

DOI: 10.11686/cyxb2015510

http://cyxb.lzu.edu.cn

沈迎芳, 马超, 吴小培, 张业猛, 王海庆. 扁蓿豆 SK2 型脱水素基因 *MrDHN3* 的异源表达提高大肠杆菌对盐和高温胁迫的抗性. 草业学报, 2016, 25(8): 118-127.

SHEN Ying-Fang, MA Chao, WU Xiao-Pei, ZHANG Ye-Meng, WANG Hai-Qing. Heterologous expression of an SK2-type dehydrin gene (*MrDHN3*) from *Medicago ruthenica* enhances *Escherichia coli* tolerance under salt and high temperature stress. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(8): 118-127.

## 扁蓿豆 SK2 型脱水素基因 *MrDHN3* 的异源表达提高大肠杆菌对盐和高温胁迫的抗性

沈迎芳<sup>1,2</sup>, 马超<sup>1</sup>, 吴小培<sup>1,2</sup>, 张业猛<sup>1,2</sup>, 王海庆<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 高原适应与进化重点实验室, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:**扁蓿豆为高原高寒地区优质豆科牧草, 具有极强的抗旱、耐寒、抗盐碱的能力。脱水素(DHNs)是参与植物逆境应答的一类蛋白。根据前期 RNA-seq 的结果, 从扁蓿豆幼苗中克隆到一个编码脱水素的基因 *MrDHN3*。序列分析显示该基因含 666 bp 的开放阅读框, 编码 221 个氨基酸, 为一个 SK2 型酸性脱水蛋白。氨基酸序列比对结果表明, *MrDHN3* 与豆科植物白三叶和蒺藜苜蓿相似性最高, 达 83%。实时荧光定量 PCR 结果显示, *MrDHN3* 基因受脱水、低温、高盐和脱落酸处理诱导表达, 表明 *MrDHN3* 参与了扁蓿豆的非生物胁迫响应。通过构建原核表达载体, 在大肠杆菌中过表达 *MrDHN3* 蛋白, 检测重组菌在盐和高温胁迫处理下的生长存活情况。结果发现, 在 0.5 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L KCl 高盐胁迫条件下, 重组大肠杆菌的存活率明显高于对照菌株; 在 55 °C 高温胁迫条件下, 转化大肠杆菌的生长状态明显优于对照。表明 *MrDHN3* 对盐和高温引起的细胞损伤具有保护作用。为今后作物抗逆性遗传改良的研究提供了有用信息。

**关键词:**脱水素基因; 非生物胁迫; 异源表达; 扁蓿豆

### \*Heterologous expression of an SK2-type dehydrin gene (*MrDHN3*) from *Medicago ruthenica* enhances *Escherichia coli* tolerance under salt and high temperature stress

SHEN Ying-Fang<sup>1,2</sup>, MA Chao<sup>1</sup>, WU Xiao-Pei<sup>1,2</sup>, ZHANG Ye-Meng<sup>1,2</sup>, WANG Hai-Qing<sup>1\*</sup>

1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** *Medicago ruthenica*, is an excellent legume in highland and cold regions, and is highly resistant to drought, cold and high salinity. Dehydrins (DHNs) are stress proteins involved in plant protective reactions against environmental stress. According to our previous RNA-sequence data, a DHN gene, *MrDHN3*, was cloned from young seedlings of *M. ruthenica*. Sequence analyses showed that the *MrDHN3* gene contained a 666 bp open reading frame, putatively translated to 221 amino acids, and was an SK2-type acidic DHN. Amino acid sequence alignment showed that *MrDHN3* shared the highest similarity (83%) with *TrDHN3* and *MtDHN3*. Quantitative RT-PCR analysis showed that the expression of *MrDHN3* was induced by dehydration, cold, high salinity stress and abscisic acid (ABA), which suggests that *MrDHN3* is involved in abiotic stress responses. A prokaryotic expression vector was constructed and transferred to *Escherichia coli* so as to induce

\* 收稿日期: 2015-11-10; 改回日期: 2016-02-17

基金项目: 青海省应用基础研究计划(2014-ZJ-764), 中科院“西部之光”联合学者项目和中科院科技服务网络计划(KFJ-SW-STS-177)资助。

作者简介: 沈迎芳(1987-), 女, 青海西宁人, 在读博士。E-mail: syfnc@126.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wanghq@nwipb.cas.cn

MrDHN3 over expression in *E. coli*. The survival and growth of the recombinant *E. coli* under salinity and high temperature stress conditions were determined. It was found that survival rates of recombinant *E. coli* after exposure to high salinity (0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L KCl) and high temperature (55 °C) stress were obviously higher than those of the control group. This suggests that MrDHN3 plays an important role in cell response to damage caused by salinity and high temperature stress. This research indicates a potential methodology for the genetic improvement of crops to improve stress tolerance.

**Key words:** dehydrins; abiotic stress; heterologous expression; *Medicago ruthenica*

高盐、低温和干旱等环境胁迫是影响植物生长发育和产量的主要因素,植物作为固着的生物,在长期的进化过程中逐渐演化出了一系列应答机制<sup>[1]</sup>。其中,脱水蛋白作为一类重要的响应蛋白,在高盐、低温、干旱等脱水的环境胁迫信号刺激及外源 ABA 处理下积累表达<sup>[2]</sup>。脱水蛋白属于晚期胚胎发育丰富蛋白(late embryogenesis abundant protein)LEAII 家族,为天然无序蛋白,富含甘氨酸,呈高度的亲水性和热稳定性<sup>[3]</sup>,广泛分布于高等植物、藻类、酵母、线虫以及蓝细菌中<sup>[4]</sup>。脱水蛋白含有至少一个保守的富含赖氨酸的基序 K 片段(EKKGIMDKIKEKLP 或其衍生物),它们常形成双亲性螺旋结构。部分脱水蛋白还包含 Y 片段和 S 片段,Y 片段通常以 1~3 个重复形式(T/VDEYGNP)出现在脱水蛋白的 N-端,S 片段由一系列丝氨酸(Ser)残基组成。基于 Y,S,K 片段出现的类型和数量可将脱水蛋白分为 5 个亚家族:YnSKn, SKn, Kn, YnKn 和 KnS 型<sup>[5-6]</sup>。体内和体外实验证明,脱水蛋白对植物抵御环境胁迫发挥重要作用<sup>[7]</sup>。

