

棉花 *GhVHA-A* 基因的原核表达及其重组大肠杆菌的抗逆性分析

刘娜, 倪志勇, 芮存, 李娟, 陈全家, 曲延英*

(新疆农业大学 农学院, 农业生物技术重点实验室, 乌鲁木齐 830052)

摘要:为进一步验证棉花 *GhVHA-A* 基因的功能, 该研究将棉花 *GhVHA-A* 基因构建到原核表达载体 pET28a 上, 利用 IPTG 诱导其在大肠杆菌 BL21(DE3) 中高效表达, 同时对重组大肠杆菌 BL21(pET28a-*GhVHA-A*) 进行抗逆性分析。结果表明: (1) 半定量 RT-PCR 分析发现, 棉花幼苗液泡膜 H^+ -ATPase 基因 (*GhVHA-A*) 表达水平受脱水和高盐胁迫诱导。 (2) 将 1 872 bp 长的编码区序列连接至原核表达载体 pET28a 上, 成功构建了原核表达载体 pET28a-*GhVHA-A*; SDS-PAGE 电泳检测结果表明, 在 70 kD 左右处有 1 条特异表达的蛋白质条带, 与预期的目的产物大小一致。 (3) 重组菌 BL21(pET28a-*GhVHA-A*) 的抗逆性分析发现, 重组菌对 PEG6000 (20%) 和 NaCl (0.5 mol/L) 的抗性明显高于对照菌株 BL21(pET28a), 表明 *GhVHA-A* 基因在大肠杆菌中表达后能够增强菌株的抗性。本研究结果为 *GhVHA-A* 基因在植物抗逆基因工程中的应用提供了理论依据。

关键词: 棉花; *GhVHA-A* 基因; 原核表达; 抗性分析; 非生物胁迫;

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Prokaryotic Expression and Stress Tolerance of *E. coli* Expressing *GhVHA-A* Gene from Cotton

LIU Na, NI Zhiyong, RUI Cun, LI Juan, CHEN Quanjia, QU Yanying*

(College of Agronomy, Key Laboratory of Agricultural Biological Technology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: In order to further verify the function of cotton *GhVHA-A* gene, we constructed the *GhVHA-A* gene into the prokaryotic expression vector pET28a and induced by IPTG in *E. coli* BL21 (DE3) for resistance analysis. The results indicated that: (1) semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the expression level of *GhVHA-A* gene in cotton seedlings was induced by dehydration and salt stress. (2) A 1 872 bp coding region was ligated into the prokaryotic expression vector pET28a. The prokaryotic expression vector pET28a-*GhVHA-A* was successfully constructed. The SDS-PAGE electrophoresis results show that there was a specific protein band at about 70 kD, which was identical with the expected molecular weight of the recombinant protein. (3) The resistance of recombinant bacterium BL21 (pET28a-*GhVHA-A*) to PEG6000 (20%) and NaCl (0.5 mol/L) was significantly higher than that of the control strain BL21 (pET28a), and indicating that the expression of *GhVHA-A* gene in *E. coli* can enhance the resistance of the strain. The results provided a theoretical basis for the application of *GhVHA-A* gene in plant stress-re-

收稿日期: 2017-09-11; 修改稿收到日期: 2017-11-20

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2017ZX08005-004); 自治区青年科技创新人才培养工程优秀青年科技人才培养项目 (qn2015yx015)

作者简介: 刘娜 (1990—), 女, 博士, 主要从事棉花分子育种研究。E-mail: 416549170@qq.com

* 通信作者: 曲延英, 博士, 教授, 主要从事棉花分子育种研究。E-mail: xjyyq5322@126.com

sistant genetic engineering.

Key words: cotton; *GhVHA-A* gene; prokaryotic expression; stress resistance; abiotic stress

由于植物固着生活的特性决定了其在整个生长发育过程中不可避免地会同时或相继遭受到各种各样生物或非生物的逆境胁迫^[1-2]。干旱、高盐以及低温等极端条件又称为水分胁迫或渗透胁迫,是植物生长过程中所面临的主要的非生物逆境胁迫因子,严重制约着植物生长。在农业生产中,这些逆境因子会降低作物的产量,影响农产品的品质,造成巨大的经济损失^[3]。棉花是中国乃至全世界最重要的经济作物之一,棉花生产对中国农业乃至国民经济的发展皆有重要影响。干旱、高盐等问题严重制约着棉花的进一步发展,是影响棉花的产量和质量的主要制约因素之一。因此,借助分子生物学和基因工程技术对棉花抗逆机理进行深入研究,进一步发掘和克隆对棉花抗旱有紧密关系的相关基因,对于抗逆棉花新品种的培育具有重大意义。

