

甜高粱角蛋白基因的分离及功能分析

宋玉双 隋娜

(山东师范大学 生命科学学院, 山东 济南 250014)

摘要 本研究从甜高粱耐盐自交系 M-81E 中分离出角蛋白 HTV(hornerin transcript variant) 基因,我们构建了 pROKII-GFP-SbHTV 融合表达载体对 SbHTV 进行亚细胞定位分析,表明该基因编码的蛋白定位于细胞核.将该基因构建过表达载体,转入到野生型拟南芥中获得纯合过表达株系,并筛选出了拟南芥 HTV 的 T-DNA 插入纯合突变体.通过测定和分析盐处理下拟南芥野生型、过表达和突变体株系在萌发期、苗期的各项生理指标,我们发现当用 100 mM NaCl 处理时,拟南芥各个株系的萌发率和根长都出现了显著差异,突变体的根长要显著长于野生型,过表达株系的根长要显著小于野生型.并且用 100 mM NaCl 处理后,突变体株系生物量积累的抑制程度明显低于野生型,而过表达株系受抑制的程度要明显高于野生型.这表明 *SbHTV* 的过量表达降低植物的抗盐能力,而敲除该基因有利于提高植物抗盐性,初步阐明该基因在植物抗盐方面的作用.

关键词 甜高粱;角蛋白基因;盐胁迫;功能分析

中图分类号

文献标识码 A

0 引言

角蛋白是一种结构蛋白质,广泛存在于人和动物的皮毛中,是毛发、角、爪、蹄的重要组成部分.动物角蛋白对动物起保护作用,可用于饲料和食品以及肥料的加工,也可用于制药和化妆品行业^[1].随着近年来研究的深入,人们发现角蛋白是植物细胞中间纤维的主要成分,它们与细胞分化、信号传导、基因调控等重要生命活动相关,但只有克隆到植物角蛋白基因,才能为进一步研究植物角蛋白以及它的生物学功能打下基础.早在 1990 年,苏菲^[2]等人对植物叶肉原生质体进行选择性的分级抽提,应用整装制样技术,首次清晰地显示玉米与烟草叶肉细胞中存在直径 10 nm 的纤维构成的精细网络体系,并用免疫胶体金标记技术进一步证明这些纤维的主要成分类似于动物细胞的角蛋白.赵大中^[3]等人以拟南芥为材料,以动物 IF 基因的保守序列为引物,克隆到一个 cDNA 片段.随后在 2000 年又以胡萝卜悬浮培养细胞为材料,纯化了两种 IF 蛋白,对其部分氨基酸序列进行了分析;同时以动物 IF 基因的一段保守序列为引物,利用 RT-PCR 技术克隆到一个相关的 cDNA 片段^[4].

近年来随着功能基因组学研究不断深入及其相关技术不断完善,植物的耐盐分子机制研究有了许多新的进展,特别是盐胁迫信号转导途径和耐盐基因的鉴定、克隆及其功能分析等方面.柯丹霞等人将大豆 WRKY6 转入百脉根中显著提高了百脉根的抗盐能力^[5].金太成等人利用沙打旺 AH1 基因的遗传转化使得转基因紫花苜蓿植株累积了大量的游离脯氨酸和可溶糖,从而改良了紫花苜蓿耐盐性^[6].水稻 OsAPX1 基因在烟草中的表达提高烟草的抗 H₂O₂ 毒害的能力^[7].

甜高粱(sweet sorghum)是粒用高粱[Sorghum bicolor (L.) Moench]的一个变种,环境恶劣的非洲大陆是甜高粱起源的地方,为适应环境,长期的进化使得甜高粱具备了耐旱、耐涝和耐盐碱等多重抗性^[8-10].对这些优良的特性进行研究有利于我们对其他作物进行基因改造,获得耐胁迫性的作物.研究甜高粱的耐盐机

收稿日期:2018-12-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31871538);山东省自然科学基金省属高校优秀青年人才联合基金项目(ZR2016JL028)资助

通讯作者:隋娜,女,汉族,博士,教授,研究方向:植物逆境生理与分子生物学等,E-mail: suina800101@163.com.

