

小麦一个新 BBI 型蛋白酶抑制剂 基因 *TaUES* 的克隆及初步分析

徐平丽¹, 彭振英¹, 马小凤^{1,3}, 唐桂英¹, 单雷¹, 夏光敏²

(¹山东省农业科学院生物技术研究中心/山东省作物遗传改良与生态生理重点实验室, 济南 250100;

²山东大学生命科学学院, 济南 250100; ³山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要:根据小麦基因表达芯片结果,以山融3号小麦叶片为试验材料,克隆获得在盐胁迫处理 24 h 时表达显著提高的基因 *TaUES*(up-regulated expression under saline-stress in wheat, ID: KC408382)。序列分析显示, *TaUES* 编码一个富含半胱氨酸的 97 个氨基酸的多肽,该多肽含有 1 个 BowB 结构域和 10 个保守的半胱氨酸残基;与小麦或其他物种 BBI 型蛋白酶抑制剂氨基酸序列具有较高的同源性。推测 *TaUES* 是小麦中一种新的 BBI 型蛋白酶抑制剂基因。基因表达分析表明, *TaUES* 基因参与盐和干旱胁迫应答。同源过表达转基因功能初步分析表明,过表达 *TaUES* 转基因烟草后代株系耐盐性提高。

关键词:小麦; *TaUES* 基因; BowB 结构域; 盐胁迫反应; 初步功能分析

Cloning and Preliminary Analysis of a New BBI-type Protease Inhibitor Gene *TaUES* from Wheat

XU Ping-li¹, PENG Zhen-ying¹, MA Xiao-Feng^{1,3}, TANG Gui-ying¹, SHAN Lei¹, XIA Guang-min²

(¹Bio-Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Shandong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Ecology and Physiology, Jinan 250100; ²School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100; ³College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014)

Abstract: A gene, named as *TaUES* (up-regulated expression under saline-stress in wheat, ID: KC408382) which significantly expressed after NaCl treatment for 24 hours, was cloned from the leaves of wheat variety Shan-rong No. 3 based on the results of wheat gene expression chips. The sequence analysis showed that *TaUES* encoded a cysteine-rich polypeptide with 97 amino acids, containing a BowB domain and 10 conserved cysteine residues. The amino acid sequence also indicated high homologue of BBI-type protease inhibitors from wheat and other species, implying that *TaUES* might be a new gene encoding wheat BBI-type protease inhibitor. *TaUES* expression pattern suggested that it involved in salt and drought stress responses. Preliminary analysis of ectopic gene expression showed that overexpression of *TaUES* gene in transgenic tobacco lines resulted in their high tolerance to salt stress.

Key words: Wheat; *TaUES*; BowB domain; salt stress responding; preliminary function analysis

小麦种植面积约占谷类作物种植总面积的三分之一,是约 35% 世界人口的主要食粮。干旱、高盐等逆境不仅造成小麦减产,还使小麦品质下降,易感病虫害等,造成极大的经济损失。研究小麦抗逆分

子机制及培育抗逆性强的小麦品种具有重大的理论和实践意义。为此,山东大学夏光敏实验室利用 SSH、基因芯片及双向电泳-质谱分析等方法,对耐盐抗旱小麦新品种山融 3 号盐或干旱胁迫前后的表

收稿日期: 2013-05-04 修回日期: 2013-06-18 网络出版日期: 2014-01-24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.13430/j.cnki.jpgr.2014.02.019.html>

基金项目: 转基因重大专项(2009ZX08009-082B)

第一作者研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail: xupingli@sina.com

通信作者: 单雷, 研究方向为植物分子遗传学。E-mail: shlei1025@sina.com

夏光敏, 研究方向为小麦分子遗传学与基因工程。E-mail: gmxia@sdu.edu.cn

达谱进行了分析,获得了大量表达模式发生变化的基因或 ESTs 信息^[1-3]。

植物体内包含多种丝氨酸蛋白酶抑制剂,大量存在于种子及受伤害的组织中,至少可以分为 16 类,Bowman-Birk 蛋白酶抑制剂(BBI)是其中研究较多、较透彻的一类^[4-7]。早期对 BBI 的研究多集中在抗虫方面,豇豆 *CPTI* 基因是研究较早的 Bowman-Birk 蛋白酶抑制剂成员之一,可同时抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性,因具有广谱抗虫性被转入多种植物^[8-10]。研究表明,蛋白酶抑制剂不仅参与生物胁迫响应,还参与非生物胁迫响应,如在番茄、板栗、大麦、水稻、小麦、大豆中都发现一些蛋白酶抑制剂基因在遭受非生物胁迫如低温、机械损伤、高温、高盐、铝、干旱等胁迫后被诱导表达^[11-21]。从铝胁迫诱导的小麦根中分离的 BBI 型蛋白酶抑制剂基因 *Wali5* 和 *Wali3*,也可被其他有毒金属诱导^[16]。小麦 *TaWRS15* 基因编码 BBI 型蛋白酶抑制剂,能够抑制胰蛋白酶活性,在遭受盐胁迫后能够被诱导表达,在根中的转录水平短时间内明显提高,其高表达水平从胁迫 12 h 开始并可持续 2 d,且干旱、氧化、铝胁迫也都可以诱导该基因的表达^[17]。机械伤害、茉莉酸可以诱导水稻 *OsBBPI* 的表达,水稻 *OsWIPI* 基因编码的蛋白具有胰蛋白酶抑制剂活性,也能被病原菌、损伤、茉莉酸诱导^[20-21]。这些结果也佐证了以往的研究,即 BBI 型蛋白酶抑制剂参与虫害、干旱、高盐等生物、非生物胁迫应答过程。