质子泵是能够推动质子跨膜运动的一种能量系统,广泛存在于生物细胞中^[4]。在膜质子泵 *AT-Pase* 家族中植物液泡膜上的 H^{+} -*ATPase* 是当前研究十分活跃的一个分支,由于它的结构复杂,功能多样以及在生命活动中的功能和可应用性,引起了人们的广泛关注^[5]。目前研究表明,植物液泡膜 H^{+} -*ATPase* 对植物细胞内离子平衡过程中起到关键的调节作用,其主要作用是酸化液泡,利用水解 ATP,为离子和代谢物的运输提供能量^[6]。除此之外液泡膜 H^{+} -*ATPase* 还能够通过控制液泡细胞的膨压达到维持细胞体积的目的;积累液泡中的离子和代谢产物,将有毒的次级代谢产物区隔来保护细胞^[7]。同时液泡膜 H^{+} -*ATPase* 作为非常重要的持家酶,在生物体内的信号转导中也发挥着至关重要的作用。虽然液泡膜 H^{+} -*ATPase* 在影响植物生长与发育以及植物对盐碱、干旱、低温等非生物胁迫的响应中起到极为重要的作用,但是对于它是如何响应各种逆境信号,以及它对植物生长发育调节上的诸多环节仍不清楚,需要进一步深入开展对液泡膜 H^{+} -*ATPase* 功能的研究,同时更加全面地了解植物抗逆反应的生理生化机制,为开发新的棉花抗逆品种提供理论依据。

本研究前期以棉花品种‘KK1543’为材料,通过 RT-PCR 方法获得了 1 个棉花液泡膜 H^{+} -*AT-Pase* A 亚基基因,命名为 *GhVHA-A*^[8]。为了进一步验证该基因的功能,本研究在此基础上将棉花

GhVHA-A 基因构建到原核表达载体 pET28a 上,利用 IPTG 诱导其在大肠杆菌 BL21(DE3)中高效表达,同时对重组大肠杆菌 BL21 (pET28a-*GhVHA-A*)进行了抗逆性分析,来探讨其在逆境胁迫下可能发挥的作用,以期为该基因在棉花抗逆育种中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

本试验所用棉花材料为‘KK1543’,由新疆农业大学农学院作物遗传育种实验室提供。选用饱满且胚完整的棉花种子种入发芽盒中,待子叶完全展开,挑选生长一致的植株移入装有 1/2 Hoagland 营养液的塑料盆。水培试验在光照培养室进行(光/暗周期为 12 h/12 h,昼夜温度为 26~28 ℃/20~22 ℃),每 2~3 d 按时更换营养液保证幼苗健康生长。待棉花幼苗长至两叶一心时,选取生长状况良好的幼苗进行不同的胁迫处理。

材料采用干旱(15% PEG6000)和高盐(250 mmol/L NaCl)胁迫处理。每个处理分别设置对照(正常浇水)和处理组,分别处理 2、4、6、12 和 24 h 后,取叶片立即用液氮速冻,于-80 ℃下贮藏,每处理重复 3 次。

原核表达载体 pET28a 及其大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)均由本研究室保存,棉花 *GhVHA-A* 基因由本研究室克隆保存。

1.2 实验方法

1.2.1 半定量 RT-PCR 分析 根据植物总 RNA 提取试剂盒(天根公司)的方法进行总 RNA 提取。按照 Thermo 反转录试剂盒(上海赛默飞公司)说明书操作步骤,获得棉花叶片总 RNA 为模板,合成 cDNA 第一条链。以合成的 cDNA 为模板,用 *Taq* 聚合酶(北京全式金公司)进行 28 次循环扩增。半定量引物为 *GhVHA-A*-qF (5′-CAAGTCGCCAT-GAATCCG-3′)和 *GhVHA-A*-qR (5′-CAAGTCGC-CATGAATCCG-3′);内标基因为 *GhUBQ7*,引物为 *GhUBQ7-F* (5′-GACCTACACCAAGCCCAAGAAG-3′)和 *GhUBQ7-R* (5′-TGAGCCCACACTTACCA-CAATAGT-3′)。

1.2.2 *GhVHA-A* 基因原核表达载体的构建 根据原核表达载体 pET28a 的多克隆位点,设计带有

酶切位点引物 VHA-28-F(5'-TTAGGATCCATGCCG-GCAGTTTACGGATCCAGATT-3')和 VHA-28-R(5'-TAAGTCGACCCTAGTTTCATCCTCCAATGCACG-3'),并以 pMD19-T-*GhVHA-A* 质粒为模板,按上述体系和程序进行 PCR 扩增,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。利用 *Sal* I 和 *Bam* H I(上海赛默飞试剂公司)双酶切 PCR 纯化产物与空质粒 pET28a,酶切产物纯化后,用 T₄ DNA 连接酶 22 ℃定向连接 20 min,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,通过菌液 PCR 初步筛选阳性重组子,阳性克隆送上海美季测序公司测序。

