

四翅滨藜 *AcDHN* 基因的克隆及其抗逆功能分析

李敬涛*, 余刚*, 陈宣明, 范臻, 刘金亮, 潘洪玉**

吉林大学植物科学学院, 长春130062

摘要: 脱水素(dehydrin, DHN)是一类胚胎发育后期丰富蛋白(LEA), 在植物脱水条件下能保护细胞内蛋白质和膜结构免受破坏。本研究中, 从四翅滨藜(*Atriplex canescens*) cDNA文库克隆得到逆境胁迫相关蛋白基因 *AcDHN* 的全长cDNA (登录号: JN974246), 并进行序列分析。将 *AcDHN* 分别插入到原核表达载体pET28a和双元表达载体pYES-DEST52中, 通过转化大肠杆菌和酿酒酵母进行原核表达分析和真核表达分析。结果表明: *AcDHN* 序列全长为1 408 bp, 完整的开放阅读框长为1 017 bp, 由338个氨基酸残基组成, 预测蛋白质分子量为38.3 kDa, 理论等电点为6.47, *AcDHN* 与仙人掌中DHN蛋白同源性为55%, *AcDHN* 基因在大肠杆菌BL21 (DE3)中诱导表达出分子质量约45.2 kDa的融合蛋白。重组酵母菌株能表现出良好抗逆性, 特别是对NaCl、低温、Na₂CO₃和NaHCO₃胁迫的抗逆性, 其中抗碱胁迫能力表现最强。

关键词: 四翅滨藜; *AcDHN*; 酵母表达; 非生物胁迫抗性

Cloning and Stress Resistance Functional Characterization of an *AcDHN* Gene from *Atriplex canescens*

LI Jing-Tao*, YU Gang*, CHEN Xuan-Ming, FAN Zhen, LIU Jin-Liang, PAN Hong-Yu**

College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract: Dehydrin (DHN) present a distinct biochemical group of late embryogenesis abundant (LEA) proteins. It is proposed that dehydrins can protect proteins and cell membranes against unfavourable structure changes caused by dehydration in the plant cells. In this research, the full sequence of cDNA sequence of *AcDHN* gene was cloned from *Atriplex canescens*. The accession number of *AcDHN* in GenBank was JN974246. The *AcDHN* gene was introduced into the prokaryotic expression vector pET28a and the binary vector pYES-DEST52, and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1, respectively. The results revealed that: the full sequence of *AcDHN* is 1 408 bp in length and contains an open reading frame (ORF) of 1 017 bp, encoding a protein of 338 amino acid residues, with protein molecular weight of 38.3 kDa and PI 6.47. The *AcDHN* had 55% amino acid sequence homology to the sequence of DHN from *Opuntia streptacantha*. *AcDHN* was expressed its fusion protein (about 45.2 kDa) in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant yeast cells have a higher stress resistance than control cells, especially exhibit the capability to cope with the NaCl, low temperature, NaCO₃ and NaHCO₃, and the tolerance to the stress of alkali is the most highly.

Key words: *Atriplex canescens*; *AcDHN*; yeast expression; abiotic stresses resistance

四翅滨藜属藜科滨藜属, 是一种抗旱、抗寒、耐盐碱的常绿饲料灌木, 它为旱生或中生植物, 是盐渍化荒漠林地的优势树种, 对盐渍化土壤的改良具有明显作用, 被称为生物脱盐器, 有“奇迹树”的美称(王刚和冯康安2010)。20世纪90年代, 四翅滨藜引入我国后在甘肃、青海、新疆、宁夏等地进行了区域性引种栽培试验, 显示了极强的耐干旱、低温、贫瘠、抗盐碱等优良特性(魏彦波等2009), 被国家林业局列为造林绿化重点推广品种, 进行了大面积推广。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株IN-

VSc1 (*MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*)是一种二倍体, 是生长迅速的理想酵母表达菌株, 现已广泛用于外源蛋白的表达(Hasegawa等2000)。唐玉林等(2007)利用酵母表达系统研究大豆SAL13-2蛋白功能, 检测到SAL13-2基因可明显提高酵母转化子的耐盐能力; Mahalakshmi等(2006)证明肌醇磷酸合

收稿 2012-03-20 修定 2012-04-09

资助 农业部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-062B)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: panhongyu@jlu.edu.cn; Tel: 0431-87836251)。

