

蒙古冰草 *Lea3* 抗旱基因片段的分离与鉴定

赵彦^{1,2}, 云锦凤¹, 石凤敏¹, 高翠萍¹

(1. 内蒙古农业大学 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要: 研究旨在利用同源序列法分离蒙古冰草抗旱基因同源片段。根据已知禾本科植物抗旱基因 *Lea* 第 3 组的保守区段设计一对简并引物, 采用 PCR 方法对蒙古冰草幼苗的基因组 DNA 进行扩增。获得了 1 个蒙古冰草的抗旱基因 *Lea3* 基因片段, 长度为 497 bp, 包含 124 bp 的非翻译区, 共编码 124 个氨基酸。核苷酸序列分析表明, 该序列与小麦抗旱基因 *LEA* 第 3 组的 *Wrab19* 同源率为 93%, 与小麦受 ABA 诱导的 *WRAB1* 基因同源率为 93%; 与一个来源于玉米 mRNA 的逆境胁迫基因克隆 9124 同源率为 96%; 与小麦受 ABA 诱导的 *pHVA1* 基因同源率为 94%; 与小麦 *HVA1* 基因同源率为 91%。Southern 杂交表明该基因在蒙古冰草基因组中以基因家族形式存在。

关键词: 蒙古冰草; *Lea* 基因; 同源序列

中图分类号: S543 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)06-0064-04

Isolation and Characterization of a *Lea3* Gene Fragment from *Agropyron mongolicum* Keng

ZHAO Yan^{1,2}, YUN Jin-feng¹, SHI Feng-min¹, GAO Cui-ping¹

(1. College of Entironment, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

2. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: In this study, drought resistance gene homology fragment from *Agropyron mongolicum* Keng was isolated using homology-based method. A pair of degeneracy primers was designed according to the amino acid conserved regions of the cloned *Gramineae* plant group 3 *Lea* genes. One drought resistance gene has been obtained, by the polymerase chain reaction (PCR) using the genomic DNA of *A. mongolicum* Keng as template. It was named as *Lea3*. The nucleotide sequences was 497 bp, including 124 bp untranslated region, and encoded 124 amino acids. Homology research showed that the nucleotides of *Lea3* was 93% identical to wheat group 3 *Lea* gene *Wrab19*, 93% identical to wheat gene *WRAB1*, 96% identical to the clone 9124 from the mRNA of maize, 94% identical to barley gene *pHVA1*, and 91% identical to barley gene *HVA1*. the analysis of its secondary structure and hydrophilicity indicated that 2-helices were predominant feature of secondary structure, and this gene had high hydrophilic property. The result of Southern blot analysis revealed the existence of an *Lea3* gene family in the *A. mongolicum* Keng genome.

Key words: *Agropyron mongolicum* Keng; *Lea* gene; Homology Sequence

干旱、盐渍和低温都能使植物产生由于细胞水分亏缺引起的生理干旱, 影响植物的正常生长发育^[1-3]。经过多年的研究, 人们已经在干旱对植物产生危害或植物耐干旱的机制方面取得了许多进展。进一步加强具有抗旱基因资源的发掘和创新, 开展抗旱生理和遗传学研究, 利用基因工程技术实现不同物种间抗旱基因的转移, 提高植物的耐旱能力是目前研究的热点之一^[4]。

Lea (Late embryogenesis abundant protein) 称为晚期胚胎发生丰富蛋白基因, 是在种子成熟和发育阶段表达的基因。这类基因与植物耐脱水性密切相关, 受植物的发育阶段、ABA 和脱水信号等调节, 在植物的许多组织器官中都有表达。*Lea* 基因在植物受到干旱、低温和盐渍等环境胁迫后造成脱水的营养组织中有所表达, 从而在种子发育过程中的胚胎晚期引起 *Lea* 基因编码的 LEA 蛋白的高度富集。

收稿日期: 2008-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30760159); 国家“973”项目子课题 (2007CB108901-1)

作者简介: 赵彦 (1977-), 女, 内蒙古通辽人, 助理研究员, 在读博士, 主要从事植物分子遗传学研究。

通讯作者: 云锦凤 (1941-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 博士生导师, 主要从事牧草遗传育种研究。

