

烟草钾离子通道研究进展

曲平治¹, 刘贯山¹, 刘好宝^{1*}, 司丛丛¹, 刘朝科², 胡晓明², 冯祥国², 张守厚³, 赵静⁴

(1.农业部烟草类作物质量控制重点开放实验室, 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2.川渝中烟工业公司, 成都 610000; 3.山东日照烟草有限公司, 山东 日照 276800; 4.山东中烟工业公司青州卷烟厂, 山东 青州 262500)

摘要: K⁺通道是烟草吸收 K⁺的重要途径之一。近年来, 已从多种植物或同种植物的不同组织器官中分离到多种 K⁺通道基因。笔者从 K⁺通道基因类型、K⁺通道基因的克隆与功能、K⁺吸收机制和 K⁺通道分子调控技术等方面综述了烟草 K⁺通道研究现状与进展。对应用生物工程技术改良烟草的钾营养性状进行了讨论, 并对利用现代生物技术手段提高烟叶含钾量进行了展望。

关键词: 烟草; 钾离子通道; 克隆; 吸收机制

中图分类号: TS413

文献标志码: A

文章编号: 1007-5119 (2009) 02-0074-07

Research Advances in Tobacco Potassium Ion Channel

QU Pingzhi¹, LIU Guanshan¹, LIU Haobao^{1*}, SI Congcong¹, LIU Chaoke²,
HU Xiaoming², FENG Xiangguo², ZHANG Shouhou³, ZHAO Jing⁴

(1.Key Laboratory of Tobacco Quality Control, MOA, Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China; 2.China Tobacco Chuanyu Industrial Corporation, Chengdu 610000, China; 3.Rizhao Tobacco Corp. Ltd., Rizhao, Shangdong 276800, China; 4.Qingzhou Cigaret Factory, China Shongdong Industrial Tobacco Corpoaration, Qingzhou, Shangdong 262500, China)

Abstract: K⁺ channel is one of the important pathway for tobacco absorbing K⁺. In recent years, Many K⁺ channel genes have been cloned from various plants or different organization of same plant. In this paper, the type of K⁺ channel gene, cloning and function of K⁺ channel, K⁺ absorption mechanism and molecular regulation technology of K⁺ channel are summarized. Applying biotechnology to improve tobacco potassium nutrition character is discussed, and utilizing the modern biotechniques to improve the potassium content of tobacco leaves is proposed.

Keywords: tobacco; potassium channel; cloning; absorption mechanism

植物吸收 K⁺涉及到质膜上的钾转运蛋白, 钾转运蛋白分为两类: K⁺通道和高亲和 K⁺转运体, 其中 K⁺通道是主要的 K⁺吸收途径。K⁺通道是一种跨膜蛋白, 广泛存在于各种细胞膜上, 它的结构与功能研究是生命科学交叉领域中研究最活跃的分支之一。K⁺通道 (potassium channel) 是允许 K⁺特异性通透质膜的离子通道, 该通道由两部分组成: 一部分是通道区, 选择并允许 K⁺通过; 另一部分是门控开关, 受环境中的信号而开关通道。

烟叶 K⁺不仅参与烟叶生理生化反应和提高烟株抗逆性, 还对烟草的可燃性有明显作用, 与烟叶香吃味及卷烟制品安全性有密切关系; 但是我国北方烟区的土壤含钾量普遍较低, 烟叶含钾量大都不

足 2%^[1], 直接影响到烟叶的产量和品质。国内学者曾采用施用钾肥和改进栽培方法等措施来提高烟叶含钾量, 但均未得到显著改善。

钾营养在分子生物学方面的研究已引起重视。施卫明^[2]将外源 K⁺通道基因导入烟草, 获得钾高效利用型转基因烟草株系, 研究证明外源 K⁺通道基因的导入不仅可提高肥料钾和土壤缓效态钾的利用率, 而且可显著提高烟叶的含钾量, 使烟草产量和品质得到较大幅度的改良; 茅野充男等^[3]通过分子技术将拟南芥的 K⁺通道基因转移至烟株中, 使其吸钾能力明显提高, 地上部含钾量提高 18%~22%。因此, 可通过现代生物技术改良烟草钾营养, 用基因工程技术将 K⁺通道和高亲和 K⁺转运体蛋白基因