成酶的丝氨酸蛋白基因的酵母转化子增加了氯化钠的耐受性; Wang等(2005)从小麦克隆的新型Ca²⁺通道蛋白基因*TaTPC1*在酵母*CCHI*缺失突变体中能够在重金属胁迫下正常生长。这说明酵母表达系统是一种可取的研究胁迫耐受性基因工具。

近几年来, 植物抗逆基因的克隆与转化取得了很大的进展, 其中, 植物脱水素(dehydrin, DHN)基因已证实抗旱、抗寒等功能方面具有重要作用(Zhu等2000; Bravo等1999; Yakubov等2005; Lim等1999; Muthalif和Rowland 1994)。脱水素是植物胚胎发育后期丰富蛋白(late embryogenesis abundant proteins, LEA)中的一类, 它是由寒冷、霜冻、高温、干旱以及盐胁迫等多种灾害环境因素导致细胞脱水所诱导产生的一种蛋白, 很多脱水素的表达也受高浓度ABA的诱导(张海萍等2008)。脱水素具有高度水合能力, 它与膜脂结合能够阻止细胞内水分的过多流失, 维持膜结构的水合保护体系, 防止膜脂双分子层间距的减小, 进而阻止膜融合以及生物膜结构的破坏(Danyluk等1998)。脱水素的重要结构特征是具有三类非常保守的区域: K、S和Y片段。其中K片段是所有脱水素都具有的富含赖氨酸片段, 通常位于C端, 可具有1到12个重复, 一般由15个氨基酸残基(EKKGIMDKIKEKLP)组成。脱水素还含有由丝氨酸残基组成的S片段, 有的在N端具有保守区域序列为(V/T)-DEYGNP的Y片段, 以及保守性稍差的Φ片段(富含甘氨酸和极性氨基酸残基), Φ片段通常分布于K片段之间。这些片段的数量以及组合方式决定了脱水素蛋白不同的结构和分子大小(Close 1997)。

然而在目前众多研究中, 还无有关含DHN功能域的四翅滨藜脱水素基因在酵母抗逆方面的相关报道。本研究以盐生灌木植物四翅滨藜为研究材料, 克隆得到含脱水素功能域的抗逆相关蛋白基因——*AcDHN* (*Atriplex canescens* dehydrin), 使其在大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)进行原核表达, 同时利用酵母表达体系, 对温度、盐碱、氧化等逆境胁迫下的抗逆性进行了初步解析。

材料与方法

1 材料

四翅滨藜 [*Atriplex canescens* (Pursh) Nute]

cDNA文库大肠杆菌菌株DH10B由本实验室构建并保存; 大肠杆菌*E. coli* DH5α、*E. coli* BL21 (DE3)菌株、酿酒酵母菌株INVSc1与表达载体pE-T28a由本实验室提供; 克隆载体pMD18T Vector购自TaKaRa公司。

2 方法

2.1 文库目标克隆子的获得

随机挑选文库克隆, 提取质粒DNA, 以载体pYES-DEST52上游引物T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')、下游引物R (5'-AGGGTTAGGGATAGGCTTACCTTC-3')为测序引物, 全序列测定得到EST序列, 然后在NCBI BLASTX库进行比对, 得到四翅滨藜编码基因*AcDHN*的cDNA序列。而含有*AcDHN*的文库菌株即为pYES-*AcDHN*。

2.2 *AcDHN*片段的克隆及序列分析

根据目的基因序列, 设计合成一对PCR扩增特异性引物。上游引物: 5'-CGGGATCCATGGCTGATAATTATAAGGAGGC-3', 下划线为*Bam*HI酶切位点; 下游引物: 5'-CCCAAGCTTTTGTAACTCTCCTTTTTCTCTTCATG-3', 下划线为*Hind*III酶切位点。以四翅滨藜cDNA为模板进行PCR, 反应体系(25.0 μL)为: ddH₂O 18.0 μL、10×*Pfu* PCR Buffer (含Mg²⁺) 2.5 μL、上游引物1.0 μL、下游引物1.0 μL、dNTPs 1.0 μL、模板1.0 μL、*Pfu*酶0.5 μL。反应程序为: 95 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸3 min, 30个循环后延伸10 min。PCR产物电泳鉴定正确后, 回收的*AcDHN*基因片段进行加“A”反应后与pMD18T Vector连接, 构建重组质粒pMD18T-*AcDHN*。连接产物转化*E. coli* DH5α, LB (Amp^r)平板上37 °C培养过夜。挑取单菌落, 接种于LB (Amp^r)液体培养基中, 37 °C、200 r·min⁻¹振荡培养过夜。采用碱裂解法提取质粒, 经*Bam*HI和*Hind*III双酶切验证、PCR鉴定, 将获得的3个阳性重组质粒送至Invitrogen公司测序。根据测序结果进行序列比较和生物信息学分析。

