

发状念珠藻 *NfwpA3* 基因的克隆及其耐旱能力分析

范红丽, 冯翠娥, 吴佳月, 周丽, 郑蕊, 苏建宇, 岳思君

(宁夏大学生命科学学院 / 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021)

摘要: 水分胁迫蛋白 (WSP, Water stress protein,) 在植物耐旱过程中起着重要作用。发状念珠藻具有极强的耐旱、耐盐和抗辐射等能力。本研究以发状念珠藻基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 技术克隆到一个发状念珠藻水分胁迫蛋白基因的开放阅读框 (ORF) 序列, 命名为 *NfwpA3*, 其序列全长 1017 bp。生物信息学预测表明, 该基因可编码 338 个氨基酸残基, 预测等电点为 4.85, 分子量为 37.48 kD, 为亲水性稳定蛋白, 分布在细胞质中。构建了 *NfwpA3* 基因的重组表达菌株 pET32a-*NfwpA3*, 以聚乙二醇-6000 (PEG-6000) 对其模拟干旱胁迫, 发现重组菌株最高可忍耐 60% 浓度的 PEG-6000, 表现出较强的耐旱性, 且具有较高的半乳糖苷酶活性。研究结果为探知发状念珠藻 WSP 蛋白逆境响应机制及其遗传改良提供了理论依据和基因元件。

关键词: 发状念珠藻; 水分胁迫蛋白; 基因克隆; *NfwpA3*; PEG-6000

Gene Cloning of *NfwpA3* and Analysis of Its Drought Tolerance Capability in *Nostoc flagelliforme*

FAN Hong-li, FENG Cui-e, WU Jia-yue, ZHOU Li, ZHENG Rui, SU Jian-yu, YUE Si-jun

(College of Life Science, Ningxia University/Western Biological Resources Protection and Utilization Lab of National Education Ministry, Yinchuan 750021)

Abstract: Water stress proteins play an important role in the process of drought tolerance in many plants. *Nostoc flagelliforme* showed strong tolerance to drought, salt and radiation stresses. In this study, using the genomic DNA of *Nostoc flagelliforme* as a template, the open reading frame (ORF) of a water stress protein gene was cloned by PCR amplification, and this gene was named *NfwpA3* according to the online annotation via blastP in NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Bioinformatic analysis showed that *NfwpA3* gene contained 1017 base pair that encodes a putative protein consisted of 338 amino acid residues. The predicted isoelectric point was 4.85 and the theoretical molecular weight was 37.48 kD. The encoded protein was predicted being a hydrophilic stable protein, and distributed in the cytoplasm. By analyzing the recombinant expression vector of pET32a-*NfwpA3* under the condition of PEG-6000 simulating drought stress, it showed strong drought tolerance. Meanwhile, the recombinant expression strain showed higher activity of galactosidase. Thus, this work will provide a theoretical basis for detecting the molecular mechanism of water stress protein and a gene element that might be used for genetically modified breeding in *Nostoc flagelliforme*.

Key words: *Nostoc flagelliforme*; water stress protein; gene cloning; *NfwpA3*; PEG-6000

发状念珠藻 (*Nostoc flagelliforme* Born. & Flah.) 我国北部和西北部荒漠与半荒漠地区。在长期的自然环境中, 发状念珠藻具有极强的耐旱、耐盐和

收稿日期: 2018-05-08 修回日期: 2018-07-01 网络出版日期: 2018-09-29

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180928.1714.002.html>

第一作者研究方向为微生物资源开发与利用, E-mail: 876572733@qq.com

通信作者: 岳思君, 研究方向为微生物资源开发与利用, E-mail: sijunyue@126.com

苏建宇, 研究方向为微生物资源开发与利用, E-mail: su_jy@nxu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31360025, 31560418, 31360361)

Fundation project: National Natural Science Foundation of China (31360025, 31560418, 31360361)

抗辐射等能力^[1-3],是荒漠化地区潜在应用于改善和控制土壤荒漠化的生物,被称为“开发荒漠的先锋”,将其接种于荒漠化土壤中可以有效改善生态环境^[4]。发状念珠藻具有很强的生物固氮作用,可为微生物的生长提供氮源,是荒漠化地区重要的固氮资源^[5]。此外,发状念珠藻还具有较高的营养价值和药用价值,备受人们的青睐^[6]。因此,开展发状念珠藻响应干旱条件的分子机制及其遗传改良方面的研究,具有十分重要的生态学意义。