1.2.3 *GhVHA-A* 基因的原核表达 使用热激法将重组质粒 pET28a-*GhVHA-A* 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞(北京全式金),涂布于含有硫酸卡那霉素(50 mg/L)的 LB 固体培养基上,37 ℃过夜培养后挑取单菌落,经含有硫酸卡那霉素的液体培养基震荡培养 12 h 后,通过菌液 PCR 筛选阳性克隆。

将重组菌株接种于 2 mL 含 50 mg/L 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 过夜培养。然后按 1:50 比例转接到 10 mL 新鲜 LB 液体培养基中(含 50 mg/L 硫酸卡那霉素),225 r/min 培养 3 h($OD_{600} \approx 0.6$),加入 IPTG 至终质量浓度分别为 0、0.2、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L,37 ℃诱导 4 h 后收集菌液。以 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的 pET28a 空载体作为对照。8 000 r/min 离心 10 min,弃上清,菌体样品加入 30 μ L 2 \times 上样缓冲液和 50 μ L ddH₂O,混匀,在 100 ℃的沸水中煮沸 10 min,冰上冷却后,取 10 μ L 进行 SDS-PAGE(5%浓缩胶,12%分离胶)电泳检测。电泳后经考马斯亮蓝染色、拍照,分析蛋白表达结果,确定最适 IPTG 诱导浓度。

按上述方法,以终质量浓度为 1 mmol/L IPTG 进行重组菌株表达蛋白的诱导表达,以相同条件的 pET28a 转化菌为对照。37 ℃培养 0、2、4 和 6 h 后分别收集菌液,进行 SDS-PAGE(5%浓缩胶,12%分离胶)电泳检测,分析确定蛋白表达最适培养时间。

1.2.4 重组大肠杆菌 BL21(pET28a-*GhVHA-A*) 的抗逆性分析 (1)定性分析。大肠杆菌培养和 IPTG 诱导条件如前所述。分别将含有 pET28a-*GhVHA-A* 载体和空载体 pET28a 的大肠杆菌进行液体培养,当 IPTG 诱导的大肠杆菌菌液 OD_{600} 为 1.0 左右时,用含有 50 mg/L 硫酸卡那霉素和 0.5 mmol/L

IPTG 的 LB 液体培养基将菌液稀释 10、100 和 1 000 倍,取原菌液以及稀释后的菌液进行胁迫处理。胁迫试验中,固体培养基中添加质量浓度为 0.5 mmol/L IPTG,以及 0.5 mol/L NaCl 和 20% PEG6000 作为胁迫处理,同时以只添加 0.5 mmol/L IPTG 的平板培养基为非胁迫对照,将 1 μ L 菌液滴加到上述平板培养基,37 ℃培养 2 d 后观察对照和处理的大肠杆菌生长存活情况。

(2)定量分析。大肠杆菌培养、IPTG 诱导及胁迫处理条件与定性分析相同。用含有 50 mg/L 硫酸卡那霉素和 0.5 mmol/L IPTG 的 LB 液体培养基连续稀释 BL21/pET28a 和 BL21/pET28a-*GhVHA-A* 菌液,并取 50 μ L 均匀涂布于含 50 mg/L 硫酸卡那霉素和 0.5 mmol/L IPTG 的非胁迫和胁迫处理的 LB 固体平板上,在 37 ℃孵育平板 2 d 后,记录每个平板上的菌落数,按如下公式分析菌落形成率。

菌落形成率(%) = 胁迫处理平板上菌落数/非胁迫处理平板上菌落数 $\times 100$

(3)重组大肠杆菌 BL21(pET28a-*GhVHA-A*) 的抗逆性实验。分别取经 IPTG 诱导后的重组菌和非重组菌液 1 mL,按 1:100 比例稀释,加入到终质量浓度为 0.5 mol/L NaCl 和 20% PEG6000 的 LB 液体培养基中,37 ℃、220 r/min 继续振荡培养,每隔 30 min 测定 OD_{600} 值,绘制生长曲线,每个处理 3 个重复,无胁迫处理的菌液作为对照。根据 OD_{600} 测定结果分析抗逆性。