普通小麦品种资源一般耐盐性较差^[22],而山融 3 号是耐盐的体细胞杂种渐渗系,其基因组中含有来自耐盐近缘种高冰草(长穗偃麦草)的遗传物质。本研究从山融 3 号盐胁迫前后的表达谱芯片结果中选取 1 个表达明显上调的 EST(ID: CA718244),对其进行了基因克隆,发现这个基因编码的蛋白包含 BBI 型蛋白酶抑制剂保守的 BowB 结构域,进一步对该基因进行了初步的功能分析,以期为进一步探明山融 3 号盐或干旱逆境胁迫调控的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 小麦(*Triticum aestivum* L.)品种山融 3 号,由山东大学生命科学院夏光敏实验室提供;烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种 SR1,本实验室保存。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*)

DH5 α 、pEASY-T3 载体购自北京全式金生物技术有限公司;植物表达载体 pROKII 和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 LBA4404,由本实验室保存。

1.1.3 试剂 Trizol 为 Invitrogen 公司产品;常用内切酶、Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 为 Fermentas 公司产品;*Taq* 酶为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 Trizol 法提取各取样时间点的小麦叶片或根总 RNA。根据 Fermentas 的 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明,反转录合成小麦 cDNA 的第 1 条链。

1.2.2 *TaUES* 基因的 cDNA 克隆 从小麦基因表达芯片结果中选取盐胁迫处理 24 h 时表达显著提高的 EST(ID: CA718244),筛选小麦 EST 数据库,拼接高度同源的 ESTs 序列,利用 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)预测拼接序列的开放阅读框(ORF, open reading frame)。使用 Primer Premier 5.0 软件在预测的开放阅读框两侧设计用于基因克隆的特异引物 *TaUES*-S1 5'-TGCTCTAGATGCTCCACAAGTTCAGGACCAA-3' 和 *TaUES*-A1 5'-CGCGGATCCCTGGGAGTGGCTCTGCTCATCT-3' (引物序列中下划线分别代表加入的 *Xba*I 和 *Bam*HI 酶切位点),并以反转录的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增,扩增产物经电泳、回收,克隆到 pEASY-T3 载体中双向测序。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。

1.2.3 *TaUES* 基因序列分析 利用网站资源对 *TaUES* 基因进行序列分析。使用 <http://au.expasy.org/tools/dna.html> 翻译 *TaUES* 氨基酸序列,以<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 为工具分析蛋白质序列的保守结构域,以 http://cn.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool 计算蛋白分子量及等电点。登录 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 网站分析信号肽,使用 TMHMM 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)查找蛋白跨膜区域。利用网站 <http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/> 预测蛋白亚细胞定位。

1.2.4 干旱和盐胁迫下 *TaUES* 基因的表达分析 挑选生长至 2 叶 1 心、健壮的山融 3 号小麦进行如下胁迫处理:200 mmol/L NaCl 浸根处理 48 h,然后恢复 48 h;18% PEG6000 浸根处理 48 h,随后恢复 48 h,对照为正常条件下同期生长的健康植株。分

别在0 h、0.5 h、1 h、2 h、6 h、12 h、24 h、48 h,恢复24 h和恢复48 h取样,液氮冷冻后-70 ℃保存备用。

取山融3号小麦植株胁迫处理不同时间点的根和叶,Trizol法提取RNA并进行反转录。以反转录的cDNA第一链为模板,以TaActin-S(5'-AGCCAT-ACCGTGCCAATC-3')和TaActin-A(5'-AGAGCCTC-CAATCCAGAC-3')作为扩增引物,获得558 bp的Actin内参产物片段。以TaUES-S(5'-TGCTCCA-CAAGTTCAGGACCAA-3')和TaUES-A(5'-CTGG-GAGTGGCTCTGCTCATCT-3')作为扩增引物,获得405 bp左右的TaUES目的基因片段。Actin基因PCR程序为:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,30个循环;72 ℃延伸10 min,4 ℃保存。以Actin基因获得的cDNA模板量和循环次数、最佳扩增程序获得单一的TaUES目的产物条带。PCR条件为:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性30 s,53 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,30个循环;72 ℃延伸10 min;4 ℃保存。

1.2.5 过表达转TaUES基因烟草的获得及后代生理指标测定、后代种子萌发分析 构建植物过量表达载体pROK II-TaUES,转入农杆菌LBA4404,通过叶盘转化法转化烟草,经卡那霉素筛选,获得阳性转基因烟草后代。

转基因T₁株系经卡那霉素筛选和X²检验,其中5个株系符合3:1的分离比例,外源基因为单拷贝插入。进一步经卡那霉素筛选获得T₂纯合株系。选取3个与野生烟草营养生长表型一致的T₂株系种植于营养钵中,长至10片叶时,取长相一致的烟草幼苗,分别用18% PEG6000、200 mmol/L NaCl处理0 h、2 h、6 h、24 h、72 h、120 h,采集叶片,测定叶片中脯氨酸、可溶性糖、钠钾离子含量等生理指标。