在干旱胁迫下,发状念珠藻的相关基因参与细胞间物质代谢的调节,以减轻细胞所受的伤害。Ye 等^[7]研究发现碳酸酐酶(CA, Carbonic anhydrase)参与缓解发状念珠藻遭受干旱胁迫的调节过程,藻细胞失水时胞内 CA 活性增强,吸水复活时胞内 CA 失活,而胞外 CA 活性则会增强。CA 能够催化藻细胞胞内 CO₂ 的生成,促进细胞无机碳的获取,并能增加藻细胞的光合固碳能力。Ai 等^[8]研究发现,发状念珠藻干旱胁迫调节相关的基因 *drnf3*、*drmf5* 和 *drnf9* 在干旱胁迫条件下可以促进细胞的生长;Wu 等^[9]克隆了海藻糖基因并发现在干旱胁迫下该基因上调表达,推测其参与抗旱过程。岳思君等^[10-11]克隆了发状念珠藻细胞内活性氧清除相关的过氧化物还原酶(Prx, Peroxidase reductase)和谷胱甘肽还原酶(GR, Glutathione reductase)基因,发现 Prx 和 GR 基因在发状念珠藻遭受干旱胁迫时上调表达,推测其通过上调表达,来清除细胞内的自由氧而保护细胞遭受干旱胁迫。干旱胁迫可作为一种诱导条件,诱导相关响应蛋白的表达。当念珠藻藻细胞受干旱胁迫时,能诱导多种渗透胁迫响应蛋白的表达。酸性水份胁迫蛋白(WSPA, Acidic water stress protein)的转录合成就是干旱诱导的结果。Potts 等^[12]研究发现,地木耳胞外多糖胶鞘中存在一类 WSPA,该蛋白具有半乳糖苷酶活性^[13]。地木耳培养在干旱胁迫条件下时, *wspA* 会上调表达,使藻细胞免受在脱水过程中所产生的氧化性胁迫的伤害^[14-15]。将地木耳 *wspA* 基因转入拟南芥发现,转基因植株半乳糖苷酶活性高于野生型对照。用 10%PEG-6000 胁迫处理 48 h 后,转基因拟南芥叶片的丙二醛(MDA, Malondialdehyde)含量及相对电导率值显著性低于野生型拟南芥,说明地木耳 WSPA 蛋白具有一定的耐旱能力^[16]。

发状念珠藻能耐受极端恶劣的环境,在干旱失水时保护核酸、蛋白质等物质,在复吸水时迅速恢复生理活性。在干旱和紫外辐射双重胁迫时,其细

胞内的 *wspA* 基因会大量表达,以调节细胞基质中伪枝藻素和 MAAs 的合成,从而抵抗干旱和紫外辐射。目前,发状念珠藻在干旱条件下的生理、生化响应机制研究的比较多,但是,对于发状念珠藻耐旱基因的研究还较少,关于 *wspA* 基因参与发状念珠藻耐旱机制尚不清楚。因此,探究 *wspA* 基因的功能及其耐旱机制,可为作物耐旱基因工程提出依据和候选功能基因。

本研究从发状念珠藻基因组中克隆了一个 WSPA 蛋白家族的基因 *NfwspA3*,并构建其重组表达菌株 pET32a-NfwspA3。以聚乙二醇-6000 模拟干旱胁迫条件,探究其在响应逆境胁迫中的表达及生长情况,推测其与发状念珠藻耐旱可能的相关性。以期为深入研究发状念珠藻耐旱的分子机制和遗传改良育种提供研究基础和挖掘基因元件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

液体悬浮培养发状念珠藻细胞由宁夏大学生命科学学院应用微生物学实验室提供。于 BG11 培养基中, 25 ℃, 60 r/min 连续光照条件下振荡培养, 培养瓶表面光照强度 60 μmol/m²·s, 培养 15 d 后, 8000 r/min 收集细胞,存于 -80 ℃备用。

T4 DNA 连接酶、pGEM[®]-T Easy 试剂盒购自 Permaga 公司;限制性内切酶 *Bam* HI、*Hind* III 购自 scientific 公司;质粒小量提试取剂盒、Taq DNA 聚合酶、Protein Marker III、DNA Marker、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根公司;原核表达质粒 pET-32a、*E.coli* 菌株 BL21 和 DH5a 感受态细胞保藏于本实验室;引物合成及基因测序由上海生工生物有限工程公司完成。

1.2 发状念珠藻基因组 DNA 提取

取 -80 ℃冷冻的发状念珠藻藻细胞 50 mg 液氮研磨至粉末,采用 CTAB 法提取其基因组 DNA。

1.3 *NfwspA3* 基因的分离

参考发状念珠藻水分胁迫蛋白基因序列设计引物,引物序列为: *wsp-F*: 5'CGGGATCCA TGCTGCATA TTTGGAATGTT3', 下划线部分为 *Bam* HI 酶切位点序列, *wsp-R*: 5'CGAAGCTTT TATTCATTAACAATC GTAAAGCCTTC3', 下划线部分为 *Hind* III 酶切位点序列。以发状念珠藻基因组 DNA 为模板进行 PCR。扩增条件为: 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 1 min, 57 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 35 个循环, 72 ℃延伸 5 min。

1.4 生物信息学分析

用 NCBI 的 ORF Finder 程序分析 *Nfwsa3* 基因序列中的开放阅读框 (ORF); 用 ExPASy (<http://www.expasy.ch>), ProtParam (<https://web.expasy.org/protpar>) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件对 *Nfwsa3* 基因编码蛋白的理化性质、二级结构预测及三级结构建模。并利用 PSORT 2 prediction (<https://psort.hgc.jp/form.html>) 在线软件预测 *Nfwsa3* 基因编码蛋白的亚细胞定位, 用 Protfun2.2 (<https://www.cbs.dtu.dk/services/Protfun>) 在线软件对 *Nfwsa3* 基因编码蛋白的功能进行预测。

