



Przeszukiwanie bazy danych EST w celu zidentyfikowania pełnej sekwencji cDNA genu kodującego akwaporynę *Pharbitis nil* Choisy (*PnPIP1*)

Grażyna Dąbrowska, Paweł Mateusz Mordaka

Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Screening of the EST database for identification of the complete cDNA sequence of the gene encoding aquaporin of *Pharbitis nil* Choisy (*PnPIP1*)

Summary

Aquaporins are membrane proteins that facilitate water transport across the membranes in various microorganisms, plants and animals. Plant aquaporins are divided into four groups based on the amino acid sequence similarities and intracellular localization: plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), tonoplast intrinsic proteins (TIPs), nodulin-like intrinsic proteins (NIPs) and small basic intrinsic proteins (SIPs). We found 35 EST sequences homologous to 3' and 5' termini of the partial cDNA of *P. nil* in the GenBank NCBI database. cDNA encoding full length aquaporin of *P. nil* was cloned with the use of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The 1189 bp full length cDNA sequence of aquaporin *P. nil* (*PnPIP1*) was obtained. Analysis of protein hydropathy indicated that cloned part of *PnPIP1* contained the NPA motif (Asn-Pro-Ala) that is present in all known aquaporins. The amino acid sequence of the PnPIP1 protein exhibits 90, 89 and 88% sequence similarity to *Petunia x hybrida*, *Nicotiana excelsior* and *Fraxinus excelsior* aquaporins respectively. We showed that the EST database is a useful tool for identification of the complete cDNA of known genes.

Key words:

gene identification, aquaporin, EST sequences, *Pharbitis nil*.

Adres do korespondencji

Grażyna Dąbrowska,
Zakład Genetyki,
Instytut Biologii Ogólnej
i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja
Kopernika,
ul. Gagarina 9,
87-100 Toruń;
e-mail:
browsk@uni.torun.pl

biotechnologia

2 (81) 190–198 2008

1. Wstęp

Transport wody oraz metabolitów ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu żywego. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku odkryto istnienie kanałów wodnych tworzonych przez białka zwane akwaporynami, pozwalających na transport wody i innych związków, takich jak glicerol, mocznik, amoniak czy kwas borowy (1-3) i CO₂ (4) poprzez błony biologiczne.

Akwaporyny to integralne białka błonowe, których konserwowane ewolucyjnie sekwencje aminokwasowe zawierają dwa charakterystyczne motywy NPA (asparagina-prolina-alanina) oraz sześć helis transbłonowych (5,6).

W genomie człowieka zidentyfikowano dotychczas 13 białek rodziny akwaporyn występujących w różnych typach tkanek. Wykazano istotną rolę kanałów wodnych w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Akwaporyny zaangażowane są m. in. w regulację ciśnienia krwi, sekrecję płynów, metabolizm tłuszczu i angiogenezę guzów nowotworowych (7,8).

Genomy roślinne wykazują dużą różnorodność akwaporyn. U *Arabidopsis thaliana* wykazano obecność 35 genów kodujących kanały wodne oraz 33 u *Oryza sativa* i *Zea mays* (9,10). Wysoką ekspresję akwaporyn zaobserwowano w tkankach przewodzących. Niektóre akwaporyny ulegają ekspresji konstytutywnej, inne podlegają regulacji czynnikami zewnętrznymi (11). Akwaporyny tworzą rodzinę białek MIP (ang. *Membrane Intrinsic Protein*) złożoną z kilku podrodzin: PIP (ang. *Plasma membrane Intrinsic Protein*) – akwaporyny błony plazmatycznej, TIP (ang. *Tonoplast membrane Intrinsic Protein*) – akwaporyny tonoplastu, NIP (ang. *Nodulin 26-like Intrinsic Protein*) – akwaporyny błony peribakteroidu, SIP (ang. *Small basic Intrinsic Protein*) – białka o nieznacznej homologii z akwaporyną 1 człowieka (12).

