

## 发菜耐旱相关蛋白 NXL-01 的 基因克隆与表达分析

梁文裕<sup>1</sup>, 杨 佳<sup>1</sup>, 吴诗杰<sup>1</sup>, 焦广飞<sup>2</sup>, 王淑萍<sup>1</sup>, 徐婷婷<sup>1</sup>

(1 宁夏大学 生命科学学院, 银川 750021; 2 福建农林大学 生命科学学院, 福州 350002)

**摘 要:**在发菜耐旱差异蛋白质组学研究中,发现假定蛋白(Hypothetical protein NXL-01)在干旱胁迫条件下表达量逐渐增加。根据已知氨基酸序列设计简并引物克隆 NXL-01 基因,长度为 327 bp (GenBank 登录号为 HM854288)。生物信息学分析表明,该基因具有较高保守性,蛋白质二级结构主要由  $\alpha$  螺旋和随机卷曲构成,是亲水性的膜外蛋白,有 5 个 Ser 磷酸化位点,1 个 Thr 磷酸化位点。将 NXL-01 基因在大肠杆菌中表达,获得预期大小的重组蛋白(12.4 kD)。RT-PCR 分析表明,NXL-01 mRNA 在干旱胁迫条件下表达量逐渐增加,与 NXL-01 蛋白的表达趋势一致。

**关键词:**发菜;假定蛋白 NXL-01;干旱胁迫;基因克隆;原核表达

**中图分类号:**Q785;Q786

**文献标志码:**A

### Clone and Expression of Hypothetical Protein NXL-01 Related to Drought-tolerant in *Nostoc flagelliforme*

LIANG Wenyu<sup>1</sup>, YANG Jia<sup>1</sup>, WU Shijie<sup>1</sup>, JIAO Guangfei<sup>2</sup>, WANG Shuping<sup>1</sup>, XU Tingting<sup>1</sup>

(1 School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** *Nostoc flagelliforme* is a kind of terrestrial nitrogen-fixing cyanobacteria being strong drought ecological adaptability. An unknown protein related to drought-tolerant, named hypothetical protein NXL-01, has been discovered by the proteomic analysis under drought stress. NXL-01 gene was cloned by designed degeneracy primers based on identified amino acid sequences. A full length of 327 bp DNA was obtained (GenBank access number: HM854288). Bioinformatics analysis showed that the NXL-01 gene was highly conservative. The secondary structure of NXL-01 was made up of  $\alpha$  helix and random coil. It was a hydrophilic outside membrane protein with five Ser phosphorylation sites and one Thr phosphorylation site. NXL-01 was expressed in *E. coli*, and a 12.4 kD heterologous protein was observed. RT-PCR showed that mRNA level of NXL-01 gradually increased, consistent with the expression trend of NXL-01 in *N. flagelliforme* under drought stress.

**Key words:** *Nostoc flagelliforme*; hypothetical protein NXL-01; drought stress; gene clone; prokaryotic expression

干旱是影响植物的最主要非生物胁迫因素之一。植物对于干旱胁迫的响应根本上决定于基因的时

空表达与调节<sup>[1-3]</sup>。这些基因至少可分为两类,一类是用于防止细胞脱水的结构基因,另一类是胁迫诱导的与基因表达和信号传导有关的调节基因。这些干旱胁迫诱导基因产物不仅通过重要代谢蛋白保护细胞结构,而且起调节信号传导和基因表达的作用。随着分子生物学技术不断发展,人们对植物抗旱相关基因表达的研究越来越集中到特异基因的分离克隆及其在干旱胁迫过程中的特异表达<sup>[4-5]</sup>方面。

发菜(*Nostoc flagelliforme*)是一种分布于干旱半干旱荒漠草原地区的陆生固氮念珠藻,在结构和生理上表现出强烈的旱生生态适应性<sup>[6-8]</sup>。在发菜耐旱蛋白质组学研究中,获得了大量差异表达的蛋白,其中假定蛋白(hypothetical protein NXL-01)在 2-DE 图谱上显示的分子量为 12.2 kD, pI 为 4.59,它在干旱胁迫条件下表达量明显高于吸水条件下的表达量<sup>[6]</sup>。这种变化表明该蛋白可能在发菜耐旱机制中具有重要作用。本研究根据串联质谱分析所得的肽段氨基酸序列,设计简并引物克隆 NXL-01 基因并进行生物信息学分析,研究其原核表达和干旱胁迫下转录水平变化,为进一步研究发菜 NXL-01 结构及其在干旱防御和胁迫应答等方面的功能提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

