

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.04.003

引用格式:刘晋囡,张驰昊,董家乐,等.紫花苜蓿*MsHSP18.2*基因的克隆与功能分析[J].草地学报,2026,34(4):1158—1167
LIU Jin-nan, ZHANG Chi-hao, DONG Jia-le, et al. Cloning and Functional Analysis of *MsHSP18.2* Gene in *Medicago sativa*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(4):1158—1167

紫花苜蓿 *MsHSP18.2* 基因的克隆与功能分析

刘晋囡¹, 张驰昊¹, 董家乐², 艾 晔¹, 晁跃辉^{1*}

(1. 北京林业大学草业与草原学院, 北京 100083; 2. 四川锦江电子医疗器械科技股份有限公司, 四川 成都 610045)

摘要:小热休克蛋白(Small heat shock proteins, sHSPs),作为植物体内重要的应激诱导因子,在植物生长发育及响应各类胁迫中起重要调控作用。为探究紫花苜蓿*MsHSP18.2*基因功能,利用生物信息学工具进行蛋白理论性质、结构和功能预测分析;对植物进行茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)、吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA)、细胞分裂素(6-BA)等激素,以及干旱胁迫和盐胁迫的处理,利用RT-qPCR方法分别对处理0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 h时进行基因表达水平分析;利用酵母表达方法检测其转录自激活特性;利用异源酵母系统初步验证其耐逆功能。生物信息学分析结果表明,该蛋白分子量为18.18 kDa,理论等电点为5.55,具有较高的不稳定性(不稳定指数54.67),其二级结构以无规卷曲为主。表达分析结果显示,*MsHSP18.2*在干旱和盐胁迫处理下表达增强,并对不同植物激素呈现差异响应。酵母自激活活性分析检测显示该蛋白具有自激活特性。异源过量表达*MsHSP18.2*基因显著增强了酵母细胞的耐盐(NaCl)和耐渗透胁迫(PEG)能力。

关键词:*MsHSP18.2*; 紫花苜蓿; 生物学信息分析; 表达分析; 自激活检测

中图分类号:S541.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)04-1158-10

Cloning and Functional Analysis of *MsHSP18.2* Gene in *Medicago sativa*

LIU Jin-nan¹, ZHANG Chi-hao¹, DONG Jia-le², AI Ye¹, CHAO Yue-hui^{1*}

(1. Beijing Forestry University School of Grassland Science, Beijing 100083, China; 2. Sichuan Jinjiang Electronic Medical Device Technology Co., Ltd, Chengdu, Sichuan Province 610045, China)

Abstract: Small heat shock proteins (Small heat shock proteins, sHSPs) are a class of stress-induced proteins widely present in plants, play crucial roles in plant growth, development, and response to drought and salt stresses. To investigate the function of the *MsHSP18.2* gene in *Medicago sativa*, bioinformatics tools were employed to predict and analyze its theoretical properties, structure, and function. Plants were treated with methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), gibberellin (GA), and cytokinin (6-BA), as well as subjected to drought and salt stress. Gene expression levels were analyzed by qRT-PCR at 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, and 12 hours post-treatment. Transcriptional autoactivation was examined by using a yeast expression system. The stress resistance function was verified using a heterologous yeast system. The results showed that this protein has a molecular weight of 18.18 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.55, exhibiting relatively high instability (instability index: 54.67). Its secondary structure was predominantly composed of random coils. Expression analysis demonstrated that *MsHSP18.2* was upregulated under drought and salt stress treatments and displayed differential responses to various plant hormones. Yeast autoactivation assays confirmed its autoactivation activity. Heterologous overexpression of *MsHSP18.2* gene significantly enhanced the salt tolerance (NaCl) and osmotic stress (PEG) tolerance of yeast cells.

Key words: *MsHSP18.2*; *Medicago sativa*; Bioinformatics analysis; Expression analysis; Self-activation detection

收稿日期:2025-06-16;修回日期:2025-08-10

基金项目:内蒙古自治区科技重大专项项目专题“抗寒高产苜蓿新品种培育”(2022JBGS00160302)资助

作者简介:刘晋囡(1998-),女,汉族,山西朔州人,硕士研究生,主要从事草地植物育种研究,E-mail: ljn19981002@163.com; *通信作者
Author for correspondence, E-mail: chaoyuehui@bjfu.edu.cn

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs),作为一类高度保守的蛋白质分子,在生物界中普遍存在^[1-2],在生物体受到外界刺激或胁迫时上调表达,协助细胞内蛋白质正确构象和分子组装,发挥分子伴侣作用^[3]。热休克蛋白根据分子特性可分为包含HSP100, HSP90, HSP70, HSP60和小热休克蛋白家族(Small heat shock proteins, sHSPs)的5个家族^[4],其中sHSPs包含10~42 kDa的热休克蛋白。HSPs主要由ATP和底物结合结构域两部分构成,2个结构域可通过与配体结合作用发生变构^[3]。与依赖ATP的Hsp60, Hsp70, Hsp90和Hsp100不同, sHSPs自身无再折叠活性^[5],普遍具有一个由80~100个氨基酸残基构成的结构域,即 α -晶体蛋白结构域(ACD)^[6-7]。

不同生物种群中存在的sHSPs基因数量有所差异,尤其在高等植物中最为丰富。高等植物中至少有20种sHSPs^[8],它们广泛存在于根、茎、叶、种子等器官中,均由核基因编码。sHSPs在植物生命活动中发挥重要作用,尤其在蛋白质稳态维持方面扮演至关重要的角色,包括参与肽链折叠和多肽降解、蛋白空间构象的建立、异常蛋白的清除以及基因表达调控等^[7]。同时,sHSPs在植物响应各类逆境胁迫的防御机制中发挥关键作用,其表达水平与植物抗逆性密切相关。当植物受到生物或非生物胁迫时,细胞内部分蛋白质易发生错误折叠,此时sHSPs常常作为抵御细胞应激有害影响的第一道防线^[9]迅速响应,增强与错误折叠底物蛋白的结合能力,通过抑制异常蛋白聚集并协助其正确折叠,进而维持细胞稳态,保护有机体^[10]。相关研究表明,在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,高温胁迫下,质体金属蛋白酶FtsH6的缺失诱导HSP21上调表达,并持续积累,从而显著提高植物的耐热能力^[11]。另有实验证实,拟南芥过表达辣椒(*Capsicum annuum*)*CaHSP25.9*基因可以促进其在干旱条件下的发芽,调控根系伸长^[12]。除此之外,sHSPs还参与植物激素信号转导途径。玉米(*Zea mays*)遭受干旱和高温双重胁迫时,外源施加脱落酸(ABA)可显著诱导*sHSP26*表达^[13]。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*),作为豆科(Fabaceae)多年生优质牧草,蛋白质含量高,具有极高营养价值 and 较强的抗逆性^[14-16],备受全球市场青睐,发展空间广阔,被称为“牧草之王”。而紫花苜蓿在种植过程中时常面临着各种环境胁迫,如干旱胁迫、

