作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2007,33(2):292 - 296 http://www.chinacrops.org/zwxb/
ISSN 0496-3490; CODEN TSHPA9 E-mail: xbzw@chinajournal.net.cn

西藏青稞 LEA3 蛋白新抗旱基因的克隆与序列分析

钱 刚[1,2,3] 翟旭光[1,3] 韩兆雪[1,3] 潘志芬[1,3] 邓光兵[1] 余懋群[1,*]

([1]中国科学院成都生物研究所,四川成都 610041; [2]遵义医学院生物学教研室,贵州遵义 563003; [3]中国科学院研究生院,北京 100039)

摘 要: 以强抗旱青稞冬青 8 号和弱抗旱青稞品比 14 为材料,将幼苗经干旱诱导处理 12 h 提取总 RNA,RT-PCR 同源克隆到 2 个有差异的 LEA3 蛋白抗旱基因的全编码框序列。冬青 8 号、品比 14 的 LEA3 蛋白基因序列全长分别为 661 bp 和 694 bp,其中,来源于品比 14 的 LEA3 蛋白基因编码框全长 639 bp,编码含 213 个氨基酸残基的蛋白质,该多肽含有 9 个重复的、由 11 个氨基酸残基组成的保守基元序列。而来源冬青 8 号的 LEA3 蛋白基因与之相比较除缺少 33 bp 核苷酸外,另有 6 个碱基的差异,所编码的蛋白质也相应地缺少第 4 个保守基元序列,由 8 个重复的保守基元序列组成。二者在 DNA 与氨基酸序列上的同源性分别为 94.38%和 92.02%。结果证实抗旱性不同的青稞品种之间 LEA3 抗旱蛋白保守基元拷贝数有差异,推测抗旱蛋白结构的差异可能对植物的抗旱性有影响。

关键词: 基因克隆;序列分析;LEA3 蛋白;青稞

Cloning and Sequence Analysis of Novel Drought-Tolerance Gene Coding LEA3 Protein in Tibetan Hulless Barley

QIAN Gang[1,2,3], ZHAI Xu-Guang[1,3], HAN Zhao-Xue[1,3], PAN Zhi-Fen[1,3], DENG Guang-Bing[1], and YU Mao-Qun[1,*]

([1] Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, Sichuan; [2] Department of Biology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou; [3] Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Late embryogenesis abundant (LEA) proteins were major group of proteins that were prominent in the stress response in various organisms including plants, algae, yeasts and bacteria. LEA3 protein was hydrophilic and accumulated in higher plants under conditions of extreme desiccation, during the last stage of seed formation, and during periods of water deficit in vegetative organs. In the present study, the most contrasting drought-tolerant genotypes were screened for comparing the differential sequences of gene coding LEA3 protein in Tibetan hulless barley, based on scoring of water loss rate (WLR), maldondialdehyde and proline measured. And Dongqing 8 with the highest scores and Pinbi 14 with the lowest ones were selected for analyzing the differences between the genes coding LEA3 protein in Tibetan hulless barley. Total RNA of two selected barley cultivars was extracted after treating with dehydration for 12 hours, and the first strand cDNA was synthesized by mRNA reverse transcription based on the primers designed according to the homologous sequence from *Hordeum vulgare* L. regiesterd in GenBank (No. X78205). RT-PCR products of gene coding LEA3 protein were cloned to pMD18-T vector. The recombinant pMD18-T plasmids, inserted interesting gene, were identified by PCR and restriction digestion, respectively. Results of sequence analysis revealed that both genes coding LEA3 protein contained entire open reading frames. The ORF of gene coding LEA3 protein from Dongqing 8 was composed of 606 bp, contrasting with 639bp from Pinbi 14. Accordingly, the deduced LEA3 protein in drought-tolerant genotype, Dongqing 8, was composed of 202 amino acid residues, while that of 213 amino acid residues in drought-sensitive genotype, Pinbi 14. The deduced LEA3 protein in the most tolerant genotype contains 8 repeats of an 11-amino acid motif that form amphiphilic α-helical structure, accordingly it shares the same characteristics as the third group of LEA protein. Comparing with LEA3 protein of the most sensitive genotype, the deduced LEA3 protein in Dongqing 8 was absent of the fourth motif because of absence of 33 nucleotides. In addition, there was a mutation of 6 differential amino acid residues appeared between in Dongqing 8. The polarity of LEA3 protein in drought-tolerant genotype could be stronger than that in Pinbi 14, due to those 6 mutant amino acid residues. Respectively, both materials shared 94.38% and 92.02% similarity by DNA and amino acid sequence homological comparison. In the present study, differential number of repeated motifs was related to the most

