

## 芍药脱水素基因*PIDHN2*的克隆及表达分析

陈煜\*, 马燕\*, 国静, 李俊杰, 韩璐璐, 郭先锋\*\*

山东农业大学林学院, 山东泰安271018

**摘要:** 脱水素(DHN)在植物经受逆境胁迫条件下对于保护细胞内蛋白质和膜结构具有重要作用。本研究以芍药‘大富贵’芽为试材, 采用RT-PCR技术克隆得到1个脱水素基因*PIDHN2* (GenBank登录号KY272747), 该基因具有399 bp的开放阅读框, 编码132个氨基酸, 具有DHN家族特有的Y、S和K片段, 属于典型的Y<sub>3</sub>SK<sub>2</sub>型脱水素; 基因结构分析表明, *PIDHN2*具有1个长度为84 bp的内含子, 位于S片段。以拟南芥和大麦的脱水素蛋白分类为参照, 聚类分析结果表明, *PIDHN2*与Y<sub>n</sub>SK<sub>2</sub>型脱水素聚合在一起, 进化关系较近。半定量PCR分析显示, *PIDHN2*在芍药各器官中均有表达, 其中在芽中的表达最高。亚细胞定位观察结果显示: *PIDHN2*蛋白定位于细胞质膜和细胞核中。表达特性分析表明, *PIDHN2*在低温、高温、水淹和ABA胁迫条件下, 表达量均不同程度地上调, 说明该基因可能参与了芍药对低温等非生物胁迫的耐受调节过程。

**关键词:** 芍药; 脱水素; 克隆; 亚细胞定位; 表达分析

植物的不同生长阶段会面临不同的非生物胁迫, 如极端温度、干旱、盐害等。胁迫会使植物膜结构遭到破坏, 胞膜透性增大, 从而导致光合作用效率降低, 代谢活动紊乱(Prasad 1996; 杨小飞和郭房庆2014)。为了能在不利的环境中生存, 植物细胞会积累大量可溶性蛋白、糖类、有机酸、脯氨酸以及脱落酸(abscisic acid, ABA), 来维持细胞内的水势平衡, 防止细胞大量失水(王娟和李德全2001)。在该适应过程中, 脱水素是变化最突出的蛋白之一。随着分子生物学的发展, 发现植物脱水素能同时响应多种逆境胁迫, 但在不同胁迫下基因的表达量存在较大差异。例如小麦*WDHN1*虽然都可以被低温、干旱、盐和ABA胁迫信号诱导而上调表达, 但是该基因在低温胁迫下的表达量远高于其它胁迫条件(刘浩等2016), 说明植物体中胁迫信号通路虽然交叉, 但仍有各自不同的特点。

脱水素(dehydrin, DHN)属于胚胎发育晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant proteins, LEA)又名LEA-II蛋白(Bies-Ethève等2008)。当植物遭受外界低温、干旱等胁迫时, 脱水素会被诱导大量表达, 从而对植物细胞膜结构甚至是植株的整个蛋白质组起到重要的保护作用(徐红霞等2009)。目前, 在大麦(Tommasini等2008)、杨树(Liu等2012)、拟南芥(Hundertmark和Hincha 2008)、苹果(Liang等2012)和葡萄(Yang等2012)等多种植物中均发现脱水素的存在。根据脱水素中Y、S和K保守片段的组成, 将其分为5种亚型: Y<sub>n</sub>SK<sub>2</sub>、Y<sub>2</sub>K<sub>n</sub>、SK<sub>n</sub>、K<sub>n</sub>S和K<sub>n</sub>型(Close 1997; 邢鑫等2010)。其中, 在蛋白质C端存在至少1个富含赖氨酸的K片段, 由15个氨基

酸残基(EKKGIME/DKIKEKLPG)组成。N端含有保守基序(T/VDEYGNP)组成的Y片段, K片段与Y片段之间有可被磷酸化的约6个丝氨酸串联成的S片段。所有脱水素不一定含有Y和S片段, 但都含有K片段, 它是LEA-II蛋白区别于其它LEA蛋白的特征(Close 1996; Zhu等2014)。

芍药是我国的传统名花, 因其极高的观赏价值而被广泛引种。随着栽培面积的不断扩大, 所面临的环境条件更加复杂。例如, 在我国南方地区, 夏季高温多涝, 严重影响着芍药的正常生长(刘林艳2008)。目前, 关于芍药的抗逆性研究多集中于对其生理指标变化规律的分析(王琪2013), 而分子水平的研究则罕有报道。本研究基于芍药转录组数据克隆得到1个与逆境相关的芍药脱水素基因, 分析了该基因编码蛋白的结构特性和不同逆境条件下的表达情况, 并构建真核表达载体, 研究其亚细胞定位。这为该基因进一步应用于芍药抗逆分子标记辅助育种提供参考依据, 也为利用基因工程手段培育抗逆芍药新品种奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料与处理

以三年生盆栽芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.) ‘大富贵’为试验材料。2015年11月采取芍药根颈芽, 剥离鳞片的混合芽用于基因克隆; 组织差异表

收稿 2017-05-12 修定 2017-06-23

资助 山东省自然科学基金(ZR2014CM028)。

\* 共同第一作者。

\*\* 通讯作者(E-mail: guoxf@sdau.edu.cn)。

达试验材料包括芽、芽鳞片、根、茎、叶、萼片和花瓣,其中芽和芽鳞片采集于2015年11月,其余材料均于2016年4月下旬采取。逆境胁迫实验在植株展叶后进行,将盆栽芍药分别置于4和40°C的条件下模拟低温和高温胁迫;水淹胁迫则通过将盆栽植株浸没于注满水的容器中来模拟(水平面超过基质表层);ABA处理采用浓度为100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ABA溶液对芍药进行叶面喷施;所有处理均于人工气候箱中进行(湿度70%,光照强度6 000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,水淹与ABA处理时温度控制在25°C),分别于0、2、4、8、12和24 h后采取叶片用于基因表达分析。以上取样均重复3次,取样后经液氮速冻于-80°C保存备用。