扁蓿豆(*Medicago ruthenica*)为多年生豆科植物,广泛分布于西伯利亚、蒙古利亚和我国北方地区,多生长于山坡草地<sup>[8-9]</sup>。Campbell 等<sup>[10]</sup>指出,扁蓿豆是唯一可适应干旱、高原严寒及贫瘠土壤的豆科苜蓿属植物。鉴于其具有优于苜蓿的抗低温性,扁蓿豆被认为是高原高寒地区优质的豆科牧草<sup>[11]</sup>,也被认为是提高苜蓿作物胁迫耐受性的优异种质资源。近年来国内学者聚焦于牧草高产、优质、抗逆育种的研究,注重与苜蓿产业发展相结合,而对分子遗传基础等机理性研究尚显不足<sup>[12]</sup>。尽管脱水蛋白基因已从很多物种中克隆出<sup>[13]</sup>,包括豆科植物苜蓿(*Medicago truncatula*)、豌豆(*Pisum sativum*)、大豆(*Glycine max*)等<sup>[14]</sup>,但其在扁蓿豆内的分子特性鲜有报道。本研究以扁蓿豆为材料,从中克隆脱水素基因(dehydrin),异源表达到大肠杆菌中,来探讨其在逆境胁迫下可能发挥的作用,以期为牧草抗逆育种提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料与处理

扁蓿豆种子承蒙中国农业科学院草原研究所孙启忠研究员惠赠。2013 年 6 月将种子用浓硫酸处理 10 min,用无菌水冲洗数次去除残余硫酸。上述经过处理的种子置于铺有湿滤纸的培养皿内,在 21 °C、16 h/8 h 光照条件下萌发。3 d 后将发芽的幼苗移栽于蛭石:营养土(3:1)的混合基质中培养,每周用含 1/2 MS 营养液浇灌 1 次。生长 3 周后对幼苗进行非生物胁迫和脱落酸处理。NaCl 胁迫处理:用 150 mmol/L NaCl 水溶液从花盆底部浇灌至培养基质饱和,处理 0,0.5,1,3,6,24 h;脱水胁迫处理:将幼苗洗去砂石后,室温自然脱水 0,0.5,1,3,6,12 h;ABA 脱落酸处理:将整株幼苗洗净砂石后,转移至铺有多层吸水纸的培养皿中,用含 0.05% Tween 20 (V/V)的 100 μmol/L 脱落酸溶液(ABA)喷雾,封盖以防植株脱水,处理 0,0.5,1,3,6,12 h;低温胁迫处理:将培养的幼苗转移到 4 °C 光照培养箱进行低温处理 0,1,4,8,12,24 h。每组处理设 3 次生物学重复,取样后液氮速冻,-80 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 MrDHN3 基因的 cDNA 克隆及序列分析

总 RNA 的提取采用 TRIZOL<sup>®</sup> 试剂(Invitrogen, USA),参照说明书用 Recombinant DNase I(RNase-free)(TaKaRa, 大连)去除基因组 DNA。cDNA 第一链按 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit(Perfect Real Time)(TaKaRa, 大连)的操作说明合成。

根据本实验室已有的扁蓿豆转录组测序结果(未发表)设计正向引物 MrDHN3F(5'-CGTGTTCATTATGT-

GTAGTAGTGAAG-3')和反向引物 MrDHN3R(5'-TAAACAAAGCACCTCCA-3'),以低温 4 °C 处理 24 h 的 cDNA 样为模板,用 Pyrobest™ DNA 聚合酶(TaKaRa,大连)进行 PCR 扩增。扩增产物胶回收后,用 Ex Taq® DNA 聚合酶(TaKaRa,大连)进行加尾,然后克隆到 pGEM®-T Easy 载体(Promega, USA)进行测序。

用 DNAMAN 软件(Lynnon Biosoft, Vaudreuil-Dorion, Quebec, Canada)分析核酸序列、编码的氨基酸序列以及开放阅读框 ORF;用 ExPASy 网站上的 ProtParam(<http://au.expasy.org/tools/protparam.htm>)软件预测理论等电点(pI)和相对分子量( $M_w$ );用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 BlastN、BlastP 软件进行核苷酸及蛋白序列相似性检索;用 MEGA 6 软件<sup>[15]</sup>构建系统进化树。

### 1.3 *MrDHN3* 基因表达的实时荧光定量 PCR 分析

将上述不同胁迫处理样品合成的 cDNA 稀释至 50~150 ng/ $\mu$ L 为模板,用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa,大连)进行 qRT-PCR,反应体系 20  $\mu$ L,用 ViiA™ 7 实时荧光定量 PCR 系统(Applied Biosystems, Foster City, CA)扩增。反应按两步法 PCR 标准程序 95 °C 30 s 预变性,95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环进行,荧光信号采集在每一循环的第 2 步:60 °C 30 s。目的基因 *MrDHN3* 和内参基因 *Mr18S* 的 qRT-PCR 引物用 PrimerPrimer 5.0(PREMIER Biosoft International, Silicon Valley, USA)设计。基因的上游和下游引物分别为 MrDHN3-qF(5'-GGATGTAACAACCTCAACCGCCTG-3')和 MrDHN3-qR(5'-GCAGTCT-TAGGGTGATAACCAGGAA-3'),Mrt18SF(5'-CGCTCCTACCGATTGAAT-3')和 Mrt18SR(5'-GTTACGACT-TCTCCTTCCT-3')。

用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[16]</sup>计算 *MrDHN3* 在各非生物胁迫及 ABA 处理下的相对表达量。每个处理设 3 次重复,相对定量结果以平均数±标准误表示。

### 1.4 *MrDHN3* 原核表达载体构建

根据已测序的 *MrDHN3* cDNA 序列设计含 BamHI 位点的正向引物 MrDHN3-F1(5'-GCGGATCCATG-GCTGATCAGGAGAATCAGAAG-3')和含 SacI 位点的反向引物 MrDHN3-R1(5'-CGCGAGCTCTCAAT-GAGTAGTAGTCTCATCCTT-3'),扩增 *MrDHN3* 基因编码区。扩增的片段测序确认后,用 BamHI 和 SacI 双酶切,将酶切后的片段插入到经 BamHI/SacI 双酶切的 pET-30a(Novagen, Madison, WI, USA)原核表达载体内,转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌菌株,挑选阳性克隆提取质粒,酶切鉴定后,获得重组的原核表达载体 pET30a-MrDHN3。