盐胁迫等^[17-18],一定程度上限制了其推广应用。目前sHSPs在植物生长发育、胁迫响应等过程中的作用得到了广泛关注,在拟南芥^[19]、猕猴桃(*Actinidia chinensis*)^[20]、甜瓜(*Cucumis melo*)^[21]等中已有报道,但紫花苜蓿中研究较少。

因此,本试验以紫花苜蓿‘中苜一号’为材料,克隆得到*MsHSP18.2*基因,进行生物信息学预测与分析,通过表达模式分析、转录自激活检测、酵母功能验证等,初步探讨*MsHSP18.2*基因在紫花苜蓿中的功能,以期为进一步探究紫花苜蓿胁迫响应的基因调控与抗逆机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为野生型紫花苜蓿品种‘中苜一号’,保存于北京林业大学草业与草原学院分子实验室。克隆载体pMD19-T、Master Assembly无缝连接酶、大肠杆菌感受态细胞DH5 α 以及限制性内切酶*Sam*I、*Kpn*I和*Eco*R I购自TAKARA公司。DNA Marker DL5000、反转录预混型试剂盒、荧光定量Ultra SYBR Mixture由艾科瑞生物公司提供。植物总RNA、DNA和质粒提取试剂盒、DNA凝胶电泳纯化试剂盒均购自OMEGA公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计

使用Primer 5.0软件设计特异性引物。引物*MsHSP18.2*-F/R用于目标基因*MsHSP18.2*的克隆;通用引物M13-F/R用于鉴定克隆载体。引物BD-*MsHSP18.2*-F/R和NTB-*MsHSP18.2*-F/R分别用于构建植物表达载体BD-*MsHSP18.2*和NTB-*MsHSP18.2*;引物T7 promoter、3'BD和CYC1-R用于检测相应表达载体的成功构建。内参基因*MsActin*和目标基因*MsHSP18.2*的荧光定量PCR(qRT-PCR)检测分别采用引物Actin-*Ms*-F/R和RT-HSP18.2-F/R。所有引物序列详见表1。

1.2.2 *MsHSP18.2*基因克隆 选取健康紫花苜蓿植株叶片,按照RNA提取试剂盒说明书操作提取总RNA,并反转录为cDNA。以此cDNA为模板,使用引物HSP18.2-F/R扩增*MsHSP18.2*基因。对纯化后的PCR产物与克隆载体pMD19-T进行连接反应。将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primers names and sequences

引物名称 Primer name	序列(5'—3') Sequence(5'—3')	用途 Usage
HSP18.2-F	ATGTCGTTGATTCCAAGTTTCT	目的基因克隆扩增
HSP18.2-R	ACCAGAGATCTCAATAGACTTA	
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT	目的基因克隆检测
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	
BD-HSP18.2-F	GGACCTGCATATGGCATGTCGTTGATTCCAAGTTTCT	表达载体构建 目的基因扩增
BD-HSP18.2-R	CGGGAATTCGGCTCTCAACCAGAGATCTCAATAGAC	
NTB-MsHSP18.2-F	TGTACGACGATGACGATAAGATGTCGTTGATTCCAAGTTT	表达载体构建检测
NTB-MsHSP18.2-R	ACTGTGCTGGATATCTGCAGTCAACCAGAGATCTCAATAG	
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGG	内参基因荧光定量PCR检测
3'BD	TTTTCGTTTTTAAACCTAAGAGTC	
CYC1-R	GAGGGCGTGAATGTAAGC	目的基因荧光定量PCR检测
Actin-Ms-F	TGATCTGGCTGGTCGTGACCTTA	
Actin-Ms-R	ATGCCTGCTGCTTCCATTCTAT	
RT-HSP18.2-F	AGGCTGATCTTCCAGGGTT	
RT-HSP18.2-R	CCACTACTGCGCTCCACA	

细胞中。吸取转化菌液均匀涂布于含氨苄青霉素($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的LB固体培养基平板, 37°C 倒置培养12 h。挑取单菌落进行富集, 随后进行菌落PCR筛选并送测序验证。

1.2.3 表达载体构建 用试剂盒提取经测序验证正确的大肠杆菌菌液质粒。以引物BD-HSP18.2-F/R对目的基因进行PCR扩增。 30°C 条件下, 用限制酶 *Sam* I 酶切15 min, 处理表达载体BD。利用Master Assembly无缝连接酶, 在 50°C 条件下反应15 min, 将符合预期大小的PCR产物片段与酶切后的线性化载体进行连接。将连接产物导入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 涂布于含卡那霉素($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的LB固体培养基平板, 37°C 倒置培养12 h。挑取单克隆富集, 进行菌落PCR检测并测序鉴定。

以引物NTB-HSP18.2-F/R对目的基因进行PCR扩增, 在 37°C 条件下同时用限制酶 *Kpn* I 和 *Eco* R I 酶切20 min 处理 pYES2-NTB 表达载体。利用Master Assembly无缝连接酶, 在 50°C 条件下反应15 min, 将符合预期大小的PCR产物片段与酶切后的线性化载体进行连接。连接产物导入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的LB固体培养基平板, 37°C 倒置培养12 h。挑取单克隆富集, 进行菌落PCR检测并测序鉴定。

1.2.4 生物信息学分析 从NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取 *MsHSP18.2* 基因序列。采用NCBI CD-search工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)预测该基因编码蛋白保守结构域。通过NCBI BLAST([\[blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi\]\(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi\)\)搜索其同源蛋白序列, 并运用MEGA 11软件构建系统进化树。蛋白质二级和三级结构预测分别借助SOPMA\(\[https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html\]\(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html\)\)和SWISS-MODEL\(<https://swissmodel.expasy.org/>\)在线平台完成。利用ExPASy ProtParam工具\(<https://web.expasy.org/protparam/>\)分析MsHSP18.2蛋白的理化特性\(如分子量、等电点、分子式\), 并通过ProtScale\(<https://www.expasy.org/resources/protscale>\)评估其亲疏水性。使用TMHMM服务器\(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>\)预测该蛋白的跨膜结构域。借助SignalP 4.1 Server\(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>\)分析信号肽序列。亚细胞定位预测在Cell-PLoc网站\(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>\)进行。利用PlantCARE在线工具\(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>\)对基因启动子区的顺式作用元件进行预测分析。](https://</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.2.5 表达分析 选取生长健壮的两个月龄盆栽紫花苜蓿植株, 分别用 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA, $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA溶液均匀喷施叶片表面; 分别用 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl和 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG6000溶液浇灌植株根部进行胁迫处理。在处理0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 h采集叶片, 立即液氮速冻。按照试剂盒方法提取各组组织及各时间点叶片的总RNA, 并反转录为cDNA。

以 *MsActin* 基因为内参,采用 SYBR Green 染料法进行 qRT-PCR 检测目标基因 *MsHSP18.2* 的表达量。引物序列详见表 1。PCR 程序设定循环参数与相对表达量计算均参考李家兴等^[22]的方法。