脯氨酸含量参照侯福林^[23]方法用酸式茚三酮显色法测定;钠钾离子含量参照王宝山等^[24]的火焰吸收法测定。

选取上述3个转基因株系的种子进行盐胁迫下的萌发分析。将种子播种在分别用含有0 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L、200 mmol/L NaCl的MS培养基上,每个试验设3次重复,分别统计培养3 d、5 d、7 d种子的萌发率。

2 结果与分析

2.1 TaUES基因的cDNA克隆

根据小麦EST(ID:CA718244)序列在NCBI中搜索获得大量与其同源的小麦ESTs序列,拼接这些

高度同源的ESTs,得到1个contig。应用特异性引物TaUES-S1和TaUES-A1扩增包括完整ORF区的cDNA序列,得到约405 bp的产物(图1),命名为TaUES。回收目标扩增产物克隆到pEASY-T3载体中,对重组质粒进行序列测定,测序结果及推导的氨基酸序列见图2。

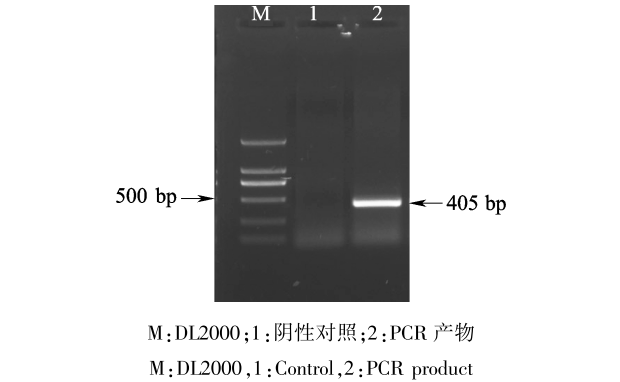


图1 小麦TaUES的cDNA扩增结果

Fig.1 Amplification result of cDNA product of TaUES

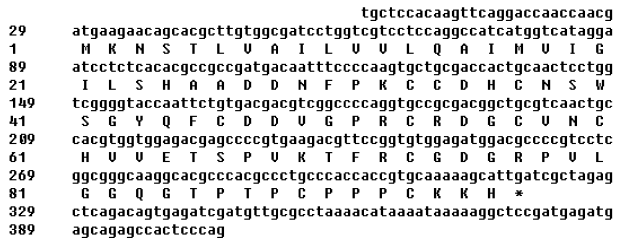


图2 TaUES的核酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 Sequences of nucleotide acids and deduced amino acids of TaUES

2.2 TaUES基因的序列分析与同源性比较

根据Kozak规则推测TaUES基因的ATG位置。初步分析显示,TaUES基因包含一个完整的ORF,编码一个富含半胱氨酸残基的97个氨基酸的多肽,预测其相对分子量是10.3 kD,理论等电点是7.52。将TaUES基因推导的氨基酸序列在NCBI上进行比对,结果表明,TaUES与小麦BBI型蛋白酶抑制剂wrsi5-1氨基酸的相似性为61%;与二穗短柄草损伤诱导的BBI型蛋白酶抑制剂WIP1-like基因编码的氨基酸相似性为55%,与大麦蛋白酶抑制剂相关蛋白序列的相似性为34%,与玉米损伤诱导的BBI型蛋白酶抑制剂WIP1有33%的氨基酸序列一致性。

对该多肽的氨基酸序列和结构分析发现,该多肽含有10个保守的半胱氨酸残基、1个BowB保守结构域;TM2HMM 2.0和SignalP 4.0软件分析显示,TaUES基因编码的蛋白在10~20处有一个跨膜区,在N端有一个长度为26个氨基酸的信号肽。因此,

推测 *TaUES* 基因编码的蛋白有可能是分泌蛋白。

通过 <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> 网站在线分析来源于水稻、玉米、蒺藜苜蓿、绿豆、芸豆、大豆以及大麦推测的 BBI 型蛋白酶抑制剂、小麦蛋白酶

抑制剂基因(*wrsi-5*)和 *TaUES* 基因推导的氨基酸序列,发现除保守的 BowB 结构域外,序列中的半胱氨酸残基的数量和所处的位置都比较保守,其余氨基酸残基变化较大(图 3)。