LEA 蛋白具有高度亲水性,因此有利于 LEA 蛋白在植物受到干旱失水时部分替代水分子,提高植物的抗旱能力^[5]。

1981 年 Dure 等^[6]首次在胚胎发育后期的棉花子叶中分离到了一组丰富的 mRNA,命名为 *Lea* mRNA,随后人们在小麦、大麦胚中也发现了几十种 LEA 蛋白。现在普遍采用免疫学方法和分子杂交来鉴别这类特异蛋白,先后已在近 20 种高等植物发育种子中检测到 LEA 蛋白,表明这类蛋白在植物中表达具有普遍性^[7]。但在国内外诸多 *Lea* 基因的相关报道中未见有关蒙古冰草抗旱基因的文献资料,本研究根据 *Lea* 第 3 组基因的保守区段设计简并引物,从抗逆性极强的禾本科优良牧草 - 蒙古冰草中分离抗旱基因同源序列,并进行同源性比较及在基因组中分布情况的初步研究,以期利用同源序列克隆技术获得蒙古冰草抗旱基因奠定基础,同时填补该领域研究的空白。

1 材料和方法

1.1 材料

蒙古冰草 (*Agropyron mongolicum* Keng) 由内蒙古农业大学牧草试验站提供种子,在生态环境学院智能型温室播种,待出苗后 28 ~ 35 d 取叶片进行基因组 DNA 提取。

1.2 试验方法

1.2.1 简并引物的设计及合成 从 GeneBank 中查找禾本科植物中已知的第 3 组 LEA 蛋白的序列,比较这些序列的同源性,依据 *Lea* 基因的保守氨基酸序列,参考国内外资料报道的简并引物设计原则,运用 DNAMAN 软件辅助分析设计 1 对简并引物。选择保守性的氨基酸序列为:(N 端) AGETKA (C 端) 和 (N 端) GKDKTG (C 端),设计的简并引物如下:

上游简并引物 P7:5' - CCNGGNGARACNAARCC - 3'

下游简并引物 P8:5' - NCCNGTYTTRTCYTINCC - 3'

送至上海生工生物技术公司合成。

1.2.2 蒙古冰草基因组 DNA 的提取 采用天为时代公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒,具体步骤参照试剂盒说明书操作。

1.2.3 目的基因的 PCR 扩增 以蒙古冰草基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。25 μ L 反应体系包括: PremixTaq 12.5 μ L, DNA 模板 1 μ L (约 30 ng), 简并引物 P7, P8 各 4 μ L, 灭菌超纯水补齐。反应程序为 95 预变性 2 min; 95 变性 30 s, 58 退火 1 min, 72 延伸 2 min, 30 个循环, 72 10 min; 4 保存。

1.2.4 PCR 产物的回收及克隆 PCR 产物经 1.5 %

的琼脂糖凝胶电泳分离,将目的 DNA 片段用天为时代公司琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化,取 5 μ L 回收产物与 pGM-T 载体 16 连接过夜,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, LB 培养基筛选,挑取白斑,提取质粒,PCR 验证插入片段。

1.2.5 Southern 杂交 将蒙古冰草基因组 DNA 用限制性内切酶 *EcoR*, *Hind*, *BamH* 完全消化,在 0.8 % 的琼脂糖凝胶电泳分离,并转到 Hybond-N + 尼龙膜上,按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit Version (Roche) 说明书用 DIG-High Prime 标记克隆的 DNA 片段,以此为探针,40 杂交过夜。次日洗膜、检测。

1.6 测序与序列比较

样品送至上海生工测序。同源性检索和序列分析采用 NCBI 和 DNAMAN 等软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 蒙古冰草 *Lea3* 基因片段的分离

根据 *Lea* 基因第 3 组保守区段设计的 1 对简并引物 P7、P8,以蒙古冰草幼苗基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,经 1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳,获得 1 条约 500 bp 的条带 (图 1)。回收该条带,经连接、转化、检测,将鉴定为阳性的单克隆 (图 2),送至上海生工进行测序。

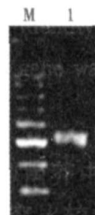


图 1 PCR 扩增片段电泳

Fig. 1 Amplification of *Lea3* DNA via PCR

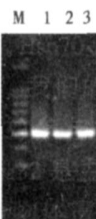


图 2 阳性克隆的 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR identifying of positive clone