作者简介: 曲平治 (1983-), 男, 在读硕士, 研究方向为烟草钾高效基因克隆与表达分析。E-mail: qupingzhi@yahoo.com.cn

*通讯作者, E-mail: zp3280965@tom.com

收稿日期: 2008-09-28

转入烟草中，使之高效表达，进而提高烟叶含钾量。

1 K⁺通道的类型

离子通道中，K⁺通道是最庞大的家族，根据不同的标准可分为不同的类别。从生物学角度，依据不同的结构和功能可将 K⁺通道分为三大类：Shaker 家族通道、KCO 家族通道和其他通道。

1.1 Shaker 家族通道

Shaker 家族通道是 K⁺通道中发现最早的。Shaker 一词来源于：在乙醚麻醉下缺失该基因的果蝇，自发强烈地抖动其肢体，这种表现型的果蝇取名为 Shaker(颤抖)突变子。植物 Shaker 通道蛋白从 N 末端至 C 末端具有 6 个跨膜区(TMS)的疏水核(图 1)；第 4 个 TMS 含有作为起电压感应器作用的正电荷氨基酸；第 5 个和第 6 个 TMS 之间具有高度保守的离子传导孔区(P 结构域)；C 末端区含有调节结构域：1 个推测的核苷酸结合位点(NBS)，1 个在大多数 Shaker 通道中存在的锚蛋白区 (ANK) 和 1 个紧靠 C 末端的富含疏水性残基区 (KHA)。

Shaker 通道的 1 个重要特点是能形成异源四聚体结构，允许植物调节不同细胞中的 K⁺转运活性，这种调节在每个器官或组织中是独立的，并与环境条件相关^[4]。

Shaker 家族通道是选择性的 K⁺通道，在很大程度上受电压的调控，按照受激活的电压范围及离子

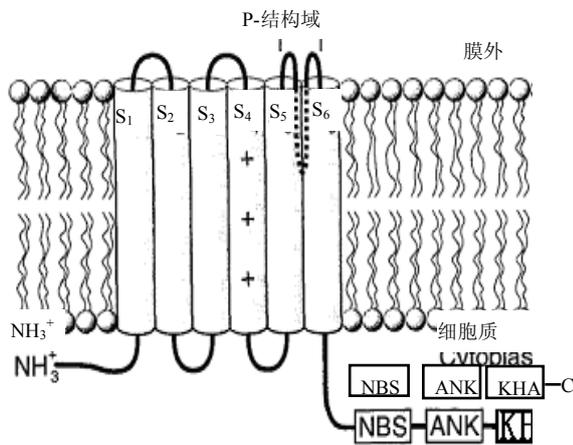


图 1 Shaker 通道蛋白(六个跨膜区域电压门控通道结构)
Fig. 1 Shaker channel protein (channel protein structure of six transmembrane segments and each have a voltage-gated)

流方向不同可细分为 3 类：内向整流 K⁺通道(K⁺_{in})、外向整流 K⁺通道(K⁺_{out})和弱内向整流 K⁺通道。

1.1.1 内向整流 K⁺通道 内向整流 K⁺通道对 K⁺浓度敏感，依赖电压，是主要的吸收 K⁺流的通道，如 NKT1, KAT1, KAT2, AKT1, AKT2/AKT3, AKT4 等，主要存在于细胞的质膜上，在细胞膜超极化的电压条件下被激活打开。

1.1.2 外向整流 K⁺通道 外向整流 K⁺通道具有电势依赖性，可释放 K⁺流，如 NTORK1, GORK, SKOR 等。

1.1.3 弱内向整流 K⁺通道 弱内向整流 K⁺通道既可吸收 K⁺，又可释放 K⁺流，如 AKT2。

1.2 KCO 通道

KCO 通道即钾通道 (K⁺channel)、钙激活的 (Ca²⁺ activated) 和外向整流 (outward-rectifying) 的缩写，首次克隆的 KCO1 基因是通过基因数据库搜索动物 K⁺通道新的植物对应物时所鉴定出来的。

与动物的 KCO 通道一样，第 1 个得到的拟南芥 KCO1 K⁺通道有 4 个预测的跨膜结构域，两个手性结构域在 C 末端，可能是 Ca²⁺的结合位点。植物 KCO 通道具有手性结构域，这是区别于哺乳动物的显著特征。KCO 家族的拓扑异构结构如图 2。