1.2.6 自激活结构域检测分析 利用 LiAc 转化法将提取纯化的 BD-HSP18.2 质粒导入 Y2HGold 酵母菌株。转化菌液涂布于 SD/-Trp 培养基平板,30℃ 培养 2~3 d。挑取单克隆富集培养,进行菌落 PCR 检测及测序。将验证正确的阳性酵母菌株在 SD/-Trp 液体培养基中培养。分别吸取 10 μL 原液及其 10,100,1000 倍稀释液,点样于 SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-Gal 以及 SD/-Trp/X-α-Gal/AbA 三种固体培养基表面。将平板置于 30℃ 培养箱中培养 2~3 d,观察并记录酵母菌的生长状况,以判断 BD-*MsHSP18.2* 融合蛋白是否具有转录自激活活性。

1.2.7 酵母功能验证分析 利用 LiAc 转化法将提取纯化的 NTB-HSP18.2 质粒导入 INVSC1 酵母菌株。转化菌液涂布于 SD/-Ura 培养基平板,30℃ 培养 2~3 d。挑取单克隆富集培养,进行菌落 PCR 检测及测序。将验证正确的阳性酵母菌株在 SD/-Ura 液体培养基中培养调整至 OD₆₀₀=0.6。经预实验设计后,确定按 10⁰,10⁻¹,10⁻²,10⁻³ 浓度梯度各取 5 μL,分别点涂于 NaCl 浓度为 0,1.3,1.5 和 2.0 mol·L⁻¹ 的四种 SG/-Ura 固体培养基;吸取原酵母菌液分别置于 PEG 浓度为 0,60,90,120 和 135 mmol·L⁻¹ 的五种 SG-Ura 液体培养基中 30℃ 培养 24 h,后点涂于 SG/-Ura 固体培养基。30℃ 培养箱中培养 2~3 d,观察并记录酵母菌的生长状况。NaCl 模拟盐胁迫,PEG 模拟干旱胁迫。

2 结果与分析

2.1 *HSP18.2* 基因克隆

克隆基因大肠杆菌转化的 PCR 菌体检测结果显示,得到一条清晰、长度约为 480 bp 的条带(图 1-A),与目标基因长度基本相同。将菌液送至公司进行测序,测序结果与目的基因序列一致,说明该基因已被成功克隆。

2.2 表达载体构建

以 pMD19-T-HSP18.2 质粒作为模板进行 PCR 扩增,将其分别与表达载体 BD、pYES2-NTB 连接后转入大肠杆菌,进行 PCR 菌体检测后(图 1B-

D),送至公司测序,其序列与目标基因序列相同,表明 BD-HSP18.2 和 NTB-HSP18.2 载体构建成功。

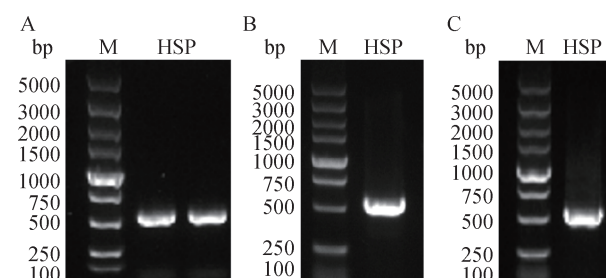


图1 目的基因克隆及载体构建 PCR 产物检测

Fig. 1 Target gene cloning and vector construction PCR product detection

注: A, 紫花苜蓿 *MsHSP18.2* 基因的克隆; B, 表达载体 BD-*MsHSP18.2* 的 PCR 检测; C, 表达载体 NTB-*MsHSP18.2* 的 PCR 检测。其中 M 为 DNA Marker DL5000, HSP 为 *MsHSP18.2* 基因

Note: A, Cloning of *MsHSP18.2* gene from alfalfa; B, PCR detection of expression vector BD-*MsHSP18.2*; C, PCR detection of expression vector NTB-*MsHSP18.2*. Where M is DNA Marker DL5000 and HSP is gene *MsHSP18.2*

2.3 生物信息学分析

紫花苜蓿 *MsHSP18.2* 基因序列分析显示,其开放阅读框长 480 bp,共编码 159 个氨基酸残基。使用 MEGA 软件构建系统发育进化树(图 2A),结果表明紫花苜蓿 *MsHSP18.2* 蛋白与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)、毛苕子 (*Vicia villosa*)、红三叶 (*Trifolium pratense*) 中 HSP 蛋白高度同源,其氨基酸序列最相似(图 2B)。蛋白理化性质分析表明, *MsHSP18.2* 分子式为 C₈₁₀H₁₂₆₄N₂₂₀O₂₄₈S₄,相对分子量为 18.2 kD,理论等电点 5.55,含 28 个带负电残基和 25 个带正电残基。生物信息学预测,该蛋白不稳定指数为 54.67,脂溶性指数为 65.53,平均亲水性系数为 -0.701,表明其属于不稳定的亲水性蛋白。蛋白结构预测分析显示, *MsHSP18.2* 的二级结构主要由无规则卷曲 (60.38%)、延伸链 (20.75%) 和 α-螺旋 (18.87%) 组成(图 3A-B);并含有一个典型的 ACD 保守结构域(图 3C)。蛋白功能预测显示, *MsHSP18.2* 蛋白无信号肽(图 3D);该蛋白含有多个亲水区和疏水区(图 3E),且为非跨膜性蛋白(图 3F)。Cell-PLoc 网站预测显示其定位于细胞质中。

MsHSP18.2 启动子顺式作用元件分析结果显示(图 4),该启动子区域除核心关键元件外,涉及众多激素响应元件,其中包含 ABRE(脱落酸 ABA 响应元件)、TGACG-motif 与 CGTCA-motif(茉莉酸甲

酯 MeJA 响应元件)、MYC(茉莉酸 JA 响应元件)、GA-motif(赤霉素 GA 响应元件)等。此外,包含 Box 4、G-Box、chs-CMA1a、chs-CMA2a、GATA-motif 等的光响应元件以及抗氧化反应元件 ARE 等