## 2 基因克隆

RNA的提取参照艾德莱的EASYspin植物RNA快速提取试剂盒说明书操作,利用Nanodrop 2000核酸分析仪测定总RNA的浓度和纯度,  $A_{260/280}=2.0$ ,同时进行琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。采用全式金反转录试剂盒合成cDNA。基因组DNA的提取采用改良CTAB法进行(苏华楠等2014)。

参考芍药‘大富贵’转录组测序结果中*PIDHN2*相关基因片段,利用软件Prime 5.0软件设计特异引物(表1)。以cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为: cDNA 1  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、PCR MIX 12.5  $\mu\text{L}$ ,用ddH<sub>2</sub>O补足至25  $\mu\text{L}$ 。用特异引物*PIDHN2*-F和*PIDHN2*-R (表1)进行完整开放阅读框(ORF)序列的扩增,PCR反应条件为: 94°C 5 min预变性; 94°C 1 min, 52°C 30 s, 72°C 45 s, 共35个循环; 72°C延伸10 min。将PCR产物用胶回收试剂盒回收后,与pMD18-T载体连接,然后转化

大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,挑选阳性克隆,送华大基因公司测序。

以基因组DNA为模板进行从起始密码子至终止密码子的DNA序列的扩增,反应体系与反应程序同上。将PCR扩增产物回收,连接,转化,测序(具体方法同上),获得编码区的DNA序列。

## 3 芍药*PIDHN2*的生物信息学、同源性及系统进化分析

利用ORF Finder程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.htm>)进行ORF的预测。利用ProtParam (<http://www.expasy.org/>)、CDD (<http://www.csb.dtu.dk/Ser-vices/>)进行蛋白质基本性质、保守结构域的预测分析。SOPMA (<http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/swxxx/Jakj/dianzi/Bioinf7/Expasy/Expasy8.htm>)分析蛋白的二级结构。利用NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>)查找核定位信号。PSORTII (<http://www.genscript.com/psort.html>)在线软件进行亚细胞定位的预测。

分别从拟南芥基因组数据库(<http://www.arabidopsis.org/>)和NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载拟南芥DHN家族氨基酸序列和大麦DHN家族氨基酸序列,利用MEGA 5.0软件构建Neighbor-Joining进化树,采用自举法(bootstrap)对系统发育树进行检验,共1 000次重复,其他均为默认设置。

## 4 *PIDHN2*在不同器官中的表达分析

检测器官包括芍药‘大富贵’的芽鳞片、混合芽、根、茎、叶片、萼片和花瓣,采用半定量PCR法。利用软件Primer 5.0设计qPCR-F和qPCR-R特异引物,内参引物为芍药*Actin*基因(表1)。半定量

表1 芍药*PIDHN2*基因克隆、表达分析及GFP载体构建所用引物及其序列

Table 1 Primers sequences used to clone and analyze the expression of *PIDHN2* and the vector construction of GFP

引物名称	核苷酸序列(5'→3')	用途
<i>PIDHN2</i> -F	TAATCTGTTGGGAAATGTCG	ORF扩增及编码区DNA序列扩增
<i>PIDHN2</i> -R	ACGCCGACCAAGGTTAGT	
<i>Actin</i> -F	ACTGCTGAACGGGAAATT	<i>Actin</i> 内参引物
<i>Actin</i> -R	ATGGCTGGAACAGGACTT	
qPCR-F	CTGTTGGGAAATGTCGT	半定量PCR引物及实时荧光定量PCR引物
qPCR-R	ATGCTCCTGCTTCTGAT	
GFP-B-F	CGGGATCCATGTCGTACCAAAAC	GFP载体构建
GFP-K-R	GGGTACCGTGGTGTCCAGCAT	

下划线部分‘GGATCC’和‘GGTACC’分别为添加的*Bam*HI和*Kpn*I酶切位点。

PCR反应体系与反应条件参考基因克隆, 琼脂糖凝胶电泳分析。

### 5 表达载体的构建及亚细胞定位

据PIDHN2的ORF设计引物GFP-B-F与GFP-K-R (表1), 以其正确的克隆产物提取质粒, 经BamHI和KpnI进行双酶切, 用T<sub>4</sub> DNA连接酶连接到pROKII-GFP载体上, 获得pROKII-GFP-PIDHN2的融合表达载体。转入DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 经PCR扩增和酶切筛选阳性克隆, 以正确的融合表达载体的克隆产物提取质粒, 并转入农杆菌GV3101, 通过PCR鉴定阳性转化。参照谭小丽等(2016)农杆菌介导侵染烟草(*Nicotiana benthamiana*)表皮细胞瞬时表达蛋白定位方法, 对培养4周大小的烟草叶片进行侵染。取侵染后48 h的烟草叶片, 在激光共聚焦显微镜488 nm检测波长下激发观察。

### 6 低温解除休眠进程与非生物学逆境胁迫下PIDHN2的表达分析

采用软件Primer 5.0设计实时定量引物qPCR-F和qPCR-R, 内参引物为芍药Actin基因(表1)。采用Bio-Rad CFX96™系统进行荧光采集, 检测不同逆境胁迫下PIDHN2的表达情况。20  $\mu$ L反应体系: 10  $\mu$ L SYBR Green Master Mix、1  $\mu$ L cDNA、引物各0.6  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7.8  $\mu$ L。反应程序: 95°C变性5 min; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 共39次循环; 每次循环第3步进行荧光采集, 最后退火至65°C, 每隔5 s上升0.5°C, 至95°C变性1 min。cDNA标样和待测样均设置3次重复, 数据分析采用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法。

## 实验结果

### 1 PIDHN2基因的克隆及序列分析

根据转录组数据中PIDHN2的全长序列, 利用ORF Finder预测该序列的开放阅读框, 在其两端设计引物并进行特异扩增(表1), 得到该基因的开放阅读框长度为399 bp (图1-A), GenBank登录号为KY272747。

