

青稞“昆仑12号”*HVA1*基因的克隆与蛋白质结构预测

姚晓华 邓晓青 吴昆仑* 张志斌

(青海省农林科学院/青稞遗传育种重点实验室/青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室,青海 西宁 810016)

摘要:抗旱性是青稞重要的耐逆性状。根据已报道的大麦抗旱相关基因 *HVA1* 的 DNA 序列,设计引物,以青稞品种昆仑12号经干旱处理 8 h 处理后的幼苗为材料,进行 PCR 扩增,得到约 700 bp 的 *HVA1* 基因编码框的全序列,将其克隆到 pMD20-T 上,重组子和酶切鉴定正确后,进行序列测定和分析。结果表明,与西藏强旱性青稞中 *HVA1* 基因相比较,昆仑12号与其核苷酸的同源性均达到 99.5%,氨基酸的同源性达 99.1%,其编码区全长 642 bp,编码含 213 个氨基酸残基的蛋白质,富含 Ala、Thr、Lys。该基因编码的蛋白质,包括 9 个重复的保守基元序列,属于第三组 *Lea* 蛋白。通过对 *HVA1* 基因编码蛋白的二级结构的分析表明,富含具有高度亲水性的 α -螺旋结构,在植物细胞脱水时能够提供疏水区的亲水表面,可见青稞品种昆仑12号具有较强的抗旱性。抗旱相关基因的克隆为我国青藏高原青稞耐逆品种的选育奠定了基础。

关键词:青稞; *HVA1* 基因; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S336; S512.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)05-0855-06

Cloning of *HVA1* Gene and Predicting of Protein Structure in Hulless Barley Kunlun 12

YAO Xiao-hua, DENG Xiao-qing, WU Kun-lun*, ZHANG Zhi-bin

(Qinghai Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Xining 810016, China)

Abstract: Drought resistance is one of the most important characters of stress tolerance ability in hulless barley. Based on the DNA sequence of *HVA1* gene in barley which is related to drought resistance, a pair of primers were designed. The specific fragments of about 700 bp in size were obtained, respectively, after PCR amplification using the seedlings cDNA of hulless barley variety Kunlun 12 under drought conditions after 8 h as template. Then they were cloned into vector pMD-20T, and sequenced after the identification of the recombinants and endonuclease analysis. The results indicated that compared with the strong drought resistance hulless barley in Tibetan, *HVA1* gene in Kunlun 12 shared 99.5% and 99.1% homology in nucleotide acid sequence and amino acid sequence, respectively. The gene included an open reading frame of 642 nucleotides and encodes 213 amino acid residues rich in Ala, Thr, Lys. The protein coded by *HVA1* including 9 repeatable conservative sequences belonged to group3 *lea*. Secondary structure analysis showed that the protein rich in super-hydrophilic α helix structure could provide a hydrophilic surface of hydrophobic areas when cells were dehydrated and thus hulless barley variety Kunlun 12 had strong capability in drought resistance. The

收稿日期: 2011-05-03 修回日期: 2011-08-01

基金项目: 农业部 948(引进国际先进农业科学技术)项目(2010-Z29)和青海大学中青年科研基金项目(2010-QN-04)

作者简介: 姚晓华(1981-),女,助理研究员,硕士,主要从事作物遗传育种研究, E-mail: yaoxiaohua009@126.com;

* 通讯作者: 吴昆仑, 副研究员, E-mail: wklqaf@gmail.com.

drought - resistant gene cloning laid the foundation for breeding Hulless Barley varieties with stress tolerance ability in Qinghai - Tibet plateau.