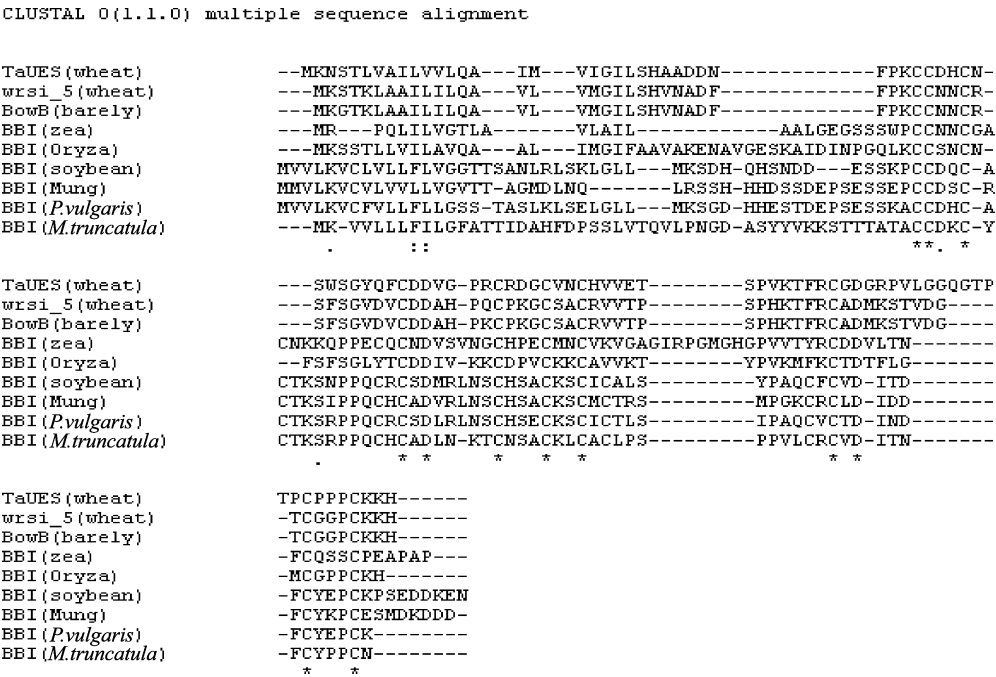


图 3 小麦 *TaUES* 基因推导的氨基酸序列与其他 BBI 型蛋白酶抑制剂的类比分析

Fig. 3 Multiple alignment of amino acid sequences derived from sequences of *TaUES* and other BBI-type protease inhibitors

运用 MEGA 3.1 软件构建 *TaUES* 基因编码的蛋白与其他物种同源蛋白的系统进化树,结果表明, *TaUES* 基因编码的蛋白与小麦铝胁迫诱导基因 *wali5* 和 *wali6* 编码的蛋白,二倍体小麦、大麦和水稻推测的 BowB 蛋白酶抑制剂,以及小麦 *wrsi-5* 蛋白酶抑制剂蛋白同源性较高,这些单子叶植物聚为一支;而双子叶植物芸豆、蒺藜苜蓿、绿豆、大豆 BBI 型蛋白酶抑制剂等则聚为另一分支(图 4)。

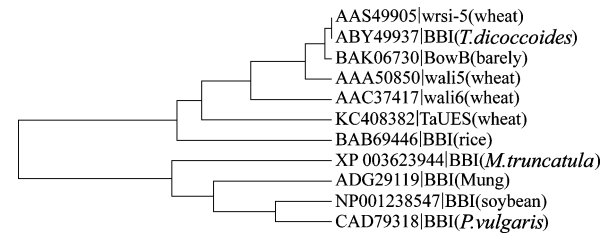


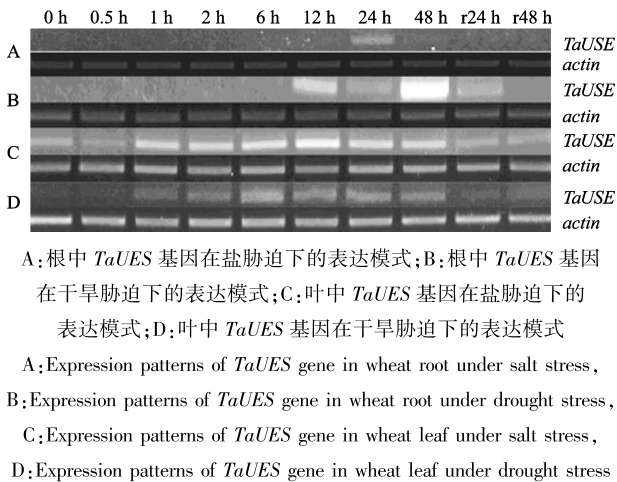
图 4 小麦 *TaUES* 基因推导的氨基酸序列与其他 BBI 型蛋白酶抑制剂的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic trees based on the amino acid sequences of *TaUES* and other BBI protease inhibitors

2.3 *TaUES* 基因在干旱和盐胁迫下的表达分析

通过对盐胁迫、PEG 处理不同时间山融 3 号

中 *TaUES* 基因表达的分析,发现在遭受胁迫后, *TaUES* 基因在根和叶中均能够被诱导表达。具体来说,盐胁迫处理 12 h 之前, *TaUES* 基因在根中的表达几乎检测不到;胁迫 24 h 时表达量达到峰值,随后迅速下降;胁迫 48 h 时有微弱表达。干旱胁迫下, *TaUES* 基因在根中的表达呈现复杂的双峰模式,即胁迫 12 h 时表达量达到第 1 个峰值,随后先降后升,至 48 h 时表达量达到第 2 个峰值,且总体表达量明显高于盐胁迫(图 5A、5B)。而在叶中,无论盐胁迫还是 PEG 处理, *TaUES* 基因的表达均表现出先升后降的倒“U”型的变化趋势,只是不同胁迫峰值出现的时间不同。盐胁迫 1 h 时 *TaUES* 基因的表达即升高到较高水平,约 12 h 时表达量达到峰值,随后略有下降,胁迫 48 h 时仍然保持较高水平的表达,恢复 48 h 后表达量与胁迫前基本相同(图 5C);干旱胁迫后约 6 h 时 *TaUES* 基因的表达量达到峰值,其后逐渐下降;恢复 48 h 后表达量与胁迫前基本相同(图 5D);在叶中,干旱胁迫诱导的 *TaUES* 基因的表达总体上明显低于盐胁迫下的表达水平。



