[30]. The evolutionary distances were computed using the p-distance method^[31]. The analysis involved 11 protein sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 7.0^[32].

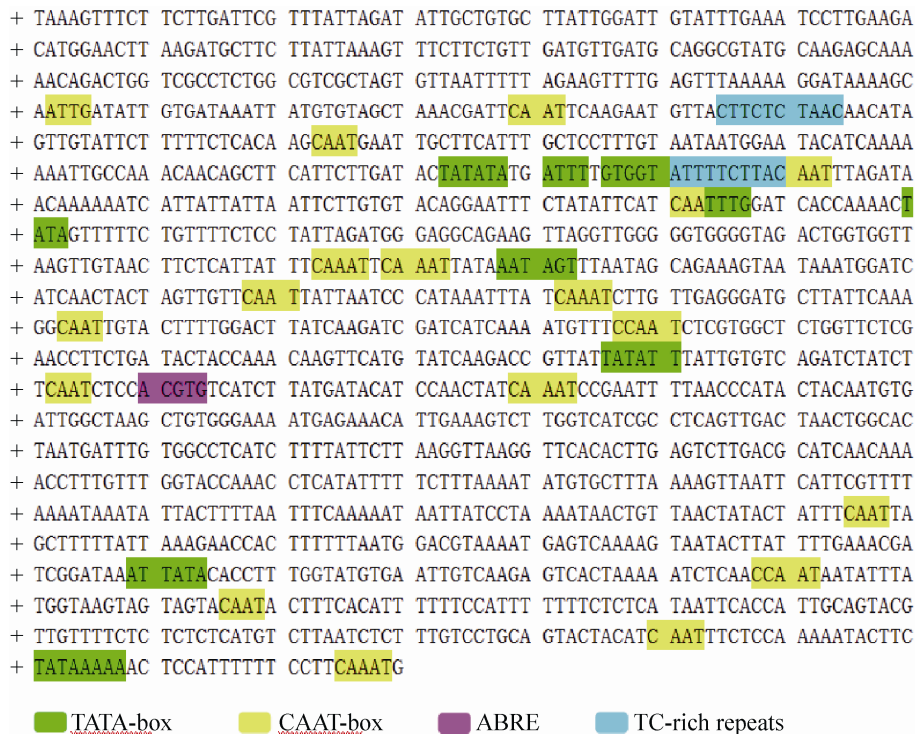


图 4 *StZnT11* 启动子预测

Fig. 4 Promoter prediction of *StZnT11*. The color blocks shown represent different *cis* elements: green for TATA-box; yellow for CAAT-box; purple for ABRE, as abscisic acid response for *cis* action element, blue for TC-rich repeats, for defense and stress response for *cis* action element.

1 500 bp 区域有 33 种潜在的顺式作用元件。在许多位置发现了多个核心顺式作用元件,包括 TATA box、CAAT box 和参与脱落酸应答的顺式作用元件 ABRE,以及参与防御和胁迫应答的顺式作用元件 TC-rich repeats。启动子区有与激素相关的调控元件,说明 *StZnT11* 参与激素调控,并且启动子区有与胁迫相关顺式作用元件,说明 *StZnT11* 参与胁迫调控。

2.5 植物激素诱导的 *StZnT11* 表达模式

StZnT11 的表达受外源激素 ABA 的上调(图 5),该基因的相对表达在 ABA 处理 72 h 后达到峰值。但在 96 h 时表达量显著降低,而第 120 h 时表达量又开始上升。表明激素 ABA 的处理诱导了 *StZnT11* 的表达,说明 *StZnT11* 的表达可能在激素信号转导过程中发挥重要作用。

