

盐穗木 HcUKPP 原核表达及重组菌 非生物胁迫耐受性研究

张丽丽, 张 冀, 张富春*

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 该研究采用 RT-PCR 技术, 从盐穗木 cDNA 文库中克隆获得未知功能多肽 *HcUKPP* 基因, 构建了大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21::pET30a-*HcUKPP* 重组菌株, 并检测了重组菌株在不同非生物胁迫下的耐受性。结果显示: *HcUKPP* 基因开放阅读框为 243 bp, 融合 His 的 *HcUKPP* 蛋白的分子量约为 15 kD。在 37 °C 条件下, 不同浓度的异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 4 h 后 His-*HcUKPP* 融合蛋白均可表达, 且 *E. coli* BL21::pET30a-*HcUKPP* 重组菌在不同浓度 NaCl(100~900 mmol/L)、聚乙二醇(2.5%~20%, PEG 6000)和甲基紫精(25~200 μmol/L)胁迫处理下, 其生长均具有明显优势。尤其是在 500 mmol/L NaCl、10% PEG 6000 和 75 μmol/L 甲基紫精胁迫 12 h 后, 重组大肠杆菌 BL21 呈现出极显著的优势, 分别达到了对照菌的 1.81、1.47 和 3.48 倍。研究表明, 盐穗木 *HcUKPP* 可以显著提高重组大肠杆菌对不同非生物胁迫的耐受性, 证明 *HcUKPP* 是一类新发现的能够响应非生物胁迫的多肽。

关键词: 盐穗木; *HcUKPP*; 原核表达; 重组大肠杆菌; 非生物耐受

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Prokaryotic Expression of *HcUKPP* from *Halostachys caspica* and Analysis of Abiotic Stress Tolerance of the Recombinant Bacteria

ZHANG Lili, ZHANG Ji, ZHANG Fuchun*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: The recombinant strain *Escherichia coli* BL21::pET30a-*HcUKPP* was obtained by the method of prokaryotic vector construction after cloning of unknown functional peptide *HcUKPP* gene, and then tested its tolerance under different abiotic stresses. The results revealed that open reading frame(ORF) of the gene was 243 bp, the molecular weight of the recombinant *HcUKPP* was approximately 15 kD. In addition, the expression of His-*HcUKPP* fusion protein could be induced with different concentrations of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h at 37 °C. Furthermore, the growth of recombinant strain *E. coli* BL21::pET30a-*HcUKPP* have shown obvious advantages under treatment of different concentrations of NaCl (100–900 mmol/L), polyethylene glycol (2.5%–20%, PEG 6000) and methyl viologen (25–200 μmol/L). Especially under the condition of 500 mmol/L NaCl, 10% PEG 6000 and 75 μmol/L methyl viologen for 12 h, interestingly, recombinant *E. coli* BL21 showed significant advantages, their

收稿日期: 2017-09-15; 修改稿收到日期: 2017-12-12

基金项目: 新疆重点实验室专项资金(2014KL001)

作者简介: 张丽丽(1993–), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: 1418607894@qq.com

* 通信作者: 张富春, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物学与基因工程研究。E-mail: zfcxju@xju.edu.cn

growth reached 1.81, 1.47 and 3.48 fold of control bacteria respectively. Overall, the *HcUKPP* gene of *Halostachys caspica* can significantly improve tolerance of recombinant *E. coli* BL21 under different abiotic stresses, which proved that the *HcUKPP* is a kind of newly discovered polypeptide in response to abiotic stress.

Key words: *Halostachys caspica*; unknown functional polypeptide; prokaryotic expression; recombinant *Escherichia coli*; abiotic tolerance

盐穗木(*Halostachys caspica*)隶属藜科(Che-nopodiaceae)盐穗木属,广泛分布于新疆干旱荒漠盐碱地,耐盐能力强,可在野外含盐量高达 27% 的重度盐渍化环境中生长,并且形成优势群落^[1-2]。因此选取盐穗木作为耐盐碱基因挖掘及相关功能验证的理想材料,对于抗逆研究具有重要意义。