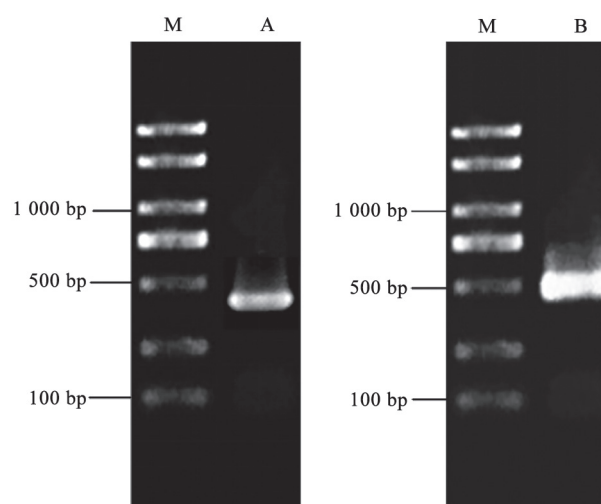


图1 PIDHN2基因的扩增

Fig.1 PCR amplification of PIDHN2

M: 分子量标准DL2000; A: ORF扩增产物; B: DNA扩增产物。

以芍药基因组DNA为模板, 扩增得到483 bp从起始密码子至终止密码子的DNA序列(图1-B)。对比ORF序列发现, PIDHN2含有2个外显子和1个内含子(图2), 其中2个外显子的碱基序列长度分别为225和174 bp, 内含子碱基序列长度为84 bp。内含子中AT碱基含量丰富(71.4%), 明显高于外显子AT含量(52.4%), 符合非编码区AT含量高的特点; 内含子和外显子交界处5'端为GT, 3'端为AG, 符合GT-AG剪切规则。通过Plant CARE对内含子序列进一步分析, 结果显示, 该基因的内含子中包含2个顺式作用元件, 包括1个光响应顺式作用调控元件(G-box, 序列是GACATGTGGT)和1个厌氧诱导的顺式作用调控元件(ARE, 序列是TGGTTT)。

### 2 PIDHN2基因编码蛋白的生物信息学分析

PIDHN2基因编码132个氨基酸, 预测分子式为C<sub>624</sub>H<sub>973</sub>N<sub>199</sub>O<sub>207</sub>S<sub>4</sub>, 相对分子量为14 703.04 Da, 理论等电点PI值为8.63。疏水氨基酸有27个, 不带电荷的极性氨基酸有63个, 碱性氨基酸有27个(Arg+Lys), 酸性氨基酸有15个(Asp+Glu), 不稳定指数为

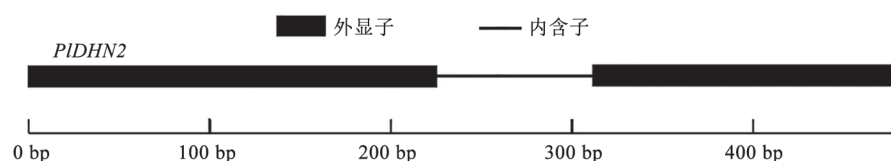


图2 PIDHN2基因组序列结构

Fig.2 Genomic structure of PIDHN2 gene

45.00, 为不稳定蛋白; 总平均疏水指数为-1.325, 属亲水性蛋白。

PIDHN2蛋白二级结构中,  $\alpha$ 螺旋(alpha helix)有35个, 延伸链(extended strand)有18个,  $\beta$ 转角(beta turn)有6个, 无规则卷曲(random coil)有73个。该基因有11个丝氨酸(serine)磷酸化位点、3个苏氨酸(threonine)磷酸化位点和5个酪氨酸(tyrosine)磷酸化位点, 由此推测PIDHN2蛋白的活性可能与其磷酸化调控有关。NLStradamus在线预测表明, PIDHN2蛋白序列84~96位包含一个核定位信号RRKKGLRE-RIKEK, 推测PIDHN2蛋白位于细胞核内; 进一步通过PSORTII在线软件分析发现, 该蛋白定位于细胞核中的可能性最高, 为78.6%, 与核定位信号预测一致。

### 3 PIDHN2基因编码蛋白的保守结构域和系统发育分析

多重比对结果表明, PIDHN2与甜瓜、芝麻等10个不同物种的脱水素蛋白序列差异较大, 但脱

水素特有的Y、S和K片段区域的氨基酸序列较为保守。另外, 该基因S片段前后依次具有蔗糖非酵解型蛋白激酶2 (sucrose non-fermenting 1-related protein kinases 2, SnRK2)和酪蛋白激酶2 (casein kinase 2, CK2)两个磷酸化识别位点, 且这两个识别位点在不同物种的脱水素内均存在(图3)。

为研究该基因所属的脱水素家族类型, 下载获得拟南芥和大麦脱水素家族的所有氨基酸序列, 利用MEGA 5.0对PIDHN2与拟南芥和大麦脱水素家族基因构建系统进化树(图4)。结果表明: PIDHN2与 $Y_nSK_2$ 型脱水素聚合在一个分支上, 因而PIDHN2属于脱水素家族中的 $Y_nSK_2$ 型。另外, 相同类型脱水素聚合在同一分支上, 表明同类型脱水素的亲缘关系更近。

