

逆境胁迫下柽柳脂质转运蛋白基因 (*ThLTP*)的克隆与功能初步分析

林琳, 李健, 李慧玉, 穆怀志, 姜静*

(东北林业大学, 林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 从以刚毛柽柳为材料构建的 NaCl 胁迫的根 cDNA 文库中测序得到 1 条 *LTP* 基因序列, 其全长为 635 bp、编码 116 个氨基酸, 命名为 *ThLTP* 基因。采用实时荧光定量 RT-PCR 的方法, 分别对 0.2 mol · L⁻¹ NaCl、150 μmol · L⁻¹ CdCl₂、20% (W/V) PEG6000、100 μmol · L⁻¹ ABA 及 4 °C 下 *ThLTP* 基因在柽柳中的表达模式进行了分析, 结果表明: *ThLTP* 基因除了在 4 °C 条件下根组织中为下调表达外, 在其它处理中均表现为上调表达。将 *ThLTP* 基因克隆到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的原核表达载体 pET32a 中, 对重组菌 *Escherichia coli* BL21(pET32a-LTP) 的抗旱耐盐性进行分析。结果表明: 在 0.8% (W/V) NaCl 和 20% (W/V) PEG6000 条件下, 对照菌 *E. coli* BL21(pET32a) 无对数生长期, 而重组菌 *E. coli* BL21(pET32a-LTP) 经过 3 h 的延迟生长后, 进入到对数增长期, 表明 *ThLTP* 可受盐、碱、低温诱导并能提高重组菌的抗旱耐盐能力。

关键词: 刚毛柽柳; 脂质转移蛋白; 抗旱耐盐性; 表达分析

中图分类号: S793.5

文献标识码: A

Cloning and Function Analysis of *Tamarix hispida* Lipid Transfer Protein under Stress

LIN Lin, LI Jian, LI Hui-yu, MU Huai-zhi, JIANG Jing

(Northeast Forestry University, State Key Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: In this study, a novel *LTP* gene which was named *ThLTP* was cloned from the cDNA library of *Tamarix hispida* root treated by 0.4 mol · L⁻¹ NaCl. The sequence of *ThLTP* was 635 bp in full length, a protein with 116 amino acids residues. The authors examined the expression pattern of the *ThLTP* gene in leaf and root of *T. hispida* treated with 0.2 mol · L⁻¹ NaCl, 150 μmol · L⁻¹ CdCl₂, 20% (W/V) PEG6000, 100 μmol · L⁻¹ ABA and 4 °C stresses for different time using real time RT-PCR. The results showed that the *ThLTP* gene was induced by all the treatments in leaf and root except the treatment of 4 °C treated in root. *ThLTP* was inserted into a prokaryotic expression vector (pET32a) to produce the recombinant expression vector pET32a-LTP. The *Escherichia coli* BL21 (pET32a) could not live but the *E. coli* BL21 (pET32a-LTP) came to the maximum after 3 h delayed growth under the stress of 0.8% (W/V) NaCl and 20% (W/V) PEG6000. The results showed that *ThLTP* may be a salt- and drought-tolerant gene and enhance the stress tolerance of the recombinant.

Key words: *Tamarix hispida*; *LTP*; salt- and drought-tolerant; expression analysis

收稿日期: 2011-11-16

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08009-098B)

作者简介: 林琳(1982—), 女, 黑龙江双鸭山人, 在读博士。

* 通讯作者: 姜静(1960—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 林木遗传育种国家重点实验室(东北林业大学), 教授。

柽柳属(*Tamarix*)植物广泛分布于我国西北地区,具有很强的耐盐碱、抗干旱、耐高温等特性,是荒漠地区盐渍化沙地上良好的固沙造林树种^[1]。刚毛柽柳(*Tamarix hispida* Willd)是柽柳属中耐盐性很强的种类,喜盐、耐水湿,多分布在河流两岸、湖沿边缘等地下水位较高、盐分较重的地区^[2-3],比柽柳属其它植物较耐干旱胁迫和耐低温胁迫^[1,4];因此,刚毛柽柳是进行耐盐耐旱抗低温等机理研究及基因克隆的理想材料之一。

脂质转运蛋白(lipid transfer protein, LTP)为一类多功能的小分子碱性分泌蛋白,占植物细胞可溶性蛋白的4%左右,是植物体内一种重要的防御蛋白,在抵抗和适应外界胁迫的过程中起重要作用^[5]。研究表明,该蛋白不仅参与了植物体内磷脂运输、蜡质分泌^[6-8]、角质合成^[9-10]、信号转导^[11-12]、还参与了植物有性生殖^[13]和对病原菌的防御^[14-15]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* Linn)^[16]、菠菜(*Spinacia oleracea* Linn)^[17]、大麦(*Hordeum vulgare* Linn)^[18-19]和小麦(*Triticum aestivum* Linn)^[20-21]等植物中还发现该蛋白受干旱、重金属、高盐和低温等非生物因子的诱导。因此,LTP基因作为编码LTP蛋白的抗逆基因受到人们的广泛关注。目前,玉米(*Zea mays* Linn)、水稻(*Oryza sativa* Linn)、高粱(*Sorghum vulgare* Pers)、草莓(*Fragaria ananassa* Duch)、蓖麻(*Ricinus communis* Linn)、陆地棉(*Gossypium hirsutum* Linn)、拟南芥、紫杆柽柳(*Tamarix androssowii* Litw)、珙桐(*Davidia involucrata* Baill)、板栗(*Castanea mollissima* Blume)等高等植物的LTP基因已被相继克隆^[15,22-24]。本研究从刚毛柽柳在 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl不同胁迫时间处理根的cDNA文库中获得了1条柽柳脂质转运蛋白基因(*ThLTP*)的全长cDNA序列(EG967210),对该基因进行生物信息学分析,通过荧光定量RT-PCR技术分析几种非生物胁迫及ABA诱导下的柽柳叶和根组织中*ThLTP*基因的表达模式,同时利用重组原核表达系统对*ThLTP*基因抗旱耐盐性进行验证,为该基因在抗逆基因工程育种的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