2 结果与分析

2.1 *GhVHA-A* 在逆境胁迫下的表达特性

利用半定量 RT-PCR,以组成型表达的 *GhUBQ7* 基因为内参基因,对 *GhVHA-A* 基因在 15% PEG6000(图 1,A)和 250 mmol/L NaCl(图 1,B)处理条件下的表达水平进行了检测。结果显示,在上述逆境胁迫处理过程中,*GhVHA-A* 基因表达水平有明显的变化,在 15% PEG6000 处理下,*GhVHA-A* 转录本在 2 h 之内迅速积累,达到最大表达量,随后降低;在 250 mmol/L NaCl 胁迫下,*GhVHA-A* 的表达逐渐增加,在处理 12 h 时达到最大值。

2.2 *GhVHA-A* 基因原核表达载体的构建与表达分析

对重组质粒 pET28a-*GhVHA-A* 进行菌液 PCR 检测,电泳结果(图 2)显示,在 2 000 bp 左右有 1 条

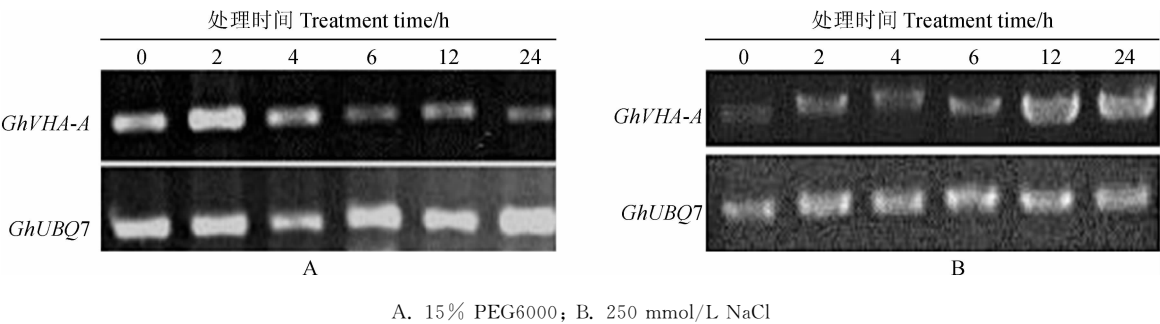


图 1 非生物胁迫下 *GhVHA-A* 基因的半定量 RT-PCR 表达分析

Fig. 1 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *GhVHA-A* expression under abiotic stress

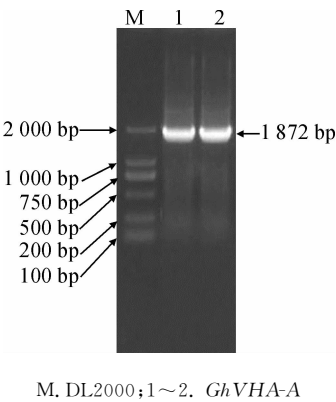
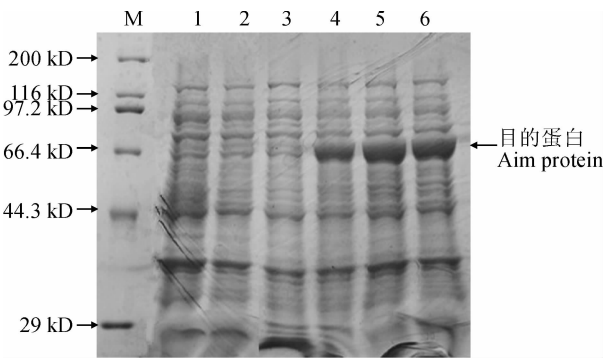


图 2 pET28a-*GhVHA-A* 菌液 PCR

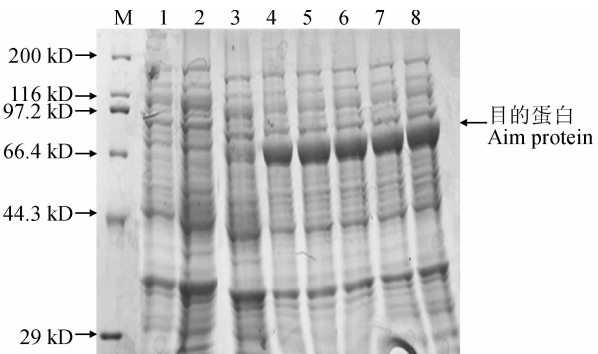
Fig. 2 pET28a-*GhVHA-A* vector bacterial liquid PCR



M. 蛋白质标准分子量;1. 未诱导 pET28a;2. pET28a 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h;3. 未诱导 pET28a-*GhVHA-A*;4~6. pET28a-*GhVHA-A* 经 0.5 mmol/L IPTG 分别诱导 2、4 和 6 h