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270830); 中国科学院-西藏自治区院区合作项目和"西部之光"人才培养计划项目

作者简介: 钱刚(1969-),男,汉族,重庆垫江人,讲师,博士研究生,专业:植物遗传学。Tel: 028-85232103; E-mail: pengjiaqiong@163.com

*通讯作者(Corresponding author):余懋群(1957-),男,四川内江人,研究员,博士生导师,专业:植物遗传学。Tel: 028-85229053; E-mail: yumq@cib.ac.cn

Received(收稿日期):2006-04-07; Accepted (接受日期): 2006-07-12.

contrasting drought-resistant genotypes in Tibetan hulless barley. The differential hydrophilic capability of LEA3 protein could be related to differential number of repeated motifs, mostly to the polarity of mutant amino acid residues. Accordingly, it was suggested that differential configuration of drought-tolerant proteins may be contributed to capability of drought resistance in plants.

Keywords: Gene cloning; Sequence analysis; LEA3 protein, Tibetan hulless barley

高等植物胚胎发育晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant proteins, LEA proteins)是种子发育后期产生的一类小分子特异多肽,这类蛋白与植物耐脱水性密切相关,受植物的发育阶段、ABA和脱水信号的调节[1-2]。根据氨基酸序列的同源性和特定的序列单元,LEA 蛋白被分为 4 类,来自普通大麦(*Hordeum vulgare* L.)的 *HVA1* 基因编码大麦类群第 3 组 LEA 蛋白(LEA3 蛋白),通常含有多拷贝的 11 个氨基酸构成的保守基元序列(TAQAAKEKAGE),该基元序列可形成兼性 α-螺旋结构,在植物细胞脱水时提供疏水区的亲水表面[3-5]。普遍认为 LEA3 蛋白基因的表达或蛋白积累与植物的渗透胁迫抗性正相关,Jayaprakash 等[6]和 Suprunova 等[7]也证实植物抗旱性的强弱与 LEA2 蛋白和 LEA3 蛋白在诱导胁迫早期的积累程度有关,Babu 等[8]已通过转大麦 *HVA1* 基因水稻证实 LEA3 蛋白具有抗旱保护功能。

干旱是限制作物生产的主要非生物逆境之一,干旱导致的作物严重减产所造成的危害甚至超过病虫害和其他自然灾害所造成危害的总和,培育和选择抗旱品种是解决干旱地区水资源不足的主要途径[9-10]。青稞是适应性较广的粮食作物之一,在高原地区的食物保障中起着不可替代的作用,近年来,青稞的综合利用及品质改良在发达国家日趋受到重视[11]。本研究以西藏青稞为材料,在抗旱性鉴定的基础上,经苗期干旱诱导胁迫处理,利用 RT-PCR 方法克隆到与大麦抗旱基因 *HVA1* 高度同源的基因,为研究抗旱基因结构的差异对植物抗旱性的影响提供了参考,也为基因工程培育作物抗旱新品种奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*青稞材料*　　通过苗期失水率、丙二醛和脯氨酸含量的测定,对 84 份西藏来源的青稞材料进行抗旱生理指标的检测,选择其中抗旱性最强的品种冬青 8 号和抗旱性最弱的材料品比 14 为材料进行试验。