制对于培育出耐盐作物具有重要的指导作用. 到目前为止, 对植物角蛋白基因的功能研究尤其是在抗逆方面的研究少之又少. 因此本文对转甜高粱角蛋白 HTV 基因的拟南芥的抗盐能力进行了初步的探索与研究.

1 材料与方法

1.1 植物材料与试剂

甜高粱耐盐自交系 M-81E 种子, 烟草(本生烟)种子, 大肠杆菌菌株(DH5 α), 农杆菌菌株(GV3101), 克隆载体 pEASY-Blunt3 simple, CaMV35S 启动子驱动的 pROKII-GFP 表达载体等. 反转录试剂盒(Code: FSQ-101)购自华越洋生物科技有限公司, RNAPrep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒胶回收试剂盒等均购自天根生化科技有限公司.

1.2 试验方法

1.2.1 基因的克隆. 将沙培的长至三叶一心时期的高粱根部取材, 提其 RNA 进行 PCR 扩增, 然后将得到的 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测目的条带以获取基因的全长. 参考 SbHTV 基因的 cDNA 序列(Gene ID: 8055395)设计引物, 引物序列如: HTV-F: 5'-GCGGATCCATGAATAACGGTTTCGCG-3'; HTV-R: 5'-GGGGTACC-TCAGAGCTTGTCGACGTCG-3'.

1.2.2 甜高粱 HTV 基因在不同盐处理下的表达水平. 将沙培的长至三叶一心时期的高粱用 0 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM NaCl 溶液处理 48 h, 取其根和叶提取 RNA, 以反转录的 cDNA 为模板. 从 NCBI 或甜高粱网站上根据基因号找到甜高粱的基因序列, 根据其 cDNA 序列用 Beacon Designer 7 软件设计定量引物, 内参引物我们选用甜高粱的 β -actin 基因. 引物序如下.

Sbactin-S: TGGCATCTCTCAGCACATTC; *Sbactin-A*: AATGGCTCTCTCGGCTTGC; *HTV-S*: TCATCAGGGTCGTCGTAGTG; *HTV-A*: GTCAACGGTGGAGAAGGAGA.

1.2.3 生物信息学分析. 利用 NCBI 数据库和生物信息学以及 DNAMAN, MEGA 5.0 等软件对 SbHTV 基因进行同源性及进化分析.

1.2.4 拟南芥过表达植株的获得. 将 1.2.1 得到的目的条带进行测序, 并将测序结果与 SbHTV 序列进行比对, 比对结果无误后, 将目的条带与 pEASY-Blunt3 Vector 进行连接并转化大肠杆菌 5 α . 37 °C 培养 12 h 后进行菌落 PCR, 然后挑选阳性克隆进行培养, 对测序正确的菌液进行质粒的提取. 用限制性内切酶 BamHI 和 KpnI 将质粒和表达载体 pROKII-GFP 双酶切之后再连接, 然后转化大肠杆菌 5 α , 将测序正确的阳性克隆提取质粒, 再将质粒转入农杆菌 GV3101, 用含有 SbHTV 的农杆菌菌液侵染野生型的拟南芥, 将收的种子在含有卡那抗性的 1/2MS 培养基上筛选, 筛选三代之后获得纯合的拟南芥过表达植株.

1.2.5 拟南芥纯合突变体植株的获得. 在 TAIR 网站上找到纯合的突变体(ATRLP51-2, SALK_049752), 把买到的突变体通过 CTAB 小量法提基因组 DNA, 用三引物法进行鉴定, 确定买到的突变体确实是纯合的.

1.2.6 Real-time PCR 分析. 以野生型, 过表达植株, 突变体植株的 RNA 为模板, 用设计的 qPCR 特异性引物对基因的表达进行定量分析. 利用拟南芥 *Actin2* 基因的引物作为内参^[11], 引物序列同 1.2.2.

1.2.7 亚细胞定位分析. 采用农杆菌注射渗透法^[12]将已活化后的含有 SbHTV 基因的农杆菌注射到烟草的下表皮, 正常培养两天后在双光子共聚焦显微镜下观察烟草下表皮的绿色荧光的表达情况.