A:根中 *TaUES* 基因在盐胁迫下的表达模式;B:根中 *TaUES* 基因在干旱胁迫下的表达模式;C:叶中 *TaUES* 基因在盐胁迫下的表达模式;D:叶中 *TaUES* 基因在干旱胁迫下的表达模式

A:Expression patterns of *TaUES* gene in wheat root under salt stress,
B:Expression patterns of *TaUES* gene in wheat root under drought stress,
C:Expression patterns of *TaUES* gene in wheat leaf under salt stress,
D:Expression patterns of *TaUES* gene in wheat leaf under drought stress

图 5 小麦根和叶片中 *TaUES* 基因在干旱和盐胁迫下的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *TaUES* gene in wheat root and leaf under drought and salt stresses

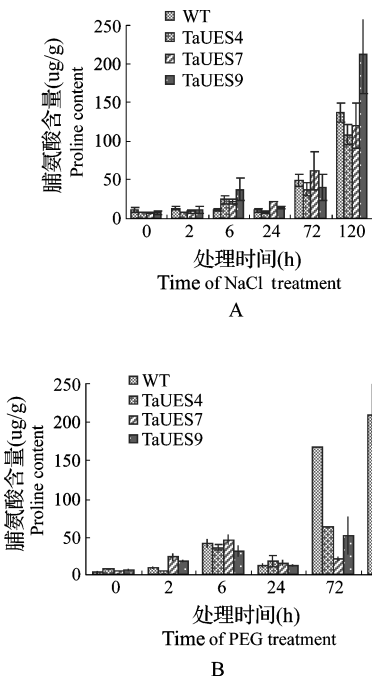
2.4 过量表达 *TaUES* 基因烟草后代生理指标的测定及后代种子萌发

2.4.1 脯氨酸含量 逆境胁迫条件下,植物细胞内一般会大量积累脯氨酸。为此,检测了高盐和干旱处理 0~6 h 以及 24 h、72 h、120 h 时转基因植株叶片中脯氨酸的含量。随胁迫时间的延长,野生型和转基因株系的脯氨酸含量均呈现先升后降再升的变化趋势。遭受盐胁迫、PEG 处理 6 h 时,野生型和转基因株系的脯氨酸含量达第 1 次峰值,24 h 时略有下降,胁迫 72 h 后脯氨酸含量又持续增高,不同株系在不同时间点上的变化幅度不同(图 6A、6B)。

2.4.2 盐胁迫下钠钾离子含量 盐胁迫下,野生型和转基因株系叶片中 Na^+ 的积累呈现基本相同的变化趋势,随着胁迫时间的延长而增加,只是不同株系的增加幅度有差异,变化比较平缓;处理 72 h 后,各转基因株系叶片中 Na^+ 的积累与野生型相比明显偏低(图 7A)。而 K^+ 积累的变化趋势与 Na^+ 的不同,胁迫早期,野生型与转基因株系叶片中 K^+ 的积累差别不大,胁迫 6 h 时叶片中 K^+ 含量达到峰值,随胁迫时间延长, K^+ 含量呈现下降的趋势(图 7B)。钠钾离子比的总变化趋势是随胁迫时间的延长,比值增加,胁迫 72 h 时转基因株系明显低于野生型的钠钾离子比(图 7C)。

2.4.3 盐胁迫下后代种子萌发分析

对盐胁迫后小麦山融 3 号基因表达芯片数据分析发现,有一类丝氨酸蛋白酶抑制剂基因能够特异性的响应盐胁迫。本实验室研究发现,这类蛋白酶



A:盐胁迫;B:干旱胁迫
A:Salt stress,B:Drought stress

图 6 盐和干旱胁迫下过表达 *TaUES* 转基因株系和对照叶中脯氨酸含量变化

Fig. 6 Changes of proline contents in tobacco leaves of over-expressed *TaUES* transgenic lines and non-transformed control under salt and drought stresses

抑制剂参与盐胁迫响应途径。*TaUES* 基因在遭受盐胁迫处理时在根和叶中都能够被诱导表达,只是表达量有差异(图 5)。

通过构建植物过表达载体 pROK II-*TaUES*,利用农杆菌介导法转化烟草野生型植株,获得了 *TaUES* 的转基因烟草过表达株系,并筛选获得了转基因纯合株系。选取 3 个过表达的 *TaUES* 转基因纯合株系、野生型对照株系的烟草种子分别播种在含有 0 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L、200 mmol/L NaCl 的 MS 培养基上萌发,统计培养 3 d、5 d、7 d 种子的萌发率。结果显示:在含有 0 mmol/L 和 50 mmol/L NaCl 的 MS 培养基上,过表达 *TaUES* 基因株系与野生型的种子萌发率没有明显差异。随着培养基中盐浓度的不断增加,野生型与过表达 *TaUES* 基因株系的种子萌发率也随之降低。盐处理后,过表达 *TaUES* 基因株系的种子对盐胁迫的敏感性要弱于野生型种子,过表达 *TaUES* 基因株系的种子萌发率略高于野生型的萌发率(图 8)。这说明过表达 *TaUES* 基因株系的种子具有更强的耐盐性,*TaUES* 基因的过表达能够提高烟草对盐胁迫的耐受力。

