

铁皮石斛 *DoLEA2* 基因的克隆、表达及功能分析

凌 鸿, 曾 旭, 郭顺星*

(中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 晚期胚胎富集蛋白 (late embryogenesis abundant proteins, LEA) 是一种亲水、热稳定性蛋白, 与植物抗逆性密切相关, 研究 LEA 家族基因对铁皮石斛抗逆性研究具有重要意义。本研究以铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 种子为材料, 采用 RACE 技术获得全长 cDNA, 命名为 *DoLEA2* (GenBank 登录号: KY626329)。该基因全长 cDNA 为 1 224 bp, 编码 313 个氨基酸, 具有晚期胚胎富集蛋白 (LEA₂) 结构域和水分胁迫高敏感响应结构域, 所编码蛋白与其他物种 LEA₂ 蛋白具有较高相似性, 在进化上与单子叶植物聚为一支, 且与蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*) 亲缘关系最近。铁皮石斛 *DoLEA2* 在叶的表达量最高, 根和茎次之。该基因在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中能够高效表达, 其优化表达条件为: 37 °C 添加终浓度 0.5 mmol·L⁻¹ 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导 4 h。盐胁迫条件下与对照组相比, 重组 pET28a-*DoLEA2* 菌株表现出较好的耐盐性。本研究首次获得了铁皮石斛 LEA₂ 全长 cDNA 序列, 验证了其耐盐胁迫功能, 为进一步研究铁皮石斛抗逆性分子机制提供科学依据。

关键词: LEA₂; RACE; 表达; 抗盐胁迫

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 08-1337-08

Cloning, expression and function analysis of *DOLEA2* gene from *Dendrobium officinale*

LING Hong, ZENG Xu, GUO Shun-xing*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: LEA (late embryogenesis abundant) proteins that are highly hydrophilic and thermally stable play a role in plant defense. The full-length cDNA of *DoLEA2* was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) from *Dendrobium officinale* (GenBank number: KY626329). The cDNA is 1 224 bp and encodes 313 amino acids. The deduced *DoLEA2* protein contained LEA₂ and WHY domains. Multiple sequence alignment revealed that *DoLEA2* shared a high homology with other species. Phylogenetic tree showed that *DoLEA2* belonged to the monocotyledon and its closest relative was *P. aphrodite*. *DoLEA2* was differentially expressed in the different organ. The expression was most abundant in the leaves, followed by that of the roots and stem. *DoLEA2* could express in *Escherichia coli* BL21 (DE3), and the best induction conditions were 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG at 37 °C for 4 h. The growth curves of *E. coli* BL21 (DE3) showed that the recombinant *DoLEA2* protein improved tolerate against salt stress over the control. This study represents the first time of cloning and identification of the function of LEA₂ in *D. officinale*. The result sets up an important foundation for the molecular mechanism of stress resistance in *Dendrobium officinale*.

Key words: LEA₂; RACE; expression; salt resistance

收稿日期: 2017-03-28; 修回日期: 2017-04-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573526); 北京协和医学院“协和青年基金”资助项目 (3332016073).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-57833231, E-mail: sxguo2015@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0273

干旱、盐渍、极端温度等环境胁迫，制约植物的生长发育^[1]。在长期的进化过程中，植物为了抵抗和适应各种环境胁迫，在形态、细胞、生理生化等方面形成了一系列独特的防御机制^[2-4]。受到逆境胁迫时，植物通过诱导表达胁迫响应蛋白等降低环境胁迫引起的损害^[3, 5]。晚期胚胎发育富集蛋白 (late embryogenesis abundant protein, LEA) 是一种防御蛋白，多参与植物抗逆境响应过程^[6, 7]。

LEA 基因首次发现是在胚胎发育后期的陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 子叶中，经研究发现种子、幼苗及其他组织均存在，受环境胁迫后表达量可达到较高水平，广泛分布于高等植物、藻类、真菌、细菌及动物^[8-11]。LEA 蛋白一般为小分子量的蛋白多肽 (10~30 kDa)，具有良好的亲水性、热稳定性^[7]。根据氨基酸序列，Pfam 数据库将 LEA 蛋白家族分为 LEA_1、LEA_2、LEA_3、LEA_4、LEA_5、Dehydrin 和 SMP (seed maturation protein) 7 个亚家族^[12]。LEA_2 家族对应以往分类法中的 LEA14、D95 蛋白等^[12]。研究发现，LEA2 蛋白在盐、干旱、脱落酸等逆境胁迫时可大量表达，具有耐冻、耐高温、耐盐等抑制渗透性损伤的功能，能够提高植物对逆境胁迫的抵御和适应^[13-16]。虽然，部分植物中 LEA2 蛋白的研究已有报道，但兰科植物中还未见相关报道。

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*)，为兰科石斛属多年生附生草本植物，为我国传统中药材中最珍稀名贵的品种之一，具有一定的观赏及经济价值，其多生长于海拔 500~1 600 m 的山地半阴湿的岩石或原始森林的树干上，野生环境下，繁殖率极低，生长缓慢，易受逆境胁迫影响^[17-19]。因此，清楚了解其胁迫响应机制、提高其抗逆性尤为重要。前期，作者通过铁皮石斛全基因组和转录组数据综合分析，对克隆得到的铁皮石斛 LEA 基因进行分类研究^[20]。鉴于 LEA2 蛋白在植物抗逆境胁迫中的重要作用，本研究利用 RACE 技术首次从铁皮石斛中分离得到一个 LEA2 基因 cDNA 全长 *DoLEA2*，并进行生物信息学和表达模式分析，同时，在重组型 *DoLEA2* 大肠杆菌体内进行耐盐胁迫实验，为进一步揭示其抗逆胁迫分子机制奠定基础。