也预测发现。这表明 *MsHSP18.2* 基因表达可能受多种激素影响,并可能通过激素调控在紫花苜蓿的生长发育过程中发挥重要作用。

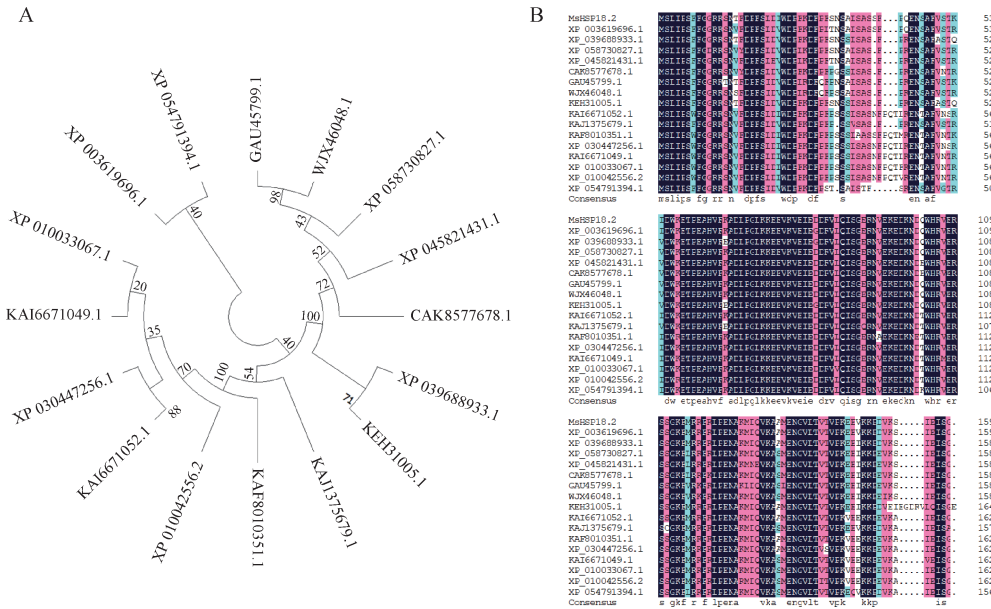


图 2 *MsHSP18.2* 同源蛋白序列进化树与氨基酸序列比对

Fig. 2 Evolutionary tree and amino acid sequence alignment of *MsHSP18.2* homologous protein

注: XP_003619696.1 为蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*); XP_039688933.1 为蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*); XP_058730827.1 为毛苕子 (*Vicia villosa*); XP_045821431.1 为红三叶 (*Trifolium pratense*); CAK8577678.1 为家山黧豆 (*Lathyrus sativus*); GAU45799.1 为地三叶 (*Trifolium subterraneum*); WJX46048.1 为白三叶 (*Trifolium repens*); KEH31005.1 为蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*); KAI6671052.1 为大蒲桃 (*Syzygium grande*); KAJ1375679.1 为刺田菁 (*Sesbania bispinosa*); KAF8010351.1 为柠檬桉 (*Corymbia citriodora subsp. variegata*); XP_030447256.1 为油叶蒲桃 (*Syzygium oleosum*); KAI6671049.1 为大蒲桃 (*Syzygium grande*); XP_010033067.1 为大桉 (*Eucalyptus grandis*); XP_010042556.2 为大桉 (*Eucalyptus grandis*); XP_054791394.1 为灰牧豆树 (*Prosopis cineraria*)

Note: XP_003619696.1, *Medicago truncatula*; XP_039688933.1, *Medicago truncatula*; XP_058730827.1, *Vicia villosa*; XP_045821431.1, *Trifolium pratense*; CAK8577678.1, *Lathyrus sativus*; GAU45799.1, *Trifolium subterraneum*; WJX46048.1, *Trifolium repens*; KEH31005.1, *Medicago truncatula*; KAI6671052.1, *Syzygium grande*; KAJ1375679.1, *Sesbania bispinosa*; KAF8010351.1, *Corymbia citriodora subsp. Variegata*; XP_030447256.1, *Syzygium oleosum*; KAI6671049.1, *Syzygium grande*; XP_010033067.1, *Eucalyptus grandis*; XP_010042556.2, *Eucalyptus grandis*; XP_054791394.1, *Prosopis cineraria*

2.4 表达分析

为探究 *MsHSP18.2* 基因在 MeJA, SA, ABA, IAA, GA, 6-BA 等激素, 以及干旱胁迫和盐胁迫处理下的表达情况, 分别对处理 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 h 时 *MsHSP18.2* 基因的表达量进行检测。结果显示, *MsHSP18.2* 在不同激素和非生物胁迫作用下具有不同的表达特征。经 MeJA 处理, *MsHSP18.2* 基因相对表达量迅速下降, 6 h 时最低, 为对照组的 0.63%, 随后逐步回升 (图 5A)。SA 处理后, *MsHSP18.2* 表达量先上升后下降, 0.5 h 时达到最高值, 为对照组的 1.55 倍 (图 5B)。ABA 处理后, *MsHSP18.2* 基因表达量迅速上升, 于 0.5 h 达到峰值,

较对照组增加约 28 倍, 随后又迅速下降 (图 5C)。IAA 处理后 *MsHSP18.2* 表达变化不规律, 但总体呈现上升趋势, 9 h 时表达量最高, 为对照组的 51.8 倍 (图 5D)。GA 处理后 *MsHSP18.2* 表达量整体高于对照组 (图 5E)。6-BA 处理后, *MsHSP18.2* 表达量在 1 h 时达到峰值, 为对照组的 2.24 倍, 而后下降并在 9 h 时出现回升 (图 5F)。经干旱处理后, *MsHSP18.2* 表达量短时间内迅速升高, 于 1 h 时达到峰值, 较对照增加约 59 倍, 此后迅速下降, 但整体仍高于对照组 (图 5G); 盐胁迫处理后, 先上升后下降, 1 h 时表达量最高, 为对照组的 4.81 倍 (图 5H)。