2.2 *Lea* 基因的序列分析

测序结果表明,该片段长度为 497 bp。利用 NCBI 中 Blast 和 DNAMAN 软件进行序列分析,发现该序列在 22 ~ 146 bp 为非编码区,长度为 124 bp。将得到的非编码区两端的序列拼接后推测其氨基酸序列,共编码 124 个氨基酸 (图 3)。该序列氨基酸组成中,Ala (丙氨酸) 占 21.49 %, Lys (赖氨酸) 占

15.70%, Thr(苏氨酸)占13.22%,这3种氨基酸含量较高,约占总量的50%。而Cys(半胱氨酸)、Pro(脯氨酸)、Tyr(色氨酸)、His(组氨酸)、Ile(异亮氨

酸)、Phe(苯丙氨酸)、Asn(天冬酰胺)则不存在,这与大多数LEA蛋白质中不含有色氨酸和半胱氨酸的结果一致^[8]。

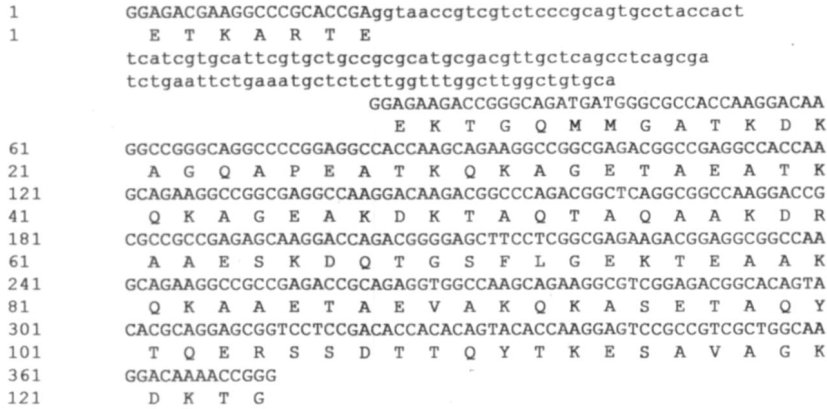


图3 蒙古冰草抗旱基因 *Lea3* 的外显子核苷酸拼接序列及氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide and amino acid sequence of *Lea3* gene in *A. mongolicum* Keng

2.3 *Lea* 基因序列同源性比较与聚类分析

对该片段的核苷酸序列在 GeneBank 中进行 Blast 分析,结果表明,该片段与小麦抗旱基因 *Lea* 第3组的 *Wrab19*(AF255052) 同源性为93%,与小麦受 ABA 诱导的 *WRAB1*(AF139915) 基因同源性为93%;与一个来源于玉米 mRNA 的受逆境胁迫诱导的基因克隆 9124(DQ244556) 同源性为96%;与大麦受 ABA 诱导的 *pHVA1*(X13498) 基因同源性为94%;与大麦 *HVA1*(X78205) 基因同源性为91%。从核苷酸序列对比的结果可以得出的结论是:与该基因片段同源性较高的基因都属于第3组 *Lea* 基因。

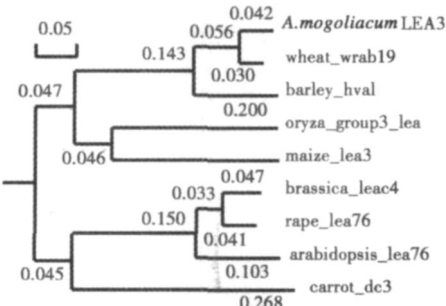


图4 蒙古冰草 *Lea3* 基因片段与8个 *Lea* 基因的聚类分析结果

Fig.4 Phylogenetic tree based on alignment of the deduced amino-acid sequences of *Lea* homologue of 8 known genes