材料与方法

材料 铁皮石斛组培苗及种子均购自江苏常州，经郭顺星研究员鉴定为铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*)。铁皮石斛苗盐胁迫实验处理方法：两组铁

皮石斛组培苗分别用 10 mol·L⁻¹ NaCl 溶液、水处理两天，取样。

pTOPO vector 购自北京艾德莱生物技术有限公司；pET-28a vector 购自北京华越洋生物有限公司；*E. coli trans* H5a、BL21(DE3) 感受态细胞均购自北京全式金生物有限公司；RNeasy Plant Mini Kit 购自德国 QIAGEN 公司；DL2000 DNA Marker、限制性内切酶 EcoRI 和 NdeI、T4 DNA 连接酶、PrimeScriptTM RT reagent Kit、SYBR[®] Premix Ex TaqTM (TliRNaseH Plus) 购自大连宝生物公司；SMARTerTM RACE 5'/3' Kit 购自日本 Clontech 公司；Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA 聚合酶购自南京诺唯赞生物技术有限公司。

仪器 NanoDropTM 2000 分光光度计 (美国 Thermo Fisher 公司)；LightCycler[®] 480II 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)；T100TM thermal cycler PCR 仪、Powerpac Universal 电泳仪、SmartSpecTM Plus 分光光度计 (美国 Bio-Rad 公司)；MB100-2A 微孔板恒温振荡器 (杭州奥盛仪器公司)；SorvallST8R 高速冷冻离心机 (美国 Thermo scientific 公司)。

总 RNA 提取和 cDNA 合成 按照 RNeasy Plant Mini Kit 操作说明提取各样品总 RNA，采用分光光度计法测定 RNA 质量和纯度，1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性。反转录合成 cDNA 第一链，-20 °C 保存备用。

3'RACE 与 RT-PCR 验证 经 NCBI Blastx 和 ORF finder 分析，发现一条 1241 bp 的 CL6357.contig2 序列被注释为 *LEA2*，其具有完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 和完整的 5'UTR。根据此序列设计特异性引物 (表 1)，进行 3'-RACE PCR 反应。以铁皮石斛种子 3'-RACE ready cDNA 为模板，反应体系：2.0 μL 10×Advantage 2 PCR buffer、0.4 μL 10 mmol·L⁻¹ dNTPs、0.4 μL *DoLEA2*-3'-GPS-F (10 mmol·L⁻¹)、2.0 μL 10×UPM、1.5 μL 3'-RACE ready cDNA、0.4 μL 50×Advantage 2 Polymerase Mix (5 U·μL⁻¹)，补充 ddH₂O 至 20 μL。PCR 产物经电泳分析，回收目的条带、克隆并测序，与原序列拼接分析后，设计 ORF、5'UTR 引物 (表 1)，克隆、测序及验证基因 cDNA 全长的可靠性。

序列分析 通过 NCBI Blastx 和 ORF Finder 分析 cDNA 序列；ProtParam 各种氨基酸含量、相对分子质量和等电点等理化性质；ProtScale 分析蛋白的亲、疏水性；SOPMA 分析二级结构；ExPASyProteomics Server 的 InterProScan 分析蛋白质保守结构域；SWISS-MODEL 进行蛋白质三维结构预测；SignalP 4.0 和

Table 1 Primers used to clone full-length gene and expression in the *D. officinale*

	Primer	Primer sequence (5'-3')
Full-length of cDNA	<i>DoLEA2</i> -3'-GPS-F	GGAAGTGCTGAGCTTAACGACTCGACGA
	<i>DoLEA2</i> -ORF-F	ATGGCGTCATCTGACAACCCAG
	<i>DoLEA2</i> -ORF-R	TCAATCCTCTCCATCATCATCTTCCC
	<i>DoLEA2</i> -5'-F	AGTCAATCATCGTTGAGTTTATTTTCTTCGT
	<i>DoLEA2</i> -5'-R	TGTGAACCCCTTTAACATCTGCTGTT
	<i>DoLEA2</i> -3'-Lp	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Gene expression	<i>DoLEA2</i> -F	<u>CATATGGCGTCATCTGACAACC</u>
	<i>DoLEA2</i> -R	<u>GAATTC</u> TCAATCCTCTCCATCATCATCT
Real-time PCR	<i>DoLEA2</i> -q-F	ATTGGCGAGAAGATTGAAGAGG
	<i>DoLEA2</i> -q-R	CAGGAATCAGTCCAGACACAAG

TMHMM 预测信号肽和跨膜区域; WoLF PSORT 进行亚细胞定位分析。通过 DNASTAR 7.0 进行氨基酸序列比对分析; 利用 MEGA 7.0 的 UPGMA 法构建系统进化树 (Boot strap=1000)^[20]。