以拟南芥为例，根据疏水区组成的不同，KCO 通道蛋白可分为两个亚家族，即 KCO-1P 和 KCO-2P。

1.2.1 KCO-1P KCO-1P 是指由两个 TMS 和 1 个 P (孔道区域) 组成的亚族。它们的 TMS 并非用来充当电压感应区，核心区都有 1 个高度 K⁺渗透性的特征序列^[5]。KCO-1P 家族有 1 个成员，即 KCO3。

1.2.2 KCO-2P KCO-2P 是指由 4 个 TMS 和两个 P (孔道区域) 组成的亚族。KCO-2P 家族有 5 个成员：KCO1, KCO2, KCO4, KCO5 和 KCO6。

1.3 其他通道

环核苷酸门控通道(CNGC)是作为膜上的非选择性配体阳离子门控通道，植物 CNGC 结构具有 6 个跨膜区(S₁~S₆)、S₅ 和 S₆ 之间的孔区及 C 端的钙调素结合域(calmodulin binding domain, CaMBD) 和环核苷酸结合域(cyclic nucleotide binding domain, CNBD)，其结构与 Shaker 家族基因相似。

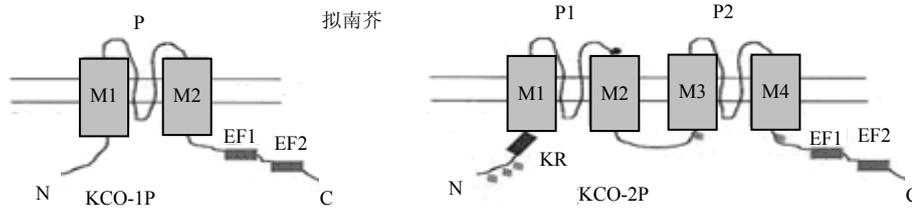


图2 KCO家族的拓扑异构结构(KCO-1P、KCO-2P)

Fig. 2 Heterogeneous topology structure of KCO family(KCO-1P、KCO-2P)

KAB1 是从拟南芥 EST 中分离出来的一种能够将 shaker 通道活化的蛋白, KAB1 跟动物的 β 亚基一样, 能够跟 Shaker α 亚基一起表达来活化没有活性的 Shaker 通道。

2 K^+ 通道的克隆、表达分析和功能

2.1 Shaker 通道

Shaker 通道基因的首次克隆是 L. Jan 通过观察果蝇突变子的表型而得到的。1992 年 Sentenac 等人首次在植物上克隆到 K^+ 通道基因 *AKT1*^[6]; 同年, Anderson 等亦从拟南芥中克隆出钾通道基因 *KAT1*^[7]。

2.1.1 Shaker 通道的克隆 Shaker 通道基因中, 拟南芥的研究最全面。拟南芥 Shaker 家族由 9 个成员组成: *KAT1*, *KAT2*, *AKT1*, *AKT2/AKT3*, *AKT5*, *AKT6*, *AtKCI*, *SKOR*, *GORK*。这些基因是通过酵母突变体功能互补、cDNA 文库筛选的方法得到的。目前从烟草中克隆的 Shaker 通道基因有 *NKCI*、*NpKTI*、*NKT1*、*NTORK1*、*NKT2* 和 *NtKCI*, 其中 *NpKTI* 基因的克隆是 1999 年在日本烟草公司植物育种和遗传实验室完成, 但文章尚未公开。

1) 酵母功能互补策略克隆 酵母功能互补策略是指具有某种营养缺陷型的突变株在缺少该营养的培养基上不能生长, 但若把互补该功能的外源 cDNA 或表达型 cDNA 文库转化到该突变株中, 即可恢复该突变株的生长, 这样就可以克隆到新的 cDNA。*AKT1* 和 *KAT1* 就是采用来自拟南芥各种组织的 cDNA 文库, 通过缺乏 K^+ 运输体的酵母突变体功能互补的方法克隆得到的。

2) 同源克隆 同源克隆是指根据其它已知的氨基酸保守区域设计引物, 进行 PCR 扩增得到目的基因中间片段, 然后利用 cDNA 末端快速扩增技术和染色体步移技术分别得到全长 cDNA 和全长基因。2004 年 Toshio Sano 采用同源克隆法得到烟草 K^+ 通道基因, 有 *NKT1*, *NTORK1*, *NKT2* 和 *NtKCI*, 均属于 Shaker 通道^[8], 2008 年郭兆奎等采用同源克隆法获得了黄花烟草 K^+ 通道基因 *NKCI*^[9]。目前模式植物拟南芥基因组全序列测定已经完成, 大量基因的功能也被揭示出来, 这为烟草 K^+ 通道基因的同源克隆提供了丰富的资源。