图 3 IPTG 诱导时间对 *GhVHA-A* 蛋白表达的影响
M. Protein marker; 1. pET28a without IPTG induction; 2. pET28a induced by 0.5 mmol/L IPTG for 4 h; 3. pET28a-*GhVHA-A* without IPTG induction; 4~6. pET28a-*GhVHA-A* induced by 0.5 mmol/L IPTG treatment for 2, 4 and 6 h, respectively

Fig. 3 Effect of induction time with IPTG on expression of *GhVHA-A* protein
预期目的条带,同时,该重组载体插入 DNA 片段的测序结果与棉花 *GhVHA-A* 基因序列完全相同,表明棉花 *GhVHA-A* 基因的原核表达载体构建成功。
pET28a-*GhVHA-A* 转化感受态细胞 BL21



M. 蛋白质标准分子量;1. 未诱导 pET-28a;2. pET28a 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h; 3. 未诱导 pET28a-*GhVHA-A*; 4~8. pET28a-*GhVHA-A* 经 IPTG 诱导 4 h,IPTG 诱导终浓度分别为 0.2、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L

图 4 IPTG 终浓度对 *GhVHA-A* 蛋白表达的影响
M. Protein marker; 1. pET28a without IPTG induction; 2. pET28a induced by 0.5 mmol/L IPTG for 4 h; 3. pET28a-*GhVHA-A* without IPTG induction; 4~8. pET28a-*GhVHA-A* induced by 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mmol/L IPTG for 4 h, respectively
Fig. 4 Effect of final concentration of IPTG on expression of *GhVHA-A* protein

(DE3)后,在 37 ℃下,用 IPTG(0.5 mmol/L)诱导 *GhVHA-A* 编码蛋白 0、2、4 和 6 h,SDS-PAGE 结果如图 3 所示。结果显示,处理 2、4 和 6 h 均能诱导出融合蛋白,且表达得到的目的蛋白与预测 *GhVHA-A* 蛋白分子量相一致。其中诱导时间为 4 h 时重组蛋白表达量就达到最大值。经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的 pET28a 空载体则没有重组蛋白的表达(图 3)。

在终质量浓度为 0.2、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L IPTG 与不加 IPTG 的条件下,37 ℃分别对含重组质粒 pET28a-*GhVHA-A* 的大肠杆菌进行 4 h 诱导表达,对 pET28a 空载体在 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h,其表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测结果(图 4)显示,在 5 个不同质量浓度的 IPTG 诱导下,均能诱导出目的蛋白,且所表达蛋白

大小与预期蛋白分子量相一致,而 pET28a 空载体则没有融合蛋白表达,表明 0.2 mmol/L IPTG 诱导获得最佳的蛋白诱导效果。

2.3 重组大肠杆菌 BL21 (pET28a-*GhVHA-A*) 的抗逆性分析

为检测不同逆境胁迫条件下过表达 *GhVHA-A* 对重组大肠杆菌的作用,将 BL21/pET28a 和 BL21/*GhVHA-A* 菌体分别滴加到含 0.5 mol/L NaCl 和 20% PEG6000 的 LB 固体培养基上,观察菌落的形成情况(图 5,A)。结果显示,在无添加胁迫因子的 LB 固体培养基中,BL21/*GhVHA-A* 和对照 BL21/pET28a 之间在克隆形成数方面没有明显的差别;当 LB 培养基上添加了 0.5 mol/L NaCl 后,重组菌的数量明显高于对照 BL21/pET28a,这一结果表明过表达 *GhVHA-A* 能显著增强大肠杆菌对盐的耐受性。同样在 PEG6000 胁迫下,经胁迫处理后 BL21/pET28a 菌落数量明显低于重组菌

BL21/*GhVHA-A* 的。该结果表明,过表达 *GhVHA-A* 能显著增强大肠杆菌对干旱胁迫的抗性。

对菌落形成率测定结果(图 5,B)显示,稀释 10 倍的菌液在 0.5mol/L NaCl 高盐胁迫和 20% PEG6000 干旱胁迫下,重组菌 BL21/*GhVHA-A* 的菌落形成率分别为 39.4%和 43.8%,而对照的菌落形成率仅为 17.4%和 13.6%;胁迫条件下,重组菌的菌落形成率是对照的 2~3 倍,表明过表达 *GhVHA-A* 显著提高宿主菌对盐和干旱的抗性,与菌落定性分析结果一致。