***DoLEA2* 表达载体构建** 根据载体序列选择两个酶切位点 EcoRI 和 NdeI, 在 *DoLEA2* 的 ORF 两端设计含有酶切位点的特异性引物 (表 1), 进行 PCR 扩增, 经纯化后克隆于 pTOPO 载体并进行筛选, 挑取白色单菌落提取质粒, 经双酶切验证获得阳性克隆, 送至北京金唯智生物技术公司测序, 验证基因序列。测序后无突变、无移码的 pT-*DoLEA2*-ORF 重组质粒, 与 pET-28a 表达载体, 分别进行双酶切实验, 经琼脂糖凝胶回收载体片段和目的基因片段, 16 °C 过夜连接, 转化 *E. coli trans* H5 α 细胞中, 经 PCR 检测, 挑取单克隆提取质粒经特异性引物鉴定后送公司测序。

***DoLEA2* 诱导表达及条件优化** 将测序无突变、无移码 pET28a-*DoLEA2* 重组质粒和 pET28a 空载体质粒同时转化到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 获得表达型重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a-*DoLEA2*。挑取阳性单克隆菌落, 37 °C、180 r·min⁻¹ 条件下培养过夜, 按照 1:100 比例扩大培养至 OD₆₀₀=0.6~0.8。分别对诱导时间 (1、2、3、4 h)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 浓度 (0、0.1、0.5、1 mmol·L⁻¹)、诱导温度 (16、25、37 °C) 进行优化。获取菌液在 4 °C 条件下 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 收集菌体, 重悬于 pH 6.8 的 PBS 缓冲液中, 一部分直接加入 5×loading buffer 混匀, 煮沸 5 min, 4 °C 条件下 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清; 另一部分经超声破碎 2 min (200 W, 5 s/5 s), 4 °C 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清、沉淀混合 loading buffer 处理后, 分别进行 12% SDS-PAGE 电泳检测。

荧光定量 PCR 分别用正常及经盐胁迫条件下的铁皮石斛根、茎、叶、种子总 RNA 反转录合成 cDNA,

18S rRNA 基因作为内参, Real-time PCR 分析基因表达模式。引物为 qPCR-F 和 qPCR-R (表 1) 扩增产物长 208 bp, 进行扩增, 反应体系: 7.5 μ L 2×SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Master Mix、0.3 μ L 正/反向引物 (10 mmol·L⁻¹)、1 μ L cDNA, 补充 ddH₂O 到 15 μ L, 生物学重复与技术重复均 3 次。PCR 程序为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环, 反应结束绘制融解曲线。根据 LightCycler[®] 480 II HTC1 软件生成的循环阈值 (cycle threshold, CT), 运用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因相对表达量。

盐胁迫下生长曲线测定 重组菌株 BL21(DE3)/pET28a-*DoLEA2* 和对照菌株 BL21(DE3)/pET28a 经 37 °C 过夜培养的单克隆菌液 (OD₆₀₀ = 0.8), 按 1:100 比例分别接种于 LB⁺ (Kan) 液体培养基, 37 °C、200 r·min⁻¹ 振荡培养 2 h, 添加终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹ 的 IPTG, 同时分别添加终浓度为 0.5、0.8 mol·L⁻¹ NaCl, 37 °C 孵育, 每隔 2 h 测定其 OD₆₀₀ 值, 技术重复 3 次, 绘制生长曲线。

结果

1 *DoLEA2* 基因克隆及全长验证

经过 3'-RACE 反应, 克隆、测序获得 435 bp 的序列, 经 RT-PCR 扩增克隆、测序获得包含完整 ORF、5'UTR 的序列 (图 1), 与原序列拼接分析获得了一条 1 224 bp 的 cDNA。该基因 ORF 长 942 bp, 5'-UTR 长 99 bp, 3'-UTR 长 183 bp, Blastx 分析表明其与多种植物 LEA2 基因有较高的相似性 (73%~88%), 命名为 *DoLEA2* (GenBank 登录号: KY626329)。

2 *DoLEA2* 基因编码蛋白理化特性分析

ProtParam 预测 *DoLEA2* 基因编码蛋白 313 个氨基酸, 分子式为 C₁₅₇₃H₂₅₀₄N₄₀₂O₄₈₁S₅, 等电点 pI 为 4.98、相对分子质量 34 903.89; *DoLEA2* 蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 为 42, 负电残基 (Asp+Glu) 为 58,

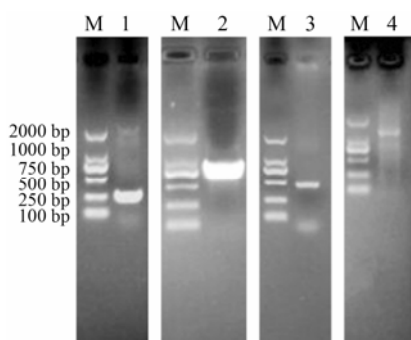


Figure 1 Clone the full length cDNA of *DoLEA2* gene from *Dendrobium officinale*. M: Maker; 1: 5'-UTR product; 2: ORF; 3: 3'-Race product; 4: Full cDNA product