2.3 *AcDHN*基因的原核表达

pMD18T-*AcDHN*和表达载体pET28a分别以*Bam*HI和*Hind*III进行双酶切, 回收, 以T4 DNA连接酶于16 °C连接过夜, 连接产物转化至*E. coli* DH5α感受态细胞中, 涂布于50 mg·L⁻¹卡那霉素的LB固

体培养基上,挑取单菌落进行PCR鉴定和酶切验证。将获得的重组质粒pET28a-*AcDHN*转至BL21 (DE3)受体菌株中,PCR和酶切验证正确后,阳性克隆接种于3 mL含卡那霉素的LB液体培养基中,37 °C、200 r·min⁻¹振荡培养过夜,以1:100的比例扩大培养,当OD₆₀₀至0.4~0.6时,加IPTG至终浓度为1 mmol·L⁻¹,分别诱导0、2、4、6、8、10 h。离心收集菌体,加入1/10体积的2×SDS上样缓冲液,煮沸10 min,12% SDS-PAGE电泳检测。

2.4 *AcDHN*基因的酵母转化与检测

分别将质粒pYES-*AcDHN*和pYES-DEST52运用醋酸锂化学转化法转化酿酒酵母INVSc1菌株中,转化酵母涂布在SC-Ura⁻固体筛选培养基上,以未转化的酵母做对照,30 °C进行培养,2 d后观察。从SC-Ura⁻上随机挑取3个阳性单克隆,高温裂解后以载体pYES-DEST52上T7和R引物进行酵母菌液PCR检测验证。

2.5 阳性转化酵母逆境胁迫处理

挑取酵母INVSc1 (pYES-DEST52)和验证正确的INVSc1 (pYES2-*AcDHN*)菌液,接种于SC-Ura⁻液体培养基(葡萄糖终浓度为2%)中,30 °C、200 r·min⁻¹摇培24 h,测OD₆₀₀。取适量菌体离心,用诱导培养基(SC-Ura⁻+2%半乳糖)重悬菌体,并将其值调为0.4,30 °C振荡培养24 h,测量两种重组酵母的OD₆₀₀值并统一调整OD₆₀₀=2,取等量的酵母,8 000 r·min⁻¹离心1 min,弃上清。对这两种酵母进行不同的胁迫处理,每组实验重复3次。

(1) NaCl和KCl处理:将上述菌体重悬于5 mol·L⁻¹ NaCl和4 mol·L⁻¹ KCl溶液,混匀后30 °C、200 r·min⁻¹振荡培养24 h;(2) Na₂CO₃和NaHCO₃处理:将菌体分别重悬于6%、8%的Na₂CO₃溶液和6%和8%的NaHCO₃溶液,混匀后30 °C、200 r·min⁻¹振荡培养2 h;(3) PEG6000和山梨醇处理:将菌体重悬于40%的PEG6000和5 mol·L⁻¹的山梨醇中,30 °C、200 r·min⁻¹振荡培养24 h;(4)低温胁迫处理:将菌体重悬于SC-U液体培养基,低温(-20 °C)胁迫48 h,其间每隔6 h把菌体冻融一次;(5)高温处理:将菌体重悬于SC-U液体培养基,53 °C处理1 h;(6)百草枯处理:将菌体重悬于含有4 mmol·L⁻¹百草枯SC-U培养基中,30 °C处理2 h。

将不同非生物胁迫处理的菌体分别稀释10⁰、

10¹、10²、10³、10⁴倍后,取2 μL样品点在SC-U(含2%半乳糖)的固体培养基上,30 °C培养48 h,比较不同处理条件下菌落的生物学特性差异。

实验结果

1 *AcDHN*基因全长cDNA的克隆及生物信息学分析

运用引物T7和R对文库克隆进行PCR扩增,PCR结果为:在1 400 bp位置上有一特异性的条带(图1)。经测序后采用NCBI的开放读码框寻找程

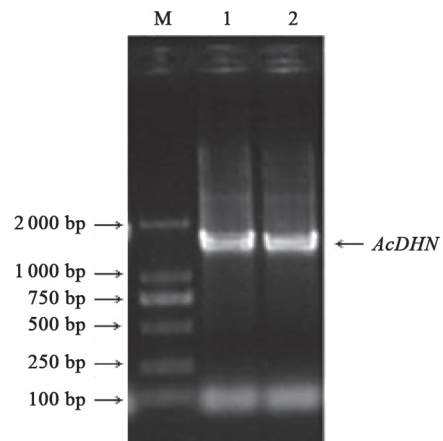


图1 PCR扩增产物电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products
M: DL2000 marker; 1、2为扩增产物。