### 1.5 MrDHN3 融合蛋白的表达及热稳定性和溶解性分析

按照说明书将重组质粒 pET30a-MrDHN3 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)表达菌株内,含 pET30a-MrDHN3 质粒的 BL21(DE3)命名为 BL/MrDHN3,只含 pET30a 的 BL21(DE3)为对照,命名为 BL/pET30a。在含有 50 mg/L 卡那霉素(kanamycin, Kan)的 LB 平板上挑取阳性克隆接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基内,37 °C 振荡培养。约 12 h 后,按 1:100(V/V)转接到 LB 培养基内培养 2~3 h 至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6~0.8 后,取 1 mL 菌液为诱导前样。其余菌液中加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)至终浓度为 0.5 mmol/L。诱导 3 h 后,取 1 mL 菌液为诱导后样。

离心收集菌体,PB 缓冲液重悬,超声 5 min 完全破碎诱导后菌体细胞,12000 r/min 离心 15 min。收集上清,将其分成 2 份,1 份于 100 °C 沸水浴中处理 10 min;另 1 份直接用于电泳分析。收集的 4 份样品中加入等体积样品缓冲液,100 °C 煮沸 10 min,冷却至室温,12000 r/min 离心 10 min,取 10  $\mu$ L 上清液,12% SDS-PAGE 进行电泳分析。

### 1.6 异源表达转化子抗逆性实验

**1.6.1 定性分析** 大肠杆菌转化和 IPTG 诱导条件如 1.5 所述。分别将 BL/MrDHN3 和对照 BL/pET30a 进行液体培养,诱导后的菌液 OD<sub>600</sub> 至 0.9 时,用含 50 mg/L 卡那霉素和 0.5 mmol/L IPTG 的新鲜液体 LB 培养基将培养菌液稀释 10 倍。取原液和稀释菌液进行胁迫处理,用含终浓度为 50 mg/L 卡那霉素和 0.5 mmol/L IPTG 的 LB 固体培养基为非胁迫对照。盐胁迫实验中,以分别添加有 0.5 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L KCl 的 LB 固体培养基为盐胁迫处理;热胁迫实验中,将原菌液和稀释菌液在 55 °C 水浴中温育 30 min 为热胁迫处理。取 10

μL 菌液滴加到上述平板上, 37 °C 倒置培养 16 h(热胁迫处理)、3 d(盐胁迫处理)后观察菌体生长情况。

**1.6.2 定量分析** 大肠杆菌培养、IPTG 诱导及胁迫处理条件同 1.6.1 定性分析。稀释 10 倍的菌液, 取 100 μL 均匀涂布于上述非胁迫和胁迫处理的平板上, 37 °C 倒置培养 16 h(热胁迫处理)、3 d(盐胁迫处理)后菌落计数, 按如下公式分析菌落形成率。

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

**2 结果与分析**

**2.1 MrDHN3 基因克隆与序列分析**

根据已有的扁蓿豆转录组数据设计引物, 采用 RT-PCR 方法从低温处理 24 h 的扁蓿豆幼苗中扩增得到约 900 bp 的特异片段(图 1A), 将其命名为 *MrDHN3*。该片段经胶回收, 进行载体连接, 并测序。测序结果显示该 cDNA 长 890 bp, 含有 666 bp 的开放阅读框, 编码 221 个氨基酸。ProtParam 预测该基因编码蛋白的分子量 ( $M_w$ ) 为 24.84 kD, 理论等电点(pI)为 5.56, 为酸性蛋白。总平均疏水性指数(grand average of hydropathicity, GRAVY)为 -1.444, 表明具有较高的亲水性。*MrDHN3* 蛋白含有 1 个 S 片段和 2 个富含赖氨酸的 K 片段, 为典型的 SK2 型脱水蛋白(图 1B)。

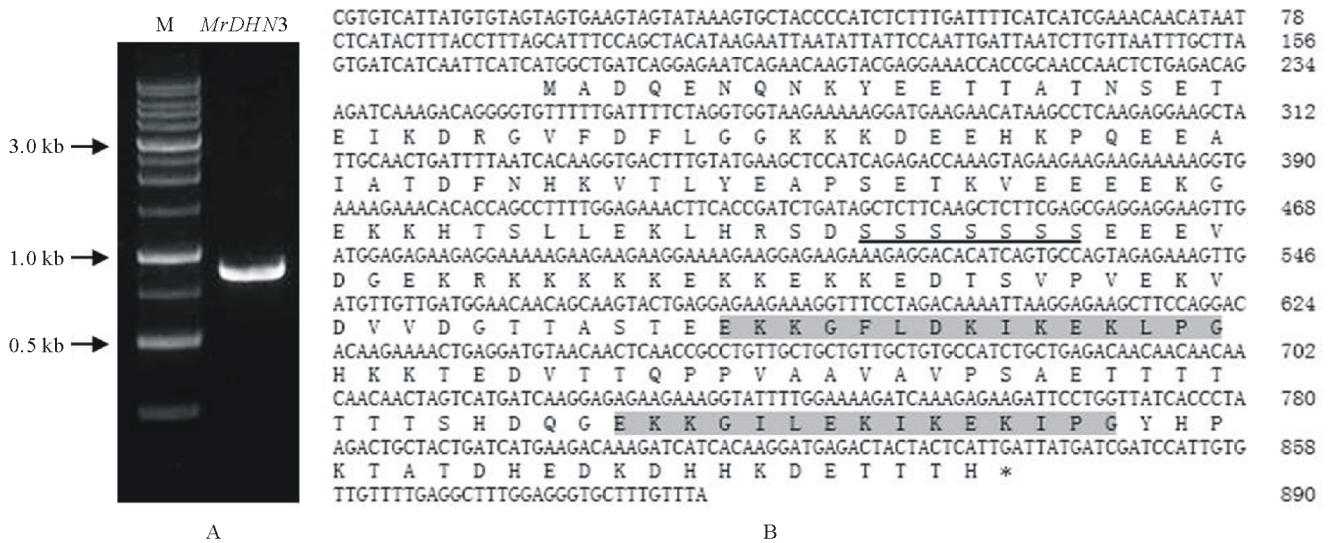


图 1 扁蓿豆 *MrDHN3* 基因的 cDNA 克隆(A)及序列分析(B)