### 4 PIDHN2基因在不同器官组织间的表达分析

通过半定量PCR分析PIDHN2基因的组织特异性(因‘大富贵’雌雄蕊退化严重, 故无雌雄蕊

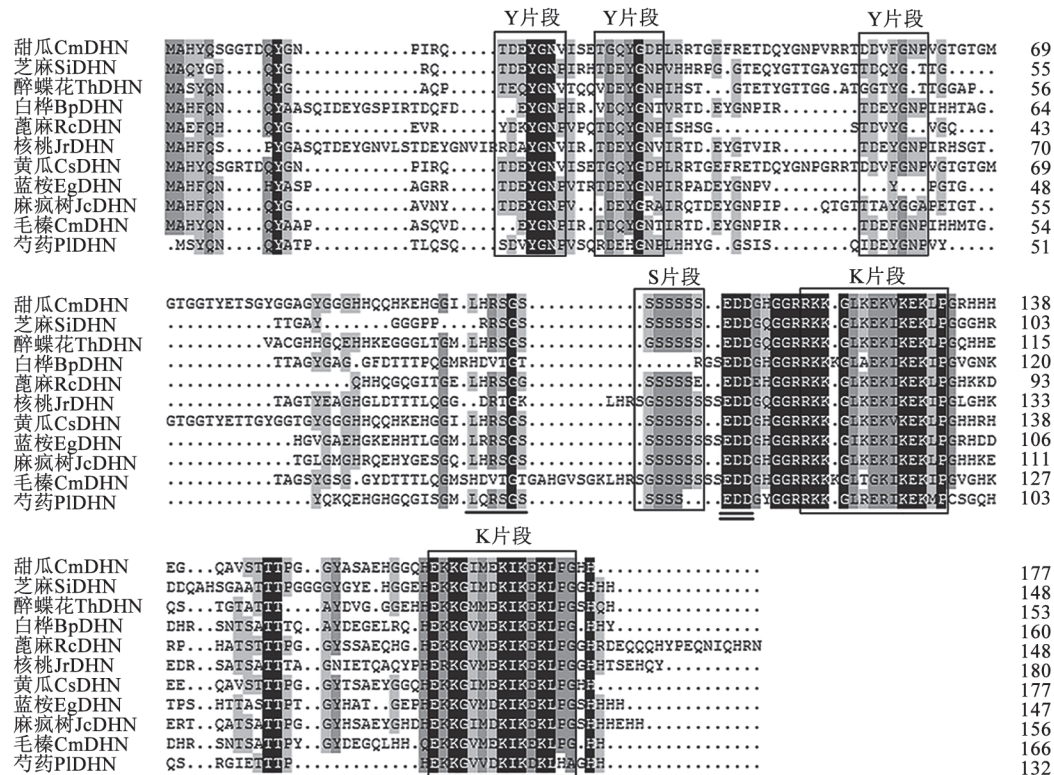


图3 PIDHN2与其它植物脱水素氨基酸的多重比对

Fig.3 Multiple alignment of the PIDHN2 protein and DHN protein from other plants

SnRK2识别位点为单划线; CK2识别位点为双划线。GenBank登录号: 甜瓜CmDHN (XP\_008452109.1)、芝麻SiDHN (XP\_011083184.2)、醉蝶花ThDHN (XP\_010550431.1)、白桦BpDHN (AMD11608.1)、蓖麻RcDHN (XP\_002521515.1)、核桃JrDHN (XP\_018824018.1)、黄瓜CsDHN (XP\_011653150.1)、蓝桉EgDHN (AEY77126.1)、麻疯树JcDHN (NP\_001295638.1)、毛榛CmDHN (AER13140.1)。

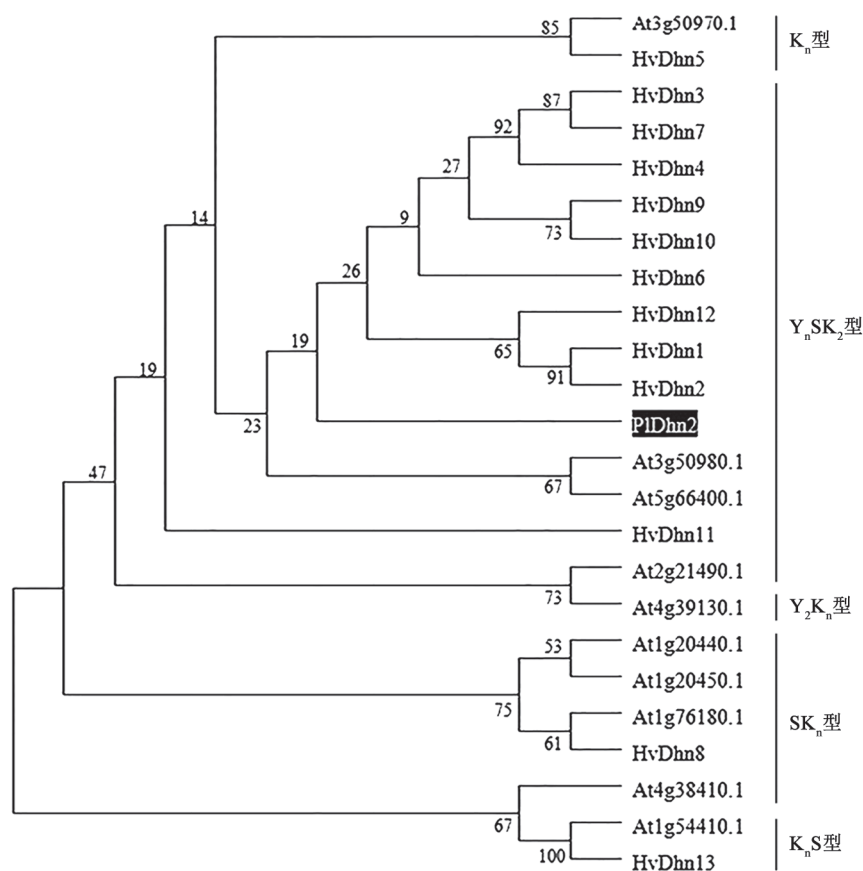


图4 PIDHN2与拟南芥和大麦脱水素家族系统进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of PIDHN2 and dehydrin family in *Arabidopsis thaliana* and *Hordeum vulgare*