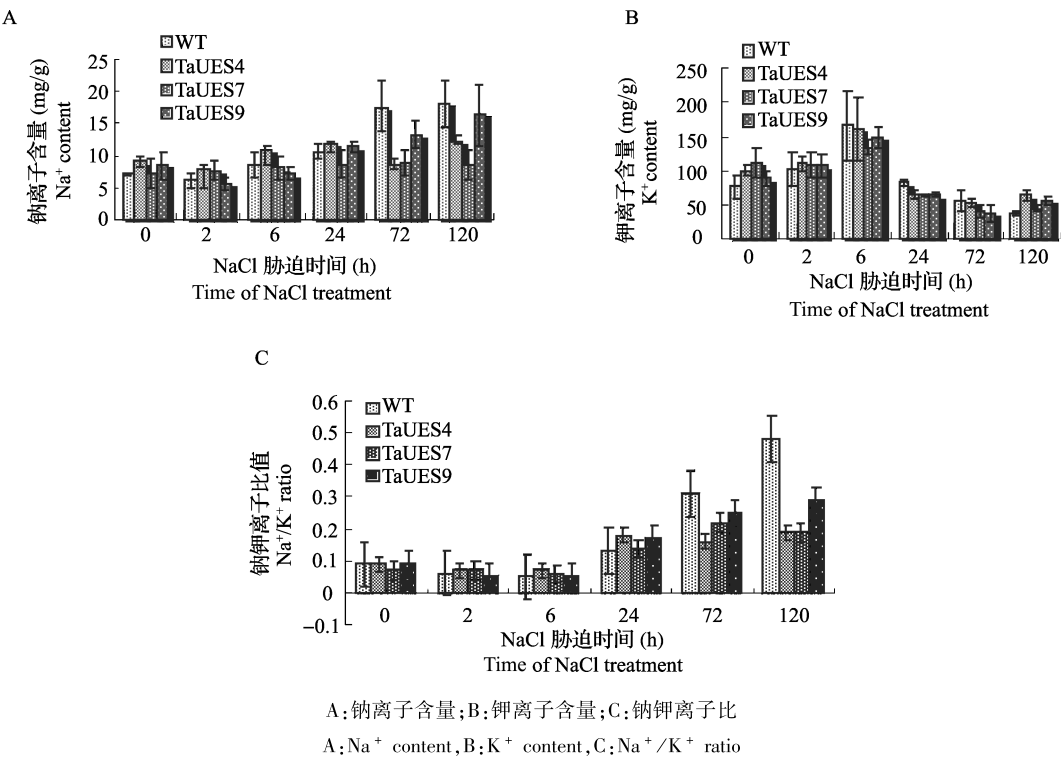


图 7 盐胁迫下过表达 *TaUES* 转基因株系和对照叶中钠钾离子含量变化
Fig. 7 Changes of Na⁺ contents, K⁺ contents, and Na⁺/K⁺ ratio in leaves of over-expressed *TaUES* transgenic lines and non-transformed control under salt stress

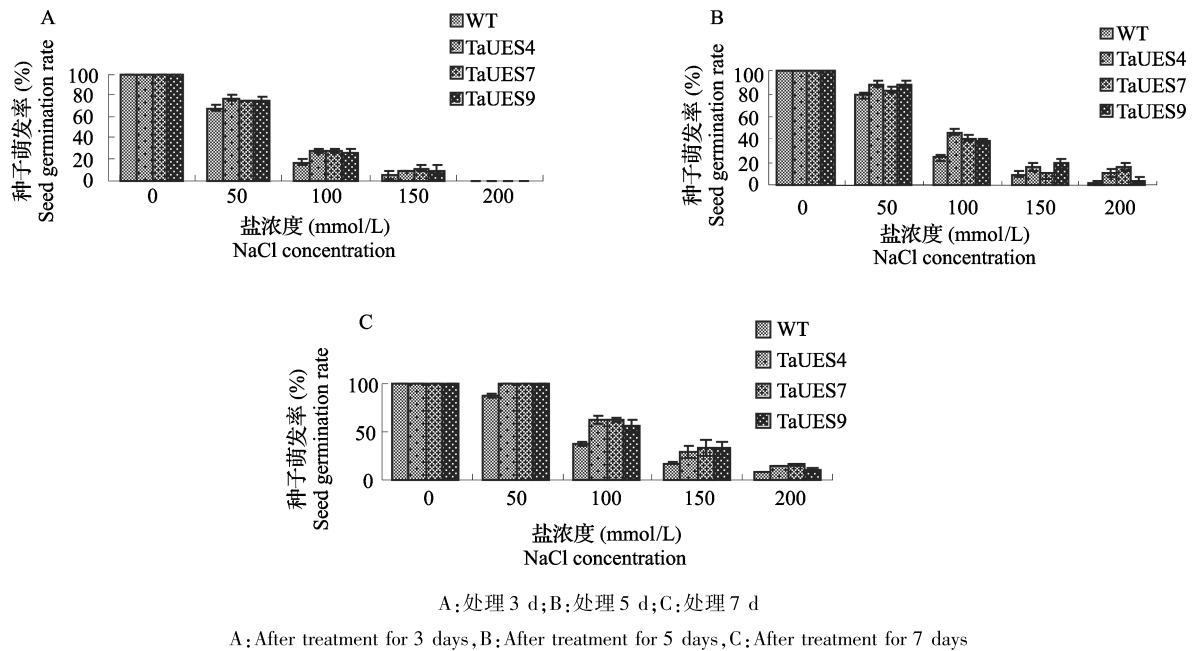


图 8 盐胁迫下过表达 *TaUES* 转基因株系和对照种子的萌发

Fig. 8 Seed germination of over-expressed *TaUES* transgenic lines and non-transformed control under salt stress