该蛋白的不稳定系数为 24.11, 属于稳定蛋白, 脂系数为 95.56, 疏水性系数为-0.392, 后经 ProtScale 验证为亲水性。经 SOPMA 分析, *DoLEA2* 蛋白的二级结构主要由 α 螺旋 (27.48%)、延伸链 (23.64%)、 β 转角 (9.58%) 和随机卷曲 (39.30%) 组成。

3 *DoLEA2* 蛋白结构域、定位、跨膜区分析和三维建模

InterProScan 分析显示, *DoLEA2* 基因编码蛋白含有晚期胚胎富集蛋白 (LEA₂) 结构域 (78-173、203-297) 和水分胁迫高敏感响应结构域 (57-174、183-299)。SignalP 4.1 分析 *DoLEA2* 蛋白不含信号肽。利用 TMHMM 2.0 分析 *DoLEA2* 蛋白不含跨膜结构域, 由此推断该蛋白不经过跨膜转运, 与信号肽分析相吻合。PSORT 预测 *DoLEA2* 蛋白定位于细胞质的可能性较高。

在蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中绝大多数 LEA₂ 蛋白的三维结构通过核磁共振波谱法获得, 以拟南芥 LEA₂ (SMTL id: 1xo8.1) 蛋白三维结构作为参考蛋白^[21], 对 *DoLEA2* 蛋白进行三维结构建模 (图 2), 结果显示, *DoLEA2* 与该蛋白有 34.72% 的空间结构相似性。



Figure 2 Three-dimensional structure of *DoLEA2* protein using SWISS-MODEL. Model information: modeled residue range: 29 to 178; based on template: 1xo8.1.A (NMR); sequence identity [%]: 34.72; GMQE: 0.27; QMEAN: -7.14

3.1 *DoLEA2* 氨基酸序列比对和进化分析 氨基酸多序列比对结果 (图 3) 显示, *DoLEA2* 与单子叶植物蝴蝶

蝶兰 (XP_020587558.1)、油棕 (XP_010927880.1)、小果野蕉 (XP_009414646.1)、石刁柏 (XP_020262013.1)、海枣 (XP_008812863.1)、花烛 (JAT64495.1)、凤梨 (OAY76998.1) 和水稻 (BAG87622.1) 的 LEA₂ 蛋白相似性分别为 88%、88%、83%、80%、87%、87%、81% 和 73%。

系统进化分析 (图 4) 表明, 系统树明显分为两大类群, 2 条双子叶植物的 LEA₂ 蛋白序列聚为一支, 组成外类群; 10 条单子叶植物的 LEA₂ 蛋白序列同源性较高, 聚为一支, 其中, *DoLEA2* 与兰科植物蝴蝶蝶兰 LEA₂ 亲缘关系最近, 处于同一分支中。

3.2 *DoLEA2* 的表达分析 Real-time PCR 结果 (图 5) 显示, *DoLEA2* 在种子、根、茎、叶组织中均有表达, 相对表达量存在差异。以种子为参考样本, 显示铁皮石斛叶的表达量最高, 根和茎次之; 在 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐胁迫处理中, 分别以未经盐胁迫处理组为参考样本, 显示经盐胁迫的根、茎、叶中 LEA₂ 的表达量均升高, 且叶升高最明显, 其次为茎、根。

3.3 *DoLEA2* 的原核表达 SDS-PAGE 电泳结果显示, 重组蛋白分子量约为 35 kDa 左右, 与理论值相符, 随着诱导温度、时间的增加, 表达量均增加 (图 6A、C), IPTG 浓度为 0.1 和 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 表达量较高, 但无明显差别 (图 6B), 其中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 条件下, 可溶性重组蛋白的量约为总重组蛋白表达量的 1/2 (图 6D)。

3.4 耐盐胁迫实验 重组型 BL21(DE3)/pET28a-*DoLEA2* 和对照菌株 BL21(DE3)/pET28a 盐胁迫下的生长曲线分析结果显示, 无盐胁迫条件下, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导表达的重组菌株和对照菌株的生长情况基本一致 (图 7A)。 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫条件下 (图 7B), 对照菌株的生长明显受到抑制, 4~24 h 菌液 OD₆₀₀ 值均低于 0.8, 重组菌株生长未受盐胁迫影响, 生长趋势较平稳, 4~24 h 菌液 OD₆₀₀ 值均高于 0.8。 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫条件下 (图 7C), 重组菌株生长也未受盐胁迫影响, 但对照菌株生长活力明显降低, 甚至出现死亡现象。由此可见, *DoLEA2* 蛋白可提高大肠杆菌的耐盐胁迫性。

讨论

LEA 蛋白为亲水、热稳定性的小分子蛋白多肽^[7], 环境胁迫下诱导产生具有稳定细胞膜结构^[22, 23]、抗氧化活性自由基^[24, 25]、结合金属离子^[26-28]等保护植物细胞、维持生理代谢过程的一类重要蛋白, 在干旱、高盐及极端温度等环境胁迫过程中发挥着重要作用,

