



# 毛尖紫萼藓抗旱相关基因 *Gp-LEA* 的克隆与表达分析

沙 伟,张梅娟,刘 博,安洪雪,宋 瑶

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江齐齐哈尔 161006)

**摘要:**以毛尖紫萼藓干旱 cDNA 文库中获得的一段与 LEA 基因同源性较高的 EST 序列为基础,采用 RACE 技术分离该基因 cDNA 全长序列,命名为 *Gp-LEA*。*Gp-LEA* 基因的 cDNA 全长 814 bp,开放阅读框 456 bp,编码含 151 个氨基酸蛋白质。生物信息学分析结果显示,*Gp-LEA* 蛋白为稳定蛋白,分子质量为 16.612 kD,理论等电点 (pI) 为 5.06,含有 LEA\_2 功能结构域,不属于跨膜蛋白且不存在信号肽。系统发生分析表明,*Gp-LEA* 基因编码蛋白与花旗松 LEA 蛋白亲缘关系最近。荧光定量 PCR 分析显示,*Gp-LEA* 基因在复水和快速干旱模式下均能表达。推测 *Gp-LEA* 基因在毛尖紫萼藓的复水和干旱过程中起着重要作用。

**关键词:**毛尖紫萼藓;*Gp-LEA* 基因;基因克隆;表达分析

中图分类号:Q785;Q786 文献标志码:A

## Cloning and Expression Analysis of Drought-tolerance Related Gene *Gp-LEA* in *Grimmia pilifera*

SHA Wei,ZHANG Meijuan,LIU Bo,AN Hongxue,SONG Lu

(College of Life Science and Agriculture and Forestry,Qiqihar University,Qiqihar,Heilongjiang 161006,China)

**Abstract:** A full-length cDNA encoding late embryogenesis abundant protein (LEA) named *Gp-LEA*, was cloned from *Grimmia pilifera* through the method of rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full length of this gene was 814 bp, and contained a 456 bp open reading frame which encoded a protein containing 151 amino acids. The result of bioinformatics showed that this protein was a stable protein with a function domain-LEA\_2, which molecular weight was 16.612 kD and theoretical pI was 5.06, and it was not a transmembrane protein and had no signal peptide. Phylogenetic analysis indicated that this gene had the closest genetic relationship with that of *Pseudotsuga menziesii*. The quantitative RT-PCR results suggested that the expression of *Gp-LEA* gene was induced in both rehydration and dehydration, and this gene might play an important role in the two processes.

**Key words:** *Grimmia pilifera*; *Gp-LEA* gene; gene clone; expression analysis

自然界中,植物的生长发育与环境变化密切相关。环境中存在多种多样的动态因素,如干旱、高温、低温、高盐碱等,这些因素在特定环境下会对植物造成不利影响,形成非生物胁迫。在长期的自然

选择下,植物在遭受非生物胁迫时能通过合成一系列功能保护蛋白来抵抗对其造成的伤害,继续进行基本正常的生理活动,LEA 蛋白(late embryogenesis abundant proteins, LEA)就是其中的一种<sup>[1]</sup>。

收稿日期:2013-05-02;修改稿收到日期:2013-07-19

基金项目:国家自然科学基金(31070180;31270254)

作者简介:沙 伟(1963—),女,教授,博士生导师,主要从事苔藓植物遗传学和分子生物学研究。E-mail:shw1129@263.net

LEA 蛋白首先发现于棉花 (*Gossypium hirsutum*) 胚胎发育后期的种子中<sup>[2]</sup>, 主要在种子发育和成熟阶段表达。但后期研究发现, 当植物遭受逆境胁迫时, LEA 蛋白也会大量积累, 受到诱导表达, 是植物抵御逆境胁迫的主要保护物质之一<sup>[3-7]</sup>。LEA 蛋白分布广泛, 除了植物, 在酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[8]</sup>、线虫 (*Aphelenchus avenae*)<sup>[9]</sup>、蛭形轮虫 (*Philodina roseola*)<sup>[10]</sup> 等中也有发现。并且 LEA 蛋白的诱导表达无组织专一性, 在种子、花粉粒、幼苗、根、茎、叶等器官中均可被诱导<sup>[1,5,11-12]</sup>。LEA 蛋白具有清除活性氧自由基, 维持膜结构稳定性, 结合金属离子等功能, 这些功能是植物在极端环境下维持正常生命活动的保障<sup>[6]</sup>。