拟南芥GenBank登录号: At1g20440 (AY114699)、At1g20450 (AF360351)、At1g54410 (NM\_104319)、At1g76180 (AF339722)、At2g21490 (BT000900)、At3g50970 (NM\_114957)、At3g50980 (NM\_114958)、At4g38410 (NM\_120003)、At4g39130 (NM\_120073)、At5g66400 (AY093779)。大麦GenBank登录号: HvDhn1 (AF043087)、HvDhn2 (AF181452)、HvDhn3 (AF181453)、HvDhn4 (AF181454)、HvDhn5 (AF181455)、HvDhn6 (AF181456)、HvDhn7 (AF181457)、HvDhn8 (AF181458)、HvDhn9 (AF181459)、HvDhn10 (AF181460)、HvDhn11 (AF043086)、HvDhn12 (AF155129)、HvDhn13 (AY681974)。

和种子的表达分析)。结果显示: 该基因在芽中表达丰度最高, 其次是萼片, 再次是芽鳞、茎和叶片, 在根和花瓣中的表达则极其微弱(图5)。说明PIDHN2基因在不同组织器官中均表达, 但表达水平存在较明显差异。

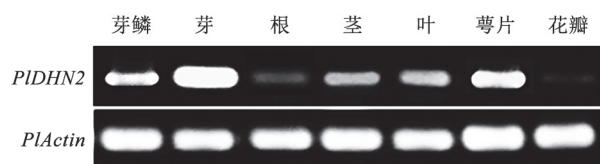


图5 芍药‘大富贵’不同器官中PIDHN2基因的表达  
Fig.5 Expression characteristics of PIDHN2 gene in *P. lactiflora* ‘Dafugui’ organs

## 5 PIDHN2基因表达载体的构建及亚细胞定位

为明确PIDHN2蛋白在植物细胞内的分布, 成功构建了农杆菌介导的亚细胞定位载体pROKII-GFP-PIDHN2。利用其侵染八叶期本氏烟植株叶片, 48 h后在荧光共聚焦显微镜下观察, 结果如图6所示: 对照pROKII-GFP的绿色荧光信号分布在整个细胞中, 而pROKII-GFP-PIDHN2融合蛋白的绿色荧光信号主要集中于细胞质膜和细胞核, 因此推断该基因定位于细胞质膜和细胞核中。

## 6 非生物学逆境胁迫下PIDHN2的表达分析

如图7所示, 在不同胁迫条件下, PIDHN2基因在转录水平上均有不同程度的响应。4°C低温处理下, PIDHN2的基因表达量响应缓慢且变化复杂,

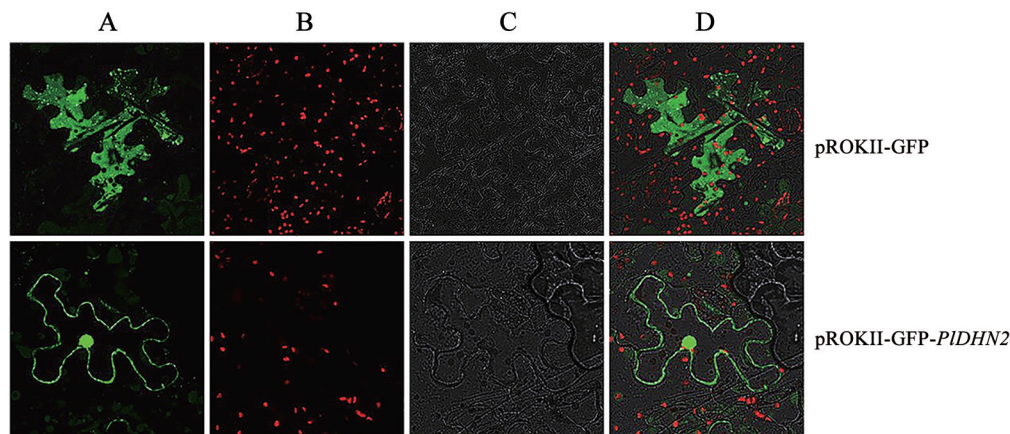


图6 PIDHN2在本氏烟叶片细胞中的定位

Fig.6 Subcellular localization of PIDHN2 in leaves of *N. benthamiana*

A: 荧光信号图; B: 叶绿体自发荧光图; C: 明图视野图; D: A、B和C的叠加图。

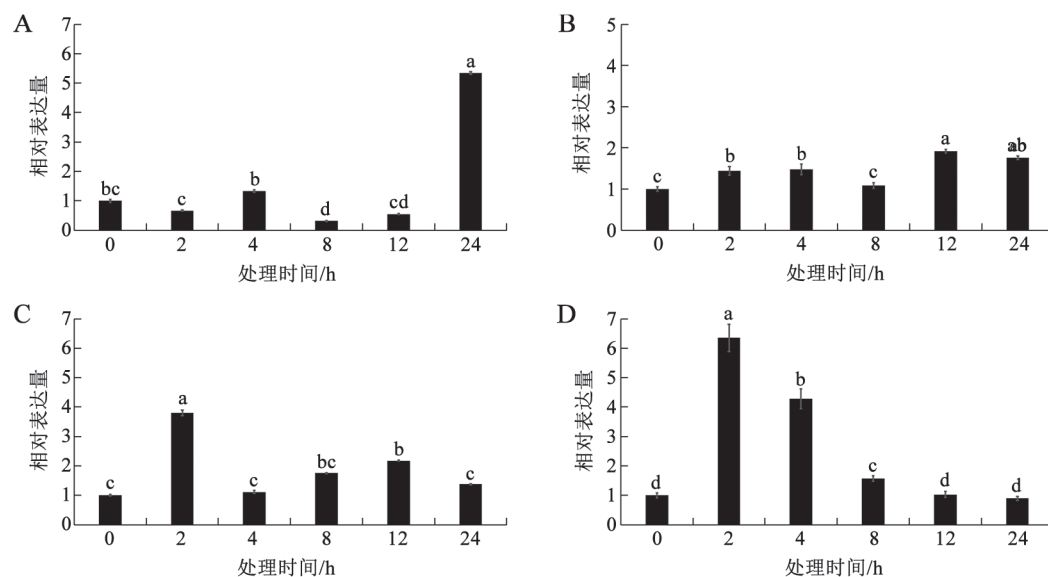


图7 不同胁迫处理条件下PIDHN2基因的表达

Fig.7 Expression levels of *PIDHN2* induced by different stress treatmentsA: 低温处理; B: 高温处理; C: 水淹处理; D: ABA处理。不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