1.1.2　*引物、主要试剂与菌种*　　LEA3 蛋白基因上游引物(P1)5′-ATGGCCTCCAACCAGAAC-3′,下游引物(P2)5′-CGAACGACCAAACACGAC-3′ 根据 GenBank 中大麦(*H. vulgare* L.)来源的 *HVA1* 基因相关序列(X78205)设计,逆转录引物 Oligo$(dT)_{18}$ 为博瑞克生物公司产品。植物总 RNA 提取试剂盒及逆转录的相关试剂分别购自 TAKARA 生物公司和天为时代生物公司,*Taq* DNA 聚合酶购自华美生物公司,DNA 回收纯化试剂盒购自上海华舜生物工程公司,pMD18-T 载体及相关试剂系 TAKARA 生物公司产品,大肠杆菌 JM109 为本实验室保存菌种,DNA 限制性内切酶购自 GIBCOBRL 公司,引物的合成及序列的测定由 Invitrogen 生物公司上海分公司完成。

1.2　方法

1.2.1　*植物总 RNA 的提取与逆转录反应*　　将冬青 8 号、品比 14 青稞种子置于铺 3 层滤纸的培养皿中,以蒸馏水浸泡,于 22℃和每天 12 h 光照的温室培养,避免干旱。当幼苗的株高约 10 cm 时,转移到干燥的吸水滤纸上,干旱处理 12 h 后剪取幼苗,按 RNA 操作试剂盒的方法提取植物总 RNA,并进行第 1 链 cDNA 的合成。反应体系为 1 μg μL^{-1} 总 RNA 2 μL、5 × MMLV buffer 4 μL、10 mmol L^{-1} dNTP 2 μL、10 mmol L^{-1} Oligo$(dT)_{18}$ 1.5 μL、10 U RNase Inhibitor 和 10 U 逆转录酶,加 0.01% DEPC 水至 20 μL。逆转录反应参数为 30℃ 10 min,42℃ 45 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min。

1.2.2　*LEA3 蛋白基因的扩增*　　目的基因 PCR 扩增反应体系为逆转录产物 1.5 μL,1 U *Taq* DNA 聚合酶,10 × buffer 2.5 μL,25 mmol L^{-1} Mg^{2+} 1.5 μL,二甲基亚砜(DMSO)1.5 μL,2.5 mmol L^{-1} dNTP 2 μL,10 μmol L^{-1} Forward Primer 2 μL,10 μmol L^{-1} Reverse Primer 2 μL,加 dH_2O 至 25 μL。反应参数为 95℃ 10 min;94℃ 40 s,55℃ 40 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 8 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,回收、纯化目的片段。

1.2.3　*LEA3 蛋白基因的克隆与测序*　　按试剂盒说明,将回收纯化的目的片段与 pMD18-T 载体进行连接,并将连接产物转化 JM109 感受态细胞,挑取阳性

克隆培养，碱裂解法提取质粒 DNA，分别通过 PCR 检测和 *Pst*Ⅰ、*Kpn*Ⅰ双酶切鉴定，并进行序列测定与分析。

2 结果与分析

2.1 LEA3 蛋白基因的 RT -PCR

以逆转录产物为模板进行 LEA3 蛋白基因的 PCR 扩增，1.2% 的琼脂糖凝胶电泳结果表明，有一大小约为 700 bp 的单一条带(图 1)，与预期的结果相符。

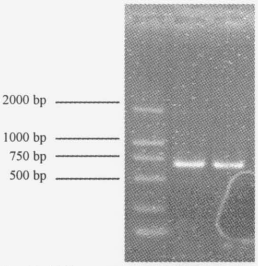

图 1 冬青 8 号、品比 14 LEA3 蛋白基因 RT-PCR 扩增结果
Fig.1 RT-PCR products of the gene coding LEA3 protein in Dongqing 8 and Pinbi 14
1：DL2000 maker；2：冬青 8 号；3：品比 14。
1: DL2000 maker; 2: Dongqing 8; 3: Pinbi 14.