Key words: hulless barley; *HVA1* gene; gene cloning; sequence analysis

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hook. f.) 属禾本科大麦属,在植物学上属于栽培大麦的变种,当其成熟时籽粒内外稃与颖果分离,籽粒裸露,故称裸大麦^[1]。青稞在青藏高原地区的利用价值以及独特的营养结构和保健作用使其成为极具开发利用价值的高原特色农作物之一^[2]。但是青藏高原高寒缺氧,环境恶劣,降雨量少、蒸发量大、植被稀疏、水土流失严重,青稞作为青藏高原最具特色的高原农作物正遭受干旱的影响。虽然生长环境恶劣,但青稞表现出对逆境很强的适应性,因而蕴藏了十分丰富的与抗逆相关的优良基因。从这些优良基因中开发与耐旱相关的基因以及对其功能的分析研究,不仅对选育优良的耐旱青稞新品种具有重要理论意义,而且对整个作物抗胁迫基础和育种应用研究都具有一定的促进作用。

高等植物胚胎发育晚期丰富蛋白(Late embryogenesis abundant proteins, LEA proteins)是种子发育后期产生的一类小分子特异多肽,这类蛋白与植物耐脱水性密切相关,受植物的发育阶段、ABA和脱水信号的调节^[3-4]。自1981年首次报道植物LEA蛋白^[5]以来,已从各种植物中发现了许多新的LEA蛋白。根据蛋白中氨基酸序列的同源性以及一些特殊基元序列,可将LEA蛋白分为6组^[6-8]。来自普通大麦(*Hordeum vulgare* L.)的*HVA1*基因编码大麦类群第3组LEA蛋白(LEA3蛋白),通常含有多拷贝的11个氨基酸构成的保守基元序列(TAQAAKEKAGE),该基元序列可形成兼性 α -螺旋结构,在植物细胞脱水时提供疏水区的亲水表面^[9-11]。大量研究表明,LEA蛋白在植物耐受干旱和盐胁迫过程中发挥着重要的功能。Xu等^[12]将大麦的LEA基因*HVA1*导入水稻后,发现转基因水稻植株的抗旱和耐盐能力大大提高,该基因的抗旱、耐盐功能在烟草^[13]和桑树^[14]中也得到了实验证实。

本实验以青稞品种“昆仑12”为材料,通过克隆*HVA1*基因,分析其编码蛋白质的二级结构和抗旱性能,为选育适应青藏高原生长的优良青稞新品种以及转基因青稞的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源及特征

本研究以青稞品种昆仑12号(青海省农科院选育品种)为材料,该品种是北青1号作母本,用昆仑1号作父本,通过有性杂交选育而成。中抗条纹病和散黑穗病,较抗倒伏,抗落粒性强,较强的耐旱耐寒性。

1.2 引物、主要试剂及载体

*HVA1*基因的上游引物(5'-ATG GCC TCC AAC CAG AAC-3')和下游引物(5'-CGA ACG ACC AAA CAC GAC-3')根据GenBank公布的大麦*HVA1*基因(X78205)的序列设计引物;实验过程中用到的试剂盒购自上海生工生物有限公司,pMD20-T载体及相关试剂购买自TAKARA生物公司,感受态细胞试剂盒购自天根公司,引物的合成及序列测定由上海生工生物有限公司完成。

1.3 试验方法

1.3.1 植物总RNA的提取与逆转录反应 将昆仑12号青稞种子置于铺3层湿润滤纸的培养皿中,在20℃的人工气候箱中培养,避免干旱。当幼苗的株高约10cm时,用滤纸将其根部的水分吸干,并放到滤纸上干旱处理8h,取其叶片按照UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒的操作方法提取植物总RNA。提取的总RNA通过质量检测合格的进行反转录。

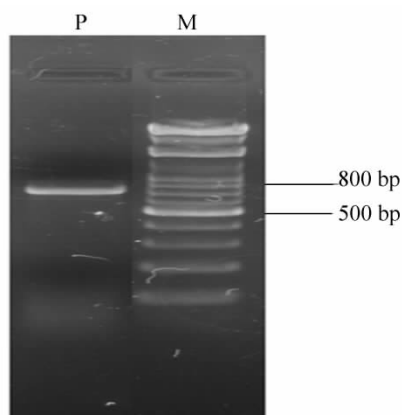
用提取的RNA进行第1链cDNA的合成。反转录步骤如下:(1)在Microtube管中分别加模板RNA 1 μ g, Oligo(dT) 18 Primer 2.5 μ L, RNase free dH₂O up to 6 μ L;(2)70℃保温10min后迅速在冰上急冷2min以上;(3)离心数秒钟使模板RNA聚集于Microtube管底部;(4)再加入反转录反应液:5 \times M-MLV Buffer 2 μ L, dNTP Mixture(各10mmol/L) 0.5 μ L, RNase inhibitor(40U/ μ L) 0.5 μ L, RTase M-MLV(RNase H⁻)(200U/ μ L) 0.5 μ L, RNase free dH₂O up to 10 μ L;(5)42℃保温1h;(6)70℃保温15min后冰上冷却,得到的cDNA溶液可直接进行下一步目的片段扩增。