Celem badań było zidentyfikowanie pełnej sekwencji cDNA genu kodującego akwaporynę *Pharbitis nil* zlokalizowaną w błonie plazmatycznej.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał

Częściowa sekwencja genu akwaporyny *P. nil* Choisy cv. Violet (NCBI numer sekwencji AY547266). Do realizacji zadania badawczego wykorzystano programy komputerowe: BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn), PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>), ProtParam (<http://www.expasy.org>), VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen.html>), Translate Tool (<http://www.expasy.org>), ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>), Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), WoLFPSORT (<http://wolffpsort.seq.cbrc.jp/>),

TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>), MotifScan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan).

2.2. Metody

Całkowite RNA wyizolowano z siewek *Pharbitis nil* Choisy zgodnie z protokołem metody Chomczynski i Sacchi (13).

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono według protokołu opisanego przez Dąbrowską i in. (14).

Kompletne cDNA genu *PnPIP1* namnożono w reakcji PCR ze starterami PnAQP1 (5'-TTGCAACAATTTACCCCAAC-3') i PnAQP2 (5'-CAACCTCAAGATTACAGAACAAACA-3'). Mieszaninę reakcyjną stanowiły: 0,2 µg cDNA, 0,6 U polimerazy Taq (EURx), startery (stężenie końcowe 0,5 µM) i dNTP (stężenie końcowe 0,5 µM) (EURx). Reakcję przeprowadzono w warunkach: 94°C – 5 min, 35 cykli (94°C – 45 s, gradient temp. 44,9-61,1°C – 75 s, 72°C – 90 s), 72°C – 30 min.

Produkt reakcji RT-PCR wklonowano w wektor pCRII-TOPO z wykorzystaniem zestawu pCRII-TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Uzyskanym DNA plazmidowym stransformowano bakterie *E. coli* TOP10F' metodą szoku cieplnego.

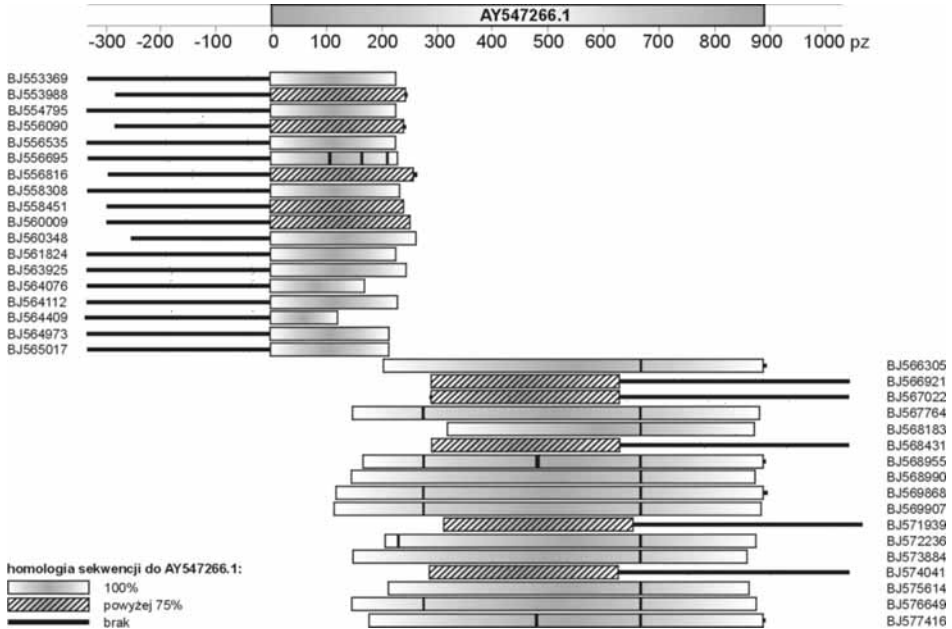
DNA plazmidowe izolowano metodą lizy alkalicznej przeprowadzonej zgodnie z protokołem Sambrook i in. (15). DNA genomowe otrzymano przy użyciu GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) zgodnie z protokołem producenta.