对经 IPTG 诱导 4 h 后的重组菌 BL21/pET28a-*GhVHA-A* 和对照菌 BL21/pET28a 在 NaCl(0.5 mol/L)和 PEG6000 (20%)处理下菌株的生长情况进行了分析,以无胁迫处理的重组和对照菌液作为对照。结果表明,在正常培养基中,对照菌和重组菌的生长状况基本一致,2 个菌株的生长均呈典型的“S”曲线,并很快进入对数生长期,这一现象说明 *GhVHA-A*

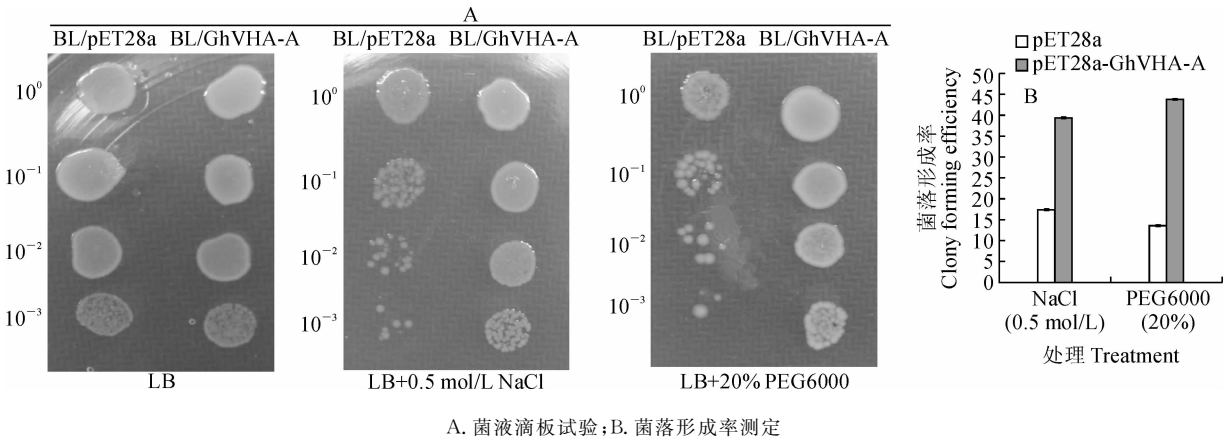


图 5 *GhVHA-A* 蛋白过表达对大肠杆菌在逆境胁迫下的保护效果

A. Spotting assays; B. Colony forming efficiency assays
Fig. 5 Effects of *GhVHA-A* over-expression on protection of *E. coli* against injury under abiotic stress

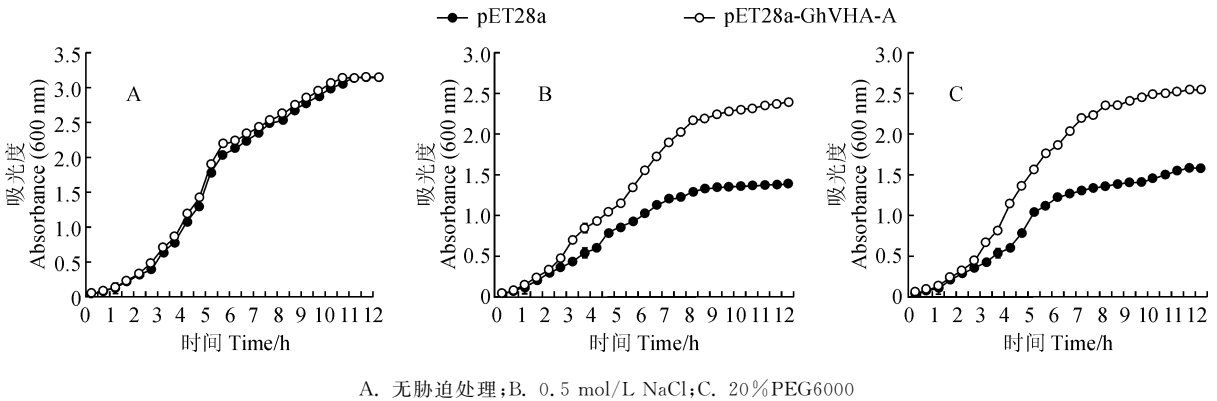


图 6 重组大肠杆菌和对照菌株在不同胁迫处理下的 OD₆₀₀ 测定结果

A. Control; B. 0.5 mol/L NaCl stress; C. 20% PEG6000
Fig. 6 Detection of OD₆₀₀ value of recombinant strain and control strain in different stresses