2.2 LEA3 蛋白基因的克隆与重组子检测

通过 PCR、酶切鉴定结果表明，重组子的 PCR 扩增片段、核酸内切酶处理的目的片段与 RT-PCR 扩增得到的目的片段大小一致(图 2)，证明筛选到含目的片段的重组子。

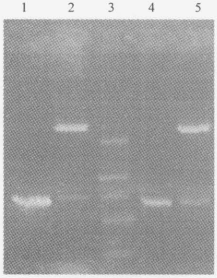

图 2 含插入目的基因的 pMD18 -T 重组子 PCR 及酶切鉴定结果
Fig.2 Identification of recombinant pMD18-T plasmids by PCR and restriction digestion
1：冬青 8 号，PCR；2：冬青 8 号，酶切；3：DL2000 marker；4：品比 14，PCR；5：品比 14，酶切。
1: Dongqing 8, PCR; 2: Dongqing 8, restriction digestion; 3. DNA Marker DL2000; 4: Pinbi 14, PCR; 5: Pinbi 14, restriction digestion.

2.3 序列测定与分析

通过对目的基因进行测序及序列分析比对，表明来源于品比 14 的目的基因核苷酸序列全长为 694 bp，包含 1 个完整的开放阅读框，其中编码框为 639 bp，编码含 213 个氨基酸残基的多肽，所编码的蛋白质包括 9 个重复的保守基元序列，属于典型的 LEA3 蛋白。与之相比较，来源于冬青 8 号的 LEA3 蛋白目的基因全长 661 bp，其中编码框长 606 bp，编码含 202 个氨基酸残基的多肽，二者在 DNA 序列和氨基酸序列上的同源性分别为 94.38% 和 92.02%(图 3，图 4)。

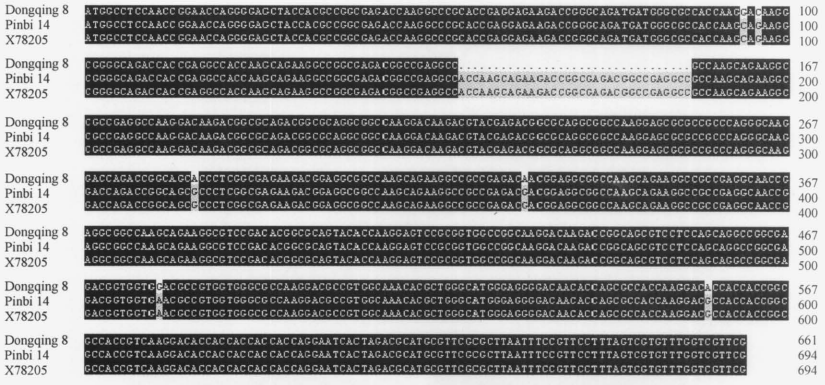

图 3 冬青 8 号、品比 14 和 *H. vulgare* L.(X78205)来源的 LEA3 蛋白基因的序列比较
Fig.3 Comparison of DNA sequence character of genes coding LEA3 protein in Dongqing 8, Pinbi 14, and *H. vulgare* L. (X78205)
黑区代表同源性为 100%；蓝区代表核苷酸缺失；白区代表同源性为 0。
Sequences in black background mean 100% similarity, sequences in blue background mean absence of nucleotides, sequences in white background mean 0 similarity.

图 4　冬青 8 号、品比 14 与 *H. vulgare* L. LEA3 蛋白的氨基酸序列比较

Fig.4　Comparison of amino acid sequence based on the deduced LEA3 proteins in Dongqing 8, Pinbi 14, and *H. vulgare* L. (X78205)

黑区代表同源性为 100%;蓝区代表核苷酸缺失;白区代表同源性为 0。

Sequences in black background mean 100% similarity, sequences in blue background mean absence of nucleotides, sequences in white background mean 0 similarity.

2.4　蛋白结构与分析

由于冬青 8 号 LEA3 蛋白基因第 154 ~ 186 之间的 33 个核苷酸序列的缺失,导致相应的 LEA3 蛋白缺少 Thr_{52}-Ala_{62} 的亲水保守基元序列,所缺少的序列属于第 4 个保守基元重复序列;此外,另 6 个有差异氨基酸残基的比较结果表明,冬青 8 号差异的氨基酸残基的极性和带电性更高(表 1)。

表 1　冬青 8 号、品比 14 差异氨基酸极性的比较

Table 1　Comparison of polarity of 6 differential amino acids between Dongqing 8 and Pinbi 14