1.2.8 种子萌发率与主根长度的测定. 将消毒的野生型、过表达株系、突变体株系的种子成排点播于含有 0、50、100 和 150 mM NaCl 的 1/2MS 培养基中, 春化 3 d 后放到组培室培养, 24 h 后统计萌发率. 萌发率 = (萌发的种子个数 ÷ 种子的总个数) × 100%, 生长 7 d 后进行主根长度的测量.

1.2.9 生物量的测定. 将拟南芥野生型、过表达、突变体株系的幼苗植株分别用 0、100 mM NaCl 处理 10 d, 然后将幼苗从营养土中取出, 并用去离子水将材料冲洗干净, 擦干植株表面的水分. 称取植株的鲜重(Fresh weight), 然后放入 70 °C 的烘箱中直至烘干, 称干重(Dry weight). 每种处理 6 个重复.

2 结果与分析

2.1 基因的克隆及序列分析

用引物扩增 SbHTV 基因,目的条带大小为 1926 bp.从 NCBI 上对 SbHTV 基因的蛋白序列进行 BLAST,然后对这些序列进行进化分析可得知与甜高粱 SbHTV 基因亲缘关系最近的是短柄稻 LOC102711408 基因,其次是籼稻的 I_07775 基因,而甜高粱 SbHTV 基因与拟南芥 AXX17_AT5G64180 基因的亲缘关系相对于其他物种来说较远.通过 SbHTV 蛋白与其他物种的同源蛋白比对分析,发现他们在比较保守的大约 150 个氨基酸内同源性比较高.

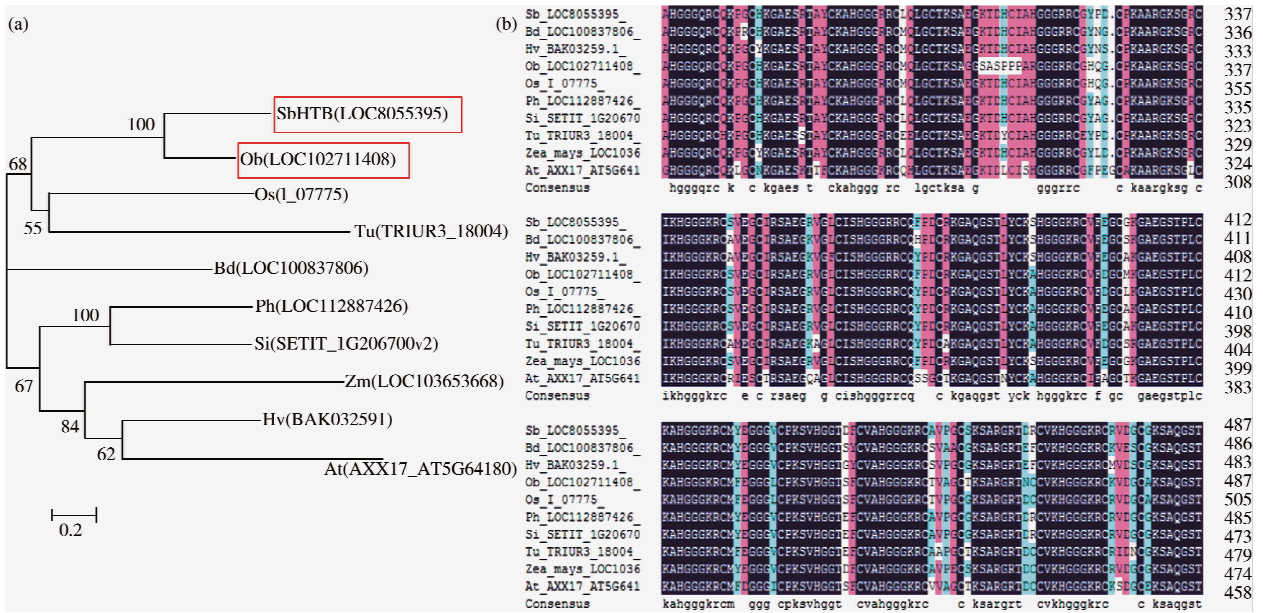


图 1 甜高粱 SbHTV 蛋白与其他物种的同源蛋白的比对及进化树分析

2.2 SbHTV 基因在不同盐浓度处理下的表达分析

如图 2 所示,无论是地上部分还是地下部分,在 50 mM NaCl 处理时,甜高粱 HTV 基因的表达量显著上升.而 100 mM NaCl 处理时,SbHTV 的表达量显著下降,当 NaCl 浓度为 200 mM 时,SbHTV 的表达量最低.表明该基因的表达受盐胁迫的诱导.