随着基因组学、转录组学和代谢组学的快速发展,许多盐胁迫相关蛋白质、转录因子、激素信号转导和胁迫响应通路相关基因相继被发现,其中有一部分基序和结构域未知,且功能模糊的蛋白质(POFs),它们在非生物胁迫时呈现了高表达,并且过表达该蛋白的植物都获得了更强的非生物胁迫耐受性^[3-5]。本实验室在前期研究中发现,在 600 mmol/L NaCl 处理条件下,采用 RACE 技术从盐穗木中扩增获得了 1 个功能未知多肽基因 *HcUKPP*,并随着胁迫处理时间的增加,该基因表达显著升高,进一步研究发现其定位于细胞质膜上,为细胞质膜相关蛋白(plasma membrane protein, PMP),猜测它可能参与调节细胞膜通透性和维持细胞结构而增强盐胁迫耐受性^[6-7]。当盐敏感型植物长期暴露在高盐环境中时,不利因素所诱发的氧化胁迫和离子损伤会导致质膜过氧化并破坏细胞膜结构,进而改变细胞的渗透势,对植物造成不可逆的伤害。研究表明,当耐盐植物暴露于盐环境中时,会激活维持膜组分和离子稳态的信号通路以及相应基因,并通过稳定细胞结构、抗脂质过氧化和维持细胞渗透势等方式增强植物对盐胁迫的耐受性^[8-11]。

本研究通过构建原核表达载体 pET30a-*HcUKPP*,并转化 *Escherichia coli* BL21(DE3)表达菌株,利用 IPTG 诱导重组菌株过表达 *HcUKPP* 蛋白质,然后用不同浓度 NaCl(100、300、500、700 和 900 mmol/L)、PEG 6000(2.5%、5%、10%、15% 和 20%)和甲基紫精(25、50、75、100、150 和 200 μ mol/L)分别模拟盐、干旱和氧化胁迫,初步证明 *HcUKPP* 蛋白对宿主菌大肠杆菌应对非生物胁迫的显著促进作用,为研究 *HcUKPP* 应对非生物胁迫的功能机理以及抗逆经济作物的培育奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

盐穗木种子采自新疆五家渠 103 团(E87.31°, N44.29°),并种植于本实验室植物培养室。载体质粒 pET30a 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 *HcUKPP* 基因的克隆和原核表达载体的构建 取适量盐穗木同化枝,利用植物总 RNA 提取试剂盒(OMEGA 公司)提取总 RNA,参照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模版,再以上游引物 P1(5'-CCGGAATTC TAT TATATGCGTACTAGGTGGCT-3', *EcoR* I)和下游引物 P2(5'-CCC AAGCTTTACCATATGGCTCTTACT CA-3', *Hind* III)进行 PCR 扩增,PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,61 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。PCR 产物回收之后连接至 pEASY-T5 载体(全式金公司),将测序正确的重组克隆载体 pEASY-T5-*HcUKPP* 和 pET30a 载体同时用 *EcoR* I 和 *Hind* III (TaKaRa 公司)双酶切,用胶回收和 PCR 产物回收试剂盒(OMEGA 公司)分别回收目的基因和载体后,用 Solution I 快速连接酶(TaKaRa 公司)16 °C 连接 4 h,将连接产物转化至 *Escherichia coli* DH5(全式金公司)中,经 PCR 和双酶切鉴定正确后,转入表达菌株 *E. coli* BL21(全式金公司)中,提取质粒进行 PCR 和双酶切鉴定。

1.2.2 融合蛋白 His-*HcUKPP* 的诱导表达及特异性分析 将阳性菌接种于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的新鲜 LB 培养基中,于 37 °C、220 r/min 过夜培养,次日,再按 1/100 接种于 7 个含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 6 mL 新鲜 LB 培养基中,在 37 °C、220 r/min 条件下振荡培养 4 h,待 *OD*₆₀₀ 达到 0.6~0.8 之后,取 1 mL 作为诱前,剩余 5 mL 在不同浓度 IPTG(0.1、0.4、0.7、1.0、1.3、1.5 和 2.0 mmol/L),37 °C、220 r/min 条件下诱导 4 h。离心收集菌体,用 PBS 缓冲液洗涤菌体 3 次后,每毫升菌用 80

μL PBS 缓冲液重悬,并加入 20 μL 5×蛋白 loading,沸水浴处理 15 min,冰浴 10 min,10 000 r/min 离心 10 min。