Sekwencjonowanie wykonano w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

3. Wyniki

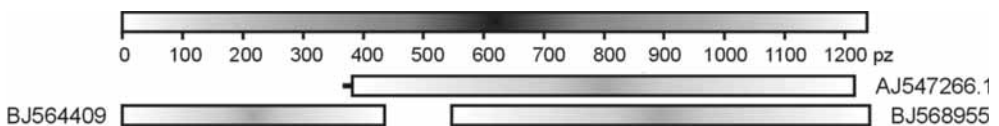
3.1. Przeszukiwanie bazy sekwencji EST i złożenie kompletnej sekwencji cDNA genu akwaporyny *P. nil*

Bazę danych EST przeszukano za pomocą programu BLAST fragmentem sekwencji genu akwaporyny (AY547266.1) zidentyfikowanego z wykorzystaniem metody ang. *differential display* (16). Uzyskano 35 sekwencji EST o długości od 400 do 700 par zasad homologicznych do genu akwaporyny *P. nil*, pochodzących z sekwencjonowania biblioteki skonstruowanej z cDNA otrzymanego z mRNA kwiatów i pąków kwiatowych *P. nil* (rys. 1). Do dalszych analiz wybrano dwie sekwencje: BJ564409 i BJ568955, z których wraz z sekwencją AY547266 złożono 1227 nukleotydową sekwencję cDNA akwaporyny *P. nil* wydłużoną w kierunkach 5' i 3' (rys. 2). Pierwsze 451 nukleotydów pochodziło z sekwencji BJ564409, dalsze 753 z sekwencji



Rys. 1. Sekwencje homologiczne do częściowej sekwencji akwaporyny *P. nil* zidentyfikowane w bazie danych EST.

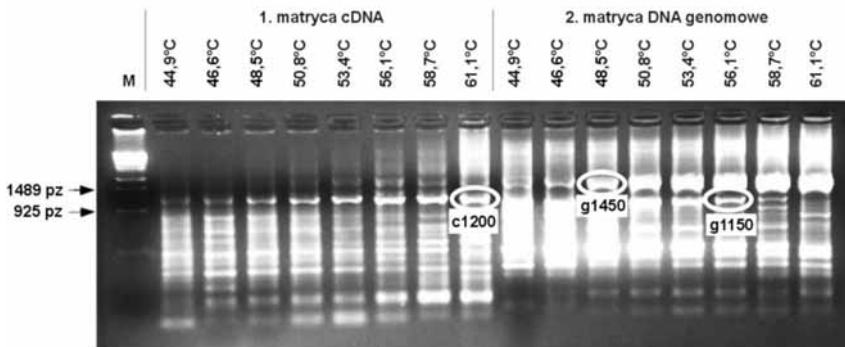
AY547266, końcowe 23 z BJ568955. Porównanie wykonane z użyciem programu ClustalW wykazało 100% homologii pomiędzy sekwencją EST BJ564409 a sekwencją AY547266 na odcinku 114 pz oraz 99% homologii pomiędzy EST BJ568955 a AY547266 na odcinku 699 pz. Piętnastonukleotydomy fragment końca 5' sekwencji AY547266 nie wykazywał homologii z BJ564409. Na podstawie porównania tych dwóch fragmentów z korespondującymi odcinkami sekwencji genów akwaporyn *Oryza sativa* (*OsRWC*), *Arabidopsis thaliana* (*AtPIPc*) i *Mesembryanthemum crystallinum* (*McMipA*) wykazano, że jest to prawdopodobnie artefakt procesu klonowania. Złożoną sekwencją cDNA *P. nil* przeszukano za pomocą programu VecScreen. Na podstawie przeprowadzonej analizy nie ujawniono obecności w badanej sekwencji *P. nil* fragmentów sekwencji wektora (dane nie pokazane).



Rys. 2. Schemat przedstawiający sposób złożenia wydłużonej sekwencji genu akwaporyny *P. nil*.