随着 LEA 蛋白研究的深入, 其家族成员越来越多, 分类依据也有所不同。Dure 等<sup>[13]</sup> 根据蛋白序列结构将 LEA 蛋白分为 3 组: 第 1 组是 Em 基因产物, 显著特点是由 20 个亲水性氨基酸组成的保守结构域, 比大多数球蛋白亲水性更强; 第 2 组是 RAB 和脱水素基因产物(如脱水素等), 显著特点是由 15 个氨基酸组成的富含赖氨酸的 K 片段, 具有分子伴侣和亲水溶剂的作用; 第 3 组包括其他 LEA 基因产物, 主要特点是由 11 个氨基酸组成的保守结构域。尽管大多数 LEA 蛋白被分在 3 大组中, 但相关研究人员根据序列的同源性和特征序列分出更多组别<sup>[6]</sup>, 如第 4 组, 第 5 组, 第 6 组<sup>[14-15]</sup> 和第 7 组<sup>[5]</sup>。第 4 组 LEA 蛋白缺乏重复的序列单元, 具有较保守的 N 末端, 并可形成  $\alpha$ -螺旋, 对离子进行束缚或形成 1 层保护膜, 在细胞膜脱水时来维持膜的稳定性, 且 C 端保守性较差<sup>[1,7,15-16]</sup>, 如棉花的 LEA14 属于该组蛋白<sup>[16]</sup>。第 5 组 LEA 蛋白缺乏高度专一性, 在结合细胞脱水过程中有浓缩离子的作用<sup>[16]</sup>。第 6 组 LEA 蛋白具有高的亲水性和热稳定性<sup>[16]</sup>。第 7 组 LEA 蛋白热稳定性高, 处于高度无序的状态<sup>[5]</sup>。而 Pfam 数据库根据蛋白保守结构域将 LEA 蛋白分为 7 类, 分别是 dehydrin, LEA\_1, LEA\_2, LEA\_3, LEA\_4, LEA\_5 和 SMP<sup>[17]</sup>。

目前有关植物 LEA 基因功能的研究已很多, 但主要集中于模式植物 [如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)] 和谷物 [如小麦 (*Triticum aestivum*)、水稻 (*Oryza sativa*)]<sup>[17-21]</sup>, 对苔藓植物的研究则很少, 且多是对小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 的研究。Yasuko 等<sup>[22]</sup> 在小立碗藓中发现了 I 型 LEA 蛋白, 其亲水性极高, 能保护细胞免受干旱胁迫的伤害。Saavedra 等<sup>[23]</sup> 通过同

源克隆从小立碗藓中获得 *PpDHNA* 基因, 该基因与植物脱水素基因和山墙藓 (*Tortula ruralis*) 的 *Tr288* 一致性很高, 编码甘氨酸, 但将其敲除后, 在正常生长环境下突变体不能恢复正常状态, 初步推断该基因在小立碗藓逆境胁迫响应中发挥重要作用。然而, 毛尖紫萼藓 (*Grimmia pilifera*) 中 LEA 基因的研究还未见报道。

毛尖紫萼藓属紫萼藓科 (Grimmiaceae) 紫萼藓属 (*Grimmia*), 生于光照强烈的花岗岩石上或林下石面上, 在干燥几分钟后叶片就会卷缩, 慢慢进入休眠状态, 而复水后瞬间可恢复活力, 是典型的耐旱藓类。本研究以毛尖紫萼藓为材料, 以其干旱 cDNA 文库获得的与 LEA 基因一致性较高的 EST 序列为基础上, 利用 RACE 技术获得全长 cDNA 序列, 并采用荧光定量 PCR 分析该基因在复水和干旱模式下的表达情况, 以期进一步研究该基因的功能, 为苔藓植物的耐旱机制研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

