

丹参晚期胚胎富集蛋白基因的克隆及表达模式分析

武玉翠, 葛 茜, 周宏骏, 晋鑫鑫, 王喆之*

陕西师范大学生命科学学院, 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062

摘要: 目的 克隆丹参晚期胚胎富集蛋白(late embryogenesis abundant protein, LEA)基因, 并进行生物信息学和表达模式分析。方法 对丹参转录组数据库进行BLAST同源性比对, 发现一条新的与LEA基因家族同源性较高的序列, 命名为SmLEA2, GenBank登录号为HQ676610。进一步利用PCR和RT-PCR技术从丹参gDNA以及cDNA水平克隆得到了SmLEA2基因全长。采用软件分析蛋白质结构性质和系统进化关系。利用实时荧光定量PCR的方法对不同部位、不同发育时期以及不同处理丹参的SmLEA2表达量进行检测。结果 获得SmLEA2 gDNA长1 961 bp, 由1个外显子和1个内含子组成, 并且内含子位于ATG的上游; 开放阅读框长为960 bp, 共编码319个氨基酸。生物信息学分析显示, SmLEA2是存在于细胞质中的亲水蛋白, 无跨膜结构域和信号肽, 其相对分子质量为35 340, 等电点为4.77。该基因在丹参的根、茎、叶中均有表达, 并且在茎中的表达量最高。随着花的成熟和种子的发育, 该基因表达量逐渐升高, 并且该基因的表达受茉莉酸甲酯(MeJA)以及脱落酸(ABA)的诱导作用影响。结论 克隆得到的丹参SmLEA2可能参与种子发育过程, 并在丹参防御反应中发挥作用。

关键词: 丹参; 晚期胚胎富集蛋白; 基因克隆; 表达分析; 茉莉酸甲酯; 脱落酸

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)13-1966-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.13.019

Molecular cloning and expression analysis of a late embryogenesis abundant protein gene (SmLEA2) from *Salvia miltiorrhiza*

WU Yu-cui, GE Qian, ZHOU Hong-jun, JIN Xin-xin, WANG Zhe-zhi

Key Laboratory of Medicinal Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry of Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drug in Northwest of China, College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: Objective To clone and characterize a late embryogenesis abundant protein SmLEA2 with its promoter region from *Salvia miltiorrhiza*, and to predict its probable function. **Methods** SmLEA2 was cloned by PCR and RT-PCR from genomic DNA and cDNA. Protein structure and phylogenetic relationships were carried out by bioinformatic analysis. Gene expression in different organs and different development periods was detected by qPCR. Gene expression was also detected under different treatments. **Results** By analyzing the cDNA library for *S. miltiorrhiza* with BLAST program, one of these sequences showed a high homology with late embryogenesis abundant (LEA) protein and was named as SmLEA2 (GenBank: HQ676610). We obtained 1 961 bp gene sequences of SmLEA2, which contained an intron and a single opening reading frame (ORF) of 960 bp encoding 319 amino acid peptides. Bioinformatic analysis showed that the putative SmLEA2 protein was a hydrophilic protein without signal peptides and transmembrane domains. The SmLEA2 protein was predicted with a molecular weight of 35 340 and a theoretical isoelectric point of 4.77. SmLEA2 was expressed in the roots, stems, and leaves of *S. miltiorrhiza*, and the most abundant in the stems. With the development of the flowers and seeds, its expression increased gradually. Expression of SmLEA2 could be induced by methyl jasmonate (MeJA) and abscisic acid (ABA). **Conclusion** Thus, we speculate that SmLEA2 may be involved in seed development and plant defenses.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; late embryogenesis abundant protein; gene cloning; expression analysis; methyl jasmonate; abscisic acid

收稿日期: 2014-12-26

基金项目: 陕西省科技计划项目(2012K19-02-04); 陕西省自然科学基金项目(2014JQ3100); 陕西省教育厅项目(2013JK0739); 院级科研项目(2014QNKJ079); 陕西省教育厅科学研究计划(14JK1178)

作者简介: 武玉翠(1985—), 女, 博士在读, 研究方向为植物生物技术。Tel: (029)85301260 E-mail: wuyucui224@163.com

*通信作者 王喆之, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物学研究。Tel: (029)85301260 E-mail: zzwang@snnu.edu.cn