发菜采自宁夏香山发菜自然生长地,人工模拟发菜生长环境进行培养。培养条件为温度( $25 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗,光照强度为  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。每天供水 1 次,供水量一致,使发菜充分吸胀。培养 30 d 后测定光合速率和呼吸速率,确保处于正常生长状态(与野生状态对照)。样品处理:发菜藻体充分吸水 4 h(4HAR),藻体含水量为( $835 \pm 10$ )%;发菜藻体充分吸水 4 h 后干旱胁迫 48 h(48HAD),藻体含水量为( $9.5 \pm 2$ )%。将样品立即放入液氮中冷冻后置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 发菜 NXL-01 基因 PCR 扩增** 发菜基因组 DNA 提取参考梁文裕等的方法<sup>[6]</sup>。

根据 NXL-01 的 MALDI-TOF-TOF/MS 肽质量指纹图谱测定的部分氨基酸序列设计简并引物,上游引物为 P<sub>1</sub>(5'-ATGAGTAACCC(C/A)CT(T/A)GTACA-3'),下游引物为 P<sub>2</sub>[5'-(C/T)TA(C/T)(G/A)CAGAA(G/C)T(T/A)CTGCGAT-3']。

PCR 扩增条件为  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 8 min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 50 s,  $49^{\circ}\text{C}$  退火 50 s,  $72^{\circ}\text{C}$  复性 1 min, 35 个循环;最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

PCR 扩增产物经 1%(W/V)琼脂糖凝胶电泳后,回收纯化连接到 pMD18-T 载体上,然后转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取阳性克隆,PCR 检测后送至天根公司测序。

**1.2.2 序列分析** 将测序结果进行 BLAST 检索,进行基因确认。运用 DNAMAN 软件对基因序列及推导出的氨基酸序列与其他物种进行同源性比较分析。运用 DNASTAR 6.0 软件对氨基酸序列进行分析。利用瑞士生物信息学研究所(Swiss Institute of Bioinformatics, SIB) ProtScale 程序 Kyte 和 Doolittle 算法,对发菜 NXL-01 氨基酸序列做亲/疏水性分析。利用 DNAMAN、PBILLYON-GERLAND 信息库、SWISS MODEL 网站和 DNASTAR 软件对 Hypothetical protein NXL-01 二级结构进行预测分析。利用丹麦科技大学(DTU)TMHMM Server v. 2.0 程序进行 NXL-01 序列跨膜区分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>; 参数选择:Extensive with graphics)。利用丹麦科技大学(DTU)NetPhos 2.0 Server 程序对 NXL-01 做磷酸化位点分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)。

**1.2.3 NXL-01 基因原核表达** 根据发菜 NXL-01 基因测序结果,设计扩增目的基因的引物 C<sub>1</sub>(5'-CGCGGATCCATGAGTAACCCACTTGTACA-3') 和 C<sub>2</sub>(5'-CCGCTCGAGTTATACAGAAGT-TCTGCGAT-3'),并分别在引物 5'端添加保护碱基(方框部分)以及 BamH I 和 Xho I 限制性酶切位点(下划线部分)。PCR 扩增条件为  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 8 min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 50 s,  $50^{\circ}\text{C}$  退火 50 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共进行 35 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

用 BamH I 和 Xho I 双酶切纯化的 PCR 产物和 pET-28a 载体,回收酶切产物,连接目的基因与载体片段,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,Kan 抗性筛选阳性克隆,提取质粒酶切鉴定,鉴定正确的质粒转化 BL21 感受态细胞,以终浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG 诱导 NXL-01 表达。12.5% SDS-PAGE 电泳检测并分析。