将3年生刚毛柽柳扦插于沙和草炭土(2:1)的培养基质中置于温室培养。温室的相对湿度为65%~75%,日照14 h,并保证土壤水分充足。待苗

高长至20~30 cm时,选择生长一致的插条分别用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的CdCl₂、20%(W/V) PEG6000、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA漫灌培养基质并在4℃的培养箱进行低温胁迫处理。每个处理均30个插条,于胁迫的0、6、24、48、72 h分别取叶组织和根组织置于-70℃下保存,用于RNA提取。

限制性内切酶、Taq酶、T4-DNA连接酶、DL2000、IPTG、反转录试剂盒Prime Script™ RT Regant Kit均购自宝生物公司,质粒提取试剂盒购自上海华舜公司,定量PCR试剂盒为SYBR Green Realtime PCR Master mix购自日本东洋纺公司,含脂质转运蛋白基因cDNA的质粒pMD18-LTP、原核表达载体pET32a、大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3)均由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 *LTP*基因的获得和序列分析 以 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl胁迫刚毛柽柳根组织构建cDNA文库,通过对文库克隆的随机测序和EST分析获得*ThLTP*基因全长cDNA序列。采用ProtParam(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html/>)分析了*ThLTP*基因编码蛋白的理化性质;用ScanProsite(<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>)分析该蛋白的结构位点;采用ProtScale(http://au.expasy.org/tools/protscale.html)分析该蛋白的疏水性;用BlastX(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)对该基因进行同源性比对,选取与*ThLTP*基因相近的12个物种的LTP基因序列进行ClustalX分析。

1.2.2 不同处理下柽柳*ThLTP*基因的表达分析 采用CTAB法分别提取柽柳根和叶的RNA,经DNase消化后反转录。以反转录产生的cDNA为模版,以18S rRNA、 β -actin、 α -tubulin和 β -tubulin为内参基因(表1),在DNA Engine Opticon™ 2型实时定量PCR仪上完成RT-PCR。反应体系为:2×SYBR Green Realtime PCR Master mix 10 μL 、模板3 μL 、上游引物和下游引物($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各0.5 μL 、用去离子水补足体积20 μL 。定量PCR的反应程序为:94℃预变性2 min,94℃变性10 s,60℃退火15 s,72℃延伸30 s,循环45次,72℃读板1 s,收集荧光,绘制溶解曲线,温度由58℃开始至95℃终止。各反应均设3次重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来确定该基因在不同胁迫处理时间下的相对表达量。

表1 实时定量PCR引物序列

基因名称	登录号	引物名称	引物序列
<i>ThLTP</i>	EG967210	上游引物	5'-CCGTCGTCTCAAAGCTCG-3'
		下游引物	5'-TGGAGCAGTCAAAGCTCC-3'
18S rRNA	EF416283	上游引物	5'-GTACTTGGACCTTGGGGTGG-3'
		下游引物	5'-CATTACTCCGATCCCCGAAAGCC-3'
β -actin	EG971352	上游引物	5'-AAACAATGGCTGATGCTG-3'
		下游引物	5'-ACAATACCGTGCTCAATAGG-3'
α -tublin	EH050602	上游引物	5'-CACCCACCGTTGTTCCAG-3'
		下游引物	5'-ACCGTCGTCATCTTACC-3'
β -tublin	EH052343	上游引物	5'-GGAAGCCATAGAAAGACC-3'
		下游引物	5'-CAACAAATGTGGGATGCT-3'

1.2.3 构建重组 pET32a-LTP 原核表达载体 根据 *ThLTP* 基因的 cDNA 序列,去掉信号肽,设计上下游引物,上游引物加入 BamH I 酶切位点,下游引物加入 Xho I 酶切位点。上游引物为:5'-CGGGATCCG-TACCTCGAGTCTTACCCCTGGAGCAGTCAA-3';下游引物为:5'-CCGCTCGAGTTGACTGCTCCAGGGT-GAAGACTCGAGGTAC-3',以 pMD18-LTP 质粒为模板进行 PCR 扩增,纯化的 PCR 产物和载体 pET-32a 分别经 BamH I 和 Xho I 酶切、纯化回收片段,用 T4 DNA 连接酶连接。将重组质粒(命名为 pET32a-LTP)转化宿主菌 *E. coli* BL21,采用 PCR、酶切和测序等方法对重组质粒进行筛选和鉴定。