序(ORF finder)确定基因*AcDHN*的开放读码框,*AcDHN*序列全长为1 408 bp,完整的开放阅读框长为1 017 bp,由338个氨基酸残基组成,其中,*AcDHN*含有91个疏水氨基酸,208个亲水氨基酸,亲水性极强,并且具有4个重复的由15~16个氨基酸组成的K片段,其中富含赖氨酸(Lys),以及具有6个丝氨酸组成的S片段,这都是DHN家族蛋白的主要特征(图2)。通过构建pMD18T-*AcDHN*并转化大肠杆菌*E. coli* DH5α,测序验证结果一致,将得到的*AcDHN*序列提交GenBank,序列号为JN974246。以ExpASY网站的Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)计算的*AcDHN*蛋白质分子量为38.3 kDa,理论等电点为6.47。用NCBI的Conserved Domains工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测保守区,结果表明该蛋白属于DHN家族蛋白。在NCBI网站上对编码基因

```

1  CAGTTTGTACAAAAGTTGGTAAAGTTTTTATATCATAAATATTATATAAGCGTTACATCT
61  GTATAATTGTTATCAAACAATCAAGCAAGTTAGTTAACATGGCTGATAATTATAAGGAG
1  M A D N Y K E
120 GCACCCGTACCCGTGGGAGATACCGATCGTGGTATGTTGATTTTCTGAAGAAAAAGAT
8  A P V P V E S T D R G M F D F L K K K D
180 CATGCCGAAGGTAACAAGCCGTCGTACGAGGCCGATACCGTCACCTCCGGTATGAAAAAG
28  H A E G N K P S Y E A D T V T S G M E K
240 GCCACGTCCTCGAACCCGTCGAGGAGAAGAAACATGAGACTCTTGGTCAGAAACATGAG
48  A H V S E P V E E K K H E T L G Q K H E
30  ACTCTTGTTAGAAAATCCAGCGCTCCGATAACTCCAGCTCTAGCTCTTCCGATGAAGAG
68  T L V Q K F Q R S D N S S S S S S D E E
360 GGAGACGATGAAGAGAAGAAGAGGAGAAGGAAGAAAGGAAAGAGAAGAAAGGAATGAAG
88  G D D E E K K R R R K E R K E K K G M K
420 GAGAAGATTGAAGAGAAATTTGGAGGAGACACAAAGAAGAGCATGATCATGAAACCTAC
108  E K I E E K F G G G H K E E H D H E T Y
480 GTGCCAATTGAGAAGATCCACGTGCAAGATCACGTGCACTCAGGCAATCTTACCCAGCA
128  V P I E K I H V Q D H V H S E Q S Y P A
540 CCAGCAACTAGATCATAACTACCTCACCACAAAGAGGAGGAGGAGAAGAAAGGGTGGGA
148  P A T L D H N Y P H H K E E E E K K G G
600 TTCGGTGACAAGATCAAGGATAAACTCCCGGTCACAAGGATAAGGCCCTACGAACACGAG
168  F G D K I K D K L P G H K D K A Y E H E
660 GCGTTGCTCATGTGGAGCCATCTTACCCAGCACATGCAACTCGATCATAACTACCTT
188  G V A H V E P S Y P A H A T L D H N Y P
720 CACCACAAAGAGGAGGAGAAGAAGGGTGGATTTCGTTGAAAAGTCAAGGATAAACTCCCC
208  H H K E E E K K G G F V E K V K D K L P
780 GGTCAAGGATAAGGCCGACGAACACGAGGCCTTTGGTATGTGGAGCCATCTTACCCA
228  G H K D K A D E H E A F G H V E P S Y P
840 GCACCAGCAACAATAGTTCATCACCTCACCACAAAGAGGAGGAGGAGAAGAAGGGTGGGA
248  A P A T I V H H P H H K E E E E K K G G
900 TTCGTTGAGAAGATCAAGGATAAACTCCCGGTCACAAGGATAAGGCCGACGAACACGAG
268  F V E K I K D K L P G H K D K A D E H E
960 GCCGTTGTTTATGTGGCAACGGCCGAGCAGAGCGTCGAGGGTATAAGGATAAGAAGGGG
288  A V V H V A T A E Q S V E G D K D K K G
1020 TTCTTGGACAAGATCAAGGACAAAATCCCTGGCCTTACTCTAAGAATGATGCTGAGGTG
308  F L D K I K D K I P G L H S K N D A E V
1080 AAGAAGGATCATGAAGAGAAAAAGGAGGTTACTAAAGTACTTTGCTTAATTTTAAATTA
328  K K D H E E K K E S Y *
1140 AATTGGTACTTAAATCTTTATTTTAAATGTTTAAAAAAGATAAAAAAGCGTATGGT
1200 TTGTTGTTTCTATAATATGTAATTTTAAATGTTTGTAAATGTTGTGAGTATTATTGTGG
1260 GTTTTGGTATGAAGTTTTTATTACTCAATAATGTGTGTATGTGTAAGCACGATTACGTG
1320 CTTATGTATATATGGAAGTATTGTTTGGTTAAAAAAGATAAAAAAACCCTAACT
1380 TCTGTACAAAGTGTGATCAGAGTCCGG