处理24 h时表达量显著上升, 为对照的5.3倍(图7-A)。40°C高温处理下, *PIDHN2*的表达量上升幅度不明显, 但处理2 h后的表达水平与对照差异显著, 于12 h达到峰值, 为对照的1.9倍(图7-B)。水淹和ABA处理下, *PIDHN2*的表达量迅速显著性上升, 且均于处理后2 h达到最大值, 分别为对照的3.8倍和6.4倍(图7-C和D), 此后表达水平均出现回落, 最终达到对照水平。以上说明, *PIDHN2*对各种胁迫的敏感程度为ABA>水淹>高温>低温。

## 讨 论

植物在生长发育过程中面临大量的环境威胁, 如生物和非生物的逆境, 面对这些环境的变化, 通过合成一系列逆境响应蛋白、小分子代谢物和一些渗透保护物质有助于植物的生存, 而积累脱水素则是植物应对环境胁迫的一条主要途径(Zhang等2006)。

本研究从芍药中克隆了*PIDHN2*基因, *PIDHN2*

氨基酸序列中含有3个Y片段、1个S片段和2个K片段,为典型的Y<sub>3</sub>SK<sub>2</sub>型脱水素。从对PIDHN2蛋白二级结构的预测分析发现,α螺旋占整个蛋白的26.52%,无规则卷曲占整个蛋白的55.30%。研究表明,富含赖氨酸的K片段可形成双亲水的α螺旋并与膜脂结合,在维持膜结构稳定性,防止生物膜功能破坏方面具有重要作用(Eriksson等2011;李敬涛等2012)。而无规则卷曲结构对于增加细胞中束缚水含量,保护细胞脱水功能则非常有利(Fan和Wang 2006)。因此推断PIDHN2作为亲水性蛋白对生物膜和细胞脱水具有保护作用。

内含子是隔断基因线性表达的冗余序列,不具备基因的功能,然而越来越多的证据显示内含子在基因转录、表达及调控方面都具有重要的生物学功能,是真核生物基因中重要的组成结构(杨寅桂等2007;房婉萍等2012)。与绝大多数植物脱水素一样,芍药PIDHN2基因含有1个内含子,该内含子位于基因编码区,插入到S片段内。该内含子中还含有1个抗氧化响应元件(ARE)。目前,许多基因的内含子中均发现了基因表达的调控元件,它们对增强基因表达效率具有重要作用(雷晨等2016)。因此,推测芍药PIDHN2基因的内含子区域对该基因响应非生物胁迫起到调控作用。

半定量PCR分析表明,PIDHN2在芍药不同组织器官中泛表达,其中,芽的表达量最高,而在根与花瓣中表达量较低。结合前人研究发现,不同物种的脱水素基因在不同组织中的表达存在较大差异,例如平榛*ChDHN*主要在种子中表达,而核桃*JrDHN*则在花瓣中表达最高(陈新等2013;徐丽等2014),这可能与不同物种和不同脱水素基因之间的特异性有关。为了明确PIDHN2蛋白在植物细胞内的分布,利用瞬时表达蛋白定位方法进行亚细胞定位,结果表明PIDHN2蛋白定位于细胞质膜和细胞核中,因而推断该蛋白在细胞质膜和细胞核中发挥作用。前人研究发现,脱水素S片段的磷酸化能使其在信号肽的引导下进入细胞核(Alsheikh等2003),因而推测PIDHN2中的S片段起着核定位的功能。已报道的欧美杨(郭鹏等2015)、棉花(王俊娟等2016)的脱水素基因只在细胞质膜附近被检测到,因此不同物种脱水素基因的分布存在差异。

不同脱水素基因所编码的脱水蛋白结构和理

化特性差异很大,不同类型的脱水素蛋白对不同胁迫的响应也有不同(徐红霞等2014)。前人研究认为中性或碱性脱水素(如Y<sub>n</sub>SK<sub>2</sub>型)通常受ABA和干旱诱导,但不受低温诱导(Ismail等1999;Rorat 2007)。本研究发现,PIDHN2基因在低温、高温、水淹和ABA胁迫下,均呈现不同程度的上调表达。这与前人总结的Y<sub>n</sub>SK<sub>2</sub>型脱水素不受低温诱导的结论不一致,说明DHN的抗寒机制相当复杂,有待进一步探究。相比较其它胁迫,PIDHN2对ABA的响应尤为敏感,说明该脱水素基因可能属于依赖于ABA的基因表达调控通路。前人的研究表明,ABA能激活bZIP (basic-domain leucine zipper) 转录因子,使其能够与脱水素启动子中的ABRE元件结合,从而启动脱水素基因表达(Allagulova等2003)。因此,进一步探讨该基因的调控途径和作用机理需要通过克隆该基因的上游调控区启动子来实现。

## 参考文献

- Allagulova CR, Gimalov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA (2003). The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry*, 68 (9): 945-951
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK (2003). Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J Biol Chem*, 278 (42): 40882-40889
- Bies-Ethève N, Gaubier-comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 67 (1): 107-124
- Chen X, Liang LS, Ma QH, Zhao TT, Liu QZ, Wang GX (2013). Cloning and expression characteristics of a novel dehydrin gene from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.). *Acta Horticult Sin*, 40 (1): 32-40 (in Chinese with English abstract) [陈新, 梁丽松, 马庆华, 赵天田, 刘庆忠, 王贵禧(2013). 平榛脱水素基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 40 (1): 32-40]
- Close TJ (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant*, 97 (4): 795-803
- Close TJ (1997). Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*, 100 (2): 291-296
- Eriksson SK, Kutzer M, Procek J, Gröbner G, Harryson P (2011). Tunable membrane binding of the intrinsically disordered dehydrin Lti30, a cold-induced plant stress protein. *Plant Cell*, 23 (6): 2391-2404
- Fan Z, Wang X (2006). Isolation and characterization of a novel dehydrin gene from *Capsella bursa-pastoris*. *Mol Biol*, 40 (1): 43-50