**1.2.4 发菜总 RNA 提取及反转录** 发菜总 RNA 提取、去除基因组 DNA 和总 RNA 纯度测定等参照 Liang<sup>[6]</sup>的方法。将去除基因组 DNA 的 RNA 直接

作为反转录模板,反应体系 25  $\mu\text{L}$ 。反应体系包含 RNA 模板 10  $\mu\text{L}$ ,DEPC 水 5  $\mu\text{L}$ ,6 个碱基的随机引物 pd(N)6(20  $\mu\text{mol/L}$ )1  $\mu\text{L}$ ,混匀后于 70  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 min,冰浴 5 min,再依此加入 5 $\times$ MMLV RT Buffer 5  $\mu\text{L}$ ,dNTP(10 mmol/L)2  $\mu\text{L}$ ,RNase Inhibitor HPRI 1  $\mu\text{L}$ ,MMLV RNase H 1  $\mu\text{L}$ 。混匀后于 42  $^{\circ}\text{C}$  反转录 1 h。反应产物可直接用于 PCR 反应或 -20  $^{\circ}\text{C}$  长期保存备用。

**1.2.5 NXL-01 表达的 RT-PCR 分析** 利用 OMI-GA2 软件设计发菜 NXL-01 引物。上游引物 RT-P<sub>1</sub>(5'-AAGTTCTGCGATAATGTTG-3'),下游引物 RT-P<sub>2</sub>(5'-GAGCAGTGGCTGAAGTAGT-3'),16s rRNA 的 p<sub>1</sub>(5'-CTGACACTGAGGGACGAA-3')和 p<sub>2</sub>(5'-CGGGACTTAACCCAACATT-3')为内标基因的上下游引物。

提取吸水 and 干旱胁迫条件下发菜总 RNA,按照前述反转录方法分别合成 cDNA 后进行 RT-PCR。先取不同的 cDNA 各 1  $\mu\text{L}$ ,以 16s rRNA 基因作为内标,根据其 RT-PCR 产物亮度调节需要加入 cDNA 模板的量,然后再根据确定的 cDNA 模板量进行 NXL-01 的 RT-PCR 检测。PCR 扩增条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 50 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 50 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共进行 28 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 1.3 数据处理

将所得实验数据用 SPSS 13.0 进行方差分析,检验结果的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 发菜 NXL-01 基因的 PCR 扩增及目的片段的克隆

将以发菜总 DNA 为模板进行 PCR 扩增的产物经 1%(W/V)琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到一条长与预期大小相符的 DNA 扩增片段(图 1)。

用 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段连接到 pMD18-T 载体上,转化到大肠杆菌 DH5a,挑选阳性单菌落进行 PCR 鉴定,扩增产物在 500 bp 处出现特异性条带,表明外源目的片段已成功克隆(图 2)。

### 2.2 发菜 NXL-01 基因序列测定及同源分析

为进一步鉴定所得到的 DNA 片段是否确为 NXL-01 基因,运用 pMD<sub>18</sub>-T 载体通用引物对目的 DNA 片段进行双向测序。结果表明,目的 DNA 片段大小为 327 bp。把测序结果提交 NCBI 进行 BLAST 检索,确定获得了发菜 NXL-01 基因编码

序列,GenBank 登录号为 HM854288(图 3)。

由 NXL-01 基因序列所推译的氨基酸序列表明 NXL-01 包含 108 个氨基酸残基。通过 DNASTar 6.0 分析表明 NXL-01 分子量为 11.765 kD,等电点为 4.42,带电荷总氨基酸为 29.63%,极性氨基酸占 25.00%,疏水氨基酸占 37.96%,酸性氨基酸和碱性氨基酸分别占 17.59% 和 10.19%。在 Hypothetical protein NXL-01 中含量丰富的氨基酸(频率)分别为 Ala(13.89%)、Leu(11.11%)、Glu(10.19%)、Arg(9.26%)、Asp(7.41%)、Ser(7.41%)、Val(7.41%)。

应用 DNAMAN 软件将发菜 NXL-01 基因核苷酸序列和氨基酸序列与 GenBank 中收录的相关序列进行 BLAST 比较,发现发菜 NXL-01 基因具有较高保守性,与点形念珠藻(*N. punctiforme* PCC 73102)假定的保守蛋白基因核苷酸相似性达 93%,氨基酸相似性达 92%;与泡沫节球藻(*Nodularia*