2.6 青枯菌诱导的 *StZnT11* 表达模式

使用 Real-time PCR 方法对接种青枯菌的马铃薯幼苗在不同时间点的诱导表达进行比较分析,以确保在青枯菌侵染下 *StZnT11* mRNA 的表达是否发生。比较分析表明:*StZnT11* 基因的表达受青枯菌上调(图 6),该基因在青枯菌处理 6、12、24 h 中相对表达量较低;在 36 h 和 48 h 中几乎不表达;但在之后的 60 h 和 72 h 内表达量又开始上调;直到 84 h 相对表达量达到最高;而在之后的 96 h 和 108 h 中表达量显著下降。由于对照组一直处于较低的表达状态,因此与对照组相比较,当受到病原菌胁迫时,*StZnT11* 基因的表达量会上调。推测 *StZnT11* 基因在马铃薯抗青枯病方面发挥重要作用。

2.7 *StZnT11* 表达的组织定位

荧光原位杂交分析显示(图 7),*StZnT11* mRNA 主要分布在茎维管系统的韧皮部(图 7-A3)和叶片维管束(图 7-C3)。此外,在对照植株中观察到

弱杂交信号(图 7-B3 和 7-D3)。这些结果表明,*StZnT11* 基因定位在维管束,表现出一定的组织特异性,这可能与青枯菌所引起的维管束系统病害青枯病有关。

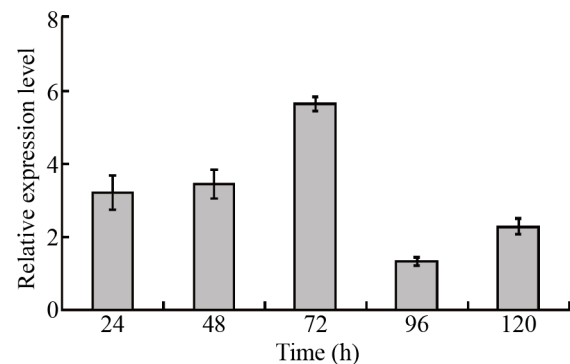


图 5 实时定量 PCR 分析激素 ABA 处理马铃薯苗 *StZnT11* 基因相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *StZnT11* gene in potato seedlings treated with hormone ABA was analyzed by real-time quantitative PCR. $\bar{x} \pm s$ ($n=3$ independent experiments, t -test).

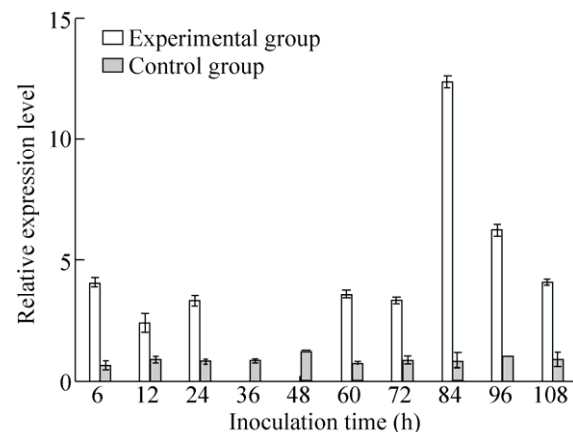


图 6 利用实时定量 PCR 分析接种青枯菌的马铃薯幼苗 *StZnT11* 基因相对表达量

Fig. 6 Relative expression of *StZnT11* gene in potato seedlings inoculated with *Ralstonia solanacearum* species complex was analyzed by real-time quantitative PCR. Water was used as control. Normalization is carried out at each point in time based on the value of actin. The value is the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$ independent experiments, t -test).