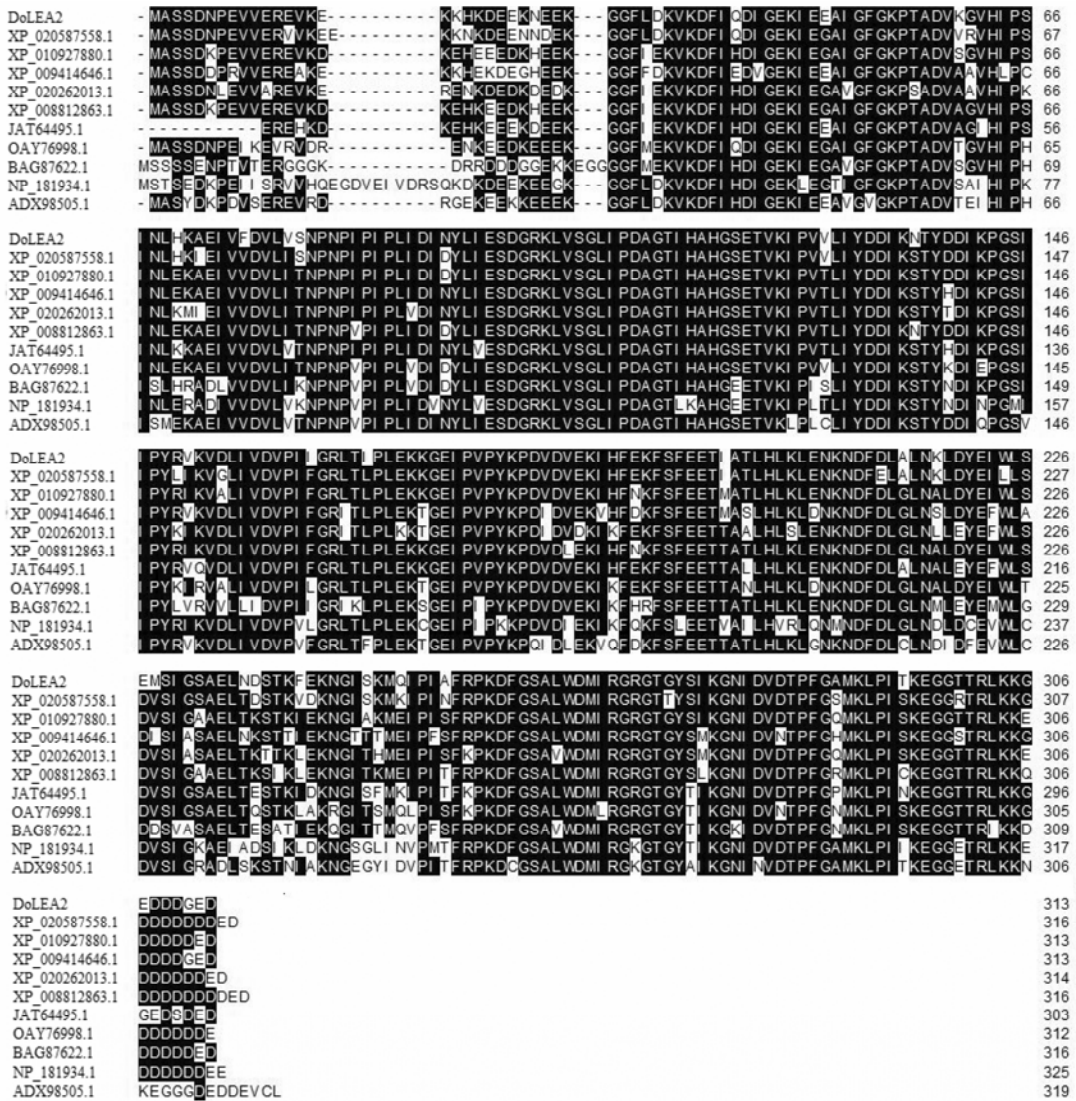


Figure 3 Multiple sequence alignment of *DoLEA2* and LEA2 protein in other species

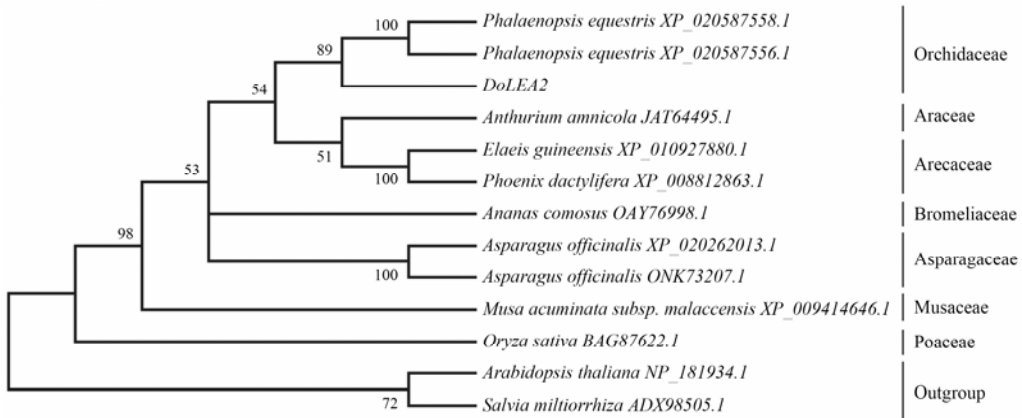


Figure 4 Phylogenetic tree of *DoLEA2* and LEA2 from other species

但主要胁迫响应机制尚未清晰。本研究利用 RACE 技术首次从珍稀药用植物铁皮石斛中分离得 *DoLEA2* 全长 cDNA 序列, 编码 313 个氨基酸, 具有 LEA₂