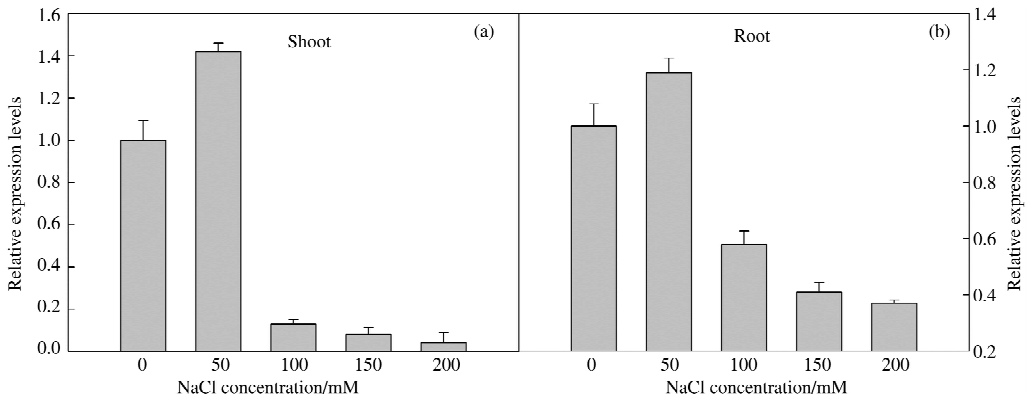


图 2 SbHTV 基因在叶片和根中的表达量分析

2.3 SbHTV 蛋白的亚细胞定位分析

在显微镜下可以明显的观察到转 pROK II-GFP 空载体的烟草表皮细胞的绿色荧光信号分布在细胞核、细胞膜等几乎整个细胞,在细胞质中也有,但不是太明显.而带有目的基因的表达载体转到烟草后发现,在下表皮细胞的绿色荧光信号几乎只分布在细胞核.

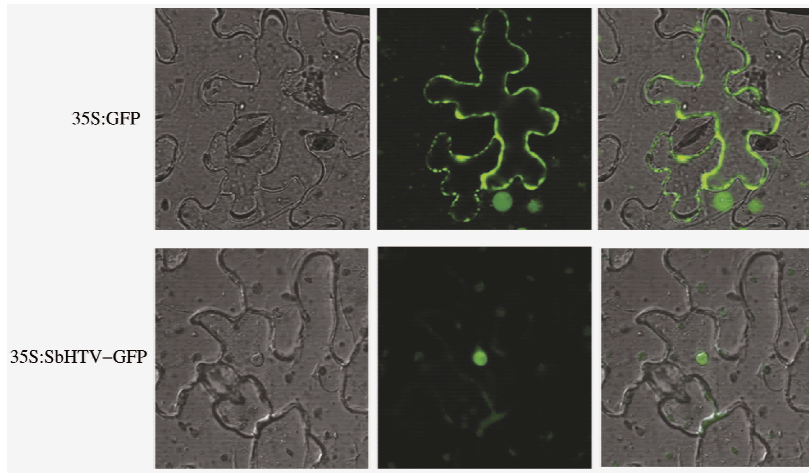


图3 SbHTV蛋白的亚细胞定位分析

2.4 拟南芥过表达纯合植株及突变体的 Real-time PCR 分析

从图4可以看出过表达拟南芥株系的SbHTV的转录水平较野生型都显著提高,由此可以充分证明SbHTV已成功转入到野生型拟南芥植株中.其次,过表达植株OE6,OE12,OE21中SbHTV的转录水平相对较高,而OE1,OE3,OE11次之,因此我们选择OE6,OE12,OE21进行后期生理指标的验证.从图4可以看出拟南芥突变体株系(*htv-1*和*htv-2*)中与SbHTV的同源的基因的转录水平较野生型都显著下降.