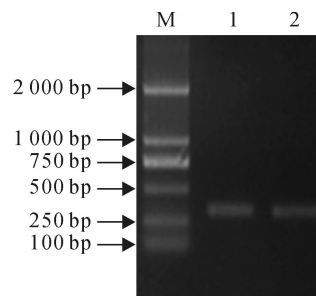


图 1 NXL-01 基因 PCR 扩增结果

1,2. NXL-01 基因;M. Marker

Fig. 1 PCR amplification of NXL-01 gene

1,2. NXL-01 gene;M. Marker

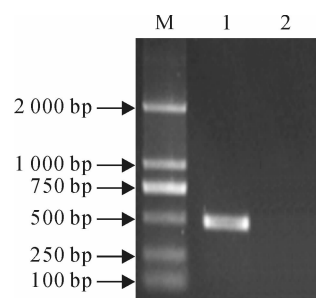


图 2 NXL-01 基因重组质粒阳性转化子

(DH5a/NXL-01)的 PCR 检测

M. Marker;1. NXL-01 基因阳性转化子

(DH5a/NXL-01);2. 阴性对照

Fig. 2 PCR identification of positive transformant(DH5a/NXL-01)

M. Marker;1. NXL-01 gene positive transformant

(DH5a/NXL-01);2. Negative control

*spumigena* CCY 9414)假定保守蛋白基因核苷酸相似性达 81.7%,氨基酸相似性为 81.5%;与多变鱼腥藻(*Ananaena variabilis* ATCC 29413)基因核苷酸相似性为 78.3%,氨基酸相似性为 80.6%;与念珠藻(*Nostoc* sp. PCC 7120)基因核苷酸相似性为 77.4%,氨基酸相似性达 79.6%。而与颤藻(*Oscillatoria* sp. PCC 6506)基因核苷酸序列和氨基酸相似性最低,分别为 59.3%和 62.0%(图 4)。

2.3 发菜 NXL-01 的疏水性、跨膜区、磷酸化位点分析及二级结构预测

对发菜 NXL-01 氨基酸序列疏水性分析表明,在第 101 位的 Glu 亲水性最强,第 12 位的 Gly 疏水性最强。从整体来看,亲水性氨基酸主要分布在肽链的中部,且多于疏水性氨基酸。整个多肽链表现为亲水性,表明 NXL-01 是亲水性蛋白。

利用丹麦科技大学(DTU)的 CBS 服务器上的 TMHMM Server v. 2.0 程序进行蛋白序列跨膜区分析。结果表明,NXL-01 为膜外蛋白。

利用 NetPhos 2.0 Server 程序对蛋白序列中的 Ser、Thr 和 Tys 3 种氨基酸残基可成为磷酸化位点作出预测。结果表明,发菜 NXL-01 有 5 个 Ser 磷酸化位点,分别位于第 68、71、76、77、107 位。有 1 个 Thr 磷酸化位点,位于 106 位。

运用 DNAMAN 软件、PBILLYON-GERLAND 信息库、SWISS MODEL 网站和 DNASStar 软件对 NXL-01 二级结构进行预测分析表明,4 种方法预测的二级结构中,虽然不同结构的氨基酸数目和百分比有一定差异,但这主要是由于方法和原理不同所导致的。综合分析认为,发菜 NXL-01 二级结构主要是由  $\alpha$  螺旋和随机卷曲构成(表 1)。

2.4 NXL-01 在 *E. coli* 中的表达

以质粒 pMD<sub>18</sub>-T-NXL-01 为模板,PCR 扩增 NXL-01 基因。将 PCR 扩增产物回收纯化,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切后,与同样经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的质粒 pET28a(+)相连接,获得 NXL-01 基因表达载体 pET28a-NXL-01。将重组质粒 pET28a-NXL-01 转化到大肠杆菌培养,通过卡纳青霉素抗性挑选阳性克隆,提取质粒进行 PCR 和双酶切验证。pET28a-NXL-01 经双酶切后,在 380 bp 处出现 1 条特异条带,与预期片段大小一致(图 5)。测序结果表明插入的 DNA 片段就是 NXL-01 基因。