植物在生长过程中总是受到不良环境因子的影响,包括非生物胁迫和生物胁迫^[1]。为了适应各种胁迫植物自身逐步形成了一系列特有的形态结构特征和生理生化机制。在逆境胁迫下,植物体内的基因表达会发生变化,产生渗透调节物质,并且合成一系列的胁迫诱导蛋白,其中包括晚期胚胎富集(late embryogenesis abundant, LEA)蛋白。1981年,Dure等^[2]首次在棉花种子胚胎发育后期发现了LEA蛋白。LEA蛋白广泛存在于高等植物中,是胚胎发育后期种子中高水平积累的一系列蛋白质。LEA基因受到干旱、脱水、盐渍、低温等胁迫因子和脱落酸(ABA)的诱导而大量表达^[3]。

LEA蛋白是一个庞大的家族,Wise等^[4]分析了拟南芥基因组中51种LEA蛋白,将其分为9个组,有研究证实其可能与植物的各种胁迫相关^[5],并且不同的家族成员具有不同的序列特异性和空间结构特征,因而可通过不同的作用机制发挥作用。LEA蛋白有分子伴侣的作用,它可以和异常或变性的蛋白质结合防止细胞内蛋白质变性沉淀,保护敏感性的酶。另外大多数LEA蛋白具高度的亲水性,能将水分捕获到细胞内,保护细胞免受水分胁迫的伤害^[6-7]。利用转基因技术过表达LEA蛋白得到了一些抗旱、耐盐植株^[8-10],为植物育种提供了新方法。目前LEA蛋白的研究已经成为一个热点,对该蛋白基因的深入研究可为揭示该家族蛋白基因的功能奠定一定的基础。

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为唇形科(Labiatae)鼠尾草属 *Salvia* L. 植物,以其干燥根及根茎入药,在临床上被广泛应用于心脑血管疾病、癌症以及各种炎症的治疗^[11-12]。随着丹参资源的开发和利用,丹参药材的需求量日益增长。使用生物技术手段来挖掘丹参的抗逆基因并进一步研究植物抗逆机制,是筛选和培育优良丹参种质的有效策略。在前期研究中,从丹参EST文库中筛选并克隆得到一条胁迫相关基因SmLEA,推测该基因所编码的蛋白属于晚期胚胎蛋白LEA14家族成员^[13-15]。SmLEA基因在丹参的根、茎、叶中均有表达,并且受到ABA、脱水、高盐和低温等诱导作用^[16]。研究表明,SmLEA基因在大肠杆菌和丹参中过量表达后提高了大肠杆菌的耐盐性和丹参的耐盐、耐旱性^[10]。为进一步深度挖掘丹参的抗逆基因和阐述丹参的抗逆机制,本研究从丹参中克隆得到一个新的LEA基因SmLEA2,采用生物信

息学方法对该基因进行了预测和分析,通过实时荧光定量PCR检测分析SmLEA2的表达特征,初步预测该基因的功能,为该领域的研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 种子经笔者鉴定后收集于陕西天士力植物药业商洛有限公司商州药源基地,在盛有蛭石-草木灰(2:1)的土壤中萌发,将长至2~3 cm的幼苗移到营养钵中,在人工气候箱(宁波,RXZ型-500D)中培养,光照强度8 000 lx,光周期为光照16 h/黑暗8 h,温度(25±2)℃,湿度48%。培养2个月的丹参幼苗用于DNA、RNA的提取和各种胁迫处理。取苗龄2个月丹参不同部位的新鲜组织,用于基因器官特异性的表达检测。取二年生丹参的花苞(F1),盛开1 d(F2)、3 d(F3)、5 d(F4)的花,未成熟种子(S1),成熟种子(S2),用于基因不同发育时期的表达检测。

DNA提取试剂盒、RNA提取试剂盒和DNase消化试剂购自Omega公司;反转录试剂盒、限制性内切酶(Dra I/EcoR V/Pvu II/Stu I)、T4 DNA连接酶、PrimeScript[®]RT Reagent Kit、SYBR Green II Premix Ex Taq、pMD19-T simple vector、DL 2000 Marker购自TaKaRa公司;大肠杆菌DH5α为本实验室保存。

1.2 MeJA、ABA处理方法

茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理时,用500 μmol/L MeJA溶液喷洒于2个月龄的丹参实生苗叶表面,分别于处理后0、1、2、4、6、8、24、48 h取全株样品。ABA处理时,用100 μmol/L ABA溶液喷洒于二月龄的丹参实生苗叶表面,分别于0、1、2、4、6、8、10、24、48 h取全株样品。