3) cDNA 文库筛选的克隆 cDNA 文库筛选是指用已知基因设计探针从基因文库中钓取新的目的基因的方法。烟草 K^+ 通道基因的克隆可以用已知基因序列作为探针, 从烟草各组织的 cDNA 文库中克隆 K^+ 通道。在拟南芥中, *AKT2* 是以 *AKT1* 为探针、从拟南芥 cDNA 文库筛选出的 K^+ 通道基因^[10], *KAT2* 是以 *KAT1* 为探针、从拟南芥 cDNA 文库中筛选出 *KAT2* 等功能类似的 K^+ 通道基因。*AKT3* 是从拟南芥文库中, 采用以 K^+ 通道(TMTTVGYGD)标记的寡核苷酸去分离 K^+ 通道基因^[10]。*AtKCI(KAT3)(AKT4)*是利用 *AKT1* 为探针, 利用 DNA 分子杂交从拟南芥中分离出来^[11]。因此, 烟草 K^+ 通道基因的克隆可以设计探针, 从烟草各组织的 cDNA 文库中克隆 K^+ 通道。

2.1.2 Shaker 通道的表达分析和功能 烟草 K^+ 通道的表达分析可采用 Northern blot 分析和荧光定量 PCR 分析, 功能分析可采用酵母双杂交、Western-blot、双向电泳等方法。

Northern blot 分析表明, *AKT1* 主要在根中表达, 特别是在成熟根表皮、皮层和内皮层, *AKT1* 编码的蛋白运输 K^+ 在转移互补酵母到无钾介质的试验中证实^[12]。

KAT1 编码一个能够被超极化激活的 K^+ 通道蛋白^[13], 表达具有组织特异性, 主要表达部位是保卫细胞, 在根和茎维管组织中也有少量表达, *KAT1* 的功能从非洲爪蟾属光滑卵母细胞上的表达得到证实^[14]。*KAT1* 以低亲和力 K^+ 吸收方式进入保卫细胞, 在气孔开合中扮演重要角色, 并向维管组织转运 K^+ , 而非直接从土壤中吸收 K^+ 。

AtKC1(KAT3)(AKT4) 作为 *Shaker* 家族, 却不具有 K^+ 通道作用, 但可通过调节 *AKT1*, 来中断 K^+ 流进入根毛细胞^[15-16]。一旦被吸收, K^+ 分泌进入根木质部以及传递到地上部便涉及到 *SKOR* (*Stelar K⁺ outward rectifying channel*) 通道, *SKOR* 在根中柱鞘、木质部软组织、花粉中表达, 当膜去极化时 *SKOR* 被激活, 该通道可调节木质部汁液中 50% 的 K^+ 外流^[17]。

KAT2 和 *GORK* (*Guard cell outward rectifying K⁺ channel*) 是在保卫细胞中表达的^[18], 它们控制 K^+ 流入和流出保卫细胞。*GORK* 在保卫细胞中是唯一的外向 K^+ 通道, 当膜去极化时 *GORK* 被激活。*GORK* 对 K^+ 敏感, 因此它有可能作为 K^+ 感应器^[19]。

AKT5/SPIK (*Shaker pollen inward rectifier K⁺ channel*) 在花粉中特异表达, 涉及到花粉中 K^+ 吸收, 是花粉管发育和最佳花粉竞争力所必需的^[20]。

AKT3 主要在韧皮组织表达。用卵母细胞中的异源表达和电压钳分别研究其生理学功能和电特性, 发现它只受膜电势的微弱调节, 可能参与了韧皮部装载和卸载中的 K^+ 运输^[21]。通过 RNA 凝胶分析和 PCR 技术, 鉴定出 *AKT2* 和 *AKT3* 在源和库的韧皮组织中均有存在, 它们是同一基因编码的两个蛋白质, 在爪蟾卵母细胞中具有相同功能^[22]。植物胁迫激素 ABA 能增加 *AKT2* 转录的数量, 显示 *AKT2* 对于干旱可能有某些反应。