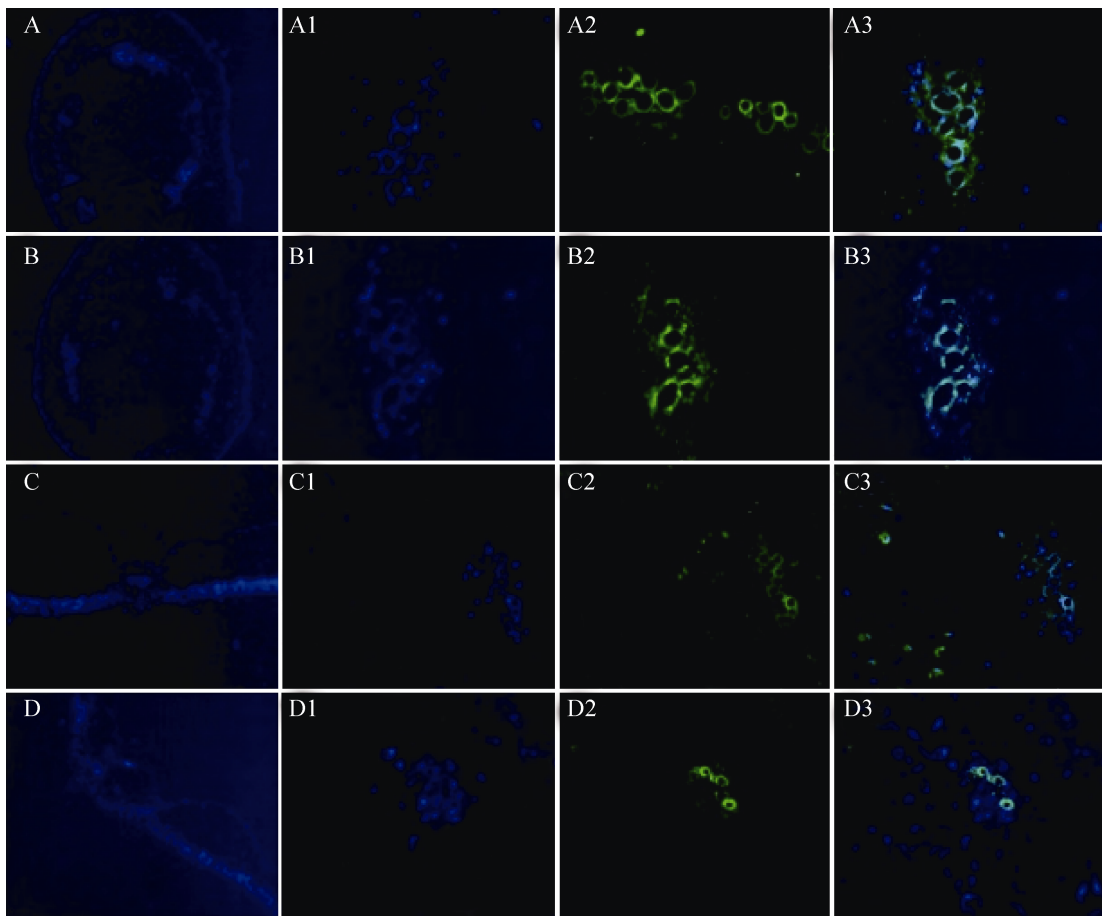


图 7 *StZnT11* 定位在茎维管系统的韧皮部和叶片维管束

Fig. 7 *StZnT11* was located in the phloem and leaf vascular bundles of the stem vascular system. The stem and leaf tissues of potato seedlings were taken 48 hours after inoculation with *Ralstonia solanacearum* species complex, and the localization of *StZnT11* protein in cells was observed by laser scanning imaging system. The first column and the second column are blue natural fluorescence, giving priority to the xylem, and the third column is green fluorescence, corresponding to the location of *StZnT11*. The fourth column is the combined image of the second column of blue fluorescence and the third column of green fluorescence. (A) Stems of potato seedlings inoculated with *Ralstonia solanacearum* species complex were crosscutting. (B) Stems of potato seedling after water treatment were crosscutting. (C) Leaves of potato seedlings inoculated with *Ralstonia solanacearum* species complex were crosscutting. (D) Leaves of potato seedling after water treatment were crosscutting. The ruler is 20 μm .