1.2.4 *E. coli* BL21 中 *LTP* 基因的诱导表达 无菌条件下挑取 pET32a-LTP 单菌落,转接到 30 mL LB (附加 50 mg · L⁻¹ Amp) 液体培养基中,37 °C 摇菌液至 OD₆₀₀ = 0.5 时,添加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol · L⁻¹,诱导 4 h,离心收集菌体,用 50 μL 1 × PBS 和 50 μL 2 × 上样缓冲液重悬菌体,沸水浴 10 min,12 000 r · min⁻¹,离心 10 min,取 20 μL 上清液进行 12% (W/V) SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.2.5 重组菌 *E. coli* BL21 中 (pET32a-LTP) 的 NaCl、PEG6000 处理 过夜培养 *E. coli* BL21 (pET32a-LTP),按 1:100 比例接种到 LB/Amp 液,培养至 OD₆₀₀ = 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol · L⁻¹ 后继续培养 4 h,用于胁迫处理,同时以 BL21 (pET32a) 菌株作为对照。取上述培养物分别加入 NaCl 和 PEG,终浓度分别为 0.8% (W/V) 和 20% (W/V),每个处理分装 10 支试管中,每只试管加 5 mL,37 °C 振荡培养,每隔 1 h 测定 OD₆₀₀ 值,各处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *ThLTP* 基因的序列分析

通过对刚毛柞柳 cDNA 文库克隆的随机测序,

获得 *ThLTP* 基因的 cDNA 序列,全长 635 bp,应用 NCBI 的 ORF 查找其开放阅读框为 351 bp,5'非编码区 129 bp,3'非编码区 155 bp,编码 116 个氨基酸(图 1)。应用 ExPASy 软件计算 *ThLTP* 基因编码蛋白分子量为 9.63 kD,等电点(pI)为 9.45,为碱性蛋白质。编码该蛋白的中极性氨基酸和带电氨基酸占 70.6%,有 3 个带负电氨基酸(Asp + Glu),有 13 个带正电氨基酸(Arg + Lys + His),该蛋白质属不稳定蛋白,不稳定系数为 64.50,脂肪族氨基酸指数为 83.45;通过 ScanProsite 对的结构位点进行分析预测,在该蛋白序列中有由 4 个保守的二硫键按照固定模式排列的 8 个高度保守的半胱氨酸残基(Cys)位点,有 3 个 N-酰化位点(32-37 GTvvSK,77-82 GClkSA,99-104 GVniGY)氨基酸位置,1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(StpD);ProtScale 对 *ThLTP* 蛋白的疏水性进行分析也表明 N 端显示出较强的疏水性,最高值达 3.056;选取与柞柳 *ThLTP* 相近 12 个物种的 *LTP* 序列利用 NCBI 上的 BlastX 进行同源性比对,ClustalX 分析结果表明:*LTP* 蛋白序列中完全保守的氨基酸残基数为 22 个,占氨基酸总数的 17.90%。表明该类蛋白的保守区较短,与已有物种的同源性在 51%~62% 间(图 2)。

2.2 不同胁迫及 ABA 诱导下柞柳中 *ThLTP* 基因的表达

图 3 表明:0.2% (W/V) NaCl 胁迫下 *ThLTP* 基因在叶和根组织中均为上调表达,胁迫 6 h 的表达量最高,在叶组织中 *ThLTP* 基因的相对表达量是非胁迫处理的 8.5 倍,在根组织中是非胁迫处理的 13.1 倍;胁迫 48 h 时的表达量次之,在叶组织中 *ThLTP* 基因的相对表达量是非胁迫处理的 5.3 倍,而在根组织中是非胁迫处理的 5.2 倍。

```

3   GTC GAC GGT ACC GGA CAT ATG CCC GGG AAT TCG GCC ATT ACG GCC   47
48  GGG GAC CCC AAC ACT AAA TTC GGT CTT CGA TTT CCC AGA TCC ACT   92
93  TCA CCA ATT AAC AAG AAG CGG CCC CCT TTG AAA AAA AAA ATG GCA   137
                                     M   A   1
138 GGC TCT TCC GCC CTG TTC AAG CTC GCT TGC TTA GTT GCC GCG TTC   182
   2   G   S   S   A   L   F   K   L   A   C   L   V   A   A   F   16
183 ATG ATT GTA TCT GCG CCA CAT GCA GAA GCT GCC ATA TCA TGC GGT   227
   17  M   I   V   S   A   P   H   A   E   A   A   I   S   C   G   31
228 ACC GTC GTC TCA AAG CTC GCC CCA TGC CTC GGC TTT CTC AGG GGC   272
   32  T   V   V   S   K   L   A   P   C   L   G   F   L   R   G   46
273 GGC GGT TCC CCA CCA CCT GCT TGT TGT AGT GGG ATT AGA AAC CTT   317
   47  G   G   S   P   P   P   A   C   C   S   G   I   R   N   L   61
318 CAA AGC ATG GCT AGG AGT ACA CCC GAT CGT CAA GCT GCT TGC GGG   362
   62  Q   S   M   A   R   S   T   P   D   R   Q   A   A   C   G   76
363 TGC TTG AAG TCT GCT TCG GCT GGT GTT AAT ATG CGT AAT GCT GCC   407
   77  C   L   K   S   A   S   A   G   V   N   M   R   N   A   A   91
408 GCT CTT CCC GGT AAA TGT GGT GTG AAC ATC GGT TAC CCA ATC AGC   452
   92  A   L   P   G   K   C   G   V   N   I   G   Y   P   I   S   106
453 AGG AGC GTT GAC TGC TCC AGG GTG AAG TGA AAC ATC TAC CTT GAC   497
  107  R   S   V   D   C   S   R   V   K   *
498 GGG TGC TCG GCC GAC TTA GCT TAG ATA TCA GTT TTC TAG TAC TCC   542
  543  GAA AAA TAA ACT GGG GCG CGA GGC ATG ATA CTA TTG TTG AGG CGT   587
  588  GTG CTT TCC TTT AAC AAT CGA TTT GTA ACT TAA GTT GCC TCC TGG   632
  633  ATT                                                                 635