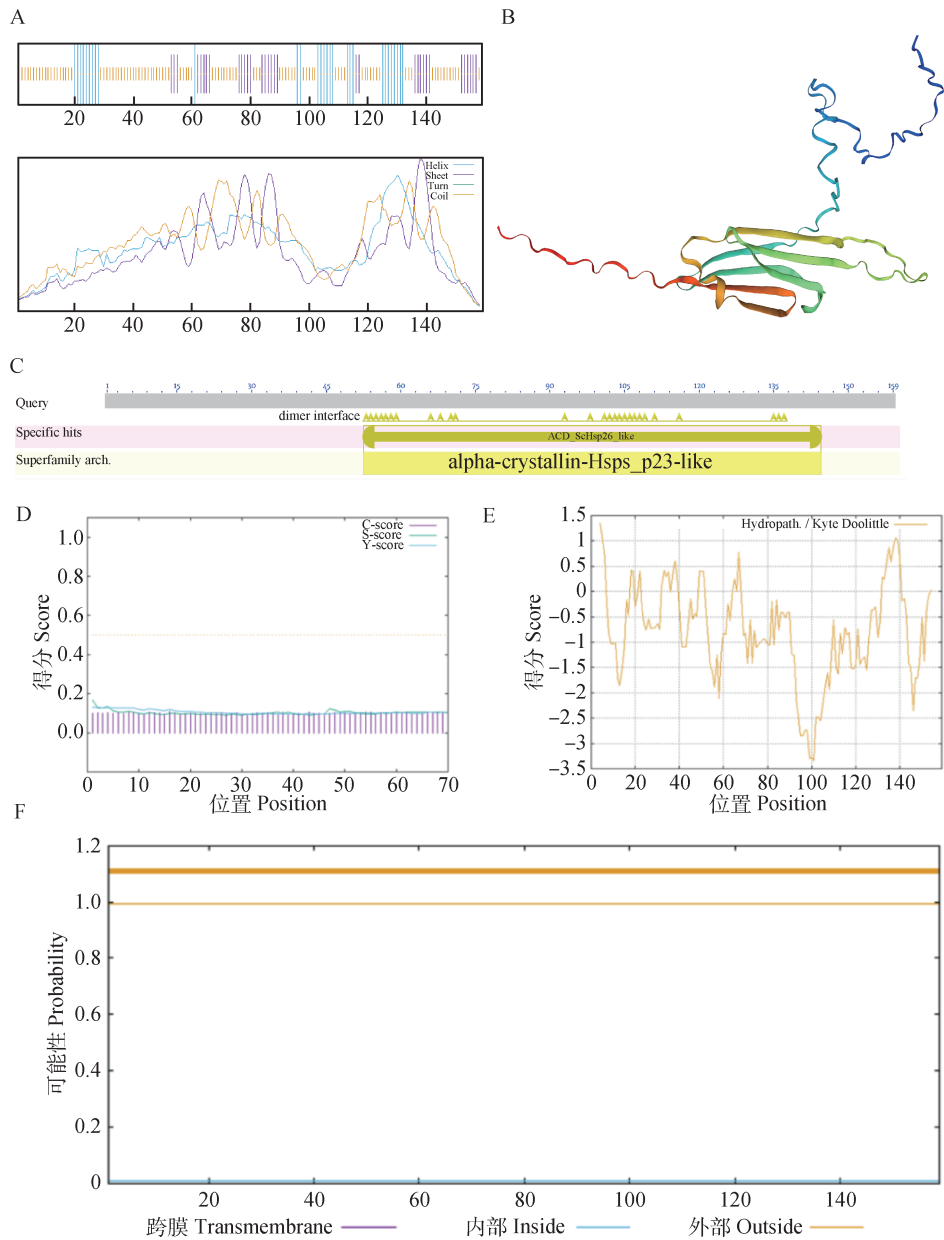


图 3 *MsHSP18.2* 蛋白生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatics analysis of *MsHSP18.2* protein

注: A, 蛋白二级结构(蓝色, α -螺旋; 黄色, 延伸链; 绿色, β 转角; 紫色, 无规则卷曲); B, 蛋白三级结构; C, 蛋白结构域预测; D, 信号肽预测; E, 亲疏水性预测; F, 跨膜结构分析

Note: A, secondary structure of protein (blue: α helix; yellow: extended strand; green: beta turn; purple: random coil); B, tertiary structure of protein; C, prediction of protein domain; D, prediction of signal peptide; E, prediction of hydrophobicity; F, analysis of transmembrane structure

2.5 自激活检测分析

将 BD-HSP18.2 质粒转入 Y2H Gold 酵母菌后进行摇菌, 并将其按不同稀释倍数点板于不同培养基, 结果如图 6, 表明 *MsHSP18.2* 蛋白无毒; 且该蛋白具有转录自激活活性。

2.5 酵母功能验证分析

将 NTB-HSP18.2 质粒转入 INVSC1 酵母菌后

进行摇菌, 处理后将接种至不同培养基, 如图 8 显示, 在添加 0, 1.3, 1.5 和 2.0 mol·L⁻¹ NaCl 的培养基上重组酵母的生长情况均显著优于对应对照组(图 7A); PEG 浓度为 60, 90, 120 和 135 mmol·L⁻¹ 培养下的重组酵母生长情况均优于对应对照组(图 7B)。结果说明在干旱与盐胁迫条件下, *MsHSP18.2* 均可以提高酵母耐盐、耐旱抗性。