所有样品收集后迅速置于液氮中速冻,置于-80℃冻存备用。

1.3 核酸提取

丹参基因组DNA的提取参照CTAB法^[17]。用Omega公司试剂盒提取总mRNA,按照反转录试剂盒说明书,以总mRNA为模板合成cDNA第一链。

1.4 文库的构建

文库构建按照BD Genome Walker[™] Universal Kit(Clontech)试剂盒说明书进行。

1.5 丹参LEA蛋白的克隆

对丹参转录组数据库序列进行BLAST分析,

发现 Unigene55769_danshen (844 bp) 与其他物种中已报道的 LEA 基因具有很高的相似度, 命名为 SmLEA2。在其序列两端设计, 上游引物 LEA2-S: 5'-TTGCTCACTTCACTTGTCTCG-3'; 下游引物 LEA2-A: 5'-CTTCCCCGTTCTTCGCAAT-3'。分别以丹参 cDNA 和 gDNA 为模板进行 PCR 扩增。将扩增产物回收, 连接至 pMD19-T simple vector, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆, 经菌落 PCR 筛选阳性克隆送至华大基因进行测序。

根据 SmLEA2 基因已有的序列设计引物, 采用 DNA Walking 方法扩增得到该 Unigene 的 5'和 3'端侧

翼序列, 所用引物见表 1。该过程包含 2 个独立的 PCR 扩增, 每一个扩增由 2 步 PCR 反应组成, 反应条件参照文献方法^[16], PCR 产物经过纯化克隆连接到 pMD19-T simple vector, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经菌落 PCR 筛选阳性克隆送至华大基因进行测序。利用 DNASTar 软件将 DNA Walking 所得序列进行拼接得到该基因的全长以及启动子区。在此基础上设计基因全长引物 SmLEA2s: 5'-ATGGCGTCTTATGATAAGCC-AG-3'; SmLEA2a: 5'-AGTGATGAATGTATACCAG-CTAAGG-3'。以丹参 cDNA 和 gDNA 为模板进行扩增。

表 1 SmLEA2 基因 5'和 3'端侧翼序列克隆所用引物

Table 1 Primers used in cloning of 5' and 3' region of SmLEA2 gene

引物名称	编号	引物序列 (5'-3')
接头序列引物	AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
	AP2	ACTATAGGGCAGGAGTGGT
3'端特异扩增引物	GSP1	CGTGCCCGTGTGTTGGTAGGCTTACTTTC
	GSP2	GGTTCAGTTTGACAAGTTCTCATTCTGA
5'端第 1 次特异扩增引物	GSP3	AACGGGATCACGGTCAAAGGGTACTCA
	GSP4	GGAGTAGCGAGAACAAGTGAAGTGAGCAAACC
5'端第 2 次特异扩增引物	GSP5	CTGGATCAATGGGATGACGCCACGT
	GSP6	GGTGTTCTTGGAGTGGATGGGGA

1.6 SmLEA2 的生物信息学分析

SmLEA2 基因采用 DNASTar、NCBI、EBI 以及 ExPASy 等生物信息学软件和数据库进行分析和预测^[13]。蛋白和核酸序列的组成、理化性质和开放阅读框分析利用 DNASTar、ProtParam、pI/MV 和 ORF Finder 等在线工具进行; 蛋白质信号肽和跨膜结构域用 SignalP 和 TMHMM 软件预测; 通过在线工具 ProtScale 分析蛋白的亲水性/疏水性; 利用 SOPMA 在线工具对蛋白质二级结构进行预测; 多序列比对利用 Clustal W2 和 BLAST 等在线工具完成; 通过 MEGA4.0 邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统树; 基因转录起始位点利用 Softberry TSSP 工具

预测; 另外用 PlantCARE Database 分析启动子区转录应答元件。

1.7 SmLEA2 基因的表达分析

分别以丹参根、茎、叶、花的不同发育时期以及经 MeJA、ABA 处理的样品 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 分析。以丹参 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (GAPDH) 为内参, 对 SmLEA2 基因进行表达分析, 引物见表 2。反应条件参照文献方法^[18], 数据分析采用 “ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ” 的方法计算相对表达量^[19], 并用 SPSS 13.0 中 One-way ANOVA 方法进行单因素方差分析, 利用 Tukey test 分析各样品间基因表达的显著性 ($P < 0.05$)。