1.5 pGEM-T-Nfwsa3 克隆载体的构建

用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物, 经 T4 DNA 连接酶将目的片段连接到 pGEM-T-easy 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选后, 提取阳性克隆质粒, 经限制性内切酶 *Bam* HI、*Hind* III 双酶切鉴定正确的重组质粒送测序。

1.6 pET32a-Nfwsa3 表达载体的构建

重组质粒测序正确后, 将 pET32a 载体和 pGEM-T-wsa3 分别用 *Bam* HI、*Hind* III 双酶切, 回收酶切片段, T4 连接酶 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接后转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 提取阳性克隆质粒酶切鉴定。

1.7 IPTG 诱导表达及蛋白质提取检测

取 1 mL 重组菌液, 接入 100 mL 的 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 条件下培养 2 h, 菌液 OD 值为 0.5~0.6 时; 取 1 mL 菌液, 记为 0 h, 向剩余培养基中添加 30 μL 的浓度为 1 mol/L 的 IPTG; 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 培养, 每隔 2 h 取 1 mL 菌液, 取到 8 h 为止, 其余菌液过夜诱导后取 1 mL。将菌液 12000 r/min 离心 1 min, 用 1 mL 0.1 PBS (pH=7.9) 重悬沉淀, 超声波破碎 5 min; 12000 r/min 离心 2 min, 上清液即为可溶性蛋白, 沉淀为包涵体蛋白。取 25 μL 上清液, 加入 25 μL 的 2 \times SDS-loading Buffer 重悬煮沸 5 min; 沉淀用 40 μL 1 \times SDS-loading Buffer 重悬煮沸 5 min; 所有样品 12000 r/min 离心 1 min 后均取 10 μL 进行蛋白质电泳检测。

1.8 pET32a-Nfwsa3 重组表达菌株耐旱能力测定

配制 PEG-6000 浓度分别为 0%、10%、20%、30%、40%、50% 和 60% 的 LB 培养基。利用微生物生长曲线分析仪测定 48 h 后重组菌株的生长情况并以含空质粒的重组菌做对照, 设 3 次重复。其中添加氨苄青霉素抗性试剂和 IPTG 诱导剂, 目的菌液与对照菌液 OD 值均取 0.6, 接种菌液与培养基的比值为 40 : 1。

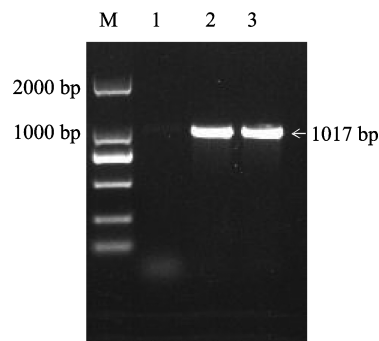
1.9 重组表达菌株 β - 半乳糖苷酶活性检测

将重组 *Nfwsa3* 基因的表达菌株过夜诱导表达, 收集菌体, 超声破碎, 用 PBS 悬浮, 制成粗酶液。分别取各粗酶液 50 μL , 每个样品 3 个重复, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 加入 100 μL 2 mmol/L ONPG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min, 加入 150 μL 1.0 mol/L Na_2CO_3 。取 200 μL 测定 OD₄₀₅, 根据 ONP 标准曲线, 计算酶活力单位。一个酶活力单位定义为 37 $^{\circ}\text{C}$, pH=7.0 的条件下, 每 min 生成的 1 $\mu\text{mol/L}$ ONP 所需要的酶量。相对比活力为每 mg 蛋白的酶活力 (U/mg)。

2 结果与分析

2.1 *Nfwsa3* 基因开放阅读框 (ORF) 克隆

以发状念珠藻基因组 DNA 为模板, wsa-F 和 wsa-R 为引物进行 PCR, 扩增到一条特异条带, 大小约为 1000 bp (图 1)。回收的目的片段连接至 PGEM-T-easy 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取重组质粒进行酶切鉴定。筛选到的阳性克隆质粒送上海生工生物技术有限公司测序。对测序序列分析可知, 该序列 ORF 长 1017 bp, 将其命名为 *Nfwsa3*。



M: 2000 DNA marker, 1: 阴性对照, 2~3: PCR 产物

M: 2000 DNA marker; 1: Negative control; 2-3: PCR products

图 1 发状念珠藻 *Nfwsa3* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 PCR amplicons of *Nfwsa3* gene

2.2 *Nfwsa3* 基因编码蛋白的生物信息学分析

2.2.1 *Nfwsa3* 基因编码蛋白的理化性质及结构预测 核苷酸序列分析表明, *Nfwsa3* 基因完整的 ORF 长 1017 bp, 可编码 338 个氨基酸残基。预测分子量 37.48 kD, 等电点 4.85, 为亲水酸性的可溶性稳定蛋白。SOPMA 在线软件预测该蛋白的二级结构, 发现其构象单元中, α -螺旋有 41 个, 占 12.13%, β -折叠 85 个, 占 25.51%, β -转角 26 个, 占 7.69%, 无规卷曲 186 个, 占 55.03%。SWISS-MODEL 在线工具进行建模, 结果显示这些 α -螺旋、 β -转角