K^+ 通道在拟南芥的根、茎、叶、花中均有表达, 因此依据拟南芥及其它作物 K^+ 通道的表达部位, 可以在烟草相应的部位克隆出相应的 K^+ 通道基因。

2.2 KCO 通道

2.2.1 KCO 通道的克隆 1997 年 Czempinski^[23] 等从拟南芥中成功克隆到首个 *KCO1* 基因。*KCO1* 是以 *Shaker* 通道的 P 结构域的保守序列为探针, 从拟南芥的 EST 数据库中筛选出来的。目前烟草还没有该基因的报告, 但可利用 EST 文库筛选、同源克隆和 cDNA 文库筛选等方法得到烟草 *KCO* 通道基因。

2.2.2 KCO 通道的表达分析和功能 *KCO1* 在植物各部分均有表达, 在根、叶中有强烈表达^[24]。*KCO1* 能够在功能上与外向整流型的 *Shaker* 通道家族区别开来。*KCO6* 在根及叶中有强烈的表达^[25]。

KCO1, *KCO2* 和 *KCO6* 特点是各自通道蛋白的 C 末端具有 1~2 个 EF 手形, EF 区域参与 Ca^{2+} 调节 *AtTPK1* 通道的过程。*KCO4* 缺少 EF 手形。*KCO5* 显示为弱的 EF 手形。

最近研究表明, 该家族的有些成员, 如 *KCO4*, 并不具备外向整流 K^+ 通道的功能, 所以, 该家族又被命名为 *TPK* (*Tandem-Pore K⁺*) 通道^[26]。*KCO4* (*At-TPK4*) 是在质膜上发挥功能的, 它可能在花粉管生长过程中参与 K^+ 平衡及膜电位的调节^[26]。

2.3 其他通道

植物 *CNGC* 离子通道是 Schuurink 等人在 1998 年筛选大麦钙调素结合转运蛋白时首次确认的^[27]。

2.3.1 其它通道的克隆 烟草和拟南芥中发现的很多 *CNGC* 基因序列是采用 cDNA 文库筛选的方法获得的。1999 年 Tzahi Arazi 等^[28] 采用从 cDNA 文库筛选的方法得到了烟草 *CNGC* 离子通道基因 *NiCBP4*, *NiCBP7*。拟南芥中, *AtCNGC1* 和 *AtCNGC2* 是通过利用动物的 *CNG* 通道序列来筛选 EST, 然后再以 EST 作为探针从拟南芥 cDNA 文库中筛选 *CNG* 通道。*AtCNGC3*, *AtCNGC4*, *AtCNGC5* 和 *AtCNGC6* 是利用 *AtCNGC1* 和 *AtCNGC2* 先从拟南芥数据库中获得的一部分片段信息, 再辅以 RACE 技术获得全长片段^[29]。目前拟南芥基因组中有 20 个编码 *CNGC* 的基因序列, 因此可参照拟南芥信息, 采用 cDNA 文库筛选和同源克隆可以快速获得更多的烟草 *CNGC* 序列。

KABI 是 Tang 等应用 EST 从拟南芥的 cDNA 文库中分离到编码 K^+ 通道 β 亚基的基因^[30]。

2.3.2 其它通道的表达分析和功能 植物 CNGC 主要定位在细胞膜上, 能够将外界信号转变成跨膜的阳离子流^[31]。它的功能主要是作为信号传导, 对离子转运、生长发育、抗逆性等起作用。

原位杂交实验表明, *KABI* 在叶细胞(尤其是保卫细胞)中表达较高, 在根细胞中表达较低。Western 杂交表明, 在叶、花、根细胞的胞质区和膜区都存在 *KABI*。

3 K⁺吸收机制

植物 K⁺吸收机制研究最早由 Epstein 等人开展, 他们采用酶动力学方法来描述 K⁺吸收, 并把 K⁺吸收分为 2 个机制^[32]。另外, 目前还有一种观点, 就是共存的钾吸收机制。

3.1 K⁺吸收机制 I

K⁺吸收机制 I 指高亲和力 K⁺吸收, K⁺吸收服从 Michaeli-Menten 动力学方程, 在低外界 K⁺浓度(如大麦在外界 0.001~0.2 mmol/L)下起作用。高亲和力 K⁺吸收为主动吸收机制, 因为 K⁺吸收是逆 K⁺电化学势梯度, 可能与 K:H 或 K:Na 的协同运输相关。高亲和力 K⁺吸收机制的作用是受诱导性表达的^[33]。