表 2 实时荧光定量 PCR 检测 SmLEA2 基因表达所用引物

Table 2 Primers used for analysis on expression of SmLEA2 by real-time qPCR

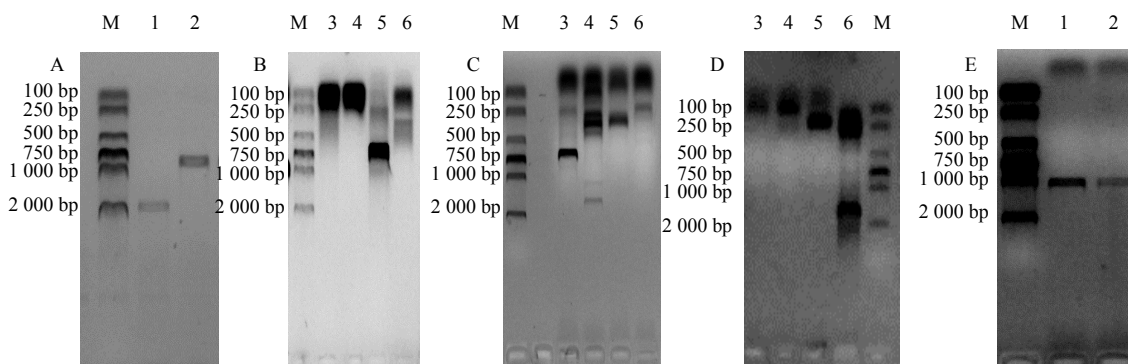
基因名称	产物大小/bp	引物名称	序列信息
GAPDH	183	GAPDHS	5'-ACCCTCACGGGGAAGACCAT-3'
		GAPDHA	5'-CCACGGAGACGGAGGACAA-3'
SmLEA2	224	RLEAS	5'-AGAGGGGAGAAAGAGGAAAAGA-3'
		RLEAA	5'-ATGAGAGGGATTGGAACAGGAT-3'

2 结果与分析

2.1 SmLEA2 基因的克隆与生物信息学分析

根据 Unigene55769_danshen 片段, 通过 DNA Walking 的方法获得了 SmLEA2 基因全长 (图 1)。拼接后得到该基因 gDNA 长为 1 961 bp, 包含 1 个外显子和 1 个内含子, 并且内含子处于起始密码子的上游, 开放读码框 960 bp, 编码 319 个氨基酸 (图

2)。SmLEA2 基因编码的蛋白质相对分子质量为 35 340, 等电点为 4.77, 为稳定性蛋白。另外 SmLEA2 蛋白缺乏半胱氨酸和酪氨酸, 而富含亲水性氨基酸, 这是大多数 LEA 蛋白的特征。进行 BLAST 保守性区域检索, 发现 SmLEA2 蛋白包含一个 LEA-2 蛋白结构域, 与其他植物中 LEA 一样具有典型的 LEA-2 结构域。



M-Marker; A-不同模板 Unigene55769_danshen 片段的扩增, 1-以基因组 DNA 为模板, 2-以 cDNA 为模板; B、C-丹参 SmLEA2 基因 5'侧翼区的 2 次扩增, 3-用 Dra I 消化, 4-用 EcoR V 消化, 5-用 Pvu II 消化, 6-用 Stu I 消化; D-SmLEA2 基因 3'侧翼区的扩增 E-SmLEA2 基因开放阅读框验证
M-Maker; A-PCR amplification products of Unigene55769_danshen obtained using different templates. Lane 1, genomic DNA as template. Lane 2, cDNA as templates; B and C-PCR amplification products of the first and second cycles of 5' flanking region of SmLEA2. Lanes showed different libraries used as template. Lane 3, digested with DraI, lane 4 with EcoRV, lane 5 with PvuII and lane 6 with StuI; D-PCR amplification products of 3' flanking region of SmLEA2; E-PCR amplification products of SmLEA2 gene.

图 1 丹参 SmLEA2 基因及其 5'侧翼区的扩增

Fig. 1 Analysis on size of SmLEA2 gene and its 5' flanking region

蛋白质在细胞内的定位不同, 预示着其将发挥不同的功能。SmLEA2 蛋白无跨膜结构域和信号肽, 定位在细胞质中, 可能在细胞质中发挥作用。蛋白质的高级结构决定了蛋白质的生物功能, 其预测分析对蛋白质的功能研究具有十分重要的意义。SmLEA2 蛋白的二级结构预测显示该蛋白不规则卷曲为 43.57%、延伸链为 29.47%、 α -螺旋为 21.00% 和 β -转角为 5.96%。SmLEA2 蛋白主要是由不规则卷曲组成, 其中 α -螺旋和不规则卷曲有助于蛋白束缚水分子和盐离子^[20-21]。SmLEA2 蛋白的三级结构具有 1 个 α -螺旋和 7 个 β -折叠, β -折叠呈反向平行。SmLEA2 蛋白的三级结构预测可进一步揭示该蛋白的功能特征。