毛尖紫萼藓于 2009 年 6 月末采于黑龙江省五大连池风景区石龙, 凭证标本 (Gf20090627) 保存于齐齐哈尔大学生命科学与农林学院标本馆。

材料处理: 沙伟等<sup>[24]</sup> 对东亚砂藓 (*Racomitrium japonicum*) 旱后复水的生理指标进行测定, 发现各项指标在复水 2 d 内能恢复到正常水平, 而毛尖紫萼藓和东亚砂藓同属紫萼藓科植物, 故以此为参照, 将保存的材料进行复水处理并延长时间, 保证恢复到正常水平, 处理时间分别为 1、3、6 和 12 h 以及 1~6 d, 并将处理 6 d 的材料作为对照 (CK)。然后对复水 6 d 的材料分别进行 10、20 和 30 min 及 1 h 硅胶快速干燥处理。以上样品取材后, 于液氮中速冻, 放入 -80 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成** 采用宋晓宏的改良 SDS 法<sup>[25]</sup> 进行干旱材料总 RNA 的提取, 稍做改动, 材料用量改为 0.2 g, 研磨时不加 PVP 和 Vc。为防止总 RNA 中残留的基因组 DNA 干扰后续试验, 利用 Promega 公司的 DNase I (RNase Free) 对总 RNA 进行纯化。按照 Clontech 公司的逆转录酶 SMARTScribe™ Reverse Transcriptase 说明书对纯化后的总 RNA 进行逆转录, 合成 cDNA 第一链。

### 1.2.2 *Gp-LEA* 基因克隆 从毛尖紫萼藓干旱

表 1 *Gp-LEA* 基因克隆及荧光定量 PCR 所用引物  
Table 1 Primers for cloning and qRT-PCR of *Gp-LEA* gene

用途 Description	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' → 3')
3'-RACE	<i>Gp-LEA</i> -GSP	ATCACTTCTGGAAACATTGGGAGCACCG
	<i>Gp-LEA</i> -NGSP	CGTGGCCTACAGCTTCCTCATCAACTTG
	UMP	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
ORF 扩增 Amplification of ORF	<i>Gp-LEA</i> -F	CTGCTGTTCAAGGTTTCAGTG
	<i>Gp-LEA</i> -R	GCCTTGTTCCATCATCTCAG
	<i>Gp-LEA</i> -qF	CTGCTGTTCAAGGTTTCAGTG
荧光定量 PCR qRT-PCR	<i>Gp-LEA</i> -qR	GCAAGTCGTGGTCATAAGGATT
	18s-F	TTGACGGAAGGGCACCA
	18s-R	ACCACCAACCCATAGAACATCAAGAA

cDNA文库中获得的LEA基因长为539 bp,经NCBI Blast验证有完整5'端,无3'端,为非全长cDNA序列,故设计3'-RACE引物*Gp-LEA*-GSP和*Gp-LEA*-NGSP,分别与通用引物UPM进行2轮PCR(表1),进行3'-RACE扩增,操作步骤按SMARTER™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)试剂盒说明书进行。所得目的片段经回收、纯化后与pMD18T载体进行连接,转化后挑取阳性克隆由北京华大基因公司测序。

测序获得的片段经验证后与原EST序列进行拼接,获得全长cDNA,命名为*Gp-LEA*。根据获得的完整cDNA序列,在5'非编码区(UTR)和3'非编码区(UTR)设计特异引物*Gp-LEA*-F和*Gp-LEA*-R(表1)进行ORF全长扩增,对拼接结果加以验证。

实验所用引物均由上海生工生物工程有限公司合成(表1)。

**1.2.3 *Gp-LEA* 基因的生物信息学分析** 利用ProtParam软件分析*Gp-LEA*基因编码蛋白质的基本理化性质;通过NCBI中的Conserved Domains分析其功能结构域;用SignalP 4.1软件预测信号肽;用TMpred软件预测可能存在的跨膜区;用REP-V1.1软件预测该蛋白的重复序列;用PSORT Prediction软件预测亚细胞定位;用SOMPA软件预测二级结构。

利用NCBI的Blast程序进行*Gp-LEA*基因编码氨基酸序列的同源性查找,经MEGA5.0软件(N-J法)构建系统进化树。

**1.2.4 *Gp-LEA* 基因在复水和干旱模式下的表达分析** 提取不同复水和干旱时间材料的总RNA,参照Promega公司的逆转录酶说明书合成cDNA第一链,用作荧光定量PCR反应模板。根据*Gp-LEA*基因全长序列,严格按照荧光定量PCR引物设计原