3 讨论

锌转运蛋白在植物中运输细胞之间以及细胞内的亚细胞之间的金属^[8]。调节细胞的多种生命活动。锌转运蛋白的有效利用可以使人们更好地了解植物体内锌稳态和抗性的机制^[33]。研究表明拟南芥的 *AtMTP1* 定位于液泡膜，参与将细胞质中过量的 Zn 固定到液泡中以维持 Zn 的动态平衡^[34]。在水稻中，*OsZIP5* 对水稻中锌分布起重要作用^[15]。

在烟草中，锌转运蛋白 *Tzn1* 的表达增强了植物中锌的积累^[16]。这些结果与亚细胞定位分析结果一致，锌转运蛋白定位于质膜，并在质膜通过转运 Zn^{2+} 发挥作用。从前期工作^[23]获得的表达文库中得到 EST 序列，利用电子克隆得到马铃薯中编码 *StZnT11* 蛋白的 cDNA 序列。采用生物信息学方法，对此蛋白质从氨基酸组成、理化性质、分子进化、磷酸化位点、高级结构等多角度进行了分析。结果表明该基因 cDNA 全长 1 300 bp，编码 348 个

氨基酸, 编码蛋白含 23 个磷酸化位点, 有 1 个信号肽, 有 9 个跨膜区域, 是定位在质膜上的疏水性蛋白。通过氨基酸序列比对, *StZnT11* 蛋白与烟草、番茄和辣椒的锌转运蛋白同源性高, 结果推断它们可能具有共同的起源。

植物激素是植物生长发育的核心调节因子, 调节植物对生物和非生物环境胁迫的响应。启动子分析结果表明在许多位置出现多个核心顺式作用元件, 包括 TATA、CAAT box 和参与脱落酸应答的顺式作用元件 ABRE, 以及参与防御和胁迫应答的顺式作用元件 TC-rich repeats。结合植物激素 ABA 诱导 *StZnT11* 的表达结果表明, *StZnT11* 的表达可能在激素信号转导过程中发挥重要作用。马铃薯青枯病属于维管束系统病害, 青枯菌从植物根部入侵, 到木质部导管发挥作用, 通过维管束迅速扩张到地上部分, 导致导管丧失功能, 进一步引起植物萎蔫, 甚至死亡。青枯菌诱导 *StZnT11* 的表达与对照组相比较, 当植物受到青枯菌胁迫时, *StZnT11* 基因的表达量会上调。结合荧光原位杂交结果显示, *StZnT11* 以组织特异性的方式在维管束表达, 而青枯菌作用位置也在维管束。因此推测 *StZnT11* 基因在马铃薯抗青枯病方面发挥重要作用。

后续可以使用实验手段克隆 *StZnT11* 基因, 利用基因过表达、基因沉默和亚细胞定位对 *StZnT11* 的功能进行验证。目前在拟南芥^[8]、水稻^[14]、小麦^[17]等植物中对 *ZnT11* 进行了相关的研究, 还尚未有在马铃薯中研究该蛋白功能的相关报道。笔者借鉴前人的经验对马铃薯中的锌转运蛋白进行研究, 推测 *StZnT11* 可能为抗病基因, 为选育对青枯病具有高抗性的新品种马铃薯奠定基础。

REFERENCES

- [1] Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, et al. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol*, 2007, 177(4): 637–645.
- [2] Andreini C, Banci L, Bertini I, et al. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res*, 2006, 5(1): 196–201.
- [3] Taylor KM, Vichova P, Jordan N, et al. ZIP7-Mediated intracellular Zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer cells. *Endocrinology*, 2008, 149(10): 4912–4920.
- [4] MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D. Zinc transporters that regulate vacuolar Zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 2000, 19(12): 2845–2855.
- [5] Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian Zinc transporter that confers resistance to Zinc. *EMBO J*, 1995, 14(4): 639–649.
- [6] Nies DH, Silver S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol*, 1995, 14(2): 186–199.
- [7] Zhao H, Eide D. The yeast ZRT1 gene encodes the Zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by Zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(6): 2454–2458.
- [8] Grotz N, Fox T, Connolly E, et al. Identification of a family of Zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to Zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 7220–7224.
- [9] Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian Zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr*, 2009, 29: 153–176.
- [10] Huang LP, Tepasamorndech S. The SLC30 family of Zinc transporters-A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2/3): 548–560.
- [11] Franklin RB, Feng P, Milon B, et al. hZIP1 Zinc uptake transporter down regulation and Zinc depletion in prostate cancer. *Mol Cancer*, 2005, 4: 32.
- [12] Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S. Current understanding of ZIP and ZnT Zinc transporters in human health and diseases. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(17): 3281–3295.
- [13] Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, et al. The physiological, biochemical, and molecular roles of Zinc transporters in Zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev*, 2015, 95(3): 749–784.
- [14] Ishimaru Y, Masuda H, Suzuki M, et al.