3.2 K⁺吸收机制 II

K⁺吸收机制 II 指低亲和力 K⁺吸收, 在高的外部 K⁺浓度(如大麦在外界 1~10mmol/L)下起作用。低亲和力 K⁺吸收为经由 K⁺选择性通道的被动运输。低亲和力 K⁺吸收机制的作用是组成性表达的^[34]。杨铁钊等^[35]在以 NC89 为材料的烟草研究中得出的结论也与 Epstein 相一致。烟草钾积累量随外界离子浓度提高呈现快速—缓慢—快速—缓慢的交替变化, 显示出烟草 K⁺吸收机制也是两个吸收机制的特性。

两个吸收机制的特性以不同烟草基因型为基础。鲁黎明等研究表明, 不同烟草基因型的 K⁺亲和力及吸收能力是影响烤烟钾营养效率高低的的重要因素^[36]; 牛佩兰等研究结果显示, 烟草基因型间的吸钾能力、钾利用效率及叶片含钾量存在显著差异, 并且这种差异可以稳定遗传^[37-38]。

3.3 共存的钾吸收机制

共存的钾吸收机制是指机制 I 和机制 II 共同作用来吸收 K⁺。K⁺通道和钾转运体共同转运 K⁺: 在

拟南芥中, K⁺选择性通道 AKT1 和 AtKC1、高亲和力 K⁺转运体 AtKUP4 在根外层细胞的质膜上执行 K⁺吸收^[39]; AtKUP1、AtKUP2 和 AtHKT1 转运体也可能对根 K⁺吸收有贡献。刘贯山^[40]等认为: 在植物中存在多个 K⁺吸收转运机制, 原因如下: 1) 植物不同器官或组织的营养和能量需求不同; 2) 养分的转运跨不同的膜(质膜、液泡膜、质体内外膜等), 因而需要不同的跨膜转运机制; 3) 根细胞外环境条件、养分和有毒竞争离子浓度变化很大。组成型和诱导型高亲和力吸收组份对变化的养分有效性和离子条件反应不同; 4) 基本养分积累机制的冗余对于植物生存可能是重要的。由此可见, 植物通过根系从土壤中吸收 K⁺以及 K⁺在植物体内的转运需要许多不同的膜蛋白, 植物具有多个 K⁺吸收转运机制。

总之, 烟草的 K⁺吸收机制是以烟草的基因型为基础的。当外界 K⁺浓度低时, 高亲和力 K⁺吸收起主要作用; 当外部 K⁺浓度高时, 低亲和力 K⁺吸收起主要作用。并且这两种吸收机制是共存的, 在实际生产中烟草所吸收的 K⁺主要以低亲和吸收为主。

4 K⁺通道分子调控的技术手段

目前主要有两种技术进行 K⁺通道分子调控的研究, 一是采用电压钳, 二是采用巨大膜片钳等技术来揭示 K⁺通道的内流和外流。

4.1 电压钳技术

电压钳可以测量细胞的膜电位、膜电流和突触后电位。电压钳是向细胞内插入一根微电极往胞内补充电流, 补充的电流正好等于跨膜流出的反向离子流量, 这样就能控制膜电位数不变。经过离子通道的离子流与经微电极施加的电流方向相反, 数量相等, 故可定量测定细胞变化时的离子电流。

武维华^[41]使用膜片钳技术, 揭示拟南芥根细胞 K⁺通道 AKT1 的活性受由 *LKSI* 基因编码的蛋白激酶 CIPK23 的正向调控。过量表达 *LKSI* 基因可使植物在低 K⁺条件下的 K⁺吸收速率增强, 显著提高植株对低钾胁迫的耐受性。研究进一步发现, CIPK23 促进植物 K⁺吸收是通过细胞 K⁺通道 AKT1 的磷酸化来实现的, 而 CIPK23 的上游受两种钙信号感受器 CBL1 和 CBL9 的正向调控。植物根细胞 K⁺

通道 AKT1 是植物细胞自土壤溶液中吸收钾的主要执行者。在拟南芥植物中过量表达 LKS1、CBL1/9 基因以增强 AKT1 的活性,能显著提高植株对低钾胁迫的耐受性。

4.2 膜片钳技术

膜片钳技术是研究离子通道的“金标准”,应用该技术可以证实细胞膜上离子通道的存在,通过记录细胞膜片上的离子通道电流来反映通道分子的生理特性,进而对各种生理机制进行深入细致的研究。