基因表达几乎不影响大肠杆菌 BL21(DE3)的正常生长(图 6,A)。将重组菌 BL21/pET28a-*GhVHA-A* 和对照菌 BL21/pET28a 转接到含 NaCl (0.5 mol/L) 和 PEG6000 (20%)培养基时, OD_{600} 值测定结果表明(图 6,B,C),在胁迫处理下,随着时间的延长,重组菌 BL21/pET28a-*GhVHA-A* 均有不同程度的持续生长, OD_{600} 值呈上升趋势,静止生长期最大的 OD_{600} 值接近 2.5,而对照菌 BL21/pET28 生长较为缓慢,在静止生长期最大的 OD_{600} 值仅接近 1.5。从以上结果可以看出,重组菌对盐和干旱的抗性明显高于对照菌,即 *GhVHA-A* 基因的表达提高了重组菌的抗逆性。

3 讨论

液泡膜 H^{+} -ATPase 在维持细胞质的 pH、 Ca^{2+} 浓度、水势平衡等方面发挥重要功能,在维持代谢物稳态以及逆境适应方面都处于中心地位^[9-10],同时它还受到干旱、高盐、低温及脱落酸信号的调节。夏朝晖等^[11]证明专性 CAM 植物燕子掌离体叶片的干旱胁迫处理 48 h 后、失水 12.4%,可引起燕子掌 V 型 H^{+} -ATP 酶的活性上升。李艳艳等^[12]证明 NaCl 胁迫下盐地碱蓬液泡膜 H^{+} -ATPase 活性及其 H、c 亚基在转录水平上协同上调,为 Na^{+} 区隔化到液泡中提供了质子驱动力。本研究中棉花液泡膜 H^{+} -ATPase 基因 *GhVHA-A* 在干旱和高盐处理下表达都有上调,由此推测 *GhVHA-A* 的表达和积累与棉花抗逆性密切相关。

大肠杆菌表达系统具有遗传背景和生化特性非常清楚、操作简便、成本低、周期短、表达蛋白可大量生产,且易于纯化等优点^[13]。近几年,科学家们提出功能筛选法分离植物抗逆相关基因,即利用单细胞生物如大肠杆菌等与高等植物在一些抗逆胁迫应答反应上的相似性,以及一些抗逆基因的功能保守性和互补性,使高等植物基因在大肠杆菌异源体系中表达,结合渗透胁迫、高盐等筛选法,从而获得植物抗逆相关基因。目前研究表明,通过在大肠杆菌中的功能筛选已经分离获得了与植物一些逆境胁迫

相关的基因。余玉雯等^[14]利用大肠杆菌表达体系功能筛选法,获得了 11 个大豆耐盐相关克隆。其中将 *GmAIP-2* 与高效表达载体 pET28a 连接后转化大肠杆菌,其转化子在胁迫培养基中生长状况明显好于对照菌。Adriana 等^[15]的研究结果表明植物 LEA 蛋白的表达直接有助于增加细菌宿主细胞的胁迫耐受性。

大肠杆菌表达体系不仅是筛选高等植物抗逆基因的快速的、有效的体系,也是进行抗逆基因功能鉴定和抗逆机制研究的一个良好系统^[13]。Neha 等^[16]研究首次描述了鱼腥藻螯合素合酶(PCS)基因转化大肠杆菌细胞,能够使大肠杆菌细胞在 47℃、6% NaCl(w/v)和碳氟呋喃(0.025 mg/mL)下比对照细胞长得更好。张弢^[17]研究重组大肠杆菌 BL21(pET28a-*BoPGIP1*)对 NaCl(0.4 mol/L)、NaHCO₃(0.2 mol/L)和 PEG6000(20%)的抗性明显高于对照菌株 BL21(pET28a)。本研究将棉花 *GhVHA-A* 基因转化到原核细胞大肠杆菌 BL21(DE3)中,在 IPTG 诱导条件下目的基因得到有效的表达,并且重组菌株较对照菌抗逆性获得了明显提高。这说明过表达 *GhVHA-A* 具有增强大肠杆菌抗旱、耐盐的能力,同时也证明了采用大肠杆菌原核表达系统对抗逆相关蛋白进行筛选和功能验证的可行性。而 *GhVHA-A* 基因同时也受脱水、高盐等非生物胁迫诱导表达,可以推测原核和真核生物在胁迫条件下可能具有相似的保护机制。

总之,本研究前期通过 RT-PCR 方法已成功克隆了棉花 *GhVHA-A* 基因的 ORF 序列,推测完整的开放阅读框编码的蛋白由 623 个氨基酸残基组成,预测的蛋白质理论分子量为 68.41 kD。本研究为进一步了解 *GhVHA-A* 蛋白的功能,利用原核表达系统异源表达 *GhVHA-A* 蛋白到大肠杆菌中,能显著增强宿主菌对模拟干旱和高盐胁迫的耐受性。这一结果为下一步研究 *GhVHA-A* 基因遗传转化提高模式植物烟草的抗胁迫能力提供试验基础,为下一步研究该基因的功能提供了依据。

参考文献:

[1] 简令成,王 红. 逆境植物细胞生物学[M]. 北京:科学出版社, 2009:115-139.
[2] JASPERS P, KANGASJARVI J. Reactive oxygen species in

abiotic stress signaling [J]. *Plant Physiology*, 2010, **138**(4): 405-413.
[3] BOYER J S. Plant productivity and environment [J]. *Science*, 1982, **218**(4 571):443-448.