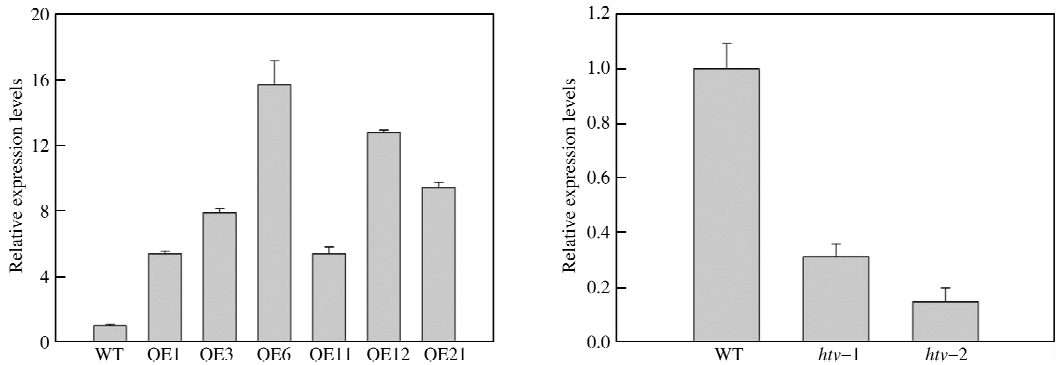


图4 过表达植株和突变体拟南芥中HTV的转录水平检测

2.5 盐胁迫对野生型和转基因植株萌发率与主根的影响

如图5(A)所示,未用NaCl处理时,野生型,过表达和突变体种子的萌发率无显著性差异.随着盐处理浓度的升高,各个株系的种子萌发率均显著下降.当用50、100、150 mM NaCl处理时,发现突变体株系的萌发率显著高于野生型拟南芥,而过表达株系的萌发率显著低于野生型.这说明在萌发期,突变体株系较野生型有较强的抗盐能力,而过表达株系比野生型的抗盐能力弱.

如图5(B),7 d后测量各个株系的根长发现,在0 mM NaCl处理时,野生型拟南芥,过表达以及突变体株系的根长无明显差异.随着盐浓度的升高,各个株系的根长都显著下降.当用50、100、150 mM NaCl处理时,拟南芥各个株系的根长都出现了显著差异,突变体的根长要显著长于野生型,过表达株系的根长要显著小于野生型.

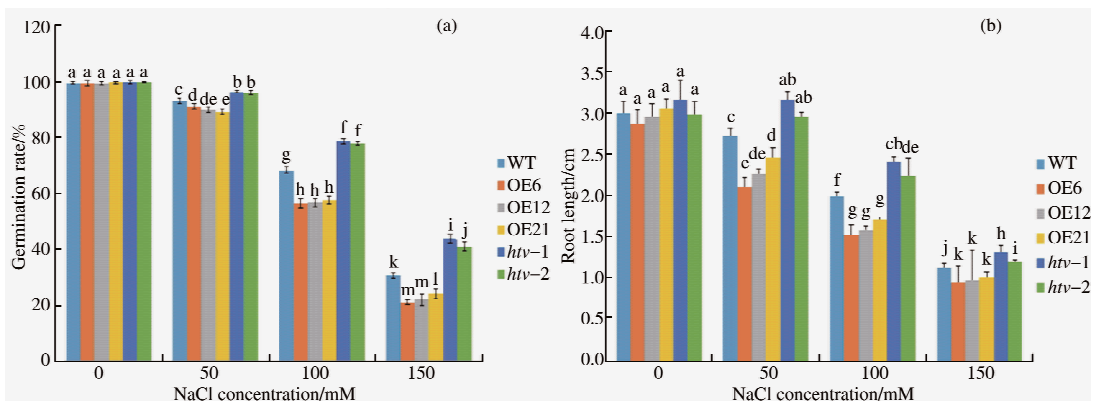


图5 盐处理条件下,野生型、过表达和突变体种子萌发率及根长的变化

2.6 干鲜重

图6可以看出,100 mM NaCl处理后,拟南芥各株系的干鲜重均显著下降,但过表达株系的下降程度显著高于野生型,而突变体株系的下降程度要显著低于野生型.这些生物量的数据变化说明,盐处理对突变体株系的生物量积累的抑制程度明显低于野生型,而过表达株系受抑制的程度要明显高于野生型.