预测蛋白质的亲疏水性可为蛋白质的功能研究提供理论参考。SmLEA2 的亲疏水性预测显示大部分氨基酸的分值为负值, 从总体来说该蛋白为亲水性蛋白。其中氨基酸序列的两端多为亲水性氨基酸, 中间多为疏水性氨基酸, 预示着该蛋白在保护细胞脱水方面具有一定的作用。

2.2 同源性分析和系统发育比较

蛋白比对 (Protein-protein BLAST) 结果显示, SmLEA2 蛋白与 GenBank 已注册的可可蛋白 (TcLEA2, XP_007026466)、刚毛柽柳蛋白 (ThLEA, AHF21584)、红蓖麻蛋白 (RcLEA14-A, XP_002533345)、拟南芥蛋白 (AtLEA2, NP_181934)、蒺藜苜蓿蛋白 (MtLEA14, XP_003617191) 的一致性达到 70% 以上, 相似性 (positives) 达到 90% 以上。对这 6 个蛋白进行蛋白序列比对分析的结果显示, SmLEA2 在氨基酸序列第 77~173 位和第 203~298 位包含有在其他物种中已报道的 LEA 蛋白的保守功能域 (图 3)。结合 Blast-CD Search 分析, SmLEA2 具有结构域 WHy, 将 SmLEA2 归属于 LEA-2 超家族。

MEGA4.0 软件平台上采用 N-J 方法构建系统进化树, 对不同物种 LEA 氨基酸序列进行分子系统进化分析 (图 4), 包括上述同源序列比对 5 种蛋白, 拟南芥 LEA 蛋白 (AtLEA3、AtLEA5、AtLEA14、AtEM1、AtXER02), 玉米 LEA 蛋白 (玉米 LEA3、玉米 LEA14-A、玉米 EMB5、玉米 DHN1) 和棉花

a-nucleotides sequence and deduced amino acid sequence of SmLEA2 b-intron of SmLEA2 (designated by an underline)

Fig. 2 Nucleotide sequence, amino acid sequence, and intron DNA sequence of SmLEA2

“*”表示6个蛋白都相同的氨基酸残基 “:”表示4个蛋白都相同的氨基酸残基 “•”代表3个蛋白都相同的氨基酸残基 下划线表示 WHy 结构域
“*”-incidates that six proteins with same amino acid residues; “:”-incidates that four proteins with the same amino acid residues; “•”-incidates that three proteins with the same amino acid residues; WHy domain was underlined

Fig. 3 Comparison on amino acid sequence of SmLEA2 with that of other LEA proteins

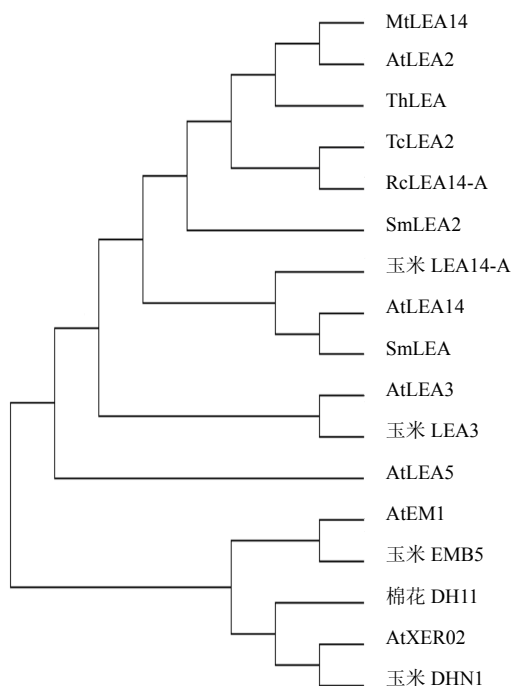


图 4 SmLEA2 与其他相关 LEA 蛋白的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of SmLEA2 with other related LEA proteins



下划线表示核心启动子区
Promoter core region was underlined

图 5 SmLEA2 基因启动子区序列及顺式作用元件

Fig. 5 Flanking region promoter sequence and *cis*-acting elements of SmLEA2

ABA 响应作用^[22]，在 SmLEA2 基因的启动子中，发现了 5 个 ABRE 元件。Abe 等^[23]发现 MYB 元件存在于拟南芥脱水应答基因 rd22 的启动子中，与脱水和 ABA 诱导有关。根据启动子区域中顺式作用