Fig. 1 Cloning and sequence analysis of cDNA for *MrDHN3* gene from *M. ruthenica*

A: 扁蓿豆 *MrDHN3* 基因 RT-PCR 产物扩增; M: 1 kb DNA Ladder; B: 扁蓿豆 *MrDHN3* 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列, 脱水蛋白预测的 S 片段用下划线标出, 3 个保守的 K 片段用阴影标出。A: RT-PCR products of *MrDHN3* from *M. ruthenica*; M: 1 kb DNA Ladder; B: Nucleotide sequence of the *MrDHN3* cDNA and its deduced amino acids, the DHN deduced S-segment is underlined and the conserved three K-segments are marked as shadow edge.

编码 *MrDHN3* 的氨基酸序列经 NCBI 数据库中的 BlastP 分析, 发现其与白三叶(*Trifolium repens*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、豌豆(*Pisum sativum*)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)等豆科植物 DHN 蛋白家族成员具有高度一致性, 相似性达 77%, 其中与白三叶和蒺藜苜蓿中 DHN 蛋白的一致性最高, 达 83%。在 GenBank 中选取部分 DHN 蛋白, 进一步用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对(图 2), 结果显示比对的 DHN 蛋白均含有保守结构域 S 片段和 2 个 K 片段, 为 SK2 型脱水蛋白。

用 MEGA6 对 NCBI 下载的 6 个物种 SKn 型脱水蛋白氨基酸序列构建系统进化树(图 3), 分析结果显示, *MrDHN3* 与豆科植物豌豆 SK2 蛋白的亲缘关系最近。而与禾本科的小麦(*Triticum aestivum*)、粳稻(*Oryza sativa*)

Japonica Group), 芭蕉科大蕉(Musa ABB Group)的亲缘关系较远。豆科不同物种聚为一组,禾本科不同物种聚为一组,其他科植物为另一组,说明 DHN 蛋白具有种属特性。

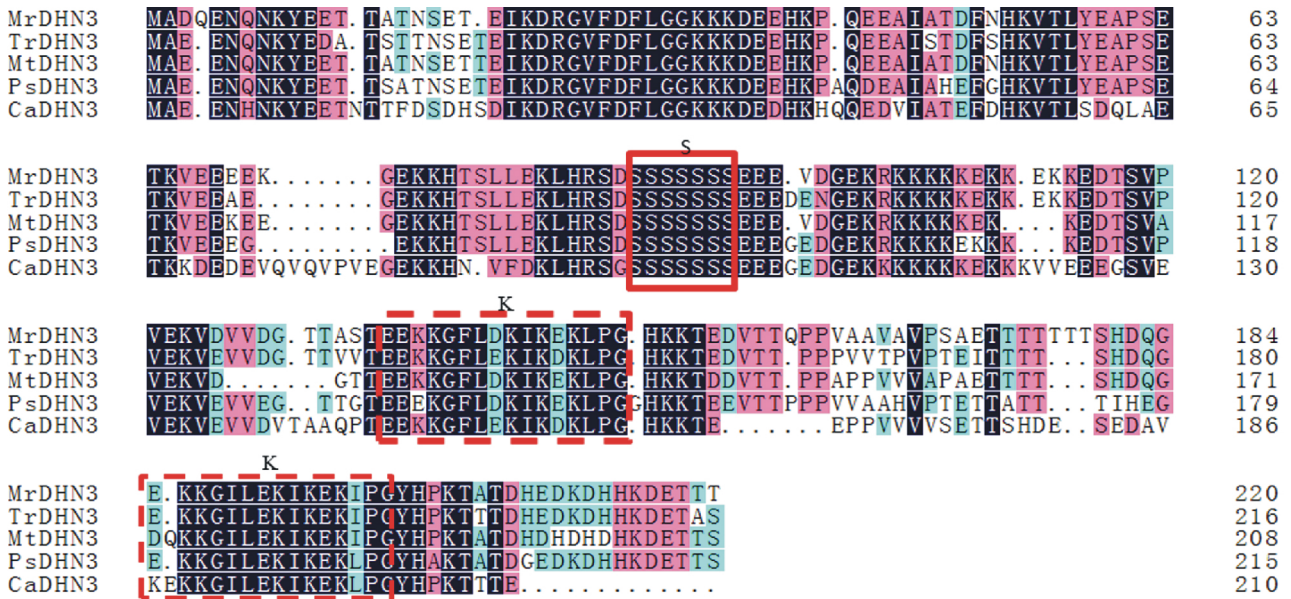


图2 MrDHN3 脱水蛋白与其他物种 SKn 类 DHN 脱水蛋白的氨基酸序列比对

Fig.2 Alignment of amino acid sequences of MrDHN3 and other SKn-type dehydrin proteins

实线方框示 DHN 脱水蛋白的保守结构区段 S 片段;虚线方框示 DHN 脱水蛋白的保守结构区段 K 片段;The conserved S-segment and K-segment of MrDHN3 and other SKn-type dehydrin proteins are boxed;TrDHN3:白三叶 *T. repens* (ADD09573. 1);MtDHN3:蒺藜苜蓿 *M. truncatula* (XP\_003603987. 1);PsDHN3:豌豆 *P. sativum* (CAA78515. 1);CaDHN3:鹰嘴豆 *C. arietinum* (XP\_004500781. 1).