将处理好的样品用 SDS-PAGE 分离后,电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用 5%脱脂奶粉 37 ℃封闭 2 h 后,转入含有 5%脱脂奶粉稀释的抗 His 一抗中,低速摇床上结合 2 h,TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,再转入 2%脱脂奶粉稀释的抗 HRP 标记的羊抗鼠二抗中,低速摇床上结合 1 h,TBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,最后用 DAB 显色至目的条带清晰。

1.2.3 重组菌非生物胁迫耐受性检测 重组菌的非生物胁迫耐受性检测参照 Narayan 和程刚等的方法并进行适当修改^[12-13]。将重组菌 *E. coli* BL21 :: pET30a-*HcUKPP* 和对照菌 *E. coli* BL21 :: pET30a 同时进行震荡培养后,为了减轻 IPTG 对菌体的伤害,用 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后将菌液调整至浓度一致,分别接种于含有 100、300、500、700 和 900 mmol/L NaCl、2.5%、5%、10%、15%和 20% PEG6000 和 25、50、75、100、150 和 200 μmol/L 甲基紫精的新鲜 LB 培养基中,37 ℃、220 r/min 振荡培养,每 2 h 检测 1 次,读取 OD₆₀₀,持续检测 12 h。

1.2.4 统计学分析 实验数据的作图和分析采用 GraphPad Prism 7。

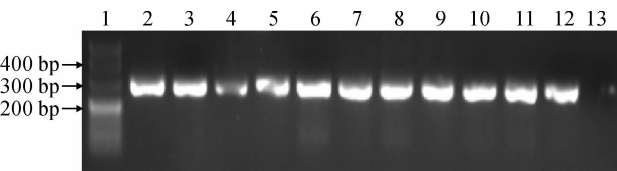
2 结果与分析

2.1 *HcUKPP* 的克隆

以反转录获得的 cDNA 为模版,P1 和 P2 为引物,利用 RT-PCR 扩增获得了 *HcUKPP* 基因,1.5%琼脂糖凝胶对目的基因进行检测。结果(图 1)表明,获得 *HcUKPP* 基因开发阅读框 243 bp,大小与预期值相符,且测序结果与 GenBank 数据库的序列比对完全一致。

2.2 pET30a-*HcUKPP* 原核表达载体的构建

将 *HcUKPP* 基因与 pET30a 连接后,转化 *E. coli* BL21,得到重组菌。用工具酶 *EcoR* I 和 *Hind*



1. DL5000;2~12. *HcUKPP* 基因;13. 阴性对照
图 1 *HcUKPP* 基因的 PCR 扩增结果
1. DL500; 2-12. *HcUKPP* gene; 13. Negative control
Fig. 1 Amplification of *HcUKPP* gene with PCR

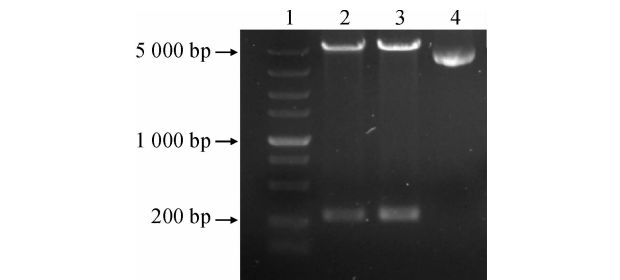
III 对构建的重组原核表达载体 pET30a-*HcUKPP* 进行双酶切后,用 1%琼脂糖凝胶对酶切产物进行检测。结果显示,pET30a-*HcUKPP* 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后出现了 2 条条带,1 条为 5 000 bp 左右的载体片段,1 条为 250 bp 左右的目的片段,而未经双酶切的 pET30a-*HcUKPP* 仅出现了 1 条条带(图 2)。该结果表明,已成功获得 *E. coli* BL21::pET30a-*HcUKPP* 原核表达载体,可用于后续蛋白表达。