```

图 1 *ThLTP* 基因序列及由此推导的氨基酸序列(下划线部分的 27 个氨基酸为信号肽)

	10	20	30	40	50	60	70
<i>P.acerifolia</i>	MAFS-RVAKLA--CLLLA	CVVATAPFAEAAIT	CGVWTRLPCLTEL	R--SGGAV	PACCGV	KALNDA	
<i>D.omyp;icrata</i>	MGRS-CVVIKVGI	VVLMCVVVSAPFAEAAIT	CGVWVSLAPCLNLYLK	--KGGV	VPPACCGV	GIKSLNAA	
<i>D.sativa</i>	--MA-RVATMV-F	CVVVT	CVVVAAPFAEAAIT	CGVWVSSL	SCASYLR--	NGGAV	PACCGV
<i>P.dulcis</i>	--MA-YSA	ATKLA	VVVALCVVVS	VPIA	CAIT--CGVW	SSLAP	CLPYR--
<i>P.persica</i>	--MA-YSA	ATKLA	VVVALCVVVS	VPIA	CAIT--CGVW	SSLAP	CLPYR--
<i>P.avium</i>	--MA-CSA	ATKLA	VVVALCVVVS	VPIA	CAIT--CGVW	SSLAP	CLPYR--
<i>M.domestica</i>	--MA-SSA	VTKLA	VVVALCVVVS	V--AI	AIT--CGVW	SSLAP	CLPYR--
<i>G.hirsutum</i>	--MA-SSA	MYL	KLAGVVV	LVV	GAPL	AVT	CGVW
<i>N.glauca</i>	--MA-KVA	LVVV	CVAVAV	VML--T	PHAA	ATS	CGVW
<i>T.hispida</i>	--MA-GSS	ALFKLA	CLVA	AE	MV	SAPFAEAAIT	CGVW
<i>A.nummularia</i>	--MA-SSV	WFKLA	CAVEM	CVVVA	APFAE	L	CGVW
<i>C.arietinum</i>	---MAS	-HKVV	CVAL	THC--L	VHAP	AE	SAIT
<i>L.culinaris</i>	---MARG	MKLA	CVV	LVIC	CVV	VAP	AE
Clustal Consensus	:	:	:	:	:	:	:

	80	90	100	110	120
<i>P.acerifolia</i>	KITPDRQAAC	GLKRA	ASTSIS	GIQLG	NAASL
<i>D.omyp;icrata</i>	KITPDRQAAC	NCLKRA	ASTSIS	GIQLG	NAASL
<i>D.sativa</i>	RTTPDRQIT	CCGLKRA	---GGV	NAASL	PGKCGV
<i>P.dulcis</i>	RTTPDRQAAC	NCLKQL	SAVPG	VN	NAAAL
<i>P.persica</i>	RTTPDRQAAC	NCLKQL	SAVPG	VN	NAAAL
<i>P.avium</i>	KITPDRQIT	ACNCLKQL	SAVPG	VN	NAAAL
<i>M.domestica</i>	RTTPDRQIT	ACNCLKQL	AGSIS	GVN	NAAAL
<i>G.hirsutum</i>	QTTPDRQAAC	GLKRA	ASTSIS	GIQLG	NAASL
<i>N.glauca</i>	TSTPDRQIT	ACNCLKRA	ASTSIS	GIQLG	NAASL
<i>T.hispida</i>	RSTPDRQAAC	GLKRA	---AGV	NAASL	PGKCGV
<i>A.nummularia</i>	STPDRQAAC	GLKRA	AGANTL	LMG	NAASL
<i>C.arietinum</i>	VITPDRQAAC	NCLKRA	ASTSIS	RLN	NAAAL
<i>L.culinaris</i>	MTTPDRQAAC	NCLKRA	ASTSIT	KLNT	NAAAL
Clustal Consensus	..*.*.*.*	*.*	:	:	*.*.*.*.*

种(收录号):悬铃木(*Platanus acerifolia* Willd)(CAL07989);珙桐(*D. involucrata*)(AAL27855);莴苣(*Lactuca sativa* Linn.)(ABK96813);扁桃(*Prunus dulcis* Mill)(Q43017);桃(*Prunus persica* Linn.)(AAV64877);甜樱桃(*Prunus avium* Linn.)(Q9M5X8);家蝇(*Musca domestica* Linn.)(AAT80649);陆地棉(*G. hirsutum*)(AAF35186);光烟草(*Nicotiana glauca* Graham)(AAT68263);刚毛怪柳(*T. hispida*);藜(*Atriplex nummularia* Linn)(BAC77694);鹰嘴豆(*Cicer arietinum* Linn)(O23758);扁豆(*Lens culinaris* Medic)(AAX35809)。13个物种的LTP氨基酸序列用ClustalX(1.83)进行多序列比对结果,相同的氨基酸用“*”表示;“:”或者“.”表示相似的氨基酸;“-”表示空位。