```

图2 四翅滨藜中*AcDHN*基因序列及由此推导的氨基酸序列Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *AcDHN* gene from *Atriplex canescens*

方框为S片段; 下划线部分为K片段。

*AcDHN*的氨基酸序列进行BLAST, 与已确定功能的其他物种氨基酸序列进行同源性分析和进化分析, 并用ClustalX和MEGA4软件绘制进化树(图3), 结果为, *AcDHN*与银白杨(*Populus alba*)中的许多DHN蛋白同源性为51%~55%, 与仙人掌(*Opuntia streptacantha*) DHN蛋白同源性为55%, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中DHN蛋白同源性为40%~45%; 通过进化树分析, *AcDHN*与菠菜(*Spinacia oleracea*)、仙人掌(*Opuntia streptacantha*)等被子植物的DHN进化关系近, 而与裸子植物欧洲云杉(*Pi-*

cea abies)的进化关系最远。

2 *AcDHN*基因的原核表达

将鉴定为阳性的pET28a-*AcDHN* BL21 (DE3)菌株经过终浓度为1 mmol·L⁻¹的IPTG分别诱导0、2、4、6、8、10 h。将诱导表达的融合蛋白经SDS-PAGE电泳检测, 结果表明在45.2 kDa处出现一条特异性蛋白带(图4), 结果表明在IPTG诱导下*AcDHN*基因在大肠杆菌中得到了正确的表达。并且随着诱导时间的增加, 目的蛋白的表达量逐渐增加, 4 h达最大值, 4 h后表达量基本稳定不变。

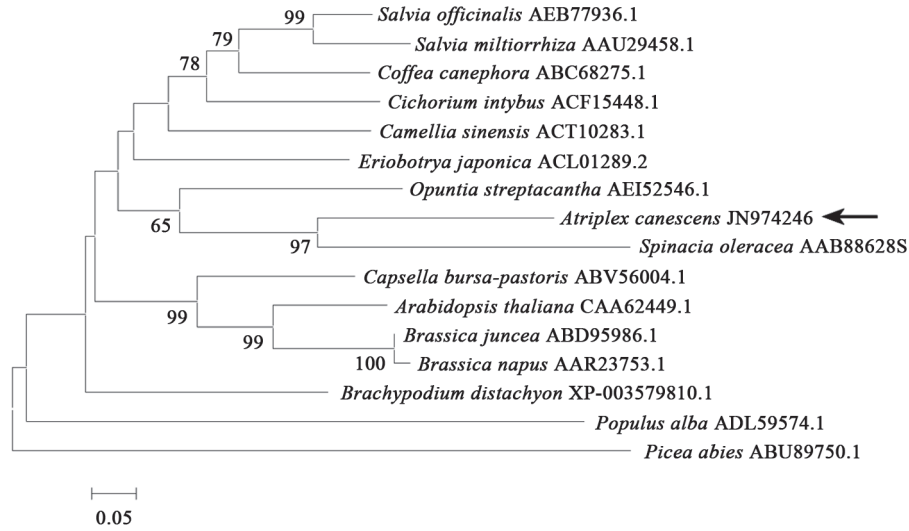
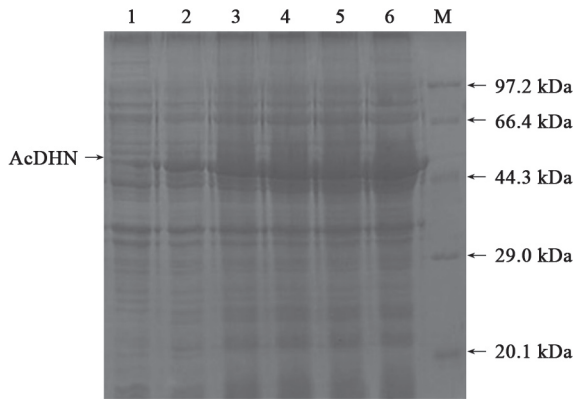