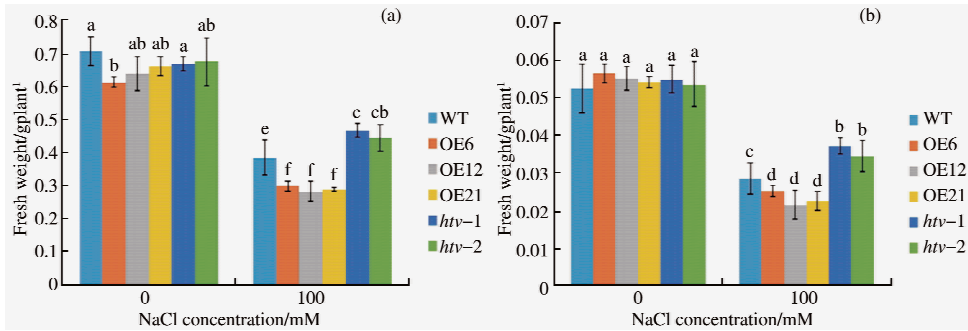


图6 盐处理条件下,野生型、过表达和突变体植株干、鲜重的变化

3 讨论

盐胁迫是对植物尤其是农作物的生长发育产生较大影响的一类非生物胁迫因子,研究一些农作物耐盐基因的表达及功能,一方面可以揭示农作物的耐盐机理,另一方面还可以提高农作物的耐盐性^[13].姜志磊等人通过在烟草中过表达玉米 ZmHKT1 与 ZmHKT5 基因,验证该基因具有提高植物耐盐性的作用^[14].姚新转等人将高粱钠离子转运蛋白基因 SbSKC1 基因在烟草中过表达能够提高烟草的抗盐性^[15].本试验通过在拟南芥中过表达 SbHTV 基因并利用拟南芥同源基因突变体,验证了该基因具有负调控植物耐盐性的作用.我们通过对甜高粱 HTV 基因的研究发现该基因的 CDS 序列有 1926 个碱基,可以编码 641 个氨基酸.通过甜高粱 HTV 氨基酸序列与其他物种的同源蛋白序列进行比较,发现其与短柄稻的亲缘关系最近.通过对甜高粱 HTV 基因在不同盐浓度处理下的表达量进行了分析,发现用 100 mM NaCl 处理时,SbHTV 的表达量开始显著下降,且 200 mM NaCl 处理时,SbHTV 基因的表达量最低,这说明甜高粱 HTV 基因是一个响应盐胁迫的基因.

种子的萌发是植物生活史中最关键阶段之一,受盐度的影响很大^[16,17].研究发现,对小麦施加中等程度的盐胁迫时会延缓它的发芽,施加高强度的 NaCl 后会降低最终的发芽率^[18].主根长度通常被用来衡量植物的抗盐能力.本研究发现无论是野生型植株、过表达植株还是突变体植株,在高盐情况下的萌发率和主根长以及干鲜重相对于对照组来说都显著降低,但很明显,突变体的萌发率最高,过表达植株的萌发率最低.这说明甜高粱 SbHTV 基因在植物抗盐过程中发挥着重要作用,该基因的过量表达能够提高转基因拟南芥的盐敏感性.