1.3.2 *HVA1*基因的扩增 目的基因PCR扩增反应体系为:cDNA 1 μ g, 25mmol/L的Mg²⁺ 1.5 μ L, 10 \times

Buffer 2.0 μL , 10 mmol/L 的 dNTP 0.5 μL , 1 u 的 *Taq* 酶, 10 μm /L 的上下游引物各 0.5 μL , 加水至 20 μL 。反应参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 64 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。PCR 产物经质量分数为 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收、纯化目的片段。

1.3.3 *HVA1* 基因的克隆与测序 将回收纯化的目的片段与 pMD20-T 载体连接, 连接体系如下: pMD20-T Vector 1 μL , Insert DNA 0.1 ~ 0.3 pmol, dH₂O up to 5 μL ; 加入 5 μL (等量) 的 Solution I; 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。将连接好的重组 DNA 全量 (10 μL) 加入至 100 μL Top10 感受态细胞中, 冰中放置 30 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 45 s, 再在冰上放置 1 min; 加入 800 μL 的 LB 液体培养基 (无抗生素)。混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床震荡 1 h; 取 200 μL 菌液铺于含 Amp (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 平放 20 min, 然后倒置培养 8 ~ 10 h。挑取阳性克隆于含有 Amp 的 LB 液体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 摇床震荡 8 ~ 10 h, 用高纯度质粒小提中量试剂盒 (TIAN pure Midi Plasmid Kit) 提取质粒 DNA, 分别通过 PCR 检测和 *Pst* I、*Kpn* I 双酶切鉴定, 并进行序列测定与分析。

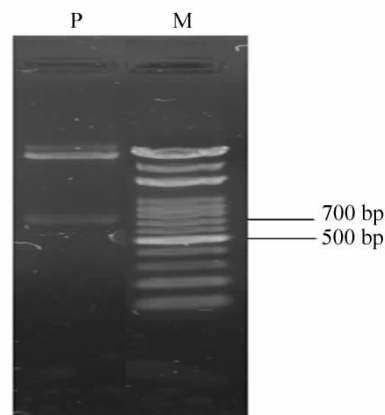
1.3.4 *HVA1* 基因编码的蛋白质结构预测 采用 ExPASy 网站的 ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 计算蛋白质的等电点及分子量; 蛋白质二级结构通过蛋白质预测服务器 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 进行分析。



M: Marker; P: 扩增产物 Product

图1 *HVA1* 扩增目标片段

Fig. 1 Amplification of the *HVA1* gene



M: Marker; P: 扩增产物 Product

图2 *HVA1* 的酶切

Fig. 2 Restriction digestion of the *HVA1* gene

2 结果与分析

2.1 青稞抗旱基因 *HVA1* 的克隆与分析

2.1.1 青稞 *HVA1* 基因的 RT-PCR 以提取的干旱处理 8 h 的青稞叶片总 RNA 为模板, 反转录 cDNA, 然后进行 PCR 扩增, 用质量分数为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 扩增出 1 条大约为 700 bp 的特异性片段 (图 1), 与预期结果相符。

2.1.2 青稞 *HVA1* 基因的克隆与重组子检测 通过 *Pst* I、*Kpn* I 双酶切鉴定结果表明, 重组子的 PCR 扩增片段、核酸内切酶处理的目的片段与 RT-PCR 扩增得到的目的片段大小一致 (图 2), 确定重组子中含有目的片段, 然后进行测序。