和 WHY 保守结构域, 与多种植物 LEA₂ 蛋白序列具有较高的同源性, 经系统进化分析, 归入单子叶植物的 LEA₂ 蛋白分支, 且与蝴蝶兰亲缘关系最近。表明,

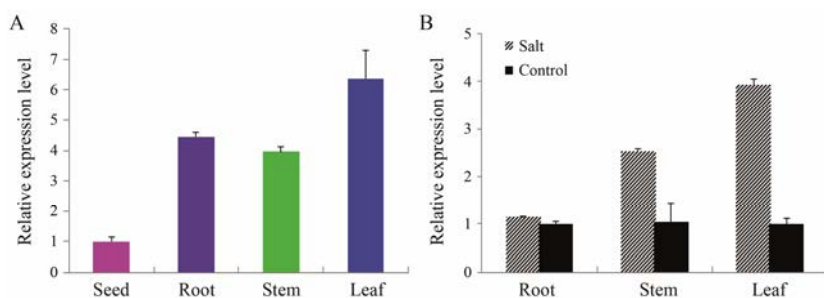


Figure 5 Expression patterns of *DoLEA2* gene using qPCR analysis. A: Expression patterns in different tissue; B: Expression pattern under $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ salt

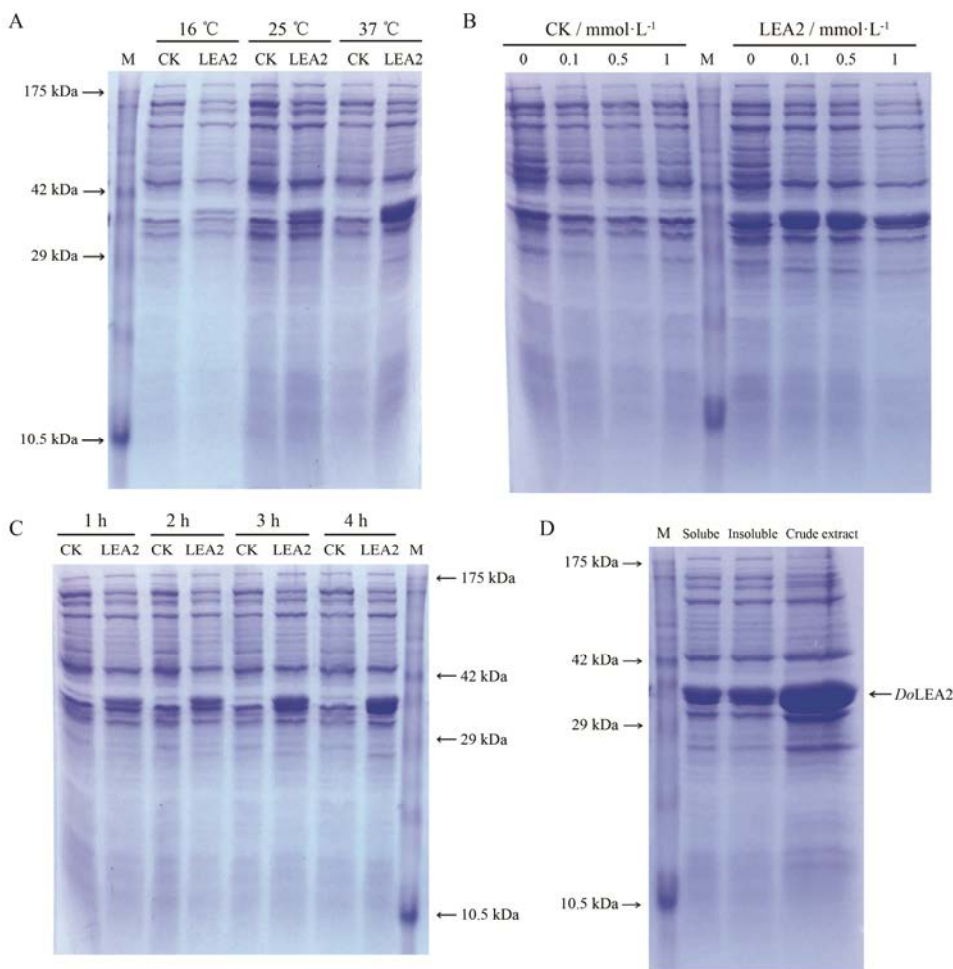


Figure 6 12% SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein of *DoLEA2* and empty vector protein. M: Protein maker; CK: pET-28a; LEA2: pET28a-*DoLEA2*. A: Induced by $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG with 4 h under different temperature; B: Induced by different IPTG concentration with 4 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$; C: Induced by $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG with different time at $37 \text{ }^\circ\text{C}$; D: The detection of soluble recombinant protein induced by $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG with 4 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$

DoLEA2 是编码铁皮石斛晚期胚胎富集蛋白的基因。

LEA 蛋白早期主要在种子中发现, 陆续在其他组织中发现, 无组织专一性, 经环境胁迫或外源物质可诱导产生并达到较高水平, *LEA* 基因的分子特异表达差异与植物的生理代谢、所处环境影响关系紧密。高盐属于渗透性环境胁迫, 是限制植物正常生长发育的主要影响因子, 通过水势、离子分布等影响植物细胞