3.2. Potwierdzenie wydłużonej sekwencji cDNA akwaporyny metoda PCR

W celu namnożenia kompletnej sekwencji cDNA *P. nil* zaprojektowano startery długości dwudziestu nukleotydów PnAQP1 i PnAQP2 z wykorzystaniem programu Primer3. Oba startery posiadały identyczną temperaturę przyłączenia, a skład par zasad AT i GC wynosił 50%. Wykonano reakcję PCR na matrycach cDNA i genomowego DNA *P. nil*. Uzyskano szereg produktów, z których wybrano trzy o zbliżonej wielkości do teoretycznej sekwencji wydłużonego cDNA genu akwaporyny: c1200 – produkt powstały na matrycy cDNA oraz g1150 i g1450 – na matrycy genomowego DNA (rys. 3). Produkty reakcji PCR wyluowano z żelu agarozowego i przeprowadzono reamplifikację. Jedynie na matrycy cDNA powstał produkt specyficzny o identycznej wielkości jak fragment DNA użyty jako matryca w reakcji PCR (dane nie pokazane). Produkt reamplifikacji ze starterami PnAQP1 i PnAQP2 wklonowano w wektor pCRII TOPO i stransformowano nim bakterie *E. coli* TOP10F'. Z uzyskanych transformantów wyizolowano DNA plazmidowe, a obecność cDNA sprawdzono restrykcyjnie. DNA plazmidowe zawierające wstawkę wielkości około 1200 pz zsekwencjonowano. Poznaną sekwencję porównano w programie ClustalW z sekwencjami AY547266, BJ564409, BJ568955. Konsensusową sekwencję cDNA długości 1189 nukleotydów oznaczono jako *PnPIP1* i wprowadzono do GenBank NCBI pod numerem AY547266.2 (rys. 4). Podczas przeszukania bazy sekwencji nukleotydowych wykazano, że cDNA *PnPIP1* wykazuje najwyższą homologię z genem kodującym białko transbłonowe *Hordeum vulgare* (X76911.1) – 81% homologii na odcinku 768 pz (dane nie pokazane).



Rys. 3. Produkty reakcji PCR rozdzielone w 1% żelu agarozowym. Ścieżki: M – marker wielkości λ /Styl (Fermentas), sekcja 1 – matryca cDNA, sekcja 2 – matryca DNA genomowe. Nad ścieżkami podano temperatury przyłączenia starterów. Obwódką zaznaczono produkty wybrane do dalszej analizy.