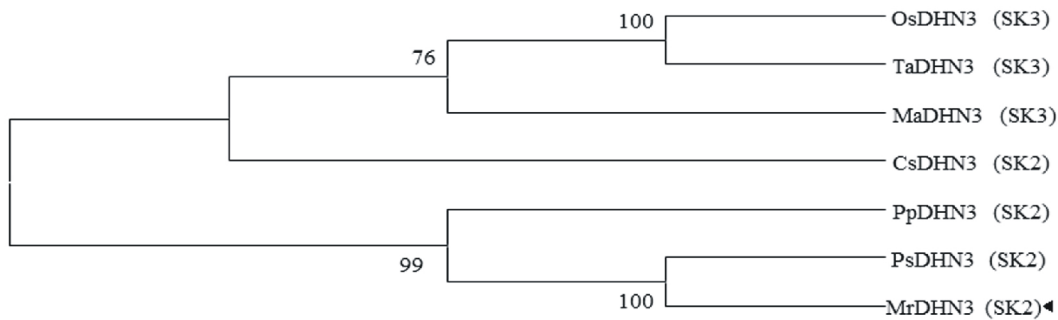


图3 MrDHN3 脱水蛋白与其他物种 SKn 类脱水蛋白构建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree between MrDHN3 and other SKn-type dehydrin proteins

OsDHN3: 粳稻 *O. sativa* Japonica Group (ABS44866. 1); TaDHN3: 小麦 *T. aestivum* (AAB18202. 1); MaDHN3: 大蕉 *Musa* ABB Group (AEI54683. 1); CsDHN3: 茶 *Camellia sinensis* (ACT10283. 1); PpDHN3: 桃 *Amygdalus persica* (AAZ83586. 1); PsDHN3: 豌豆 *P. sativum* (AAL50315. 1).

2.2 MrDHN3 基因在非生物胁迫下表达特性

为分析 MrDHN3 是否受非生物胁迫和 ABA 处理诱导表达,以组成型表达的基因 Mr18S 为内参,利用实时荧光定量 PCR 定量检测 MrDHN3 基因在各非生物胁迫,低温、高盐、室温脱水以及外源 ABA 处理下的相对表达量(图 4)。结果显示,MrDHN3 基因在不同处理条件下的表达特性是有差异的。在低温(图 4A)和脱水胁迫(图 4C)处理下,MrDHN3 的表达量呈逐步上升的趋势,在胁迫处理 24 和 12 h 时相对表达量达到最高,分别约为对照的 2.7 和 6.9 倍;不同于低温和脱水胁迫,MrDHN3 的相对表达量在 NaCl 胁迫(图 4B)1 h 时快速积累



达到对照的 4.8 倍,在 ABA 处理(图 4D)3 h 时达到对照的 6 倍,之后逐渐降低到与对照相当的表达水平。由此可见,*MrDHN3* 基因的表达受各种非生物胁迫和 ABA 的诱导。表明 *MrDHN3* 基因参与了 ABA 及干旱、低温、盐等非生物胁迫应答反应。

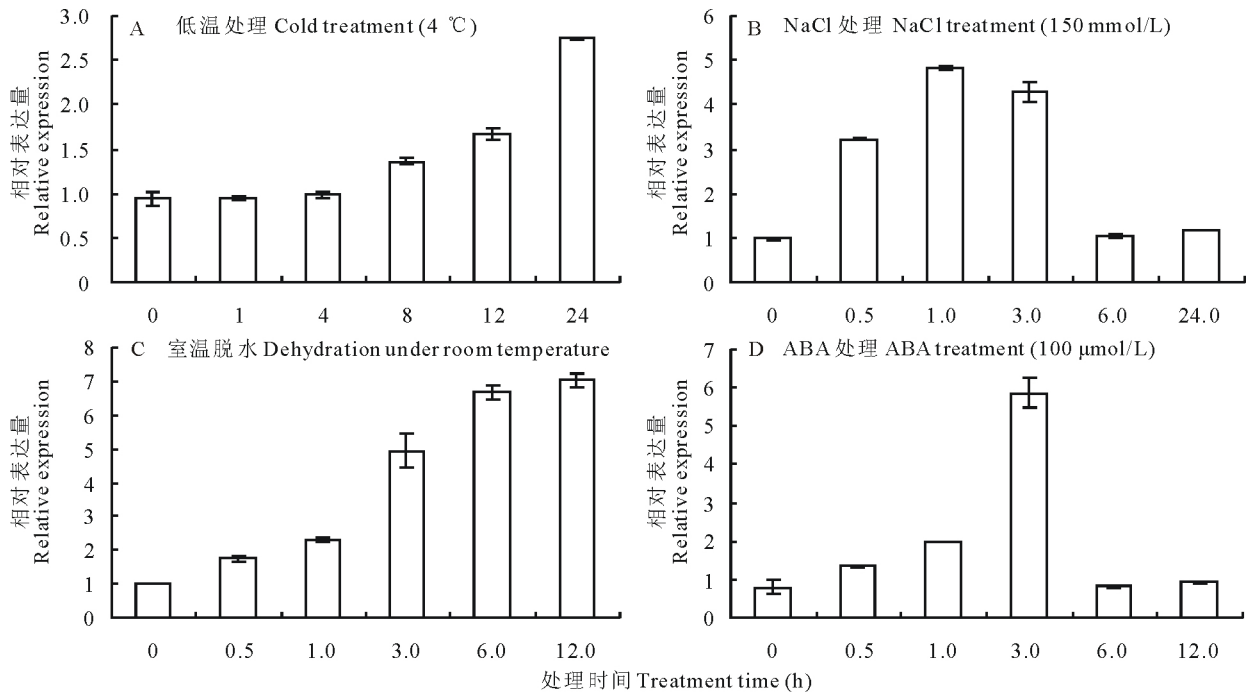


图 4 扁蓿豆 *MrDHN3* 基因在不同非生物胁迫及 ABA 处理下的实时荧光定量 PCR 分析

Fig. 4 Relative expression patterns of *MrDHN3* gene in *M. ruthenica* under various abiotic stresses and ABA treatment

### 2.3 *MrDHN3* 原核表达载体的构建及蛋白的表达特性分析

为了解 *MrDHN3* 在体外非生物胁迫下可能的功能,将 *MrDHN3* 基因的编码区经 *Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切后,重组到 pET30a 表达载体内,得到重组质粒 pET30a-*MrDHN3*。构建的表达载体 pET30a-*MrDHN3* 经酶切鉴定(图 5A)后,以 pET30a 为对照,转入大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)。