则,设计引物*Gp-LEA*-qF和*Gp-LEA*-qR,同时以毛尖紫萼藓18s rRNA作为内参基因,引物为18s-F和18s-R(表1)。

参照Bio-Rad公司的SsoFast EvaGreen supermix的荧光定量试剂盒说明书,于Bio-Rad CFX-96仪器上进行qRT-PCR。PCR反应体系为:SsoFast EvaGreen supermix(2×)10 μL,上下游引物各0.6 μL,模板100 ng,用无菌水补足20 μL。反应程序为:95 °C预变性30 s,95 °C变性10 s,58 °C退火10 s,72 °C延伸20 s(收集荧光信号),40个循环,每个样品重复3次。目标基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Gp-LEA* 基因的克隆与分析

以毛尖紫萼藓干旱cDNA文库的EST序列为为基础,参照3'-RACE试剂盒说明书,扩增出1条长约479 bp的片段(图1,A),经NCBI Blast验证为完整的3'端序列。将该序列与原EST序列进行拼接,获得1条814 bp的全长cDNA序列,含有1个456 bp的开放阅读框,编码的蛋白质含151个氨基酸,并且包含125 bp的5'-UTR和233 bp的3'-UTR(图2)。以*Gp-LEA*基因完整ORF序列为基础设计特异引物,扩增得到1条长约563 bp的片段,与预期结果一致(图1,B)。将目的片段回收后进行测序,结果表明,该序列包含完整的ORF,与拼接序列完全相同,说明拼接结果正确。

### 2.2 *Gp-LEA* 基因的生物信息学分析

ProtParam软件分析该基因编码的蛋白质分子量约为16.612 kD,理论等电点为5.06,属于酸性蛋白;负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)总数为21,正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)总数为15;不稳定系数为

20.48, 属于稳定型蛋白( $<40$  蛋白稳定), 脂肪系数为 100.73, 总亲水性平均系数为 -0.060, 预测该蛋白为轻度亲水性蛋白。Conserved Domains 分析发现, 该蛋白具有 LEA\_2 结构域, 属于 LEA 蛋白家族。REP-V1.1 软件显示该蛋白无氨基酸重复序列。用 SignalP 4.1 和 TMpred 软件预测 Gp-LEA 蛋白无信号肽且无跨膜结构域, 全部位于膜外, 说明该蛋白为非分泌型蛋白且不属于膜蛋白。PSORT Prediction 软件预测该蛋白定位于细胞质的可信度为 0.650, 定位于叶绿体类囊体膜的可信度为 0.280, 定位于叶绿体基质的可信度为 0.200, 因此该蛋白的细胞最可能定位于细胞质。

SOMPA 软件预测二级结构表明, 该蛋白中形成  $\alpha$  螺旋的氨基酸有 31 个, 占总数的 20.53%, 主要集中于 N 端; 无规则卷曲由 74 个氨基酸形成, 占总数的 49.01%, 而 C 端主要为无规则卷曲, 保守性差; 同时, 该蛋白还含有 26.49% 的延伸链和 3.97% 的  $\beta$  转角(图 3)。

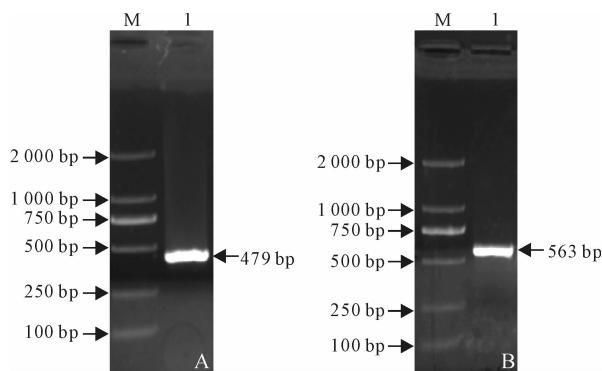


图 1 Gp-LEA 基因 3'-RACE(A) 和 ORF 扩增结果(B)