LEA 蛋白 (DH11)。结果显示 SmLEA2 与抗逆蛋白 TcLEA2 和 RcLEA14-A 亲缘关系较近。

2.3 SmLEA2 基因启动子区的克隆和序列分析

基因启动子由核心元件和转录调控区域 2 部分组成，核心元件包括 TATA 框和转录起始位点附近的起始子。对启动子区的分析有利于阐释基因的表达特征和调控机制。采用 DNA Walking 的方法获得 SmLEA2 基因 5' 启动子区长约 860 bp 的片段，该片段位于该基因内含子的上游，含有典型的植物启动子核心元件。软件预测发现 SmLEA2 基因 ATG 上游 -983 bp 处有 1 个 TSS 转录起始位点 (图 5)，并且该基因 TSS 的上游 23 bp 处有一个 TATA box (真核基因转录核心元件)。启动子区有 9 个对转录效率有影响的 CAAT box 序列和 1 个 5' UTR Py-rich stretch 元件。此外，该序列还包括多种顺式作用元件，包括 ABRE、TGACG-motif、CGTCA-motif、ERE 等与激素响应相关的顺式作用元件，MYB 转录因子结合位点以及 Box 4、CACGTGG-Box 等与光诱导相关的元件等 (表 3)。

研究表明 2 个或 2 个以上 ABRE 元件可以激活

元件的分析，推测该基因可能受到 MeJA、ABA 和逆境胁迫的诱导。

2.4 SmLEA2 基因的表达特征分析

利用实时荧光定量 PCR 的方法分析 SmLEA2

表 3 启动子区顺式作用元件的分析

Table 3 Analysis on *cis*-acting elements of promoter sequences

调控元件名称	序列	个数	作用
ABRE	MACGYGB	5	参与 ABA 应答反应
Box 4	ATTAAT	2	参与光反应
Box 1	TTTCAAA	1	参与光反应
CAAT-box	CAAT	9	启动子区和增强子区的作用元件
CGTCA-motif	CGTCA	2	参与 MeJA 胁迫反应的作用元件
ERE	ATTTCAAA	1	乙烯响应元件
CACGTGG-Box	CACGTG	2	参与光反应的作用元件
ACACGTGGC G-Box	ACACGTGGC	1	参与光反应的作用元件
GA-motif	ATAGATAA	1	光反应的作用元件
HD-Zip 3	GTAAT (G/C)ATTAC	1	蛋白结合位点
MBS	AACTG	2	参与干旱诱导的 MYB 结合位点
Skn-1_motif	GTCAT	2	胚胎表达相关作用元件
TATA-box	TATA	10	转录起始位点-30 处的核心启动子区
TCT-motif	ATAGAA	1	光反应的作用元件
TGACG-motif	TGACG	1	与 MeJA 胁迫反应的作用元件
Circadian	CAANNNNATC	4	生理调控相关的作用元件
5UTR Py-rich stretch	TTTCTTCTCT	1	赋予高转录水平的作用元件

基因的表达特征。结果表明：该基因为组成型表达基因，在丹参的根、茎、叶、花、种子中均有表达。在根、茎、叶中，SmLEA2 基因在茎中的表达量最高；该基因在花和种子的各个发育时期表达量不同，SmLEA2 的表达随着花的盛开和种子的成熟表达量显著上调，在 S1 中表达量最高，而在种子成熟后其表达量下降。SmLEA2 基因在不同部位和各个发育阶段中不

均匀的表达可能与 SmLEA2 不同的功能密切相关。结果见图 6。

SmLEA2 的表达响应 MeJA 的诱导，处理 4 h 后 SmLEA2 表达量显著上调，并在 8 h 达到峰值，约是对照 (0 h) 的 3 倍。ABA 处理后，SmLEA2 的表达量呈上调趋势，在 8 h 达到峰值，约是对照 (0 h) 的 52 倍，8 h 后该基因的表达量下降并趋于稳定。结果见图 6。