- Overexpression of the OsZIP4 Zinc transporter confers disarrangement of Zinc distribution in rice plants. *J Exp Bot*, 2007, 58(11): 2909–2915.
- [15] Lee S, Jeong HJ, Kim SA, et al. OsZIP5 is a plasma membrane Zinc transporter in rice. *Plant Mol Biol*, 2010, 73(4/5): 507–517.
- [16] Dixit P, Singh S, Vancheeswaran R, et al. Expression of a *Neurospora crassa* Zinc transporter gene in transgenic *Nicotiana tabacum* enhances plant Zinc accumulation without co-transport of cadmium. *Plant Cell Environ*, 2010, 33(10): 1697–1707.
- [17] Durmaz E, Coruh C, Dinler G, et al. Expression and cellular localization of ZIP1 transporter under Zinc deficiency in wild emmer wheat. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29(3): 582–596.
- [18] Burleigh SH, Kristensen BK, Bechmann IE. A plasma membrane Zinc transporter from *Medicago truncatula* is up-regulated in roots by Zn fertilization, yet down-regulated by arbuscular mycorrhizal colonization. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(5): 1077–1088.
- [19] Kolenko V, Teper E, Kutikov A, et al. Zinc and Zinc transporters in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Urol*, 2013, 10(4): 219–226.
- [20] Tuteja N. Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav*, 2007, 2(3): 135–138.
- [21] Grant MR, Jones JDG. Hormone (Dis) harmony moulds plant health and disease. *Science*, 2009, 324(5928): 750–752.
- [22] Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, et al. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online*, 2007, 19(5): 1665–1681.
- [23] Gao G. Cloning and expression of defence-related genes induced by *Ralstonia solanacearum* in potato[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008 (in Chinese).
郝刚. 青枯菌诱导的马铃薯防卫相关基因克隆与表达[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [24] Mirzaei K, Bahramnejad B, Shamsifard MH, et al. *In silico* identification, phylogenetic and bioinformatic analysis of argonaute genes in plants. *Int J Genomics*, 2014, 2014: 1–17.
- [25] Pang PX, Shi L, Wang XJ, et al. Cloning and expression analysis of the StCUL1 gene in potato. *J Plant Biochem Biot Online*, 2019.
- [26] Blaudez D, Kohler A, Martin F, et al. Poplar metal tolerance protein 1 confers Zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar Zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *Plant Cell Online*, 2003, 15(12): 2911–2928.
- [27] Denancé N, Ranocha P, Oria N, et al. *Arabidopsis* wat1 (walls are thin1)-mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, *Ralstonia solanacearum*, is accompanied by cross-regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism. *Plant J*, 2013, 73(2): 225–239.
- [28] He LY, Sequeira L, Kelman A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis*, 1983, 67: 1357–1361.
- [29] Zelman AK, Dawe A, Gehring C, et al. Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 95.
- [30] Kim M, Lee S. Bootstrap entropy test for general location-scale time series models with heteroscedasticity. *J Stat Comput Simul*, 2018, 88(13): 2573–2588.
- [31] Patil SA, Burnham KP, Kovner JL. Nonparametric estimation of plant density by the distance method. *Biometrics*, 1979, 35(3): 597–604.
- [32] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [33] van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, et al. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative Zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced Zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol*, 1999, 119(3): 1047–1055.
- [34] Kobae Y, Uemura T, Sato MH, et al. Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in Zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(12): 1749–1758.

(本文责编 郝丽芳)