Fig. 1 PCR products of 3'-RACE(A) and ORF(B) of Gp-LEA gene

M. DL2000

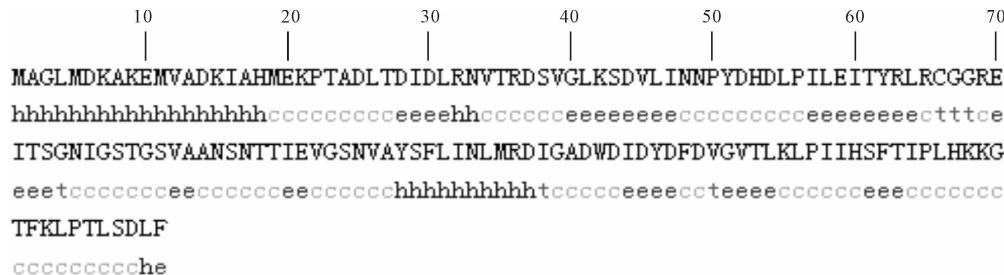


图 3 Gp-LEA 基因编码蛋白的二级结构

大写字母为 Gp-LEA 基因编码的氨基酸序列; h.  $\alpha$ -螺旋; c. 无规则卷曲; e. 延伸链; t.  $\beta$ -转角

Fig. 3 Secondary structure of the coded protein of Gp-LEA gene

Capital letters are coded amino acid sequence of Gp-LEA; h. Alpha helix; c. Random coil; e. Extended strand; t. Beta turn

### 2.3 Gp-LEA 蛋白系统进化树分析

利用 NCBI 的 Blast 进行毛尖紫萼藓 Gp-LEA 基因编码氨基酸序列的同源性查找, 结果发现, Gp-LEA 蛋白与花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)、北美云杉(*Picea sitchensis*)、甘蔗(*Saccharum officinale*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、玉米(*Zea mays*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、野草莓(*Fragaria vesca*)、山茶(*Camellia sinensis*)、大蒜(*Allium sativum*)和江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)的 LEA 蛋白一致性较高, 均在 50% 以上, 其中, 与花旗松和北

1	GGGATCCGAGCTGAAACCGCTTGTGAAAGTGATCAGGAGAACGTTCTGCAAGTTT
61	GAAGCCCTGCTTCAAGGTTTCAGTGAAGTTGACTTGGAGGGCTTGTGCTTTTGC
121	GCAAAATGCGGGGTGTGGACAAGCCGAGAGGAGATGGTGGCGGACAAGATCGCGCACAA
1	MAGLMDKAKEMWADKIAHMEKPTADLTDIDLRNVRD... 181 TGGAGAACGCCGACGGCGACTTGACGGACATTGATCTCGGAATGAACTCGCGACTCTG
60	60 K P T A D L T D I D L R N V T R D S 241 TTGACTGAAGAGCGATGTGTTGATTAACATCCTTATGACCACGACTTGCGCATTC
80	80 V G L K S D V L I N N P Y D H D L P I L 301 AGATCACTTACCGCTCGCCTGTCGGCTGAGATCACTCTGGAAACATTGGGAGCA
100	100 E I T Y R L R C G G R E I T S G N I G S 361 CCCGATCTGTGGCTGGCAACTAAACACCACTTGAAGTCGGTTCGAACGTCGCTACAA
120	120 T G S V A A N S N T T I E V G S N V A Y 421 GCTTCCCTCATCAACTTGCGCTGATATTGGCGCTGACTGGGACATCGACTATGAGTTTG
140	140 S F L I N L M R D I G A D W D I D Y D E 481 ACCTCGGTGTGACGCTGAAGCTGCCATTATCCACTCTTCACCATCCGCTCAAAAGA
160	160 D V G V T L L K L P I I H S F T I P L H H 541 AGGGCACCTTCAAGCTGCCAACATTATCCGACTTGTITTGAGGTTTACATCTAGTTT
180	180 K G T F K L P T L S D L F *
601	601 TGTCAGACTGAGATGATGAAACAAAGCGCGTGTAGGGAGCTTCCGACTTGTATATG 661 CAGATTITCTCATCGTGTGAGATTGATCCGAAACTCTTATACAGCGGTTCTTGTGGTGG
721	721 CCAGAGTTGTGGTGAACGGATTCTCCGACTGTTTATAAATTCAAACGATTAT 781 TATTTGAAAAAAA.....