和无规则卷曲通过延伸链连接折叠成不对称的三维空间结构(图2)。PSORT 2 prediction 在线预测软件将 *Nfwsap3* 基因编码的蛋白定位在细胞质中。

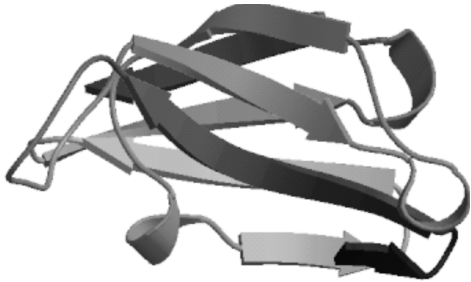
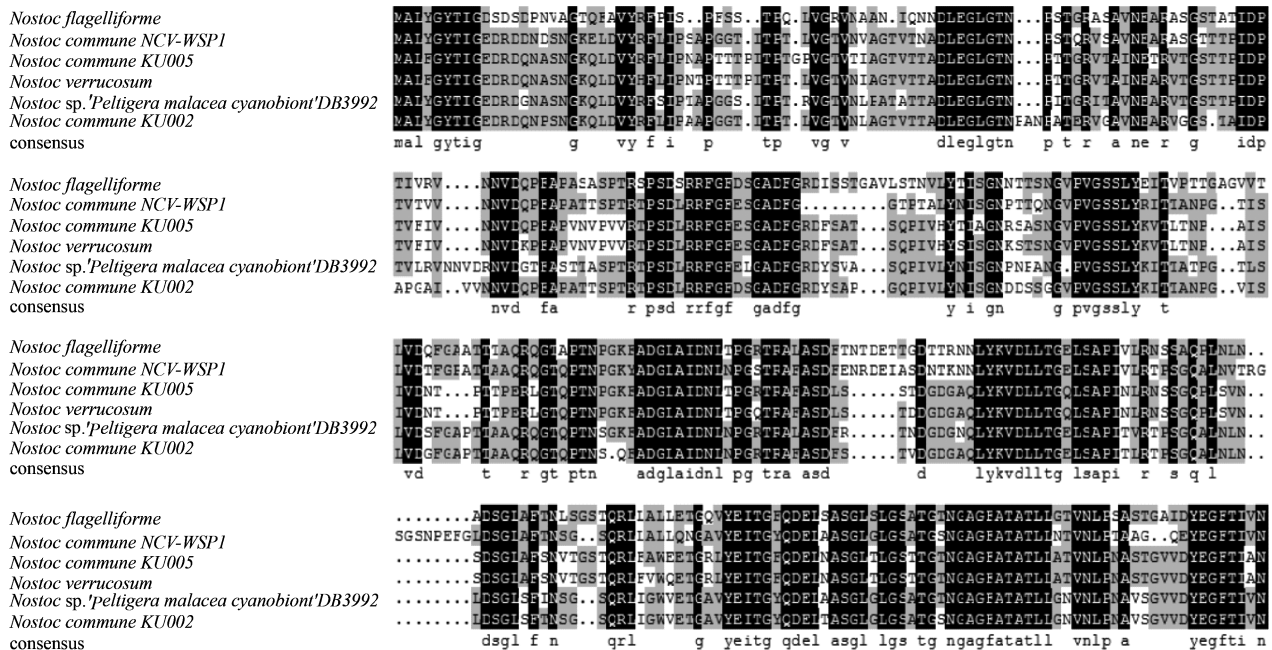


图2 *Nfwsap3* 基因编码蛋白三级结构建模

Fig.2 The predicted tertiary structure of NfWSPA3 protein

2.2.2 *Nfwsap3* 基因编码蛋白的同源多序列比对
通过在线软件对 *Nfwsap3* 基因编码蛋白序列进行同源序列比对,发现该蛋白序列与地木耳 (*Nostoc commune* KU002)、地木耳 (*Nostoc commune* NCV-WSP1)、裂褶念珠藻 (*Nostoc verrucosum* KU005) 和裂褶念珠藻 (*Nostoc verrucosum*) 中水分胁迫蛋白序列相似度分别为 68%、67%、63% 和 63%, 表明 *Nfwsap3* 基因编码蛋白属于念珠藻属的 WSPA 蛋白家族,其结构具有一定的保守性(图3)。系统发育分析发状念珠藻 (*Nostoc flagelliforme*) 的 WSPA3 蛋白与裂褶念珠藻属 (*Nostoc verrucosum*) 的 WSPA 聚为一类(图4),表明其进化上的亲缘关系,与多序列比对结果一致。



Nostoc flagelliforme: 发状念珠藻; *Nostoc commune* NCV-WSP1: 地木耳 NCV-WSP1; *Nostoc verrucosum* KU005: 裂褶念珠藻 KU005;

Nostoc verrucosum: 裂褶念珠藻; *Nostoc sp. Peltigera malacea cyanobiont* DB3992: 白腹地卷念珠藻 DB3992;