含重组质粒的菌体经 IPTG 诱导培养 2 h,用 SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达(图 5B)。与诱导前的样相比(图 5B-1),图 5B-2 显示 1 条约 28 kD 蛋白出现在诱导表达的 BL/*MrDHN3* 中,表明重组蛋白成功表达。但表达的蛋白比融合蛋白的理论分子量略大,推测可能是 *MrDHN3* 含有大量亲水结构域并且重组蛋白 N-端含有碱性残基的 His- 标签序列,阻滞了重组蛋白在 SDS-PAGE 中的泳动,导致表观分子量变大。

诱导表达的菌体破碎后离心,表达的大部分蛋白出现在上清液中(图 5B-3)。另外,经沸水浴处理后,上清液中仍有目标蛋白存在(图 5B-4),这些结果表明目标蛋白 *MrDHN3* 在大肠杆菌中具有一定的亲水性和热稳定性。

### 2.4 过表达 *MrDHN3* 对大肠杆菌的逆境胁迫保护

为检测不同逆境胁迫条件下过表达 *MrDHN3* 对重组大肠杆菌的作用,将 BL/pET30a 和 BL/*MrDHN3* 菌体滴加到含不同胁迫因子的 LB 培养基上,观察菌落形成情况(图 6A)。结果显示,BL/*MrDHN3* 和对照 BL/pET30a 之间在克隆形成数和生长速率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 BL/pET30a,添加 0.5 mol/L KCl 的结果与之相同。以上结果表明过表达 *MrDHN3* 能显著增强大肠杆菌对盐的耐受性。在热胁迫下,经 55 °C 胁迫处理 30 min 后大部分 BL/pET30a 菌死亡。而同样条件下,BL/*MrDHN3* 的菌体存活率高于对照。该结果表明,过表达 *MrDHN3* 能显著增强大肠杆菌对高温胁迫的抗性。

菌落计数结果(图 6B)显示,在 0.5 mol/L NaCl 和 KCl 高盐胁迫下,BL/*MrDHN3* 的菌落形成率分别为

16.71%和20.80%,对照 BL/pET30a 的菌落形成率仅为 3.55%和 4.29%;55 °C 高温处理后, BL/MrDHN3 的菌落形成率为 11.22%,对照 BL/pET30a 的菌落形成率为 2.40%。胁迫条件下, BL/MrDHN3 的菌落形成率是 BL/pET30a 的 4~5 倍,表明 MrDHN3 能显著增强宿主菌对盐和热的抗性,与菌落定性分析结果一致。

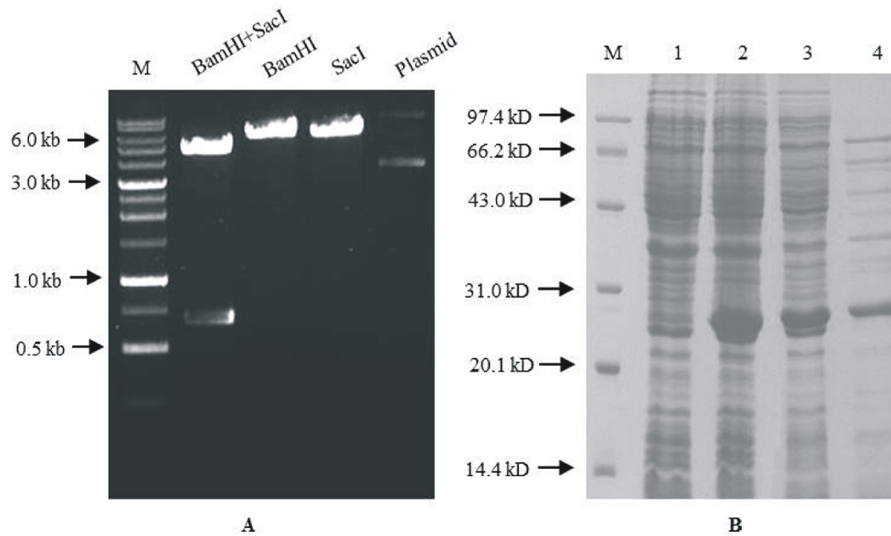


图 5 MrDHN3 原核表达载体的鉴定(A)及原核表达产物的 SDS-PAGE 分析(B)

Fig. 5 Identification of pET30a-MrDHN3 by enzymatic digestion (A) and analysis of prokaryotic expression products by SDS-PAGE (B)

M: 1 kb DNA Ladder(A), 低分子量标准蛋白(B); 1: IPTG 诱导前的 BL/MrDHN3 表达产物; 2: IPTG 诱导后的 BL/MrDHN3 表达产物; 3: 上清液中诱导表达的 BL/MrDHN3; 4: 上清液 100 °C 处理 10 min 后的表达产物。M: 1 kb DNA Ladder (A), LMW Markers Proteins (B); Lane 1: Total protein fraction from non-induced BL/MrDHN3 cells; Lane 2: Total protein fraction from IPTG-induced BL/MrDHN3 cells; Lane 3: Soluble supernatant protein fraction from IPTG-induced BL/MrDHN3 cells; Lane 4: Protein fraction from soluble supernatant, which boiled at 100 °C for 10 min.

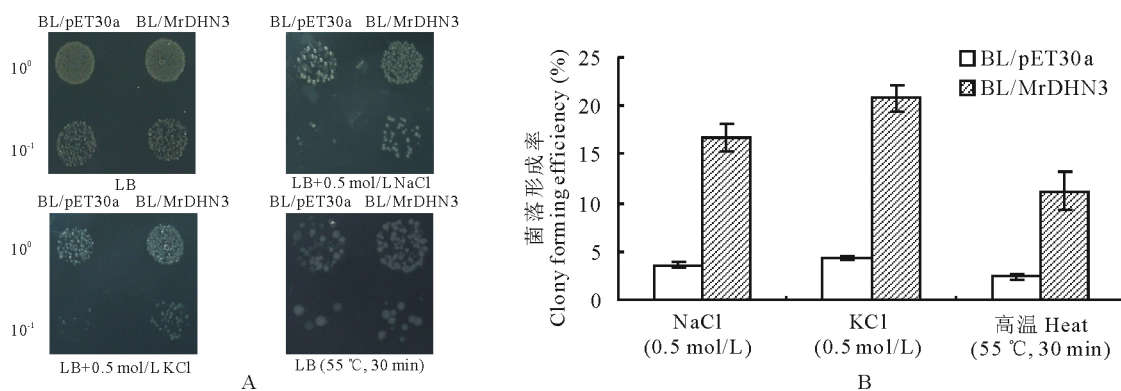


图 6 MrDHN3 蛋白过表达对大肠杆菌在逆境胁迫下的保护效果

Fig. 6 Effects of MrDHN3 over-expression on protection of *E. coli* against injury under abiotic stresses