品种 Cultivar	1	2	3	4	5	6
品比 14 Pinbi 14	Gln_{32} 极性/- Polar/-	Lys_{33} 非极性/正 Nonpolar/Positive	Ala_{106} 非极性/- Nonpolar/-	Asp_{189} 极性/正 Polar/-	Ala_{197} 非极性/- Nonpolar/-	Thr_{209} 极性/- Polar/-
冬青 8 号 Dongqing 8	Asp_{32} 极性/- Polar/-	Glu_{33} 极性/负 Polar/Negative	Thr_{95} 极性/- Polar/-	Asn_{178} 极性/- Polar/-	Thr_{186} 极性/- Polar/-	Pro_{198} 非极性/- Nonpolar/-

"极性"代表极性氨基酸,"非极性"代表非极性氨基酸;"-"表示不带电荷,"正"代表正电荷,"负"代表负电荷。

Polar represents polar amino acid residues, nonpolar represents nonpolar amino acid residues; "-" represents no charge, positive represents positive charge, negative represents negative charge.

3　讨论

LEA 蛋白是一大类与逆境相关的蛋白质,迄今为止,LEA2 蛋白基因(即脱水素基因,*Dhn*)和 LEA3 蛋白基因是麦类作物中研究最多的 2 类抗旱基因,已有的研究结果证实 LEA3 蛋白的累积程度与植物的抗旱性呈正相关[12-14]。其中 LEA3 蛋白主要存在于细胞质中,根据氨基酸序列特征推断,LEA3 蛋白对植物组织脱水的保护性在于它的多拷贝基元重复序列能形成具有高度亲水性的兼性 α-螺旋结构,目前尚无试验数据证明基元拷贝数与抗旱性强弱之间的相关性[15-16]。

在对青稞苗期失水率、丙二醛和脯氨酸等抗旱生理指标测定的基础上,对西藏来源的青稞材料进行了抗旱性鉴定,并选取抗旱性差异最大的 2 份青稞材料冬青 8 号、品比 14,采用 RT-PCR 技术对 LEA3 蛋白编码抗旱基因的 cDNA 序列进行同源克隆,结果发现,二甲基亚砜(占反应体系的 6% ~ 10%)对目的基因的专一性扩增影响很大,在 PCR 反应体系中不加入二甲基亚砜得到的目的片段专一性很低而且难以连接到克隆载体上。通过对目的基因 DNA 序列与所推导的氨基酸序列分析结果表明,LEA3 蛋白在这两品种间存在差异性,主要表现在保守基元序列拷贝数的差异,青稞不同品系之间的 LEA3 蛋白基因到底有着怎样的同源差异性,这些同源差异性与抗旱性之间有着怎样的联系,有待进一步研究。

从现有的研究结果看,不同物种来源的 LEA3 蛋白在 11 个氨基酸残基组成的保守的基元重复序列的拷贝数上有所差异,例如:在棉花中 LEAD7 蛋白的保守基元拷贝数只有 5 个,油菜 LEA76 蛋白含有 13 个重复的保守基元,而大豆 pGmPM8 和

pGmPM10 编码的蛋白则多达 30 个相连的保守基元序列[17-19]。所报道的 LEA3 蛋白保守基元拷贝数在同一物种中相对稳定,但笔者发现在抗旱性强弱不同的青稞品系与 LEA3 蛋白保守基元拷贝数之间存在联系,即在同一作物品种中 LEA3 蛋白基因也具多态现象,表现在强抗旱品种冬青 8 号的 LEA3 蛋白缺少第 4 个保守基元序列。除了 LEA3 蛋白的保守基元拷贝数的差异,编码框也有 6 个碱基的突变,导致冬青 8 号 LEA3 蛋白差异的氨基酸更有极性,这种有差异的 LEA3 抗旱蛋白可能具有更高的亲水能力,进而对植物的抗旱性及抗旱能力产生直接的影响。LEA3 蛋白保守基元拷贝数的差异与亲水能力的关系,以及这种差异对作物抗旱性的影响,正在进一步研究中。