Nostoc commune KU002: 地木耳 KU002

图3 发状念珠藻水分胁迫蛋白同源序列比对

Fig.3 Sequence alignment of NfWSPA3 protein with other known WSP proteins

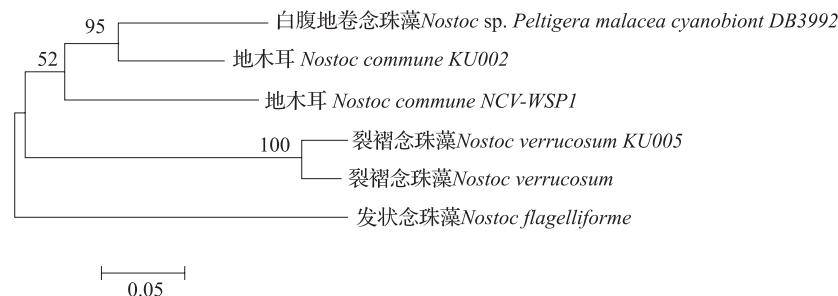
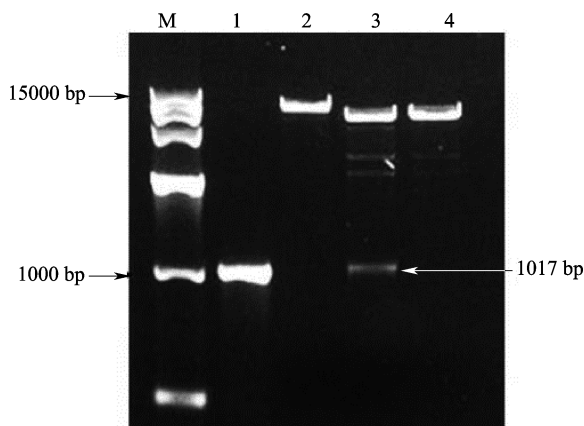


图4 NfWSPA3 蛋白系统进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of NfWSPA3 protein sequence

2.3 融合表达载体 pET32a-NfwsaA3 的鉴定

将鉴定正确阳性克隆 pET32a-NfwsaA3 重组质粒进行双酶切, 得到两条条带, 一条为 pET32a 线性产物, 一条为目的基因 (图 5), 证明原核表达载体构建成功。



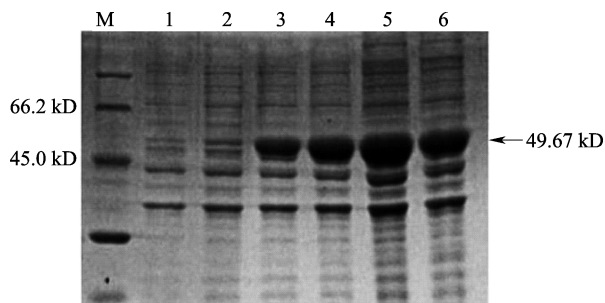
M: 15000 DNA marker; 1: PCR 产物; 2: 空载双酶切;
3~4: 重组质粒双酶切产物

M: 15000 DNA marker, 1: PCR products, 2: Empty carrier double enzyme, 3-4: Double enzyme product

图 5 pET32a-NfwsaA3 双酶切琼脂糖凝胶电泳
Fig.5 Double digestion of pET32a-NfwsaA3

2.4 重组质粒 pET32a-NfwsaA3 的原核诱导表达

将构建好的原核表达载体 pET32a-NfwsaA3 转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 用 IPTG 分别诱导 2 h、4 h、6 h 和 8 h, 经 SDS-PAGE 电泳分析得知, 诱导 2 h、4 h、6 h 和 8 h 都可以检测到目的蛋白 (图 6)。检测到的蛋白相对分子量为 50 kD 左右, 除去 His-Tag 蛋白 15 kD 后, 与 *NfwsaA3* 基因编码蛋白的理论分子量 37.48 kD 相符。而空载和未诱导的转化重组质粒均未检测到目的蛋白条带, 表明在 IPTG



M: 蛋白 Marker; 1: 空载体; 2: 未诱导;
3~6: 分别用 IPTG 诱导 2 h、4 h、6 h 和 8 h
M: Marker, 1: Empty vector, 2: Non-induced,
3-6: Induced by IPTG for 2 h, 4 h, 6 h and 8 h individually

图 6 *NfwsaA3* 基因重组质粒的原核表达
Fig.6 The prokaryotic expression of
recombinant plasmid of *NfwsaA3*

的诱导下, 重组质粒 pET32a-NfwsaA3 在大肠杆菌 BL21 中表达了外源 NfWSPA3 蛋白。蛋白表达量随诱导时间增加而增加, 在诱导 6 h 时, 融合蛋白的表达量达到最大值, 之后表达水平有所下降。