图 2 *ThLTP* 基因同源性分析

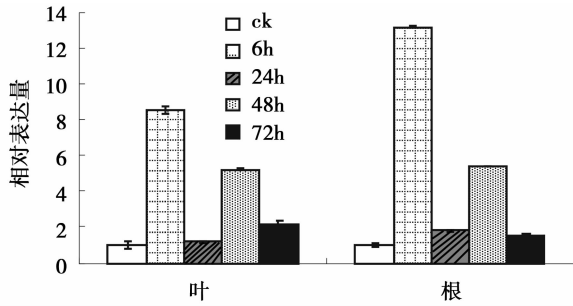
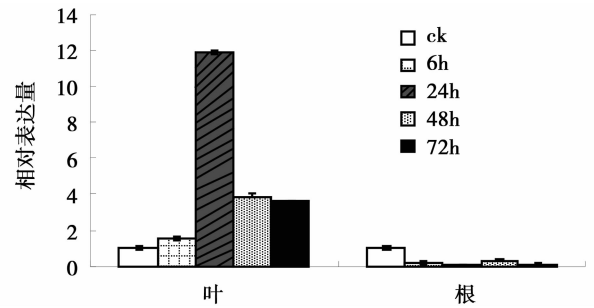
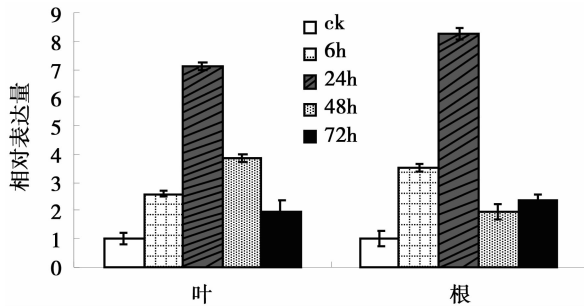
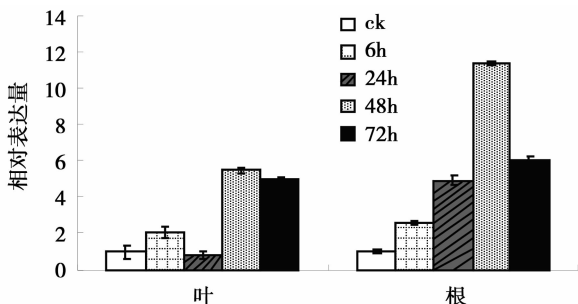
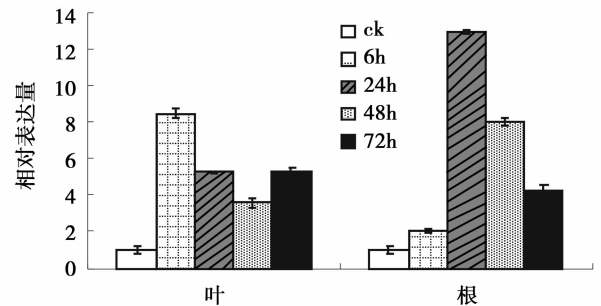
图3 0.2% NaCl胁迫下 *ThLTP* 基因在柽柳叶组织与根组织的表达图6 4 °C胁迫条件下 *ThLTP* 基因在柽柳叶组织与根组织的表达图4 150 μmol · L⁻¹ CdCl₂胁迫下 *ThLTP* 基因在柽柳叶组织与根组织的表达

图4表明:在150 μmol · L⁻¹ CdCl₂胁迫处理下,在叶和根中 *ThLTP* 基因的相对表达量也明显比未胁迫处理的高,胁迫24 h时叶和根的表达量最高,分别是非胁迫处理的7.0和8.2倍;胁迫48 h和72 h的表达量虽然明显下降,但也明显高于非胁迫处理。

在20% (W/V) PEG6000胁迫处理下,叶组织和根组织 *ThLTP* 基因的表达量比未处理的均明显升高,胁迫48 h时表达量达到高峰,为非胁迫处理的5.48、11.34倍(图5)。随着4 °C低温胁迫处理时间的延长,叶组织中 *ThLTP* 的表达量也呈上升趋势。在胁迫24 h时表达量达到最高为对照的11.8倍,而后表达量又逐渐下降,在根组织中 *ThLTP* 基因的表达量明显低于对照,呈现下调表达(图6)。

图5 20% (W/V) PEG6000胁迫条件下 *ThLTP* 基因在柽柳叶组织与根组织的表达

在100 μmol · L⁻¹ ABA诱导下 *ThLTP* 基因也呈上调表达,在处理6 h时叶组织中的 *ThLTP* 基因表达量最大,为对照的8.48倍;而在根组织中是处理24 h时的表达量最大,为对照的12.96倍。随后在叶和根中又略有下降,但均高于非胁迫处理时的表达水平(图7)。