2.3 重组蛋白 His-*HcUKPP* 的诱导表达和特异性检测

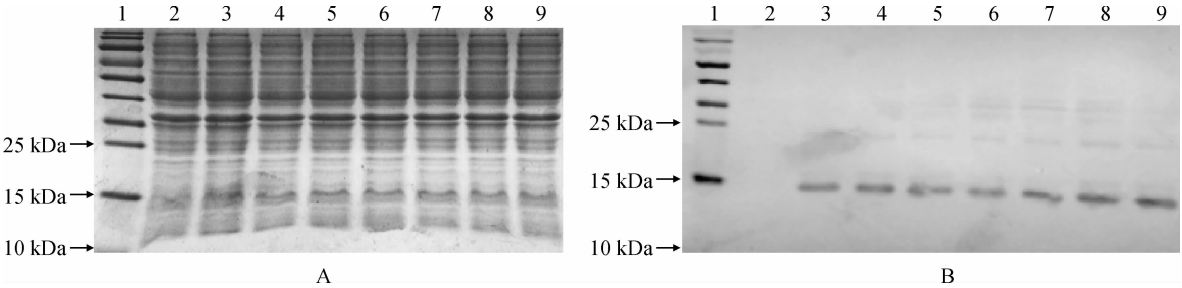
重组菌 *E. coli* BL21::pET30a-*HcUKPP* 经诱导表达条件优化之后,确定在 37 ℃、4 h,0.1、0.4、0.7、1.0、1.3、1.5 和 2.0 mmol/L IPTG 条件下均可诱导表达蛋白,且表达量差异不显著。SDS-PAGE 结果显示,与诱导前相比,诱导后出现了 1 条约为 15 kDa 目的条带(图 3,A),Western Blot 结果表明该条带为特异性的 His-*HcUKPP*(图 3,B)。

2.4 重组菌非生物胁迫下生长曲线的测定

通过测定重组菌 *E. coli* BL21::pET30a-*HcUKPP* 在 NaCl、PEG 6000 以及甲基紫精等非生物胁迫的 OD₆₀₀,来检测其生长状况(图 4,A~C)。结果显示,在上述 3 种非生物胁迫下,重组菌都表现出了优于对照菌的趋势;进一步分析发现,在 500 mmol/L NaCl、10% PEG 6000 和 75 μmol/L 甲基紫精胁迫 12 h 之后,重组菌的生长优势最为显著,OD₆₀₀ 分别是对照菌的 1.81、1.47 和 3.48 倍(图 4,D~G)。以上结果表明,*HcUKPP* 的表达能提高宿主菌对非生物胁迫的耐受性。



1. DL5000;2~3. 重组质粒 pET30a-*HcUKPP* 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切;4. 重组质粒 pET30a-*HcUKPP*
图 2 重组质粒 pET30a-*HcUKPP* 的双酶切鉴定
1. DL5000; 2-3. Recombinant plasmid pET30a-*HcUKPP* digested by *EcoR* I and *Hind* III; 4. Recombinant plasmid pET30a-*HcUKPP*
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pET30a-*HcUKPP* with double-enzyme digestion