参 考 文 献

- [1] 李芳莹.羽毛角蛋白的高效提取及其在可控释放材料中的应用[D].兰州:西北师范大学,2010.
- [2] 苏菲,顾伟,翟中和.植物叶肉细胞的类角蛋白中间纤维[J].中国科学,1990(3):267-270.
- [3] 赵大中,陈丹英,陈敏,等.拟南芥细胞中存在中间纤维的研究[J].植物学报(英文版),1999,41(8):795-799.
- [4] 赵大中,陈丹英,杨澄,等.植物细胞类角蛋白的纯化、序列分析与类中间纤维 cDNA 的克隆[J].中国科学:生命科学,2000,30(3):316-321.
- [5] 柯丹霞,彭昆鹏,夏远君,等.盐胁迫应答基因 GmWRKY6 的克隆及转基因百脉根的抗盐分析[J].草业学报,2018,27,157(08):98-109.
- [6] 金太成,孟大伟,王悦,等.利用 AH1 基因的遗传转化改良紫花苜蓿耐盐性[J].分子植物育种官方网站,2016,14(12):1724-1729.
- [7] 管清杰,罗秋香,夏德习,等.水稻 OsAPX1 基因在烟草中的表达及其抗盐性研究[J].分子植物育种,2007(1):1-7.
- [8] Steduto P, Katerji N, Puertos-Molina H, et al. Water-use efficiency of sweet sorghum under water stress conditions Gas-exchange investigations at leaf and canopy scales[J]. Field Crops Research, 1997, 54(2-3): 221-234.
- [9] Almodares A, Hadi M R, Kholdebarin B, et al. The response of sweet sorghum cultivars to salt stress and accumulation of Na⁺, Cl⁻ and K

- + ions in relation to salinity[J]. *Journal of Environmental Biology*,2014,35(4):733-739.
- [10] Xie T,Su P. Canopy and leaf photosynthetic characteristics and water use efficiency of sweet sorghum under drought stress[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*,2012,59(2):224-234.
- [11] Han G,Wang M,Yuan F,et al. The CCCH zinc finger protein gene AtZFP1,improves salt resistance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Molecular Biology*,2014,86(3):237-253.
- [12] 黎茵. 农杆菌注射渗透法转化烟草实验研究[J]. *实验技术与管理*,2010,27(11):50-52.
- [13] 王为,潘宗瑾,潘群斌. 作物耐盐性状研究进展[J]. *江西农业学报*,2009,21(2):30-33.
- [14] 姜志磊,刘艳芝,韦正乙,等. 玉米耐盐基因 ZmHKT1;5 在烟草中的功能验证[J]. *玉米科学*,2017(5):32-39.
- [15] 姚新转,刘洋,赵德刚. 高粱 Na⁺ 转运蛋白基因 SbSKC1 的克隆及其在烟草中的抗盐功能鉴定[J]. *作物学报*,2017,43(2):190-200.
- [16] Rahman S,Matsumuro T,Miyake H,et al. Salinity-induced ultrastructural alterations in leaf cells of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Production Science*,2000,3(4):422-429.
- [17] Misra N,Dwivedi UN. Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars [J]. *Plant Science*,2004,166(5):1135-1142.
- [18] Almansouri M,Kinet J M,Lutts S. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.)[J]. *Plant & Soil*,2001,231(2):243-254.

Isolation and Functional Analysis of Hornerin Gene from Sweet Sorghum

SONG Yu-shuang SUI Na

(Shandong Normal University,School of Life Sciences,Jinan 250014,China)

Abstract In this study,hornerin transcript variant (HTV) gene was isolated from sweet sorghum of salt-tolerant inbred line M-81E. We constructed a pROKII-SbHTV-GFP vector for subcellular localization analysis of SbHTV,which indicated that the gene was located in the cell nucleus. Homozygous overexpression lines were obtained,and T-DNA insertion homozygous mutants of *Arabidopsis thaliana* HTV were screened. The physiological indices of wild type,overexpression and mutant lines at germination and seedling stages under salt stress were determined and analyzed to elucidate the role of the gene under salt stress. We found that when treated with 100 mM NaCl,the germination rate and root length of each *Arabidopsis* strain were significantly different. The root length of the mutant was significantly longer than that of the wild type,and that of the overexpressed strain was significantly smaller than that of the wild type. After 100 mM NaCl treatment,the inhibition degree of biomass accumulation of mutant lines was significantly lower than that of wild type,while that of overexpressed lines was significantly higher than that of wild type. This indicates that the overexpression of SbHTV reduces the salt tolerance of plants,and the knockout of SbHTV gene is beneficial to improve the salt tolerance of plants. The role of SbHTV gene in salt tolerance of plants is elucidated preliminarily.

Key words sweet sorghum; SbHTV; salt stress; functional analysis