图7 100 μmol · L⁻¹ ABA诱导条件下 *ThLTP* 基因在柽柳叶组织与根组织的表达

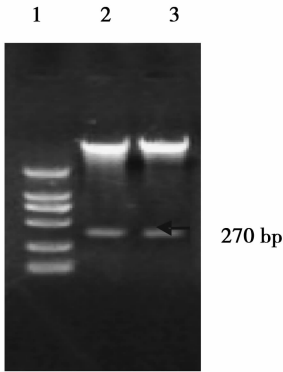
2.3 重组质粒 pET32a-LTP 的获得及 *ThLTP* 基因的诱导表达

随机选取2个重组质粒 pET32a-LTP 进行双酶切,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明:在270 bp均获得阳性谱带(图8)。对重组质粒的插入序列测序表明: *ThLTP* 基因已经克隆到原核表达载体中。12% (W/V) SDS-PAGE 的检测结果表明: IPTG 诱导重组菌 *E. coli* BL21 (pET32a-LTP) 表达产物在分子量30 kD左右出现特异条带,而对照 *E. coli* BL21 (pET32a) 无此条带,仅表达 TrxA 和 His · Tag 蛋白产物(20.67 kD),表明 *LTP* 基因在重组菌 *E. coli* BL21 (pET32a-LTP) 中成功地表达并翻译成蛋白质(图9)。

2.4 重组菌 *E. coli* BL21 (pET32a-LTP) 的抗旱耐盐性

在0.8% (W/V) NaCl胁迫条件下:对照菌 *E. coli* BL21 (pET32a) 未进入对数生长期,培养4 h后 OD₆₀₀ 略有所增长,但增长极其缓慢,其 OD₆₀₀ 最大值仅为0.156,而重组菌 *E. coli* BL21 (pET32a-LTP) 在

胁迫3 h后进入对数期生长,7 h后达到平台期,OD₆₀₀最大值为0.706,明显比对照菌*E. coli* BL21(pET32a)的高(图10)。20% (W/V) PEG6000胁迫处理后,对照菌株*E. coli* BL21(pET32a)同样几乎不能生长,而重组菌*E. coli* BL21(pET32a-LTP)经过3 h的延迟生长后,进入对数生长期,其OD₆₀₀在9 h时高达1.091,对照菌株*E. coli* BL21(pET32a)仅为0.1593(图11)。



1为Marker(2000、1000、750、500、250、100 bp);
2,3为Bam H I Xho I 双酶切产物

图8 重组质粒的双酶切鉴定电泳图谱

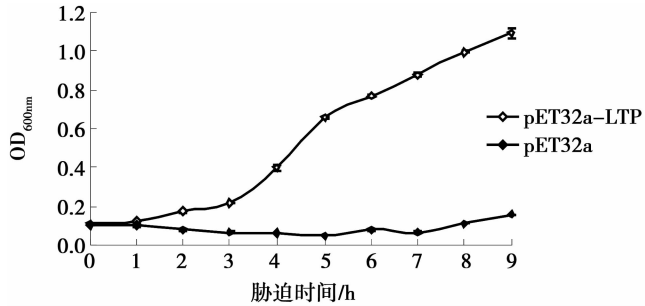
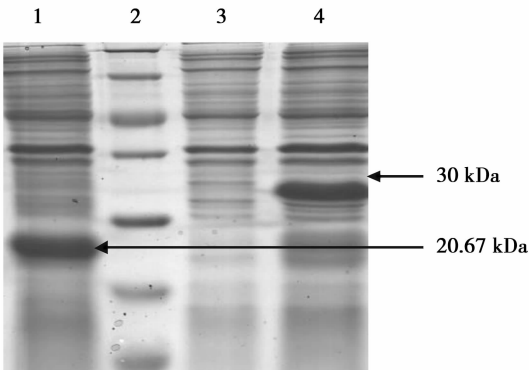


图11 重组菌*E. coli* BL21(pET32a-LTP)和对照菌*E. coli* BL21(pET32a)在20% (W/V) PEG6000下的生长曲线

3 结论与讨论

实验所克隆的*ThLTP*基因编码116个氨基酸,与其它12个物种的*LTP*基因序列同源比对表明同源性相似性在51%~62%之间,表明其一级结构在不同物种间相差很大。*ThLTP*基因编码蛋白的1~27区段氨基酸疏水性很强,包括由4个保守的二硫键按照固定模式排列的8个高度保守的半胱氨酸残基(Cys)位点。尽管该蛋白的一级结构同源性较低,但具有典型的LTP蛋白的结构特征^[25-29]。

已有的研究表明,作为植物一种重要防御蛋白,*LTP*基因的表达可受干旱、高盐、低温等多种不良环境条件诱导。本实验对几种逆境胁迫下*ThLTP*基因表达模式分析也证明该基因在NaCl、CdCl₂、PEG、ABA和低温胁迫下都具有应答反应。从实验结果中还可以看出,*ThLTP*在盐胁迫下6 h表达量就达到丰值,说明它对盐胁迫应答迅速,与柽柳的耐盐能力有关,原核表达实验也说明*ThLTP*基因的表达可以提高宿主的抗盐耐旱的能力。干旱、NaHCO₃胁迫下紫杆柽柳基因表达谱研究也表明,*LTP*基因可受干旱和盐胁迫诱导并呈上调表达模式^[29]。4℃胁迫条件下*ThLTP*基因只在叶组织中表达,而根组织中几乎未有表达,说明*ThLTP*表达具有一定的组织特异性。*LTP*基因在其它植物中也有类似的表达模式,例如:Maghuly等^[12]发现,*LTP*基因受低温、高温、高盐、机械伤害诱导,*LTP*基因在叶组织中表达量明显上调,但在根组织中却有轻微下调趋势;在黑暗诱导下拟南芥LTP₅仅在下胚轴表达,干旱条件下LTP₆仅在子叶中表达^[25]。对于LTP的这种复杂的表达模式和其在各种胁迫条件下的应答作用机理的研究目前还尚不明确,但一些研究发现这可能与植物参与外界胁迫的信号转导有关。有研究表明,nsLTP与茉莉酸分子结合后参与植物对各种胁迫的局部或系统性信号转导,而茉莉酸是植物应答各类