2.5 pET32a-NfwsaA3 重组菌株耐旱性分析

对两组菌株进行 PEG-6000 模拟干旱胁迫处理, 菌株的生长曲线如图 7 所示。在没有 PEG-6000 胁迫的情况下, *NfwsaA3* 重组菌株和对照菌株生长趋势相近, 都是先快速生长之后停滞, 之后缓慢生长, OD 值在 0.1~0.5 之间。加入 PEG-6000 之后, 两组菌株的生长表现出明显的差异。在 PEG-6000 浓度为 10% 时, *NfwsaA3* 重组菌株生长旺盛, 一直呈上升趋势, 在 48 h 时的 OD 值高于未胁迫的, 而对照菌株明显生长缓慢, OD 值变化在 0.1~0.4 之间。随着 PEG-6000 浓度的升高, *NfwsaA3* 重组菌株的生长逐渐缓慢, 生长曲线渐渐平缓, 对照菌株的生长量也逐渐下降。待 PEG-6000 浓度达到 60% 时, 两组菌株的生长曲线都处于平稳状态, 但 *NfwsaA3* 重组菌株生长速率稍高于对照菌株, 表明 *NfwsaA3* 重组表达菌株可以耐 60% 及以下浓度的 PEG-6000 的胁迫。48 h 后两组菌株的生长量如图 8 所示。在 PEG-6000 浓度为 10% 时, *NfwsaA3* 重组菌株生长量达到最大值, 后随 PEG-6000 浓度增加呈下降趋势。而对照菌株在 PEG-6000 浓度为 10%、20% 和 30% 的情况下处于平稳状态, PEG-6000 浓度高于 30% 时, 对照菌株生长量呈下降趋势, 且整个生长过程, 其生长量一直低于 *NfwsaA3* 重组表达菌株。

2.6 酶活性分析

向重组大肠杆菌的粗酶液中加入半乳糖苷酶的底物 ONPG, 产生黄色的 ONP 产物, 测定 OD₄₀₅。结果发现对照菌株酶比活力为 2.87, 重组菌株酶比活力为 11.3。重组菌株中酶比活力显著高于对照菌株 (图 9)。表明 NfWSPA3 蛋白在宿主细胞中具有 β- 半乳糖苷酶活性。

3 讨论

干旱是一个非常重要的非生物胁迫因子, 植物在遭受干旱胁迫时能够通过自身调节方式, 使自身的水分状态、渗透调节物质及保护酶活性等物质积极活跃起来抵抗干旱, 以达到生存的目的^[17]。植物耐干旱能力的形成是多个基因协同表达的结果, 耐旱相关调节基因的上调表达一定程度上提高了植物的耐旱性。因此, 耐旱优良基因的获得及其功能分

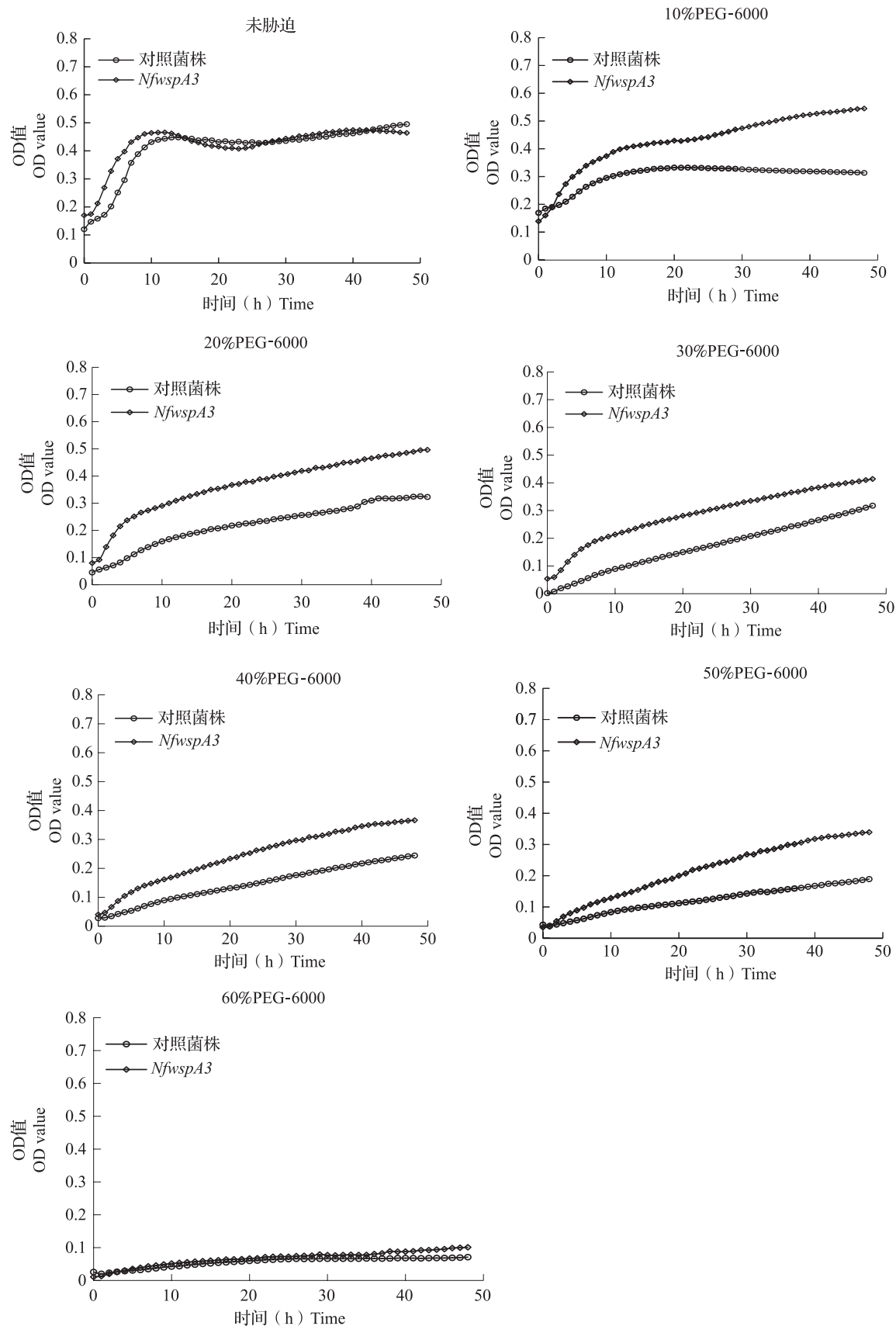
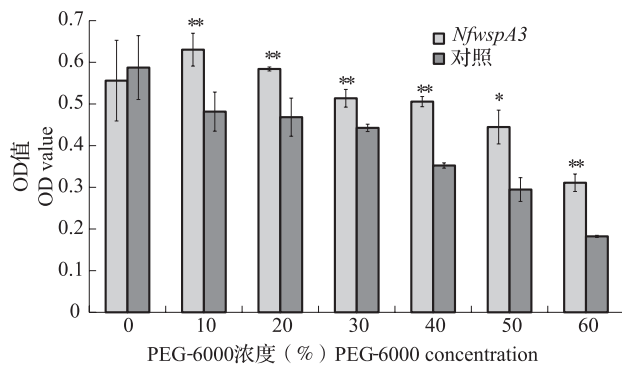