2.1.3 青稞 *HVA1* 基因序列测定和分析 通过对目的基因进行测序及序列分析比对, 克隆的青稞品种昆仑 12 号的 *HVA1* 基因共有 695 个核苷酸, 其中包括 642 bp 的开放阅读框 (图 3), 共编码 213 个氨基酸残基 (图 4), 所编码的蛋白质包括 9 个重复的保守基元序列, 属于第 3 组 Lea 蛋白。序列 Blast 表明, 昆仑 12 号 *HVA1* 基因与 GenBank 上公布的大麦的 *pHVA1* (EMBX13498.1) 基因和藏青稞的 *HVA1* (EM-BX78205.1) 核苷酸的同源性为 99.5%; 氨基酸的同源性为 99.1%。昆仑 12 号与大麦和藏青稞在核苷酸序列上都只有 3 个碱基的差异, 分别是 364 位的 A—G、374 位的 A—G 和 590 位的 A—G, 而且这 3 个碱基的差异都在开放阅读框 (ORF) 里。这 3 个碱基的差异导致了 2 个氨基酸的不同, 分别是第 125 位 (苏氨酸—丙氨酸) 和 197 位 (苏氨酸—丙氨酸)。该氨基酸序列组成中, Ala (丙氨酸) 占 21.6%, Thr (苏

氨酸) 占 17.4% 和 Lys(赖氨酸) 占 13.6% 这 3 种氨基酸的含量丰富,为总氨基酸含量的 52.6%;而不含半胱氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸。这与前人研究大多数 LEA 蛋白质中不含有色氨酸和半胱氨酸的结果一致^[15]。

2.1.4 理化性质、蛋白质的结构及功能预测 ProtParam 软件分析结果显示,HVA1 的理论分子量为 21.88 ku,理论等电点为 9.02,在生理条件下,HVA1 带正电。蛋白质二级结构预测结果显示,这段多肽序列主要有 α -螺旋(80.75%)、 β -折叠(3.29%)、 β -转角(1.88%) 和无规则卷曲(14.08%) 构成(图 5);该区域共形成 4 个大段的 α -螺旋、5 小段的无规则卷曲和 1 小段的 β -折叠结构,在 α -螺旋两侧常有无规则卷曲结构,两者常用 β -转角连接。表明该基因是由 1 个富含 α -螺旋的氨基酸序列编码而成,这些高度亲水性的 α -螺旋结构,在植物细胞脱水时提供疏水区的亲水表面,使植物细胞对干旱有一定的耐受性。

Table with 3 columns: Accession (Kunlun 12, Barlery, Tibetan barley), DNA sequence, and Position (80-695). The table shows the DNA sequence for the HVA1 gene in Kunlun 12, Barlery, and Tibetan barley, with positions indicated on the right. Some nucleotides are enclosed in boxes to indicate differences.

白区代表同源性为 100% 加方框区没有同源性。

There is 100% similarity in sequences with white background; no similarity in sequence enclosed by hairlines.

图 3 昆仑 12 号、大麦、藏青稞 HVA1 基因的序列比较

Fig. 3 Comparison of DNA sequence of HVA1 gene in Kunlun 12 *H. vulgare* L. (X78205) and tibetan barley

Table with 3 columns: Accession (Kunlun 12, Barlery, Tibetan barley), Amino acid sequence, and Position (80-213). The table shows the amino acid sequence encoded by the HVA1 gene in Kunlun 12, Barlery, and Tibetan barley, with positions indicated on the right. Some amino acids are enclosed in boxes to indicate differences.

白区代表同源性为 100% 加方框区没有同源性。

There is 100% similarity in sequences with white background; no similarity in sequence enclosed by hairlines.