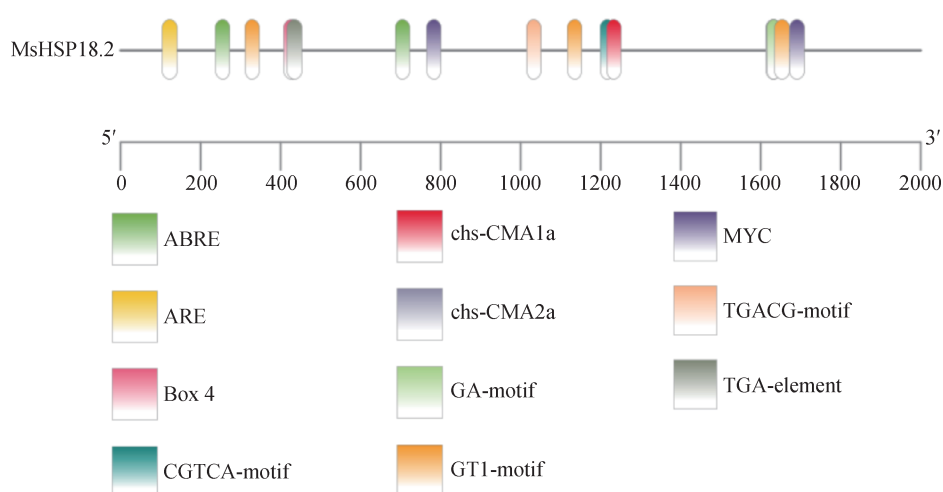
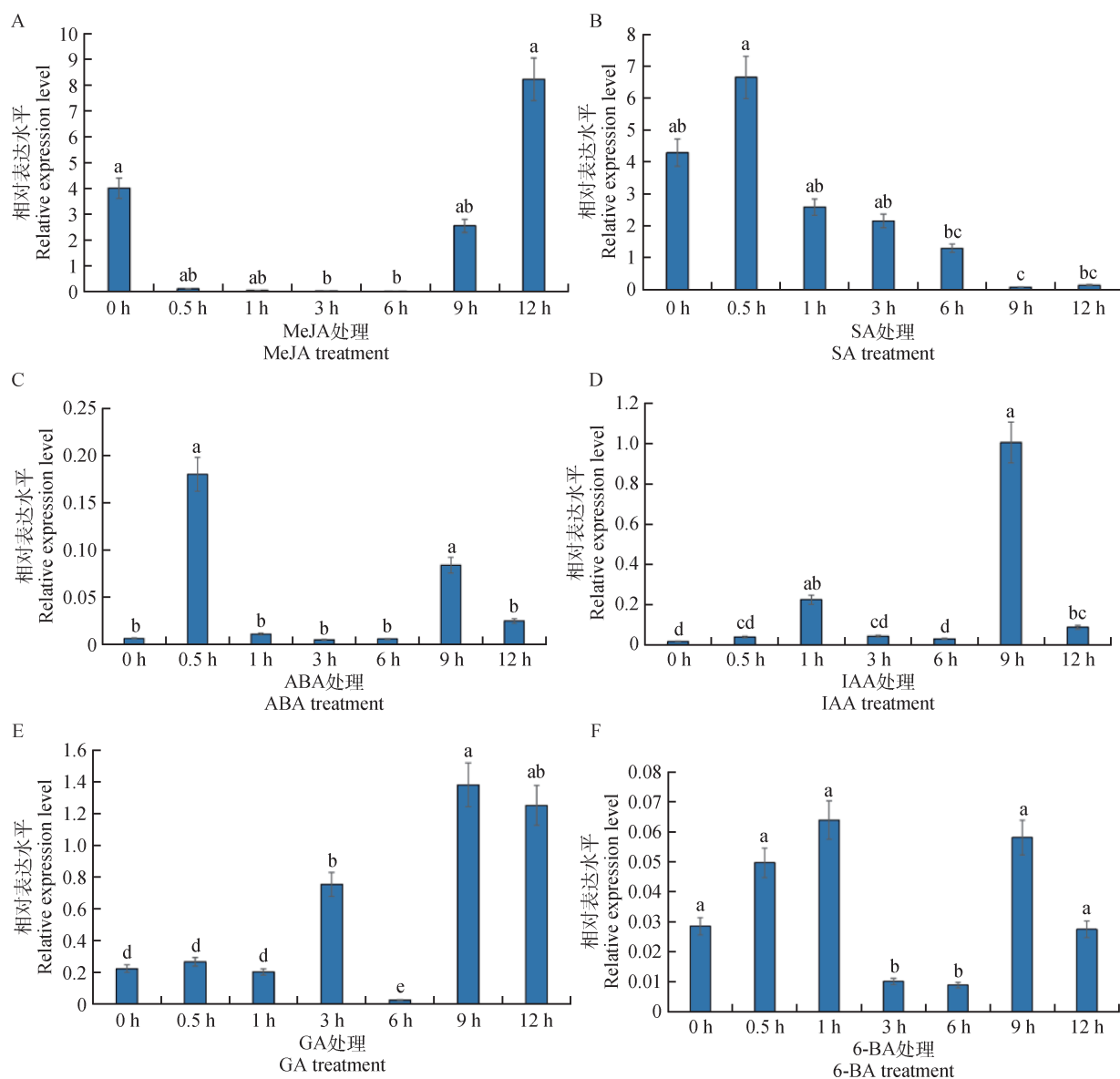
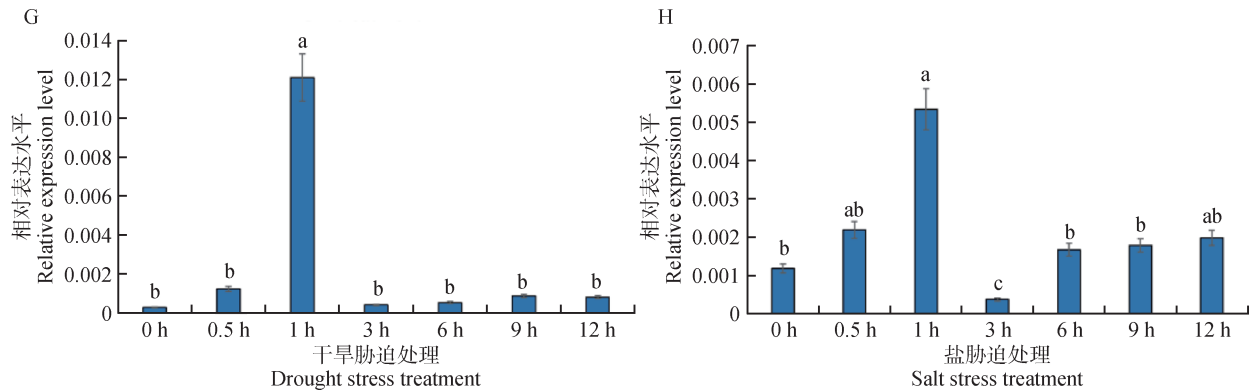


图 4 *MsHSP18.2* 基因启动子顺式作用元件分析

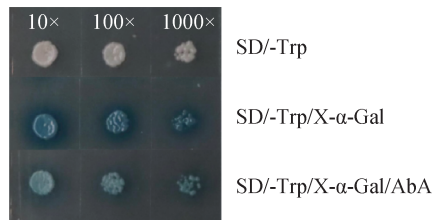
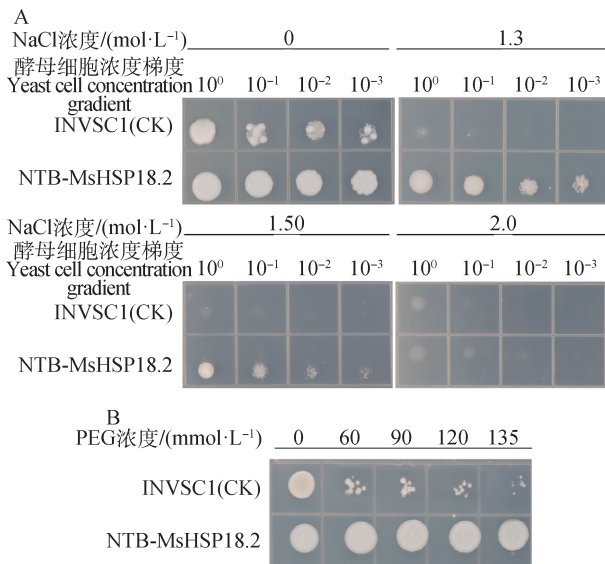
Fig. 4 Analysis of *cis*-acting elements in the *MsHSP18.2* gene promoter



图 5 *MsHSP18.2* 基因的表达分析Fig. 5 Expression analysis of the *MsHSP18.2* gene

注:不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different small letters mean significant difference ($P < 0.05$)

图 6 *MsHSP18.2* 蛋白的自激活检测Fig. 6 Self-activation detection of *MsHSP18.2* protein图 7 异源酵母系统验证 *MsHSP18.2* 的耐逆功能Fig. 7 The heterologous yeast system verified the stress resistances function of *MsHSP18.2*

3 讨论

sHSPs 作为广泛存在于高等植物中的关键蛋白,在植物生长发育及胁迫响应中扮演重要角色,因此受到广泛关注。本研究中 *MsHSP18.2* 蛋白不稳定系数为 54.67,属不稳定蛋白,这一特性与张琼等

人^[23]在甜菜(*Beta vulgaris*)中鉴定的不稳定亲水蛋白 BvHSP18.2,以及王馨桐^[24]预测紫茉莉(*Mirabilis jalapa*)MjsHsp18.2 蛋白不稳定的结果一致,符合 sHSPs 的共同特性。sHSPs 的亚细胞定位差异决定了其功能的多样性,且在不同细胞器中的丰度也不同。大量研究表明,大多数植物 sHSPs 主要在细胞质中发挥生理功能。例如,烟草 NbHSP20^[25]和玉米 ZmHSP17.7^[26]。本研究中 *MsHSP18.2* 同样预测定位于细胞质中,这与前人研究相符。