李乐攻等^[42]利用大膜片钳、电压钳、DNA 改组 (DNA Shuffling) 等技术,发现了控制 K⁺通道流向转换的分子偶联机制,揭开了使同一离子通道的离子流向发生逆转的关键因素。他首先进行 DNA 改组,将拟南芥基因在分子水平上进行有性重组,然后得到的产物分别植入 CY162 筛选系统(该酵母没有内向型 K⁺通道)。再用电生理学方法分析筛选,后来发现实际上只要 312 和 271 两个位点的氨基酸残基偶联改变,通道流向就会发生转变。该定点改变实验证实了通道流向转换的分子偶联机制。这项研究成果不仅发现了控制植物 K⁺流向的新机制,也为其他离子的流向控制提供了可供借鉴的调控模式。

因此在烟草方面可采用以上两种技术,再结合生物技术寻找 K⁺通道的上游调控元件,或通过改变 K⁺通道氨基酸点与点之间的残基来揭示 K⁺流向。

5 展望

烟草虽然是模式植物,但对于其本身的 K⁺通道研究很少,所以可围绕烟草的 K⁺吸收机制,重点研究烟草的 K⁺通道的调控。第一,在基础研究方面,可更深一步地揭示 K⁺转运机制;第二,在烟草应用方面,把分子水平的生理功能跟目前的栽培技术结合起来,可提高钾肥利用率,缓解我国钾肥贫瘠现状。在生产应用上,采用可能提高钾含量的基因构建基因构件,使其能调控烟叶的基因表达;再经分子生物学方法鉴定分离,通过改善细胞代谢环境,调控细胞离子通道系统,筛选高钾含量烟草。采用上述方法,能显著提高烟叶的钾含量,如扩大筛选规模,可获得含钾量更高的烟叶。另外,采用转基

因的方法导入 K⁺通道基因,可提高烟草抗逆性。总之,目前可从烟草本身出发克隆出 K⁺通道,研究受哪些物质调控、以及这些通道之间是如何协调运行的。烟草 K⁺通道的研究具有广阔的发展空间。

参考文献

- [1] 曹志洪. 优质烤烟生产的土壤与施肥[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1991: 17-28.
- [2] Shi Weiming, Su Yanhua, Fujiwara T, et al. Transfer of potassium channel genes into tobacco[G]//Ando T. Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997: 195-196.
- [3] 刘国栋. 植物营养学研究的五种新观点[J]. 科技导报, 2000, 18(2): 7-9.
- [4] Frans J M, Audrey M, Dale S, et al. Roles of Higher Plant K⁺ Channels[J]. Plant Physiol, 1997, 114: 1141-1149.
- [5] Moshelion M, Becker D, Czempinski K, et al. Diurnal and circadian regulation of putative potassium channels in a leaf moving organ [J]. Plant Physiol, 2002, 128: 634-642.
- [6] Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, et al. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system[J]. Science, 1992, 256: 663-665.
- [7] Anderson J A, Huprikar S S, Kochian L V, et al. Functional expression of a probable Arabidopsis thaliana potassium channel in Saccharomyces cerevisiae[J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89: 3736-3740.
- [8] Toshio S, Dirk B, Natalya I, et al. Plant cells must pass a K⁺ threshold to re-enter the cell cycle[J]. The Plant Journal, 2007, 50: 401-413.
- [9] 郭兆奎, 杨谦, 颜培强, 等. 黄花烟草 K⁺通道基因 NKC1 克隆与序列分析[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(5):63-68.
- [10] Cao Y, Ward J M, Kelly W B, et al. Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in Arabidopsis thaliana[J]. Plant Physiol, 1995, 109: 1093-1106.
- [11] Ketchum K A, Slayman C W. Isolation of an ion channel gene Arabidopsis thaliana from using the H5 signature sequence from voltage-dependent K⁺ channels[J]. FEBS Lett, 1996, 378: 19-26.
- [12] Hirsch R E, Lewis B D, Spalding E P, et al. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition[J]. Science, 1998, 280: 918-921.
- [13] Nobuyuki U, Walter G, Cao Yongwei, et al. Identification of Strong Modifications in Cation Selectivity in an Arabidopsis Inward Rectifying Potassium Channel by Mutant Selection in Yeast[J]. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1995, 270(41): 24276-24281.