4 结论

抗旱性不同的青稞的 LEA3 蛋白基因的 cDNA 序列表现出差异,与品比 14 相比,强抗旱品种冬青 8 号的 LEA3 蛋白除缺少第 4 个保守基元重复序列外,还有 6 个氨基酸残基发生改变,这种差异可能对植物的抗旱性有直接影响。

致谢:供试青稞材料由西藏农牧科学院强小林研究员、唐亚伟先生提供,在此表示感谢。

References

[1] Sun L-P (孙立平), Li D-Q (李德全). Progress in molecular biology of LEA protein. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2003, (6): 5-9 (in Chinese with English abstract)

[2] Ramanjulu S, Bartels D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 141-151

[3] Dure L Ⅲ. Structural motifs in LEA proteins of higher plants. In: Close T J, Bray E A eds. Response of Plants to Cellular Dehydration during Environmental Stress. Rockville, Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists, 1993. pp 91-103

[4] Yu J-N (俞嘉宁), Shan L (山仑). The relationship of LEA protein to drought tolerance in plants. *Biol Eng Prog* (生物工程进展), 2002, 22(2):10-14 (in Chinese with English abstract)

[5] Choi D W, Zhu B, Close T J. The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allelic types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 *Dhn* genes of cv Dicktoo. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1234-1247

[6] Jayaprakash T L, Ramamohan G, Krishnaprasad B T, Ganeshkumar, Prasad T G, Mathew M K, Udayakumar M. Genotypic variability in differential expression of LEA2 and LEA3 genes and proteins in response to salinity stress in fingermillet (*Eleusine coracana* Gaertn) and rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Ann Bot*, 1998, 82: 513-522

[7] Suprunova T, Krugman T, Fahima T, Chen G, Shams I, Korol A, Nevo E. Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant Cell Environ*, 2004, 27: 1297-1308

[8] Babu R C, Zhang J X, Blum A, Ho T H D, Wu R, Nguyen H T. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci*, 2004, 166: 855-862

[9] Araus J L, Slafer G A, Reynolds M P, Royo C. Plant breeding and drought in C_3 cereals: what should we breed for? *Ann Bot*, 2002, 89: 925-940

[10] Bartels D, Souer E. Molecular responses of higher plants to dehydration. In: Hirt H, Shinozaki K eds. Plant Responses to Abiotic Stress, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2004. pp 9-38

[11] Nimazhaxi (尼玛扎西). Highland barley is necessary to the food supply for people in highland. *Tibetan Agric Technol* (西藏农业科技), 1998, 20(2):20-25 (in Chinese)

[12] Flower D J, Ludlow M M. Contribution of osmotic adjustment to the dehydration tolerance of water-stressed pigeonpea [*Cajanus caian* (L.) Millsp.] leaves. *Plant Cell Environ*, 1986, 9: 33-40

[13] Ramanjulu S, Bartels D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 141-151

[14] Guo W-D (郭卫东), Rao J-P (饶景萍), Li J-R (李嘉瑞), Zheng X-Q (郑学勤). Cloning of a group 3 LEA cDNA from two row barley. *Acta Univ Agric Boreal-Occident* (西北农业大学学报), 2000, 28(2):8-12 (in Chinese with English abstract)

[15] Gal Z T, Glazer I, Koltai H. An LEA group 3 family member is survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Lett*, 2004, 577:21-26

[16] Sun H-D (孙海丹), Lan Y (兰英), Liu Y (刘昀), Zheng Y-Z (郑易之). 11-amino acid motif in late embryogenesis bundant protein (LEA) and plant desiccation tolerance. *J Northeast Normal Univ* (Nat Sci) (东北师大学报·自然科学版), 2004, 36(3): 85-90 (in Chinese with English abstract)

[17] Bray E A. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 153-161

[18] Dure L Ⅲ, Crouch M, Harada J, Ho T H D, Quatrano R, Thomas T, Sung Z R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol*, 1989, 12: 475-486

[19] Zhang L-S (张林生), Zhao W-M (赵文明). LEA protein functions to tolerance drought of the plant. *Plant Physiol Bull* (植物生理学通讯), 2003, 39(1): 61-66 (in Chinese)