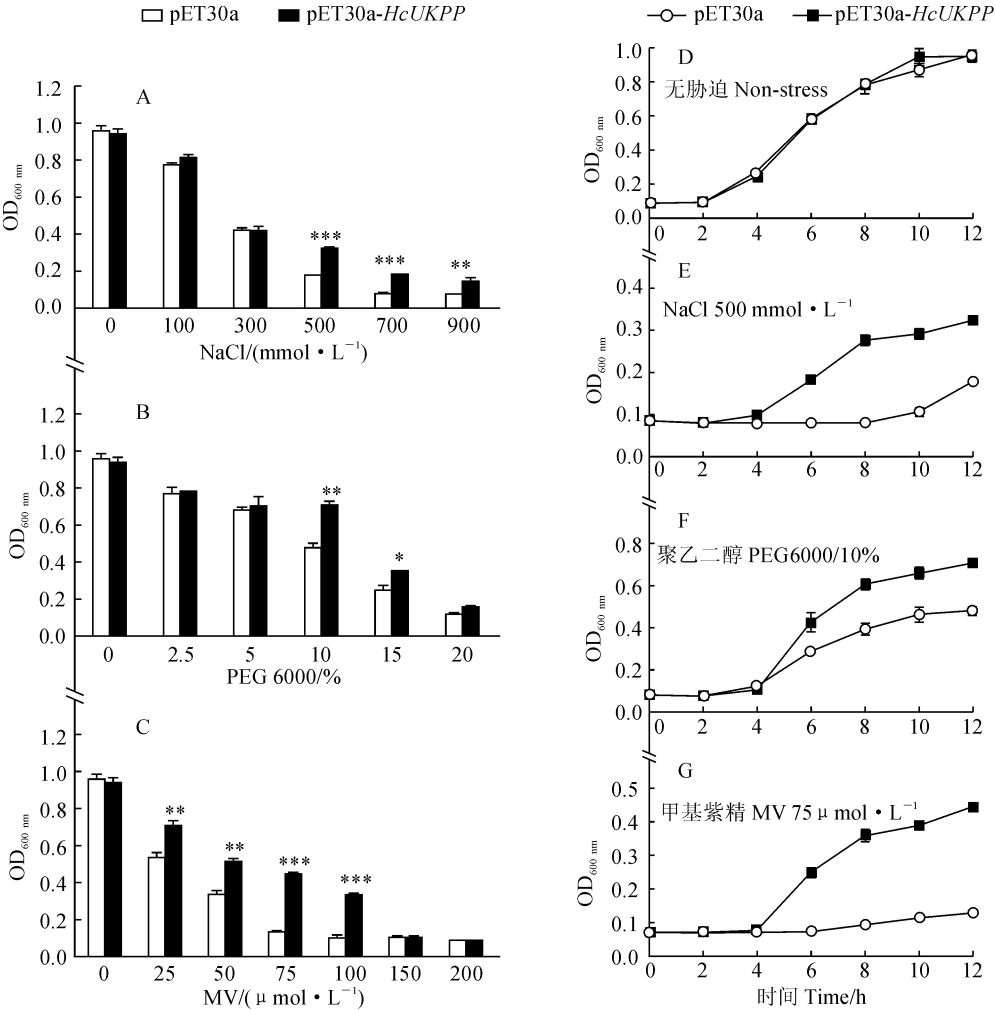


A. SDS-PAGE 分析 pET30a-HcUKPP 融合蛋白;B. His-HcUKPP 融合蛋白的 Western blot 鉴定;1. 蛋白 Marker;
2. *E. coli* BL21::pET30a-HcUKPP 诱导前; 3. 0.1 mmol/L IPTG; 4. 0.4 mmol/L IPTG; 5. 0.7 mmol/L IPTG;
6. 1.0 mmol/L IPTG; 7. 1.3 mmol/L IPTG; 8. 1.5 mmol/L IPTG; 9. 2.0 mmol/L IPTG

图 3 His-HcUKPP 重组蛋白的诱导表达及特异性分析

A. Expression analysis of recombinant His-HcUKPP protein; B. Identification of recombinant His-HcUKPP protein by Western Blot;
1. Protein standard marker; 2. Un-induced *E. coli* BL21::pET30a-HcUKPP; 3. 0.1 mmol/L IPTG; 4. 0.4 mmol/L IPTG;
5. 0.7 mmol/L IPTG; 6. 1.0 mmol/L IPTG; 7. 1.3 mmol/L IPTG; 8. 1.5 mmol/L IPTG; 9. 2.0 mmol/L IPTG

Fig. 3 Identification and expression analysis of recombinant His-HcUKPP protein



*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

A~C. 非生物胁迫 12 h 后菌体生长的检测; D~G. *E. coli* BL21::pET30a-HcUKPP 在不同非生物胁迫下的生长检测

图 4 重组菌 *E. coli* BL21::pET30a-HcUKPP 在不同非生物胁迫下生长曲线

A~C. Strains growth under various abiotic stresses for 12 h; D~G. Growth of the recombinant *E. coli* BL21::pET30a-HcUKPP under different abiotic stresses

Fig. 4 Growth curve of recombinant strain *E. coli* BL21::pET30a-HcUKPP under different abiotic stresses

3 讨 论

近年来,由于基因组和转录组测序技术的快速推广,在真核生物基因组内发现了大量功能未知基因。研究表明,平均每个物种中就有 15%~40% 的基因功能是未知的^[14]。其中在对包括裂殖酵母、小鼠和拟南芥等 10 种真核生物蛋白组进行 Blast 比对分析时发现,有 18%~38%(平均 26%)的蛋白质功能是未知的,并且在对不同真核生物蛋白质组中功能已知蛋白(PDFs)和功能未知蛋白(POFs)进行多样性分析时发现,POFs 的物种差异性要显著高于 PDFs^[15]。在针对紫花苜蓿共生根瘤菌的研究过程中,发现了一个非常重要且高度保守的未知功能蛋白 SMC01113 家族,通过基因工程的方法对该基因进行改造突变并接种至植物后,极显著增加了根瘤菌的数量,促进了根瘤的生长,从而使植物固氮能力显著提高,且接种 SMC01113 开放阅读框中一段基因的突变体植株 SMC01113::mTn5(284~507 bp)在应对多种环境胁迫时,都表现出了显著优势^[16]。将 23 个 POFs 在拟南芥中过表达,结果显示,高达 70%转基因拟南芥都显示出了对氧化胁迫的耐受性^[17]。因此,探讨植物 POFs 的功能在研究植物抗逆领域具有重要作用。