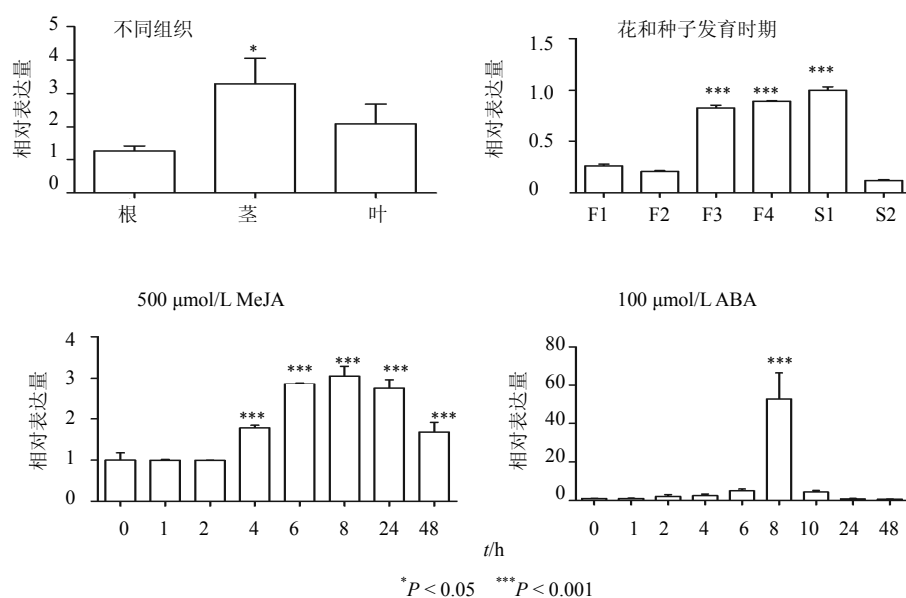


图 6 SmLEA2 的表达分析

Fig. 6 Expression analysis on SmLEA2

3 讨论

LEA 蛋白基因是植物体内一类重要的抗逆蛋白。本研究在丹参转录组数据库的基础上利用 PCR 技术和 DNA Walking 的方法克隆到了 SmLEA2 基因的全长。SmLEA2 与抗逆蛋白 TcLEA2 和 RcLEA14-A 亲缘关系较近,与拟南芥 AtLEA2 蛋白 (NP_181934) 的相似性高达 90% 以上, SmLEA2 具有 LEA-2 结构域,属于 LEA2 大家族。SmLEA2 蛋白的二级结构主要表现为不规则卷曲,富含甘氨酸、赖氨酸等亲水性氨基酸,这也是 LEA 家族蛋白的特点,属于 LEA 蛋白成员。生物信息学分析 SmLEA2 与已报道的 SmLEA 蛋白具有类似的三级结构,但是它们的亲疏水性不同。SmLEA2 为亲水性蛋白; SmLEA 为疏水性蛋白,属于 LEA14 大家族^[10],这预示着 SmLEA 和 SmLEA2 可能具有不同的功能和作用机制,这需要进行进一步的研究。

实时荧光定量 PCR 结果显示, SmLEA2 基因为组成型表达基因,在丹参的根、茎、叶中均有表达,以茎中表达最为丰富。SmLEA 则在根中表达最为丰富,茎中表达量最低^[13]。SmLEA2 与 SmLEA 在不同部位的表达差异性,进一步暗示它们所发挥的功能或者发挥功能的作用机制有所不同。

在胚胎发育中, LEA 蛋白在种子或胚胎的成熟时大量积累,在种子萌发时很快消失,这被认为是 LEA 蛋白在胚胎发育中呈现的特定表达模式^[5]。实时荧光定量 PCR 结果显示, SmLEA2 随着种子成熟其表达量逐步增加,而种子成熟后其表达量下降,预示着它在种子发育阶段中发挥着一定的功能。正常性种子发育末端都会发生成熟脱水事件,而 SmLEA2 蛋白在此阶段大量表达,表明该蛋白可能与种子的脱水耐性获得有着密切的关系。

利用 DNA Walking 的方法克隆获得了 SmLEA2 基因的 5'侧翼序列。经顺式作用元件预测,该区域含有多种与逆境胁迫相关的顺式作用元件,如 ABRE、MYB、CGTCA-motif 等,该基因可能受到 MeJA、ABA 和逆境胁迫的诱导。MeJA、ABA 在植物各种环境胁迫应答中发挥着重要作用。MeJA 参与植物生长发育调控,并且与植物抗机械伤害和抗病性密切相关,可传导逆境信号并启动下游抗逆基因来提高植物的抗逆境胁迫能力^[24]。实时荧光定量 PCR 分析结果显示,外源喷洒 MeJA 可显著诱导 SmLEA2 的表达。由此推测, SmLEA2 参与了丹参的抗逆反应过程。ABA 参与控制植物