在激素响应方面,sHSPs 基因的表达模式存在物种特异性。研究发现,烟草 sHSP 在 MeJA 处理后被诱导表达,表达水平快速升高,从而响应热胁迫^[27];然而,本研究中 MeJA 处理却迅速抑制 *MsHSP18.2* 基因的表达,说明不同物种 sHSPs 对 MeJA 响应各异。相反,ABA 处理则能显著诱导多种植物 sHSPs 基因的表达,如丹参 *SmHSP21.8* 基因显著上调^[28],以及在水稻(*Oryza sativa*)中 *OsHSP23.7*、*OsHSP17.7* 等热激蛋白基因表达水平提高,并且伴随着幼苗的抗氧化防御能力与耐热性的增强^[29]。与前人研究一致的是,本研究中 ABA 处理也导致 *MsHSP18.2* 基因在短期内显著上调表达,且整体水平高于对照组。

sHSPs 基因家族在响应干旱和盐等非生物胁迫过程中发挥重要作用。干旱和盐通过影响植物渗透调节水平和信号转导^[30],进而制约植物生长发育。研究表明,过量表达 sHSPs 可显著提升植物的耐旱性,表现为转基因植株抗氧化酶(如 SOD 和 POD)活性增强、游离脯氨酸积累量增加、膜损伤指标 MDA 含量降低^[31]。在拟南芥中过表达小麦(*Triticum aestivum*)*TaHSP17.6* 基因可以通过促进侧根发育来适应高盐环境^[32]。此外,已有文献证实,

sHSPs 可通过多种途径(例如提高细胞抗氧化防御能力、维持组织水分平衡、促进种子萌发等)增强植物耐盐性^[7]。本研究, *MsHSP18.2* 在干旱和盐胁迫下均呈现上调表达, 更重要的是, *MsHSP18.2* 的重组酵母在相应胁迫条件下的生长状况均优于对照组, 直接证明该基因具有响应干旱胁迫和盐胁迫的功能潜力。这表明 *MsHSP18.2* 基因在紫花苜蓿中可能通过类似机制发挥作用, 为后续选育抗旱、耐盐紫花苜蓿转基因品种提供帮助。

4 结论

研究团队成功克隆紫花苜蓿 *MsHSP18.2* 基因, 该基因开放阅读框长度为 480 bp, 编码 159 个氨基酸。生物信息学分析表明, *MsHSP18.2* 蛋白的相对分子量为 18.18 kDa, 理论等电点为 5.55, 不稳定系数为 54.67, 表明其属于不稳定蛋白。系统进化分析显示, *MsHSP18.2* 蛋白与蒺藜苜蓿 *MtHSP18.2* 的亲缘关系较近。酵母双杂交试验发现, *MsHSP18.2* 蛋白存在自激活活性。表达模式分析揭示了 *MsHSP18.2* 对激素的响应, MeJA 诱导下基因表达水平显著降低, SA 和 ABA 诱导下基因表达量呈瞬时上升, 推测 *MsHSP18.2* 基因可能正向参与 SA 和 ABA 信号通路, 负向参与 MeJA 信号通路。胁迫条件下的表达模式与初步功能验证, 表明 *MsHSP18.2* 基因对紫花苜蓿的耐旱、耐盐机制可能具有重要的响应与调控作用。

参考文献

- [1] 栗振义, 龙瑞才, 张铁军, 等. 植物热激蛋白研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(2): 7-13
LI Z Y, LONG R C, ZHANG T J, et al. Research progress on plant heat shock protein[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(2): 7-13
- [2] 李艳, 张国强, 邵东燕, 等. 小分子热休克蛋白的结构与功能[J]. 生命科学, 2017, 29(1): 55-61
LI Y, ZHANG G Q, SHAO D Y, et al. The structure and function of the small heat shock proteins[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2017, 29(1): 55-61
- [3] 李庆伟, 徐静, 李瑶. 热休克蛋白进化及生物学功能研究进展[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2024, 47(1): 78-85
LI Q W, XU J, LI Y. Research progress on function and evolution of heat shock protein[J]. Journal of Liaoning Normal University(Natural Science Edition), 2024, 47(1): 78-85
- [4] GUPTA S C, SHARMA A, MISHRA M, et al. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? [J]. Life Sciences, 2010, 86(11-12): 377-384
- [5] WATERS E R. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. [J]. Journal of experimental botany, 2013: 391-403
- [6] 俞佳虹, 冯坤, 程远等. 植物小热激蛋白的研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(8): 3016-3023
YU J H, FENG K, CHENG Y, et al. Research progress on small heat shock proteins in plants[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(8): 3016-3023
- [7] 邢悦楠, 王皓, 张琼, 等. 植物小分子热激蛋白的功能及表达调控[J]. 植物生理学报, 2023, 59(8): 1524-1532
XING Y N, WANG H, ZHANG Q, et al. Function and expression regulation of plant small molecule heat shock proteins[J]. Plant Physiology Journal, 2023, 59(8): 1524-1532
- [8] 郭尚敬, 陈娜, 孟庆伟. 叶绿体小分子量热激蛋白介绍[J]. 植物学报, 2005, 22(2): 223-230
GUO S J, CHEN N, MENG Q W. Chloroplast-localized small heat shock Proteins[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2005, 22(2): 223-230
- [9] 王敏, 江彪, 林毓娥, 等. 小分子热激蛋白参与植物抗逆性方面的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(18): 29-32, 35
WANG M, JIANG B, LIN Y E, et al. Advances of small heat shock proteins participating in plant resistance[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(18): 29-32, 35
- [10] 李春子, 成善汉. 烟草细胞质小分子热激蛋白基因 *Nt-Hsp17.8* 的克隆及胁迫诱导表达特性分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(4): 202-206
LI C Z, CHENG S H. Cloning of small molecular shock protein gene *Nt-Hsp17.8* from *Nicotiana tabacum* and its expression analysis under inuced by stress [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2011, 26(4): 202-206
- [11] SEDAGHATMEHR M, MUELLER-ROEBER B, BALAZADEH S. The plastid metalloprotease FtsH6 and small heat shock protein HSP21 jointly regulate thermomemory in *Arabidopsis*. Nature Communications, 2016, 7(1): 12439-12452
- [12] FENG X H, ZHANG H X, Ali M, et al. A small heat shock protein CaHsp25.9 positively regulates heat, salt, and drought stress tolerance in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 142: 151-16
- [13] 潘攀, 杨彦芳, 王瑛等. 干旱高温复合胁迫下 *sHSPs* 基因在不同耐旱性玉米中的表达差异及其对 ABA 和 H_2O_2 的响应[J]. 西北植物学报, 2013, 33(8): 1612-1620
PAN P, YANG Y F, WANG Y, et al. Difference of *sHSPs* expression in four maize varieties with different endurance and the influence of ABA and H_2O_2 on them under combined drought and heat stress[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(8): 1612-1620
- [14] 李迪娜, 王凯, 陶佳丽, 等. 偏关苜蓿 *MsMYB44* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J/OL]. <https://link.cnki.net/urlid/11.3362.S.20250527.0937.002>, 2025-05-27/2025-11-24
LI D N, WANG K, TAO J L, et al. Cloning, subcellular localization and expression analysis of *MsMYB44* gene in *Medicago*