本实验室前期在盐穗木转录组中发现了 1 个定位于细胞质膜上的盐响应未知功能基因 *HcUK-PP*,表达特性分析表明,其在 600 mmol/L NaCl 处理条件下,随着胁迫时间的延长呈现出上调趋势。生物信息学分析发现,在 N 端信号肽区与 C 末端分别含有一个跨膜区,并且拥有 1 个 Thr 和 1 个的 Tys 的蛋白激酶磷酸化位点^[6-7]。其可能在响应盐等非生物胁迫时通过充当膜受体或者通过磷酸化修饰调控等方式参与胁迫信号转导、基因表达和合成代谢等途径调控植物的耐受性^[18-19]。到目前为止,

还没有任何关于 *HcUKPP* 基因在生物和非生物胁迫中潜在功能的研究。因此开展盐穗木未知多肽基因 *HcUKPP* 后续的功能验证研究对于理解其潜在功能和可能参与胁迫反应的反应机制具有重要作用。

本研究通过构建重组原核表达载体 pET30a-*HcUKPP*,并以 *E. coli* BL21 为宿主菌,研究了重组菌株在不同浓度 NaCl、PEG 6000 和甲基紫精胁迫下的耐受性。结果表明,在不同浓度 NaCl、PEG 6000 和甲基紫精胁迫下,重组菌都显示出强于对照菌的生长优势,尤其在 500 mmol/L NaCl、10% PEG 6000 和 75 μmol/L 甲基紫精胁迫 12 h 之后,重组菌株的优势最为显著。值得注意的是,在 500、700 和 900 mmol/L 高浓度 NaCl 处理 12 h 之后,重组菌株都表现出了不同程度的盐耐受性,该结果表明 *HcUKPP* 可能在维持渗透平衡等方面发挥重要作用^[20]。此外,相比于盐胁迫,75 μmol/L 甲基紫精胁迫 12 h 之后,重组菌株的生长极显著优于对照菌株。可能是在高浓度的甲基紫精胁迫下,产生的大量活性氧使得细胞质膜蛋白发生过度氧化,导致细胞膜结构破坏而失去功能,从而使细胞内环境失衡、抗逆信号转导途径终止,最终导致对照菌体生长受限,并发生死亡^[21]。而重组菌由于过表达了 *HcUKPP* 蛋白,阻止了质膜蛋白的过度氧化,维持了细胞膜结构,在保证细胞稳态的情况下,高效地传递了抗逆信号,从而合成了抗氧化物质,维持了活性氧的平衡,从而使得重组菌株获得了氧化胁迫耐受性。

本研究对盐穗木未知功能多肽 *HcUKPP* 进行了原核表达,且 *E. coli* BL21::pET30a-*HcUKPP* 重组菌抗非生物胁迫的能力显著提高。研究结果为深入探索盐穗木 *HcUKPP* 潜在的生理功能提供了基础。

参考文献:

[1] 鄯金标,张福锁,毛达如,等. 新疆盐生植物群落物种多样性及其分布规律的初步研究[J]. 林业科学,2006,42(10):6-12.

XI J B, ZHANG F S, MAO D R, *et al.* Species diversity and distribution of halophytic vegetation in Xinjiang[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2006,42(10):6-12.

[2] 常 丹,张 霞,张富春. 盐穗木 *HcPEAMT* 基因的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报,2014,34(8):1 522-1 528.

CHANG D, ZHANG X, ZHANG F C. Cloning and expression analysis of *HcPEAMT* gene from *Halostachys caspica* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, 34 (8): 1 522-1 528.