乃至整个植物体内生理平衡, 引起细胞脱水, 破坏细胞膜系统、结构及功能, 导致植物生长抑制或死亡^[29,30]。已有报道^[31], 海滨锦葵 (*Kosteletzkya virginica*) 中 *KvLEA* 基因在根、茎、叶、种子中均有表达, 其中, 根的表达量最高, 且高盐胁迫可诱导积累其表达, 随盐离子浓度的升高而升高, 受高盐胁迫 2~24 h 表达量均处于较高水平。本研究分析了 *DoLEA2* 基因在正常

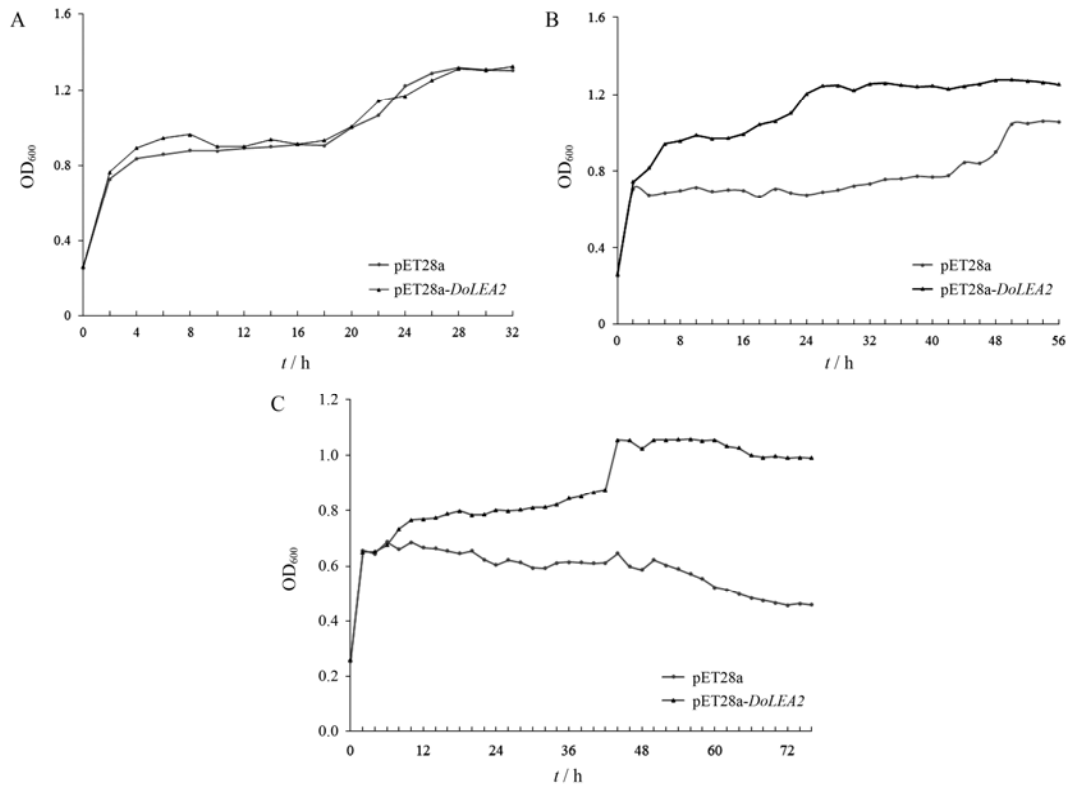


Figure 7 Growth curves of *E. coli* under salt stress. Control: pET28a; Experiment: pET28a-*DoLEA2*. A: Incubated without salt at 37 °C; B: Incubated with 0.5 mol·L⁻¹ NaCl at 37 °C; C: Incubated with 0.8 mol·L⁻¹ NaCl at 37 °C

条件、盐胁迫条件下不同组织的表达模式, 正常条件下, *DoLEA2* 在铁皮石斛根、茎、叶、种子中均有表达, 相对表达量存在差异, 叶中表达量最高, 符合 LEA 蛋白无组织专一性的特点; 盐胁迫条件下, 该基因在根、茎、叶中表达量均明显上调, 且叶 > 茎 > 根, 与小麦 (*Triticum aestivum*) *TaLEA2* 基因受盐胁迫时根中表达无变化、叶中表达上调的表达模式相似^[32]。推测高盐胁迫可能对植物叶片组织影响较大, 以防细胞严重失水、萎蔫甚至死亡, 诱导 *DoLEA2* 蛋白表达积累, 通过缓解细胞内 Na⁺、调节细胞渗透压和稳定内膜系统等方式, 将足够的水分运输到细胞内部, 以免细胞失水破裂, 导致植物缺水干枯而死^[33]。表明 *DoLEA2* 基因参与了铁皮石斛的相关环境胁迫响应过程。

同时, 本研究成功构建 pET28a-*DoLEA2* 原核表达系统, 并进行耐盐实验, 受高盐胁迫时, 重组型菌株生长较为正常, 未明显受到高盐胁迫影响, 而对照菌株生长抑制甚至出现死亡现象, 但相关研究仅发现对照菌株达到生长对数期的时间晚于重组菌株, 生长受到抑制, 但未发现其出现死亡现象^[16, 33]。表明 *DoLEA2* 蛋白的积累可提高大肠杆菌对高盐浓度的耐受性。