图3 植物种间的DHN进化树构建

Fig.3 Phylogenetic tree of DHN in plants

箭头代表AcDHN在进化树中的位置。

图4 *AcDHN*在大肠杆菌BL21 (DE3)中表达的SDS-PAGE电泳图Fig.4 Expressing of *AcDHN* in *E. coli* BL21 (DE3), detecting by SDS-PAGE

M为低分子量蛋白标记; 1~6分别为IPTG诱导0、2、4、6、8、10 h的BL21 (DE3)。

3 重组酵母的转化、鉴定与抗逆性分析

转化酵母涂布于SC-Ura⁻平板后, 酿酒酵母INVSc1野生型菌株在SC-Ura⁻上未长出菌落, 而转化空质粒的酵母INVSc1 (pYES-DEST52)和重组质粒酵母INVSc1 (pYES-*AcDHN*)在SC-Ura⁻上均有菌落长出, 说明质粒转化酵母成功, 并且在无逆境胁迫条件下INVSc1 (pYES-DEST52)和INVSc1 (pYES-*AcDHN*)的菌落生长状况一致。通过对酵母裂解

上清液进行PCR, 进一步证明重组质粒pYES2-*AcDHN*已经转化进入到酵母中。

在不同的非生物逆境胁迫处理条件下, 两种重组酵母均能够生长, 但是不同处理间又存在一定的差异, 说明*AcDHN*基因对不同逆境可能有不同的作用(图5)。

盐胁迫处理: 在4 mol·L⁻¹ KCl和5 mol·L⁻¹ NaCl处理条件下, INVSc1 (pYES-*AcDHN*)的存活率明显高于INVSc1 (pYES-DEST52) (图5-A、B)。这是由于*AcDHN*基因的表达, 增强了酵母INVSc1 (pYES-*AcDHN*)对KCl和NaCl胁迫的耐受力, 说明*AcDHN*基因可能具有一定抗盐胁迫的能力, 并且对抗NaCl能力表现更明显。

温度胁迫处理: 在53 °C处理条件下INVSc1 (pYES-*AcDHN*)的存活率小于INVSc1 (pYES-DEST52); 而经-20 °C处理后, 结果相反(图5-C、D)。说明*AcDHN*基因的表达可促使酵母INVSc1 (pYES-*AcDHN*)对低温的耐受能力, 而对高温耐受力反而减弱。

碱胁迫处理: 在6% NaHCO₃、8% NaHCO₃、6% Na₂CO₃、8% Na₂CO₃处理条件下INVSc1 (pYES-*AcDHN*)的存活率都明显高于INVSc1 (pYES-DEST52) (图5-E~H)。说明*AcDHN*基因的表达能明显提高酵母INVSc1 (pYES-*AcDHN*)对碱的耐受能力。