图 4 昆仑 12 号、大麦、藏青稞 HVA1 编码蛋白氨基酸序列比较

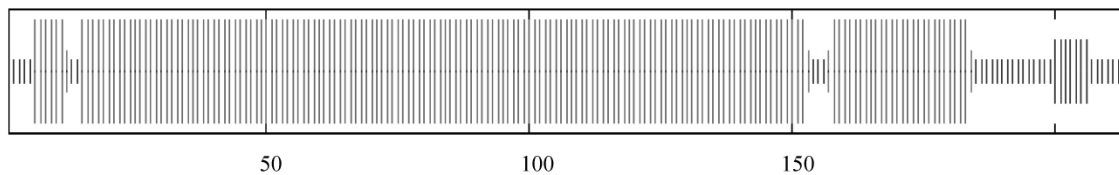
Fig. 4 Comparison of amino acid sequence encoded by HVA1 gene in Kunlun 12 *H. vulgare* L. (X78205) and tibetan barley

```

10          20          30          40          50          60          70
|          |          |          |          |          |          |
MASNQNQGSYHAGETKARTEEKTGQMMGATKQKAGQTTEATKQKAGETAETKQKTGETAEAAKQKAAEA
h hc cc ch hh hh ht cc hh hh hh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hh hh hh hh hh hh hh hh h
KDKTAQTAQAADKTYETAQAAKERAAQGKDQTSALGEKTEAAKQKAAETTEATKQKAAEATEAAKQKA
h hh hh hh hh hh hh hh hh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hh hh hh hh hh hh hh hh h
SDTAQYTKESAVAGKDKTGSVLQAGETVVNAVVGAKDAVANTLGMGGDNTSATKDTTTTGATVKDTTTTT
h hh hh hh hh hh hh tc cc th hh hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcc cc cc cc cc cc ce ee ee cc c
RNH ccc
    
```

Sequence length: 213。

SOPMA: Alpha helix (Hh) : 172 is 80.75%; 310 helix (Gg) : 0 is 0.00%; Pi helix (Ii) : 0 is 0.00%; Beta bridge (Bb) : 0 is 0.00%; Extended strand (Ee) : 7 is 3.29%; Beta turn (Tt) : 4 is 1.88%; Bend region (Ss) : 0 is 0.00%; Random coil (Cc) : 30 is 14.08%; Ambiguous states (?) : 0 is 0.00%; Other states : 0 is 0.00%。



线条从长到短依次为螺旋、折叠、转角和卷曲。

The lines from long to short respectively represent helix , extended strand , beta turn and random coil.

图 5 SOPMA 软件预测 HVA1 的二级结构

Fig.5 The secondary structure of the HVA1 was analyzed by SOPMA

3 讨论与结论

到目前为止,已发现含有 *lea* 基因的植物已有几十种。近几年对 LEA3 蛋白作用机制的研究已经积累了较多的资料,其中主要的观点认为 LEA3 蛋白的基元序列可以形成亲水的 α -螺旋结构,该结构能避免干旱胁迫时细胞内高浓度离子的积累所引起的损伤,同时也可以防止组织内过度失水。而且研究发现,第 3 组 LEA 蛋白大小差异很大,11 个氨基酸基元序列的重复次数也有较大差异,其中高粱 LEA3 蛋白重复次数较少只有 4 次;油菜 LEA76 蛋白则有 13 个重复的基元序列;大豆 pGmPM8 含有的串联基元序列则超过 30 个。钱刚等^[16]从抗旱性不同的西藏青稞中克隆到 2 个有差异的 *lea3* 基因,通过对比证实抗旱性不同的青稞品种之间 LEA3 保守基元拷贝数有差异,因此,推测抗旱蛋白结构的差异以及保守基元序列的数量差异可能对植物的抗旱性有影响。

本实验克隆了青稞品种“昆仑 12 号”的 HVA1 基因,通过对其 DNA 序列和氨基酸序列分析,结果表明目的基因编码的蛋白质含有丰富的 α -螺旋,这些高度亲水性的 α -螺旋结构,在植物细胞脱水时提供疏水区的亲水表面,使植物细胞对干旱有一定的耐受性;而且目的基因编码的蛋白质富含 Ala、Thr、Lys, Bahrndorff 等^[17]在跳虫基因组中发现了类似于植物 LEA3 蛋白的一种蛋白质,该蛋白包含大量的赖氨酸和丙氨酸重复序列,结果表明干旱胁迫可以诱导其表达。因此,“昆仑 12 号”丰富的 Ala、Thr、Lys 可能是干旱胁迫诱导时大量表达的,从而可以更进一步证明青稞的 HVA1 基因是与植物的抗旱性相关的基因。