RWC-1_BAA24016.1	MEGKEEDVRFRANRYSERQPIGTAAQAGDDKDYKEPPAPLFEPGELKSWSFYRAGIAE	60
PIP1c_CAA53476.1	MEGKEEDVRVGANKFPERQPIGTSAQT---DKDYKEPPAPFFEPGELSSWSFYRAGIAE	57
mipA_AAB09747.1	MEGKEEDVRLGANKFSEKQPLGTVAQ---DRDYREPPRA-LFEAGELTWSFYRAGIAE	55
PM28a_AAA99274.2	MS-KEVSEEAQAHQH-----KDYVDPFPAPFFDLGELKLSWFWRAIAE	44
dTIP_AAC49281.1	-----MAGVAFSGFDDSFSLASLRRLAE	24
AQP2_AAB31999.1	-----MDELRSIAFSRAVFAE	16
PnPIP1_AAS55867.2	MEHREEDVRLGANKFPEKQAI GTAAQ---DKDYTEAPPTALFEPSELSSWSFYRAGIAE	56
	TM1 LoopA TM2	
RWC-1_BAA24016.1	FVATFLFLYITILTVMGVSK--SSSKCATVGIQCIAWSFGGMIFALVYCTAGISGGHINP	118
PIP1c_CAA53476.1	FIAATFLFLYITVLTVMGVK--APNMCASVGIQCIAWAFGGMIFALVYCTAGISGGHINP	115
mipA_AAB09747.1	FIAATFLFLYISILTVMGVNR--SPSKCASVGIQCIAWSFGGMIFALVYCTAGISGGHINP	113
PM28a_AAA99274.2	FIAITLLFLYITVATVIGHSK--ETVVCVGVLLGIAWAFGGMIFVLYCTAGISGGHINP	102
dTIP_AAC49281.1	FISTLLFVFAVGSIAIAYAKLTSDAALDTPGLVAIVAVCHGFALFVAVAI GANISGGHINP	84
AQP2_AAB31999.1	FLATLLFVFFGLGSALNPF-----QALPVLQIAMAFLGLIGTLVQALGHSI GAHINP	69
PnPIP1_AAS55867.2	FIAATFLFLYITILTVMGVSK--SDSKCKTVGIQCIAWAFGGMIFALVYCTAGISGGHINP	114
	LoopB TM3 LoopC	
RWC-1_BAA24016.1	AVTEGLFLARKLSLTPAVFYIVMQCLGAI CGAVGVKGFQCG-LYMGNGGGANVVASGYTK	177
PIP1c_CAA53476.1	AVTEGLFLARKLSLTPAVFYIVMQCFGAICGAVGVKGFQPN-PYQTLGGGANTVAHGYTK	174
mipA_AAB09747.1	AVTEGLFLARKLSLTPAVFYVMVQCLGAI CGAVGVKGFQPT-PYQLGGGANSVNPGYTK	172
PM28a_AAA99274.2	AVTEGLFLARKVSLTALVYVIAQCLGAI CGVGLVKAFKPKG-PYNQFGGGANSVALGYNK	161
dTIP_AAC49281.1	AVTEGLAVGGQITVITGVFYVIAQLLGS TAAACFLKLYV-----GGLAVPHTSVAAGLGS	139
AQP2_AAB31999.1	AVTVLVLVGHVSVLPAAFYVAAQLLGA VAGAALLHEITPADIRGLD LAVNALSNSTTAG-	128
PnPIP1_AAS55867.2	AVTEGLFLARKVSLTALVYVIVMQCLGAI CGAVGVKGFQKT-LYNSKGGANVNVNPGYTK	173
	TM4 LoopD TM5	
RWC-1_BAA24016.1	GDGLGAEIVGTFVLYVTVFSATDAKRNRARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGI	237
PIP1c_CAA53476.1	GSGLGAEIIGTFVLYVTVFSATDAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLASIPITGTGI	234
mipA_AAB09747.1	GSGLGAEIIGTFVLYVTVFSATDAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGI	232
PM28a_AAA99274.2	GTALGAEIIGTFVLYVTVFSATDKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFMVHLATIPITGTGI	221
dTIP_AAC49281.1	IEGVVMEIITFALVYTVYTAADP---KKGSLGTIAPLAIGLIVGANILAAGPFGSGGSM	196
AQP2_AAB31999.1	-QAVTVLFLTLQLVLCIFASTDE---RRGENFGTPALSIGFSVALGHLGHIHTGCSM	183
PnPIP1_AAS55867.2	GDGLGAEIVGTFVLYVTVFSATDAKRNRARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGI	233
	LoopE TM6	
RWC-1_BAA24016.1	NPARSLGAAI IYNKDHAWNDDHWIFWVGPFVGAALAAIYHQV IIRAI PFKRS-----	289
PIP1c_CAA53476.1	NPARSLGAAI IYNKDHAWDDHWIFWVGPFIGAALAAIYHQV IIRAI PFKRS-----	286
mipA_AAB09747.1	NPARSLGAAI IYNRPHAWADHWIFWVGPFIGAALAAIYHQV IIRAI PFKRS-----	283
PM28a_AAA99274.2	NPARSFGAAVIFNSNKVWDDQWIFWVGPFIGAALAAIYHQV IIRAI PFKRS-----	281
dTIP_AAC49281.1	NPARSFGPAVAAAG---DFSGHWYVWVGLIGGLAGL IYGNVFMGSSSEHVP LASADF---	250
AQP2_AAB31999.1	NPACSLAPAVVTG---KFDDHWVFWIGPLVGAAILGSLLYNYVLFPPAKSLSERLAVLRGL	240
PnPIP1_AAS55867.2	NPARSLGAAI IYNNEHAWNDHWIFWVGPFVGAALAAIYHQV IIRAI PFKRS-----	284
RWC-1_BAA24016.1	-----	
PIP1c_CAA53476.1	-----	
mipA_AAB09747.1	-----	
PM28a_AAA99274.2	-----	
dTIP_AAC49281.1	-----	
AQP2_AAB31999.1	EPDITDWEEREVRRRQSVLEHSPQSLPRGTKA	271
PnPIP1_AAS55867.2	-----	