利用 NCBI 中的 BLAST 软件和 DNAMAN 软件,对该片段与已知的8个植物 *Lea* 基因在氨基酸水平上进行聚类分析并绘制系统进化树(图4)。结果表明,这9种植物 *Lea* 基因聚为2个类群。5个禾本科植物 *Lea* 基因聚为一类,其中蒙古冰草 *LEA3* 与小麦 *wrab19* 基因亲缘关系最近,较早地聚到一起,与大麦 *HVA1* 基因亲缘关系较近,这3种植物 *Lea* 基因可聚为一个亚类;水稻、玉米 *Lea* 基因为另一亚类。其他4种双子叶植物 *Lea* 基因聚为一类,其中

拟南芥、油菜、葡萄 *Lea* 基因聚为一个亚类;胡萝卜 *Dc3* 基因与这3个基因的亲缘关系较远,最终与双子叶植物聚为一类。这9个植物 *Lea* 基因的聚类结果与它们的生物学分类结果相符,说明 *Lea* 基因具有一定的物种保守性。

2.4 二级结构特征及亲水性分析

运用 DNAMAN 软件,对该序列编码氨基酸序列的二级结构和亲水性进行了预测,结果表明,124个氨基酸在亲水性方面呈现一定的周期性,形成几个亲水性高峰(图5),有利于形成兼性 α -螺旋结构。从而达到结合水分子以保护细胞免受水分亏缺时的伤害^[9]。在二级结构的分析中, α -螺旋占结构的主导,其高频率的 α -螺旋与高频率的亲水高峰相吻合,这充分说明了该基因有很高的亲水性,在水分缺乏时,LEA蛋白的亲水 α -螺旋结构扩大了与离子结合的表面积,并存在着周期性的核电子空间结合位点,在脱水时核电子结合于这些位点,从而缓冲了因脱水使离子强度提高造成的细胞伤害^[8,10],从而证明了该二级结构与 LEA 蛋白的抗旱功能相关。

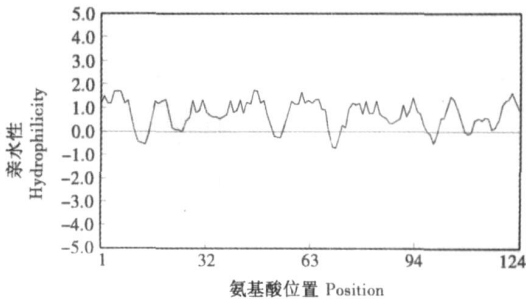


图5 蒙古冰草 *Lea3* 基因片段的亲水性分析
Fig.5 Hydrophilicity analysis of *Lea3* gene fragment in *A. mongolicum* Keng

综上所述,通过对本研究分离的 *Lea3* 基因片段的核酸和氨基酸序列进行生物信息学分析,能够证

明该片段为第 3 组 *Lea*, 并预测出该基因可能具有很高的亲水性。

2.5 Southern 杂交分析

用 3 种限制性内切酶 *EcoR*、*Hind*、*BamH* 酶切蒙古冰草基因组 DNA, 以 *Lea3* 基因片段为探针进行 Southern 杂交, 结果表明, 在每一组酶切中有 2~4 条带(图 6), 由于 *Lea3* 序列中无这 3 种限制性内切酶酶切位点, 表明该基因在蒙古冰草基因组中可能以基因家族形式存在。



图 6 *Lea3* 基因片段 Southern 杂交结果

Fig. 6 Southern hybridization patterns of genomic DNA from *A. mongolicum* Keng digested with restriction endonucleases *EcoR*, *Hind*, *BamH* using *Lea3* as the probe

3 结论与讨论

LEA 蛋白共同的结构特征是偏性氨基酸组成形成高度亲水性的多肽, 缺乏半胱氨酸和酪氨酸残基, 但富含赖氨酸和甘氨酸。本研究获得的蒙古冰草 *Lea3* 基因片段同样富含赖氨酸和甘氨酸, 缺乏半胱氨酸和酪氨酸残基, 并形成亲水性 α -螺旋结构, 这与人研究结果一致。据其氨基酸序列特征, LEA 蛋白可划分为 3 个主要的组, 即 group 1 LEA 蛋白、group 2 LEA 蛋白、group 3 LEA 蛋白^[10]。随着科技的发展, 新的组不断地被发现, 1993 年 Bray 根据氨基酸序列的同源性以及一些特殊的基元序列, 把 LEA 蛋白分为 6 组^[11]。