综上所述, *DoLEA2* 蛋白无组织专一性, 参与了

铁皮石斛正常条件下的生长发育, 且在高盐胁迫条件下表达积累以响应环境胁迫, 降低环境胁迫引起的损害, 在环境胁迫过程中发挥重要作用, 但其胁迫响应分子机制尚不清楚。本研究后续将通过转基因技术深入研究具体功能, 为揭示 LEA 蛋白与铁皮石斛生长发育及抗环境胁迫响应分子机制奠定理论基础。

References

- [1] Sengupta S, Majumder AL. Insight into the salt tolerance factors of a wild halophytic rice, *Porteresia coarctata*: a physiological and proteomic approach [J]. *Planta*, 2009, 229: 911–929.
- [2] Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review [J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2005, 60: 324–349.
- [3] Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, et al. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, 17: 113–122.
- [4] Krasensky J, Jonak C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63: 1593–1608.
- [5] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 651–681.

- [6] Hand SC, Menze MA, Toner M, et al. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 115–134.
- [7] Tunnacliffe A, Wise MJ. The continuing conundrum of the LEA proteins [J]. *Naturwissenschaften*, 2007, 94: 791–812.
- [8] Dure L, Chlan C. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: XII. Purification and properties of principal storage proteins [J]. *Plant Physiol*, 1981, 68: 180–186.
- [9] Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, et al. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148: 6–24.
- [10] Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena TS, et al. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia* [J]. *Biol Plant*, 2008, 52: 101–104.
- [11] Wise MJ, Tunnacliffe A. POPP the question: what do LEA proteins do? [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9: 13–17.
- [12] Hundertmark M, Hinch DK. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 118.
- [13] Jayaprakash TL, Ramamohan G, Krishnaprasad BT, et al. Genotypic variability in differential expression of *lea2* and *lea3* genes and proteins in response to salinity stress in Finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn) and Rice (*Oryza sativa* L.) seedlings [J]. *Ann Bot*, 1998, 82: 513–522.
- [14] Soulages JL, Kim K, Arrese EL, et al. Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (*L*-proline)-type II structure [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131: 963–975.
- [15] Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, et al. A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 346–350.
- [16] Wang HQ, Wu YC, Yang XB, et al. SmLEA2, a gene for late embryogenesis abundant protein isolated from *Salvia miltiorrhiza*, confers tolerance to drought and salt stress in *Escherichia coli* and *S. miltiorrhiza* [J]. *Protoplasma*, 2017, 254: 685–696.
- [17] Zhao MM, Zhang G, Zhang DW, et al. ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale* [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e72705.
- [18] Huang C, Wang D, Sun L, et al. Effects of exogenous salicylic acid on the physiological characteristics of *Dendrobium officinale* under chilling stress [J]. *Plant Growth Regul*, 2016, 79: 199–208.
- [19] Zhang G, Liu SS, Yang XJ, et al. Molecular cloning and characterization of a novel *DoSWEET1* gene from *Dendrobium officinale* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 991–997.
- [20] Ling H, Zeng X, Guo S. Functional insights into the late embryogenesis abundant (LEA) protein family from *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using an *Escherichia coli* system [J]. *Sci Reports*, 2016, 6: 39693.
- [21] Singh S, Cornilescu CC, Tyler RC, et al. Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein [J]. *Protein Sci*, 2005, 14: 2601–2609.
- [22] Gao J, Lan T. Functional characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein gene family from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in *Escherichia coli* [J]. *Sci Reports*, 2016, 6: 19467.
- [23] Koag MC, Wilkens S, Fenton RD, et al. The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150: 1503–1514.
- [24] Hara M, Fujinaga M, Kuboi T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42: 657–662.
- [25] Shanlin FU, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation [J]. *Biochem J*, 1997, 324: 1–18.
- [26] Zhao X, Zhan LP, Zou XZ. Improvement of cold tolerance of the half-high bush Northland blueberry by transformation with the LEA gene from *Tamarix androssowii* [J]. *Plant Growth Regul*, 2011, 63: 13–22.
- [27] Hughes S, Graether SP. Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein [J]. *Protein Sci*, 2011, 20: 42–50.
- [28] Hara M, Shinoda Y, Tanaka Y, et al. DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion [J]. *Plant Cell Environ*, 2009, 32: 532–541.
- [29] Serrano R, Rodriguez-Navarro A. Ion homeostasis during salt stress in plants [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 399–404.
- [30] Zhu JK. Plant salt tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 66–71.
- [31] Tang X, Wang H, Chu L, et al. KvLEA, a new isolated late embryogenesis abundant protein gene from *Kosteletzkya virginica* responding to multiabiotic stresses [J]. *BioMed Res Int*, 2016, 2016: 9823697. DOI:10.1155/2016/9823697.
- [32] Long X, Pu Z, Yang L, et al. Molecular cloning, expression and bioinformatic analysis of TaLEA2 gene from wheat [J]. *J South China Agric Univ (华南农业大学学报)*, 2014, 35: 88–92.
- [33] Chen J, Jiang Y, Zhang Y, et al. Cloning and expression analyses of LEA2 gene from *Ipomoea batatas* [J]. *Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报)*, 2014, 20: 204–210.