生长和发育的多种生理过程,并且在植物抗逆性方面具有重要作用^[25]。研究表明,某些 LEA 基因的启动子区域含有 ABA 响应元件 (ABRES),胁迫信号通过 ABA 作用于响应元件,来调节 LEA 基因的表达^[24]。结合实时荧光定量 PCR 结果表明 SmLEA2 的表达受 ABA 诱导,并可能通过 ABA 依赖型途径参与丹参的耐受胁迫的过程。

SmLEA 基因受到 ABA 以及其他非生物因子如低温、高盐、干旱等的诱导^[18],在大肠杆菌和丹参中过量表达该基因,验证了 SmLEA 基因与丹参的耐盐、耐旱作用有关^[10]。SmLEA2 基因可对 MeJA 和 ABA 做出响应,基因表达结果与预测的调控元件结果相符合。SmLEA2 和 SmLEA 基因的表达都受到 ABA 的诱导,但它们的表达特征不尽相同。因此推测 SmLEA2 基因可能在丹参抗逆和防御反应中发挥作用,并且 SmLEA2 与 SmLEA 可能具有不同的作用机制,这需要进行进一步研究得到证实。

参考文献

- [1] 喻方圆,徐锡增.植物逆境生理研究进展[J].世界林业研究,2003,16(5):6-11.
- [2] Dure L, Greenway S C, Galau G A. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(14): 4162-4168.
- [3] Peter F S, Shen Q X, David H T H. Structure and promoter analysis of an ABA-and stress-regulated barley gene *HVA1* [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 617-630.
- [4] Wise M. LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles [J]. *BMC Bioinform*, 2003, 4(2): 52-70.
- [5] 詹立平,赵鑫,邹学忠.植物晚期胚胎富集蛋白的研究进展[J].吉林林业科技,2007,36(2):1-4.
- [6] Reyes J L, Rodrigo M J, Colmenero-Flores J M, et al. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects *in vitro* [J]. *Plant Cell Environ*, 2005, 28(6): 709-718.
- [7] Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores J M, Garcarrubio A, et al. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(8): 5668-5674.
- [8] Park S C, Kim C Y, Lee H S, et al. Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (*lblea14*) gene influences lignification and increases osmotic- and salt-stress

- tolerance of transgenic calli [J]. *Planta*, 233(3): 621-634.
- [9] Kim H S, Lee J H, Kim J J, *et al.* Molecular and functional characterization of *CaLEA6*, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum* [J]. *Gene*, 2005, 344(3): 115-123.
- [10] Wu Y C, Liu C L, Kuang J, *et al.* Overexpression of *SmLEA* enhances salt and drought tolerance in *Escherichia coli* and *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Protoplasma*, 2014, 251(5): 1191-1199.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [12] 柳 丽, 张洪泉. 丹参活性成分的现代中药药理研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(6): 1-4.
- [13] 刘从龄, 王喆之. 丹参晚期胚胎蛋白基因 *SmLEA* 的克隆及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2009, 30(5): 80-84.
- [14] 周宏骏, 武玉翠, 晋鑫鑫, 等. 丹参转录因子 *SmbHLH93* 的克隆及表达模式分析 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3449-3455.
- [15] 刘莉嘉, 杨 鑫, 彭玉帅, 等. 丹参酮生物合成的关键酶研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 140-147.
- [16] 刘从龄, 王喆之. 丹参晚期胚胎富集蛋白基因 *SmLEA* 的表达特征研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(1): 51-55.
- [17] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [18] Wang D H, Yao W, Song Y, *et al.* Molecular characterization and expression of three galactinol synthase genes that confer stress tolerance in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Plant Physiol*, 2012, 169(18): 1838-1848.
- [19] Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7): 11-18.
- [20] Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores J M, Garciarrubio A, *et al.* Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(8): 5668-5674.
- [21] Swire-Clark G A, Marcotte W R J. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(1): 117-128.
- [22] Urano K, Maruyama K, Ogata Y, *et al.* Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics [J]. *Plant J*, 2009, 57(6): 1065-1078.
- [23] Abe H, Urao T, Ito T, *et al.* *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 63-78.
- [24] Chong J J, Yang D D. Methyl jasmonate as vital substance in plants [J]. *Trends Genet*, 2003, 19(7): 409-413.
- [25] 童 超. ABA 生理功能与信号转导相关综述 [J]. 科技资讯, 2008(10): 44-45.