[4] 王延枝,许献忠. 空泡膜类型的 V-ATPase 的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,1993,**20**(1):19-23.

[5] THIERRY M, ANNICK F, CLAUDINE T. The tonoplast H⁺-ATPase of *Acer psedoplatanus* is a vacuolar-type ATPase that operates with a phosphoenzyme intermediate[J]. *Plant Physiol.*, 1995,**109**(1):285-292.

[6] RATAJAZAK R. Structure function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase [J]. *Biochimicaet Biophysica Acta*, 2000,**1465**(1-2):17-36.

[7] ROYTRAKUL S, VERPOORTE R. Role of vacuolar transporter proteins in plant secondary metabolism: Catharanthus roseus cell culture[J]. *Phytochem Rev.*, 2007,**6**(2):383-396.

[8] 刘 娜,倪志勇,曲延英,等. 棉花液泡膜 H⁺-ATPase A 亚基的克隆及表达载体的构建[J]. 分子植物育种, 2015, **13**(3): 541-546.

LIU N, NI Z Y, QU Y Y, *et al.* Cloning of subunit A of V-H⁺-ATPase in cotton and constructing its plant expression vector[J]. *Mol. Plant Breeding*, 2015, **13**(3):541-546.

[9] NISHI T, FORGAC M. The vacuolar (H⁺)-ATPase-nature's most versatile proton pumps[J]. *Nat. Rev Mol. Cell Biol.*, 2002,**3**(2):94-103.

[10] STROMPEN G, DETTMER J, STIERHOF Y D, *et al.* *Arabidopsis* vacuolar H⁺-ATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis[J]. *Plant J.*, 2005, **41**(1):125-132.

[11] 夏朝晖,李晓薇,余和芬,等. 盐和干旱胁迫对燕子掌(*Crassula agenten* Thunb.)叶片液泡膜 H⁺-ATPase 活性的影响[J]. 植物生理学报, 2000, **26**(5):433-436.

XIA Z H, LI X W, YU H F, *et al.* Effects of salt and drought stress on H⁺-ATPase in the tonoplast of leaf cell of *Crassula agenten* Thunb. [J]. *Plant Physiology Journal*, 2000, **26**(5):433-436.

[12] 李艳艳,李平华,王宝山. 盐胁迫下盐地碱蓬叶片液泡膜 H⁺-ATPase H 亚基的克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2006, **26**(1):63-67.

LI Y Y, LI P H, WANG B S. Cloning and expression of subunit H of V-H⁺-ATPase in vacuole membrane in the leaves of the halophyte *Suaeda salsa* under salt stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, **26**(1):63-67.

[13] GOWRISHANKAR J. Identification of osmoreponsive genes in *Escherichia coli*; evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, **164**(1):434

[14] 余玉雯,孙海丹,麻晓亮,等. 大豆耐盐相关基因的分离及其功能鉴定[J]. 深圳大学学报, 2004, **21**(4):324-330.

YU Y W, SUN H D, MA X L, *et al.* Isolation and characterization of genes related to salt-tolerance in soybean[J]. *Journal of Shenzhen University Science and Engineering*, 2004, **21**(4):324-330.

[15] GARAY A A, COLMENERO F J M, GARCIARRUBIO A, *et al.* High hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit[J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(8):5 668-5 674.

[16] NEHA C, YOGESH M, LAL C R. Cloning expression and analysis of phytochelatin synthase (pcs) gene from *Anabaena* sp. PCC 7120 offering multiple stress tolerance in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, **376**(1):225-230.

[17] 张 弢. 青花菜 *BoPGIP1* 基因的原核表达及其重组大肠杆菌的抗逆性分析[J]. 华北农学报, 2015, **30**(1):24-28.

ZHANG T. Prokaryotic expression of *BoPGIP1* gene from *Broccoli* and stress tolerance of *E. coli* BL21 expressing *BoPGIP1* gene[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2015, **30**(1):24-28.

(编辑:宋亚珍)