Rys. 4. Zestawienie wyników analizy struktury pierwo- i drugorzędowej białka PnPIP1. Sekwencję aminokwasową porównano w programie ClustalW z sekwencjami białek rodziny MIP: RWC1 *Oryza sativa* (AB009665.1), PIPC *Arabidopsis thaliana* (X75882), MipA *Mesembryanthemum crystallinum* (AAB09747), PM28A *Spinacia oleracea* (AAA99274.2), δ-TIP *Arabidopsis thaliana* (U39485) oraz AQP2 człowieka (D13906). Szarym wyróżnieniem zaznaczono hydrofobowe helisy transbłonowe (TM 1-6), wytłuszczeniem motywy asparagino-prolina-alanina (NPA), podkreśleniem – miejsca fosforylacji przez kinazę zależną m.in. od cAMP i cGMP oraz fosforylacji przez kinazę II. Pętle cytoplazmatyczne oznaczono jako LoopB i D, zewnątrzkomórkowe – LoopA, C i E.

3.3. Analiza sekwencji nukleotydowej cDNA *P. nil* oraz kodowanej przez nią sekwencji aminokwasowej

Charakterystykę sklonowanej sekwencji przeprowadzono z wykorzystaniem programów komputerowych dostępnych w internetowych serwisach bioinformatycznych.

Sekwencję *P. nil* przetłumaczono na sekwencję aminokwasową za pomocą programu Translate Tool. W sekwencji cDNA *PnPIP1* zlokalizowano otwartą ramkę odczytu o długości 284 aminokwasów. Wykorzystując program ProtParam obliczono przypuszczalne parametry fizyczne i chemiczne białka PnPIP1. Teoretycznie obliczona masa cząsteczkowa wynosi 30,4 kDa, a punkt izoelektryczny 8,81. Sekwencja PnPIP1 na długości 228 aminokwasów jest silnie homologiczna z konserwowaną domeną MIP, charakterystyczną dla białek rodziny akwaporyn i kanałów transportujących glicerol (program NCBI Conserve Domain Search). W wyniku wykorzystania programu TopPred wykazano obecność sześciu potencjalnych domen hydrofobowych przechodzących przez dwuwarstwę lipidową błony plazmatycznej. Po analizie sekwencji aminokwasowej białka *PnPIP1* w programie MotifScan wykazano obecność wielu funkcjonalnych motywów białkowych: potencjalne miejsca fosforylacji dla kinazy II i kinazy zależnej od cAMP i cGMP oraz motywy białek rodziny MIP (ang. *Membrane Intrinsic Protein*). Analiza sekwencji w programie WoLFPSORT wykazała, że przewidywanym miejscem subkomórkowej lokalizacji białka jest błona plazmatyczna. Na poziomie sekwencji aminokwasowej białko kodowane przez gen *PnPIP1* na odcinku 248 aminokwasów jest homologiczne do roślinnych akwaporyn *Petunia x hybrida*, *Nicotiana excelsior* i *Fraxinus excelsior* (odpowiednio 90, 89 i 88% homologii) (rys. 4).

4. Dyskusja

Baza danych EST (ang. *Expressed Sequence Tags*) zawiera sekwencje kodujące fragmenty genów, które ulegają ekspresji w danym typie tkanki. Ich liczba znacznie przewyższa ilość innych sekwencji zdeponowanych w GenBank NCBI. Sekwencje te są krótkie, ich długość wynosi około 600-700 nukleotydów, a ich homologia z wcześniej opisanymi genami nie jest zbadana. Sekwencje EST są generowane poprzez przypadkowe sekwencjonowanie klonów z różnych bibliotek cDNA. EST mogą być używane do identyfikacji paralogów i ortologów genów lub produktów alternatywnego składania transkryptów znanych genów (17). Analiza zestawionych, zachodzących na siebie sekwencji EST może prowadzić do odkrycia polimorfizmu pojedynczych nukleotydów SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphisms*) (18,19). Sekwencje EST znalazły także zastosowanie podczas tworzenia map genów ludzkich (20) i przewidywania lokalizacji genów w DNA genomowym (21).