3 讨论

双子叶植物和单子叶植物 BBI 型蛋白酶抑制剂蛋白结构存在较大差异。大多数双子叶植物的 BBIs 含有 14 个保守的半胱氨酸残基和 7 对二硫键

(C₁-C₁₄, C₂-C₆, C₃-C₁₃, C₄-C₅, C₇-C₉, C₈-C₁₂, C₁₀-C₁₁); 而来源于单子叶植物大小接近 8kD 的 BBIs 在进化过程中常丢失 2 个(C₁₀、C₁₁)或 4 个(C₃、C₁₀、C₁₁、C₁₃或 C₄、C₅、C₁₀、C₁₁)半胱氨酸残基^[5]。豆科植物 BBI 的特征是一个结构域包含有 2 个活性位

点,一个抑制胰蛋白酶,另一个抑制胰凝乳蛋白酶。如豇豆 *CPTI* 基因编码的 Bowman-Birk 蛋白酶抑制剂,可同时抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性。但到目前为止,在单子叶植物中还没有发现类似结构的 BBI。图 9 显示了大多数双子叶植物一个结构域和某些单子叶植物 BBI 蛋白结构域中二硫键的连接



图 9 双子叶和单子叶植物中 BBI 二硫键连接方式^[25]

Fig. 9 Disulphide connectivity in dicot and monocot Bowman-Birk inhibitors^[25]

方式。单子叶植物位于 N-端的第 1 个反应位点与双子叶植物的第 1 个反应位点具有极高的序列相似性,几乎都具有抑制胰蛋白酶的特定性,第 2 个反应位点常常因为丢失了 C₁₀-C₁₁ 桥而失去了蛋白酶抑制活性^[25]。也有一些胁迫诱导 BBI 蛋白即使缺失 2 个抑制环所在区域上的 C₄、C₅ 和 C₁₀、C₁₁ 残基,仍具有相应的蛋白酶抑制活性^[17,26]。小麦 *TaWSRI5* 在 32~87 位含有 1 个保守的 BowB 结构域和 10 个保守的半胱氨酸残基,缺少了 4,5,10,11 位的半胱氨酸残基。体外活性试验表明,*TaWSRI5* 具有较强的胰蛋白酶抑制活性,而不能抑制胰凝乳蛋白酶的活性^[17]。*TaUES* 基因编码的蛋白包含保守的 BowB 结构域,并且同样含有大多数单子叶植物中保守的 10 个半胱氨酸残基,第 1 个活性位点附近的氨基酸序列与 *TaWSRI5* 和大麦 BowB 蛋白酶抑制剂同源性极高,因此,推测 *TaUES* 基因编码 BBI 型蛋白酶抑制剂,与其他 BBI 型蛋白酶抑制剂有着类似的生物学功能。但是,*TaUES* 基因是否真正行使丝氨酸蛋白酶抑制剂的功能还有待进一步的试验验证。

脯氨酸、可溶性糖、钠钾离子的含量等生理指标是衡量植物耐逆性的重要指标。为此,本研究初步分析了过量表达 *TaUES* 转基因烟草后代干旱和高盐胁迫下的上述生理指标(可溶性糖含量测定的资料未列)。一般情况下,植物在受到干旱或高盐胁迫时,体内会大量积累脯氨酸以调节体内的渗透平衡。在感应胁迫的早期,植物优先通过根部运送外源脯氨酸增加耐逆性。A. Ueda 等^[27] 发现盐胁迫

30 min 后大麦根部负责脯氨酸转运的 *HvProT* 基因转录开始升高,比脯氨酸合成关键基因 *P5CS* 反应明显要快。本研究中,脯氨酸含量在过表达 *TaUES* 转基因株系和对照经 PEG 处理 24 h 内均有较低水平的积累,干旱胁迫下转基因株系应答速度较对照更快,这一现象可能与脯氨酸转运系统受胁迫迅速激活相关。而处理 72 h 后脯氨酸含量明显升高,但转基因株系脯氨酸含量明显低于野生型的脯氨酸含量。并且 *TaUES* 基因在干旱胁迫的叶中的表达一直处于较低水平。推测 *TaUES* 基因不是通过调控脯氨酸积累而是通过其他机制维持叶片细胞内渗透平衡。