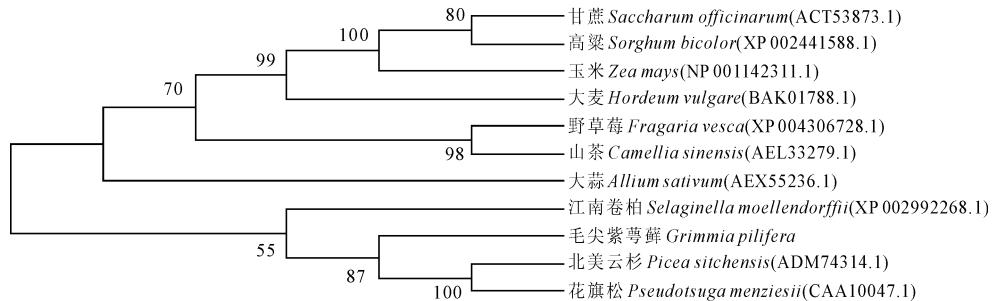
图 2 Gp-LEA 基因核苷酸序列

和推导氨基酸序列

方框中 ATG 代表起始密码, TGA 代表终止密码; 圆中 GGG 和 AAG 代表原 EST 序列起始处和终止处

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Gp-LEA gene

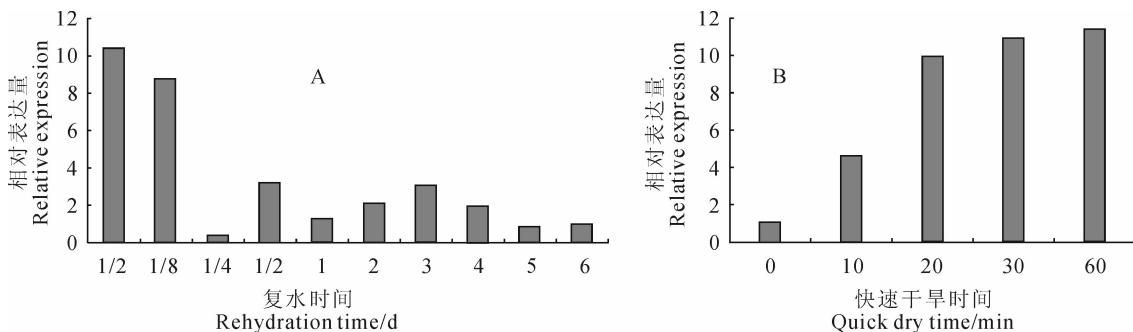
In the box, ATG means initiator codon, TGA means terminator codon; GGG and AAG in the round box mean initiator and terminator of original EST sequence

图4 *Gp-LEA*基因与其他植物*LEA*基因氨基酸序列系统进化树分析

分支上的数字表示Bootstrap验证中基于1 000次重复该节点可信度

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of *Gp-LEA* and other plant *LEA* genes

The numbers on the branches represent the reliability percent of bootstraps values based on 1 000 replications

图5 复水(A)和快速干旱(B)模式下*Gp-LEA*基因的表达分析Fig. 5 Expression analysis of *Gp-LEA* gene under rehydration (A) and quick dehydration (B)

美云杉的一致性最高,分别为60%和58%,这说明在长期的进化中,*LEA*基因的结构也在进化,但是相对保守的。

由系统进化树可知(图4),以上物种被聚为两支,一支为被子植物,另一支为苔藓植物、蕨类植物和裸子植物。其中,毛尖紫萼藓与裸子植物(花旗松和北美云杉)的亲缘关系最近,与被子植物(甘蔗和高粱)的亲缘关系最远。

#### 2.4 *Gp-LEA*基因在复水和快速干旱模式下的表达

利用实时荧光定量PCR对不同复水时间和快速干旱时间下*Gp-LEA*基因表达情况进行分析(CK表达量定义为1),结果显示,在复水处理过程中(图5,A),*Gp-LEA*基因在复水1 h时表达量最高,约为对照的10.4倍,3 h时表达量下降,当复水6 h时表达量低于CK,表达受到抑制,之后呈现先下降、后上升再下降的趋势,在复水5 d时表达量同CK表达量相当。在快速干旱处理过程中(图5,B),*Gp-LEA*基因的表达量呈现升高的趋势,尤其是快速干旱10 min后大幅度升高,但快速干旱30 min和60 min时表达量变化不太明显,呈相当水平,分

别为对照的10.9倍和11.4倍。这说明*Gp-LEA*基因的表达除了在复水6 h时受到抑制,其余处理时间明显受到诱导,推断该基因在毛尖紫萼藓的复水和干旱过程中起着重要作用。