1:重组菌*E. coli* BL21(pET32a)空载体的总蛋白;2:蛋白marker(116、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4、14.4 kDa);3:重组菌*E. coli* BL21(pET32a-LTP)未经IPTG诱导;4:重组菌*E. coli* BL21(pET32a-LTP)经IPTG诱导和诱导5 h

图9 THLTP蛋白的诱导表达

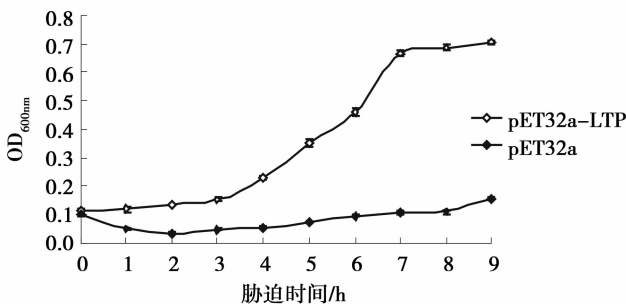


图10 重组菌*E. coli* BL21(pET32a-LTP)和对照菌*E. coli* BL21(pET32a)在0.8% (W/V) NaCl下的生长曲线

损伤和病原物侵染产生的内源信号分子^[30-31]。*nsLTP* 还可能在植物系统获得抗性有关的脂类信号的传播途径中起作用,促进信号的长距离运输^[28]。*LTP* 蛋白还与钙调素结合蛋白具有相似的性质^[12,33],参与细胞膜上的钙调素蛋白受体的竞争性结合,认为 *LTP* 蛋白作为一种配体在植物的抗逆过程中以受体-配体的方式起作用^[34],但是详细作用机理尚不清楚。

综上所述,*ThLTP* 基因是一个抗旱耐盐相关基因,它可受多种胁迫因子所诱导,其表达可以增强植物对外界不良环境的适应,也可以赋予原核细胞对干旱和盐的耐受能力。据此,采用基因工程技术将 *LTP* 基因导入植物体内,通过 *LTP* 的组成型表达,以增强植物对环境胁迫的抗性是可行的,本研究为该基因在林木抗逆基因工程育种中的应用提供了参考。具有多种功能的脂质转移蛋白在植物生长发育及对外界不良环境的适应中起一定的作用,其作用机理虽有一定的探索,但还不十分明确,还需要做进一步的研究。

参考文献:

[1] 张道远,尹林克,潘伯荣. 怪柳属植物抗旱性能研究极其应用潜力评价[J]. 中国沙漠,2003,23(3):52-56

[2] 张鹏云,张耀甲. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1979:142-143

[3] 张道远,杨维康,潘伯荣,等. 刚毛怪柳群落特征及其生态、生理适应性[J]. 中国沙漠,2003,23(4):446-451

[4] 司剑华,卢素锦. 低温胁迫对5种怪柳抗寒性生理指标的影响[J]. 中南林业科技大学学报,2010,30(8):78-81

[5] Kader J C. Lipid-Transfer Proteins in Plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47(1): 627-654

[6] Neinhuis K K, W B. Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles [J]. Planta, 2001, 213(3): 427-434

[7] Cameron K D, Teece M A, Smart L B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco [J]. Plant Physiology, 2006, 140(1): 176-183

[8] Lee S B, Go Y S, Bae H J, et al. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola* [J]. Plant Physiol, 2009, 150(1): 42-54

[9] Thoma S, Kaneko Y, Somerville C. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein [J]. Plant J, 1993, 3(3): 427-436

[10] Pyee J, Yu H, Kolattukudy P E. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves [J]. Arch Biochem Biophys, 1994, 311(2):

460-468

[11] Pagnussat L A, Lombardo C, Regente M, et al. Unexpected localization of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds [J]. J Plant Physiol, 2009, 166(8): 797-806

[12] Maghuly F, Borroto-Fernandez E G, Khan M A, et al. Expression of calmodulin and lipid transfer protein genes in *Prunus incisa* x *serula* under different stress conditions [J]. Tree Physiol, 2009, 29(3): 437-444

[13] Thoma S, Hecht U, Kippers A, et al. Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 1994, 105(1): 35-45

[14] Molina A, Garcia-Olmedo F. Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein *LTP2* [J]. Plant J, 1997, 12(3): 669-675

[15] 唐 征, 杨 凯, 冯永庆, 等. 板栗脂质转运蛋白基因的克隆及表达 [J]. 林业科学, 2010, 46(4): 43-46

[16] Jung H W, Kim K D, Hwang B K. Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (*CALTP1*) and the enhanced resistance of the *CALTP1* transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses [J]. Planta, 2005, 221(3): 361-373