将 pET28a-NXL-01 阳性质粒转化到 BL21 感受态细胞中,并以 IPTG 诱导 NXL-01 蛋白表达,12.5% SDS-PAGE 电泳,结果表明有大量外源蛋白表达(图6),参照蛋白分子量标准,外源蛋白分子量

```
1 ATGAGTAACCCACTTGTACAAGCCTTTTCGTAGGCAGAGCAGTAGCTGAAGTAGTTAATGAGCGTTTAGAGGTCGCCTTGACCGATGCT
1 M S N P L V Q A F F V G R A V A E V V N E R L E V A L T D A
91 TTGAGCGATCTGGGCAAATTTGATGCAGAAGCTAGAGAGCAGTTCGCCAGTTTACAGACGAAGTTCTAGAGCGGGCAAAATCGGGCAGCA
31 L S D L G K F D A E A R E Q L R Q F T D E V L E R A N R A A
181 GAAGCTGCTAATGGTGGCCAAAGTACCAAGTACTGGACAAGGCAGTTCTGATTTCAGGTGACTTGCAAGCAGATATTGATGAATTACGA
61 E A A N G G Q S T T S T G Q G S S D S G L Q A D I D E L R D
271 GCAGAAATGCCCCTGTTACGAACAGAATTGAACATTATCGCAGAACTTCTGTATAA
91 A E I A L L R T E L Q H Y R R T S V *
```

图 3 发菜 NXL-01 的核苷酸序列(上行)及推导氨基酸序列(下行)  
Fig. 3 The nucleotide sequence(upper lines) and deduced amino acid sequence (lower lines) of NXL-01 of *N. flagelliforme*

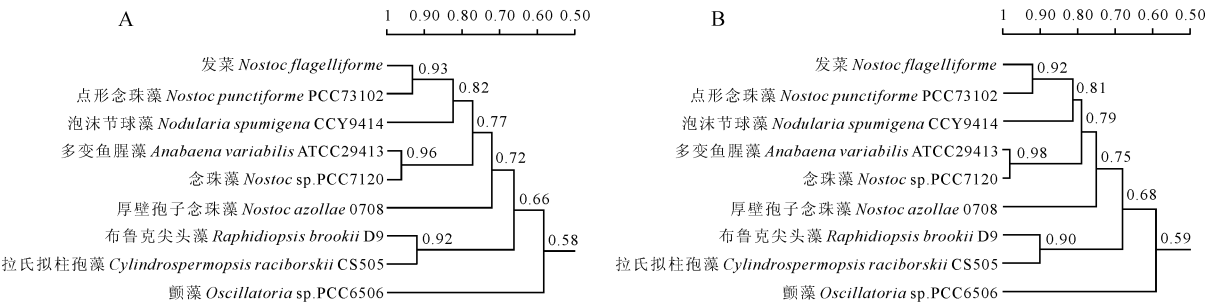


图 4 NXL-01 核苷酸序列(A)和氨基酸序列(B)系统进化树  
标尺及数值代表物种之间的序列相似度  
Fig. 4 Phylogenetic tree of nucleotide sequences(A) and amino acid sequences(B) of NXL-01  
Scale and numerical value indicate sequence similarity between different species

表 1 发菜 NXL-01 二级结构预测

Table 1 The secondary structure prediction of NXL-01 from *N. flagelliforme*

分析方法 Method	α 螺旋 α helix	β 折叠 β strands	转角 Turn	随机卷曲 Random coil
DNAMAN	76 * (70.37%) **	3(2.78%)	0	29(26.86%)
PBILLYON-GERLAND Hopfield(HNN)	79(73.15%)	0	0	29(26.85%)
SWISS MODEL	84(77.78%)	2(1.85%)	0	22(20.37%)
DNAStar(Garnier-Robson)	81(75.00%)	1(0.93%)	13(12.04%)	13(12.04%)

注：\* . 氨基酸数目；\* \* . 占全部氨基酸的百分比。  
Note: \* . Amount of amino acid; \* \* . Amino acid in total percentage.