[3] ITURRIAGA G, MAF C, CUSHMAN J C. An EST catalogue from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* reveals abiotic stress-adaptive genes[J]. *Plant Science*, 2006, 170(6):1 173-1 184.

- [4] ZHANG X, ZHEN J, LI Z, *et al.* Expression profile of early responsive genes under salt stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, **29**(3):626-637.
- [5] LUHUA S, HEGIE A, SUZUKI N, *et al.* Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening[J]. *Physiologia Plantarum*, 2013, **148**(3):322-333.
- [6] 姚曼红, 曾幼玲. 极端耐盐植物盐穗木编码未知多肽基因 *HcUKPP* 的克隆与表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, **28**(3):261-266.
YAO M H, ZENG Y L. Cloning and expression of unknown polypeptide gene (*HcUKPP*) from extreme salt-tolerant plant *Halostachys caspica* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, **28**(3):261-266.
- [7] 彭 丹, 张 霞, 张富春. 盐穗木功能未知蛋白(*HcUKPP*)的亚细胞定位[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, **30**(12):1 244-1 249.
PENG D, ZHANG X, ZHANG F C. Subcellular localization of function unknown protein (*HcUKPP*) from *Halostachys caspica* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, **30**(12):1 244-1 249.
- [8] YOSHIKAWA S, MITSUI N, CHIKARA K I, *et al.* Effect of salt stress on plasma membrane permeability and lipid saturation in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 1995, **80**(2):131-135.
- [9] MANSOUR M M F. Plasma membrane permeability as an indicator of salt tolerance in plants[J]. *Biologia Plantarum*, 2012, **57**(1):1-10.
- [10] NATERA S H A, HILL C B, RUPASINGHE T W T, *et al.* Salt-stress induced alterations in the root lipidome of two barley genotypes with contrasting responses to salinity[J]. *Functional Plant Biology*, 2016, **43**(2):207-219.
- [11] CHAVES M M, FLEXAS J, PINHEIRO C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell[J]. *Annals of Botany*, 2009, **103**(4):551-560.
- [12] NARAYAN O P, KUMARI N, RAI L C. Heterologous expression of *Anabaena* PCC 7120 *all3940* (a Dps family gene) protects *Escherichia coli* from nutrient limitation and abiotic stresses[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, **394**(1):163-169.
- [13] 程 刚, 兰海燕. 异子蓬 PEPC 基因原核表达及其重组菌在非生物胁迫下的耐受力解析[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(9):1 767-1 775.
CHENG G, LAN H Y. Prokaryotic expression of PEPC from halophyte *Suaeda aralocaspica* and analysis of stress tolerance of the recombinant strain [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(9):1 767-1 775.
- [14] GOLLERY M, HARPER J, CUSHMAN J, *et al.* What makes species unique? The contribution of proteins with obscure features[J]. *Genome Biology*, 2006, **7**(7):R57.
- [15] GOLLERY M, HARPER J, CUSHMAN J, *et al.* POFs: what we don't know can hurt us[J]. *Trends in Plant Science*, 2007, **12**(11):492-496.
- [16] DAVIES B W, WALKER G C. A highly conserved protein of unknown function is required by *Sinorhizobium meliloti* for symbiosis and environmental stress protection[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, **190**(3):1 118-1 123.
- [17] SONG L, CIFTCIYILMAZ S, HARPER J, *et al.* Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic *Arabidopsis* plants expressing proteins of unknown function[J]. *Plant Physiology*, 2008, **148**(1):280-292.
- [18] OSAKABE Y, MIZUNO S, TANAKA H, *et al.* Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase 1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(12):9 190-9 201.
- [19] BHATOTIA K, KHATODIA S, KHURANA S. Abiotic stress specific phosphorylation in plant proteins: A review [J]. *Current Advances in Agricultural Sciences*, 2015, **7**(2):95-100.
- [20] LI J, SUN X, YU G, *et al.* Generation and analysis of expressed sequence tags (ESTs) from halophyte *Atriplex canescens* to explore salt-responsive related genes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, **15**(6):11 172-11 189.
- [21] HUANG P, CHUNG M S, JU H W, *et al.* Physiological characterization of the *Arabidopsis thaliana* oxidation-related zinc finger 1, a plasma membrane protein involved in oxidative stress[J]. *Journal of Plant Research*, 2011, **124**(6):699-705.

(编辑:宋亚珍)