Istnieje wiele metod umożliwiających identyfikację sekwencji genów. Jedną z nich jest konstruowanie i przeszukiwanie bibliotek cDNA. W przypadku genu *PnPIP1*

z bibliotek cDNA *P. nil* skonstruowanych z mRNA uzyskanego z liścieni roślin uprawianych w różnych warunkach świetlnych uzyskano jedynie fragment sekwencji cDNA genu akwaporyny (16). Podjęto zatem próbę uzyskania pełnej sekwencji cDNA kodującego kanał wodny *P. nil* poprzez przeszukanie bazy danych krótkich sekwencji kodujących zawartych w GenBank NCBI.

Do identyfikacji sekwencji EST dostępnych w GenBank można wykorzystać fragment sekwencji genu, którego poszukujemy. Możliwe jest także użycie sekwencji genu homologicznego z innego organizmu. W pierwszym przypadku mamy pewność, że zidentyfikujemy pożądaną sekwencję. W drugim przypadku istnieje prawdopodobieństwo znalezienia sekwencji o niskiej homologii. Wówczas w celu zweryfikowania wyniku używamy programu BLASTX, co pozwala znaleźć sekwencje homologiczne do nowo poznanej, ale już na poziomie aminokwasowym.

Często zdarza się, że biblioteki cDNA zawierają niekompletne sekwencje cDNA, wówczas brakujący fragment sekwencji można zidentyfikować poprzez przeszukanie bazy EST, co udało się uzyskać dla sekwencji akwaporyny *P. nil*. Podobne analizy i porównanie sekwencji klonów EST kukurydzy doprowadziło do zidentyfikowania członka rodziny PIP2, nazwanego ZmPIP2;1 (9). Wiele roślinnych akwaporyn sklonowano (22-25) i sklasyfikowano w dwie podrodziny PIP i TIP uwzględniając ich subkomórkową lokalizację (26). Dysponując pełną sekwencją aminokwasową białka *PnPIP1* przeprowadzono analizę filogenetyczną przy użyciu programów pakietu PHYLIP, w której wykazano, że akwaporyna *P. nil* należy do podrodziny PIP1 (8). Białka PIP (ang. *Plasma membrane Intrinsic Protein*) zlokalizowane są w plazmalemmie komórek roślinnych. Ze względu na homologię sekwencji akwaporyn błony komórkowej, podrodzinę PIP podzielono na izoformy PIP1 i PIP2. Przypuszczalną funkcją białek PIP2 jest transport wody – ich ekspresja w oocytach *Xenopus laevis* gwałtownie zwiększa przepuszczalność cząsteczek wody przez błonę komórkową. Akwaporyny PIP1 wykazują znacznie słabsze zdolności transportu wody – sugeruje się ich odmienną specyficzność substratową (przewodzenie glicerolu, CO₂) (27). Białka PIP biorą udział w procesie wzrostu i rozwoju rośliny warunkując pobieranie i jej transport w organach roślinnych. Rośliny pozbawione akwaporyn PIP (poprzez wprowadzenie antysensowego mRNA) wykazują spadek przepuszczalności cząsteczek wody przez błonę plazmatyczną ich protoplastów, wzrost wielkości systemu korzeniowego oraz większą wrażliwość na stres wodny i osmotyczny (28).

Analizy z wykorzystaniem bazy danych EST umożliwiły uzyskanie pełnej sekwencji cDNA genu akwaporyny *P. nil*. W przeprowadzonych eksperymentach wykazano jak w prosty, szybki i tani sposób możliwe jest zidentyfikowanie kompletnej sekwencji cDNA genu.