植物体内 Na⁺ 的吸收和分布是决定其耐盐能力的重要因素。盐胁迫下细胞内离子平衡破坏的一个典型指标就是 Na⁺/K⁺ 升高,维持较低的 Na⁺/K⁺ 是植物保证正常气孔功能和正常代谢的必要前提^[28-31]。过表达 *TaUES* 转基因烟草在胁迫后期叶片中的钠离子积累比野生型总量偏低,钠钾离子比值明显低于野生型。表明过表达 *TaUES* 基因烟草后代的耐盐能力有所提高,这与该基因在盐胁迫下表达明显受到诱导相一致。盐胁迫下种子萌发分析结果也显示,转基因株系种子的萌发对盐胁迫的敏感性降低,应对盐胁迫的能力略有提高。L. Shan 等^[17] 研究表明,过表达 *TaWSRI5* 基因的拟南芥株系可以在一定程度上提高耐盐性。因此,推测 *TaUES* 基因有可能参与调控 Na⁺、K⁺ 运输或调节 Na⁺ 在植物体内的分布来提高植物的耐盐性。

参考文献

[1] Peng Z Y, Wang M C, Li F, et al. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(12): 2676-2686

[2] Liu C, Li S, Wang M C, et al. A transcriptomic analysis reveals the nature of salinity tolerance of a wheat introgression line [J]. *Plant Mol Biol*, 2012, 78(1-2): 159-169

[3] Wang M C, Peng Z Y, Li C L, et al. Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*/*Thinopyrum ponticum* [J]. *Proteomics*, 2008, 8: 1470-1489

[4] Ryan C A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1990, 28: 425-449

[5] Mello M O, Tanaka A S, Silva-Filho M C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 27: 103-112

[6] Clemente A, Domoney C. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2006, 7(3): 201-216

[7] Konarev A V, Anisimova I N, Gavrilova V A, et al. Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(3): 279-291

[8] Hinder V A, Gatehouse A M R, Sheerman S E, et al. A novel

- mechanism of insect resistance engineered into tobacco [J]. Nature, 1987, 330: 160-163
- [9] Hinder V A, Barker R F, Samour R A, et al. Protein and cDNA sequences of Bowman-Birk protease inhibitors from the cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.) [J]. Plant Mol Biol, 1989, 13(6): 701-710
- [10] 徐鸿林, 翟红利, 王锋, 等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*cpti*)及其在抗虫转基因作物中的应用[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(1): 18-27
- [11] Dombrowski J E. Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants [J]. Plant Physiol, 2003, 132: 2098-2107
- [12] Pernas M, Sánchez-Monge R, Salcedo G. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut [J]. FEBS Lett, 2000, 467(2-3): 206-210
- [13] Gaddour K, Vicente-Carbajosa J, Lara P, et al. A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli [J]. Plant Mol Biol, 2001, 45(5): 599-608
- [14] Huang Y M, Xiao B Z, Xiong L Z. Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice [J]. Planta, 2007, 226(1): 73-85
- [15] Richards R A, Liang Y L. Coleoptile tiller development is associated with fast early vigour in wheat [J]. Euphytica, 1994, 80: 119-124
- [16] Snowden K C, Richards K D, Gardner R C. Aluminum-induced genes-induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips [J]. Plant Physiol, 1995, 107(2): 341-348
- [17] Shan L, Li C L, Chen F, et al. A Bowman-Birk type protease inhibitor is involved in the tolerance to salt stress in wheat [J]. Plant Cell Environ, 2008, 31(8): 1128-1137
- [18] Qu L J, Chen J, Liu M H, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel type of Bowman-Birk inhibitor gene family in rice [J]. Plant Physiol, 2003, 133(2): 560-570
- [19] Moons A, Prinsen E, Bauw G, et al. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress inducible transcripts in rice roots [J]. Plant Cell, 1997, 9: 2243-2259
- [20] Rakwal R, Kumar A G, Jwa N S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor; tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors [J]. Gene, 2001, 263(1-2): 189-198
- [21] Chen J, Liu J, Guo L, et al. Inducible expression pattern of rice Bowman-Birk inhibitor gene *OsWIP1-2* and its protease inhibitory activity [J]. Chinese Sci Bull, 2004, 49(9): 895-899
- [22] 王萌萌, 姜奇彦, 胡正, 等. 小麦品种资源耐盐性鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2): 189-194
- [23] 侯福林. 植物生理学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 90-92
- [24] 王宝山, 赵可夫. 小麦叶片中 Na、K 提取方法的比较 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(1): 50-52
- [25] Prakash B, Selvaraj S, Murthy M R N, et al. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors [J]. J Mol Evol, 1996, 42: 560-569
- [26] Rohrmeier T, Lehle L. *WIP1*, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitors [J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 783-792
- [27] Ueda A, Shi W, Sanmiya K, et al. Functional analysis of salt-inducible proline transporter of Barley roots [J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42: 1282-1289
- [28] 单雷, 赵双宜, 夏光敏. 植物耐盐相关基因及其耐盐机制研究进展[J]. 分子植物育种, 2006, 4(1): 15-22
- [29] 刘友良, 汪良驹. 植物对盐胁迫的反应和耐盐性 [M]//余叔文. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1999: 767-752
- [30] 王学征, 李秋红, 吴凤芝. NaCl 胁迫下载培型番茄 Na^+ 、 K^+ 吸收、分配和转运特性 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(7): 1423-1432
- [31] 汪贵斌, 曹福亮, 游庆方, 等. 盐胁迫对 4 树种叶片中 K^+ 和 Na^+ 的影响及其耐盐能力的评价 [J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(1): 30-34