由于 LEA3 蛋白与植物抗逆性有密切关系,尤其是在植物抵抗脱水胁迫方面表现出优势,因此,对 LEA3 蛋白抗旱分子机制的深入研究可以为研究植物抗旱育种提供新的思路和方法。目前,将抗旱基因转入水稻^[12]、紫花苜蓿^[18]、小麦^[19]、番茄^[20]中,均已获得表现出具有一定抗旱、耐盐性的植株。本研究表明,青稞品种“昆仑 12 号”与强抗旱藏青稞序列同源性达到 99.5%,而且目的基因的蛋白质二级结构和与抗旱相关的 LEA3 蛋白一致,可见青稞品种“昆仑 12 号”具有较强的抗旱性。该研究结果为青稞转基因新品种的产生奠定了基础。

参考文献:

- [1]郭本兆. 青海经济植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1987: 701.
- [2]臧靖巍, 阚建全. 青稞的成分研究及其应用现状[J]. 中国食品添加剂, 2004, 4: 43.
- [3]孙立平, 李德全. LEA蛋白的分子生物学研究进展[J]. 生物技术通报, 2003(6): 5-9.
- [4]Ramanjulu S, Bartels D. Drought - and desiccation - induced modulation of gene expression in plants [J]. Plant Cell Environ, 2002, 25: 141-151.
- [5]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.
- [6]Bray E A. Molecular responses to water deficit [J]. Plant Physiol, 1993, 103(4): 1035-1040.
- [7]Wise M J, Tunnacliffe A. POPP the question: what do LEA proteins do [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9(1): 13-17.
- [8]张改娜, 何王贾. 盐胁迫下植物基因的表达与基因工程研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2005(2): 188-195.
- [9]Dure L III. Structural motifs in LEA proteins of higher plants [M]//Close T J, Bray E A eds. Response of plants to cellular dehydration during environmental stress. Rockville, Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists, 1993: 91-103.
- [10]俞嘉宁, 山仑. LEA蛋白与植物的抗旱性[J]. 生物工程进展, 2002, 22(2): 10-14.
- [11]Choi D W, Zhu B, Close T J. The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allelic types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 1234-1247.
- [12]Xu D, Duan X, Wang B, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice [J]. Plant Physiol, 1996, 110(1): 249-257.
- [13]李楠, 赵琦, 黄静, 等. 六棱大麦 *hva1* 基因在烟草中遗传转化的研究[J]. 生物技术通报, 2007(3): 139-144.
- [14]Lal S, Gulyani V, Khurana P. Overexpression of *HVA1* gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*) [J]. Transgenic Res, 2008, 17(4): 651-663.
- [15]刘铁燕. 一种大豆胚胎发育晚期丰富蛋白基因片段的提取与分析[D]. 东北师范大学, 2002.
- [16]钱刚, 翟旭光, 韩兆雪, 等. 西藏青稞 LEA3 蛋白新抗旱基因的克隆与序列分析[J]. 作物学报, 2007, 33(2): 292-296.
- [17]Bahmdorff S, Tunnacliffe A, Wise M J, et al. Bioinformatics and protein expression analyses implicate LEA proteins in the drought response of *Collembola* [J]. J Insect Physiol, 2009, 55: 210-217.
- [18]王瑛, 朱宝成, 孙毅, 等. 外源 *lea3* 基因转化紫花苜蓿的研究[J]. 核农学报, 2007, 21(3): 249-252.
- [19]Sivamani E. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene [J]. Plant Sci, 2000, 155: 1-9.
- [20]陈火英, 庄天明, 张晓宁, 等. *HVA1* 基因转化番茄及转基因番茄耐盐性的初步鉴定[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2006, 24(1): 1-5.