- sativa* 'Pianguan' [J/OL]. <https://link.cnki.net/urlid/11.3362.S.20250527.0937.002,2025-05-27/2025-11-24>
- [15] 石菁,刘晓静,李佳奇,等. 15个紫花苜蓿品种在民勤地区的适应性研究[J]. 草地学报,2025,33(9):2843-2853
SHI J, LIU X J, LI J Q, et al. Study on the adaptability of 15 alfalfa varieties in minqin area[J]. Acta Agrestia Sinica, 2025, 33(9):2843-2853
- [16] 丛龙丽,高凯,刘之浩,等. 磷添加对紫花苜蓿生物量、根系特性及化学计量特征的影响[J]. 中国草地学报,2024,46(11):66-73
CONG L L, GAO K, LIU Z H, et al. Effects of phosphorus addition on biomass, root characteristics and stoichiometric characteristics of alfalfa [J]. Chinese Journal of Grassland, 2024, 46(11):66-73
- [17] 安雯,张新宇,麻冬梅,等. 紫花苜蓿 *MsNF-YB8* 基因的克隆及耐盐性分析[J]. 草地学报,2025,33(8):2456-2466
AN W, ZHANG X Y, MA D M, et al. Cloning and salt tolerance analysis of *MsNF-YB8* gene in alfalfa[J]. Acta Agrestia Sinica, 2025, 33(8):2456-2466
- [18] 高鑫,高佳荷,侯瑞虹,等. 基于转录组测序的紫花苜蓿耐盐相关转录因子挖掘研究[J]. 中国草地学报,2024,46(12):1-11
GAO X, GAO J H, HOU R H, et al. Research on the mining of salt-tolerant related transcription factors in alfalfa based on transcriptome sequencing[J]. Chinese Journal of Grassland, 2024, 46(12):1-11
- [19] 黄思沛,黄德娅,付连郭,等. 拟南芥 *Hsp20* 基因家族的特征及其在干旱和盐胁迫下的表达分析[J]. 生命科学研究,2023,27(2):162-169
HUANG S P, HUANG D Y, FU L G, et al. Characterization of *Arabidopsis thaliana* *Hsp20* gene family and its expression analysis under drought and salt stress [J]. Life Science Research, 2023, 27(2):162-169
- [20] 侯雅琼,郎红珊,闻蒙蒙,等. 猕猴桃 *AcHSP20* 基因家族的鉴定及表达分析[J]. 生物技术通报,2024,40(5):167-178
HOU Y Q, LANG H S, WEN M M, et al. Identification and expression analysis of *AcHSP20* gene family in kiwifruit [J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(5):167-178
- [21] 杨森要,张修月,毛文文,等. 甜瓜热激蛋白 *HSP20* 基因家族鉴定及生物信息学分析[J]. 中国蔬菜,2023(12):26-34
YANG S Y, ZHANG X Y, MAO W W, et al. Identification and bioinformatics analysis of heat shock protein 20 (*HSP20*) gene family in melon [J]. China Vegetables, 2023, (12):26-34
- [22] 李家兴,周丽莹,苑峰,等. 紫花苜蓿 *MsHB1* 基因的克隆及表达分析[J]. 草地学报,2023,31(12):3617-3625
LI J X, ZHOU L Y, YUAN F, et al. Cloning and expression analysis of *MsHB1* gene from *Medicago sativa* [J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(12):3617-3625
- [23] 张琼,王锦霞,孟诗琪,等. 甜菜热激蛋白基因 *BvHSP18.2* 的克隆和生物信息学分析[J]. 中国农学通报,2022,38(27):111-118
ZHANG Q, WANG J X, MENG S Q, et al. Sugar beet Heat-shock protein gene *BvHSP18.2*: cloning and bioinformatics Analysis [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(27):111-118
- [24] 王馨桐. 紫茉莉小热休克蛋白 *MjsHsp18.2*、*MjsHsp17.7* 在酵母内质网应激反应中的功能研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2018,15-21
WANG X T. The defense function of *MjsHsp18.2* and *MjsHsp17.7* from *Mirabilis jalapa* L. responding of endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae* strains [D]. Shenyang:Shenyang Agricultural University, 2018, 15-21
- [25] 齐盼盼. 烟草小热休克蛋白 (*NbHSP20*) 与两种植物病毒的互作研究[D]. 杭州:浙江师范大学,2023,26-27
QI P P. Interaction between small heat shock protein of *Nicotiana tabacum* (*NbHSP20*) and two plant viruses [D]. Hongzhou: Zhejiang Normal University, 2023, 26-27
- [26] 孙爱清,葛淑娟,董伟,等. 玉米小分子热激蛋白 *ZmHSP17.7* 基因的克隆与功能分析[J]. 作物学报,2015,41(3):414-421
SUN A Q, GE S J, DONG W, et al. Cloning and function analysis of small heat shock protein gene *ZmHSP17.7* from *Maize* [J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(3):414-421
- [27] KOBAYASHI M, YAMAMOTO-KATOU A, KATOU S, et al. Identification of an amino acid residue required for differential recognition of a viral movement protein by the tomato mosaic virus resistance gene *Tm-2(2)* [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(10):1142-1145
- [28] 王世威,屈仁军,彭佳铭等. 丹参小分子热激蛋白 *SmHSP21.8* 基因克隆、诱导模式和原核表达[J]. 药学报,2022,57(6):1909-1917
WANG S W, QU R J, PENG J M, et al. Cloning, induction pattern and prokaryotic expression of a small heat shock protein *SmHSP21.8* gene from *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2022, 57(6):1909-1917
- [29] LIU X L, JI P, YANG H T, et al. Priming effect of exogenous ABA on heat stress tolerance in rice seedlings is associated with the upregulation of antioxidative defense capability and heat shock-related genes [J]. Plant Growth Regulation, 2022, 98(1), 23-38
- [30] 宋雪,付楚涵,李家红,等. 内生菌提高植物抗旱性和耐盐性分子机制研究进展[J]. 草地学报,2024,32(1):13-24
SONG X, FU C H, LI J H, et al. Research progress on molecular mechanism of endophytes improving the drought resistance and salt tolerance of plant [J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(1):13-24
- [31] ZHANG Y, LI G, HU S, et al. Cloning and drought resistance analysis of soybean *GmHsps_p23*-like gene. Phytion-International Journal of Experimental Botany, 2022, 91(6):1183-1198
- [32] QIN Y, LIUX, QUAN X, et al. Heterologously expressing a wheat CI small heat shock protein gene enhances the salinity tolerance of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Growth Regulation, 2021(41):236-243

(责任编辑 付 宸)