Praca częściowo finansowana z grantu Uniwersytetu Mikołaja Kopernika nr 452B

Literatura

1. Lu D., Grayson P., Schulten K., (2003), *Biophys. J.*, 85, 2977-2987.
2. Ma S., Quist T. M., Ulanov A., Joly R., Bohnert H. J., (2004), *Plant J.*, 40, 845-859.
3. Niemietz C. M., Tyerman S. D., (2000), *FEBS Lett.*, 465, 110-114.
4. Hanba Y. T., Shibasaki M., Hayashi Y., Hayakawa T., Kasamo K., Teraschima I., Katsuhara M., (2004), *Plant Cell Physiol.*, 45, 521-529.
5. Kaldenhoff R., Eckert M., (1999), *J. Photochem. Photobiol.*, 52, 1-6.
6. Dąbrowska G., Głowacka B., (2004), *Postępy Bioch.*, 50, 383-387.
7. Wang F., Feng X., Li Y. M., Yang H., Ma T. H., (2006), *Acta Pharmacol. Sin.*, 27, 395-401.
8. Mordaka P., Dąbrowska G., (2007), *Postępy Bioch.*, 53, 84-90.
9. Chaumont F., Barrieu F., Jung R., Chrispeels M. J., (2000), *Plant Physiol.*, 122, 1025-1034.
10. Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M., Maeshima M., (2005), *Plant Cell Physiol.*, 46, 1568-1577.
11. Luu D.-T., Maurel C., (2005), *Plant Cell Environ.*, 28, 85-96.
12. Kaldenhoff R., Fischer M., (2006), *Acta Bioch. Bioph.*, 1758, 1134-1141.
13. Chomczynski P., Sacchi N., (1987), *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
14. Dąbrowska G., Veit J., Szyp I., Wrotek S., Tyburski J., Goc A., Tretyn A., (2002), *Zeszyty Probl. Post. Nauk Rol.*, 488, 651-660.
15. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 10.38-10.40.
16. Dąbrowska G., Doss R., Goc A., Smoliński D., (2004), 53 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego Toruń-Bydgoszcz 6-11 wrzesień, 23-24.
17. Bogulski M. S., Tolstoshev C. M., Bassett D. E., (1994), *Science*, 265, 1993-1994.
18. Garg K., Green P., Nickerson D. A., (1999), *Genome Res.*, 9, 1087-1092.
19. Buetow K. H., Edmonson M. N., Cassidy A. B., (1999), *Nat. Genet.*, 21, 323-325.
20. Deloukas P., Schuler G. D., Gyapay G., Beasley E. M., Soderlund C., Rodrigez-Tome P., Hui L., Matisse T. C., McKusik K. B., Beckmann J. S., Bentolila S., Bihoreau M., Birren B. B., Browne J., Butler A., Castle A. B., Chiannikulchai N., Clee C., Day P. J., Dehejia A., Dibling T., Drouot N., Duprat S., Fizames C., Bentley D. R., et al., (1998), *Science*, 282, 744-746.
21. Mayer K., Schuller C., Wambutt R., Murphy G., Volckaert G., Pohl T., Dusterhof A., Stiekema W., Entian K. D., Terry N., Harris B., et al., (1999), *Nature*, 402, 769-777.
22. Yamaguchi-Shinasaki K., Koizumi M., Urao S., et al., (1992), *Plant Cell Physiol.*, 33, 217-224.
23. Kaldenhoff R., Kölling A., Richter G., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 23, 1187-1198.
24. Li L.-G., Li S.-F., Tao Y., Kitagawa Y., (2000), *Plant Sci.*, 154, 43-51.
25. Gaspari M., Bousser A., Sissoëff I., Roche O., Hoarau J., Mahe A., (2003), *Plant Sci.*, 165, 21-31.
26. Schäffner A. R., (1998), *Planta*, 204, 131-139.
27. Alexandersson E., Fraysse L., Sjövall-Larsen S., Gustavsson S., Fellert M., Karlsson M., Johanson U., Kjellbom P., (2005), *Plant Mol. Biol.*, 59, 469-484.
28. Maurel C., Chrispeels M. J., (2001), *Plant Physiol.*, 125, 135-138.