图7 PEG-6000胁迫下重组菌株生长曲线

Fig.7 Growth curve of recombinant strain under PEG-6000 stress



*: 差异显著 ($P < 0.05$); **: 差异极显著 ($P < 0.01$); 下同

*: indicates significant difference ($P < 0.05$), **: indicates significant difference ($P < 0.01$), The same as below

图 8 PEG-6000 胁迫 48 h 后菌株的生长量

Fig.8 Strain growth 48 hours post PEG-6000 treatment

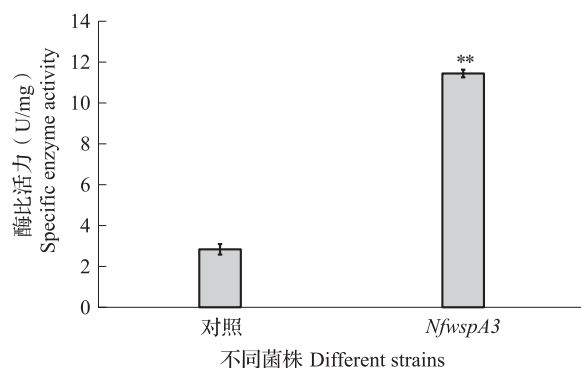


图 9 半乳糖苷酶比活力

Fig.9 Specific activity of galactosidase

析,从分子水平获知植物对于干旱环境胁迫的耐受机理具有重要的意义。抗旱相关基因不断被克隆,现已报道,许多耐旱相关基因的表达产物可提高植物的耐逆性^[18-19]。

发状念珠藻是荒漠化地带的一种重要生态植物,具有较强的耐旱能力。干旱条件会诱导相关基因的表达,产生相关的功能蛋白和调节蛋白,以减轻其所受伤害。发状念珠藻、地木耳和葛仙米是 3 种典型的具鞘类念珠藻,它们的亲缘关系较近^[20]。研究发现地木耳胶质鞘中存在大量的 WSPA,它们的分布与该蛋白的 C 端有大约 14 个氨基酸残基与革兰氏阳性菌的信号肽同源有关。WSPA 蛋白具有 β -半乳糖苷酶的活性。推测地木耳在长期受到生长环境的干旱条件时,诱导表达了 WSPA 蛋白,通过保护细胞膜免受缺水损害,而表现出其较强的耐旱性。

发状念珠藻和葛仙米存在大量的 WSPA 同源蛋白,具有高度保守性^[8]。本研究克隆的发状念珠藻 *Nfwsa3* 基因与地木耳的 *wspa* 基因同源性达 67%。构建的 *Nfwsa3* 基因的重组菌株可稳定

诱导表达出 34 kD 大小的目的蛋白,检测到其在宿主细胞中具有 β -半乳糖酶活性,显著高于对照组。在 PEG-6000 模拟干旱胁迫下,*Nfwsa3* 重组菌株生长状态优于对照,可以耐 60% 及以下浓度的 PEG-6000 胁迫,表现出较强的耐旱特性。初步推测 NfWSPA3 蛋白参与了发状念珠藻响应干旱胁迫过程,这为深入研究发状念珠藻 WSP 蛋白参与逆境响应的分子机制及其遗传改良提供了理论依据和基因元件。