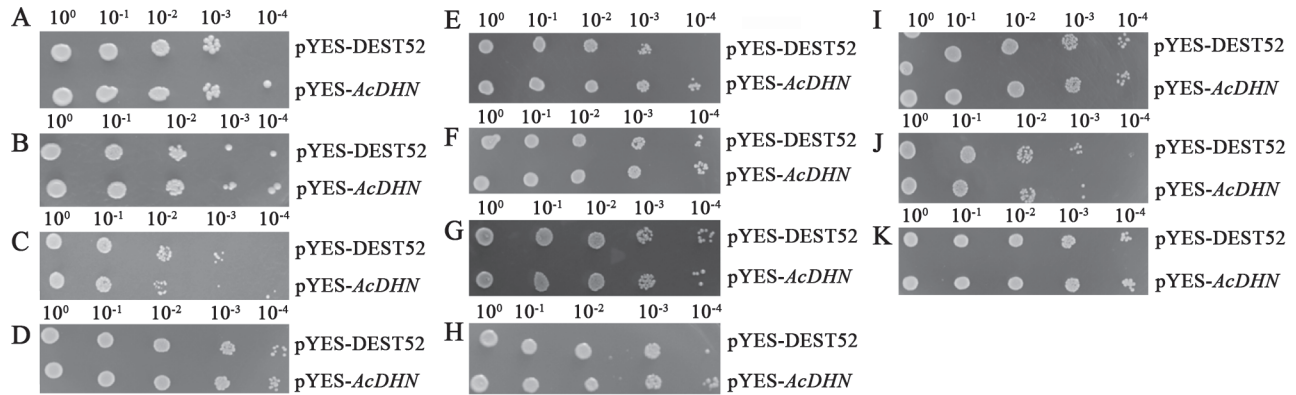


图5 酵母INVSc1 (pYES2-*AcDHN*)和INVSc1 (pYES-DEST52)在不同胁迫条件下的生长

Fig. 5 Growth of INVSc1 (pYES2-*AcDHN*) and INVSc1 (pYES-DEST52) yeast under different stress conditions

10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 分别代表不稀释和稀释10、100、1 000、10 000倍的菌体。A: KCl胁迫; B: NaCl胁迫; C: 高温(53 °C)胁迫; D: 低温(-20 °C)胁迫; E: 6% NaHCO_3 胁迫; F: 8% NaHCO_3 胁迫; G: 6% Na_2CO_3 胁迫; H: 8% Na_2CO_3 胁迫; I: PEG胁迫; J: 山梨醇胁迫; K: 百草枯胁迫。

干旱胁迫处理: 在PEG6000处理条件下, INVSc1 (pYES-*AcDHN*)的存活率略高于INVSc1 (pYES-DEST52) (图5-I), 但在山梨醇处理下, INVSc1 (pYES-*AcDHN*)的生长优势不明显(图5-J)。说明*AcDHN*基因的表达能提高酵母INVSc1 (pYES-*AcDHN*)对PEG6000的耐受能力, 因此*AcDHN*基因可能具有抗干旱的能力。

百草枯胁迫处理: 在4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 百草枯处理条件下, INVSc1 (pYES-*AcDHN*)的存活率明显高于INVSc1 (pYES-DEST52) (图5-K)。说明*AcDHN*基因的表达能明显提高酵母INVSc1 (pYES-*AcDHN*)清除活性氧的能力, 重组酵母菌株对百草枯表现一定的抗性。

讨 论

植物存在于自然界中要面对各种生物和非生物逆境, 其中最主要的是盐害、碱害、干旱胁迫、高温及冻害胁迫以及植物病原菌感染胁迫, 限制了作物的生长发育, 从而影响作物产量, 直接威胁到粮食安全。从耐盐耐旱植物中分离抗逆性功能基因是研究植物抗盐机制, 并且通过基因工程手段提高植物耐受性的关键(刘小立等2010)。但是, 当前很多研究主要集中在草本植物, 很少对木本植物特别是盐生木本植物进行分子遗传学的研究。本研究以盐生灌木四翅滨藜为实验材料, 打破了传统的以草本植物为研究对象, 从而为抗逆基因在木本植物的遗传转化开辟了新途径。

在实验室条件下, 我们的抗逆分析以潘妍等(2010)、王留强等(2011)和Wang等(2008)的相关研究为依据, 分别通过5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl和4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl模拟盐胁迫, 6%、8%的 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 模拟碱胁迫, 40%的PEG6000和5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的山梨醇模拟干旱胁迫, 低温(-20 °C)模拟冷冻胁迫, 高温(53 °C)模拟高温胁迫, 利用4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 百草枯可以模拟病原微生物侵染植物过程中产生的活性氧物质从而模拟植物病原菌等微生物的生物胁迫, 研究了转*AcDHN*基因酵母在各种逆境胁迫下的耐受性分析, 结果显示*AcDHN*基因在酵母中具有不同程度的抗低温、抗盐、抗碱、抗PEG及清除活性氧功能, 对NaCl、低温、 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 胁迫的抗逆性较强, 其中抗碱胁迫能力表现最强, 抗低温、PEG结果与Bravo等(1999)克隆的*DHN*相关基因具有抗寒、抗旱等功能结果相似。最近, 在脱水素家族中又发现一些脱水素具有新的功能, 如拟南芥中的脱水素蛋白ERD14具有 Ca^{2+} 结合能力, 柑橘中的脱水素蛋白CuCOR19和CuCOR15分别具有结合金属离子能力和自由基清除能力(徐红霞等2009), 而四翅滨藜*AcDHN*是否同样有这些功能需要进一步研究。