- [14] Schachtman D P, Schroeder J I, Lucas W, et al. Expression of a inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA[J]. *Science*, 1992, 258: 1652-1658.
- [15] Dreyer I, Antunes S, Hoshi T, et al. Plant K⁺ channel alpha-subunits assemble indiscriminately[J]. *Biophysical Journal*, 1997, 72: 2143-2150.
- [16] Reintanz B, Szyroki A, Ivashikina N, et al. AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel α -subunit modulates root hair K⁺ influx[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99: 4079-4084.
- [17] Mouline K, Ali  nor V  ry A, Gaymard F, et al. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in Arabidopsis[J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 339-350.
- [18] 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 Lett*, 2000, 486(2): 93-98.
- [19] Ivashikina N, Becker D, Ache P, et al. K⁺ channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs[J]. *FEBS Letters*, 2001, 508: 463-469.
- [20] Mouline K, V  ry A-A, Gaymard F, et al. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in Arabidopsis[J]. *Gene Dev*, 2002, 16: 339-350.
- [21] Marten I. AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked protons[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96(13): 7581-7586.
- [22] Lacombe B. A shaker-like K⁺ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis[J]. *Plant cell*, 2000, 12(6): 837-851.
- [23] Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T, et al. New structure and function in plant K⁺ channels : KCO1 ,an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency[J]. *EMBO J*, 1997, 16: 2565-2575.
- [24] Czempinski K, Frachisse J-M, Maurel C, et al. Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis 'two-pore' K⁺ channel KCO1 [J]. *Plant J*, 2002, 29: 809-820.
- [25] BECKER D, Geiger D, Dunkel M, et al. AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH-and Ca²⁺-dependent manner [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 15621-15626.
- [26] Ashley M K, Grant M, Grabov A. et al. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins[J]. *J Exp Bot*, 2006, 57: 425-436.
- [27] Schuurink R C, Shartzner S F, Fath A, et al. Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasmamembrane of barley aleurone[J]. *Plant Biol*, 1998, 95(4): 1944-1949.
- [28] Tzahi A, Ramanjulu S, Boaz K, et al. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants[J]. *The Plant Journal*, 1999, 20(2): 171-182.
- [29] Claudia Kohler, Thomas Merkle, Gunther Neuhaus. Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in Arabidopsis thaliana[J]. *The Plant Journal*, 1999, 18(1): 97-104.
- [30] Tang H X, Vasconcelos A C, Berkowitz G A, et al. Evidence that plant K⁺ channel proteins have two different types of subunits [J]. *Plant Physiol*, 1995: 109-327.
- [31] Flynn G E, Johnson J P, Zagotta W N, et al. Cyclic nucleotide-gated channels: shedding light on the opening of a channel pore[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(9): 643-652.
- [32] Epstein E, Rains D W, Elzam O E, et al. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1963, 49: 684-692.
- [33] Fernando M, Kulpa J, Siddiqi M Y, et al. Potassium dependent changes in the expression of membrane-associated proteins in barley roots: I, Correlations with K⁺(86Rb⁺) influx and root K⁺ concentration[J]. *Plant Physiol*, 1990, 92: 1128-1132.
- [34] Gassmann W, Schroeder J I. Inward-rectifying K⁺ channels in root hairs of wheat[J]. *Plant Physiol*, 1994, 105: 1399-1408.
- [35] 杨铁钊. 植物吸钾机理及分子生物学研究进展[G]//国家烟草栽培生理生化研究基地. 烟草科技文献, 郑州: 2005, 30-43.
- [36] 鲁黎明, 杨铁钊. 植物 K⁺吸收转运的分子机制研究进展[J]. *棉花学报*, 2006, 18(6): 379-385.
- [37] 牛佩兰, 石屹, 刘好宝. 烟草基因型间钾效率差异研究初报[J]. *烟草科技*, 1996(1): 33-35.
- [38] 杨铁钊, 范进华. 不同基因型烤烟品种吸收钾差异的根系特性研究[J]. *西北农业学报*, 2006, 15(3): 41-44.
- [39] BANUELOS M A, Garcı  deblas B, Cubero B, et al. Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 784-795.
- [40] 刘贯山, 王元英, 孙玉合, 等. 高等植物钾转运蛋白[J]. *生物技术通报*, 2006, 5: 13-18.
- [41] 武维华. 拟南芥蛋白激酶 CIPK23 正向调控细胞 K⁺通道 AKT1[J]. *Cell*, 2006, 125(7): 1347-1360.
- [42] Li Legong, Liu Kun, Hu Yong, et al. Single mutations convert an outward K⁺ channel into an inward K⁺ channel[J]. *PNAS*, 2008, 105(8): 2871-2876.

(责任编辑 王 颖)