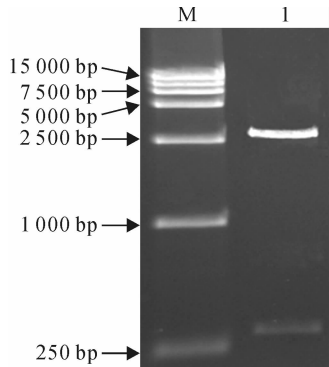


图 5 重组表达载体 pET28a-NXL-01 酶切分析  
Fig. 5 Restriction analysis of recombinant plasmid pET28a-NXL-01  
M. Marker; 1. pET28a-NXL-01

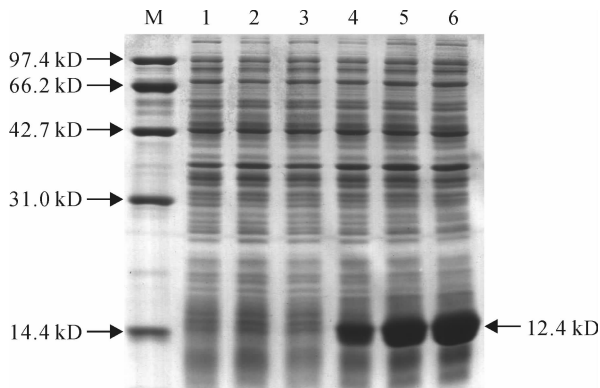


图 6 NXL-01 蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

M. 蛋白分子量标准; 1. 未诱导的空质粒; 2. IPTG 诱导的空质粒; 3. 未诱导的阳性质粒; 4~6. IPTG 诱导 1、3、5 h 阳性质粒  
Fig. 6 SDS-PAGE image of NXL-01 expressed in *E. coli*  
M. Marker; 1. IPTG uninduced negative transformant; 2. IPTG induced negative transformant; 3. IPTG uninduced positive transformant with pET28a-NXL-01; 4-6. IPTG induced positive transformant with pET28a-NXL-01 after 1, 3, 5 h, respectively  
约为 12.4 kD, 与预测的 NXL-01 分子量相同。经凝胶扫描测定, IPTG 诱导 5 h 后外源蛋白约占细菌蛋白总量的 68.7%。

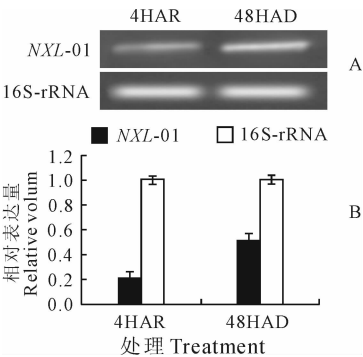


图 7 干旱胁迫条件下发菜 NXL-01 的表达谱(A)及表达量差异(B)

Fig. 7 RT-PCR(A) and relative expression(B) of NXL-01 under the condition of 48 hours after dehydration(48HAD) and 4 hours after rehydration (4HAR) in *N. flagelliforme*

2.5 发菜干旱胁迫条件下 NXL-01 基因表达特征

提取不同干旱条件下发菜总 RNA, 并进行定量。取等量总 RNA 进行反转录, 并取等量反转录产物进行 RT-PCR 扩增, 最后取等量 PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳分析。结果(图 7)表明, 在干旱胁迫条件下表达量明显高于充分吸水时的表达量 ( $P < 0.05$ ), 这与 NXL-01 在干旱胁迫下的表达趋势基本一致。

3 讨论

对某一新蛋白进行生物信息学分析是研究蛋白质最基本和最常用的方法, 多数情况下可以发现该蛋白的同源性或其拥有的家族成员, 并且可以通过已知功能的其它成员对所关注蛋白功能、进化速度等做出合理推断<sup>[9-10]</sup>。本研究根据干旱胁迫条件下差异表达的 NXL-01 氨基酸序列设计简并引物, 成功克隆发菜中 NXL-01 基因。同源性比较发现发菜 NXL-01 基因具有较高保守性, 与点形念珠藻 (*N. punctiforme* PCC 73102) 假定的保守蛋白基因核苷酸相似性达 93.3%, 氨基酸相似性达 91.7%。生物信息学分析表明 NXL-01 是一种亲水性膜外蛋

白,其 Ser 有 5 个磷酸化位点,Thr 有 1 个磷酸化位点。二级结构预测表明发菜 NXL-01 主要由  $\alpha$  螺旋和随机卷曲构成。这为进一步研究发菜 NXL-01 结构及其在发菜干旱防御和胁迫应答以及提高发菜抗旱机制等方面奠定了基础。此外,本研究构建了发菜 NXL-01 高效表达载体,5 h 的表达量占可溶性蛋白 65 % 以上,且以可溶性蛋白的形式存在,为今后利用工程菌大量生产 NXL-01 提供了试验依据。