参考文献

- [1] Guo J Y, Shi M K, Ren G Y, Yin Y, Jia S R. Response of *Nostoc flagelliforme* cell to hyperthermia stress. *Advanced Materials Research*, 2012, 518-523: 614-618
- [2] Yu, H F, Liu R. Effect of UV-B radiation on the synthesis of UV-absorbing compounds in a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25 (5): 1441-1446
- [3] 王鑫, 杨秀丽, 薛林贵. 蓝细菌对极端环境适应性研究进展. *中兽医医药杂志*, 2014 (3): 32-37
Wang X, Yang X L, Xue L G. Research progress on the adaptability of cyanobacteria to extreme environment. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2014 (3): 32-37
- [4] Han P P, Shen S G, Jia S R, Wang H Y, Zhong C, Tan Z L, Lv H X. Comparison of bacterial community structures of terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*, in three different regions of China using PCR-DGGE analysis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 31 (7): 1061-1069
- [5] Su J Y, Jia S R, Chen X F, Yu H F. Morphology, cell growth, and polysaccharide production of *Nostoc flagelliforme* in liquid suspension culture at different agitation rates. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20 (3): 213-217
- [6] Jensena S, Petersenb B O, Omarsdottira S, Paulsen B S, Duus J, Olafsdottir E S. Structural characterisation of a complex heteroglycan from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 91 (1): 370-376
- [7] Ye C, Gao K, Giordano M. The odd behaviour of carbonic anhydrase in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* during hydration-dehydration cycles. *Environmental Microbiology*, 2010, 10 (4): 1018-1023
- [8] Ai Y, Yang Y, Qiu B, Gao X. Unique WSPA protein from terrestrial macroscopic cyanobacteria can confer resistance to osmotic stress in transgenic plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30 (9): 2361-2369
- [9] Wu S X, He L, Shen R R, Zhang X, Wang Q X. Molecular cloning of maltotriose trehalose trehalohydrolase gene from *Nostoc flagelliforme* and trehalose-related response to stresses. *Journal Microbiology Biotechnology*, 2011, 21 (8): 830-837
- [10] 岳思君, 周娟, 郑蕊, 范红丽, 苏建宇. 发状念珠藻过氧化物还原酶 *NfPrx* 基因的克隆与表达分析. *植物生理学报*, 2016, 52 (8): 1287-1294
Yue S J, Zhou J, Zheng R, Fan H L, Su J Y. Cloning and expression analysis of *NfPrx* gene of *Candida albicans* reductase. *Acta Physiologica Sinica*, 2016, 52 (8): 1287-1294

- [11] 岳思君,范红丽,郑蕊,周娟,苏建宇.发状态念珠藻干旱胁迫响应基因 *NfGR* 的克隆与鉴定.西北植物学报,2016,36(10): 1955-1961
Yue S J, Fan H L, Zheng R, Zhou J, Su J Y. Cloning and identification of drought stress response gene *NfGR* from candida albicans. Journal of Northwest Botanical Plant, 2016, 36(10): 1955-1961
- [12] Potts M. The changes induced in protein index of *Nostoc commune* UTEX584 (cyanobacteria): immobilized cells by water stress. Archives of Microbiology, 1986, 146: 87-95
- [13] Morsy F M, Satomi K, Yayoi T, Toshio S. Novel thermostable glycosidases extracellular matrix of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. Journal of General and Applied Microbiology, 2008, 54: 243-252
- [14] Wright D J, Smith S C, Joardar V, Scherer S, Jervis J, Warren A, Helm R F, Potts M. UV Irradiation and desiccation modulate the three-dimensional extracellular matrix of *Nostoc commune* (Cyanobacteria). Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(48): 40271-40281
- [15] Shirkey B, Kovarcik D P, Wright D J, Wilmoth G, Prickett T F, Helm R F, Gregory E M, Potts M. Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant sodF mRNA in *Nostoc commune* (cyanobacteria) after years of desiccation. Journal of Bacteriology, 2000, 182: 189-197
- [16] Gao X, Ai Y F, Qiu B S. Drought adaptation of a terrestrial macroscopic cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*, in arid areas: A review. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(28): 5728-5735
- [17] 李龙,彭智,毛新国,王景一,吕小平,柳玉平,景蕊莲.小麦高密度遗传图谱构建及抗旱相关生理性状的遗传解析.植物遗传资源学报,2018,19(3): 531-538
Li L, Peng Z, Mao X G, Wang J Y, Chang X P, Liu Y P, Jing R L. Construction of high-density genetic map of wheat and genetic analysis of physiological traits related to drought resistance. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(3): 531-538
- [18] 施俊凤,孙常青.植物水分胁迫诱导蛋白研究进展.安徽农业科学,2009,37(12): 5355-5357
Shi J F, Sun C Q. Research progress of plant water stress induced proteins. Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(12): 5355-5357
- [19] 孙仁玮,刘永杰,王翔,张荃,张立平,张辉,王永波,高建刚,杨卫兵,赵昌平,高世庆,韩俊.小麦 ARF 基因家族生物信息学分析及在干旱胁迫下的表达特性研究.植物遗传资源学报,2018,19(1): 122-134
Sun R W, Liu Y J, Wang X, Z Q, Zhang L P, Zhang H, Wang Y B, Gao J G, Yang W B, Zhao C P, Gao S Q, Han J. Bioinformatics analysis of wheat ARF gene family and its expression characteristics under drought stress. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(1): 122-134
- [20] 刘晶晶,康升云,曹建国,王全喜.利用 16S rRNA 基因分析 3 种念珠藻的亲缘关系.西北植物学报,2008,28(3): 459-464
Liu J J, Kang S Y, Cao J G, Wang Q X. Analysis of the relationship of three candida algae using 16S rRNA gene. Journal of Northwest Botanical Plant, 2008, 28(3): 459-464