用酵母表达系统筛选植物抗逆基因具有原核表达系统不可替代的优越性, 它可以体现目的基因在真核细胞内的表达情况。因此, 本研究首先进行了目的基因*AcDHN*在大肠杆菌BL21 (DE3)中

的表达分析,在IPTG诱导4 h后*AcDHN*基因得到高效表达,这为我们下一步纯化分离*AcDHN*蛋白以制备抗血清,并进一步进行相关功能验证提供实验基础。通过*AcDHN*基因在酵母中的表达情况,我们的研究初步说明*AcDHN*基因具有提高酵母抗非生物逆境胁迫的能力,这为该基因可以用于转入作物以提高其在自然条件下的耐盐碱、耐低温、耐干旱等能力提供实验理论依据。然而*AcDHN*基因能否成功转入作物并提高作物的非生物胁迫抗性,以及转*AcDHN*基因作物能否成功进行抗逆育种并进行产业化生产有待于进一步研究。

参考文献

- 刘小立,柳参奎,高野哲夫(2010). 碱茅Put-HVA1基因的克隆及在酵母和拟南芥中的表达. 分子植物育种, 8 (5): 846~852
- 潘妍,王玉成,张大伟,杨传平(2010). 二色补血草*LbGRP*基因的克隆及抗逆能力分析. 遗传, 32 (3): 278~286
- 唐玉林,李小杰,钟昫廷,郑易之(2007). 利用酵母表达体系研究大豆SALI3-2蛋白功能. 深圳大学学报理工版, 24 (3): 324~329
- 王刚狮,冯康安(2010). 四翅滨藜耐盐特性研究. 山西农业科学, 38 (7): 59~61, 100
- 王留强,班巧英,贺琳,王玉成(2011). 二色补血草*LbDREB*基因在酵母中的抗逆性分析. 植物生理学报, 47 (4): 347~350
- 魏彦波,范阿南,王立刚,李志,张忠辉,杨雨春,谢朋(2009). 四翅滨藜抗盐性的研究. 吉林农业科技, 38 (4): 13~16, 19
- 徐红霞,陈俊伟,谢鸣(2009). 脱水素在植物低温胁迫响应中的作用. 西北植物学报, 29 (1): 199~206
- 张海萍,常成,张秀英,闫长生,肖世和(2008). 参与ABA调控小麦种子胚休眠的*dehydrin*基因的分离与表达分析. 分子植物育种, 6 (6): 1175~1181
- Bravo LA, Close TJ, Corcuera LJ, Guy CL (1999). Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation. *Physiol Plant*, 106 (2): 177~183
- Close TJ (1997). Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*, 100 (2): 291~296
- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10 (4): 623~638
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51: 463~499
- Lim CC, Krebs SL, Arora R (1999). A 25-kDa dehydrin associated with genotype- and age-dependent leaf freezing-tolerance in *Rhododendron*: a genetic marker for cold hardiness? *Theor Appl Genet*, 99 (5): 912~920
- Mahalakshmi S, Christopher GSB, Reddy TP, Rao KV, Reddy VD (2006). Isolation of a cDNA clone (*PcSrp*) encoding serine-rich protein from *Porteresia coarctata* T. and its expression in yeast and finger millet (*Eleusine coracana* L.) affording salt tolerance. *Planta*, 224 (2): 347~359
- Muthalif MM, Rowland LJ (1994). Identification of dehydrin-like proteins responsive to chilling in floral buds of blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). *Plant Physiol*, 104 (4): 1439~1447
- Wang BF, Wang YC, Zhang DW, Li HY, Yang CP (2008). Verification of the resistance of a *LEA* gene from *Tamarix* expression in *Saccharomyces cerevisiae* to abiotic stresses. *J For Res*, 19 (1): 58~62
- Wang YJ, Yu JN, Chen T, Zhang ZG, Hao YJ, Zhang JS, Chen SY (2005). Functional analysis of a putative Ca^{2+} channel gene *TaTPC1* from wheat. *J Exp Bot*, 56 (422): 3051~3060
- Yakubov B, Barazani O, Shachack A, Rowland LJ, Shoseyov O, Golan-Goldhirsh A (2005). Cloning and expression of a dehydrin-like protein from *Pistacia vera* L. *Trees*, 19: 224~230
- Zhu B, Choi DW, Fenton R, Close TJ (2000). Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. *Mol Gen Genet*, 264: 145~153