第 3 组 *Lea* 基因序列的保守性强, 该组 LEA 蛋白的同源序列区域包括 11 mers 氨基酸基元序列的串联重复排列, 其表达所产生的蛋白质具有规律性的兼性 α -螺旋结构^[8]。研究表明, 这些基因的表达或蛋白累积与植物的渗透胁迫抗性成正相关。例如, 在严重干旱的小麦幼苗中, 第 3 组 LEA 蛋白累积量的大小与组织的耐旱能力密切相关^[12]。此外, 脱水还可造成 *Lea* mRNAs, 包括第 3 组 *Lea* mRNA 转录水平的增加, 故第 3 组 *Lea* 与植物抗旱相关^[13]。另有研究表明, 大多数 LEA 蛋白主要由碱性的亲水氨基酸组成, 无半胱氨酸和色氨酸, 其疏水面有利于形成同型二聚体, 处在表面带电的基团, 可中和因

脱水而增加的离子。由 LEA 蛋白的结构, 推测其功能是在种子成熟干燥过程中, 或渗透胁迫条件下保护细胞免受水势降低的损伤^[6-8]。而 *Lea* 基因表达与植物的环境胁迫成正相关, 在胁迫条件下, LEA 蛋白在植物细胞中起保护作用。所以该组 *Lea* 基因得到了人们的广泛重视, 已成为在众多的 *Lea* 基因中的研究重点^[14]。本研究得到的蒙古冰草 *Lea3* 抗旱基因片段, 经过核苷酸及氨基酸序列对比分析确定为第 3 组 LEA 蛋白成员。目前对该片段的进一步研究正在进行中。

LEA 蛋白的研究虽然已取得了一些进展, 但至今为止, 对多数 LEA 蛋白的功能及其表达机理仍不是很清楚。从目前研究结果分析, LEA 蛋白不仅与种子的脱水耐受性有关, 也与干旱胁迫、ABA 诱导有密切联系。由于 LEA 蛋白存在多种功能, 与植物的抗逆性有密切关系, 分离、克隆与植物抗逆有关的 *Lea* 基因, 可以用于植物的抗逆性基因工程育种, 特别是抗旱育种^[14]。因此对 LEA 蛋白的深入研究不仅可以从分子水平上了解植物的抗逆机制, 而且可以为植物抗逆性调节提供新的思路, 也可为利用基因工程技术改良作物奠定基础。

参考文献:

- [1] 俞嘉宁, 山 仑. LEA 蛋白与植物的抗旱性[J]. 生物工程进展, 2002, 22(2): 10-14.
- [2] 刘娥娥, 汪沛洪, 郭振飞. 植物的抗旱诱导蛋白[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(2): 155-160.
- [3] 张永恩, 李潮海, 王 群. 植物抗旱相关基因研究进展[J]. 中国农学通报, 2004, 20(6): 85-88.
- [4] 孙立平, 李德全. LEA 蛋白的分子生物学研究进展[J]. 生物技术通报, 2003(6): 5-13.
- [5] 马媛媛. 抗旱基因 LEA 的克隆及其序列解析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2003.
- [6] Dare L, Greanway S C, Galau G A. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: changing mRNA population as shown in vitro and in vivo protein synthesis[J]. Biochemistry, 1981, 20: 4162-4168.
- [7] Dure L, Crouch M, Harada J, et al. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants[J]. Plant Mol Biol, 1989, 12: 475-486.
- [8] Dure L. A repeating 11-mers amino acid motif and plant desiccation[J]. Plant J, 1993, 3: 363-369.
- [9] Hsing Y C, Chen Z Y, Shin M D, et al. Unusual sequence of groups 3 *Lea* mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds[J]. Plant Mol Biol, 1995, 29: 863-868.
- [10] Baker. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton[J]. Plant Mol Biol, 1988, 11: 277-291.
- [11] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plant[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 377-403.
- [12] Ried J L, Walker-Simmons M K. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Plant Physiol, 1993, 102: 125-131.
- [13] Chandler P M, Robertson M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1994, 45: 113-141.
- [14] 赖钟雄, 张妙霞, 李冬梅. 植物 LEA 蛋白与 *Lea* 基因表达[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2002, 31(4): 463-466.