### 3 讨论

本研究通过RACE法从毛尖紫萼藓中成功克隆得到*Gp-LEA*基因的全长cDNA序列。Conserved Domains分析显示,该基因所编码的蛋白具有LEA\_2结构域,根据Dure<sup>[14]</sup>和Pfam数据库<sup>[17]</sup>对LEA蛋白的分类原则,该蛋白属于LEA14家族;按照Battaglia等<sup>[5]</sup>的分类原则,该蛋白应属于第5组LEA蛋白中的一员。但二级结构预测发现,毛尖紫萼藓*Gp-LEA*基因编码的蛋白无氨基酸重复序列,α螺旋主要集中于N端,C端主要为无规则卷曲,保守性差,这些结构特点与第4组LEA蛋白特征很相符。随着LEA蛋白种类的增多,其分类越来越繁琐,各家族间分类差距也越来越小,目前的分类标准并不能适用于所有物种<sup>[7,26]</sup>。因此本研究认为*Gp-LEA*基因编码的蛋白为第4组LEA家族中的一员,这与师静等<sup>[27]</sup>的结论相一致。同样,棉

花的 LEA14 也属于第 4 组 LEA 蛋白<sup>[16]</sup>。

LEA 蛋白具有高度的抗逆性,尤其是在抗旱方面。目前,有关 LEA 蛋白与植物的抗旱性之间的关系,已有很多报道。Wang 等<sup>[19]</sup>对柽柳(*Tamarix*)的 LEA 基因进行原核表达时发现,半乳糖能诱导酵母细胞中的 LEA 基因,且表达量能达到最高水平是在 12~24 h 后,转基因酵母细胞在干旱胁迫下具有更高的成活率。Wang 等<sup>[20]</sup>在小麦中得到 1 个 *TaLEA3* 基因,利用农杆菌介导法将该基因转入到中华羊草(*Leymus chinensis*)中,结果显示,经过超表达后,羊草的耐旱力有了很大提高,说明该基因在应对干旱胁迫时能起很大作用。刘金仙等<sup>[28]</sup>从甘蔗中克隆得到 1 个属于第 4 组 LEA 蛋白的基因 *Sc-Lea*,研究发现,该基因在受到模拟干旱胁迫和盐胁迫时,表达量明显上调,说明其具有干旱和盐胁迫保护功能。Thalhammer 等<sup>[29]</sup>研究拟南芥 LEA 蛋

白家族中的成员 COR15A 和 COR15B 时得出,在干旱胁迫下,它们能与脂膜相结合,对脂膜起到保护作用。Dalala 等<sup>[30]</sup>将从甘蓝型油菜(*Brassica napus*)中获得的第 4 组 LEA 蛋白基因 *BnLEA4-1* 转入拟南芥中,在非生物胁迫和 ABA 诱导下,转基因拟南芥对高盐和干旱胁迫的抗性得到提高。本研究中,荧光定量 PCR 结果显示,在复水和快速干旱模式下,*Gp-LEA* 基因除了在复水 6 h 时受到抑制,其余时间均能被诱导表达,并且不同时间下,表达量差异明显,推测该基因在毛尖紫萼藓的复水和快速干旱过程中起着重要作用。

本研究中所得的 *Gp-LEA* 基因是 LEA 蛋白家族中的一员,研究结果可为后续通过原核表达、转基因等方式深入研究其功能提供重要的基础数据,并最终为苔藓植物的耐旱机制研究提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] LI J(李剑), ZHAO CH Y(赵常玉), ZHANG F SH(张富生), et al. LEA protein and plant stress tolerance[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2010, **46**(11): 1 102—1 108(in Chinese).
- [2] DURE L, GALAU G A. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination (Ⅲ): Regulation of biosynthesis of principal storage proteins[J]. *Plant Physiology*, 1981, **68**(1): 187—194.
- [3] BAKER J, STEELE C V, DURE L. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton[J]. *Plant Molecular Biology*, 1988, **11**(3): 277—291.
- [4] DEANE J E, ROVERSI P, KING C, et al. Structures of the *Shigella flexneri* type 3 secretion system protein MxiC reveal conformational variability amongst homologues[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, **377**(4): 985—992.
- [5] BATTAGLIA M, OLVERA-CARRILLO Y, GARCIA-RUBIO A, et al. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins[J]. *Plant Physiology*, 2008, **148**(1): 6—24.
- [6] BAI Y Q(白永琴), YANG Q CH(杨青川). Study of late embryogenesis abundant protein [J]. *Biotechnology Bulletin*(生物技术通报), 2009, 9, 1—7(in Chinese).
- [7] LIU Y(刘洋), XING X(邢鑫), LI D Q(李德全). Studies on the classification and function of LEA proteins[J]. *Biotechnology Bulletin*(生物技术通报), 2011, 8: 36—43(in Chinese).
- [8] SALES K, BRANDT W, RUMBAK E, et al. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1463**(2): 267—278.
- [9] BROWNE J, TUNNACLiffe A, BURNELL A. Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode[J]. *Nature*, 2002, **416**(6 876): 38.
- [10] TUNNACLiffe A, LAPINSKI J, MCGEE B. A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers[J]. *Hydrobiologia*, 2005, **546**: 315—321.
- [11] COLMENERO-FLORES J M, MORENO L P, SMITH C E, et al. Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings[J]. *Plant Physiology*, 1999, **120**(1): 93—104.
- [12] ZHANG L SH(张林生), ZHAO W M(赵文明). LEA protein functions to tolerance drought of the plant[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2003, **39**(1): 161—166(in Chinese).
- [13] DURE L, CROUCH M, HARAD J, et al. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, **12**: 475—486.