蛋白质(酶)是基因表达的产物,蛋白质生物学功能的发挥是多个因素综合作用的结果。发菜 NXL-01 的表达与其生长发育和所处的环境密切相关。发菜生长于极端干旱的环境中,其风干含水量

在 7.3% ~ 11.2% 之间,饱和含水量在 616% ~ 1 258.4% 之间,相对含水量极低,只有 1% 左右,与其他旱生植物相比,对极端干旱环境具有更强的适应能力<sup>[11]</sup>。此外,发菜在干旱胁迫条件下,新陈代谢减弱,光合活性降低,固氮能力下降,而恢复吸水时,光合活性和固氮能力升高<sup>[12-14]</sup>。本研究表明,NXL-01 mRNA 在干旱胁迫条件下表达量逐渐增加,与 NXL-01 的 2-DE 的结果一致<sup>[6]</sup>,这一结果暗示 NXL-01 在发菜耐旱作用中可能发挥了重要作用。然而,发菜在其生长发育和耐旱过程中,NXL-01 究竟是单独起到抗逆作用还是与其他因素相互影响共同抵御干旱环境的,仍需要深入研究。

## 参考文献:

- [1] REYAZUL R M, MAINASSARA Z A, NESE S, RICHARD T, *et al.* Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125: 625—645.
- [2] COMINELLI E, CONTI L, TONELLI C, *et al.* Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance[J]. *New Biotechnology*, 2013, 30(4): 355—361.
- [3] ASHRAF M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28: 169—183.
- [4] WANG SH CH(王树昌). Progress in the study on plant drought tolerance mechanism[J]. *Journal of Tropical Organisms* (热带生物学报), 2010, 1(4): 376—379 (in Chinese).
- [5] LIANG W Y(梁文裕), JIAO G F(焦广飞), YOU X R(游向荣), *et al.* Differential expression and gene cloning of Mn-CAT from *Nostoc flagelliforme* under dry and wet conditions[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, 31(2): 248—254 (in Chinese).
- [6] LIANG W Y, ZHOU Y W, WANG L X, *et al.* Ultrastructural, physiological and proteomic analysis of *Nostoc flagelliforme* in response to dehydration and rehydration[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 5 604—5 627.
- [7] CAMERON R E. Species of *Nostoc vaucher* occurring in the sonoran desert in arizona[J]. *Transactions of the American Microscopical Society*, 1962, 81: 379—384.
- [8] QIAN K X(钱凯先), ZHU H R(朱浩然), CHEN SH G(陈树谷). The ecological conditions for *Nostoc flagelliforme* and their analysis[J]. *Acta Phytoecologica et Geobotanica Sinica* (植物生态学与地植物学报), 1989, 13(2): 97—105 (in Chinese).
- [9] WANG X H(王旭辉), QIAO K(乔 坤), WANG ZH J(汪振娟), *et al.* Cloning and expression analysis of Cyclophilins A(CyPA) gene from *Chlorella*[J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), 2014, 34(2): 245—251 (in Chinese).
- [10] PEHRSON J R, FUJI R N. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(12): 2 837—2 842.
- [11] TANG J N(唐进年), ZHAO M(赵 明), ZHANG D M(张吨明), *et al.* Water physiological characteristics of *Nostoc flagelliforme*[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2005, 25(2): 236—243 (in Chinese).
- [12] ZHAO X M, BI Y H, CHEN L, *et al.* Responses of photosynthetic activity in the drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme* to rehydration at different temperature[J]. *Journal of Arid Environment*, 2008, 72: 370—377.
- [13] BI Y H(毕永红), HU ZH Y(胡征宇). Effect of water on physiological activity of *Nostoc flagelliforme*[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), 2003, 21(6): 503—507 (in Chinese).
- [14] WEI L Z, MA L M, WANG Q X, *et al.* Effect of cell amount on photosynthetic yield in the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* and involvement of NADPH dehydrogenase-mediated cyclic electron transport[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21: 179—184.

(编辑:宋亚珍)