- Fang WP, Zhang Y, Ruan GX, Chen X, Wang YH, Zhuang J, Li XH (2012). Analysis of genomic structure and introns of *CsHI* gene from tea plant. *J Nanjing Agric Univ*, 35 (4): 37–40 (in Chinese with English abstract) [房婉萍, 张玥, 阮光兴, 陈暄, 王玉花, 庄静, 黎星辉(2012). 茶树*CsHI*基因结构及其内含子信息分析. 南京农业大学学报, 35 (4): 37–40]
- Guo P, Xing X, Zhang WJ, Jiang J (2015). Cloning and characterization of *PdDHN2b* gene from *Populus deltoides*×*Populus nigra*. *J Beijing Fore Univ*, 37 (1): 22–28 (in Chinese with English abstract) [郭鹏, 邢鑫, 张万筠, 姜健(2015). 欧美杨脱水素*PdDHN2b*的克隆与表达分析. 北京林业大学学报, 37 (1): 22–28]
- Hundertmark M, Hinch DK (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9 (1): 118
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ (1999). Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (23): 13566–13570
- Lei C, Liu SL, Yu TQ, Chen YZ, Lu CF (2016). Bioinformatics analysis of genomic structure and introns of *AmCIP* gene from *Ammopiptanthus mongolicus*. *Biotechnol Bull*, 32 (9): 93–99 (in Chinese with English abstract) [雷晨, 刘胜利, 于婷乔, 陈玉珍, 卢存福(2016). 沙冬青*AmCIP*基因结构及其内含子生物信息学分析. 生物技术通报, 32 (9): 93–99]
- Li JT, Yu G, Chen XM, Fan Z, Liu JL, Pan HY (2012). Cloning and stress resistance functional characterization of an *AcDHN* gene from *Atriplex canescens*. *Plant Physiol J*, 48 (7): 676–682 (in Chinese with English abstract) [李敬涛, 余刚, 陈宣明, 范臻, 刘金亮, 潘洪玉(2012). 四翅滨藜*AcDHN*基因的克隆及其抗逆功能分析. 植物生理学报, 48 (7): 676–682]
- Liang D, Xia H, Wu S, Ma FW (2012). Genome-wide identification and expression profiling of dehydrin gene family in *Malus domestica*. *Mol Biol Rep*, 39 (12): 10759–10768
- Liu CC, Li CM, Liu BG, Ge SJ, Dong XM, Li W, Zhu HY, Wang BC, Yang CP (2012). Genome-wide identification and characterization of a dehydrin gene family in polar (*Populus trichocarpa*). *Plant Mol Biol Rep*, 30 (4): 848–859
- Liu H, Du Y, Li H, Wang XY, Yu ZY, Zhu WN, Zhang DP, Zhang LS (2016). Cloning, expression and functional analysis of *WDHNI* gene from wheat (*Triticum aestivum*). *Chin J Agric Biotechnol*, 24 (11): 1676–1687 (in Chinese with English abstract) [刘浩, 杜娅, 李核, 王晓宇, 于正阳, 朱维宁, 张大鹏, 张林生(2016). 小麦*WDHNI*基因的克隆、表达及功能分析. 农业生物技术学报, 24 (11): 1676–1687]
- Liu LY (2008). Studies on the physiological and biochemical character of heat and humidity tolerant *Paeonia lactiflora* [Master's thesis]. Changsha: Hunan Agricultural University (in Chinese with English abstract) [刘林艳(2008). 几个芍药品种的耐湿生生理生化特性研究(硕士论文). 长沙: 湖南农业大学]
- Prasad TK (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J*, 10 (10): 1017–1026
- Rorat T (2007). Plant dehydrins-tissue location, structure and function. *Cell Mol Biol Lett*, 12 (1): 148
- Su HN, Wang XF, Huang AJ, Li ZA, Tang KZ, Zhou CY (2014). High quality total nucleic acid extraction method from citrus for disease detection. *Acta Hort Sin*, 41 (11): 2342–2352 (in Chinese with English abstract) [苏华楠, 王雪峰, 黄爱军, 李中安, 唐科志, 周常勇(2014). 高质量提取柑橘样品中病原总核酸方法的建立. 园艺学报, 41 (11): 2342–2352]
- Tan XL, Fan ZQ, Li LL, Wu Y, Kuang JF, Lu WJ, Chen JY (2016). Molecular characterization of a transcription factor *BrWRKY75* related to leaf senescence of chinese flowering cabbage. *Acta Hort Sin*, 43 (6): 1089–1098 (in Chinese with English abstract) [谭小丽, 范中奇, 李露露, 吴亚, 邝健飞, 陆旺金, 陈建业(2016). 菜薹叶片衰老相关转录因子*BrWRKY75*的特性分析. 园艺学报, 43 (6): 1089–1098]
- Tommasini L, Svensson JT, Rodriguez EM, Wahid A, Malatrasi M, Kato K, Wanamaker S, Resnik J, Close TJ (2008). Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Funct Integr Genomics*, 8 (4): 387–405
- Wang J, Li DQ (2001). The accumulation of plant osmoticum and activated oxygen metabolism under stress. *Chin Bull Bot*, 18 (4): 459–465 (in Chinese with English abstract) [王娟, 李德全(2001). 逆境条件下植物体内渗透调节物质的积累与活性氧代谢. 植物学通报, 18 (4): 459–465]
- Wang JJ, Mu M, Wang S, Lu XK, Chen XG, Wang DL, Fan WL, Yin ZJ, Guo LX, Ye WW, et al (2016). Molecular clone and expression of *GhDHN1* gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Sci Agric Sin*, 49 (15): 2867–2878 (in Chinese with English abstract) [王俊娟, 穆敏, 王帅, 陆许可, 陈修贵, 王德龙, 樊伟丽, 阴祖军, 郭丽雪, 叶武威, 等(2016). 棉花脱水素*GhDHN1*的克隆及其表达. 中国农业科学, 49 (15): 2867–2878]
- Wang Q (2013). Study on physiological and biochemical responses to cold, drought, and saline-alkali stress in some cultivars of herbaceous peony [Master's thesis]. Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese with English abstract) [王琪(2013). 几个芍药品种对低温、干旱及盐碱胁迫的生理生化研究(硕士论文). 北京: 北京林业大学]
- Xing X, Liu Y, Li DQ (2010). Structure and function of plant dehydrins. *Plant Physiol J*, 46 (3): 268–276 (in Chinese with English abstract) [邢鑫, 刘洋, 李德全(2010). 植物脱水素的结构和功能. 植物生理学报, 46 (3): 268–276]
- Xu HX, Chen JW, Xie M (2009). The role dehydrin in plant response to cold stress. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 29 (1): 199–206 (in Chinese with English abstract) [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]
- Xu HX, Li XY, Chen JW, Feng JJ, Xu CJ (2014). Expression analysis of seven dehydrin genes in loquat. *Acta Hort Sin*, 41 (8): 1554–1562 (in Chinese with English abstract) [徐红霞, 李晓颖, 陈俊伟, 冯健君, 徐昌杰(2014). 枇杷7个脱水素基因表达差异分析. 园艺学报, 41 (8): 1554–1562]
- Xu L, Chen X, Wei HR, Zhang LS, Zong XJ, Wang JW, Zhu DZ, Liu QZ (2014). Molecular cloning, expression and single nucleotide polymorphisms analysis of typical  $Y_2SK_2$  dehydrin in *Juglans*.