A: 菌液滴板试验; B: 菌落形成率测定; BL/pET30a: 含有 pET30a(+) 质粒的 BL21(DE3) 大肠杆菌; BL/MrDHN3: 含有 pET30a-MrDHN3 质粒的 BL21(DE3) 大肠杆菌; LB: Luria-Bertani (LB) 固体培养基添加有 0.5 mmol/L IPTG; LB+0.5 mol/L NaCl: LB 固体培养基添加 0.5 mmol/L IPTG 和 0.5 mol/L NaCl; LB+0.5 mol/L KCl: LB 固体培养基添加 0.5 mmol/L IPTG 和 0.5 mol/L KCl; LB(55 °C, 30 min): 55 °C 热处理 30 min。A: Spotting assays; B: Colony forming efficiency assays; BL/pET30a: pET-30a(+) plasmid harboring BL21(DE3) strain; BL/MrDHN3: pET30a-MrDHN3 plasmid harboring BL21(DE3) strain; LB: Luria-Bertani (LB) solid medium with 0.5 mmol/L IPTG; LB+0.5 mol/L NaCl: LB solid medium with 0.5 mmol/L IPTG and 0.5 mol/L NaCl; LB+0.5 mol/L KCl: LB solid medium with 0.5 mmol/L IPTG and 0.5 mol/L KCl; LB (55 °C, 30 min): Incubation at 55 °C for 30 min.

### 3 讨论

脱水素(dehydrin)为 LEA 蛋白 DII 家族成员。本研究所克隆的 *MrDHN3* 基因含 1 个 S 片段和 2 个 K 片段,为 SK2 类脱水蛋白。SKn 类脱水蛋白是一类酸性蛋白,受低温、高盐、干旱、机械损伤及脱落酸信号的调节<sup>[17]</sup>。小麦 *wzy1-2* 基因编码一个 SK3 类脱水蛋白,其 mRNA 的表达量在低温、渗透胁迫及 ABA 诱导下上调<sup>[18]</sup>。紫花针茅(*Stipa purpurea*)SK3 型脱水蛋白基因 *SpDHN1* 在干旱胁迫时表达<sup>[19]</sup>。本研究中扁蓿豆 SK2 型脱水蛋白基因 *MrDHN3* 在低温、干旱、盐及 ABA 处理下表达都有上调,由此推测 *MrDHN3* 的表达与积累和扁蓿豆抗逆性之间存在正相关关系。

众多研究为异源表达 dehydrins(DHNs)基因能增强植物和细菌的非生物胁迫抗性提供了直接的证据。Ochoa-Alfaro 等<sup>[20]</sup>发现转扭刺仙人掌(*Opuntia streptacantha*)SK3 型脱水蛋白基因 *OpsDHN1* 的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)抗冻能力提高。Lakshmi 等<sup>[21]</sup>研究发现,超表达高粱(*Sorghum bicolor*)SK2 型脱水蛋白基因 *SbDHN1* 到烟草(*Nicotiana tabacum*)中可以增强其对干旱和盐胁迫的抗性。目前,关于原核表达植物脱水蛋白基因提高大肠杆菌抗性的研究也有很多。原核表达大豆(*Glycine max*)KS 型脱水基因 *SLT1629* 可提高大肠杆菌抗盐能力<sup>[22]</sup>。过表达沙冬青(*Ammopi pthanthus mongolicus*)KS 类脱水蛋白 AmCIP 到大肠杆菌可增强宿主菌对低温胁迫的耐受性<sup>[23]</sup>。本研究将 *MrDHN3* 编码区连接到 pET30a 表达载体上,异源表达 *MrDHN3* 到大肠杆菌中,发现 *MrDHN3* 与维持大肠杆菌在盐和高温胁迫条件下的存活有密切联系,说明植物基因可以提高宿主菌的抗胁迫能力。基于以上研究,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。

高盐和极端温度胁迫会引起胞内脱水,也可导致蛋白及细胞膜的损伤<sup>[24]</sup>。本研究显示,重组的大肠杆菌细胞对盐和高温胁迫的抗性增强,表明过表达扁蓿豆 *MrDHN3* 基因可以使宿主菌的蛋白、细胞膜、细胞免受损伤。本研究预测扁蓿豆 *MrDHN3* 基因编码一个酸性蛋白,总平均疏水性指数为 -1.444,具有较高的亲水性。在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达的 *MrDHN3* 呈水溶性和热稳定性。有报道指出,脱水蛋白含有高比例的亲水性氨基酸残基,在水溶液中呈高度无序的柔性状态<sup>[25]</sup>。当处于脱水环境下,其构象会发生改变,K 片段可形成双亲性  $\alpha$ -螺旋结构<sup>[26]</sup>,可与其他蛋白部分脱水的表面及生物膜表面相互作用,进而保护该蛋白免受更进一步脱水导致的不可逆的蛋白变性<sup>[27]</sup>。S 片段可以被酪蛋白激酶磷酸化<sup>[28]</sup>,从而具有  $Ca^{2+}$  结合活性<sup>[29]</sup>。此外 DHNs 中的组氨酸也可与  $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和  $Fe^{2+}$  等金属离子结合<sup>[30]</sup>。因此可以推测,在逆境胁迫条件下,*MrDHN3* 中的 K 片段可维持膜系统的稳定性,防止其在高温下的聚集;酸性的 SKn 蛋白可作为离子缓冲液或伴侣分子稳定受胁迫细胞的蛋白、核酸和膜结构,减少细胞脱水过程中盐分沉淀和结晶,从而减轻高盐胁迫对重组菌的毒害,提高转化子的存活率。