[17] K Hinch D. Cryoprotectin: a plant lipid-transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2002, 357(1423): 909-916

[18] Hollenbach B, Schreiber L, Hartung W, et al. Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly [J]. Planta, 1997, 203(1): 9-19

[19] Federico M L, Kaeppler H F, Skadsen R W. The complex developmental expression of a novel stress-responsive barley *Ltp* gene is determined by a shortened promoter sequence [J]. Plant MolBiol, 2005, 57(1): 35-51

[20] Douliez J P, Michon T, Marion D. Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (*nsLTP1*) [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1467(1): 65-72

[21] Kirubakaran S I, Begum S M, Ulaganathan K, et al. Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat [J]. Plant Physiol Biochem, 2008, 46(10): 918-927

[22] Wang C, Yang C, Gao C, et al. Cloning and expression analysis of 14 lipid transfer protein genes from *Tamarix hispida* responding to different abiotic stresses [J]. Tree Physiol, 2009, 29(12): 1607-1619

[23] 张明永, 梁承邺. 植物脂质转运蛋白的研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(3): 244-247

[24] 王玉成, 褚延广, 姜 静, 等. 紫杆怪柳与其它物种脂质转运蛋白基因编码蛋白的同源性比较 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(1): 14-18

[25] Chae K, J Gongong B, Kim S C, et al. A multifaceted study of stigma/style cysteine-rich adhesin (*SCA*)-like *Arabidopsis* lipid transfer proteins (*LTPs*) suggests diversified roles for these *LTPs* in plant growth and reproduction [J]. Experimental Botany, 2010, 61

- (15): 4277-4290
- [26] Lee J Y, Min K, Cha H, *et al.* Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity [J]. *J Mol Biol*, 1998, 276 (2): 437-448
- [27] Gomar J, Petit M C, Sodano P, *et al.* Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds [J]. *Protein Sci*, 1996, 5(4): 565-577
- [28] Jang C S, S. Kim D, Bu S Y, *et al.* Isolation and characterization of lipid transfer protein (LTP) genes from a wheat-rye translocation line [J]. *Plant Cell Reports* 2002, 20(10): 961-966
- [29] 王玉成. 柞柳抗逆分子机理研究与相关基因的克隆[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005
- [30] Koo A J K, Chung H S, Kobayashi Y, *et al.* Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in *Arabidopsis* [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2006, 281(44): 33511-33520
- [31] Shah J. Lipids, Lipases, and Lipid-Modifying Enzymes in Plant Disease Resistance [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2005, 43(1): 229-260
- [32] Sarowar S, Kim Y J, Kim K D, *et al.* Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(3): 419-427
- [33] Chunming W, Wanqin X, Fang C, *et al.* BeLTP, a novel lipid transfer protein in *Brassica chinensis*, may secrete and combine extracellular CaM [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(1): 159-169
- [34] 汪笑峰. 水稻细胞膜上非特异性脂质转移蛋白受体的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2007

欢迎订阅 2013 年《中国农业科学》中、英文版

《中国农业科学》中、英文版由农业部主管、中国农业科学院主办。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究论文、综述、简报等。设有作物遗传育种·种质资源·分子遗传学;耕作栽培·生理生化·农业信息技术;植物保护;土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境;园艺;贮藏·保鲜·加工;畜牧·资源昆虫;兽医;农业经济与管理等栏目。

《中国农业科学》中文版为半月刊,影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。为北京大学图书馆 1992—2011 年连续 6 次遴选的核心期刊,位居《中文核心期刊要目总览》“农业综合类核心期刊表”的首位。1999 年起连续 10 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;1999 年获“首届国家期刊奖”,2003、2005 年获“第二、三届国家期刊奖提名奖”;2002—2011 年先后 9 次被中信所授予“百种中国杰出学术期刊”称号;2009 年获中国期刊协会/中国出版科学研究院“新中国 60 年有影响力的期刊”称号;2010 年荣获“第二届中国出版政府奖期刊提名奖”。

《中国农业科学》中文版大 16 开,每月 1、16 日出版,国内外公开发行人。定价 49.50 元,全年定价 1188.00 元。国内统一刊号:CN11-1328/S,邮发代号:2-138。

《中国农业科学》英文版(Agricultural Sciences in China),2002 年创刊,月刊,2012 年更名为《农业科学学报》(Journal of Integrative Agriculture, JIA)。2006 年 1 月起与国际著名出版集团 Elsevier 合作,全文数据在 ScienceDirect 平台面向世界发行。2009 年被 SCI 收录,2012 年 JCR 影响因子为 0.449。

JIA 大 16 开,每月 20 日出版,国内外公开发行人。国内订价 80.00 元,全年 960.00 元。国内统一刊号:CN 10-1039/S,国际标准刊号:ISSN 2095-3119,邮发代号:2-851,国外代号:1591M。

《中国农业科学》中、英文版均可通过全国各地邮局订阅,也可向编辑部直接订购。

邮编:100081;地址:北京 中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部

电话:010-82109808,82106280,82106281,82106282;传真:010-82106247

网址:www.ChinaAgriSci.com;E-mail:zgnykx@mail.caas.net.cn 联系人:林鉴非