- Acta Hort. Sin., 41 (8): 1573–1582 (in Chinese with English abstract) [徐丽, 陈新, 魏海蓉, 张力思, 宗晓娟, 王甲威, 朱东姿, 刘庆忠(2014). 核桃 $Y_2SK_2$ 型脱水素基因*JrDHN*的克隆、表达和单核苷酸多态性分析. 园艺学报, 41 (8): 1573–1582]
- Yang XF, Guo FQ (2014). Research advances in mechanisms of plant leaf senescence under heat stress. J Plant Physiol, 50 (9): 1285–1292 (in Chinese with English abstract) [杨小飞, 郭房庆(2014). 高温逆境下植物叶片衰老机理研究进展. 植物生理学报, 50 (9): 1285–1292]
- Yang YG, Lou QF, Chen JF, Liu Q, Li WG (2007). Structural analysis of the introns of cucumber *CSHSP70* Gene. Sci Agric Sin, 40 (12): 2915–2919 (in Chinese with English abstract) [杨寅桂, 娄群峰, 陈劲枫, 刘强, 李为观(2007). 黄瓜*CSHSP70*基因内含子结构分析. 中国农业科学, 40 (12): 2915–2919]
- Yang YZ, He MY, Zhu ZG, Li SX, Xu Y, Zhang CH, Singer SD, Wang YJ (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. BMC Plant Biol, 12 (1): 140
- Zhang Y, Li J, Yu F, Cong L, Wang L, Burkard G, Chai T (2006). Cloning and expression analysis of  $SK_n$ -type dehydrin gene from bean in response to heavy metals. Mol Biotechnol, 32 (3): 205–217
- Zhu WN, Zhang DP, Lu XX, Zhang LS, Yu ZY, Lv H, Zhang HM (2014). Characterisation of an  $SK_n$ -type dehydrin promoter from wheat and its responsiveness to various abiotic and biotic stresses. Plant Mol Biol Rep, 32 (3): 664–678

## Cloning and expression analysis of the dehydrin gene *PIDHN2* in peony (*Paeonia lactiflora*)

CHEN Yu\*, MA Yan\*, GUO Jing, LI Jun-Jie, HAN Lu-Lu, GUO Xian-Feng\*\*

Colloge of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

**Abstract:** Dehydrin (DHN) proteins play a protective role in plants under different abiotic stress conditions. In this study, the full-length cDNA of a dehydrin-like gene *PIDHN2* (GenBank accession number KY272747) was cloned from buds of *Paeonia lactiflora* ‘Dafugui’ by reverse transcription PCR (RT-PCR). *PIDHN2* gene contains 399 bp open reading frame (ORF) encoded 132 amino acids. Sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *PIDHN2* possesses typical characteristic of DHN family, belonging to the typical  $Y_3SK_2$ -type dehydrin. Gene structural analysis demonstrated that *PIDHN2* contains one 84 bp intron, which was inserted in the nucleotide sequence encoding the S-motif and characterised by a GT-AG border. Semi-quantitative PCR showed that *PIDHN2* was expressed in each organ and extremely high in buds, but at very low levels in roots and petals. Subcellular localization analysis revealed that the *PIDHN2* protein was mainly detected in the cytomembrane and nuclear. The expression of *PIDHN2* was up-regulated in response to cold, heat, waterlogging and ABA treatment in various degree. It was deduced that *PIDHN2* plays an important role in stress tolerance of cold, heat, waterlogging and ABA.

**Key words:** peony (*Paeonia lactiflora*); *PIDHN2*; molecular cloning; intron; subcellular localization; expression analysis

Received 2017-05-12 Accepted 2017-06-23

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No. ZR2014CM028).

\*Co-first authors.

\*\* Corresponding author (E-mail: guoxf@sdau.edu.cn).