本研究中,虽然 *MrDHN3* 蛋白可明显提高大肠杆菌的耐盐和耐高温能力,但对低温胁迫及山梨醇和甘露醇模拟的渗透胁迫未表现出明显的抗性,其可能的原因是 *MrDHN3* 对不同胁迫保护存在机制上的差异性。这与 Zhang 等<sup>[31]</sup>和 Lan 等<sup>[32]</sup>的研究结果类似,他们发现不同组的 LEA 基因在渗透胁迫中的保护机制不同。

总之本研究克隆并分析了扁蓿豆 *MrDHN3* 基因,结果表明,*MrDHN3* 为 SK2 类 LEAII 蛋白,*MrDHN3* 基因受脱水等非生物胁迫及外源激素 ABA 诱导表达,异源表达 *MrDHN3* 蛋白到大肠杆菌中能显著增强宿主菌对盐和高温的胁迫耐受性。推测超表达 *MrDHN3* 在提高植物的逆境胁迫耐受性方面有一定的作用,以后可用于作物抗逆基因工程改良研究中。未来,对于过表达 *MrDHN3* 到植物体中是否能提高作物的抗胁迫能力还有待进一步研究。

### References:

- [1] Hanin M, Brini F, Ebel C, et al. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(10): 1503-1509.
- [2] Tunnacliffe A, Wise M J. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 2007, 94(10): 791-812.
- [3] Allagulova C R, Gimalov F R, Shakirova F M, et al. The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, 68(9): 945-951.



- [4] Close T J. Dehydrins: a commonality in the response of plant to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*, 1997, 100(2): 291-296.
- [5] Close T J, Bray E A. Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress[C]. *Riverside Symposium in Plant Physiology 1993*: University of California, Riverside. American Society of Plant Physiologists, 1993.
- [6] Campbell S A, Close T J. Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytologist*, 1997, 137: 61-74.
- [7] Hara M. The multifunctionality of dehydrins: an overview. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5(5): 503-508.
- [8] Small E, Jomphe M. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany*, 1989, 67(11): 3260-3294.
- [9] Hao J H, Shi F L. Study on drought resistance of *Medicago ruthenica* accessions. *Chinese Journal of Grassland*, 2006, 28: 39-42.
- [10] Campbell T A, Bao G, Xia Z L. Completion of the agronomic evaluations of *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour] germplasm collected in Inner Mongolia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1999, 46(5): 477-484.
- [11] Yang J Y, Zheng W, Tian Y, *et al.* Effects of various mixed salt-alkaline stresses on growth, photosynthesis, and photosynthetic pigment concentrations of *Medicago ruthenica* seedlings. *Photosynthetica*, 2011, 49(2): 275-284.
- [12] Liu Z Y, Li X L, Qi X, *et al.* Alfalfa science research by Chinese scholars science 1950: history and main topics. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(10): 58-69.
- [13] Rorat T. Plant dehydrins-tissue location, structure and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2006, 11(4): 536-556.
- [14] Battaglia M, Covarrubias A A. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 190.
- [15] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [16] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [17] Kalembe E M, Bagniewska-Zadworna A, Ratajczak E. Multiple subcellular localizations of dehydrin-like proteins in the embryonic axes of common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds during maturation and dry storage. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34(1): 137-149.
- [18] Zhu W, Zhang D, Lu X, *et al.* Characterisation of an SKn-type dehydrin promoter from wheat and its responsiveness to various abiotic and biotic stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 32(3): 664-678.
- [19] Yang Y, Sun X, Yang S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel SK3-type dehydrin gene from *Stipa purpurea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 448(2): 145-150.
- [20] Ochoa-Alfaro A E, Rodríguez-Kessler M, Pérez-Morales M B, *et al.* Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta*, 2012, 235(3): 565-578.
- [21] Lakshmi T V, Varalaxmi Y, Yadav S K, *et al.* Metabolic engineering of SK2-type of dehydrin1 (DHN1) gene isolated from *Sorghum bicolor* enhances tolerance to water-deficit and NaCl stresses in transgenic tobacco. *Plant Omics*, 2015, 8(6): 556.
- [22] Chung E S, Cho C W, Kim K M, *et al.* Ectopic expression of soybean KS-type dehydrin, SLTI66 and SLTI629 conferred tolerance against osmotic and metal stresses of *Escherichia coli* and *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biotechnology*, 2009, 36(1): 38-44.
- [23] Shi J, Liu M, Chen Y, *et al.* Heterologous expression of the dehydrin-like protein gene AmCIP from *Ammopiptanthus mongolicus* enhances viability of *Escherichia coli* and tobacco under cold stress. *Plant Growth Regulation*, 2015, 79(1): 1-10.
- [24] Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 2003, 218: 1-14.
- [25] Mouillon J, Eriksson S K, Harryson P. Mimicking the plant cell interior under water stress by macromolecular crowding: disordered dehydrin proteins are highly resistant to structural collapse. *Plant Physiology*, 2008, 148: 1925-1937.
- [26] Graether S P, Boddington K F. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 576.
- [27] Rahman L N, Chen L, Nazim S, *et al.* Interactions of intrinsically disordered *Thellungiella salsuginea* dehydrins TsDHN-1 and TsDHN-2 with membranes-synergistic effects of lipid composition and temperature on secondary structure. *Biochemistry and Cell Biology*, 2010, 88(5): 791-807.
- [28] Kosová K, Vítámvás P, Prášil I T. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity-what can LEA-II proteins tell us about plant stress response. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 343.

- [29] Alsheikh M K, Svensson J T, Randall S K. Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant, Cell & Environment*, 2005, 28(9): 1114-1122.
- [30] Hara M, Fujinaga M, Kuboi T. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56: 2695-2703.
- [31] Zhang L, Ohta A, Takagi M, *et al.* Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *Journal of Biochemistry*, 2000, 127(4): 611-616.
- [32] Lan Y, Cai D, Zheng Y Z. Expression of three different group soybean lea genes enhanced stress tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 42(5): 613-621.

#### 参考文献:

- [9] 郝建辉, 石凤翎. 不同扁蓊豆材料抗旱性比较研究. *中国草地学报*, 2006, 28(3): 39-42.
- [12] 刘志英, 李西良, 齐晓, 等. 1950 年以来中国学者对苜蓿属的研究: 历史脉络与启示. *草业学报*, 2015, 24(10): 58-69.