- [14] DURE L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation[J]. *Plant Journal*, 1993, **3**(3): 363–369.
- [15] BRAY E A. Molecular responses to water deficit[J]. *Plant Physiology*, 1993, **103**(4): 1 035–1 040.
- [16] INGRAM J, BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 1996, **47**: 377–403.
- [17] HUNDERTMARK M, HINCHA D K. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Genomics*, 2008, **9**: 118–139.
- [18] XIAO B Z, HUANG Y M, TANG N, et al. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, **115**: 35–46.
- [19] WANG B F, WANG Y C, ZHANG D W, et al. Verification of the resistance of a LEA gene from *Tamarix* expression in *Saccharomyces cerevisiae* to abiotic stresses[J]. *Journal of Forestry Research*, 2008, **19**(1): 58–62.
- [20] WANG L J, LI X F, CHEN S Y, et al. Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* plants with constitutively expressed wheat TaLEA 3[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, **31**(2): 313–319.
- [21] ZHOU L(周丽), JI X N(姬向楠), HE F(何非), et al. Structure and function of late embryogenesis abundant proteins in plant[J]. *Journal of Tropical Organisms(热带生物学报)*, 2012, **3**(2): 191–196(in Chinese).
- [22] YAUKO K, ANDREW C C. The evolution of the abscisic acid response in land plants: comparative analysis of group I. LEA gene expression in moss and cereals[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, **59**: 723–737.
- [23] SAAVEDRA L, SVENSSON J, CARBALLO V, et al. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance[J]. *The Plant Journal*, 2006, **45**(2): 237–249.
- [24] SHA W(沙伟), WANG H(王欢), SHI SH(师帅). Effects of rewatering on the physio-b biochemical indexes of *Racomitrium japonicum* in long-time drought[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research(武汉植物学研究)*, 2010, **28**(2): 246–249(in Chinese).
- [25] SONG X H(宋晓宏), SHA W(沙伟), LIN L(林琳), et al. Construction of cDNA library in *Grimmia pilifera* under drought stress [J]. *Bulletin of Botanical Research(植物研究)*, 2010, **30**(6): 713–717.
- [26] ZHANG L H(张林华), LIU CH(刘超), QIU H L(邱红林), et al. Cloning and function analysis of *SiLEA14* from *Saussurea involucratae* Kar. et Kir. [J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin. (西北植物学报)*, 2013, **33**(6): 1 071–1 078(in Chinese).
- [27] SHI J(师静), LIU M Q(刘美芹), SHI J N(史军娜), et al. Sequence analysis and expression pattern of *AmLEA14* encoding a late embryogenesis abundant protein in *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. *Journal of Beijing Forestry University(北京林业大学学报)*, 2012, **34**(4): 114–119(in Chinese).
- [28] LIU J X(刘金仙), QUE Y X(阙友雄), GUO J L(郭晋隆), et al. Molecular cloning of sugarcane late embryogenesis abundant protein gene (LEA) and its expression character[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology(农业生物技术学报)*, 2009, **17**(5): 836–842(in Chinese).
- [29] THALHAMMER A, HUNDERTMARK M, POPOVA A V, et al. Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, **1798**(9): 1 812–1 820.
- [30] DALALA M, TAYAL D, CHINNUSAMY V, et al. Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, **139**(2): 137–145.